



Universidad Católica de Santa María

Facultad de Odontología
Escuela Profesional de Odontología

**Evaluación de la actividad antibiofilm de la bromelina en estado libre
frente a *Enterococcus faecalis*, Arequipa, 2025**

Tesis presentada por:

Paucar Sanchez, Veronica Lucero

ORCID: 0009-0006-5053-6315

para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista

Asesor:

Dr. Figueroa Banda, Rufo Alberto

ORCID: 0000-0001-7249-0270

Arequipa - Perú

2026

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

ODONTOLOGIA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 19 de Junio del 2026

Dictamen: 015128-C-EPO-2026

Visto el borrador del expediente 015128, presentado por:

2020802352 - PAUCCAR SANCHEZ VERONICA LUCERO

Titulado:

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIOFILM DE LA BROMELINA EN ESTADO LIBRE FRENTE
A ENTEROCOCCUS FAECALIS, AREQUIPA, 2025**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

Título Profesional/Título de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

CIRUJANO DENTISTA

**29714707 - QUIROZ HUERTA CARLOS ALBERTO
DICTAMINADOR**



**04641311 - TEJADA TEJADA RENAN FERNANDO
DICTAMINADOR**



**29649041 - ZEVALLOS CHAVEZ MARCO ANTONIO
DICTAMINADOR**



EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIOFILM DE LA BROMELINA EN ESTADO LIBRE FRENTE A ENTEROCOCCUS FAECALIS, AREQUIPA, 2025

INFORME DE ORIGINALIDAD

11%

INDICE DE SIMILITUD

10%

FUENTES DE INTERNET

3%

PUBLICACIONES

4%

TRABAJOS DEL ESTUD

FUENTES PRIMARIAS

1 repositorio.ucsm.edu.pe
Fuente de Internet

2 Submitted to Universidad Católica de Santa María
Trabajo del estudiante

3 hdl.handle.net
Fuente de Internet

4 digibug.ugr.es
Fuente de Internet

5 sedici.unlp.edu.ar
Fuente de Internet

6 repositorio.unicartagena.edu.co
Fuente de Internet

7 rpu.edu.pe
Fuente de Internet

8 alicia.concytec.gob.pe
Fuente de Internet

9 docplayer.dk
Fuente de Internet

10 Submitted to Universidad Agraria del Ecuador
Trabajo del estudiante

11 repositorio.ucv.edu.pe
Fuente de Internet

12 revistes.ub.edu
Fuente de Internet

13 www.coursehero.com
Fuente de Internet

14 cop.org.pe
Fuente de Internet

DEDICATORIA

A Dios, por acompañar cada etapa de este camino y sostenerme con fortaleza, serenidad y esperanza en los momentos más exigentes de mi formación.

A mis padres, por ser mi apoyo constante, por su amor generoso y por confiar en mí aun cuando el cansancio o la incertidumbre aparecieron. Gracias por enseñarme, con su ejemplo, que la perseverancia y la fe permiten alcanzar aquello que se sueña.

A mi hermanita, quien representa una de mis mayores motivaciones y me impulsa a esforzarme cada día para ser una guía positiva en su vida.

A mi familia y a mis amigos, por estar presentes con su cariño, su confianza y sus palabras oportunas durante este proceso académico y personal.

Dedico este logro a todos ustedes, porque en cada página de este trabajo también se refleja el amor, la paciencia y el respaldo que me brindaron a lo largo de este camino.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi gratitud a Dios y a la Virgen María, por haberme acompañado durante esta etapa y por concederme la claridad, la fortaleza y la calma necesarias para culminar esta meta profesional.

A mi papá Moisés, por su respaldo permanente, por su esfuerzo diario y por ser un ejemplo de constancia. Gracias por creer en mis capacidades y por recordarme que los objetivos se alcanzan con compromiso, sacrificio y determinación.

A mi mamá Cinthya, por su amor incondicional, su paciencia y su entrega. Gracias por ser mi refugio en los días difíciles, por tus palabras de ánimo y por acompañarme con ternura en cada paso. Este logro también lleva tu dedicación.

A mi hermanita Dayira, por ser una inspiración constante y por motivarme a crecer, superarme y procurar ser siempre un buen ejemplo para ti.

A mis abuelos, por su cariño, sus enseñanzas y los valores que han sembrado en mi vida. Su presencia y ejemplo han sido una guía importante en mi desarrollo personal y académico.

A mis tíos, tías y primas, por el afecto, la confianza y el apoyo que me brindaron durante esta etapa.

A mis amigos, por su compañía sincera, por sus palabras de aliento y por compartir conmigo distintos momentos de este recorrido.

Finalmente, agradezco al Dr. Alberto Figueroa, por su orientación, sus aportes y su acompañamiento en mi formación académica y profesional.

RESUMEN

La presente investigación tuvo como finalidad evaluar la actividad antibiofilm de la bromelina en estado libre frente a cepas de *Enterococcus faecalis*, mediante un estudio experimental in vitro. El trabajo se desarrolló bajo un enfoque cuantitativo, de nivel explicativo y con diseño experimental. Para ello, se analizaron diez concentraciones seriadas de bromelina, comprendidas entre 0.12 y 25 µg/mL, frente a una cepa estándar de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Como controles se utilizaron Bacitracina al 1 %, en calidad de control positivo, y agua destilada como control negativo. La medición de la biomasa del biofilm se efectuó mediante el método de microdilución en placa de 96 pocillos, aplicando tinción con azul de bromofenol al 1 % y lectura espectrofotométrica de densidad óptica a 580 nm en un lector de microplacas BIORAD PR-4100. Para el procesamiento estadístico se emplearon las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene con el propósito de verificar supuestos; posteriormente, debido a la ausencia de normalidad en los datos, se aplicaron las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney. Los resultados mostraron que el control positivo con Bacitracina presentó elevada dispersión, con una media de absorbancia de 0.245 ± 0.108 y valores atípicos significativos que llegaron a 0.492 unidades. Por el contrario, la bromelina evidenció un comportamiento farmacodinámico más estable y reproducible. En particular, las microdosis de 1.04 µg/mL y 3.12 µg/mL conservaron la densidad óptica en valores basales ($DO \approx 0.123$), evitando el incremento exponencial de la biomasa sin signos aparentes de citotoxicidad. La curva dosis-respuesta mostró un comportamiento no monotónico, en el cual las concentraciones superiores no produjeron erradicación total, sino una estabilización estructural del biofilm. Se concluye que la bromelina en estado libre, a microconcentraciones, no se comporta como un agente de eliminación inmediata, sino como un modulador biológico con capacidad para estabilizar y contener el crecimiento del biofilm de *E. faecalis*, mostrando mayor predictibilidad que el antibiótico convencional y posible utilidad como coadyuvante en terapias endodónticas.

Palabras clave: Bromelina, *Enterococcus faecalis*, endodoncia.

ABSTRACT

The aim of this research was to evaluate the antibiofilm activity of free-state bromelain against *Enterococcus faecalis* strains through an in vitro experimental study. The investigation followed a quantitative approach, with an explanatory level and an experimental design. Ten serial concentrations of bromelain, ranging from 0.12 to 25 µg/mL, were tested against a standard *Enterococcus faecalis* strain (ATCC 29212). Bacitracin 1 % was used as the positive control, while distilled water was used as the negative control. Biofilm biomass was quantified through the 96-well plate microdilution method, using bromophenol blue 1 % staining and spectrophotometric optical density reading at 580 nm with a BIORAD PR-4100 microplate reader. Statistical processing included Shapiro-Wilk and Levene tests to assess assumptions; subsequently, because the data did not follow a normal distribution, the non-parametric Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U tests were applied. The findings showed that the positive control group treated with Bacitracin had high variability, with a mean absorbance of 0.245 ± 0.108 and significant outliers reaching 0.492 units. In contrast, bromelain displayed a more stable and reproducible pharmacodynamic pattern. Specifically, the microdoses of 1.04 µg/mL and 3.12 µg/mL kept optical density at basal values ($OD \approx 0.123$), preventing exponential biomass increase without apparent cytotoxicity. The dose-response curve showed a non-monotonic behavior, in which the highest concentrations did not produce complete eradication but rather structural stabilization of the biofilm. It is concluded that free-state bromelain, at microconcentrations, does not act as an immediate eradication agent, but as a biological modulator capable of stabilizing and containing *E. faecalis* biofilm growth, with greater predictability than the conventional antibiotic and potential usefulness as an adjuvant in endodontic therapies.

Keywords: Bromelain, *Enterococcus faecalis*, endodontics.

ÍNDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN..... 1

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO TEÓRICO 3

1. Determinación del problema	4
2. Pregunta de investigación	5
3. Justificación.....	5
4. Objetivo.....	6
5. Marco Conceptual y Antecedentes Investigativos	7
5.1. Marco Conceptual.....	7
5.1.1. Anatomía del sistema de conductos radiculares y sus implicancias clínicas. ..	7
5.1.2. Microbiología de las infecciones endodónticas	8
5.1.3. Enterococcus faecalis: características y factores de virulencia	9
5.1.4. El biofilm como estrategia de supervivencia	10
5.1.5. Etapas de la formación del biofilm en endodoncia	11
5.1.6. La matriz extracelular (EPS): la fortaleza bacteriana.....	12
5.1.7. Comunicación bacteriana: quorum sensing.....	13
5.1.8. Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos.....	14
5.1.9. Irrigantes endodónticos convencionales: el hipoclorito de sodio.....	15
5.1.10. La clorhexidina como agente alternativo	16
5.1.11. Fitoterapia y enzimología: un nuevo paradigma en odontología	17
5.1.12. La bromelina: origen y propiedades farmacológicas	18
5.2. Antecedentes Investigativos	19
6. Hipótesis.....	22

CAPÍTULO II: PLANTEAMIENTO OPERACIONAL..... 23

1. Diseño metodológico	24
2. Población y muestra	24
3. Tabla de variables	26
4. Técnicas y procedimientos	27
5. Plan de análisis	30
6. Consideraciones éticas	31
7. Recursos	31

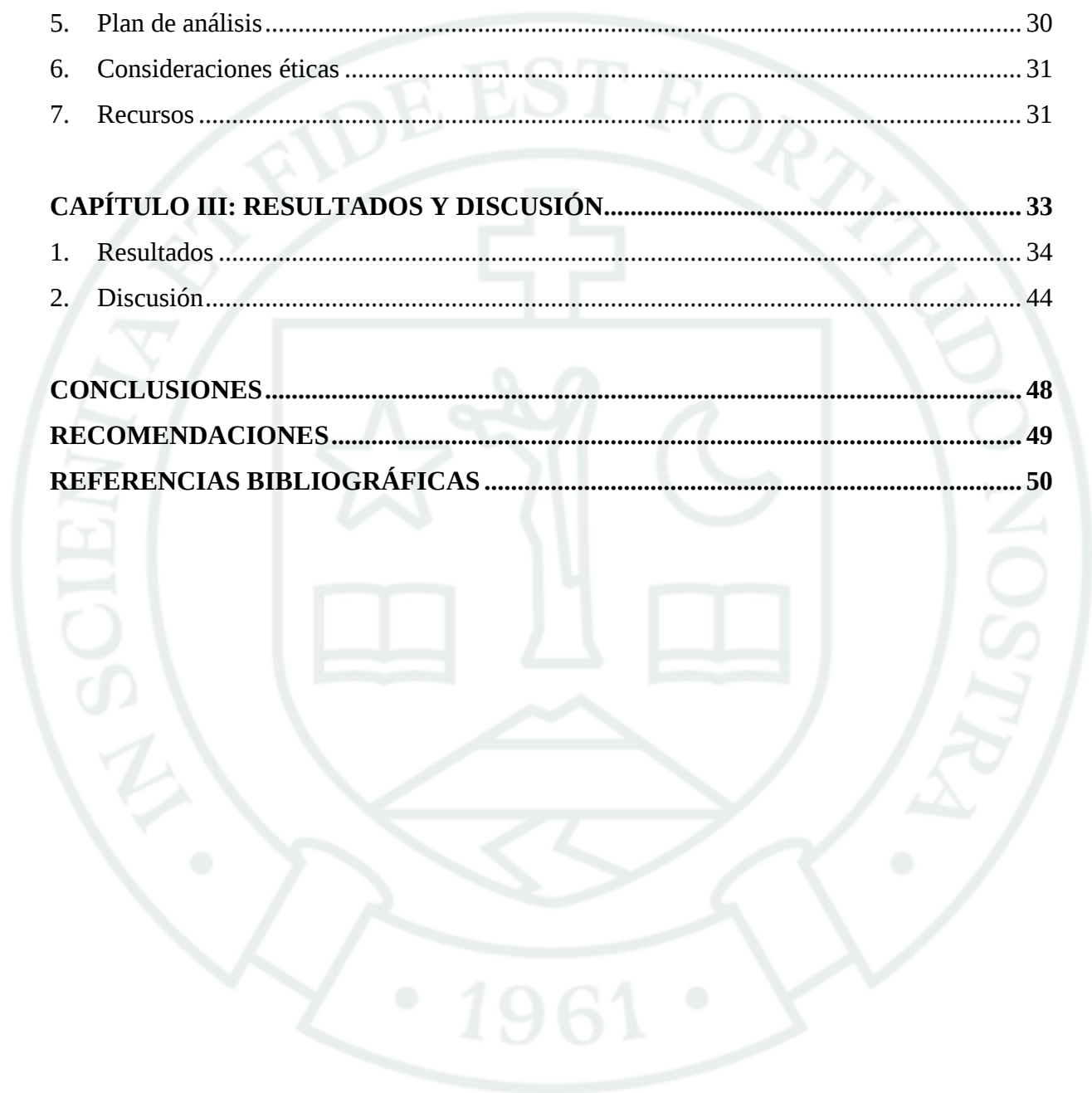
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 33

1. Resultados	34
2. Discusión.....	44

CONCLUSIONES..... 48

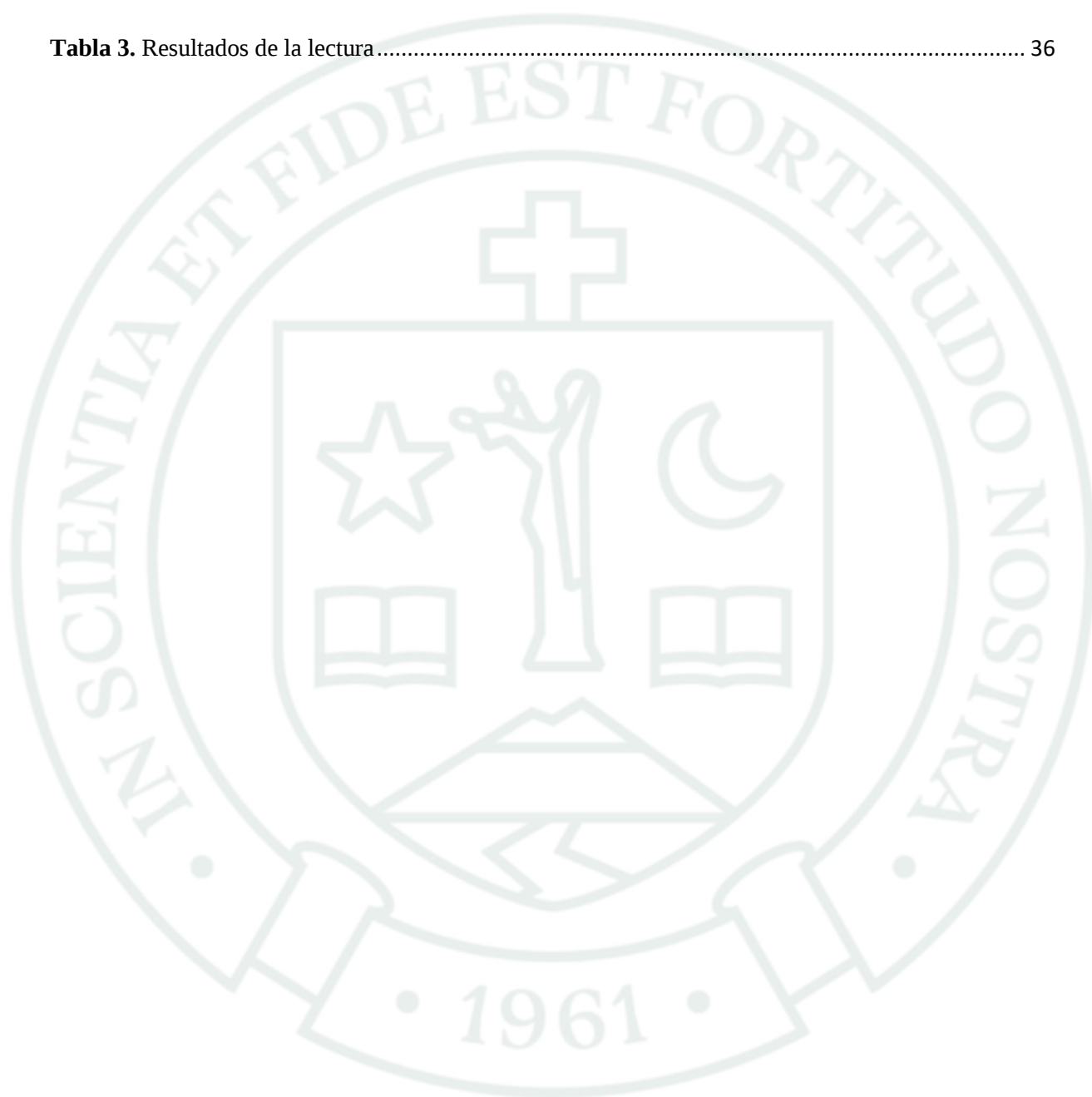
RECOMENDACIONES..... 49

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 50



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Variables e indicadores	26
Tabla 2. Análisis de datos.....	30
Tabla 3. Resultados de la lectura.....	36

