

DOI: <https://doi.org/10.20453/reh.v34i4.6158>

Efecto inhibitorio de la fracción metanólica del propóleo de Oxapampa en diferentes genotipos aislados de *Streptococcus mutans* en niños con caries*

Inhibitory effect of the methanolic fraction of Oxapampa propolis on different isolated genotypes of *Streptococcus mutans* in children with caries

Efeito inibitório da fração metanólica da própolis de Oxapampa em diferentes genótipos de *Streptococcus mutans* isolados de crianças com cárie

Mayra Lizeth Vargas Gil^{1, a} , Pablo Alejandro Millones Gómez^{2, b} , Lidia Yileng Tay Chu Jon^{3, c} , Ana Cecilia Valderrama Negrón^{4, d} , Ingrit Elida Collantes Diaz^{5, e} , Dora Jesús Maurtua Torres^{1, a} 

RESUMEN

Objetivo: Determinar el efecto inhibitorio de la fracción metanólica del propóleo de Oxapampa, Perú, en diferentes genotipos de *Streptococcus mutans* en niños diagnosticados con caries. **Materiales y métodos:** Se recolectaron 150 muestras de hisopado oral, las cuales fueron sembradas para el aislamiento de *S. mutans* y luego identificadas por pruebas bioquímicas de fermentación de carbohidratos, Api 20 Strep (bioMérieux) y PCR convencional. Las 138 cepas aisladas e identificadas de los pacientes y el control de *S. mutans* ATCC® 25175™ se enfrentaron a la fracción metanólica por el método de difusión en disco, teniendo como control positivo clorhexidina al 0,12 % y control negativo agua Milli-Q y DMSO (1:1). **Resultados:**

*El presente artículo fue elaborado a partir de la tesis de Mayra Lizeth Vargas Gil para obtener el grado de maestra en Microbiología por la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

¹ Universidad Peruana Cayetano Heredia, Facultad de Ciencias e Ingeniería. Lima, Perú.

² Universidad Norbert Wiener, Lima, Perú.

³ Universidad Peruana Cayetano Heredia, Facultad de Estomatología. Lima, Perú.

⁴ Universidad Nacional de Ingeniería, Facultad de Ciencias. Lima, Perú.

⁵ Universidad Nacional de Ingeniería, Facultad de Ingeniería Química y Textil. Lima, Perú.

^a Magíster en Microbiología.

^b Doctor en Estomatología.

^c Doctora en Odontología.

^d Doctora en Química Inorgánica.

^e Doctora en Química Orgánica.

Citar como:

Vargas ML, Millones PA, Tay LY, Valderrama AC, Collantes IE, Maurtua DJ. Efecto inhibitorio de la fracción metanólica del propóleo de Oxapampa en diferentes genotipos aislados de *Streptococcus mutans* en niños con caries. Rev Estomatol Herediana. 2024; 34(4): 307-315. DOI: 10.20453/reh.v34i4.6158

Recibido: 18-08-2022

Aceptado: 03-10-2024

En línea: 23-12-2024

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Financiamiento: Fondecyt (Prociencia)-Concytec Perú, bajo el Contrato n.º 163-2016 con la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Aprobación de ética: Cuenta con la autorización del Comité Institucional de Ética de Investigación de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (CIEI-UPCH), con Constancia n.º 324-13-18.

Contribución de autoría:

MLVG: conceptualización, investigación, metodología, redacción de borrador original.

PAMG: adquisición de fondos, metodología, recursos.

LYTCJ: conceptualización, adquisición de fondos, análisis formal, redacción (revisión y edición).

ACVN: metodología, análisis formal.

IECD: metodología, investigación, análisis formal.

DJMT: conceptualización, metodología, investigación, supervisión, redacción (revisión y edición).

Correspondencia:

Dora Jesús Maurtua Torres
Contacto: dora.maurtua@upch.pe



Artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional.

© Los autores

© Revista Estomatológica Herediana

Se encontró que el diámetro de inhibición de las cepas extraídas de los niños diagnosticados con caries frente a la fracción metanólica mostró mayor diámetro (14,13 mm) en relación con la cepa de *S. mutans* ATCC® 25175™ (10,16 mm) con diferencias estadísticamente significativas. En la genotipificación de las 138 cepas con los diferentes primers específicos (c, e, f y k), se encontró que el 63,77 % pertenecía al genotipo c, el 21,73 % a los genotipos c y e, y el 14,50 % a los genotipos c y f. **Conclusiones:** La fracción metanólica del propóleo de Oxapampa presenta actividad inhibitoria en cepas de *S. mutans* aisladas y genotipificadas en niños diagnosticados con caries. Además, presenta mayor actividad inhibitoria en las cepas obtenidas de los niños en comparación con el *S. mutans* ATCC® 25175™.

Palabras clave: *Streptococcus mutans*; extracto propóleo; caries dental; inhibición bacteriana.

