



Casa abierta al tiempo

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Sistemas Biológicos

Maestría en Ciencias Farmacéuticas

Línea de investigación:

Diseño, obtención y evaluación de fármacos y biomoléculas

# **Evaluación de la administración nasal de Cannabidiol para determinar el efecto ansiolítico en caballos: Estudio piloto**

Idónea comunicación de resultados para obtener el grado de maestro en Ciencias Farmacéuticas

Presenta

**M.V.Z. MORELOS CRUZ ELBA REBECA**

Matricula: 2233800650

**Comité tutorial:**

Cotutora: Dra. Rubria Marlen Martínez Casares

Cotutor: Dr. Ismael Martínez Cortés

Asesora: Dra. Beatriz Godínez Chaparro

Mayo 2026

**EVALUACIÓN DE LA ADMINISTRACIÓN NASAL DE  
CANNABIDIOL PARA DETERMINAR EL EFECTO ANSIOLÍTICO EN  
CABALLOS: ESTUDIO PILOTO**

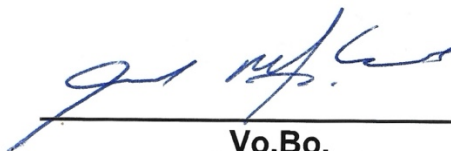
**COMITÉ TUTORAL**

**Cotutora: Dra. Rubria Marlen Martínez Casares**



\_\_\_\_\_  
**Vo.Bo.**

**Cotutor: Dr. Ismael Martínez Cortés**



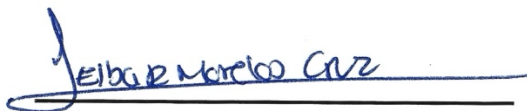
\_\_\_\_\_  
**Vo.Bo.**

**Asesora: Dra. Beatriz Godinez Chaparro**



\_\_\_\_\_  
**Vo.Bo.**

**Alumna: M.V.Z. Elba Rebeca Morelos Cruz  
Matrícula: 2233800650**



**EVALUACIÓN DE LA ADMINISTRACIÓN NASAL DE  
CANNABIDIOL PARA DETERMINAR EL EFECTO ANSIOLÍTICO EN  
CABALLOS: ESTUDIO PILOTO**

**JURADO DEL EXAMEN DE GRADO**

**Presidente: Dr. Lauro Alberto Avila Luna**



---

**Vo.Bo.**

**Vocal: Dr. Martín Gómez Hernández**



---

**Vo.Bo.**

**Secretario: Dra. Rubria Marlen Martínez Casares**



---

**Vo.Bo.**

## Resumen

La ansiedad en equinos representa un desafío clínico cuya evaluación y abordaje terapéutico continúan siendo limitados. En la literatura, los fitocannabinoides, en particular el cannabidiol (CBD), han demostrado propiedades ansiolíticas en diversas especies, siendo la administración por vía oral la más estudiada.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto ansiolítico de la administración de CBD a una dosis de 1.2 mg/kg por vía anasal e intravenosa en cuatro caballos mediante la obtención y el análisis de datos cualitativos relacionados con el comportamiento del ejemplar para desarrollar la escala de la mueca asociada con la ansiedad, así como desarrollar y validar un método analítico por HPLC-DAD para detectar y cuantificar CBD en solución oleosa y plasma equino posadministración (0, 5, 15, 30 y 60 min).

Se desarrolló y validó un método analítico para la detección y cuantificación de CBD en solución oleosa y en muestras de plasma equino por HPLC-DAD. Según las guías de la ICH, se puede afirmar que el método analítico es selectivo, específico, lineal, preciso y exacto.

Se recabó evidencia visual de cuatro caballos para la elaboración de la escala de la mueca, la cual fue utilizada para evaluar el grado de tensión asociado a la ansiedad. Las evidencias preliminares indican que la administración intranasal induce una modulación progresiva y sostenida de la respuesta conductual y fisiológica al disminuir la tensión de las unidades de acción facial y las constantes fisiológicas. Con lo anterior se demostró que la escala de la mueca equina es sensible para detectar cambios temporales y su conveniencia para evaluar el efecto ansiolítico en caballos.

Los hallazgos de este estudio sugieren que la administración intranasal de CBD, evaluada mediante herramientas conductuales y respaldada por un método analítico validado, constituye un enfoque viable para el estudio de la ansiedad en caballos.

## **Abstract**

Anxiety in horses presents a clinical challenge for which evaluation and therapeutic management remain limited. In the literature, phytocannabinoids—particularly cannabidiol (CBD)—have demonstrated anxiolytic properties in various species, with oral administration being the most widely studied route.

The objective of this study was to evaluate the anxiolytic effect of CBD administration at a dose of 1.2 mg/kg via intranasal and intravenous routes in horses by obtaining and analyzing qualitative data related to the behavior of the specimen to develop the grimace scale associated with anxiety, as well as to develop and validate an analytical method by HPLC-DAD to detect and quantify CBD in oil solution and equine plasma post-administration (0, 5, 15, 30, and 60 min).

An analytical method was developed and validated for the detection and quantification of CBD in oil solution and equine plasma samples by HPLC-DAD. According to ICH guidelines, the analytical method can be considered selective, specific, linear, precise, and accurate.

Visual data were collected from four horses to develop the grimace scale, which was used to assess the degree of tension associated with anxiety. Preliminary findings indicate that intranasal administration induces a progressive and sustained modulation of behavioral and physiological responses by reducing the tension of facial action units and physiological parameters. This demonstrated that the equine grimace scale is sensitive to detecting temporal changes and suitable for evaluating the anxiolytic effect in horses.

The findings of this study suggest that intranasal administration of CBD, evaluated using behavioral tools and supported by a validated analytical method, constitutes a viable approach for studying anxiety in horses

## Agradecimientos institucionales

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnologías (CONAHCYT), actualmente Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI), por la beca otorgada para realizar los estudios de maestría durante el periodo Noviembre del 2023 a Noviembre de 25 con el número de CVU **2000738**.

A la Rectoría de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco por el apoyo económico otorgado mediante la Convocatoria para el Desarrollo Académico 2025 en el programa “Apoyo a los trabajos terminales del alumnado” con folio: **TT7**.

Se agradece el apoyo de la Secretaría de Educación, Ciencia, Tecnología e Innovación del Gobierno de la Ciudad de México, de conformidad con los convenios SEC-TEI/010/2024, “Soberanía Alimentaria: Sistema agroalimentario sostenible para la Ciudad de México” y CASA-UAM: Centro Articulador para la Sostenibilidad Alimentaria.

A mi *alma mater*, la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, por brindarme la oportunidad de formarme académicamente y seguir creciendo profesionalmente.

Al Cuerpo Académico Consolidado: Biocatálisis Aplicada a la Química Orgánica, UAM-X, Laboratorio N-201, Biotransformaciones; por ofrecerme un espacio de aprendizaje y acompañamiento continuo.

Al Laboratorio de Farmacología e Inmunología molecular, edificio F, segundo piso, por ofrecerme un espacio de aprendizaje y acompañamiento continuo.

Al Rancho “Los Chilpas”, por abrir sus puertas y facilitar la realización de esta investigación con animales de invaluable nobleza.

## **Agradecimientos personales**

A Ceci, gracias por ser mi lugar seguro, mi sostén y mi mayor inspiración. Gracias por enseñarme que, incluso en los días más inciertos, la fe y la confianza pueden más que el miedo. Soy plenamente consciente de que nada de esto habría sido posible sin tu presencia constante, tu paciencia y tu amor incondicional.

A mis padrinos, Rebeca y Odilón, por ser mis segundos padres y mi red cuando el mundo parece cerrarse. Gracias por el amor firme, por la guía silenciosa y por estar siempre, incluso cuando las palabras no alcanzan.

A mi amada familia: mamá Coco, tío David, Tere, Leila, Arvin y Anayanci, gracias por ser refugio, raíz y hogar. Por recordarme, aun en la distancia, que el amor familiar es un lugar al que siempre se puede volver.

A mis tutores, Marlen, Ismael y Beatriz, por su guía, paciencia y exigencia. Gracias por acompañar este proceso con rigor y compromiso, por sus observaciones puntuales y por confiar en mi capacidad incluso cuando yo misma la cuestionaba. Gracias por mostrarme que siempre podemos lograr algo más. Su acompañamiento fue clave para transformar dudas en conocimiento y esfuerzo en resultados.

A la doctora Marcela Vergara, por ser la primera en confiar en mí y brindarme la oportunidad de recorrer este camino. Su confianza marcó el inicio de esta etapa y fue el impulso necesario para atreverme a avanzar.

A mi familia académica: Dr. Antonio, Mario, Raquel y Mónica, por estar siempre al pendiente de mis avances, por cada broma y consejo oportuno y por el acompañamiento constante en cada paso de este proceso.

A Pancho, por acompañarme en cada noche de desvelo, por los silencios compartidos y por recordarme, incluso en los momentos de mayor cansancio, que nunca estaba sola.

A Estrella, por tu lealtad, por tu escucha infinita y por caminar a mi lado. Tu amistad es uno de los regalos más grandes que la vida me ha dado.

A mis amigos: David, Memo, Viri, Maggie, Tania, Ivo, Mitzi y Eve, gracias por recordarme que la vida no se reduce a lo académico. Por las risas, la contención y las palabras de ánimo cuando el cansancio parecía ganar.

A mis padres, Miriam y Rafael, por las lecciones que la vida me permitió aprender a través de nuestra historia y por la fortaleza que de ella nació.

A la memoria de mi tío Arturo, quien siempre dijo que estaría presente el día que terminara esta etapa. De alguna manera, hoy sigue aquí.

Esta tesis no solo representa un trabajo académico, sino también un proceso profundo de aprendizaje, resiliencia y crecimiento. Hubo momentos de incertidumbre, cansancio y temor; sin embargo, cada obstáculo reforzó mi convicción de continuar. Hoy entiendo que este logro no es únicamente el resultado de horas de estudio y experimentación, sino también de la fuerza que nace del acompañamiento, del amor que sostiene en silencio y de la determinación que se construye día a día. Porque al final, todo logro es la suma de muchas manos, muchas voces y de una voluntad que decidió no rendirse.

# ÍNDICE

|                                                                                                                           |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Introducción .....</b>                                                                                              | <b>10</b> |
| <b>2. Antecedentes .....</b>                                                                                              | <b>13</b> |
| <b>2.1. Ansiedad .....</b>                                                                                                | <b>13</b> |
| <b>2.2. Escala de la mueca equina y su relevancia en el SGA prolongado en<br/>caballos .....</b>                          | <b>16</b> |
| <b>2.3. La ansiedad y el sistema endocannabinoide .....</b>                                                               | <b>19</b> |
| <b>2.4. CBD: propiedades y mecanismos de acción como ansiolítico .....</b>                                                | <b>21</b> |
| <b>2.5. Farmacocinética del CBD en diversas especies .....</b>                                                            | <b>23</b> |
| <b>2.6. Farmacocinética del CBD en caballos .....</b>                                                                     | <b>25</b> |
| 2.6.1 Vía de administración oral de CBD en caballos.....                                                                  | 26        |
| 2.6.2 Vía de administración intranasal de CBD en caballos como estrategia terapéutica                                     | 27        |
| <b>2.7. Desarrollo de formulaciones para administración vía intranasal con<br/>CBD.....</b>                               | <b>29</b> |
| <b>2.8. Cuantificación de CBD en diversas matrices .....</b>                                                              | <b>30</b> |
| 2.8.1 Cuantificación de CBD en muestras biológicas .....                                                                  | 34        |
| <b>2.10. Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación<br/>de CBD .....</b>                       | <b>37</b> |
| <b>3. Planteamiento del problema.....</b>                                                                                 | <b>41</b> |
| <b>4. Justificación del estudio.....</b>                                                                                  | <b>43</b> |
| <b>5. Hipótesis.....</b>                                                                                                  | <b>45</b> |
| <b>6. Objetivos .....</b>                                                                                                 | <b>45</b> |
| <b>6.1 Objetivo general .....</b>                                                                                         | <b>45</b> |
| <b>6.2 Objetivos específicos .....</b>                                                                                    | <b>45</b> |
| <b>7. Material y métodos .....</b>                                                                                        | <b>46</b> |
| <b>7.1 Animales .....</b>                                                                                                 | <b>46</b> |
| <b>7.2 Materiales .....</b>                                                                                               | <b>48</b> |
| <b>7.3 Desarrollo y Validación del método analítico para detectar y cuantificar<br/>CBD.....</b>                          | <b>48</b> |
| 7.3.1 Preparación de disoluciones y muestras .....                                                                        | 48        |
| 7.2.2 Condiciones de operación del sistema cromatográfico.....                                                            | 51        |
| 7.3.3 Validación del método analítico para la identificación y cuantificación de CBD .....                                | 52        |
| <b>7.4 Preparación de la solución oleosa (SO) con CBD para su<br/>administración en caballos por vía intranasal .....</b> | <b>56</b> |
| <b>7.5 Evaluación del efecto ansiolítico de CBD por vía intranasal en caballos<br/>.....</b>                              | <b>56</b> |

|                                                                                                                                   |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 7.6 Análisis Estadístico .....                                                                                                    | 58  |
| 8. Resultados y discusión.....                                                                                                    | 60  |
| 8.1 Desarrollo y validación de un método analítico HPLC-DAD para<br>detectar y cuantificar CBD .....                              | 60  |
| 8.1.1 Método analítico para la cuantificación y detección de CBD .....                                                            | 60  |
| 8.2 Validación del método analítico para la cuantificación y detección de<br>CBD.....                                             | 61  |
| 8.2.1 Especificidad del método analítico.....                                                                                     | 61  |
| 8.2.2 Adecuabilidad del método analítico .....                                                                                    | 63  |
| 8.2.3 Límites de Detección y Cuantificación .....                                                                                 | 65  |
| 8.2.4 Validación del método analítico para la cuantificación de CBD en SO.....                                                    | 66  |
| 8.2.5 Análisis del CBD y solución oleosa de CBD .....                                                                             | 70  |
| 8.2.6 Validación del método analítico para la cuantificación de CBD en plasma equino ..                                           | 72  |
| 8.3 Preparación de la solución con CBD para su administración en<br>caballos por vía intranasal .....                             | 80  |
| 8.4 Evaluación del efecto ansiolítico del CBD administrado por vía<br>intranasal en caballos .....                                | 84  |
| 8.4.1 Evaluación de la Escala de la Mueca equina (EM).....                                                                        | 85  |
| 8.4.2 Evaluación del comportamiento de caballos administrados con CBD mediante<br>escala de la mueca asociada a la ansiedad ..... | 88  |
| 8.4.3 Efecto ansiolítico del CBD sobre la EM .....                                                                                | 93  |
| 9. Limitaciones y perspectivas del estudio.....                                                                                   | 101 |
| 10. Conclusiones .....                                                                                                            | 102 |
| Bibliografía .....                                                                                                                | 104 |
| Anexos .....                                                                                                                      | 120 |

## 1. Introducción

La ansiedad se define como un cuadro conductual, fisiológico y neuroendocrino que se manifiesta ante la presencia de estímulos estresantes, amenazantes o potencialmente peligrosos, que alteran la psique del individuo. Este cuadro no es exclusivo del humano, también se manifiesta en otros seres vivos, tal como los animales, en donde esta respuesta se describe como parte del llamado Síndrome General de Adaptación (SGA), el cual, cuando se presenta de manera prolongada, modifica la conducta o el comportamiento de los animales y conduce a un desequilibrio homeostático que compromete el bienestar, la salud y el desempeño productivo o deportivo de un ejemplar (Camargo, 2010) pudiendo representar de esta forma una un problema de salud y productividad.

Al abordar la ansiedad desde un enfoque neurobiológico, la patogénesis de los trastornos de ansiedad se relaciona principalmente con alteraciones en los sistemas de neurotransmisión monoaminérgica, incluyendo deficiencias de los neurotransmisores 5-hidroxitriptamina (serotonina), dopamina y norepinefrina, lo que representa un desequilibrio entre los neurotransmisores inhibitorios y excitatorios, en particular entre el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y el glutamato (Chand & Marwaha, 2023). A este punto es importante resaltar que la etiología de la ansiedad no se encuentra completamente dilucidada ya que al ser un desequilibrio químico en el sistema nervioso continúan explorándose otros mecanismos patológicos potenciales, tales como la disfunción de canales iónicos, la mitofagia excesiva en regiones cerebrales como la amígdala, así como alteraciones en los circuitos neuronales implicados en la regulación emocional (Zhao *et al.*, 2023) ya que el cerebro y el sistema nervioso representan un campo en continua exploración.

Partiendo de este preámbulo, el cannabidiol (CBD) se popularizó como un compuesto de interés debido a su capacidad para interactuar con diversos sistemas neurobiológicos estudiados en los trastornos de ansiedad. De acuerdo con resultados de diversos estudios, se comprobó que el CBD modula indirectamente receptores serotoninérgicos, GABAérgicos y del sistema endocannabinoide, lo que

podría contribuir a la disminución de los signos y síntomas de los cuadros ansiosos sin que se manifiesten los efectos psicoactivos característicos de otros cannabinoides (Barakat *et al.*, 2025; Mujahid *et al.*, 2025).

Con base en lo anterior, puede describirse el CBD como un compuesto químico fitocannabinoides no psicoactivo, derivado de *Cannabis sativa*, por el cual, en los últimos años, existe un creciente interés en el ámbito de la medicina veterinaria. Este creciente interés se debe a que su potencial terapéutico se explora en diversas especies domésticas y, en particular, en animales de alto valor deportivo y económico, como los caballos (Yocom *et al.*, 2022). Es importante destacar la exploración terapéutica en la especie equina, debido a la relevancia económica de los cuadros de ansiedad en ella, ya que estos pueden afectar el comportamiento, el manejo, el rendimiento deportivo y la seguridad tanto del animal como del personal involucrado en su uso y cuidado. Aunque existen diversos estudios que establecen el potencial del CBD como agente ansiolítico, principalmente en humanos (Blessing *et al.*, 2015; Reddy *et al.*, 2025; Shannon *et al.*, 2019; Spinella *et al.*, 2021), aún se carece de suficientes datos que aborden alternativas para contrarrestar las desventajas que se presentan cuando el CBD se administra por vía oral, principal vía de administración estudiada en equinos, lo que representa una problemática relevante en la medicina veterinaria (Ryan *et al.*, 2021; Yocom *et al.*, 2022) siendo un riesgo económico y ético para el bienestar animal de esta especie.

Considerando lo anterior, al comparar la vía de administración oral con la administración intranasal, esta última se describe como una estrategia eficiente para el suministro de fármacos con baja biodisponibilidad oral (Paudel *et al.*, 2010). Sin embargo, la información disponible y los datos recabados sobre la influencia de la vía intranasal en la efectividad del CBD en equinos son limitados, lo que justifica el estudio de la administración de CBD por vía intranasal, con el objetivo de incrementar la biodisponibilidad comparada con la vía oral y, con ello, presentar esta vía de administración como una alternativa para tratar este cuadro clínico.

Considerando que antes de administrar cualquier tratamiento terapéutico, es necesario garantizar su calidad, seguridad e inocuidad, es de vital importancia

contar con alternativas analíticas, entre ellas la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), la cromatografía de gases (CG) y técnicas espectrométricas, como herramientas de medición que determinen con exactitud y precisión el contenido del compuesto.

En particular, la cuantificación de CBD en diferentes formas farmacéuticas se reporta mayoritariamente mediante HPLC acoplada a diversos detectores; mientras que la determinación de CBD en matrices biológicas, como el plasma, para estudios de biodisponibilidad, se realiza comúnmente mediante HPLC acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS). Los detectores de espectrometría de masas permiten tener metodologías más sensibles; sin embargo, son más escasos, requieren personal especializado y son más costosos comparados con otros detectores convencionales como el de arreglo de diodos (DAD). Para evaluar la calidad del producto, estimar la biodisponibilidad del CBD y, adicionalmente, constituir una herramienta analítica útil para la detección de sustancias potencialmente prohibidas en el ámbito de las competencias ecuestres, es necesario desarrollar metodologías analíticas de fácil acceso. Por lo anterior, en el presente trabajo se desarrolló y validó un método analítico por HPLC-DAD que permitió cuantificar CBD tanto en el vehículo intranasal destinado a la administración en caballos como en muestras de plasma. Asimismo, este estudio tuvo como objetivo evaluar la eficacia del CBD administrado por vía intranasal para determinar su efecto ansiolítico en caballos sometidos a condiciones de estrés controladas. Para ello, se analizaron parámetros fisiológicos y conductuales antes y después de la administración de CBD.

