

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE CANNABIDIOL,
CANNABIGEROL, CANNABIDIVARINA Y EXTRACTOS DE *CANNABIS SATIVA*
DEL QUIMIOTIPO II, III y IV FRENTE A BACTERIAS PATÓGENAS**

Valeria González García

Diego Caleb Parra Quiguanás

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE INGENIERÍA, DISEÑO Y CIENCIAS APLICADAS

Química Farmacéutica

Cali, Valle del Cauca

2023

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE CANNABIDIOL,
CANNABIGEROL, CANNABIDIVARINA Y EXTRACTOS DE *CANNABIS SATIVA*
DEL QUIMIOTIPO II, III y IV FRENTE A BACTERIAS PATÓGENAS**

Valeria González García

Diego Caleb Parra Quiguanás

Trabajo de grado para optar al título del programa de Química Farmacéutica

Tutores:

Diego Javier Enriquez Valencia, Msc.

Ruby Lizeth Pérez Muñoz, Ph. D

Mónica Chávez Vivas, Ph. D

Cali, Valle del Cauca

2023

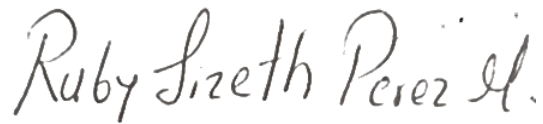
AVAL PARA LA ENTREGA DE PDG II

Firma del Asesor:



Diego Javier Enriquez Valencia

Firma del Asesor:



Ruby Lizeth Pérez Muñoz

Firma del Asesor:



Mónica Chávez Vivas

Firma del estudiante 1



Valeria González García

Firma del estudiante 2



Diego Caleb Parra Quiguanás

TABLA DE CONTENIDO

1. Resumen	4
2. Introducción.....	4
3. Metodología.....	6
3.1. Material vegetal y obtención de los extractos.....	6
3.2. Caracterización de los extractos.....	6
3.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana	7
3.3.1. Preparación del inóculo.....	7
3.3.2. Difusión en pocillos	8
3.3.3. Dilución en agar	8
3.4. Análisis estadístico.....	8
4. Resultados y discusión.....	9
4.1. Caracterización de los extractos.....	9
4.2. Actividad antimicrobiana.....	10
4.3. Análisis estadístico.....	11
4.4. Discusión.....	11
5. Conclusiones.....	15
6. Referencias	16
7. Anexos	18
8. Agradecimientos	27

1. Resumen

El incremento de bacterias multirresistentes a los antibióticos y a la escasez de nuevos antibióticos en desarrollo subraya la necesidad de explorar alternativas para hacer frente a patógenos resistentes. Los principales metabolitos de *Cannabis sativa*, los cannabinoides, han sido investigados por su potencial actividad antimicrobiana. El objetivo de esta investigación es evaluar la actividad antibacteriana de los extractos de *Cannabis Sativa*, quimiotipos II, III y IV y de los cannabinoides, cannabidiol, cannabigerol y cannabidivarina, frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. La evaluación de la actividad antimicrobiana se realizó mediante el método de difusión en pocillos y dilución en agar. Los resultados mostraron que los extractos y cannabinoides presentaron actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, pero no contra *E. coli*. El CBG exhibió mayor actividad antibacteriana que el CBD, y este a su vez mayor que el CBDV, según los valores de concentración mínima inhibitoria. Además, los cannabinoides puros presentaron mayor actividad que los extractos. No se encontró una correlación significativa entre el quimiotipo y la CMI. Este estudio respalda el potencial de los cannabinoides como una alternativa terapéutica prometedora contra infecciones por bacterias Gram positivas como *S. aureus*.

Palabras clave: *Cannabis sativa*, cannabinoides, resistencia antimicrobiana.

2. Introducción

Los productos naturales (PN) abarcan un amplio grupo de compuestos producidos por organismos vivos, generalmente como metabolitos secundarios que ayudan a los organismos a defenderse de depredadores o adaptarse a su entorno¹. Durante mucho tiempo, estos compuestos se han utilizado ampliamente en forma de remedios a base de plantas para el tratamiento de diferentes enfermedades, incluidas las enfermedades infecciosas².

El principal interés en torno a estas moléculas se encuentra en su diversidad y complejidad química, ya que se pueden encontrar una amplia gama de masas moleculares, centros quirales, entre otros³. Adicionalmente, el creciente incremento de bacterias resistentes a los antibióticos (BRA), causantes de infecciones comunes, ha generado una crisis en los tratamientos actuales, motivando a los investigadores a desarrollar nuevas y seguras moléculas antimicrobianas derivadas de productos naturales². Los compuestos antimicrobianos derivados de PN, con propiedades

antimicrobianas y mecanismos de acción diferentes a los de los antimicrobianos comunes, resultan ser una alternativa para el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos resistentes.

En este sentido, los extractos y metabolitos secundarios de *Cannabis sativa* (*C. sativa*) se han estudiado debido al efecto bactericida que han demostrado contra patógenos de interés clínico⁴. *C. sativa* es una planta medicinal perteneciente a la familia *Cannabaceae*⁵. La alta variabilidad fitoquímica de la planta ha llevado a una clasificación basada en las concentraciones de sus cannabinoides principales: tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC), cannabidiol (CBD) y cannabigerol (CBG)⁶. Estos compuestos son marcadores quimiotaxonómicos porque son metabolitos secundarios exclusivos del *Cannabis* que permiten categorizar a esta planta en cinco quimiotipos principales⁶. Estos quimiotipos se dividen en: 1) planta tipo droga predominante en THC (Tipo I); 2) planta medicinal con un contenido balanceado de THC: CBD (Tipo II); 3) planta tipo fibra con una alta concentración de CBD (Tipo III); 4) planta tipo fibra con CBG como cannabinoide principal (Tipo IV); 5) cáñamo de fibra industrial sin niveles significativos de cannabinoides (Tipo V)⁷.

Investigaciones previas indican que *Cannabis* presenta propiedades medicinales como el alivio del dolor, las náuseas, la ansiedad y la epilepsia⁸. Adicionalmente, se ha reportado que esta planta tiene propiedades antibacterianas y antifúngicas⁹. Fitocannabinoides como el CBG, CBD, cannabinocromeno (CBC), Δ^9 -THC y cannabinal (CBN) presentan actividad antibiótica contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*^{10,11}. Sumado a esto, metabolitos primarios como aminoácidos, ácidos grasos y esteroides, y metabolitos secundarios, como terpenoides, flavonoides, estilbenoides, lignanos y alcaloides^{12,13} también se destacan por presentar efectos antimicrobianos significativos corroborado por investigaciones previas^{14,15}. Cabe destacar que la actividad de otros cannabinoides, como la cannabidivarina (CBDV), aún no es completamente comprendida; sin embargo, se ha reportado que presenta mayor actividad antimicrobiana contra *Neisseria gonorrhoeae* y menor actividad contra SARM, en comparación el CBD¹⁶.

Adicionalmente, la actividad antimicrobiana del Cannabis también se ha estudiado en función de su perfil fitoquímico, es decir, según el quimiotipo de la planta. Se ha reportado que los extractos de *C. sativa* del quimiotipo II son efectivos principalmente contra bacterias Gram positivas, presentando una inhibición del 90-95% en microorganismos Gram positivos como *Micrococcus*

luteus y *Bacillus thuringiensis*⁹. El quimiotipo IV ha demostrado tener actividad contra cepas de SARM, así como también ha exhibido actividad contra *Streptococcus mutans*, patógeno asociado con la caries dental¹⁷.

Hasta la fecha, en Colombia no se ha reportado el efecto antibacteriano de las variedades de *Cannabis* cultivadas en el país. Esto incrementa el interés de investigar el potencial antibacteriano de extractos de *C. sativa* cultivados en Colombia, y de tres de sus metabolitos secundarios, la cannabidivarina (CBDV), el cannabidiol (CBD) y el cannabigerol (CBG). Considerando la importancia de explorar alternativas antimicrobianas y aportar información crítica acerca de compuestos fitoquímicos con potencial antimicrobiano útil en el tratamiento de infecciones bacterianas resistentes a antibióticos, el presente proyecto evaluó la actividad antibacteriana de extractos de *C. sativa* del quimiotipo II, III y IV, así como del cannabidiol, cannabigerol y cannabidivarina en cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, mediante las técnicas de difusión en pocillos y dilución en agar.

3. Metodología

3.1. Material vegetal y obtención de los extractos.

En el marco de la investigación sobre la actividad antimicrobiana de los compuestos presentes en el material vegetal de *Cannabis*, se estableció una colaboración con empresas licenciadas respaldadas por el Ministerio de Justicia de Colombia, especializadas en el cultivo de *Cannabis* medicinal para adquirir dicho material.

La muestra vegetal se sometió a molienda y homogeneización. Se realizó una molienda de la flor y se pasaron 100.0 mg en un tubo Falcon de 15.0 mL y se llevaron a 5.0 mL de metanol:agua 80:20 para obtener una concentración de 20000 mg/L. Luego, se agitó mediante vórtex y se sometió a ultrasonido durante 20 minutos, agitando cada 5 minutos en vórtex.

3.2. Caracterización de los extractos

Los extractos metanólicos obtenidos fueron caracterizados mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), para identificar y cuantificar fitocannabinoides (Tabla 1). Los parámetros del método analítico se presentan en la tabla 2. Un total de 18 flores de *Cannabis* cultivadas en Colombia fueron caracterizadas cuantificando los siguientes cannabinoides: CBD, ácido

cannabidiólico (CBDA), CBG, Δ^9 -THC, ácido tetrahidrocannabinólico (THCA), tetrahidrocannabivarina (THCV), CBC y CBDV.

