



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE CUENCA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

EVALUACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO DE

Cannabis sativa L. EN CEPAS RESISTENTES DE *Staphylococcus aureus* (MRSA)

ANALIZADAS EN INSPI CZ6, ECUADOR.

Trabajo de titulación previo a la obtención del

título de Ingeniero Biotecnólogo

AUTOR: JUAN FRANCISCO LÓPEZ YÉPEZ

TUTORA: DRA. MYRIAM XIMENA MANCHENO CÁRDENAS

Cuenca - Ecuador

2025

**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Yo, Juan Francisco López Yépez con documento de identificación N° 0106722366 manifiesto que:

Soy el autor y responsable del presente trabajo; y, autorizo a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Cuenca, 8 de agosto del 2025

Atentamente,



Juan Francisco López Yépez

0106722366

**CERTIFICADO CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Yo, Juan Francisco López Yépez con documento de identificación N° 0106722366, expreso mi voluntad y por medio del presente documento cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del Trabajo experimental: “Evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana del extracto de *Cannabis sativa* L. En cepas resistentes de *Staphylococcus aureus* (MRSA) analizadas en INSPI CZ6, Ecuador.”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero Biotecnólogo, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribo este documento en el momento que hago la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 8 de agosto del 2025

Atentamente,



Juan Francisco López Yépez

0106722366

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Myriam Ximena Mancheno Cárdenas con documento de identificación N° 0602018160, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: EVALUACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO DE *CANNABIS SATIVA L.* EN CEPAS RESISTENTES DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (MRSA) ANALIZADAS EN INSPI CZ6, ECUADOR., realizado por Juan Francisco López Yépez con documento de identificación N° 0106722366, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 8 de agosto del 2025

Atentamente,



Dra. Myriam Ximena Mancheno Cárdenas

0602018160

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación está dedicado a todos quienes creyeron en mí:
A mis padres Patricio y Jenny porque me apoyaron desde el primer día de la carrera.

A mis hermanos Andrés y Xavier por inspirarme.

A mis perritas Julieta y Pirula por acompañarme incondicionalmente.

A mis abuelos León y Rosario, por cuidarme, sé que estarían orgullosos.

A mi abuelita Carmen, por estar pendiente de mí.

A mis primas Isa y Sofí por ser mis amigas y escucharme.

A mis amigos Ricky J., Romi E., Jorge R., Fernando S., Diego C., Paula G., Ramiro I., Daniel T.,
Ana G., Dome G., Gaby G. porque los amo, me enseñaron que para todos hay un lugar donde
puedes ser tú mismo, sentirte querido y seguro.

También dedico este trabajo a mí, Juan López,
por el esfuerzo y los sacrificios durante la carrera,
por no abandonarte ni rendirte a pesar de todo.

Juan Francisco López Yépez

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer a mis padres, que me han brindado una vida buena y privilegiada, muchas veces sacrificando sus intereses. Gracias por los consejos, por apoyarme siempre y por educarme. Gracias a ustedes, soy el hombre que soy.

A mis hermanos, por estar pendientes de mí y cuidarme siempre, siempre fueron, son y serán mi mayor inspiración, quiero ser exitoso como ustedes.

Agradezco a mis abuelos porque sé que me cuidan, desde aquí y desde arriba, quiero que se sientan orgullosos de mí.

A mi popa Julieta y a la Pirula, porque me han acompañado en cada noche de estudio, en las buenas y en las malas, en las tristezas y las alegrías. Sin ellas no hubiera podido continuar.

A mi prima Isa, porque siempre ha estado para mí de manera incondicional.

A Marcelo, porque en verdad tus palabras y apoyo me ayudaron a continuar y no rendirme.

A mis amigas Anita y Dome G. por la directiva, los consejos, las funas y por ser mis amigas.

A Ricky, Romi, Jorge, Ramiro, Fernando y Diego, por los momentos, los viajes, las risas.

Gracias por ser mis amigos, por quererme, apoyarme. Por darme un lugar donde pertenecer.

A la Dra. Myriam Mancheno, por tenerme paciencia y aconsejarme en mi trabajo de titulación.

Agradezco a la vida por ser gentil conmigo, me siento afortunado de conocer tanta gente increíble.

Me agradezco también a mí, por no rendirme.

Todo el esfuerzo cuenta, aunque a veces pienses que no.

Juan Francisco López Yépez

Tabla de Contenido

Resumen.....	1
Abstract.....	2
Capítulo 1: Introducción	3
1.1 Introducción	3
1.2 Planteamiento del Problema.....	4
1.3 Pregunta de Investigación	6
1.4 Justificación.....	7
1.5 Limitaciones	9
1.6 Objetivos	11
Objetivo general	11
Objetivos específicos.....	11
1.7 Hipótesis.....	12
Capítulo 2: Fundamentos Teóricos	12
2.1 Antecedentes.....	12
2.2 Marco Conceptual	15
2.3 Bases teóricas	16
2.3.1 Resistencia a los antimicrobianos.....	16
2.3.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	18
2.3.3 <i>Staphylococcus aureus</i> Resistente a la Meticilina [MRSA].....	22
2.3.4 <i>Cannabis sativa</i> L.....	24
2.3.5 Cannabinoides	25
2.3.6 Aspectos éticos y regulaciones	30
2.3.7 Actividad Antimicrobiana de Extractos y Fracciones.....	30
2.3.8 Métodos de Evaluación Antimicrobiana.....	31
2.3.9 Lectura en microplaca tipo ELISA.....	32
Capítulo 3: Materiales y Métodos.....	31
3.1 Nivel de Investigación.....	31
3.2 Diseño de Investigación	31
3.3 Diseño de Experimento	33
Tipo de extracto:	33
3.3.1. Cepas <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la Meticilina [MRSA] y ATCC 25923.....	33
3.3.2. Extractos de <i>Cannabis sativa</i> L.....	34

3.3.3. Diseño de microplaca	34
3.4 Variables	37
3.5 Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos	38
3.6 Técnicas de Procesamiento y Análisis de Datos	39
3.7 Protocolo	42
3.6.1 Preparación de extractos	42
3.6.2 Selección y recuperación de cepas	44
3.6.3 Preparación de medios.....	44
3.6.4 Recuperación y verificación de cepas	45
3.6.5 Preparación del inóculo	46
3.6.6 Armado de placas.....	46
3.6.7 Lectura de placas	47
3.6.8 Análisis estadístico de resultados.	47
Capítulo 4: Resultados y discusión	48
4.1. Análisis de los datos	48
4.1.1. Selección de las cepas.....	48
4.1.2. Verificación de cepas	50
4.1.3. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria [CMI].....	52
4.1.4. Análisis Estadístico de las CMI en función al tipo de extracto	57
4.1.5. Comparación CMI promedio entre cepas	60
4.1.6. Multirresistencia clínica y eficacia de los extractos	64
4.1.7. Limitaciones técnicas del ensayo	68
4.2.1. Implicaciones terapéuticas y perspectivas a futuro.	69
Capítulo 5: Conclusiones y Recomendaciones	70
5.1 Conclusiones	70
5.2 Recomendaciones.....	71
Bibliografía	73
Anexos	85
Anexo A.....	85
Anexo B.....	88
Anexo C.....	90

Resumen

El incremento de bacterias multirresistentes representa una gran amenaza para la salud pública mundial. El *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina [MRSA] se distingue por su capacidad para neutralizar los tratamientos antibióticos, lo que requiere nuevas estrategias terapéuticas. Este estudio evalúa la actividad antimicrobiana *in vitro* de dos extractos de *Cannabis sativa* L. en 14 cepas de MRSA analizadas por el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública CZ6 [INSPI] en Ecuador, utilizando el método de microdilución en caldo para determinar la concentración mínima inhibidora [CMI].

Se utilizan extractos de etanol y hexano de *Cannabis sativa* L., caracterizados previamente mediante cromatografía. Las cepas se seleccionan de acuerdo con criterios fenotípicos y genotípicos [presencia del gen *mecA*] y se reactivan en condiciones controladas. Las mediciones se realizan en microplacas de 96 pocillos. Los resultados se analizan mediante pruebas estadísticas.

Los resultados demuestran que los extractos etanólicos y hexánicos de *Cannabis sativa* L. poseen actividad antimicrobiana *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), con valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) clasificados entre moderados y altos. El extracto etanólico muestra una mayor eficacia en comparación con el hexánico, diferencia que resultó estadísticamente significativa. No se observó una tendencia entre el nivel de multirresistencia de las cepas y su tolerancia al tratamiento. Estos hallazgos respaldan el potencial de *C. sativa* L. como fuente de compuestos antimicrobianos y sientan las bases para futuras investigaciones orientadas a su aplicación terapéutica en infecciones causadas por bacterias multirresistentes.

Palabras clave: Actividad antimicrobiana, cannabinoides, *Cannabis sativa* L., MRSA, resistencia antimicrobiana, *Staphylococcus aureus*.

Abstract

The rise of multidrug-resistant bacteria represents a major threat to global public health. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is notable for its ability to withstand antibiotic treatments, necessitating the development of new therapeutic strategies. This study evaluates the *in vitro* antimicrobial activity of two *Cannabis sativa* L. extracts against 14 MRSA strains analyzed by the National Institute of Public Health Research CZ6 (INSPI) in Ecuador, using the broth microdilution method to determine the minimum inhibitory concentration (MIC).

Ethanol and hexane extracts of *Cannabis sativa* L., previously characterized by chromatography, are used. The strains were selected based on phenotypic and genotypic criteria (presence of the *mecA* gene) and reactivated under controlled conditions. Measurements were performed in 96-well microplates, and the results were analyzed using statistical tests.

The findings demonstrated that both ethanol and hexane extracts of *Cannabis sativa* L. exhibit *in vitro* antimicrobial activity against MRSA strains, with MIC values ranging from moderate to high. The ethanol extract showed greater efficacy compared to the hexane extract, a difference that was statistically significant. There was no trend observed between the level of multidrug resistance in the strains and their tolerance to treatment. These results support the potential of *C. sativa* L. as a source of antimicrobial compounds and lay the groundwork for future research aimed at its therapeutic application in infections caused by multidrug-resistant bacteria.

Keywords: Antimicrobial activity, antimicrobial resistance, cannabinoids, *Cannabis sativa* L., MRSA, *Staphylococcus aureus*.

Capítulo 1: Introducción

Introducción

El incremento de bacterias multirresistentes representa una de las principales amenazas a la salud pública global. Dentro de este contexto, el *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina [MRSA] ha adquirido especial relevancia debido a su capacidad para evadir tratamientos antibióticos convencionales, ocasionando infecciones difíciles de tratar tanto en entornos comunitarios como hospitalarios. Esta problemática se ha agudizado en países de ingresos medios y bajos, como Ecuador, donde se reportan niveles preocupantes de resistencia en cepas clínicas de *S. aureus*.

En respuesta a esta crisis sanitaria, la comunidad científica ha intensificado la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos, destacando el potencial de los compuestos naturales. Entre ellos, los cannabinoides extraídos de *Cannabis sativa* L. han emergido como prometedores candidatos, debido a su actividad antimicrobiana demostrada, especialmente frente a bacterias Gram positivas como MRSA. Diversos estudios han evidenciado que cannabinoides como el cannabidiol [CBD] y el tetrahidrocannabinol [THC] pueden inhibir la formación de biopelículas, eliminar cepas persistentes y presentar un bajo riesgo de inducir resistencia bacteriana.

Este trabajo de titulación tiene como finalidad evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto de *Cannabis sativa* L. frente a cepas de MRSA aisladas y conservadas en el cepario del INSPI CZ6 en Ecuador. La investigación asume un enfoque experimental y explicativo, aplicando la técnica de concentración mínima inhibitoria [CMI] a través del método de microdilución en caldo, y se complementa con un análisis *in silico* para identificar posibles mecanismos moleculares de acción.

Conceptualmente, la investigación se apoya en fundamentos de microbiología, farmacognosia y biotecnología, abordando nociones clave como resistencia a los antimicrobianos, mecanismos de patogenicidad, compuestos bioactivos y evaluación fenotípica de susceptibilidad bacteriana. Se considera también el marco ético y regulatorio vigente en relación con el uso de *Cannabis sativa* L. con fines medicinales.

El presente documento se estructura en capítulos que abordan: la formulación del problema, objetivos y justificación; un marco teórico que compila antecedentes científicos y bases conceptuales del tema; el diseño metodológico detallado; y finalmente, los aspectos logísticos y administrativos para la ejecución del estudio. De esta manera, se busca aportar conocimiento científico relevante que permita explorar nuevas estrategias terapéuticas frente a infecciones resistentes, con base en recursos naturales y realidad epidemiológica local.

Planteamiento del Problema

Como protagonistas clave en la prevención y el tratamiento de infecciones bacterianas, se encuentran los antibióticos. Sin embargo, el uso indiscriminado de estos fármacos y en respuesta al estrés producido, las poblaciones bacterianas han desarrollado mecanismos de resistencia. ya sean inherentes o adquiridos durante el proceso infeccioso, que les confiere la capacidad para resistir los efectos de los antibióticos, esto es lo que se conoce como resistencia a los antimicrobianos. (Giono-Cerezo et al., 2020; Organización Mundial de la Salud (OMS), 2020).

La resistencia a los antibióticos es, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud [OMS], una de las principales amenazas tanto para la salud mundial, la seguridad alimentaria y el desarrollo. Si no se toman medidas urgentes, se proyecta que para el 2050, esta problemática cause

10 millones de muertes anuales, además de una reducción del producto interno bruto de entre el 2 y 5% en algunos países (Giono-Cerezo et al., 2020).

Entre las bacterias más relevantes a nivel mundial se encuentra a *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina [MRSA], una de las principales causas de infecciones tanto en la comunidad como en hospitales y considerada por la OMS como prioridad alta, pues causa mucha morbilidad en países de ingresos medianos y bajos (OMS, 2024). En Ecuador, el informe anual de susceptibilidad antibiótica del Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los antibióticos reporta a *Staphylococcus aureus* como el tercer patógeno más frecuente, con un 9.13% [2 242 casos] de infecciones hospitalarias y un 4.55% [603 casos] en pacientes ambulatorios el año 2022. Además, se identificaron niveles preocupantes de resistencia a antibióticos clave como oxacilina [29.23% en la comunidad y 37.15% en hospitales] y eritromicina [50.55% a nivel ambulatorio y 46.07% a nivel hospitalario] (Instituto Nacional De Investigación en Salud Pública (INSPI), 2023).

Frente a este escenario, la búsqueda de nuevas estrategias antimicrobianas se ha convertido en una prioridad y es cada vez más necesario explorar nuevas alternativas terapéuticas. En este sentido, los productos naturales han desempeñado un papel importante en el desarrollo de antibióticos innovadores. (Corzo Barragán, 2012). Una de las fuentes estrella de compuestos bioactivos de los últimos años es *Cannabis sativa* L., una planta de origen asiático, que ha ganado interés debido a sus propiedades medicinales y su reciente legalización en varios países. (Voza Berardo et al., 2024).

Diversos estudios han demostrado que los cannabinoides como el Δ^9 -tetrahidrocannabinol [THC] y cannabidiol [CBD], presentan actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas, con una concentración mínima inhibitoria [CMI] en el rango de 1-5 $\mu\text{g/mL}$ para estafilococos y

estreptococos (van Klíngeren & ten Ham, 1976). En particular, se ha identificado que el mecanismo de acción de los cannabinoides consiste en dañar la integridad de la membrana bacteriana. Así, bacterias gramnegativas se ven afectadas únicamente si la membrana ha sido permeabilizada antes, mientras que en bacterias Gram positivas como *S. aureus* puede actuar directamente y así inhibir la capacidad de formar biopelículas en MRSA, eliminar las ya preformadas y atacar las células persistentes resistentes a antibióticos convencionales. Además, el mismo estudio indicó que, incluso después de aplicaciones repetidas a concentraciones letales, no se detectó el desarrollo de resistencia en MRSA, lo que convierte a los cannabinoides en candidatos prometedores como antibióticos (Farha et al., 2020).

Existen variaciones considerables en la prevalencia de *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina [MRSA] entre instituciones y entre áreas geográficas (Stefani & Varaldo, 2003). En Ecuador, no se han realizado estudios sobre la susceptibilidad de las cepas a extractos de *Cannabis sativa* L.; por lo tanto, este trabajo busca evaluar *in vitro* el efecto antimicrobiano del extracto de esta planta en cepas MRSA aisladas en hospitales pertenecientes a la red RAM analizadas en INSPI CZ6. A través de este enfoque, se espera contribuir así al descubrimiento del potencial terapéutico de los cannabinoides frente a infecciones y contribuir a estrategias de control adaptadas a la realidad epidemiológica local.

Pregunta de Investigación

¿Cuál es la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto de *Cannabis sativa* L. que inhibe el crecimiento de cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina [MRSA] que fueron analizadas en INSPI CZ6, Ecuador?

Justificación

La resistencia a los antimicrobianos representa uno de los mayores desafíos para la salud pública a nivel mundial, el rápido aumento y distribución de bacterias resistentes ha llevado a la Organización Mundial de la Salud [OMS] a publicar una lista de patógenos prioritarios, dentro de los cuales se encuentra *Staphylococcus aureus*, un agente infeccioso de alta prioridad en hospitales y la comunidad (Farha et al., 2020). En particular, la aparición y propagación de la variante de *S. aureus* resistente a la metilina [MRSA] ha reducido significativamente las opciones terapéuticas debido a la inefectividad de antibióticos β -lactámicos y en algunos casos también antibióticos de última línea como vancomicina, linezolid y daptomicina, comprometiendo el tratamiento de infecciones graves (Lee et al., 2018).

A pesar de los esfuerzos internacionales, la OMS advierte que, sin medidas urgentes, el mundo se enfrenta a una era “post-antibióticos”, donde infecciones comunes y lesiones menores podrían volverse mortales (OMS, 2024). La disminución en el desarrollo de los antibióticos ha impulsado la búsqueda de estrategias alternativas, incluyendo compuestos de origen natural (Farha et al., 2020). Los productos naturales han sido particularmente importantes en el descubrimiento de antibióticos y continúan desempeñando un papel fundamental en la farmacología moderna. Actualmente, más del 50% de los fármacos en uso se derivan de compuestos naturales (Corzo Barragán, 2012).

Dentro de estas alternativas, *Cannabis sativa* L. ha despertado gran interés como una fuente prometedora de compuestos bioactivos con potencial antimicrobiano (Farha et al., 2020). Los cannabinoides, en particular cannabidiol [CBD] y cannabigerol [CBG], han demostrado una fuerte actividad antibacteriana contra *S. aureus*, incluyendo cepas MRSA. Se ha reportado que estos

compuestos inhiben la formación de biopelículas, eliminan aquellas ya establecidas y destruyen células persistentes a antibióticos convencionales (Farha et al., 2020).

Además del cannabidiol y el cannabigerol, el Δ 9-tetrahidrocannabinol [THC] también ha mostrado propiedades antimicrobianas relevantes. Estudios pioneros demostraron que el THC presenta actividad bactericida y bacteriostática frente a bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, con concentraciones mínimas inhibitorias eficaces en medios de cultivo estándar (van Klingeren & ten Ham, 1976). Aunque su efectividad disminuye en presencia de componentes como suero o sangre, lo cual limita su uso sistémico, su capacidad antimicrobiana sugiere aplicaciones potenciales en formulaciones tópicas o como base para el desarrollo de nuevos fármacos. La combinación del efecto antimicrobiano de distintos cannabinoides refuerza la relevancia de *Cannabis sativa* L. como fuente de compuestos naturales con potencial terapéutico frente a bacterias multirresistentes.

Desde un punto de vista terapéutico, los cannabinoides presentan una ventaja clave frente a antibióticos convencionales: un bajo riesgo de inducir resistencia bacteriana. Se ha demostrado que la frecuencia de resistencia innata al CBD en MRSA es extremadamente baja [$<3,78 \times 10^{-10}$], mientras que su capacidad de inducir resistencia es significativamente menor comparada con antibióticos como la daptomicina (Blaskovich et al., 2021). Además, cannabinoides como el CBD tienen el potencial de inhibir vesículas de membrana bacterianas [VMs], teniendo gran impacto en la comunicación interbacteriana y la resistencia a los antibióticos (Kosgodage et al., 2019).