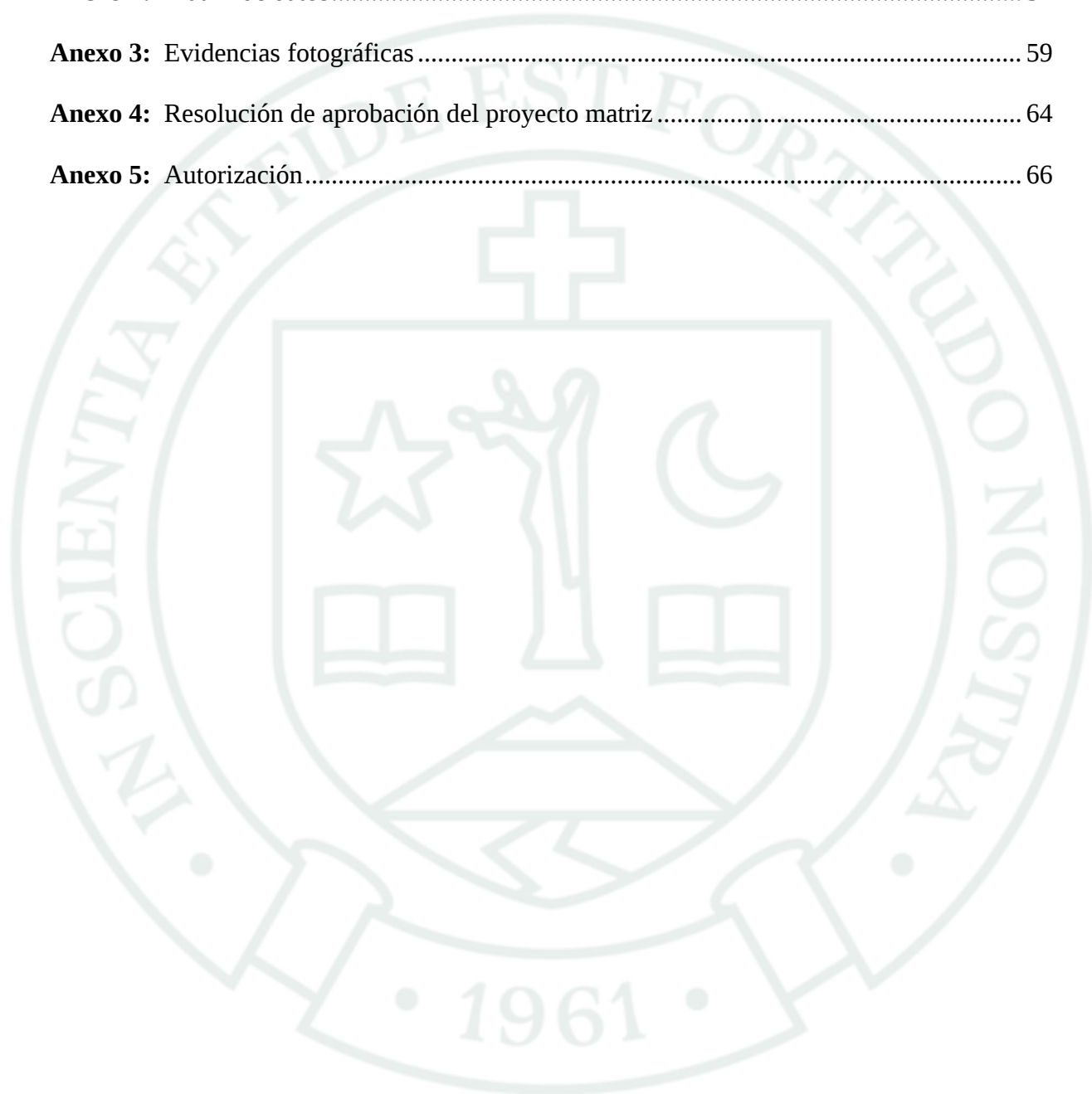


ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Cultivo de la cepa bacteriana de <i>Enterococcus faecalis</i>	34
Figura 2.	Microplaca de 96 pocillos durante el ensayo de biofilm: (1) incubación a 20 horas, (2) tinción con azul de bromofenol, (3) último lavado con PBS.....	35
Figura 3.	Resultado de la microplaca antes de la lectura espectrofotométrica.....	35
Figura 4.	Distribución de la densidad óptica por tratamiento (diagrama de cajas y bigotes).....	37
Figura 5.	Efecto antibacteriano promedio: media de absorbancia $\pm$ error estándar por tratamiento	38
Figura 6.	Perfil de comportamiento de la turbidez bacteriana a través de los grupos experimentales.	39
Figura 7.	Densidad de actividad antibiofilm: distribución de la absorbancia por grupo experimental	41
Figura 8.	Correlación entre concentración de bromelina y densidad bacteriana del biofilm.....	42

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Instrumento de recolección de datos	55
Anexo 2: Matriz de datos.....	57
Anexo 3: Evidencias fotográficas	59
Anexo 4: Resolución de aprobación del proyecto matriz	64
Anexo 5: Autorización.....	66



INTRODUCCIÓN

Las infecciones endodónticas continúan siendo un problema relevante dentro de la práctica odontológica, principalmente por la complejidad del sistema de conductos radiculares y por la capacidad de determinados microorganismos para mantenerse viables aun después de los procedimientos de limpieza, conformación e irrigación. Cuando la carga bacteriana no es eliminada por completo, el pronóstico del tratamiento puede verse comprometido y existe mayor posibilidad de persistencia o recurrencia de lesiones periapicales.

Entre los microorganismos asociados con el fracaso del tratamiento endodóntico, *Enterococcus faecalis* destaca por su capacidad de adaptación y resistencia. Esta bacteria puede tolerar condiciones desfavorables, penetrar en los túbulos dentinarios y organizarse en forma de biofilm. Dichas comunidades microbianas se encuentran rodeadas por una matriz extracelular que les proporciona protección frente a los agentes antimicrobianos, lo que dificulta la reducción total de la carga bacteriana durante la terapia endodóntica (1).

Los irrigantes utilizados con mayor frecuencia, como el hipoclorito de sodio y la clorhexidina, han demostrado eficacia para disminuir microorganismos presentes en los conductos radiculares. No obstante, su acción puede verse limitada en ciertas condiciones, especialmente cuando existen biofilms maduros, zonas anatómicas de difícil acceso o restricciones relacionadas con la biocompatibilidad. Además, algunos de estos agentes pueden presentar efectos indeseables sobre los tejidos, lo que motiva la búsqueda de alternativas que combinen actividad antimicrobiana con un perfil más favorable de seguridad biológica.

Dentro de estas alternativas, la bromelina representa una sustancia de interés por su origen natural y por su actividad proteolítica. Esta enzima, obtenida principalmente de la piña (*Ananas comosus*), ha sido relacionada con propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas y degradadoras de componentes proteicos. Considerando que la matriz del biofilm contiene sustancias poliméricas extracelulares, como proteínas y polisacáridos, la bromelina podría participar en la alteración de dicha estructura y favorecer el control de la organización bacteriana (2).

En ese contexto, la presente investigación busca evaluar la actividad antibiofilm de la bromelina en estado libre frente a cepas de *Enterococcus faecalis*. Con ello se pretende aportar evidencia experimental sobre su posible utilidad como alternativa o coadyuvante en los protocolos de

desinfección endodónica, especialmente en situaciones donde la persistencia bacteriana representa un desafío para el éxito del tratamiento.



CAPÍTULO I:
PLANTEAMIENTO TEÓRICO

1. Determinación del problema

El tratamiento endodóntico busca controlar y eliminar los microorganismos presentes en el sistema de conductos radiculares, así como evitar que se produzca una nueva contaminación después de la terapia. A pesar de ello, en la práctica clínica todavía se presentan casos de fracaso asociados a infecciones persistentes. Esta situación ocurre, en parte, porque ciertos microorganismos pueden mantenerse en áreas de difícil acceso, como túbulos dentinarios, conductos laterales, istmos, ramificaciones apicales y otras irregularidades anatómicas. Por esta razón, la eficacia del tratamiento no depende únicamente de la instrumentación mecánica, sino también de la capacidad antimicrobiana de las sustancias empleadas durante la desinfección.

Dentro de los microorganismos que se relacionan con infecciones endodónticas persistentes, *Enterococcus faecalis* adquiere especial relevancia. Esta bacteria puede sobrevivir en ambientes desfavorables, resistir limitaciones nutricionales y adherirse a las superficies dentinarias del conducto radicular. Además, posee la capacidad de organizarse en biofilm, condición que incrementa su resistencia frente a irrigantes, medicamentos intraconducto y mecanismos defensivos del huésped. Por ello, su presencia constituye un problema importante en dientes con infecciones persistentes o con tratamientos endodónticos previos.

Los biofilms bacterianos se caracterizan por presentar una matriz extracelular que protege a las bacterias y dificulta el ingreso de los agentes antimicrobianos. Esta matriz funciona como una barrera estructural y química, lo que puede reducir la efectividad de sustancias usadas habitualmente en endodoncia, como el hipoclorito de sodio y la clorhexidina. Aunque estos irrigantes cumplen un papel importante en la reducción microbiana, su acción puede ser insuficiente frente a biofilms maduros o localizados en zonas anatómicas complejas. Además, se han descrito limitaciones vinculadas con toxicidad tisular, alteraciones dentinarias y necesidad de opciones con mayor biocompatibilidad.

Ante esta problemática, resulta pertinente estudiar compuestos de origen natural que puedan contribuir al control de la biopelícula bacteriana. La bromelina, enzima proteolítica obtenida principalmente de *Ananas comosus*, ha despertado interés por su capacidad para degradar componentes proteicos. Esta característica permite plantear que podría actuar sobre elementos estructurales de la matriz del biofilm y, con ello, favorecer la

desorganización o contención de la comunidad bacteriana. Sin embargo, aún es necesario evaluar experimentalmente su comportamiento frente a cepas de *Enterococcus faecalis*, especialmente cuando se utiliza en estado libre y bajo concentraciones definidas.

En consecuencia, el problema de investigación se centra en determinar si la bromelina en estado libre presenta actividad antibiofilm frente a cepas de *Enterococcus faecalis*. La evaluación de esta actividad permitirá establecer si dicha enzima puede ser considerada una alternativa o un coadyuvante potencial dentro de los protocolos de desinfección endodóntica. De esta manera, el estudio busca aportar evidencia experimental que contribuya al desarrollo de futuras estrategias orientadas al control de infecciones endodónticas persistentes.

2. Pregunta de investigación

¿Cuál es la actividad antibiofilm de la bromelina en estado libre frente a cepas de *Enterococcus faecalis*?

3. Justificación

La presente investigación posee relevancia científica porque aborda un problema vigente en endodoncia: la permanencia de microorganismos capaces de formar biofilms dentro del sistema de conductos radiculares. Entre estos microorganismos, *Enterococcus faecalis* destaca por su resistencia, su capacidad de adherencia a la dentina y su participación en infecciones asociadas al fracaso del tratamiento endodóntico. Frente a este escenario, resulta necesario estudiar nuevas sustancias que puedan contribuir al control de la biopelícula bacteriana y ampliar las posibilidades terapéuticas disponibles.

En este marco, la bromelina constituye una alternativa de interés debido a su naturaleza enzimática y a su posible acción sobre componentes proteicos de la matriz extracelular del biofilm. Analizar su actividad antibiofilm en estado libre frente a cepas de *Enterococcus faecalis* permitirá generar evidencia experimental sobre una sustancia natural con potencial aplicación en odontología. Asimismo, los hallazgos podrían servir como punto de partida para investigaciones posteriores orientadas al diseño de agentes coadyuvantes en la desinfección endodóntica.

Desde una perspectiva social, el éxito del tratamiento endodóntico tiene importancia porque permite conservar las piezas dentarias naturales y preservar funciones esenciales

como la masticación, la fonación y la estética. Cuando una infección persiste o el tratamiento fracasa, el paciente puede presentar dolor, lesiones periapicales, necesidad de retratamiento, procedimientos quirúrgicos o incluso pérdida dentaria. Estas consecuencias afectan el bienestar general y pueden comprometer la calidad de vida.

Por ello, estudiar sustancias que puedan mejorar el control bacteriano dentro del sistema de conductos radiculares resulta relevante para la práctica odontológica. Si la bromelina demuestra actividad antibiofilm frente a *Enterococcus faecalis*, podría considerarse en el futuro como una opción complementaria dentro de protocolos orientados a reforzar la desinfección y disminuir las limitaciones asociadas a ciertos agentes químicos convencionales.

La investigación también posee relevancia económica, ya que los fracasos endodónticos suelen generar mayores gastos para los pacientes y para los servicios odontológicos. Los retratamientos, cirugías periapicales y alternativas rehabilitadoras demandan más tiempo clínico y recursos adicionales. En ese sentido, fortalecer las estrategias de control microbiano podría contribuir indirectamente a reducir la necesidad de procedimientos posteriores.

Finalmente, la bromelina, por ser una enzima de origen natural, representa una posibilidad interesante para el desarrollo de productos odontológicos accesibles y potencialmente biocompatibles. Si los resultados evidencian una acción favorable sobre el biofilm, el estudio podrá orientar futuras investigaciones destinadas a formular alternativas coadyuvantes de menor toxicidad relativa para la terapia endodóntica.

4. Objetivo

Evaluar la actividad antibiofilm de la bromelina en estado libre frente a cepas de *Enterococcus faecalis*, mediante un estudio experimental in vitro, Arequipa, 2025.

5. Marco Conceptual y Antecedentes Investigativos

5.1. Marco Conceptual

5.1.1. Anatomía del sistema de conductos radiculares y sus implicancias clínicas.

El sistema de conductos radiculares (SCR) no puede entenderse como una estructura simple, recta o uniforme. Por el contrario, constituye una red interna compleja, variable y tridimensional, cuya morfología puede cambiar según la pieza dentaria, la edad del paciente y las condiciones anatómicas particulares. Los estudios morfológicos realizados mediante microtomografía computarizada y técnicas de diafanización han demostrado que el interior radicular presenta múltiples accidentes anatómicos, como conductos laterales, conductos accesorios, conductos secundarios, interconductos, deltas apicales y zonas de reabsorción interna.

Esta complejidad anatómica tiene consecuencias directas en la terapia endodóntica. Aunque la instrumentación manual y rotatoria permite conformar el conducto principal, su acción se concentra principalmente en las paredes accesibles del trayecto radicular. Por ello, una parte importante del sistema permanece fuera del contacto directo de los instrumentos. Incluso con técnicas modernas de preparación biomecánica, se ha señalado que más del 35% de las paredes del conducto radicular pueden quedar sin instrumentarse al finalizar el procedimiento.

Las zonas no alcanzadas por la instrumentación, como istmos, ramificaciones, irregularidades y áreas apicales estrechas, pueden convertirse en espacios de retención para restos de tejido pulpar necrótico, detritos orgánicos y colonias bacterianas. En estos lugares, los microorganismos pueden permanecer protegidos de la acción mecánica directa. Por esta razón, la desinfección efectiva del SCR depende en gran medida de la acción química de los irrigantes, de su capacidad de penetración, de su flujo dentro del sistema y de su contacto con las áreas anatómicas complejas. Sin embargo, dicha acción puede verse limitada por factores como la tensión

superficial del irrigante, la estrechez del tercio apical y la geometría irregular del conducto (7,8).

5.1.2. Microbiología de las infecciones endodónticas

En condiciones normales, la cavidad pulpar se mantiene libre de microorganismos. No obstante, cuando se produce una ruptura de las barreras protectoras del diente, ya sea por caries profunda, traumatismos, filtración restauradora o procedimientos odontológicos, los microorganismos pueden ingresar al espacio pulpar y establecer un proceso infeccioso. La microbiota presente en el conducto radicular no es estática, sino que varía según el tiempo de evolución, la disponibilidad de nutrientes, el estado del tejido pulpar y la existencia o no de tratamiento endodóntico previo.

En las infecciones primarias, propias de dientes que no han recibido tratamiento endodóntico, suele predominar una microbiota mixta, polimicrobiana y principalmente anaerobia. En este escenario, géneros como *Prevotella*, *Porphyromonas* y *Fusobacterium* pueden encontrar condiciones favorables para su desarrollo, debido a la presencia de tejido necrótico, fluidos tisulares y nutrientes disponibles dentro del conducto. Este tipo de infección se caracteriza por una mayor diversidad bacteriana y por la participación simultánea de diferentes especies microbianas (9).

La situación cambia en dientes con fracaso endodóntico o con infección secundaria o persistente. En estos casos, el ambiente intrarradicular suele ser más desfavorable para muchas bacterias, debido a la escasez de nutrientes, la presencia de materiales de obturación, restos de medicamentos intraconducto y residuos de sustancias antimicrobianas utilizadas previamente. Estas condiciones generan una presión selectiva que reduce la diversidad microbiana y favorece la permanencia de microorganismos con mayor capacidad de adaptación. Como consecuencia, las infecciones persistentes suelen presentar una microbiota menos diversa, con predominio de especies capaces de resistir condiciones ambientales extremas. En este contexto adquieren importancia los cocos Gram positivos anaerobios facultativos, entre los cuales *Enterococcus faecalis* se reconoce como una especie de alta

relevancia clínica. Su capacidad para sobrevivir en el sistema de conductos radiculares y participar en infecciones resistentes al tratamiento convencional explica su frecuente asociación con casos de fracaso endodóntico (10).

5.1.3. *Enterococcus faecalis*: características y factores de virulencia

Enterococcus faecalis es una bacteria que forma parte de la microbiota comensal del tracto gastrointestinal humano. Sin embargo, cuando se encuentra en el ambiente endodóntico puede comportarse como un patógeno oportunista con importante capacidad de persistencia. Su presencia ha sido reportada con frecuencia en casos de periodontitis apical persistente y en retratamientos endodónticos, lo que evidencia su relevancia en infecciones que no responden adecuadamente a la terapia convencional.

La capacidad de *E. faecalis* para mantenerse en el conducto radicular se relaciona con diversos factores de virulencia y mecanismos de adaptación. Uno de los más importantes es su habilidad para resistir condiciones alcalinas. Esta bacteria posee mecanismos de regulación del pH intracelular, entre ellos la bomba de protones, que le permite expulsar iones H^+ hacia el exterior y conservar condiciones internas compatibles con su supervivencia. Gracias a este mecanismo, puede tolerar ambientes fuertemente alcalinos, como los generados por el hidróxido de calcio, medicación intraconducto que puede alcanzar valores de pH de 11.5 o superiores, generalmente letales para muchas bacterias endodónticas.