Tabla 1. Cannabinoides evaluados

Analito	Cannabinoide	Nomenclatura
1	Cannabicromeno	CBC
2	Δ^9 -Tetrahidrocannabinol	Δ^9 -THC
3	Cannabidiol	CBD
4	Cannabinol	CBN
5	Cannabidivarina	CBDV
6	Ácido tetrahidrocanabinólico	THCA
7	Ácido canabidiólico	CBDA
8	Cannabigerol	CBG
9	Tetrahydrocanabivarina	THCV

Tabla 2. Configuración cromatográfica del método de análisis por HPLC

Parámetros	Especificación
Columna	Kinetex 2.6 μm C18 100 Å de 100 x 4.60 mm
Temperatura del horno	25 °C (ambiente)
Volumen de inyección	5 μL
Longitud de onda de detección	222 nm
Fase móvil A	Agua tipo I + ácido fórmico 0.1%
Fase móvil B	Metanol + ácido fórmico al 0.05%
Flujo	1.0 mL/min
Modo de elución	Isocrático
Tiempo de corrida	15 minutos

3.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana

3.3.1. Preparación del inóculo

La actividad antimicrobiana in vitro de los extractos de Cannabis y de los cannabinoides individuales (CBD, CBDV y Δ^9 -THC) se evaluó frente a bacterias Gram positivas: *S. aureus* (ATCC 12600) y Gram negativas: *E. coli* (ATCC 25922). Para estandarizar el inóculo, se tomaron de 4 a 5 colonias de un cultivo puro del día anterior y se agregaron en 5 mL de solución salina al 0.9% hasta alcanzar una turbidez igual al estándar de McFarland de 0.5, equivalente a 10^8 unidades

formadoras de colonias (UFC)/mL. El inóculo se utilizó dentro de los 30 minutos posteriores a su estandarización, para evitar cambios en la concentración bacteriana.

3.3.2. Difusión en pocillos

El inóculo bacteriano se sembró masivamente en Agar Mueller-Hinton. Posteriormente, se realizaron pocillos con la ayuda de un horador estéril de 5 mm de diámetro. Los extractos de *Cannabis* y los estándares se prepararon a una concentración de 5000 mg/L. Se adicionó 20 µL de cada extracto y de los estándares a los pocillos correspondientes. Luego, las placas se incubaron a 37 °C toda la noche. Se utilizó metanol:agua 80:20 como control negativo y azitromicina (5000 mg/L) como control positivo. Los ensayos se realizaron por duplicado y la actividad antimicrobiana de cada muestra y de los cannabinoides individuales se indicó como el diámetro promedio (mm) de inhibición (con su respectiva desviación estándar) generado por los extractos y los cannabinoides individuales después de 24 horas de incubación.

Los extractos y los cannabinoides que generaron un diámetro de inhibición se evaluaron en un ensayo posterior (dilución en agar) para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada muestra.

3.3.3. Dilución en agar

La CMI se determinó utilizando el método de dilución en agar¹⁸. Los extractos y cannabinoides se disolvieron en una mezcla de metanol:agua 80:20 para alcanzar concentraciones finales de 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 mg/L (extractos) y 5, 2.5, 1.25, 0.625 y 0.3125 mg/L (cannabinoides). En tubos Falcón estériles, se adicionó 1 mL de las diluciones preparadas previamente de las muestras y 19 mL de agar Mueller Hinton fundido. La mezcla se homogenizó en vórtex 10 segundos y se vertió el agar en cajas Petri estériles. Posteriormente, a partir del inóculo de 10^8 ufc/mL, se preparó un inóculo de 10^4 ufc/mL. Se añadieron 100 uL del inóculo de 10^4 ufc/mL al agar y se realizó una siembra masiva. Las placas se incubaron durante 18-24 horas a 37 °C. La CMI se estableció como es la concentración más baja que inhibe completamente el crecimiento de las bacterias.

3.4. Análisis estadístico

La comparación de medias se realizó mediante la prueba de medias Tukey. El análisis estadístico se realizó utilizando el software RStudio. Se realizó una prueba de Chi cuadrado de Pearson, para

verificar la significancia de la correlación entre el quimiotipo y la CMI. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

4. Resultados y discusión

4.1. Caracterización de los extractos

Se realizó la caracterización de 18 flores de Cannabis cultivadas en Colombia, cuantificando los cannabinoides: CBD, ácido cannabidiólico (CBDA), CBG, Δ^9 -THC, ácido tetrahidrocannabinólico (THCA), tetrahidrocannabivarina (THCV), CBC y CBDV. De acuerdo con los resultados obtenidos de las 18 muestras (Ver anexos, Tabla 8), se seleccionaron nueve con las mayores concentraciones de cannabinoides. Las muestras 1-3 se identificaron como quimiotipo II (Δ^9 -THC: CBD balanceado), destacando CBD y Δ^9 -THC como cannabinoides predominantes. Las muestras 4-6 se clasificaron como quimiotipo III, con CBD y CBDA en mayor proporción y las muestras 7-9 corresponden a quimiotipo IV, caracterizada por ser CBG dominante. Los resultados obtenidos de la caracterización de las nueve muestras y la clasificación en quimiotipos se presentan en la Tabla 2 y 3, respectivamente.

Tabla 3. Composición cannabinoides en las muestras

Muestra No.	Cannabinoide	Concentración (%p/p)								
		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9
1	CBD	4.68	3.86	3.19	8.13	7.63	7.07	0.13	0.04	0.02
2	CBDA	3.68	7.23	2.66	4.13	9.08	3.79	0.15	0.07	0.03
3	CBG	0.09	0.08	0.01	0.02	0.05	0.08	0.23	0.13	0.06
4	Δ^9 -THC	2.78	2.77	1.43	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	THCA	ND	0.38	0.23	0.33	ND	ND	ND	ND	ND
6	THCV	0.01	0.02	ND	0.04	ND	0.02	ND	ND	ND
7	CBC	0.36	0.28	0.06	0.07	0.10	0.28	0.04	0.02	0.01
8	CBDV	0.14	0.09	0.04	0.06	0.05	0.09	ND	ND	0.05

ND: No detectado; M1-M9: Muestra 1-9.

Tabla 4. Clasificación por quimiotipos de las muestras analizadas

Muestra No.	Quimiotipo identificado
1	II
2	
3	
4	III
5	
6	
7	IV
8	
9	

4.2. Actividad antimicrobiana

En la Tabla 5 se presenta el diámetro de inhibición y la CMI de cada extracto y cannabinoide evaluado en ambas bacterias.

En el caso de *E. coli*, ninguna de las muestras evaluadas inhibió el crecimiento bacteriano, por ello, no se realizó la prueba de dilución en agar para esta bacteria. En contraste, *S. aureus* mostró sensibilidad frente a los compuestos estudiados. El halo de inhibición más grande correspondió a la muestra 8 (15.5 ± 0.7 mm), clasificada como una variedad del quimiotipo IV. El halo de inhibición más pequeño se observó en la muestra 5 (5.0 ± 0.0 mm), perteneciente al quimiotipo III. En general, las muestras 7, 8 y 9 (quimiotipo IV) mostraron la mayor inhibición del crecimiento de *S. aureus*, mientras que las muestras 4, 5 y 6 (quimiotipo III) fueron las de menor inhibición. Entre las variedades de Cannabis estudiadas, la actividad antibacteriana más potente frente a *S. aureus*, en función de la CIM, fue la de las muestras 1 y 2 (quimiotipo II). Después, se encuentran las muestras 6 (quimiotipo III), 7 y 8 (quimiotipo IV) con una CMI de 50 mg/L. En tercer lugar, se encuentra la muestra 3 (quimiotipo II) con una CMI de 100 mg/L. Finalmente, las muestras 4 y 5 (quimiotipo III) y 9 (quimiotipo IV) presentaron el menor efecto antimicrobiano, ya que no fue posible determinar su CIM, dentro del rango de concentraciones evaluadas en este estudio.

En cuanto a la actividad antibacteriana de los cannabinoides frente a *S. aureus*, el mayor halo de inhibición fue para el CBG (11.5 ± 0.7 mm), seguido del CBD (11.0 ± 0.0 mm) y el CBDV (10.0 ± 0.0 mm). Respecto a la CMI obtenida para los cannabinoides, se tiene que el CBG presentó la mayor actividad antibacteriana, seguida del CBD y el CBDV.

Tabla 5. Diámetro de inhibición promedio y concentración mínima inhibitoria obtenidas de los extractos y cannabinoides

Muestra	<i>S. aureus</i>		<i>E. Coli</i>	
	Diámetro de inhibición (mm)	CMI (mg/L)	Diámetro de inhibición (mm)	CMI (mg/L)
1	$11 \pm 0,0$	25	$5,0 \pm 0,0$	-
2	$12 \pm 2,8$	25	$5,0 \pm 0,0$	-
3	$8,5 \pm 0,7$	100	$5,0 \pm 0,0$	-
4	$6,5 \pm 0,7$	>100	$5,0 \pm 0,0$	-
5	$5,0 \pm 0,0$	>100	$5,0 \pm 0,0$	-
6	$10 \pm 0,0$	50	$5,0 \pm 0,0$	-
7	$14,5 \pm 0,7$	50	$5,0 \pm 0,0$	-
8	$15,5 \pm 0,7$	50	$5,0 \pm 0,0$	-

9	12 ± 0,0	>100	5,0 ± 0,0	-
CBD	11 ± 0,0	2.5	5,0 ± 0,0	-
CBG	11,5 ± 0,7	1.25	5,0 ± 0,0	-
CBDV	10,0 ± 0,0	5	5,0 ± 0,0	-

El diámetro de la zona de inhibición incluye el diámetro del pozo (5 mm). Los resultados están expresados como el promedio de los valores ± desviación estándar de los dos datos.

Adicionalmente, se determinó la concentración de los cannabinoides presente en los extractos para cada CMI obtenida como se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Cuantificación de cannabinoides de los extractos en mg/L a las CMI determinadas

Cannabinoides en CMI determinadas (mg/L)										
Muestras	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	
CMI (mg/L)	25	25	100	>100	>100	50	50	50	>100	
Cannabinoides	CBD	1,17	0,965	3,19	>8,13	>7,63	3,535	0,065	0,01	>0,04
	CBDA	0,92	1,8075	2,66	>4,13	>9,08	1,895	0,075	0,015	>0,07
	CBG	0,0225	0,02	0,01	>0,02	>0,05	0,04	0,115	0,03	>0,13
	Δ^9 -THC	0,695	0,6925	1,43	> 0	>0	0	0	0	>0
	THCA	0	0,095	0,23	>0,33	>0	0	0	0	>0
	THCV	0,0025	0,005	0	>0,04	>0	0,01	0	0	>0
	CBC	0,09	0,07	0,06	>0,07	>0,1	0,14	0,02	0,005	>0,02
	CBDV	0,035	0,0225	0,04	>0,06	>0,05	0,045	0	0	>0

4.3. Análisis estadístico

La relación entre el quimiotipo y la CMI se evaluó mediante la prueba de Chi cuadrado de Person. Se encontró que no existe una correlación significativa entre el quimiotipo y la CMI, dando esta prueba un valor p de 0.1714, es decir, el quimiotipo no es un factor determinante en la actividad antimicrobiana.

