



Evaluación del efecto antibacteriano de cannabidiol full spectrum sobre Streptococcus mutans ATCC 25175 y desarrollo de una pasta dental

Evaluation of the antibacterial effect of full spectrum cannabidiol on Streptococcus mutans ATCC 25175 and development of a toothpaste

Avaliação do efeito antibacteriano do canabidiol de espectro total sobre o Streptococcus mutans ATCC 25175 e desenvolvimento de um dentífrico

Luis Eduardo Montesdeoca-Vique ^I

luis.montesdeoca@epoch.edu.ec

<https://orcid.org/0009-0002-4041-792X>

Diego Renato Vinueza-Tapia ^{II}

drvinueza@epoch.edu.ec

<https://orcid.org/0000-0002-6910-0726>

Correspondencia: luis.montesdeoca@epoch.edu.ec

Ciencias de la Salud
Artículo de Investigación

* **Recibido:** 03 de julio de 2024 * **Aceptado:** 29 de agosto de 2024 * **Publicado:** 09 de septiembre de 2024

- I. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- II. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.

Resumen

El objetivo de la investigación fue determinar la susceptibilidad de la bacteria *Streptococcus mutans* ATCC 25175 frente a cannabidiol full spectrum (un concentrado de CBD >52%), para su inclusión en una formulación cosmética de una pasta dental. Para probar la sensibilidad de la bacteria frente a CBD full spectrum a distintas concentraciones, se utilizó el método de difusión en disco en comparación a un patrón (clorhexidina) y blanco (dimetilsulfóxido 25%, o agua estéril). Posteriormente, para incluir el CBD full spectrum a la formulación de la pasta dental se aplicó un diseño simplex-centroide de la metodología de superficie de respuesta para optimizar la viscosidad a un valor objetivo. Finalmente, se comprobó la actividad antibacteriana de CBD full spectrum frente a *S. mutans* ATCC 25175 a niveles comparables a la clorhexidina y se desarrolló una pasta dental optimizada a un valor de viscosidad adecuado para su uso cosmético.

Palabras Clave: *Streptococcus mutans*; cannabidiol full spectrum; dentífrico; antibacteriano.

Abstract

The objective of the research was to determine the susceptibility of the bacteria *Streptococcus mutans* ATCC 25175 to full spectrum cannabidiol (a CBD concentrate >52%), for its inclusion in a cosmetic formulation of a toothpaste. To test the sensitivity of the bacteria to full spectrum CBD at different concentrations, the disk diffusion method was used in comparison to a standard (chlorhexidine) and blank (25% dimethyl sulfoxide, or sterile water). Subsequently, to include the full spectrum CBD in the toothpaste formulation, a simplex-centroid design of the response surface methodology was applied to optimize the viscosity to a target value. Finally, the antibacterial activity of full spectrum CBD against *S. mutans* ATCC 25175 was verified at levels comparable to chlorhexidine and an optimized toothpaste was developed at a viscosity value suitable for cosmetic use.

Keywords: *Streptococcus mutans*; full spectrum cannabidiol; toothpaste; antibacterial.

Resumo

O objetivo da investigação foi determinar a suscetibilidade da bactéria *Streptococcus mutans* ATCC 25175 ao canabidiol de espectro total (um concentrado de CBD >52%), para inclusão na formulação cosmética de uma pasta de dentes. Para testar a sensibilidade das bactérias ao CBD de espectro total em diferentes concentrações, foi utilizado o método de difusão em disco em

comparação com um padrão (clorexidina) e um branco (dimetilsulfóxido a 25% ou água estéril). Posteriormente, para incluir o CBD de espectro completo na formulação da pasta de dentes, foi aplicado um design simplex-centróide da metodologia de superfície de resposta para otimizar a viscosidade para um valor alvo. Finalmente, a atividade antibacteriana do espectro completo do CBD contra o *S. mutans* ATCC 25175 foi verificada a níveis comparáveis aos da clorexidina e foi desenvolvido um dentífrico otimizado com um valor de viscosidade adequado para uso cosmético.

Palavras-chave: Streptococcus mutans; canabidiol de espectro total; dentífrico; antibacteriano.