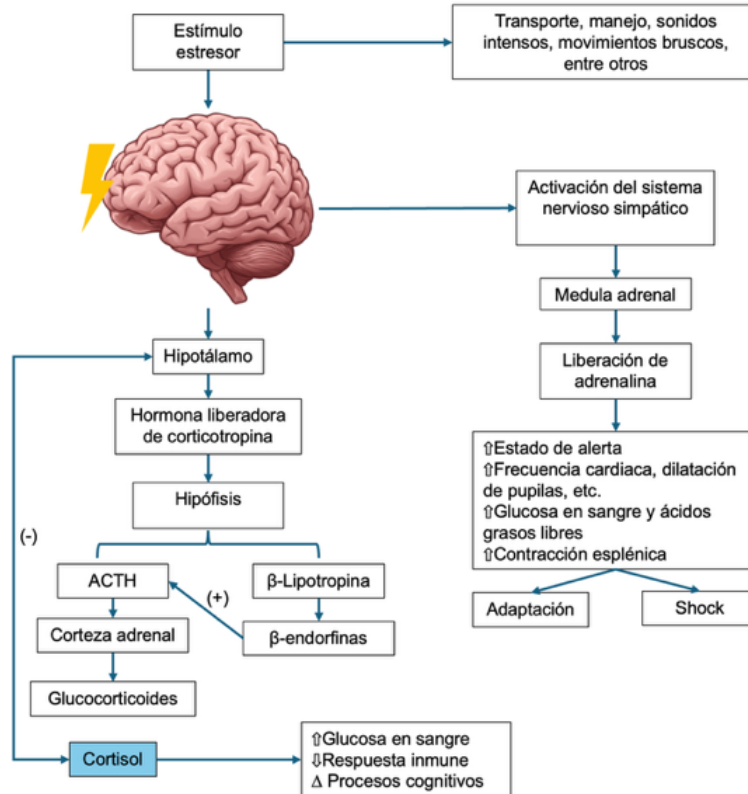
## 2. Antecedentes

### 2.1. Ansiedad

La ansiedad es una alteración fisiológica y, en el ámbito veterinario, se describe como la prolongación del Síndrome General de Adaptación (SGA), ya que provoca la misma respuesta fisiológica que la ansiedad. El SGA comienza con un estímulo estresor y desencadena 3 etapas:

1. Etapa de alarma: Falta de adaptación de los animales ante el estímulo estresor; las reacciones observadas incluyen respuestas de lucha o de huida.
2. Etapa de resistencia: punto máximo de adaptación de los animales al estímulo estresor.
3. Etapa de agotamiento: Pérdida de la adaptación adquirida.

Desde el punto de vista fisiológico (**Figura 1**), el SGA puede desencadenarse ante un estímulo estresante que activa el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), lo que provoca la liberación de cortisol (del Río García, 2020). Este aumento de cortisol desencadena múltiples efectos adaptativos: moviliza energía al estimular la gluconeogénesis hepática, degradar proteínas musculares y liberar ácidos grasos libres para mantener niveles elevados de glucosa en sangre (Pereira Pía, 2025); al mismo tiempo, este desbalance de cortisol suprime la respuesta inmunitaria al inducir la apoptosis de linfocitos T, inhibir la producción de anticuerpos por linfocitos B y reducir el reclutamiento de neutrófilos (Chu *et al.*, 2025). A nivel cognitivo, el aumento de cortisol mejora inicialmente el enfoque y la consolidación de recuerdos emocionalmente relevantes, pero niveles elevados y sostenidos de cortisol están asociados con deterioro de la memoria y alteraciones estructurales en el hipocampo, como atrofia dendrítica (James *et al.*, 2023). Estas respuestas adaptativas pueden resultar perjudiciales cuando se mantienen en el animal a largo plazo, contribuyendo a mantener o a empeorar el cuadro de ansiedad.



**Figura 1.** Fisiología del Síndrome General de Adaptación y de la ansiedad. Mecanismo fisiológico desencadenado por un estímulo estresor (del Río García, 2020).

Las posibles manifestaciones del trastorno de ansiedad varían según la especie de interés. De manera general, las manifestaciones de estrés se agrupan en las siguientes dos categorías:

**Manifestaciones clínicas (Categoría 1):** Incluye aumento en las siguientes variables: concentración sérica de cortisol, frecuencia cardíaca (taquicardia), frecuencia respiratoria (taquipnea o hiperventilación), dilatación pupilar (midriasis), sudoración (hiperhidrosis), temperatura corporal (hipertermia); así como pérdida breve e inesperada de la conciencia y del tono postural (síncope), entre otros (Harro, 2018; Hernández-Avalos *et al.*, 2021; Wormald *et al.*, 2017).

**Manifestaciones del comportamiento (Categoría 2):** Se presentan como comportamientos repetitivos sin finalidad aparente, como aumento de la vocalización, hiperreactividad, agresividad y comportamientos destructivos, inquietud, hipervigilancia, entre otros (Riva *et al.*, 2022). Estos signos son

comúnmente conocidos como estereotipias y se encuentran diversificados por especie (Tatemoto *et al.*, 2022). En los caballos, los comportamientos estereotipados más frecuentes son: morder y/o lamer, balanceo lateral del cuerpo, caminar en caja y tragar aire (aerofagia), entre otros (Sarrafchi & Blokhuis, 2013). Cabe mencionar que estas manifestaciones pueden presentarse con diferentes intensidades o en combinación y variar según la especie y el individuo.

Para realizar un diagnóstico de ansiedad, es necesario reconocer las manifestaciones en el ejemplar, así como realizar una evaluación clínica integral que considere el historial médico, el contexto ambiental y, cuando sea posible, la evaluación de biomarcadores como el cortisol, la alfa-amilasa salival y la butirilcolinesterasa (Agorastos *et. al.*, 2023; Babington *et. al.*, 2024; Bazzano *et. al.*, 2024).

La importancia de un diagnóstico oportuno de la prolongación del SGA es evitar las secuelas, ya que estas representan un deterioro del bienestar físico y emocional, inmunosupresión, alteraciones gastrointestinales, disminución del rendimiento físico y conductas estereotipadas o de automutilación, disminución de peso corporal; y particularmente en animales dedicados a la producción, la disminución de parámetros productivos como ganancia de peso diaria, producción de leche o de huevo y aumento en la conversión alimenticia (cantidad de alimento necesaria para producir una unidad de producto) (Josefson *et. al.*, 2023; Pan *et. al.*, 2022).

Es importante mencionar que en animales para dar un diagnóstico definitivo de ansiedad es necesario el análisis de biomarcadores, lo cual representa evaluaciones costosas e invasivas y que en grandes especies es poco práctico (Morera *et. al.*, 2019). Por lo anterior, es importante buscar métodos de evaluación fisiológica y conductual que faciliten la identificación de signos que evidencien el estado físico y emocional de los animales, como la escala de la mueca (Evangelista *et al.*, 2022).

## **2.2. Escala de la mueca equina y su relevancia en el SGA prolongado en caballos**

La Escala de la Mueca en Caballos (EM) constituye una de las herramientas más relevantes para evitar por completo el manejo de los ejemplares, por ser un sistema de evaluación particularmente explorado en casos de dolor y ansiedad y, por ende, respaldado científicamente.

El desarrollo de EM responde a la necesidad de contar con un método objetivo, estandarizado y no invasivo, capaz de superar las limitaciones de las escalas basadas únicamente en la observación clínica general o en signos fisiológicos, que pueden ser subjetivos, poco específicos y dependientes del evaluador. La EM fue propuesta inicialmente por Dalla Costa *et al.* (2014), quienes identificaron que las expresiones faciales de los caballos, al igual que en otras especies, cambian de manera consistente ante el dolor, el malestar o los estímulos estresores.

El sistema de evaluación de la EM se basa en la identificación y puntuación de microexpresiones faciales caracterizadas en seis Unidades de Acción Facial (UAF):

1. Orejas rígidas hacia atrás.
2. Tensión orbital.
3. Tensión en la región supraorbital.
4. Tensión en los músculos masticatorios.
5. Tensión de boca y mentón más pronunciado.
6. Fosas nasales dilatadas o contraídas.

Cada UAF recibe un puntaje de 0 (ausente), 1 (moderadamente presente) o 2 (evidentemente presente), con un máximo de 12 puntos. Este tipo de evaluación permite establecer un criterio objetivo y reproducible que presenta alta concordancia interobservador, incluso entre evaluadores con diferentes grados de experiencia, tras un breve entrenamiento (Dalla Costa *et al.*, 2016; van Loon & Van Dierendonck, 2017).

Si bien su validación inicial se realizó en contextos de dolor agudo, como son los procedimientos quirúrgicos (orquiectomía: extirpación de testículos) (Dalla Costa *et al.*, 2014) o en casos de laminitis (inflamación y separación de las láminas del casco) (Dalla Costa *et al.*, 2016), también se evaluó su aplicación en condiciones de dolor asociado a procedimientos dentales (Marcantonio Coneglian *et al.*, 2020) o asociado al síndrome de úlcera gástrica (Ferlini Agne *et al.*, 2023). En estudios recientes, la EM se emplea para evaluar cambios asociados a estados emocionales negativos no necesariamente ligados al dolor físico, como el miedo, el SGA prolongado o la ansiedad (Dalla Costa *et al.*, 2017). En un ensayo exploratorio, se observó que los caballos sometidos a estímulos estresantes o novedosos presentaron un incremento en las UAF relacionadas con tensión en las orejas, los ojos y los músculos masticatorios, lo cual sugiere que la escala podría captar señales de incomodidad emocional (Dalla Costa *et al.*, 2017). Esto abre un campo de aplicabilidad importante en el ámbito del bienestar animal, donde resulta fundamental diferenciar entre el dolor, el miedo y la ansiedad.

En particular, los equinos son una especie altamente sensible a su entorno y a diferentes situaciones, como el transporte, los cambios de instalaciones, la participación en competencias o los procedimientos veterinarios, que pueden generar el SGA. La prolongación del SGA no solo compromete su bienestar, sino que también puede interferir con el rendimiento deportivo y la recuperación clínica. Tradicionalmente, el SGA se evalúa mediante manifestaciones clínicas y biomarcadores; sin embargo, estos métodos presentan limitaciones, ya que requieren equipos especializados y son invasivos, mientras que las evaluaciones conductuales dependen de observadores entrenados y están sujetas a interpretaciones subjetivas (van Loon & Van Dierendonck, 2017).

Por lo anterior, la EM ofrece una ventaja significativa como herramienta complementaria, ya que permite: una evaluación no invasiva, al observar la expresión facial sin manipular al animal directamente; aplicación rápida, en menos de un minuto tras un entrenamiento básico del evaluador y una vez capacitado al evaluador, se logra reproducibilidad interobservador con resultados estandarizados,

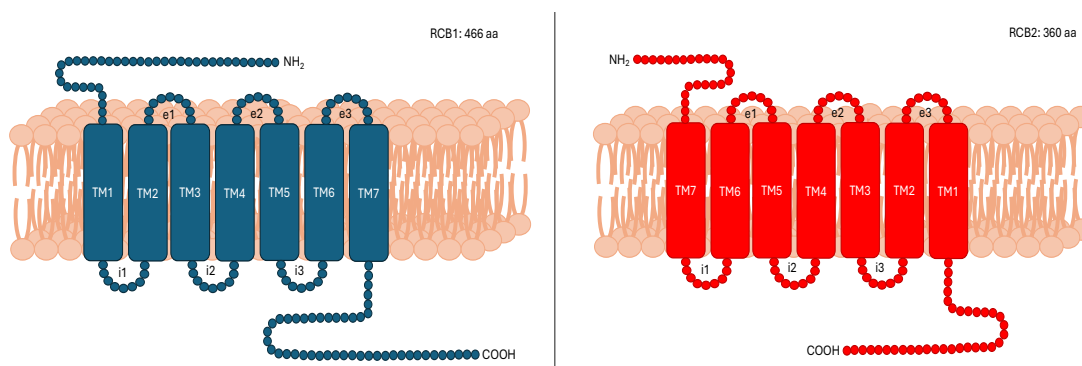
la EM puede ser aplicada tanto en campo como clínica, sin necesidad de equipos especializados por lo cual es menos costosa y práctica, además de su alta sensibilidad a estados emocionales, lo que la convierte en un indicador potencial de ansiedad además de dolor (Hintze *et al.*, 2016; McLennan, 2018).

Por su naturaleza visual, la EM puede emplearse en estudios experimentales para evaluar la eficacia de tratamientos ansiolíticos y analgésicos en caballos. Los evaluadores pueden registrar los cambios en la expresión facial antes y después de la administración de un fármaco, sin manipular al animal, lo que permite obtener datos precisos sobre su estado emocional; además, las evaluaciones pueden ser digitalizadas y automatizadas, lo que aumenta la precisión y la robustez del diagnóstico y, con ello, mejora la respuesta al tratamiento (Dalla Costa *et al.*, 2016).

El tratamiento farmacológico de la ansiedad en algunas especies animales consiste en la administración de benzodiacepinas (p. ej., diazepam), inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (p. ej., fluoxetina) y tricíclicos (p. ej., clomipramina) (Farach *et al.*, 2012). Estos fármacos disminuyen la activación neuronal excesiva, manteniendo el control del SGA; sin embargo, estos fármacos causan efectos adversos como somnolencia, dependencia, ataxia (falta de coordinación motriz) o alteraciones gastrointestinales, y su uso debe ser supervisado y, preferentemente, combinado con intervenciones conductuales y ambientales (Meneses *et al.*, 2021; Shinfuku *et al.*, 2019). Cabe mencionar que existen algunas alternativas terapéuticas basadas en productos naturales como lo son la hierba de San Juan, lavanda, lúpulo, valeriana, menta piperita y cannabis, entre otros (Kenda *et al.*, 2022). Sin embargo, su uso debe ser cuidadoso ya que los extractos de plantas contienen varios compuestos con diversas actividades; por ello se desarrolló la purificación de compuestos con potencial actividad ansiolítica; los cuales pueden tener interacciones con diferentes receptores; por ejemplo, de *Cannabis sativa* de lograron purificar más de 100 fitocannabinoides, entre ellos se destacan el cannabidiol (CBD), cannabigenol (CBG), cannabinol (CBN), entre otros, que se caracterizan por interactuar con los sistemas endocannabinoide ampliado y canónico (Alves *et al.*, 2020; Andre *et al.*, 2016).

### 2.3. La ansiedad y el sistema endocannabinoide

El sistema endocannabinoide (SEC) es un complejo mecanismo de señalización celular que desempeña un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis fisiológica (Barakat *et al.*, 2025). El SEC está constituido por una red de receptores, ligandos endógenos y enzimas que regulan múltiples funciones fisiológicas. Entre sus componentes más relevantes se encuentran los ligandos endógenos llamados receptores de cannabinoides (RCB, **Figura 2**), los cuales están conformados por siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G. Estos receptores se clasifican en RCB<sub>1</sub> y RCB<sub>2</sub> (SEIC, 2002; Zou & Kumar, 2018).



**Figura 2.** Modelo estructural de RCB<sub>1</sub> y RCB<sub>2</sub>. Estructura de los receptores tipo 1 (RCB<sub>1</sub>) y tipo 2 (RCB<sub>2</sub>), ambos cuentan con 7 dominios transmembranales (TM), 3 dominios extracelulares (e) y 3 dominios intracelulares (i), con extremos terminales amino (-NH<sub>2</sub>) y ácido carboxílico (-COOH).

La diferencia estructural entre RCB<sub>1</sub> y RCB<sub>2</sub> radica en el número de aminoácidos de sus extremos terminales, siendo el receptor RCB<sub>1</sub> el que presenta mayor longitud en esta región. Esta variación estructural está estrechamente relacionada con sus funciones fisiológicas; en particular, el receptor RCB<sub>2</sub> carece de la capacidad de modificar la actividad de los canales iónicos, a diferencia del RCB<sub>1</sub> (Zou & Kumar, 2018).

Además de los receptores canónicos mencionados anteriormente, existe el sistema endocannabinoide ampliado, que incluye diversos receptores de interés terapéutico, como los receptores vanilloides de potencial transitorio tipo V1 (TRPV1), algunos

receptores acoplados a proteína G, como GPR18 y GPR55, y los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR) (de Almeida & Devi, 2020). Si bien este conjunto de receptores no es específico para los cannabinoides, estos pueden unirse a ellos y producir un efecto biológico.

La activación de estos receptores de los sistemas endocannabinoide ampliado y canónico puede modular positiva o negativamente la actividad de la adenilato ciclasa, las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y las cinasas A y C; además, puede influir en la apertura de canales iónicos de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y potasio ( $\text{K}^{+}$ ) (Dhopeshwarkar & Mackie, 2014; SEIC, 2002; Soria-Lara et al., 2019).

El SEC tiene una relación directa con el sistema nervioso central (SNC), particularmente en la modulación de las emociones y de las respuestas al estrés y, con ello, del SGA. El SEC regula circuitos emocionales claves (amígdala, corteza prefrontal, eje HHA), modulando la liberación de cortisol, neurotransmisores y con ello el comportamiento (Finn, 2010; Hasbi *et al.*, 2023; Henson *et al.*, 2021; Maldonado *et al.*, 2020). En particular, los receptores  $\text{RCB}_1$ , se encuentran distribuidos ampliamente en regiones del SNC como la amígdala, el hipocampo, la sustancia gris y la corteza prefrontal; participan en la regulación de la liberación de neurotransmisores inhibitorios como GABA y excitatorios como glutamato, lo que influye directamente en los circuitos neurales relacionados con el SGA; por lo cual, la activación del SEC en estas regiones contribuye directamente en la reducción de la excitabilidad neuronal asociada con miedo, estrés y respuesta emocional exacerbada (Lu & Mackie, 2016; Ruehle *et al.*, 2012).

En condiciones fisiológicas normales, el SEC actúa como un sistema amortiguador frente a estímulos hostiles; sin embargo, las disfunciones de este sistema se relacionan con una hiperactividad del eje HHA y una mayor vulnerabilidad al desarrollo de trastornos de ansiedad (Hill & Gorzalka, 2009).

En conjunto, el SEC representa un mecanismo neuromodulador clave en el control de la ansiedad, actuando sobre múltiples rutas neuroquímicas y regiones cerebrales. En medicina veterinaria, el estudio SEC en especies animales abre

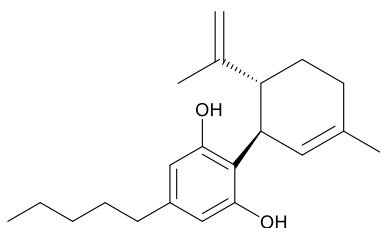
nuevas posibilidades terapéuticas, especialmente en el desarrollo de estrategias menos invasivas para el manejo del estrés y el bienestar emocional, lo que da sustento biológico al uso de fitocannabinoides en cuadros de ansiedad; sin embargo, es importante señalar que aún se requiere mayor investigación para confirmar su eficacia y seguridad en contextos clínicos veterinarios (Alvarenga *et al.*, 2023; Yu & Rupasinghe, 2021).

Los fitocannabinoides más importantes e investigados con actividad sobre el SEC son el  $\Delta^9$ -Tetrahidrocannabinol (THC) y el Cannabidiol (CBD), debido a que son los de mayor concentración en las plantas de *Cannabis*. El THC es el principal compuesto psicoactivo, mientras que el CBD carece de actividad psicotrópica y se asocia con diversas actividades farmacológicas, como antiinflamatorias, analgésicas, anticonvulsivantes, ansiolíticas, antioxidantes, neuroprotectoras, antieméticas y antineoplásicas (Oke, 2021).

#### **2.4. CBD: propiedades y mecanismos de acción como ansiolítico**

El CBD es uno de los principales fitocannabinoides no psicoactivos derivados de la planta *Cannabis sativa*, que interactúa con el SEC y presenta una amplia acción farmacológica. Químicamente, el CBD corresponde a un compuesto lipofílico de estructura bicíclica con un grupo hidroxilo fenólico y una cadena pentílica, con fórmula molecular  $C_{21}H_{30}O_2$  (**Figura 3**) y un peso molecular de 314.46 g/mol. Presenta un punto de fusión aproximado de 66 °C y es insoluble en agua, pero altamente soluble en disolventes orgánicos como etanol, metanol, dimetilsulfóxido y aceites vegetales. Su lipofilicidad, reflejada en un  $\log P$  de 6.1, es decir, muy lipofílico, lo cual favorece su acumulación en tejidos lipídicos y le permite atravesar fácilmente membranas biológicas, incluida la barrera hematoencefálica (Francke *et al.*, 2021). Es químicamente estable en condiciones neutras y de oscuridad, pero susceptible de degradación por exposición a la luz, al calor y a pH extremos. El CBD se encuentra en su forma ácida en la planta, como ácido cannabidiólico (CBDA) y requiere descarboxilación térmica para transformarse en su forma neutra activa (CBD) (Tavčar & Vidak, 2024). Estas propiedades fisicoquímicas condicionan

su biodisponibilidad, su formulación farmacéutica y su vía de administración, lo que afecta directamente su perfil farmacocinético y farmacodinámico.