Dado que muchas cepas de MRSA son resistentes a múltiples antibióticos, estas infecciones se están convirtiendo en patógenos graves tanto en el ámbito hospitalario como en el comunitario,

representando un aumento en la morbilidad y estancia hospitalaria en comparación a las causadas por *S. aureus* sensible a la Meticilina [MSSA] (Cheung et al., 2021; Taylor & Unakal., 2023).

En este contexto, el presente trabajo de experimental tiene como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana del extracto de *Cannabis sativa* L. sobre cepas de MRSA aislada en la CZ6 de Ecuador. Dado que existe poca investigación sobre el efecto de cannabis en aislamientos locales, este trabajo busca ampliar el conocimiento sobre su potencial terapéutico y su posible aplicación en el desarrollo de nuevos antibióticos. Los resultados obtenidos podrían sentar las bases para futuras investigaciones en el uso de cannabinoides en infecciones resistentes y fortalecer estrategias terapéuticas frente a la creciente crisis de resistencia a los antibióticos

Limitaciones

Restricciones institucionales y de bioseguridad

Dado que las cepas de MRSA a ser utilizadas en este trabajo experimental representan un riesgo biológico, todas las pruebas deben realizarse exclusivamente dentro de las instalaciones del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública [INSPI], lo que limita la posibilidad de trasladar muestras o realizar análisis en las instalaciones de la Universidad Politécnica Salesiana.

Factores ambientales y técnicos en el laboratorio

Variables no controladas, como posibles fluctuaciones en la temperatura de incubación, humedad, tiempo de exposición a reactivos o contaminación por agentes externos, podrían afectar la replicabilidad del estudio. Además, la pureza del extracto, la recuperación de las muestras y la disponibilidad de medios de cultivo e insumos podrían influir en los resultados experimentales.

Restricciones legales en la obtención del extracto de *Cannabis sativa* L.

Debido a la normativa vigente, la adquisición y manipulación del extracto de *Cannabis sativa* L. puede estar sujeta a permisos legales específicos, lo que podría retrasar o limitar ciertas fases del estudio.

Limitaciones en la duración del estudio

El tiempo disponible para la investigación, estimado en cuatro meses, puede restringir la cantidad de pruebas replicadas y la amplitud de los datos obtenidos sobre la actividad antimicrobiana del extracto. Por lo que la disponibilidad de reactivos, insumos y la recuperación de cepas deben ser cuidadosamente planificadas, considerando el diseño estadístico adecuado para optimizar los recursos.

Limitaciones metodológicas

La ausencia de un antibiótico de referencia como vancomicina o linezolid que hubieran servido como control positivo de referencia frente a MRSA. Esto impide comparar directamente la potencia inhibitoria del extracto con estándares clínicos. Incluir un control farmacológico habría proporcionado un marco de referencia más robusto para interpretar la actividad observada.

Limitaciones técnicas

La alta viscosidad y poca miscibilidad del extracto volvieron difícil su disolución en caldo Mueller-Hinton. Aunque al principio se observó aparente homogeneidad, pasadas las 24 horas, se observó precipitación de los extractos en los pocillos. Esto implicó no solo interferencias en las

lecturas, sino también una distribución no homogénea de los extractos en las repeticiones y soluciones seriadas.

Objetivos

Objetivo general

- Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto de *Cannabis sativa* L. en diferentes concentraciones frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) analizadas INSPI CZ6, Ecuador, mediante la aplicación de la técnica Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) determinando su potencial como antimicrobiano frente a infecciones.

Objetivos específicos

- Seleccionar cepas representativas de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), portadoras de genes de resistencia como *mecA*, a partir de la base de datos del INSPI CZ6 (Ecuador), aplicando criterios de inclusión y exclusión para su uso posterior en ensayos antimicrobianos.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto de *Cannabis sativa* L. frente a cepas seleccionadas de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), mediante ensayos de microdilución en caldo, evaluando su actividad antimicrobiana.

Hipótesis

El extracto de *Cannabis sativa* L. inhibe el crecimiento de cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) analizadas en INSPI CZ6, Ecuador; por lo tanto, es una posible alternativa para su control.

Capítulo 2: Fundamentos Teóricos

2.1 Antecedentes

Uno de los primeros estudios que abordan el uso de cannabinoides como antimicrobiano es el artículo realizado por van Klingerén & ten Ham (1976), titulado “*Antibacterial activity of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and cannabidiol*”. En él, se aplicaron dichos compuestos en bacterias de las familias *Staphylococcus* y *Streptococcus*, obteniéndose Concentraciones Mínimas Inhibitorias [CMI] entre 1-5 μ g/mL, y demostrando también actividad bactericida en el mismo rango. Sin embargo, en medios con 4% de suero o 5% de sangre, su potencial antimicrobiano se redujo drásticamente [CMI: 50 μ g/mL]. Los autores concluyeron que, aunque el Delta [9]-tetrahydrocannabinol [THC] y el cannabidiol [CBD] no son buenos antibióticos sistémicos debido a su rápida eliminación del torrente sanguíneo y su baja actividad en presencia de suero, podrían ser útiles en formulaciones para aplicaciones tópicas o en el desarrollo de nuevos antimicrobianos derivados de *Cannabis sativa* L.

Posteriormente, Appendino et al. (2008) en su estudio “*Antibacterial cannabinoids from Cannabis sativa L. : a structure-activity study*”, analizaron como modificar la estructura de los cinco cannabinoides más representativos, entre ellos CBD y THC, afectan su actividad antimicrobiana frente a cepas de relevancia clínica como *S. aureus* resistente a la meticilina [MRSA]. Aunque modificaciones en la naturaleza de la fracción prenil, cambios de posición relativa con la fracción n-pentil [cannabinoides anormales] y carboxilación de la fracción resorcinil [precannabinoides] no alteraron significativamente la actividad; otras modificaciones como la metilación y acetilación de los hidroxilos fenólicos, la esterificación del grupo carboxílico de los precannabinoides y la introducción de una segunda fracción prenil si resultaron perjudiciales para

el efecto antibacteriano. Estas observaciones resaltaron que la fracción prenil de los cannabinoides actúa como modulador principal en la afinidad lipídica por el núcleo olivetol, un farmacóforo antibacteriano que por sí solo es poco efectivo, mientras que, la alta potencia de los cannabinoides sugiere un mecanismo de actividad específico difícil de determinar.

En primer lugar, Martinenghi et al. (2020), Jønsson, Lund y Jenssen (2020), en el artículo “*Isolation, Purification, and Antimicrobial Characterization of Cannabidiolic Acid and Cannabidiol from Cannabis sativa L.*” emplearon extractos etanólicos para aislar Cannabidiol [CBD] y su forma ácida [CBDA] y los aplicaron en pruebas de sensibilidad frente a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. El CBD mostró un efecto inhibitorio sustancial frente a microorganismos grampositivos [CMI: entre 1 y 2 µg/mL], mientras que, el CBDA tuvo una actividad dos veces menor. En pruebas con MRSA no se encontró efecto sinérgico, pero tampoco antagonista. La baja actividad frente a microorganismos gramnegativos permitió inferir que el farmacóforo antimicrobiano del principio activo está en su capacidad de permeabilizar la membrana celular bacteriana, actuando de modo similar a un detergente.

En línea con estos hallazgos, Blaskovich et al. (2021) en “*The antimicrobial potential of cannabidiol*” explican que el CBD tiene excelente actividad contra biopelículas siendo un factor clave en infecciones crónicas, gran eficacia tópica in vivo y sobre todo poca propensión a inducir resistencia en cepas ya resistentes de *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Clostridioides difficile* incluso tras veinte días de exposición en contraste contra antibióticos como la daptomicina. Este estudio señala nuevamente como mecanismo primario bactericida la disrupción de la membrana y concluye que el CBD es un candidato prometedor para el desarrollo de antibióticos de bacterias grampositivas resistentes.

Por su parte, Farha et al. (2020), confirman la actividad antimicrobiana de los cannabinoides frente a MRSA, inhibiendo su capacidad para formar biopelículas, erradicar las preformadas y las células en fase estacionaria. Se demostró que cannabinoides como el Cannabigerol [CBG], tienen un mecanismo de acción dirigido a la membrana citoplasmática de bacterias grampositivas y que este es eficaz contra infecciones sistémicas de MRSA en modelos *in vivo* murinos. Además, es posible aplicarlos contra organismos gramnegativos cuya membrana está permeabilizada, generando gran sinergia en combinación con antibióticos como la polimixina B, revelando el potencial terapéutico de amplio espectro de los cannabinoides. Sin embargo, señalaron que todavía se requieren estudios adicionales para evaluar su viabilidad como tratamiento clínico.

Complementariamente, el artículo de Kosgodage et al. (2019) investigó los efectos del CBD en la modulación de vesículas de membrana bacteriana [MVS], centrándose en su posible papel en la resistencia a los antimicrobianos. Se encontró que el CBD es un fuerte inhibidor de la liberación de MVS en bacterias gramnegativas, pero no en bacterias Gram positivas. Además, el CBD potenció la acción de antibióticos como la kanamicina en *S. aureus*. Este estudio también determinó que el bloqueo de MVS por parte del CBD impacta en la comunicación interbacteriana y la resistencia a los antibióticos, así, este cannabinoide podría ser usado como modulador de la resistencia bacteriana, actuando en combinación con antibióticos específicos para mejorar su eficacia y reducir la resistencia a los antimicrobianos.

Finalmente, en su revisión sistemática “*Cannabinoides como agentes antibacterianos: una revisión sistemática y crítica de la eficacia in vitro contra estreptococos y estafilococos*”, tras el análisis de 24 artículos, concluyeron que el CBD resultó ser el cannabinoide más eficaz, con concentraciones mínimas inhibitorias [CMI] de entre 0,65 y 32 mg/L contra *S. aureus*, de entre 0,5

y 4 mg/L para MRSA y de entre 1 y 2 mg/L para *S. aureus* resistente a la vancomicina [VRSA]. Otros cannabinoides como el delta-9-tetrahidrocannabinol [Δ^9 -THC] también mostraron una actividad antiestafilocócica significativa. Se reportó también que existe sinergia al combinar CBD con el aceite esencial de *Cannabis sativa* L. y otros agentes antibacterianos como betalactámicos y la ciprofloxacina. Se menciona también la actividad del delta-8-tetrahidrocannabinol [Δ^8 -THC] para erradicar biopelículas, teniendo una concentración mínima de 2 mg/L. Se concluye que la potencia antimicrobiana de los cannabinoides está influenciada de gran manera por su estructura y características como la región monoterpénica, la cadena lateral alquílica aromática y los grupos carboxílicos aromáticos especialmente en CBD y sus formas cíclicas.

2.2 Marco Conceptual

Cannabinoides: Compuestos químicos derivados de *Cannabis sativa* L. con diversas propiedades biológicas. Entre los más estudiados se encuentra el cannabidiol [CBD], el cannabigerol [CBG] y el Δ^9 -Tetrahydrocannabinol [THC], los cuales han demostrado actividad antimicrobiana contra bacterias grampositivas (Farha et al., 2020).

Actividad antimicrobiana: Capacidad de un compuesto para inhibir el crecimiento o eliminar microorganismos patógenos.

MRSA [Meticilin-Resistant *Staphylococcus aureus*]: Variante de *S. aureus* con resistencia a los antibióticos β -lactámicos, incluyendo la meticilina, este microorganismo es denominado un patógeno de alta prioridad según la OMS [2024].

Concentración Mínima Inhibitoria [CMI]: Mínima concentración de un agente antimicrobiano-necesaria para inhibir el crecimiento visible de una bacteria en un medio de cultivo.

Resistencia a los antimicrobianos: La capacidad de los microorganismos para sobrevivir a la acción de un antibiótico, reduciendo su efectividad en el tratamiento de infecciones. Es considerada una amenaza global para la Salud Pública, OMS (2020).

Extracto de *Cannabis sativa* L.: Mezcla de compuestos bioactivos obtenidos de la planta *Cannabis sativa* L. empleando como solventes etanol y hexano; estos incluyen cannabinoides con potencial antimicrobiano.

Cepa ATCC: Una cepa ATCC es una cepa microbiana de referencia depositada y certificada por la American Type Culture Collection [ATCC], una de las colecciones biológicas más reconocidas a nivel mundial. Estas cepas están caracterizadas genética y fenotípicamente, y se utilizan como estándares en investigaciones científicas.

2.3 Bases teóricas

2.3.1 Resistencia a los antimicrobianos

Un antimicrobiano es un medicamento usado para prevenir y tratar infecciones, ya sea de origen viral, bacteriano, fúngico o parasitario. A partir de este concepto, la resistencia a los antimicrobianos se define como una característica inherente o adquirida por los patógenos en respuesta a la exposición a antibióticos, lo que les confiere la capacidad de resistir los efectos nocivos de estos medicamentos (Giono-Cerezo et al., 2020; Organización Mundial de la Salud (OMS), 2020).

Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos. Las bacterias pueden desarrollar resistencia mediante mecanismos tanto genéticos [mutaciones cromosómicas, genes de resistencia e integrones] o no genéticos, cuando se dan cambios fenotípicos transitorios [modificación de la expresión génica] o se envían señales químicas que modulan la resistencia de manera reversible (Munita & Arias, 2016).

Entre los principales mecanismos tenemos:

- Inactivación enzimática de antibióticos;
- Alteración del sitio blanco;
- Disminución de la permeabilidad;
- Expulsión activa [Bombas de eflujo];
- Evasión del efecto antibiótico.

Resistencia a los antimicrobianos en Ecuador. En Ecuador, la resistencia a los antimicrobianos es un problema creciente, con impacto tanto en hospitales como en la comunidad. De acuerdo con el informe del Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos [CRN-RAM], en 2022 se analizaron 55.901 aislamientos bacterianos provenientes de 37 hospitales del país. De los cuales, el 72.44% fueron microorganismos Gram negativos y el 21.12% Gram positivos (Instituto Nacional De Investigación en Salud Pública (INSPI), 2023).

2.3.2 *Staphylococcus aureus*

S. aureus es una bacteria grampositiva con forma de coco, su diámetro oscila entre 0.8 y 1.5 micrómetros [μm], tiende a formar grupos denominados “racimos” similares a uvas y algunas cepas son capaces de producir una cápsula mucoide que aumenta su infectividad [Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo [INSST], 2021]. Pueden crecer en cultivos tanto aerobios como anaerobios, con hasta un 10% de sal y a una temperatura de entre 18-40°C (Taylor & Unakal., 2023). Sus colonias son a menudo doradas o amarillas y en agar sangre se puede observar β hemólisis, las pruebas de identificación bioquímicas incluyen catalasa, oxidasa y fermentación de manitol positiva (Pasachova et al., 2019; Taylor & Unakal., 2023).

En 1940, el uso de la penicilina G era el tratamiento de elección para combatir su infección, sin embargo, desde entonces las cepas han adquirido no solo resistencia a este medicamento, sino también a otros β -lactámicos, macrólidos y lincosamidas. Incluso se han reportado cepas resistentes al trimetoprim y las sulfonamidas (Pasachova et al., 2019). *S. aureus* puede mostrar, a menudo de forma combinada, resistencia a casi todos los antibióticos disponibles (Cheung et al., 2021).

Tabla 1.

Clasificación taxonómica de Staphylococcus aureus.

Reino	<i>Bacteria</i>
División	<i>Bacillota</i>
Clase	<i>Bacilli</i>
Orden	<i>Bacillales</i>
Familia	<i>Staphylococcaceae</i>
Género	<i>Staphulococcus</i>
Especie	<i>S. aureus</i>

Nota: Adaptado de (Winn et al., 2008)

Epidemiología. Las mucosas y la piel de los seres humanos son los principales reservorios de *Staphylococcus aureus*, incluidas cepas resistentes como MRSA (Taylor & Unakal., 2023). Sin embargo, también se pueden encontrar en otros mamíferos, aves, alimentos y agua [INSST, 2021]. La ingesta de la bacteria o sus toxinas es la principal causa de transmisión. Por otro lado, el contacto con objetos, personas o animales [zoonosis] contaminados produce la inoculación accidental de heridas y mucosas, ya sea por pinchazos, cortes o mordeduras (INSST, 2021).

Mecanismos de patogenicidad. *Staphylococcus aureus* es un patógeno oportunista cuya virulencia se sustenta en diversos factores que le permiten invadir tejidos y sortear los mecanismos

de defensa del huésped para establecer infecciones persistentes y complejas (Lakhundi & Zhang, 2018). Entre estos mecanismos destacan:

Adherencia y Formación de Biopelículas. El primer paso en la infección estafilocócica es la adherencia a superficies biológicas o materiales médicos, mediada por adhesinas específicas. Estas proteínas facilitan la fijación a la matriz extracelular y permiten el establecimiento inicial en el huésped. A partir de esta adhesión, *S. aureus* puede formar biopelículas: comunidades microbianas protegidas por una matriz extracelular que no solo dificultan la penetración de antibióticos, sino que también protegen a la bacteria frente a la acción de fagocitos y otras defensas inmunes dando como resultado infecciones persistentes y de difícil eliminación. (Cheung et al., 2021; Lakhundi & Zhang, 2018).

Producción de Toxinas y Exoenzimas. *S. aureus* produce un amplio repertorio de exotoxinas y exoenzimas que facilitan la diseminación y el daño tisular. Entre ellas destaca la α -toxina, con efecto citolítico sobre células inmunitarias, así como las toxinas exfoliativas y las leucocidinas, como la de Pantón-Valentine, que destruyen barreras epiteliales y neutralizan células fagocíticas (Lakhundi & Zhang, 2018).

Además, algunas cepas inducen la activación inespecífica de linfocitos T mediante superantígenos, provocando una respuesta inmunitaria desregulada caracterizada por la activación policlonal de células T y la liberación masiva de citocinas, lo que puede agravar el daño tisular y favorecer la diseminación (Cheung et al., 2021).

Evasión del Sistema Inmunológico. Entre estas se incluyen:

- *Cápsula antifagocítica*, que impide el reconocimiento y la ingestión por fagocitos.

- *Aureolisina*, una metaloproteasa que inactiva proteínas clave del sistema del complemento como C3 y C5, lo que reduce la opsonización y la quimiotaxis leucocitaria.
- *Proteína A*, que se une a la región Fc de anticuerpos IgG, bloqueando su capacidad opsonizante.
- *Inhibición de la quimiotaxis*, impidiendo el reclutamiento de leucocitos al sitio de infección.

Estas estrategias permiten a la bacteria evitar su eliminación, mantenerse en tejidos profundos y generar cuadros clínicos de difícil resolución (Cheung et al., 2021; Pasachova et al., 2019; Taylor & Unakal., 2023).

Invasión tisular y diseminación sistémica. Al superar las barreras inmunológicas, *S. aureus* puede acceder al torrente sanguíneo y diseminarse a diferentes órganos. En modelos murinos, se ha observado que el transporte a otros tejidos ocurre dentro de las primeras 1–3 horas postinfección, mientras que las lesiones microscópicas aparecen alrededor de las 48 horas (Cheung et al., 2021).

Formación de Abscesos. Las infecciones profundas causadas por estafilococos se caracterizan por la formación de abscesos, dentro de estas estructuras se produce una infiltración de leucocitos y una proliferación activa de bacterias. Para sobrevivir a pesar de la sobrepoblación y recursos limitados, *S. aureus* secreta citolisinas que destruyen células huésped, así como enzimas hidrolíticas que degradan macromoléculas, de este modo es capaz de aprovechar los nutrientes liberados para mantener su crecimiento en un entorno cerrado y protegido (Cheung et al., 2021).

