

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL  
CUSCO**  
**FACULTAD DE MEDICINA HUMANA**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA**



**TESIS**

**COMPARACIÓN IN VITRO DE LA EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA  
DE LA BROMELINA Y EL GLUCONATO DE CLORHEXIDINA AL  
0.12% SOBRE CEPAS DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175,  
CUSCO-2024**

**PRESENTADO POR:**

Br. Hilda Huallpa Cusihuallpa

**PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL  
DE CIRUJANO DENTISTA**

**ASESORA:**

Dra. Sively Luz Mercado Mamani

**CUSCO - PERÚ**  
**2024**

## INFORME DE ORIGINALIDAD

(Aprobado por Resolución Nro. CU-303-2020-UNSAAC)

El que suscribe, Asesor del trabajo de investigación/tesis titulada: Comparación in vitro de la efectividad antibacteriana de la biomelina y el gluconato de clohexidina al 0.12% sobre cepas de Streptococcus mutans ATCC 25175, Cusco - 2024

presentado por: B. Hilda Huallpa Cusiwallpa con DNI Nro.: 77324403, presentado por: ..... con DNI Nro.: ..... para optar el título profesional/grado académico de Crujano Dentista


Informo que el trabajo de investigación ha sido sometido a revisión por 1 veces, mediante el Software Antiplagio, conforme al Art. 6° del **Reglamento para Uso de Sistema Antiplagio de la UNSAAC** y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de 9 %.

Evaluación y acciones del reporte de coincidencia para trabajos de investigación conducentes a grado académico o título profesional, tesis

Porcentaje	Evaluación y Acciones	Marque con una (X)
Del 1 al 10%	No se considera plagio.	<input checked="" type="checkbox"/>
Del 11 al 30 %	Devolver al usuario para las correcciones.	<input type="checkbox"/>
Mayor a 31%	El responsable de la revisión del documento emite un informe al inmediato jerárquico, quien a su vez eleva el informe a la autoridad académica para que tome las acciones correspondientes. Sin perjuicio de las sanciones administrativas que correspondan de acuerdo a Ley.	<input type="checkbox"/>

Por tanto, en mi condición de asesor, firmo el presente informe en señal de conformidad y adjunto la primera página del reporte del Sistema Antiplagio.

Cusco, 14 de agosto de 2024

  
Firma  
Post firma: Sirely Luz Cresado Ramirez  
Nro. de DNI: 43700814  
ORCID del Asesor: 0000-0003-4101-4989

Se adjunta:

1. Reporte generado por el Sistema Antiplagio.
2. Enlace del Reporte Generado por el Sistema Antiplagio: oid: 27259:372717540

NOMBRE DEL TRABAJO

**tesis Hilda Huallpa turnitin.docx**

AUTOR

**hilda huallpa**

RECuento DE PALABRAS

**18036 Words**

RECuento DE CARACTERES

**101329 Characters**

RECuento DE PÁGINAS

**87 Pages**

TAMAÑO DEL ARCHIVO

**9.7MB**

FECHA DE ENTREGA

**Aug 13, 2024 10:13 AM GMT-5**

FECHA DEL INFORME

**Aug 13, 2024 10:14 AM GMT-5****● 9% de similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos.

- 8% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 4% Base de datos de trabajos entregados
- 0% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

**● Excluir del Reporte de Similitud**

- Material bibliográfico
- Coincidencia baja (menos de 15 palabras)

## DEDICATORIA

*A Dios, por obsequiarme esta vida y además por ser mi apoyo principal en los tiempos más adversos en los que quería rendirme. Por mostrarme que todo lo que sucede es con la finalidad de protegerme y mostrarme el camino correcto.*

*A mis padres, Julia y Vicente, por brindarme su apoyo incondicional durante toda mi carrera, por confiar en mí a pesar de las adversidades y principalmente por ser mi motivo principal para buscar el éxito profesional.*

*A mis hermanos, por apoyarme con su granito de arena, que en su momento significó todo para mí y motivo por el cual jamás me rendí.*

*A Haydeé, que más que una hermana fue una amiga y mi ejemplo a seguir durante toda esta travesía. Por enseñarme que el querer es poder, por acompañarme y hacerme sentir valiosa en las adversidades.*

## AGRADECIMIENTOS

*A Dios, por darme la fortaleza tanto a nivel psicológico como físico. Por proteger a mis seres más queridos y a mí.*

*A mis padres, por creer siempre en mí y ofrecerme las oportunidades necesarias para perseguir mis sueños, por su comprensión y paciencia durante las largas horas de estudio.*

*A mis hermanos, por sus palabras de aliento y confianza que han sido fuente constante de motivación. Gracias por estar siempre a mi lado, celebrando cada pequeño logro y brindándome el empuje necesario en los momentos de adversidad.*

*Mi gratitud es también para mi querida Universidad San Antonio Abad del Cusco y a mi añorada Escuela Profesional de Odontología por proporcionarme los recursos y el ambiente académico necesarios para llevar a cabo mi formación profesional para ser una profesional competente.*

*Agradezco profundamente a mi asesora de tesis, la Dra. Sively Luz Mercado Mamani, por su invaluable orientación, paciencia y apoyo constante a lo largo de este proceso. Sus conocimientos y consejos han sido fundamentales para la realización de esta tesis.*

*Al doctor Carlos Alberto Serrano Flores, por brindarme su tiempo y conocimiento para la correcta ejecución de parte de esta tesis*

*Al doctor Mario Urrunaga Ormachea, por darme las facilidades de uso del laboratorio para la realización de esta tesis.*

*Al biólogo Victor Andres Tapia Puma por asesorarme y supervisar el procedimiento experimental de la presente tesis.*

*Extiendo también mi gratitud a los miembros del jurado calificador de la presente tesis, por sus valiosas críticas y recomendaciones que han enriquecido significativamente este estudio.*

*Finalmente, agradezco a todas las personas que, de una manera u otra, contribuyeron a la culminación de esta tesis. Este logro también les pertenece a ustedes.*

*Gracias.*

# ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTOS .....	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
ÍNDICE DE ANEXOS .....	VIII
SIGLAS Y ABREVIATURAS.....	IX
RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I.....	5
PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN .....	5
1.1. CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA .....	5
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA .....	6
1.3. OBJETIVOS .....	7
1.4. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN .....	7
CAPÍTULO II.....	10
MARCO TEÓRICO .....	10
2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN .....	10
2.2. BASES TEÓRICAS .....	13
2.3. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS:.....	27
CAPITULO III.....	29
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	29
3.1. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN .....	29
3.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN .....	30
3.3. MUESTRA.....	30
3.5. VARIABLES DE ESTUDIO.....	31
3.6. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES.....	32
3.7. HIPÓTESIS .....	33
3.8. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS .....	33
3.9. PROCEDIMIENTOS.....	33
3.10. PLAN DE ANÁLISIS .....	38
3.11. ASPECTOS ÉTICOS DE LA INVESTIGACIÓN .....	39
CAPÍTULO IV .....	40
RESULTADOS .....	40
CAPÍTULO V .....	47

DISCUSIÓN Y COMENTARIOS.....	47
CONCLUSIONES.....	51
SUGERENCIAS Y RECOMENDACIONES .....	52
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	54
ANEXOS.....	60

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA N° 01</b> .....	<b>40</b>
PRUEBA DE NORMALIDAD	
<b>TABLA N° 02</b> .....	<b>41</b>
PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE MEDIAS A LAS 24 y 48 HORAS	
<b>TABLA N° 03</b> .....	<b>42</b>
COMPARACIÓN DE LA EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA BROMELINA Y EL GLUCONATO DE CLORHEXIDINA SOBRE CEPAS DE <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 A LAS 24 y 48 HORAS	
<b>TABLA N° 04</b> .....	<b>44</b>
COMPARACIÓN DE LA EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA BROMELINA Y EL GLUCONATO DE CLORHEXIDINA SOBRE CEPAS DE <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 A LAS 24 y 48 HORAS SEGÚN SU CONCENTRACIÓN	
<b>TABLA N° 05</b> .....	<b>46</b>
EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA BROMELINA Y EL GLUCONATO DE CLORHEXIDINA SOBRE CEPAS DE <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 A LAS 24 y 48 HORAS	



## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO N° 01</b> .....	<b>61</b>
MATRIZ DE CONSISTENCIA	
<b>ANEXO N° 02</b> .....	<b>62</b>
FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS	
<b>ANEXO N° 03</b> .....	<b>63</b>
AUTORIZACIÓN DEL USO DE LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES	
<b>ANEXO N° 04</b> .....	<b>64</b>
AUTORIZACIÓN DEL USO DE LABORATORIO DE TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA	
<b>ANEXO N° 05</b> .....	<b>65</b>
CONSTANCIA DEL AISLAMIENTO DE LA ENZIMA BROMELINA	
<b>ANEXO N° 06</b> .....	<b>66</b>
CONSTANCIA DE LA EJECUCION Y SUPERVISION DEL PROYECTO	
<b>ANEXO N° 07</b> .....	<b>67</b>
PRUEBA DE CALIBRACIÓN DEL INVESTIGADOR	
<b>ANEXO N° 08</b> .....	<b>68</b>
FLUJOGRAMA 01: OBTENCIÓN DE LA ENZIMA BROMELINA	
<b>ANEXO N° 09</b> .....	<b>69</b>
CERTIFICADO DE ANÁLISIS DE STREPTOCOCCUS MUTANS ATCC 25175	
<b>ANEXO N° 10</b> .....	<b>70</b>
FOTOGRAFÍAS DEL AISLAMIENTO DE LA ENZIMA BROMELINA	
<b>ANEXO N° 11</b> .....	<b>74</b>
FOTOGRAFÍAS DEL PROCEDIMIENTO MICROBIOLÓGICO	
<b>ANEXO N° 12</b> .....	<b>79</b>
INFORME DE PRUEBA PILOTO	

## SIGLAS Y ABREVIATURAS

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**ATCC:** American Type Culture Collection

**CMI:** Concentración Mínima Inhibitoria

**CMB:** Concentración Mínima Bactericida

**EC:** Comisión de Enzimas

**PG:** Prostaglandina

**ATPS:** Sistema Bifásico Acuoso

**PEG:** Polietilenglicol

**CHX:** Clorhexidina

**RAM:** Reacción Adversa a Medicamentos

**NCCLS:** Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico

**TLC:** Cromatografía En Capa Fina

**UNSAAC:** Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco

**mg:** miligramos

**mL:** mililitros

**rpm:** revolución por minuto

**mm:** milímetros

## RESUMEN

**Objetivo:** La presente investigación tuvo como propósito comparar la efectividad antibacteriana de la bromelina y el gluconato de clorhexidina al 0.12% sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

**Métodos:** Se efectuó un estudio cuasi-experimental in vitro, de corte longitudinal y enfoque explicativo. Se aisló la bromelina por el método de precipitación con etanol al 50%; posteriormente, se prepararon las soluciones a las concentraciones del 1%, 5% y 10 % de la bromelina con agua destilada estéril. La cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 fue adquirida del laboratorio GenLab del Perú S.A.C.

Se aplicó el método de disco difusión para la evaluación de la efectividad antibacteriana, empleándose 10 repeticiones para cada grupo de estudio. Se utilizó la técnica observacional para medir los halos de inhibición a las 24 y 48 horas, que fueron registrados en la ficha de observación y evaluados mediante la escala de Duraffourd.

**Resultados:** A las 24 horas, los halos de inhibición de la bromelina al 5% y 10% fueron de 15.53 mm  $\pm$  0.52715 mm y 16.75 mm  $\pm$  0.83566 mm, respectivamente, frente a 11.75 mm  $\pm$  0.35963 mm del gluconato de clorhexidina. A las 48 horas, la bromelina al 5% y 10% mostró halos de 17.21 mm  $\pm$  0.91706 mm y 18.92 mm  $\pm$  1.24168 mm, respectivamente, comparado con 11.95 mm  $\pm$  0.41433 mm del gluconato de clorhexidina. La capacidad inhibidora de bromelina al 1% fue menos efectiva.

**Conclusión:** La bromelina, en concentraciones del 5% y 10%, demostró una capacidad superior para inhibir el crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, superando al gluconato de clorhexidina al 0.12% tanto a las 24 como a las 48 horas.

**Palabras clave:** Efectividad, Clorhexidina, *Streptococcus mutans*.

## ABSTRACT

**Objective:** The purpose of this research was to compare the antibacterial effectiveness of bromelain and 0.12% chlorhexidine gluconate on *Streptococcus mutans* ATCC 25175 strains.

**Methodology:** A quasi-experimental, longitudinal, in vitro study with an explanatory approach was carried out. Bromelain was isolated by the 50% ethanol precipitation method; subsequently, solutions at concentrations of 1%, 5% and 10% of bromelain were prepared with sterile distilled water. The *Streptococcus mutans* ATCC 25175 strain was acquired from the GenLab del Perú S.A.C. laboratory.

The diffusion disc method was applied to evaluate antibacterial effectiveness, using 10 replicates for each study group. The observational technique was used to measure the inhibition halos at 24 and 48 hours, which were recorded in the observation card and evaluated using the Duraffourd scale.

**Results:** At 24 hours, the inhibition halos of 5% and 10% bromelain were  $15.53 \text{ mm} \pm 0.52715 \text{ mm}$  and  $16.75 \text{ mm} \pm 0.83566 \text{ mm}$ , respectively, versus  $11.75 \text{ mm} \pm 0.35963 \text{ mm}$  for chlorhexidine gluconate. At 48 hours, 5% and 10% bromelain showed halos of  $17.21 \text{ mm} \pm 0.91706 \text{ mm}$  and  $18.92 \text{ mm} \pm 1.24168 \text{ mm}$ , respectively, compared to  $11.95 \text{ mm} \pm 0.41433 \text{ mm}$  for chlorhexidine gluconate. The inhibitory capacity of 1% bromelain was less effective.

**Conclusion:** Bromelain, at concentrations of 5% and 10%, demonstrated superior ability to inhibit the growth of *Streptococcus mutans* ATCC 25175, outperforming 0.12% chlorhexidine gluconate at both 24 and 48 hours.

**Key words:** Effectiveness, Chlorhexidine, *Streptococcus mutans*.

## INTRODUCCIÓN

La caries dental se produce por múltiples factores, es descrita por la OMS como un proceso patológico localizado que se inicia con la pérdida de minerales de los tejidos duros del diente para posteriormente dar lugar a la caries propiamente dicha, este proceso se debe a la acción de los ácidos que se fermentan por la acción de bacterias cariogénicas, especialmente el *Streptococcus mutans* (1).

El *Streptococcus mutans* es una bacteria que forma parte de la microflora oral de la cavidad oral en condiciones normales. Sin embargo, tiene un papel principal en el inicio de la caries dental, aunque no es la única responsable de su desarrollo, se ha demostrado que esta bacteria puede modificar el entorno bucal al formar una capa rica en polímeros extracelulares y con un pH bajo. Esta alteración crea un ambiente propicio para que otras bacterias que también producen ácidos y pueden prosperar en ambientes ácidos encuentren un lugar favorable para desarrollarse (2).

Existen muchas formas de impedir o limitar la formación de la placa dental, el mecanismo más eficaz es el control mecánico (cepillado y uso de hilo dental) pero en ocasiones este no es suficiente para llegar a todas las superficies dentarias; por lo que, es necesario complementarlo con el control químico a través de sustancias químicas, el estándar de oro hoy en día es la clorhexidina debido a sus propiedades antibacterianas, la baja toxicidad con la mucosa oral y la sustantividad que posee. Sin embargo, tiene algunas desventajas como el cambio de coloración en los dientes o la disgeusia.(3)

Históricamente, los remedios naturales en base a plantas han sido utilizados en el tratamiento de enfermedades dentales. Diversas partes de las plantas se emplean para abordar problemas como las enfermedades periodontales, la higiene bucal, la prevención de caries y trastornos de las mucosas. Según la OMS, el 80% de la población perteneciente a los países en desarrollo utilizan los remedios naturales para tratar problemas dentales. Es común en zonas rurales que las personas prefieran las plantas medicinales debido a su fácil acceso, bajo costo y menores efectos secundarios en comparación con los medicamentos convencionales (4).

Dentro de estos remedios naturales, se encuentra la piña, que es una fruta que está incluida en la dieta de muchas personas, debido a su sabor agradable y dulce;

además, de aportar nutrientes. Esta fruta pertenece a la familia Bromeliaceae, un gran porcentaje de sus componentes como las hojas, tallo, corteza y corona se desechan; sin embargo, estudios han demostrado que el tallo tiene como componente principal a la bromelina, enzima proteolítica que causa especial interés en el campo médico por sus múltiples propiedades antiinflamatorias, antibacterianas, antioxidantes, anticancerígenas y fibrinolíticas (5) (6).

Por consiguiente, la presente investigación tiene como objetivo evaluar la comparación la eficacia antibacteriana de la bromelina sobre cepas de *Streptococcus mutans* con el gluconato de clorhexidina al 0.12% y a partir de los resultados obtenidos recomendar el uso de este principio activo en productos químicos para la prevención de la caries dental.

# CAPÍTULO I

## PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

### 1.1. CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA

Según el estudio de la carga mundial de morbilidad del 2019, la caries dental en la dentición adulta es la más prevalente en la actualidad. La caries dental en la dentición permanente afecta a 2000 millones de personas y en dientes deciduos a 514 millones de niños (7). Estas cifras son alarmantes, teniendo en cuenta que esta enfermedad es prevenible y tratable con un diagnóstico precoz. A pesar de que se han tomado medidas preventivas a nivel global, la prevalencia de la caries dental sigue en aumento a causa de múltiples factores; como la urbanización, escasez de acceso a una atención odontológica integral, disponibilidad elevada de alimentos ricos en azúcar, entre otros (8).

El *Streptococcus mutans* es el agente causal predominante en la formación de la placa dental, la que interviene en el desarrollo de la caries. Para poder controlar la placa se utilizan los métodos mecánicos (cepillado dental), pero en ocasiones este método es insuficiente debido a múltiples factores propios o externos del paciente, por lo que es necesario complementarlo con métodos químicos (enjuagues bucales) para un control bacteriano más amplio.

Hoy en día, la clorhexidina es el estándar de oro para el control bacteriano como enjuague bucal, debido a su amplio espectro y sus muchas propiedades; sin embargo, esta ha demostrado algunos efectos adversos; además, de su elevado precio para la población en general, por lo que su uso está limitado.

En los últimos años se han propuesto aditivos naturales para obtener productos con propiedades similares o superiores a la clorhexidina, que además tengan menos efectos negativos en la cavidad oral. Dentro de estos productos se tiene a la bromelina, una enzima proteolítica que deriva tanto del tallo como del fruto de la planta de la piña (*Ananas comosus*), siendo el tallo la parte de mayor concentración de esta enzima (6). Una de las razones por lo que la bromelina ha sido estudiada en el campo de la odontología es por su acción frente a los patógenos bucales, esta acción antibacteriana se debe a la presencia de proteasas y flavonoides en su composición(5).

