



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

Programa de Posgrados

**VALIDACIÓN DE UNA TÉCNICA DE DETECCIÓN DE THC Y CBD
EN SUERO SANGUÍNEO DE PERROS MEDIANTE HPLC-UV**

SANTIAGO SOSA MAYUNCALDI

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

URUGUAY

AÑO 2023



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**VALIDACIÓN DE UNA TÉCNICA DE DETECCIÓN DE THC Y CBD
EN SUERO SANGUÍNEO DE PERROS MEDIANTE HPLC-UV**

SANTIAGO SOSA MAYUNCALDI

Dra. Silvana Alvariza

Directora de Tesis

Dra. Carmen García y Santos

Co-directora

AÑO

2023

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

Gonzalo Suárez; DMTV, MSc, PhD

Facultad de Veterinaria

Universidad de la República – Uruguay

Andrea Fernández; DCV, MSc, PhD

Facultad de Veterinaria

Universidad de la República – Uruguay

Pedro Zeinsteger; MV, Esp, PhD

Facultad de Ciencias Veterinaria

Universidad Nacional de La Plata- Argentina

AÑO

2023



Centro de Posgrados
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República

ACTA DEFENSA DE TESIS DE MAESTRIA

ORIENTACIÓN: SALUD ANIMAL

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: FVET, 13/12/2023

TRIBUNAL: GONZALO SUAREZ, ANDREA FERNANDEZ, PEDRO ZEINSTEGER

CI	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
3982262-1	SOSA, SANTIAGO	SSS	12

NOTA: La calificación mínima para aprobar la defensa es B.B.B (6)

Gonzalo Suarez

ANDREA
FERNANDEZ

Pedro Zeinsteiger

TRIBUNAL

FIRMA

DEDICATORIAS Y/O AGRADECIMIENTOS

Quiero dedicar este trabajo a Adri y Anahí, su amor y comprensión de todos los días me hacen cada día más feliz, no tengo palabras para agradecer el amor que me brindan en cada despertar, su apoyo ha sido incondicional en este largo trabajo, gracias por comprender y siempre estar pase lo que pase...

A mis viejos Mario y Raquel y hermanos Rubén y Mario que estoy culminando esta nueva etapa en mi vida gracias a su amor, apoyo y confianza que me dieron allá por el 2003 cuando decidí realizar esta carrera, la vida me llevo a dedicarme a esto, ser docente universitario, sin dudas una profesión que me conquisto, siendo difícil para ellos que no me tengan el día a día, ahí, con ellos, pero con todo su amor y comprensión entendieron que era mi pasión a ellos también les quiero dedicar este esfuerzo y logro. Gracias.

Gracias a mis más que tutoras Carmen García y Santos y Silvana Alvariza por toda la dedicación que le han puesto para que pudiera terminar esta etapa, por su cuidado y confianza, su apoyo y dedicación han sido fundamentales para que este día llegara. Gracias

Gracias a Nadia Crosignani por haber confiado en mí y motivado todo este tiempo para que este trabajo saliera adelante, siempre con esa alegría y apoyo para llegar.

A mis compañeros y compañera de Toxicología, “*los tóxicos*” los que están, Alejandra Capelli, Ana Cecilia Corro, Joaquín Heredia, Mariana Perdomo, Bruno Canneva y a los que hoy no nos acompañan por las vueltas de la vida, pero que también son importantes en todo este proceso vivido, Anita Ingold, Leticia Guerra, Nadia Coppola, Dahiana Greno, Alejandra Mondino, y Clarisa Brighenti, todos ellos y ellas también son parte de este logro, sin su apoyo y palabra de aliento este trabajo no hubiera culminado, gracias infinitas.

A los compañeros y compañeras de Farmacología Vernadet “Peco” Bianchinotti, Diego Robaina, Cristian Valiente, que sin dudas han sido fundamentales en este trabajo, su dedicación para brindarme todo y estar ahí en todo momento, sin dudas hizo que todo fuera más fácil, siempre con esa palabra de aliento y alegría.

A Guillermo Cazulli, Leticia Diana y Eli Lancaster que en este último tirón han estado ahí haciendo el aguante.

A la banda amiga que me aguanta el corazón, Salú! Que por suerte son un montón, gracias por siempre estar!

A Erika Gutierre, Silvina Bonilla, Silvana Ures, Sofia Borgno y el Laboratorio de Análisis clínicos todos sus funcionarios docentes y no docentes por colaborar con este trabajo, sin ellos y ellas este trabajo no se hubiera concretado.

A Carlos García por su predisposición a colaborar siempre y tener esa buena energía para que este trabajo se pudiera concluir.

Al tribunal que participó en la defensa de la propuesta de tesis, Gonzalo Suárez, Cecilia Scorza y Pedro Zeinsteger, sus aportes y comentarios de aquel día hicieron sin dudas que este trabajo llegara a concretarse, gracias por la buena energía.

A las y los compañeras y compañeros del Departamento de Patobiología, que nos encontró para bien en este nuevo espacio todas y todos, sin dudas que muchos de ellos y ellas estarán contentos porque este día llego. Gracias.

A la Facultad de Veterinaria y la educación pública y gratuita de nuestro país, impensado que un hijo de obrero y primero en la familia con estudios terciarios haya llegado hasta acá si no tuviéramos el privilegio de elegir que estudiar.

INDICE

DEDICATORIAS Y/O AGRADECIMIENTOS	I
LISTA DE TABLAS.....	V
LISTA DE FIGURAS.....	VI
RESUMEN	VII
SUMMARY	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.....	2
2.1. Características botánicas de <i>Cannabis</i> sp.....	2
2.2. Descripción de las moléculas presentes en <i>Cannabis</i>	3
<i>Fitocannabinoides</i>	4
<i>Sistema endocannabinoide</i>	5
<i>Cannabinomiméticos sintéticos</i>	6
2.3 Uso de <i>Cannabis</i> en Medicina Veterinaria.....	7
2.4. Intoxicación por <i>Cannabis</i> en animales domésticos	8
2.5. Desarrollo y validación de técnicas analíticas	10
<i>Definición de los parámetros analíticos:</i>	11
2.6 Preparación de la muestra.....	12
<i>Extracción líquido-líquido</i>	12
<i>Precipitación de proteínas</i>	13
<i>Extracción en fase sólida</i>	13
2.7 Cromatografía Líquida	14
<i>Fase móvil</i>	14
<i>Fase estacionaria</i>	14
<i>Términos y conceptos básicos</i>	15
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
4. HIPÓTESIS.....	18
5. OBJETIVOS	18
5.1. Objetivo general	18
5.2. Objetivos específicos.....	18
6. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN	19
6.1. Técnica Zgair <i>et al.</i> (2015)	19
6.1.1 Materiales y métodos.....	19
6.1.2 Resultados y discusión	22
6.2 Técnica Mercolini <i>et al.</i> (2008)	28

6.2.1 Materiales y métodos.....	28
6.2.2 Resultados y discusión	29
6.2.3 Validación de la técnica de Mercolini <i>et al.</i> 2008.	34
7. DISCUSIÓN GENERAL	38
8. CONCLUSIONES	41
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	42
ANEXO I.....	50
ANEXO II.....	54

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Concentración de las soluciones de trabajo empleadas para la elaboración de la curva de calibración.	20
Tabla 2. Concentración de las soluciones de trabajo para la evaluación de la exactitud y precisión.....	20
Tabla 3. Resumen de la técnica original y las modificaciones ensayadas de la técnica de Zgair <i>et al.</i> (2015)	26
Tabla 4 Resumen de la técnica original y las modificaciones ensayadas de la técnica de Mercolini <i>et al.</i> (2008).....	33
Tabla 5. Valores de Precisión y Exactitud para los tres niveles ensayados.....	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tricomias de <i>Cannabis sativa</i>.	3
Figura 2. Esquema de la formación de los principales Fitocannabinoides	5
Figura 3. Cromatogramas técnica Zgair <i>et al.</i> (2015) Suero blanco y Punto 3 extracción simple	23
Figura 4. Cromatogramas técnica Zgair <i>et al.</i> (2015). Punto 3, 500 μL	24
Figura 5. Cromatogramas técnica Zgair <i>et al.</i> (2015). Punto 3, 500 μL, doble extracción	25
Figura 6. Cromatogramas Mercolini <i>et al.</i> (2008). Suero blanco y Punto 3	30
Figura 7. Cromatogramas técnica Mercolini <i>et al.</i> (2008). Punto 3, columna XDB-C8, SPE C8 SUPELCO Discovery™ y SPE C8 Strata Phenomenex	32
Figura 8. Curvas de calibración para CBD (A) y THC (B).	36

RESUMEN

Cannabis es una de las drogas recreativas más consumidas en el mundo, en nuestro país ocupa el cuarto lugar en términos de consumo. Esta planta presenta una extraordinaria diversidad química. Se han identificado más de 500 compuestos, de los cuales 125 son cannabinoides, de estos el Δ^9 -Tetrahidrocannabinol (THC) y el Cannabidiol (CBD) son los principales y más ampliamente estudiados. Además de los cannabinoides, el *Cannabis* contiene fenoles, flavonoides, terpenos y alcaloides, entre otras moléculas. Esta amplia gama de principios activos ha permitido explorar otros usos, además del recreativo, especialmente en el campo terapéutico. Aunque existe una vasta literatura científica sobre el cannabis en medicina humana, especialmente en el tratamiento del dolor y diversas enfermedades, en medicina veterinaria la investigación es más limitada. En este ámbito, el cannabis se ha destacado por su posible uso en el manejo del dolor, control de la epilepsia, tratamiento de la dermatitis atópica y la modulación de alteraciones en el comportamiento en perros. Sin embargo, su aplicación es más restringida hasta el momento en otras especies, como equinos y felinos. Dada la evolución hacia la legalización y regulación de la producción y comercialización de cannabis con fines recreativos, medicinales e industriales en nuestro país, es que nos propusimos como objetivo desarrollar y validar una técnica analítica de HPLC-UV en suero de perros para la detección y cuantificación de cannabinoides como el CBD y THC. Para lograr este objetivo, se han evaluado dos técnicas publicadas, que difieren tanto en el método de extracción de THC y CBD del suero (extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida), como en las condiciones cromatográficas. Se han considerado los principales parámetros necesarios para validar una técnica analítica, la selectividad, linealidad, precisión, exactitud, especificidad, estabilidad, reproducibilidad y límite inferior de cuantificación y de detección. En nuestras condiciones de trabajo, la técnica basada en extracción líquido-líquido no logró alcanzar la selectividad adecuada en la extracción de los analitos, lo que resultó en una baja resolución cromatográfica entre estos y otros componentes del suero. Por otro lado, la técnica de extracción en fase sólida, mediante la introducción de modificaciones, permitió cuantificar los cannabinoides en un rango lineal de 10-500 ng/mL para CBD y de 30-500 ng/mL para THC, con un coeficiente de correlación (R^2) superior a 0.99. La técnica validada demostró una precisión y exactitud satisfactorias, con valores entre 80% y 120% para los tres niveles especificados. A su vez, las soluciones séricas y metanólicas mantuvieron su estabilidad por más de 6 meses a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Este método, basado en la técnica desarrollada por Mercolini *et al.* (2008) con adaptaciones, permite la determinación de los fitocannabinoides CBD y THC en suero canino, facilitando el diagnóstico de intoxicaciones, la optimización de tratamientos farmacológicos y el desarrollo de estudios de farmacocinética básica de estos compuestos.

SUMMARY

Cannabis is one of the most widely consumed recreational drugs in the world; in our country, it ranks fourth in terms of consumption. This plant exhibits an extraordinary chemical diversity, with over 500 identified compounds, 125 of which are cannabinoids. Among these, Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) and Cannabidiol (CBD) are the most prominent and studied. In addition to cannabinoids, *Cannabis* contains phenols, flavonoids, terpenes, and alkaloids, among other molecules. This wide range of active principles has made it possible to explore other uses beyond recreational, especially in the therapeutic field. Although there is a vast scientific literature on cannabis use in human medicine, especially in the treatment of pain and various diseases, research in veterinary medicine is more limited. In this field, cannabis has been highlighted for its potential use in pain management, epilepsy control, treatment of atopic dermatitis, and modulation of behavioral alterations in dogs. However, its application is more restricted to other species, such as equines and felines. Given the evolution towards the legalization and regulation of the production and commercialization of cannabis for recreational, medicinal, and industrial purposes in our country, which has greatly increased the availability of these substances, we set out to develop and validate an analytical HPLC-UV technique in dog serum for the detection and quantification of cannabinoids such as CBD and THC. To achieve this objective, two published techniques have been evaluated, differing both in the method of extraction of THC and CBD from serum (liquid-liquid extraction and solid-phase extraction) and the chromatographic conditions. The main parameters necessary to validate an analytical technique, selectivity, linearity, precision, accuracy, specificity, stability, reproducibility and lower limit of quantification and detection were considered. Under our working conditions, the technique based on liquid-liquid extraction failed to achieve adequate selectivity in the extraction of the analytes, resulting in a low chromatographic resolution between these and other serum components. On the other hand, solid-phase extraction technique, with modifications, allowed for quantification of cannabinoids in a linear range of 10-500 ng/mL for CBD and 30-500 ng/mL for THC, with a correlation coefficient (R^2) greater than 0.99. The validated technique demonstrated satisfactory precision and accuracy, with values between 80% and 120% for the three specified levels. Additionally, the serous and methanolic solutions remained stable for over six months at -20°C . This method, based on that developed by Mercolini *et al.* (2008) with adaptations, allows the determination of CBD and THC phytocannabinoids in canine serum, facilitating the diagnosis of intoxications, the optimization of pharmacological treatments, and the development of basic pharmacokinetic studies of these compounds.

1. INTRODUCCIÓN

Cannabis es una de las drogas recreativas más consumida en el mundo, ocupando el cuarto lugar en nuestro país, luego del alcohol, tabaco y tranquilizantes con y sin prescripción médica (Ramírez *et al.*, 2019). *Cannabis sativa* (Marihuana) perteneciente a la Familia *Cannabaceae* (McPartland, 2018) es una planta de ciclo anual, dioica, que también puede presentar ejemplares hermafroditas (Radwan *et al.*, 2021; UNDOC, 2022). La floración comienza cuando las noches superan las 11 horas y puede durar entre 4 y 12 semanas; sin embargo, estos tiempos se pueden ver afectados dependiendo de las condiciones ambientales y de la cepa cultivada (UNDOC, 2022).

Las plantas del género *Cannabis* presentan tricomas que pueden ser glandulares y no glandulares, siendo los glandulares importantes en la producción de metabolitos. Estas estructuras se pueden dividir en tres clases, capitados pedunculados, sésiles y bulbosos, las cuales se distribuyen en diferentes partes de la planta y presentan diferentes concentraciones de los cannabinoides de interés para esta tesis (Farag & Kayser, 2017; Happyana *et al.*, 2013). Esta planta posee más de 500 compuestos, de estos, 125 han sido clasificados como cannabinoides. Además, presenta compuestos no cannabinoides, como los fenoles, flavonoides, terpenos, alcaloides y otros (Radwan *et al.*, 2021).

Los cannabinoides se pueden dividir en tres tipos, los fitocannabinoides, presentes en las plantas, los endocannabinoides, compuestos endógenos y por último los sintéticos (Duggan, 2021). Los fitocannabinoides más estudiados son el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) y el cannabidiol (CBD) (Evans, 1991; Russo, 2011; Di Marzo & Pisticielli, 2015). El contenido de fitocannabinoides en las plantas puede verse afectado por las condiciones de crecimiento, la temperatura, la humedad y los nutrientes del suelo (Bonini *et al.*, 2018).

Existe amplia bibliografía documentando el uso terapéutico de *Cannabis* en medicina humana para el tratamiento del dolor y de diferentes enfermedades y afecciones (De Briyne *et al.*, 2021; della Roca & Di Salvo, 2020; Landa, 2016). Sin embargo, el uso en medicina veterinaria es más limitado. Se destacan trabajos en el manejo del dolor en osteoartritis, epilepsia, dermatitis atópica y alteraciones en el comportamiento en perros (Ukai *et al.*, 2023; Lima *et al.*, 2022). Si bien es necesario contar con mayor cantidad de estudios clínicos, los resultados obtenidos hasta el momento son alentadores para continuar las investigaciones en el uso de fitocannabinoides en animales para el tratamiento de diferentes patologías.

Es así que disponer de un método analítico confiable para la cuantificación de xenobióticos, sus metabolitos y/o biomarcadores, es un requisito fundamental para garantizar el éxito de un ensayo clínico, estudios farmacocinéticos, biofarmacéuticos, toxicológicos o procedimientos diagnósticos (ICH, 2022). Además, considerando el uso recreativo y en el marco de la legalización de la venta, consumo y uso terapéutico del *Cannabis* en nuestro país, es importante contar con técnicas de detección de CBD y THC como ser HPLC-UV, que permitan continuar con el estudio del uso terapéutico de estas moléculas y de su determinación en casos de sospecha de intoxicaciones en pequeños animales.

2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

2.1. Características botánicas de *Cannabis* sp.

Cannabis sativa (Marihuana) es una planta que pertenece a la Familia *Cannabaceae*, que incluye además otros géneros como *Humulus*, *Celtis*, *Pteroceltis*, *Aphananthe*, *Chaetachme*, *Gironniera*, *Lozanella*, *Tremay* y *Parasponia*, y abarca alrededor de 170 especies (McPartland, 2018).

La marihuana o marijuana como se conoce popularmente a *Cannabis* es una planta anual, dioica, que también puede presentar ejemplares hermafroditas (Radwan *et al.*, 2021; UNDOC, 2022). Posee tallos erectos que pueden medir de 1 a 6 metros de altura, con ramas opuestas o alternas y raíces fuertes. Las hojas son de color verde y palmadas con siete lóbulos, pueden estar dispuestas de forma opuesta, alternas o en espiral. Los folíolos son de 6 a 11 cm de largo y 2 a 15 mm de ancho, con márgenes aserrados que pueden variar en tamaño y forma dependiendo del origen genético (Frag & Kayser, 2017).

Cannabis posee inflorescencias que se pueden encontrar en los tallos largos de cada axila de la hoja. El ciclo de floración comienza cuando las noches superan las 11 horas y puede durar entre 4 y 12 semanas, dependiendo de si son plantas de semillas o de esquejes. Sin embargo, estos tiempos pueden verse afectados por las condiciones ambientales y la cepa cultivada (UNDOC, 2022). Las flores masculinas están compuestas por cinco sépalos de color verde que miden de 2,5 a 4 mm de largo y por cinco estambres pendulares con filamentos y anteras prominentes. El pistilo de las flores femeninas es casi sésil y se encuentra en pares. El fruto de esta planta es un aquenio de entre 2 a 5 mm de largo, que contiene una sola semilla de cáscara dura, con forma elipsoidal, ligeramente comprimida, lisa de color marrón y moteada (Frag & Kayser, 2017; UNDOC, 2022).

A nivel microscópico se observan los tricomas (Fig. 1A) que pueden ser glandulares y no glandulares (Schillmiller *et al.*, 2008), presentando la especie *C. sativa* ambos tipos de tricomas (Frag & Kayser, 2017). Los tricomas glandulares son importantes en la producción de metabolitos, y se dividen en tres clases: capitados pedunculados, sésiles y bulbosos. Los capitados pedunculados o peciolados se caracterizan por poseer una glándula (cabeza) y un tallo (Fig. 1B). Estos se encuentran únicamente en las flores durante el período de floración, mayormente en las brácteas y las hojas florales, lo que explica la gran cantidad de cannabinoides presentes en las flores. Los tricomas capitados sésiles, son similares a pelos (Fig. 1C) y aparecen en flores, tallos y hojas, tanto en períodos vegetativos como en floración. De acuerdo con su tamaño se pueden dividir en grandes (Fig. 1G), ubicados solo en las flores, y en pequeños (Fig. 1H), que se observan en flores, hojas y tallos. Por último, se encuentran los tricomas bulbosos, con forma de globo (Fig. 1D); son los más pequeños y se encuentran en la superficie de la planta ya sea en flores, hojas y tallos. Su presencia es mayor en los tallos y menor en las brácteas (Frag & Kayser, 2017; Happyana *et al.*, 2013).

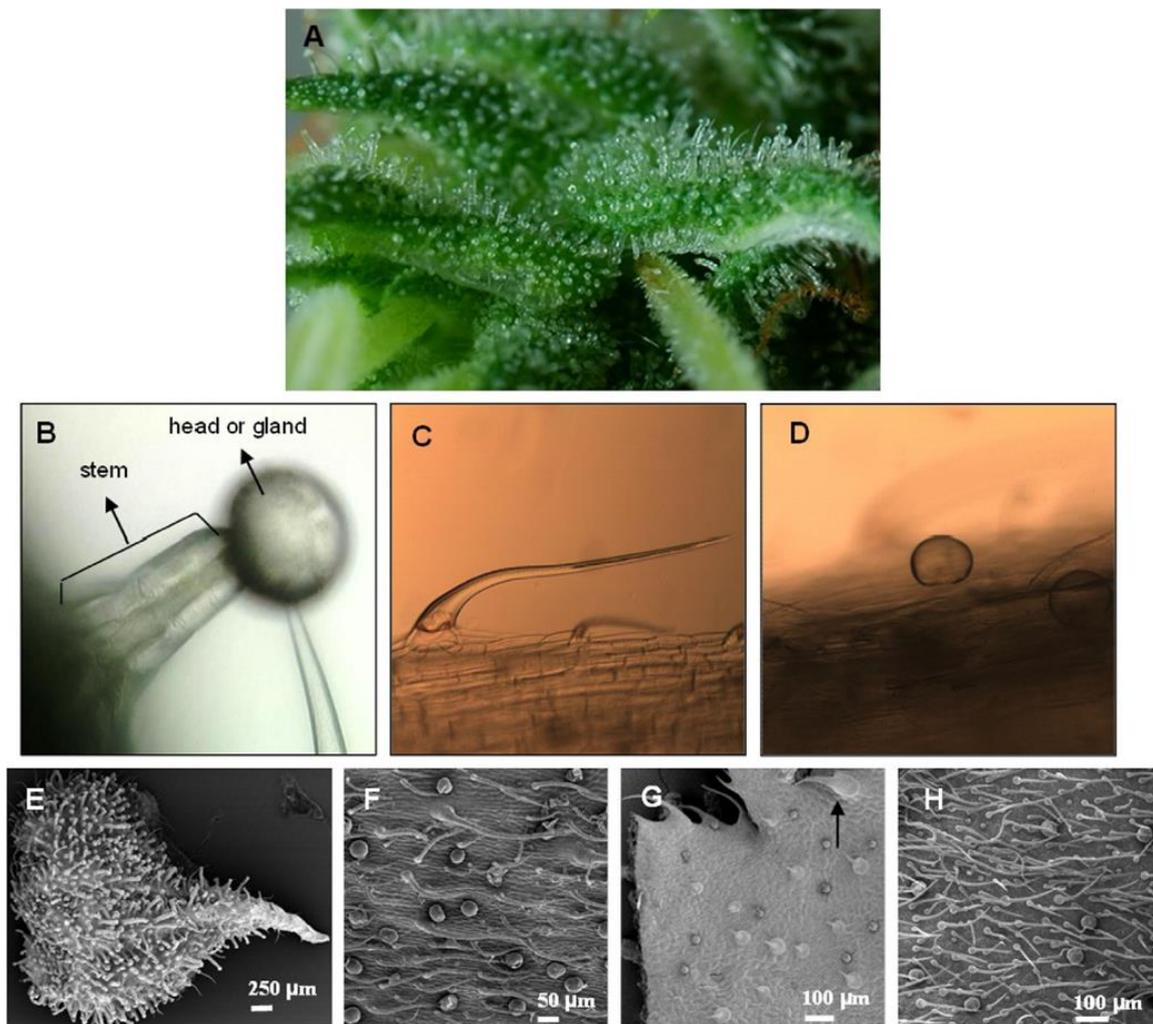


Figura 1. Tricomas de *Cannabis sativa*. (A) Tricomas en la flor, (B) Tricomas capitados pedunculados (peciolados), (C) Tricomas capitados sésiles, (D) Tricomas bulbosos, con forma de globo, (E) Tricomas en la bráctea, (F) Tricomas en el tallo, (G) Tricomas en la superficie adaxial de una hoja de la flor; se indica con una flecha un gran tricoma capitado-sésil, (H) Tricomas en la superficie abaxial de una hoja; presentan abundantes tricomas pequeños capitados-sésiles y bulbosos. (Tomado de Happyana, et al., 2013).