**Figura 3.** Estructura molecular del cannabidiol

En varios estudios se reporta el efecto ansiolítico del CBD tras su administración, debido a su interacción con diversos sistemas neurobiológicos implicados en la respuesta al SGA, como se menciona en la **Tabla 1** (Campos *et al.*, 2016).

**Tabla 1.** Receptores y sistemas neurobiológicos asociados con el efecto ansiolítico del CBD

| Sistema          | Receptores clave                    | Actividad                      |
|------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| Eje HHA          | CRH, ACTH, cortisol                 | Respuesta al estrés            |
| GABAérgico       | GABA <sub>A</sub>                   | Inhibición, efecto ansiolítico |
| Serotoninérgico  | 5-HT <sub>1A</sub>                  | Modulación emocional           |
| Glutamatérgico   | NMDA                                | Excitación neuronal            |
| Noradrenérgico   | $\alpha$ / $\beta$                  | Alerta e hipervigilancia       |
| Endocannabinoide | RCB <sub>1</sub> , RCB <sub>2</sub> | Regulación del estrés          |

CRH: Hormona liberadora de corticotropina, 5-HT: Receptor de serotonina, NMDA: Receptor *N-metil-D-glutamato*

El CBD puede estimular receptores serotoninérgicos (5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>3A</sub>), así como antagonizar receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos y  $\mu$ -opioides, e inhibir la recaptura sinaptosomal de neurotransmisores como noradrenalina, dopamina, serotonina y ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) (Campos *et al.*, 2016; Franco & Perucca, 2019). Además, el CBD ejerce efectos ansiolíticos indirectos mediante la modulación de receptores centrales como la familia de receptores potenciales de transducción de señal de iones (TRPV1, involucrado en la termorregulación y nocicepción) y los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR $\gamma$ ) y puede influir en la recaptura sináptica de neurotransmisores clave. Estas acciones pueden disminuir la activación del eje HHA, normalizar el tono serotoninérgico y reducir la carga excitatoria en las redes límbicas, lo cual se presenta tanto en modelos animales como en ensayos clínicos en humanos (Blessing *et al.*, 2015; Galiazzo *et al.*, 2022).

Cabe señalar que los primeros estudios farmacológicos en animales domésticos con un modelo de ansiedad que incluyen la administración de CBD se realizaron en caninos, siendo Samara *et al.* (1988) el primer grupo de investigación que informó sobre los efectos de CBD administrado por vía oral, destacando la baja biodisponibilidad y la absorción incompleta del CBD.

## 2.5. Farmacocinética del CBD en diversas especies

Diversos estudios describen la farmacocinética del CBD en distintas especies (**Tabla 2**) y se observa que existen variaciones importantes en los parámetros farmacocinéticos. Estas investigaciones en modelos animales, como roedores, gatos, perros y caballos, así como en humanos, permitió determinar parámetros clave como la concentración máxima ( $C_{max}$ ), el tiempo para alcanzar la concentración máxima ( $T_{max}$ ), la vida media de eliminación ( $t_{1/2}$ ) y la biodisponibilidad relativa, aportando un panorama comparativo útil para la medicina veterinaria.

**Tabla 2.** Parámetros farmacocinéticos del CBD en diversas especies

| Parámetro                 | Caballos                      | Ratones                        |      | Terneros                   | Perros                      | Gatos                      |
|---------------------------|-------------------------------|--------------------------------|------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Dosis (mg/kg)             | 2                             | 13.9                           | 10   | 5                          | 2 y 8                       | 2.8-30.5                   |
| Vía de administración     | Oral                          | Inhalación                     | Oral | Oral                       | Oral                        | Oral                       |
| $C_{max}$ (ng/mL)         | 51 ± 14                       | 2.56                           |      | 106                        | ~50                         | 250 ± 97                   |
| $T_{max}$                 | 2.4 ± 1.1 h                   | ~5 min                         | ~2 h | 7.5 h                      | 1.4 h                       | 3.3 h                      |
| $t_{1/2}$ eliminación (h) | 10.4 ± 6                      | 2.4–5.3                        | ~4.2 | ~23                        | ~4.2                        | 2                          |
| Biodisponibilidad (%)     | ~7.9                          | —                              |      | —                          | 0-19                        | —                          |
| Referencia                | Williams <i>et al.</i> , 2022 | Schwotzer <i>et al.</i> , 2023 |      | Meyer <i>et al.</i> , 2022 | Gamble <i>et al.</i> , 2018 | Kulpa <i>et al.</i> , 2021 |

La absorción del CBD depende de diversos factores anatómicos, fisiológicos y farmacológicos que influyen directamente en su biodisponibilidad y en su eficacia clínica (Chayasirisobhon, 2020).

Uno de los principales factores que afectan la farmacocinética es la vía de administración; por ejemplo, la vía de administración oral, aunque es la más común y práctica, presenta una baja biodisponibilidad del CBD debido al efecto de primer paso hepático y a su limitada solubilidad en agua (Millar *et al.*, 2018). En contraste, otras vías de administración, como la intravenosa, la sublingual o la inhalatoria,

pueden ofrecer una absorción más rápida y eficiente, evitando parcialmente el metabolismo hepático inicial (Currie, 2018).

En la **tabla 2**, se presentan los resultados obtenidos al administrar CBD por vía oral en diversas especies. En caballos, la administración oral de CBD se asocia con valores moderados de  $C_{max}$  y  $T_{max}$ , es decir, una biodisponibilidad baja, lo cual concuerda con lo observado en otras especies, como los perros, donde el efecto de primer paso hepático y la limitada solubilidad acuosa del CBD restringen su absorción sistémica. Asimismo, la vida media de eliminación del CBD varía considerablemente entre especies, siendo más prolongada en perros (Gamble *et al.*, 2018), terneros (Meyer *et al.*, 2022) y caballos (Williams *et al.*, 2022), lo que podría tener implicaciones clínicas relevantes en términos de dosificación y riesgo de acumulación (Kulpa *et al.*, 2021; Schwotzer *et al.*, 2023).

Asimismo, la forma farmacéutica se considera uno de los factores predominantes que modifican la farmacocinética. En este sentido, el CBD se administra en diversas formas farmacéuticas, como en aceites, emulsiones o nanopartículas lipídicas, con el objetivo de mejorar la solubilidad y permeabilidad intestinal, con lo cual se favorece la absorción (Bialer *et al.*, 2020); en las diferentes formulaciones se utilizan vehículos lipofílicos como aceites de coco, oliva o ajonjolí, lo cual demuestra facilitar la absorción intestinal del CBD (Saals *et al.*, 2025).

Otro aspecto importante que modifica la farmacocinética es la dosis administrada, aunque en general existe una correlación dosis-dependiente, la absorción del CBD no siempre es lineal y su biodisponibilidad puede variar significativamente entre individuos debido a diferencias en el metabolismo hepático, la microbiota intestinal y la capacidad de transporte activo de las células epiteliales del intestino (Moazen Zaedeh *et al.*, 2024; Nagao *et al.*, 2020). Por ejemplo, en el caso específico de los caballos, la farmacocinética del CBD administrado por vía oral se caracteriza por una absorción limitada y una elevada variabilidad interindividual. Esta variabilidad está relacionada con las características fisiológicas y anatómicas de la especie.

Por lo anterior, es importante considerar las particularidades fisiológicas de cada especie, así como el diseño de formulaciones farmacéuticas, para mejorar la biodisponibilidad y la eficacia terapéutica del CBD.

## **2.6. Farmacocinética del CBD en caballos**

En los estudios reportados en equinos, el CBD se administra principalmente por vía oral. Como ya se mencionó, la absorción oral en caballos depende de la formulación y del manejo alimentario, con gran variabilidad tanto interindividual como entre presentaciones. Las formulaciones orales más estudiadas son cápsulas/polvos y granulados que suelen mejorar la biodisponibilidad frente a pastas o mezclas oleosas en muchos fármacos (Sánchez de Medina *et al.*, 2023; Williams *et al.*, 2022).

Los estudios en caballos presentan parámetros farmacocinéticos variables según la formulación, la dosis y el régimen de administración (única vs. repetida). Los hallazgos más robustos indican la absorción oral detectada, la conversión a metabolitos predominantes y, en regímenes múltiples, así como la posibilidad de acumulación en tejido adiposo (Ryan *et al.*, 2021; Yocom *et al.*, 2022).

Ryan *et al.* (2021) administraron CBD solubilizado en aceite de ajonjolí a caballos por vía oral en dosis únicas de 0.5 a 2 mg/kg. En esta investigación se reportó una  $t_{1/2}$  de eliminación de  $\approx 9.9 - 10.7$  h; el CBD se detectó durante 72 h, así como la detección de metabolitos carboxilados (7-carboxi-cannabidiol) e hidroxilados (7-hidroxi-cannabidiol) en suero y orina. Asimismo, Yocom *et al.* (2022), administraron CBD a caballos por vía oral y concluyeron que la dosis de 3 mg/kg de CBD es bien tolerada, además de que la administración prolongada de hasta 6 semanas no produce ninguna anomalía bioquímica permanente.

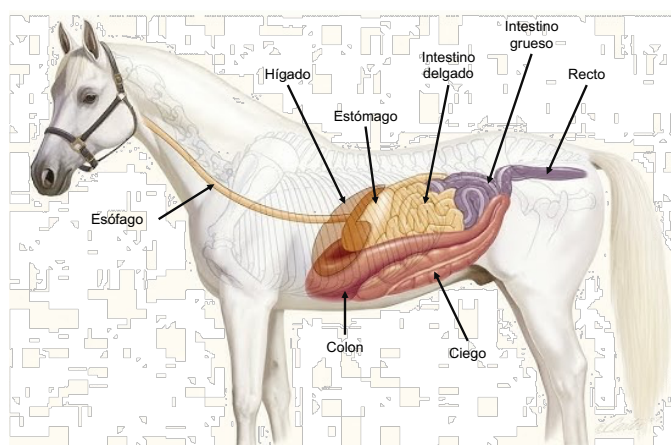
La vida media de eliminación ( $t_{1/2} \approx 10.4 \pm 6$  h) sugiere una permanencia sistémica suficiente para considerar esquemas de dosificación espaciados, aunque con cautela ante un posible riesgo de acumulación (Wang *et al.*, 2025).

Los estudios de la administración de CBD por vía oral indican una biodisponibilidad baja, lo que se atribuye principalmente al efecto de primer paso hepático y a las particularidades del tracto gastrointestinal equino.

### 2.6.1 Vía de administración oral de CBD en caballos

La vía de administración oral en caballos se ve afectada por varios factores como el estado nutricional del animal, las características anatómicas de la especie y la composición de los alimentos. Por ejemplo, la administración de CBD con alimentos ricos en grasas aumenta su absorción hasta cinco veces en comparación con la administración de CBD en ayunas (Birnbaum *et al.*, 2019; Moazen Zaedeh *et al.*, 2024).

Es importante mencionar que existen particularidades anatómicas y fisiológicas en los caballos que afectan la absorción de fármacos administrados por vía oral, entre las cuales se destaca que el caballo es un herbívoro, con intestino posterior (ciego y colon) fermentador, cuyas particularidades anatómicas y fisiológicas influyen de manera directa en la absorción, biodisponibilidad y eficacia de los fármacos administrados por vía oral (**Figura 4**).



**Figura 4.** Esquema del sistema digestivo del caballo

Particularidades anatómicas y fisiológicas del caballo:

- Reducido tamaño del estómago (aproximadamente el 8–10 % del volumen total del tracto digestivo).
- Mucosa gástrica escamosa y glandular, y un entorno gástrico ácido que puede degradar principios activos sensibles al pH.
- El tiempo de vaciamiento gástrico y la motilidad intestinal hacen que la digestión estomacal sea rápida y concluya con la fermentación de los alimentos en el intestino.
- Una longitud de intestino delgado ( $\approx 20 - 25$  m); la extensión del intestino delgado influye en el tiempo de tránsito y en la superficie disponible para la absorción, mientras que la elevada motilidad intestinal puede disminuir el contacto del fármaco con la mucosa intestinal.
- Intestino posterior altamente fermentativo, con microbiota de alta actividad metabólica, que puede modificar o degradar ciertos compuestos, alterando su fracción absorbible.

El tamaño relativo reducido del estómago, junto con su pH gástrico y el tiempo de vaciamiento gástrico, condiciona la disolución y la estabilidad de numerosos principios activos antes de que alcancen el intestino delgado (principal sitio de absorción). Estos factores, sumados al manejo alimenticio, es decir, el tipo de dieta (acceso libre a forraje frente a dietas altas en grano), hacen que la absorción oral en caballos sea compleja y difícil de predecir, lo cual justifica la exploración de vías alternativas de administración en esta especie (Abuhelwa *et. al.*, 2017; Qian *et. al.*, 2024).

### **2.6.2 Vía de administración intranasal de CBD en caballos como estrategia terapéutica**

Con base en los desafíos que presenta la administración oral del CBD, como su baja solubilidad y la degradación por el metabolismo de primer paso, surge la necesidad de explorar rutas alternativas más eficientes para mejorar su biodisponibilidad y su acción central. En este contexto, la vía intranasal presenta un

creciente interés por sus ventajas fisiológicas y farmacocinéticas: la mucosa nasal presenta una superficie extensa, un alto grado de vascularización y epitelio respiratorio, que se conforma por epitelio cilíndrico (columnar) pseudoestratificado ciliado con células caliciformes y epitelio olfatorio (Crowe & Hsu, 2022), lo que facilita la absorción rápida de sustancias hacia la circulación sistémica sin atravesar el hígado. También ofrece una vía directa de acceso al sistema nervioso central a través del trayecto “nariz-cerebro”, evitando la barrera hematoencefálica y potencialmente acelerando el efecto terapéutico de moléculas lipofílicas como el CBD (Wu *et al.*, 2025).

La administración de fármacos por vía intranasal aprovecha la característica fisiológica del epitelio nasal, formado por una mucosa mono pseudoestratificada, altamente vascularizada y por la amplia área de contacto a la que se tiene acceso (Crowe & Hsu, 2022; Godge *et al.*, 2023); estas características permiten una absorción rápida hacia la circulación sistémica sin atravesar el metabolismo hepático de primer paso. Además, el acceso directo a través de la región olfatoria facilita la vía “nariz a cerebro” (Wang *et al.*, 2019), lo que permite el transporte a través de los nervios olfatorios y trigéminos, con potencial para alcanzar el SNC rápidamente.

Entre las ventajas de esta vía de administración se destacan: inicio de acción rápido (efecto en 5 a 30 minutos), evitar el metabolismo hepático, administración sencilla sin aguja, buena tolerancia por parte del ejemplar y posibilidad de administración de fármacos sin limitaciones por el tamaño de partícula del principio activo (Godge *et al.*, 2023). Sin embargo, hay limitaciones como el volumen máximo tolerado (dependiente de la especie), la posible irritación de la mucosa y la limpieza mucociliar, que puede promover la eliminación del fármaco entre 15 y 20 minutos (Clementino *et al.*, 2025).

Algunos ejemplos de fármacos utilizados por esta vía de administración son:

- Fentanilo intranasal, con biodisponibilidad del 70–90 % y efectos analgésicos en menos de 5 minutos, usado en urgencias y en dolor agudo (Vidal *et al.*, 2014).
- Midazolam, empleado en urgencias para control de convulsiones, gracias a su rápida absorción y efecto sedante (Cornett *et al.*, 2022).
- Esketamina, aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) en 2019 como monoterapia en casos de depresión persistente, con efecto en pocas horas tras la administración (González-Pinto, 2020).
- Sumatriptán y dihidroergotamina, usados para la migraña, muestran eficacia rápida con los sprays nasales (Touchon *et al.*, 1996).

En resumen, la vía intranasal representa una opción no invasiva, ideal para fármacos que requieren una acción rápida y acceso al SNC; es importante considerar sus ventajas fisiológicas, las limitaciones de volumen y la formulación adecuada para maximizar la absorción. La vía intranasal ofrece un acceso rápido al SNC y el posible aumento de la biodisponibilidad de CBD frente a la administración oral, lo que constituye una ventaja interesante por investigar, razón por la cual se eligió esta vía de administración de CBD para la evaluación en equinos.

## **2.7. Desarrollo de formulaciones para administración vía intranasal con CBD**

Uno de los mayores retos en el desarrollo de productos farmacéuticos veterinarios a base de CBD es la selección de la vía de administración óptima (Pires *et al.*, 2009).

Para el diseño de formulaciones intranasales, es crucial considerar las propiedades fisicoquímicas del CBD, como su baja solubilidad en agua, lipofilicidad, susceptibilidad a la oxidación, foto y termosensibilidad (Kosović *et al.*, 2021). Por ello, se emplean excipientes para mejorar la solubilidad y la estabilidad del compuesto (Villafuerte Robles, 2011). Los vehículos nasales también deben presentar una viscosidad adecuada, un pH compatible con la mucosa nasal (pH de

la mucosa nasal en caballos: 5.0-6.5) y una baja toxicidad para evitar daños o irritación (England *et al.*, 1999).

En México, la NOM-012-SAG/ZOO-2020 exige criterios específicos de control de calidad para productos veterinarios nasales, entre ellos el pH, la viscosidad y la uniformidad de contenido. De manera complementaria, la Guía técnica del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) obliga a validar métodos analíticos conforme a estándares internacionales, como los de la FDA y la Organización Mundial de la Salud Animal (OIE), así como las farmacopeas y diversos códigos que garanticen la identidad, pureza y estabilidad de cualquier compuesto administrado a animales, como lo es el CBD (SADER, 2021).

En conjunto, el desarrollo de una formulación intranasal de CBD requiere un enfoque integral que abarque desde las propiedades fisicoquímicas del compuesto hasta los aspectos analíticos que garanticen su estabilidad, eficacia y seguridad en su aplicación veterinaria.

## **2.8. Cuantificación de CBD en diversas matrices**

Con la finalidad de verificar la identidad, pureza y concentración de los fármacos, así como evaluar su comportamiento farmacológico tanto del fármaco como de sus metabolitos, es importante cuantificar su concentración en muestras biológicas. El desarrollo de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos en matrices biológicas presenta algunas limitaciones, como la concentración de los fármacos, la interferencia de otros metabolitos con similitud estructural, así como la sensibilidad, exactitud y precisión de las metodologías, por lo anterior, es necesario contar con métodos analíticos de detección y cuantificación que permitan estimar los parámetros farmacocinéticos, como la concentración máxima ( $C_{max}$ ) y tiempo máximo ( $t_{max}$ ), vida media ( $t_{1/2}$ ), entre otras; los cuales son importantes para la posología y elección de vías de administración, entre otras.

Para cuantificar el CBD en formulaciones y muestras biológicas, se emplean técnicas cromatográficas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC),

la cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC) y la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). HPLC y UHPLC permiten la separación eficiente de cannabinoides, mientras que LC-MS/MS ofrece mayor sensibilidad, especificidad y es especialmente útil para el análisis de muestras biológicas (Hajrulai-Musliu *et al.*, 2024; Meng *et al.*, 2018; Pichini *et al.*, 2021).

La caracterización y cuantificación del CBD en diferentes matrices requieren metodologías analíticas robustas y sensibles, ya que las propiedades fisicoquímicas del CBD, como la baja solubilidad acuosa y la tendencia a la degradación, representan un reto para su detección confiable (Citti *et al.*, 2018). Diversos enfoques cromatográficos se emplean con este propósito, principalmente técnicas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acopladas a diferentes tipos de detectores, en las que factores como el tipo de columna, la composición de la fase móvil, el flujo y el volumen de inyección influyen directamente en la resolución, el tiempo de retención y la sensibilidad del método (Castaneto *et al.*, 2015; Micalizzi *et al.*, 2021). En la **tabla 3** se resumen algunos de los métodos reportados en la literatura para la determinación de CBD tanto en productos farmacéuticos como en muestras biológicas, destacando las condiciones cromatográficas clave que aseguran la precisión y la reproducibilidad de los análisis.