Teniendo en cuenta que la bromelina se extrae de un fruto, se espera que esta tenga mayor biocompatibilidad con la mucosa oral; además, de que sus efectos adversos a su uso continuo sean mínimos. Por otro lado, buscamos abordar un desafío de salud pública de gran relevancia global, como es la caries dental, al estudiar y evaluar la efectividad antibacteriana de la bromelina, ofreceremos una solución más efectiva, accesible y sostenible en comparación con los métodos existentes. Además, buscamos impulsar avances significativos en la odontología preventiva y promover la salud oral de la población, contribuyendo así al bienestar general y atenuando la carga financiera derivada del tratamiento de la caries dental.

Finalmente, con esta investigación buscamos resolver problemas ambientales al reducir los residuos de la piña (*Ananas comosus*), promover prácticas sostenibles en la agricultura y la industria, generar beneficios económicos para la región Cusco mediante el impulso laboral y la atracción de capital, valorizar los recursos locales al convertir los desechos en productos de valor agregado, y contribuir al desarrollo sostenible alineándose con los Objetivos de Desarrollo Sostenible propuestos por la Organización de las Naciones Unidas.

## **1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

### **1.2.1. Problema general**

¿Cuál es la efectividad antibacteriana de la bromelina en comparación al gluconato de clorhexidina al 0,12% sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175?

### **1.2.2. Problemas específicos**

1. ¿Cuál es la efectividad antibacteriana de la bromelina al 1% sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a las 24 y 48 horas?
2. ¿Cuál es la efectividad antibacteriana de la bromelina al 5% sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a las 24 y 48 horas?
3. ¿Cuál es la efectividad antibacteriana de la bromelina al 10% sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a las 24 y 48 horas?
4. ¿Cuál es la efectividad antibacteriana del gluconato de clorhexidina al 0,12% sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a las 24 y 48 horas?



### **1.3. OBJETIVOS**

#### **1.3.1 Objetivo general**

Evaluar la efectividad antibacteriana de la bromelina en comparación al gluconato de clorhexidina al 0,12% sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

#### **1.3.2. Objetivos específicos**

1. Evaluar la efectividad antibacteriana de la bromelina al 1% sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a las 24 y 48 horas.
2. Evaluar la efectividad antibacteriana de la bromelina al 5% sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a las 24 y 48 horas.
3. Evaluar la efectividad antibacteriana de la bromelina al 10% sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a las 24 y 48 horas.
4. Determinar la efectividad antibacteriana del gluconato de clorhexidina sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a las 24 y 48 horas.

### **1.4. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN**

El uso de remedios naturales para tratar problemas de salud bucodental puede considerarse una opción lógica en comparación con los enfoques farmacéuticos. Esto se debe a que estos remedios naturales suelen estar fácilmente disponibles, son más económicos y tienden a tener menores reacciones secundarias. La evidencia detrás de esta afirmación es que, en muchos casos, las plantas y sustancias naturales han demostrado tener propiedades beneficiosas para tratar diversas afecciones orales y dentales. Además, estas alternativas naturales a menudo son más accesibles y económicas que los medicamentos tradicionales. Al optar por remedios naturales, se pretende aprovechar las propiedades terapéuticas de la naturaleza de manera más sostenible y menos invasiva.

Además, la mención de "menores reacciones secundarias" sugiere que, en comparación con algunos medicamentos farmacéuticos, los remedios naturales pueden ser más suaves en términos de posibles reacciones adversas.

El enfoque de esta investigación está en la bromelina, agente que se ha utilizado en varias áreas de la odontología, por la gran variedad de propiedades que posee, por lo

que se busca evaluar su efectividad antibacteriano sobre cepas de *Streptococcus mutans* y partiendo de los resultados de estos poder recomendar su uso como principio activo en agentes orales para la gestión química de la placa dental.

#### **1.4.1. Relevancia Social**

La inclusión de bromelina como agente antibacteriano no solo ofrece una alternativa efectiva para el tratamiento de infecciones bacterianas, sino que también contribuye a minimizar el impacto de la caries dental y a mejorar la calidad de vida de los pacientes. Además, al optar por un principio activo de origen natural, se promueve un enfoque más sostenible y responsable con el medio ambiente. Esta combinación de beneficios no solo optimiza los resultados clínicos, sino que también genera una experiencia positiva para el paciente, fortaleciendo la confianza en tratamientos que cuidan tanto su salud como el entorno en el que viven.

#### **1.4.2. Valor teórico**

La presente investigación proporcionará evidencia científica; debido a que, este producto aún no ha sido estudiado a gran profundidad como agente antibacteriano.

La investigación sobre la bromelina es fundamental para generar nuevos conocimientos que permitan desarrollar fármacos y productos accesibles que la utilicen como principio activo. Este estudio se centra en evaluar su efectividad antibacteriana en comparación con agentes estándar como el gluconato de clorhexidina, con el objetivo de determinar si la bromelina puede ser una alternativa viable o incluso superior en la prevención de caries. Además, se investiga la seguridad de su uso en la cavidad oral, así como las concentraciones y tiempos de exposición necesarios para obtener una actividad antibacteriana significativa. Asimismo, se exploran posibles aplicaciones en productos dentales y se analiza su impacto en la salud bucal, incluyendo su efecto en la gingivitis y la flora bacteriana oral, ampliando así el conocimiento en esta área.

#### **1.4.3. Conveniencia**

Este estudio implica el uso de los recientes avances tecnológicos; lo cual, facilita el estudio en condiciones óptimas y controladas. Al ser un estudio experimental que beneficia el campo de la investigación tecnológica, se cuenta con mayor accesibilidad y permisos en el uso de los laboratorios de las instituciones vinculadas al investigador. Por otro lado, el estudio de nuevos productos para prevenir el inicio de la caries dental,

como es el caso de la bromelina, resulta en una inversión justificada, considerando que esta enfermedad conlleva a altos costos sanitarios por su elevada incidencia.

#### **1.4.4. Implicancias prácticas**

Al poder corroborar las escasas investigaciones sobre la bromelina como agente antibacteriano, da pie a poder utilizarla como principio activo en productos odontológicos como enjuagues o pastas dentales, para reducir la incidencia de caries.

Además, tratándose de un producto natural este se convierte en una medida preventiva accesible para toda la sociedad, independientemente de su condición socioeconómica. Por otro lado, reduciría significativamente las intervenciones más invasivas y costosas en el tratamiento de la caries dental.

#### **1.4.5. Utilidad metodológica**

Propone un nuevo método para disminuir el número de agentes patógenos en la boca, además de incluir un instrumento para evaluar la efectividad de la bromelina, el cual puede ser utilizado en investigaciones futuras.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

##### 2.1.1. Antecedentes internacionales

**PEREIRA M. (Rio de Janeiro, 2022)** en su estudio titulado “Análisis de la actividad antibacteriana y antibiofilm de la bromelina en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*”; el objetivo fue identificar la posible actividad de la bromelina frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, patógenos oportunistas de alta relevancia clínica, capaces de formar biofilms comúnmente asociados al desarrollo de infecciones crónicas. En este estudio se evaluaron cuarenta y cuatro cepas de *P. aeruginosa* y cuarenta y tres cepas de *S. aureus* aisladas de heridas crónicas y hemocultivos de origen humano. La actividad antibacteriana de la bromelina se evaluó mediante la prueba de dilución en agar de Mueller-Hinton para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y mediante la realización de curvas de crecimiento. La actividad antibiofilm se analizó mediante ensayos de formación de biofilm en presencia de bromelina al 1% y mediante la exposición de biofilms maduros a bromelina al 1%. Los resultados especificaron que la bromelina no demostró actividad antibacteriana contra *P. aeruginosa* y *S. aureus* en sus diferentes concentraciones ensayadas (CMI > 4 mg/mL). No se ha identificado una actividad potencial antibiofilm de la bromelina contra *P. aeruginosa*. Sin embargo, la bromelina mostró una acción antibiofilm significativa contra las cepas de *S. aureus* en el estudio, especialmente aquellas aisladas de heridas crónicas, que en su mayoría fueron resistentes a la meticilina. Se concluyó que la bromelina puede representar una alternativa prometedora para el control de biopelículas de *S. aureus*, particularmente en el contexto del cuidado de heridas (9).

**LIMA C. (Rio de Janeiro, 2016)** en su estudio titulado “Evaluación de la actividad proteolítica y antimicrobiana de la bromelina en el proceso de adhesión a la estructura de la dentina”; el objetivo fue evaluar la influencia de la actividad proteolítica de la bromelina en los procesos de fuerza de unión y nanoinfiltración de los sistemas adhesivos Adper Single Bond 2 (SB) y Prime Bond 2.1, así como su efecto antimicrobiano frente a *Streptococcus mutans*. Se utilizaron soluciones de bromelina

al 0,5% y 1% para la desproteización de la dentina, con hipoclorito de sodio al 10% como control. Se realizaron pruebas en 80 incisivos bovinos y 60 discos de resina/adhesivo para evaluar la fuerza de adhesión y la nanoinfiltración. Los resultados mostraron que la bromelina al 1% mejoró la desproteización y el rendimiento del sistema adhesivo. Además, todas las soluciones de bromelina redujeron la actividad metabólica y la producción de ácido láctico por la biopelícula de *S. mutans*. Se concluyó que la bromelina al 1% demostró ser eficaz en la desproteización y mejora del rendimiento adhesivo, así como en la reducción de la actividad microbiana de *S. mutans* (10).

**PRAVEEN, et al. (2014)**, en su estudio titulado “Evaluación in vitro de la eficacia antibacteriana del extracto de piña (bromelina) sobre patógenos periodontales”; el objetivo fue evaluar la eficacia antibacteriana de la bromelina en microorganismos periodontales aeróbicos y anaeróbicos. Materiales y métodos: La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de bromelina se probó en cepas aisladas de *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis* utilizando el método de caldo de dilución seriado. Los resultados especificaron que el *S. mutans* mostró sensibilidad a la concentración más baja de 2 mg/ml en comparación con *E. faecalis* (31,25 mg/ml), mientras que *P. gingivalis* mostró sensibilidad a la concentración más baja de 4,15 mg/ml en comparación con *A. actinomycetemcomitans* (16,6 mg/ml). Se concluyó que la bromelina ejerce un efecto antibacteriano contra potentes patógenos periodontales; por lo tanto, puede usarse como agente antibacteriano. Sin embargo, es necesario realizar más ensayos para validar este resultado (11).

### **2.1.2. Antecedentes nacionales**

**CHAMORRO MR. (Lima, 2023)** en su tesis titulada, “Efectividad antibacteriana del extracto etanólico de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Un estudio in vitro”; el objetivo fue determinar la efectividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Se realizaron pruebas comparativas con concentraciones del extracto etanólico de eucalipto (25%, 50%, 75%, y 100%) y clorhexidina al 0.12%, a las 24 y 48 horas, mediante el método de Kirby Bauer. Los resultados mostraron que el extracto al 100% exhibió el mayor halo inhibitorio (21.67

mm y 20.12 mm), siendo significativamente mayor que la clorhexidina al 0.12% (17.50 mm y 17.04 mm respectivamente), ( $p < 0.05$ ). Se concluyó que el extracto etanólico de eucalipto al 100% fue el más efectivo a las 24 y 48 horas en comparación a los otros dos grupos (12).

**BELSUZARRI C. y VALDERRAMA D. (Huánuco, 2015)** “Efectividad antibacteriana del extracto etanólico de *Pelargonium x hortorum* L.H. Bailey sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis*”; el objetivo fue evaluar la efectividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de *Pelargonium x hortorum* L. H Bailey en diferentes concentraciones sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 y compararlos con el gluconato de clorhexidina al 0,12%. La metodología estableció un enfoque cuantitativo y un diseño experimental in vitro. Se utilizó el método de difusión en pozo, con 25 muestras de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 incubadas en condiciones anaeróbicas a 37°C durante 72 horas. Se empleó Dimetilsulfóxido (DMSO) para diluir el extracto, y se incluyó agua destilada como control negativo. Los halos de inhibición se midieron a las 72 horas y se registraron. Se realizó un análisis fitoquímico preliminar mediante el ensayo a la gota. Los resultados mostraron que el promedio del diámetro del halo de inhibición del extracto etanólico de *Pelargonium x hortorum* a 6,25 mg/ml es de 3,68 mm; a 12,5 mg/ml es de 5,50 mm; a 25 mg/ml es de 7,18 mm y a 50 mg/ml es 11,44 mm y el gluconato de Clorhexidina al 0,12% fue 10,32 mm. Se concluyó que el extracto etanólico de *Pelargonium x hortorum* a una concentración de 50 mg/ml mostró una eficacia antibacteriana superior a la del gluconato de Clorhexidina al 0,12% (13).

**DELGADO EM. y TAPIA Y.(Lima, 2021)** en su tesis titulada, “Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (Tara) frente a *Streptococcus mutans*”, el objetivo fue demostrar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (Tara) frente a *Streptococcus mutans*. Se utilizó la maceración con etanol de 96° para obtener extractos etanólicos al 50%, 75% y 100% de *Caesalpinia spinosa* (Tara). Para evaluar el efecto antibacteriano contra *Streptococcus mutans*, se empleó el método de difusión en pozo con agar. Los valores promedio de los extractos etanólicos de *Caesalpinia spinosa* (Tara) frente a *Streptococcus mutans* fueron 23.97mm + 0.05 para el extracto al 50%, 24.74mm + 0.04 para el 75%, y 26.2mm + 0.05 para el 100%. El control negativo mostró un halo de inhibición de

6.02mm + 0.08, mientras que el control positivo con clorhexidina al 1% fue de 36.30mm + 0.05. Se evidenció el efecto antibacteriano de los extractos etanólicos al 50%, 75% y 100% de *Caesalpinia spinosa* (Tara) contra *Streptococcus mutans* (14).

**LOPEZ MV. (Trujillo, 2018)** en su tesis titulada, "Efectividad antibacteriana in vitro del gel de *Burm. f.* (aloe vera) y extracto hidroetanólico de *Matricaria chamomilla* (manzanilla) sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC"; el objetivo fue comparar la efectividad antibacteriana entre el gel de *Aloe vera* y el extracto etanólico de Manzanilla sobre cepas de *Streptococcus mutans*. La metodología fue de tipo cuantitativo, diseño prospectivo, longitudinal, analítico y experimental. Se utilizaron varias concentraciones de ambos productos, y se aplicaron a las cepas cultivadas en condiciones específicas. Se midió la sensibilidad bacteriana mediante la técnica de discos de difusión, los resultados evidenciaron que tanto el gel de *Aloe vera* al 50% como el extracto etanólico de Manzanilla al 25% mostraron efectos antibacterianos, siendo este último más efectivo con halos de inhibición de 10.2 mm. Se concluyó que el extracto etanólico de Manzanilla al 25% presentó el mejor efecto antibacteriano frente a las cepas de *Streptococcus mutans* (15).

## **2.2. BASES TEÓRICAS**

### **2.2.1. BROMELINA**

#### **2.2.1.1. Historia**

La bromelina es una enzima que fue descubierta por primera vez en 1891 por Vicente Marcano, un químico venezolano. Aunque se iniciaron los estudios para aislar y analizar esta enzima en 1894, no fue hasta 1957 que se comenzó a producir comercialmente. Este proceso se desencadenó cuando Heinecke descubrió que el tallo de la piña contenía más bromelina que la fruta en sí. Esto resultó en una situación interesante, ya que el subproducto de desecho, la bromelina, se volvió más comercialmente valioso que la propia fruta de la piña. Desde entonces, la bromelina se ha utilizado en diversas aplicaciones comerciales debido a sus propiedades enzimáticas beneficiosas (6) (16).

### **2.2.1.2. Estructura y bioquímica**

La bromelina es una enzima proteasa obtenida de la piña (*Ananas comosus*), aunque existen otras enzimas proteolíticas en la planta de piña, como la comosina y la anaína, la bromelina es la más investigada. Esta enzima, que pertenece a la familia Bromeliaceae, descompone las proteínas en aminoácidos y se clasifica como cisteína proteinasa debido a la presencia de cisteína tiol en su sitio activo (16). Las dos formas predominantes son la bromelina presente en el tallo (EC 3.4.22.32) de la piña y la bromelina del fruto (EC 3.4.22.33) de la misma (17). En la bromelina cruda se encuentran varias otras enzimas y elementos como endopeptidasas de cisteína, fosfatasas, peroxidasas, carbohidratos, ribonucleasas, inhibidores de proteasas, celulasas, glicoproteínas y calcio orgánicamente unido. Su función depende en parte de una fracción de sulfhidrilo(16) (18).

### **2.2.1.3. Propiedades físicas**

La bromelina del tallo mantiene una estructura secundaria constante. Es efectiva en un rango de pH de 7 a 10, pero su actividad se pierde permanentemente por encima de un pH 10. A un pH 14, adquiere una forma gelatinosa característica. Además, se ha confirmado su estabilidad a largo plazo cuando se conserva a temperaturas menores a 20 °C (16) (19).

### **2.2.1.4. Biodisponibilidad**

La bromelina se absorbe de manera eficaz en el organismo, lo que contribuye a su alta disponibilidad según un estudio realizado in vitro. Esta se absorbe activamente en todas las partes del sistema gastrointestinal, con aproximadamente el 40% de la cantidad total de bromelina absorbida en su forma de alto peso molecular desde el intestino (19). Estudios realizados por Castell et al. (20) indican que la bromelina tiene una vida media de 6 a 9 horas.

Se ha observado en estudios in vivo que se pueden consumir casi 12 gramos de bromelina al día sin presentar efectos secundarios notables(19) (21).

### **2.2.1.5. Farmacocinética**

El pico máximo de concentración de bromelina en la sangre se alcanza una hora después de su administración oral. Además, se ha confirmado que la bromelina mantiene su actividad proteolítica en la sangre (19). A partir de esto, investigaciones



más recientes han revelado que alrededor del 30% de la bromelina permanece estable en el jugo gástrico artificial después de 4 horas, y aproximadamente el 20% permanece estable en la sangre artificial durante el mismo período(19) (18).

### **2.2.1.6. Aplicaciones terapéuticas**

#### **a. Efectividad antibacteriana**

La bromelina tiene propiedades antibacterianas gracias a componentes como taninos, saponinas y flavonoides. En particular, el flavonoide puede unirse a proteínas celulares, afectando la membrana de las bacterias. Aunque no se comprende completamente, se cree que la bromelina ejerce su actividad antimicrobiana al hidrolizar enlaces peptídicos en la pared celular de la bacteria, lo que daña la superficie de la célula. Este proceso provoca fugas, hinchazón y apertura de la célula. Además, la bromelina impide el crecimiento bacteriano al evitar que las bacterias se adhieran a receptores específicos de glicoproteínas en su superficie (6).