Tabla 7. Prueba de Chi cuadrado de Pearson

Número de muestras por quimiotipo según su CMI						
Quimiotipo	CMI					
	>100	100	50	25	12.5	6.25
II	0	1	0	2	0	0
III	2	0	1	0	0	0
IV	1	0	2	0	0	0

Valor p obtenido = 0.1714

4.4. Discusión

La alta variabilidad en las concentraciones de cannabinoides observada entre las 18 muestras de flores de *C. sativa* evaluadas evidencia la influencia de diversos factores, como el clima, el tipo de

suelo, el método de cultivo y el tipo de luz¹⁹. Las variedades de Cannabis cultivadas en Colombia han generado interés a nivel mundial, debido a las distintas condiciones climáticas del país, los bajos costos de producción, y la existencia de variedades que son consideradas nativas en la región, presentando posiblemente perfiles químicos únicos²⁰, lo que podría relacionarse con distintas actividades antibacterianas.

La caracterización química de variedades del *Cannabis*, teniendo en cuenta los principales cannabinoides (Δ^9 -THC, CBD y CBG), se justifica porque estos son metabolitos exclusivos de la planta. Sin embargo, es importante destacar que la composición fitoquímica de *C. sativa* es compleja, con alrededor de 480 metabolitos secundarios que incluyen los cannabinoides, terpenos y compuestos fenólicos¹⁹. Por consiguiente, sería relevante analizar y especificar los aspectos cualitativos y cuantitativos de los quimiotipos además de los cannabinoides. Por ello, se ha propuesto una clasificación que incluya todos otros componentes, garantizando una distinción quimiotaxonómica más precisa²¹.

En el presente estudio, se estableció que solo la cepa de *S. aureus* presentó sensibilidad frente a los compuestos evaluados. Estos resultados son coherentes con lo reportado en la literatura, debido a que se ha encontrado que tanto los extractos de Cannabis como los cannabinoides poseen mayor actividad antibacteriana en bacterias Gram positivas comparado con bacterias Gram negativas²². Generalmente, se ha encontrado que las bacterias Gram positivas son más sensibles a las propiedades de extractos naturales en comparación con las Gram negativas, debido a que la membrana externa (compuesta principalmente de lipopolisacáridos) que rodea la pared celular, actúa como una barrera que restringe la difusión de compuestos²³.

Los extractos y cannabinoides que produjeron inhibición se examinaron para determinar las CMI y evaluar la eficacia antimicrobiana de cada muestra mediante el método de dilución en agar¹⁸. Considerando que ni los extractos ni los cannabinoides presentaron actividad antibacteriana en *E. Coli*, no se realizaron las pruebas de dilución en agar para esta bacteria. Por otro lado, *S. aureus* sí presentó sensibilidad frente los compuestos estudiados. Para los estándares, se encontró que la CMI es de 1.25, 2.5 y 5 mg/L para CBG, CBD y CBDV, respectivamente. Estos resultados indican que, entre los cannabinoides evaluados, el CBG es el metabolito secundario con mayor actividad antibacteriana frente a *S. aureus*.

Si bien el mecanismo de acción de los cannabinoides no se ha establecido con claridad, el CBD es el compuesto que más ampliamente ha sido estudiado. Se ha encontrado que el CBD puede disminuir el potencial de membrana, alterando su estabilidad. Por ello, Wassmann y colaboradores consideran que el mecanismo de acción de este cannabinoide podría estar relacionado con el proceso de división y la envoltura celular²⁴. En el caso del CBDV, la información acerca de su actividad antimicrobiana es limitada; probablemente porque no es un cannabinoide mayoritario. En el presente estudio, se encontró una disminución en el efecto antibacteriano del CBDV (CMI=5 mg/L) comparado al del CBD (CMI=2.5 mg/L). Los resultados encontrados en esta investigación son consistentes con lo reportado en otros estudios; Russo e investigadores encontraron que *S. aureus* presentó mayor sensibilidad al CBD que al CBDV después de 72 horas de exposición²⁵. La pérdida de actividad se ha asociado con el cambio del sustituyente n-pentil (CBD) por n-propil (CBDV)²⁶. Estos resultados sugieren que la lipofilidad de los cannabinoides podría ser un factor importante para determinar la potencia de su actividad antibacteriana²⁷.

En el caso del CBG, se ha reportado que este cannabinoide además de inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas, es capaz de reprimir la formación de biopelículas y erradicar biopelículas pre-formadas²⁶, posicionándolo como un agente antimicrobiano prometedor²⁸. En nuestra investigación, el CBG demostró ser el cannabinoide más efectivo contra *S. aureus*. Estos resultados concuerdan con estudios previos que reportan al CBG como el cannabinoide más potente contra cepas resistentes de *S. aureus*²⁹. Además, un estudio comparativo del potencial antimicrobiano del CBD y el CBG determinó que el CBG era más efectivo frente a bacterias Gram positivas en comparación con el CBD. Estos hallazgos podrían explicarse por las diferencias estructurales entre ambos compuestos, lo que los lleva a interactuar de manera distinta con los receptores de la membrana bacteriana²⁹. Respecto a su mecanismo de acción, se considera que el CBG altera la membrana citoplasmática de las bacterias, causando daños en el ADN y proteínas y generando especies reactivas de oxígeno³⁰.

Múltiples estudios han evaluado la CMI de los cannabinoides frente a bacterias Gram positivas. Martinenghi et al. determinaron que la CMI del CBD oscila entre ~1.00 y ~2.00 mg/L, mientras que Blaskovich et al. evaluaron la actividad del CBD frente a 20 bacterias Gram positivas y encontraron una CMI de 1 a 4 mg/L³¹. Luz-Veiga et al. reportaron concentraciones mínimas inhibitorias entre ~3.14 y ~24 mg/L. Por otro lado, en una investigación realizada por Farha et al.

evaluaron la actividad antibacteriana de 18 cannabinoides; en ese estudio, se encontró que tanto el CBG como el CBD son potenciales compuestos antimicrobianos con una CMI de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que el CBDV presentó una CMI de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ²⁶. En el presente estudio, la CMI obtenida fue de 1.25, 2.5 y 5 mg/L para CBG, CBD y CBDV, respectivamente. Esta variabilidad en los resultados podría atribuirse a la metodología utilizada por cada investigador, a las diferencias en las cepas de estudio o a las propiedades mismas del cannabinoide, ya que se ha demostrado que los métodos de purificación y/o extracción pueden afectar su actividad antibacteriana²⁹.

Respecto a las muestras identificadas como quimiotipo II, la mayor actividad antibacteriana se observó en las muestras 1 y 2, las cuales tienen concentraciones más altas de CBD y THC, así como mayor contenido de CBG y CBDV en comparación con la muestra 3 (Tabla 3). Estos cannabinoides también podrían aportar de forma sinérgica a la actividad antibacteriana total, lo que explica que la CMI de estas variedades sea la más baja en comparación con las demás muestras.

En el caso de las variedades del quimiotipo III, las muestras 4 y 5 tienen un contenido de CBD mayor que la muestra 6. Sin embargo, según la CMI obtenida (tabla 3), el efecto antibacteriano fue menor. Estos resultados sugieren que un aumento en las concentraciones de CBD no implica necesariamente una mayor actividad antimicrobiana y que esta puede depender de otros factores, como el contenido total de cannabinoides y otros metabolitos secundarios, incluidos los terpenos, los cuales también presentan actividad antimicrobiana³².

Las muestras del quimiotipo IV (7, 8 y 9) mostraron diferentes actividades antibacterianas. Según la CMI obtenida, las variedades 7 y 8 demostraron un mayor efecto frente a *S. aureus*. Esto podría estar relacionado con las concentraciones de CBG, ya que este cannabinoide se encontró en mayor proporción en las muestras 7 y 8 que en la muestra 9. Además, al comparar la concentración total de cannabinoides, las muestras 7 y 8 presentaron una mayor composición de cannabinoides respecto a la muestra 9.

Al observar la CMI obtenida por los cannabinoides estándares y los extractos se tiene en cuenta que los primeros obtuvieron una CMI mucho menor, en comparación con los extractos, esto sugiere que los cannabinoides puros presentan mayor actividad que los extractos.

A pesar de lo anterior se observa que estos extractos también tienen una actividad comparable puesto que parten desde una concentración de material vegetal y no a partir de estándares puros, es decir, al establecer la concentración de cannabinoides en las CMI obtenidas de los extractos (Tabla 6) se observa que estas concentraciones de cannabinoides son mucho menores en comparación con los cannabinoides puros. Lo anterior tiene sentido desde el punto de una sinergia de actividad biológica. Se tiene en cuenta que los extractos de *C.sativa* no sólo presentan cannabinoides sino otros metabolitos secundarios en diversas proporciones³³. Según Pollastro et. al., la combinación de cannabinoides y componentes no cannabinoides podría mejorar sinérgicamente la actividad antimicrobiana^{33,34}. Según Issepi et al., cannabinoides como el CBD presentan una buena actividad antibacteriana, sin embargo, esta puede tener un efecto sinérgico junto a terpenos volátiles, que también se encuentran en el *C. sativa*, contra cepas de *S. aureus*³⁴. De esta manera la mezcla de cannabinoides y no cannabinoides en muy bajas proporciones es una buena alternativa para aumentar la actividad antimicrobiana.

Dado que los extractos presentan otros metabolitos secundarios como flavonoides, terpenos, lignanos, etc³³, es muy probable que la actividad antimicrobiana del cannabis no esté determinada por el cannabinoide principal, sino por el conjunto metabólico de esta³⁵, incluso si determinados metabolitos se encuentran a muy bajas concentraciones³⁶. Es por lo anterior que es necesario abarcar un perfil metabólico más amplio de la planta en el que se evalúen el perfil de terpenos, lignanos, estilbenos, flavonoides, etc.

Si bien el análisis estadístico realizado demostró que el quimiotipo no es un factor determinante en la actividad antimicrobiana, es necesario contar con más datos y muestras para obtener una muestra representativa que permita realizar análisis más complejos y robustos, como modelos de regresión, entre otros. Además, se hace necesario reducir el error de muestreo y evitar el sesgo de selección.