La importancia de los tricomas glandulares radica en que en estos se encuentran la mayoría de los metabolitos secundarios de interés, como los fitocannabinoides y los terpenos. Estos metabolitos son utilizados por la planta para la defensa de infecciones microbianas e infestación por insectos. Además, los terpenos pueden ser utilizados por la planta para atraer insectos que son depredadores de las larvas y huevos de otros insectos patógenos para la planta (Duggan, 2021). El contenido de fitocannabinoides en las plantas puede verse afectado por las condiciones de crecimiento, la temperatura, la humedad y los nutrientes del suelo (Bonini *et al.*, 2018).

2.2. Descripción de las moléculas presentes en *Cannabis*

Las plantas del género *Cannabis* poseen más de 500 compuestos identificados, de los cuales 125 han sido clasificados como cannabinoides, además presentan compuestos no cannabinoides, como los fenoles, flavonoides, terpenos, alcaloides y otros (Radwan *et al.*, 2021).

El término cannabinoide se refiere a cualquier sustancia química que interactúe con los receptores cannabinoides y desencadene efectos biológicos. Se pueden dividir en tres tipos, los fitocannabinoides, presentes en las plantas, los endocannabinoides, compuestos endógenos presentes en los animales con actividad sobre los receptores cannabinoides, y por último los sintéticos, que pueden ser o no estructuralmente similares a los fitocannabinoides y que producen efectos agonistas en los receptores cannabinoides (Duggan, 2021).

Fitocannabinoides

El proceso de biosíntesis de fitocannabinoides tiene como precursor biosintético común al ácido cannabigerólico (CBGA). La formación del CBGA (3a) implica la unión de dos fragmentos: la porción del pirofosfato de geranilo (1) y el ácido olivetólico (2). Estos fragmentos se generan a través de vías biosintéticas específicas, la de terpenos y policétidos, respectivamente (Duggan, 2021; Ukai et al., 2023). La ruta biosintética de los principales cannabinoides se muestra en la Figura 2.

La formación de CBGA (3a) es catalizada por la enzima geranil-pirofosfato-ácido olivólico geraniltransferasa (GOT), otras enzimas vegetales catalizan tres tipos diferentes de reacciones de ciclación de CBGA. Los cierres de anillos simples producen ácido cannabicrómenico (CBCA, 6) y ácido cannabidiólico (CBDA, 4a), mientras que una doble ciclación produce ácido Δ^9 tetrahidrocannabinólico (Δ^9 -THCA, 7a). Estos tres cannabinoides junto con el CBGA son los únicos productos naturales verdaderos que se observan en la Figura 2. La formación de los demás cannabinoides que se presentan son productos de degradación resultante de la exposición de los ácidos al calor, la luz y otros agentes oxidantes (Hanus *et al.*, 2016; Elsohly *et al.*, 2017; Duggan, 2021).

Los cuatro ácidos mencionados pueden sufrir una descarboxilación inducida térmicamente que conlleva a sus correspondientes formas “neutras” cannabigerol (CBG, 5), cannabicromeno (CBC, 9), Δ^9 Tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC, 10a) y cannabidiol (CBD, 8a). Este es un proceso que comienza luego de la cosecha de las plantas y que a temperatura ambiente ocurre más lentamente. La mayoría de los efectos biológicos producidos por *Cannabis* spp., son inducidos por los cannabinoides neutros. Esto explica, por ejemplo, el consumo fumado (combustión) del cannabis recreativo (Δ^9 -THC, 10a). A su vez, el THC puede sufrir varias reacciones químicas, como la isomerización a Δ^8 -THC (11) a través de la relocalización del doble enlace, y la oxidación a un compuesto aromático como el cannabinol (CBN, 13) (Hanus *et al.*, 2016; Duggan, 2021).

El principal cannabinoide producido por el *Cannabis* “tipo” cáñamo (medicinal, no psicoactivo) es el CBDA y para el “tipo” marihuana (recreativo, psicoactivo) es el Δ^9 -THCA. El uso medicinal de esta planta para el tratamiento de enfermedades en los animales y el humano se produce con altos niveles de Δ^9 -THCA y CBDA, considerando el uso de CBD y mezclas de CBD y Δ^9 -THC en diferentes proporciones de uno y otro para el tratamiento de las enfermedades (Duggan, 2021).

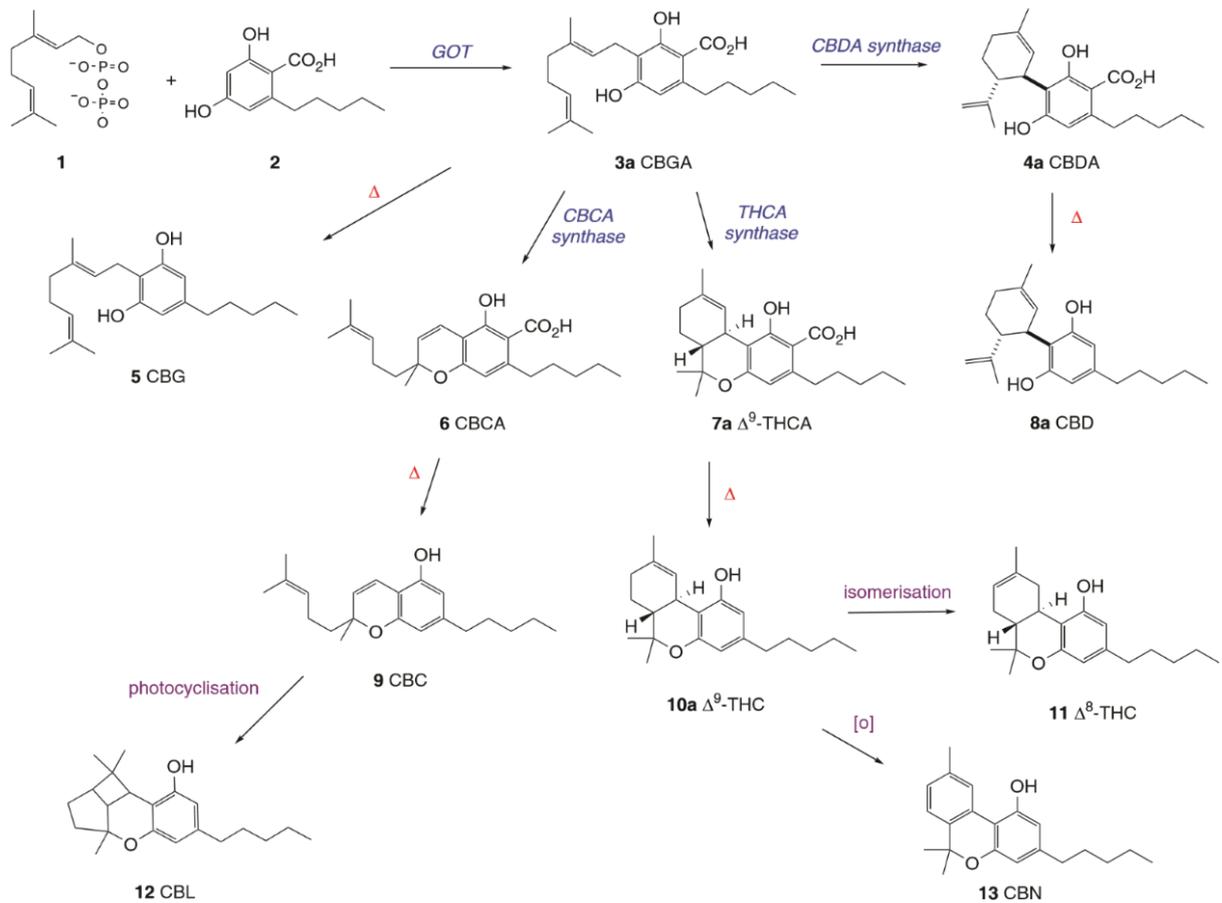


Figura 2. Esquema de la formación de los principales Fitocannabinoides (Tomado de Duggan, 2021).

Sistema endocannabinoide

El sistema endocannabinoide (SEC) se define como un sistema de señalización lipídica que ha acompañado el desarrollo del sistema nervioso de organismos multicelulares como los vertebrados. En estos organismos cumple funciones de regulación en el sistema nervioso central y autónomo, sistemas endocrinos, inmunitario y reproductivo, en el tracto gastrointestinal y en la microcirculación (Rodríguez de Fonseca *et al.*, 2005). También se encuentra en invertebrados a excepción de los Phylum *Protozoo* e *Insecta* (Silver, 2019).

El SEC está formado por tres componentes principales: receptores cannabinoides, ligandos endógenos (endocannabinoides) y enzimas responsables de la activación, transporte y degradación de los endocannabinoides (Hazzah *et al.*, 2020). Los receptores del SEC, CB1 y CB2 interactúan con moléculas lipofílicas denominadas cannabinoides. Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores de membrana, acoplados a Proteína G. Pueden ser activados por tres tipos de moléculas: fitocannabinoides, como THC y en menor medida CBD; eicosanoides, como la anandamida y el 2-Araquidonoilglicerol; y los Aminoalkylindoles. Se han desarrollado además numerosas moléculas sintéticas capaces de interactuar con estos receptores ya sea como agonistas, antagonistas y moduladores alostéricos (Devane, 1992; Mechoulam *et al.*, 1995; Pertwee, 2010; Duggan, 2021).

Respecto a su distribución anatómica, el receptor CB1 se ubica principalmente a nivel de varias estructuras del sistema nervioso central y periférico, tracto digestivo, corazón, hígado, tejido adiposo, músculo liso y esquelético, sistema reproductor (tanto femenino como

masculino), huesos y piel (Herkenham *et al.*, 1990; Iannotti *et al.*, 2016; Freundt-Revilla *et al.*, 2017). El receptor CB2 se expresa ampliamente a nivel periférico, sobre todo en las células y órganos del sistema inmune, y en menor medida a nivel central, aunque su expresión es inducible por injuria tisular (Guindon & Hohmann, 2008). Si bien no presentan diferencias estructurales significativas, sí existen variaciones entre especies en cuanto a la localización y densidad de expresión de los receptores CB1. Se ha reportado una mayor densidad y extensión en la expresión de este receptor a nivel cerebral en perros respecto a humanos, como por ejemplo en zonas como el cerebelo y tronco encefálico, que expresan constitutivamente CB1 en perros y está ausente en nuestra especie (Herkenham *et al.*, 1990; Silver, 2019).

Se han identificado hasta el momento más de cien cannabinoides, entre los cuales el Δ^9 -THC y el CBD son los más estudiados. El THC es el principal componente psicoactivo de la planta *Cannabis sativa*, y fue el primer cannabinoide descubierto en la década de los 60. El THC es agonista parcial de receptores CB1 y CB2, actúa además sobre otros blancos moleculares dando lugar a efectos como modulación del dolor, tono muscular, apetito y estado de ánimo y de la acción broncodilatadora. A su vez, es un potente antiinflamatorio, analgésico, antiespasmódico y antioxidante neuronal (Evans, 1991; Russo, 2011; Di Marzo & Pisticielli, 2015).

El CBD por su parte posee propiedades ansiolíticas, sedantes, anticonvulsivantes, antipsicóticas, antieméticas, antiinflamatorias, analgésicas, antifúngicas y antibacterianas (Costa *et al.*, 2007; Landa *et al.*, 2022). Esta molécula posee baja afinidad por los receptores CB1 y CB2, pero los antagoniza en presencia de THC. Es un modulador alostérico de los receptores CB1 que disminuye la potencia y eficacia tanto del THC como de la anandamida, inhibiendo a su vez la recaptación de esta última por inhibición del enzima ácido graso amida hidrolasas (Vuckovic *et al.*, 2018).

Los cannabinoides además de la actividad sobre los receptores CB1 y CB2, presentan actividad sobre otros receptores, como los GPR55, GPR18, GPR11, TRPV1, TRPA1, TPRM8, PPARs, receptor de glicina, GABA_A y receptores serotoninérgicos 5-HT1A (Mechoulam, 2016, Hazzah *et al.*, 2020).

Cannabinomiméticos sintéticos

Los primeros cannabinoides sintéticos fueron desarrollados por el grupo de trabajo de Raphael Mechoulam, luego de obtener la primera síntesis del Δ^9 -THC en el año 1972 (Mechoulam *et al.*, 1972). Es entonces que con el desarrollo de este fitocannabinoide surgen diferentes análogos con probada actividad biológica (Edery *et al.*, 1971).

Estos compuestos fueron sintetizados por laboratorios de la industria farmacéutica y por laboratorios universitarios. Es por esto por lo que son nombrados con alguna referencia del lugar donde fueron sintetizados como ser JWH-018 (Johon W. Huffman), AM-2201 (Alexandros Markriyannis), HU-210 (Universidad Hebrea), CP 47497 (Charles Pzifer), WIN 55212-2 (Sterling-Winthrop, Inc.) entre otros. Los cannabinoides sintéticos se pueden clasificar de acuerdo con su estructura química en siete grupos: naftoilindoles, naftilmetilindoles, naftoilpirroles, naftilmetilindenos, fenilacetilindoles, ciclohexilfenoles y

dibenzopiranos o cannabinoides clásicos. Sin embargo, también pueden clasificarse en referencia a su acción agonista o agonista parcial de los receptores cannabinoides, aunque se han descrito otros mecanismos de acción, como la inhibición de enzimas que degradan a los cannabinoides naturales (FAAH, hidrolasa de amidas de ácido graso) (Papaseit *et al.*, 2018).

2.3 Uso de *Cannabis* en Medicina Veterinaria

Existe amplia bibliografía documentando el uso terapéutico de *Cannabis* en medicina humana, ya sea en el tratamiento del dolor y de diferentes enfermedades y en afecciones como epilepsia, cáncer, inflamación, asma, glaucoma, diabetes, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, Alzheimer y depresión entre otras (De Briyne *et al.*, 2021; della Roca & Di Salvo, 2020; Landa, 2016). Sin embargo, el uso en medicina veterinaria es más limitado. Se destacan trabajos en el manejo del dolor en osteoartritis, epilepsia, dermatitis atópica y alteraciones en el comportamiento en perros (Gamble *et al.*, 2018; Mc Grath *et al.*, 2019; Brioschi *et al.*, 2020; Verrico *et al.*, 2020; Corsetti *et al.*, 2021; Mejia *et al.*, 2021; Lima *et al.*, 2022; Loewinger *et al.*, 2022; Ukai *et al.*, 2023).

En cuanto al tratamiento del dolor además de los trabajos de Ukai *et al.*, (2023) y de Lima, *et al.* (2022), otros autores han reportado sobre el uso de *Cannabis* en perros (Gamble *et al.*, 2018; Brioschi *et al.*, 2020; Verrico *et al.*, 2020 y Mejia *et al.*, 2021). Además, a nivel nacional se realizó un estudio con la administración de Epifractan®, solución de CBD aislado al 5% en aceite de oliva (Furtado, 2019). En todos los reportes se aplicaron escalas validadas para la evaluación del dolor de los animales. En algunos, además, compararon con animales de un grupo control que recibían placebo e incluso Brioschi *et al.* (2020) comparó animales que recibían un tratamiento analgésico multimodal con firocoxib, prednisolona, gabapentina y amitriptilina con CBD y un grupo sin CBD. En todos los estudios, los perros utilizados fueron de distintas razas y tanto las formulaciones como las dosis utilizadas de CBD fueron diferentes (Lima *et al.*, 2022). A su vez, se observaron posibles efectos adversos y se obtuvieron muestras sanguíneas para la realización de controles de enzimas hepáticas y bioquímica sanguínea, observándose alteraciones de las enzimas hepáticas en algunos casos (Gamble *et al.*, 2018; Mejia *et al.*, 2021; Furtado, 2019). Brioschi *et al.* (2020) reportó la presentación de ptialismo, somnolencia y ataxia que se resolvió cuando se redujo la dosis empleada de gabapentina.

Otros usos de la planta reportados en esta especie animal fueron sobre pacientes con epilepsia (Mc Grath *et al.*, 2019), con alteraciones del compartimiento, (Corsetti *et al.*, 2021), y en el tratamiento de la dermatitis atópica (Loewinger *et al.*, 2022). En el caso de Mc Garth *et al.* (2019), los resultados obtenidos fueron alentadores para continuar trabajando en esta línea de investigación, destacando una reducción en la frecuencia de las convulsiones. Estos resultados demostraron la necesidad de probar con dosis más altas de CBD, ya que algunos de los perros en el ensayo no respondieron a las dosis utilizadas y las respuestas fueron similares al grupo de los perros tratados con otros anticonvulsivantes. Corsetti *et al.* (2021) realizó un trabajo para evaluar el uso de CBD en perros de un refugio sobre el comportamiento agresivo y los trastornos conductuales. Los resultados obtenidos mostraron una disminución del comportamiento agresivo de los perros tratados hacia los humanos, sin embargo, no hubo diferencias significativas con el grupo control. Los mismos autores

consideran que el número de animales utilizados era bajo, por lo que quizás no se observó diferencia entre el grupo control y el grupo tratado. Estos resultados, al igual que los de Mc Grath *et al.* (2019), son promisorios respecto al efecto del CBD en el comportamiento agresivo, requiriéndose más estudios para demostrar si el CBD puede ser efectivo en el tratamiento de los trastornos conductuales. Por último, Loewinger *et al.* (2022) estudiaron el uso de CBD y CBDA en el tratamiento de la dermatitis atópica, destacándolo como tratamiento complementario en la disminución del prurito.

El uso de fitocannabinoides en otras especies animales está aún menos estudiado todavía, encontrándose en la bibliografía pocos reportes de ensayos clínicos, y destacándose a continuación los realizados en equinos y felinos. Ellis & Contino (2021), administraron CBD en estado puro para el tratamiento de un equino con aumento de la sensibilidad en la zona de la cruz. Anteriormente había sido tratado con otras drogas analgésicas y antiinflamatorias, sin respuesta esperada. A las 36 horas de iniciado el tratamiento con CBD vía oral dos veces al día, disminuyó su respuesta a los estímulos recibidos en la zona de la dolencia. Además, se destaca la patente de Denapoli & Denapoli (2020), donde describen el uso de CBD para el tratamiento del estrés y ansiedad en siete equinos. En relación a los felinos, su uso clínico ha sido probado en un caso donde se utilizó aceite que contenía CBD y THC, proporcionando una adecuada analgesia para el dolor crónico (Gutierre *et al.*, 2023). En otro reporte se utilizó aceite para el tratamiento de un sarcoma de ojo, donde se comprobó disminución del dolor y del tamaño del tumor (Buranakarn, 2020). Así como es escasa la bibliografía referida al uso clínico en esta especie animal, según Grigg *et al.* (2019), mediante una encuesta realizada de forma anónima y *on line*, los tutores de gatos declararon que estarían dispuestos a utilizar cannabinoides para el tratamiento de problemas de comportamiento en esta especie.

Si bien se requieren aún mayor cantidad de estudios clínicos, los resultados obtenidos son alentadores para continuar las investigaciones en el uso de fitocannabinoides en animales para el tratamiento de diferentes patologías.

2.4. Intoxicación por *Cannabis* en animales domésticos

En nuestro país, a partir de la aprobación de la ley 19.172 que regula la producción y comercialización de productos derivados del *Cannabis*, existe una mayor disponibilidad tanto para el uso medicinal como para el recreativo. Estos factores, al igual que ha sucedido en otros países según Meola *et al.* (2012), Brutlag & Hommerding (2018) y Amissah *et al.* (2022), podrían incidir en el aumento de consultas por intoxicaciones en animales domésticos, mayormente relacionadas al uso recreativo del *Cannabis*, ya que tiene un mayor contenido de THC (Mondino *et al.*, 2019; De Briyne *et al.*, 2021; Amissah *et al.*, 2022). A su vez, debemos sumar las consultas recibidas por su uso medicinal en animales domésticos y analizar los riesgos toxicológicos que estos productos podrían causar. En este último caso, el medicinal posee principalmente CBD y a veces una baja concentración de THC, sin embargo, se pueden observar efectos adversos en estos pacientes (Mondino *et al.*, 2019; Wakshlag *et al.*, 2020; De Briyne *et al.*, 2021).

Los animales domésticos se pueden intoxicar principalmente con el consumo de *Cannabis* recreativo con concentraciones altas de THC (*Cannabis* recreativo, *Cannabis* psicoactivo). En Uruguay, *Cannabis* psicoactivo es el que presenta una concentración de THC en la planta

igual o superior al 1% en base seca y no psicoactivo cuando la concentración es menor a 1% (Ley 19.172). Los perros y gatos son susceptibles a la intoxicación por *Cannabis*, siendo los perros más comúnmente afectados (Donaldson, 2002; Mondino *et al.*, 2019; Amissah *et al.*, 2022).