En una investigación realizada en condiciones controladas, se analizó la efectividad antibacteriana de la bromelina en comparación con otras sustancias en infecciones endodónticas. Se encontró que la bromelina era más efectiva que el hidróxido de calcio y comparable a una pasta antibiótica triple. Se observó que la bromelina tiene un mayor efecto contra bacterias de tinción Gram-positiva que contra las de tinción Gram-negativa. Además, se ha calculado la concentración mínima inhibitoria de bromelina en patógenos periodontales, mostrando eficacia antibacteriana, especialmente contra *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*. En general, la bromelina podría ser utilizada como un agente antibacteriano potente, especialmente en infecciones periodontales (16).

- b. **Acción antiinflamatoria:** La bromelina inhibe específicamente la síntesis de prostaglandinas que desencadenan la inflamación, actuando de manera indirecta. Esta modula la formación de prostaglandinas proinflamatorias al reducir los niveles de PGE<sub>2</sub>(prostaglandina E<sub>2</sub>) y TXA-2 (tromboxano A<sub>2</sub>), mientras potencia los mediadores antiinflamatorios y los niveles de PGI-2 (prostaglandina I<sub>2</sub>). También influye en moléculas de adhesión en las células inmunitarias, afectando la migración de neutrófilos a los sitios inflamados (6).
- c. **Quemaduras y cicatrización de heridas:** La crema de bromelina, que contiene un 35% de esta enzima en una base lipídica, se utiliza para desbridar tejido

necrótico, lo que acelera la recuperación gracias a la presencia de escharasa. Su aplicación sigue siendo prioritaria en el tratamiento postoperatorio para aliviar dolor e inflamación, ya que mejora el proceso de desbridamiento y favorece una cicatrización más rápida y efectiva (17) (18) (19).

- d. **Efecto anticancerígeno:** La bromelina ha mostrado efectos anticancerígenos en estudios in vitro con diversas líneas celulares cancerosas, incluyendo el cáncer de mama, próstata, gástrico, melanoma, carcinoma epidermoide, cáncer colorrectal, ovario, pulmón, páncreas y hepatocelular (6).
- e. **Potenciación antibiótica:** En humanos, la bromelina incrementa los niveles de antibióticos tanto en la orina como en la sangre. Tras la administración de bromelina, se detecta un aumento en los niveles sanguíneos y tisulares de amoxicilina y tetraciclina. Esto resulta en una mayor concentración del fármaco en la sangre y los tejidos. Por consiguiente, la bromelina mejora la efectividad de los antibióticos y reduce los efectos secundarios asociados (17).

#### 2.2.1.7. Aplicaciones en la odontología

- a. **Después de cirugía de terceros molares:** estudios realizados por Mendes et al. (22) indicaron que la bromelina tiene un impacto moderado en la disminución del dolor en las primeras 24 horas y a lo largo de los 7 días posteriores a la cirugía, y también resultó en una reducción en la cantidad promedio de medicamentos adicionales necesarios por paciente. Aunque no se encontraron pruebas concluyentes de que la bromelina fuera efectiva para reducir el trismo y la hinchazón facial, sí tuvo un efecto de moderado a grande en la mejora de varios aspectos de los estilos de vida durante la primera semana después de la operación, incluyendo la alimentación, la apariencia física, el aislamiento social y la calidad del sueño.
- b. **Mejora de la capacidad de unión de los adhesivos:** Antes de aplicar un sistema adhesivo, Chauhan et al. (23) evaluaron el impacto de la bromelina en la fuerza de unión al corte, comparándola con hipoclorito de sodio al 5%. Descubrieron que la bromelina elimina las fibrillas de colágeno sin soporte después del grabado ácido, reduciendo las nanofugas y mejorando la fuerza de unión. En comparación con el efecto desproteinizante obtenido con hipoclorito de sodio al 5%, los resultados obtenidos con bromelina fueron mayores y estadísticamente significativos.

- c. **Eliminación de caries:** La bromelina tiene la capacidad de actuar sobre las redes de colágeno que han sido predegradadas en una lesión cariosa. Su función consiste en suavizar estas redes de colágeno, lo cual facilita su eliminación. En una investigación in vitro realizado por Reddy et al., evaluaron la efectividad de la bromelina como un agente quimio-mecánico para la eliminación de caries. Los resultados indicaron que la bromelina tardó aproximadamente 335 segundos en eliminar la caries, y a partir de ese momento, quedó una cantidad menor de dentina desmineralizada (16).
- d. **Agente anti-placa:** Según un estudio de Harmely et al. (2011), la bromelina derivada del tallo al 5% es útil en la pasta dental como agente anti-placa. Rahmadini (2013) llevó a cabo una investigación similar utilizando bromelina extraída directamente de la piña en la pasta dental, evaluando su eficacia durante un período de 28 días (17).

#### **2.2.1.8. Métodos de extracción**

Los métodos para obtener extractos pueden dividirse en físicos y químicos. Los métodos físicos incluyen la homogenización, que emplea diversos equipos como licuadoras o homogeneizadores para triturar el tejido y romper mecánicamente las células, la sonicación, que utiliza ultrasonido para agitar las partículas en el líquido y romper las membranas celulares, y los ciclos de congelado descongelado, que congelan las células y luego las descongelan para romper sus membranas. En los métodos químicos, como el choque osmótico, las células se exponen a una solución hipotónica para inflarse y fragmentarse, y los detergentes solubilizan las proteínas y perturban las interacciones lipídicas y proteicas en las membranas celulares. Por último, los disolventes orgánicos(enzimas) pueden degradar la pared celular de algunas células, que proporciona forma y protección (24).

#### **2.2.1.9. Métodos de purificación**

##### **a. Sistema acuoso bifásico (ATPS)**

Este sistema implica el uso de dos polímeros distintos, como el polietilenglicol (PEG) y el dextrano, o un polímero junto con una sal, como el PEG en conjunto con una sal de fosfato. Este método permite eliminar subproductos no deseados, como proteínas y pigmentos, que pueden afectar la actividad enzimática. La bromelina se prefiere en la fase PEG, mientras que el polifenol oxidasa se

encuentra en la fase de fosfato de potasio. La recuperación activa de la enzima es alta gracias a la modificación de los sitios activos por parte del PEG (17) (25).

#### **b. Ultrafiltración**

La ultrafiltración es una técnica de purificación basada en la filtración por membranas para separar moléculas por tamaño. Requiere membranas con alta capacidad de separación, buen flujo y propiedades mecánicas y químicas óptimas. Las moléculas más pequeñas pasan a través de la membrana bajo presión, mientras que las más grandes quedan atrapadas. Para una separación más precisa, se puede combinar con métodos selectivos como cromatografía o electroforesis (26).

#### **c. Sistema micelar inverso**

El sistema micelar inverso es una técnica de extracción líquido-líquido utilizada en el procesamiento de biomoléculas. Consiste en gotas de fase acuosa separadas en un disolvente orgánico mediante tensioactivos en la interfaz. Estos tensioactivos tienen colas hidrofóbicas e hidrofílicas, con la cabeza hidrófila dentro de la micela y la cola apolar en contacto con el disolvente. El movimiento de proteínas dentro y fuera de la micela puede ser controlado mediante ajustes en el pH, la fuerza iónica de la fase líquida y la concentración de surfactante (17) (25).

#### **d. Precipitación**

La eficacia del proceso de precipitación depende de las características de la proteína recombinante y de las propiedades de las proteínas contaminantes. Puede eliminar hasta el 90% de las proteínas de la célula huésped. Se agrega una sal, generalmente sulfato de amonio, al extracto en una concentración que induce la precipitación de proteínas (27). También se han utilizado disolventes orgánicos como etanol, cetonas, metanol, propanol y otros alcoholes en la precipitación de proteínas. El propósito es determinar la concentración óptima donde solo precipitan las impurezas proteicas no deseadas, sin afectar a la proteína objetivo, para este fin se necesitan pasos adicionales como centrifugación y diálisis (28).

#### **e. Cromatografía**

La bromelina se purifica comúnmente mediante métodos de cromatografía, incluyendo filtración en gel, intercambio iónico, afinidad y contracorriente de alta velocidad (HSCCC). La cromatografía de intercambio iónico es particularmente relevante, proporcionando una purificación hasta 10 veces mayor. El HSCCC puede producir 3,01 g de bromelina purificada a partir de 5 g de extracto crudo. El

uso de una membrana de afinidad metálica inmovilizada (IMAM) logra una purificación de 15,4 veces con una recuperación del 94,6% (17).

## **2.2.2. GLUCONATO DE CLORHEXIDINA**

El gluconato de clorhexidina, un compuesto catiónico de la familia de las biguanidas ha sido empleado como antiséptico de amplio espectro en medicina general desde 1953. Su efectividad antimicrobiana abarca bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y hongos(29). Su actividad antibacteriana de largo alcance y amplio espectro la hace efectiva en la gestión clínica de la placa dental, así como en la atenuación de la inflamación y el sangrado gingival. Además, estudios in vitro respaldan su eficacia al disminuir la proliferación de diversas especies bacterianas asociadas a enfermedades periodontales, como *Porphyromonas gingivalis* y *Streptococcus mutans*, este último vinculado a la caries dental (30).

### **2.2.2.1. Efectividad antibacteriana**

Los efectos antibacterianos del gluconato de clorhexidina están relacionados con su efecto sobre la membrana celular. A concentraciones bajas (0,02%-0,06%), el gluconato de clorhexidina induce la liberación de  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  y la pérdida de K desde la pared celular, generando un efecto bacteriostático, es decir, inhibe el crecimiento bacteriano; por otro lado, a concentraciones más altas (>0,1%), provoca la liberación de todos los componentes intracelulares esenciales fuera de la célula, resultando en una acción bactericida, donde se desencadena la lisis celular y la muerte bacteriana (31).

### **2.2.2.2. Mecanismo de acción**

La acción de la clorhexidina se divide en cuatro etapas:

1. **Adhesión inicial:** Teniendo en cuenta que la clorhexidina es una molécula de carga positiva, ésta se une de manera firme a la superficie de la célula bacteriana, la cual está cargada negativamente debido a la presencia de fosfatos y grupos sulfato (32).
2. **Adsorción específica:** Esta etapa involucra una adsorción específica a los componentes de la célula bacteriana que contienen fosfatos (32).
3. **Penetración y aumento de permeabilidad:** La clorhexidina penetra la pared celular bacteriana mediante difusión pasiva, lo que resulta en un incremento de

la permeabilidad de la membrana celular interna. Este proceso resulta en la liberación de moléculas de bajo peso molecular y elementos citoplasmáticos, al mismo tiempo que bloquea la función de ciertas enzimas vinculadas a la membrana citoplasmática (acción bacteriostática) (32).

4. **Coagulación citoplasmática y precipitación:** En la cuarta etapa, si la concentración de clorhexidina se mantiene o aumenta, se produce la coagulación citoplasmática y la precipitación. Esto ocurre debido a la producción de compuestos fosforilados, como el trifosfato de adenosina y ácidos nucleicos, confiriendo así su acción bactericida (32).

Es importante mencionar que gracias a la capacidad de la clorhexidina de adherencia a las superficies orales (dientes, mucosas y glicoproteínas salivales) interfiere con la adhesión bacteriana, dándole la propiedad de la sustantividad que permite su acción por hasta 12 horas.

### 2.2.2.3. Aplicaciones clínicas en odontología

- a. **Enfermedades periodontales:** El gluconato de clorhexidina ha demostrado ser activa contra microorganismos periodontopatógenos clave, incluyendo enterobacterias, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Fusobacterium nucleatum* (29).

El colutorio de gluconato de clorhexidina en concentraciones entre el 0,1% y el 0,2% muestra notables efectos antiinflamatorios y anti-placa en encías y dientes. El uso diario de un enjuague bucal al 0,2% durante 4 a 6 semanas reduce los signos clínicos de gingivitis, según varios estudios. No obstante, el enjuague bucal al 0,12% es más efectivo para prevenir la gingivitis en superficies dentales sin placa (32).

- b. **Caries:** Aunque el enjuague bucal puede ser útil para reducir la placa, las directrices nacionales indican que el cepillado mecánico de dientes y la limpieza interdental son métodos preferidos para eliminar eficazmente la placa. En este contexto, cualquier enjuague bucal se considera un complemento y no un sustituto del cepillado (31).

En relación con *S. mutans*, la clorhexidina (CHX) tiene una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) que no supera 1 µg/mL. Los enjuagues bucales con CHX han demostrado reducir significativamente la presencia de *S. mutans*, pero esta eficacia no se observa en los geles de CHX. A pesar de que los enjuagues bucales

con CHX han mostrado reducciones en *S. mutans*, esto no se traduce directamente en beneficios clínicos, como la reducción de la caries (32).

- c. **Tratamiento del conducto radicular:** el gluconato de clorhexidina al 2% mostró propiedades bactericidas superiores al hipoclorito de sodio (2,5%) en *Enterococcus faecalis* en estudios in vitro, pero después de períodos más largos, el hipoclorito de sodio al 2,5% fue más eficaz. Aunque concentraciones más altas (5,25%) son más efectivas, el gluconato de clorhexidina al 2% es preferido como irrigante por ser menos tóxico (31).
- d. **Procedimientos post-cirugía oral:** En el periodo posoperatorio, su importancia radica en su capacidad de evitar el desarrollo de placa bacteriana y la recolonización de bacterias en el sitio quirúrgico, especialmente en zonas de difícil limpieza con procedimientos de higiene oral convencionales (29).

#### 2.2.2.4. Efectos adversos

Algunas reacciones adversas comunes incluyen xerostomía (sequedad bucal), pérdida del gusto (hipogeusia) y decoloración de la lengua. Además, el uso a largo plazo puede llevar a la formación de cálculos y manchas externas en los dientes. Las reacciones adversas menos frecuentes abarcan hinchazón de la glándula parótida, sensación anormal en la boca, ardor en la lengua y descamación de la mucosa oral. Sin embargo, la tinción dental es la reacción adversa más común que desanima a los pacientes a utilizar clorhexidina (31) (32).

Por otro lado, el gluconato de clorhexidina puede producir reacciones de hipersensibilidad, tanto de tipo inmediato (tipo I) como retardado (tipo IV). Muchos pacientes alérgicos a la clorhexidina informan retrospectivamente sobre reacciones leves previas, como picazón, enrojecimiento e hinchazón localizada después de procedimientos como extracciones de sangre o acceso intravenoso, o una reacción urticaria posoperatoria. Las reacciones alérgicas perioperatorias a la clorhexidina suelen ser graves, con riesgo para la vida, y a menudo se presentan con afectación de múltiples órganos, llegando en casos raros al paro cardíaco (33).

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es un desafío creciente asociado con la clorhexidina. Hay evidencia reciente que sugiere que la clorhexidina puede volverse menos efectivo contra ciertos tipos de bacterias, tanto las Gram-negativas como las Gram-positivas. Esto se debe a que las bacterias experimentan mutaciones o agregan

material genético, lo que cambia la forma en que la clorhexidina afecta la membrana celular y las bombas de iones, especialmente cuando se usa en concentraciones bajas (34).

### **2.2.3. MÉTODOS PARA EVALUAR LA EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA**

Hay varios métodos de laboratorio que se pueden emplear para determinar la sensibilidad de las bacterias a los agentes antimicrobianos en entornos controlados, aunque su sensibilidad y principios no son uniformes, lo que puede llevar a resultados influenciados por factores como el método específico utilizado, los tipos de microorganismos y la solubilidad de los compuestos en evaluación. Los métodos principales para evaluar la efectividad antibacteriana incluyen los de difusión, dilución y bioautografía. Específicamente, los métodos de difusión, han sido ampliamente utilizados para evaluar extractos de plantas con actividad antimicrobiana (35).

#### **a) Método de difusión**

Este método se fundamenta en cómo varía la cantidad de una sustancia requerida para detener el crecimiento de una cepa bacteriana y el área donde este crecimiento se inhibe en la superficie de una placa de agar.

**El método disco-placa:** fundamentado en los estudios de Kirby, Bauer y colaboradores, es recomendado por el Subcomité de Pruebas de Susceptibilidad (NCCLS) para determinar la susceptibilidad de las bacterias a los agentes antibacterianos. Consiste en colocar discos de papel filtro de 6 mm impregnados con bromelina en una placa de agar inoculada previamente con el microorganismo sobre el que se desea estudiar. Luego de la incubación, se observa una zona de inhibición alrededor de los discos, que indica la sensibilidad del microorganismo al agente con actividad antimicrobiana. La concentración crítica del antibiótico se encuentra en la interfase entre las bacterias inhibidas y las que siguen creciendo. La interpretación de los diámetros de inhibición se realiza según categorías establecidas por el NCCLS: sensible (S), intermedia (I) o resistente (R)(36).

El inóculo puede prepararse mediante dos técnicas: la suspensión directa de colonias y la fase de crecimiento logarítmico. De estos, únicamente la suspensión directa de colonias ofrece resultados óptimos para organismos particulares. En este método, las colonias deben tener entre 18 y 24 horas de aislamiento y se suspenden en suero



fisiológico o caldo. El inóculo se ajusta hasta alcanzar la turbidez estándar de 0.5 de McFarland, aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml. Estas suspensiones se utilizan en los 15 minutos posteriores a su preparación. Los estándares de McFarland, deben mezclarse mediante agitación o inversión, según corresponda (37).

### **b) Métodos de dilución**

Los agentes con actividad antibacteriana se evalúan in vitro mediante métodos de dilución, donde el microorganismo crece en concentraciones crecientes del antimicrobiano en caldo o agar. Estos métodos se utilizan para determinar la CMI y la Concentración Mínima Bactericida (CMB), preparando diluciones en progresión geométrica y luego inoculando el medio para permitir el crecimiento antes de determinar la concentración que inhibe el crecimiento. El subcultivo en medio sin antimicrobiano permite determinar la actividad bactericida (36). En la técnica de dilución en caldo, se usan tubos o microplacas con concentraciones crecientes de extracto vegetal. El microorganismo se inocula en ellos y se determina la CMI tras la incubación. En la dilución en agar, se siembran cajas con una concentración específica de extracto, se inocula el microorganismo y se incuba durante 24 horas para verificar su crecimiento. La principal limitación es la cantidad de muestra requerida. Los métodos de microdilución en caldo son preferidos para múltiples muestras, ofreciendo mayor sensibilidad para cantidades pequeñas y permitiendo distinguir entre efectos bactericidas o bacteriostáticos (35).