ATCC 25923. Es un aislado clínico con la designación Seattle 1945 cuyo genoma completo se ha secuenciado. Este cultivo se utiliza como cepa de control de calidad para análisis microbiológicos debido a que es sensible a diversos antibióticos, incluido la meticilina (Treangen et al., 2014).

2.3.3 *Staphylococcus aureus* Resistente a la Meticilina [MRSA]

Staphylococcus aureus resistente a la meticilina [oxacilina] [MRSA] es una cepa que presenta resistencia a la mayoría de los antibióticos betalactámicos, entre ellos carbapenémicos y cefalosporinas, así como otros antibióticos de uso común, como la clindamicina, eritromicina, tetraciclina y fluoroquinolonas (Centers for disease control and prevention [CDC], 2025).

Métodos de prueba. Para conocer los métodos de prueba e inoculación y sus criterios de interpretación, es importante consultar la versión más reciente del CLSI M100, entre ellos se encuentra:

- Microdilución en caldo de oxacilina y cefoxitina y pruebas en agar.
- Método de difusión en disco con cefoxitina.
- Placa de agar Mueller-Hinton que contenga 6 µg/mL suplementado con NaCl 4% p/v.

La detección precisa de este perfil de resistencia puede ser complicado debido a la presencia de subpoblaciones, una resistente y otra susceptible, que pueden coexistir en un mismo cultivo de estafilococos. Por ello, Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI), (2025) en su

manual M100 recomienda la incubación a 35 °C con la precaución de que a temperaturas superiores, las pruebas podrían no detectar todos los estafilococos resistentes a la meticilina.

Genética. Este perfil de resistencia se presenta debido a la adquisición del gen *mecA*, localizado en el elemento cromosómico móvil SCCmec. Este gen codifica la proteína PBP2a, una variante de la proteína de unión a penicilina con baja afinidad por los betalactámicos, lo que permite al microorganismo continuar con la síntesis de peptidoglicano aún en presencia de estos antibióticos (Lakhundi & Zhang, 2018; Lee et al., 2018).

Además de *mecA*, algunas variantes de MRSA, como USA300, incluyen genes plasmídicos [como *tetK*, *ermC* e *ileS*] que confieren resistencia a otras familias antimicrobianas, incluyendo tetraciclinas, macrólidos, lincosamidas, estreptograminas B y mupirocina (Pasachova et al., 2019). Estas cepas también integran islas genómicas de patogenicidad, como:

ACME. Asociada con la colonización cutánea.

vSaa/vSaβ. Codifican toxinas inmunomoduladoras como leucocidinas y superantígenos.

Adicionalmente, MRSA presenta sistemas de bombas de eflujo, como los regulados por *norA* y *mepA*, que expulsan antibióticos y sustancias tóxicas fuera de la célula, disminuyendo su eficacia intracelular (Aborah et al., 2025).

La resistencia de MRSA se extiende a prácticamente todos los β-lactámicos, excepto ceftarolina y ceftobiprol, que aún pueden unirse a PBP2a. La movilidad del SCCmec, facilitada por recombinasas Ccr, permite la rápida disseminación horizontal del gen *mecA*, contribuyendo a la expansión de cepas multirresistentes (Taylor & Unakal., 2023; Touaitia et al., 2025).

2.3.4 *Cannabis sativa* L.

Fue domesticada en de Asia Central, específicamente de las estribaciones del Himalaya, hace unos 12 000 años. Al ser una planta adaptable y de rápido crecimiento, se puede cultivar en diversos climas, desde tropicales hasta templados, actualmente se encuentra distribuida en todo el mundo, excepto en la Antártida (Chaachouaya et al., 2023; Rodríguez-Yzquierdo et al., 2021; Trono, 2024).

El uso medicinal del *Cannabis sativa* L. se remonta al año 2700 a.n.e., principalmente para tratar dolor, paludismo y otras afecciones. En América Latina, su introducción ocurrió en el siglo XVI, llevada por esclavos africanos a Brasil, donde fue utilizada para dolor dental y dismenorrea. Durante la primera mitad del siglo XX, su uso fue eliminado por sus efectos psicoactivos y potencial de abuso; sin embargo, en la década de 1970 resurgió el interés científico y clínico en la planta (Rodríguez-Venega & Fontaine-Ortiz, 2020).

Cannabis sativa L. es una planta herbácea anual dioica que alcanza de 1 a 2 metros de altura. Presenta un olor intenso, hojas opuestas, pecioladas y palmeadas [5-7 segmentos], tallos erectos, rígidos y ramificados, semillas redondas o lenticulares y flores verdes unisexuales llamadas cogollos producidas únicamente por las plantas femeninas. (Chaachouaya et al., 2023; McPartland, 2017)

Fue clasificada botánicamente por primera vez en 1753 por Carl Linnaeus (Rodríguez-Venega & Fontaine-Ortiz, 2020).

Tabla 2.*Clasificación taxonómica de Cannabis sativa L.*

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Urticales</i>
Familia	<i>Cannabaceae</i>
Género	<i>Cannabis</i>
Especie	<i>C. sativa</i>

Nota: Adaptado de (McPartland, 2017)

Propiedades bioactivas. La planta destaca por su diversidad química: se han identificado entre 500 y 565 compuestos, incluyendo al menos 125 fitocannabinoides y más de 100 terpenos (Chaachouaya et al., 2023; Rodríguez-Venega & Fontaine-Ortiz, 2020). También contiene flavonoides, alcaloides, estilbenos, lignanamidas, ácidos grasos, polifenoles, aceites y ceras (Pattnaik et al., 2022).

2.3.5 Cannabinoides

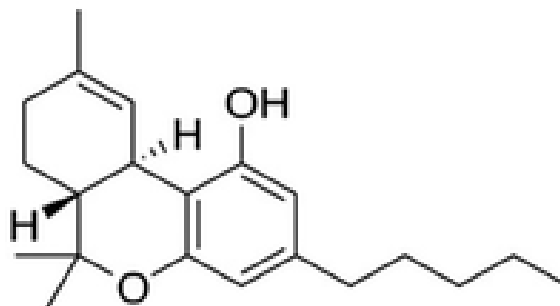
Los compuestos bioactivos más relevantes son el Δ^9 -tetrahidrocannabinol [THC] y el cannabidiol [CBD], aunque también se han identificado otros como el cannabino [CBN] y sus formas ácidas precursoras. Estas sustancias han demostrado actividades farmacológicas de interés,

incluyendo propiedades antinociceptivas, antiinflamatorias, antimicrobianas, antioxidantes, inmunosupresoras, neuroprotectoras, anticancerígenas y efectos positivos sobre trastornos psiquiátricos como ansiedad, depresión e insomnio (Hourfane et al., 2023; Pattnaik et al., 2022; Rodríguez-Venega & Fontaine-Ortiz, 2020).

Δ^9 -tetrahydrocannabinol [Δ^9 -THC]. Es el principal compuesto psicoactivo de *Cannabis sativa* L., un diterpenoide con estructura tricíclica de 21 carbonos y dos centros quirales en configuración trans (Sharma et al., 2012), presenta un anillo fenólico y una cadena alquilo que le confiere afinidad por los receptores cannabinoides (Appendino et al., 2008). Es un aceite viscoso volátil con alta solubilidad lipídica y baja solubilidad acuosa, con un pKa de 10.6, y la exposición al aire, calor o luz lo descomponen (Sharma et al., 2012).

Figura 1

Estructura química del Δ^9 -tetrahydrocannabinol [Δ^9 -THC].



**delta-9-Tetrahydrocannabinol
(delta-9-THC)**

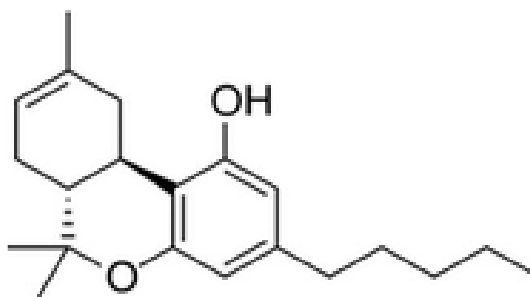
Nota. Adaptado de Suk-SaiYasna Remedy, a Traditional Thai Medicine, Mitigates Stress-Induced Cognitive Impairment via Keap1-Nrf2 Pathway, por Wuttipong et al., 2025, ResearchGate [https://www.researchgate.net/figure/Structures-of-cannabidiol-CBD-delta-8-tetrahydrocannabinol-delta-8-THC_fig1_392422250]

Actividad antimicrobiana. Se ha demostrado que THC, a comparación de su forma ácida precursora, exhibe potentes efectos antimicrobianos frente a cepas de MRSA, con concentraciones mínimas inhibitorias [CMI] de 0.5 – 2 µg/mL, se ha sugerido que los grupos hidroxilos libres son críticos para su interacción con blancos bacterianos (Appendino et al., 2008).

Δ8-tetrahidrocannabinol [Δ8-THC]. Es un cannabinoide minoritario que tiene una potencia psicoactiva menor a su contraparte y cuya única diferencia con Delta-9-THC es que el doble enlace se encuentra en la octava posición. (Tagen & Klumpers, 2022).

Figura 2

Estructura química del Δ⁸-tetrahidrocannabinol [Δ⁸-THC].



**delta-8-tetrahydrocannabinol
(delta-8-THC)**

Nota. Adaptado de Suk-SaiYasna Remedy, a Traditional Thai Medicine, Mitigates Stress-Induced Cognitive Impairment via Keap1-Nrf2 Pathway, por Wuttipong et al., 2025, ResearchGate [https://www.researchgate.net/figure/Structures-of-cannabidiol-CBD-delta-8-tetrahydrocannabinol-delta-8-THC_fig1_392422250]

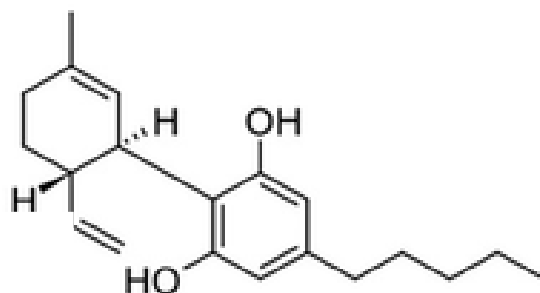
Actividad antimicrobiana. En ensayos de microdilución muestra valores de CMI en el rango entre 4-8 mg/L y en estudios de erradicación de biopelícula estática alcanzó una

Concentración Mínima de Erradicación de Biopelículas [CMEB] de 2 mg/L lo que sugiere capacidad para interferir con biofilms establecidos (Niyangoda et al., 2024).

Cannabidiol [CBD]. Es un cannabinoide no psicotrópico presente en quimioterapias. Tiene una estructura compleja que presenta hidroxilos fenólicos, una región monoterpénica, una cadena lateral alquílica aromática y un grupo carboxílico en su forma ácida (Martinenghi et al., 2020). Se mantiene estable en medios orgánicos, aunque puede perder eficacia en formulaciones acuosas debido a la interacción con surfactantes (Pillai, Kera, Kleyi, Beer, Magwaza, & Ray, 2024).

Figura 3

Estructura química del Cannabidiol [CBD].



cannabidiol
(CBD)

Nota. Adaptado de Suk-SaiYasna Remedy, a Traditional Thai Medicine, Mitigates Stress-Induced Cognitive Impairment via Keap1-Nrf2 Pathway, por Wuttipong et al., 2025, ResearchGate [https://www.researchgate.net/figure/Structures-of-cannabidiol-CBD-delta-8-tetrahydrocannabinol-delta-8-THC_fig1_392422250]

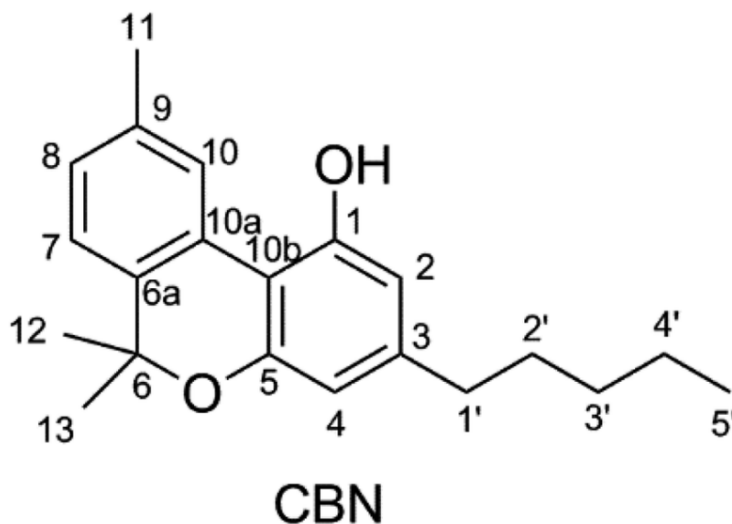
Actividad antimicrobiana. Su mecanismo de acción antimicrobiana se basa en la disrupción de membranas de bacterias grampositivas, ejerciendo una acción similar a la de los detergentes (Martinenghi et al., 2020). Ha demostrado una CMI de 0.5-1 µg/mL frente a diversas

cepas de MRSA, las alteraciones estructurales en sus grupos fenólicos conducen a una pérdida significativa de actividad, por lo que se presume la importancia de estos sitios en su mecanismo antimicrobiano (Appendino et al., 2008). También ha demostrado sinergia parcial con antibióticos como la bacitracina y CmeB de 4 mg/L.

Cannabinol [CBN]. Deriva de la oxidación y desaromatización semisintética del THC al calentarse manteniendo características aromáticas en su estructura química (Appendino et al., 2008). Los datos sobre su estabilidad y mecanismos específicos de acción son limitados en la literatura científica actual.

Figura 4

Estructura química del Cannabinol [CBN].



Nota. Adaptado de *The influence of terpenes on the release of volatile organic compounds and active ingredients to cannabis vaping aerosols*, por Meehan-Atrash et al., 2021, ResearchGate [https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structures-of-D-tetrahydrocannabinol-THC-cannabinol-CBN-and-b-myrcene_fig1_350333264]

Actividad antimicrobiana. Se ha demostrado su actividad contra cepas MRSA, donde mostró una CMI de 1-2 µg/mL y tolerancia a mecanismos de resistencia de EMRSA-15 como NorA y TetK (Appendino et al., 2008).

2.3.6 Aspectos éticos y regulaciones

De acuerdo con Pattnaik et al., (2022), el creciente interés por los usos medicinales de los cannabinoides ha impulsado una rápida evolución en las políticas de legalización a nivel global. Sin embargo, aún existe una limitada cantidad de artículos de revisión que aborden de forma integral temas clave como la química del cannabis, los métodos de extracción de cannabinoides, sus aplicaciones terapéuticas, así como los dilemas éticos y legales relacionados con su uso. La información disponible suele estar dispersa, lo que dificulta tener una visión clara del panorama general. Frente a este vacío en la literatura, surge la necesidad de desarrollar una revisión que reúna y analice de manera estructurada aspectos como la biosíntesis y extracción de cannabinoides, los impactos socioeconómicos, la distribución geográfica del cannabis, sus aplicaciones medicinales y el estado actual de su legalización.

2.3.7 Actividad Antimicrobiana de Extractos y Fracciones

La evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos vegetales y sus fracciones se basa en la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria [CMI o MIC], este valor expresa la menor concentración [mg/mL o µg/mL] capaz de inhibir el crecimiento microbiano *in vitro* (Zouine et al., 2024).

No existen puntos de corte oficiales como los de CLSI o EUCAST para extractos vegetales (Vaou et al., 2021), sin embargo, varios autores han definido rangos de concentración para clasificar la actividad antimicrobiana de los extractos y fracciones de plantas (Lagnika et al., 2016):

- La actividad es alta si la CIM es $\leq 0,1$ mg/mL;

- Moderada si $0,1 < CIM \leq 0,625$ mg/mL;
- Y débil si la $CIM > 0,625$ mg/mL.

2.3.8 Métodos de Evaluación Antimicrobiana

Son muy variadas las metodologías empleadas para determinar la actividad antimicrobiana de extractos de plantas, y aportan información de gran valor para la búsqueda preliminar de compuestos con propiedades antimicrobianas (Rivas-Morales et al., 2019). De acuerdo con Luz Ramirez y Darwin Marin (2009), los métodos para evaluar la actividad antibacteriana por lo general se encuentran clasificados en tres grupos principales: de difusión, de dilución y bioautografía, un cuarto método es el análisis conductimétrica que detecta el crecimiento en los cambios de conductividad eléctrica del medio de cultivo.

Método de Microdilución en Caldo. Este método se basa en la presencia o ausencia de crecimiento de un microorganismo en un cultivo en caldo donde se agrega una concentración de antimicrobiano. Para esto se comprueba visualmente si los pocillos presentan turbidez. El método se puede realizar como macrodilución, en tubos de ensayo, o en microdilución, si se usan placas multipocillo (Esteve & Soler, 2021). La Concentración Mínima Inhibitoria se define como la concentración más baja en la que el crecimiento de una cepa bacteriana específica se ve inhibido debido a un antibiótico o sustancia (IDEXX, 2023).

Estudios previos han reportado que los extractos de flores de *Cannabis sativa* L. ricos en Cannabidiol [CBD], exhiben actividad antimicrobiana contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina [MRSA], con valores de Concentración Inhibitoria Mínima [CMI] que oscilan entre 1 y 64 $\mu\text{g/mL}$. La Concentración Bactericida Mínima [CBM], que es la concentración

más baja capaz de erradicar completamente la población bacteriana, se ha reportado en un rango de 4.9 a 78.1 $\mu\text{g/mL}$ (Muscarà et al., 2021).

Miscibilidad. Se refiere a la propiedad de dos o más sustancias de mezclarse en cualquier proporción para formar una solución homogénea (Holm, 1986). Es una propiedad aprovechable de los solventes que juega un rol crítico para asegurar la solubilidad y distribución homogénea de compuestos lipofílicos como los cannabinoides. DMSO es miscible con agua y otros solventes tanto acuosos como orgánicos (Kuroda et al., 2020), mientras que los Tween son emulsificantes no iónicos usados para mejorar la solubilidad en formulaciones biológicas (Di & Kerns, 2006). La falta de miscibilidad puede producir actividad subestimada o resultados inconsistentes, lo cual es crítico en pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (Di & Kerns, 2006).

2.3.9 Lectura en microplaca tipo ELISA

La lectura de microplacas se basa en la medición de la absorbancia y su funcionamiento es similar al de un ensayo ELISA, aunque para ensayos microbiológicos su objetivo es cuantificar el crecimiento bacteriano en función de la turbidez. (Abkar et al., 2022).

En estudios comparativos de crecimiento bacteriano se ha demostrado que el uso de microplacas y lectores tipo ELISA ofrecen alta reproductibilidad y precisión para cuantificar la concentración de células bacterianas (Ameta et al., 2023).

Densidad óptica. La densidad óptica [DO] cuantifica la turbidez de una suspensión bacteriana midiendo la atenuación de luz a través de la muestra (Meyers et al., 2018). Los lectores de microplaca pueden usarse para determinar la CMI al medir dichas señales luminosas, normalmente a 600 nanómetros [nm]; sin embargo, la relación entre células/mL y DO es compleja

y depende de varios factores como la longitud del recorrido de la luz, el tamaño de las células y el número de partículas (Mira et al., 2022).

Capítulo 3: Materiales y Métodos

3.1 Nivel de Investigación

El presente trabajo experimental pertenece al nivel de investigación explicativa, ya que busca evaluar la actividad antimicrobiana del extracto de *Cannabis sativa* L. contra las cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a la Meticilina [MRSA]. Para ello, se determinará el efecto inhibitorio del extracto mediante la aplicación de la técnica de concentración mínima inhibitoria [CMI] en ensayos de susceptibilidad antimicrobiana. Como señala Arias [2012], este enfoque busca identificar las razones detrás de los fenómenos, estableciendo conexiones entre causas y efectos, lo que aporta profundidad al conocimiento científico del tema.