ABSTRACT

Objective: To determine the inhibitory effect of the methanolic fraction of propolis from Oxapampa, Peru, on different genotypes of *Streptococcus mutans* in children diagnosed with caries. **Materials and methods:** 150 oral swab samples were collected, seeded for isolation of *S. mutans* and then identified by biochemical tests of carbohydrate fermentation, Api 20 Strep (bioMérieux) and conventional PCR. The 138 strains isolated and identified from patients and the *S. mutans* ATCC® 25175™ control were confronted with the methanolic fraction by the disk diffusion method, having as positive control 0.12% chlorhexidine and negative control Milli-Q water and DMSO (1:1). **Results:** It was found that the inhibition diameter of the strains extracted from children diagnosed with caries against the methanolic fraction showed greater diameter (14.13 mm) in relation to the strain of *S. mutans* ATCC® 25175™ (10.16 mm) with statistically significant differences. In the genotyping of the 138 strains with the different specific primers (c, e, f, and k), it was found that 63.77% belonged to genotype c, 21.73% to genotypes c and e, and 14.50% to genotypes c and f. **Conclusions:** The methanolic fraction of Oxapampa propolis presents inhibitory activity on *S. mutans* strains isolated and genotyped in children diagnosed with caries. In addition, it presents greater inhibitory activity in strains obtained from children compared to *S. mutans* ATCC® 25175™.

Keywords: *Streptococcus mutans*; propolis extract; dental caries; bacterial inhibition.

RESUMO

Objetivo: Determinar o efeito inibitório da fração metanólica da própolis de Oxapampa, Peru, sobre diferentes genótipos de *Streptococcus mutans* em crianças com diagnóstico de cárie. **Materiais e métodos:** 150 amostras de swab oral foram coletadas, semeadas para isolamento de *S. mutans* e depois identificadas por testes bioquímicos de fermentação de carboidratos, Api 20 Strep (bioMérieux) e PCR convencional. As 138 cepas isoladas e identificadas dos pacientes e o controle *S. mutans* ATCC® 25175™ foram desafiados com a fração metanólica pelo método de difusão em disco, tendo clorexidina 0,12 % como controle positivo e água Milli-Q e DMSO (1:1) como controle negativo. **Resultados:** Verificou-se que o diâmetro de inibição das cepas extraídas de crianças diagnosticadas com cárie contra a fração metanólica apresentou maior diâmetro (14,13 mm) em relação à cepa *S. mutans* ATCC® 25175™ (10,16 mm) com diferenças estatisticamente significativas. Na genotipagem das 138 cepas com os diferentes primers específicos (c, e, f e k), verificou-se que 63,77 % pertenciam ao genótipo c, 21,73 % aos genótipos c e e, e 14,50 % aos genótipos c e f. **Conclusões:** A fração metanólica da própolis de Oxapampa apresenta atividade inibitória sobre cepas de *S. mutans* isoladas e genotipadas em crianças diagnosticadas com cárie. Além disso, apresenta maior atividade inibitória em cepas obtidas de crianças em comparação com *S. mutans* ATCC® 25175™.

Palavras-chave: *Streptococcus mutans*; extrato de própolis; cárie dentária; inibição bacteriana.

INTRODUCCIÓN

La caries dental es una enfermedad de etiología bacteriana que constituye un problema de salud pública, y que se caracteriza por la destrucción de los tejidos dentales ocasionada por la acción de ácidos producidos por bacterias presentes en la placa dental. Los principales microorganismos implicados son *Streptococcus mutans* y *S. sobrinus*, aunque también participan *Lactobacillus* y *Actinomyces*. De estos, el primero es el patógeno más asociado a la caries (1), ya que provoca la desmineralización del esmalte dental e incluso, en algunos casos, su pérdida. Esto se da por un desequilibrio en la composición del esmalte dental como consecuencia del metabolismo de los carbohidratos que producen ácidos, así como por la actividad del *biofilm* bacteriano formado, lo cual causa dolor, infección o pérdida del diente (2-5).

El *S. mutans* es un diplococo Gram positivo, dispuesto en cadena, anaerobio facultativo, catalasa negativo y no móvil. Puede producir ácidos láctico, fórmico y propiónico debido a la fermentación de glucosa, lactosa, sacarosa, rafinosa, manitol, inulina y salicina, lo que reduce el pH de 7 a 4,2 en aproximadamente 24 horas, provocando, a su vez, la desmineralización del esmalte dental (6). En medios de cultivo como el agar mitis salivarius (MRS), enriquecido con bacitracina (200 U/uL), telurito de potasio al 1 % y sacarosa al 10 %, las colonias de *S. mutans* presentan una morfología mucoide, convexa, con bordes claros y un punto oscuro. Esta especie se ha subclasificado por serología en varios serotipos según sus propiedades inmunológicas y biológicas, siendo los principales los siguientes: c, e, f y k (6, 7).

Investigaciones sugieren que el serotipo c es el progenitor de *S. mutans*, mientras que e y f habrían surgido por mutaciones (7). Estos serotipos están compuestos por un esqueleto de ramnosa y cadenas laterales de glucosa (8). Respecto al genotipo k, estudios recientes indican que este se distingue por una notable reducción en la cantidad de cadenas laterales de glucosa, lo que resulta en una menor cariogenicidad debido a alteraciones en varios antígenos proteicos de su superficie (8); además, presenta una mayor supervivencia en la sangre por su menor susceptibilidad a la fagocitosis (9).