Otro rasgo relevante es su capacidad para entrar en un estado viable pero no cultivable (VBNC). Cuando las condiciones nutricionales son desfavorables, *E. faecalis* puede reducir su actividad metabólica, detener su división y conservar su integridad celular durante periodos prolongados. Este estado le permite permanecer latente dentro del sistema de conductos radiculares y recuperar su actividad cuando reaparecen fuentes de nutrientes, como ocurre ante filtración coronal o presencia de fluidos periapicales.

Además, *E. faecalis* cuenta con proteínas de superficie que favorecen su adhesión a la dentina radicular. Entre ellas se encuentra Ace, una adhesina con afinidad por el colágeno, especialmente por el colágeno tipo I presente

en la dentina. Esta unión facilita el contacto inicial con la superficie dentinaria y contribuye a la colonización estable del conducto. La adhesión bacteriana constituye una etapa fundamental para la formación posterior de biofilm y para la persistencia del microorganismo dentro del ambiente endodóntico (11).

5.1.4. El biofilm como estrategia de supervivencia

Durante mucho tiempo, el estudio microbiológico se concentró en bacterias en estado planctónico, es decir, células libres suspendidas en medios líquidos. Sin embargo, actualmente se reconoce que, en los ambientes naturales y en muchos procesos infecciosos, las bacterias suelen organizarse en comunidades adheridas a superficies. Estas comunidades reciben el nombre de biofilms y representan una forma de crecimiento más resistente, organizada y adaptada a condiciones adversas.

Un biofilm no corresponde a una acumulación desordenada de bacterias. Se trata de una comunidad microbiana sésil, estructurada y unida de manera estable a una superficie biótica o abiótica. Sus células se encuentran rodeadas por una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) producida por los propios microorganismos. Esta matriz cumple funciones de soporte, protección y comunicación, permitiendo que las bacterias resistan la acción de fuerzas mecánicas, la respuesta inmune y distintos tipos de estrés ambiental (12).

El paso de una bacteria planctónica a una bacteria organizada en biofilm implica cambios importantes en su comportamiento biológico. Esta transición no solo modifica su forma de adherirse a una superficie, sino también su expresión genética, su metabolismo, su capacidad de comunicación y su tolerancia a los antimicrobianos. En el caso de *Enterococcus faecalis*, la formación de biofilm favorece la activación de genes vinculados con adhesinas, producción de matriz extracelular y mecanismos de protección comunitaria. Por esta razón, el biofilm representa una estrategia de supervivencia especialmente relevante en endodoncia, ya que aumenta su

capacidad de persistir dentro del sistema de conductos radiculares y reduce la efectividad de los agentes antimicrobianos convencionales (13).

5.1.5. Etapas de la formación del biofilm en endodoncia

La colonización del sistema de conductos radiculares por *Enterococcus faecalis* no ocurre de manera inmediata ni desordenada, sino a través de un proceso progresivo que permite a la bacteria adherirse, organizarse, protegerse y, finalmente, diseminarse hacia nuevas zonas. En el contexto endodóntico, este proceso puede comprenderse mediante cuatro fases principales:

1. **Adhesión reversible:** esta fase inicial se produce cuando las bacterias planctónicas entran en contacto con la superficie dentinaria. Antes de la unión estable, puede formarse sobre la dentina una película adquirida constituida por glicoproteínas provenientes de fluidos tisulares o saliva. Las bacterias se aproximan a esta superficie por interacciones físicas débiles, como fuerzas de Van der Waals y fuerzas electrostáticas. En este momento, la unión todavía no es definitiva, por lo que las células bacterianas pueden desprenderse con relativa facilidad mediante el flujo de fluidos o por acción de una irrigación simple.
2. **Adhesión irreversible:** si las bacterias no son eliminadas durante la etapa inicial, comienzan a fijarse de manera más estable a la dentina mediante estructuras específicas de superficie. *Enterococcus faecalis* utiliza moléculas de adhesión, entre ellas la proteína de unión al colágeno (Ace) y el antígeno de superficie enterocócica (Esp). Estas estructuras favorecen la unión con el colágeno tipo I presente en la dentina radicular, haciendo que la adhesión sea más firme y menos susceptible al arrastre mecánico o al lavado convencional (13).
3. **Maduración y desarrollo de la arquitectura:** después de la fijación estable, las bacterias se multiplican y empiezan a producir activamente sustancias poliméricas extracelulares. La biopelícula aumenta su espesor y adquiere una organización tridimensional más compleja. En esta etapa se forman canales de agua que separan zonas de la estructura y facilitan el transporte

de nutrientes y oxígeno hacia capas internas, además de permitir la eliminación de productos metabólicos. Esta arquitectura favorece la supervivencia del biofilm y su capacidad de resistir condiciones adversas (13).

4. **Dispersión:** en la fase final, cuando el biofilm alcanza un grado avanzado de maduración o cuando la disponibilidad de nutrientes disminuye, algunas bacterias ubicadas en la superficie pueden recuperar movilidad. Para ello, se liberan enzimas capaces de degradar parcialmente la matriz extracelular, lo que permite el desprendimiento de células planctónicas. Estas células pueden desplazarse hacia otras zonas del conducto radicular o alcanzar tejidos periapicales, contribuyendo a la continuidad de la infección y a su comportamiento crónico (13).

5.1.6. La matriz extracelular (EPS): la fortaleza bacteriana

La matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) constituye el componente predominante del biofilm. Se estima que representa cerca del 85% de su volumen total, mientras que las células bacterianas conforman aproximadamente el 15% restante. Esta matriz posee una composición química compleja, integrada por polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, como el ADN extracelular, y lípidos, elementos que en conjunto otorgan estabilidad estructural y protección a la comunidad bacteriana (14).

En el ambiente endodóntico, la EPS cumple una función esencial de defensa. Su presencia dificulta el ingreso de los agentes antimicrobianos hacia las capas profundas del biofilm, actuando como una barrera física y química. De esta manera, un irrigante con elevada capacidad antimicrobiana, como el hipoclorito de sodio, puede perder parte de su eficacia al interactuar primero con las capas externas de la matriz, antes de alcanzar a las bacterias situadas en zonas internas o basales de la biopelícula.

Además de su función de barrera, la matriz extracelular contribuye a mantener condiciones favorables para la supervivencia bacteriana. Retiene agua, protege frente a la desecación y puede capturar nutrientes del medio externo, funcionando como una reserva útil en periodos de escasez. Esta

capacidad de sostén convierte a la EPS en un componente decisivo para la persistencia del biofilm dentro del sistema de conductos radiculares.

La bromelina adquiere interés dentro de este contexto debido a su actividad proteolítica. Al tener capacidad para degradar proteínas, podría actuar sobre el componente proteico de la matriz extracelular y debilitar parte de su organización. Esta posible acción permitiría plantear que la enzima no solo afectaría a las bacterias de manera directa, sino también a la estructura que las protege, favoreciendo la desorganización del biofilm y aumentando la susceptibilidad de la comunidad bacteriana (14).

5.1.7. Comunicación bacteriana: quorum sensing

La supervivencia del biofilm de *Enterococcus faecalis* no depende únicamente de la adhesión y de la matriz extracelular. También se relaciona con la capacidad de las bacterias para coordinar su comportamiento mediante sistemas de comunicación química. Uno de los mecanismos más importantes es el quorum sensing o detección de quórum, mediante el cual las bacterias liberan y reconocen moléculas señalizadoras denominadas autoinductores.

Este sistema permite que la comunidad bacteriana detecte su propia densidad poblacional. A medida que aumenta el número de células, también se incrementa la concentración de moléculas señalizadoras en el entorno. Cuando dichas moléculas alcanzan un umbral determinado, se activa una respuesta genética colectiva que modifica el comportamiento del biofilm. De esta forma, las bacterias dejan de actuar como células aisladas y pasan a comportarse como una comunidad organizada.

En *Enterococcus faecalis*, el quorum sensing se vincula con la regulación de factores de virulencia relevantes. Entre ellos destaca la gelatinasa (GelE), una enzima relacionada tanto con el daño tisular como con la formación y maduración del biofilm. La expresión coordinada de estos factores favorece la estabilidad de la biopelícula y aumenta su capacidad de persistencia dentro del sistema de conductos radiculares.

Por esta razón, interferir con la comunicación bacteriana constituye una estrategia de interés frente a infecciones asociadas a biofilm. Si una comunidad bacteriana pierde la capacidad de coordinar su comportamiento colectivo, su organización defensiva puede debilitarse. En consecuencia, el biofilm podría volverse menos resistente y más susceptible a la acción de agentes antimicrobianos o sustancias coadyuvantes (15).

5.1.8. Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos

La resistencia de los biofilms frente a antibióticos e irrigantes endodónticos responde a varios mecanismos simultáneos. No se explica únicamente por mutaciones genéticas, sino también por condiciones estructurales, fisiológicas y fenotípicas propias de la vida en comunidad. Entre los mecanismos más importantes se encuentran los siguientes:

- Barrera de difusión: la matriz EPS limita el avance de los agentes antimicrobianos hacia el interior del biofilm. Esta barrera puede retardar la llegada del irrigante a las capas profundas y reducir su concentración efectiva antes de que entre en contacto con todas las bacterias protegidas por la biopelícula.
- Gradientes fisiológicos: dentro del biofilm no todas las bacterias se encuentran en las mismas condiciones. Existen microambientes con variaciones de pH, disponibilidad de oxígeno y acceso a nutrientes. Las bacterias localizadas en zonas profundas suelen presentar un metabolismo más lento, lo que disminuye su susceptibilidad frente a antimicrobianos que actúan sobre procesos celulares activos, como la síntesis de pared celular.
- Células persistentes: una pequeña subpoblación bacteriana puede ingresar en un estado de latencia profunda. Estas células no necesariamente son resistentes por mutación genética, sino fenotípicamente tolerantes a concentraciones elevadas de antimicrobianos, debido a que sus blancos moleculares permanecen inactivos. Una vez que el tratamiento termina y las condiciones vuelven a ser favorables, estas bacterias pueden reactivarse, multiplicarse y

repoblar el conducto radicular, favoreciendo la recurrencia de la lesión apical (15).

Estos mecanismos explican por qué los biofilms endodónticos son difíciles de eliminar mediante protocolos convencionales. En el caso de *Enterococcus faecalis*, la combinación de adhesión dentinaria, matriz protectora, comunicación bacteriana y células persistentes refuerza su capacidad de supervivencia. Por ello, el estudio de sustancias con acción antibiofilm, como la bromelina, resulta pertinente para explorar estrategias complementarias orientadas a debilitar la estructura del biofilm y mejorar el control microbiano en endodoncia.

5.1.9. Irrigantes endodónticos convencionales: el hipoclorito de sodio

El hipoclorito de sodio ha sido utilizado durante décadas como uno de los irrigantes principales en endodoncia. Su importancia se debe a que combina una acción antimicrobiana potente con la capacidad de disolver tejido orgánico, tanto vital como necrótico. Esta doble propiedad explica por qué se le considera un agente de referencia dentro de los protocolos de desinfección del sistema de conductos radiculares.

Su acción química se produce mediante diferentes reacciones, entre ellas la saponificación, la neutralización de aminoácidos y la cloraminación. Al entrar en contacto con lípidos, contribuye a la degradación de componentes grasos; mientras que, al interactuar con proteínas, favorece la ruptura de enlaces peptídicos. Estos procesos permiten la destrucción de estructuras bacterianas y la digestión de remanentes orgánicos presentes dentro del conducto radicular.

No obstante, su eficacia antimicrobiana se acompaña de limitaciones biológicas importantes. La principal corresponde a su baja biocompatibilidad cuando entra en contacto accidental con los tejidos periapicales. La extrusión del hipoclorito fuera del ápice puede generar un cuadro inflamatorio severo, necrosis tisular, dolor intenso y parestesia, situación conocida como accidente por hipoclorito.

Asimismo, se ha descrito que el uso de concentraciones elevadas puede modificar propiedades mecánicas de la dentina. Entre estas alteraciones se encuentra la reducción del módulo de elasticidad, lo que podría aumentar la fragilidad dentinaria y favorecer fracturas radiculares a largo plazo. Además, aunque el hipoclorito resulta eficaz frente a bacterias en suspensión, su acción contra *Enterococcus faecalis* organizado en biofilms maduros puede ser variable, debido a que la matriz polimérica del biofilm puede neutralizar el cloro libre antes de que alcance a las bacterias ubicadas en capas profundas (16).

5.1.10. La clorhexidina como agente alternativo

El gluconato de clorhexidina constituye otro agente antimicrobiano ampliamente empleado en endodoncia. Una de sus características más valoradas es la sustantividad, es decir, su capacidad para unirse a la dentina y liberarse de manera gradual, prolongando así su efecto antimicrobiano después de la aplicación. Esta propiedad ha favorecido su uso como alternativa o complemento en distintos protocolos clínicos.

El mecanismo de acción de la clorhexidina se relaciona con la alteración de la membrana citoplasmática bacteriana. Al modificar su permeabilidad, provoca pérdida de equilibrio celular, precipitación del contenido intracelular y muerte bacteriana. En comparación con el hipoclorito de sodio, suele considerarse un agente con mejor tolerancia tisular y menor potencial irritante sobre los tejidos periapicales.

Sin embargo, la clorhexidina presenta una limitación relevante: no posee capacidad para disolver tejido orgánico. Esto significa que, aunque puede ejercer acción antibacteriana, no elimina restos de pulpa necrótica ni degrada completamente la matriz del biofilm. En consecuencia, pueden permanecer residuos orgánicos dentro del conducto, los cuales podrían actuar como sustrato para una futura recolonización bacteriana.

Otro aspecto que limita su uso combinado es su interacción química con el hipoclorito de sodio. Cuando ambos irrigantes entran en contacto, se produce un precipitado pardo-anaranjado denominado paracloroanilina. Esta

sustancia puede obstruir túbulos dentinarios y se ha asociado con potencial toxicidad. Por ello, la combinación directa de hipoclorito de sodio y clorhexidina dentro de un mismo protocolo endodóntico debe manejarse con precaución (13).

5.1.11. Fitoterapia y enzimología: un nuevo paradigma en odontología

Las limitaciones de los irrigantes sintéticos han impulsado el estudio de alternativas derivadas de fuentes naturales. En este contexto, la fitoterapia adquiere relevancia como línea de investigación orientada al uso de compuestos vegetales con finalidad terapéutica. El interés por estos productos se relaciona con la posibilidad de encontrar agentes bioactivos que ofrezcan acción antimicrobiana y, al mismo tiempo, un perfil de biocompatibilidad más favorable.

En endodoncia, la búsqueda de nuevas sustancias se dirige especialmente hacia compuestos capaces de colaborar en el control bacteriano sin producir daño significativo en los tejidos del huésped. Esta necesidad se vuelve más evidente cuando se trata de infecciones asociadas a biofilm, debido a que las comunidades bacterianas organizadas presentan mayor resistencia frente a irrigantes y medicamentos convencionales.

Dentro de esta perspectiva, las enzimas proteolíticas exógenas representan una alternativa de interés. Su importancia se basa en que la matriz del biofilm y algunas adhesinas bacterianas contienen componentes proteicos que participan en la estabilidad estructural de la biopelícula. Por ello, una enzima capaz de hidrolizar enlaces peptídicos podría debilitar la arquitectura del biofilm, facilitar su remoción física o aumentar la susceptibilidad de las bacterias frente a otros agentes antimicrobianos.

La enzimología aplicada a la odontología propone, por tanto, un enfoque distinto al de la eliminación puramente química. En lugar de actuar solo sobre la célula bacteriana, busca intervenir también sobre los elementos que sostienen y protegen a la comunidad microbiana. Desde esta lógica, la bromelina resulta una molécula de interés para ser evaluada como posible coadyuvante en la desinfección endodóntica (16).

5.1.12. La bromelina: origen y propiedades farmacológicas

La bromelina es un complejo de enzimas proteolíticas con grupos sulfhidrilo, obtenido principalmente del tallo y, en menor proporción, del fruto de la piña, *Ananas comosus*, especie perteneciente a la familia Bromeliaceae. Desde el punto de vista químico, no constituye una única molécula, sino una mezcla de componentes enzimáticos y no enzimáticos, entre los que se incluyen tiol-endopeptidasas, fosfatasas, glucosidasas, peroxidasas, celulasas e inhibidores de proteasas.

La composición heterogénea de la bromelina explica la amplitud de sus actividades biológicas descritas en la literatura médica. Entre sus propiedades más relevantes se encuentran la acción antiinflamatoria, antiedematosa, antitrombótica y fibrinolítica. Estas características han favorecido su estudio en diferentes áreas biomédicas, especialmente en situaciones donde se requiere modulación inflamatoria o degradación selectiva de componentes proteicos.

En el ámbito clínico médico, la bromelina ha sido utilizada como agente de desbridamiento para remover tejido necrótico en lesiones donde resulta necesaria la degradación selectiva de proteínas. Esta propiedad de desbridamiento enzimático permite plantear su posible aplicación en endodoncia, ya que el sistema de conductos radiculares puede contener restos orgánicos, proteínas bacterianas y componentes de matriz extracelular asociados a biofilm.

Al trasladar este mecanismo al ambiente microscópico del conducto radicular, se considera que la bromelina podría hidrolizar enlaces peptídicos presentes en glicoproteínas y proteínas estructurales de la matriz extracelular del biofilm de *Enterococcus faecalis*. Esta acción podría debilitar la organización que mantiene cohesionada a la comunidad bacteriana y, al mismo tiempo, interferir con proteínas de superficie relacionadas con la adhesión a la dentina.

De esta manera, la bromelina no solo tendría potencial para actuar sobre la estructura ya formada del biofilm, sino también sobre procesos asociados a la

recolonización bacteriana. Por ello, su evaluación experimental frente a *Enterococcus faecalis* resulta pertinente, especialmente cuando se busca explorar alternativas naturales o coadyuvantes que puedan contribuir al control de infecciones endodónticas persistentes (16).

5.2. Antecedentes Investigativos

En una investigación clínica desarrollada en 30 pacientes con dientes unirradiculares y periodontitis apical asintomática, se evaluó la eficacia antimicrobiana de la pasta de bromelina en comparación con la pasta triantibiótica como medicación intraconducto frente a *Enterococcus faecalis*. Las muestras microbiológicas fueron recolectadas en tres momentos: antes de la instrumentación, después de la preparación biomecánica y luego de siete días de medicación. Ambos tratamientos lograron disminuir de manera significativa la carga bacteriana; no obstante, al finalizar el periodo de medicación, el grupo tratado con bromelina presentó un menor recuento de unidades formadoras de colonias, con una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,012$). A partir de estos resultados, se sostuvo que la bromelina puede ejercer una actividad antibacteriana comparable e incluso superior a la pasta triantibiótica, por lo que representa una alternativa biocompatible para la desinfección endodóntica (17).