Por otro lado, este estudio incorpora también un componente descriptivo, al observar y caracterizar el comportamiento de las cepas frente a diferentes concentraciones del extracto, utilizando herramientas estadísticas para analizar los resultados obtenidos. De acuerdo con Supo [2023], este tipo de investigación permite describir hechos de manera ordenada y rigurosa, con la finalidad de generar datos que puedan ser extrapolados a una población específica. Esta combinación metodológica permite no solo explicar los efectos del extracto, sino también generar información cuantificable sobre su comportamiento antimicrobiano.

3.2 Diseño de Investigación

El diseño de investigación adoptado en este trabajo de titulación es experimental, ya que se manipulan de manera intencionada variables bajo condiciones controladas para evaluar la actividad antimicrobiana de diferentes concentraciones del extracto de *Cannabis sativa* L. contra varias cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina [MRSA]. Siguiendo lo

establecido por Arias, (2012), se introducen tratamientos específicos y se registra meticulosamente la respuesta de las muestras, lo que coincide con el enfoque experimental propuesto para esta investigación.

Se realizaron actividades en ambas instituciones participantes:

En primer lugar, en los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana, se preparó el material estéril, los medios de cultivo y la medición final de absorbancias en el lector de microplacas.

Por otro lado, en las instalaciones del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública CZ6, bajo la supervisión del técnico responsable se llevó a cabo una revisión de bases de datos WHONET del laboratorio de resistencia a los antimicrobianos [RAM] para verificar la existencia y selección de las cepas de interés para el estudio, de acuerdo con los criterios de selección siendo principalmente resistencia fenotípica a oxacilina [$\text{CMI} \geq 4 \mu\text{g/mL}$] y detección del gen *mecA*.

Debido al riesgo biológico que representan las cepas de estudio, actividades como la búsqueda, reactivación, verificación de pureza, inoculación e incubación de cepas con los diferentes tratamientos se realizaron dentro de las instalaciones de INSPI. De igual manera, para preservar las características de los extractos, la preparación de las disoluciones y el ensamblado de las placas se llevó a cabo dentro de esta institución.

Finalmente, los datos obtenidos fueron analizados empleando el software RStudio donde se aplicaron las técnicas estadísticas correspondientes tales como Shapiro-Wilk y Wilcoxon y se elaboraron gráficas estadísticas para facilitar la comprensión de los resultados.

3.3 Diseño de Experimento

Se aplicó un diseño completamente al azar (DCA), donde se consideró como unidad experimental cada pocillo individual de una microplaca de 96 pocillos con tres repeticiones técnicas. Se evaluaron tres factores independientes:

Tipo de extracto: Etanólico [E] y hexánico [H].

Concentración del extracto: Diez niveles [C1 a C10], de $6.125 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ hasta $0.01 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$

Cepa bacteriana: 14 cepas MRSA y la cepa de referencia ATCC 25923

3.3.1. Cepas *Staphylococcus aureus* resistente a la Meticilina [MRSA] y ATCC 25923

Se trabajó con 14 cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA, identificadas con los parámetros establecidos en los lineamientos técnicos de vigilancia del centro de referencia nacional de resistencia a los antimicrobianos (CRN-RAM, 2025) y seleccionadas a partir de la base de datos WHONET de la Red de Resistencia a los antimicrobianos [RAM], junto con una cepa ATCC 25923. La selección de cepas MRSA se basó en los siguientes criterios:

Criterios de inclusión:

- Aislamientos de *S. aureus* con resistencia a betalactámicos, específicamente Oxacilina.
- Cepas cuyo perfil MRSA fue confirmado mediante pruebas fenotípicas por difusión en disco.

- Presencia confirmada del gen *mecA* mediante biología molecular.
- Muestras provenientes de sangre.
- Cepas viables para reactivación y cultivo.

Criterios de exclusión:

- Cepas con información incompleta sobre su perfil de resistencia.
- Duplicados del mismo paciente o muestra.

3.3.2. Extractos de *Cannabis sativa* L.

Se emplearon dos extractos de *Cannabis sativa* L., previamente obtenidos mediante extracción con etanol [E] y hexano [H], cuyos perfiles de cannabinoides totales fueron determinados mediante cromatografía. Estos extractos fueron evaluados en un diseño basado en diluciones seriadas dobles, organizados en una microplaca de 96 pocillos.

3.3.3. Diseño de microplaca

La asignación de los tratamientos en la microplaca fue estructurada por filas y columnas para facilitar la organización de los experimentos. Las diluciones seriadas fueron distribuidas en orden descendente de C1 a C10 de izquierda a derecha, siendo C1 la concentración más alta y C10 la más baja. Las filas A-C se utilizaron para las pruebas con el extracto etanólico, y las filas F-H para el extracto hexánico. Las columnas 11 y 12 se reservaron para los controles.

Se incluyeron los siguientes controles experimentales:

Control de crecimiento [CC]: medio con inóculo, sin extracto [columna 11].

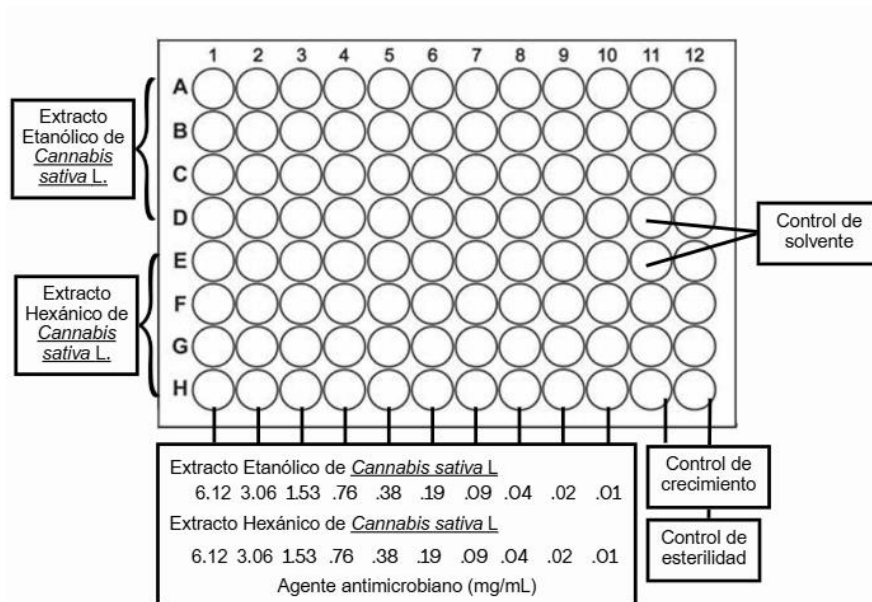
Control de esterilidad [CN]: medio sin inóculo ni extracto [columna 12].

Controles de extracto [CE]: ubicados en las filas D y E, para corregir interferencias en la lectura de densidad óptica debido a la turbidez y precipitación del extracto.

Controles de solvente [CS]: pocillos D11 y E11, con DMSO y Tween 20 en las concentraciones equivalentes a las más altas usadas en los tratamientos, sin extracto, con el fin de verificar que no generaban efecto antimicrobiano por sí mismos.

Figura 5

Diseño de microplaca de 96 pocillos.



Nota. Distribución de tratamientos, controles y diluciones en la microplaca usada para la determinación de la concentración mínima inhibitoria [CMI] de extractos de *Cannabis sativa* L. Las filas A-C y F-H se emplearon para preparar las diluciones seriadas de los extractos etanólico [E] y hexánico [H] respectivamente. Las concentraciones fueron dispuestas de manera descendente en las columnas. La columna 11 corresponde al control de crecimiento [CC] y la columna 12 al control de esterilidad [CN].

A continuación, en la Tabla 3 se presentan las combinaciones de tratamientos. La concentración de los extractos aplicados va desde 6.125 hasta 0.01 mg/mL

Tabla 3.

Tratamientos para la evaluación de la actividad antimicrobiana

Corrida	F1	F2	F3
1	6.125	E	MRSA-1
2	3.06	E	MRSA-1
3	1.53	E	MRSA-1
...
10	0.01	E	MRSA-1
11	6.125	H	MRSA-1
...
21	6.125	E	MRSA-2
22	3.06	E	MRSA-2
...
[m+1] x 30	6.125	H	ATCC

Nota. [F₁] corresponde a Concentración del extracto en [mg · mL⁻¹]; [F₂] Tipo de extracto [E] Etanólico, [H] Hexánico; y [F₃] Cepa bacteriana evaluada.

3.4 Variables

Con el propósito de evaluar la actividad antibacteriana de los extractos de *Cannabis sativa* L. frente a cepas y de referencia de *Staphylococcus aureus*, se definieron las variables experimentales que intervienen en el diseño del estudio, descritas a continuación:

Tabla 4.

Variables del estudio

VARIABLE	DEFINICIÓN	INDICADOR
INDEPENDIENTES		
Concentración del extracto de <i>Cannabis sativa</i> L.	Cantidad del extracto aplicada en cada pocillo durante el ensayo	[mg/mL]
Cepa bacteriana	Cepa resistente y de referencia de <i>Staphylococcus aureus</i> evaluada	Código de cepa [MRSA-1 a MRSA-14, ATCC 25923]
DEPENDIENTES		
Concentración Mínima Inhibitoria [CMI]	Menor concentración del extracto capaz de inhibir el crecimiento bacteriano	[mg/mL, basado en DO600]

3.5 Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos

Para este trabajo experimental se aplicaron las técnicas de observación experimental y análisis cuantitativo de resultados, con el objetivo principal de evaluar la actividad antimicrobiana del extracto vegetal. Los datos se recolectaron mediante ensayos de susceptibilidad antimicrobiana *in vitro*, empleando la técnica de microdilución en caldo en microplacas de 96 pocillos, para determinar la concentración mínima inhibitoria [CMI] de los extractos frente a las cepas seleccionadas.

Los instrumentos y materiales necesarios para los ensayos fueron proporcionados por las instituciones colaboradoras:

Universidad Politécnica Salesiana – sede Cuenca. Esta institución facilitó los materiales y reactivos necesarios para la ejecución de los ensayos, entre ellos se incluyen micropipetas, puntas estériles, solventes [DMSO y Tween 20], material de vidrio, asas de siembra, Parafilm y medios de cultivo como caldo infusión cerebro-corazón [BHI], Mueller-Hinton [caldo y agar], agar sangre y agar manitol. En sus laboratorios se realizó, posterior a la incubación, la recolección de datos para el análisis de resultados mediante lector de microplacas.

Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública [INSPI]. El INSPI proporcionó acceso a la base de datos WHONET de la Red de Resistencia a los antimicrobianos [RAM], lo que permitió la selección de 14 cepas analizadas con perfil *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina [MRSA], junto con una cepa de referencia ATCC 25923. Debido a criterios de bioseguridad, las cepas no podían ser manipuladas fuera de la institución, por lo que en los laboratorios del INSPI se realizó la reactivación, identificación fenotípica, la preparación de los extractos y el ensamblado e inoculación de las microplacas.

3.6 Técnicas de Procesamiento y Análisis de Datos

La actividad antimicrobiana fue evaluada mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria [CMI], tanto por observación empírica, como por el reporte de absorbancias a densidad óptica [DO] de 600 nm, emitido por el lector de microplacas.

Dado que los extractos de *Cannabis sativa* L. provistos, por su viscosidad y composición oleosa, generaban interferencias ópticas [turbidez y precipitados], se aplicó un ajuste de absorbancia. Esta consistió en restar a cada valor de lectura la absorbancia de los controles de extracto sin inóculo, con el fin de evitar falsos positivos de crecimiento.

Tabla 5.

Formato de recolección de datos para el ajuste de absorbancias

Muestra:	Extracto: E / H						
Concentración [mg/mL]	CE	Rep1	Rep2	Rep3	Adj1	Adj2	Adj3
6.125					CE- Rep1	CE- Rep2	CE- Rep3
3.06							
...
0.01							
CC		Control de crecimiento					-
CN		Control de esterilidad					-
CS		Control de solvente					-

Nota. [E] indica extracto etanólico y [H] extracto hexánico. [CE] corresponde al control de extracto sin inóculo. Rep1, Rep2 y Rep3 son réplicas técnicas; Adj1, Adj2 y Adj3 son los valores ajustados: Adj = Rep. – CE. Controles: CC [crecimiento], CN [esterilidad], CS [solvente].

Los datos fueron organizados en una matriz en Microsoft Excel, como se muestra en la Tabla 5, para posteriormente ser importados a un entorno en RStudio para su procesamiento estadístico.

Tabla 6.

Formato de recolección de datos de concentración mínima inhibitoria [CMI]

Muestra	Replica	CMI [H] [mg/mL]	CMI [E] [mg/mL]
MRSA-1	1		
MRSA-1	2		
MRSA-1	3		
MRSA-2	1		
MRSA-2	2		
...	...		
ATCC	3		

Nota. Registro de las concentraciones mínimas inhibitorias [CMI] obtenidas para cada muestra frente a extractos de *Cannabis sativa* L. [hexánico [H] y etanólico [E] mediante el método de microdilución en placa. Se realizaron tres réplicas técnicas por muestra para cada tipo de extracto. Las concentraciones se expresan en mg/mL.

Se aplicó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para verificar normalidad. Al no cumplirse el supuesto, se empleó la prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras relacionadas, con el fin de comparar los valores CMI entre los extractos etanólico y hexánico.

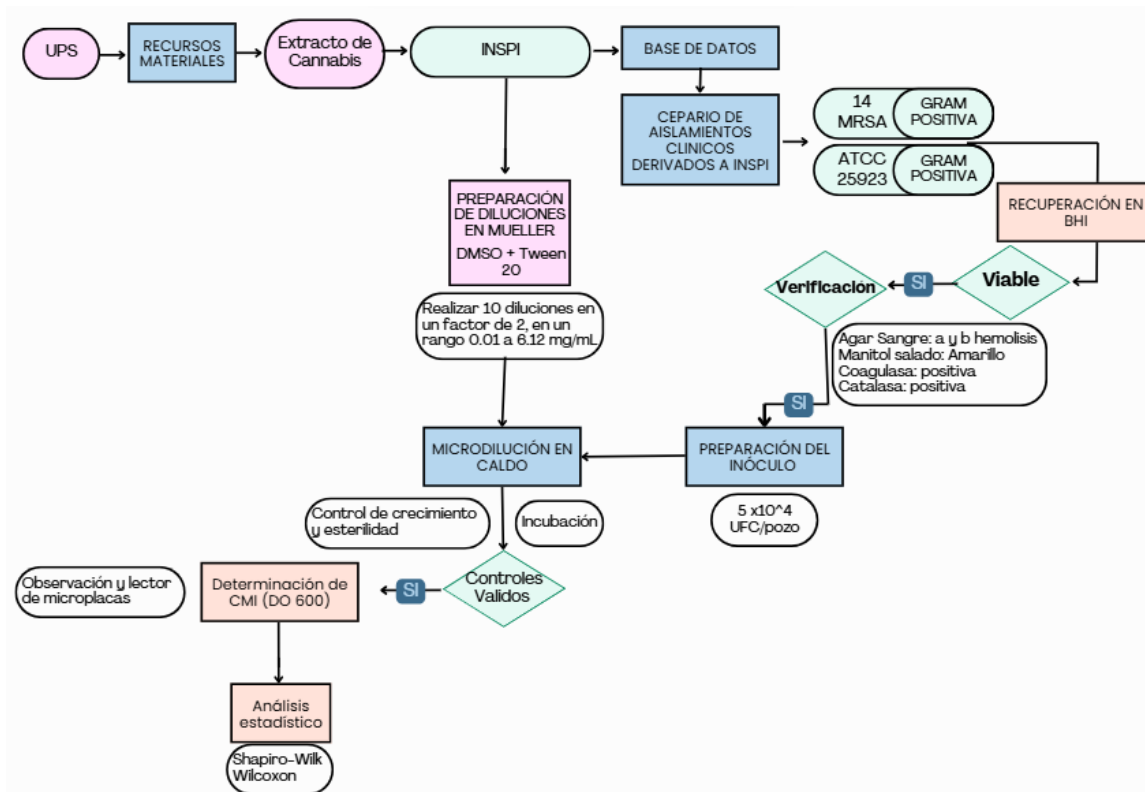
Finalmente, se elaboraron gráficos para facilitar la comprensión e interpretación del comportamiento antimicrobiano de los extractos frente a las distintas cepas evaluadas.

3.7 Protocolo

Para evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos de *Cannabis sativa* L. frente a cepas resistentes, se diseñó un flujo de trabajo que abarca desde la obtención y caracterización de los aislamientos bacterianos hasta la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). El siguiente diagrama resume cada una de las etapas del proceso experimental.

Figura 6.

Diagrama de flujo del protocolo a aplicar



3.6.1 Preparación de extractos

Los extractos son proporcionados como parte de un trabajo de titulación realizado por Alba Naranjo y Minchala Espinoza (2022), titulado “Extracción de aceite esencial de *Cannabis sativa*

L. utilizando dos técnicas de laboratorio, determinando el método más eficiente”. Se utilizan dos extractos de cogollo, uno etanólico [E] y otro hexánico [H], con una densidad de 0.7 mg/mL, con concentraciones de cannabinoides determinadas mediante cromatografía realizada por Hemp Ecuador Labs, reportando 64.89% y 86.96% de cannabinoides totales respectivamente.

Tabla 7

Composición de los extractos etanólicos y hexánicos de *Cannabis sativa* L.

Solvente	Cannabinoides totales [%]	Δ^9 -THC [%]	Δ^8 -THC [%]	CBD [%]	CBN [%]
Hexano [H]	86.96	51.67	2.46	29.59	3.22
Etanol [E]	64.89	34.61	1.74	26.55	1.99

Nota. [Δ^9 -THC] Δ^9 -tetrahidrocannabinol; [Δ^8 -THC] Δ^8 -tetrahidrocannabinol; [CBD] cannabidiol; [CBN] cannabinol.

La dilución madre de los extractos se prepara colocando 168 μ L de DMSO puro en dos tubos Eppendorf estériles, seguido de 50 μ L de Tween 20 en cada uno. Posteriormente, a cada uno se le añade 70 μ L del extracto etanólico y hexánico respectivamente. Se agita vigorosamente con un vórtex hasta obtener una disolución homogénea.

Se completa cada tubo Eppendorf con caldo Mueller-Hinton, agitándose vigorosamente hasta obtener 2 mL, obteniendo una concentración aproximada de 12.5mg/ml.

Se prepara también un control de solventes [DMSO + Tween 20]. Para ello, en un Eppendorf se colocan 168 μ L de DMSO puro con 50 μ L de Tween 20. Se agita vigorosamente y se agrega 1782 μ L de caldo Mueller-Hinton estéril.

3.6.2 Selección y recuperación de cepas

Se accede a la base de datos WHONET del CR-RAM CZ6 y se realiza un cribado de los datos con base en los aislamientos de *Staphylococcus aureus* con reportes de resistencia a antibióticos betalactámicos como la oxacilina, de acuerdo con lo establecido en los lineamientos técnicos de vigilancia del centro de referencia nacional de resistencia a los antimicrobianos (CRN-RAM, 2025), además del gen *mecA* confirmado mediante biología molecular y provenientes de muestras de sangre.

3.6.3 Preparación de medios

Para la elaboración de los medios se siguen las instrucciones del fabricante, y su posterior esterilización se realiza en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Caldo Infusión cerebro-corazón + Glicerol 5%. Se preparan 57 mL de caldo BHI [Brain Heart Infusion, Oxoid, Reino Unido]. A esta solución se le añaden 3 mL de glicerol estéril para alcanzar una concentración final del 5%. Una vez autoclavado se vierte en 30 viales de conservación estériles de 2 mL.

Agar Sangre de cordero 5%. Se preparan 475 mL de la base de agar sangre [Oxoid, Reino Unido]. Una vez enfriada la base a una temperatura inferior a 50 °C, se añaden 25 mL de sangre de cordero. La mezcla se homogeneiza cuidadosamente y se dispensa en 20 cajas petri de 90 mm de diámetro.

Agar Manitol Salado. Se preparan 500 mL y posterior su esterilización se vierten en 20 cajas petri de 90 mm de diámetro.