Por otro lado, el propóleo es una sustancia resinosa y pegajosa de origen natural, recolectada y procesada por las abejas *Apis mellifera* a partir de exudaciones de árboles y plantas (10). Esta sustancia ha sido ampliamente reconocida por sus propiedades antisépticas, debido a su actividad antibacteriana, antiviral y antifúngica. Su componente activo más destacado, el éster fenílico del ácido cafeico, es responsable de sus efectos antimicrobianos y antiinflamatorios. Además, presenta propiedades inmunoestimulantes, antialérgicas, remineralizantes y antioxidantes.

Numerosos estudios científicos han identificado más de 100 componentes del propóleo que actúan sinérgicamente, siendo los flavonoides los más relevantes por su actividad biológica y terapéutica (11). Algunos autores sugieren que esta sustancia inhibe la actividad enzimática de diversas proteínas esenciales para el crecimiento y desarrollo de los microorganismos orales responsables de la caries dental, como el *S. mutans* y, en menor medida, el *Lactobacillus acidophilus* (12, 13). Además, otras investigaciones han demostrado que el extracto metanólico de canela y clavo de olor posee

actividad antibacteriana contra los microorganismos mencionados (14). De manera similar, se observó que la fracción metanólica del propóleo de Oxapampa mostró actividad *in vitro* contra el *biofilm* de *S. gordonii* ATCC® 51656TM y *F. nucleatum* ATCC® 10953TM (15).

En el presente estudio, se propuso determinar el efecto inhibitorio de la fracción metanólica del propóleo de Oxapampa, Perú, en diferentes genotipos de *S. mutans* aislados de niños con caries dental.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio es de tipo experimental *in vitro*. La recolección de muestras de niños con caries dental fue realizada previa aprobación del Comité Institucional de Ética en Investigación de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (CIEI-UPCH), bajo la Constancia n.º 324-13-18 y Código de Inscripción n.º 102214, con fecha 18 de junio de 2018. El tamaño muestral fue calculado utilizando el programa EPIDAT v. 3.1. Se incluyó a 250 niños que asistieron por primera vez al Centro Dental Docente de la UPCH, con un intervalo de confianza del 95 % y una proporción esperada del 70 %.

Se reclutaron 250 niños sin tratamientos previos contra caries. De este grupo, se seleccionaron 150 niños de entre 6 y 12 años, de ambos sexos. A cada uno de ellos se le realizó un hisopado de la mucosa del carrillo y un raspado de la placa dental blanda en una pieza dental afectada por caries (con al menos una lesión), durante el mes de agosto de 2018. Las muestras fueron transportadas en tubos de ensayo que contenían 3 mL de medio tioglicolato (Merck® 108190) al laboratorio de bacteriología de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo de la UPCH, donde fueron incubadas a 37 °C durante 48 horas.

Aislamiento e identificación de *S. mutans*

Se realizó la siembra en agar mitis salivarius (MS) con bacitracina (200 U/μL), telurito al 1 % y sacarosa al 10 % durante 48 horas en condiciones de anaerobiosis a 37 °C. Posteriormente, se buscaron colonias mucoides, convexas, con bordes claros y un punto oscuro, características del *S. mutans*. Cada colonia fue transferida a un medio agar cerebro-corazón (BHA) e incubada a 37 °C durante 24 horas para su mantenimiento e identificación posterior. La identificación se realizó mediante coloración de Gram, prueba de catalasa y fermentación de carbohidratos, incluyendo sorbitol, manitol, rafinosa y sacarosa. Para confirmar la presencia de *S. mutans*, se utilizó el

sistema de identificación Api20 Strep (bioMérieux®). Las colonias se conservaron en medio de infusión cerebro-corazón (BHI, Merck®). La determinación de los genotipos se realizó mediante PCR convencional, utilizando como cepa control al *S. mutans* genotipo c (ATCC® 25175™). Para la extracción del ADN

genómico se empleó el kit GenElute Bacterial Genomic DNA (Merck®). La identificación de la especie *S. mutans* se efectuó utilizando primers específicos smut, seguida de la genotipificación mediante los primers c, e, f y k (tabla 1) (16).

Tabla 1. Primers utilizados para la identificación de genotipos de *Streptococcus mutans*.