**Tabla 3.** Metodologías de detección de CBD a partir de diversas matrices

| Detector | Matriz                         | Analito de interés                         | t <sub>R</sub> CBD (min) | LOQ (µg/mL)      | LOD (µg/mL)      | Tiempo total (min) | Fase móvil                                                                                                                                                                       | Columna                                             | Longitud de onda (nm) | Flujo (mL/min) | T (°C) | Vol Iny (µL) | Referencia                            |
|----------|--------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------|------------------|------------------|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------|----------------|--------|--------------|---------------------------------------|
| UV/Vis   | Producto                       | CBD-THC                                    | 7.1                      | 1                | NR               | 20                 | CH <sub>3</sub> CN:H <sub>2</sub> O (75:25)                                                                                                                                      | SOLAS 100 Å C18 150×4.6 mm, 5 µm)                   | 214                   | 1,5            | 25     | 20           | Analakkattillam <i>et. al.</i> , 2022 |
| UV/Vis   | Producto                       | Cannabinoides (8 compuestos)               | 6.3                      | 1                | 1                | 20                 | CH <sub>3</sub> CN:H <sub>2</sub> O (50:50)                                                                                                                                      | Phenomenex Kinetex XB-C18 (150 × 4.6 mm, 2.6 µm)    | 220                   | 1.8 a 0.8      | 50     | 15           | Zivovinov <i>et. al.</i> , 2018       |
| UV/Vis   | Producto                       | CBD-THC                                    | 6.6                      | ---              | ---              | 20                 | CH <sub>3</sub> CN : SA de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 5mM (75:25)                                                                                                           | Agilent Poroshell®120 SB-C18 (150×2. mm, 2.7 µm)    | 222                   | 0.38           | 53     | 10           | Deidda <i>et. al.</i> , 2019          |
| MS/MS    | Sangre                         | Cannabinoides y glucurónidos cannabinoides | 5.9                      | 0.001            | 0.00025          | 16                 | A: SA de NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> (10mM a pH 6.15 con CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )<br>B: CH <sub>3</sub> CN con 15% de CH <sub>3</sub> OH (Gradiente) | Ultra bifenilo (100 × 2.1 mm, 5 µm)                 | --                    | 0.4            | 40     | 25           | Schwoppe <i>et. al.</i> , 2011        |
| MS/MS    | Producto incautado             | Cannabinoides (24 compuestos)              | 4.39                     | ---              | 0.00003-0.00061  | 8                  | A: H <sub>2</sub> O y CH <sub>3</sub> OH B: H <sub>2</sub> O, CH <sub>3</sub> CN con 0.1% de CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Gradiente)                                          | Accucore aQ C18 (100 × 2.1 mm, 2.6 µm)              | --                    | 0.35           | 40     | 3 a 5        | Lebel <i>et. al.</i> , 2026           |
| MS/MS    | Suero y orina equino           | CBD y 2 metabolitos                        | 3.03                     | 0.0001 ng/ml     | 0.5              | NR                 | CH <sub>3</sub> CN: NH <sub>4</sub> OH al 0.2 % (Gradiente)                                                                                                                      | ACE 3 C18 (100 × 2.1 mm 3 µm)                       | --                    | 0,35           | 25     | 30           | Ryan <i>et. al.</i> , 2021            |
| MS/MS    | Producto cárnico y concentrado | THC, CBD, CBN y THCA                       | 3.81                     | 0.0159 a 0.02226 | 0.0053 a 0.00742 | 8                  | SA de NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> 2 mM : CH <sub>3</sub> CN Ambos con 0.2 % v/v de CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (10:90).                                   | Agilent Poroshell 120 EC-C18 (100 × 2.1 mm, 2.7 µm) | --                    | 0,5            | 500    | 10           | Sin <i>et. al.</i> , 2024             |

|        |                               |                                                                        |       |        |      |       |                                                                                                                                             |                                                                         |     |      |    |     |                               |
|--------|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------|-------|--------|------|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-----|------|----|-----|-------------------------------|
| DAD    | Medicamentos incautados       | THC, THCA, CBN y CBD                                                   | 6.584 | 5      | 1    | 18    | SA de TEAP 25 mM :CH <sub>3</sub> CN (36:64)                                                                                                | Merck LiChroCart 125-4 LiChrospher 60 RP-Select B (125 mm x 4 mm, 5 µm) | 210 | 1.0  | -- | 10  | Ambach <i>et. al.</i> , 2014  |
| DAD    | Planta o derivados incautados | THCA, THC, CBD A, CBD y CBN                                            | 6.7   | 0.3    | 1    | 13    | H <sub>2</sub> O : CH <sub>3</sub> CN Ambos con 0.1% de CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Gradiente)                                          | Kinetex 2.6 µm C8 (100 x 2.1 mm)                                        | 210 | 0.6  | 25 | 5   | Hädener <i>et. al.</i> , 2019 |
| DAD    | Planta o derivados cultivo    | THC, CBD, CBN, Δ <sup>8</sup> -THC, THCA, CBG, CBGA y CBDA             | 5548  | 0.0625 | 0.25 | 20    | SA de NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> 25 mM: (ajustado a pH 4.75 con CH <sub>3</sub> COOH) : CH <sub>3</sub> OH (Gradiente) | Agilent Poroshell 120 SB-C18 (3.0 x 75 mm, 2.7 µm)                      | 235 | 0.70 | 30 | 10  | Patel <i>et. al.</i> , 2017   |
| PDA    | Producto                      | CBD-THC                                                                | 5.2   | 32     | 106  | 8     | CH <sub>3</sub> CN: H <sub>2</sub> O ambos con CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0.1%) (Gradiente)                                            | PerkinElmer Brownlee™ SPP C18, (3.0 x 100 mm, 2.7 µm.)                  | 210 | 1.0  | 50 | 25  | Layton <i>et. al.</i> , 2015  |
| MS/MS  | Suero y orina                 | Metabolitos 7-OH-CBD, 6-α-OH-CBD, 6-β -OH-CBD, 7-COOH-CBD              | NR    | NR     | NR   | 8     | SA NH <sub>4</sub> HCO <sub>2</sub> 5 Mm (pH 7.5) : CH <sub>3</sub> CN (Gradiente)                                                          | ACQUITY UPLC® BEH C18 de Waters® (100 x 2.1 mm, 1.7 µm)                 | --  | 1.0  | 50 | 10  | Pichini <i>et. al.</i> , 2021 |
| MS/MS  | Producto                      | Δ <sup>8</sup> -THC, Δ <sup>9</sup> -THC, CBD y otros 10 cannabinoides | 3.49  | 0.0005 | ---  | 9     | H <sub>2</sub> O con CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :CH <sub>3</sub> CN (95:5)                                                              | CORTECS C18 (2.1 x 50 mm, 1.6 µm)                                       | --  | 0,5  | 26 | 6,0 | Lin <i>et. al.</i> , 2022     |
| UV/Vis | Plasma de rata                | CBD y THC                                                              | 8.2   | 0.01   | ---  | 20-30 | CH <sub>3</sub> CN: H <sub>2</sub> O (62:38)                                                                                                | ACE C18-PFP de (150 x 4.6 mm, 3 µm)                                     | 220 | 1.0  | 55 | 30  | Zgair <i>et. al.</i> , 2015   |

SA: Solución amortiguadora; CBD: Cannabidiol; THC: Δ<sup>9</sup>-tetrahidrocannabinol; CBN: Cannabinol; CBG: Cannabigenol; THCA, CBDA, CBGA: Forma acida del cannabinoide; CH<sub>3</sub>CN: Acetonitrilo; mM: milimolar; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: Fosfato de Potasio Dibásico; NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>: Acetato de amonio; CH<sub>3</sub>OH: Metanol; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Agua; CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Ácido fórmico; NH<sub>4</sub>OH: Hidróxido de amonio; TEAP: Fosfato de trietilamonio; CH<sub>3</sub>COOH: Ácido acético; NH<sub>4</sub>HCO<sub>2</sub>: Formiato de amonio; NR: No reportado.

### 2.8.1 Cuantificación de CBD en muestras biológicas

En las muestras biológicas, la sensibilidad del método es un factor relevante debido a la baja concentración de CBD. Además, es necesario minimizar las interferencias de compuestos endógenos o de excipientes. Aunado a esto, el CBD es susceptible de degradación, por lo que tanto las formulaciones como las muestras biológicas deben conservarse en condiciones controladas: en oscuridad, refrigeración (2-8 °C) o congelación (-20 a -80 °C), y protegidas de la humedad (Dybowski *et al.*, 2023).

Otro paso crítico en el análisis es la preparación de las muestras. En el caso de formulaciones farmacéuticas, se reporta el uso de disoluciones en disolventes orgánicos, seguidas de filtración. Para muestras de plasma, los métodos de extracción más utilizados incluyen la extracción líquido-líquido (ELL), la extracción en fase sólida (SPE) y la precipitación proteica. Cada técnica presenta ventajas y limitaciones en cuanto a la recuperación, la limpieza de la muestra y la compatibilidad con el sistema analítico (Dybowski *et al.*, 2023).

Para la extracción de CBD a partir de muestras biológicas, se emplean diversos métodos de extracción; en la **tabla 4** se presenta un resumen de las metodologías de extracción y algunas ventajas frente a las otras técnicas.

- **Extracción líquido-líquido (ELL):** Estudios comparativos en plasma muestran que ELL ofrece recuperaciones inferiores ( $\approx 65\%$ ) frente a SPE, con mayor variabilidad y mayor contenido de interferentes en los sobrenadantes que pueden afectar los análisis tanto por cromatografía de gases (GC) como por cromatografía de líquidos acoplada a detectores de masas (LC-MS).
- **Extracción en fase sólida (SPE):** La SPE es un método purificación basado en la afinidad selectiva, la muestra pasa a través de un cartucho que retiene el analito de interés permitiendo su posterior elución con un disolvente adecuado, es un método rápido y selectivo, además dentro de sus ventajas se encuentra la disponibilidad de varios tipos de fase estacionaria como

octadecil (C18) octil (C8) -silano, una recuperación > 95 %, muy reproducible en muestras biológicas. Hay reportes para el análisis de CBD utilizando SPE acoplado a LC-MS/MS, en columna monolítica C18 bajo gradiente usando 50 µL de muestra, con límites de cuantificación de 10 ng/mL y linealidad de 10–150 ng/mL.

- **QuEChERS:** Es un método de extracción en fase sólida dispersiva, llamado así por sus siglas en inglés, Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (rápido, fácil, barato, efectivo, resistente y seguro). Esta técnica mostró recuperaciones de ~ 87 % de CBD extraído del plasma, pero con una mayor probabilidad de interferentes que pueden afectar la cuantificación.
- **Microextracción en fase sólida (SPME) y variantes magnéticas:** La SPME es una técnica de preparación de muestras rápida, sin disolventes y portátil que utiliza una fibra recubierta (polímero o disolvente) para extraer o concentrar analitos de matrices líquidas o gaseosas, muy sensible e ideal para compuestos volátiles. Franco *et al.* (2022) desarrollaron y validaron una metodología para la extracción de CBD a partir de plasma y saliva mediante nanotubos de carbono de acceso restringido magnéticos y su cuantificación mediante UHPLC-MS-MS. Esta técnica tiene ventajas: mínimo uso de disolvente, posibilidad de automatización y buena selectividad, con una recuperación similar a la de la SPE (> 95 %) (Franco *et al.*, 2022).

**Tabla 4.** Metodologías de extracción de CBD en muestras biológicas

| Método de extracción             | Recuperación de CBD         | Límite de cuantificación (LOQ, ng/mL) | Ventajas                                          | Referencias                   |
|----------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------------|-------------------------------|
| Extracción líquido-líquido (ELL) | ~ 65 % en plasma            | —                                     | Bajo costo de materiales, pero menor recuperación | Ocque <i>et al.</i> , 2019    |
| Extracción en fase sólida (SPE)  | > 95 % en plasma            | —                                     | Alta recuperación y repetibilidad                 | Franco <i>et al.</i> , 2022   |
| On-line SPE + LC-MS/MS           | 81 – 129 % para CBD         | 2.5                                   | Muy baja muestra (50 µL), alta sensibilidad       | Franco <i>et al.</i> , 2022   |
| Micro-SPE (SPME)                 | Precisa y sin efecto matriz | 10                                    | Bajo consumo de disolvente                        | Cruz <i>et al.</i> , 2022     |
| QuEChERS                         | ~ 87 % en plasma            | —                                     | Rápido y sencillo, pero posibles interferencias   | Dybowski <i>et al.</i> , 2023 |

El análisis de CBD en sangre, plasma y suero requiere métodos de extracción que afronten la alta unión de CBD a proteínas y a matrices complejas; los estudios disponibles muestran que la extracción en fase sólida (SPE) ofrece una mejor recuperación y sensibilidad. El CBD puede cuantificar en diversas matrices biológicas, por ejemplo:

- **Sangre completa, plasma y saliva:** Extracción por SPE con posterior análisis en LC-MS/MS permite análisis en microvolúmenes (50 µL) y fue validada para CBD con rango de calibración 10–1,000 ng/mL, LOQ 2.5 ng/mL y recuperaciones de extracción reportadas entre 81–129% para CBD (Franco *et al.*, 2022).
- **Plasma:** Microextracción en fase sólida (SPME) con nanotubos de carbono restrictivos magnéticos, se desarrollaron y validaron para cuantificar CBD en plasma; se reportándose una linealidad adecuada, un LOQ de 10 ng/mL, una precisión (CV) <15% y la ausencia de efectos de matriz (Cruz *et al.*, 2022).

Debido a la alta unión del CBD a proteínas plasmáticas ( $\approx 90 - 94 \%$ ), es habitual incluir pasos de purificación, como el SPE, que reduzcan las interferencias de la matriz biológica.

## 2.10. Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de CBD

El desarrollo de un método analítico validado para cuantificar CBD es fundamental para garantizar resultados confiables en formulaciones y estudios farmacocinéticos. Según las guías del Consejo Internacional para la Armonización (ICH) y la FDA (ICH, 2021; FDA, 2018), deben evaluarse la selectividad/especificidad, la linealidad y el rango, la precisión, la exactitud, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), robustez y estabilidad de la muestra (Mohamed *et al.*, 2021; ICH, 2021).

- **Selectividad y especificidad:** Se refieren a la capacidad del método para diferenciar el CBD de otros compuestos o de interferencias. Se demuestra mediante pruebas con muestras en blanco y con analitos estructuralmente similares (productos de degradación).
- **Linealidad y rango:** Evalúa la respuesta proporcional del detector entre concentraciones bajas y altas y asegura que los resultados sean válidos en el rango terapéutico esperado.
- **Precisión y exactitud:** La repetibilidad y reproducibilidad se evalúan mediante réplicas, cuantificando el error de medición y el sesgo frente a estándares de concentración conocidos.
- **Límite de detección (LOD) y Límite de cuantificación (LOQ):** Se determinan usando la relación señal-ruido ( $\text{LOD} \geq 3:1$  y  $\text{LOQ} \geq 10:1$ ) o mediante desviaciones estándar del blanco.
- **Robustez:** implica que la cuantificación del compuesto de interés no se ve afectada por pequeñas variaciones en el flujo, la temperatura o el pH.
- **Estabilidad:** Se evalúa la respuesta del compuesto de interés ante variaciones en la temperatura, la luz y el tiempo.

- **Efecto matriz y recuperación:** Para matrices complejas, como las muestras biológicas, se evalúa la exactitud, donde se debe considerar no exigir el 100 % de recuperación (EMA, 2023).

La validación de métodos analíticos es un medio esencial para asegurar la confiabilidad, exactitud y reproducibilidad de los resultados en estudios farmacocinéticos y en procesos de control de calidad. Numerosas agencias reguladoras internacionales, como la ICH (Q2), la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) (VICH GL1 y GL2), la FDA, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), entre otras, establecen requisitos específicos para la validación de métodos, subrayando su carácter obligatorio en investigaciones formales (Viswanathan *et al.*, 2007). Esta normativa internacional otorga legitimidad científica y respaldo regulatorio a los resultados, garantizando que los métodos utilizados estén debidamente evaluados y sean aceptables para aplicaciones clínicas y de calidad. En consecuencia, la validación metodológica no solo respalda la precisión de los datos experimentales, sino también su credibilidad y su transferibilidad en contextos veterinarios y farmacéuticos (More *et al.*, 2025).

Un método validado aporta fiabilidad científica, comparabilidad entre laboratorios y cumplimiento normativo; atributos esenciales para estudios farmacocinéticos y monitoreo terapéutico. La precisión en mediciones favorece:

- Determinación de la biodisponibilidad, aclarando la absorción y la distribución del CBD.
- Ajuste individualizado de la dosis mediante el seguimiento de los niveles plasmáticos.
- Evaluación de interacciones farmacológicas y de variaciones patológicas del metabolismo.

La validación de un método analítico confiable es un pilar esencial para la investigación farmacocinética, ya que permite caracterizar con precisión el comportamiento de un fármaco en el organismo, desde su absorción hasta su

eliminación, y cuantificarlo en distintos momentos posteriores a su administración. En el caso del CBD, esto es especialmente relevante debido a su variabilidad interindividual, su amplio metabolismo hepático extenso y su biodisponibilidad dependiente de la vía de administración (Millar *et al.*, 2018).

Un método validado proporciona datos cuantitativos consistentes que permiten calcular parámetros clave como la concentración máxima, el tiempo para alcanzarla, el área bajo la curva (AUC), la vida media de eliminación y la biodisponibilidad relativa o absoluta (Meyer *et al.*, 2022). Sin un método analítico robusto, estos cálculos pueden subestimar o sobrestimar la exposición al fármaco, lo que puede comprometer tanto la interpretación científica como la aplicación clínica.

En el marco del monitoreo terapéutico, es fundamental disponer de métodos analíticos altamente sensibles y específicos que permitan correlacionar las concentraciones plasmáticas de cannabidiol (CBD) con sus efectos farmacológicos, especialmente en especies animales cuyos perfiles farmacodinámicos aún están en investigación. Esta correlación es esencial para ajustar dosis individuales y equilibrar la relación entre la infraexposición (que podría resultar en falta de efecto terapéutico) y la toxicidad (efectos adversos), un aspecto crítico en animales de alto valor como los equinos de competencia (Lainesse, 2009; Riviere & Papich, 2017). En la práctica veterinaria, este enfoque se fundamenta en principios de farmacocinética y farmacodinámica, que permiten la optimización de regímenes terapéuticos basados en la respuesta individual del paciente y los parámetros del fármaco (Toutain *et al.*, 2010).

Además de esto, en medicina veterinaria la cuantificación precisa de CBD también tiene implicaciones regulatorias y legales, sobre todo en contextos deportivos, donde se requiere demostrar que no existe presencia de cannabinoides en los ejemplares, ya que todos estos se encuentran en la lista de sustancias prohibidas emitida por el organismo rector internacional de los deportes ecuestres (FEI,

Federación Ecuestre International). Asimismo, permite establecer intervalos de retiro en animales productores de alimentos o bien documentar la ausencia de residuos activos (Health Canada, 2022).

La farmacocinética también es clave para el diseño de formulaciones, ya que permite comparar las vías de administración (oral, intranasal, transdérmica), optimizar los excipientes y desarrollar esquemas de liberación sostenida o dirigida. Sin un método validado, cualquier comparación entre formulaciones carece de valor científico y clínico (Chaudhari & Bhat, 2025; Chung *et al.*, 2025).

### 3. Planteamiento del problema

La ansiedad en los animales es un estado fisiopatológico que altera la homeostasis, la inmunidad, la conducta y el rendimiento productivo y deportivo; este desequilibrio se traduce en pérdidas clínicas y económicas medibles. Los caballos son animales presa, altamente reactivos al ambiente y particularmente sensibles a cambios en la rutina, el aislamiento, el transporte y al manejo. Ante estados de ansiedad crónica, pueden manifestar comportamientos estereotipados, los cuales constituyen indicadores conductuales clave para la detección de estos trastornos. Para el control terapéutico de la ansiedad existen diversas estrategias; sin embargo, en los últimos años ha crecido el interés por terapias basadas en productos naturales, especialmente aquellos derivados de *Cannabis*, en particular el CBD (Barnes, 2021; Camargo, 2010; Muñoz-Alonzo et al., 2015).