5. Conclusiones

A partir de la investigación realizada, se determinó que las muestras 1, 2 y 3 corresponden al quimiotipo II; las muestras 4, 5 y 6 al quimiotipo III; y las muestras 7, 8 y 9 al quimiotipo IV. Además, se estableció que los extractos de Cannabis y los cannabinoides presentan actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*, mientras que ninguna de las muestras analizadas mostró actividad antibacteriana frente a *E. coli*. Por otro lado, se encontró que la actividad antibacteriana

del CBG es mayor en comparación con el CBD, y este, a su vez, tiene mayor actividad que la CBDV, según los valores obtenidos de CMI. En general, los cannabinoides individuales (CBD, CBG y CBDV) presentaron mayor actividad antibacteriana frente a los extractos. Los resultados presentados en esta investigación corroboran la evidencia de los efectos antimicrobianos potenciales de *Cannabis*. Finalmente, se estableció que no existe una correlación significativa entre el quimiotipo y la CMI, considerando que las variedades que pertenecen a un mismo quimiotipo presentan actividad antibacteriana diferentes.

6. Referencias

1. Abdel-Azeem, A. M., Abdel-Azeem, M. A. & Khalil, W. F. Endophytic Fungi as a New Source of Antirheumatoid Metabolites. in *Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases* 355–384 (Elsevier, 2019). doi:10.1016/B978-0-12-813820-5.00021-0.
2. Ghavam, M., Manconi, M., Manca, M. L. & Bacchetta, G. Extraction of essential oil from *Dracocephalum kotschyi* Boiss. (Lamiaceae), identification of two active compounds and evaluation of the antimicrobial properties. *J Ethnopharmacol* **267**, 113513 (2021).
3. Katz, L. & Baltz, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. *J Ind Microbiol Biotechnol* **43**, 155–176 (2016).
4. Hong, H. J., Sloan, L., Saxena, D. & Scott, D. A. The Antimicrobial Properties of Cannabis and Cannabis-Derived Compounds and Relevance to CB2-Targeted Neurodegenerative Therapeutics. *Biomedicines* 2022, Vol. 10, Page 1959 **10**, 1959 (2022).
5. Atakan, Z. Cannabis, a complex plant: different compounds and different effects on individuals. *Ther Adv Psychopharmacol* **2**, 241 (2012).
6. Hao, D. C., Gu, X.-J. & Xiao, P. G. Phytochemical and biological research of Cannabis pharmaceutical resources. *Medicinal Plants* 431–464 (2015) doi:10.1016/B978-0-08-100085-4.00011-6.
7. Salamone, S. *et al.* Phytochemical Characterization of Cannabis sativa L. Chemotype V Reveals Three New Dihydrophenanthrenoids That Favorably Reprogram Lipid Mediator Biosynthesis in Macrophages. *Plants* **11**, 2130 (2022).
8. Rock, E. M. & Parker, L. A. Constituents of Cannabis Sativa. *Adv Exp Med Biol* **1264**, 1–13 (2021).
9. Vozza Berardo, M. E., Mendieta, J. R., Villamonte, M. D., Colman, S. L. & Nercessian, D. Antifungal and antibacterial activities of Cannabis sativa L. resins. *J Ethnopharmacol* **318**, 116839 (2024).
10. Appendino, G. *et al.* Antibacterial cannabinoids from Cannabis sativa: A structure-activity study. *J Nat Prod* **71**, 1427–1430 (2008).

11. Luz-Veiga, M. *et al.* Cannabidiol and Cannabigerol Exert Antimicrobial Activity without Compromising Skin Microbiota. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol. 24, Page 2389 **24**, 2389 (2023).
12. Sionov, R. V. & Steinberg, D. Anti-Microbial Activity of Phytocannabinoids and Endocannabinoids in the Light of Their Physiological and Pathophysiological Roles. *Biomedicines* 2022, Vol. 10, Page 631 **10**, 631 (2022).
13. Zengin, G. *et al.* Chromatographic Analyses, In Vitro Biological Activities, and Cytotoxicity of Cannabis sativa L. Essential Oil: A Multidisciplinary Study. *Molecules* 2018, Vol. 23, Page 3266 **23**, 3266 (2018).
14. Russo, E. B. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *Br J Pharmacol* **163**, 1344–1364 (2011).
15. Pancu, D. F. *et al.* Antibiotics: Conventional Therapy and Natural Compounds with Antibacterial Activity—A Pharmaco-Toxicological Screening. *Antibiotics* 2021, Vol. 10, Page 401 **10**, 401 (2021).
16. Blaskovich, M. A. T. *et al.* The antimicrobial potential of cannabidiol. *Communications Biology* 2021 4:1 **4**, 1–18 (2021).
17. Zagozen, M., Cerenak, A. & Kreft, S. Cannabigerol and cannabichromene in Cannabis sativa L. *Acta Pharmaceutica* **71**, 355–364 (2021).
18. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. *Clinical Microbiology and Infection* **6**, 509–515 (2000).
19. Barrales-Cureño, H. J. *et al.* Chemical Characteristics, Therapeutic Uses, and Legal Aspects of the Cannabinoids of Cannabis sativa: A Review. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **63**, e20190222 (2020).
20. Cubillos Sánchez, P. A. Cannabis for medical and scientific purposes: the Colombian landscape. *Colombian Journal of Anesthesiology* **49**, (2020).
21. Aliferis, K. A. & Bernard-Perron, D. Cannabinomics: Application of Metabolomics in Cannabis (Cannabis sativa L.) Research and Development. *Front Plant Sci* **11**, (2020).
22. Karas, J. A. *et al.* The Antimicrobial Activity of Cannabinoids. *Antibiotics* **9**, 406 (2020).
23. Lelario, F. *et al.* Identification and antimicrobial activity of most representative secondary metabolites from different plant species. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* **5**, 13 (2018).
24. Wassmann, C. S., Højrup, P. & Klitgaard, J. K. Cannabidiol is an effective helper compound in combination with bacitracin to kill Gram-positive bacteria. *Sci Rep* **10**, 4112 (2020).
25. Russo, C., Lavorgna, M., Nugnes, R., Orlo, E. & Isidori, M. Comparative assessment of antimicrobial, antiradical and cytotoxic activities of cannabidiol and its propyl analogue cannabidivarin. *Sci Rep* **11**, 22494 (2021).

26. Farha, M. A. *et al.* Uncovering the hidden antibiotic potential of Cannabis. *bioRxiv* 833392 (2020) doi:10.1101/833392.
27. Saleemi, M. A. *et al.* Antimicrobial and Cytotoxic Effects of Cannabinoids: An Updated Review with Future Perspectives and Current Challenges. *Pharmaceuticals* **15**, 1228 (2022).
28. Wong-Salgado, P. *et al.* Therapeutic Potential of Cannabinoid Profiles Identified in Cannabis L. Crops in Peru. *Biomedicines* **12**, 306 (2024).
29. Luz-Veiga, M. *et al.* Cannabidiol and Cannabigerol Exert Antimicrobial Activity without Compromising Skin Microbiota. *Int J Mol Sci* **24**, 2389 (2023).
30. Saleemi, M. A. *et al.* Antimicrobial and Cytotoxic Effects of Cannabinoids: An Updated Review with Future Perspectives and Current Challenges. *Pharmaceuticals* **15**, 1228 (2022).
31. Blaskovich, M. A. T. *et al.* The antimicrobial potential of cannabidiol. *Commun Biol* **4**, 7 (2021).
32. Masyita, A. *et al.* Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. *Food Chem X* **13**, 100217 (2022).
33. Pollastro, F., Minassi, A. & Fresu, L. G. Cannabis Phenolics and their Bioactivities. *Curr Med Chem* **25**, 1160–1185 (2018).
34. Iseppi, R. *et al.* Chemical Characterization and Evaluation of the Antibacterial Activity of Essential Oils from Fibre-Type Cannabis sativa L. (Hemp). *Molecules* **24**, 2302 (2019).
35. Giselle, F. *et al.* Antibacterial activity of cannabis (Cannabis sativa L.) female inflorescence and root extract against Paenibacillus larvae, causal agent of American foulbrood. *Biocatal Agric Biotechnol* **47**, 102575 (2023).
36. Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N. & Mnif, W. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines* **3**, 25 (2016).

7. Anexos

Tabla 8. Resultados de la caracterización de las 18 muestras de Cannabis

Muestra	Cannabinoides cuantificados (% p/p)							
	CBD	CBDA	CBG	THC	THCA	THCV	CBC	CBDV
M1	4,68	3,68	0,09	2,78	0	0,01	0,36	0,14
M2	3,86	7,23	0,08	2,77	0,38	0,02	0,28	0,09
M3	3,19	2,66	0,01	1,43	0,23	0	0,06	0,04
M4	8,13	4,13	0,02	ND	0,33	0,04	0,07	0,06
M5	7,63	9,08	0,05	ND	ND	ND	0,1	0,05
M6	7,07	3,79	0,08	ND	ND	0,02	0,28	0,09
M7	0,13	0,15	0,23	ND	ND	ND	0,04	ND
M8	0,02	0,03	0,06	ND	ND	ND	0,01	ND
M9	0,04	0,07	0,13	ND	ND	ND	0,02	ND

Muestra	Cannabinoides cuantificados (% p/p)							
	CBD	CBDA	CBG	THC	THCA	THCV	CBC	CBDV
M10	0,52	0,18	0,02	0,68	ND	0,04	0,07	0,06
M11	1,13	6,87	0,04	1,12	1,34	0,01	0,08	0,04
M12	2,04	4,12	0,05	1,48	ND	ND	0,1	0,05
M13	4,62	10,68	0,01	ND	ND	ND	0,06	0,04
M14	5,52	10,68	0,04	ND	ND	0,01	0,08	0,04
M15	0,89	1,39	0,09	ND	ND	0,01	0,36	0,14
M16	0,05	0,09	0,18	ND	ND	ND	ND	ND
M17	0,12	0,1	0,25	ND	ND	ND	0,04	ND
M18	0,01	0	0,24	ND	ND	ND	0,05	ND

Fotografías actividad antimicrobiana de extractos y cannabinoides en difusión en pocillos