Genotipo	Primer	Pb
<i>Streptococcus mutans</i>	SMUT5: TGA AAC CTT GTC TAT CTC CTC TTT ACC	137 pb
	SMUT3: TCA GTT TTC AAA GGG CTC TG	
c	SC-F CGG AGT GCT TTT TAC AAG TGC TGG	727 pb
	SC-R AAC CAC GGC CAG CAA ACC CTT TAT	
e	SE-F CCT GCT TTT CAA GTA CCT TTC GCC	517 pb
	SE-R CTG CTT GCC AAG CCC TAC TAG AAA	
f	SF-F CCC ACA ATT GGC TTC AAG AGG AGA	316 pb
	SF-R TGC GAA ACC ATA AGC ATA GCG AGG	
k	CEFK-F ATT CCC GCC GTT GGA CCA TTC C	294 pb
	K-R CCA ATG TGA TTC ATC CCA TAC C	

Las 150 cepas de *S. mutans* fueron amplificadas utilizando primers smut en un termociclador, bajo un programa de 25 ciclos, que incluyó una

desnaturalización a 96 °C durante 15 segundos, hibridación a 61 °C durante 30 segundos y una extensión a 72 °C durante 1 minuto (figura 1) (17).

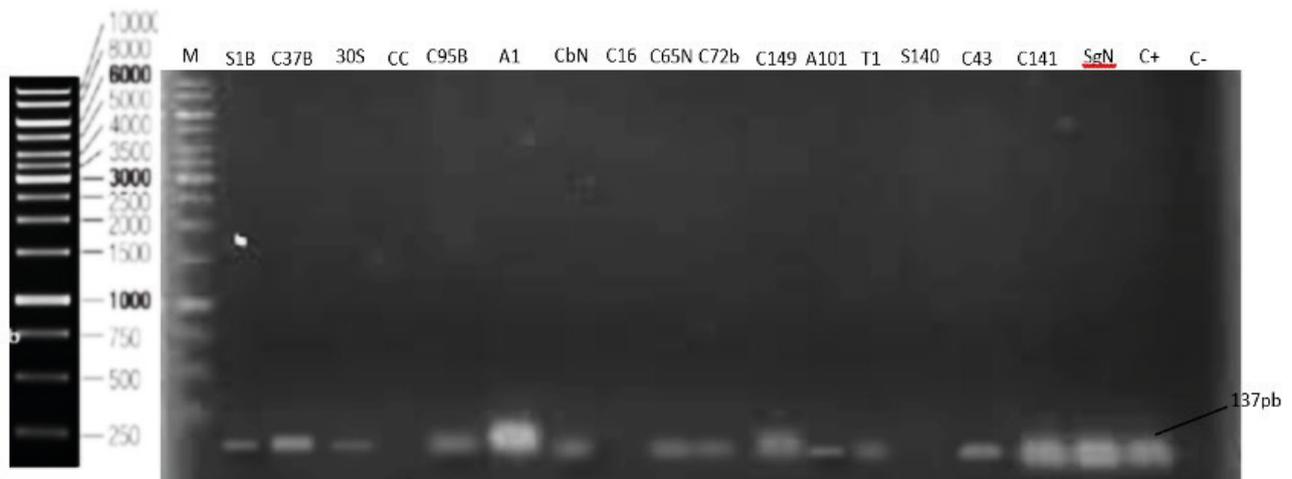


Figura 1. Electroforesis en gel agarosa 1 % de los productos de amplificación con los primers smut. Fragmento de 137 pb.

Para la genotipificación de las cepas, se emplearon los primers c, e y f, que fueron amplificados en el termociclador durante 25 ciclos, con desnaturalización a 96 °C por 15 segundos, hibridación a 61 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 1 minuto. Para el

genotipo k, se realizó un protocolo de 25 ciclos con desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, hibridación a 60 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 30 segundos (figura 2) (18).

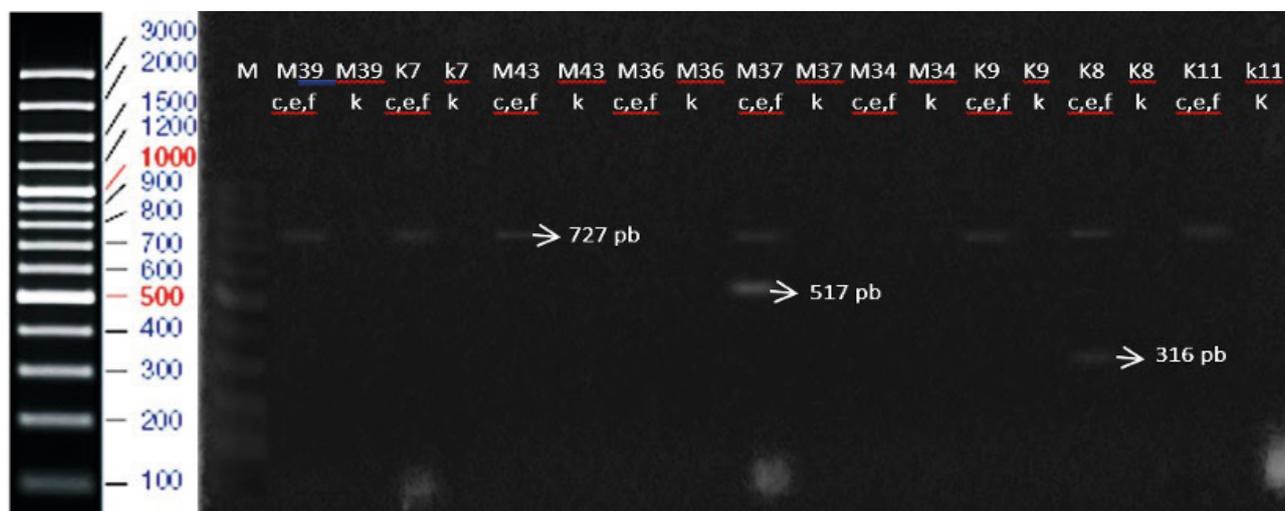


Figura 2. Electroforesis en agarosa 1 % de los productos de amplificación con los primers c, e, f y k. Fragmento de 727 pb genotipo c, 517 pb genotipo e y 316 pb genotipo f.