### **c) Bioautografía**

El ensayo consiste en colocar muestras en placas de cromatografía delgada TLC y luego invertirlas sobre una placa petri con el microorganismo a evaluar. Tras la incubación, se observa el halo de inhibición donde está el compuesto activo. Se puede usar alguna sal de tetrazolio para visualizar mejor los resultados. Es crucial evitar solventes ácidos o demasiado alcalinos en las placas de TLC, ya que podrían inhibir el crecimiento bacteriano. Este método puede ser útil para purificar sustancias antibacterianas o realizar un tamizaje fitoquímico preliminar o un fraccionamiento bioquímico (35).

## **2.2.4. MICROFLORA ORAL NORMAL**

La microflora oral normal es la población microbiana comensal (bacterias, hongos, virus, protozoos) que habita en la cavidad oral. Ésta contribuye en el mantenimiento de la homeostasis; es decir, una simbiosis y ausencia de enfermedades de la cavidad oral (38,39). En condiciones normales la microflora oral está constituida principalmente por las especies *Streptococcus*, *Neisseria*, *Veillonela*, *Prevotella* y *Haemophilus* (39) (40).

La cavidad oral tiene la segunda comunidad microbiana más grande, después de la microflora intestinal, esto se debe a las condiciones idóneas que brinda a las especies microbianas; como la humedad, el pH salival y la temperatura (41).

### **2.2.4.1. Disbiosis de la microflora oral**

La disbiosis es el desequilibrio de la relación huésped-microbio, esto se debe a cambios a nivel local o sistémico, tales como; la disminución de la secreción salival, el uso de antibióticos, la dieta, la edad, el uso de aparatos ortodónticos, coronas, entre otros. Este desequilibrio se traduce en el aumento de la prevalencia de algunas bacterias o la aparición de otras especies dañinas (38). En consecuencia, se producen enfermedades locales como la caries dental y las enfermedades periodontales (gingivitis y periodontitis); por otro lado, también se producen enfermedades sistémicas, como la diabetes, obesidad, artritis reumatoide, enfermedades intestinales, enfermedades cardiovasculares, etc. (42) (43)

### **2.2.4.2. Microflora oral y caries dental**

Tanto la caries dental como la enfermedad periodontal están relacionadas con el microbioma oral (las bacterias y otros microorganismos en la boca) y cómo interactúan con el cuerpo. En el caso de la caries, la dieta juega un papel importante; mientras que, en la enfermedad periodontal, es el sistema inmunológico el que desempeña un papel crucial. Es importante destacar que el paso de una condición de salud bucal a una enfermedad no se debe necesariamente a la introducción de bacterias dañinas desde el exterior, sino más bien a cambios en la estructura de la comunidad microbiana en la boca. Estos cambios incluyen la composición y la cantidad relativa de diferentes tipos de microorganismos, lo que transforma las comunidades microbianas en estados patológicos (44).

Desde 1971, *Streptococcus mutans* se ha considerado un patógeno esencial en la aparición de la caries dental. Además de este, se han aislado muchas otras bacterias de áreas afectadas por caries; por otro lado, se ha descubierto que algunos hongos también están vinculados con la caries. Es relevante mencionar que, aunque se ha informado que diversas especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacteria* están fuertemente asociadas con la progresión de la caries, se ha demostrado que otras especies de estos géneros actúan como probióticos efectivos para prevenir la caries. Estos probióticos pueden ejercer su efecto preventivo regulando el desequilibrio en la microflora causado por el estrés ambiental (45).

#### **2.2.4.3. Género *Streptococcus***

Los estreptococos son comunes en diversas partes del cuerpo humano, siendo predominantes en la cavidad oral y el tracto respiratorio superior. Los estreptococos orales, antes llamados estreptococos viridans debido a su hemólisis parcial, presentan desafíos en la clasificación, ya que algunos pueden mostrar otros tipos de hemólisis.

Inicialmente, los estreptococos orales se dividieron en cuatro grupos: *anginosus*, *mitis*, *mutans* y *salivarius*, mientras que los estreptococos aislados fuera de la cavidad oral se clasificaron en los grupos *bovis* o *piógenos*. Sin embargo, un enfoque filogenético más robusto llevó a una nueva clasificación en ocho grupos: *mutans*, *pyogenic*, *salivarius*, *mitis*, *sanguinis*, *anginosus*, *downei* y *bovis*. En la actualidad, los estreptococos orales se encuentran en todos los grupos, excepto en los grupos *piógeno* y *bovis*. El grupo *mitis* es el más grande en la cavidad oral, con actualmente 20 especies (46).

#### **2.2.4.4. *Streptococcus* y placa dental**

La placa en la superficie dental se compone principalmente de glucano, fructano y proteínas, diferenciándose de la saliva en términos de lípidos, calcio, magnesio, flúor y fósforo. Con un 80% de agua in situ, esta membrana amorfa proporciona un entorno propicio para la supervivencia bacteriana, determinando la virulencia de la biopelícula. Sus características físicas y bioquímicas facilitan la adhesión, promueven la cohesión celular y actúan como fuente de energía. La difusión limitada hacia y desde la biopelícula concentra nutrientes, pero dificulta la entrada de sustancias externas, incluyendo antibióticos.

En el estudio de Kreikemeyer et al. sobre la placa dental en estreptococos, se descubrieron estructuras filamentosas similares a pilus en las bacterias, vinculadas a la patogenicidad. Estas estructuras adhesivas desempeñan un papel crucial en la adhesión a células y tejidos del huésped, así como en la formación de la placa dental (47).

#### **2.2.4.5. Streptococcus mutans**

El *Streptococcus mutans* es una bacteria grampositiva, lo que significa que tiene una membrana externa gruesa en su estructura celular (48). *Streptococcus mutans* es una bacteria comensal oral asociada a la caries dental, especialmente en la superficie lisa de los dientes. Produce enzimas que generan glucanos, esenciales para la formación de placa dental, y ácidos que contribuyen a la desmineralización dental, por lo que se considera como principal factor etiológico de la caries (49).

Además de su papel en la caries dental, *Streptococcus mutans*, como patógeno humano, también está vinculado a la endocarditis bacteriana subaguda, una inflamación peligrosa de las válvulas cardíacas. Ciertas cepas de esta bacteria también se han asociado con otras enfermedades fuera de la boca, como microhemorragias cerebrales, nefropatía por IgA y aterosclerosis (50).

#### **2.2.4.6. Streptococcus mutans y caries dental**

*Streptococcus mutans* en condiciones homeostáticas contribuye al mantenimiento de la salud oral; sin embargo, al producirse una disbiosis, este se convierte en el principal factor etiológico de la caries dental, esta se adhiere a la superficie del esmalte produciendo ácidos que desmineralizan este tejido dentario, que son los subproductos de los carbohidratos fermentables que constituyen la dieta del huésped (51).

*Streptococcus mutans* tiene la capacidad de proliferarse y formar biopelículas en las superficies de los dientes (esmalte), esto se debe a su capacidad de metabolizar los azúcares fermentables de la dieta del huésped, principalmente la sacarosa y la fructosa, que sirven de sustrato a las enzimas (glicosiltransferasas y fructosiltransferasas) capaces de catalizar la producción de glucanos y fructanos, principales responsables de la virulencia al formar una matriz de polisacáridos similar al pegamento, lo que contribuye a la acumulación de biopelículas en las superficies del esmalte, para posteriormente desmineralizarlo a través de la producción del ácido láctico (2).

#### 2.2.4.7. Factores de virulencia de *Streptococcus mutans*

Se ha aceptado ampliamente que el potencial cariogénico de *Streptococcus mutans* se basa en tres características fundamentales (50):

1. **Su habilidad para producir grandes cantidades de glucano extracelular a partir de sacarosa**, lo que facilita la colonización permanente de las superficies dentales y la formación de una matriz polimérica extracelular.
2. **Su capacidad para transportar y metabolizar diversos carbohidratos, generando ácidos orgánicos (acidogenicidad)**: *S. mutans*, como bacteria del ácido láctico, utiliza la glucólisis para obtener energía y destaca por su capacidad para metabolizar diversos carbohidratos. Su genoma codifica sistemas de transporte de azúcar y enzimas que permiten catabolizar eficientemente la sacarosa, un disacárido particularmente cariogénico. La sacarosa se convierte en un glucano extracelular que favorece la formación de biopelículas, promoviendo la adhesión a las superficies dentales. Las enzimas glicosiltransferasa (Gtfs) desempeñan un papel clave en la creación de una matriz ácida que contribuye a la desmineralización dental y a la prevalencia de especies acidotolerantes.
3. **Su capacidad para sobrevivir en condiciones de estrés ambiental, especialmente en entornos de pH bajo (aciduricidad)**: *Streptococcus mutans* puede reducir rápidamente el pH al fermentar carbohidratos, activando la Respuesta de Tolerancia al Ácido (ATR) para mantener la homeostasis. La F1F0La -ATPasa (F-ATPasa) expulsa protones, y se producen adaptaciones en la membrana y la generación de moléculas neutralizantes como amoníaco y CO<sub>2</sub> para contrarrestar el estrés ácido. La activación de la fermentación maloláctica (FML) convierte malato en lactato y CO<sub>2</sub>, que se utiliza para neutralizar el citoplasma. Estos mecanismos permiten a *Streptococcus mutans* sobrevivir en condiciones de pH bajo.

#### 2.3. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS:

**Bromelina:** enzima proteolítica (proteasa) que cataliza la descomposición de las proteínas en aminoácidos, se encuentra en las plantas de piña (52).

**Purificación:** acción de quitar de algo lo que le es extraño, dejándolo en el ser y perfección que debe tener según su calidad (53).

**Inmovilización:** método potencial para asegurar la eficiencia de una enzima sin la disminución de su actividad con el tiempo o después del procesamiento(6).

**Biodisponibilidad:** Grado en que una sustancia o un principio activo alcanza la circulación general (53).

**Efectividad antibacteriana:** capacidad de lograr un efecto deseado a través de una sustancia o agente para combatir las bacterias.

**Bactericida:** Que mata o es capaz de matar las bacterias (54).

**Bacteriostático:** Que inhibe o puede inhibir la multiplicación de las bacterias (54).

**Microflora:** Conjunto de microorganismos que habitan un ecosistema (54).

**Disbiosis:** Alteración o cambio significativo de la homeostasis de la microflora, así como conjunto de las respuestas adversas que dicho cambio desencadena en el organismo del huésped (54).

**In vitro:** Que sucede o que tiene lugar en un tubo de ensayo, en un medio de cultivo o en otro ambiente artificial en el laboratorio (54).

# CAPITULO III

## METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

### 3.1. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

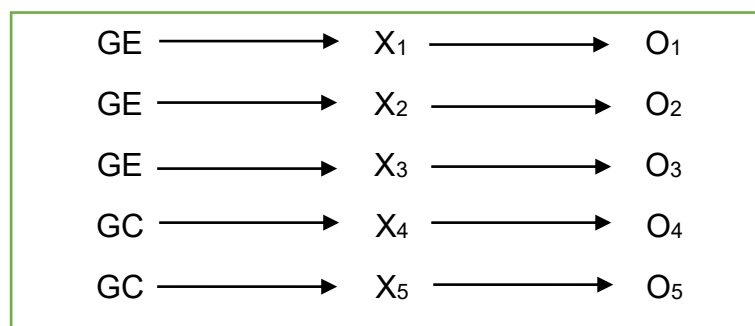
Diseño experimental

Tipo de diseño experimental: cuasiexperimental, porque implica la manipulación de una o más variables independientes (bromelina) para evaluar el efecto que esta tiene sobre la variable dependiente, además de contar con grupos de control positivo y negativo para aumentar la confiabilidad del estudio; por otro lado, la selección de grupos no fue de manera aleatoria.

De corte longitudinal: porque la recopilación de datos se realizó más de una vez (24 y 48 horas).

Alcance de la investigación: El estudio tiene un enfoque explicativo, ya que se analizó las diferencias en las relaciones de causa y efecto entre las soluciones antibacterianas; la bromelina al 1%, 5% y 10% y el gluconato de clorhexidina al 0.12%, que se emplearon con el propósito de controlar el crecimiento del *Streptococcus mutans* ATCC 25175 (55).

Esquema de diseño:



Donde:

GE: grupo experimental

GC: grupo control

X<sub>1</sub>: bromelina al 1%

X<sub>2</sub>: bromelina al 5%

X<sub>3</sub>: bromelina al 10%

X<sub>4</sub>: gluconato de clorhexidina al 0.12%

X<sub>5</sub>: suero fisiológico estéril

O: observación de los halos de los diferentes grupos

### **3.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN**

El enfoque de esta investigación es de tipo cuantitativo; debido a que, es objetiva y su medición se hizo a través de métodos estadísticos (56).

### **3.3. MUESTRA**

#### **3.3.1. Muestra vegetal**

Se emplearon los tallos de la especie *Ananas comosus* (Piña).

#### **3.3.2. Muestra microbiana**

Cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175

#### **3.3.3. Criterios de selección**

- **Criterios de inclusión de la muestra vegetal**

Se incluyeron los tallos de la especie *Ananas Camosus* (piña) que estén en buen estado de conservación.

- **Criterios de exclusión de la muestra vegetal**

Se excluyeron los tallos de la especie *Ananas Camosus* (piña) que no estén en buen estado de conservación (putrefacción) o contaminadas.

- **Criterios de inclusión de la muestra microbiana**

Cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 que se mantuvieron en un entorno controlado, asegurando una temperatura y humedad adecuadas, sin contaminantes presentes.

- **Criterios de exclusión de la muestra microbiana**

Cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 sembradas en placas Petri con manipulación inadecuada ocasionando la contaminación de los medios de cultivo.

#### **3.3.4. Muestreo**

No probabilístico por conveniencia



### **3.4. UNIDAD DE ANÁLISIS**

Estuvo constituida por los discos de papel filtro inmersos en las soluciones antibacterianas estudiadas. De los cuales un grupo perteneció a la enzima bromelina, que estuvo dividido en tres grupos según su concentración del 1%, 5% y 10%, el segundo grupo estuvo constituido por el gluconato de clorhexidina al 0.12% y el tercer grupo por el control negativo (suero fisiológico estéril).

### **3.5. VARIABLES DE ESTUDIO**

#### **3.5.1. Identificación de variables**

- **Variables estímulo**
  - Bromelina
  - Gluconato de Clorhexidina al 0.12%
- **Variable respuesta**
  - Efectividad antibacteriana sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

### 3.6. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

VARIABLES	DEFINICION CONCEPTUAL	NATURALEZA	INDICADOR	TÉCNICA E INSTRUMENTO	ESCALA DE MEDICIÓN	EXPRESIÓN FINAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL
ESTÍMULO	Enzima purificada a partir del tallo (corazón) de la piña ( <i>Ananas Camosus</i> )	cualitativa	Concentración de la bromelina	Ficha de recolección de datos	Ordinal	Concentración menor: Bromelina al 1%	La variable bromelina a una concentración del 1%,5% y 10% con efectividad antibacteriana a las 24 y 48 horas.
Bromelina (Piña)						Concentración media: Bromelina al 5%	
ESTÍMULO	Antiséptico utilizado para la inhibición del crecimiento bacteriano de la placa dental	cualitativa	Concentración del gluconato de clorhexidina	Ficha de recolección de datos	Nominal	Gluconato de clorhexidina al 0.12%	La variable Gluconato de clorhexidina al 0.12% se con efectividad antibacteriana a las 24 y 48 horas.
Gluconato de clorhexidina al 0.12%							
RESPUESTA	Capacidad de una sustancia para eliminar microorganismos bacterianos o para detener su crecimiento	cualitativa	Diámetro del halo de inhibición	ficha de recolección de datos	Ordinal	- Nula (-) ≤ 8 mm. - Sensible (sensible =+): 9 - 14 mm. - Muy sensible (muy sensible = ++): 15-19 mm. - Sumamente sensible (S.S.= +++): ≥ 20 mm.	La variable <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 se medirá directamente y se expresará como: Nula Sensible Muy sensible Sumamente sensible
Efectividad antibacteriana sobre el <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175							

### **3.7. HIPÓTESIS**

**Hi:** La efectividad antibacteriana de la bromelina al 5% es mayor frente al del Gluconato de Clorhexidina al 0.12% sobre cepas de *Streptococcus Mutans* a las 48 horas.

**Ho:** La efectividad antibacteriana de la bromelina al 5% no es mayor frente al Gluconato de Clorhexidina al 0.12% sobre la cepa de *Streptococcus Mutans* a las 48 horas.

### **3.8. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS**

#### **3.8.1. Técnicas**

En el presente trabajo de investigación se empleó la técnica observacional, la cual consistió en observar y registrar los eventos del procedimiento microbiológico (medición de los halos de inhibición).

#### **3.8.2. Instrumento**

Se utilizó una ficha de recolección de datos (Anexo 2) que fue empleada en una investigación previa por María del Rosario Chamorro Palacios, por lo que no fue necesaria su validación (12).

Para registrar los datos de los halos de inhibición en mm, se utilizó un vernier digital. Las medidas se tomaron a las 24 horas y 48 horas respectivamente, con la finalidad de evaluar si el efecto antibacteriano de la bromelina era estable o disminuía al transcurrir el tiempo.

### **3.9. PROCEDIMIENTOS**

#### **3.9.1. Etapa de procedimientos administrativos**

Se solicitó y obtuvo autorización de la Unidad de Investigación de la Escuela Profesional de Odontología de la UNSAAC para realizar el estudio de investigación, a través de la aprobación del proyecto mediante la Resolución de Decanatura correspondiente.

Para el procedimiento de la obtención de la enzima bromelina se solicitó la autorización al encargado del laboratorio de Fitoquímica de la escuela profesional de Química de la UNSAAC; mientras que, para el procedimiento microbiológico se

solicitó la autorización al laboratorio de Tecnología Farmacéutica de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica para supervisión y acceso a las instalaciones durante el período de investigación necesario (Anexo 3 y 4).

### **3.9.2. Prueba piloto**

Se realizó con un total de 3 placas Petri, con el objetivo de ensayar el procedimiento y corregir cualquier error, para asegurar que el experimento propiamente dicho se realice correctamente (Anexo 12).

### **3.9.3. Calibración**

Para garantizar la precisión y confiabilidad de los resultados en esta investigación, la investigadora recibió una capacitación exhaustiva y fue calibrada por un experto en microbiología, asegurando así la correcta ejecución del procedimiento microbiológico en el proyecto (Anexo 6 y 7).

Por otro lado, también se recibió capacitación y se obtuvo supervisión en el correcto aislamiento de la enzima bromelina, por parte de un profesional experto en el área (Anexo 5).

### **3.9.4. Procedimientos químicos**

#### **Protocolo para la obtención de la enzima Bromelina (Anexo 8)**

##### **a) Recolección de la fruta**

Se obtuvo la especie *Ananas comosus* (Piña) de un depósito de piñas en la ciudad del Cusco (Av. Antonio Lorena 318), proveniente de la ciudad de Quillabamba, ubicada a 1,050 metros sobre el nivel del mar, esta al tener un clima tropical (14°C-30°C) permite el crecimiento y desarrollo adecuado de la fruta.