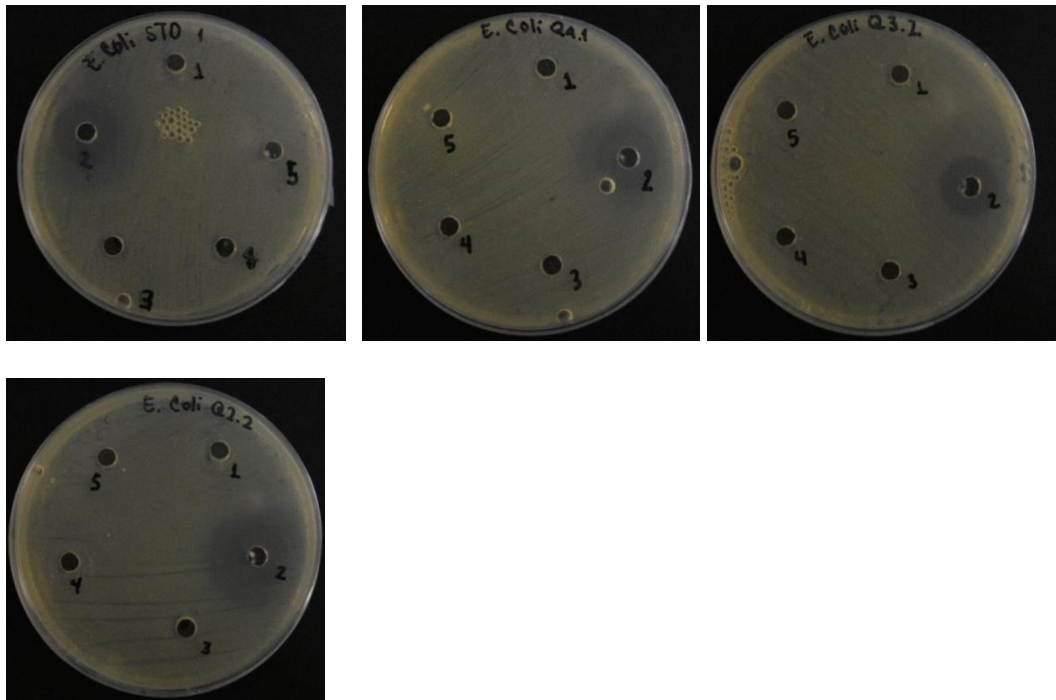


Imagen 1-4. Prueba de difusión de pocillos, *E.coli* frente a extractos y cannabinoides. Superior izquierda. Evaluación Cannabinoides Puros. Pocillos: 1. Metanol: agua 80:20, 2. Azitromicina, 3. CBD, 4. CBG, 5. CBDV. Superior centro. Evaluación Extractos Quimiotipo IV. Pocillos: 1. Metanol: agua 80:20, 2. Azitromicina, 3. M7, 4. M8, 5. M9. Superior derecha. Evaluación Extractos Quimiotipo III. Pocillos: 1. Metanol: agua 80:20, 2. Azitromicina, 3. M4, 4. M5, 5. M6. Inferior izquierda. Evaluación Extractos Quimiotipo II. Pocillos: 1. Metanol: agua 80:20, 2. Azitromicina, 3. M1, 4. M2, 5. M3.

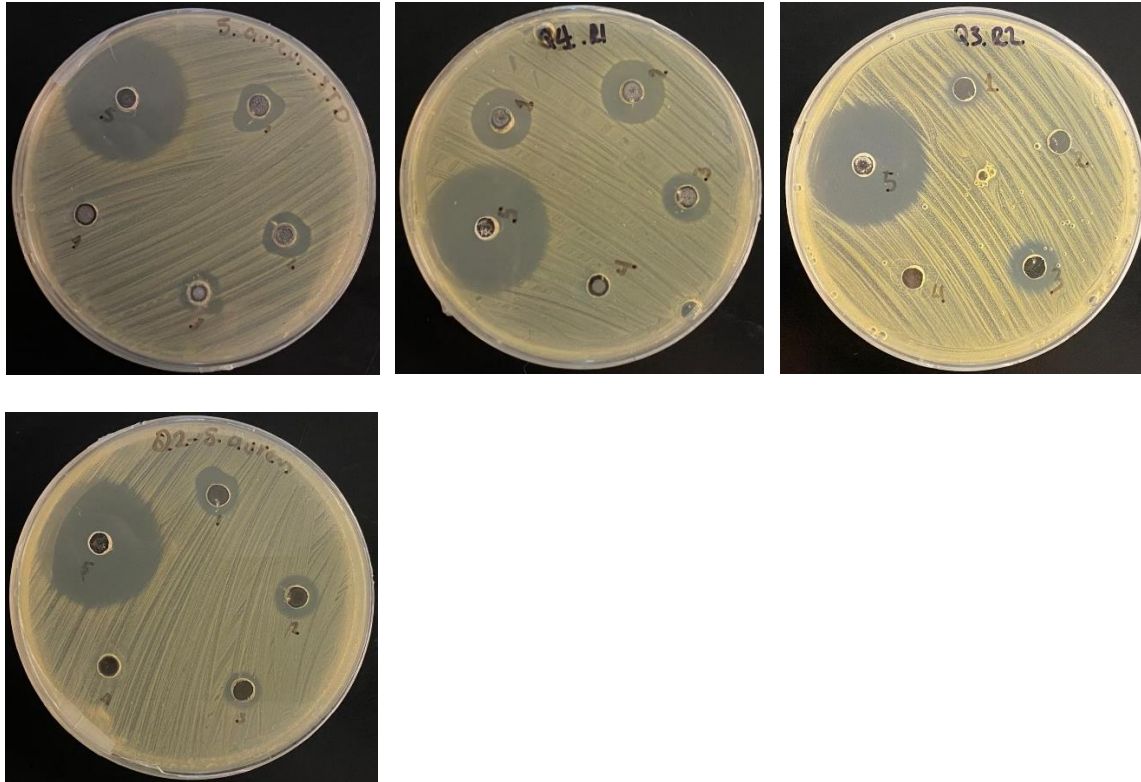
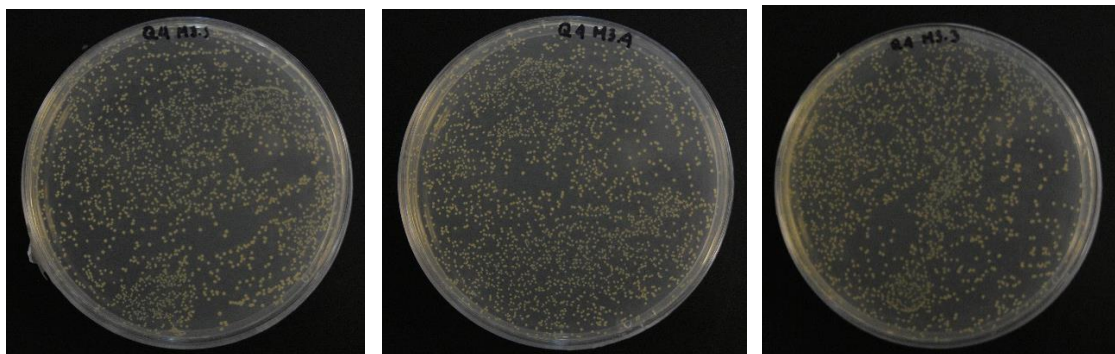


Imagen 5-8. Prueba de difusión de pocillos, *S.aureus* frente a extractos y cannabinoides. Superior izquierda. Evaluación Cannabinoides Puros. Pocillos: 1. CBD, 2. CBG, 3. CBDV, 4. Metanol:agua 80:20, 5. Azitromicina. Superior centro. Evaluación Extractos Quimiotipo IV. Pocillos: 1. M7, 2. M8, 3. M9, 4. Metanol:agua 80:20, 5. Azitromicina. Superior derecha. Evaluación Extractos Quimiotipo III. Pocillos: 1. M4, 2. M5, 3. M6, 4. Metanol:agua 80:20, 5. Azitromicina. Inferior izquierda. Evaluación Extractos Quimiotipo II. Pocillos: 1. M1, 2. M2, 3. M3, 4. Metanol:agua 80:20, 5. Azitromicina.

Fotografías actividad antimicrobiana de extractos mediante dilución en agar



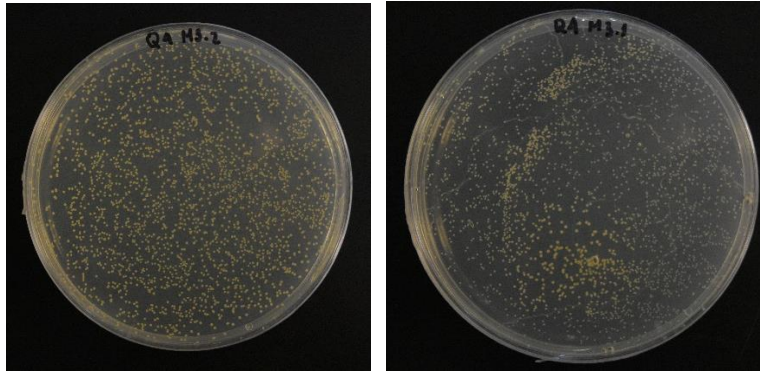


Imagen 9-13. Prueba de dilución en agar, *S.aureus* frente a extractos de Quimiotipo IV, Muestra 3. Superior izquierda a Superior derecha: 6.25 mg/L, 12.5 mg/L, 25 mg/L. Inferior izquierda – Inferior centro: 50 mg/L, 100 mg/L.