Agar Mueller-Hinton. Se preparan 200 mL, los cuales se esterilizan y se dispensan en 20 cajas de Petri de 60 mm de diámetro.

Caldo Mueller-Hinton. Se preparan 500 mL del medio, divididos en dos frascos estériles de 250 mL cada uno.

3.6.4 Recuperación y verificación de cepas

Debido a que las cepas se mantienen preservadas a -80°C en un ultracongelador, se requiere descongelarlas, reactivarlas y verificar su viabilidad e identidad para su uso en el estudio. El descongelamiento se realiza a temperatura ambiente. Una vez descongelado el vial, se toman 200 μL de la suspensión y se inoculan en 10 mL de caldo infusión cerebro corazón. Se deja incubar por 24 horas, con la finalidad de reactivar el metabolismo bacteriano, evidenciado por la turbidez del medio.

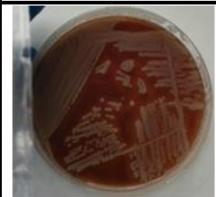

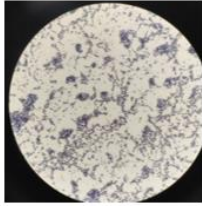
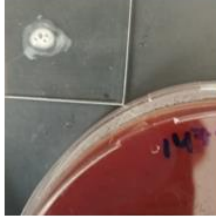


Transcurridas 24 horas de crecimiento, se realiza una resiembra empleando la técnica de estriado por agotamiento en agar sangre de cordero al 5%, para ser incubado a 37°C por 24 horas. Posteriormente, se verifica la pureza de la cepa y se evalúan características morfológicas como la coloración y la presencia de beta-hemólisis.

Se realizan pruebas adicionales como la tinción de Gram, fermentación en agar manitol y prueba de catalasa para garantizar el género *Staphylococcus* [catalasa+].

Una vez verificada la pureza e identidad, se realizan copias de trabajo de las cepas empleando BHI + Glicerol al 5%.

Figura 7.

Tabla de referencia para la identificación de Staphylococcus aureus.

a) Foto	b) Color	c) Hemolisis	d) Tinción gram	e) Catalasa	f) Manitol
	Amarillo				
	Gris	β (Beta) hemolisis	Grampositiva	Positiva	Positiva

3.6.5 Preparación del inóculo

A partir de los viales de conservación, se resembran las cepas en agar Mueller-Hinton mediante la técnica de estriado por agotamiento, con el fin de obtener un cultivo fresco de 24 horas. Una vez incubadas, se toman entre 4 y 5 colonias y se colocan en 5 mL de solución salina hasta alcanzar turbidez equivalente al estándar 0.5 McFarland [1.5×10^8 UFC/mL]. En caso de usar espectrofotómetro, se ajusta la absorbancia entre 0.08 y 0.13.

Luego, se toman 100 μ L de la solución ajustada y se colocan en 10 mL de caldo Mueller-Hinton para obtener una concentración de 1.5×10^6 UFC/mL. Este inóculo se debe usar en un tiempo no mayor a 15 minutos.

3.6.6 Armado de placas

Se colocan 100 μ L de caldo Mueller-Hinton en las columnas 1-11 de las filas [A, B, C, F, G, H]. En la columna 12 y las filas D y E, se colocan 200 μ L del caldo.

Se añaden 100 μL de los extractos en la columna 1, diluyendo su concentración a 6.125 mg/mL; A-D para extracto etanólico y E-H para el hexánico. Se realizan diluciones seriadas binarias de la columna 1 a la 10, descartando el exceso.

Se añaden 100 μL del control de solvente [DMSO+Tween20] en D11 y E11, se homogeneiza con micropipeta y se descarta el sobrante.

Posteriormente, se colocan 100 μL del inóculo bacteriano en todos los pocillos, excepto en la columna 12 y las filas D y E. Se sellan las placas y se incuban por 24 horas a 37 °C.

3.6.7 Lectura de placas

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realiza la lectura de las placas visualmente y con lector de microplacas [modelo UT-2100C]. La CMI se define como la menor concentración en la que no se observa crecimiento.

3.6.8 Análisis estadístico de resultados.

Los datos obtenidos de las pruebas de CMI se analizan mediante herramientas estadísticas para determinar si existen diferencias significativas entre extractos o cepas. Para verificar la normalidad se aplica la prueba de Shapiro-Wilk. Al no cumplirse la normalidad, se aplican pruebas no paramétricas. En este caso, se utiliza la prueba de Wilcoxon para comparar los valores CMI entre los extractos etanólico y hexánico, determinando si existen diferencias significativas entre ambos.

Capítulo 4: Resultados y discusión

4.1. Análisis de los datos

4.1.1. Selección de las cepas

Se identificaron un total de 81 aislamientos que coincidieron con los criterios de resistencia fenotípica a oxacilina y detección del gen *mecA*. Debido a que se ha documentado que algunas cepas portadoras de *mecA* pueden mostrar CMI bajas [$\leq 2 \mu\text{g/mL}$] y escapar a la detección fenotípica, se estableció el criterio [CMI $\geq 4 \mu\text{g/mL}$] que asegura la inclusión de cepas *Staphylococcus aureus* resistente a la Meticilina [MRSA] francamente resistentes (Chen et al., 2012).

Del grupo antes mencionado, se seleccionaron únicamente aquellos aislamientos provenientes de muestras sanguíneas, debido a que los aislamientos de *S. aureus* procedentes de hemocultivos representan infecciones invasivas de alta gravedad, con tasas de mortalidad hospitalaria que oscilan entre 15% y 40% (Kimmig et al., 2021). De esta manera, se obtuvieron un total de 14 cepas de MRSA analizadas entre los años 2022 y 2025, todas procedentes de hemocultivos y representativas de grupos etarios diversos [recién nacidos, adultos, adultos mayores y pediátricos] y ambos sexos como se observa en la Tabla 8.

Tabla 8.*Características clínicas y genotípicas de las cepas MRSA seleccionadas*

#	Muestra	Año	Sexo	Grupo etario	Tipo	mecA	Oxa CMI [$\mu\text{g/mL}$]
1	8	2024	M	P	Sangre	+	4
2	30	2024	F	AM	Sangre	+	4
3	60	2023	F	AM	Sangre	+	4
4	64	2024	F	AM	Sangre	+	4
5	111	2023	M	A	Sangre	+	4
6	147	2022	F	P	Sangre	+	4
7	154	2022	F	P	Sangre	+	4
8	182	2024	M	P	Sangre	+	4
9	200	2024	M	AM	Sangre	+	4
10	206	2024	F	P	Sangre	+	4
11	247	2024	F	P	Sangre	+	4
12	268	2024	M	NB	Sangre	+	4
13	304	2024	F	P	Sangre	+	4
14	320	2025	M	AM	Sangre	+	4

Nota. [M] Masculino, [F] Femenino; [NB]Recién nacido, [P]Pediátrico, [A] Adulto, [AM] Adulto mayor.

Este número de cepas se encuentra en el rango utilizado en estudios enfocados en ensayos antimicrobianos con extractos naturales, los cuales frecuentemente emplean entre 5 y 20 cepas caracterizadas para ensayos de CMI (Umoh et al., 2022). Por tanto, el número de aislamientos y su origen respaldan la validez del modelo microbiológico empleado en esta investigación.

4.1.2. Verificación de cepas

Antes de iniciar los ensayos, y debido a que las muestras estuvieron congeladas a -80°C , se verificó la viabilidad de las 14 cepas seleccionadas. Todas evidenciaron crecimiento en caldo infusión cerebro corazón [BHI], al observar turbidez. Todas las cepas fermentaron manitol, evidenciado por el viraje de color del medio a amarillo. Se observó hemólisis β [Beta] en agar sangre para todas las cepas, sin excepción. Autores han señalado que hasta 2–3% de cepas de *S. aureus* podrían no fermentar manitol o exhibir hemólisis débil (Kateete et al., 2010), sin embargo en este trabajo todas mostraron fermentación típica y hemólisis β .

A su vez, todas las muestras fueron positivas a las pruebas de catalasa y tinción de Gram [cocos grampositivos], estos resultados fenotípicos son consistentes con múltiples referencias académicas, lo que confirma su identidad como *S. aureus*. Tal como mencionan Taylor & Unakal, (2025), la combinación de crecimiento en agar con alta salinidad y fermentación de manitol, junto con pruebas de catalasa y coagulasa, es el procedimiento convencional para la identificación inicial de *S. aureus* en laboratorios clínicos. La cepa control ATCC 25923 presentó los mismos resultados fenotípicos, validando las pruebas realizadas. La Tabla 9 resume las pruebas bioquímicas y morfológicas.

Tabla 9.*Confirmación fenotípica de cepas MRSA mediante pruebas bioquímicas y de cultivo*

# Muestra	Crecimiento	Manitol	Hemolisis	Catalasa	Tinción de Gram
8	SI	+	β [Beta]	+	Positiva
30	SI	+	β [Beta]	+	Positiva
60	SI	+	β [Beta]	+	Positiva
64	SI	+	β [Beta]	+	Positiva
111	SI	+	β [Beta]	+	Positiva
147	SI	+	β [Beta]	+	Positiva
154	SI	+	β [Beta]	+	Positiva
182	SI	+	β [Beta]	+	Positiva
200	SI	+	β [Beta]	+	Positiva
206	SI	+	β [Beta]	+	Positiva
247	SI	+	β [Beta]	+	Positiva
268	SI	+	β [Beta]	+	Positiva
304	SI	+	β [Beta]	+	Positiva
320	SI	+	β [Beta]	+	Positiva
ATCC 25923	SI	+	β [Beta]	+	Positiva

4.1.3. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria [CMI]

La determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria se llevó a cabo mediante el ensayo de microdilución en placas de 96 pocillos, integrando tres repeticiones técnicas por cepa. Se incluyeron controles de crecimiento [CC], esterilidad [CN], de solvente [CS] y de extracto [CE] indispensables para la validación de las placas (Vanegas, et al., 2021). Debido a la baja solubilidad observada de los extractos en el medio Mueller-Hinton, las absorbancias fueron ajustadas restando el valor CE con el fin de eliminar posibles interferencias por precipitados.

La CMI fue definida como la concentración más baja cuya absorbancia corregida fue igual o cercana al control de esterilidad. En la Tabla 10 se presenta como ejemplo el análisis correspondiente a la cepa de referencia ATCC 25923, frente al extracto etanólico. Dicha cepa mostró una CMI de 0.01 mg/ml, lo que confirma la actividad antimicrobiana básica del extracto, y valida el funcionamiento del protocolo aplicado. El mismo criterio fue aplicado con todas las cepas, para los extractos etanólico [E] y hexánico [H], como se resume en la tabla 11.

Tabla 10.

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria [CMI] del extracto etanólico de Cannabis sativa L. frente a cepa control ATCC 25923

Muestra: ATCC 25923		Extracto: E					
Concentración [mg/mL]	CE	Rep1	Rep2	Rep3	Adj1	Adj2	Adj3
3.06	1200	1173	1280	1389	-27	80	189
1.53	850	844	763	726	-6	-87	-124
0.76	400	347	385	419	-53	-15	19
0.38	254	154	194	217	-100	-60	-37
0.19	140	125	136	241	-15	-4	101
0.09	102	122	135	130	20	33	28
0.04	110	93	105	89	-17	-5	-21
0.02	95	109	78	81	14	-17	-14
0.01	75	100	106	121	25	31	46
0,005	65	200	250	198	135	185	133
CC		963	921	882			
CN		100	103	106			
CS		883	861				

Nota. CMI expresada en mg/mL. Se incluyen resultados obtenidos por triplicado. La cepa ATCC 25923 permite validar el funcionamiento del ensayo.

Una vez validadas las condiciones, se determinaron los valores de CMI para cada una de las 14 cepas de MRSA evaluadas. Los resultados se presentan en la Tabla 11 como los valores medios de CMI [\pm desviación estándar]. Es importante destacar que, aunque algunas cepas tenían una CIM superior a 3 mg/ml, la mayoría tenía valores por debajo de este umbral. Esta variabilidad entre cepas podría atribuirse, al menos en parte, a la limitada solubilidad de los extractos, lo que provocó la formación de precipitados en altas concentraciones y, posiblemente, una distribución no uniforme en los pocillos.

Tabla 11.

Concentración Mínima Inhibitoria [CMI] media [\pm DE] de extractos etanólico [E] y hexánico [H] de Cannabis sativa L. frente a cepas MRSA

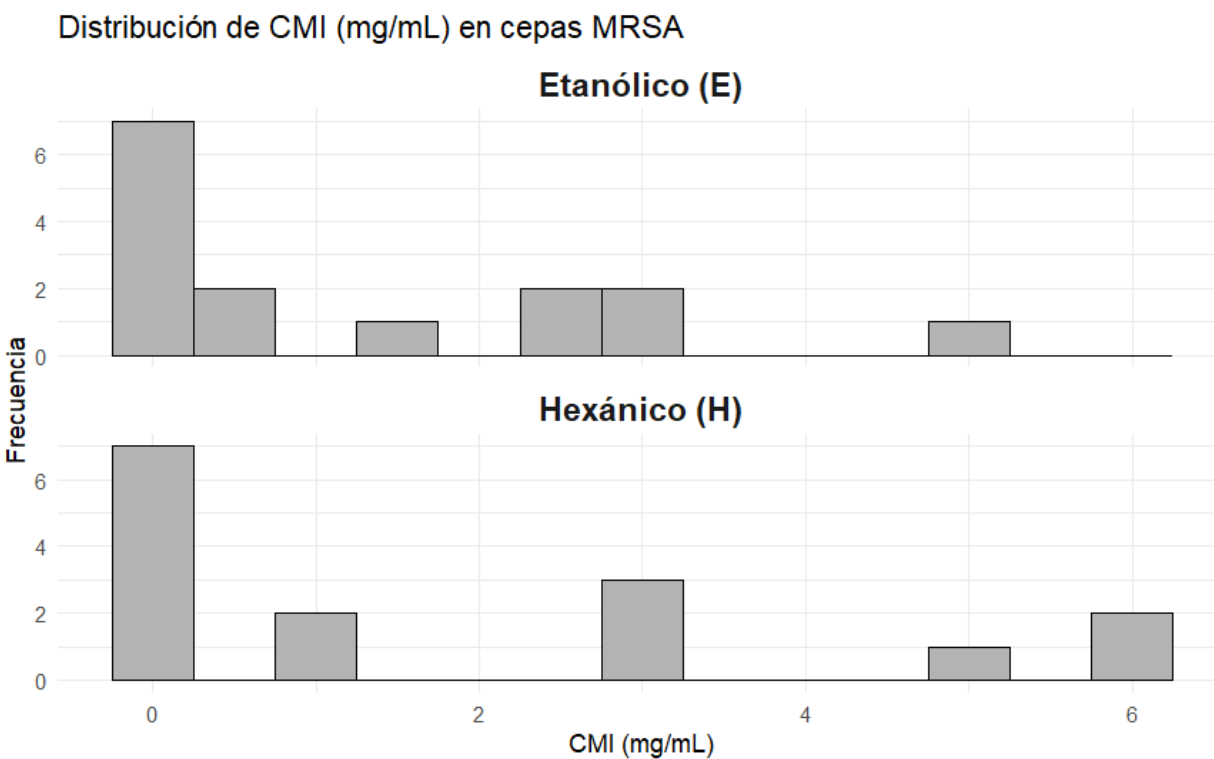
Muestra	Código	CMI [\pm DE][E]	CMI [\pm DE][H]
8	MRSA-1	1.53 \pm 0.00	5.10 \pm 1.77
64	MRSA-2	2.55 \pm 0.88	6.12 \pm 0.00
182	MRSA-3	2.55 \pm 0.88	3.06 \pm 0.00
247	MRSA-4	3.06 \pm 0.00	3.06 \pm 0.00
206	MRSA-5	3.06 \pm 0.00	3.06 \pm 0.00
200	MRSA-6	0.51 \pm 0.22	1.02 \pm 0.44
320	MRSA-7	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00
154	MRSA-8	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00
60	MRSA-9	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00
111	MRSA-10	0.51 \pm 0.22	1.02 \pm 0.44
304	MRSA-11	0.02 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00
147	MRSA-12	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.01
268	MRSA-13	5.10 \pm 1.77	6.12 \pm 0.00
30	MRSA-14	0.03 \pm 0.01	0.12 \pm 0.06
ATCC	ATCC	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00

Nota. Valores obtenidos como promedio de tres réplicas técnicas; CMI [mg/mL]; [DE] desviación estándar.

La Figura 8 representa la distribución de frecuencias de las CMI obtenidas para ambos extractos. Se observa claramente una distribución no normal caracterizada por una alta concentración de CMI bajas [0.01-0.02 mg/mL] tanto para extracto etanólico como hexánico. En ambos casos, la mayoría de las cepas MRSA fueron inhibidas por concentraciones iguales o menores a 3.06 mg/mL. Estos resultados son consistentes con estudios como el Malikova et al., (2024) que encontraron CMI de 0.032-0.256 mg/mL obtenidos de plantas cultivada sin suelo.

Figura 8.

Distribución de frecuencias de los valores de Concentración Mínima Inhibitoria [CMI] de ambos extractos



4.1.4. Análisis Estadístico de las CMI en función al tipo de extracto

El análisis estadístico de los valores de CMI según el tipo de extracto mostró que los datos no siguen una distribución normal. La prueba de Shapiro–Wilk aplicada a los valores de CMI del extracto etanólico (E) y del hexánico (H) arrojó valores de $p < 0.05$ en ambos casos [etanólico, $p = 6.611e-08$; hexánico $p = 3.559e-07$], rechazando la hipótesis nula de normalidad. Estos resultados se presentan en la Tabla 12.

Tabla 12.

Resultados de la prueba de normalidad Shapiro-Wilk para valores de CMI

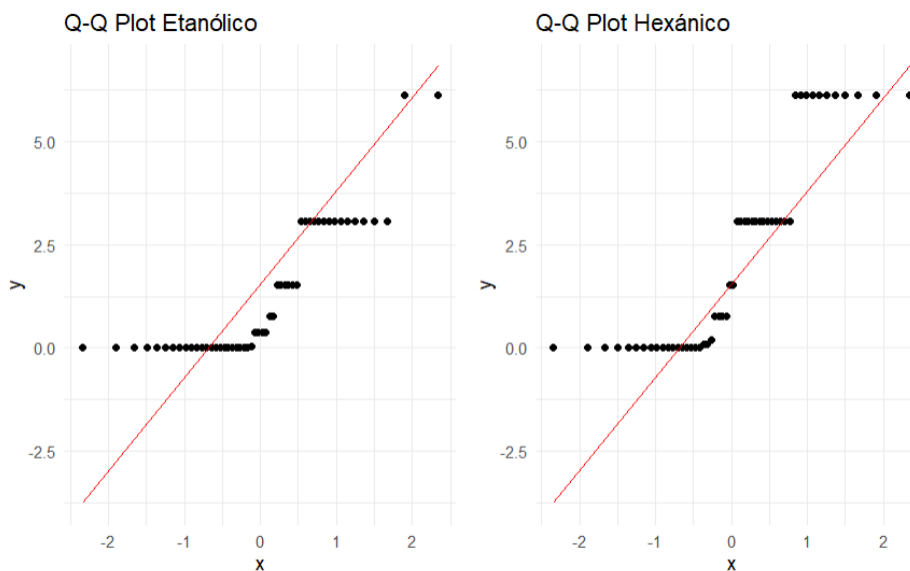
Extracto	W	p-value
E	0.75673	6.611e-08
H	0.79032	3.559e-07

Nota. [E] Etanólico, [H]Hexánico

Estos resultados son respaldados por el gráfico de probabilidad cuantil-cuantil [Q-Q plot] que se muestran en la Figura 9. En dichos gráficos se observan desviaciones y agrupamientos. En particular, el extracto hexánico muestra una distribución claramente no normal, con valores repetidos y sesgos marcados, por otro lado, el extracto etanólico tiene un ajuste más cercano, su distribución tampoco cumple el supuesto de normalidad.