El CBD en caballos usualmente se administra por vía oral; sin embargo, esta vía presenta algunos inconvenientes importantes como la rápida metabolización por efecto de primer paso, las variaciones en la absorción dadas por el alimento o la baja biodisponibilidad, por mencionar algunos (Sánchez de Medina *et al.*, 2023). Por este motivo, la vía intranasal podría ser una opción viable, ya que presenta ventajas farmacocinéticas que contrarrestan las desventajas de la vía convencional; además, apunta a ser una buena elección para el acceso de moléculas al sistema nervioso central, lugar donde existe gran presencia de receptores que pueden interactuar con CBD (Paudel *et al.*, 2010). A pesar de ello, en la literatura no existe evidencia suficiente sobre la viabilidad de la vía intranasal para la administración de CBD en equinos, asimismo, no hay reportes de métodos analíticos para la cuantificación de CBD en muestras de plasma por HPLC acoplado a un detector DAD, lo cual limita la evaluación de las concentraciones de CBD en muestras plasmáticas de equinos. Por lo anterior, surge la necesidad de desarrollar un estudio que permita evaluar experimentalmente la farmacocinética del CBD administrado por vía intranasal en

caballos, así como de desarrollar y validar un método analítico sensible y específico para cuantificar su concentración tanto en suspensión como en plasma equino.

#### 4. Justificación del estudio

El CBD presenta una variedad de efectos terapéuticos; es ampliamente comercializado y estudiado en medicina humana; a pesar de esto, sus efectos terapéuticos no han sido estudiados de forma similar en medicina veterinaria, especialmente en grandes especies como los equinos. Un aspecto crítico en la aplicación terapéutica del CBD es la vía de administración; en equinos, las formas más empleadas son la oral y la tópica, aunque ambas presentan limitaciones importantes como baja biodisponibilidad, alta variabilidad en la absorción y metabolismo hepático de primer paso, pero estas limitaciones también abren la posibilidad a la optimización.

Una forma de contrarrestar las limitaciones mencionadas es cambiar la vía de administración; en este caso, la administración intranasal se plantea como una estrategia eficaz, ya que podría permitir una absorción rápida y directa en la circulación sistémica, evitando el metabolismo hepático y aumentando la eficiencia terapéutica (Lacerda *et al.*, 2025; Paudel *et al.*, 2010). Sin embargo, para asegurar la exactitud de la concentración administrada y verificar las concentraciones alcanzadas a nivel sistémico, es importante contar con métodos analíticos validados para cuantificar el CBD en las diversas formulaciones, así como en muestras biológicas como plasma equino, que permitan una cuantificación precisa para respaldar científicamente la dosificación, la eficacia y la seguridad del CBD (Andonova *et al.*, 2021).

Herramientas como HPLC, CG y espectrometría demuestran ser confiables en estudios analíticos de cannabinoides (Radwan *et al.*, 2017). Contar con un método validado no solo garantiza la calidad del producto administrado, sino que también permite establecer correlaciones entre dosis, concentraciones plasmáticas y respuesta clínica, lo cual resulta indispensable para determinar eficacia, ajustar esquemas terapéuticos y garantizar la seguridad del tratamiento (Martínez Naya *et al.*, 2024).

Por otro lado, evaluar el efecto ansiolítico en equinos representa un desafío, ya que la ansiedad suele asociarse a situaciones de estrés agudo. En este sentido, la Escala de la Mueca Equina (Dalla Costa *et al.*, 2014), basada en las Unidades de Acción Facial, constituye una herramienta no invasiva y confiable para detectar cambios conductuales y fisiológicos en el rostro de los caballos (Clark *et al.*, 2020). Su carácter no invasivo es especialmente valioso, ya que minimiza la interferencia asociada al manejo y permite obtener resultados más precisos.

En conjunto, la evidencia disponible muestra vacíos significativos en torno al uso del CBD en equinos, en particular en cuanto a la vía de administración y a la evaluación objetiva de su efecto ansiolítico. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del cannabidiol (CBD) administrado por vía intranasal en caballos mediante la obtención y el análisis de datos cualitativos relacionados con el comportamiento del ejemplar (escala de la mueca asociada a la ansiedad), con el fin de contar con un estudio piloto orientado a generar evidencia que sustente investigaciones posteriores de mayor alcance, así como desarrollar y validar un método analítico por HPLC para la cuantificación de CBD en plasma equino.

## **5. Hipótesis**

La administración intranasal de cannabidiol (CBD) en caballos producirá una disminución observable en los indicadores conductuales asociados con ansiedad, evaluados mediante la escala de la mueca equina, en comparación con los valores basales, y se podrá evaluar la farmacocinética cuantificando la concentración plasmática de CBD mediante un método analítico validado, mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) acoplada a un detector de arreglo de diodos (DAD).

## **6. Objetivos**

### **6.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto farmacológico del CBD administrado por vía intranasal en caballos, cuantificando la concentración plasmática del CBD (HPLC-DAD) y analizando los datos cualitativos relacionados con el comportamiento del ejemplar (escala de la mueca asociada a la ansiedad), con el fin de contar con un estudio piloto orientado a generar evidencia que sustente investigaciones posteriores de mayor alcance.

### **6.2 Objetivos específicos**

- Desarrollar y validar un método analítico de HPLC-DAD para detectar y cuantificar CBD en muestras de plasma de caballos.
- Diseñar un método de administración de CBD por vía intranasal en caballos.
- Evaluar el efecto ansiolítico del CBD por vía intranasal en caballos.

## **7. Material y métodos**

### **7.1 Animales**

En este estudio preliminar se utilizaron cuatro caballos adultos, enteros, clínicamente sanos: dos hembras y dos machos de raza Cuarto de Milla, con un rango de peso corporal entre 450 y 500 kg y de edad entre 3 y 14 años. Los ejemplares fueron alojados en estabulación individual en las instalaciones del rancho “Los Chilpas”, ubicado en San Miguel Ajusco, Tlalpan, Ciudad de México (19.2343810, -99.2285060, latitud/longitud).

El experimento se realizó en la temporada de otoño. La temperatura ambiental osciló entre 7.3° y 19.7 °C, con una humedad relativa de 57%, sin control de luz-oscuridad, con aproximadamente 11 h de luz al día (Weather, 2025); el manejo de los ejemplares para la administración y toma de muestras se realizó a partir de las 9:00 am. El régimen de alimentación consistió en 2 kg de avena en paca, 3 kg de grano de avena más 200 g de salvado y 1.5 kg de alimento concentrado (Omolene Purina®) dos veces al día. Asimismo, la actividad física se controló y estandarizó para todos los ejemplares, con el objetivo de mantener condiciones de manejo homogéneas durante el periodo experimental. El cuidado y manejo de los caballos se llevó a cabo de conformidad con la NOM-062-ZOO-1999 (Diario Oficial de la Federación, 2001), que establece las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio en México, así como en apego a los lineamientos internacionales de bienestar animal recomendados por la EMA (EMA, 2016) y la Guía de cuidados y uso de animales de laboratorio (NRC, 2011).

El uso de animales fue aprobado por el Consejo de Bioética y la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM, Unidad Xochimilco, como parte del proyecto “Uso de suplementos nutricionales a base de nutraceuticos de origen herbal, en animales con fermentación posgástrica (équidos y lagomorfos), que repercutan como factores de crecimiento e incrementen las características organolépticas en carne de conejo, además de la salud de los equinos” con número de Oficio: **X.DCBS.CD.289.24**

Las dosis de 0.6 mg/kg/d y 1.2 mg/kg/d fueron seleccionadas con base en estudios farmacocinéticos previos en caballos (Ryan et al., 2021; Yocom et al., 2022), en los que se describen rangos de dosificación seguros y concentraciones plasmáticas cuantificables tras la administración oral de CBD. Considerando que la vía intranasal incrementa la biodisponibilidad de diversos fármacos entre un 34 % y un 46 % en comparación con la vía oral, se planteó que un efecto farmacológico de magnitud similar podría alcanzarse mediante una reducción aproximada del 40 % al 60 % de la dosis reportada para la administración oral (Paudel *et al.*, 2010).

La solución de CBD se administró por vía intranasal; para asegurar una dosificación precisa y una correcta dispersión de la SO, se utilizó una jeringa de 5 mL sin aguja. De la SO se administraron 2.5 mL en cada narina (5 mL en total). Para minimizar el riesgo de pérdida por deglución o estornudo, el personal encargado de manipular al ejemplar realizó una extensión cervical, manteniendo el cráneo ligeramente inclinado hacia arriba durante cinco minutos, como se muestra en la **figura 5**.



**Figura 5.** Contención del movimiento de caballo tras la administración de la solución de CBD.

Para realizar la evaluación con la escala de la mueca de forma asincrónica, se tomó evidencia videográfica antes y después de la administración de la SO. Además, se tomaron muestras sanguíneas de la vena yugular en los siguientes tiempos: basal (0 min), 5, 15, 30, 60 min posteriores a la administración. Las muestras fueron

recolectadas en tubos con EDTA, centrifugadas a 3300 rpm durante 15 minutos, y el plasma resultante se almacenó en microtubos a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. De cada tiempo de muestreo se obtuvieron 20 mL de sangre y entre 5 y 6 mL de plasma, que se congelaron a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis.

## **7.2 Materiales**

El CBD se obtuvo mediante donación de dos presentaciones de CBD: una en forma de sólido blanco cristalino y otra en forma de resina. Previo al estudio, se realizó un análisis por cromatografía de gases acoplada a un detector de masas para corroborar su identidad y pureza: el sólido blanco cristalino, con una pureza de 99.38%, y, por otro lado, el CBD en forma de resina, con una pureza de 91.91%, se analizaron por HPLC-DAD. El acetonitrilo y agua fueron grado HPLC (Tecsiquim®; Toluca, México); el sulfato de sodio y metiliterbutiléter (J.T. Baker®, Nueva Jersey, Estados Unidos) fueron grado reactivo. Para la purificación de las muestras biológicas se utilizaron cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) CHROMABOND® C8 (Macherey-Nagel, Alemania), a base de partículas porosas de sílice ligada a octilo (C8), con tamaño de partícula de  $45\text{ }\mu\text{m}$  y capacidad de la columna SPE de 1 mL por cada 100 mg de adsorbente. Acrodiscos de jeringa de nylon (Jin Teng®, Tianjin, China) con diámetro de 25 mm y tamaño de partícula de  $45\text{ }\mu\text{m}$ . El aceite de ajonjolí fue adquirido en la Farmacia París® (Ciudad de México, México) con pureza del 100%.

## **7.3 Desarrollo y Validación del método analítico para detectar y cuantificar CBD**

### **7.3.1 Preparación de disoluciones y muestras**

Fase móvil (FM): Se mezclan acetonitrilo y agua en una relación de 75:25 % v/v.

Solución oleosa de CBD (SO): Se pesaron 1.2 g de CBD y se adicionaron 10 mL de aceite de ajonjolí; la mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta su disolución (120 mg/mL) y se protegió de la luz.

Solución A estándar de CBD para la cuantificación en SO: Se pesaron 12 mg de CBD (99.38 % de pureza) en un matraz volumétrico de 10 mL, se disolvió con la mínima cantidad de acetonitrilo ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) y se llevó a aforo con el mismo disolvente (1.2 mg/mL). A partir de esta disolución, se tomó 1 mL con una pipeta volumétrica y se transfirió a un matraz volumétrico de 10 mL. Se aforó con fase móvil (0.12 mg/mL). La disolución resultante se filtró utilizando acrodiscos de nylon con tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ .

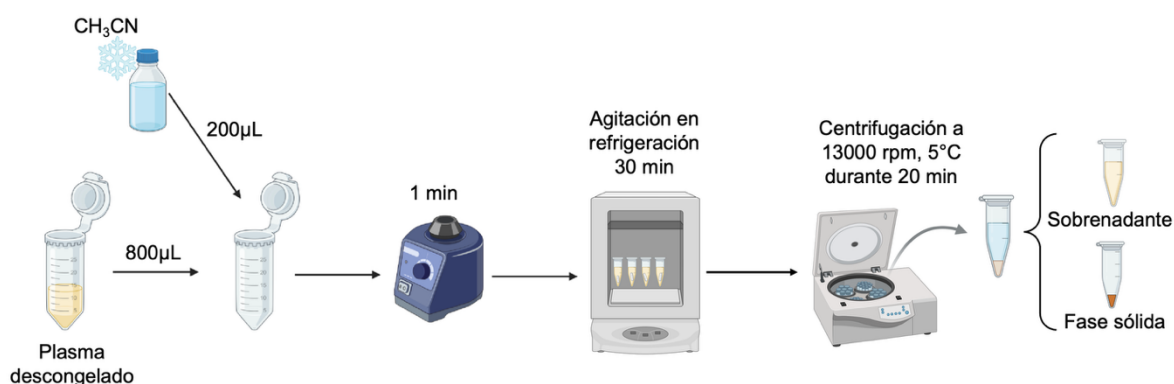
Solución stock B: Se pesaron 10 mg de CBD, se transfirieron a un matraz aforado de 10 mL, se disolvieron con la mínima cantidad de  $\text{CH}_3\text{CN}$  y se llevaron a aforo con el mismo disolvente (1.0 mg/mL). De la disolución anterior se tomó 1 mL y se transfirió a un matraz volumétrico de 10 mL hasta alcanzar una concentración de 0.01 mg/mL.

Solución B estándar de CBD para la cuantificación en plasma: Se pesaron 10 mg de CBD, se transfirieron a un matraz aforado de 10 mL, se disolvieron con la mínima cantidad de  $\text{CH}_3\text{CN}$  y se llevaron a aforo con el mismo disolvente (1.0 mg/mL). Mediante diluciones sucesivas de 1 mL, transferidas a matraces volumétricos de 10 mL, hasta alcanzar una concentración de 0.001 mg/mL, la disolución resultante se filtró utilizando acrodiscos de nylon con un tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ .

Preparación de las muestras para cuantificación de CBD en la SO: Se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de la SO y se transfirieron a un matraz volumétrico de 10 mL, se diluyó con 5 mL de  $\text{CH}_3\text{CN}$ , la solución fue llevada a sonicación durante 2 minutos, y se aforó con  $\text{CH}_3\text{CN}$ , se dejó reposar durante 30 min y posteriormente se separó la fase orgánica de la fase oleosa. La separación de fases se realizó mediante un embudo de separación. Se tomó 1 mL de la fase orgánica, se transfirió a un matraz volumétrico de 10 mL y se llevó a volumen con la fase móvil. La disolución resultante se filtró utilizando acrodiscos de nylon con tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ .

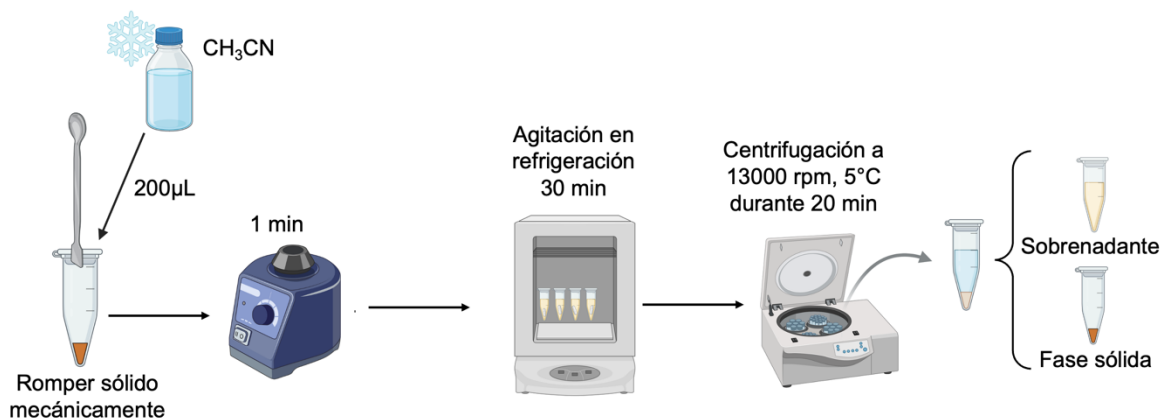
Preparación de las muestras para cuantificación de CBD en plasma: Las muestras de plasma se descongelaron a 25 °C, se tomó 800  $\mu\text{L}$  de plasma y se transfirió a tubos eppendorf de 2 mL, se le añadió 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{CH}_3\text{CN}$  y se agitó en vortex

durante 1 min, posteriormente se llevó a agitación durante 30 min a 5°C, al término las muestras se llevaron a centrifugación durante 20 min a 5°C y 13000 rpm. El sobrenadante A y la fase sólida se separan (**Figura 6**).



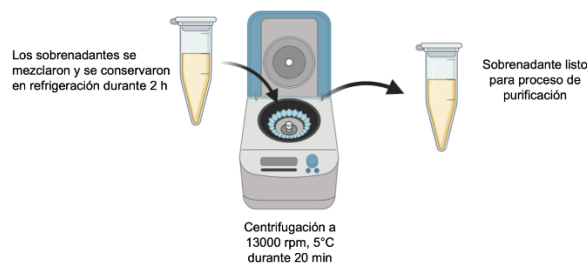
**Figura 6.** Diagrama para la extracción líquido-líquido de CBD de plasma equino

A la fase sólida se le adicionaron 200 µL de CH<sub>3</sub>CN y se agitó con vórtex durante 1 min; posteriormente, se agitó mecánicamente durante 30 min a 5 °C y se centrifugó durante 20 min a 5 °C a 13000 rpm, obteniéndose el sobrenadante B (**Figura 7**).



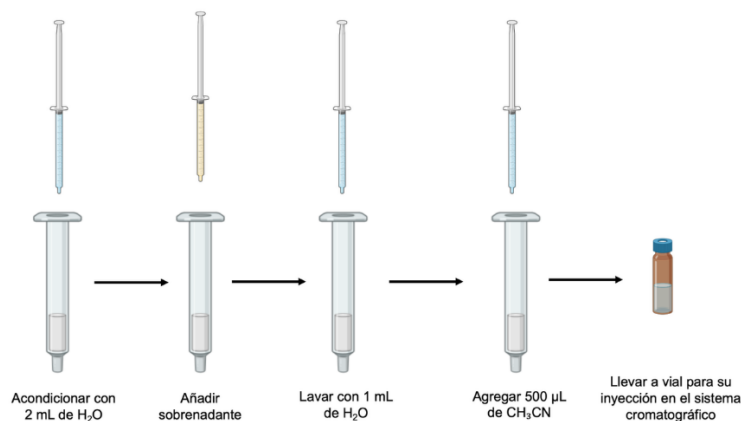
**Figura 7.** Diagrama para la extracción sólido-líquido de CBD del residuo de plasma

Los sobrenadantes recuperados (A y B) se mezclaron y se conservaron en refrigeración durante 2 horas. Posteriormente, se centrifugaron durante 20 min a 5 °C y 13000 rpm. El sobrenadante recuperado fue purificado mediante extracción en fase sólida (SPE; **Figura 8**).



**Figura 8.** Centrifugación del sobrenadante recuperado de las ELL y ESL

Para la SPE se empleó un cartucho CHROMABOND® (Macherey-Nagel, Alemania) C8. El cartucho se acondicionó con 2 mL de H<sub>2</sub>O. Luego se añadió el sobrenadante. Para el lavado se agregaron 2 mL de H<sub>2</sub>O y para la elución de CBD se agregaron 500 µL de CH<sub>3</sub>CN, mismos que se recuperaron para su posterior inyección en el sistema cromatográfico. Este último paso se realizó por triplicado para asegurar la elución completa de CBD (**Figura 9**).



**Figura 9.** Proceso SPE para la purificación de CBD extraído de plasma

### 7.2.2 Condiciones de operación del sistema cromatográfico

La metodología analítica fue desarrollada empleando un cromatógrafo Agilent Technologies ® (California, Estados Unidos) serie 1260 equipado con automuestreador, termostato de columna y detector de arreglo de diodos (DAD). Los datos, como el área, el tiempo de retención ( $t_R$ ) y la simetría (Symm) de cada

pico, se calcularon con el software OpenLAB CDS (Agilent Technologies ®). El método fue desarrollado por cromatografía en fase inversa, se utilizó una columna Phenomenex® (California, Estados Unidos) Luna C18 (150 × 3.0 mm, 5 µm, 100 Å) y la fase móvil fue una mezcla de acetonitrilo: agua en relación 75:25 % v/v (CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O), con un flujo de 1.0 mL/min y temperatura controlada a 25 °C, el volumen de inyección fue de 20 µL para las muestras de SO y de 40 µL para las muestras de plasma. La detección se realizó a longitudes de onda ( $\lambda$ ) de 210, 220 y 254 nm; adicionalmente, se colectaron absorbancias entre 200 y 400 nm para evaluar la pureza espectral. Para la selección de la metodología se evaluaron diferentes parámetros: proporción de disolventes, temperatura y volumen de inyección.