Posteriormente, para la determinación de la especie y la genotipificación, los productos de PCR se colocaron en un gel de agarosa al 1 % con buffer tris-acetato-EDTA (TAE 1X), y se realizó una electroforesis a 94 V durante 1 hora. Las bandas se revelaron con bromuro de etidio al 1 % y se visualizaron con un transiluminador UV (modelo High Performance UV Transilluminator TFM-40V), comparándolas con el control. Finalmente, se utilizó 40 mL de la fracción metanólica del propóleo a una concentración de 0,78 mg/mL, proporcionada por el Laboratorio de Bacteriología de la UPCH. Esta fracción fue obtenida mediante la extracción metanólica del propóleo de Oxapampa, en el departamento de Cerro de Pasco, Perú (15).

Determinación de la actividad inhibitoria de las cepas genotipificadas de *S. mutans*

Las cepas genotipificadas y *S. mutans* ATCC® 25175™ fueron cultivadas en medio BHI durante 24 horas a 37 °C bajo condiciones de microaerofilia. Se aplicó la prueba de susceptibilidad antibiótica mediante el método de difusión en disco para evaluar la actividad inhibitoria del extracto metanólico de propóleo (19). Las cepas genotipificadas y la cepa *S. mutans* ATCC® 25175™ se ajustaron a una turbidez equivalente a la escala de McFarland 0.5. Posteriormente, se sembraron en medio BHA (Merck®), y se colocaron discos de papel de filtro de 6 mm (Whatman 3®) impregnados con 10 µL de clorhexidina al 0,12 % (control positivo),

10 µL de DMSO y agua Milli-Q (1:1) como control negativo, y 10 µL de la fracción metanólica de propóleo a una concentración de 0,78 mg/mL. Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 horas en condiciones de microaerofilia. Finalmente, los halos de inhibición fueron medidos en milímetros (mm) utilizando un vernier calibrado de la marca Truper®.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos en la prueba de PCR convencional fueron analizados mediante estadística descriptiva. Los resultados de los halos de inhibición se presentaron en términos de medias, desviaciones estándar y medianas. Se aplicó la prueba t de Student con un nivel de confianza del 95 % (NC = 95 %) y un error $\alpha = 0,05$ para comparar los diferentes serotipos de *S. mutans* entre la cepa control *S. mutans* ATCC® 25175™ y las muestras de niños con caries dental.

RESULTADOS

De las 150 muestras recolectadas de los niños diagnosticados con caries, se identificaron 138 cepas de *S. mutans* a través del primer específico smut (figuras 1 y 2), a las cuales se le realizó la genotipificación con los diferentes primers específicos (c, e, f y k). Se encontró que el 63,77 % pertenecía al genotipo c; el 21,73 %, a los genotipos c y e; y el 14,50 %, a los genotipos c y f, observándose así la presencia de genotipos múltiples y la ausencia del genotipo k (figura 3).