La intoxicación se puede producir por la inhalación de humo, ingestión de semillas, tallos, flores, hojas, preparaciones como galletas y brownies o por productos que concentren THC como el aceite de *hashish* e incluso se describe intoxicación por consumo de heces humanas (Campbell, 2000; Fitzgerald *et al.*, 2013; Brutlag & Hommerding, 2018; Amissah *et al.*, 2022; Lauinger & Peacock, 2022). El THC es absorbido rápidamente cuando el humo es inhalado (combustión), sin embargo, por vía oral su absorción es más lenta y su efecto más impredecible en comparación a la inhalación por combustión. En los animales, la ruta más común de intoxicación es la ingestión, la vía inhalatoria es secundaria debido a que comparten un ambiente donde se esté fumando o cuando se le sopla directamente el humo en la cara (Meola *et al.*, 2012; Volmer, 2013; Brutlag & Hommerding, 2018). La biodisponibilidad vía oral de THC se incrementa cuando la ingestión se acompaña de alimentos grasos debido a sus características lipofílicas. En perros, los efectos farmacodinámicos son observados luego de 30 a 60 minutos de la ingestión, y siendo el THC altamente liposoluble, es distribuido en la grasa corporal, hígado, cerebro y riñones. La metabolización de las moléculas de THC y CBD, son realizadas en el hígado (Fitzgerald *et al.*, 2013; Volmer, 2013). Existe evidencia de que el THC posee circulación enterohepática, lo que, sumado a su liposolubilidad, serían factores importantes para tener en cuenta en el manejo del tratamiento en casos de intoxicación (Garrett & Hunt, 1977).

Estudios recientes donde se utilizaron tres formulaciones diferentes de un extracto de *Cannabis* rico en CBD a distintas concentraciones y se administraron vía oral a perros, buscaron en el suero además de los metabolitos conocidos, otras moléculas como THCA, CBDA, CBN, CBG y los metabolitos 11-OH-THC, 7-OH-CBD, 7-COOH-CBD y COOH-THC-Glu (Wakshlag *et al.*, 2020). En otro estudio se determinaron las moléculas de CBD, THC, CBC (Cannabicromeno) y los metabolitos 6-OH-CBD, 7-OH-CBD, 11-OH-THC y THC-COOH en el plasma de perros (Chicoine *et al.*, 2020). De los metabolitos estudiados en estos trabajos, el metabolito activo asociado a los cuadros de intoxicación en humanos es el 11-OH-THC. Este metabolito se encontró presente en el plasma o suero de perros en bajas concentraciones y los efectos adversos observados fueron mínimos a las dosis utilizadas, a excepción de la dosis más alta recibida de CBD:THC (10:0,5 mg/kg) en el trabajo de Chicoine *et al.* (2020). Estos resultados sugieren que la metabolización de las moléculas es diferente según la especie animal que sea, ratas, perros o humanos (Chicoine *et al.*, 2020; Wakshlag *et al.*, 2020).

Establecer una dosis tóxica exacta del THC en mg/kg es difícil, ya que dependerá de la cantidad presente del mismo en la planta y de la vía de exposición (Meola *et al.*, 2012; Fitzgerald *et al.*, 2013). Según el trabajo de Thompson *et al.* (1973) dosis de hasta 3000 mg/kg vía oral de THC en perros, no produce la muerte. Además, debemos sumar la posible interacción entre los distintos compuestos presentes en la planta (cannabinoides, terpenos) y los receptores cannabinoides, lo que se conoce como “*efecto sequito o entourage*”, estudiado en los humanos. Este efecto es conocido por el sinergismo que se produce por los

distintos componentes presentes en los extractos de la planta en comparación con sus análogos por separado, tanto sintéticos como naturales (Russo, 2011; Christensen *et al.*, 2023) Este efecto hasta el momento no se ha comprobado en perros (Chicoine *et al.*, 2020).

Los signos clínicos de intoxicación más comúnmente observados en perros y gatos son ataxia, sedación, midriasis, vómitos, incontinencia urinaria, bradicardia o taquicardia, hipertermia o hipotermia, hiperestesia, temblores musculares, convulsiones, estupor, vocalizaciones, agitación e incluso coma. Se ha reportado que la muerte por intoxicación con esta planta es poco probable (Donaldson, 2002; McKnight, 2003; Janczyk *et al.*, 2004; Meola *et al.*, 2012; Amissah *et al.*, 2022).

El diagnóstico de la intoxicación hasta hace poco tiempo era dificultoso, ya que en nuestro país fue una droga ilegal por mucho tiempo y los tutores de los animales no siempre manifestaban el consumo de ésta. Es importante obtener datos anamnésticos correctos, considerando que el tutor de los animales pueda no declarar lo realmente ocurrido. Es por esto por lo que se debe generar un buen relacionamiento con el tutor, para así obtener datos fehacientes, siendo un factor importante e imprescindible al momento del diagnóstico de esta intoxicación (Fitzgerald *et al.*, 2013). Se pueden obtener muestras de contenido estomacal o de orina para detectar el principio por medio de cromatografía gaseosa/espectrometría de masa (GC/MS) e inmunoensayo (McGuigon, 2006; Fitzgerald *et al.*, 2013). Sin embargo, la prueba de detección en orina para uso humano es controvertida en animales, ya que se han reportado falsos negativos (Meola *et al.*, 2012; Fitzgerald *et al.*, 2013; Fitzgerald *et al.*, 2021).

En relación con el tratamiento, no se ha reportado un tratamiento específico para esta intoxicación (Janczyk *et al.*, 2004; Fitzgerald *et al.*, 2013). Frente a una intoxicación se instaura un tratamiento sintomático, y si la ingestión fue reciente (menor a dos horas), se puede provocar emesis. En estos casos, hay que tener presente que la propia planta tiene efectos antieméticos (Janczyk *et al.*, 2004).

2.5. Desarrollo y validación de técnicas analíticas

Disponer de un método analítico confiable para la cuantificación de xenobióticos, sus metabolitos y/o biomarcadores, es un requisito fundamental para garantizar el éxito de un ensayo clínico, estudios farmacocinéticos, biofarmacéuticos, toxicológicos o procedimientos diagnósticos. De ahí la importancia de que el método analítico que se vaya a utilizar para cualquiera de estas finalidades esté validado. Para la validación de una técnica analítica se requiere de procedimientos experimentales que demuestren que la misma es confiable y reproducible para el propósito indicado (ICH, 2022). En este sentido, la validación debe comprender procedimientos que demuestren que un método particular es confiable y reproducible para la medición cuantitativa de analitos en una matriz biológica como sangre, plasma, suero, saliva u orina. Los principales parámetros para evaluar la validez de un método analítico según la *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry* (BMVGI) de la *Food and Drug Administration (FDA)* (2018) son la selectividad, linealidad, precisión, exactitud (veracidad), especificidad, estabilidad, estabilidad a largo plazo, sensibilidad, reproducibilidad, los límites inferiores de cuantificación y de detección y finalmente la recuperación.

Definición de los parámetros analíticos:

- La selectividad es el grado en que el método puede determinar un compuesto particular en las matrices analizadas sin interferencia de los componentes de la matriz (BMVGI-FDA, 2018).
- La precisión es la concordancia entre una serie de mediciones obtenidas a partir de múltiples muestreos de la misma muestra homogénea bajo condiciones prescritas de uso (Fundación PROSAIA, 2013).
- La curva de calibración o linealidad, también conocida como curva estándar, es la relación entre la respuesta del instrumento y los estándares de calibración dentro del rango de cuantificación previsto. Los resultados analíticos deben ser directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra (ICH, 2022).
- La exactitud o veracidad es el grado de aproximación del valor determinado al valor nominal o verdadero conocido en condiciones prescritas. Está estrechamente relacionada con el error sistémico (sesgo del método analítico) y la recuperación del analito desde la matriz estudiada (porcentaje de recuperación) (Fundación PROSAIA, 2013).
- La especificidad es la capacidad del método para evaluar, de manera inequívoca el analito en presencia de otros componentes que se espera que estén presentes como pueden ser impurezas, productos de degradación, componentes de la matriz entre otros (BMVGI-FDA, 2018).
- La estabilidad es una medida de la integridad de un analito (ausencia de degradación) en una matriz determinada en condiciones específicas de almacenamiento y uso en relación con el material de partida durante intervalos de tiempo determinados. Se habla de estabilidad a largo plazo cuando se evalúa la degradación de un analito en la matriz en relación con el material de partida tras períodos de almacenamiento congelado (Fundación PROSAIA, 2013).
- La sensibilidad o límite inferior de cuantificación (LLOQ) se define como la concentración más baja de analito en la matriz que puede medirse con una exactitud y precisión aceptables. Siendo este valor cuando la relación señal/ruido (S/N) es mayor o igual a 10. (BMVGI-FDA, 2018)
- El límite inferior de detección (LLOD) es la concentración más baja del analito a partir de la cual es posible demostrar su presencia en la muestra con un grado aceptable de certeza. Siendo este valor cuando la relación S/N es mayor o igual a 3. (Fundación PROSAIA, 2013).
- La reproducibilidad es la precisión entre dos laboratorios. También representa la precisión del método en las mismas condiciones de funcionamiento durante un corto período de tiempo (BMVGI-FDA, 2018).
- La recuperación se refiere a la eficiencia de extracción de un proceso analítico, informada como un porcentaje de la cantidad conocida de un analito transportado a través de la extracción de la muestra y los pasos de procesamiento del método (BMVGI-FDA, 2018).

En el Anexo I se presentan las recomendaciones y criterios de aceptación para la validación de métodos bioanalíticos y la realización de estudios de la *Food and Drug Administration (FDA)*, *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry* (mayo 2018).

2.6 Preparación de la muestra

La preparación de una muestra biológica para su análisis es uno de los pasos más importantes para lograr resultados satisfactorios, siendo el tiempo utilizado en esta etapa un 65 a 80 % del tiempo total (Stashenko & Martínez, 2011). El método ideal para la preparación de muestras a analizar debe ser simple, insumir la menor cantidad de tiempo posible e incluir la menor cantidad posible de etapas para disminuir la ocurrencia de errores. Además, debe ser un método selectivo para minimizar las interferencias y aumentar la señal de los analitos. Es también importante que utilice instrumentos de fácil acceso, permita la automatización y, si es necesario, que incluya una etapa de concentración del analito para mejorar la detección. Por último, se debe minimizar el uso de reactivos y solventes para reducir su impacto ambiental (Ferreira, 2016).

Las técnicas más comúnmente utilizadas para la extracción de compuestos presentes en fluidos biológicos son la extracción líquido-líquido (LLE), la precipitación de proteínas (PP) y la extracción en fase sólida (SPE) (Oliveira *et al.*, 2008).

Actualmente la tendencia se inclina hacia la adopción de técnicas que utilicen una menor cantidad de muestra, sean automatizables, operen en línea y sean más respetuosos con el medio ambiente, por ejemplos las técnicas de microextracción (microextracción en fase sólida -SPME-, microextracción en gota suspendida -SDME-, la extracción por membranas -SLM-, extracción líquido-líquido con membrana microporosa -MMLLE-, microextracción en fase líquida -LPME-) (Kataoka, 2003; Oliveira *et al.*, 2008; Saunders *et al.*, 2009).

Extracción líquido-líquido

La LLE permite sustraer analitos de una muestra líquida mediante el uso de solventes o mezcla de solventes inmiscibles. Esta técnica se basa en la diferencia de solubilidad de la molécula de interés por una u otra fase, típicamente, una acuosa y otra orgánica. Se utiliza para la separación selectiva de analitos presentes en la muestra o para la eliminación de interferencias (Queiroz *et al.*, 2001; Serban, 2015a).

Tiene como ventajas la simplicidad en cuanto la manipulación de la muestra, la desnaturalización de las proteínas que está implícita durante la extracción, la amplia variedad de solventes y sus posibles combinaciones, para lograr una mayor efectividad y selectividad en la extracción de los analitos de interés, la accesibilidad y la capacidad de concentrar las muestras para su posterior análisis. En este sentido, también es de destacar su compatibilidad con técnicas analíticas como cromatografía líquida de alta presión (HPLC), cromatografía de gases (GC), entre otras (Queiroz *et al.*, 2001; Stashenko & Martínez, 2011). Sin embargo, presenta algunas desventajas, como su limitada aplicabilidad a analitos hidrosolubles y a moléculas térmicamente inestables, que podrán perderse durante el proceso de concentración de la muestra. También es una técnica costosa en cuanto al tiempo que requiere la optimización del sistema de solventes de extracción y la alta calidad que se les debe exigir a los mismos para evitar la concentración de sus impurezas. Existe muchas veces el riesgo de

la formación de emulsiones y la automatización del proceso puede ser complicada. Adicionalmente, esta técnica puede requerir el uso de gran cantidad de solventes (algunos altamente tóxicos) y su disposición final (Queiroz *et al.*, 2001; Serban, 2015a; Stashenko & Martínez, 2011).

Precipitación de proteínas

La PP es un método comúnmente utilizado en la preparación de muestras biológicas para la eliminación de proteínas. Esta precipitación se logra mediante la introducción de un modificador orgánico, una sal o al modificar el pH de la muestra, los cuales afectan la solubilidad de las proteínas. Posteriormente, las muestras son sometidas a centrifugación y el líquido sobrenadante resultante puede inyectarse directamente en el sistema cromatográfico o ser evaporado para luego ser disuelto en un solvente apropiado, permitiendo, además, la concentración de la muestra.

La PP ofrece ventajas, como su rapidez y el bajo consumo de solventes orgánicos u otras de las sustancias que puedan afectar la solubilidad de las proteínas. Sin embargo, también presenta desventajas, ya que es un método de limpieza no selectivo, lo que implica el riesgo de que compuestos endógenos u otros xenobióticos generen interferencias en los análisis cromatográficos. Con frecuencia, para superar estas limitaciones, se combina la PP con otras técnicas, como la SPE o la LLE, con el fin de obtener un extracto más limpio y eliminar o reducir interferencias (Kirthi *et al.*, 2014, Ahmad *et al.*, 2015)

Extracción en fase sólida

La SPE es una técnica comúnmente utilizada para la preparación de muestras para cromatografía (Serban, 2015b). Esta técnica permite concentrar y aislar los analitos buscados, removiendo las interferencias que puedan estar presentes en las diferentes matrices. Fue desarrollada para superar las limitaciones de la LLE y se ha convertido en uno de los métodos más populares para la preparación de muestras. (Jardim, 2010).

El fundamento de la SPE es similar al de la LLE, ya que implica la partición de solutos entre dos fases, que en lugar de ser dos líquidos inmiscibles implicará el reparto entre una fase líquida que contendrá los analitos y una fase sólida que actuará como adsorbente. En líneas generales, el procedimiento consiste en hacer pasar una solución en la que están disueltas la o las moléculas de interés a través de una fase sólida estacionaria, eliminar los componentes no deseados mediante su lavado y finalmente recuperar analitos deseados eluyéndolos con otro solvente en un tubo de recolección (Buszewski & Szultka, 2012). En general los materiales utilizados como fase estacionaria son los mismos de las columnas cromatográficas, basados en grupos orgánicos como C18, C8, C2, cicloexil, fenil, cianopropil, aminopropil (NH₂), ligados químicamente a sílica (Jardim, 2010; Serban, 2015b).

Entre las ventajas de la SPE se incluyen un menor consumo de solventes orgánicos, la prevención de la formación de emulsiones, facilidad de automatización, altos índices de recuperación de los analitos, bajos volúmenes de residuos tóxicos y la capacidad de aumentar selectivamente la concentración de los analitos. Además, existe una amplia disponibilidad comercial de equipos y adsorbentes para SPE. Sin embargo, algunas desventajas incluyen el

tiempo necesario para procesar las muestras, los costos de los dispositivos de extracción, la elección adecuada del adsorbente y solvente de elución y el hecho de que los cartuchos sean de un solo uso (Jardim, 2010).

2.7 Cromatografía Líquida

La cromatografía líquida es una técnica que permite la separación y el análisis de los componentes de una mezcla en función de su afinidad por una fase estacionaria y una fase móvil. La fase estacionaria generalmente consiste en un material sólido con diferentes propiedades químicas contenido en una columna por la cual fluye una fase móvil que transporta los analitos (Sgariglia *et al.*, 2010). Los componentes con mayor afinidad por la fase estacionaria generarán interacciones más intensas y, por lo tanto, se desplazarán con menor velocidad que aquellos con menor afinidad. Es esta diferencia en la velocidad lo que da lugar a la separación de los componentes (Suárez & Morales, 2018).

La correcta elección de las fases móvil y estacionaria es clave para obtener una adecuada y efectiva separación de los analitos (Quattrocchi, 2019).

Fase móvil

La fase móvil es una mezcla de solventes acuosos y orgánicos utilizada para transportar el analito a través de la fase estacionaria. Su composición desempeña un papel crucial en la separación de los analitos, ya que la interacción entre las moléculas, la fase móvil y la fase estacionaria determina tanto el tiempo de retención como la selectividad del proceso. Para que una fase móvil sea considerada ideal, debe cumplir con ciertas condiciones: debe tener una excelente solubilidad para los componentes de la muestra, evitar la corrosión de los elementos del HPLC, ser económica, de alta pureza y tener una baja absorción en el espectro UV. Además, debe ser de baja viscosidad y no tóxica ni inflamable (Dong, 2019). Por lo general, se utilizan mezclas de disolventes con diferentes polaridades en un gradiente, de modo que la polaridad global se pueda ajustar según las necesidades analíticas (Blum, 2014).

Fase estacionaria

La fase estacionaria en HPLC está contenida en una columna de acero inoxidable y consiste en partículas porosas que se utilizan para separar muestras en función de sus polaridades relativas (Blum, 2014; Dong, 2019). Estas columnas según Dong, (2019) pueden clasificarse de varias maneras:

- Según el tipo: estándar o cartucho, acero inoxidable, políester eter acetona (PEEK), titanio, acero inoxidable revestido de PEEK o sílice fundida.
- Según el modo cromatográfico: Cromatografía de fase normal, de fase reversa, de intercambio iónico, de exclusión por tamaño, de interacción hidrofílica, de fluido supercrítico y de modo mixto.
- Por sus dimensiones: Preparativa, semipreparativa, analítica, LC rápida, mini-bore, narrowbore, microbore, micro-LC y nano-LC (capilar).
- Según el tipo de soporte: sílica, polímero, híbrido, circonio, carbono grafitico poroso, totalmente poroso, no poroso y poroso superficial.
- Según la presión nominal: UHPLC, HPLC, media o baja presión

- Según sus aplicaciones: moléculas pequeñas, bio separaciones, polímeros sintéticos, quiral, fluidos supercríticos, LC/MS, aplicaciones específicas.

Estas columnas están rellenas de pequeñas partículas esféricas, que varían su tamaño entre 1,5 a 5 μm de diámetro. Actualmente la mayoría están hechas de sílice porosa, con un poro individual de un diámetro determinado generalmente de 10 nm, el interior de estos está recubierto por la fase estacionaria (C8, C18, C6, C4, CN, PFP y otras) (Snyder, 2010). Las distintas sustancias interactúan con la fase estacionaria de diferentes maneras, lo que hace que la polaridad de la fase móvil influya en el tiempo de retención del analito de interés. Este tiempo de retención puede entonces utilizarse como uno de los identificadores de ese analito en las mismas condiciones de composición, gradiente y flujo de la fase móvil (Blum, 2014).

Términos y conceptos básicos

En cromatografía, existen varios parámetros fundamentales que se utilizan para describir y analizar el comportamiento de los analitos en el proceso. Estos parámetros son esenciales para el análisis cuali-cuantitativo de una muestra. A continuación, se describen algunos de los principales parámetros cromatográficos:

- Tiempo de retención (t_R): El tiempo de retención se define como el tiempo transcurrido desde la inyección de la muestra hasta la aparición del pico en el cromatograma (Snyder *et al.*, 2010; Dong, 2019). Representa cuánto tiempo un analito permanece en la columna antes de ser detectado.
- Tiempo muerto (t_M): El tiempo muerto, también conocido como tiempo vacío, es el tiempo que demora en observarse el primer pico en la línea de base que corresponde a la fase móvil, es decir, al componente no retenido por la fase estacionaria (Dong, 2019). Es esencial para el cálculo de otros parámetros cromatográficos.
- Tiempo de retención ajustado (t_R'): El tiempo de retención ajustado es igual al tiempo de retención real (t_R) menos el tiempo muerto (t_M). En otras palabras, representa el tiempo durante el cual el analito se encuentra en la fase estacionaria. Matemáticamente, $t_R' = t_R - t_M$. Así, el tiempo de retención total se divide en el tiempo en la fase estacionaria y el tiempo en la fase móvil (Dong, 2019).
- Anchura del pico (w_b) y Altura media del pico ($w_{1/2}$): La anchura del pico se mide en la base del pico (w_b) o en la altura media del pico ($w_{1/2}$). Estos parámetros describen cuán ancho o estrecho es el pico cromatográfico. La altura del pico (h) también se utiliza para caracterizar la forma y la intensidad del pico (Quattrocchi, 2019).
- Área del Pico: El área del pico es proporcional a la cantidad del analito presente en la muestra. Se utiliza principalmente para realizar cálculos cuantitativos. Cuanto mayor sea el área del pico, mayor será la concentración del analito en la muestra (Dong, 2019).
- Factor de Retención (k): El factor de retención (k) es un parámetro fundamental que indica el grado de retención del analito en la columna. Se define como el cociente entre el tiempo de retención en la fase estacionaria (t_R') y el tiempo de retención en la fase móvil (t_M) (Dong, 2019).

$$\text{Factor de retención } k = \frac{t_{R'}}{t_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Reordenando la ecuación se obtiene que: $t_R = t_M + t_M k = t_M(1 + k)$

- Volumen de retención (V_R): El volumen de retención se calcula multiplicando el flujo (F) por el tiempo de retención, obteniéndose: $V_R = Ft_R = Ft_M(1+k)$ o $V_R = V_M(1+k)$

Donde V_M representa el volumen de la fase móvil. El V_R es útil para comprender el comportamiento de los analitos en la columna (Dong, 2019).

Un valor de k igual a cero indica que el analito no es retenido por la fase estacionaria y se eluye con la fase móvil. Si el valor de k es mayor a 20, significa que el analito se encuentra altamente retenido en la fase estacionaria, lo que puede dificultar su detección debido al ensanchamiento excesivo del pico. Se considera deseable que el valor de k esté en el rango de 1 a 20 (Quattrocchi, 2019).