### **7.3.3 Validación del método analítico para la identificación y cuantificación de CBD**

La validación del método analítico para la identificación y cuantificación de CBD se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones establecidas en las guías ICH Q2(R) y ICH M10 (ICH, 2021), que proporcionan criterios internacionales para garantizar la fiabilidad y la reproducibilidad de los métodos de análisis farmacéutico. Los parámetros evaluados incluyeron la adecuabilidad del sistema, especificidad, linealidad, precisión, exactitud y límites de detección y cuantificación (LOD y LOQ), los cuales permiten garantizar que el método sea adecuado para su aplicación en muestras con diferentes matrices, como la oleosa y las biológicas, entre otras, y asegurar que los resultados sean precisos, reproducibles y, por lo tanto, confiables.

*Adecuabilidad:* La adecuabilidad del sistema cromatográfico se evaluó mediante 6 réplicas de la inyección de la Solución A del estándar de CBD. Se determinó la repetibilidad de las áreas del CBD y del tiempo de retención ( $t_R$ ) mediante el coeficiente de variación (CV), considerándose aceptable un valor  $\leq 2$  %. La simetría de los picos cromatográficos se consideró aceptable cuando el valor fue  $\geq 0.8$  (ICH, 2021).

*Especificidad:* Se evaluó la especificidad del método mediante inyecciones independientes de la fase móvil, los placebos (plasma y aceite de ajonjolí previamente tratados), las soluciones A y B de los estándares de CBD, así como las muestras (SO y plasma), asegurando que la respuesta obtenida corresponda exclusivamente al analito de interés y que las matrices no generen interferencias para la identificación y cuantificación de CBD.

*Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ):* Se pesaron por triplicado 10 mg de CBD, se transfirieron a un matraz volumétrico de 10 mL y se aforaron con CH<sub>3</sub>CN (1 mg/mL); a partir de la solución de 1 mg/mL se realizaron diluciones sucesivas para obtener concentraciones de 62.50, 31.25, 15.62, 7.81, 3.91 y 1.95 µg/mL, filtradas con acrodiscos de nylon de 0.45 µm. Con los resultados obtenidos se determinaron la ecuación de la recta, el coeficiente de correlación ( $r \geq 0.99$ ), el coeficiente de determinación ( $r^2 > 0.98$ ) y el CV de cada nivel ( $CV \leq 2\%$ ) (ICH, 2021). Los valores de LOD y LOQ se calcularon a partir de las curvas de calibración en el rango de 1.95 a 62.5 µg/mL.

La estimación del límite de detección (LOD) y del límite de cuantificación (LOQ) se realizó mediante el método basado en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente de la curva de calibración, conforme a los lineamientos establecidos por la FDA (2018) y la ICH Q2(R2) (2021). Para ello, se calcularon los valores de LOD y LOQ a partir de la curva de calibración A, se estimó el intervalo de confianza para la pendiente a través de la siguiente ecuación:

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} Sb'$$

$$Sb' = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n - 2}}$$

A continuación, se calculó la desviación estándar de la ordenada al origen ( $S_{b0}$ )

$$S_{b0} = \frac{1}{n} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(x)^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

donde  $x = \frac{\sum x}{n}$

Una vez obtenidos los valores anteriores, se estimaron los límites empleando las siguientes ecuaciones:

$$LOD = \frac{(3.3 * S_{y/x})}{\beta_1} \quad y \quad LOQ = \frac{(10 * S_{y/x})}{\beta_1}$$

Donde:  $S_{y/x}$  corresponde a la desviación estándar de la regresión;  $S_{b0}$  es la desviación estándar de la ordenada al origen;  $\beta_0$  representa la ordenada al origen;  $\beta_1$  representa la pendiente de la recta. Asimismo, se determinó el intervalo de confianza para la pendiente (IC  $\beta_1$ ) con un nivel de confianza  $\alpha = 0.05$ , con el propósito de evaluar la precisión de la relación concentración–respuesta y confirmar la robustez del modelo empleado.

El método analítico desarrollado se utilizó para cuantificar CBD en solución oleosa y en plasma (matriz biológica). Al tratarse de matrices diferentes, requieren procedimientos y metodologías distintos; además, los rangos de concentración para la cuantificación son distintos; por ende, la metodología para evaluar el parámetro de validación es distinta y se describe a continuación.

### 7.3.3.1 Validación del método analítico para la cuantificación de CBD en SO

*Linealidad del sistema:* La linealidad se determinó mediante tres curvas de calibración en un rango de 72 a 168  $\mu\text{g/mL}$ , con 5 niveles de concentración (60, 80, 100, 120 y 140 %) como se indica en la **tabla 5**, evaluados por triplicado, siendo el 100% la concentración de 120  $\mu\text{g/mL}$ . A partir de los datos obtenidos, se calculó la ecuación de la recta, el coeficiente de correlación ( $r \geq 0.99$ ), el coeficiente de determinación ( $r^2 > 0.98$ ), la pendiente ( $\beta_1$ ) y el CV de cada nivel ( $\text{CV} \leq 2.0 \%$ ).

**Tabla 5.** Concentraciones para la curva de calibración de la linealidad del sistema

| Nivel | Concentración (%) | Concentración (µg/mL) |
|-------|-------------------|-----------------------|
| 1     | 60                | 72                    |
| 2     | 80                | 96                    |
| 3     | 100               | 120                   |
| 4     | 120               | 144                   |
| 5     | 140               | 168                   |

*Precisión:* Se inyectó por sextuplicado la solución A. La precisión se evaluó mediante el coeficiente de variación entre las réplicas de la solución A ( $CV \leq 2\%$ ).

*Exactitud:* Se pesaron 120 mg de CBD, se transfirieron a un tubo Eppendorf y se agregó 1 mL de aceite de ajonjolí con una pipeta volumétrica. La solución se agitó con vórtex durante 5 min. De la solución anterior se midió 100 µL, transfirió a un matraz volumétrico de 10 mL, se aforó con FM, se agitó durante 1 min y se dejó reposar durante 30 min, después de la separación de las fases se tomó un 1 mL de la fase orgánica, se transfirió a un matraz volumétrico de 10 mL y se aforó con FM, la disolución resultante se filtró utilizando acrodiscos de nylon con tamaño de poro de 0.45 µm, este procedimiento se realizó por sextuplicado. El porcentaje de recobro se determinó empleando la respuesta cromatográfica de cada muestra de exactitud y la respuesta de dos soluciones estándar A, inyectadas por triplicado. Se consideró aceptable que el promedio del porcentaje de recobro se encontrara dentro del rango de 95–105 %; el intervalo de confianza del porcentaje de recobro debe incluir la media aritmética o el 100% y se evaluó el CV del porcentaje del recobro  $\leq 2\%$  (ICH, 2021).

#### **7.3.3.2 Validación del método analítico para la cuantificación de CBD en plasma**

*Linealidad del sistema:* La linealidad se determinó mediante tres curvas de calibración, con la evaluación de 6 niveles de concentración, de 62.50 a 1.95 µg/mL, evaluados por triplicado. A partir de los datos obtenidos, se calculó la ecuación de

la recta, el coeficiente de correlación ( $r \geq 0.99$ ), el coeficiente de determinación ( $r^2 > 0.98$ ), la pendiente ( $\beta_1$ ) y el CV de cada nivel ( $CV \leq 2.0 \%$ ).

*Precisión:* Se inyectó por sextuplicado la solución B. La precisión se evaluó mediante el coeficiente de variación entre las réplicas de la solución B ( $CV \leq 2 \%$ ).

*Exactitud:* Se prepararon seis muestras de plasma cargadas; para cada preparación se tomaron 200  $\mu\text{L}$  de solución stock B, que se adicionaron a 800  $\mu\text{L}$  de plasma, y se realizó el procedimiento descrito para la preparación de las muestras destinadas a *la cuantificación de CBD en plasma*. El porcentaje de recobro se determinó empleando la respuesta cromatográfica de cada muestra, con exactitud cuantificada mediante estándar externo, en la que se consideró la respuesta de dos soluciones estándar B inyectadas por triplicado. Se consideró aceptable que el promedio del porcentaje de recobro se encuentre dentro del rango de 85–115 %, un intervalo de confianza del porcentaje de recobro que debe incluir la media aritmética o el 100% de recuperación y un CV del porcentaje del recobro  $\leq 15 \%$  (AOAC, 2016; ICH M10 EMA, 2023)

#### **7.4 Preparación de la solución oleosa (SO) con CBD para su administración en caballos por vía intranasal**

El CBD se disolvió en aceite de ajonjolí a una concentración de 120 mg/mL. La preparación se realizó bajo condiciones controladas y se mantuvo en recipientes de vidrio ámbar para evitar su degradación por la exposición a la luz. Previo a la administración, se revisa que la solución oleosa de CBD (SO) se mantenga homogeneizada para garantizar una distribución uniforme del compuesto y se corroboró la concentración de CBD en la solución mediante un análisis de HPLC-DAD.

#### **7.5 Evaluación del efecto ansiolítico de CBD por vía intranasal en caballos**

La evaluación del estado ansioso de los ejemplares se realizó mediante la Escala de la Mueca Equina. Para cada caballo, se determinaron las constantes fisiológicas como: frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria y temperatura, además se

registraron imágenes y/o videos de la región facial en situaciones controladas (mencionadas en el diseño experimental); como estímulo estresor los ejemplares fueron expuestos a un costal anudado a un palo, el cual fue agitado de forma rítmica y a una distancia segura del animal (aproximadamente 2 metros) para generar ruido y movimiento como se observa en la **figura 10**. Este estímulo estresor se aplicó durante 40 s, a partir de 2 minutos después de la administración de la SO de CBD, y a los tiempos 15, 30 y 60 antes de la evaluación de la EM.



**Figura 10.** Estímulo estresor en caballos. Se observa a un ejemplar siendo inducido a estado de estrés agudo basado en la estimulación audiovisual con un costal

Este procedimiento tuvo como objetivo provocar una reacción de alerta sin comprometer el bienestar del ejemplar e identificar variaciones en la UAF, tales como:

1. Orejas rígidas hacia atrás
2. Tensión orbital
3. Tensión en la región supraorbital
4. Tensión en los músculos masticatorios
5. Tensión de boca y mentón más pronunciado
6. Fosas nasales dilatadas o contraídas

Las UAF fueron documentadas en registros audiovisuales, los cuales se analizaron de manera sistemática, asignando puntajes de 0 a 2 según la intensidad de cada UAF, donde: 0 es ausencia; 1, presencia moderada; y 2, presencia evidente. El resultado es la escala de mueca (EM), que puede ir del 0 al 12 puntos; 12 es el nivel

máximo en cada evaluación, en el que el ejemplar estaría en el estado de mayor tensión, asociado a dolor y ansiedad. Los registros audiovisuales fueron analizados por tres evaluadores previamente capacitados para reducir sesgos y asegurar la reproducibilidad de los resultados.

La EM se utilizó para evaluar los cambios en el comportamiento antes y después de la administración de CBD por vía intranasal (2 ejemplares) e intravenosa (2 ejemplares).

## **7.6 Análisis Estadístico**

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa JMP® (SAS Institute Inc., Carolina del Norte, Estados Unidos), versión 16.0. Para la validación del método analítico se realizaron pruebas paramétricas. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  desviación estándar ( $\sigma$ ). Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para la regresión. Los valores de probabilidad ( $p$ )  $< 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

Para la evaluación de la Escala de la Mueca Equina (EM) se consideró que los datos son ordinales y fueron transformados a una escala cuantitativa con fines analíticos; también se tomó en cuenta que se contó con 2 unidades experimentales por vía de administración, por lo cual no se asumió la normalidad en la distribución de los datos ni la homogeneidad de varianzas. La EM fue evaluada a diferentes tiempos de muestreo en un mismo ejemplar, por lo anterior, se emplearon pruebas estadísticas no paramétricas para medidas repetidas.

Los datos obtenidos de la EM fueron evaluados de manera independiente para cada vía de administración empleando la prueba de Wilcoxon/Kruskal-Wallis, la cual es un método no paramétrico para determinar si existen diferencias significativas entre las medianas de 3 o más grupos; es considerada la alternativa directa de un análisis de varianza (ANOVA) de un factor cuando los datos no se ajustan a la normal o el número de datos es pequeño. Se consideró un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ . Cuando se identificaron diferencias estadísticamente significativas en la prueba de

Wilcoxon/Kruskal-Wallis, se realizaron pruebas post hoc de comparación de medianas, para lo cual se empleó la prueba de Dunn, en la que se compararon los diferentes tiempos (5, 15, 30 y 60 min) vs el control (tiempo 0 min).

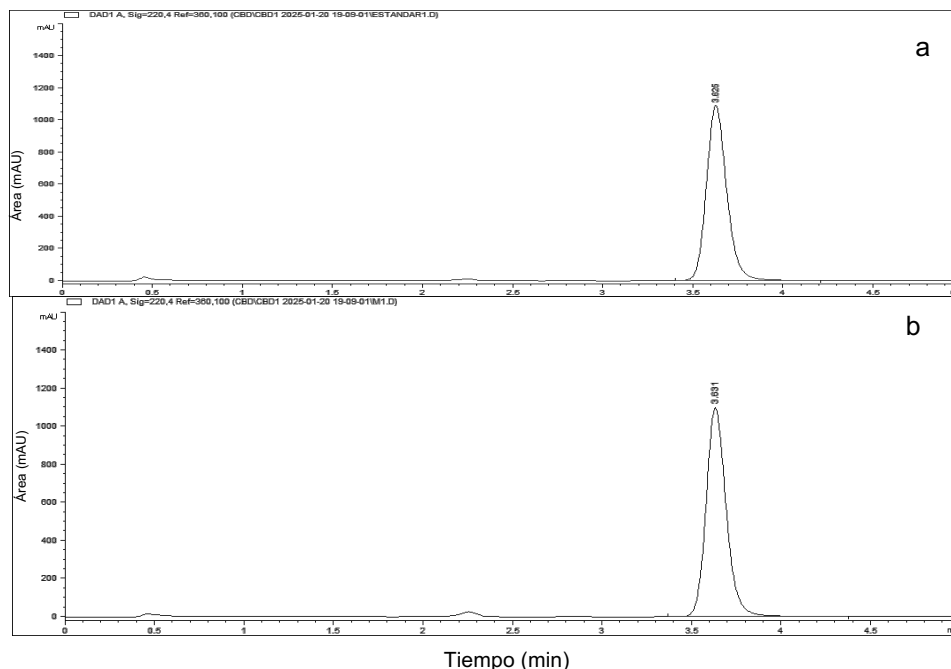
## 8. Resultados y discusión

### 8.1 Desarrollo y validación de un método analítico HPLC-DAD para detectar y cuantificar CBD

En esta sección se presentan los principales hallazgos derivados del análisis de datos recolectados para el desarrollo y la validación del método analítico de la detección y la cuantificación de CBD por HPLC-DAD a partir de muestras de solución oleosa y muestras de plasma equino.

#### 8.1.1 Método analítico para la cuantificación y detección de CBD

La cromatografía en fase inversa para el análisis de CBD se realizó con las condiciones cromatográficas mencionadas anteriormente; bajo estas condiciones, el  $t_R$  de CBD fue de 3.6 min (**Figura 11**). El tiempo total de corrida para muestras de CBD en solución oleosa fue de 5 min, mientras que para las muestras de CBD en plasma fue de 10 min.



**Figura 11.** Cromatogramas de Cannabidiol Se observan los cromatogramas de la solución A estándar de CBD (**11a**) y el cromatograma de una muestra de SO (**11b**), ambos con  $t_R = 3.6$  min.

El  $t_R$  de CBD y el tiempo total de análisis obtenidos en esta investigación son menores que lo reportado para el análisis de CBD utilizando columnas de dimensiones similares (Analakkattillam *et al.*, 2022; Deidda *et al.*, 2019; Zgair *et al.*, 2015; Zivovinovic *et al.*, 2018).

## **8.2 Validación del método analítico para la cuantificación y detección de CBD**

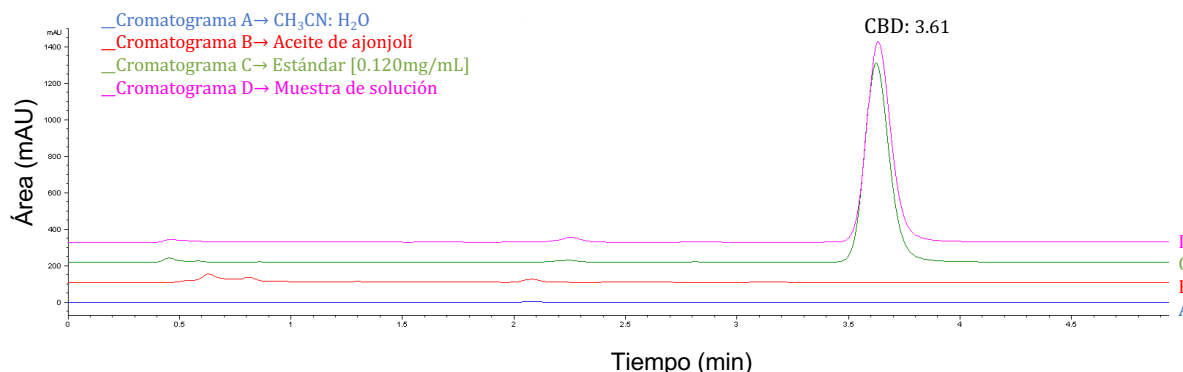
Con el propósito de garantizar la confiabilidad, reproducibilidad y trazabilidad de los resultados obtenidos, así como de demostrar que el método propuesto cumple con los lineamientos nacionales e internacionales, se llevó a cabo el proceso de validación del método destinado a la detección y cuantificación de CBD en muestras de solución oleosa y de plasma equino. Este procedimiento tuvo como objetivo confirmar que el método desarrollado cumple con los parámetros de especificidad, exactitud, precisión, linealidad y sensibilidad de acuerdo con los criterios establecidos por las guías internacionales de validación analítica, tales como la guía de validación de métodos bioanalíticos para la industria emitida por la FDA (2018), la Directriz sobre la validación de métodos bioanalíticos emitida por la EMA (2011), la actualización de la guía ICH Q2 (R2) (2021) y ICH M10 (2023) y la guía de validación de métodos analíticos emitida por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México (CNQFB *et al.*, 2023), de las cuales, se optó por apagarse a las guías ICH Q2 (R2) (2021) y ICH M10 (2023). En este sentido, se realizó una serie de pruebas analíticas orientadas a evaluar el desempeño del método en cada uno de estos parámetros, con el fin de asegurar su idoneidad para su aplicación en estudios farmacocinéticos en equinos y en el análisis de muestras de medicamentos en formulaciones oleosas.

### **8.2.1 Especificidad del método analítico**

La especificidad es uno de los parámetros fundamentales en la validación de métodos analíticos, ya que permite demostrar la capacidad del método analítico para identificar y cuantificar de manera inequívoca el analito de interés en presencia de otros componentes que puedan encontrarse en la matriz, tales como impurezas, productos de degradación, excipientes o compuestos endógenos.

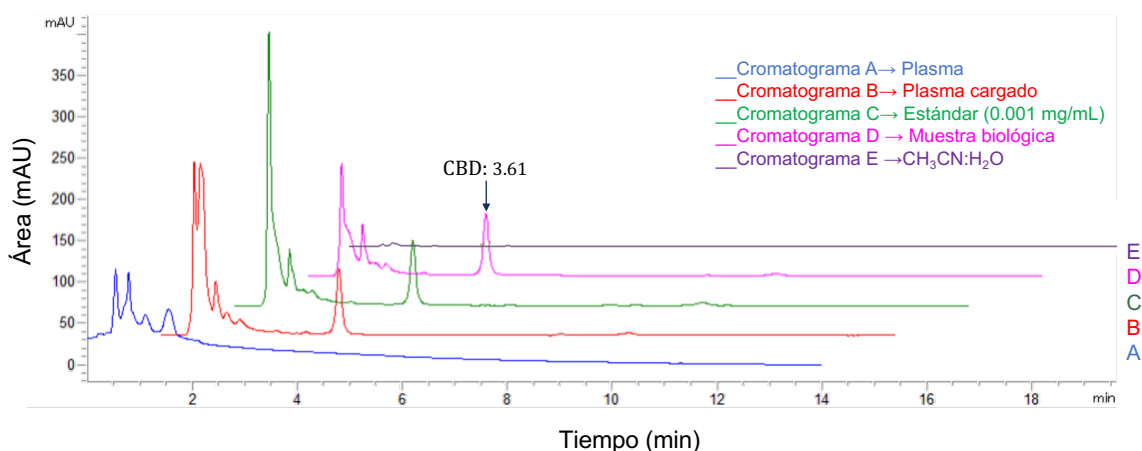
En el presente trabajo, la evaluación de la especificidad confirmó que el método desarrollado es adecuado para el análisis selectivo del CBD, sin interferencias significativas provenientes de la matriz (aceite de ajonjolí o plasma equino). Por lo anterior, la especificidad del método analítico se evaluó mediante la comparación de los cromatogramas de la FM, de las soluciones A y B estándar de CBD, del plasma equino, del placebo (aceite de ajonjolí) y de las muestras (CBD en solución oleosa y CBD extraído de plasma equino).