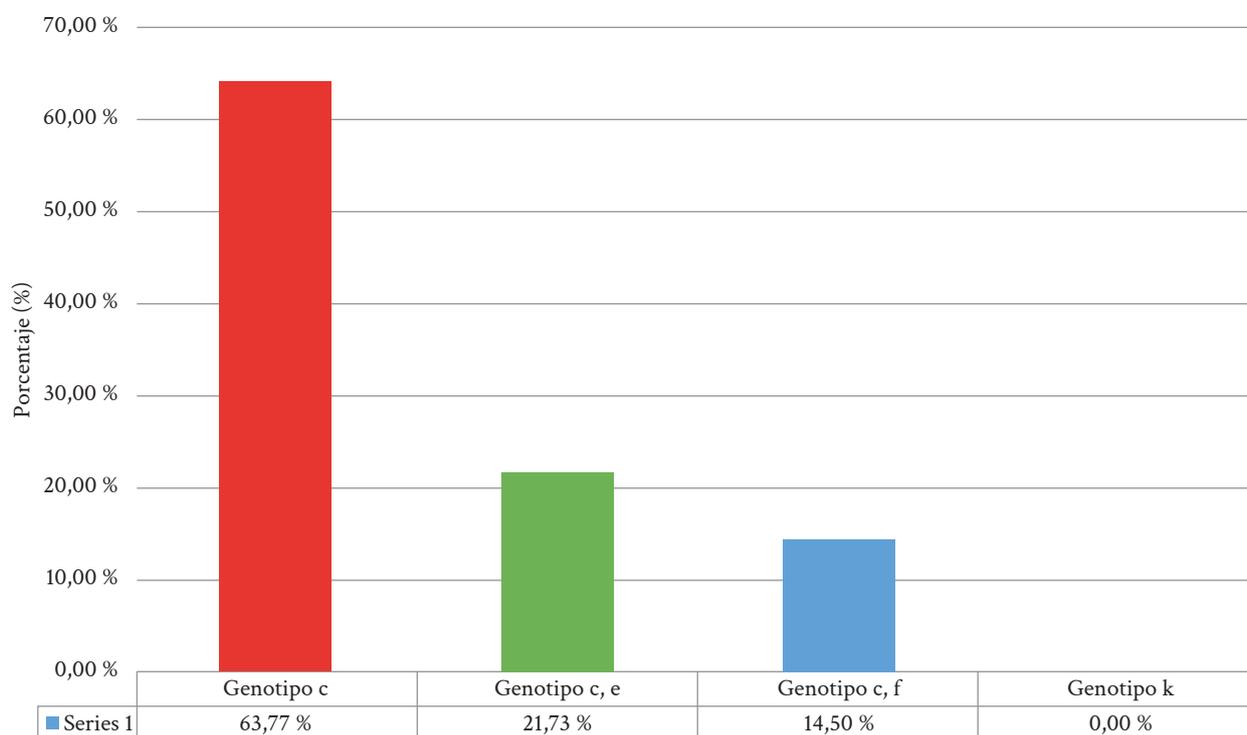


Figura 3. Porcentaje de genotipos individuales y múltiples hallados en el estudio.

En la tabla 2 se muestra el promedio, la desviación estándar y la mediana de los halos de inhibición de *S. mutans* ATCC® 25175™ y las cepas de los pacientes de niños diagnosticados con caries. Se observa que la fracción metanólica de propóleo responde de manera similar a la clorhexidina frente a las cepas aisladas de

S. mutans de los niños con caries. Se encontró, además, que el diámetro de inhibición de las cepas extraídas frente a la fracción metanólica mostró mayor diámetro (14,13 mm) en relación con la cepa de *S. mutans* ATCC® 25175™ (10,16 mm) con diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 2. Comparación del promedio, la desviación estándar y la mediana de los halos de inhibición (en milímetros) de *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™ y cepas de pacientes de los niños diagnosticados con caries.

Sustancias impregnadas	Cepas de <i>Streptococcus mutans</i>					
	<i>S. mutans</i> ATCC® 25175™			Cepas genotificadas de <i>S. mutans</i>		
	Promedio	DE	Mediana	Promedio	DE	Mediana
DMSO + agua milli Q	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Clorhexidina	14,83	0,28	15,00	10,16	0,28	10,00
Fracción metanólica	16,83	5,35	15,50	14,13	5,27	11,50
Valor de p*		0,005			0,850	

*Prueba t de Student con NC = 95 %.

*Un valor de p < 0,05 indica significancia estadística.

DE: desviación estándar.

DISCUSIÓN

Diversos estudios han relacionado la caries dental con la presencia de *S. mutans* (20). Los niños menores de 12 años son los más afectados, en gran parte debido a un mayor consumo de carbohidratos, lo que genera ácidos que pueden provocar caries. Actualmente, diferentes extractos de plantas y productos naturales están siendo investigados para evaluar su efecto inhibitorio sobre el *S. mutans*, así como su prevalencia y los genotipos circulantes. Entre los genotipos de este microorganismo, destacan los c, e, f y k. En el estudio de Momeni et al. (21), realizado en 129 pacientes, se encontró que los genotipos c y k fueron los más prevalentes, seguidos de los genotipos e y f. Sin embargo, en el presente estudio, cuya muestra estuvo constituida de 138 pacientes menores de 12 años, el genotipo c fue el más frecuente, seguido de los genotipos e y f, mientras que no se detectó el genotipo k. Momeni et al. (21) sugieren que la presencia del genotipo k se relaciona con cepas que contienen proteínas de unión al colágeno (CBP, Cnm y Cbm), las cuales están asociadas con enfermedades sistémicas.

La identificación de la especie *S. mutans*, empleando PCR convencional en placa dental blanda en carrillo, tuvo una prevalencia de 92,00 % (138 de 150 niños), que fue mayor que la encontrada por Delgadillo et al. (22), en Perú, quienes evidenciaron un 75,60 % (59 de 78 niños) en saliva. Sánchez-Pérez y Acosta (23), en México, hallaron un 32 % en placa dentobacteriana de la fisura; y Arévalo-Ruano et al. (24), en Colombia, obtuvieron una prevalencia del 14,90 % en saliva. Esta diferencia puede deberse a las múltiples técnicas empleadas para el muestreo, aislamiento e identificación, así como también a la alimentación, consumo de antibióticos, lesión cariosa y clasificación de los distintos tipos de caries presentes en los niños.