Figura 9.

Q-Q plots para los valores de CMI según extracto Etanólico y Hexánico



Debido al rechazo del supuesto de normalidad, se utilizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras relacionadas, comparando las CMI entre extractos. La prueba arrojó $W = 82.5$ y $p = 0.006148$, lo cual indicó una diferencia estadísticamente significativa en la actividad antimicrobiana de ambos extractos frente a cepas MRSA.

Tabla 13.

Resultado de Wilcoxon para los datos CMI según tipo de extracto

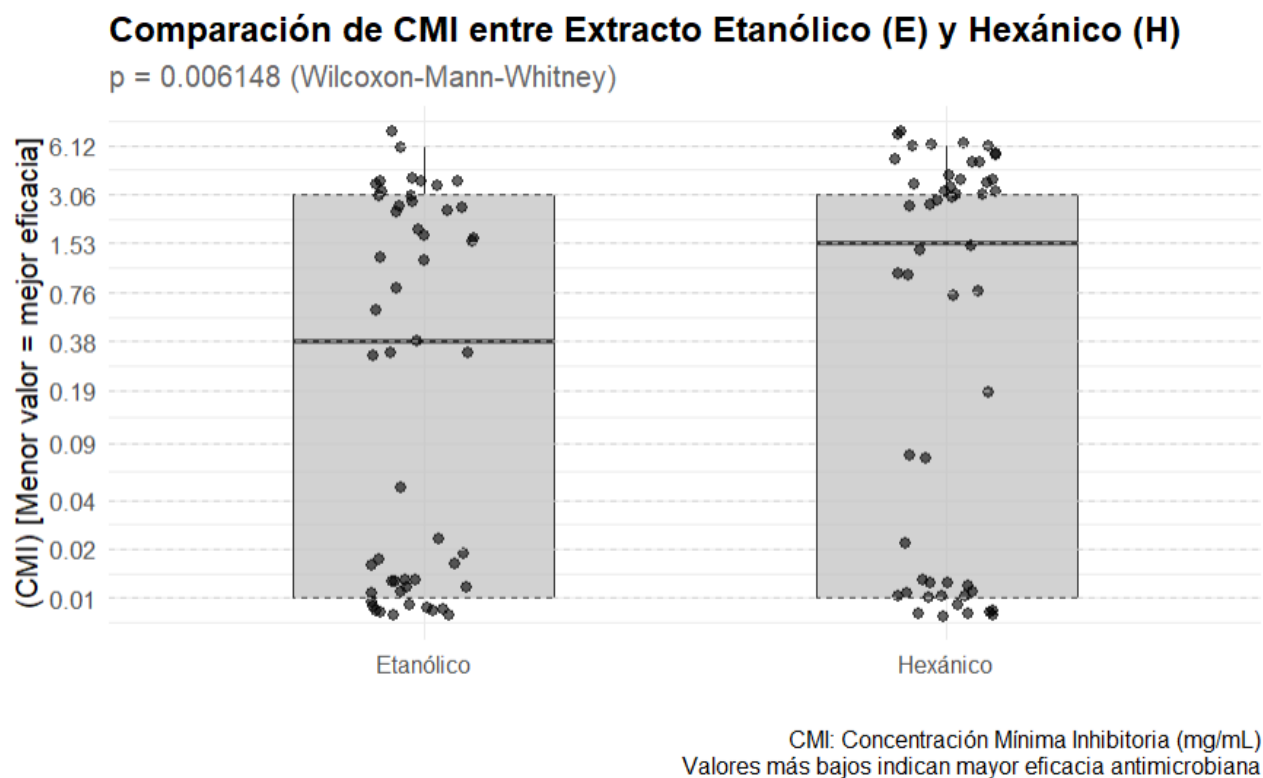
V	p-value
82.5	0.006148

La Figura 10 refuerza visualmente estos resultados mediante un diagrama de caja [boxplot], donde se observa que, aunque las medianas de ambos extractos son similares, la mediana del

extracto etanólico fue menor en comparación al extracto hexánico, sugiriendo que el extracto etanólico es ligeramente más eficaz al inhibir el crecimiento de cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina [MRSA]. Además, ambos extractos comparten una variabilidad comparable, lo que confirma la robustez del análisis estadístico aplicado y, a su vez indica que los principios activos responsables de la actividad antimicrobiana ya sean cannabinoides, terpenos o flavonoides, están presentes en las dos fracciones, como sugieren estudios de propiedades antimicrobianas del cannabis (Stasiłowicz-Krzemień et al., 2024).

Figura 10.

Boxplot de valores \log_2 de CMI para extractos etanólico y hexánico de *Cannabis sativa* L. frente a cepas MRSA



Nota. Diagrama de caja que muestra mediana, cuartiles y valores atípicos de los valores de la Concentración Mínima Inhibitoria [mg/mL] para los extractos etanólico [E] y hexánico [H]. Se observan diferencias estadísticamente significativas [Wilcoxon $p = 0.006148$].

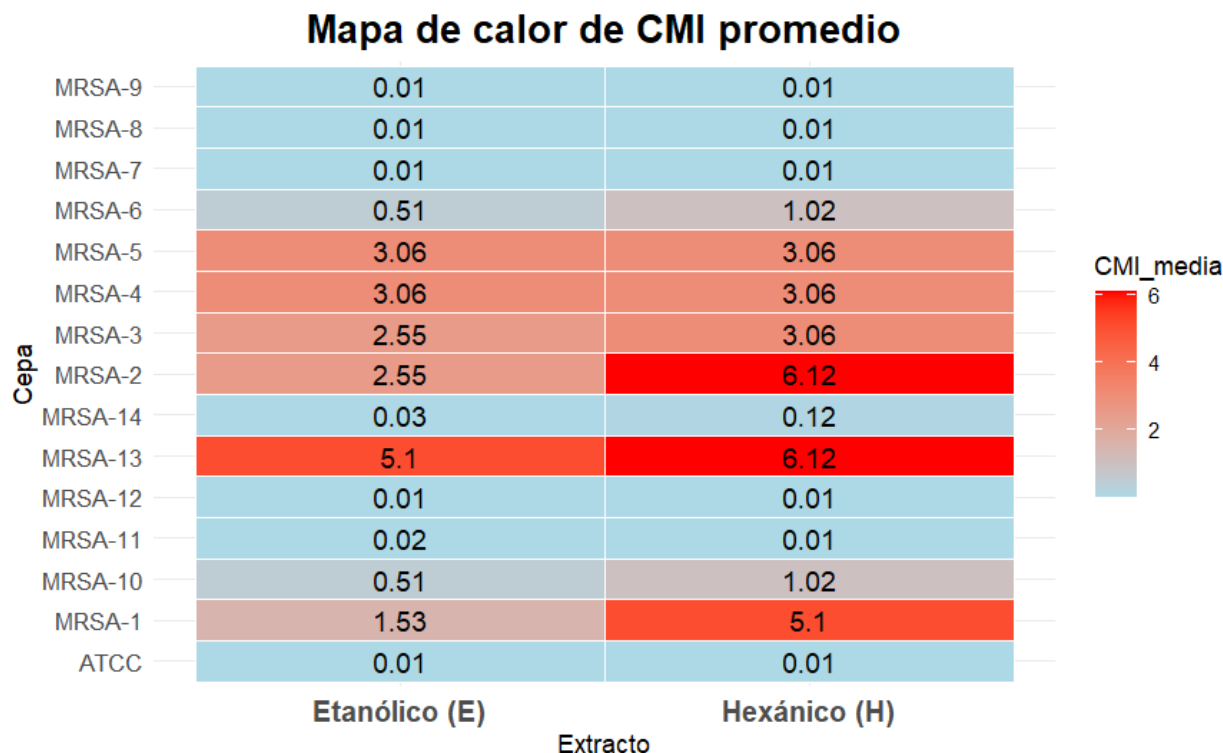
Estos hallazgos sugieren que, aunque ambos extractos presentan actividad frente a cepas MRSA, el extracto etanólico posee una eficacia ligeramente superior. Esta diferencia se puede explicar de acuerdo con la química de los solventes, pues estudios han indicado que extractos alcohólicos [polares] recuperan mayores contenidos de compuestos antioxidantes y fenoles que extractos con solventes apolares como hexano, que recuperan más compuestos lipofílicos (Motiejauskaitė et al., 2023). Así mismo, la regla de oro de disolución donde “similar disuelve similar” (Sharapova et al., 2022), podría indicar que, a pesar de la baja solubilidad y homogeneización de los extractos, las concentraciones preparadas con la fracción más polar [etanólica] pudieron tener mayor disponibilidad de metabolitos frente a aquellas donde se utilizó el extracto más apolar [hexánico].

4.1.5. Comparación CMI promedio entre cepas

La comparación del promedio de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) entre las cepas permitió identificar patrones de sensibilidad diferencial frente a los extractos etanólico y hexánico de *Cannabis sativa* L. La Figura 11 representa un gráfico de calor que correlaciona el promedio de la CMI [mg/mL] de 14 cepas MRSA y ATCC 25923 para los extractos etanólico y hexánico, con una codificación de color que va de azul claro [mayor sensibilidad] a rojo intenso [menor sensibilidad].

Figura 11.

Mapa de calor de valores de CMI por cepa y tipo de extracto



Nota. El degradado de color va de azul claro para CMI bajas a rojo intenso para CMI altas.

Esta visualización permitió identificar que la mayoría de las cepas MRSA presenta tolerancia a los extractos. Se observa un grupo de seis cepas [MRSA-1,-2,-3,-4,-5,-13] para las cuales ambos extractos mostraron eficacia reducida en comparación con la cepa de referencia ATCC 25923, es decir que concentraciones mayores fueron necesarias para inhibir su crecimiento.

Para interpretar de mejor manera, se clasificó la actividad antimicrobiana para cada cepa con base a los criterios propuestos por Lagnika et al., (2016), que define valores de CMI para alta actividad [$CMI \leq 0.01$ mg/mL], actividad moderada [$0.01 < CMI \leq 0.625$ mg/mL] y baja actividad [$CMI > 0.625$ mg/mL]. Los resultados de esta clasificación por cepa y por tipo se resumen en la Tabla 14.

Tabla 14.

Clasificación de la actividad antimicrobiana del extracto de Cannabis sativa L. según rangos de CMI

Cepa	CMI E [mg/mL]	Clasificación E	CMI H [mg/mL]	Clasificación H
ATCC	0.01	Alta actividad	0.01	Alta actividad
MRSA-1	1.53	Baja actividad	5.10	Baja actividad
MRSA-2	2.55	Baja actividad	6.12	Baja actividad
MRSA-3	2.55	Baja actividad	3.06	Baja actividad
MRSA-4	3.06	Baja actividad	3.06	Baja actividad
MRSA-5	3.06	Baja actividad	3.06	Baja actividad
MRSA-6	0.51	Actividad moderada	1.02	Baja actividad
MRSA-7	0.01	Alta actividad	0.01	Alta actividad
MRSA-8	0.01	Alta actividad	0.01	Alta actividad
MRSA-9	0.01	Alta actividad	0.01	Alta actividad
MRSA-10	0.51	Actividad moderada	1.02	Baja actividad
MRSA-11	0.02	Alta actividad	0.01	Alta actividad
MRSA-12	0.01	Alta actividad	0.01	Alta actividad
MRSA-13	5.10	Baja actividad	6.12	Baja actividad
MRSA-14	0.03	Alta actividad	0.12	Actividad moderada

Nota. [CMI E] CMI para extracto Etanólico, [CMI H] CMI para extracto Hexánico. Se consideraron los valores promedio de las réplicas de cada cepa.

A partir de dicha clasificación, se observó que el extracto etanólico presentó alta actividad en el 57.14% de las cepas, actividad moderada en el 7.14% y baja actividad en el 35.71%. Por su parte, el extracto hexánico mostró alta actividad en el 50%, moderada en el 21.43% y baja en el 28.57% de las cepas. Estas proporciones reflejan que, si bien ambos extractos poseen potencial antimicrobiano frente a cepas MRSA, existe una heterogeneidad importante en la respuesta de las cepas.

La variabilidad observada en las CMI entre cepas, se alinea con hallazgos previos en la literatura, donde se ha demostrado que los cannabinoides de *C. sativa*, en especial el cannabidiol [CBD], el cannabigerol [CGB] y el Δ^9 -tetrahidrocannabinol [Δ^9 -THC], inhiben eficazmente el crecimiento de *S. aureus* y cepas MRSA en bajas concentraciones (Appendino et al., 2008; Malikova et al., 2024). En este sentido, las diferencias en las CMI, siendo algunas muy bajas 0.01 mg/mL y otras más altas 6.125 mg/mL, se ha observado también en otros estudios con *S. aureus* donde las CMI fueron de pocos microgramos hasta miligramos (Malikova et al., 2024).

La variabilidad en la sensibilidad podría estar relacionada con diferencias en sus mecanismos de resistencia, o en la composición de sus membranas celulares, aunque en este estudio no se exploraron tales características. Estudios previos han reportado que algunas cepas de *Staphylococcus aureus* pueden desarrollar adaptaciones como un engrosamiento en la pared celular, lo cual podría influir en la eficacia de compuestos lipofílicos como los cannabinoides (Hu et al., 2016; Martinenghi et al., 2020).

Aunque las cepas seleccionadas provienen de pacientes de distintos grupos etarios y años, el tamaño de muestra y la falta de datos clínicos detallados impiden establecer correlaciones significativas entre estas variables y la sensibilidad a los extractos.

4.1.6. Multirresistencia clínica y eficacia de los extractos

Finalmente, se decidió realizar un análisis para determinar si relación entre los perfiles de resistencia de las cepas estudiadas y la eficacia de los extractos sobre ellas. Para ello, extrajeron los datos de los puntos de corte de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de la base de datos WHONET de la Red de Resistencia a los antimicrobianos [RAM].

Tabla 15.

Puntajes de susceptibilidad antimicrobiana por número de cepa

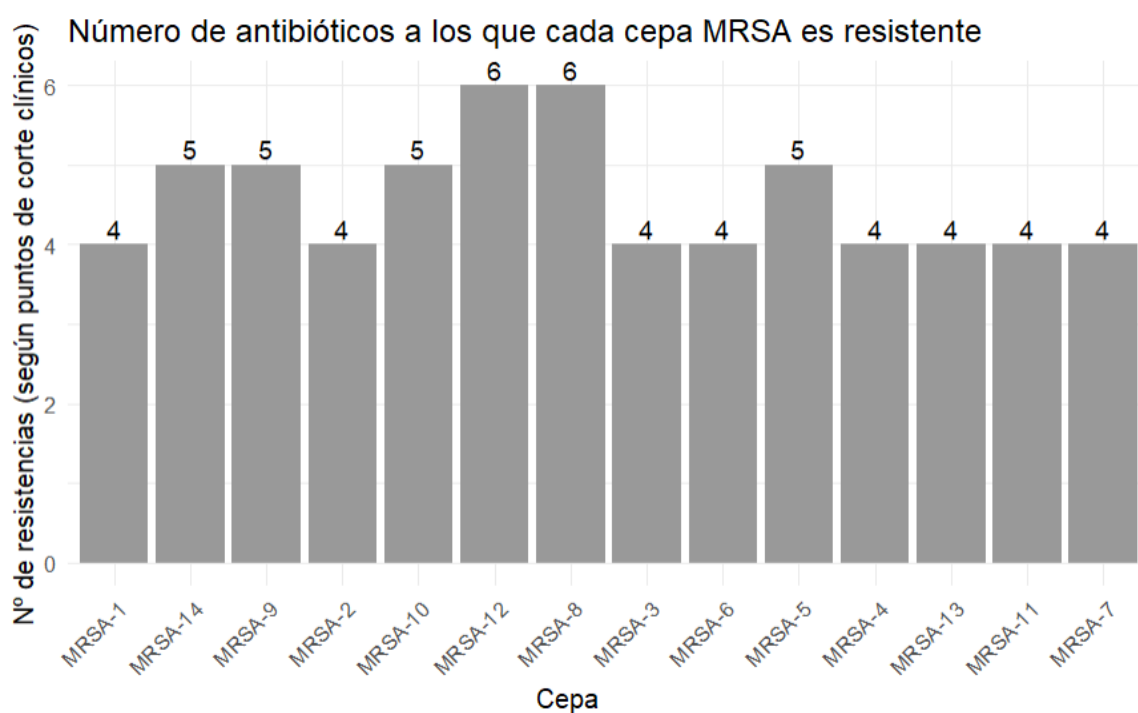
Cepa	MLS	MEC	FOX	CIP	SXT	GEN	RIF	PEN	OXA1	OXA2	ERY	VAN	CLI
MRSA-8	+	1	14	21	18	23	29	10	6	4	6	16	24
MRSA-12	+	1	13	23	20	24	27	9	6	4	7	16	23
MRSA-9	+	1	12	24	18	12	29	7	6	4	27	16	23
MRSA-10	-	1	8	6	37	-	-	-	6	4	29	18	29
MRSA-1	+	1	14	26	27	-	-	-	7	4	6	-	26
MRSA-14	+	1	15	29	-	-	-	-	6	4	6	16	6
MRSA-2	+	1	19	26	23	-	-	-	8	4	6	18	26
MRSA-3	-	1	12	25	21	-	-	-	6	4	29	19	30
MRSA-6	+	1	15	25	24	-	-	-	6	4	10	17	26
MRSA-5	+	1	16	27	18	-	-	-	16	4	6	17	26
MRSA-4	+	1	11	24	26	-	-	-	6	4	6	17	28
MRSA-13	-	1	18	26	25	-	-	-	6	4	10	17	22
MRSA-11	+	1	14	25	-	-	-	-	6	4	6	16	24
MRSA-7	+	1	14	26	-	-	-	-	6	4	6	17	25

Nota. [MLS]: resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B positivo [+]; [MEC]; *Gen mecA*; [FOX]: cefoxitina; [CIP]: ciprofloxacino; [SXT]: trimetoprim-sulfametoxazol; [GEN]: gentamicina; [RIF]: rifampicina; [OXA]: oxacilina; [ERY]: eritromicina; [VAN]: vancomicina; [CLI]: clindamicina; [LNZ]: linezolid; [TEC]: teicoplanina

Se calcularon los índices de resistencia para cada cepa al comparar los puntajes de susceptibilidad con los puntos de corte de cada antibiótico para *S. aureus*, de acuerdo con el CLSI M100, presentados en el Anexo C. Se determinó que todas las cepas MRSA presentaron multirresistencia a al menos cuatro grupos de antibióticos.

Figura 12.

Perfil de multirresistencia clínica en cepas MRSA analizadas



Dado que los datos de CMI no seguían una distribución normal [según pruebas previas de normalidad], se aplicó una correlación de Spearman para determinar la posible relación entre el número de resistencias clínicas y la CMI promedio frente a los extractos

Tabla 16.