Otro estudio experimental analizó la eficacia antimicrobiana de la bromelina, el extracto de romero, el hidróxido de calcio y la pasta triantibiótica frente a *Enterococcus faecalis* mediante la técnica de difusión en agar. Los resultados mostraron diferencias significativas entre los agentes evaluados. La bromelina produjo la mayor zona de inhibición bacteriana, seguida por el extracto de romero, la pasta triantibiótica y el hidróxido de calcio. Estos hallazgos permitieron concluir que la bromelina presenta una actividad antimicrobiana superior a la de algunos medicamentos intraconducto convencionales, respaldando su potencial como recurso fitoterapéutico para la desinfección del sistema de conductos radiculares (18).

En una investigación experimental se aisló y purificó bromelina obtenida del tallo de *Ananas comosus*, con la finalidad de evaluar su efecto frente a *Enterococcus faecalis*. Después del proceso de purificación, la enzima mostró un incremento significativo de su actividad específica y evidenció capacidad para inhibir el crecimiento

bacteriano incluso en concentraciones bajas, siendo efectiva desde el 12,5 %. Los resultados indicaron que la bromelina posee actividad enzimática elevada y propiedades antibacterianas que respaldan su posible uso como agente alternativo dentro de la terapia endodóntica (19).

Un estudio in vitro evaluó la concentración mínima inhibitoria de la bromelina frente a distintos microorganismos patógenos orales, entre ellos *Enterococcus faecalis*. Los resultados evidenciaron que la bromelina logró inhibir el crecimiento de todas las bacterias analizadas; sin embargo, *E. faecalis* requirió concentraciones más altas, condición atribuida a su reconocida capacidad de resistencia. A partir de estos hallazgos, se concluyó que la bromelina presenta actividad antibacteriana frente a este microorganismo y que, por su origen natural, puede ser considerada una alternativa promisorio para futuras aplicaciones clínicas en endodoncia (20).

Una investigación experimental comparó la eficacia antimicrobiana de la bromelina, el hidróxido de calcio y la pasta triantibiótica en dientes infectados con biofilm maduro de *Enterococcus faecalis*. La evaluación de la carga bacteriana mostró que la bromelina fue significativamente más efectiva que el hidróxido de calcio. Asimismo, su eficacia fue similar a la observada con la pasta triantibiótica, sin diferencias estadísticas entre ambos tratamientos. Los autores concluyeron que la bromelina constituye una alternativa biológica con capacidad adecuada para actuar sobre biofilms presentes en el sistema de conductos radiculares (21).

En otro estudio experimental se evaluó la actividad antibacteriana del extracto de hojas de piña, rico en bromelina, frente a *Enterococcus faecalis*. Se observó una respuesta dependiente de la concentración, alcanzándose la mayor eficacia con una concentración del 12,5 %, la cual actuó como concentración mínima inhibitoria y bactericida. Los resultados permitieron concluir que dicho extracto posee actividad antimicrobiana y puede representar una fuente potencial de agentes alternativos para la irrigación endodóntica, aunque requiere concentraciones relativamente elevadas para lograr un efecto bactericida completo (22).

Una revisión sistemática recopiló y analizó la evidencia científica disponible sobre la eficacia antimicrobiana de la bromelina frente a *Enterococcus faecalis*. Los estudios incluidos coincidieron en señalar que la bromelina supera al hidróxido de

calcio y presenta una eficacia comparable a la pasta triantibiótica en la reducción bacteriana. En consecuencia, se concluyó que este compuesto constituye una alternativa prometedora como irrigante o medicación intraconducto. No obstante, también se recomendó realizar más investigaciones clínicas que permitan respaldar su incorporación en la práctica endodóntica (23).

Una investigación in vitro comparó la actividad antimicrobiana de la bromelina y la papaína frente a *Enterococcus faecalis*, utilizando clorhexidina al 2 % como referencia. Los resultados mostraron que ambas enzimas ejercieron efecto antibacteriano; sin embargo, la bromelina generó zonas de inhibición significativamente mayores que la papaína y alcanzó una eficacia cercana a la de la clorhexidina. A partir de ello, se concluyó que la bromelina es una enzima natural con alto potencial para el desarrollo de nuevos irrigantes endodónticos (24).

En un estudio experimental se comparó la capacidad de la bromelina y del hipoclorito de sodio para eliminar biofilms maduros de *Enterococcus faecalis*. Se encontró que el hipoclorito de sodio al 5,25 % produjo la mayor reducción bacteriana en tiempos cortos. Sin embargo, la bromelina al 10 % alcanzó resultados comparables a los del hipoclorito de sodio al 2,5 % después de 30 minutos de contacto. Estos resultados permitieron concluir que la bromelina puede considerarse una alternativa prometedora para la desinfección endodóntica, especialmente cuando se busca reducir la toxicidad asociada a los irrigantes convencionales (25).

Finalmente, un ensayo clínico aleatorizado comparó la eficacia antimicrobiana de la pasta de bromelina, la pasta triantibiótica y el gel de clorhexidina al 2 % en dientes con necrosis pulpar e infección por *Enterococcus faecalis*. Los tres tratamientos redujeron significativamente la carga bacteriana; sin embargo, la bromelina obtuvo la mayor reducción, seguida por la pasta triantibiótica y la clorhexidina. Se concluyó que la pasta de bromelina constituye una medicación intraconducto eficaz, con potencial para sustituir o complementar los tratamientos convencionales debido a su origen natural y a su menor riesgo de citotoxicidad y resistencia bacteriana (26).

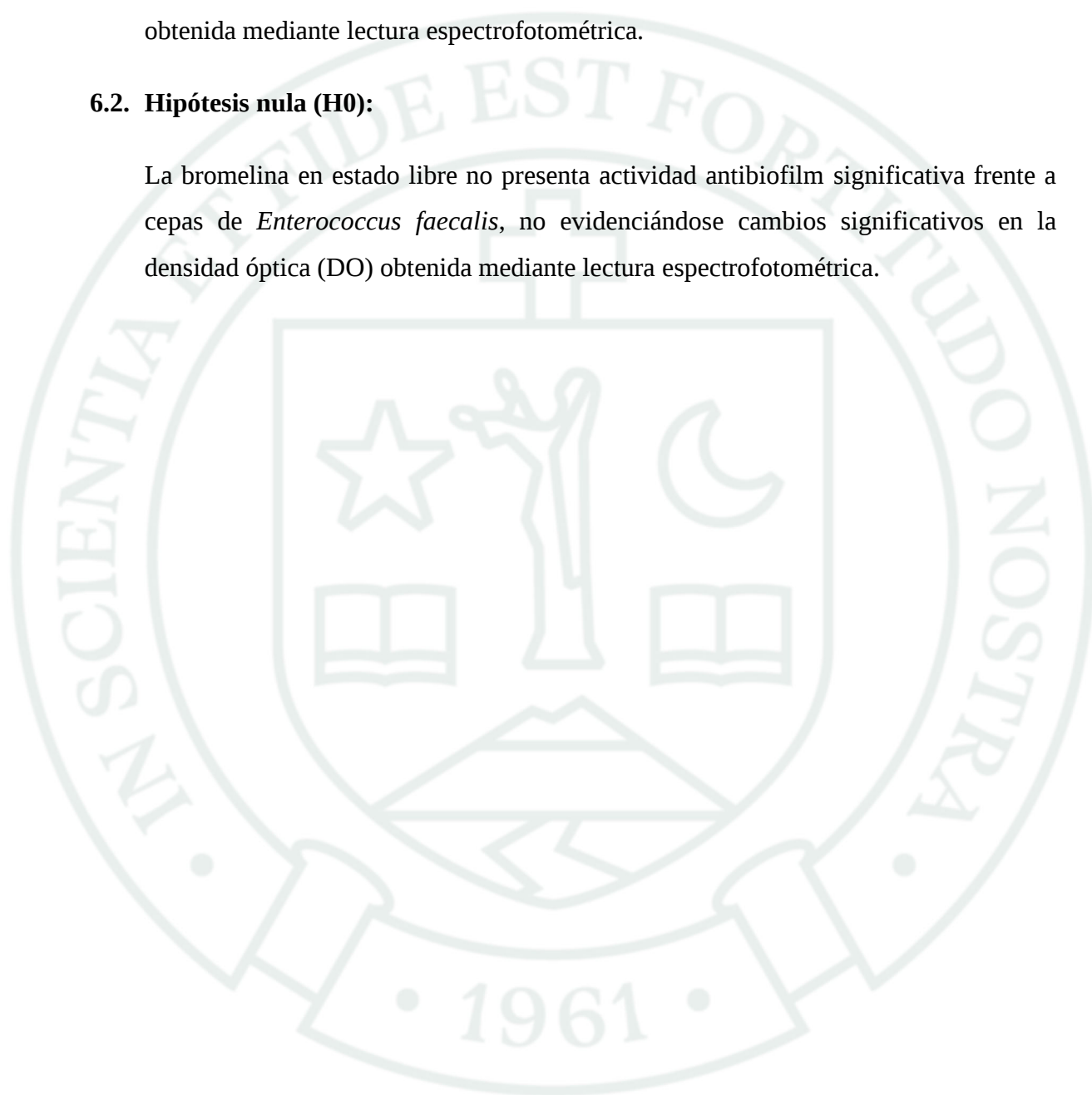
6. Hipótesis

6.1. Hipótesis alterna (Ha):

La bromelina en estado libre presenta actividad antibiofilm significativa frente a cepas de *Enterococcus faecalis*, evidenciada por cambios en la densidad óptica (DO) obtenida mediante lectura espectrofotométrica.

6.2. Hipótesis nula (H0):

La bromelina en estado libre no presenta actividad antibiofilm significativa frente a cepas de *Enterococcus faecalis*, no evidenciándose cambios significativos en la densidad óptica (DO) obtenida mediante lectura espectrofotométrica.



CAPÍTULO II:
PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

1. Diseño metodológico

La investigación se desarrolló bajo un enfoque cuantitativo, debido a que la actividad antibiofilm fue evaluada mediante valores numéricos obtenidos por lectura espectrofotométrica. Asimismo, correspondió a un estudio de nivel explicativo y diseño experimental in vitro, ya que se analizó el comportamiento de la bromelina en estado libre frente a cepas de *Enterococcus faecalis* en condiciones controladas de laboratorio.

De acuerdo con su finalidad, el estudio fue de tipo aplicado, puesto que buscó producir evidencia experimental sobre una sustancia con posible utilidad como alternativa o coadyuvante en el control de biofilms bacterianos relacionados con la práctica endodóntica. En cuanto a la planificación de los datos, fue prospectivo, porque los valores de densidad óptica fueron generados a partir del procedimiento experimental diseñado específicamente para la investigación.

Según el número de mediciones de la variable principal, el estudio fue transversal, dado que la actividad antibiofilm fue cuantificada en un momento determinado mediante lectura espectrofotométrica. Además, presentó un diseño comparativo, ya que se contrastaron los valores de densidad óptica obtenidos en los grupos tratados con diferentes concentraciones de bromelina frente a los grupos control establecidos para el ensayo.

La variable independiente estuvo representada por la concentración de bromelina en estado libre. La variable dependiente correspondió a la actividad antibiofilm, expresada a través de los valores de absorbancia o densidad óptica obtenidos luego de la tinción y lectura espectrofotométrica. Esta organización permitió evaluar si las distintas concentraciones de bromelina modificaban la biomasa del biofilm formado por *Enterococcus faecalis*.

2. Población y muestra

2.1. Población

La población estuvo constituida por cepas estandarizadas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, cultivadas bajo condiciones microbiológicas controladas en laboratorio. También formó parte del sistema experimental la bromelina en estado libre, preparada de acuerdo con el protocolo establecido para el estudio.

Asimismo, se consideraron dentro de la población experimental las unidades destinadas a la formación, exposición y evaluación del biofilm bacteriano. Estas unidades estuvieron conformadas por los pocillos de microplaca o tubos de ensayo utilizados para poner en contacto la cepa bacteriana con las distintas concentraciones de bromelina y con los grupos control correspondientes.

2.2. Muestra

La muestra estuvo integrada por las unidades experimentales obtenidas a partir de la distribución de la cepa *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 en los grupos de tratamiento. Estos grupos comprendieron las concentraciones de bromelina en estado libre evaluadas durante el ensayo, así como los controles empleados para establecer la comparación experimental.

Para la selección de los insumos biológicos se empleó un muestreo no probabilístico por conveniencia, debido a que se trabajó con una cepa bacteriana estandarizada y con bromelina preparada bajo condiciones controladas. Posteriormente, las unidades experimentales fueron asignadas a los grupos de tratamiento mediante distribución aleatoria simple, con el fin de reducir posibles sesgos durante la comparación de los resultados.

Las unidades experimentales correspondieron a los pocillos de microplaca en los que se formó el biofilm de *Enterococcus faecalis* y se aplicaron las concentraciones de bromelina o los controles correspondientes. Cada unidad fue identificada según el grupo experimental al que pertenecía, permitiendo el registro individual de los valores de densidad óptica obtenidos en la lectura espectrofotométrica.

Criterios de inclusión

- Cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 reactivadas de forma adecuada y con viabilidad comprobada mediante crecimiento en medio de cultivo.
- Inóculos bacterianos estandarizados conforme al método de turbidez empleado en el laboratorio y ajustados a la concentración de trabajo definida para el ensayo.

- Bromelina en estado libre preparada y conservada según el protocolo experimental, sin evidencia de contaminación, precipitación anómala o modificación visible.
- Tubos de ensayo, pocillos de microplaca y materiales estériles en condiciones físicas apropiadas para la ejecución del procedimiento.
- Unidades experimentales identificadas correctamente y asignadas al grupo de tratamiento o control correspondiente.

Criterios de exclusión

- Unidades experimentales con evidencia de contaminación cruzada por otros microorganismos, identificada por morfología colonial atípica, turbidez irregular o verificación microscópica.
- Tubos, pocillos o muestras que presentaron ruptura, derrame, evaporación excesiva o errores de manipulación durante la preparación, incubación o lectura.
- Muestras en las que el control negativo presentó crecimiento bacteriano o alteración inesperada, situación compatible con contaminación o falla del procedimiento.
- Muestras en las que el control positivo no mostró el comportamiento esperado, lo que indicaría error en la preparación, incubación o lectura experimental.
- Unidades experimentales con lectura espectrofotométrica inválida por presencia de burbujas, residuos, volumen insuficiente o interferencias visibles en el pocillo.

3. Tabla de variables

Tabla 1. Variables e indicadores

Variable	Definición operacional	Unidad de medida	Escala
Bromelina en estado libre	Sustancia enzimática aplicada en distintas concentraciones sobre el biofilm de <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212, de acuerdo con el protocolo experimental establecido.	Microgramos por mililitro ($\mu\text{g/mL}$)	De razón

Variable	Definición operacional	Unidad de medida	Escala
Actividad antibiofilm	Capacidad de la bromelina en estado libre para modificar la biomasa del biofilm formado por <i>Enterococcus faecalis</i> , evaluada mediante lectura espectrofotométrica posterior a la tinción.	Unidades de absorbancia, DO a 580 nm	De razón

* Elaboración propia.

La actividad antibiofilm fue cuantificada mediante densidad óptica, considerando que los valores de absorbancia representan la biomasa del biofilm adherido en cada unidad experimental. En ese sentido, valores más altos indican mayor biomasa residual, mientras que valores más bajos reflejan menor formación o permanencia del biofilm después de la exposición al tratamiento correspondiente.

4. Técnicas y procedimientos

4.1. Técnica

La técnica utilizada correspondió a un ensayo experimental in vitro mediante microdilución en placa. Este procedimiento permitió evaluar la actividad antibiofilm de la bromelina en estado libre frente a cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, bajo condiciones controladas de laboratorio. La biomasa del biofilm fue cuantificada a través de lectura espectrofotométrica de densidad óptica, expresada en unidades de absorbancia.

4.2. Instrumento

Para el registro de información se empleó una ficha de recolección de datos diseñada para la investigación. En ella se consignaron los grupos experimentales, las concentraciones de bromelina en estado libre, los controles utilizados y los valores de densidad óptica obtenidos en la lectura espectrofotométrica.

Este instrumento permitió ordenar los resultados según grupo de tratamiento, facilitar la comparación entre las concentraciones evaluadas y estructurar la base de datos necesaria para el procesamiento estadístico posterior.

4.3. Procedimiento experimental

a. Estandarización de la cepa bacteriana

Para estandarizar la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, se seleccionó una colonia aislada del cultivo bacteriano y se inoculó en caldo tripticasa de soya. Luego, el cultivo fue incubado a 37 °C durante un periodo de 18 a 24 horas, con el propósito de obtener un crecimiento bacteriano viable, activo y homogéneo.

Después de la incubación, la suspensión bacteriana fue ajustada hasta alcanzar una turbidez compatible con el estándar de trabajo establecido para el ensayo. Para ello, se tomó como referencia la escala de McFarland o el método de turbidez utilizado en el laboratorio. Esta etapa permitió disponer de un inóculo uniforme para su posterior distribución en las unidades experimentales.

b. Preparación de la bromelina en estado libre

La bromelina en estado libre fue obtenida a partir de una solución madre preparada conforme al protocolo experimental. Desde esta solución inicial se realizaron diluciones seriadas hasta alcanzar las concentraciones establecidas para el estudio, expresadas en microgramos por mililitro.

Cada concentración fue preparada en condiciones controladas, utilizando material estéril y procurando evitar contaminación, precipitación o cambios visibles en la solución. Antes de su aplicación en la microplaca, las concentraciones fueron debidamente rotuladas para asegurar su correcta identificación durante el procedimiento.

c. Distribución de los grupos experimentales y controles

Las unidades experimentales fueron distribuidas en una microplaca estéril de 96 pocillos. En cada pocillo se colocó el volumen correspondiente del inóculo

bacteriano estandarizado junto con la concentración asignada de bromelina en estado libre, de acuerdo con la organización prevista en el diseño experimental.