##### **b) Características de la materia prima**

Para el estudio utilizó el corazón de la fruta como materia prima; debido a que, según la literatura revisada, éste tiene una mayor composición de la enzima Bromelina y; por lo tanto, una mayor actividad proteolítica.

##### **c) Extracción y purificación de la enzima Bromelina**

El procedimiento se inició con la desinfección de la fruta con alcohol al 70%, y posteriormente se procedió con el pelado de la fruta, separando tanto la cáscara y la corona de la fruta. Después se procedió a despulparla para obtener el corazón de la piña.

##### **d) Extracción del extracto crudo de Bromelina: método de homogenización**

Una vez obtenido el corazón se procedió a cortar en cubos pequeños,

posteriormente estos cubos se trituraron en un extractor, el cual permitió separar la parte sólida del corazón para solo obtener el jugo. Posteriormente, el jugo resultante se centrifugó a 3500 rpm por 10 minutos para eliminar cualquier residuo de impurezas(57) .

**e) Purificación del extracto crudo de bromelina: método de precipitación**

Mediante el uso de una probeta, se determinó el volumen del jugo filtrado el cual fue de 136 mL, paso seguido se agregó etanol al 50%, en una proporción 1.2 veces mayor que el volumen del jugo de piña, el cálculo se realizó de la siguiente manera:

$$136\text{mL} \times 1.2 = 163.2\text{mL}$$
$$163.2\text{mL} + 136\text{mL} = 299.2\text{mL}$$

La mezcla obtenida se mantuvo refrigerada en un vaso de precipitación a una temperatura de 4°C en el refrigerador durante 7 días. Tras el periodo de precipitación, se colocó el precipitado en tubos de ensayo de 15 ml, centrifugando a 4500 rpm durante 20 minutos. Se retiró el sobrenadante y los precipitados, obteniéndose la enzima en dos tubos de ensayo los cuales contenían 516.1 mg y 656 mg de la enzima respectivamente.

Para mantener sus propiedades hasta el momento de uso se procedió a liofilizar la enzima. El procedimiento de liofilización comenzó congelando la enzima por 24 horas, terminado el proceso se colocó en el liofilizador por 24 horas, obteniéndose la enzima liofilizada en dos tubos de ensayo, los cuales contenían 68.7mg y 85.8mg respectivamente.

**f) Preparación de la enzima a diferentes concentraciones**

Para la preparación de la enzima a las diferentes concentraciones, se utilizó agua destilada estéril (58) (59).

Para obtener la bromelina al 10% se utilizó el primer tubo de ensayo con 68.7mg de la enzima, equivalente a 0.0687g, el cual se calculó con la siguiente fórmula:

$$\begin{array}{l} 0.687\text{mL} \text{-----} 100\% \\ x \text{-----} 10\% \\ \hline \frac{0.687\text{mL} \times 10\%}{100\%} = 0.0687\text{g} \end{array}$$

Entonces, para obtener una concentración de bromelina al 10% se añadió 0.687mL de agua destilada estéril para la dilución de la enzima liofilizada. Para obtener la bromelina al 5% se empleó el segundo tubo de ensayo con 85.8mg, equivalente a 0.0858g, para lo cual se utilizó la siguiente fórmula:

$$\begin{array}{l} 1.7\text{mL} \text{-----} 100\% \\ x \text{-----} 5\% \\ \hline \frac{1.7\text{mL} \times 5\%}{100\%} = 0.085\text{mg} \end{array}$$

Finalmente, para obtener la concentración de bromelina al 1%, se utilizó 0.7mL de la solución al 5% y se añadió agua destilada estéril hasta alcanzar la solución al 1%, cuyo cálculo se realizó de la siguiente manera:

$$0.7\text{mL} \times 5 = 3.5\text{mL}$$

Por lo tanto, para obtener una solución al 1% de bromelina, se tuvo que añadir 3.5mL de agua destilada estéril.

### **3.9.5. Procedimientos microbiológicos**

#### **a. Obtención y preparación de la cepa bacteriana**

Las cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 se obtuvieron del laboratorio GenLab S.A.C del Perú, la cual se mantuvo refrigerada a 4°C hasta el momento de su uso (Anexo 9).

#### **b. Activación de cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175**

Para la activación de la cepa se utilizó el medio de cultivo en Agar sangre, medio de cultivo enriquecido que favorece el crecimiento de la bacteria en cuestión, ésta se incubó a 37°C para permitir la proliferación de las colonias jóvenes de *Streptococcus mutans*.

#### **c. Preparación del inóculo**

Para la preparación del inóculo se eligieron colonias aisladas correctamente, luego se transfirieron a un tubo de ensayo de 3ml de agua destilada estéril, por medio de un asa de siembra se colocaron las colonias hasta alcanzar la turbidez del estándar 0,5 de la escala de McFarland (60).

#### **d. Inoculación de las placas Petri**

Una vez ajustada la turbidez, se aplicó la suspensión bacteriana a cada una de las placas con Agar sangre (5%). Se utilizó un hisopo estéril para distribuir la cepa bacteriana con la técnica de estriado garantizando así la distribución uniforme del inóculo en la superficie de la placa. Se esperó aproximadamente entre 3 a 5 minutos antes de colocar los discos sobre las placas (60).

### **3.9.6. Determinación de la sensibilidad bacteriana: método de disco difusión**

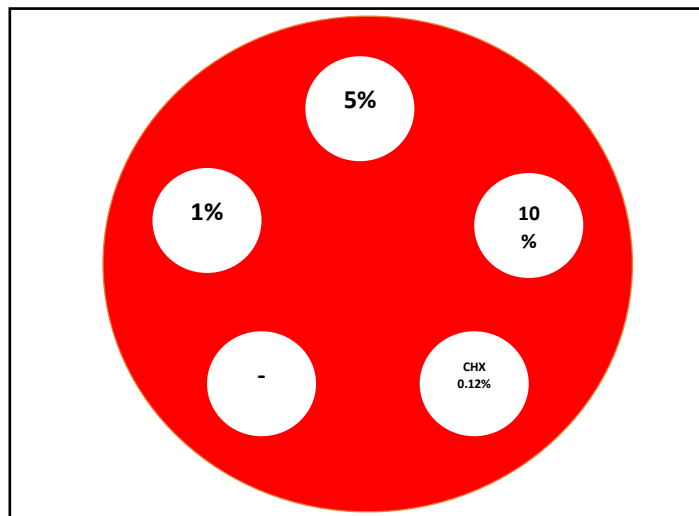
#### **a. Procedimiento de inoculación de discos**

Se utilizaron discos de papel filtro con un diámetro de 6mm (según las normas de la OMS), los cuales fueron esterilizados en autoclave a 121°C por 15 minutos. Se procedió a colocar 10 discos en 5 placas Petri, para las concentraciones del 1%, 5%, 10% de la bromelina; así como, 10 discos para el gluconato de clorhexidina al 0.12% y; finalmente, 10 discos para el control negativo (suero fisiológico estéril).

Con la ayuda de una micropipeta se procedió a inocular 15 µl de las diferentes soluciones en los discos de papel filtro de manera que estuvieron completamente embebidos, se esperó aproximadamente 1 hora hasta que los excesos alrededor de los discos se ventilaran.

Posteriormente, se procedió a distribuir los discos uniformemente con una pinza estéril a una distancia mínima de 25mm entre ellos (60).

#### **Ilustración: distribución de los discos de papel filtro**



*Fuente: elaboración propia*

## **b. Incubación**

Este proceso se realizó a una temperatura de 37°C en condiciones de microanaerobiosis, para lo cual se colocaron las placas inoculadas de manera invertida en un recipiente hermético utilizando el método de la vela.

### **3.9.7. Medición de diámetro de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano**

La medición de los halos de inhibición se realizó con un vernier digital, el cual nos permitió medir el diámetro que generaron las diferentes soluciones a las 24 y 48 horas.

Para la evaluación y clasificación de los resultados se utilizó la escala de Duraffourd (61); donde, la efectividad antibacteriana se mide de la siguiente manera:

Nula (-)	$\leq 8$ mm
Sensible (sensible =+)	9 - 14 mm
Muy sensible (muy sensible = ++)	15-19 mm
Sumamente sensible (S.S.= +++)	$\geq 20$ mm

### **3.9.8. Eliminación de los residuos biológicos**

Todos los residuos del experimento fueron desechados en los tachos rojos; por otro lado, los instrumentos utilizados se esterilizaron en autoclave según protocolo.

## **3.10. PLAN DE ANÁLISIS**

Los resultados obtenidos se organizaron y clasificaron en Microsoft Excel según las horas y mediciones establecidas para la evaluación. Luego, estos datos se introdujeron en el programa SPSS versión 25 para su procesamiento y presentación a través de tablas que respondían a los objetivos planteados en la siguiente investigación. El análisis estadístico se realizó a través de la prueba ANOVA para determinar si hay diferencias significativas entre las medias de los grupos estudiados y la prueba de Tukey para identificar qué grupos específicos difieren entre sí, para lo cual se empleó un nivel de significancia del 5%.



### **3.11. ASPECTOS ÉTICOS DE LA INVESTIGACIÓN**

Para asegurar la calidad del trabajo, tanto en términos teóricos como empíricos, se siguió la guía para la elaboración de tesis cuantitativas y el estilo Vancouver para citar y referenciar, se registró el contenido con atención a los derechos de autor. Además, se siguieron las normas para el manejo de desechos biológicos respetando los medios adecuados de eliminación de residuos contaminados.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS

TABLA N° 01

#### PRUEBA DE NORMALIDAD

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Bromelina 1 %	,210	10	,200*	,929	10	,442
Bromelina 5 %	,174	10	,200*	,951	10	,675
Bromelina 10 %	,218	10	,197	,934	10	,484
Gluconato de clorhexidina 0.12 %	,151	10	,200*	,954	10	,715

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Fuente: Ficha de observación

**INTERPRETACIÓN:** En la tabla se observa que el grado de libertad es menor a 50 elementos; por lo que, se utiliza la prueba de normalidad Shapiro-Wilk, donde los grados de significancia son mayores a 0.05 lo que evidencia una distribución normal, por lo cual se utilizó la prueba estadística ANOVA.

**TABLA N° 02**

**PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE MEDIAS A LAS 24 y 48 HORAS**

**ANOVA**

**Halos de inhibición 24Hrs**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	367,190	3	122,397	412,341	,000
Dentro de grupos	10,686	36	,297		
Total	377,876	39			

**Halos de inhibición 48Hrs**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	574,639	3	191,546	271,494	,000
Dentro de grupos	25,399	36	,706		
Total	600,038	39			

**INTERPRETACIÓN:** En la tabla se muestra el análisis ANOVA realizado para evaluar la efectividad antibacteriana de la bromelina al 1%, 5%, 10% y el gluconato de clorhexidina al 0.12% sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a las 24 horas, donde se muestran resultados significativos. Con una suma de cuadrados entre grupos de 367.190 y dentro de grupos de 10.686, los grados de libertad correspondientes son 3 y 36, respectivamente. La media cuadrática entre grupos es 122.397 y dentro de grupos es 0.297, resultando en un valor F de 412.341. El valor p obtenido es 0.000, indicando una diferencia significativa entre los grupos. Estos resultados sugieren que las evaluaciones tienen una efectividad antibacteriana significativamente diferente.

A las 48 horas también se muestran resultados significativos. Con una suma de cuadrados entre grupos de 574.639 y dentro de grupos de 25.399, los grados de libertad correspondientes son 3 y 36, respectivamente. La media cuadrática entre grupos es 191.546 y dentro de grupos es 0.706, resultando en un valor F de 271.494. El valor p obtenido es 0.000, indicando una diferencia significativa entre los grupos. Estos resultados sugieren que las evaluaciones tienen una efectividad antibacteriana significativamente diferente.

**TABLA N° 03**

**COMPARACIÓN DE LA EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA BROMELINA Y EL GLUCONATO DE CLORHEXIDINA SOBRE CEPAS DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175 A LAS 24 y 48 HORAS**

**Comparaciones múltiples**

Variable dependiente: Halos de inhibición 24y 48Hrs

HSD Tukey

(I) Bromelina 24Hrs	(J) Bromelina 24Hrs	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Gluconato de clorhexidina al 0.12%	Bromelina al 1%	2,64000*	,24365	,000	1,9838	3,2962
	Bromelina al 5%	-3,77000*	,24365	,000	-4,4262	-3,1138
	Bromelina al 10%	-4,99000*	,24365	,000	-5,6462	-4,3338
Bromelina al 1%	Gluconato de clorhexidina al 0,12%	-2,64000*	,24365	,000	-3,2962	-1,9838
	Bromelina al 5%	-6,41000*	,24365	,000	-7,0662	-5,7538
	Bromelina al 10%	-7,63000*	,24365	,000	-8,2862	-6,9738
Bromelina al 5%	Gluconato de clorhexidina al 0,12%	3,77000*	,24365	,000	3,1138	4,4262
	Bromelina al 1%	6,41000*	,24365	,000	5,7538	7,0662
	Bromelina al 10%	-1,22000*	,24365	,000	-1,8762	-,5638
Bromelina al 10%	Gluconato de clorhexidina al 0,12%	4,99000*	,24365	,000	4,3338	5,6462
	Bromelina al 1%	7,63000*	,24365	,000	6,9738	8,2862
	Bromelina al 5%	1,22000*	,24365	,000	,5638	1,8762

(I) Bromelina 48Hrs	(J) Bromelina 48Hrs	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Gluconato de clorhexidina al 0,12%	Bromelina al 1%	2,36000*	,37564	,000	1,3483	3,3717
	Bromelina al 5%	-5,26000*	,37564	,000	-6,2717	-4,2483
	Bromelina al 10%	-6,97000*	,37564	,000	-7,9817	-5,9583
Bromelina al 1%	Gluconato de clorhexidina al 0,12%	-2,36000*	,37564	,000	-3,3717	-1,3483
	Bromelina al 5%	-7,62000*	,37564	,000	-8,6317	-6,6083
	Bromelina al 10%	-9,33000*	,37564	,000	-10,3417	-8,3183
Bromelina al 5%	Gluconato de clorhexidina al 0,12%	5,26000*	,37564	,000	4,2483	6,2717
	Bromelina al 1%	7,62000*	,37564	,000	6,6083	8,6317
	Bromelina al 10%	-1,71000*	,37564	,000	-2,7217	-,6983
Bromelina al 10%	Gluconato de clorhexidina al 0,12%	6,97000*	,37564	,000	5,9583	7,9817
	Bromelina al 1%	9,33000*	,37564	,000	8,3183	10,3417
	Bromelina al 5%	1,71000*	,37564	,000	-,6983	2,7217

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Fuente: Ficha de observación

**INTERPRETACIÓN:** En la tabla se muestra el análisis de las comparaciones múltiples mediante el test HSD de Tukey y este revela que todas las diferencias en la efectividad antibacteriana entre las concentraciones de bromelina (1%, 5%, 10%) y gluconato clorhexidina al 0.12%, sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a las 24 y 48 horas son estadísticamente significativas, con un valor p de 0.000 en todas las comparaciones, siendo estos resultados menores al 0.05, esto indica que cada tratamiento tiene una efectividad significativamente diferente al resto.

**TABLA N° 04**

**COMPARACIÓN DE LA EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA BROMELINA Y EL GLUCONATO DE CLORHEXIDINA SOBRE CEPAS DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175 A LAS 24 Y 48 HORAS SEGÚN SU CONCENTRACIÓN**

**Halos de inhibición 24Hrs**

HSD Tukey<sup>a</sup>

Bromelina 24Hrs	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
Bromelina al 1%	10	9,1200			
Gluconato de clorhexidina al 0,12%	10		11,7600		
Bromelina al 5%	10			15,5300	
Bromelina al 10%	10				16,7500
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

**Halos de inhibición 48Hrs**

HSD Tukey<sup>a</sup>

Bromelina 48Hrs	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
Bromelina al 1%	10	9,5900			
Gluconato de clorhexidina al 0,12%	10		11,9500		
Bromelina al 5%	10			17,2100	
Bromelina al 10%	10				18,9200
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 10.000.

**INTERPRETACIÓN:** En la tabla se muestra la comparación de la efectividad bacteriana de la bromelina y el gluconato de clorhexidina sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, a las 24 horas de acuerdo a las concentraciones mediante el test HSD Tukey, al realizar la comparación de la bromelina al 1%, 5%, 10% y el gluconato de clorhexidina al 0.12% difieren entre sí, siendo la bromelina al 1% y el gluconato de clorhexidina al 0.12% **sensibles** con halos de 9.12mm y 11.76mm respectivamente en contraste con la bromelina al 5% y 10% **muy sensibles** con halos de 15.53mm y 16.75mm respectivamente, estos resultados indican que la bromelina tiene efectos antibacterianos sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175,

siendo más efectiva a concentraciones más altas, donde se observan halos de inhibición más grandes. La significativa diferencia entre las diferentes concentraciones sugiere que el efecto bactericida de la bromelina varía según su concentración, lo cual es crucial para determinar su potencial uso en aplicaciones antimicrobianas.

A las 48 horas se observó que el *Streptococcus mutans* es **sensible** a la bromelina al 1% y el gluconato de clorhexidina 0.12% con halos de 9.59mm y 11.95mm respectivamente; en contraste, a la bromelina al 5% y 10% siendo el *Streptococcus mutans* **muy sensible** con halos de 17.21mm y 18.92mm respectivamente, estos resultados indican que la bromelina tiene una capacidad mayor para inhibir el crecimiento de *Streptococcus mutans* a concentraciones más altas.

**TABLA N° 05**

**EFFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA BROMELINA Y EL GLUCONATO DE CLORHEXIDINA SOBRE CEPAS DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175 A LAS 24 y 48 HORAS**

<b>A LAS 24 HORAS</b>				
<b>Concentración</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Desviación típica</b>	<b>Escala de DURAFFOURD</b>
<b>Bromelina al 1%</b>	10	9.12	0.28597	Sensible
<b>Bromelina al 5%</b>	10	15.53	0.52715	Muy Sensible
<b>Bromelina al 10%</b>	10	16.75	0.83566	Muy Sensible
<b>Gluconato de clorhexidina al 0,12%</b>	10	11.76	0.35963	Sensible
<b>A LAS 48 HORAS</b>				
<b>Concentración</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Desviación típica</b>	<b>Escala de DURAFFOURD</b>
<b>Bromelina al 1%</b>	10	9.59	0.51737	Sensible
<b>Bromelina al 5%</b>	10	17.21	0.91706	Muy Sensible
<b>Bromelina al 10%</b>	10	18.92	1.24168	Muy Sensible
<b>Gluconato de clorhexidina al 0,12%</b>	10	11.95	0.41433	Sensible

*Fuente: Ficha de observación*

**INTERPRETACIÓN:** En la tabla se presenta la efectividad antibacteriana de la bromelina en comparación con el gluconato de clorhexidina al 0.12% sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, evaluada a las 24 y 48 horas.