La cromatografía es una técnica de separación basada en principios termodinámicos, donde cada componente de la muestra se distribuye entre la fase móvil y la fase estacionaria. Este equilibrio y la velocidad de migración de un analito están influenciados por factores como la estructura molecular del analito, la composición química de la fase móvil y estacionaria, así como la temperatura (Snyder *et al.*, 2010). La selección adecuada de las fases móviles y estacionarias es fundamental para optimizar la separación y el análisis de los componentes en una muestra (Quattrocchi, 2019).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En Uruguay luego de la aprobación de la Ley N° 19.172 que regula la producción y distribución de *Cannabis* psicoactivo con una concentración de THC mayor o igual a 1% para uso personal, probablemente ocurra lo mismo que en otros países que pasaron por el proceso de legalización, aumentando la casuística de intoxicaciones por esta planta en pequeños animales (Meola *et al.* 2012, Brutlag & Hommerding 2018, Amissah *et al.* 2022). Este incremento puede deberse a un mayor acceso a la planta por parte de las mascotas, o a que los tutores de estas puedan declarar en la anamnesis, que sus mascotas consumieron parte de la planta o alguna preparación realizada con esta, sin prejuicio como existía previo a la legalización.

Sumado a lo anterior, a partir de octubre del 2017 se reglamentó la ley que autoriza la "venta bajo receta profesional" para las especialidades farmacéuticas con cannabidiol (CBD) como principio activo, elaboradas a partir de extractos de *Cannabis* de variedades no psicoactivos (cáñamo), con un contenido menor a 1% de THC.

En el marco de la legalización de la venta, consumo y uso terapéutico del *Cannabis* en nuestro país es importante contar con técnicas de detección de CBD y THC por HPLC-UV equipamiento disponible en nuestras instalaciones. Esto permitirá diagnosticar la intoxicación y tener un mejor manejo del paciente en tratamiento, así como el desarrollo de líneas de investigación en el uso terapéutico de estas moléculas.

4. HIPÓTESIS

Utilizando la técnica analítica de HPLC-UV podremos detectar y cuantificar concentraciones de CBD y THC en suero sanguíneo de perros.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Desarrollar y validar la técnica analítica de HPLC-UV para detectar y cuantificar CBD y THC en suero sanguíneo de perros.

5.2. Objetivos específicos

Desarrollar la técnica que permita la extracción de las moléculas de THC y CBD en suero sanguíneo de perros.

Determinar los parámetros de validación en una técnica de detección de THC en suero sanguíneo de perros, mediante HPLC-UV.

Determinar los parámetros de validación en una técnica de detección de CBD en suero sanguíneo de perros, mediante HPLC-UV.

6. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN

Para cumplir con los objetivos de investigación, se desarrolló y validó una técnica analítica para la determinación de THC y CBD en suero sanguíneo de perros. Se siguieron las guías de validación de métodos bioanalíticos sugeridos por la *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry (2018)* de la *Food and Drug Administration (FDA)*.

Se tomaron como referencias las técnicas desarrolladas por Zgair *et al.* (2015) en plasma sanguíneo de ratas y el trabajo realizado por Mercolini *et al.* (2008) que utilizó suero y orina de humanos. Las técnicas difieren en el método de extracción del THC y CBD del plasma sanguíneo, extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida respectivamente.

A continuación, se describen por separado los materiales y métodos, resultados y discusión de las dos técnicas utilizadas de referencia. Al final se incluyen un ítem de discusión general y las conclusiones.

6.1. Técnica Zgair *et al.* (2015)

La técnica desarrollada por Zgair *et al.* (2015), utiliza un HPLC-UV y fue descrita para la determinación de THC y CBD en plasma de ratas. Esta técnica utiliza un volumen sanguíneo muy pequeño (150 µL), lo cual nos pareció una ventaja por el poco volumen necesario y sumado a esto, contamos en el Laboratorio de Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Veterinaria con un HPLC-UV.

6.1.1 Materiales y métodos

Obtención de suero blanco

El suero blanco fue provisto por el Laboratorio de Análisis Clínicos de la Facultad de Veterinaria a partir de sangre de perras sanas, que no estaban recibiendo ninguna medicación y que fueron previamente utilizadas para la determinación de perfiles hormonales. Todas las muestras fueron congeladas a -20°C hasta el momento de su uso.

Reactivos y solventes utilizadas

Los estándares de THC y CBD (soluciones metanólicas de concentración 1 mg/mL, 99% de pureza) fueron provistos por Lipomed Inc., como estándar interno el Dietilftalato 99% (DFT). Como solventes se utilizaron Hexano (Merck Millipore calidad HPLC), Acetonitrilo (ACN) (J T Baker calidad HPLC) y Agua Milli-Q. Para la concentración y evaporación se utilizó Gas Nitrógeno calidad industrial.

Etapa de desarrollo y validación

Las actividades de desarrollo y validación de la técnica de detección de THC y CBD en suero sanguíneo fueron llevadas a cabo en el Laboratorio de Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Veterinaria, según las pautas de la *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry (2018)* de la *Food and Drug Administration (FDA)*.

Preparación de soluciones de trabajo

Para la preparación de las soluciones de trabajo 1 y 2 se partió de una solución madre de THC y CBD preparada como se describe en el Anexo II.

A partir de las soluciones de trabajo se prepararon los 6 puntos de suero enriquecido con concentraciones de CBD y THC para construir la curva de calibración (Tabla 1). Cada punto fue realizado por triplicado a excepción del punto más bajo que se realizó por sextuplicado para la determinación del límite de cuantificación.

Tabla 1. Concentración de las soluciones de trabajo empleadas para la elaboración de la curva de calibración.

Soluciones plasmáticas	CBD ng/mL	THC ng/mL
Punto 1	566,03	566,03
Punto 2	291,26	291,26
Punto 3	99,00	99,00
Punto 4	56,60	56,60
Punto 5	29,12	29,12
Punto 6	9,90	9,90
Soluciones metanólicas (ST1)	20000	20000
Soluciones metanólicas (ST2)	2000	2000

CBD (Cannabidiol), THC (Delta-9-Tetrahydrocannabinol)

Para la evaluación de los parámetros de exactitud y precisión, se preparó suero enriquecido con THC y CBD en tres niveles de concentración: baja (25%), media (50%) y alta (75%), utilizando los valores de la curva de calibración como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Concentración de las soluciones de trabajo para la evaluación de la exactitud y precisión.

Soluciones plasmáticas	CBD ng/mL	THC ng/mL
Punto 1 (75%)	350	350
Punto 2 (50%)	225	225
Punto 3 (25%)	150	150

CBD (Cannabidiol), THC (Delta-9-Tetrahydrocannabinol)

Sistema cromatográfico

Zgair *et al.* (2015) proponen un sistema cromatográfico que utiliza como fase estacionaria una columna cromatográfica ACE C18-PFP (100Å, 4,6 x 150 mm, 3 µm) acoplada a una columna de seguridad ACE C18-PFP de 3 µm. La fase móvil se compone de una mezcla de acetonitrilo y agua en una proporción de 62:38 (v/v) con un flujo isocrático de 1 mL/min. La temperatura del compartimento de la columna se mantuvo constante a 55 °C, y la longitud de onda de detección se configuró en 220 nm. Bajo estas condiciones, los tiempos de retención fueron de 8 minutos para el CBD y 15 minutos para el THC.

Para adaptar el sistema cromatográfico a nuestras condiciones de laboratorio, se empleó un equipo UHPLC Dionex Ultimate 3000 que incluye una bomba cuaternaria y un detector DAD. La fase estacionaria utilizada fue una columna Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (100Å, 4,6 x 250 mm, 5 µm), el cambio de la columna original utilizada por los autores se debió a la imposibilidad de conseguir la misma en nuestro mercado, la temperatura del compartimento de la columna se mantuvo a 55 °C. La fase móvil se compuso de una mezcla de acetonitrilo y agua (68:32 v/v), fluyendo de manera isocrática a 1 mL/min. Con el fin de reducir el tiempo de corrida, se exploraron modificaciones en la proporción de acetonitrilo en la fase móvil, llegando a una proporción del 80%.

Método de extracción

El método utilizado inicialmente, según la descripción de Zgair *et al.* (2015), involucró una PP seguida de una LLE. Para esto se tomaron 150 µL de suero enriquecido (P3, 99 ng/mL) y se les añadieron 25 µL de una solución de diclorodifeniltricloroetano (DDT) utilizada como estándar interno (EI). Para la PP, se agregaron 2 mL de ACN previamente enfriado a -20 °C, y se agitó la mezcla en un vortex durante 1 minuto. Luego, se añadieron 2 mL de agua Milli-Q y 3 mL de hexano. La mezcla resultante se agitó en un vortex durante 5 minutos a 2000 RPM y posteriormente se centrifugó a 3000 RPM durante 15 minutos. En este trabajo por motivos regulatorios y de seguridad de los operadores, fue utilizada una solución metanólica de Dietilftalato $2,5 \times 10^{-5}$ como estándar interno.

La fase orgánica sobrenadante se transfirió a un tubo cónico y se llevó a sequedad bajo corriente de gas nitrógeno a 40 °C. El residuo seco se reconstituyó con 150 µL de una solución compuesta por una mezcla de ACN y agua en una proporción de 68:32 (v/v) y 30 µL de esta fueron inyectadas en el cromatógrafo para su análisis.

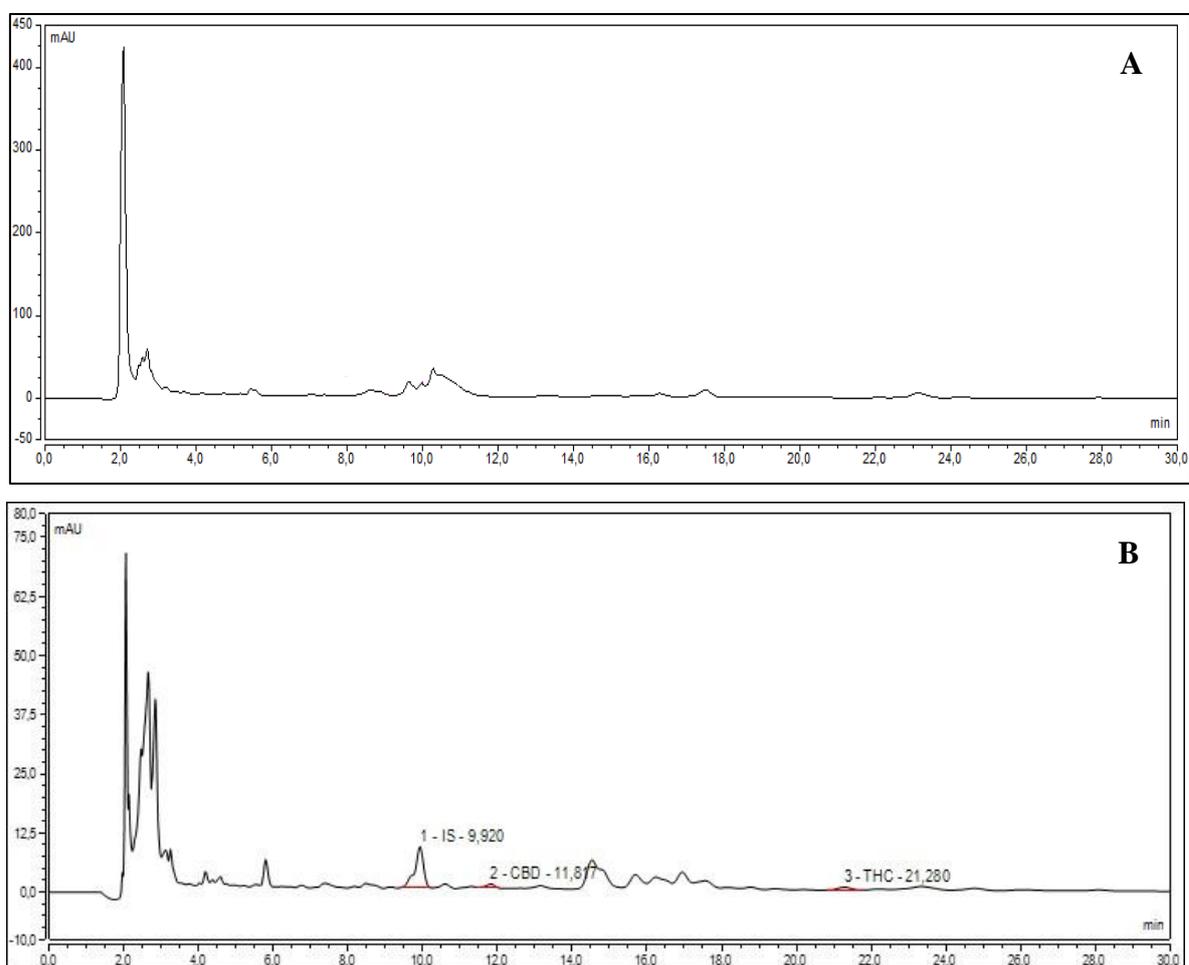
Con el objetivo de mejorar la detección de los analitos, en primer lugar, se realizaron incrementos en los volúmenes de extracción, ajustando los volúmenes de solvente utilizados para cada caso. Se llevaron a cabo ensayos con volúmenes de 250, 500, 750 y 1000 µL.

Además, para optimizar el proceso de extracción, se aplicó una estrategia denominada "doble extracción". En este método, la fase acuosa resultante de la LLE se sometió a una segunda extracción utilizando nuevamente 3 mL de hexano. Posteriormente, ambas fases orgánicas resultantes se combinaron y se secaron con gas nitrógeno. El residuo seco se reconstituyó siguiendo las mismas condiciones del procedimiento anteriormente descrito y se inyectaron volúmenes de 30 y 50 µL en el cromatógrafo para su análisis.

6.1.2 Resultados y discusión

Las técnicas empleadas para la detección de CBD y THC en matrices biológicas, principalmente utilizan como herramientas de detección y cuantificación la espectrofotometría de masas, sin embargo, no es una técnica accesible para todos los laboratorios analíticos (Mercolini *et al.*, 2008). Es así que validar y contar con una técnica que utilice un equipamiento más accesible como el HPLC-UV, es importante para que el desarrollo de futuras líneas de investigación no sea tan costoso y además poder contribuir al diagnóstico clínico de esta intoxicación.

En nuestras condiciones de trabajo, la técnica propuesta por Zgair *et al.* (2015) no alcanzó la selectividad adecuada en la extracción de los analitos, como se observa en la Figura 3, lo que provocó una baja resolución cromatográfica entre estos y los otros componentes del suero.



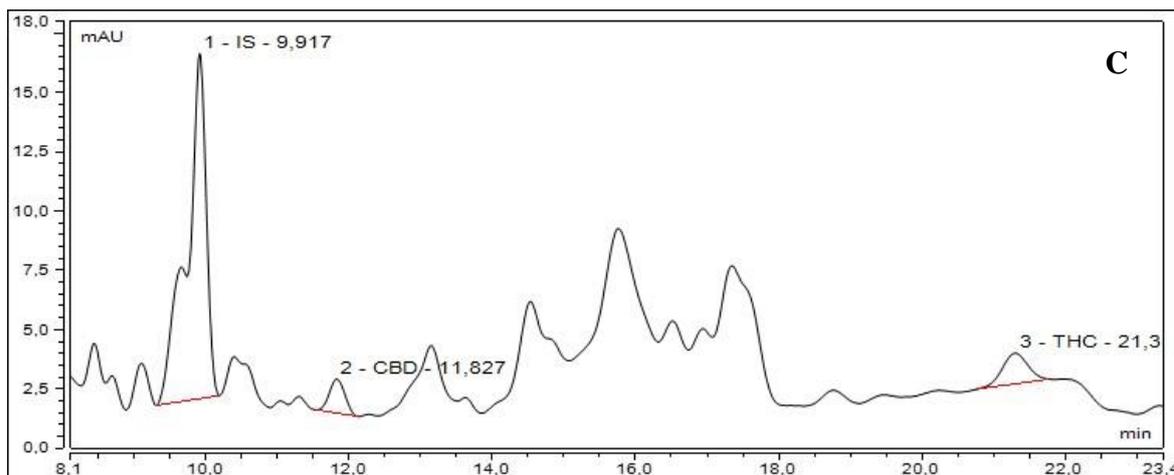
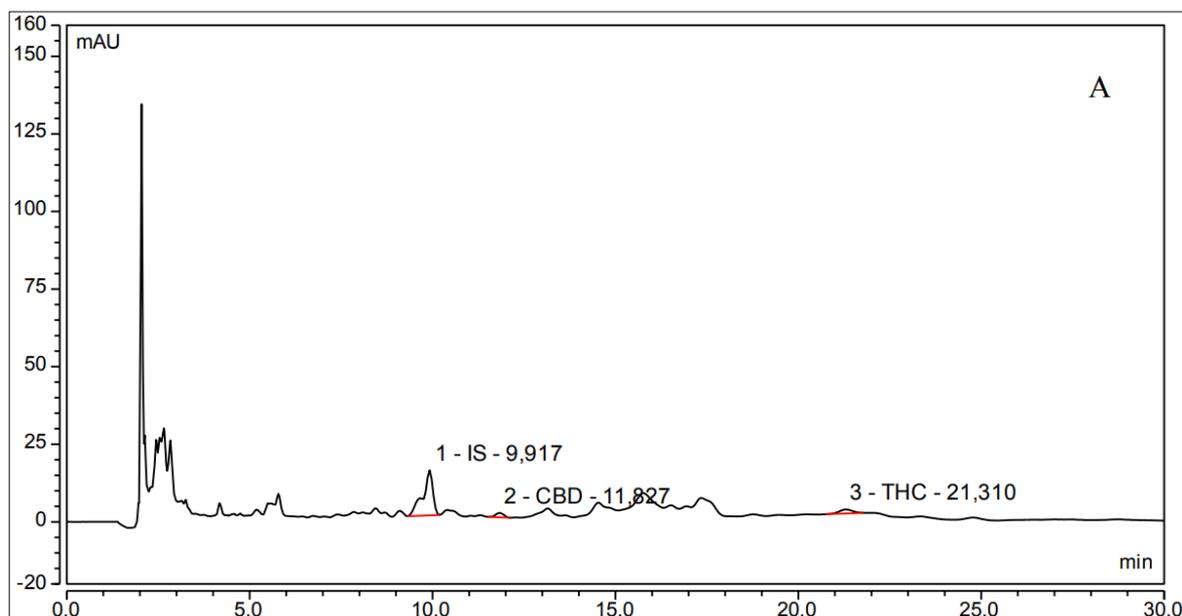


Figura 3. Cromatogramas correspondientes a la técnica desarrollada por Zgair *et al.* (2015). **A.** Cromatograma de suero en blanco. **B.** Cromatograma del Punto 3, 250 μ L de muestra, LLE simple (S/N < 7). **C.** Cromatograma de B autoajustado a los tiempos de retención de los analitos.

A pesar de las modificaciones realizadas con el objetivo de obtener una mejor extracción del analito, aumentando el volumen de la muestra y empleando la técnica de doble extracción, con el fin de mejorar la recuperación, selectividad y resolución cromatográfica, como fue sugerido por Quattrochi (2019), no se lograron superar estos inconvenientes.

En lo que respecta a las modificaciones en la fase móvil, no se logró reducir significativamente los tiempos de retención de los analitos ya que, en nuestras condiciones, los tiempos de retención más bajos alcanzados fueron de 14 minutos para el CBD y 22 minutos para el THC (Figura 4). Es probable que la sustitución de la columna original haya sido un punto crítico en este aspecto.



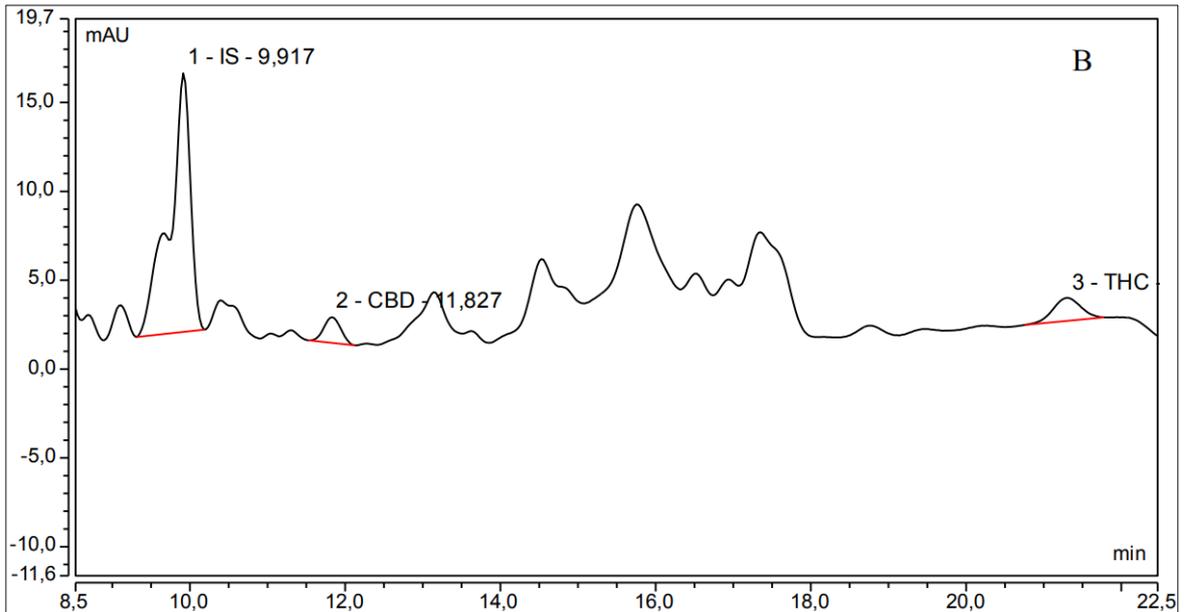
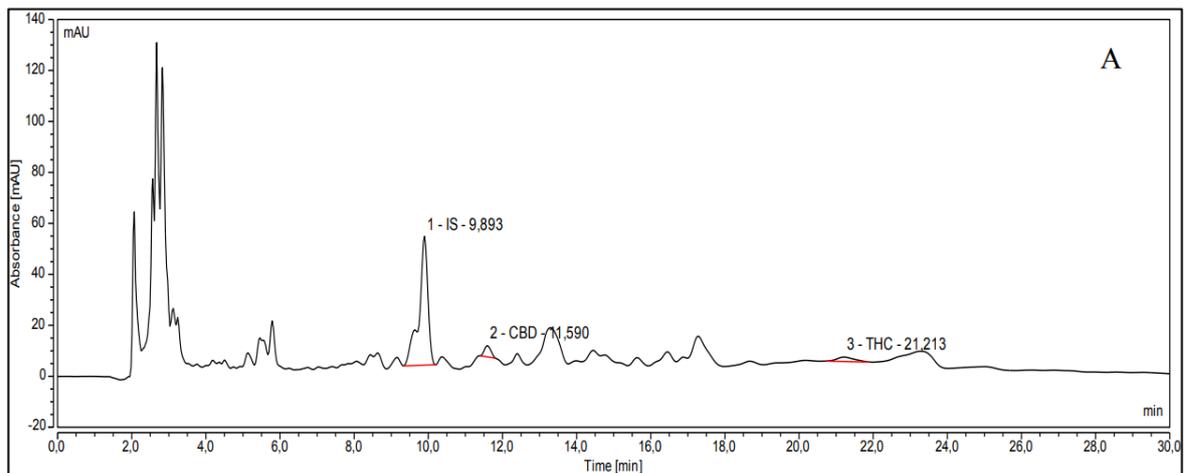


Figura 4. Cromatogramas correspondientes a la técnica desarrollada por Zgair *et al.* (2015). **A.** Cromatograma Punto 3, 500 μ L de muestra, LLE simple (S/N <3). **B.** Cromatograma A autoajustado a tiempos de retención de los analitos.