Introducción

Dentro de las patologías a nivel bucal se pueden citar la caries dental, periodontitis severa, halitosis, la pérdida de piezas dentales, entre las más comunes. La caries dental no tratada representa la patología con mayor prevalencia con aproximadamente un 32% de la población mundial afectada (OMS/FAO, 2022). A nivel de Latinoamérica, de modo particular en aquellos países con deficiencias tanto de acceso a servicios de salud oral, así como; educación relacionada a la higiene bucal la prevalencia de caries dental es considerable, con tasas que se modifican según edad, género, características socioeconómicas y ubicación geográfica. En tal contexto existe una prevalencia de 79% de caries en la dentición primaria y 93% en la dentición permanente en niños de Latinoamérica (Frencken et al., 2017). En el Ecuador la caries dental representa un serio problema de salud pública, con elevada prevalencia en la población. En relación a estudios publicados, la prevalencia de caries en adolescentes de 12 a 15 años es del 80.8%, de esta circunstancia la necesidad de hacer énfasis a esfuerzos de naturaleza preventiva y de tratamiento para reducir en medida de lo posible la caries dental en la población (Valarezo et al., 2015). Por otra parte, es conocido el efecto antibacteriano del cannabidiol, lo cual podría convertirla en una molécula de interés para combatir diversos tipos de infecciones (Narayanan & Elshaari, 2018).

Metodología

Obtención del concentrado de cannabidiol full spectrum

El concentrado de cannabidiol full spectrum fue adquirido a la empresa CBD Solutions SAS, con sede en Quito, Ecuador, según reporta la empresa el método de extracción es CO₂ supercrítico, el

producto viene acompañado de un certificado de análisis realizado por Laboratorio LASA acreditado en Ecuador con N° SAE LEN 06-002 (Lambert & Park, 2018).

Composición química del concentrado de cannabidiol full spectrum

El certificado de análisis detalla la composición del concentrado de cannabidiol full spectrum, en términos de cannabinoides. La composición reportada de cannabinoides es: 52,15% CBD, 1,5% THC, 6,9% CDB-A, <0.00909% THC-A, todos en %p/p según certificado de análisis. El método de ensayo corresponde a PEE.LASA.INS.16 AOAC.2018.11, el cual consiste en cromatografía líquida acoplada a detector de arreglo de diodos o alternativamente espectrometría de masas (UHPLC-DAD/MS) (Valenti & Zoccali, 2020). El concentrado de cannabidiol full spectrum fue usado diluido en soluciones acuosas de dimetilsulfóxido para las pruebas antimicrobianas.

Actividad antimicrobiana

La cepa *Streptococcus mutans* ATCC 25175 de la marca KwikStik™ fue adquirida a CAPILAB S.A.S. con sede en Quito, Ecuador. Para la activación de *S. mutans* se usó como medio de cultivo agar BHI (Brain Heart Infusion) y condiciones anaeróbicas en una incubadora Thermo Scientific – Heratherm modelo IGS 60, a una temperatura de 35±0.5°C. Las pruebas de actividad antimicrobiana se realizaron mediante el método de difusión en disco (Kirby-Bauer), para lo cual se preparó una suspensión con colonias de 18-20 h de crecimiento (fase exponencial) en suero fisiológico estéril, la turbidez fue ajustada a 0.5 McFarland, y fueron estriadas en placas Petri con agar Mueller Hinton (Hakimiha et al., 2014). Se cargaron discos en blanco con las soluciones tanto del patrón de comparación clorhexidina 0.05% (15 mm), 0.12% (17 mm), 0.2% (19 mm) y 2.0% (29 mm) como las de cannabidiol full spectrum a diversas concentraciones 0.15%, 1.0%, 2.5%, 5.0% y 25% (expresadas como CBD); además de una solución de dimetilsulfóxido (DMSO) 25% v/v en agua como blanco, que fueron incorporados a las placas y luego incubados en las condiciones descritas (Steinberg et al., 2019). Se comprobaron previamente la solubilidad de las sustancias en soluciones de DMSO (cannabidiol full spectrum) o agua estéril (gluconato de clorhexidina) y la tolerancia de la cepa de *S. mutans* frente al DMSO, obteniendo que el microorganismo es capaz de soportar concentraciones de hasta 50% v/v de dimetilsulfóxido sin sufrir alteraciones en su desarrollo (Gonçalves et al., 2019).