También se incluyeron grupos control para validar el comportamiento del ensayo. El control positivo estuvo constituido por Bacitracina, debido a su acción antimicrobiana frente a la cepa evaluada. El control negativo estuvo conformado por el sistema sin agente antibiofilm, empleándose agua destilada estéril o el diluyente correspondiente, según el protocolo utilizado en el laboratorio.

d. Incubación de la microplaca

Una vez distribuidos los tratamientos y controles, la microplaca fue incubada durante 20 horas en condiciones controladas. Este tiempo permitió la interacción entre *Enterococcus faecalis* y las distintas concentraciones de bromelina, así como la formación o permanencia de biomasa adherida compatible con biofilm.

e. Lavado de los pocillos

Concluido el periodo de incubación, los pocillos fueron lavados con solución tampón fosfato salino. Esta etapa tuvo como finalidad retirar bacterias no adheridas y conservar únicamente la biomasa bacteriana fijada a la superficie del pocillo. El lavado se realizó cuidadosamente para evitar el desprendimiento accidental del biofilm formado.

f. Tinción del biofilm

Luego del lavado, se añadió azul de bromofenol al 1 % en cada pocillo y se dejó actuar durante 20 minutos. Esta tinción permitió evidenciar la biomasa adherida correspondiente al biofilm bacteriano. Posteriormente, se efectuó un nuevo lavado con solución tampón fosfato salino para retirar el exceso de colorante no fijado.

g. Solubilización del colorante retenido

Después de la tinción y el lavado final, se agregó ácido acético glacial al 30 % con el propósito de solubilizar el colorante retenido por la biomasa del biofilm. Este procedimiento permitió obtener una solución coloreada que pudiera ser cuantificada mediante lectura espectrofotométrica.

h. Lectura espectrofotométrica

La actividad antibiofilm fue evaluada mediante un lector de microplacas, registrándose los valores de densidad óptica a 580 nm. Los resultados fueron expresados en unidades de absorbancia. Para la interpretación, se consideró que una mayor densidad óptica representa mayor biomasa de biofilm adherido, mientras que valores menores indican menor formación o persistencia del biofilm después del tratamiento.

i. Registro de datos

Los valores de densidad óptica obtenidos en cada pocillo fueron consignados en la ficha de recolección de datos. Posteriormente, la información fue organizada en una base de datos en formato Excel, identificando cada valor según grupo experimental, concentración de bromelina y control correspondiente.

j. Control de calidad del procedimiento

Con la finalidad de garantizar la validez del procedimiento experimental, se verificó la esterilidad de los materiales, la correcta rotulación de los pocillos, la viabilidad de la cepa bacteriana y el comportamiento esperado de los grupos control. Fueron excluidas las unidades experimentales que presentaron contaminación, derrame, volumen insuficiente, presencia de burbujas, precipitación anómala o errores visibles durante la incubación, tinción, lavado o lectura espectrofotométrica.

5. Plan de análisis

Tabla 2. Análisis de datos

Etapas del análisis	Descripción / procedimiento	Prueba estadística a utilizar
1. Procesamiento de datos	Organización, depuración y validación de la base de datos elaborada con los valores de densidad óptica registrados mediante el lector de microplacas.	No aplica
2. Análisis descriptivo	Resumen de los valores de densidad óptica para describir el comportamiento de la	Media aritmética, mediana, desviación

Etapas del análisis	Descripción / procedimiento	Prueba estadística a utilizar
	actividad antibiofilm en cada grupo experimental y control.	estándar, valor mínimo y valor máximo
3. Prueba de normalidad	Evaluación de la distribución de los datos para definir si correspondía aplicar pruebas paramétricas o no paramétricas.	Shapiro-Wilk
4. Análisis inferencial global	Comparación de los valores de densidad óptica entre las concentraciones de bromelina en estado libre y los grupos control.	Kruskal-Wallis
5. Comparaciones por pares	Contraste específico entre grupos cuando el análisis global evidenció diferencias estadísticamente significativas.	U de Mann-Whitney
6. Nivel de significancia	Criterio estadístico utilizado para aceptar o rechazar la hipótesis nula.	$p < 0.05$

* Elaboración propia.

6. Consideraciones éticas

Por su naturaleza experimental in vitro, la presente investigación no requirió aprobación de un Comité de Ética en Investigación con seres humanos ni animales. Las unidades de estudio correspondieron exclusivamente a cepas bacterianas estandarizadas y a compuestos de origen vegetal empleados bajo condiciones de laboratorio, por lo que no existió intervención sobre sujetos biológicos protegidos por la Declaración de Helsinki.

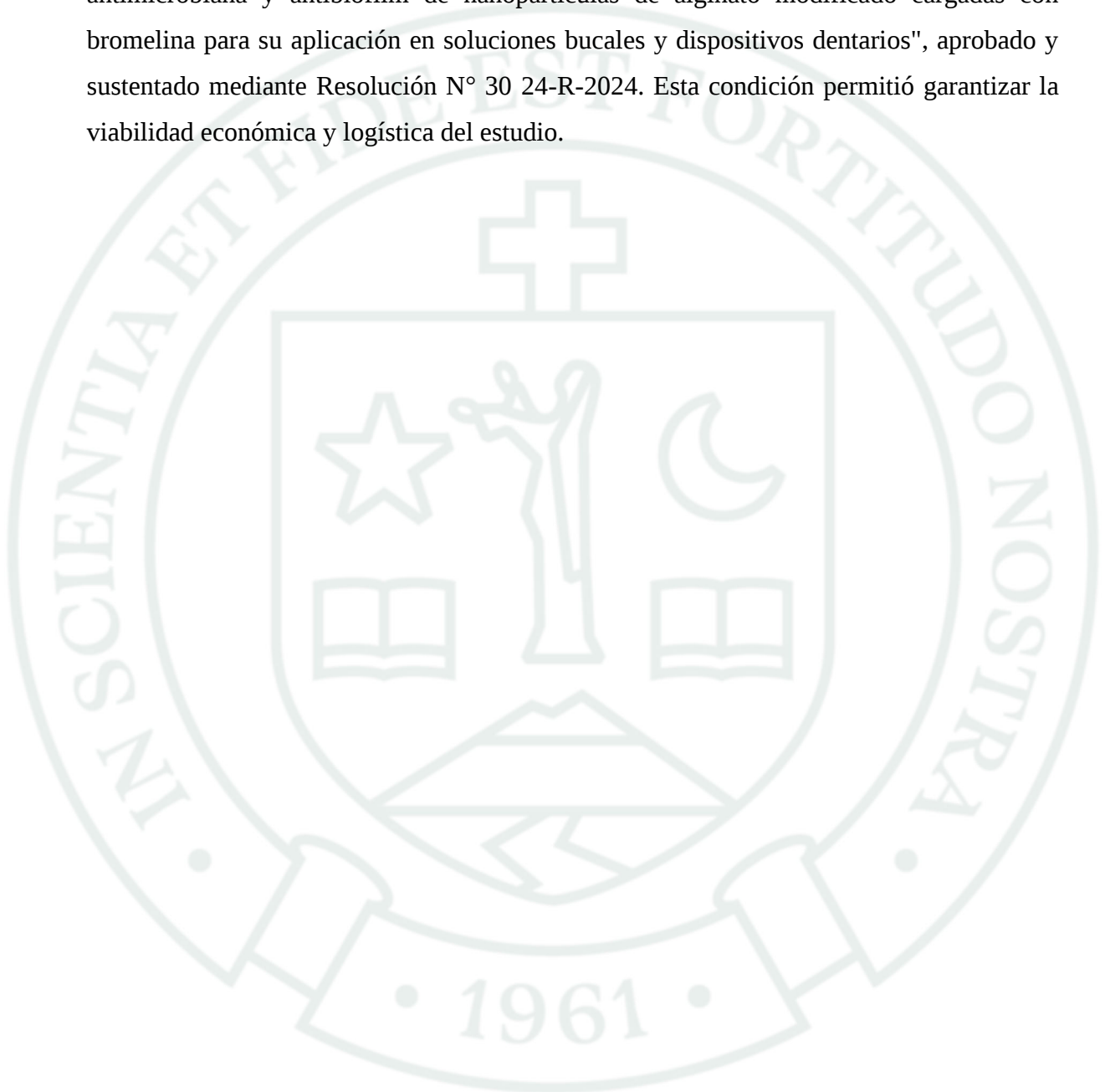
Asimismo, el trabajo se desarrolló procurando el cumplimiento de criterios de bioseguridad durante la manipulación de la cepa bacteriana, los reactivos y los materiales de laboratorio. El manejo de los datos experimentales se realizó de forma objetiva, respetando la trazabilidad de los registros obtenidos y evitando modificaciones que pudieran alterar la interpretación de los resultados.

7. Recursos

La ejecución de la investigación contó con los recursos humanos, materiales y de infraestructura necesarios para realizar los ensayos experimentales. El desarrollo del procedimiento requirió insumos microbiológicos, reactivos, material estéril, microplacas,

equipos de incubación, lector de microplacas y recursos para el registro y procesamiento de los datos.

En cuanto al financiamiento, los gastos operativos y la adquisición de insumos fueron cubiertos por el proyecto matriz titulado "Evaluación de la estabilidad, actividad antimicrobiana y antibiofilm de nanopartículas de alginato modificado cargadas con bromelina para su aplicación en soluciones bucales y dispositivos dentarios", aprobado y sustentado mediante Resolución N° 30 24-R-2024. Esta condición permitió garantizar la viabilidad económica y logística del estudio.



**CAPÍTULO III:
RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

1. Resultados

La cepa bacteriana fue estandarizada hasta alcanzar un inóculo con turbidez de 90 NTU por tubo. De manera paralela, se preparó una solución madre de bromelina a 10 µg/mL, empleada como agente antibiofilm, a partir de la cual se obtuvieron diez concentraciones mediante diluciones seriadas. En la microplaca de 96 pocillos se colocaron 100 µL del inóculo bacteriano estandarizado y 100 µL de cada dilución de bromelina, distribuyéndose además los controles establecidos para el ensayo. La placa fue incubada durante 20 horas, permitiendo la interacción entre la cepa bacteriana, la bromelina y los controles experimentales.

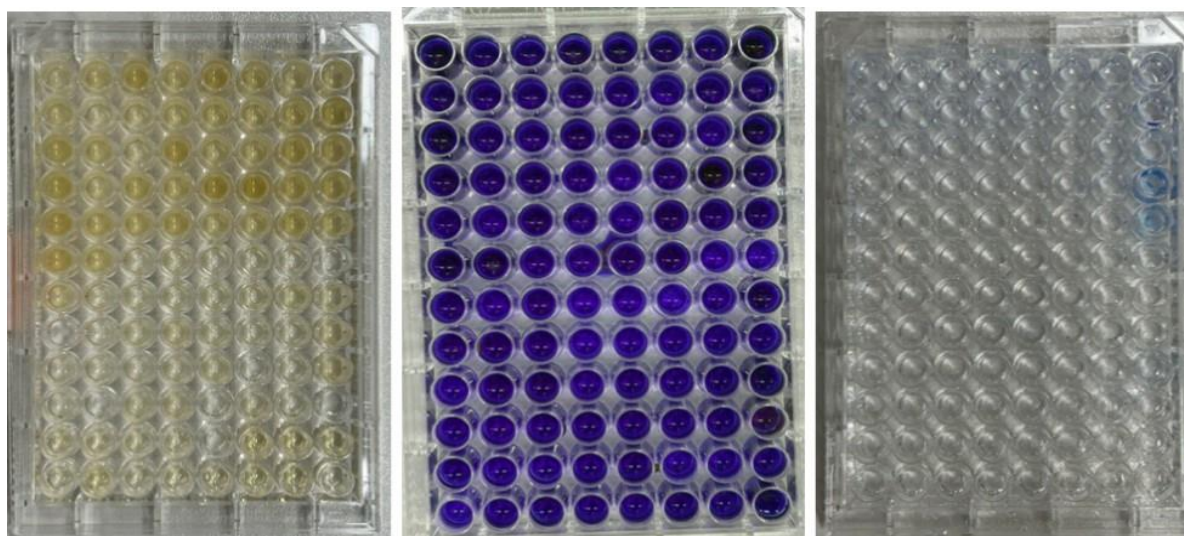
Finalizado el periodo de incubación, se efectuó un lavado con PBS para retirar las bacterias no adheridas, es decir, aquellas que no formaron biofilm. Posteriormente, los pocillos fueron teñidos con 100 µL de azul de bromofenol al 1 % durante 20 minutos y luego sometidos a doble lavado con PBS. Para solubilizar el colorante retenido por la biomasa adherida, se añadió ácido acético glacial al 30 %, produciéndose el cambio de color a amarillo correspondiente al tinte absorbido. La actividad antibiofilm se midió en un lector de microplacas BIORAD modelo PR 4100, configurado en modo lineal para absorbancia a 580 nm, con lectura de fondo, ajuste automático de ganancia y sin punto de corte. Finalmente, los valores obtenidos fueron exportados en formato Excel para su análisis.

Figura 1. Cultivo de la cepa bacteriana de *Enterococcus faecalis*



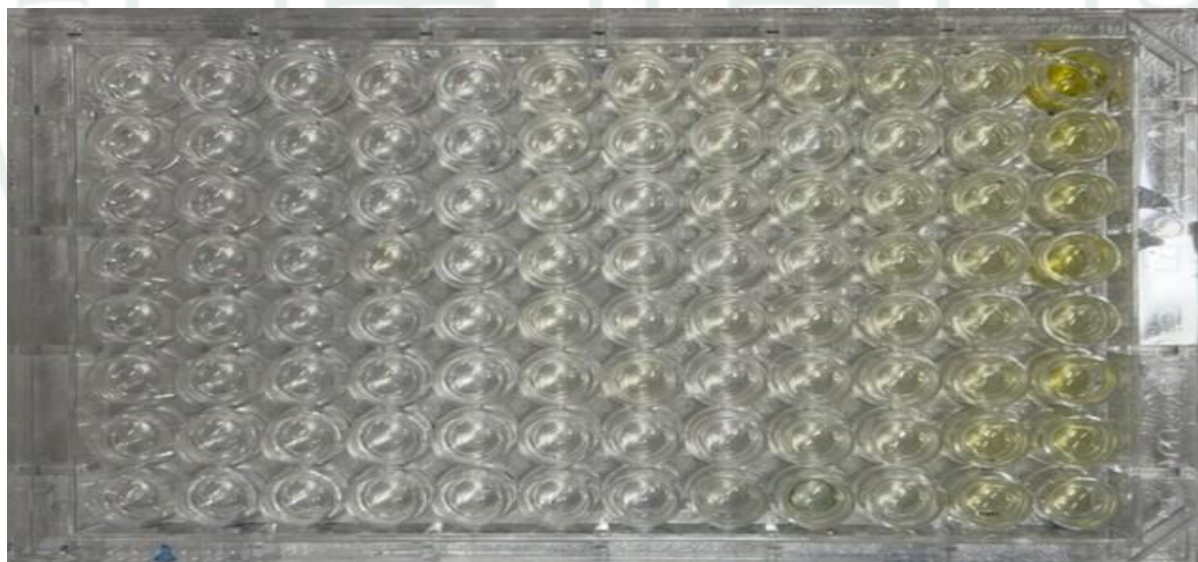
* Elaboración propia.

Figura 2. Microplaca de 96 pocillos durante el ensayo de biofilm: (1) incubación a 20 horas, (2) tinción con azul de bromofenol, (3) último lavado con PBS



* Elaboración propia.

Figura 3. Resultado de la microplaca antes de la lectura espectrofotométrica



* Elaboración propia.

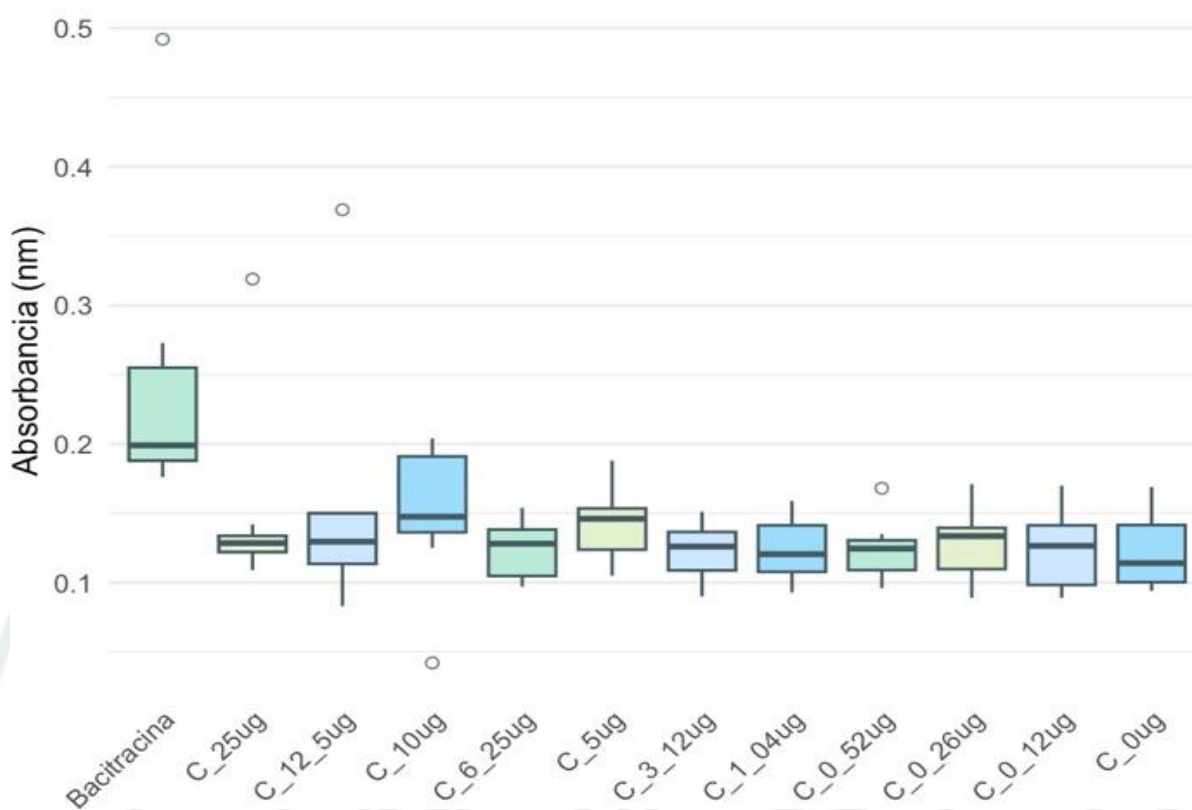
A continuación, se presentan los valores brutos de absorbancia correspondientes a las ocho réplicas realizadas para las concentraciones experimentales evaluadas, incluyendo el control con bacitracina al 1 %.