En cuanto al volumen de suero utilizado, se pudo detectar la presencia de CBD a partir de un volumen de 500 μ L, lo que conlleva la necesidad de utilizar volúmenes elevados de solventes en el tratamiento de la muestra. Por otra parte, la técnica de doble extracción no logra una adecuada selectividad como se observa en la Figura 5, probablemente sea debido a que en el proceso además se aumentó la cantidad de interferentes.



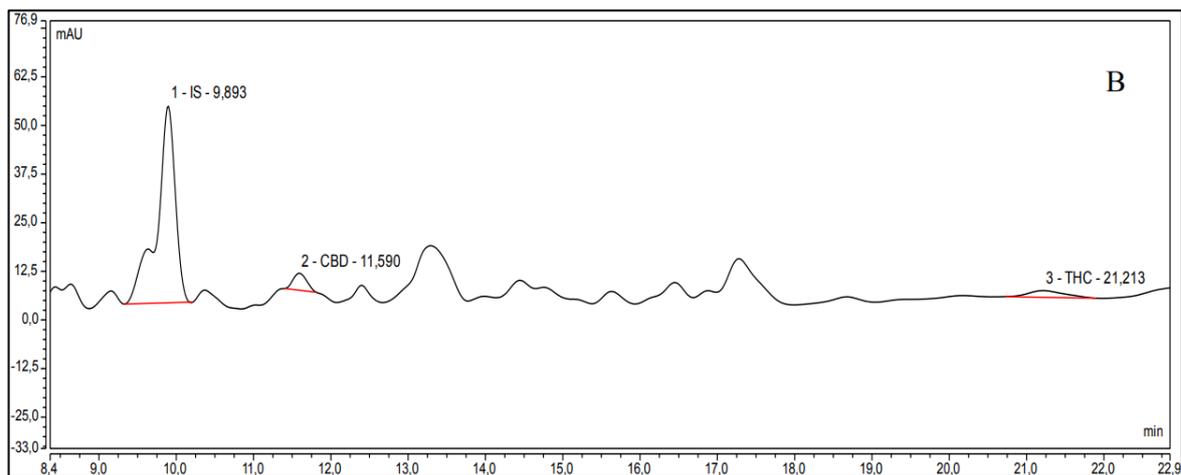


Figura 5. Cromatogramas correspondientes a la técnica desarrollada por Zgair *et al.* (2015). **A** Cromatograma Punto 3, 500 μ L, doble extracción. (S/N < 3). **B.** Cromatograma A autoajustado a tiempos de retención de los analitos.

A modo de resumen en la Tabla 3 se presenta la técnica original desarrollada por Zgair *et al.* (2015) y los cambios que se realizaron para intentar obtener resultados que permitieran cumplir con los objetivos de validar una técnica para la detección de THC y CBD en suero de perros en nuestras condiciones de laboratorio.

Tabla 3. Resumen de la técnica original y las modificaciones ensayadas de la técnica de Zgair *et al.* (2015)

	Técnica original	Variaciones realizadas
Método de extracción	PP + LLE	PP+LLE/PP+LLE x 2
Volumen de muestra	150 µL plasma sanguíneo	150 µL, 250 µL, 500 µL suero sanguíneo
Fase estacionaria	Varian Zorbax Eclipse C8 (80Å, 4,6 x 150 mm, 5 µm)	Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (100Å, 4,6 x 250 mm, 5 µm)
Fase móvil	ACN: H ₂ O 62:38 (v/v)	ACN: H ₂ O 68:32 - 70:30 - 80:20 (v:v)
Velocidad de flujo	isocrático 1mL/min	isocrático 1mL/min
Estándar interno	Diclorodifeniltricloroetano (DDT)	Dietilftalato (DFT)
Longitud de onda de detección	220 nm	220 nm
Temperatura del compartimiento de columna	55°C	55°C
Tiempos de retención	- CBD: 8 min - THC: 15 min	- CBD: 14 min - THC: 22 min
Selectividad	Cumple: evaluada con sustancias endógenas. No hay interferencias a los tiempos de retención de los analitos	No cumple: evaluada con sustancias endógenas. Aparecen interferencias a los tiempos de retención de los analitos que no se logran resolver con modificaciones de la fase móvil.
Rango lineal CBD	10 – 10000 ng/mL	- No corresponde
Rango lineal THC	10 – 10000 ng/mL	- No corresponde
Precisión	Conc. CBD (ng/mL) – CV (%)	- No corresponde
	20 8.02	
	100 3.23	
	1000 2.60	
	Conc. THC (ng/mL) – CV (%)	- No corresponde
	20 14.33	
	100 4.97	
	1000 3.54	
Exactitud	Conc. CBD (ng/mL) – ER (%)	- No corresponde
	20 13.60	
	100 -3.00	
	1000 0.73	
	Conc. THC (ng/mL) – ER (%)	- No corresponde
	20 13.60	
	100 -3.00	
	1000 0.73	

	Técnica original	Variaciones realizadas
Límite inferior cuantificación (LLOQ)(ng/mL)	10	- No corresponde
Límite inferior de detección (LLOD) (ng/mL)	10	- No corresponde

Debido a estos factores, se tomó la decisión de recurrir a otra técnica con el objetivo de lograr una mejor detección, recuperación y resolución de los analitos, además de minimizar el uso de solventes orgánicos y reducir los tiempos de manipulación y de las corridas cromatográficas. Se optó, por lo tanto, evaluar la técnica propuesta por Mercolini *et al.* (2008), originalmente diseñada para plasma y orina de humanos.

6.2 Técnica Mercolini *et al.* (2008)

El método propuesto por Mercolini *et al.* (2008) presenta varias ventajas en comparación con la técnica Zgair *et al.* (2015). La incorporación de la SPE contribuye a una limpieza más efectiva de la matriz, mejorando la selectividad en la extracción de los analitos del suero y evitando la formación de emulsiones, un problema frecuente en la LLE. Además, la SPE permite un considerable ahorro de tiempo, solventes orgánicos y gases de evaporación debido a los menores volúmenes generados. Sin embargo, la SPE no está exenta de desventajas en comparación con la LLE, tales como los elevados costos de los cartuchos, el requerimiento de equipamiento adicional y la limitación en los volúmenes de muestra que se pueden procesar (Ahadi *et al.* 2011).

6.2.1 Materiales y métodos

La *Obtención del suero blanco* y la *Preparación de soluciones de trabajo* fueron las mismas que se detallaron por la técnica de Zgair *et al.* (2015).

Reactivos y solventes utilizados

Los estándares de THC, CBD y el estándar interno DFT fueron los mismos que los descritos en la técnica de Zgair *et al.* (2015). Los solventes utilizados incluyeron metanol grado HPLC (Mallinckrodt Pharmaceuticals), acetonitrilo grado HPLC (J.T. Baker), y agua Milli-Q. Para la preparación del Buffer fosfato (BF) 50 mM a pH 2.7, se empleó fosfato de sodio anhidro fosfato disódico monohidrato (J.T. Baker) y ácido fosfórico al 98% (Dorwil). En el proceso de SPE, se utilizaron cartuchos Strata Phenomenex SPE C18-E (55 μm , 70 \AA), 100 mg/1 ml, Strata Phenomenex SPE C8 (55 μm , 70 \AA), 100 mg/1 ml y cartuchos SUPELCO Discovery™ SPE C8 (50 μm , 70 \AA), 100 mg/1 ml. La concentración y evaporación se llevaron a cabo mediante el uso de Gas Nitrógeno industrial.

Sistema cromatográfico

Mercolini *et al.* (2008) proponen un sistema cromatográfico que utiliza una columna cromatográfica Varian Zorbax Eclipse C8 (80 \AA , 4,6 x 150 mm, 5 μm), acoplada a una columna de seguridad Phenomenex C8 (4 mm x 3,0 mm i.d., 5 μm). La fase móvil consiste en una mezcla de ACN y buffer fosfato a pH 2,7, 50 mM en una proporción de 65:35 (v/v). El flujo es variable, en un gradiente de 0 a 8 minutos, con un flujo lineal de 0,3-2,5 ml/min. Desde el minuto 8 al 12, el flujo se mantuvo constante a 2,5 ml/min, y del minuto 12 al 14, se aplicó un gradiente lineal de 2,5-0,3 ml/min. La longitud de onda de detección fue configurada a 220 nm. Bajo estas condiciones, el tiempo de retención para el THC es de 10,7 minutos.

El sistema cromatográfico se adecuó para adaptarse a nuestras condiciones de laboratorio. En esta versión, se utilizaron columnas Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (100 \AA , 4,6 x 250 mm, 5 μm) y Agilent Zorbax Eclipse XDB C8 (80 \AA , 3,0 x 150 mm, 5 μm). La fase móvil original se utilizó siguiendo las condiciones propuestas por los autores del trabajo. Posteriormente, se realizaron las siguientes modificaciones: en una primera etapa, se sustituyó el sistema de gradientes por un flujo isocrático de 1 mL/min; en una segunda etapa, se reemplazó el tampón fosfato por agua Milli-Q y la proporción (68:32 v/v), además la

longitud de onda de detección se fijó a 210 nm y la temperatura del compartimiento de la columna se fijó a 37 °C.

Método de extracción

El procedimiento de extracción propuesto por Mercolini *et al.* (2008) utilizó cartuchos Isolute C8 (100 mg, 1 mL) el uso de SPE permite obtener una mejor selectividad en la extracción de los analitos del plasma. Estos cartuchos son activados pasando 1 mL de metanol a través de cada cartucho cinco veces, y se acondicionan pasando 1 mL de agua ultrapura cinco veces.

A 500 o 1000 µL de plasma se le añaden 1000 µL de agua ultrapura y 50 µL de una solución de estándar interno de indometacina. Esta mezcla es cargada en el cartucho, lavada dos veces con 1 mL de un BF 50 mM, pH 2.7, y una vez con 1 mL de una mezcla de BF 50 mM, pH 2.7/MeOH (80/20, v/v), seguido de un último lavado con 100 µL de metanol. Luego, el cartucho es secado por vacío durante 1 min a -30 mmHg, y los analitos son eluidos con 1 mL de metanol. El eluto resultante es llevado a sequedad por rotaevaporación y se reconstituye con 125 µL de metanol.

En este trabajo de tesis, a diferencia de lo realizado por Mercolini *et al.* (2008), utilizamos suero en vez de plasma sanguíneo y se llevó a sequedad a 40 °C bajo corriente de gas nitrógeno. Además, se probaron tres tipos de cartuchos, tal como se describe en la sección 6.2.1. En el caso de los cartuchos C18, se utilizó ACN como solvente de elución para compensar el aumento en la hidrofobicidad de esta fase estacionaria. Los cartuchos C8 se utilizaron siguiendo las condiciones propuestas por los autores.

6.2.2 Resultados y discusión

La técnica desarrollada por Mercolini *et al.* (2008) para la cuantificación de THC en plasma humano, arrojó resultados satisfactorios en términos de selectividad, recuperación de CBD y THC, tiempos de análisis y consumo de solventes orgánicos. Como se puede apreciar en la Tabla 4.

En cuanto a las condiciones cromatográficas, se intentó inicialmente la utilización de una columna Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (100Å, 4,6 x 250 mm, 5 µm). Aunque en esta oportunidad se lograron mejores resultados en términos de resolución de los componentes del suero y los analitos en comparación con la técnica de Zgair *et al.* (2015) (Figura 6), no se lograron tiempos de corrida más cortos en condiciones isocráticas, y las presiones alcanzadas con gradientes de flujo comprometían la vida útil de la columna. La columna ZORBAX Eclipse, XDB-C8 (80Å, 3,0 x 150 mm, 5 µm, de Agilent Technologies) en cambio, permitió reducir el tiempo de corrida en comparación con la columna C18, y permitió el trabajo en condiciones isocráticas, a diferencia de lo propuesto en la técnica original (Figura 7). Los tiempos de retención logrados en estas condiciones fueron de 4.0 minutos para el estándar interno, 5.5 minutos para CBD y 10.0 minutos para THC. La disminución de los tiempos de retención de los analitos se puede atribuir a la menor polaridad de la fase estacionaria, lo que permitió una mejor resolución de los analitos al eluir parte de los interferentes en el frente de corrida (Dong, 2019). Este aspecto resulta especialmente relevante para moléculas como el THC y el CBD que carecen de grupos cromóforos y

presentan bajas absorbancias en el espectro UV. Por este motivo solo absorben a longitudes de onda muy bajas donde la detección de los analitos es menos efectiva debido a la presencia de muchas sustancias con altas absorbancias en esas regiones del espectro (Pragst *et al.*, 2004).

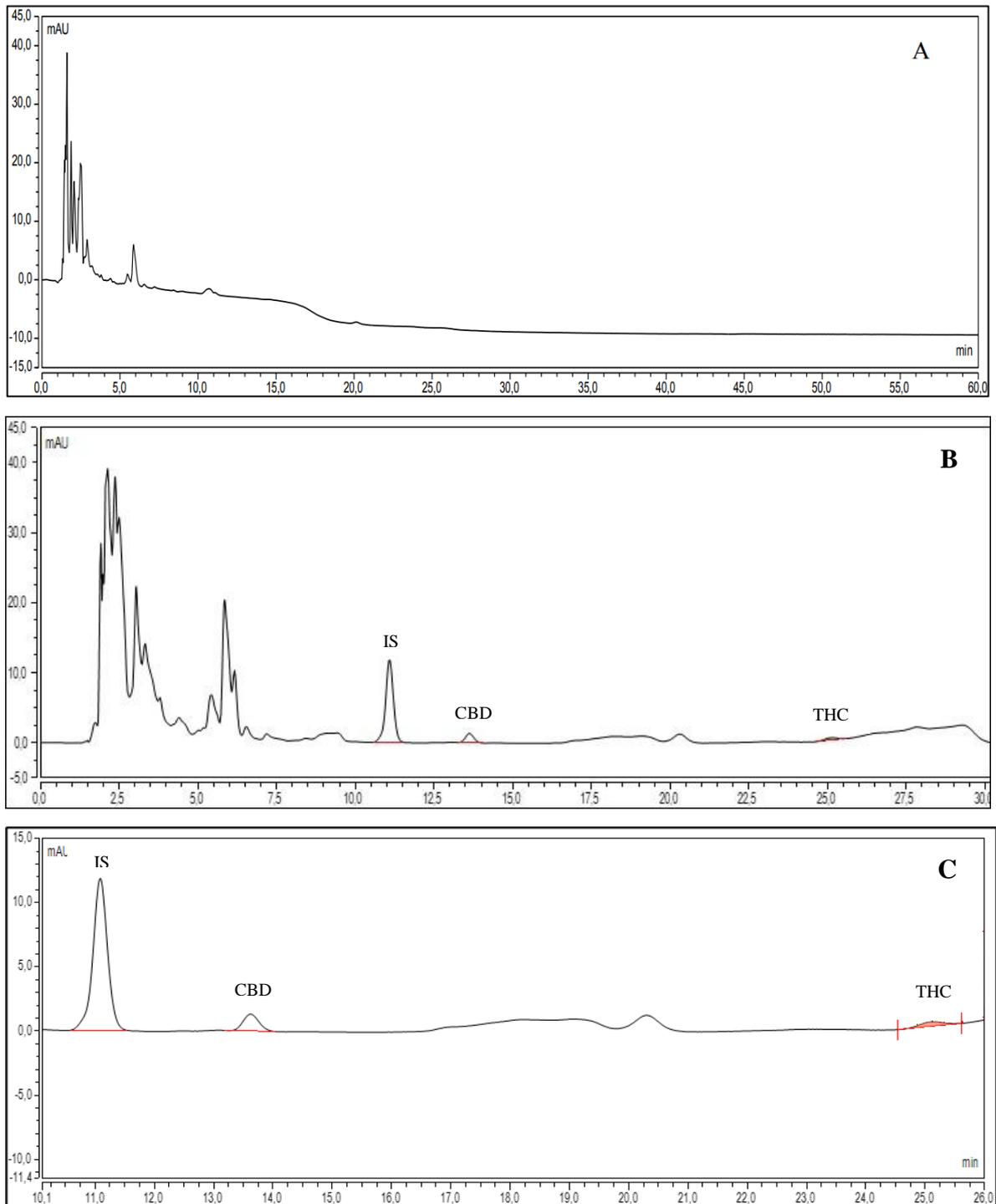
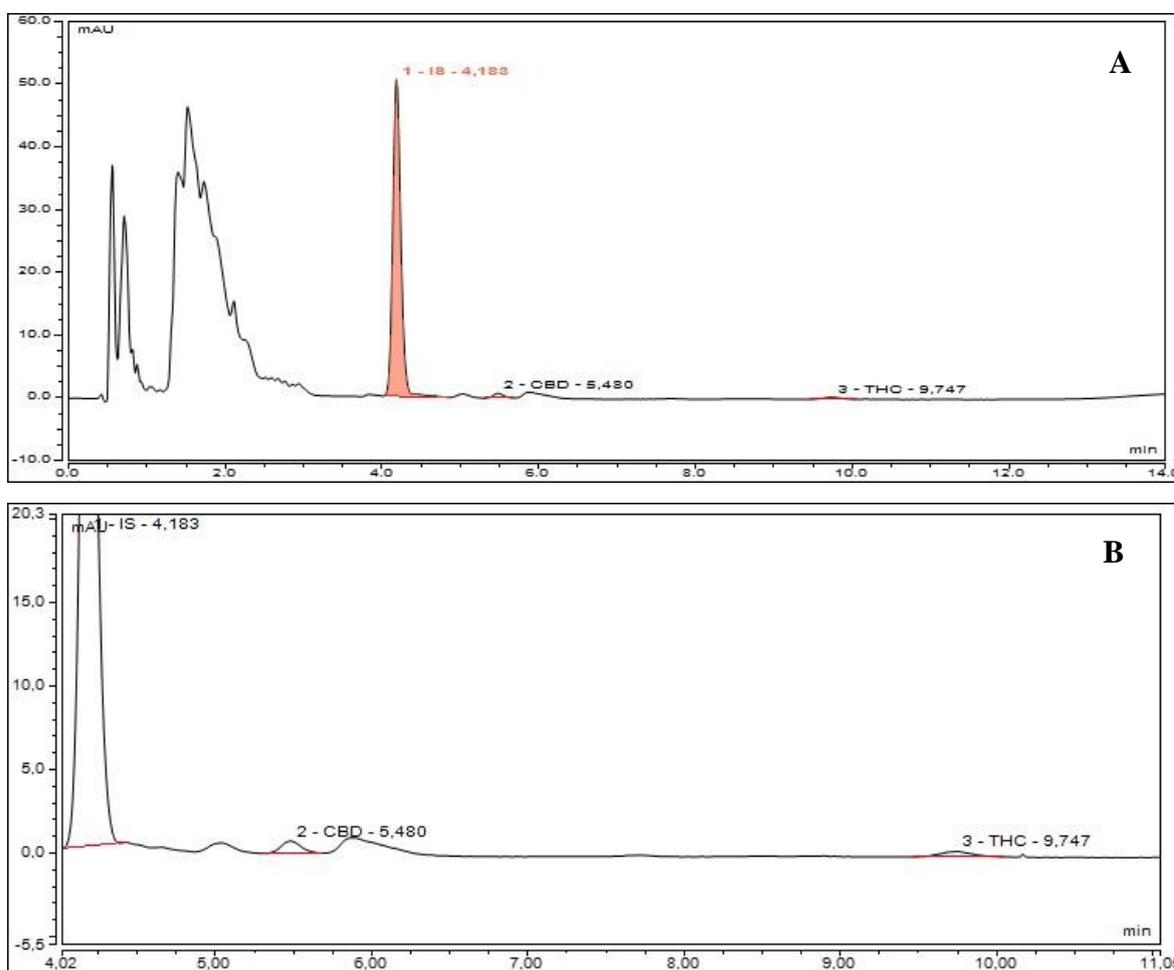


Figura 6. Cromatogramas correspondientes a la técnica desarrollada por Mercolini *et al.* (2008) **A.** Cromatograma de suero blanco. **B.** Cromatograma del Punto 3, 500 μ L de muestra, columna C18, SPE C18 (100 mg/1 mL), (S/N >10). **C.** Cromatograma B autoajustado a tiempos de retención de los analitos.

La posibilidad de trabajar en condiciones isocráticas se debió, probablemente, a las características de la fase estacionaria XDB o de “unión extra densa”. Este tipo de fase estacionaria ofrece una mayor disponibilidad de sitios activos de unión y un menor tamaño de poro aumentando del área efectiva de interacción entre la fase estacionaria y los componentes de la muestra (Dong, 2019).

En términos comparativos, los cartuchos C8 proporcionaron una mejor limpieza de la muestra en relación con los C18-E (Figura 6 y 7). Los cartuchos C8 poseen una mayor lipófila, lo que facilita que se retengan los analitos de interés y permite su elución con solventes de fuerza media como el metanol (Mercolini *et al.*, 2008). Entre los diferentes tipos de cartuchos C8 evaluados, los SUPELCO Discovery™ SPE C8 (50 μm , 70 Å), 100 mg/1 mL, mostraron un rendimiento superior a los Strata Phenomenex SPE C8 (55 μm , 70 Å), 100 mg/1 mL en términos de limpieza de la muestra (Figura 7).