Formulación de la pasta dental

Los ingredientes incluidos en la fórmula fueron seleccionados en atención a la categoría funcional de los excipientes, y máxima potencia por unidad de dosis, según la base de ingredientes inactivos de la FDA. La formulación desarrollada es una pasta acuosa y los componentes básicos se describen en la Tabla 1 (Kumar & Yadav, 2018).

Tabla 1: Límites de ingredientes inactivos según FDA.

Compuesto	Máxima potencia por unidad de dosis, %
Carbonato de Calcio	50
Laurilsulfato de Sodio	1.4
Glicerina	18
Sacarina de Sodio	0.2
Metilparabeno	0.05
Propilparabeno	NA
Mentol	4.7
Agua	-

Diseño experimental

Para la generación de las combinaciones del experimento se aplicó el diseño simplex centroide correspondiente a la metodología de superficie de respuesta (Uygun et al., 2020). El objetivo fue determinar la combinación de polímeros que exprese valores de viscosidad optimizados en términos de un valor objetivo. Se tomaron en cuenta 3 excipientes viscosantes: carboximetilcelulosa sódica, goma xantán e hidroxietilcelulosa (CMC, GOM y HEC) obteniendo la secuencia que se describe en la Tabla 2 (Botelho et al., 2020).

Tabla 2: Combinaciones de polímeros para la generación de formulaciones del dentrífico.

Compuesto
Carboximetilcelulosa + Goma xantán
Carboximetilcelulosa + Hidroxietilcelulosa
Goma xantán + Carboximetilcelulosa
Goma xantán + Hidroxietilcelulosa
Hidroxietilcelulosa + Carboximetilcelulosa

Hidroxietilcelulosa + Goma xantán

Se utilizó el programa Minitab® versión 18, aplicando un diseño de mezclas de vértices extremos de grado 2, sin puntos centrales y axiales. Lo anterior en consecuencia de que en pruebas preliminares se demostró que la mezcla de 3 viscosantes origina desestabilización física de la formulación.

Resultados y discusión

Del ensayo de actividad antimicrobiana, se demuestra la sensibilidad de *S.mutans* ATCC 25175 frente al concentrado de CBD full spectrum evaluado (Thomford et al., 2018). En función de los valores de referencia según se indica en la Tabla 3, la sensibilidad del microorganismo inicia a partir de la mínima concentración ensayada. Asimismo, se verifica el comportamiento directamente proporcional de la concentración frente al nivel de sensibilidad.

Tabla 3: Concentración de CBD full spectrum vs. Halos de inhibición

Concentración expresada en CBD, %	Resultados	Interpretación	Valores de Referencia
25.0	21±0.1 mm	Sensible	Sensible ≥ 12 mm Medianamente sensible 10-11 mm Resistente ≤9mm
5.00	20±0.2 mm	Sensible	
2.50	16±0.2 mm	Sensible	
1.00	14±0.3 mm	Sensible	
0.15	12±0.4 mm	Sensible	

Valores expresados como promedio ± desviación estándar, n = 5

En la Tabla 4 se indican los resultados de viscosidad para cada una de las 6 formulaciones a dos réplicas para un total de 12 formulaciones (Silverson Machines Ltd., 2022). Para cada combinación con su respectiva réplica se describen valores de viscosidad con una relativa baja diferencia, debido a distintas variables como la velocidad de mezclado o las diferencias intrínsecas de las materias primas, por ejemplo, la aireación, dado que de modo general los polvos contienen un porcentaje significativo de aire interparticular y el detergente “tensoactivo” puede ahondar este problema (Silverson, 2022).