Tabla 3. Resultados de la lectura

N°	Bacitracina 1%	10 µg/mL	5 µg/mL	25 µg/mL	12.5 µg/mL	6.25 µg/mL	3.12 µg/mL	1.04 µg/mL	0.52 µg/mL	0.26 µg/mL	0.12 µg/mL	0.06 µg/mL
1	0.198	0.204	0.170	0.319	0.369	0.154	0.151	0.159	0.168	0.171	0.170	0.169
2	0.191	0.200	0.124	0.131	0.103	0.097	0.105	0.111	0.112	0.114	0.089	0.098
3	0.200	0.125	0.105	0.116	0.083	0.104	0.090	0.093	0.096	0.089	0.093	0.094
4	0.176	0.042	0.145	0.126	0.126	0.131	0.127	0.142	0.128	0.131	0.132	0.119
5	0.273	0.188	0.188	0.131	0.150	0.148	0.135	0.121	0.121	0.138	0.141	0.152
6	0.179	0.149	0.123	0.109	0.117	0.105	0.110	0.098	0.100	0.097	0.100	0.101
7	0.249	0.140	0.148	0.124	0.150	0.135	0.141	0.141	0.135	0.144	0.142	0.138
8	0.492	0.146	0.147	0.142	0.133	0.125	0.125	0.120	0.129	0.136	0.121	0.109

Antes de comparar los promedios entre tratamientos, se examinó la distribución de los valores de densidad óptica obtenidos mediante lectura espectrofotométrica. Esta revisión permitió observar la variabilidad de cada grupo y valorar la estabilidad de la respuesta antibiofilm frente a las distintas concentraciones aplicadas.

Figura 4. Distribución de la densidad óptica por tratamiento (diagrama de cajas y bigotes).



* Elaboración propia.

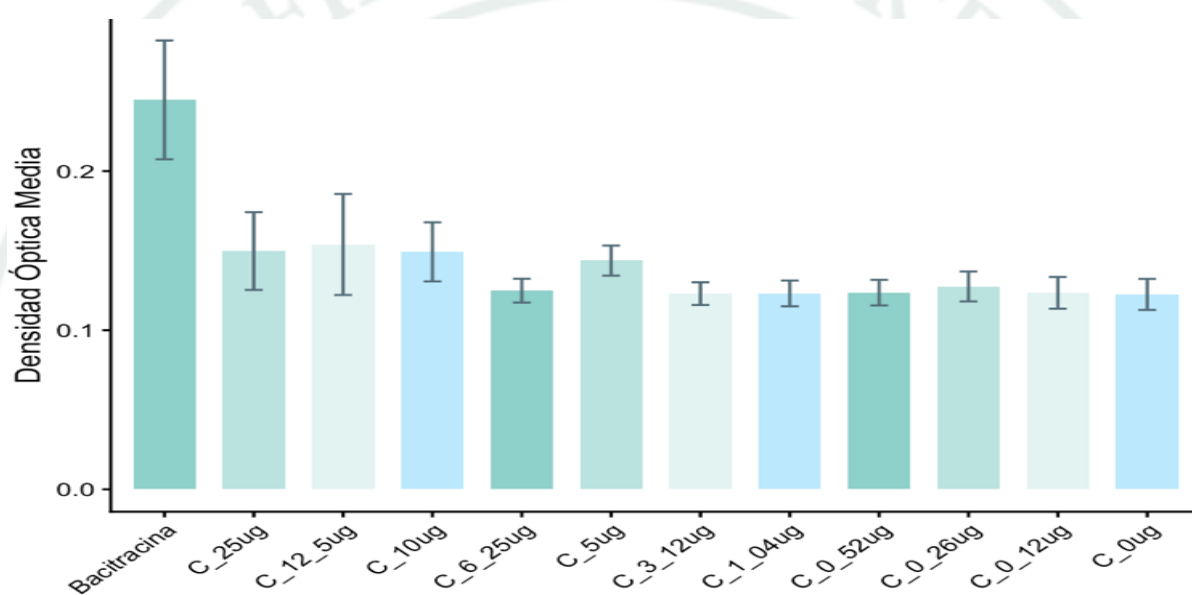
La distribución de la densidad óptica evidenció diferencias en el comportamiento de los grupos evaluados. El grupo tratado con Bacitracina presentó una dispersión más marcada, con valores extremos que llegaron a 0.492 unidades de absorbancia. Este comportamiento sugiere una respuesta menos uniforme de la cepa frente al antibiótico bajo las condiciones del ensayo.

En cambio, los grupos expuestos a bromelina, especialmente entre 0.26 y 5 $\mu\text{g/mL}$, mostraron distribuciones más concentradas y homogéneas. Este patrón indica que la respuesta biológica frente al tratamiento enzimático fue más estable entre las réplicas. En las concentraciones bajas, desde 0 $\mu\text{g/mL}$ hasta 1.04 $\mu\text{g/mL}$, las medianas se mantuvieron alrededor de 0.120 a 0.130 unidades de absorbancia, estableciendo una referencia basal del comportamiento del biofilm en el sistema experimental.

Magnitud del Efecto: Comparación de Promedios

Después de revisar la distribución de los datos, se procedió a valorar el efecto promedio de cada concentración sobre la biomasa del biofilm. Este análisis permitió identificar si las variaciones en la absorbancia media reflejaban posibles efectos de contención, inhibición o modificación del crecimiento bacteriano.

Figura 5. Efecto antibacteriano promedio: media de absorbancia $\pm$ error estándar por tratamiento



* Elaboración propia.

El análisis de las medias mostró que la densidad del biofilm no disminuyó de manera lineal conforme aumentó la concentración de bromelina. El control negativo de crecimiento, correspondiente a 0 $\mu\text{g/mL}$, presentó una media de 0.129 ± 0.009 unidades de absorbancia.

Algunas concentraciones, como 12.5 $\mu\text{g/mL}$ y 25 $\mu\text{g/mL}$, registraron medias de absorbancia ligeramente mayores, con valores de 0.166 y 0.150, respectivamente. Esta respuesta no necesariamente representa mayor proliferación bacteriana, sino que podría relacionarse con una respuesta adaptativa del biofilm, con incremento de matriz extracelular ante una condición de estrés, o con una interacción entre la enzima, el medio y el sistema de lectura óptica. Por su parte, la Bacitracina presentó la media más elevada, con 0.245 unidades de absorbancia, influenciada por los valores extremos observados previamente.

Determinación de la Actividad Dosis-Respuesta (Objetivo Específico)

Para responder al objetivo específico relacionado con la actividad antibiofilm según la dosis, se realizó un modelamiento de regresión no lineal mediante LOESS sobre las concentraciones activas de bromelina. Se utilizó una escala logarítmica Log2 en el eje de las abscisas, con la finalidad de visualizar con mayor precisión las variaciones presentes en las dosis bajas.

Figura 6. Perfil de comportamiento de la turbidez bacteriana a través de los grupos experimentales.



* Elaboración propia.

El análisis de la curva de tendencia mostró que la actividad de la bromelina no siguió una relación lineal simple. La línea de tendencia y su intervalo de confianza al 95 % evidenciaron un comportamiento no monotónico, es decir, una respuesta que no disminuye de forma progresiva y uniforme conforme aumenta la concentración.

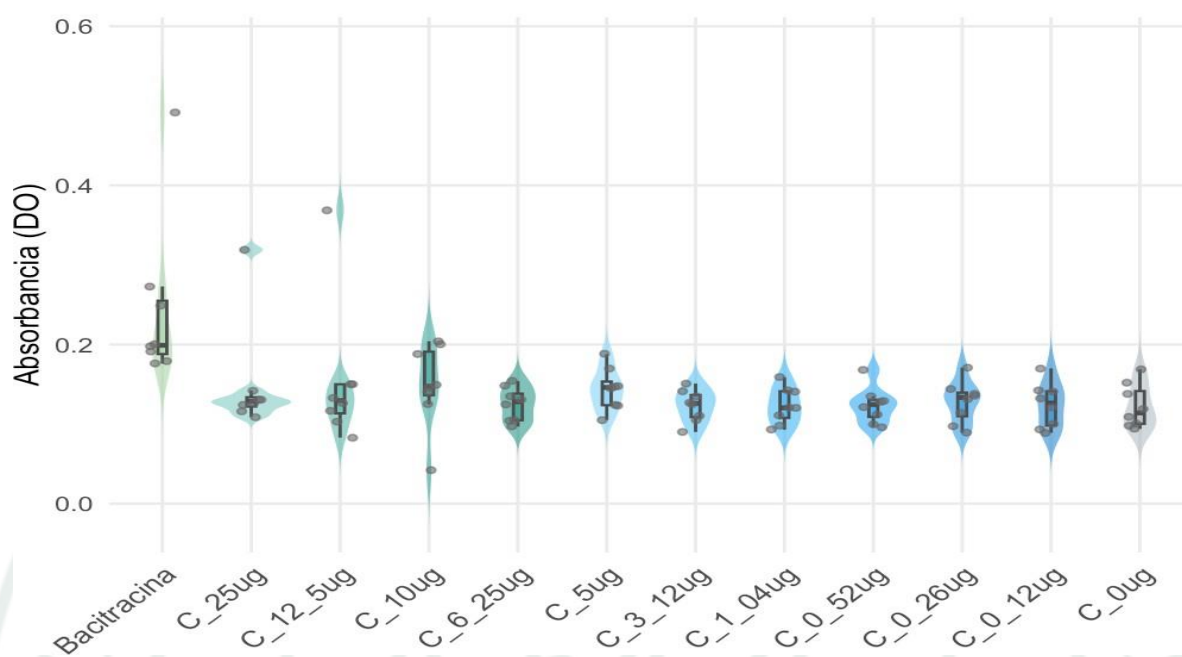
Se identifican tres fases de comportamiento en la curva:

- 1) Fase de estabilidad (Bajas dosis): Entre 0.26 y 1.04 $\mu\text{g/mL}$, los valores de absorbancia se mantuvieron prácticamente constantes. Esto indica que, en ese intervalo, las concentraciones evaluadas no produjeron cambios marcados en la estructura del biofilm.
- 2) Fase de fluctuación (Dosis medias): Entre 3.12 $\mu\text{g/mL}$ y 10 $\mu\text{g/mL}$ se observó una ligera variación en la tendencia, aunque sin una reducción suficiente de absorbancia que permita considerar una erradicación total del biofilm.
- 3) Fase de saturación/estrés: En las concentraciones más altas, la curva no descendió hacia valores cercanos a cero. Por el contrario, tendió a estabilizarse o a elevarse de manera leve.

Este comportamiento sugiere que, bajo las condiciones experimentales aplicadas, la bromelina en estado libre podría necesitar concentraciones mayores, tiempos de exposición más prolongados o una formulación distinta para lograr una dispersión más intensa del biofilm maduro. También es posible que, en las dosis evaluadas, su acción se oriente más hacia la reorganización o estabilización de la matriz del biofilm que hacia su eliminación completa.

Antes de estimar la eficacia inhibitoria central, se evaluó la arquitectura distribucional de los datos. El análisis de densidad permitió observar no solo las medianas de la biomasa bacteriana remanente, sino también la uniformidad de la respuesta en cada tratamiento. La Figura 7 muestra un diagrama de violín que integra la densidad de probabilidad de la absorbancia con la dispersión intercuartílica, permitiendo comparar la estabilidad del efecto de la bromelina frente a los controles.

Figura 7. Densidad de actividad antibiofilm: distribución de la absorbancia por grupo experimental



* Elaboración propia.

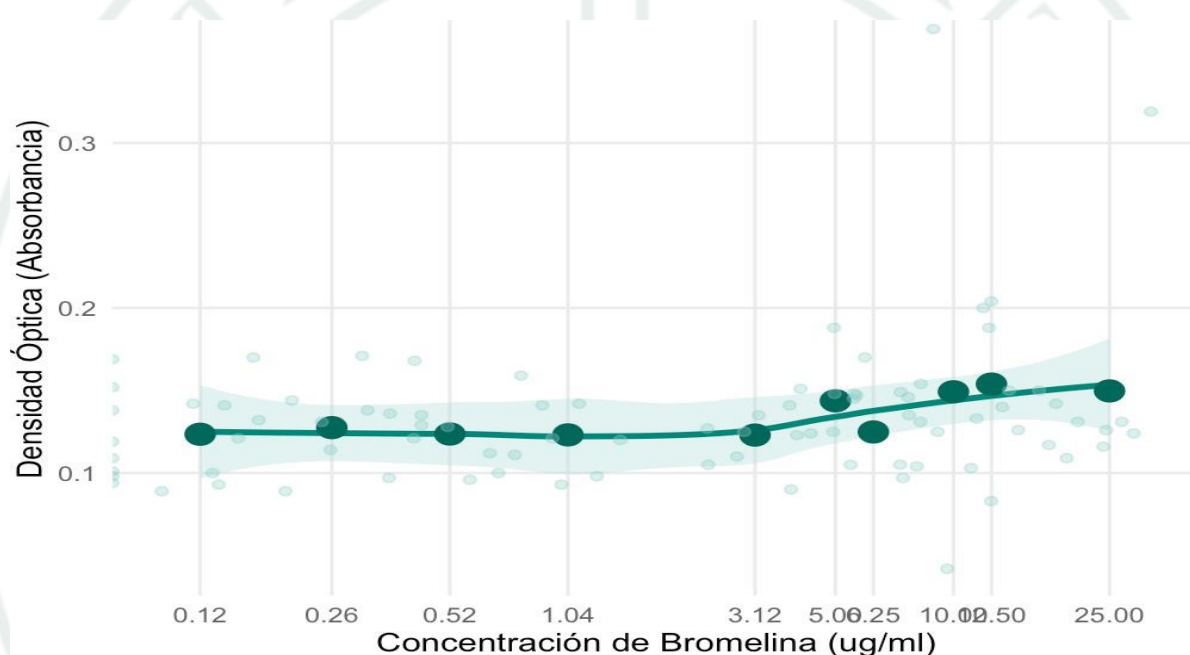
El análisis de densidad mostró una diferencia clara entre el comportamiento de los tratamientos con bromelina y el grupo control con antibiótico.

- 1) Heterogeneidad en el Control Positivo: El grupo tratado con Bacitracina presentó una distribución alargada y con alta dispersión vertical. La presencia de una cola superior en el gráfico indica que, aunque el antibiótico puede actuar sobre parte de la población bacteriana, algunas réplicas conservaron valores elevados de densidad óptica, superiores a $DO > 0.400$. Este hallazgo sugiere variabilidad en la sensibilidad fenotípica de la cepa bajo las condiciones evaluadas.
- 2) Consistencia de la Bromelina: A diferencia del grupo con Bacitracina, las concentraciones de bromelina mostraron distribuciones más compactas y uniformes, principalmente en los rangos de dosis bajas. Este comportamiento indica que el tratamiento enzimático generó una respuesta más homogénea entre réplicas, con baja variabilidad interna, lo que respalda la consistencia del ensayo experimental.

3)

Para determinar el tipo de asociación entre la concentración de bromelina y la biomasa del biofilm, se modeló la tendencia mediante una curva de regresión no lineal. Este análisis permitió explorar si existía una relación inversa directa, es decir, mayor concentración y menor biofilm, o si la respuesta seguía un patrón más complejo, vinculado a saturación, estabilidad o estrés bacteriano. La Figura 8 representa la cinética de la absorbancia en función del logaritmo de la concentración de bromelina.

Figura 8. Correlación entre concentración de bromelina y densidad bacteriana del biofilm



* Elaboración propia.

La evaluación visual y estadística de la curva indica una relación no monotónica entre la concentración de bromelina y la densidad bacteriana del biofilm. A diferencia de un antibiótico clásico, que habitualmente muestra una reducción progresiva de la biomasa al aumentar la dosis, la bromelina en estado libre presentó un comportamiento trifásico.

- 1) Fase Basal (Dosis Bajas): En concentraciones menores a 1.04 $\mu\text{g/mL}$, la tendencia se mantuvo cercana al valor del control negativo, aproximadamente 0.130 unidades de absorbancia. Esto indica una zona de efecto mínimo o sin modificación importante del biofilm.

- 2) Punto de Inflexión: En el rango intermedio no se observó una disminución drástica de la absorbancia. Por el contrario, la curva mostró estabilidad e incluso un leve incremento en algunas medias marginales, como ocurrió en 12.5 µg/mL y 25 µg/mL.

Conclusión del análisis de correlación: Los resultados no evidencian una correlación lineal inversa fuerte entre concentración y densidad óptica. La permanencia de absorbancias en concentraciones altas podría explicarse por la saturación de sitios activos enzimáticos o por una respuesta defensiva de la bacteria, mediante mayor producción de matriz extracelular frente al estrés enzimático, manteniéndose así la turbidez del sistema.



2. Discusión

Los resultados obtenidos muestran que la bromelina en estado libre presentó un comportamiento antibiofilm complejo frente a *Enterococcus faecalis*. Su efecto no siguió el patrón esperado de un antimicrobiano clásico, en el que el incremento de la dosis suele relacionarse con una reducción progresiva y marcada de la biomasa. En este ensayo, la bromelina mostró una respuesta más estable, con valores de absorbancia concentrados en rangos relativamente estrechos y con menor dispersión que la observada en el grupo tratado con Bacitracina.

El control con Bacitracina al 1 % presentó la mayor variabilidad del ensayo, con una media de absorbancia de 0.245 y valores extremos que llegaron hasta 0.492 unidades de densidad óptica. Este comportamiento sugiere una respuesta heterogénea de *Enterococcus faecalis* frente al antibiótico, con presencia de réplicas capaces de mantener niveles elevados de biomasa a pesar de la exposición al agente antimicrobiano. Esta variabilidad es coherente con la capacidad de *E. faecalis* para persistir en forma de biofilm y mostrar tolerancia fenotípica frente a sustancias antimicrobianas convencionales (28).