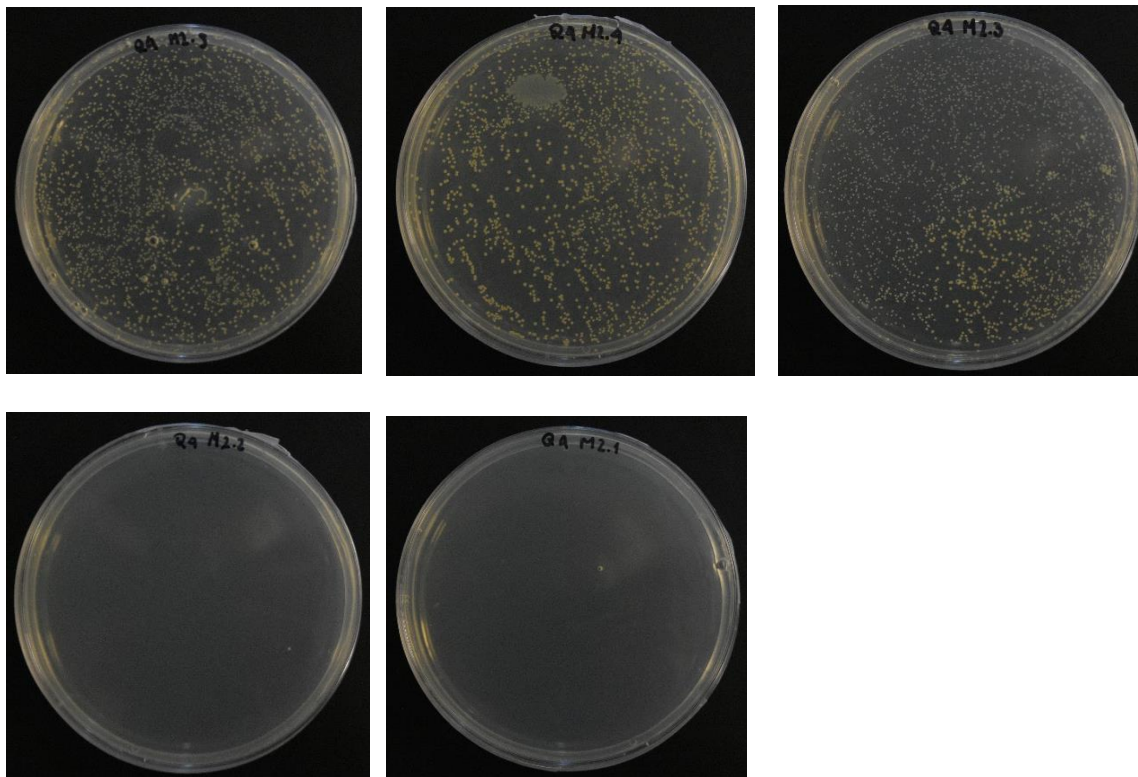


Imagen 14 - 18. Prueba de dilución en agar, *S.aureus* frente a extractos de Quimiotipo IV, Muestra 2. Superior izquierda – Superior derecha: 6.25 mg/L, 12.5 mg/L, 25 mg/L. Inferior izquierda – Inferior centro: 50 mg/L, 100 mg/L.

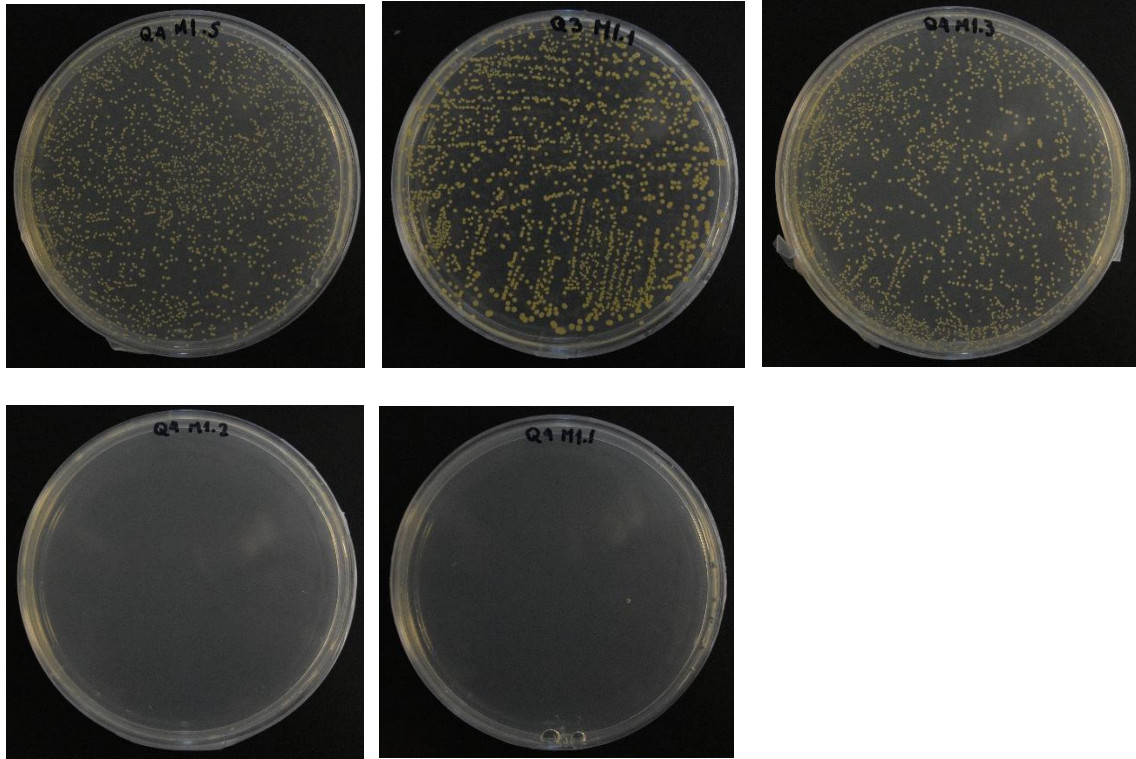


Imagen 19 - 23. Prueba de dilución en agar, *S.aureus* frente a extractos de Quimiotipo III, Muestra 1. Superior izquierda – Superior derecha: 6.25 mg/L, 12.5 mg/L, 25 mg/L. Inferior izquierda – Inferior centro: 50 mg/L, 100 mg/L.

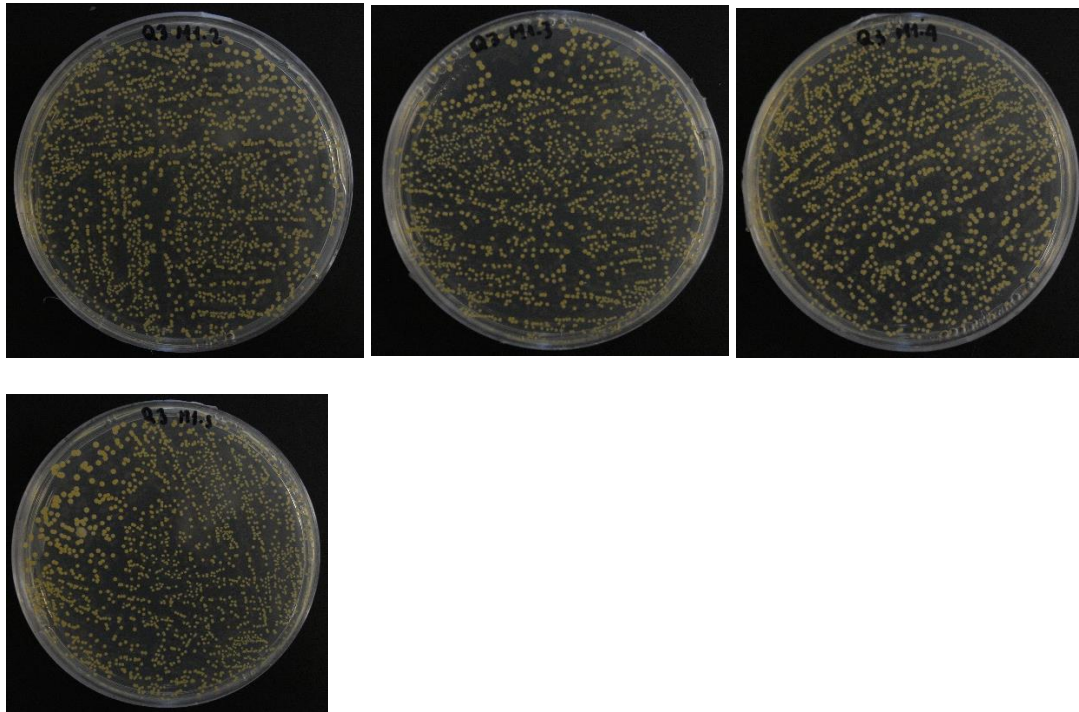


Imagen 20 - 24. Prueba de dilución en agar, *S.aureus* frente a extractos de Quimiotipo III, Muestra 1. Superior izquierda – Superior derecha: 6.25 mg/L, 12.5 mg/L, 25 mg/L. Inferior izquierda – Inferior centro: 50 mg/L, 100 mg/L.

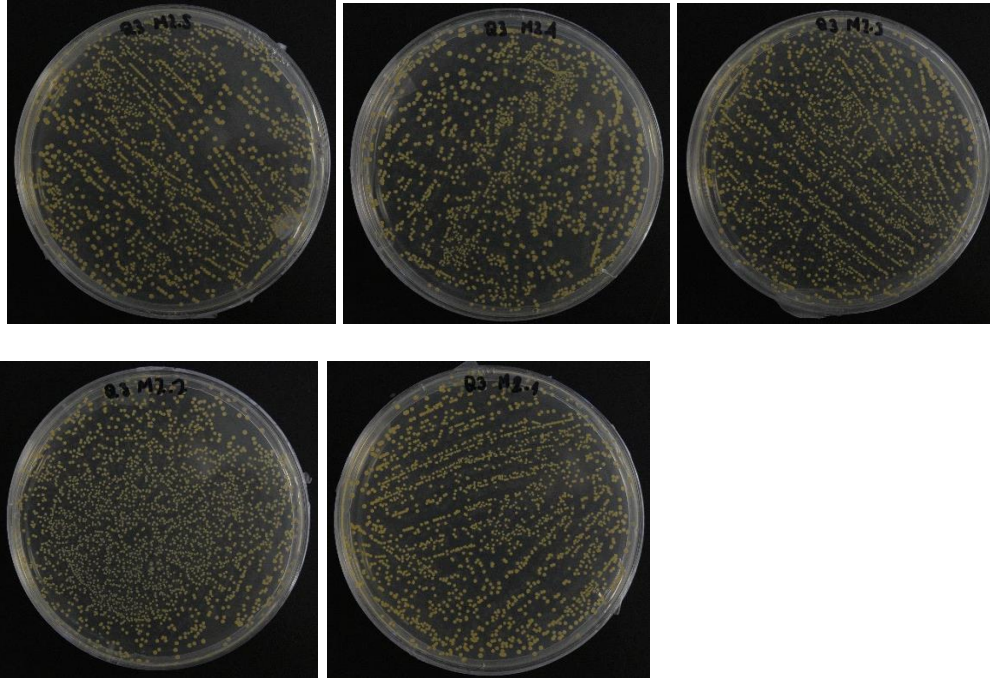


Imagen 21 - 26. Prueba de dilución en agar, *S.aureus* frente a extractos de Quimiotipo III, Muestra 2. Superior izquierda – Superior derecha: 6.25 mg/L, 12.5 mg/L, 25 mg/L. Inferior izquierda – Inferior centro: 50 mg/L, 100 mg/L.