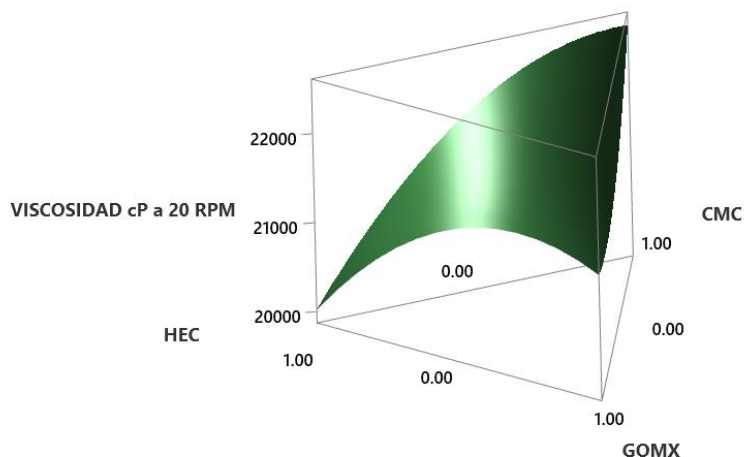
Tabla 4: Resultados de viscosidad a 20 rpm para las corridas planteadas en el DOE.

Orden de Corrida	TipoPt	Bloques	CMC	HEC	GOMX	Viscosidad, cP
1	1	1	0	0	1	21226.85
2	1	1	1	0	0	22401.60
3	1	1	0	1	0	20006.93
4	2	1	0	0.5	0.5	21282.28
5	2	1	0.5	0	0.5	21345.74
6	2	1	0.5	0.5	0	21827.83
7	1	1	0	0	1	21345.70
8	1	1	1	0	0	22532.30
9	1	1	0	1	0	20032.43
10	2	1	0	0.5	0.5	21453.50
11	2	1	0.5	0	0.5	21387.40
12	2	1	0.5	0.5	0	21964.90

Los resultados del coeficiente de regresión en función al diseño de mezclas aplicado, se verifica que para las mezclas de los modificadores del comportamiento reológico, tales poseen un valor $p < 0.05$, por ende, se infiere que los resultados presentan diferencias significativas desde el punto de vista estadístico, lo que sugiere que la variable en cuestión tiene un efecto importante en los resultados de los experimentos desarrollados (Montgomery, 2017; Myers et al., 2016).

En torno al factor de inflación de la varianza (fiv) en todos los casos tiene un valor de 1.5, lo que explica que no existe multicolinealidad significativa, debido a que valores por encima de 10 suelen indicar problemas de multicolinealidad (Kutner et al., 2005; Hair et al., 2010). Lo anterior implica que las variables en el modelo no están íntimamente correlacionadas, lo que es deseable en un diseño experimental. Finalmente, de manera general, los valores $p = 0$ y FIV de 1,50 sugieren que el modelo es adecuado y que las variables independientes están contribuyendo de manera significativa a explicar la variabilidad en la variable de respuesta (Myers et al., 2016).

Figura 1: Viscosidad vs cantidad de viscosantes



Luego, en la Figura 1, se detalla la gráfica de ajuste, en donde se puede comprobar lo expuesto en la gráfica de probabilidad Figura 2, pues se observa una dispersión aleatoria de los puntos alrededor de la línea horizontal en cero. Lo anterior indica que los residuos “errores” no están relacionados de forma sistemática con los valores ajustados, representando a su vez una señal de que el modelo es adecuado para los datos (Montgomery, 2017). En la región de diseño experimental se observan los valores extremos para cada factor donde se muestra cómo la variable de respuesta cambia cuando varían los factores a la vez: Se determinó que la región de la superficie donde la respuesta es máxima cuando existe la adición únicamente de CMC, mientras que la respuesta mínima se evidencia hacia la HEC y un valor relativamente intermedio para la GOMx (Anderson & Whitcomb, 2016).

Figura 2: Gráfica de probabilidad normal a Viscosidad cP a 20 RPM.