Diversos estudios manifiestan que el genotipo c de *S. mutans* es la principal bacteria asociada a caries (7, 25, 26), lo que concuerda con el hallazgo en el presente estudio; asimismo, otras investigaciones han encontrado genotipos e en un 20 %, f en un 10 % y k en menos del 5 % (27), resultados que coinciden con el presente estudio, que encontró genotipos c y e en un 21,73 %, genotipos f en un 14,50 % y no se evidenció genotipos k. Además, el estudio previamente citado encontró que más de la mitad de una población de 129 niños presentaba genotipos múltiples, siendo los más frecuentes c y k en un 31 %, seguido de c, e y k en un 11 %, y c y e en un 7,75 % (27), coincidiendo con los hallazgos de este trabajo.

Los halos de inhibición generados por la fracción metanólica del propóleo frente a *S. mutans* mostraron un mayor diámetro en comparación con los observados en la cepa *S. mutans* ATCC® 25175™. Esto podría atribuirse a las características de la fracción metanólica, ya que, según Galgowski et al. (28), esta fracción podría contener una mayor concentración de compuestos bioactivos no polares con una actividad antimicrobiana superior.

Entre las principales limitaciones de este estudio, se resalta que la genotipificación fue realizada durante el período de pandemia, lo que ocasionó dificultades logísticas con los proveedores debido a la escasez de insumos. Los tiempos de entrega de los pedidos alcanzaron hasta seis meses para su arribo a Perú, lo cual retrasó significativamente el proceso. Asimismo, el aislamiento de *S. mutans* presentó desafíos adicionales, dado que esta bacteria puede confundirse fácilmente con *Streptococcus sobrinus*, para lo cual se requirió del uso de técnicas moleculares avanzadas para asegurar una identificación adecuada y precisa.

CONCLUSIONES

La fracción metanólica del propóleo de Oxapampa presenta actividad inhibitoria en cepas de *S. mutans* aisladas y genotipificadas en niños diagnosticados con caries, de los cuales el 100 % pertenecía al genotipo c, el 21,58 % al genotipo e, y el 14,39 % al genotipo f, no encontrándose el genotipo k. Además, la fracción metanólica del propóleo de Oxapampa presenta mayor actividad inhibitoria en las cepas obtenidas de los niños, en comparación con el *S. mutans* ATCC® 25175™.

REFERENCIAS

- Ojeda-Garcés JC, Oviedo-García E, Salas LA. *Streptococcus mutans* y caries dental. CES Odontol [Internet]. 2013; 26(1): 44-56. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-971X2013000100005
- De la Fuente J, Sifuentes MC, Nieto ME. Promoción y educación para la salud en odontología. Ciudad de México: Manual Moderno; 2014.
- Instituto Nacional de Investigación Dental y Craneofacial. La caries dental [Internet]. NIH; 2019, abril. Disponible en: <https://www.nidcr.nih.gov/espanol/temas-de-salud/la-caries-dental>
- Basso ML. Conceptos actualizados en cariología. Rev Asoc Odontol Argent [Internet]. 2019; 107: 25-32. Disponible en: <https://raoa.aoa.org.ar/revistas/?roi=1071000026>