Al analizar la bromelina al 1%, se observó un halo de inhibición de 9.12 mm  $\pm$  0.28597 mm a las 24 horas, incrementando ligeramente a 9.59 mm  $\pm$  0.51737 mm a las 48 horas., lo cual sugiere una capacidad limitada de inhibición del crecimiento bacteriano.

Para la bromelina al 5%, se registró un halo de inhibición de 15.53 mm  $\pm$  0.52715 mm a las 24 horas, el cual aumentó a 17.21 mm  $\pm$  0.91706 mm a las 48 horas, destacando su alta efectividad y una clara mejora con el tiempo.

En cuanto a la bromelina al 10%, los resultados mostraron un halo de inhibición de 16.75 mm  $\pm$  0.83566 mm a las 24 horas, que se amplió a 18.92 mm  $\pm$  1.24168 mm a las 48 horas, destacando su alta efectividad y una clara mejora con el tiempo.

Por último, el gluconato de clorhexidina al 0.12% mostró un halo de inhibición de 11.76 mm  $\pm$  0.35963 mm a las 24 horas, y de 11.95 mm  $\pm$  0.41433 mm a las 48 horas, evidenciando una efectividad constante pero moderada en la inhibición del crecimiento bacteriano.



## CAPÍTULO V

### DISCUSIÓN Y COMENTARIOS

#### 5.1. Descripción de los hallazgos más relevantes

En la presente investigación, se evaluó la efectividad antibacteriana de la bromelina y se comparó con el gluconato de clorhexidina al 0.12% en inhibir el crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Los resultados demostraron que la bromelina es más efectiva que el gluconato de clorhexidina en inhibir el crecimiento de estas cepas bacterianas. Específicamente, se observó que las concentraciones de bromelina del 5% y 10% presentaron halos de inhibición significativamente más grandes tanto a las 24 horas ( $15.53 \text{ mm} \pm 0.52715 \text{ mm}$  y  $16.75 \text{ mm} \pm 0.83566 \text{ mm}$ , respectivamente) como a las 48 horas ( $17.21 \text{ mm} \pm 0.91706 \text{ mm}$  y  $18.92 \text{ mm} \pm 1.24168 \text{ mm}$ , respectivamente).

#### 5.2. Comparación crítica con la literatura existente

Es importante destacar que, en comparación con el estudio realizado por LIMA C. (10), donde se evaluó cómo la bromelina afecta la formación de biopelícula y la actividad metabólica de *S. mutans*, se observó una reducción en la producción de ácido láctico y la actividad metabólica de la biopelícula. Lima C. utilizó bromelina al 0.5% y 1% para tratar discos de resina, evaluando la formación de biopelícula en condiciones anaeróbicas durante 48 horas. Estos hallazgos sugieren que la bromelina tiene un efecto positivo en la reducción de la actividad microbiana y la actividad cariogénica.

Por lo tanto, tanto la presente investigación como el realizado por Lima C., sugieren que la bromelina podría tener un papel prometedor en la odontología, aunque su efectividad varía según la aplicación específica. La bromelina al 1% podría no ser suficiente para una acción antibacteriana directa robusta, pero su capacidad para reducir la actividad metabólica y mejorar la adhesión adhesiva es significativa. En aplicaciones clínicas, concentraciones más altas de bromelina (como 5% y 10%) podrían ser más efectivas para la inhibición directa del crecimiento de *Streptococcus mutans*.

Por otro lado, en comparación al estudio realizado por PRAVEEN et al. (11), este se centra en la determinación de la CMI mediante microdilución en caldo, proporcionando una evaluación más detallada de la capacidad antibacteriana de la bromelina contra

una gama más amplia de microorganismos, y confirma su efectividad a una concentración mínima específica (2 mg/ml) contra *S. mutans*.

La metodología de determinación de CMI proporciona información crucial sobre la concentración precisa de bromelina necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano, lo cual es fundamental para el desarrollo de tratamientos antimicrobianos efectivos.

Por lo tanto, mientras que el presente estudio proporciona una visión inmediata de la capacidad antibacteriana de la bromelina, este último profundiza su actividad a nivel molecular, destacando su potencial para aplicaciones clínicas más precisas y efectivas.

Sin embargo, en el estudio realizado por Pereira M. (9) se evaluaron cuarenta y cuatro cepas de *P. aeruginosa* y cuarenta y tres cepas de *S. aureus* de heridas crónicas y hemocultivos humanos. Se usó la prueba de dilución en agar para determinar la CMI y curvas de crecimiento, y se analizó la actividad antibiofilm con bromelina al 1%. La bromelina no mostró actividad antibacteriana contra *P. aeruginosa* y *S. aureus* (CMI > 4 mg/mL) y no tuvo efecto antibiofilm contra *P. aeruginosa*. Sin embargo, demostró una acción antibiofilm significativa contra *S. aureus*, especialmente en cepas resistentes a la meticilina de heridas crónicas. La variación en los resultados con la investigación presente se debe varios factores. Por un lado, la especificidad de la bacteria juega un papel importante, ya que *P. aeruginosa* (Gram-) y *S. aureus* (Gram+) tienen estructuras celulares y mecanismos de resistencia que difieren significativamente de *S. mutans*, lo que podría explicar la falta de actividad de la bromelina contra las primeras. Además, el tipo de infección es relevante; la formación de biofilms, una característica clave en infecciones crónicas, mostró diferencias en la efectividad de la bromelina, siendo notable contra biofilms de *S. aureus*, pero no contra los de *P. aeruginosa*, indicando variaciones en la composición y resistencia de los biofilms. La bromelina según la literatura revisada es más efectiva contra microorganismos Gram +, por lo que es más efectivo contra *S. aureus*. Por otro lado, la efectividad de la bromelina contra *S. mutans* en la presente investigación fue dependiente de la concentración y el tiempo de exposición, sugiriendo que la bromelina puede requerir mayores concentraciones y un tiempo de exposición más prolongado para ser efectiva contra ciertas bacterias.

En cuanto al estudio realizado por Chamorro MR. (12), se realizaron pruebas comparativas con extracto etanólico de eucalipto (25%, 50%, 75%, y 100%) y clorhexidina al 0.12% a las 24 y 48 horas, usando el método de Kirby Bauer sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. El extracto al 100% mostró el mayor halo inhibitorio (21.67 mm y 20.12 mm), significativamente mayor que la clorhexidina al 0.12% (17.50 mm y 17.04 mm) ( $p < 0.05$ ). En contraste con la presente investigación los halos de inhibición en cuanto al gluconato de clorhexidina varían, al ser de menor diámetro (11.75 mm y 11.95mm), esto podría deberse a las condiciones experimentales, dentro de los cuales podemos mencionar la cantidad de la sustancia impregnada en los discos de papel filtro, 40  $\mu$ l en el estudio de Chamorro MR. y 15  $\mu$ l en el presente estudio. Por otro lado, estos resultados también difieren de los encontrados en el estudio realizado por Belsuzarri C. Y Valderrama D. (13), donde los halos de inhibición para el gluconato de clorhexidina son menores (10,32 mm), esto puede deberse al tiempo de exposición, debido a que en este estudio se recopilaron los datos una sola vez (72 horas) y además se evaluó la efectividad antibacteriana sobre *P. gingivalis*, que es un microorganismo de estructura y mecanismo de resistencia distinto al *S. mutans*. Asimismo, el estudio realizado por Delgado EM. y Tapia Y. (14), muestra resultados diferentes en cuanto al halo de inhibición del gluconato de clorhexidina (36.30mm), la variabilidad de este resultado se puede deber a la concentración mayor de la clorhexidina que fue del 1% , mientras que el presente estudio se utilizó la concentración del 0.12%.

Si bien es cierto, en la mayoría de las investigaciones donde se proponen nuevos aditivos naturales con eficacia antibacteriana como es el caso de la presente investigación tienen resultados positivos, estos no se traducen directamente a la práctica clínica debido a varios motivos. Primero, estos estudios suelen requerir validación en diferentes contextos y poblaciones para establecer la replicabilidad y robustez de los resultados. Además, los aditivos naturales deben cumplir con estrictas regulaciones que exigen pruebas exhaustivas de seguridad y eficacia antes de su aprobación para uso clínico, lo que puede retrasar su incorporación. También es crucial comparar su efectividad con tratamientos estándar existentes, evaluando coste-beneficio y asegurando la estandarización de su composición y concentración para una aplicación clínica confiable. Finalmente, la aceptación en la comunidad

científica y clínica requiere acumular evidencia convincente a través de estudios adicionales y revisiones sistemáticas.

Por último, con la presente investigación se buscaba que la efectividad antibacteriana de la bromelina fuera superior al gluconato de clorhexidina, en base a la hipótesis de investigación planteada y además a la literatura existente sobre esta propiedad de la bromelina, lo cual se corroboró al encontrar que la bromelina, sobre todo a concentraciones altas (5% y 10%) tiene una efectividad superior al gluconato de clorhexidina, por lo cual se concluye en la aceptación de la hipótesis de investigación.

## CONCLUSIONES

**PRIMERA:** La bromelina, especialmente en concentraciones del 5% y 10%, mostró mayor capacidad para inhibir el crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en comparación con el gluconato de clorhexidina al 0.12% tanto a las 24 como a las 48 horas. Los halos de inhibición para la bromelina al 5% y 10% fueron significativamente mayores que los del gluconato de clorhexidina, sugiriendo que la bromelina es más efectiva, especialmente en concentraciones más altas, y tiene potencial como agente antibacteriano en tratamientos preventivos de la caries dental.

**SEGUNDA:** La bromelina al 1% mostró una capacidad limitada para inhibir *Streptococcus mutans* ATCC 25175, indicando una ligera mejora con el aumento del tiempo de exposición.

**TERCERA:** La bromelina al 5% mostró efectividad en inhibir *Streptococcus mutans* ATCC 25175, indicando un aumento en la efectividad con el tiempo de exposición.

**CUARTA:** La bromelina al 10% mostró alta efectividad en inhibir *Streptococcus mutans* ATCC 25175, indicando un aumento en la efectividad con el tiempo de exposición.

**QUINTA:** El gluconato de clorhexidina al 0.12% mostró una efectividad antibacteriana constante pero moderada contra *Streptococcus mutans* ATCC 25175; por lo tanto, este hallazgo afirma la literatura existente acerca de las propiedades del gluconato de clorhexidina en la prevención de la caries dental.

## SUGERENCIAS Y RECOMENDACIONES

### PARA EL VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN DE LA UNSAAC

**PRIMERA:** Facilitar el acceso a laboratorios bien equipados y con los materiales necesarios para investigaciones avanzadas sobre la bromelina y su potencial en la prevención y tratamiento de enfermedades bucodentales, promoviendo también el uso compartido de los laboratorios de las Escuelas, lo que permitirá un intercambio eficaz de conocimientos y recursos.

**SEGUNDA:** Fomentar proyectos de investigación aplicada que vinculen los descubrimientos científicos con posibles aplicaciones clínicas y prácticas en odontología.

### PARA LOS DOCENTES DE LA ESCUELA PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA

**TERCERA:** motivar a los estudiantes a realizar nuevas investigaciones sobre la bromelina, respaldando proyectos con el potencial de lograr un impacto significativo en la prevención de la caries dental.

**CUARTA:** Proporcionar capacitación en técnicas de laboratorio específicas para la investigación de enzimas, como el caso de la bromelina, y su aplicación en odontología, asegurando que los estudiantes estén bien preparados para realizar sus proyectos.

**QUINTA:** Brindar supervisión y mentoría constante durante todas las fases del proyecto de investigación, ayudando a los estudiantes a realizar estudios adecuados y a interpretar los resultados correctamente.

### PARA LOS ESTUDIANTES DE LA ESCUELA PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA

**SEXTA:** Realizar una revisión exhaustiva de la literatura sobre la bromelina y su potencial en la prevención y/o tratamiento de enfermedades bucodentales para fundamentar sólidamente sus hipótesis y enfoques experimentales.

**SÉPTIMA:** realizar experimentos con controles adecuados y replicaciones suficientes para obtener resultados fiables y válidos; además de mantener una documentación detallada de todos los procedimientos experimentales, observaciones y resultados para garantizar la reproducibilidad y la integridad científica.

**OCTAVA:** Buscar oportunidades para presentar sus hallazgos en conferencias académicas y considerar la publicación de sus resultados en revistas científicas indexadas con filiación de la UNSAAC para contribuir al avance del conocimiento en el campo de la odontología y visibilidad científica en la investigación de la bromelina en diferentes áreas de la odontología.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Krupa NC, Thippeswamy HM, Chandrashekar BR. Antimicrobial efficacy of Xylitol, Probiotic and Chlorhexidine mouth rinses among children and elderly population at high risk for dental caries - A Randomized Controlled Trial. *J Prev Med Hyg.* junio de 2022;63(2):E282-7.
2. Lemos JA, Palmer SR, Zeng L, Wen ZT, Kajfasz JK, Freires IA, et al. The Biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Spectr.* enero de 2019;7(1).
3. Sharma P, Chandrashekar BR, Mruthunjaya K, Bhaskar V. Evaluation of the effectiveness of green tea mouth rinse on oral halitosis, tongue coating, and plaque accumulation in comparison with 0.2% chlorhexidine mouth rinse – A double-blind randomized control trial. *J Indian Soc Periodontol.* 2023;27(3):308-14.
4. Rehman S, Iqbal Z, Qureshi R, AlOmar TS, Almasoud N, Younas M, et al. Ethno-Dentistry of Medicinal Plants Used in North Waziristan, Pakistan. *Int Dent J.* 10 de noviembre de 2023;S0020-6539(23)00934-6.
5. Chandwani ND, Maurya N, Nikhade P, Chandwani J. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of calcium hydroxide, triple antibiotic paste and bromelain against *Enterococcus faecalis*: An In Vitro study. *J Conserv Dent JCD.* 2022;25(1):63-7.
6. Jančič U, Gorgieva S. Bromelain and Nisin: The Natural Antimicrobials with High Potential in Biomedicine. *Pharmaceutics.* 29 de diciembre de 2021;14(1):76.
7. Organización Mundial de la Salud. Salud bucodental [Internet]. [citado 20 de noviembre de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/oral-health>
8. Nigel B P, Svante T, Julian F, Philip D M. Understanding dental caries as a non-communicable disease. *Br Dent J [Internet].* diciembre de 2021 [citado 20 de noviembre de 2023];231(12). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34921271/>
9. Pereira Silva M. Análise da atividade antibacteriana e antibiofilme de bromelina em cepas de *pseudomonas aeruginosa* e *staphylococcus aureus* [Internet] [Tesis de posgrado]. [Rio de Janeiro]: Universidade Federal Fluminense; 2022 [citado 6 de noviembre de 2023]. Disponible en: <https://app.homologacao.uff.br/riuff/handle/1/27427>
10. Lima Capillé C. Avaliação da atividade proteolítica e antimicrobiana da bromelina no processo de adesão à estrutura dentinária [Internet] [Tesis para optar al título de Maestría]. [Rio de Janeiro]: Universidade Federal Fluminense; 2016 [citado 7 de noviembre de 2023]. Disponible en: <http://app.uff.br/riuff/handle/1/15138>



11. 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 JIOH*. septiembre de 2014;6(5):96-8.
12. Chamorro Palacios M del R. Efectividad antibacteriana del extracto etanólico de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Un estudio in vitro [Internet] [Tesis para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista]. [Lima]: Universidad Nacional Federico Villarreal; 2023 [citado 9 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://repositorio.unfv.edu.pe/handle/20.500.13084/7610>
13. Belsuzarri Victorio CD, Valderrama Castillo DW. Efectividad antibacteriana del extracto etanólico de *Pelargonium x hortorum* L.H. Bailey sobre cepas de *Porphyromonas Gingivalis*. [Internet] [Tesis para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista]. [Huánuco]: Universidad Nacional Hermilio Valdizan; 2015 [citado 9 de mayo de 2024]. Disponible en: <http://repositorio.unheval.edu.pe/handle/20.500.13080/723>
14. Delgado Heredia EM, Tapia Oblitas YB. Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (Tara) frente a *Streptococcus mutans* [Internet] [Tesis Para Optar El Título Profesional De Químico Farmacéutico]. [Lima]: Universidad María Auxiliadora; 2021 [citado 9 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://repositorio.uma.edu.pe/handle/20.500.12970/447>
15. López Alvarado MV. Efectividad antibacteriana in vitro del gel de *Burm. f. (aloe vera)* y extracto hidroetanólico de *Matricaria chamomilla* (manzanilla) sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 [Internet] [Tesis para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista]. [Áncash]: Universidad Católica de los Ángeles Chimbote; 2018 [citado 24 de noviembre de 2023]. Disponible en: <https://repositorio.uladech.edu.pe/handle/20.500.13032/4966>
16. Agrawal P, Nikhade P, Patel A, Mankar N, Sedani S. Bromelain: A Potent Phytomedicine. *Cureus*. agosto de 2022;14(8):e27876.
17. Chakraborty AJ, Mitra S, Tallei TE, Tareq AM, Nainu F, Cicia D, et al. Bromelain a Potential Bioactive Compound: A Comprehensive Overview from a Pharmacological Perspective. *Life*. 6 de abril de 2021;11(4):317.
18. Hikisz P, Bernasinska-Slomczewska J. Beneficial Properties of Bromelain. *Nutrients*. 29 de noviembre de 2021;13(12):4313.
19. 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*. 23 de septiembre de 2021;10(10):2249.
20. Castell JV, Friedrich G, Kuhn CS, Poppe GE. Intestinal absorption of undegraded proteins in men: presence of bromelain in plasma after oral intake. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol*. julio de 1997;273(1):G139-46.