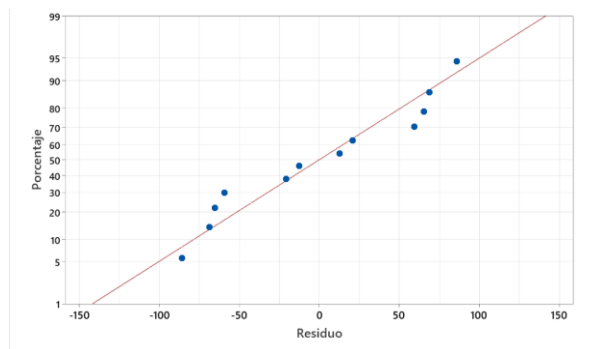
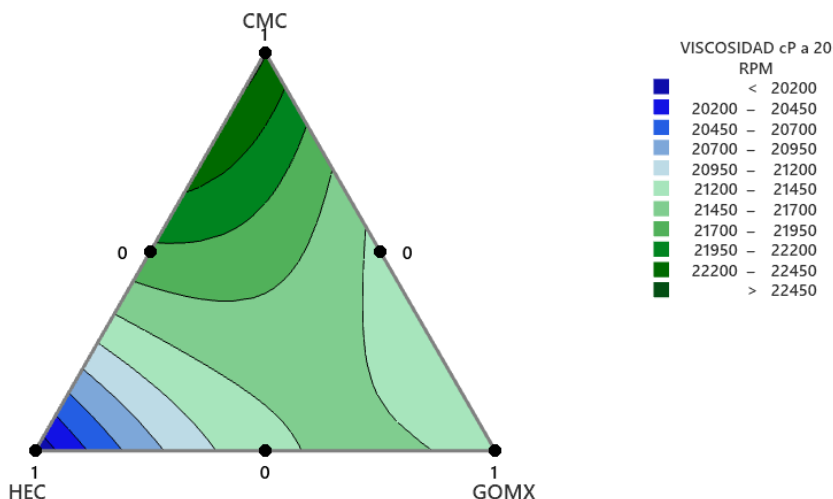


Figura 3: Gráfica de contorno de mezcla para Viscosidad cP a 20 RPM.



En la Figura 3, se muestra cómo cambia la respuesta en función de la cantidad de agentes viscosantes. Se determinó que los contornos más cercanos muestran regiones donde la respuesta es constante, de tal forma que nos permite inferir cuáles son las áreas óptimas y subóptimas de los factores para optimizar la viscosidad a 20850 cP, en este caso la tercera región de color celeste es la zona ideal pues está dentro del rango de: 20700 a 20950, además la forma de este espacio nos indica interacciones mínimas entre los factores en este caso CMC Y HEC (Anderson & Whitcomb, 2016).

Conclusiones

Ha quedado demostrada la utilidad práctica de CBD full spectrum como agente antibacteriano frente a *Streptococcus mutans*, a concentraciones tan bajas como 0,15%, lo cual transforma a este recurso en una herramienta fundamental para la lucha contra las enfermedades periodontales y la caries de modo particular. Adicionalmente, mediante la aplicación de un diseño de mezclas de vértices extremos, fueron optimizados satisfactoriamente los componentes en la formulación a una mezcla de viscosantes de 81,90% CMC y 18,10% HEC para la formulación final en términos de viscosidad, misma que posteriormente se comprobó a nivel experimental.

Declaratoria

Una versión temprana de los hallazgos de esta investigación fue presentada en una memoria de trabajo de grado titulada “*Diseño, formulación y control de calidad de un dentífrico anticariogénico a base de cannabidiol*” de nuestra autoría y diseño.

Conflicto de interés

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses con respecto a la publicación de este artículo.

Referencias

1. Anil, S., Anand, P. S., & Al Sherbini, K. (2017). Oral health knowledge, attitude, and practices among school children in Qatar: A school-based survey. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry*, 7(2), 79-85. doi:10.4103/jispcd.JISPCD_213_17.
2. 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. doi:10.1021/np8002673.
3. Bhat, S., Hegde, K. S., George, G. B., & Gautham, S. (2019). Cannabidiol: An emerging therapeutic molecule for oral health management. *Journal of Oral Health and Dentistry*, 21(2), 102-109.
4. Botelho, J., Machado, V., Leira, Y., & Mendes, J. J. (2020). Periodontitis and dental caries in children and adolescents: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology*, 47(8), 865-875. doi:10.1111/jcpe.13323.
5. Costa, G., Rocha, L., & Da Silva, L. (2021). Efficacy of Cannabidiol as an Antibacterial Agent against Oral Pathogens. *International Journal of Dentistry*, 2021, 1-8. doi:10.1155/2021/7678694.
6. Frencken, J. E., Sharma, P., Stenhouse, L., Green, D., Lavery, D., & Dietrich, T. (2017). Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis – A comprehensive review. *Journal of Clinical Periodontology*, 44(S18), S94-S105. doi:10.1111/jcpe.12677.