5. Brambilla E, García-Godoy F, Strohmenger L. Principles of diagnosis and treatment of high-caries-risk subjects. *Dent Clin North Am* [Internet]. 2000; 44(3): 507-540. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10925771/>
6. Clarke JK. On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. *Br J Exp Pathol* [Internet]. 1924; 5(3): 141-147. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2047899/>
7. Shibata Y, Ozaki K, Seki M, Kawato T, Tanaka H, Nakano Y, et al. Analysis of loci required for determination of serotype antigenicity in *Streptococcus mutans* and its clinical utilization. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2003; 41(9): 4107-4112. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4107-4112.2003>
8. Nakano K, Nomura R, Nakagawa I, Hamada S, Ooshima T. Demonstration of *Streptococcus mutans* with a cell wall polysaccharide specific to a new serotype, k, in the human oral cavity. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2004; 42(1): 198-202. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/jcm.42.1.198-202.2004>
9. Li L, Messas E, Batista EL Jr, Levine RA, Amar S. Porphyromonas gingivalis infection accelerates the progression of atherosclerosis in a heterozygous apolipoprotein E-deficient murine model. *Circulation* [Internet]. 2002; 105(7): 861-867. Disponible en: <https://doi.org/10.1161/hc0702.104178>
10. Agra da Silva R, Rodrigues AE, Ribeiro MC, Custódio AR, Andrade NE, Pereira WE. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. *Ciênc Rural* [Internet]. 2006; 36(6): 1842-1848. Disponible en: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782006000600027>
11. Manrique AJ. Actividad antimicrobiana de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del Estado Miranda, Venezuela. Efecto de la variación estacional. *Zootecnia Trop* [Internet]. 2006; 24(1): 43-53. Disponible en: https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-72692006000100004
12. Bellón S, Calzadilla XM. Efectividad del uso del propóleo en el tratamiento de la estomatitis aftosa. *Rev Cubana Estomatol* [Internet]. 2007; 44(3). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072007000300008&lng=es&nrm=iso&tlng=es
13. Carrillo ML, Castillo LN, Rosalba M. Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de la Huasteca Potosina (México). *Inf Tecnol* [Internet]. 2011; 22(5): 21-28. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642011000500004
14. Elgamily H, Safy R, Makharita R. Influence of medicinal plant extracts on the growth of oral pathogens *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus*: an *in-vitro* study. *Open Access Maced J Med Sci* [Internet]. 2019; 7(14): 2328-2334. Disponible en: <https://oamjms.eu/index.php/mjms/article/view/oamjms.2019.653>
15. Millones PA. Efecto antibacteriano de propóleos peruanos y acción de una fracción metanólica sobre un *biofilm in vitro* de *Streptococcus gordonii* y *Fusobacterium nucleatum* [tesis de doctorado en Internet]. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2021. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.12866/9017>
16. Hirasawa M, Takada K. A new selective medium for *Streptococcus mutans* and the distribution of *S. mutans* and *S. sobrinus* and their serotypes in dental plaque. *Caries Res* [Internet]. 2003; 37(3): 212-217. Disponible en: <https://doi.org/10.1159/000070447>
17. Salazar LA, Vásquez C, Almuna A, Oporto G, Santana R, Herrera CL, et al. Detección molecular de estreptococos cariogénicos en saliva. *Int J Morphol* [Internet]. 2008; 26(4): 951-958. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022008000400027>
18. Nakano K, Nomura R, Shimizu N, Nakagawa I, Hamada S, Ooshima T. Development of a PCR method for rapid identification of new *Streptococcus mutans* serotype k strains. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2004; 42(11): 4925-4930. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/JCM.42.11.4925-4930.2004>
19. Rodero L, Córdoba S, Vivot W, Campo M, Corfield P, Olguín C, et al. Método de difusión con discos para la determinación de sensibilidad a fluconazol en aislamientos de *Candida* spp. *Rev Argent Microbiol* [Internet]. 2006; 38(3): 155-163. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/2130/213016796012.pdf>
20. Ministerio de Salud (PE), Oficina General de Epidemiología y Dirección General de Salud de las Personas. Prevalencia nacional de caries dental, fluorosis del esmalte y urgencia de tratamiento en escolares de 6 a 8, 10, 12 y 15 años, Perú. 2001-2002 [Internet]. Lima: Minsa; 2005. Disponible en: https://www.dge.gob.pe/publicaciones/pub_caries/prevalencia_caries.pdf

21. Momeni SS, Ghazal T, Grenett H, Whiddon J, Moser SA, Childers NK. *Streptococcus mutans* serotypes and collagen-binding proteins Cnm/Cbm in children with caries analysed by PCR. *Mol Oral Microbiol* [Internet]. 2019; 34(2): 64-73. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/omi.12254>
22. Delgadillo JR, Espinoza SB, Campodónico CH, Evaristo TA, Cáceres L, Gómez DN, et al. Presencia de *Streptococcus mutans* genotipo C en niños y adolescentes peruanos con caries. *ODOVTOS Int J Dent Sc* [Internet]. 2018; 20(3): 105-113. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/odovtos/ijd-2018/ijd183k.pdf>
23. Sánchez-Pérez L, Acosta GE. Estreptococos cariogénicos predominantes, niveles de infección e incidencia de caries en escolares. Estudio exploratorio. *Rev ADM* [Internet]. 2007; 64(2): 45-51. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=11986>
24. Arévalo-Ruano ML, Canacúan-Melo FY, Echeverry-Chica J, Salazar-González CL, Martínez-Delgado CM, Martínez-Pabón MC, et al. Molecular identification and genotyping of *Streptococcus mutans* from saliva samples of children in Medellín, Colombia. *CES Odontol* [Internet]. 2014; 27(2): 47-60. Disponible en: <https://revistas.ces.edu.co/index.php/odontologia/article/view/3241>
25. Gamboa FO. Identificación y caracterización microbiológica, fenotípica y genotípica del *Streptococcus mutans*: experiencias de investigación. *Univ Odontol* [Internet]. 2014; 33(71): 65-73. Disponible en: <https://doi.org/10.11144/Javeriana.uo33-71.icmf>
26. Biswas S, Biswas I. Complete genome sequence of *Streptococcus mutans* GS-5, a serotype c strain. *J Bacteriol* [Internet]. 2012; 194(17): 4787-4788. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/jb.01106-12>
27. Nakano K, Ooshima T. Serotype classification of *Streptococcus mutans* and its detection outside the oral cavity. *Future Microbiol* [Internet]. 2009; 4(7): 891-902. Disponible en: <https://doi.org/10.2217/fmb.09.64>
28. Galgowski C, Pavanelo S, Rau M, Debiase M, Althoff S, Guedes A, et al. Mollicute anti-adhesive and growth inhibition properties of the methanolic extract of propolis from the Brazilian native bee *Melipona quadrifasciata*. *Chem Biodivers* [Internet]. 2021; 18(1): e2000711. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/cbdv.202000711>