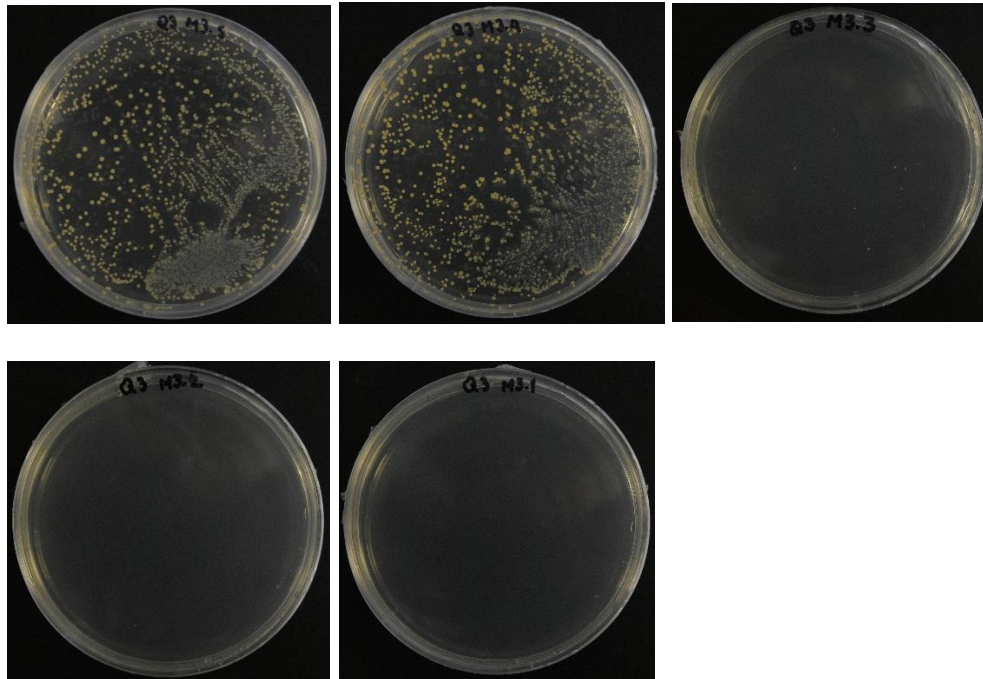


Imagen 27 - 31. Prueba de dilución en agar, *S.aureus* frente a extractos de Quimiotipo III, Muestra 3. Superior izquierda – Superior derecha: 6.25 mg/L, 12.5 mg/L, 25 mg/L. Inferior izquierda – Inferior centro: 50 mg/L, 100 mg/L.

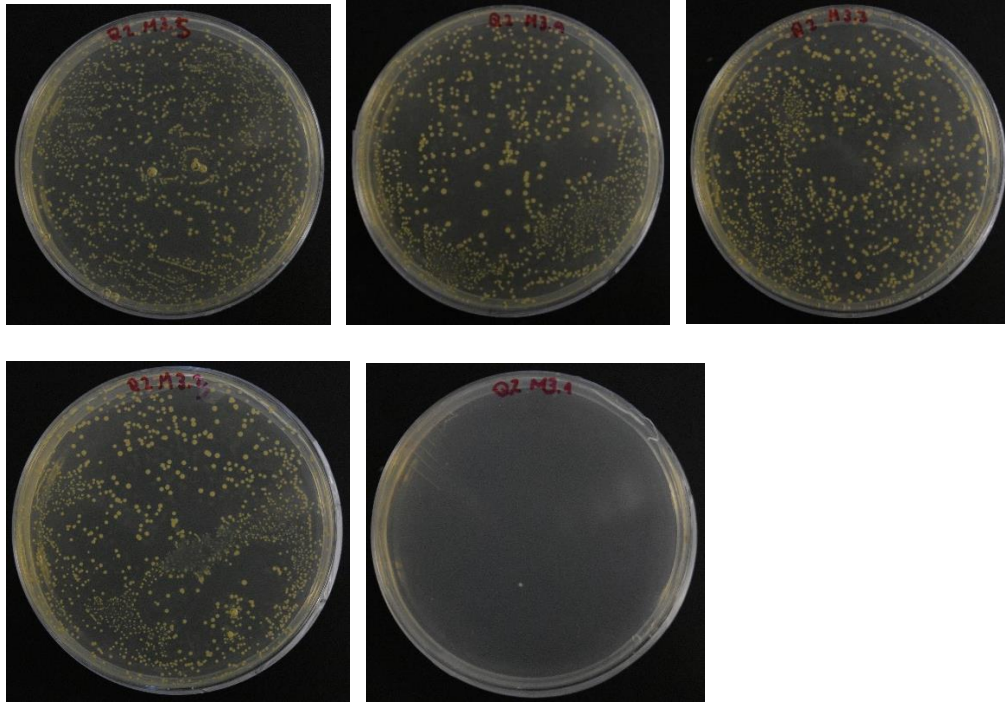


Imagen 32 - 36. Prueba de dilución en agar, *S.aureus* frente a extractos de Quimiotipo II, Muestra 3. Superior izquierda – Superior derecha: 6.25 mg/L, 12.5 mg/L, 25 mg/L. Inferior izquierda – Inferior centro: 50 mg/L, 100 mg/L.

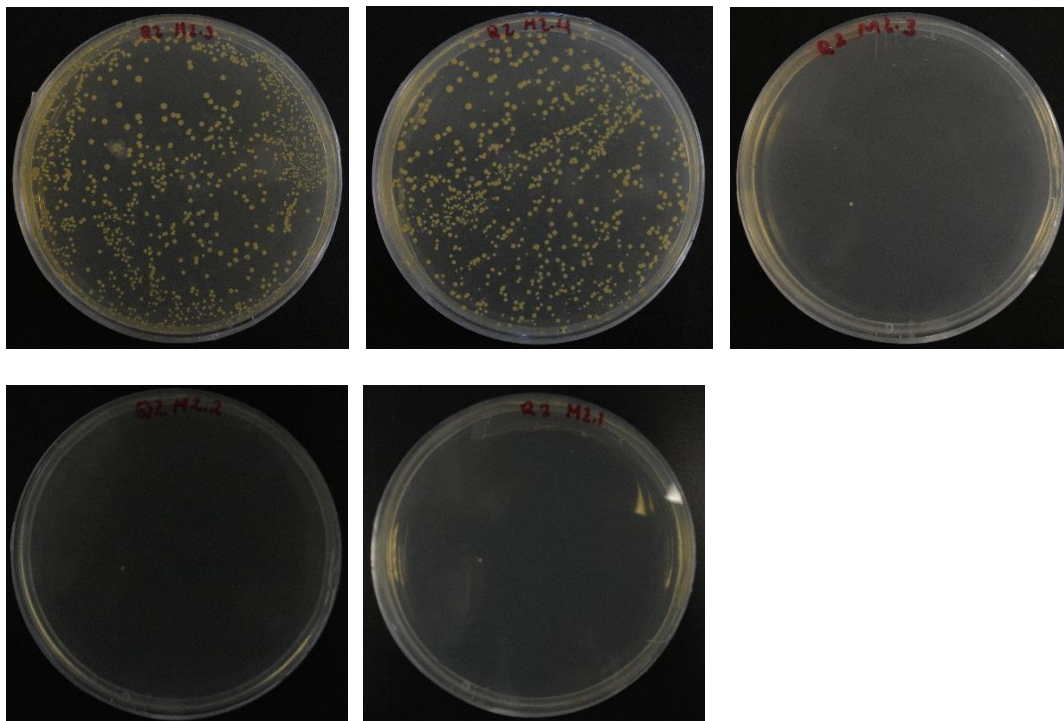


Imagen 37 - 41. Prueba de dilución en agar, *S.aureus* frente a extractos de Quimiotipo II, Muestra 2. Superior izquierda – Superior derecha: 6.25 mg/L, 12.5 mg/L, 25 mg/L. Inferior izquierda – Inferior centro: 50 mg/L, 100 mg/L.

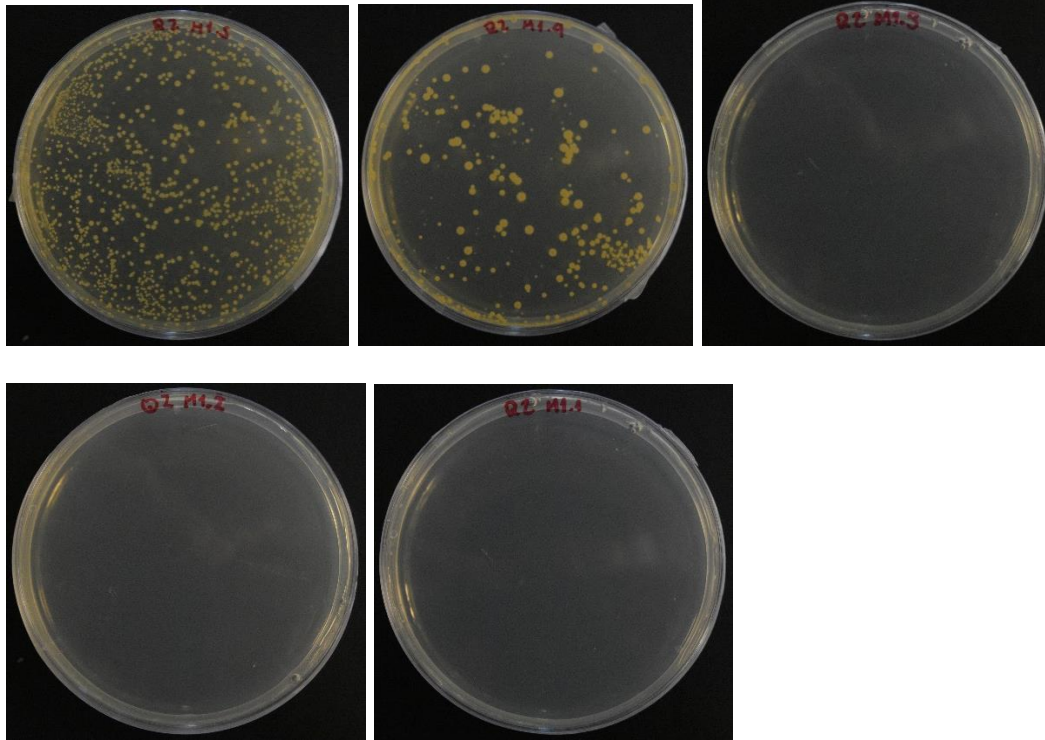


Imagen 41 - 45. Prueba de dilución en agar, *S.aureus* frente a extractos de Quimiotipo II, Muestra 1. Superior izquierda – Superior derecha: 6.25 mg/L, 12.5 mg/L, 25 mg/L. Inferior izquierda – Inferior centro: 50 mg/L, 100 mg/L.