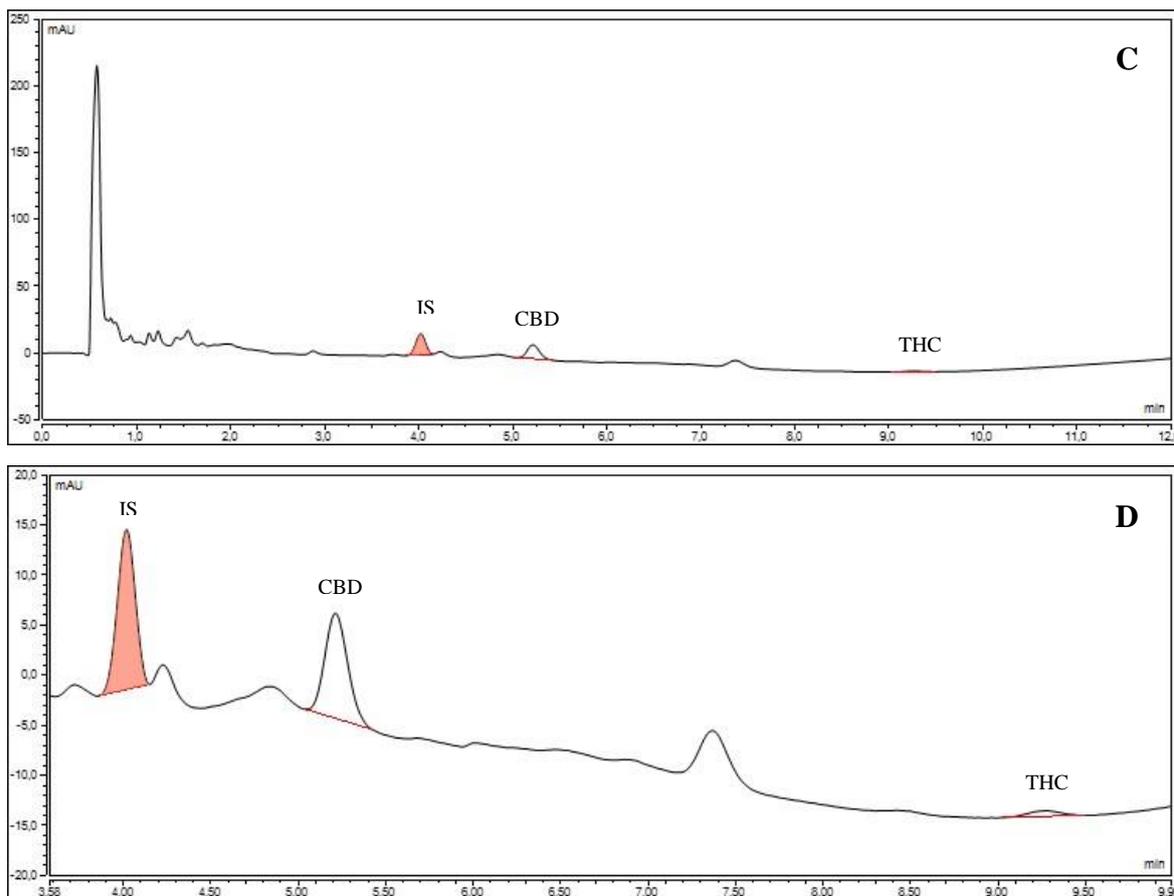


Figura 7. Cromatogramas correspondientes a la técnica desarrollada por Mercolini *et al.* (2008) **A.** Cromatograma Punto 3, 1000 μ L de muestra, columna XDB-C8, SPE C8 SUPELCO Discovery™ (100 mg/1 mL). (S/N > 10). **B.** Cromatograma A autoajustado a tiempos de retención de los analitos. **C.** Cromatograma Punto 3, 1000 μ L de muestra, columna XDB-C8, SPE C8 Strata Phenomenex (100 mg/1 mL). (S/N >10) **D.** Cromatograma C autoajustado a tiempos de retención de los analitos.

A modo de resumen en la Tabla 4 se presenta la técnica original desarrollada por Mercolini *et al.* (2008) y los cambios que se realizaron para intentar obtener resultados que permitieran cumplir con los objetivos de validar una técnica para la detección de THC y CBD en suero de perros en nuestras condiciones de Laboratorio. La técnica propuesta por Mercolini *et al.* (2008) con las modificaciones antes detalladas, resultó satisfactoria para los objetivos de esta tesis, por lo que se procedió a su validación.

Tabla 4. Resumen de la técnica original y las modificaciones ensayadas de la técnica de Mercolini *et al.* (2008).

	Técnica original	Variaciones realizadas
Método de extracción	SPE Isolute C8 (100 mg, 1mL)	SPE C18-E, C8 (100 mg, 1mL)
Volumen de muestra	500-1000 µL plasma sanguíneo	1000 µL suero sanguíneo
Lavado de la muestra	- 1 mL BF 50 mM, pH 2.7 - BF 50 mM, pH 2.7/MeOH (80/20, v/v) - 100 µL MeOH	- 1 mL BF 50 mM, pH 2.7; - BF 50 mM, pH 2.7/MeOH (80/20, v/v) - 100 µL MeOH
Fase estacionaria	ACE C18-PFP (100Å, 4,6 x 150 mm, 3 µm)	Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (100Å, 4,6 x 250 mm, 5 µm)
Fase móvil	ACN: BF 50 mM, pH 2, 65/35 (V/V)	ACN: H2O (68/32; v/v)
Velocidad de flujo de fase móvil.	- 0-8 min (0,3-2,5 ml/min), - 8-12 min (2,5 ml/min) - 12-14 min (2,5-0,3 ml/min)	Isocrático 1 mL/min
Estándar interno	Indometacina	Dietilftalato
Longitud de onda de detección	220 nm	210 nm
Temperatura del compartimiento de columna	No especifica	37°C
Tiempos de retención	THC: 10,7 min	- THC: 10,0 min - CBD: 5,5 min
Selectividad	Cumple: evaluada con sustancias exógenas y endógenas por 30 min	Cumple: evaluada con sustancias endógenas por 36 min
Rango lineal THC	- 2 – 50 ng/mL - 50 – 650 ng/mL	30 – 500 ng/mL
Rango lineal CBD		10 – 500 ng/mL

	Técnica original	Variaciones realizadas				
Precisión	Conc. THC (ng/mL) – CV (%)	Conc. THC (ng/mL) – CV (%)				
			2	6.0	125	14
			350	4.6	250	8
		650	3.0	375	5	
			Conc. CBD (ng/mL) – CV (%)			
			125	8		
			250	8		
			375	5		
	Exactitud	No se realiza según guías internacionales	Conc. THC (ng/mL) – CV (%)			
			125	104		
250			115			
375			96			
Conc. CBD (ng/mL) – CV (%)						
125			93			
250			104			
375			110			
Límite inferior de cuantificación (LLOQ)(ng/mL)			2	- THC: 15		
		- CBD: 10				
Límite inferior de detección (LLOD) (ng/mL)	0.8	- THC: 10				
		- CBD: ND*				

*ND: no determinado

6.2.3 Validación de la técnica de Mercolini *et al.* 2008.

Luego de obtener resultados satisfactorios con la técnica de Mercolini *et al.* (2008) modificada, se prosiguió a realizar la validación de esta técnica siguiendo las recomendaciones de la *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry (2018)* de la *Food and Drug Administration (FDA)*. Durante la validación, evaluamos las siguientes características analíticas: Selectividad, Linealidad, Precisión, Exactitud y Estabilidad. A continuación, se presentan los resultados obtenidos. La técnica utilizada para el proceso de validación es la descrita en el Anexo II.

Selectividad

La selectividad se determinó utilizando seis sueros blancos, provenientes de animales que no estaban sometidos a ningún tratamiento farmacológico para verificar la no interferencia de componentes de la matriz biológica con los analitos y el estándar interno utilizado (Dietilftalato). Como se puede observar en la Figura 6. Los tiempos de retención del EI ~ 4.0 minutos, el CBD ~ 5,5 minutos y el THC ~ 10,0 minutos.

Linealidad

La linealidad se determinó realizando una curva de calibración utilizando seis niveles de concentraciones séricas en un rango de entre 10 – 500 ng/mL para CBD y 30 – 500 ng/mL para THC. Cada punto fue realizado por triplicado y con los dos analitos en cada punto.

El análisis estadístico de la curva se realizó utilizando el software Microsoft Excel [2016]. El modelo matemático empleado fue el siguiente:

$$C=RA \cdot \beta + \gamma$$

donde:

- **RA**: Relación de áreas,
- **β** : Pendiente (determinada mediante el Test de Fischer),
- **γ** : Ordenada en el origen.

Los valores de β y γ fueron determinados mediante el método de mínimos cuadrados. Se consideró un nivel de significancia $\alpha < 5\%$.

Para evaluar si β la significancia de la pendiente, se utilizó el Test de Fischer con un nivel de significancia del 95%.

En este caso ambas pendientes resultaron ser significativamente diferentes de cero con $p < 0.00001$ para CBD y $p < 0.00001$ para THC

Para evaluar si la ordenada en el origen γ , difiere significativamente de cero se calcula el intervalo de confianza al 95% según la formula:

$$IC_{95\% \gamma} = \gamma \pm t(0.05, GL_{reg}) \cdot SE(\gamma)$$

donde:

- **t**: Valor crítico de la distribución t de Student para $\alpha < 5\%$
- **GL_{reg}** : Grados de libertad de la regresión,
- **$SE(\gamma)$** : Error estándar de la pendiente.

Se considera que γ no difiere estadísticamente de cero cuando el $IC_{95\% \gamma}$ incluye el cero.

$$IC_{95\% \gamma} CBD = -1.5 - 2.1$$

$$IC_{95\% \gamma} CBD = -4.9 - 4.7$$

En ambos casos los $IC_{95\% \gamma}$ incluyen al valor cero

El método desarrollado, permite la cuantificación en un rango lineal de 10 – 500 ng/mL para CBD y 30 – 500 ng/mL para THC, con un coeficiente de correlación R^2 superior a 0.99.

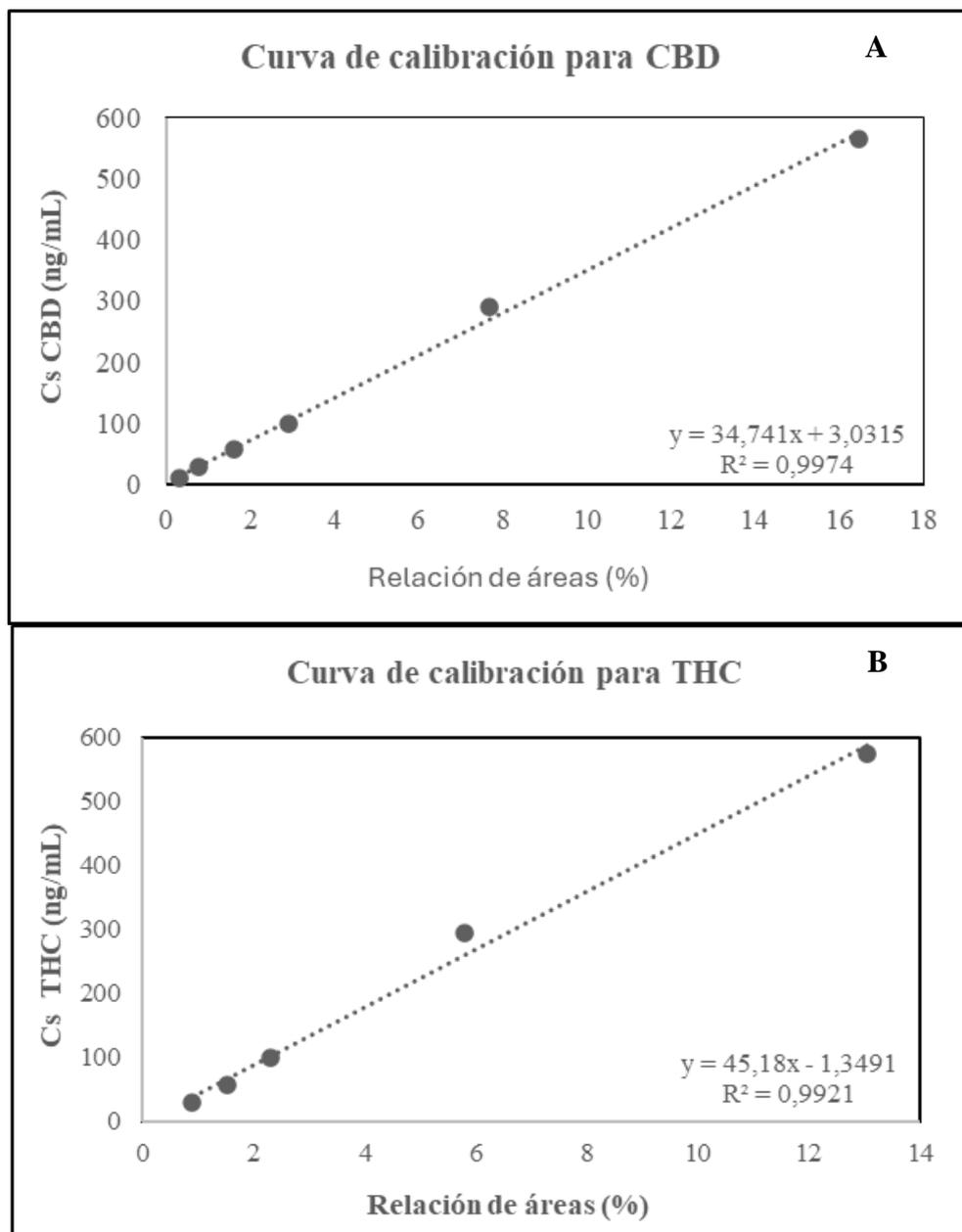


Figura 8. Curvas de calibración para CBD (A) y THC (B).

Precisión y exactitud

La precisión se determinó utilizando tres niveles por sextuplicado de concentraciones conocidas a 25, 50 y 75% de la curva de calibración. Se consideró aceptable para la precisión un coeficiente de variación [CV (%)] menor al 15 %. En el caso de la exactitud como sugieren las BMVGI-FDA se consideró aceptable un valor promedio de entre 85 y 115 % del valor nominal de la muestra, excepto para el nivel menor al que se le exige un rango de exactitud promedio de entre 80 y 120 % del valor nominal de la muestra (BMVGI-FDA, 2018).

La precisión y exactitud se mantuvieron dentro de los límites de aceptación para los tres niveles ensayados (Tabla 3).

Tabla 5. Valores de Precisión y Exactitud para los tres niveles ensayados

		N3 (125 ng/mL)	N2 (250 ng/mL)	N1 (375 ng/mL)
CBD	Precisión [CV (%)]*	14	8	5
	Exactitud (%)*	93	104	110
THC	Precisión [CV (%)]*	8	8	5
	Exactitud (%)*	104	115	96

*n=6

Estabilidad

Las muestras séricas de concentraciones conocidas mantenidas a -20 °C se mantuvieron estables por más de 6 meses. Para esto se utilizaron las mismas condiciones que para la validación de la linealidad, utilizando los sueros con los seis niveles de concentraciones descritas anteriormente a seis meses de su elaboración.

Límite inferior de cuantificación (LLOQ)

Para la determinación del LLOQ se tomó el punto más bajo de la curva de calibración se realizó por sextuplicado. Se tomó como límite de cuantificación la menor concentración cuyo cociente señal/ruido (S/N) es mayor o igual a 10.

Límite inferior de detección (LLOD)

Para la determinación del LLOD se tomó el punto más bajo de la curva de calibración se realizó por sextuplicado. Se tomó como límite de cuantificación la menor concentración cuyo cociente señal/ruido (S/N) es mayor o igual a 3.

7. DISCUSIÓN GENERAL

El hecho de que *Cannabis* sea una de las drogas recreativas más consumidas a nivel mundial y de que en Uruguay ocupe el cuarto lugar (Ramírez *et al.*, 2019), sumado a su uso terapéutico incipiente en medicina veterinaria (Gamble *et al.*, 2018; Brioschi *et al.*, 2020; Verrico *et al.*, 2020; Mejia *et al.*, 2021; Lima, *et al.*, 2022; Ukai *et al.*, 2023), hace que estos factores lleven a la necesidad de contar con técnicas analíticas capaces de detectar concentraciones bajas de THC y CBD, los dos fitocannabinoides más importantes y estudiados (Evans, 1991; Russo, 2011; Di Marzo & Pisticielli, 2015). Por otro lado, luego de la aprobación de la ley que regula la producción y comercialización de los productos derivados del *Cannabis* en nuestro país, aumentó el uso medicinal y recreativo del mismo. Además, particularmente el *Cannabis* para uso recreativo tiene mayor contenido de THC (Mondino *et al.*, 2019; De Briyne *et al.*, 2021; Amissah *et al.*, 2022). Todo esto podría llevar al incremento de las consultas por intoxicaciones en animales de compañía con esta planta, al igual que ha sucedido en otros países (Meola *et al.*, 2012; Brutlag & Hommerding, 2018; Amissah *et al.*, 2022). Es así como con esta tesis buscamos validar una técnica acorde a nuestra realidad para profundizar futuras líneas de investigación y contar con un método diagnóstico en nuestros laboratorios. Dado que el método analítico que se vaya a utilizar para cualquiera de estas finalidades debe estar validado, demostrando ser confiable y reproducible para el propósito indicado (ICH, 2022), se evaluaron los parámetros de acuerdo con la *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry* de la *Food and Drug Administration (FDA)* (2018).

La preparación de la muestra biológica para su análisis es fundamental para lograr buenos resultados (Stashenko & Martínez, 2011). Para esto, el método ideal debe ser lo más simple, insumir el menor tiempo posible, debe ser selectivo, si es necesario debe concentrar el analito para mejorar la detección y debe minimizar el uso de reactivos y solventes para reducir su impacto ambiental (Ferreira, 2016). Todo esto fue considerado mientras se probaron las técnicas de referencia y se validaba una de ellas. A partir de los resultados obtenidos, se hace evidente que el uso de diferentes fases estacionarias ejerce una influencia decisiva en la determinación de los analitos.

El estudio realizado por Zgair *et al.* (2015) se basó en una columna C18-PFP (100Å, 4,6 x 150 mm, 3µm). Dado que no fue posible adquirir una columna de estas características desde nuestro país, utilizamos una columna de fase estacionaria C18 (100Å, 4,6 x 250 mm, 5 µm). Con esta columna no se obtuvieron resultados satisfactorios, ya que no se logró una adecuada detección ni resolución de los picos de THC y CBD. En este sentido, es importante destacar las diferencias existentes entre ambas columnas, principalmente las C18-PFP (pentafluorofenilo) tienen una polaridad significativamente mayor que las C18 convencionales. Esto podría haber permitido que una gran proporción de los componentes más hidrofóbicos del plasma eluyan a tiempos de retención menores que nuestros analitos, generando cromatograma “más limpios” a la vez que se reducen sensiblemente los tiempos de retención respecto a la C18 (Dong, 2019). Además, el menor tamaño de partícula de estas columnas permite una mejor resolución de los picos al aumentar la superficie específica de interacción entre moléculas y fase estacionaria (Quattrocchi, 2019).

En el caso de la técnica propuesta por Mercolini *et al.* (2008), los autores utilizaron una fase estacionaria convencional C8 (95Å 150mm x 4.6mm, 5 µm) mientras que en este trabajo de tesis se utilizó una columna C8 XDB (80Å 150mm x 3.0mm, 3.5 µm) con la que se obtuvieron resultados superiores no solo en comparación con la C18 (100Å, 4,6 x 250 mm, 5 µm), sino con la utilizada por los autores del trabajo. En este estudio, se han empleado fases estacionarias caracterizadas por la longitud de sus cadenas alquílicas de carbono y grupos sustituyentes modificadores de la polaridad, siendo la C18 la de mayor longitud. Esto tiene un impacto directo en la hidrofobicidad de la fase estacionaria, lo que resulta en una mayor retención de los analitos apolares. En contraste, las columnas C8 presentan cadenas de carbono más cortas, lo que disminuye la hidrofobicidad y permite una elusión más rápida de los compuestos más polares en comparación con las columnas C18 (Chang-Hui, 2019). Cuando comparamos la fase estacionaria C8 vs C18 estamos nuevamente frente a una diferencia de polaridad a favor de la C8, lo que ejercería un efecto similar a la C18-PFP. Adicionalmente, el menor tamaño del poro y diámetro de partícula permiten aumentar la superficie de interacción de los solutos con la fase estacionaria, esto disminuye el ancho de los picos, mejorando su resolución y la relación señal/ruido (Dong, 2019). La utilización de una fase estacionaria de unión extra densa con un menor tamaño de poro y partícula permitió una adecuada separación de los analitos en condiciones isocráticas y con tiempos de retenciones inferiores a los 10 minutos.

En cuanto a la extracción de los analitos de la muestra, se llevaron a cabo extracciones en fase sólida y líquido-líquido. Como se describe en esta tesis la LLE propuesta por Zgair *et al.* (2015) no logró selectividad en la extracción de los analitos de interés. Probablemente los autores de este trabajo pudieron compensar la baja eficacia de su método de extracción con la selección de la fase estacionaria. Por su parte, la técnica SPE permitió en nuestro caso una mejor recuperación de los analitos y selectividad en la extracción que la LLE. A su vez, esta técnica tuvo la importante ventaja de reducir el consumo de solventes orgánicos, contribuyendo a un uso más eficiente de los mismos, disminuyendo costos e impacto ambiental. En este sentido, se ha mejorado la detección de los analitos, aumentando la resolución y reduciendo notablemente el riesgo de posibles interferencias, lo que se traduce en una mejora de los resultados obtenidos.