En la **figura 12** se muestran los cromatogramas correspondientes a la fase móvil, placebo (aceite de ajonjolí), solución A estándar de CBD y la solución oleosa; el  $t_R$  de CBD fue de 3.6 min en la solución A y corresponde a lo obtenido en la muestra proveniente de la solución oleosa.



**Figura 12:** Cromatogramas obtenidos por HPLC para la determinación de la especificidad, **A)** Fase móvil, **B)** Aceite de ajonjolí, **C)** Solución A estándar de CBD [0.01 mg/mL], **D)** Muestra de solución de CBD.

En la **figura 13** se muestran los cromatogramas correspondientes a la fase móvil, plasma equino, solución estándar B de CBD, plasma cargado con CBD y muestra biológica obtenida de equinos previamente administrados con CBD; el  $t_R$  de CBD fue de 3.6 min en la solución estándar B y corresponde a lo obtenido en la muestra biológica.



**Figura 13:** Cromatogramas obtenidos por HPLC para determinación de especificidad, **A)** plasma, **B)** plasma cargado con CBD, **C)** Solución B estándar de CBD [0.001 mg/mL], **D)** muestra biológica, **E)** fase móvil.

Los resultados obtenidos evidenciaron que la señal analítica correspondiente a CBD ( $t_R=3.6$  min) se encontró claramente diferenciada y bien resuelta respecto de las señales generadas por el blanco (fase móvil) y las matrices (aceite de ajonjolí y plasma equino). La ausencia de picos coeluyentes o de respuestas instrumentales superpuestas en el tiempo de retención correspondiente a CBD en las longitudes de onda evaluadas (210, 220 y 254 nm) indica que el método es selectivo y mantiene su capacidad de discriminación, lo que respalda su especificidad analítica y es esencial para garantizar la confiabilidad de los resultados cuantitativos y cualitativos. Este comportamiento es particularmente relevante cuando se trabaja con matrices biológicas o complejas, donde la probabilidad de interferencias es elevada, lo que permite tanto la identificación como la cuantificación precisa del analito sin sesgos derivados de interferencias (Fu *et al.*, 2024).

### 8.2.2 Adecuabilidad del método analítico

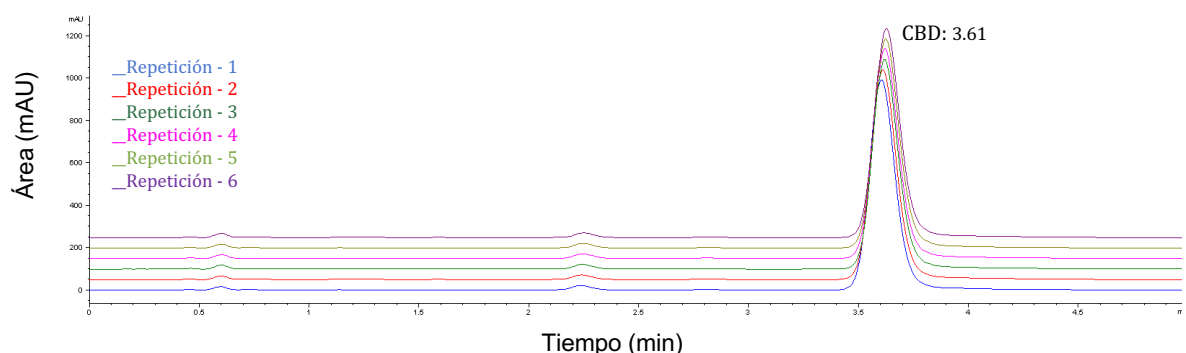
La adecuabilidad del sistema cromatográfico se evaluó determinando la repetibilidad de la respuesta cromatográfica del CBD y del  $t_R$  de 6 inyecciones de la solución A estándar de CBD, así como el número de platos teóricos (N), la simetría del pico cromatográfico (Symm) y la pureza cromatográfica. La adecuabilidad del sistema constituye un parámetro esencial en la validación de los métodos analíticos,

ya que permite verificar que el sistema instrumental y las condiciones operativas sean capaces de proporcionar un desempeño consistente y reproducible antes y durante el análisis de las muestras. Este parámetro actúa como un control de calidad previo que garantiza que los resultados obtenidos sean confiables y que el método cumpla con los criterios de aceptación establecidos. En el presente trabajo, los ensayos de adecuabilidad del sistema demostraron que el método analítico presenta un desempeño estable bajo las condiciones experimentales seleccionadas (**Figura 14**), y los valores obtenidos para los parámetros evaluados se mantuvieron dentro de los límites recomendados por la guía Q2 (R2), que aplica al desarrollo farmacéutico y al producto comercial (ver tabla 6) (ICH, 2021). El resultado obtenido para el CV de la respuesta analítica fue de 0.13% y el CV del  $t_R$  del CBD fue de 0.2%, lo cual indica que el sistema cromatográfico presenta adecuada precisión instrumental y repetibilidad entre inyecciones consecutivas, garantizando la idoneidad del sistema (adecuabilidad) para comenzar la validación.

**Tabla 6.** Adecuabilidad del sistema y parámetros cromatográficos obtenidos

|                                | Área de respuesta | $t_R$ (min)     | Pureza Cromatográfica | N             | Symm            |
|--------------------------------|-------------------|-----------------|-----------------------|---------------|-----------------|
| <b>CBD</b>                     | 8537.43           | 3.62            | 99.7%                 | 4405.5        | 0.82            |
| <b>CV</b>                      | 0.1307            | 0.2018          |                       |               |                 |
| <b>Criterios de aceptación</b> | $CV \leq 2.0\%$   | $CV \leq 2.0\%$ | NA                    | $N \geq 1000$ | $Symm \leq 2.0$ |

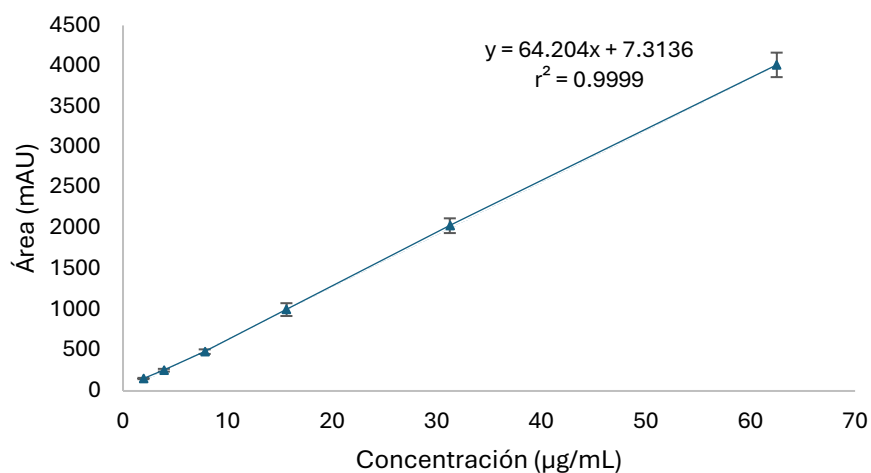
NA: No aplica  
Especificaciones de ICH Q2(R2) (2021)



**Figura 14.** Adecuabilidad del sistema cromatográfico.

### 8.2.3 Límites de Detección y Cuantificación

Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) para CBD se calcularon mediante la pendiente y la desviación estándar de las curvas de calibración (ICH Q2, 2021). En la **figura 15** se observa que la respuesta analítica es lineal, es decir, es proporcional a la concentración; los resultados de las pendientes y desviaciones estándar ( $S_{y/x}$ ) se muestran en la **tabla 7**.



**Figura 15.** Curva de calibración para la estimación de LOD y LOQ.

**Tabla 7.** Estimación de los límites de cuantificación y detección

| Concentración<br>(µg/mL) | Pendiente ± DE   | $S_{y/x}$ | LOD<br>(µg/mL) | LOQ<br>(µg/mL) |
|--------------------------|------------------|-----------|----------------|----------------|
| 62 a 1.9                 | $64.20 \pm 0.39$ | 0.3502    | 1.87           | 5.68           |

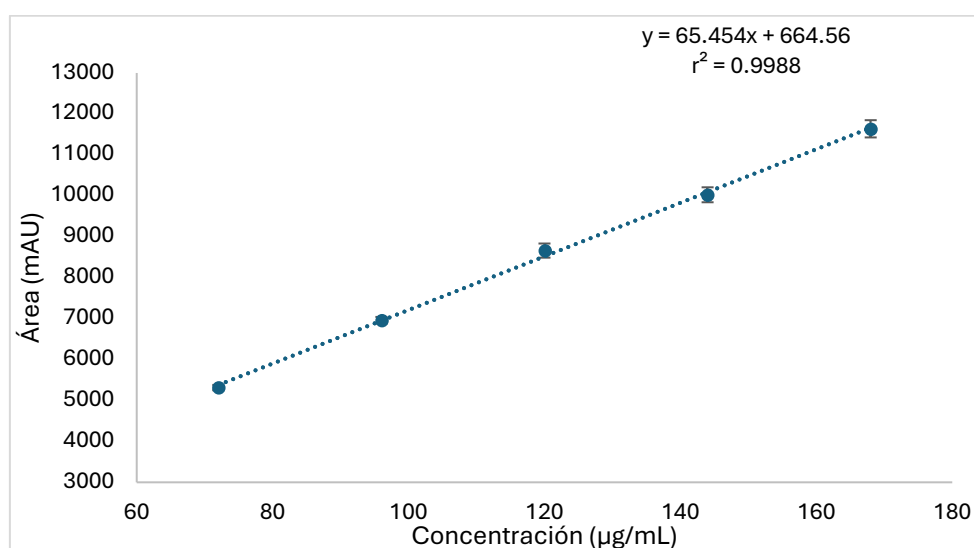
La estimación matemática de los límites de detección y cuantificación se estableció como LOD igual a 1.87 µg/mL y el LOQ a 5.68 µg/mL. Hay que tener presente que el LOD representa la menor concentración del analito que puede detectarse, aunque no necesariamente cuantificarse con exactitud, mientras que el LOQ indica la concentración mínima que puede cuantificarse con precisión y exactitud aceptables. La verificación de que ambos valores se encuentran dentro del rango lineal del método analítico garantiza que la sensibilidad y la capacidad de detección son

adecuadas para las concentraciones esperadas en las muestras biológicas evaluadas.

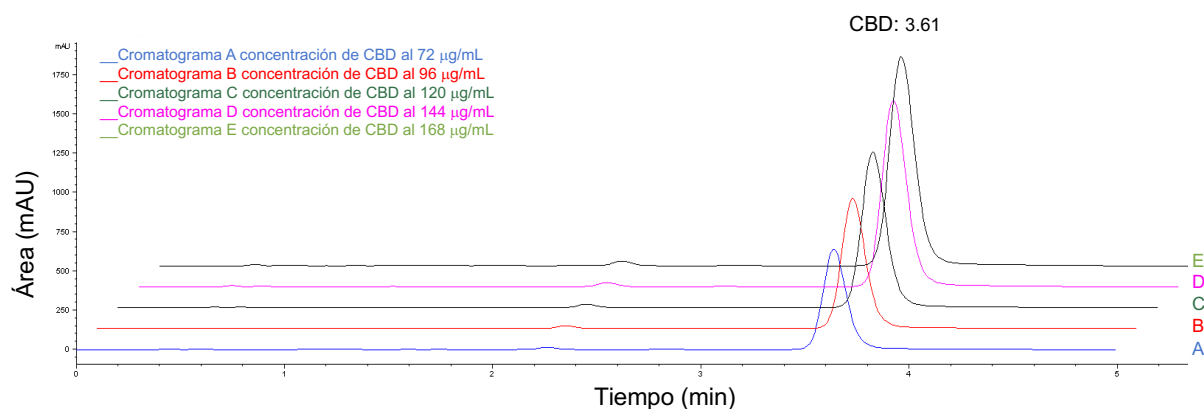
## 8.2.4 Validación del método analítico para la cuantificación de CBD en SO

### 8.2.4.1 Linealidad del sistema cromatográfico

La evaluación de la linealidad del sistema se realizó con tres curvas de calibración con cinco niveles de concentración (ICH, 2021). El análisis de regresión y el promedio de cada nivel de las curvas de calibración se muestran en la **figura 16** y el rango de linealidad del sistema fue de 72 a 168 µg/mL. En la **figura 17** se presentan los cromatogramas de cada uno de los niveles de concentración de CBD para una de las curvas de calibración, utilizadas para estimar la linealidad del sistema. De los resultados obtenidos a partir de las curvas de calibración se estimó la ecuación de la recta, coeficiente de correlación ( $r \geq 0.99$ ), coeficiente de determinación ( $r^2 > 0.98$ ), pendiente ( $\beta_1$ ) y el porcentaje del CV para cada nivel de concentración ( $CV \leq 2.0\%$ ), ver **tabla 8**. Estos valores demuestran una linealidad aceptable y una adecuada proporcionalidad entre la señal y la concentración, que cumplen con las regulaciones nacionales e internacionales para la cuantificación de CBD (ICH, 2021).



**Figura 16.** Linealidad del sistema en el rango de 72 a 168 µg/mL.



**Figura 17.** Cromatogramas representativos de la linealidad del sistema cromatográfico.

**Tabla 8.** Parámetros evaluados para linealidad del sistema

| Parámetro                                | Curva               | Especificación       |
|------------------------------------------|---------------------|----------------------|
| Pendiente ( $\beta_1$ )                  | 65.45 $\pm$ 1.30    | NA                   |
| Ordenada al origen ( $\beta_0$ )         | 664.56 $\pm$ 161.97 | NA                   |
| Coefficiente de regresión ( $r$ )        | 0.9994              | $\geq 0.99$          |
| Coefficiente de determinación ( $r^2$ )  | 0.9988              | $\geq 0.98$          |
| Intervalo de confianza para la pendiente | 61.32-69.59         | No debe incluir el 0 |
| CV% por nivel                            | Cumplen             | $\leq 2\%$           |

\*Los datos se presentan como promedio y desviación estándar ( $\sigma$ ), n=3. No aplica (NA)  
Especificaciones de ICH Q2(R2) (2021).

#### 8.2.4.2 Precisión

La precisión analítica se evaluó tras la inyección repetida de la Solución B; este análisis tiene como finalidad evaluar la concordancia o dispersión entre los resultados de mediciones repetidas del mismo analito bajo las mismas condiciones, lo que indica la reproducibilidad. Se evalúa con el coeficiente de variación (CV) y es crucial para la fiabilidad de los datos. El resultado del CV de la respuesta analítica es de 0.13% y la especificación dada por la ICH Q2 (2021) para el CV es de  $\leq 2\%$ , lo cual indica que el método analítico es preciso (ver tablas 9 y 10).

Los resultados de las inyecciones para esta evaluación se presentan en la **tabla 9** y la especificación se presenta en la **tabla 10**.

**Tabla 9.** Parámetros evaluados para precisión del sistema cromatográfico

| Estándar    | $t_R$ (min)   | Área CBD      |
|-------------|---------------|---------------|
| 1           | 3.61          | 8515.7        |
| 2           | 3.61          | 8539.2        |
| 3           | 3.62          | 8545.0        |
| 4           | 3.62          | 8543.6        |
| 5           | 3.63          | 8544.6        |
| 6           | 3.63          | 8536.5        |
| $\bar{x}$   | <b>3.63</b>   | <b>8537.4</b> |
| $\sigma$    | <b>0.0073</b> | <b>11.16</b>  |
| <b>% CV</b> | <b>0.20</b>   | <b>0.13</b>   |

$t_R$ : Tiempo de retención;  $\sigma$ : Desviación estándar; %CV: Coeficiente de variación;  $\bar{x}$ : Promedio

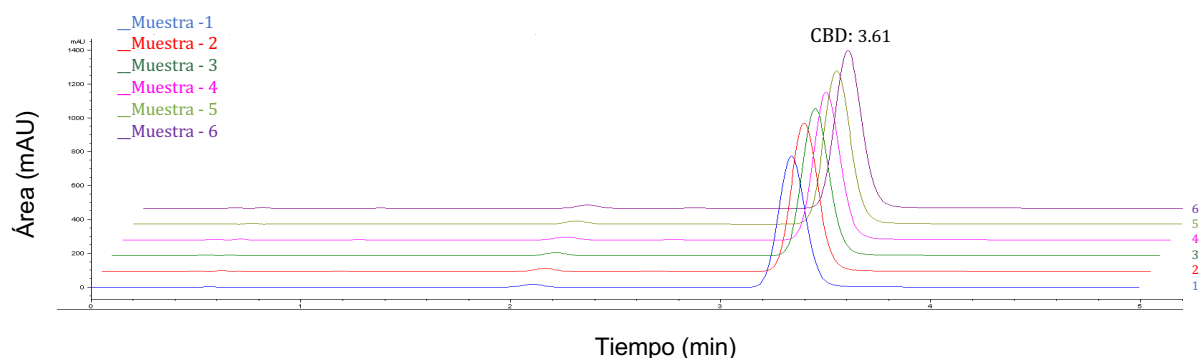
**Tabla 10.** Parámetros evaluados para precisión del sistema cromatográfico

| Parámetro   | Resultado     | Especificación               |
|-------------|---------------|------------------------------|
| <b>% CV</b> | <b>0.13 %</b> | <b><math>\leq 2\%</math></b> |

Especificaciones de ICH Q2(R2) (2021)

#### 8.2.4.3 Exactitud

La exactitud se evaluó mediante la estimación del porcentaje de recobro de cada muestra, el cual se calculó según la metodología del estándar externo (ICH, 2021). Para este parámetro se estimó el intervalo de confianza de la media aritmética del porcentaje de recobro (IC  $\bar{x}$  %Recobro), el cual debe incluir la media aritmética o el 100% y el coeficiente de variación  $\leq 2.0$  %. Los resultados obtenidos para evaluar la exactitud se presentan en la **tabla 11** y en la **figura 18** se presentan las áreas de respuesta de cada inyección independiente de la prueba de exactitud. El promedio del porcentaje de recobro fue de 100.03%, teniendo un intervalo de confianza de 98.92- 101.14%, lo cual cumple con los criterios de especificación de la ICH (Q2).



**Figura 18.** Cromatogramas de exactitud de SO. Cromatogramas representativos de las áreas de respuesta correspondientes a la exactitud del método analítico para CBD en solución oleosa.

**Tabla 11.** Parámetros de evaluación para la exactitud del método analítico para muestras de CBD en solución oleosa

| Parámetro                | Resultado     | Especificación           |
|--------------------------|---------------|--------------------------|
| %Recobro                 | 100.03%       | 98-102%                  |
| IC ( $\bar{x}$ %Recobro) | 98.92-101.14% | Incluir media aritmética |
| CV % Recobro             | 1.48%         | $\leq 2.0\%$             |

Especificaciones de ICH Q2(R2) (2021)

#### 8.2.4.4 Estabilidad de las muestras

Para los ensayos de estabilidad de la solución estándar y la SO, se estimaron las diferencias absolutas entre el porcentaje de recobro en el tiempo 0 y los diferentes tiempos de muestreo (24, 48 y 96 h) en refrigeración y a temperatura ambiente. Según la ICH Q2, las diferencias entre el tiempo 0 y los distintos tiempos de muestreo deben ser menores a 2 ( $|t| < 2$ ); considerando lo anterior, los resultados obtenidos para la evaluación a temperatura ambiente indican una estabilidad hasta las 24 h (**Tabla 12**), mientras que para la evaluación en condiciones de refrigeración las soluciones fueron estables hasta las 96 h (**Tabla 13**).