En comparación, las concentraciones de bromelina mantuvieron valores de absorbancia alrededor de 0.12 a 0.16 unidades. Este rango más compacto sugiere que la enzima generó una respuesta más homogénea y reproducible entre las réplicas. Las concentraciones bajas, como 0.26, 0.52, 1.04 y 3.12 $\mu\text{g/mL}$, mantuvieron medianas cercanas a 0.120 y 0.130, valores prácticamente superponibles al control de crecimiento y, en algunos casos, ligeramente inferiores. Este resultado puede interpretarse como un efecto de contención de la biomasa, más que como una eliminación directa del biofilm.

La curva de tendencia mostró un perfil trifásico. En primer lugar, se observó una fase basal en concentraciones inferiores a 1.04 $\mu\text{g/mL}$, donde la absorbancia se mantuvo sin variaciones importantes. Luego, en las dosis intermedias, apareció una zona de fluctuación sin caída marcada de la densidad óptica. Finalmente, en las concentraciones más altas, la curva tendió a estabilizarse o elevarse ligeramente, lo que sugiere un fenómeno de saturación o respuesta de estrés. Este comportamiento coincide con investigaciones que describen a la bromelina como un agente con efecto modulador y dependiente de la dosis, antes que como un bactericida inmediato (29,31).

Las concentraciones de 12.5 µg/mL y 25 µg/mL mostraron medias de absorbancia de 0.166 y 0.150, respectivamente. Aunque estos valores son superiores a los observados en algunas concentraciones bajas, no deben interpretarse automáticamente como ausencia de actividad. Una explicación plausible es que el biofilm, ante la presión enzimática, incremente la producción de matriz extracelular o reorganice su estructura, generando mayor retención de colorante y, por tanto, mayor lectura de densidad óptica. También podría tratarse de un punto de saturación en el que la enzima continúa actuando sobre componentes proteicos, pero sin traducirse en una reducción proporcional de la biomasa total medida por absorbancia.

Los resultados también deben analizarse considerando la naturaleza del método empleado. La lectura espectrofotométrica permite cuantificar biomasa adherida mediante absorbancia, pero no distingue de manera directa entre células viables, matriz extracelular residual o restos estructurales del biofilm. Por ello, una densidad óptica estable puede indicar contención del crecimiento, permanencia de matriz o reorganización de la biopelícula. En este sentido, la ausencia de una reducción lineal no invalida la actividad de la bromelina, sino que orienta su interpretación hacia un mecanismo antibiofilm más estructural y modulador.

Asimismo, debe considerarse que la respuesta observada en este estudio no necesariamente representa una ausencia de efecto cuando la densidad óptica no disminuye de forma pronunciada. En los ensayos de biofilm, la lectura por absorbancia refleja una señal global del material adherido al pocillo, pero esa señal puede estar integrada por células viables, células dañadas, matriz extracelular, restos proteicos y residuos retenidos después del proceso de tinción. Por ello, una absorbancia estable puede interpretarse como una expresión de control estructural del biofilm, especialmente cuando los valores se mantienen dentro de un rango estrecho y con poca variabilidad entre réplicas. En el caso de la bromelina, este comportamiento resulta coherente con su naturaleza enzimática, ya que su acción podría dirigirse inicialmente a modificar la organización de la matriz antes que a destruir de manera inmediata toda la biomasa bacteriana. Esta lectura permite comprender el efecto antibiofilm desde una perspectiva más amplia: no solo como reducción absoluta de densidad óptica, sino también como capacidad para limitar la expansión, ordenar la respuesta experimental y disminuir la dispersión del crecimiento bacteriano frente a un microorganismo reconocido por su persistencia endodóntica.

Desde una perspectiva comparativa, los hallazgos se relacionan con estudios previos en los que la bromelina ha demostrado actividad frente a *Enterococcus faecalis*. Se han reportado zonas de inhibición promedio de 28.87 mm en ensayos de difusión, superiores a las obtenidas con hidróxido de calcio y pasta triantibiótica. Asimismo, investigaciones clínicas han señalado reducciones importantes del recuento bacteriano con pasta de bromelina, incluso frente a comparadores como clorhexidina al 2 %. Aunque el presente estudio utilizó un modelo de microplaca basado en absorbancia y no recuento de unidades formadoras de colonias, sus resultados son compatibles con la idea de que la bromelina posee potencial antibiofilm (26).

En el presente ensayo, la bromelina no produjo una erradicación inmediata del biofilm bajo las concentraciones evaluadas. Sin embargo, sí mostró capacidad para mantener la densidad óptica dentro de rangos estrechos y evitar la dispersión marcada observada con Bacitracina. Este hallazgo es importante porque, en infecciones endodónticas persistentes, la estabilidad y predictibilidad de la respuesta terapéutica puede ser tan relevante como la reducción absoluta de la biomasa, especialmente cuando se plantea el uso de la bromelina como coadyuvante y no como sustituto único de los irrigantes convencionales.

La acción de la bromelina podría explicarse por su naturaleza proteolítica. Al actuar sobre componentes proteicos de la matriz extracelular del biofilm, la enzima podría debilitar su organización y modificar la adhesión bacteriana a la superficie. No obstante, si la matriz contiene una proporción importante de polisacáridos u otros componentes no proteicos, la degradación enzimática podría ser parcial. Esto explicaría por qué la absorbancia se mantuvo dentro de valores controlados, pero sin descender de forma drástica en las concentraciones más altas.

En conjunto, los datos muestran que la bromelina, dentro del rango evaluado de 0.26 a 25 µg/mL, mantuvo la absorbancia del biofilm de *E. faecalis* cerca de los valores basales y por debajo de la dispersión registrada en el grupo tratado con Bacitracina. Por tanto, su efecto puede describirse como antibiofilm modulador, reproducible y dependiente de las condiciones experimentales. La falta de una relación lineal inversa fuerte entre concentración y densidad óptica sugiere que futuras investigaciones deberían evaluar mayores tiempos de exposición, formulaciones que mejoren la biodisponibilidad de la

enzima o combinaciones con irrigantes convencionales. Estos hallazgos respaldan la hipótesis de que la bromelina en estado libre presenta actividad antibiofilm frente a *Enterococcus faecalis*, aunque su efecto no corresponde a una eliminación inmediata ni total de la biomasa. Su utilidad potencial se orienta más bien hacia la estabilización, debilitamiento estructural o contención del biofilm, lo que podría favorecer su incorporación futura como agente coadyuvante en protocolos de desinfección endodóntica.



CONCLUSIONES

La bromelina en estado libre presentó actividad antibiofilm cuantificable frente a *Enterococcus faecalis*. Su comportamiento permitió mantener la biomasa bacteriana en valores próximos al control negativo, aun cuando la concentración se incrementó desde 0.26 hasta 25 $\mu\text{g/mL}$. Las medias de absorbancia se ubicaron principalmente entre 0.12 y 0.16 unidades, sin alcanzar picos extremos como los observados en el grupo tratado con Bacitracina al 1 %, cuyo valor máximo llegó a 0.492 unidades. Este patrón indica que la enzima generó una respuesta estable entre réplicas y con menor presencia de valores atípicos.

La acción de la bromelina no produjo una disminución drástica por debajo de la línea basal establecida por el control negativo; sin embargo, sí evidenció capacidad para modular la estructura del biofilm y evitar incrementos descontrolados de densidad óptica. Este resultado sugiere que su efecto antibiofilm se orienta más hacia la estabilización o contención de la biomasa que hacia una erradicación inmediata del biofilm bajo las condiciones experimentales evaluadas.

En comparación con el control antibiótico, que obtuvo una media de absorbancia de 0.245 y mostró amplia dispersión de los valores, la bromelina evidenció una respuesta numéricamente más uniforme y predecible. Esta característica respalda su posible empleo como agente coadyuvante en protocolos de desinfección endodóntica, especialmente por su potencial para actuar sobre componentes proteicos de la matriz del biofilm y facilitar la acción de irrigantes o medicaciones intraconducto convencionales.

Finalmente, los resultados permiten considerar a la bromelina como una alternativa promisorio dentro del estudio de agentes naturales con actividad antibiofilm. Aunque su efecto no se manifestó como eliminación total de la biomasa, sí mostró una estabilidad biológica superior a la observada con Bacitracina en términos de respuesta cuantitativa. Por ello, futuras investigaciones deberán evaluar concentraciones mayores, tiempos de contacto más prolongados y formulaciones combinadas que permitan transformar esta modulación del biofilm en reducciones más intensas de la carga bacteriana.

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda desarrollar estudios complementarios con concentraciones de bromelina superiores a 25 $\mu\text{g/mL}$ y con periodos de exposición más prolongados. Esto permitirá determinar si la estabilidad observada en la absorbancia, ubicada alrededor de 0.12 a 0.16 unidades, puede convertirse en una disminución más intensa y sostenida de la biomasa del biofilm de *Enterococcus faecalis*.
2. Se sugiere evaluar formulaciones combinadas de bromelina con irrigantes endodónticos convencionales, como el hipoclorito de sodio o la clorhexidina. Esta línea de estudio permitiría identificar posibles efectos sinérgicos orientados a reducir la dosis de agentes químicos sin comprometer la eficacia antimicrobiana, lo cual sería importante desde el punto de vista de la biocompatibilidad tisular.
3. Se recomienda estandarizar futuros ensayos in vitro mediante metodologías comparables con las utilizadas en investigaciones previas, incluyendo determinación de CMI y CMB, recuento de UFC y medición de densidad óptica. De esta manera, los resultados obtenidos podrán contrastarse con mayor precisión frente a los reportados para hidróxido de calcio, pasta triantibiótica y otros agentes empleados en endodoncia.
4. Finalmente, se recomienda realizar investigaciones in vivo y ensayos clínicos controlados que permitan evaluar no solo la reducción cuantitativa del biofilm, sino también resultados clínicos relevantes, como alivio sintomático, preservación de la pieza dentaria y ausencia de eventos adversos locales o sistémicos. Estos estudios serán necesarios para validar la aplicación de los hallazgos experimentales en la práctica odontológica.

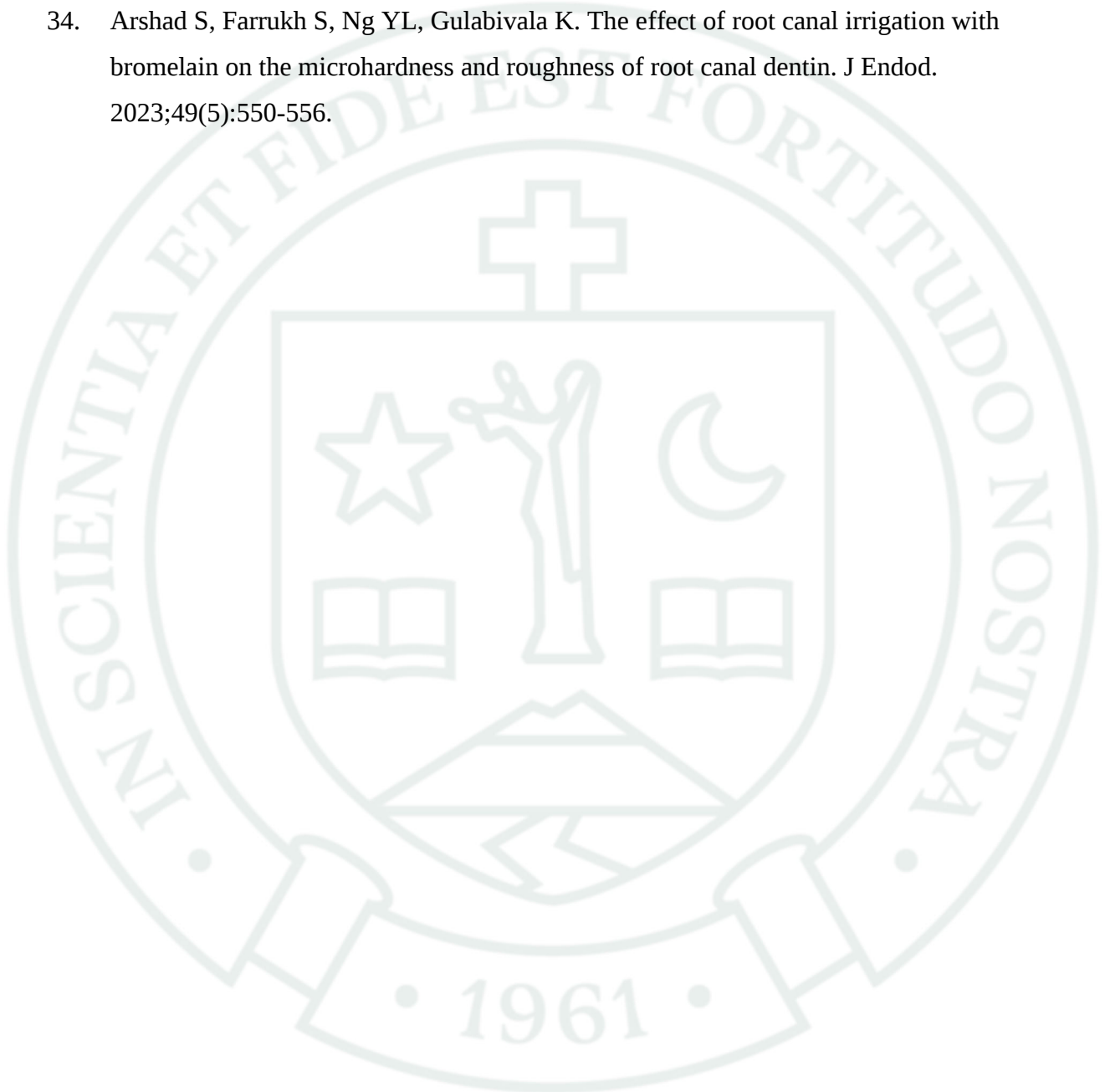
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bhupal SD, Patel SP, Gulve MN, Kolhe SJ, Kolhe PS, Pawar PA. Comparative antimicrobial efficacy of triple antibiotic paste, 2% chlorhexidine gel, and bromelain paste against *Enterococcus faecalis* in mandibular premolars: a randomized clinical trial. *J Conserv Dent Endod*. 2025;28(8):795-802.
2. Praveen NC, Rajesh A, Madan M, Chaurasia VR, Hiremath NV, Sharma AM. In vitro evaluation of antibacterial efficacy of pineapple extract (bromelain) on periodontal pathogens. *J Int Oral Health*. 2014;6(5):96-98.
3. Nikhade P, Chandak M, Manwar N, Chandak R. Assessment of antimicrobial efficacy of bromelain, trypsin and their combination against *Enterococcus faecalis*: an in vitro study. *J Clin Diagn Res*. 2022;16(4):ZC05-ZC09.
4. Balki M, Karatas E. Antibacterial and antibiofilm effects of bromelain against bacteria isolated from root canals. *Niger J Clin Pract*. 2024;27(2):180-186.
5. Lilianny D, Munadzirah E, Yulianti A. Antibacterial activity of bromelain enzyme isolated from pineapple hump (*Ananas comosus*) against *Enterococcus faecalis*. *J Int Dent Med Res*. 2018;11(2):642-646.
6. Chandwani N, Mankar N, Chandak M, Nikhade P. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of bromelain and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis*. *J Datta Meghe Inst Med Sci*. 2022;17(1):123-127.
7. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod*. 2006;32(2):93-98.
8. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod*. 2008;34(11):1291-1301.
9. Pavan R, Jain S, Shraddha, Kumar A. Properties and therapeutic application of bromelain: a review. *Biotechnol Res Int*. 2012;2012:976203.

10. Rathnavelu V, Alitheen NB, Sohila S, Kanagesan S, Ramesh R. Potential role of bromelain in clinical and therapeutic applications. *Biomed Rep.* 2016;5(3):283-288.
11. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS.* 2007;115(8):891-899.
12. Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod.* 2006;32(5):389-398.
13. Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J.* 2009;42(4):288-302.
14. Haapasalo M, Shen Y, Wang Z, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Br Dent J.* 2014;216(6):299-303.
15. Khurshid Z, Zafar MS, Khan RS, Najeeb S, Slowey PD, Rehman IU. Role of salivary biomarkers in oral cancer detection. *Adv Clin Chem.* 2018;86:23-70.
16. Maurer HR. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. *Cell Mol Life Sci.* 2001;58(9):1234-1245.
17. Love RM. *Enterococcus faecalis*: a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J.* 2001;34(5):399-405.
18. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod.* 2002;28(10):689-693.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 13th ed. CLSI standard M02. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
20. O'Toole GA. Microtiter dish biofilm formation assay. *J Vis Exp.* 2011;(47):2437.
21. Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15(5):308-320.

22. Sedgley C, Applegate B, Nagel A, Hall J. Real-time quantitative PCR and culturing analysis of *Enterococcus faecalis* in teeth with secondary apical periodontitis. *J Endod.* 2004;30:324-329.
23. Gomes BP, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, et al. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol.* 2004;19(2):71-76.
24. Chávez de Paz LE. Image analysis software based on color segmentation for characterization of viability and physiological activity of biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(6):1734-1739.
25. Tong Z, Zhang Y, Ling J, Ma J, Huang L, Zhang L. An in vitro study on the effect of free amino acids alone or in combination with nickel-titanium file instrumentation on *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod.* 2014;40(3):400-405.
26. Varilla C, Marcone M, Paiva L, Baptista J. Bromelain, a group of pineapple proteolytic complex enzymes (*Ananas comosus*) and their possible therapeutic and clinical effects: a summary. *Foods.* 2021;10(10):2249.
27. Hikisz P, Bernasinska-Slomczewska J. Beneficial properties of bromelain. *Nutrients.* 2021;13(12):4313.
28. Feres M, Figueiredo LC, Faveri M, Stewart B, de Vizio W. The effectiveness of a preprocedural mouthrinse containing cetylpyridinium chloride in reducing bacteria in the dental office. *J Am Dent Assoc.* 2010;141(4):415-422.
29. Kishen A. Advanced therapeutic options for endodontic biofilms. *Endod Topics.* 2010;22(1):99-123.
30. Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 2001;9(1):34-39.
31. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet.* 2001;358(9276):135-138.