Recientemente, Fitzgerald *et al.* (2021) publicaron un artículo en el que determinaron las concentraciones de THC, 11-OH-THC y CBD en 19 perros con sospecha de intoxicación por ingesta de plantas de marihuana o sus subproductos. La presencia de THC se confirmó en 17 de estos perros, y los autores informaron una concentración promedio para estos pacientes de 68 ng/mL (0.14–160 ng/mL), la cual es detectable con los límites de detección establecidos en nuestro trabajo (30 ng/mL). En cuanto a la concentración de CBD, se detectó en 12 de los 19 perros, con una concentración promedio de 8.70 ng/mL (0.11–82.5 ng/mL). Aunque la técnica validada no podría detectar este valor (10 ng/mL), es importante considerar la amplia variabilidad en resultados obtenidos por los autores. Si bien este trabajo de Fitzgerald *et al.* (2021) provee una guía de la gama de concentraciones que se pueden hallar en estos casos, tiene algunas limitaciones a tener en cuenta, como ser que no define el momento de toma de muestra post-ingesta. Es así como para algunos de los animales los valores pueden ser confirmatorios de la ingesta, pero no estar correlacionados con los efectos

que presentó el paciente. Por otro lado, se limita a la ingesta de partes de plantas o sus subproductos, relacionados al consumo recreativo, siendo este, solo una de las posibles fuentes de cannabinoides. (Fitzgerald *et al.*, 2021)

Amissah *et al.* (2022), describe que la ruta más común de exposición es la ingestión, además menciona que generalmente es difícil de determinar el momento exacto en cual comienzan a aparecer los signos clínicos en los animales intoxicados. Sin embargo, en los perros los signos aparecen unos minutos después de la inhalación y varias horas en caso de ingestión ((Meola *et al.*, 2012; Brutlag & Hommerding, 2018; Amissah *et al.*, 2022). Este retraso en la aparición de los signos se puede deber a semivida biológica del THC en perros debido al almacenamiento en tejido adiposo, aunque la semivida plasmática sea relativamente corta. Además, este retraso se puede deber al tiempo que tarda el THC en someterse al metabolismo hepático de primer paso tras la ingestión (Amissah *et al.*, 2022). Es por esto por lo que es importante tener presente el tiempo que transcurre desde la exposición y la toma de la muestra.

Existen además otros trabajos como el de Wakshlag *et al.* (2020), en el que administrando CBD bajo tres diferentes formulaciones a dosis aproximadas de 1 mg/kg/12hs durante dos semanas, computó los siguientes resultados: concentraciones séricas máximas (C_{max}) de CBD de entre 79 ± 9 ng/mL y 129 ± 10 ng/mL en la primera dosis según la formulación administrada, y de entre 94 ± 14 ng/mL y 122 ± 10 ng/mL a las 6 horas post-dosis del último día del experimento. En este mismo sentido, el trabajo realizado por Chicoine *et al.* (2020), muestra un estudio farmacocinético en el que la dosis más baja administrada (2 mg/kg) resultaba en una C_{max} de 213 ng/mL. Estos resultados encontrados en la bibliografía son alentadores en que la técnica analítica desarrollada en esta tesis permitirá diagnosticar casos de intoxicación con CBD y THC y continuar con las líneas de investigación que llevan adelante la Unidad Académica de Toxicología y la de Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Veterinaria.

Con esta tesis logramos desarrollar y validar una técnica analítica para detectar y cuantificar cannabidiol (CBD) y Δ^9 -tetrahidrocannabidiol (THC) en sueros sanguíneos de perros, utilizando un HPLC-UV. Es importante resaltar que el método de referencia para la cuantificación de estos analitos es el HPLC-MS (McGuigon, 2006; Fitzgerald *et al.*, 2013), sin embargo, este equipamiento es poco accesible y es una limitante para el desarrollo de líneas de trabajo que requieran el monitoreo de THC y CBD en nuestro país. Es así que el desarrollo de esta técnica analítica basada y modificada según el trabajo de Mercolini *et al.* (2008), podría ser un punto de partida para implementar el diagnóstico de intoxicaciones por fitocannabinoides en caninos de nuestro país.

8. CONCLUSIONES

El método validado permite la determinación de los fitocannabinoides CBD y THC en suero canino mediante el uso de HPLC-UV, equipamiento más accesible económicamente que un HPLC acoplado a un detector de masa (HPLC-MS).

Los niveles detectados con las modificaciones realizadas en la técnica de Mercolini *et al.* (2008) de THC y CBD permiten la determinación de estas moléculas en casos de sospecha de intoxicación y animales que se encuentren bajo tratamiento médico.

La modificación de la técnica de Mercolini *et al.* (2008), permitió la disminución del uso de solventes orgánicos, lo que contribuye a una menor contaminación ambiental y al desarrollo de lo que se conoce como química verde.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Amissah RQ, Vogt NA, Chen C, Urban K, Khokhar J (2022). Prevalence and characteristics of cannabis-induced toxicoses in pets: Results from a survey of veterinarians in North America. PLoS ONE 17(4): e0261909. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261909>
2. Ahadi, A, Partoazar A, Abedi-Khorasgani MH, Shetab-Boushehri SV (2011). Comparison of liquid-liquid extraction-thin layer chromatography with solid-phase extraction-high-performance thin layer chromatography in detection of urinary morphine. Journal of biomedical research, 25(5), 362–367. [https://doi.org/10.1016/S1674-8301\(11\)60048-1](https://doi.org/10.1016/S1674-8301(11)60048-1)
3. Blum F. (2014) High performance liquid chromatography. Br J Hosp Med (Lond). 75(2):18-21. doi: [10.12968/hmed.2014.75.Sup2.C18](https://doi.org/10.12968/hmed.2014.75.Sup2.C18)
4. BMVGI-FDA (2018) *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry* de la Food and Drug Administration (FDA) (2018) Disponible en: [Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry | FDA](https://www.fda.gov/oc/ohrt/bioanalytical-method-validation-guidance-for-industry)
5. Bonini SA, Premoli M, Tambaro S, Kumar A, Maccarinelli G, Memo M, Mastinu A. (2018). *Cannabis sativa*: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. J Ethnopharmacol 227:300-315. doi: [10.1016/j.jep.2018.09.004](https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.09.004)
6. Brioschi F A, Di Cesare F, Gioeni D, Rabbogliatti V, Ferrari F, D'Urso E S, Amari M, Ravasio G. (2020). Oral Transmucosal Cannabidiol Oil Formulation as Part of a Multimodal Analgesic Regimen: Effects on Pain Relief and Quality of Life Improvement in Dogs Affected by Spontaneous Osteoarthritis. Animals 10(9):1505-1519. doi: [10.3390/ani10091505](https://doi.org/10.3390/ani10091505)
7. Brutlag A, Hommerding H (2018). Toxicology of Marijuana, Synthetic Cannabinoids, and Cannabidiol in Dogs and Cats. Vet Clin North Am Small Anim Pract 48(6):1087–1102. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2018.07.008>
8. Buranakarn V. (2020). Sarcoma Cancer Treatment using Extracted Cannabis Oil in Cat. Int J Innov Sci Technol 3(1):39-44.
9. Buszewski B, Szultka M. (2012). Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review. Crit Rev Anal Chem 42:(3)198-213 <https://doi.org/10.1080/07373937.2011.645413>
10. Campbell, A. (2000) Cannabis/Marihuana/Hashish. En: Campbell, A., Chapman, M. (2000). Handbook of Poisoning in dogs and cats. Ed. London: Blackwell Science Ltd. pp. 97-100.
11. Chang-Hui S. (2019). Quantification and Analysis of Proteins. En: Chang-Hui Shen (2019) Diagnostic Molecular Biology. Ed. Academic Press Elsevier United Kindon, Chapter 8, pp.187-214 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802823-0.00008-0>.

12. Chicoine A, Illing K, Vuong S, Pinto KR, Alcorn J, Cosford K. (2020). Pharmacokinetic and Safety Evaluation of Various Oral Doses of a Novel 1:20 THC:CBD *Cannabis* Herbal Extract in Dogs. *Front Vet Sci.* 7:583404. doi: [10.3389/fvets.2020.583404](https://doi.org/10.3389/fvets.2020.583404)
13. Christensen C, Rose M, Cornett C, Allesø M. (2023). Decoding the Postulated Entourage Effect of Medicinal Cannabis: What It Is and What It Isn't. *Biomedicine* 11:2323. doi: <https://doi.org/10.3390/biomedicines11082323>
14. Corsetti S, Borruso S, Malandrucchio L, Spallucci V, Maragliano L, Perino R, D'Agostino P, Natoli E. (2021). *Cannabis sativa* L. may reduce aggressive behaviour towards humans in shelter dogs. *Sci Rep.* 11(1):2773. doi: [10.1038/s41598-021-82439-2](https://doi.org/10.1038/s41598-021-82439-2)
15. Costa B, Trovato A, Comelli, F, Giagnoni G, Colleoni M. (2007). The non-psychoactive cannabis constituent cannabidiol is an orally effective therapeutic agent in rat chronic inflammatory and neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* 556:75–83. doi: 10.1016/j.ejphar.2006.11.006
16. De Briyne N, Holmes D, Sandler I, Stiles E, Szymanski D, Moody S, Neumann S, Anadón A. (2021). Cannabis, Cannabidiol Oils and Tetrahydrocannabinol—What Do Veterinarians Need to Know? *Animals* 11:892-911. <https://doi.org/10.3390/ani11030892>
17. Decreto N° 298/017 AUTORIZACION DE "VENTA BAJO RECETA PROFESIONAL" PARA LAS ESPECIALIDADES FARMACEUTICAS CON CANNABIDIOL COMO PRINCIPIO ACTIVO. Disponible en: <https://www.impo.com.uy/bases/decretos/298-2017>
18. della Rocca G, Di Salvo A. (2020). Hemp in Veterinary Medicine: From Feed to Drug. *Front. Vet. Sci.* 7:387-398. doi: [10.3389/fvets.2020.00387](https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00387)
19. Denapoli A, Denapoli C. Method of reducing stress and anxiety in equines. United States Patent. 2020 Apr; Patent No.: US 10,624,936 B2. Disponible en: <https://patents.google.com/patent/US10220061B1#patentCitations>
20. Devane, W., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R., Stevenson, L., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258(5090), 1946–1949. <https://doi.org/10.1126/science.1470919>
21. Di Marzo V, Piscitelli F. (2015). The Endocannabinoid System and its Modulation by Phytocannabinoids. *Neurotherapeutics.* 12(4):692- 698. doi: [10.1007/s13311-015-0374-6](https://doi.org/10.1007/s13311-015-0374-6)
22. Donaldson C W (2002) Marijuana exposure in animals. *Vet Med* 97(6): 437-439.
23. Dong MW. (2019). HPLC and UHPLC for practicing scientists. Ed. Michael W. Dong 2ªed. Hoboken, NJ. Wiley.

24. Duggan PJ. (2021). The Chemistry of Cannabis and Cannabinoids. *Aust. J. Chem.* 74:369–387. doi: <https://doi.org/10.1071/CH21006>
25. Edery H, Grunfeld Y, Ben-Zvi Z, Mechoulam R. (1971). Structural requirements for Cannabinoid activity. *Annals New York Academy of Sciences.* 191(1):40-53 doi: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1971.tb13985.x>
26. Ellis KL, Contino EK. (2021). Treatment using cannabidiol in a horse with mechanical allodynia. *Equine Vet Educ.* 33(4):79-82.
27. ElSohly M A, Radwan M M, Gul W, Chandra S, Galal A. (2017) Phytochemistry of *Cannabis sativa* L. En: Kinghorn A, Falk H, Gibbons S, Kobayashi J. (2017) Phytocannabinoids: Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. Ed. Springer: Cham, Switzerland, Volume 103, pp. 1-36. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45541-9_1
28. Evans FJ. (1991). Cannabinoids: the separation of central from peripheral effects on a structural basis. *Planta Med.* 57(7):60-67.
29. Farag S, Kayser O. (2017). The Cannabis Plant: Botanical Aspects. En: Preedy V R. (2017) Handbook of Cannabis and Related Pathologies: Biology, Pharmacology, Diagnosis, and Treatment. Ed. Academic Press Elsevier United Kindon, Charper 1, pp. 3-12. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800756-3.00001-6>
30. Ferreira TP (2016). Estudo comparativo de métodos de extração para determinação de fluazuron em suero bovino por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção em ultravioleta. Mestrado em Química, área de concentração em Química Analítica. Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brasil.
31. Fitzgerald AH, Zhang Y, Fritz S, Whitehouse W, Brabson T., Pohlman L., Cernicchiaro N., Tonozzi C., and Ensley S. (2021). Detecting and quantifying marijuana metabolites in serum and urine of 19 dogs affected by marijuana toxicity. *J Vet Diag Invest* 33(5):1002-1007. doi:[10.1177/10406387211027227](https://doi.org/10.1177/10406387211027227)
32. Fitzgerald KT, Bronstein AC, Newquist KL. (2013). Marijuana Poisoning. *Top Companion Ani Medi* 28:8-12.
33. Freundt-Revilla J, Kegler K, Baumgartner W, Tipold A (2017). Spatial distribution of cannabinoid receptor type 1 (CB1) in normal canine central and peripheral nervous system. *PLoS ONE* 12(7):1-21. [10.1371/journal.pone.0181064](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181064)
34. Fundación PROSAIA (2011). Guía Para la Validación de los Métodos Analíticos para la Determinación de Residuos en Matrices Biológicas de Origen Animal. Disponible en: [GUIDELINE FOR GOOD CLINICAL PRACTICE \(prosaia.org\)](https://prosaia.org/GUIDELINE_FOR_GOOD_CLINICAL_PRACTICE)
35. Furtado A. (2019). Cannabis de uso medicinal para el tratamiento de dolor crónico de un *Labrador retriever* con osteoartrosis: relato del caso. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria. Universidad de la República.

36. Gamble LJ, Boesch JM, Frye CW, Schwark WS, Mann S, Wolfe L, Brown H, Berthelsen ES, Wakshlag JJ. (2018). Pharmacokinetics, Safety, and Clinical Efficacy of Cannabidiol Treatment in Osteoarthritic Dogs. *Front Vet Sci.* 5:165. doi: [10.3389/fvets.2018.00165](https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00165)
37. Garrett E R, Hunt C A. (1977). Pharmacokinetics of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol in Dogs. *J Pharm Sci* 66 (3):395-406.
38. Grigg EK, Kogan LR, van Haaften K, Kolus C. (2019) Cat owners' perceptions of psychoactive medications, supplements and pheromones for the treatment of feline behavior problems. *J Feline Med Surg* 21(10):902-909. doi: [10.1177/1098612X18807783](https://doi.org/10.1177/1098612X18807783)
39. Guindon J, Hohmann AG. (2008). Cannabinoid CB2 receptors: a therapeutic target for the treatment of inflammatory and neuropathic pain. *Br J Pharmacol.* 53(2):319-334. doi: [10.1038/sj.bjp.0707531](https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707531)
40. Gutierre E, Crosignani N, García-Carnelli C, di Mateo A, Recchi L. (2023). A case report of CBD and THC as analgesic therapy in a cat with chronic osteoarthritic pain. *Vet Med Sci* 9:1021–1025. <https://doi.org/10.1002/vms3.1057>
41. Hanuš LO, Meyer SM, Muñoz E, Tagliabue S, Scafati O, Appendino G. (2016) Phytocannabinoids: a unified critical inventory. *Nat Prod Rep.* 33(12):1357-1392. doi: [10.1039/c6np00074f](https://doi.org/10.1039/c6np00074f)
42. Happyana N, Agnolet S, Muntendam R, Van Dam A, Schneider B, Kayser O. (2013). Analysis of cannabinoids in laser-microdissected trichomes of medicinal *Cannabis sativa* using LCMS and cryogenic NMR. *Phytochemistry.* 87:51-9. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.11.001>.
43. Hazzah T, André C M, Richter G, McGrath S. (2020). Cannabis in Veterinary Medicine: A Critical Review. *AHVMA.* 61:17-41.
44. Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC. (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 87(5):1932–1936.
45. Iannotti FA, Di Marzo V, Petrosino S. Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: Targets, metabolism and role in neurological disorders. *Prog Lipid Res.* 2016 Apr; 62:107-28. doi: 10.1016/j.plipres.2016.02.002. Epub 2016 Mar 7. PMID: 26965148.
46. ICH (2022). Harmonised Guideline Validation of Analytical Procedures Q2(R2) ICH Consensus Guideline Disponible en: [ich-guideline-q2r2-validation-analytical-procedures-step-2b_en.pdf \(europa.eu\)](https://www.ich.org/topics/guidelines/ich-guideline-q2r2-validation-analytical-procedures-step-2b_en.pdf)
47. Janczyk P, Donaldson CW, Gwaltney S (2004). Two Hundred and Thirteen Cases of Marijuana Toxicoses in Dogs. *Vet hum toxicol* 48(1):19-21.

48. Jardim ICSF (2010). Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. *Scientia Chromatographica*, 2(1):13–25.
49. Kataoka, H. (2003). New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. *Trends Analyt Chem* 22(4):232-244.
50. Kirthi A, Shanmugam R, Shanti Prathyusha M, Jamal Basha D. (2014). A Review on Bioanalytical Method Development and Validation by RP –HPLC. *JGTPS* 5(4): 2265 -2271
51. Landa, L., Sulcova, A. y Gbelec, P. (2016). The use of cannabinoids in animals and therapeutic implications for veterinary medicine: A review. *Vet Med (Praha)*, 61(3), 111-122. doi: <https://doi.org/10.17221/8762-VETMED>
52. Lauinger CA, Peacock R. (2022). Marijuana toxicosis in dogs in Melbourne, Australia, following suspected ingestion of human faeces: 15 cases (2011-2020). *Aust Vet J* 100(3): 90–97. <https://doi.org/10.1111/avj.13134>
53. Ley 19.172 (2014). Marihuana y sus derivados. Control y regulación del Estado de la importación, producción, adquisición, almacenamiento, comercialización y distribución. Uruguay. Disponible en: <https://legislativo.parlamento.gub.uy/temporales/leytemp6965815.htm>
54. Lima TM, Santiago NR, Alves ECR, Chaves DSA, Visacri MB. (2022). Use of cannabis in the treatment of animals: a systematic review of randomized clinical trials. *Anim. Health Res. Rev* 23:25–38. <https://doi.org/10.1017/S1466252321000189>
55. Loewinger M, Wakshlag JJ, Bowden D, Peters-Kennedy J, Rosenberg A. (2022) The effect of a mixed cannabidiol and cannabidiolic acid based oil on client-owned dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 33(4):329-377. doi: 10.1111/vde.13077
56. McGrath S, Bartner LR, Rao S, Packer RA, Gustafson DL. (2019). Randomized blinded controlled clinical trial to assess the effect of oral cannabidiol administration in addition to conventional antiepileptic treatment on seizure frequency in dogs with intractable idiopathic epilepsy. *J Am Vet Med Assoc*. 254(11):1301-1308. doi: [10.2460/javma.254.11.1301](https://doi.org/10.2460/javma.254.11.1301)
57. McGuigon M. (2006). Cannabinoids. En: Goldfrank LR, Flomenbaum NE, Howland MA, Lewin NA, Hoffman RS, Nelson LS, editors. *Goldfrank's Toxicological Emergencies*. 8th ed. New York: McGraw-Hill; Chaper 81, pp.1212–1220
58. McKnight K. (2003). Marijuana Toxicosis. *Veterinary Technician* 24(4):264-266.
59. McPartland JM. (2018). *Cannabis* Systematics at the Levels of Family, Genus, and Species. *Cannabis Cannabinoid Res* 3(1):203-212. doi: [10.1089/can.2018.0039](https://doi.org/10.1089/can.2018.0039)
60. Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski N E, Schatz A R, Gopher A, Almog S, Martin B R, Campton D R, Pertwee R G, Griffin G, Bayewitch M, Barg J, Vogel Z. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride,

- present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 50(1):83–90. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(95\)00109-D](https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)00109-D)
61. Mechoulam R. (2016). Cannabis - the Israeli perspective. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 27(3):181-187. doi: [10.1515/jbcpp-2015-0091](https://doi.org/10.1515/jbcpp-2015-0091)
 62. Mechoulam, R, Braun P, Gaoni Y. (1972). Syntheses of Delta.1-tetrahydrocannabinol and related cannabinoids. *J. Am. Chem. Soc.* 94(17):6159–6165. <https://doi.org/10.1021/ja00772a038>
 63. Mejia S, Duerr FM, Griffenhagen G and McGrath S (2021) Evaluation of the effect of cannabidiol on naturally occurring osteoarthritis-associated pain: a pilot study in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 57:81–90
 64. Meola SD, Tearney CC, Haas SA, Hackett TB, Mazzaferro EM (2012). Evaluation of trends in marijuana toxicosis in dogs living in a state with legalized medical marijuana: 125 dogs (2005-2010). *J Vet Emerg Crit Care* 22(6):690-696.
 65. Mercolini L, Musenga A, Comin I, Baccini C, Conti M, Raggi MA. (2008) Determination of plasma and urine levels of Delta9-tetrahydrocannabinol and its main metabolite by liquid chromatography after solid-phase extraction. *J Pharm Biomed Anal* 47(1):156-63. doi: [10.1016/j.jpba.2007.12.023](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.12.023)
 66. Mondino A, Sosa S, Zeinsteger P, Garcia y Sanyos MC. (2019). Intoxicación por Cannabis en Pequeños Animales. Revisión. *Veterinaria (Montev)* 55(212): 86-95. doi: <https://doi.org/10.29155/vet.55.212.7>.
 67. Oliveira ARMD, Magalhães IRDS, Santana, FJMD, Bonato PS (2008). Microextração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. *Química Nova*, 31, 637-644.
 68. Papaseit E, Pérez-Mañá C, Pérez-Acevedo AP, Hladun O, Torres-Moreno MC, Muga R, Torrens M, Farré M. (2018). Cannabinoids: from pot to lab. *Int J Med Sci.* 15(12):1286–1295.
 69. Pertwee RG (2010). Receptors and channels targeted by synthetic cannabinoid receptor agonists and antagonists. *Curr Med Chem.* 17(14):1360-1381. doi: [10.2174/092986710790980050](https://doi.org/10.2174/092986710790980050)
 70. Pragst F, Herzler M, Erxleben BT. (2004). Systematic toxicological analysis by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD). *Clin Chem Lab Med.* 42(11):1325-1340. doi: [10.1515/CCLM.2004.251](https://doi.org/10.1515/CCLM.2004.251)
 71. Quattrocchi OA. (2019). Compendio de HPLC. Ed. Quattrocchi OA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Dunken.
 72. Queiroz SC, Collins CH, Jardim IC. (2001). Methods of extraction and/or concentration of compounds found in biological fluids for subsequent chromatographic determination. *Quim Nova* 24:68-76.