21. Flores AA, Espinosa AC, Rodríguez AM, Peña MAS, Camarillo DL, Baéz AZM. La bromelina y su aplicación terapéutica antiinflamatoria en humanos: una revisión de alcance. *Nutr Clínica Dietética Hosp* [Internet]. 16 de mayo de 2023 [citado 2 de diciembre de 2023];43(2). Disponible en: <https://revista.nutricion.org/index.php/ncdh/article/view/371>
22. Mendes MLT, do Nascimento-Júnior EM, Reinheimer DM, Martins-Filho PRS. Efficacy of proteolytic enzyme bromelain on health outcomes after third molar surgery. Systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Med Oral Patol Oral Cirugia Bucal*. 1 de enero de 2019;24(1):e61-9.
23. Chauhan K, Basavanna RS, Shivanna V. Effect of bromelain enzyme for dentin deproteinization on bond strength of adhesive system. *J Conserv Dent JCD*. 2015;18(5):360-3.
24. Ramírez-Carreto, S, Miranda-Zaragoza, B, Rodríguez-Almazán, C. Purificación de proteínas. *Mens Bioquím*. 2021;45:35-47.
25. Arshad ZIM, Amid A, Yusof F, Jaswir I, Ahmad K, Loke SP. Bromelain: an overview of industrial application and purification strategies. *Appl Microbiol Biotechnol*. septiembre de 2014;98(17):7283-97.
26. Echave J, Fraga-Corral M, Garcia-Perez P, Popović-Djordjević J, H. Avdović E, Radulović M, et al. Seaweed Protein Hydrolysates and Bioactive Peptides: Extraction, Purification, and Applications. *Mar Drugs*. 31 de agosto de 2021;19(9):500.
27. Łojewska E, Kowalczyk T, Olejniczak S, Sakowicz T. Extraction and purification methods in downstream processing of plant-based recombinant proteins. *Protein Expr Purif*. 1 de abril de 2016;120:110-7.
28. de Lencastre Novaes LC, Jozala AF, Lopes AM, de Carvalho Santos-Ebinuma V, Mazzola PG, Pessoa Junior A. Stability, purification, and applications of bromelain: A review. *Biotechnol Prog*. 2016;32(1):5-13.
29. Luque C, Rodríguez S, Martínez-Sandoval G, Elizondo Cantu O, Enriquez M, Rodriguez-Pulido J. Propiedades y uso de la clorhexidina en el tratamiento periodontal no quirúrgico y quirúrgico. 2 de octubre de 2019;16:56-60.
30. Bescos R, Ashworth A, Cutler C, Brookes ZL, Belfield L, Rodiles A, et al. Effects of Chlorhexidine mouthwash on the oral microbiome. *Sci Rep*. 24 de marzo de 2020;10(1):5254.
31. Brookes ZLS, Bescos R, Belfield LA, Ali K, Roberts A. Current uses of chlorhexidine for management of oral disease: a narrative review. *J Dent*. diciembre de 2020;103:103497.
32. Poppolo Deus F, Ouanounou A. Chlorhexidine in Dentistry: Pharmacology, Uses, and Adverse Effects. *Int Dent J*. 12 de marzo de 2022;72(3):269-77.

33. Opstrup MS, Jemec GBE, Garvey LH. Chlorhexidine Allergy: On the Rise and Often Overlooked. *Curr Allergy Asthma Rep.* 14 de marzo de 2019;19(5):23.
34. Brookes ZLS, Belfield LA, Ashworth A, Casas-Agustench P, Raja M, Pollard AJ, et al. Effects of chlorhexidine mouthwash on the oral microbiome. *J Dent.* octubre de 2021;113:103768.
35. Ramirez LS, Castaño DM. Metodologías Para Evaluar in Vitro La Actividad Antibacteriana De Compuestos De Origen Vegetal. *Sci Tech.* 2009;XV(42):263-8.
36. Picazo JJ. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad ante los antimicrobianos [Internet]. SEIMC; 2000. Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>
37. Ortez JH. Prueba de Difusión por Disco. En: *Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana* [Internet]. American Society for Microbiology; 2009. p. 39-52. Disponible en: [https://www3.paho.org/spanish/ad/ths/ev/labs\\_sucep\\_antimicro.pdf](https://www3.paho.org/spanish/ad/ths/ev/labs_sucep_antimicro.pdf)
38. Bacali C, Vulturar R, Buduru S, Cozma A, Fodor A, Chiş A, et al. Oral Microbiome: Getting to Know and Befriend Neighbors, a Biological Approach. *Biomedicines.* 14 de marzo de 2022;10(3):671.
39. Nagakubo D, Kaibori Y. Oral Microbiota: The Influences and Interactions of Saliva, IgA, and Dietary Factors in Health and Disease. *Microorganisms.* 13 de septiembre de 2023;11(9):2307.
40. Lee YH, Chung SW, Auh QS, Hong SJ, Lee YA, Jung J, et al. Progress in Oral Microbiome Related to Oral and Systemic Diseases: An Update. *Diagn Basel Switz.* 16 de julio de 2021;11(7):1283.
41. Belibasakis GN, Bostanci N, Marsh PD, Zaura E. Applications of the oral microbiome in personalized dentistry. *Arch Oral Biol.* agosto de 2019;104:7-12.
42. Peng X, Cheng L, You Y, Tang C, Ren B, Li Y, et al. Oral microbiota in human systematic diseases. *Int J Oral Sci.* 2 de marzo de 2022;14:14.
43. Tuominen H, Rautava J. Oral Microbiota and Cancer Development. *Pathobiology.* 11 de noviembre de 2020;88(2):116-26.
44. Valm AM. The Structure of Dental Plaque Microbial Communities in the Transition from Health to Dental Caries and Periodontal Disease. *J Mol Biol.* 26 de julio de 2019;431(16):2957-69.
45. Zhang JS, Chu CH, Yu OY. Oral Microbiome and Dental Caries Development. *Dent J.* 30 de septiembre de 2022;10(10):184.

46. Abranches J, Zeng L, Kajfasz JK, Palmer SR, Chakraborty B, Wen ZT, et al. Biology of Oral Streptococci. *Microbiol Spectr.* octubre de 2018;6(5).
47. Krzyściak W, Jurczak A, Kościelniak D, Bystrowska B, Skalniak A. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014;33(4):499-515.
48. Mosterd C, Moineau S. Characterization of a Type II-A CRISPR-Cas System in *Streptococcus mutans*. *mSphere.* 24 de junio de 2020;5(3):e00235-20.
49. Watanabe A, Kawada-Matsuo M, Le MNT, Hisatsune J, Oogai Y, Nakano Y, et al. Comprehensive analysis of bacteriocins in *Streptococcus mutans*. *Sci Rep.* 21 de junio de 2021;11:12963.
50. Lemos J, Palmer S, Zeng L, Wen Z, Kajfasz J, Freires I, et al. The Biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Spectr* [Internet]. enero de 2019 [citado 20 de diciembre de 2023];7(1). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6615571/>
51. Muñoz LF, Uribe AM, Reyes MC, Castro LA, Rodríguez MJ. Salivary *Streptococcus mutans* colony-forming unit count in patients with and without orthodontic appliances. *Acta Odontol Latinoam AOL.* 31 de diciembre de 2022;35(3):171-7.
52. Agrawal P, Nikhade P, Patel A, Mankar N, Sedani S. Bromelain: A Potent Phytomedicine. *Cureus.* agosto de 2022;14(8):e27876.
53. ASALE R, RAE. «Diccionario de la lengua española» - Edición del Tricentenario. [citado 5 de diciembre de 2023]. *Diccionario de la lengua española | Edición del Tricentenario.* Disponible en: <https://dle.rae.es/>
54. Real Academia Nacional de Medicina: Presentación Diccionario de términos médicos [Internet]. [citado 5 de diciembre de 2023]. Disponible en: <https://dtme.ranm.es/index.aspx>
55. Hernández Sampieri R. Metodología de la Investigación [Internet]. 6ta ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2018. Disponible en: <https://drive.google.com/file/d/1Fjufmi0oGY4Zs8EajFiAJYNT2qoecH4k/view>
56. Pereyra LE. Metodología de la investigación. Klik; 2020. 145 p.
57. Misran E, Idris A, Ya'akob H. Bromelain extraction using single stage nanofiltration membrane process. *J Food Sci Technol.* enero de 2023;60(1):315-27.
58. Coasaca Ramos MM. Eficacia in vitro del gel elaborado a base de bromelina en la remoción químico mecánica de caries dental en dientes deciduos Puno, 2022 [Internet] [Tesis para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista]. [Puno]: Universidad Nacional del Altiplano; 2023 [citado 25 de marzo de 2024]. Disponible en: <https://repositorio.unap.edu.pe/handle/20.500.14082/19542>

59. Catucuago Sánchez JE. Evaluación del proceso de obtención de la enzima bromelina a partir de desechos de piña (Ananas Comosus) [Internet] [tesis de bachiller]. [Ibarra-Ecuador]: Universidad Técnica del Norte; 2023 [citado 26 de marzo de 2024]. Disponible en: <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/14238>
60. Sacsquispe R, Pomar J. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de Disco Difusión [Internet]. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud; 2002. Disponible en: <https://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/manual%20sensibilidad%202.pdf>
61. Duraffourd C, Lapraz JC, Hervicourt L d'. Cuadernos de fitoterapia clínica [Internet]. Masson; 1987 [citado 25 de agosto de 2024]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=229853>

# ANEXOS

**ANEXO N° 01  
MATRIZ DE CONSISTENCIA**

<b>PROBLEMA</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>HIPOTESIS</b>	<b>VARIABLES</b>	<b>METODOLOGIA</b>
¿Cuál es la efectividad antibacteriana de la bromelina en comparación al gluconato de clorhexidina al 0,12% sobre cepas de Streptococcus mutans ATCC 25175?	<p><b>GENERAL:</b></p> <p>Evaluar la efectividad antibacteriana de la bromelina en comparación al gluconato de clorhexidina al 0,12% sobre cepas de Streptococcus mutans ATCC 25175.</p>	<p><b>Hi:</b></p> <p>La efectividad antibacteriana de la bromelina al 5% es mayor frente al del Gluconato de Clorhexidina al 0.12% sobre cepas de <i>Streptococcus Mutans</i> a las 48 horas.</p>	<p><b>VARIABLES ESTÍMULO</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Bromelina</li> <li>• Gluconato de Clorhexidina al 0.12%</li> </ul>	<p><b>Tipo de investigación:</b></p> <p>Experimental</p> <p><b>Diseño:</b></p> <p>Cuasi-experimental, longitudinal, in vitro.</p> <p><b>Técnica:</b></p> <p>Observación y medición de los halos de inhibición</p> <p><b>Instrumento:</b></p> <p>Ficha de observación</p> <p><b>Procesamiento y análisis de datos:</b></p> <p>Análisis descriptivo e inferencial empleando el software estadístico SPSS versión 25 y Excel. Para comparar más de dos grupos, se utilizó la prueba estadística ANOVA y el test de Tukey.</p>
	<p><b>ESPECIFICOS:</b></p> <p>1.Evaluar la efectividad antibacteriana de la bromelina al 1% sobre cepas de Streptococcus mutans ATCC 25175 a las 24 y 48 horas.</p> <p>2.Evaluar la efectividad antibacteriana de la bromelina al 5% sobre cepas de Streptococcus mutans ATCC 25175 a las 24 y 48 horas.</p> <p>3.Evaluar la efectividad antibacteriana de la bromelina al 10% sobre cepas de Streptococcus mutans ATCC 25175 a las 24 y 48 horas.</p> <p>4.Determinar la efectividad antibacteriana del gluconato de clorhexidina sobre cepas de Streptococcus mutans ATCC 25175 a las 24 y 48 horas.</p>	<p><b>Ho:</b></p> <p>La efectividad antibacteriana de la bromelina al 5% no es mayor frente al Gluconato de Clorhexidina al 0.12% sobre la cepa de <i>Streptococcus Mutans</i> a las 48 horas.</p>	<p><b>VARIABLE RESPUESTA</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Efectividad antibacteriana sobre cepas de Streptococcus mutans ATCC 25175.</li> </ul>	

**ANEXO N° 02**  
**FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

Tiempo de medición:

Repeticiones	Halo de inhibición (mm)				
	Bromelina al 1%	Bromelina al 5%	Bromelina al 10%	Gluconato de clorhexidina al 0.12%	Control negativo (-)
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					



**ANEXO N° 03**  
**AUTORIZACIÓN DEL USO DE LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, FÍSICAS Y MATEMÁTICAS  
Escuela profesional de Química

**"Año del Bicentenario, de la consolidación de nuestra Independencia, y de la conmemoración de las heroicas batallas de Junín y Ayacucho"**

Cusco, 20 de mayo del 2024

A : DRA. SIVELY LUZ MERCADO MAMANI  
COORDINADORA DE TRABAJOS DE INVESTIGACION DE PRE-GRADO ESCUELA  
PROFESIONAL DE ODONTOLOGIA

**ASUNTO: Autorización para uso de laboratorio**

De mi consideración:

En respuesta a la solicitud presentada, se autoriza a la tesista HILDA HUALLPA CUSIHUALLPA, bachiller de la Escuela Profesional de Odontología, el uso del laboratorio de Productos Naturales P-205, a cargo del Dr. Carlos Alberto Serrano Flores para el aislamiento de la enzima Bromelina, como parte de procedimiento del trabajo de investigación titulado "COMPARACIÓN IN VITRO DE LA EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA BROMELINA Y EL GLUCONATO DE CLORHEXIDINA AL 0.12% SOBRE CEPAS DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175, CUSCO-2024", durante el tiempo requerido hasta la obtención de la enzima.

Atentamente,

Dr. Carlos Alberto Serrano Flores

**ANEXO N° 04**  
**AUTORIZACIÓN DEL USO DE LABORATORIO DE TECNOLOGÍA**  
**FARMACÉUTICA**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO**  
**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA**

**"Año del Bicentenario, de la consolidación de nuestra Independencia, y de la  
conmemoración de las heroicas batallas de Junín y Ayacucho"**

Cusco, 10 de junio del 2024

A : DRA. SIVELY LUZ MERCADO MAMANI  
COORDINADORA DE TRABAJOS DE INVESTIGACION DE PRE-GRADO ESCUELA  
PROFESIONAL DE ODONTOLOGIA

**ASUNTO:** Autorización para uso de laboratorio

De mi consideración:

En respuesta a la solicitud presentada, se autoriza a la tesista HILDA HUALLPA CUSIHUALLPA, bachiller de la Escuela Profesional de Odontología, el uso del laboratorio de Tecnología Farmacéutica de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, a cargo del Mgt. Roger Giancarlo Gutierrez Chávez, para la realización del trabajo de investigación titulado "COMPARACIÓN IN VITRO DE LA EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA BROMELINA Y EL GLUCONATO DE CLORHEXIDINA AL 0.12% SOBRE CEPAS DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175, CUSCO-2024".

Atentamente,

Dr. Roger Giancarlo Gutierrez Chávez

**ANEXO N° 05**  
**CONSTANCIA DEL AISLAMIENTO DE LA ENZIMA BROMELINA**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO**  
**Escuela profesional de Farmacia y Bioquímica**  
**Laboratorio de tecnología farmacéutica**



**CONSTANCIA DEL AISLAMIENTO DE LA ENZIMA BROMELINA**

Yo, **Dr. Carlos Alberto Serrano**, identificado con C.Q.P. 356, doctor en Ciencias e Ingenierías Biológicas, hago CONSTAR que he asesorado y supervisado a la bachiller **Hilda Huallpa Cusihualpa** con DNI N° 74324403, estudiante de la Escuela Profesional de Odontología, en el correcto aislamiento de la enzima bromelina, lo que incluye la obtención de la fruta, extracción, purificación y liofilización de la enzima bromelina ; así como, la preparación a las diferentes concentraciones, del proyecto de tesis intitulado **“COMPARACIÓN IN VITRO DE LA EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA BROMELINA Y EL GLUCONATO DE CLORHEXIDINA AL 0.12% SOBRE CEPAS DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175, CUSCO-2024”**; el cual fue realizado en los ambiente de Productos Naturales P-205, de la Escuela Profesional de Química de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

Asimismo, hago constar de que todo el proceso se realizó dentro de las condiciones y parámetros que requiere la enzima en estudio.

Por lo cual, se expide la presente para los fines pertinentes.

Atentamente,

**Dr. Carlos Alberto Serrano**

C.Q.P.: 356

**ANEXO N° 06**  
**CONSTANCIA DE LA EJECUCION Y SUPERVISION DEL PROYECTO**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO**  
**Escuela profesional de Farmacia y Bioquímica**  
**Laboratorio de tecnología farmacéutica**





**CONSTANCIA DE LA REALIZACIÓN DEL PROYECTO**

Yo, **Blgo. Victor Andres Tapia Puma**, identificado con C.B.P. 17354, docente de la Escuela Profesional de Biología, hago CONSTAR que he asesorado y supervisado a la bachiller **Hilda Huallpa Cusihuallpa** con DNI N° 74324403, estudiante de la Escuela Profesional de Odontología, en la correcta ejecución del procedimiento microbiológico que incluye la activación de la cepa de *Streptococcus mutans*, inoculación de los discos de papel filtro a las diferentes concentraciones, medición de los halos de inhibición a las 24 y 48 horas y la evaluación de la efectividad antibacteriana de la enzima bromelina, del proyecto de tesis intitulado **"COMPARACIÓN IN VITRO DE LA EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA BROMELINA Y EL GLUCONATO DE CLORHEXIDINA AL 0.12% SOBRE CEPAS DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175, CUSCO-2024"**; el cual fue realizado en los ambiente de Tecnología Farmacéutica de la Escuela Profesional de Farmacia y bioquímica de la UNSAAC.

Asimismo, hago constar que se ha realizado la prueba de calibración de la investigadora para la correcta visualización y medición de los halos de inhibición.

Por lo cual, se expide la presente para los fines pertinentes.