32. Conde NJ, Mendez DA, Arachchi A. Efficacy of natural enzyme based whitening dentifrices: a systematic review. *J Dent Sci.* 2021;16(3):890-900.
33. Agarwal H, Kumar S, Kumar S. Green synthesis of nanoparticles and their applications in dentistry: a review. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2017;7(3):227-233.
34. Arshad S, Farrukh S, Ng YL, Gulabivala K. The effect of root canal irrigation with bromelain on the microhardness and roughness of root canal dentin. *J Endod.* 2023;49(5):550-556.



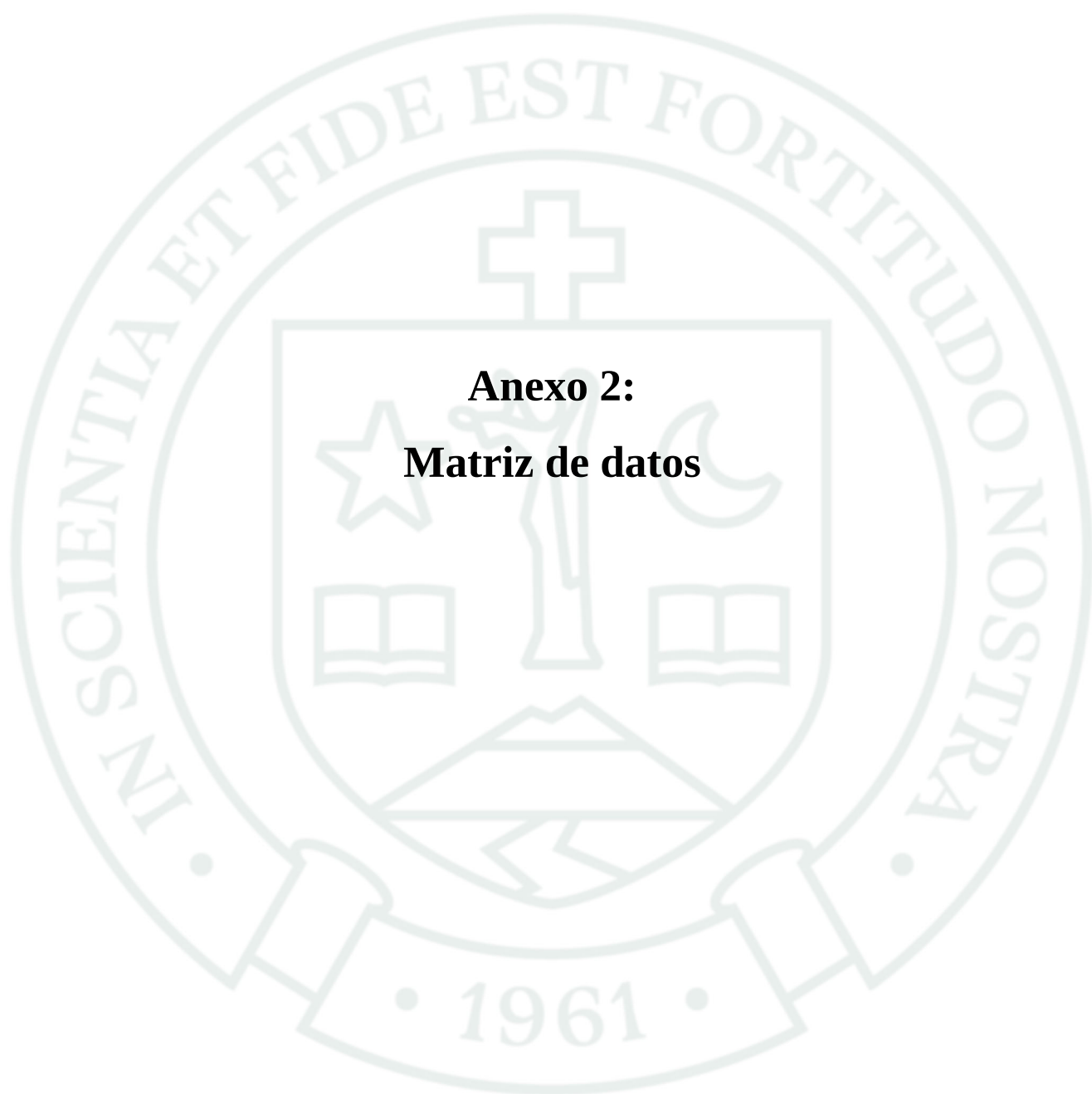


ANEXOS



Anexo 1:
Instrumento de recolección de datos

N°	Bacitracina 1%	10 µg/mL	5 µg/mL	25 µg/mL	12.5 µg/mL	6.25 µg/mL	3.12 µg/mL	1.04 µg/mL	0.52 µg/mL	0.26 µg/mL	0.12 µg/mL	0.06 µg/mL
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												



Anexo 2:
Matriz de datos

La base de datos completa con las ocho réplicas de absorbancia obtenidas en el lector BIORAD PR-4100 a 580 nm, para cada concentración de bromelina y para los controles, se detalla en la Tabla 3 del Capítulo III, así como en el archivo electrónico de respaldo asociado al proyecto.

Nº	Bacitracina 1%	10 µg/mL	5 µg/mL	25 µg/mL	12.5 µg/mL	6.25 µg/mL	3.12 µg/mL	1.04 µg/mL	0.52 µg/mL	0.26 µg/mL	0.12 µg/mL	0.06 µg/mL
1	0.198	0.204	0.170	0.319	0.369	0.154	0.151	0.159	0.168	0.171	0.170	0.169
2	0.191	0.200	0.124	0.131	0.103	0.097	0.105	0.111	0.112	0.114	0.089	0.098
3	0.200	0.125	0.105	0.116	0.083	0.104	0.090	0.093	0.096	0.089	0.093	0.094
4	0.176	0.042	0.145	0.126	0.126	0.131	0.127	0.142	0.128	0.131	0.132	0.119
5	0.273	0.188	0.188	0.131	0.150	0.148	0.135	0.121	0.121	0.138	0.141	0.152
6	0.179	0.149	0.123	0.109	0.117	0.105	0.110	0.098	0.100	0.097	0.100	0.101
7	0.249	0.140	0.148	0.124	0.150	0.135	0.141	0.141	0.135	0.144	0.142	0.138
8	0.492	0.146	0.147	0.142	0.133	0.125	0.125	0.120	0.129	0.136	0.121	0.109

Anexo 3:
Evidencias fotográficas

A continuación, se presenta el registro fotográfico que evidencia las distintas etapas del procedimiento experimental llevado a cabo en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Católica de Santa María.

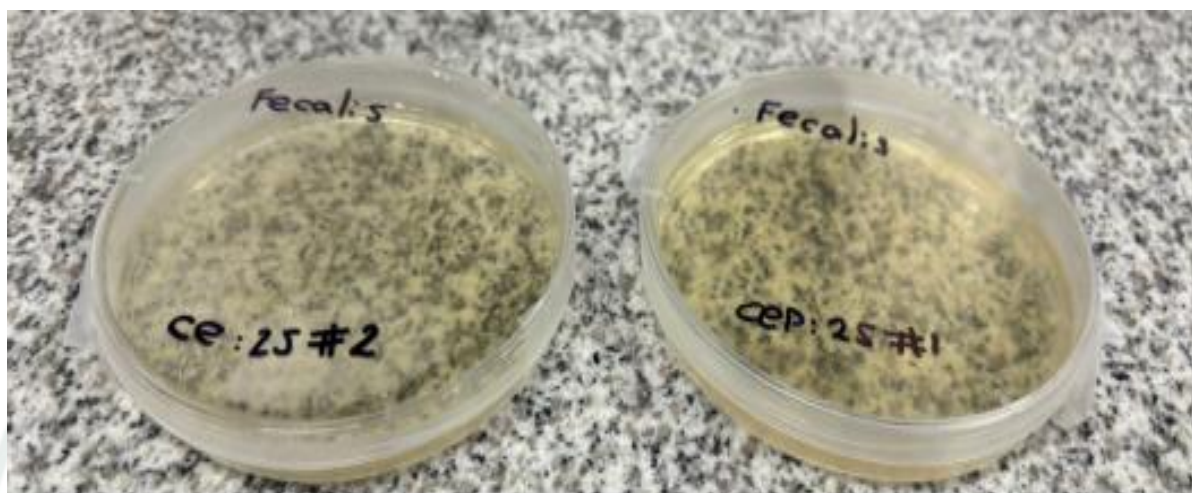


Foto 1: Cultivo de la cepa estándar de *Enterococcus faecalis* (ATCC) en placas de agar para verificación de viabilidad.

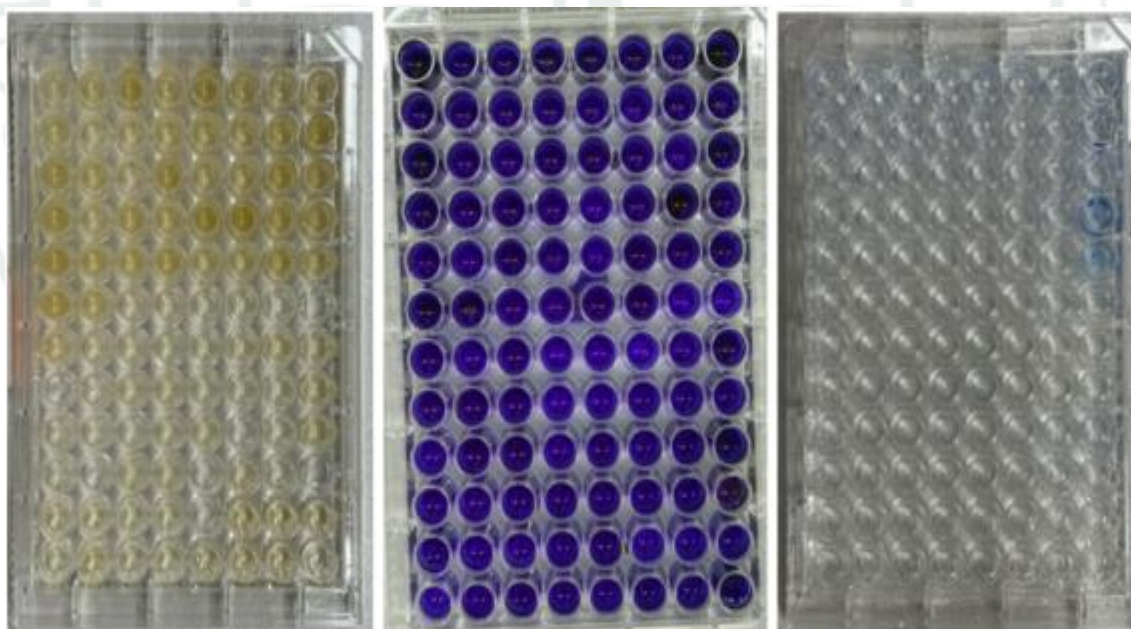


Foto 2: Etapas del ensayo en microplaca de 96 pocillos: (1) tras 20 horas de incubación, (2) tinción con azul de bromofenol al 1% y (3) último lavado con PBS para retirar el tinte no adherido.



Foto 3: Aspecto final de la microplaca tras la solubilización con ácido acético glacial al 30%, previo a la lectura espectrofotométrica en el lector BIORAD PR-4100.



Foto 4: Organización de microtubos y preparación de alícuotas en el área de trabajo



Foto 5: Manipulación de tubos con solución durante el procedimiento experimental.

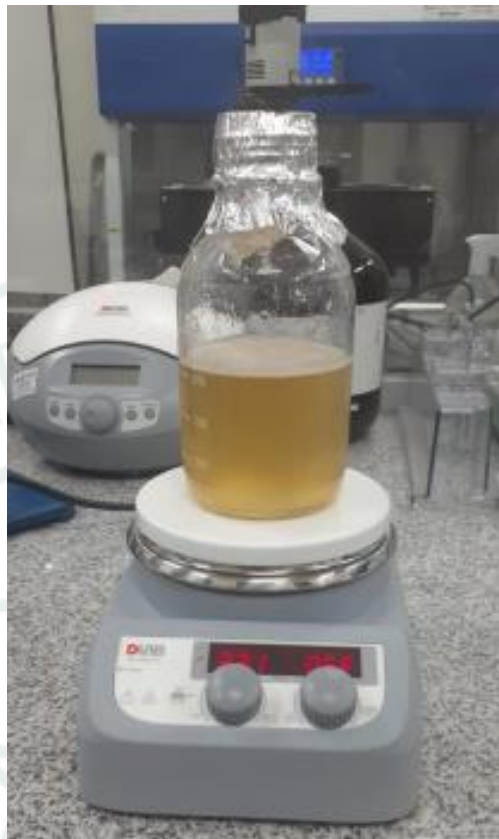
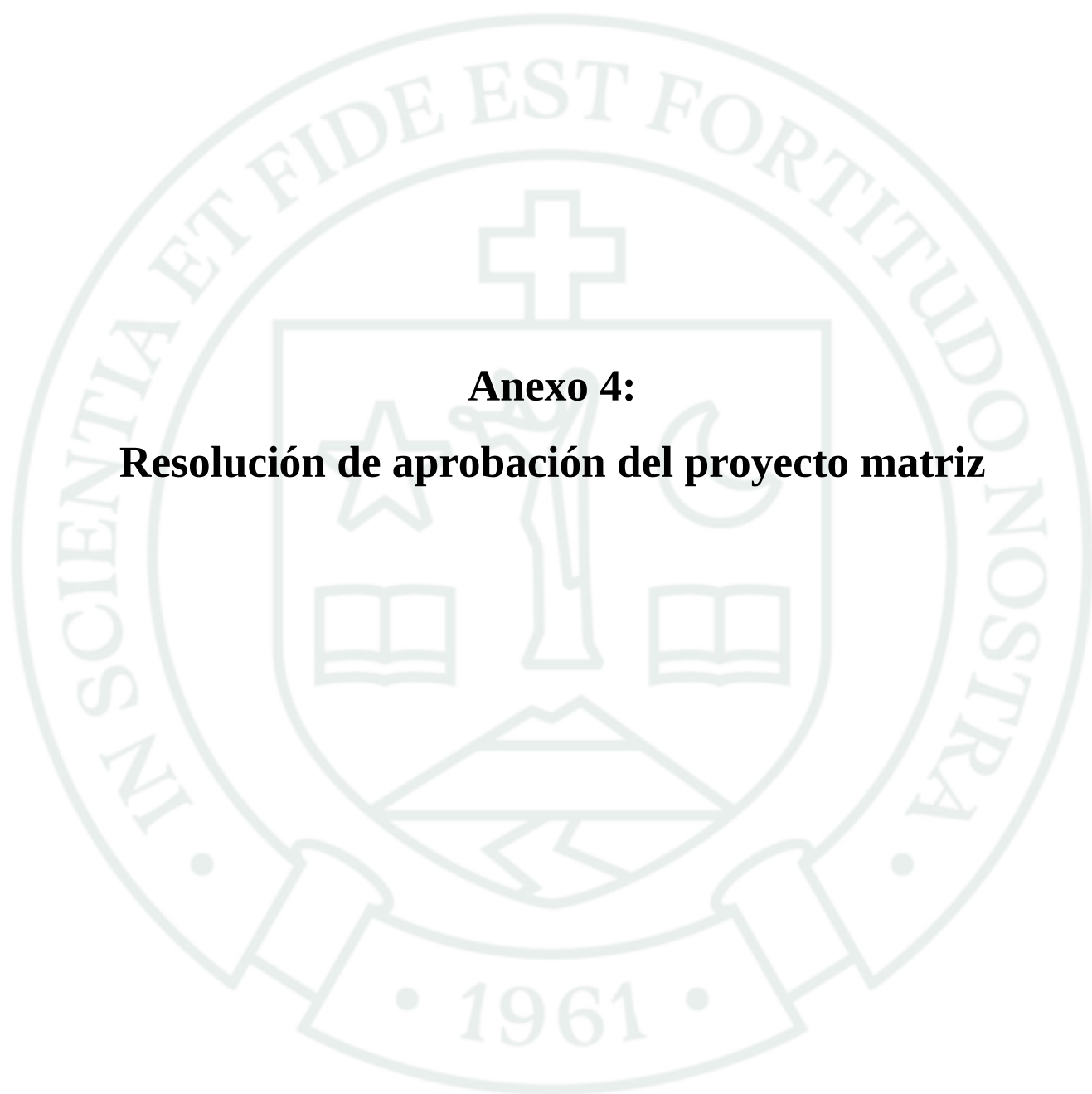


Foto 6: Medio de cultivo



Foto 7: Estandarizacion de la cepa bacteriana



Anexo 4:
Resolución de aprobación del proyecto matriz

La presente investigación se enmarca en el proyecto matriz titulado “Evaluación de la estabilidad, actividad antimicrobiana y antibiofilm de nanopartículas de alginato modificado cargadas con bromelina para su aplicación en soluciones bucales y dispositivos dentarios”, aprobado mediante Resolución N° 3024-R-2024 de la Universidad Católica de Santa María, documento que respalda la viabilidad ética, económica y metodológica del proyecto, así como la disponibilidad de los recursos, la infraestructura y el soporte institucional necesarios para el desarrollo de la investigación.





Anexo 5:
Autorización

DECLARACIÓN JURADA DE AUTORIZACION

El que suscribe *Professor* Luis Alberto Ponce Soto Ph.D. con DNI N°29546298, Docente Investigador y Coordinador del laboratorio de Química de Proteínas del Vicerrectorado de Investigación F-401, de la Universidad Católica de Santa María de Arequipa.

DECLARO:

Que el trabajo de Investigación denominado: ***“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-BIOFILM DE BROMELINA EN ESTADO LIBRE FRENTE A ENTEROCOCCUS FAECALIS, AREQUIPA 2025 ”***, fue realizado por el Alumno: ***VERÓNICA LUCERO PAUCCAR SÁNCHEZ*** y el docente ***Dr. Rufo Alberto Figueroa Banda***, en las instalaciones del laboratorio de Química de Proteínas, bajo mi supervisión.

Se expide la presente a solicitud de los interesados para los fines debidos.

Arequipa, 26 de junio del 2026.

Atentamente,



*Professor Luis Alberto Ponce Soto
Coordinador del Laboratorio de Química de Proteínas
Vicerrectorado de Investigación
Universidad Católica de Santa María*

ORCID: 0000-0001-5976-2913

<https://orcid.org/0000-0001-5976-2913>

Other IDs

Scopus Author ID: 8987609300 ResearcherID:
B-1328-2017.