Resultados correlación de Spearman

Extracto	S	p-value
E	407.09	0.7202
H	395.95	0.6584

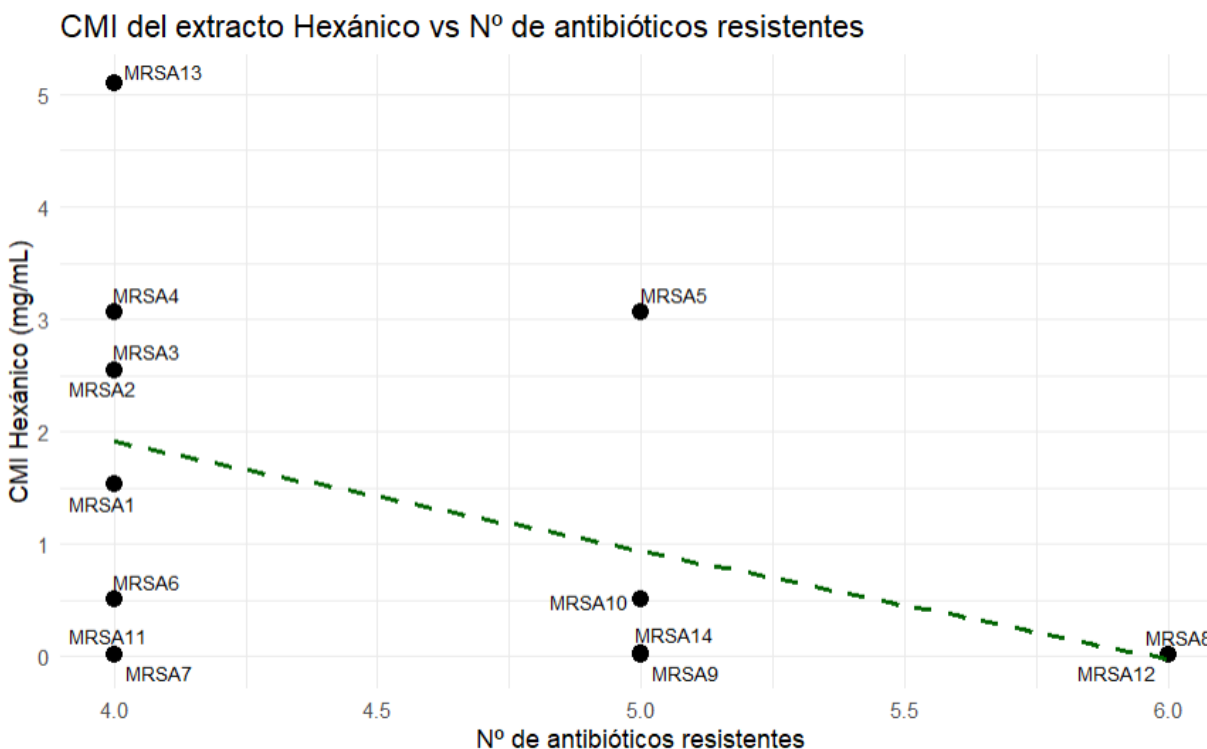
Nota. Un $p\text{-value} < 0.05$ representa una correlación estadísticamente significativa

Los resultados revelan que ninguno de los extractos mostró una correlación estadísticamente significativa entre el índice de resistencia clínica y la concentración mínima inhibitoria. Para el extracto hexánico [$S = 395.95$; $p = 0.6584$] y el etanólico [$S = 407.09$; $p = 0.7202$], ambos mostraron correlaciones positivas débiles, pero sin significancia estadística.

En la Figura 13 se aprecia que no existe un patrón evidente entre el grado de resistencia y la CMI del extracto hexánico. Aunque algunas cepas con menor resistencia fueron inhibidas a concentraciones más bajas, esta tendencia no fue consistente. Esto sugiere que, en las condiciones evaluadas, la multirresistencia clínica no influye directamente en la eficacia del extracto hexánico.

Figura 13.

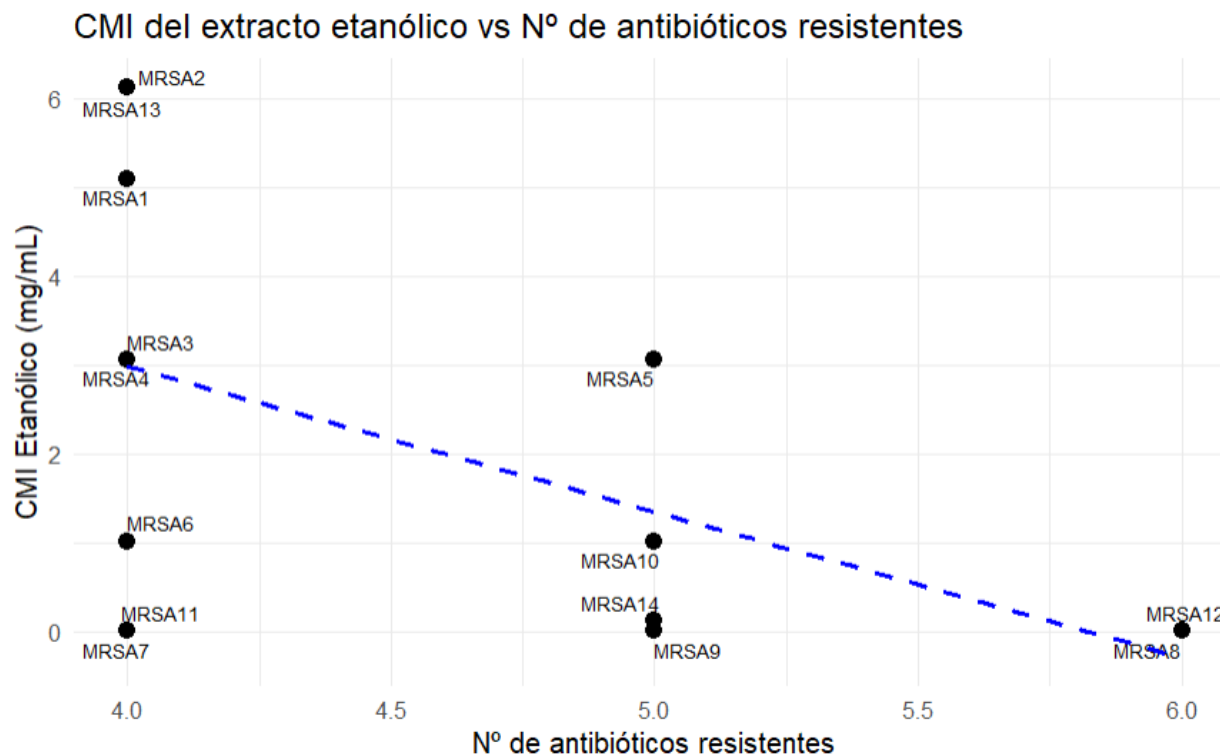
Correlación entre índice de resistencia clínica y CMI del extracto hexánico de Cannabis sativa L.



De forma similar, la Figura 14 no muestra una tendencia clara para el extracto etanólico. Por ejemplo, cepas como MRSA-9 y MRSA-10 presentaron CMI relativamente elevadas pese a un perfil de resistencia moderado, mientras que cepas como MRSA-13, con un bajo índice de resistencia, también requirieron concentraciones considerables del extracto. Esta falta de asociación directa indica que la resistencia antimicrobiana convencional no predice necesariamente la sensibilidad a extractos vegetales.

Figura 14.

Correlación entre índice de resistencia clínica y CMI del extracto etanólico de Cannabis sativa L.



No obstante, estudios recientes han sugerido que ciertos mecanismos de resistencia, como la sobreexpresión de bombas de eflujo, pueden reducir la efectividad tanto de antibióticos como de fitocompuestos (Umoh et al., 2022). Aunque los resultados aquí obtenidos no respaldan la asociación directa entre resistencia antimicrobiana convencional y susceptibilidad al extracto etanólico, esto sigue siendo un punto de interés para investigaciones futuras.

4.2. Limitaciones técnicas del ensayo

Los cannabinoides son compuestos altamente lipofílicos; por ejemplo, el CBD es prácticamente insoluble en agua, siendo necesarios solventes orgánicos para disolverse (Pillai, Kera, Kleyi, Beer, Magwaza, & Sinha Ray, 2024). Esta baja solubilidad fue el principal reto del

diseño experimental, pues a pesar de que se utilizaron solventes y tensioactivos como DMSO y Tween 20, la dispersión inadecuada del extracto en el medio de cultivo pudo llevar a mayor variabilidad en los datos o a la desestimación de la actividad real.

Es importante también destacar la sensibilidad que tienen los cannabinoides a la luz, temperatura y pH extremos (Pillai, Kera, Kleyi, Beer, Magwaza, & Sinha Ray, 2024), lo que puede causar degradación si no se manipulan con precaución. Al trabajar con 15 bacterias y no ser posible el cultivo de todas en una misma jornada, fue necesario preparar las soluciones de las fracciones para cada sesión, por lo que su manipulación constante pudo verse reflejada en una actividad reducida de los extractos.

4.3. Implicaciones terapéuticas y perspectivas a futuro.

Los hallazgos sugieren que los extractos de *C. sativa* y sus cannabinoides constituyen candidatos prometedores como nuevos agentes antimicrobianos, particularmente contra *S. aureus* resistente. Se ha postulado que los cannabinoides podrían construir una nueva clase de antibacterianos con mecanismos de acción únicos y de espectro variado (Ribeiro et al., 2024). Para aprovechar este potencial es crucial abordar limitaciones de formulación y biodisponibilidad. A futuro podría explorarse el uso de estos extractos como agentes tópicos o coadyuvantes de antibióticos tradicionales para potenciar su efecto. Sin embargo, actualmente la investigación se ha enfocado en síntomas asociados al dolor e inflamación antes que en su potencial antimicrobiano (Ribeiro et al., 2024). Por ello, es necesario estandarizar los protocolos de extracción, determinación de actividad antimicrobiana e implementar estudios preclínicos y ensayos clínicos.

Capítulo 5: Conclusiones y Recomendaciones

5.1 Conclusiones

De 81 cepas MRSA registradas, se seleccionaron 14 provenientes de sangre que cumplieron con los criterios establecidos resistentes a oxacilina ($CMI \geq 4 \mu\text{g/mL}$) y portadoras del gen *mecA*. Estas cepas fueron reactivadas con éxito, se confirmó su identidad frente a la cepa control ATCC 25923, quedando establecidas como modelo experimental válido en el estudio de CMI.

Al menos el 50 % de las cepas analizadas mostraron alta susceptibilidad a los extractos de *Cannabis sativa* ($CMI \leq 0.01 \text{ mg/mL}$), mientras que el resto presentó susceptibilidad moderada, lo que evidencia una heterogeneidad fenotípica entre las cepas. No se encontró una correlación estadísticamente significativa entre el grado de multirresistencia y la CMI para ninguno de los extractos evaluados (hexánico: $p = 0.658$; etanólico: $p = 0.720$). Esto sugiere que, en este conjunto de cepas, el nivel de resistencia a antibióticos no predice necesariamente la sensibilidad a los extractos de *Cannabis sativa*.

El análisis estadístico mediante la prueba de Wilcoxon reveló diferencias significativas en la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y hexánicos [$p = 0.00615$], aunque el solapamiento entre medianas y rangos indica que la eficacia global es comparable entre fracciones etanólica y hexánica.

Los extractos etanólico y hexánico de *Cannabis sativa* demostraron actividad antimicrobiana frente a todas las cepas evaluadas, incluyendo ATCC 25923 y MRSA, con CMI en el rango de 0.01 a 6.12 mg/mL. Donde el extracto etanólico presentó una mediana de CMI ligeramente inferior, indicando un perfil de inhibición más potente.

Los resultados respaldan la hipótesis de que *Cannabis sativa* L. posee compuestos bioactivos eficaces contra cepas resistentes a la Meticilina de *S. aureus* [MRSA]. Sin embargo, se requieren más estudios preclínicos para confirmar su aplicabilidad terapéutica.

5.2 Recomendaciones

Aislamiento y evaluación de metabolitos individuales: Se recomienda aislar y purificar los principales componentes de los extractos de *Cannabis sativa* L., como cannabinoides, terpenos y flavonoides, para evaluar su actividad antimicrobiana individual. Esto permite identificar los metabolitos más activos, determinar sinergias entre ellos y optimizar futuras formulaciones con base científica.

Estudios preclínicos in vivo: Para validar el potencial terapéutico de los extractos, los estudios in vivo son esenciales para evaluar su eficacia, toxicidad, estabilidad y farmacocinética, así como sus efectos en modelos animales infectados con cepas de MRSA.

Desarrollo de formulaciones tópicas: Dada la actividad antimicrobiana observada, se sugiere evaluar la viabilidad del uso de extractos estandarizados en formulaciones tópicas [geles, cremas o soluciones antisépticas], especialmente para infecciones cutáneas causadas por *Staphylococcus aureus* multirresistente.

Evaluación de los efectos sinérgicos con antibióticos convencionales: Sería interesante analizar si los extractos o compuestos aislados presentan efectos sinérgicos al combinarse con antibióticos convencionales, lo que podría mejorar la eficacia del tratamiento y reducir las dosis requeridas.

Ampliación del espectro bacteriano: Finalmente, se sugiere evaluar la actividad de los extractos frente a otros patógenos clínicamente relevantes, tanto grampositivos como gramnegativos, para determinar su espectro antimicrobiano y su aplicabilidad a otras infecciones.

Bibliografía

- Abkar, L., Wilfart, F. M., Piercey, M., & Gagnon, G. A. (2022). Enhanced Reproducibility and Precision of High-Throughput Quantification of Bacterial Growth Data Using a Microplate Reader. *Journal of Visualized Experiments (JoVE)*, 185, e63849. <https://doi.org/10.3791/63849>
- Aborah, E., Ayitah, M., Boafo, K. F., Ortiz-Alegria, A., Lekshmi, M., Dhanush, C. K., Kumar, S., & Varela, M. F. (2025). Multidrug resistance and major facilitator superfamily antimicrobial efflux pumps of the ESKAPEE pathogen *Staphylococcus aureus*. *Exploration of Drug Science*, 3, 100897. <https://doi.org/10.37349/eds.2025.100897>
- Alba Naranjo, M. N., & Minchala Espinoza, L. A. (2022). *Extracción de aceite esencial de Cannabis sativa L. utilizando dos técnicas de laboratorio, determinando el método más eficiente* [bachelorThesis]. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/23370>
- Ameta, R. K., Soni, K., & Bhattarai, A. (2023). Recent Advances in Improving the Bioavailability of Hydrophobic/Lipophilic Drugs and Their Delivery via Self-Emulsifying Formulations. *Colloids and Interfaces*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/colloids7010016>
- Appendino, G., Gibbons, S., Giana, A., Pagani, A., Grassi, G., Stavri, M., Smith, E., & Rahman, M. M. (2008). Antibacterial cannabinoids from *Cannabis sativa*: A structure-activity study. *Journal of Natural Products*, 71(8), 1427-1430. <https://doi.org/10.1021/np8002673>
- Arias, F. (2012). *El Proyecto de Investigación* (6.^a ed.).
- Blaskovich, M. A. T., Kavanagh, A. M., Elliott, A. G., Zhang, B., Ramu, S., Amado, M., Lowe, G. J., Hinton, A. O., Pham, D. M. T., Zuegg, J., Beare, N., Quach, D., Sharp, M. D.,

- Pogliano, J., Rogers, A. P., Lyras, D., Tan, L., West, N. P., Crawford, D. W., ... Thurn, M. (2021). The antimicrobial potential of cannabidiol. *Communications Biology*, 4(1), 1-18. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01530-y>
- CDC. (2025, junio 27). *Laboratory Testing for Methicillin (oxacillin)-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*. Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA). <https://www.cdc.gov/mrsa/php/laboratories/index.html>
- Chaachouaya, N., Azerouala, A., Bencharkia, B., Douirab, A., & Zidaneb, L. (2023). Cannabis sativa L.: A Review on Traditional Uses, Botany, Phytochemistry, and Pharmacological Aspects. *Traditional and Integrative Medicine*. <https://doi.org/10.18502/tim.v8i1.12407>
- Chen, F.-J., Huang, I.-W., Wang, C.-H., Chen, P.-C., Wang, H.-Y., Lai, J.-F., Shiau, Y.-R., & Lauderdale, T.-L. Y. (2012). mecA-Positive Staphylococcus aureus with Low-Level Oxacillin MIC in Taiwan. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(5), 1679-1683. <https://doi.org/10.1128/JCM.06711-11>
- Cheung, G. Y. C., Bae, Justin S., & Otto, M. (2021). Pathogenicity and virulence of Staphylococcus aureus. *Virulence*, 12(1), 547-569. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1878688>
- Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI). (2025). *CLSI M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. <https://clsi.org/shop/standards/m100/>
- Corzo Barragán, D. C. (2012). Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 43(3), 81-86.

- Di, L., & Kerns, E. H. (2006). Biological assay challenges from compound solubility: Strategies for bioassay optimization. *Drug Discovery Today*, 11(9-10), 446-451.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2006.03.004>
- Esteve, É. P., & Soler, A. R. (2021). *Determinación de la sensibilidad de los microorganismos frente a antimicrobianos de origen natural y la concentración mínima inhibitoria (CMI) por métodos fenotípicos*. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.00213-21>
- Farha, M. A., El-Halfawy, O. M., Gale, R. T., MacNair, C. R., Carfrae, L. A., Zhang, X., Jentsch, N. G., Magolan, J., & Brown, E. D. (2020). Uncovering the Hidden Antibiotic Potential of Cannabis. *ACS Infectious Diseases*, 6(3), 338-346.
<https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00419>
- Giono-Cerezo, S., Santos-Preciado, J. I., Rayo Morfín-Otero, M. del, Torres-López, F. J., Alcántar-Curiel, M. D., Giono-Cerezo, S., Santos-Preciado, J. I., Rayo Morfín-Otero, M. del, Torres-López, F. J., & Alcántar-Curiel, M. D. (2020). Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. *Gaceta médica de México*, 156(2), 172-180.
<https://doi.org/10.24875/gmm.20005624>
- Holm, L. W. (1986). Miscibility and Miscible Displacement. *Journal of Petroleum Technology*, 38(08), 817-818. <https://doi.org/10.2118/15794-PA>
- Hourfane, S., Mechqoq, H., Bekkali, A. Y., Rocha, J. M., & El Aouad, N. (2023). A Comprehensive Review on Cannabis sativa Ethnobotany, Phytochemistry, Molecular Docking and Biological Activities. *Plants*, 12(6), Article 6.
<https://doi.org/10.3390/plants12061245>

IDEXX. (2023). *Guía microbiológica para interpretar la concentración mínima inhibitoria (CMI)*. <https://www.idexx.es/files/mic-gui%CC%81a-microbiolo%CC%81gica-es.pdf>

Instituto Nacional De Investigación en Salud Pública (INSPI). (2023). *Reporte anual de susceptibilidad antibiótica periodo 2022* (p. 34). INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA (INSPI).

Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo (INSST). (2021). *Staphylococcus aureus*. Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo (INSST). <https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/bacterias/staphylococcus-aureus>

Kateete, D. P., Kimani, C. N., Katabazi, F. A., Okeng, A., Okee, M. S., Nanteza, A., Joloba, M. L., & Najjuka, F. C. (2010). Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 9, 23. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-9-23>

Kimmig, A., Hagel, S., Weis, S., Bahrs, C., Löffler, B., & Pletz, M. W. (2021). Management of *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections. *Frontiers in Medicine*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.616524>

Kosgodage, U. S., Matewele, P., Awamaria, B., Kraev, I., Warde, P., Mastroianni, G., Nunn, A. V., Guy, G. W., Bell, J. D., Inal, J. M., & Lange, S. (2019). Cannabidiol Is a Novel Modulator of Bacterial Membrane Vesicles. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00324>

Kuroda, K., Komori, T., Ishibashi, K., Uto, T., Kobayashi, I., Kadokawa, R., Kato, Y., Ninomiya, K., Takahashi, K., & Hirata, E. (2020). Non-aqueous, zwitterionic solvent as an

- alternative for dimethyl sulfoxide in the life sciences. *Communications Chemistry*, 3(1), 163. <https://doi.org/10.1038/s42004-020-00409-7>
- Lagnika, L., Amoussa, A. M. O., Adjileye, R. A. A., Laleye, A., & Sanni, A. (2016). Antimicrobial, antioxidant, toxicity and phytochemical assessment of extracts from *Acmella uliginosa*, a leafy-vegetable consumed in Bénin, West Africa. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 34. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1014-3>
- Lakhundi, S., & Zhang, K. (2018). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4), 10.1128/cmr.00020-18. <https://doi.org/10.1128/cmr.00020-18>
- Lee, A. S., de Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra-Kumar, S., Peschel, A., & Harbarth, S. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 1-23. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.33>
- Malikova, L., Malik, M., Pavlik, J., Ulman, M., Pechouckova, E., Skrivan, M., Kokoska, L., & Tlustos, P. (2024). Anti-staphylococcal activity of soilless cultivated cannabis across the whole vegetation cycle under various nutritional treatments in relation to cannabinoid content. *Scientific Reports*, 14(1), 4343. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-54805-3>
- Martinenghi, L. D., Jønsson, R., Lund, T., & Jenssen, H. (2020). Isolation, Purification, and Antimicrobial Characterization of Cannabidiolic Acid and Cannabidiol from *Cannabis sativa* L. *Biomolecules*, 10(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/biom10060900>
- McPartland, J. M. (2017). (PDF) *Cannabis sativa* and *Cannabis indica* versus “Sativa” and “Indica”. En *ResearchGate*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-54564-6_4

- Meehan-Atrash, J., Luo, W., McWhirter, K. J., Dennis, D. G., Sarlah, D., Jensen, R. P., Afreh, I., Jiang, J., Barsanti, K. C., Ortiz, A., & Strongin, R. M. (2021). *The influence of terpenes on the release of volatile organic compounds and active ingredients to cannabis vaping aerosols*). <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2021/ra/d1ra00934f>
- Meyers, A., Furtmann, C., & Jose, J. (2018). Direct optical density determination of bacterial cultures in microplates for high-throughput screening applications. *Enzyme and Microbial Technology*, *118*, 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.06.016>
- Mira, P., Yeh, P., & Hall, B. G. (2022). Estimating microbial population data from optical density. *PLoS ONE*, *17*(10), e0276040. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0276040>
- Motiejauskaitė, D., Ullah, S., Kundrotaitė, A., Žvirdauskienė, R., Bakšinskaitė, A., & Barčauskaitė, K. (2023). Isolation of Biologically Active Compounds from Cannabis sativa L. Inflorescences by Using Different Extraction Solvents and Evaluation of Antimicrobial Activity. *Antioxidants*, *12*(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/antiox12050998>
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, *4*(2), 10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015>
- Muscarà, C., Smeriglio, A., Trombetta, D., Mandalari, G., La Camera, E., Grassi, G., & Circosta, C. (2021). Phytochemical characterization and biological properties of two standardized extracts from a non-psychotropic Cannabis sativa L. cannabidiol (CBD)-chemotype. *Phytotherapy Research: PTR*, *35*(9), 5269-5281. <https://doi.org/10.1002/ptr.7201>

- Niyangoda, D., Aung, M. L., Qader, M., Tesfaye, W., Bushell, M., Chiong, F., Tsai, D., Ahmad, D., Samarawickrema, I., Sinnollareddy, M., & Thomas, J. (2024). Cannabinoids as Antibacterial Agents: A Systematic and Critical Review of In Vitro Efficacy Against Streptococcus and Staphylococcus. *Antibiotics*, 13(11), 1023.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics13111023>
- OMS. (2024). *La OMS pone al día la lista de bacterias farmacorresistentes más peligrosas para la salud humana*. <https://www.who.int/es/news/item/17-05-2024-who-updates-list-of-drug-resistant-bacteria-most-threatening-to-human-health>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2020). *Resistencia a los antibióticos*.
<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
- Pasachova, Ramirez, & Munoz. (2019). *Staphylococcus aureus: Generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular*.
- Pattnaik, F., Nanda, S., Mohanty, S., Dalai, A. K., Kumar, V., Ponnusamy, S. K., & Naik, S. (2022). *Cannabis: Química, extracción y aplicaciones terapéuticas*. *Chemosphere*, 289, 133012. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133012>
- Pillai, S. K., Kera, N. H., Kleyi, P., Beer, M. de, Magwaza, M., & Ray, S. S. (2024). Stability, biofunctional, and antimicrobial characteristics of cannabidiol isolate for the design of topical formulations. *Soft Matter*, 20(10), 2348-2360.
<https://doi.org/10.1039/D3SM01466E>
- Pillai, S. K., Kera, N. H., Kleyi, P., Beer, M. de, Magwaza, M., & Sinha Ray, S. (2024). Stability, biofunctional, and antimicrobial characteristics of cannabidiol isolate for the design of

- topical formulations. *Soft Matter*, 20(10), 2348-2360.
<https://doi.org/10.1039/D3SM01466E>
- Ramirez, L., & Marin, D. (2009). *METODOLOGIAS PARA EVALUAR IN VITRO LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE COMPUESTOS DE ORIGEN VEGETAL*.
<https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4713047.pdf>
- Ribeiro, A., Alsayyed, R., Oliveira, D., Loureiro, R., & Cabral-Marques, H. (2024).
Cannabinoids from *C. sativa* L.: Systematic Review on Potential Pharmacological Effects
against Infectious Diseases Downstream and Multidrug-Resistant Pathogens. *Future
Pharmacology*, 4(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/futurepharmacol4030033>
- Rivas-Morales, O. B. C., Oranday-Cárdenas, M. A., García-González, M. J. V.-S. S., Leos-Rivas,
C., García-Hernández, D. G., Sánchez-García, E., Castillo-Hernández, S. L., García-
Palencia, P., Moreno-Peña, D. P., Cordero-Pérez, P., Pérez-Hernández, R. A., Ramos-
Ibarra, M. L., Torres-González, L., Cienfuegos-Pecina, E., Ortiz-Martínez, D.-M.,
Martínez-Torres, A. C., Uscanga-Palomeque, A. C., Rodríguez-Padilla, C., Cabello-Ruiz,
E. D., ... Galindo-Rodríguez, S. A. (2019). Investigación en plantas de importancia
médica. En *OmniaScience Monographs*.
<https://www.omniascience.com/books/index.php/monographs/catalog/book/97>
- Rodríguez-Venega, E. de la C., & Fontaine-Ortiz, J. E. (2020). Situación actual de Cannabis
sativa, beneficios terapéuticos y reacciones adversas. *Revista Habanera de Ciencias
Médicas*.
https://www.researchgate.net/publication/354355458_Situacion_actual_de_Cannabis_sativa_beneficios_terapeuticos_y_reacciones_adversas

- Rodríguez-Yzquierdo, G. A., Patiño-Moscoso, M. A., & Betancourt-Vásquez, M. (2021). Caracterización fisiológica en plantas de Cannabis medicinal durante distintas etapas fenológicas bajo estrés biótico. *Universidad de Costa Rica*.
<https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/8064052.pdf>
- Sharapova, A., Ol'khovich, M., Blokhina, S., & Perlovich, G. L. (2022). Experimental Examination of Solubility and Lipophilicity as Pharmaceutically Relevant Points of Novel Bioactive Hybrid Compounds. *Molecules*, 27(19), Article 19.
<https://doi.org/10.3390/molecules27196504>
- Sharma, P., Murthy, P., & Bharath, M. M. S. (2012). Chemistry, Metabolism, and Toxicology of Cannabis: Clinical Implications. *Iranian Journal of Psychiatry*, 7(4), 149-156.
- Stasiłowicz-Krzemień, A., Szymanowska, D., Szulc, P., & Cielecka-Piontek, J. (2024). Antimicrobial, Probiotic, and Immunomodulatory Potential of Cannabis sativa Extract and Delivery Systems. *Antibiotics*, 13(4), 369.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics13040369>
- Stefani, S., & Varaldo, P. E. (2003). Epidemiology of methicillin-resistant staphylococci in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 9(12), 1179-1186.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2003.00698.x>
- Supo, J. (2023, abril 3). *Niveles de investigación*. BIOESTADISTICO.
<https://bioestadistico.com/niveles-de-investigacion>
- Tagen, M., & Klumpers, L. E. (2022). Review of delta-8-tetrahydrocannabinol (Δ^8 -THC): Comparative pharmacology with Δ^9 -THC. *British Journal of Pharmacology*, 179(15), 3915-3933. <https://doi.org/10.1111/bph.15865>

Taylor, T. A., & Unakal., C. G. (2023). *Staphylococcus aureus Infection*.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/>

Taylor, T. A., & Unakal, C. G. (2025). *Staphylococcus aureus Infection*. En *StatPearls*. StatPearls

Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/>

Touaitia, R., Mairi, A., Ibrahim, N. A., Basher, N. S., Idres, T., & Touati, A. (2025).

Staphylococcus aureus: A Review of the Pathogenesis and Virulence Mechanisms.

Antibiotics, 14(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/antibiotics14050470>

Treangen, T. J., Maybank, R. A., Enke, S., Friss, M. B., Diviak, L. F., Karaolis, D. K. R., Koren,

S., Ondov, B., Phillippy, A. M., Bergman, N. H., & Rosovitz, M. J. (2014). Complete

Genome Sequence of the Quality Control Strain *Staphylococcus aureus* subsp. *Aureus*

ATCC 25923. *Genome Announcements*, 2(6), e01110-14.

<https://doi.org/10.1128/genomeA.01110-14>

Trono, D. (2024). *Cannabis sativa: From Plants to Humans*. *International Journal of Molecular*

Sciences, 25(24), Article 24. <https://doi.org/10.3390/ijms252413288>

Umoh, U. F., Thomas, P. S., Essien, E. E., Okokon, J. E., DeLeo, M., Ajibesin, K. K., Flamini,

G., & Eseyin, O. A. (2022a). Corrigendum to "Isolation and characterization of bioactive xanthonones from *Hippocratea africana* (Wild.) Loes. ex Engl. (Celastraceae) [J.

Ethnopharmacol. 280 (2021) 114031]. *Journal of Ethnopharmacology*, 284, 114703.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114703>

Umoh, U. F., Thomas, P. S., Essien, E. E., Okokon, J. E., DeLeo, M., Ajibesin, K. K., Flamini,

G., & Eseyin, O. A. (2022b). Corrigendum to "Isolation and characterization of bioactive xanthonones from *Hippocratea africana* (Wild.) Loes. ex Engl. (Celastraceae) [J.

- Ethnopharmacol. 280 (2021) 114031]. *Journal of Ethnopharmacology*, 284, 114703.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114703>
- van Klingerren, B., & ten Ham, M. (1976). Antibacterial activity of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Antonie van Leeuwenhoek*, 42(1), 9-12. <https://doi.org/10.1007/BF00399444>
- Vanegas, D., Abril-Novillo, A., Khachatryan, A., Jerves-Andrade, L., Peñaherrera, E., Cuzco, N., Wilches, I., Calle, J., & León-Tamariz, F. (2021). *Validation of a method of broth microdilution for the determination of antibacterial activity of essential oils | BMC Research Notes | Full Text*.
<https://bmresnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13104-021-05838-8>
- Vaou, N., Stavropoulou, E., Voidarou, C., Tsigalou, C., & Bezirtzoglou, E. (2021). Towards Advances in Medicinal Plant Antimicrobial Activity: A Review Study on Challenges and Future Perspectives. *Microorganisms*, 9(10), Article 10.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9102041>
- Voza Berardo, M. E., Mendieta, J. R., Villamonte, M. D., Colman, S. L., & Nercessian, D. (2024). Actividades antifúngicas y antibacterianas de las resinas de *Cannabis sativa* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 318, 116839. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2023.116839>
- Winn, Allen, Janda, Koneman, Propcop, Schreckenberger, & Brooks. (2008). *Koneman Diagnostico microbiológico* (6.^a ed.).
- Wuttipong, M., Supawadee, D., Orawan, M., Chantana, B., Charinya, K., CharinyaKhamphukdee, Pakakrong, K., Abdulwaris, M., Poowanarth, M., Juthamart, M., Suresh, A., Kinzo, M., & Yaowared, C. (2025). *Uk-SaiYasna Remedy, a Traditional Thai Medicine, Mitigates Stress-Induced Cognitive Impairment via Keap1-Nrf2 Pathway*.

researchgate. https://www.researchgate.net/figure/Structures-of-cannabidiol-CBD-delta-8-tetrahydrocannabinol-delta-8-THC_fig1_392422250



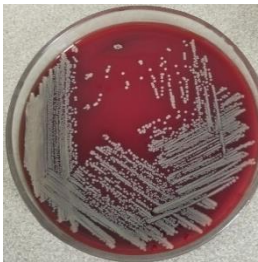

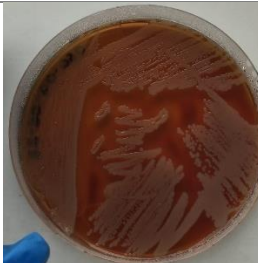


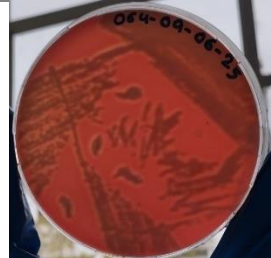
Zouine, N., Ghachtouli, N. E., Abed, S. E., & Koraichi, S. I. (2024). A comprehensive review on medicinal plant extracts as antibacterial agents: Factors, mechanism insights and future prospects. *Scientific African*, 26, e02395. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2024.e02395>











Anexos

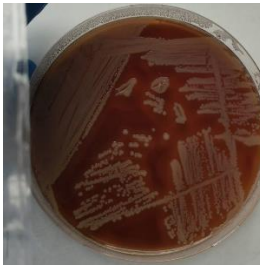




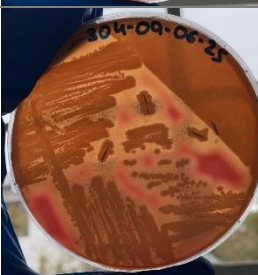


Anexo A. Recuperación de cepas seleccionadas

Tabla 17.

Recuperación de cepas y resiembra en agar sangre

Muestra	Foto	Color	Hemolisis
008		Amarillo	 Beta
030		Gris	 Alfa
060		Amarillo grisáceo	
064		Gris	

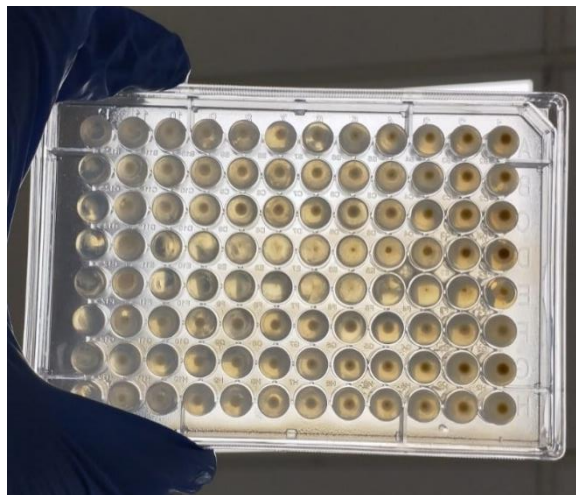
111		Amarillo	-
147		Amarillo grisáceo	
154		Amarillo grisáceo	
182		Amarillo	-
200		Gris	
206		Gris	

247		Amarillo	
268		Amarillo- Grisáceo	
304		Amarillo grisáceo	
320		Amarillo	

Anexo B. Crecimiento en microplaca de cepas bacteriana

Figura 15.

Microplaca de muestra 008



Nota. En la microplaca de la muestra 008, las concentraciones se encuentran de manera descendente, siendo el de la izquierda la concentración más alta y a la derecha la concentración más baja.

Figura 16.

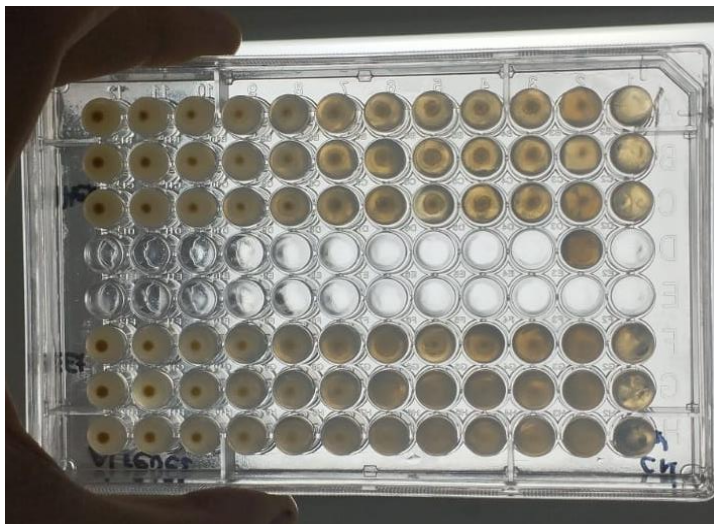
Crecimiento en microplaca de muestra 064



Nota. En la microplaca de la muestra 064, se observa el crecimiento de la cepa frente al aceite de cannabis.

Figura 17.

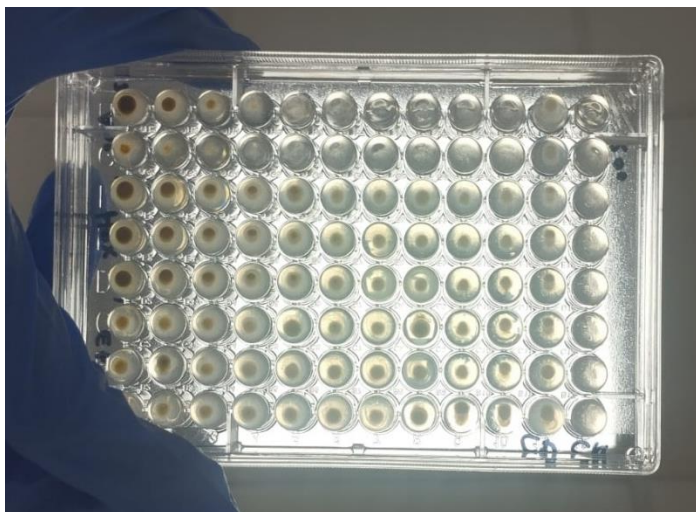
Concentraciones en microplaca de muestra 182



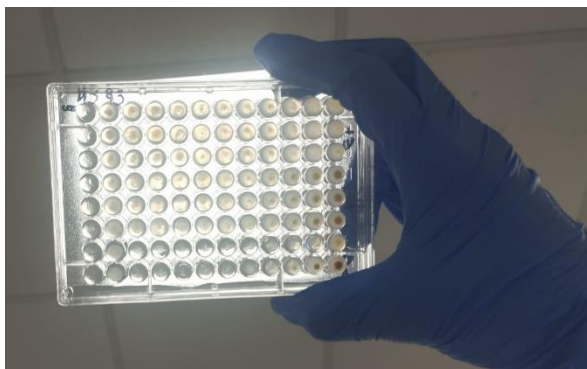
Nota. Crecimiento en microplaca de cepa 182 frente al aceite de cannabis en diferentes concentraciones.

Figura 18.

Crecimiento en microplaca de muestra 206



Nota. Microplaca de la muestra 206, se observa el crecimiento de la cepa frente al aceite de cannabis.

Figura 19.*Microplaca de muestra 268*

Nota. Microplaca de la muestra 268, se observa el crecimiento de la cepa frente al aceite de cannabis a diferentes concentraciones.

Anexo C. Puntos de corte antibióticos para *S. aureus* CLSI M100**Tabla 18.***Puntos de corte antibióticos para *S. aureus* CLSI M100*

Antibiótico	S (\geq mm)	I (mm)	R (\leq mm)
FOX	≥ 22	-	≤ 21
CIP	≥ 21	16-20	≤ 15
SXT	≥ 16	11-15	≤ 10
PEN	≥ 29	-	≤ 28
GEN	≥ 15	13-14	≤ 12
RIF	≥ 20	17-19	≤ 16
OXA1	-	-	-
OXA2	≤ 2	-	≥ 4
ERY	≥ 23	14-22	≤ 13
VAN	≤ 2	4-8	≥ 16
CLI	≥ 21	15-20	≤ 14
LNZ	≥ 21	-	≤ 20
TEC	≤ 8	16	≥ 32

Nota. Adaptado del Manual M100 de Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI), (2025). [FOX]: cefoxitina; [CIP]: ciprofloxacino; [SXT]: trimetoprim-sulfametoxazol; [PEN] penicilina; [GEN]: gentamicina; [RIF]: rifampicina; [OXA]: oxacilina; [ERY]: eritromicina; [VAN]: vancomicina; [CLI]: clindamicina; [LNZ]: linezolid; [TEC]: teicoplanina