Atentamente,

  
  
**Victor Andres Tapia Puma**  
**Biólogo**  
**C.B.P. 17354**

**ANEXO N° 07**  
**PRUEBA DE CALIBRACIÓN DEL INVESTIGADOR**

<b>KAPPA DE COHEN</b>					
<b>Variable</b>	<b>n</b>	<b>Calibración</b>	<b>%</b>	<b>Kappa</b>	<b>*p</b>
<b>Bromelina</b>	10	Interevaluador	100%	1,000	,000
<b>Gluconato de Clorhexidina</b>	10	Interevaluador	100%	1,000	,000

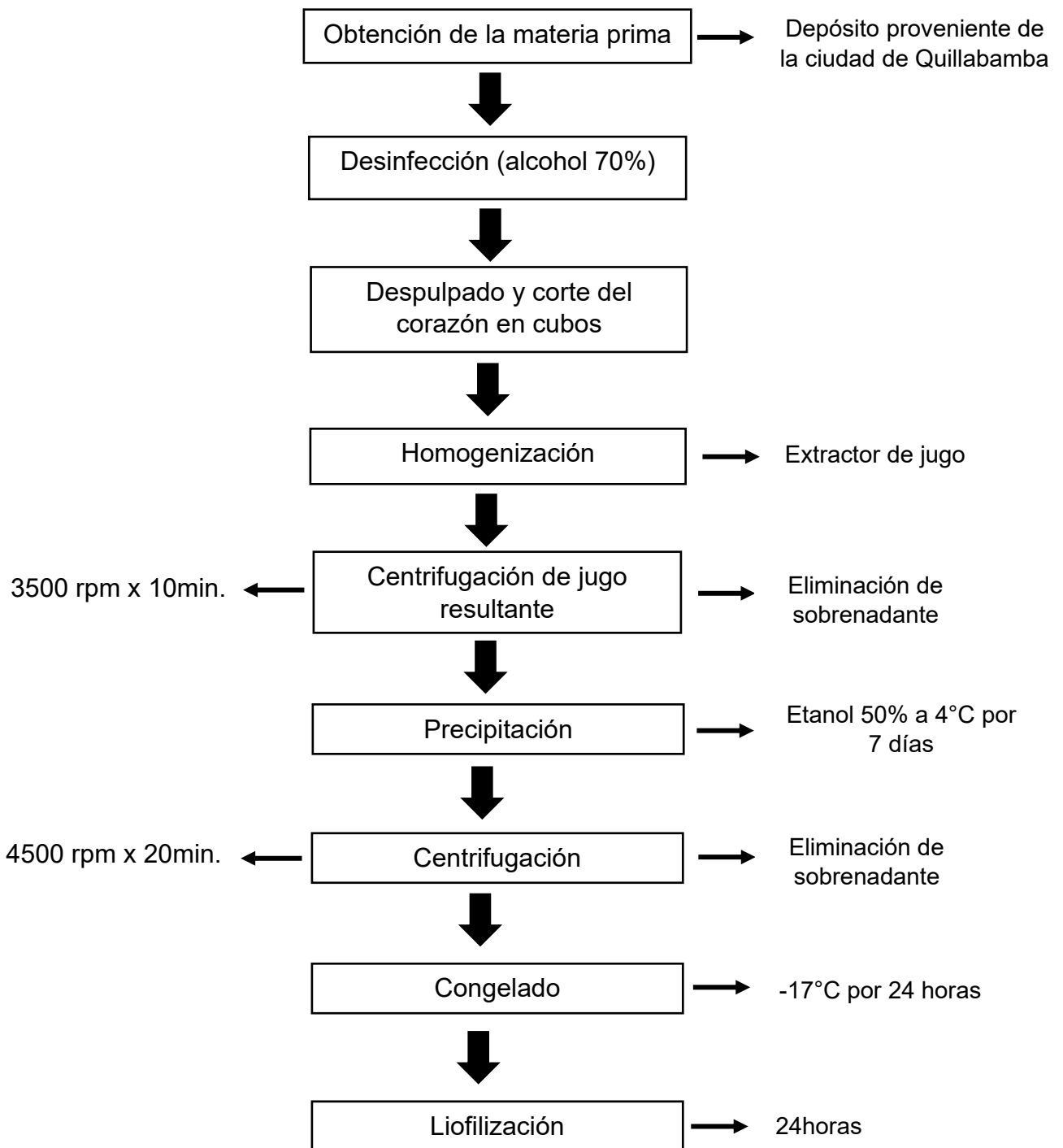
**Escala de Kappa:**

- 0-0.2: Ínfima concordancia
- 0.2-0.4: Escasa concordancia
- 0.4-0.6: Moderada concordancia
- 0.6-0.8: Buena concordancia
- **0.8-1.0: Muy buena concordancia**

**INTERPRETACIÓN:** Dado que los valores de Kappa están entre 0.8 y 1, se puede interpretar que existe una muy buena concordancia entre los evaluadores. Esto implica que ambos evaluadores tienen un alto grado de acuerdo en sus evaluaciones, lo que sugiere que las observaciones o mediciones realizadas son consistentes y fiables. Esta muy buena concordancia es un indicativo positivo de la calidad y reproducibilidad de los datos obtenidos en la presente investigación, reflejando que los criterios de evaluación son claros y aplicados de manera uniforme por ambos evaluadores.

## ANEXO N° 08

### FLUJOGRAMA 01: OBTENCIÓN DE LA ENZIMA BROMELINA




*Fuente: Elaboración propia*

**ANEXO N° 09**  
**CERTIFICADO DE ANÁLISIS DE STREPTOCOCCUS MUTANS ATCC 25175**



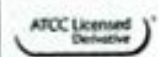
Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<b>Specifications</b> Microorganism Name: Streptococcus mutans Catalog Number: 0266 Lot Number: 266-35** Reference Number: ATCC® 25175™** Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2024/8/31 Release Information: Quality Control Technologist: Jacob A Lohman Release Date: 2022/5/12
--	---

<b>Macroscopic Features:</b> Two colony types: small, circular, dome shaped, entire edge, white and the other is small, circular and translucent.	<b>Performance</b> Medium: SBAP Method: Gram Stain (1)
<b>Microscopic Features:</b> Small gram positive coccid to ovoid cells occurring singly, in pairs and predominately in chains.	<b>Other Features/ Challenges: Results</b> (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): negative
<b>ID System: MALDI-TOF (1)</b> See attached ID System results document.	 Amanda Kuperus Director of Quality Control AUTHORIZED SIGNATURE

\*\*Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.  
 Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(1) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC Microbiologics, Inc. It is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.  
 (1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025.

**ANEXO N° 010**  
**FOTOGRAFÍAS DEL AISLAMIENTO DE LA ENZIMA BROMELINA**



Obtención de la materia prima



Pelado, despulpado de la fruta y obtención de los corazones de piña



Corte del corazón en cubos pequeños



Obtención del extracto de piña a través del extractor de jugo







Centrifugación del extracto obtenido a 3500 rpm por 10 minutos.



Determinación de la cantidad del extracto centrifugado



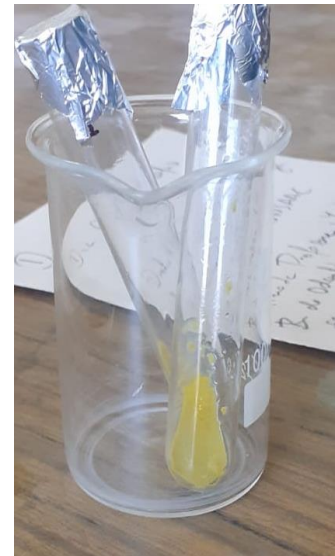
Adición de etanol al 50%, 1.2 más que el volumen del extracto obtenido



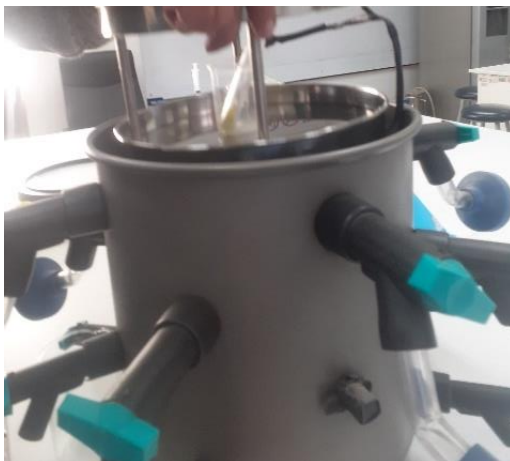
Enzima precipitado después de 7 días de refrigeración a 4°C



Centrifugación del precipitado a 4500 rpm por 20 minutos



Obtención de la enzima en dos tubos de ensayo de 516.1 mg y 656 mg de enzima



Liofilización de la enzima por 24 horas, para una mejor conservación de sus propiedades.



Preparación de la enzima a las concentraciones del 1%, 5% y 10%.

## ANEXO N° 011

### FOTOGRAFÍAS DEL PROCEDIMIENTO MICROBIOLÓGICO

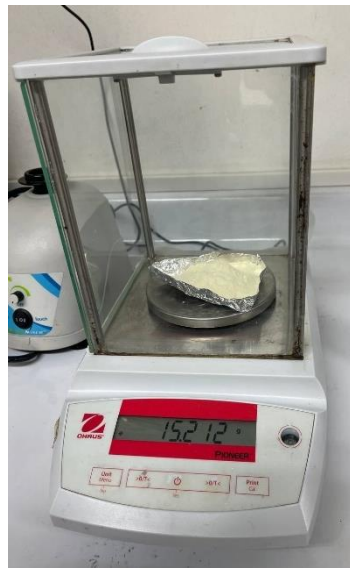


Preparación del medio de cultivo agar sangre para la activación e la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.



Cultivo de la cepa en dos placas Petri con Agar Sangre

Incubación a 37°C por 48 horas.



Preparación del medio de cultivo Agar Sangre 5%

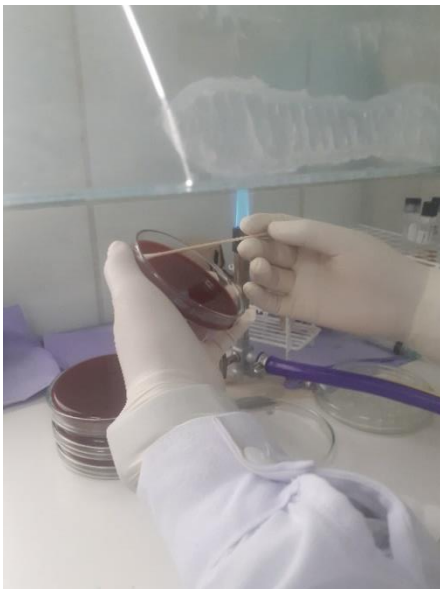


Homogenización por medio de calor y esterilización a 121°C por 15 minutos del medio de cultivo

Adición de 5% sangre



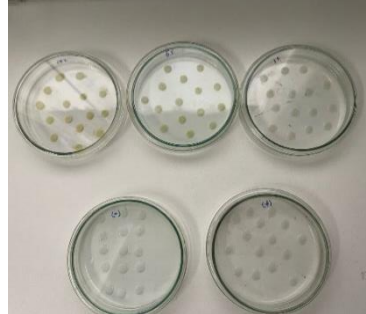
Transferencia de colonias aisladas a un tubo de ensayo con 3mL de agua destilada hasta alcanzar la turbidez estándar de 0.5 de McFarland.



Aplicación de la suspensión bacteriana por medio de un hisopo estéril con la técnica de estriado para una distribución uniforme



Inoculación de discos con 15µl de cada solución



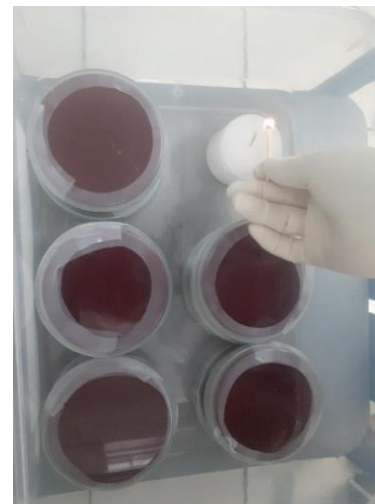
Evaporación de los excesos de las soluciones



Colocación discos en las placas con el medio de cultivo



Colocación de las placas de manera invertida en un recipiente hermético



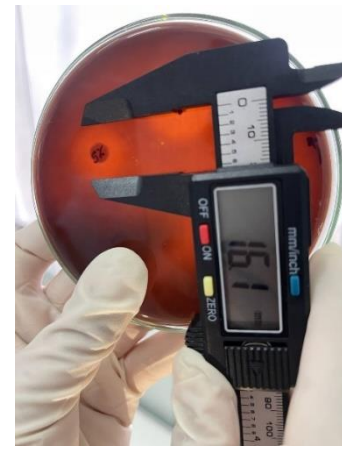
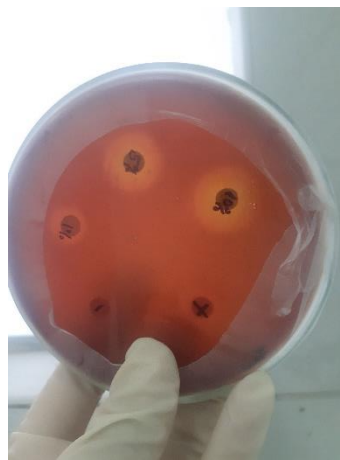
Creación del ambiente de microanaerobiosis, utilizando el método de la vela



Recipiente cerrado herméticamente



Incubación a 37°C, por el tiempo requerido para la medición de los halos de inhibición.



. Medición de los halos de inhibición con el uso de un vernier digital.



Halos de inhibición de la bromelina al 1%, 5% y 10 % respectivamente



## ANEXO N° 012

### INFORME DE PRUEBA PILOTO

<b>Título de la investigación</b>	COMPARACIÓN IN VITRO DE LA EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA BROMELINA Y EL GLUCONATO DE CLORHEXIDINA AL 0.12% SOBRE CEPAS DE <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175, CUSCO-2024
-----------------------------------	---

#### Informe prueba piloto

**1. Propósito:** El propósito de este informe preliminar es evaluar la efectividad antibacteriana de la Bromelina comparándola con un agente conocido y utilizado frecuentemente, el Gluconato de Clorhexidina al 0.12%, en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Esta bacteria está comúnmente relacionada con las caries dentales, y es de gran interés en la investigación odontológica encontrar tratamientos alternativos efectivos.

#### 2. OBJETIVOS:

##### Objetivo general

Evaluar la efectividad antibacteriana de la bromelina en comparación al gluconato de clorhexidina al 0,12% sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

##### Objetivos específicos

1. Evaluar la efectividad antibacteriana de la bromelina al 1% sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a las 24 y 48 horas.
2. Evaluar la efectividad antibacteriana de la bromelina al 5% sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a las 24 y 48 horas.
3. Evaluar la efectividad antibacteriana de la bromelina al 10% sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a las 24 y 48 horas.
4. Determinar la efectividad antibacteriana del gluconato de clorhexidina sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a las 24 y 48 horas.

#### 3. METODOLOGÍA

##### 3.1. Materiales y métodos

**Cepa bacteriana:** *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

**Agentes evaluados:**

- Bromelina a diferentes concentraciones (1%, 5% y 10%).
- Gluconato de Clorhexidina al 0.12%.

**Medio de cultivo:** Agar Sangre 5%.

**Condiciones de incubación:** 37°C, en condiciones de microanaerobiosis.

**Tiempos de evaluación:** 24 y 48 horas.

### 3.2. Procedimientos

1. Activación de la cepa bacteriana de *Streptococcus mutans* en el medio de cultivo Agar sangre (5%), posteriormente se incubo a 37°C por 48 horas para obtener colonias jóvenes (Anexo 1) .
2. Preparación de suspensiones bacterianas a una densidad óptica de 0.5 McFarland.
3. Inoculación de placas de agar Mueller-Hinton con 5% de sangre con la suspensión bacteriana (Anexo 2).
4. Aplicación de discos impregnados con las soluciones de Bromelina a las diferentes concentraciones (1%, 5% y 10%), Gluconato de Clorhexidina al 0.12% y el control negativo (suero fisiológico estéril) (Anexo 3).
5. Incubación de las placas a 37°C en una atmósfera de microanaerobiosis aplicando el método de la vela (Anexo 4).
6. Medición de los diámetros de los halos de inhibición (en mm) con un vernier digital a las 24 y 48 horas (Anexo 5)

### Resultados

#### Resultados a las 24 horas

Repeticiones	Halo de inhibición (mm)				
	Bromelina al 1%	Bromelina al 5%	Bromelina al 10%	Gluconato de clorhexidina al 0.12%	Control negativo (-)
1	8.5	13.4	17	11	6
2	8.9	15.8	16.3	11.5	6
3	8.7	16	17	12	6

### Resultados a las 48 horas

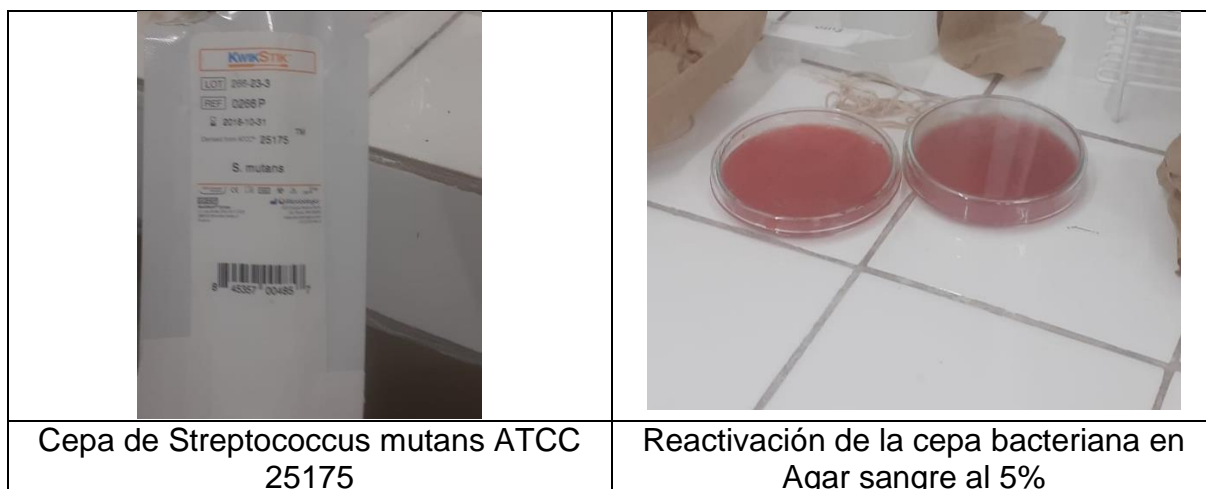
Repeticiones	Halo de inhibición (mm)				
	Bromelina al 1%	Bromelina al 5%	Bromelina al 10%	Gluconato de clorhexidina al 0.12%	Control negativo (-)
1	9.5	16.7	18	11.5	6
2	-	-	-	-	-
3	9.6	17.6	18.5	12.2	6

### Conclusión

Se concluyó que todos los procedimientos en la primera etapa fueron óptimos; mientras que, en la lectura de los halos a las 48 horas, la placa 2 se contaminó, impidiendo la lectura de los halos. Por lo que, para la fase experimental propiamente dicha se deben de tomar las medidas necesarias para mantener la esterilidad del ambiente y así impedir la contaminación de las placas.

## ANEXOS

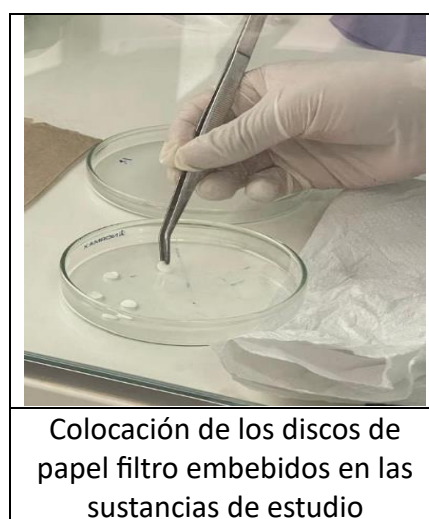
### ANEXO 1





### ANEXO 2



### ANEXO 3



## ANEXO 4

	
<p>Creación del medio de anaerobiosis por el método de la vela</p>	<p>Incubación de las placas Petri a 37°C</p>

## ANEXO 5

		
<p>Halos de inhibición de las diferentes sustancias de estudio</p>	<p>Medición de los halos de inhibición</p>	<p>Halo de inhibición a las 48 horas de la bromelina al 5%</p>