Fotografías actividad antimicrobiana de cannabinoides mediante dilución en agar

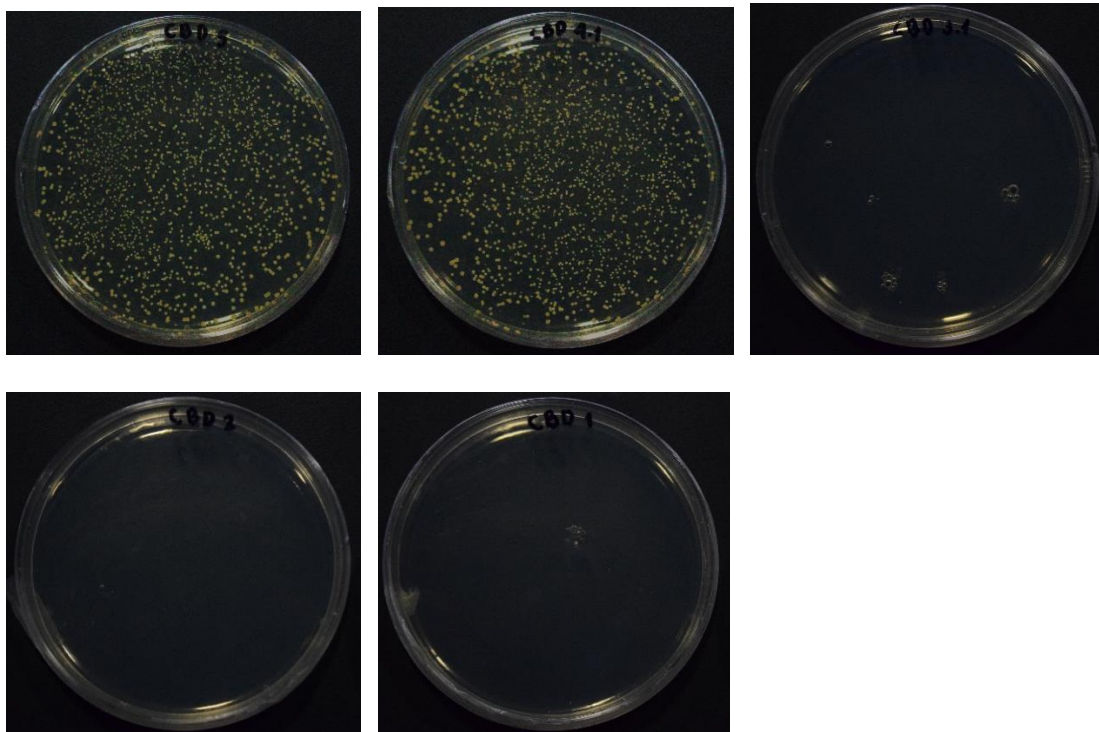


Imagen 46 - 50. Prueba de dilución en agar, *S.aureus* frente a cannabidiol. Superior izquierda – Superior derecha: 0.3125 mg/L, 0.625 mg/L, 1.25 mg/L. Inferior izquierda – Inferior centro: 2.5 mg/L, 5 mg/L.

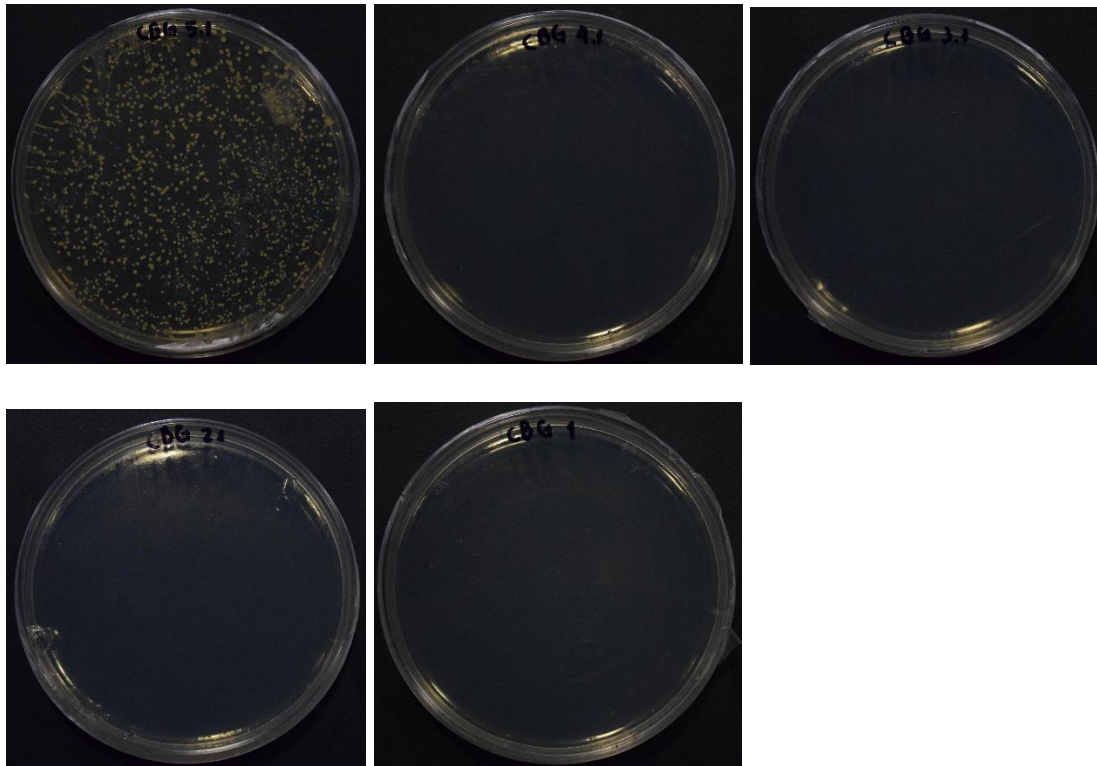


Imagen 51 - 55. Prueba de dilución en agar, *S.aureus* frente a cannabigerol. Superior izquierda – Superior derecha: 0.3125 mg/L, 0.625 mg/L, 1.25 mg/L. Inferior izquierda – Inferior centro: 2.5 mg/L, 5 mg/L.

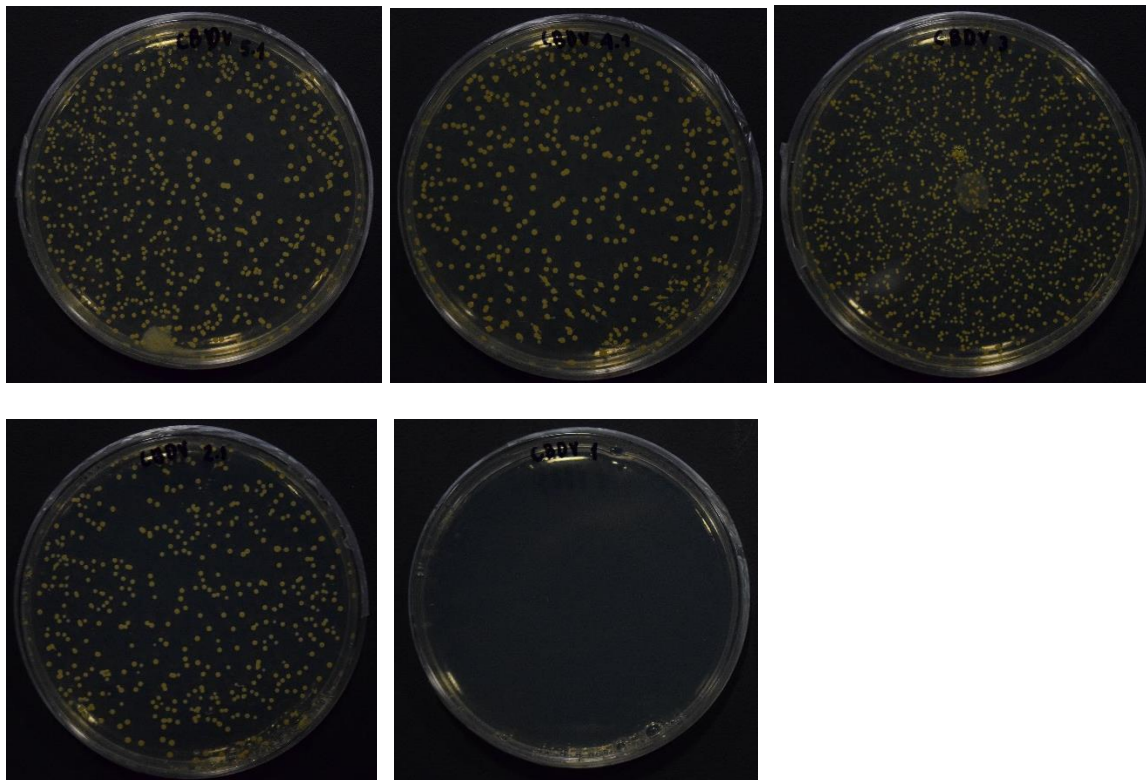


Imagen 56 - 60. Prueba de dilución en agar, *S.aureus* frente a cannabidivarinol. Superior izquierda – Superior derecha: 0.3125 mg/L, 0.625 mg/L, 1.25 mg/L. Inferior izquierda – Inferior centro: 2.5 mg/L, 5 mg/L.

8. Agradecimientos

A Dios, a nuestros tutores, familiares y amigos, así como a todas las personas que contribuyeron a la realización de este proyecto, les expresamos nuestro más profundo cariño y agradecimiento.