7. Gonçalves, L. S., Junior, A. S. A., & Dos Santos, M. B. (2019). Streptococcus mutans: A comprehensive review on its virulence factors. *European Journal of Dentistry*, 13(3), 465-471. doi:10.1055/s-0039-1697458.
8. Hakimiha, N., Afshar, H., Chiniforush, N., Jafari, Z., & Beyabanaki, E. (2014). Comparison of antimicrobial effects of photodynamic therapy, diode laser, and chlorhexidine gluconate mouthwash on Streptococcus mutans: An in vitro study. *Journal of Lasers in Medical Sciences*, 5(3), 125-130.
9. Kozłowski, M., & Sedykh, D. (2019). Investigation of bioadhesive and antimicrobial properties of toothpaste formulations containing cannabidiol. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(4), 2027-2033. doi:10.13040/IJPSR.0975-8232.
10. Kumar, A., & Yadav, R. (2018). A review on recent advances in toothpaste formulation and strategies for delivering therapeutic agents to the oral cavity. *Journal of Oral Health and Dental Management*, 17(2), 59-64.
11. Lambert, J. D., & Park, M. H. (2018). Supercritical CO₂ extraction of cannabis: Modeling, simulation, and analysis. *Journal of Supercritical Fluids*, 133, 137-145. doi:10.1016/j.supflu.2017.11.008.
12. Narayanan, A., & Elshaari, F. (2018). The Antibacterial Effect of Cannabidiol and its Potential Use as an Alternative Therapy for Oral Diseases: A Review. *Journal of Cannabis Research*, 2(1), 1-10.
13. OMS/FAO. (2022). Informe sobre la situación mundial de la salud bucodental 2022. Organización Mundial de la Salud. Recuperado de <https://www.who.int>.
14. Silversen Machines Ltd. (2022). The effect of high shear mixing on powder dispersion and dissolution. Recuperado de <https://www.silversen.com>.
15. Steinberg, D., Feldman, M., & Weiss, E. I. (2019). Cannabidiol for oral health: Potential use as an antibacterial agent. *Journal of Cannabis Research*, 1(1), 1-8. doi:10.1186/s42238-019-0005-4.
16. Thomford, N. E., Senthebane, D. A., & Rowe, A. (2018). Cannabidiol: Pharmacology, therapeutic effects, and the anti-inflammatory effects in periodontal disease. *Journal of Periodontology Research*, 53(3), 278-285. doi:10.1111/jre.12513.

17. Uygur, O., Durmaz, E., & Yildiz, Y. (2020). Application of surface response methodology for optimization of formulation and processing conditions of toothpaste containing natural ingredients. *Journal of Cosmetic Science*, 71(3), 193-205.
18. Valarezo, F., Rivera, J., Cuesta, E., & Arias, A. (2015). Epidemiología de la caries dental en adolescentes de 12 a 15 años en Ecuador. *Revista de Salud Pública*, 17(3), 310-320.
19. Valenti, A., & Zoccali, M. (2020). High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection (HPLC-DAD) for the Determination of Cannabinoids in *Cannabis sativa* L. Extracts. *Journal of Chromatographic Science*, 58(1), 89-96. doi:10.1093/chromsci/bmz103.
20. Van Dijk, M. P., Dolezel, R., & Moutsopoulos, N. M. (2021). Cannabinoids and their application in the treatment of oral diseases: A narrative review. *Frontiers in Oral Health*, 2, 55. doi:10.3389/froh.2021.702183.

© 2024 por los autores. Este artículo es de acceso abierto y distribuido según los términos y condiciones de la licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0) (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>).