73. Radwan M M, Chandra S, Gul S, ElSohly M A. (2021). Cannabinoids, Phenolics, Terpenes and Alkaloids of Cannabis. *Molecules*. 26:2774. <https://doi.org/10.3390/molecules26092774>
74. Ramírez, J., Keuroglan, L., Suárez, H. VII Encuesta Nacional sobre Consumo de Drogas en población general. Informe de investigación. Año 2019. Disponible en: https://www.gub.uy/junta-nacional-drogas/sites/junta-nacional-drogas/files/documentos/publicaciones/VII_ENCUESTA_NACIONAL_DROGAS_POBLACIoN_GENERAL_2019.pdf
75. Rodríguez de Fonseca F, Del Arco I, Bermudez-Silva FJ, Bilbao A, Cippitelli A, Navarro M. (2005). The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. *Alcohol Alcohol*. 40(1):2-14. doi: [10.1093/alcalc/agh110](https://doi.org/10.1093/alcalc/agh110)
76. Russo, EB (2011). Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *Br. J. Pharmacol.* 163, 1344– 1364. doi: [10.1111/j.1476-5381.2011.01238.x](https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01238.x)
77. Sarfaraz A, Nawazish A., MD Sarfaraz A. (2015). Qualitative and quantitative bioanalysis by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *J. Chem. Pharm. Res.* 7(9):982-992
78. Saunders KC, Ghanem A, Hon WB, Hilder EF, Haddad PR (2009). Separation and sample pre-treatment in bioanalysis using monolithic phases: A review. *Anal Chim Acta*, 652(1-2), 22-31. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.05.043>
79. Schillmiller, A.L., Last, R.L. and Pichersky, E. (2008). Harnessing plant trichome biochemistry for the production of useful compounds. *Plant J* 54:702–711. doi: [10.1111/j.1365-313X.2008.03432.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03432.x)
80. Serban, VD (2015a) Solvent Extraction. En: Serban, VD (2015) *Modern Sample Preparation for Chromatography*. Ed. Elsevier USA Chapter 6, pp 131-189. doi: <https://doi.org/10.1016/C2011-0-00093-5>
81. Serban, VD (2015b) Solid-Phase Extraction. En: Serban, VD (2015) *Modern Sample Preparation for Chromatography*. Ed. Elsevier USA Chapter 7, pp 191-286. doi: <https://doi.org/10.1016/C2011-0-00093-5>
82. Sgariglia MA, Soberon JR, Sampietro DA, Vattuone MA. (2010). Cromatografía: conceptos y aplicaciones. *Arakuku*; 2(1):1-6
83. Silver R. J. (2019). The Endocannabinoid System of Animals. *Animals*. 9(9):686. <https://doi.org/10.3390/ani9090686>
84. Snyder, L., Kirkland, J., y Dolan, J. (2010). En: Snyder L, Kirkland J, Dolan J. (2010) *Introduction to modern liquid chromatography*. Ed. Snyder L, Kirkland J, Dolan J. John Wiley & Sons Inc 3ª ed. Hoboken, EE. UU. Cap. 2, pp.19-86.
85. Stashenko E, Martínez J. (2011). Preparación de la muestra: un paso crucial para el análisis por GC-MS. *Scientia Chromatographica*, 3(1), 25-49.

86. Suarez D, Morales Y. (2018). Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas. *Semilleros: Formación Investigativa*. 4(1):7-14. <https://hdl.handle.net/20.500.11839/7731>
87. Thompson G R, Rosenkrantz H, Schaeppi U H, Braude M C (1973). Comparison of Acute Oral Toxicity of Cannabinoids in Rats, Dogs and Monkeys. *Toxicol Appl Pharmacol* 25: 363-372.
88. Ukai M, McGrath S, Wakshlag J. The clinical use of cannabidiol and cannabidiolic acid-rich hemp in veterinary medicine and lessons from human medicine. *J Am Vet Med Assoc*. 2023 Mar 23;261(5):623-631. doi: 10.2460/javma.23.02.0064. PMID: 36965472.
89. UNDOC (2022). Recommended methods for the identification and analysis of cannabis and cannabis products. Disponible en: [Recommended Methods for the Identification and Analysis of Synthetic Cannabinoid Receptor Agonists in Seized Materials \(unodc.org\)](https://www.unodc.org/en/cannabis/recommended-methods-for-the-identification-and-analysis-of-synthetic-cannabinoid-receptor-agonists-in-seized-materials)
90. Verrico CD, Wesson S, Konduri V, Hofferek CJ, Vazquez-Perez J, Blair E, Dunner K Jr, Salimpour P, Decker WK, Halpert MM. (2020). A randomized, double-blind, placebo-controlled study of daily cannabidiol for the treatment of canine osteoarthritis pain. *Pain*. 161(9):2191-2202. doi: [10.1097/j.pain.0000000000001896](https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001896)
91. Volmer P A. (2013) "Recreational" drugs. En: Peterson ME, Talcott PA (2013) *Small Animal Toxicology*. Third Edition. EEUU: El Sevier pp. 321-323.
92. Vučković S, Srebro D, Vujović KS, Vučetić Č, Prostran M. (2018). Cannabinoids and Pain: New Insights From Old Molecules. *Front Pharmacol*. 9:1259. doi: [10.3389/fphar.2018.01259](https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01259)
93. Wakshlag JJ, Schwark WS, Deabold KA, Talsma BN, Cital S, Lyubimov A, Iqbal A and Zakharov A (2020). Pharmacokinetics of Cannabidiol, Cannabidiolic Acid, Δ^9 -Tetrahydrocannabinol, Tetrahydrocannabinolic Acid and Related Metabolites in Canine Serum After Dosing With Three Oral Forms of Hemp Extract. *Front. Vet. Sci*. 7:505-517. [10.3389/fvets.2020.00505](https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00505)
94. Zgair A, Wong JC, Sabri A, Fischer PM, Barrett DA, Constantinescu CS, Gershkovich P. (2015). Development of a simple and sensitive HPLC-UV method for the simultaneous determination of cannabidiol and $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinol in rat plasma. *J Pharm Biomed Anal* 114:145-51. doi: [10.1016/j.jpba.2015.05.019](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.05.019)

ANEXO I

Recomendaciones y criterios de aceptación para la validación de métodos bioanalíticos y la realización de estudios (tomado de *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry*-mayo 2018)

Parámetros	Recomendaciones de validación
	Ensayos cromatográficos (CC)
Curva de calibración	<p><u>Elementos:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Un blanco (sin analito, sin IS), un calibrador cero (blanco más IS) y al menos seis niveles de calibrador distintos de cero que cubran el intervalo de cuantificación, incluido el LLOQ en cada serie. - Todos los blancos y calibradores deben estar en la misma matriz que las muestras de estudio. - La relación concentración-respuesta debe ajustarse con el modelo de regresión más simple. <p><u>Criterios de aceptación:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Los calibradores distintos de cero deben ser $\pm 15\%$ de las concentraciones nominales (teóricas), excepto en LLOQ, donde el calibrador debe ser $\pm 20\%$ de las concentraciones nominales en cada serie de validación. - El 75% y un mínimo de seis niveles de calibrador distintos de cero deben cumplir los criterios anteriores en cada serie de validación.
	Sólo pueden excluirse los puntos de datos que no cumplan los criterios de aceptación. La exclusión no debe modificar el modelo utilizado.
Controles de calidad (QC)	<p><u>Elementos:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Para las series A y P: cuatro controles de calidad, incluidos LLOQ, bajo (L: definido como tres veces el LLOQ), medio (M: definido como rango medio) y alto (H: definido como rango alto) de al menos cinco réplicas en al menos tres series. • Para otros procesos de validación: L, M y H QC por duplicado. <p><u>Criterios de aceptación:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Véanse las ejecuciones A y P, otras ejecuciones de validación y evaluaciones de estabilidad.

Parámetros	Recomendaciones de validación
	Ensayos cromatográficos (CC)
Selectividad	<p><u>Elementos:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Analizar muestras en blanco de la matriz biológica apropiada de al menos seis fuentes individuales. <p><u>Criterios de aceptación:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Los calibradores blanco y cero deben estar libres de interferencias en los tiempos de retención del (de los) analito(s) y del IS. Las muestras enriquecidas deben ser $\pm 20\%$ LLOQ. La respuesta IS de los blancos no debe superar el 5% de las respuestas IS medias de los calibradores y los QC.
Especificidad	<p><u>Elementos:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> La especificidad del método debe evaluarse para detectar interferencias por moléculas de reacción cruzada, medicamentos concomitantes, especies biotransformadas, etc. <p><u>Criterios de aceptación:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Véase más arriba Selectividad.
Traspaso Carryover (arrastre)	<p><u>Elementos:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Debe evaluarse el impacto del arrastre en la exactitud de las concentraciones de las muestras del estudio. <p><u>Criterios de aceptación:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> El remanente (arrastre) no debe superar el 20% del LLOQ.
Sensibilidad	<p><u>Elementos:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> El estándar más bajo distinto de cero en la curva de calibración define la sensibilidad (LLOQ). <p><u>Criterios de aceptación:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> La respuesta del analito en el LLOQ debe ser \geq cinco veces la respuesta del analito del calibrador cero. La precisión debe ser de $\pm 20\%$ de la concentración nominal (a partir de \geq cinco réplicas en al menos tres corridas). La precisión debe ser de $\pm 20\%$ CV (a partir de \geq cinco réplicas en al menos tres ejecuciones).

Parámetros	Recomendaciones de validación
	Ensayos cromatográficos (CC)
Exactitud y precisión (A y P)	<p><u>Elementos:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Los A&P deben establecerse con al menos tres A&P independientes, cuatro niveles de QC por corrida (LLOQ, L, M, H QC), y \geq cinco réplicas por nivel de QC. <p><u>Criterios de aceptación de la serie A y P:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - La serie debe cumplir los criterios de aceptación de la curva de calibración e incluir el calibrador LLOQ. - Esta tirada no tiene criterios de aceptación de control de calidad. <p><u>Precisión: Dentro de una misma serie y entre series:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - $\pm 15\%$ de las concentraciones nominales; excepto $\pm 20\%$ en LLOQ. <p><u>Precisión: Dentro de cada serie y entre series:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - $\pm 15\%$ CV, excepto $\pm 20\%$ CV en LLOQ <p><u>Error total:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - No aplicable
Sensibilidad	<p><u>Elementos:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • El estándar más bajo distinto de cero en la curva de calibración define la sensibilidad (LLOQ). <p><u>Criterios de aceptación:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - La respuesta del analito en el LLOQ debe ser \geq cinco veces la respuesta del analito del calibrador cero. - La precisión debe ser de $\pm 20\%$ de la concentración nominal (a partir de \geq cinco réplicas en al menos tres corridas). - La precisión debe ser de $\pm 20\%$ CV (a partir de \geq cinco réplicas en al menos tres ejecuciones).

Parámetros	Recomendaciones de validación
	Ensayos cromatográficos (CC)
Otras validaciones	<p><u>Elementos:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • \geq tres niveles de control de calidad (L, M, H) en al menos duplicados en cada ejecución. <p><u>Criterios de aceptación de la ejecución:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Cumplir los criterios de aceptación de la calibración - $\geq 67\%$ de los QC deben ser $\pm 15\%$ de los valores nominales (teóricos), $\geq 50\%$ de los QC por nivel deben ser $\pm 15\%$ de sus concentraciones nominales.
Recuperación	<p><u>Elementos:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Muestras extraídas en concentraciones de control de calidad L, M y H frente a extractos de blancos enriquecidos con el analito tras la extracción (en L, M y H)
Estabilidad	<p><u>Elementos:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Para el automuestreador, el banco, el extracto, la congelación-descongelación, la solución madre y la estabilidad a largo plazo, realizar al menos tres réplicas a las concentraciones L y HQC. <p><u>Criterios de aceptación:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - La precisión (% nominal) en cada nivel debe ser de $\pm 15\%$.
Dilución	<p><u>Elementos:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • QCs para diluciones planificadas, 5 réplicas por factor de dilución: <ul style="list-style-type: none"> ○ Precisión: $\pm 15\%$ de las concentraciones nominales ○ o Precisión: $\pm 15\%$ CV
Reanálisis de muestras incurridas (ISR)	No aplicable
Repetir el análisis	- No se permite el reanálisis de calibradores y QC individuales.

ANEXO II

Técnica determinación de CBD y THC en suero sanguíneo de perros

1. OBJETIVO

El objetivo de este procedimiento es disponer de una metodología normalizada para la determinación de THC y CBD en suero de canino.

2. ALCANCE

Este procedimiento se aplica al Laboratorio de Farmacología Veterinaria y a todos los ensayos con THC y CBD realizados en la Unidad académica de Farmacología.

3. RESPONSABILIDAD

La responsabilidad por la aplicación de este procedimiento corresponde a los analistas del Laboratorio de Farmacología Veterinaria.

Sin perjuicio de lo anterior el Supervisor del Área Analítica es responsable de verificar la correcta aplicación de este procedimiento y de evaluar periódicamente su adecuabilidad para el alcance previsto.

4. DEFINICIONES, SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ACN: Acetonitrilo calidad HPLC

MeOH: Metanol calidad HPLC

HPLC: Cromatógrafo líquido de alto rendimiento. (High performance liquid chromatograph)

Agua HPLC: Agua Milli-Q filtrada por membrana de 0.45 µm

SPE: extracción en fase solida

CBD: Cannabidiol

THC: Delta-9-Tetrahidrocannabinol

5. DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES

5.1.1 Preparación de soluciones

5.1.1 Preparación de Buffer Fosfato 50 mM pH 2,7: pesar 35,8 g de Na₂HPO₄·12H₂O y 20,7 g de NaH₂PO₄·H₂O y llevar a 500 mL con agua destilada. Tomar 10 mL de esta solución y llevarlos a 100 mL con agua destilada obteniendo una solución de 50 mM. Agregar 10 mL de TEA y llevar a pH 3,00 con H₃PO₄ 3%.

5.1.2 Solución Madre CBD (SM CBD). Tomar en forma exacta 100 µL de estándar de referencia de CBD y llevar a 10,0 mL con metanol en matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada a 1.000.000 ng/mL.

5.1.3 Solución Madre THC (SM THC): Tomar en forma exacta 100 µL de estándar de referencia de THC y llevar a 10,0 mL con metanol en matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada de 1.000.000 ng/mL.

5.1.3 Solución de Trabajo 1 de CBD (ST1 CBD): Tomar 200 μL de SM CBD y colocar en un matraz aforado de 10,0 mL. Llevar a volumen con metanol obteniendo una concentración aproximada de 20.000 ng/mL.

5.1.4 Solución de Trabajo 1 de THC (ST1 THC): Tomar 200 μL de SM THC y colocar en un matraz aforado de 10,0 mL. Llevar a volumen con metanol obteniendo una concentración aproximada de 20.000 ng/mL.

5.1.5 Solución de Trabajo 2 (ST2 CBD): tomar 1.0 mL de ST1 CBD con pipeta aforada y colocar en un matraz aforado de 10,0 mL. Llevar a volumen con metanol obteniendo una concentración de CBD aproximada de 2.000 ng/mL.

5.1.6 Solución de Trabajo 2 (ST2 THC): tomar 1.0 mL de ST1 THC con pipeta aforada y colocar en un matraz aforado de 10,0 mL. Llevar a volumen con metanol obteniendo una concentración de CBD aproximada de 2.000 ng/mL.

5.1.7 Solución Madre de estándar interno (SM DTF): Tomar 100 μL de estándar de referencia DFT y llevar a 10.0 mL con metanol en matraz aforado, obteniendo una concentración de 1%.

5.1.8 Solución de trabajo de estándar interno (ST DFT): tomar 25 μL de SM DFT y colocar en un matraz aforado de 10,0 mL. Llevar a volumen con metanol obteniendo una concentración de DFT de $2,5 \times 10^{-5}$.

5.1.9 Soluciones Plasmáticas estándar CBD y THC para curva de calibración: a 10,0 mL de plasma blanco tomados con pipeta aforada, agregar la cantidad correspondiente de solución metanólica indicada en la Tabla 1 utilizando. Homogeneizar en vórtex por 2 minutos a 2000 RPM.

Tabla 1

Punto	CBD y THC		
	Solución	Volumen (μL)	Concentración de CBD y THC (ng/mL)
P1	ST1 CBD y ST1 THC	300	566,04
P2	ST1 CBD y ST1 THC	150	291,26
P3	ST1 CBD y ST1 THC	50	99,00
P4	ST2 CBD y ST2 THC	300	56,60
P5	ST2 CBD y ST2 THC	150	29,12
P6	ST2 CBD y ST2 THC	50	9,90

5.2 Tratamiento de muestras

1. Activación de cartuchos SPE (C8, 100mg/1ml): pasar 1 mL de MeOH, por quintuplicado, seguido de 5 porciones de 1 mL de agua Milli-Q.
2. A 1000 μL de muestra plasmática tomada con micropipeta agregar 40 μL de Solución de trabajo de estándar interno (ST DFT) utilizando micropipeta y 1000 μL de agua Mili-Q. Agitar por vórtex por 2 min a 2000 RPM.
3. Cargara la muestra en el cartucho SPE.
4. Agregar 2 mL de Buffer Fosfato 50 mM, pH 2.7

5. Agregar 1 mL de Buffer Fosfato 50 mM, pH 2.7 /MeOH (80:20).
6. Secar el cartucho durante 2 minutos bajo vacío.
7. Eluir los analitos con 1000 μ L de MeOH a tubo de vidrio de base cónica.
8. Llevar a sequedad bajo corriente de N₂ (g) a 40°C.
9. Reconstituir el residuo seco con 125 μ L MeOH. Agitar por vórtex por 3 minutos a 2000 RPM.
10. Inyectar 50 μ L en HPLC.

5.3 Condiciones cromatográficas

- Equipo: UHPLC Dionex Ultimate 3000.
- Fase estacionaria: Columna ZORBAX Eclipse, XDB-C8, 80Å, 5 μ m, 3,0 x 150 mm, Agilent Technologies.
- Fase móvil: ACN:H₂O (68:32).
- Flujo: 1 mL/min.
- Temperatura de compartimiento de columna: 37 °C.
- Longitud de onda de detección: 210 nm

5.4 Tiempos de retención

- EI ~ 4.0 minutos
- CBD ~ 5,5 minutos
- THC ~ 10,0 minutos

5.5 Cálculos

Se determinará la concentración de CBD y THC utilizando como variable independiente la relación de áreas porcentual de los analitos respecto el área del estándar interno.

6. DOCUMENTOS APLICABLES

- Instructivo de operación de la balanza
- Instructivo de operación del UHPLC
- Instructivo de operación del vortex
- Instructivo de operación del baño seco
- Instructivo de operación del pH-metro
- Instructivo de operación de la centrifuga refrigerada

7. MODIFICACIONES

Versión	Fecha	Modificaciones
01	24/11/2022	Primera edición

8. ANEXOS

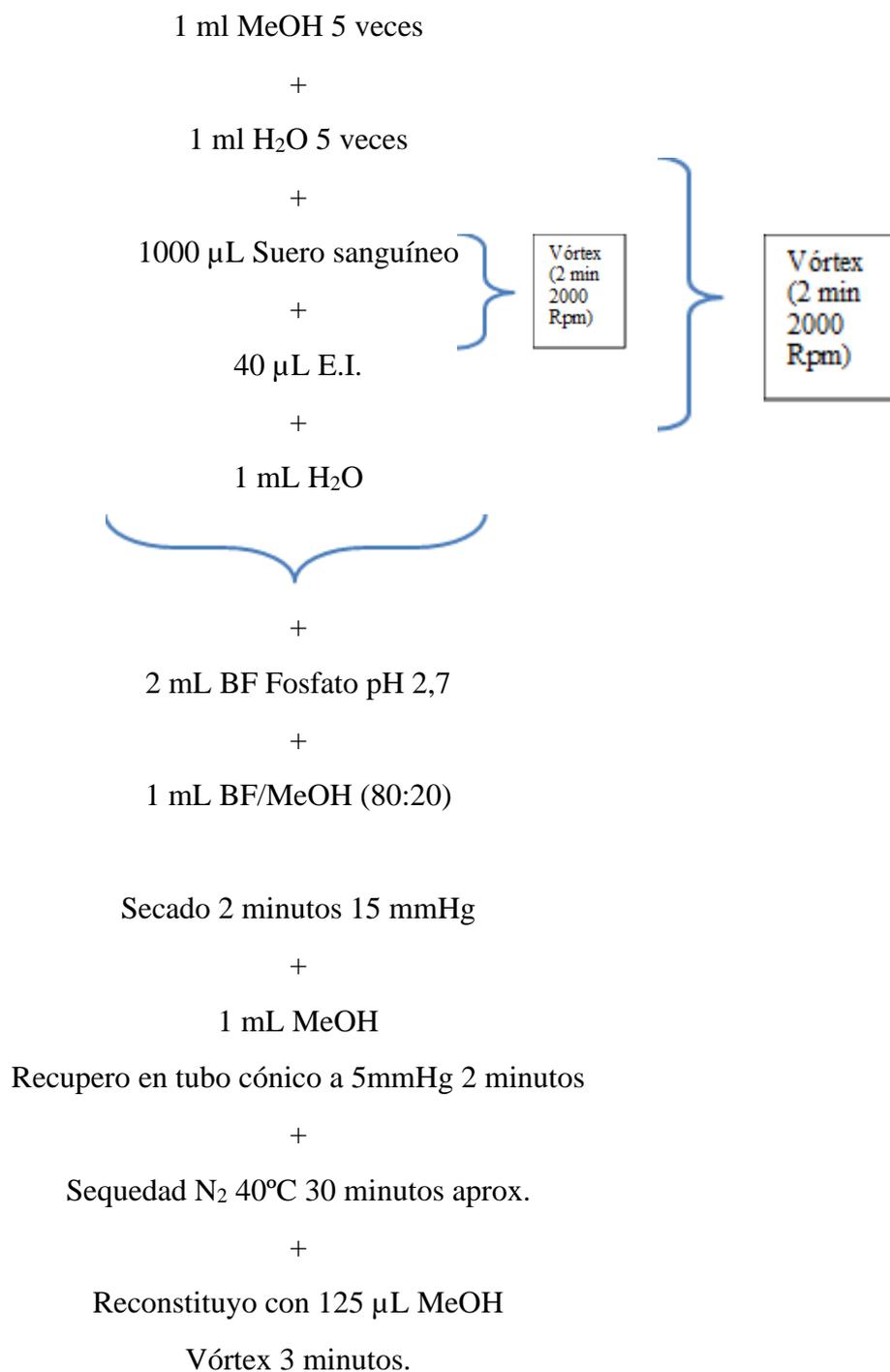
No aplicable

	ELABORADO POR	REVISADO POR	APROBADO POR
Cargo	Santiago Sosa	Silvana Alvariza	Silvana Alvariza
Fecha	24/11/2022		
Firma			

9. DIAGRAMA DE FLUJO

Se encuentra en la página siguiente.

Flujograma de la técnica modificada de Mercolini *et al.* 2008



Se inyectan 50 µL corremos a 1 mL/min a 37°C 68% ACN: 32% H₂O.

Tiempo de corrida 14 minutos