Los resultados anteriores sugieren que las soluciones de trabajo deben mantenerse en condiciones de refrigeración, ya que, de no ser así, se compromete la estabilidad y, con ello, la veracidad de los resultados. Hasta donde tenemos conocimiento, no existen reportes de la estabilidad de muestras de CBD.

**Tabla 12.** Resultados de estabilidad de soluciones a temperatura ambiente

| Muestra   | % Recobro |        | DA  | % Recobro<br>t=48h | DA  | % Recobro<br>t=96h | DA  |
|-----------|-----------|--------|-----|--------------------|-----|--------------------|-----|
|           | t=0       | t=24h  |     |                    |     |                    |     |
| 1         | 100.00    | 100.09 | 0.0 | 103.52             | 2.4 | 103.88             | 3.9 |
| 2         | 101.39    | 101.39 |     | 103.64             |     | 106.12             |     |
| 3         | 98.32     | 98.32  |     | 99.65              |     | 101.26             |     |
| $\bar{x}$ | 99.90     | 99.94  |     | 102.27             |     | 103.75             |     |
| $\sigma$  | 1.54      | 1.54   |     | 2.26               |     | 2.43               |     |
| % CV      | 1.54      | 1.54   |     | 2.21               |     | 2.34               |     |

$\sigma$ : desviación estándar; % CV: coeficiente de variación;  $\bar{x}$ : promedio; DA: diferencia absoluta  
Especificaciones de ICH Q2(R2) (2021)

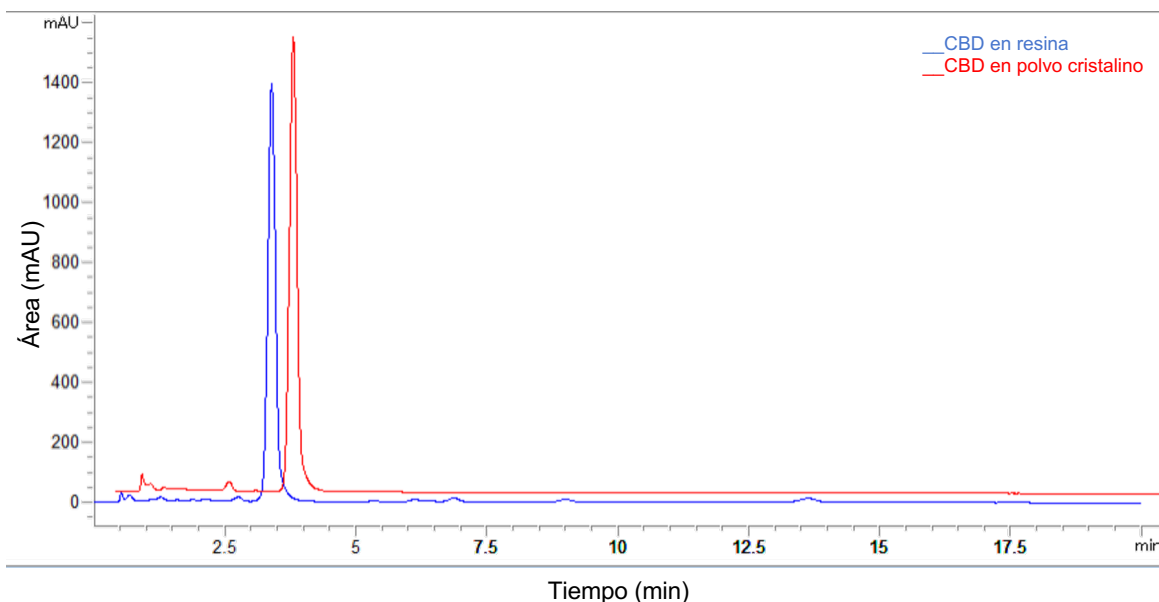
**Tabla 13.** Resultados de estabilidad de soluciones en condiciones de refrigeración

| Muestra   | % Recobro |        | DA  | % Recobro<br>t=48h | DA  | % Recobro<br>t=96h | DA  |
|-----------|-----------|--------|-----|--------------------|-----|--------------------|-----|
|           | t=0       | t=24h  |     |                    |     |                    |     |
| 1         | 100.00    | 102.76 | 1.8 | 102.60             | 1.8 | 101.03             | 0.1 |
| 2         | 101.39    | 101.02 |     | 102.88             |     | 100.69             |     |
| 3         | 98.32     | 101.36 |     | 99.76              |     | 98.25              |     |
| $\bar{x}$ | 99.90     | 101.71 |     | 101.75             |     | 99.99              |     |
| $\sigma$  | 1.53      | 0.91   |     | 1.72               |     | 1.51               |     |
| % CV      | 1.53      | 0.90   |     | 1.69               |     | 1.51               |     |

$\sigma$ : desviación estándar; % CV: coeficiente de variación;  $\bar{x}$ : promedio; DA: diferencia absoluta  
Especificaciones de ICH Q2(R2) (2021)

### 8.2.5 Análisis del CBD y solución oleosa de CBD

Para la presente investigación se contó con el donativo de dos presentaciones de CBD: una en forma de resina y otra en forma de sólido cristalino. Previo a su incorporación al desarrollo experimental, ambas presentaciones fueron sometidas a un proceso de evaluación analítica con el fin de verificar su identidad y determinar su grado de pureza. Dicha evaluación se realizó mediante el análisis de la respuesta cromatográfica, a partir del cual se determinó que la resina donada presentó una pureza del 91.91% y el polvo cristalino de 99.38 %, es decir, la resina contiene al menos 8% de compuestos no identificados en esta investigación (**Figura 19**).



**Figura 19.** Cromatogramas de las presentaciones de CBD. Comparación de la respuesta de CBD en resina y polvo cristalino.

Una vez verificadas la identidad y pureza del CBD, se procedió a la elaboración de las SO para la administración intranasal en caballos. Estas SO fueron evaluadas de manera independiente con el objetivo de determinar el porcentaje de recobro asociado a cada preparación, como parte de la verificación del desempeño del procedimiento de preparación de las soluciones. Los resultados obtenidos se presentan en la **tabla 14**, donde se observa que el porcentaje de recobro promedio fue de 98.22%, lo que indica una adecuada recuperación del analito y respalda la confiabilidad del procedimiento empleado.

**Tabla 14.** Evaluación del porcentaje de recobro del CBD en SO

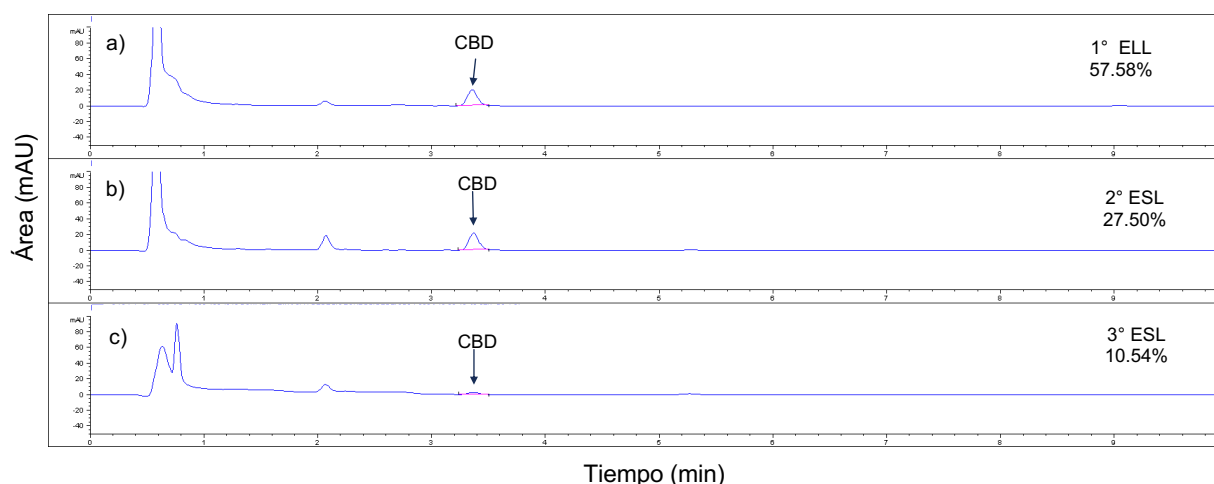
| <b>Muestra</b>  | <b>Concentración<br/>(<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b> | <b>%<br/>Recobro</b> |
|-----------------|--------------------------------------------------------|----------------------|
| <b>1</b>        | 120.51                                                 | 100.42               |
| <b>2</b>        | 117.19                                                 | 97.66                |
| <b>3</b>        | 116.82                                                 | 97.35                |
| <b>4</b>        | 119.62                                                 | 99.68                |
| <b>5</b>        | 116.33                                                 | 96.94                |
| <b>6</b>        | 116.75                                                 | 97.29                |
| <b>Promedio</b> | <b>117.87</b>                                          | <b>98.22</b>         |
| <b>DV</b>       | <b>1.74</b>                                            | <b>1.45</b>          |
| <b>CV</b>       | <b>1.48</b>                                            | <b>1.48</b>          |

## **8.2.6 Validación del método analítico para la cuantificación de CBD en plasma equino**

### **8.2.6.1 Desarrollo de la metodología de extracción de CBD del plasma equino**

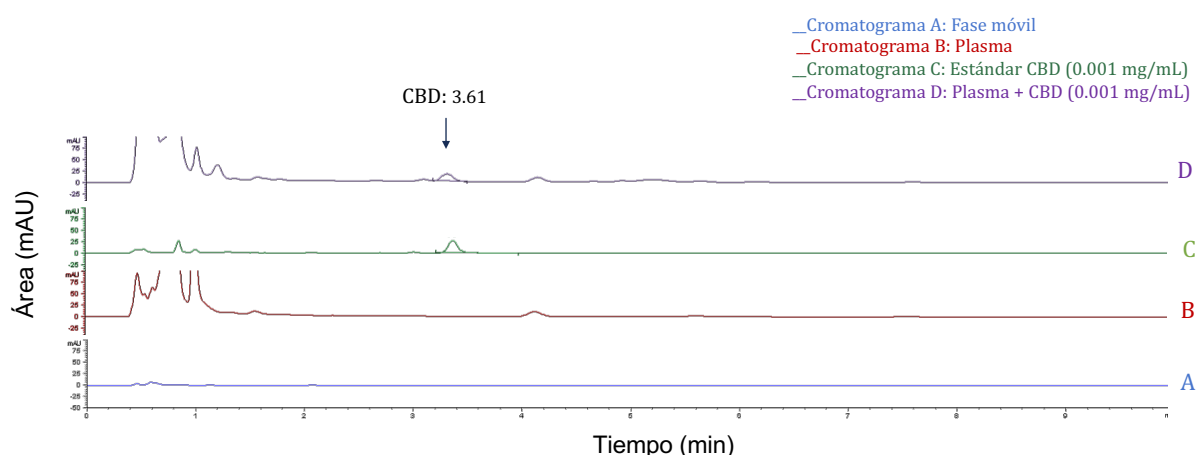
Es importante destacar que el proceso de extracción de CBD a partir de muestras de plasma equino implicó diversas pruebas preliminares orientadas a optimizar las condiciones experimentales para obtener una respuesta cromatográfica que aumente la sensibilidad del sistema, dada la complejidad de la muestra. Entre los procedimientos evaluados, se destacan tres metodologías para la extracción de CBD del plasma equino.

La metodología A ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) consistió en una extracción líquido-líquido (ELL). Se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{CH}_3\text{CN}$  frío a 1 mL de plasma con la finalidad de precipitar las proteínas, seguida de procesos repetidos de centrifugación con el objetivo de separar el sobrenadante en donde se encuentra el CBD de la fracción de proteínas precipitadas, el sobrenadante se filtró con membrana de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  y se inyectó al cromatógrafo con una recuperación de 57.58% (**Figura 20a**). A la proteína precipitada se le adicionó 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{CH}_3\text{CN}$  frío y se realizó una extracción sólido-líquido (ESL). El sobrenadante se filtró con membrana de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  y se inyectó al cromatógrafo con una recuperación de 27.50% (**Figura 20b**), el proceso anterior se repitió con la fase sólida recuperada del paso previo, obteniendo un porcentaje de recuperación de 10.54% (**Figura 20c**). La recuperación total de la metodología A fue de 95.62 %.



**Figura 20.** Cromatogramas de CBD extraído de plasma equino mediante la metodología A ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ). a) Primera ELL con un 57.58% de recobro, b) Segunda ESL con un 27.50% de recobro, c) Tercera ESL con un 10.54% de recobro.

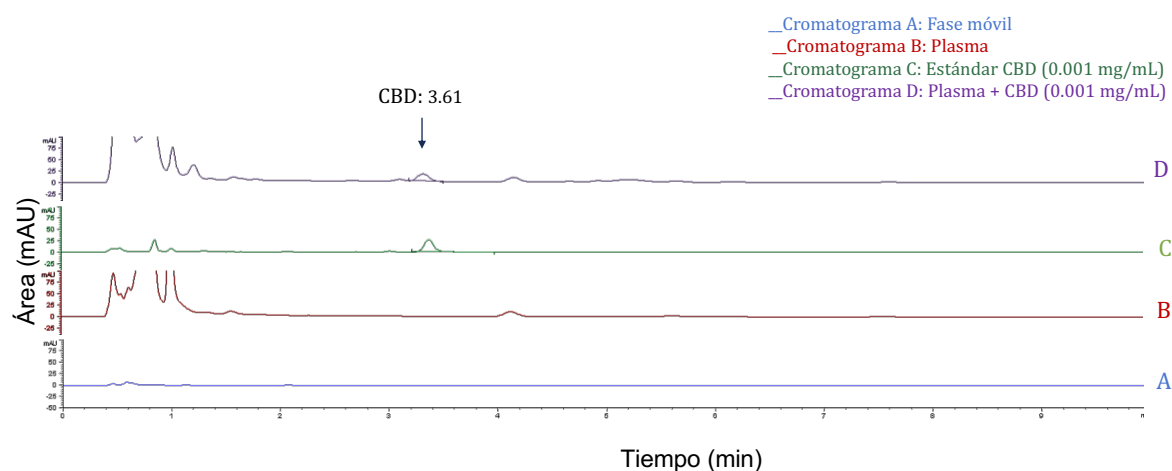
Al determinar la especificidad de la metodología A (**Figura 21**), se observa que tanto el plasma como la fase móvil no interfieren con la respuesta analítica del CBD presente en el placebo cargado y en la muestra de plasma equino a los 15 min después de una administración intranasal de SO de CBD. Con lo anterior, confirmamos la consistencia y la selectividad del método analítico.



**Figura 21.** Cromatogramas para evaluar la especificidad de la Metodología A para la extracción de CBD a partir de muestras de plasma de caballo. A) cromatograma de la fase móvil (línea azul), B) cromatograma del tratamiento de plasma (línea roja), C) cromatograma de la solución estándar de CBD a 0.001 mg/mL (línea verde) y D) cromatograma de plasma cargado con la solución estándar de CBD a 0.001 mg/mL (línea morada).

Sin embargo, esta metodología fue descartada debido a que se observó un precipitado después de 24 h y un aumento progresivo de la presión del sistema cromatográfico tras cada inyección, lo que sugiere la acumulación de componentes residuales de la matriz biológica en la columna analítica. Esta retención comprometía tanto la integridad de la columna como la estabilidad operativa del sistema, elevando el riesgo de obstrucción y afectando la reproducibilidad del análisis. En consecuencia, se priorizó un procedimiento alternativo que minimizará estos inconvenientes y garantizará un desempeño cromatográfico robusto y estable.

En la metodología B se realizó una ELL empleando metilterbutiléter (MTBE) como disolvente orgánico. Se adicionaron 5 mL de MTBE a 2 mL de plasma. La fase orgánica se evaporó bajo presión reducida y se reconstituyó con 130  $\mu$ L de  $\text{CH}_3\text{CN}$ . Se filtró con una membrana de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  y se inyectó en el cromatógrafo con una recuperación > al 80% (**Figura 22D**).



**Figura 22.** Evaluación de la especificidad de la Metodología B (MTBE). A) cromatograma de la fase móvil (línea azul), B) cromatograma del tratamiento de plasma (línea roja), C) cromatograma de la solución estándar de CBD a 0.001 mg/mL (línea verde) y D) cromatograma de plasma cargado con la solución estándar de CBD a 0.001 mg/mL (línea morada).

En la metodología B (MTBE) se observan más picos de respuesta en los cromatogramas, además de la respuesta de CBD ( $t_R=3.6$ )(**Figura 22**), contrario a lo observado en la metodología A ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) (**Figura 21**), cabe señalar esta

metodología requería un análisis cromatográfico de 40 minutos, ya que ambas muestras de plasma presentaban respuesta cromatográfica hasta los 35 min, lo que encarecería el análisis por aumentar el consumo de disolvente así como el tiempo de uso del equipo; sumado a esto, se presenta un área de respuesta más baja para CBD que la obtenida en la metodología A ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) y en esta metodología también se presentó un incremento en la presión del sistema. Esta metodología fue descartada debido a que el disolvente MTBE, al ser poco polar, tiende a extraer componentes lipídicos de las matrices biológicas, lo que complica su análisis. Lo anterior concuerda con lo mencionado por Gutmann *et al.* (2024) quienes señalan que la ELL utilizando MTBE, aunque es efectiva para la recuperación de componentes de carácter lipídico como el CBD, suele tener metodologías complicadas, menor consistencia en su reproducibilidad y es propensa a la extracción de otros componentes de la matriz que comprometen la selectividad analítica.

Con las pruebas realizadas en esta investigación, tanto las metodologías A y B tienen un impacto negativo sobre la vida útil de la columna cromatográfica con un aumento en la presión, por lo que se tomó la decisión de implementar un procedimiento de purificación de la muestra basado en el empleo de un cartucho de extracción en fase sólida (SPE) C8, con el objetivo de reducir la carga de interferentes provenientes de la matriz biológica previa a la inyección cromatográfica.

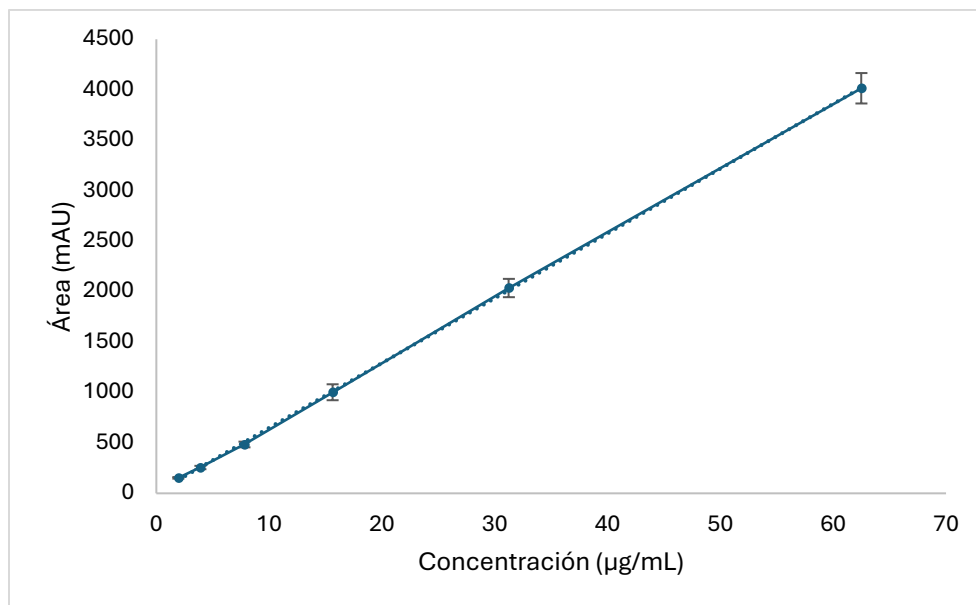
A la metodología A se le añadió la purificación por SPE, lo que permitió mejorar la selectividad del método, disminuir la presencia de otros compuestos de la matriz y, en consecuencia, reducir la presión del sistema, lo que contribuye a preservar la integridad de la columna y a prolongar su vida útil. Con esta metodología se obtuvo una señal analítica más limpia y reproducible. Además, la optimización de esta metodología permitió reducir el tiempo total de análisis a 10 minutos, sin comprometer la sensibilidad del método, lo que representa una ventaja operativa relevante en términos de eficiencia analítica, consumo de recursos y tiempo de uso del equipo, lo que resulta en un método más económico. El procedimiento detallado

de esta metodología se describe en el **apartado 7.2.1**, correspondiente a la preparación de disoluciones y muestras.

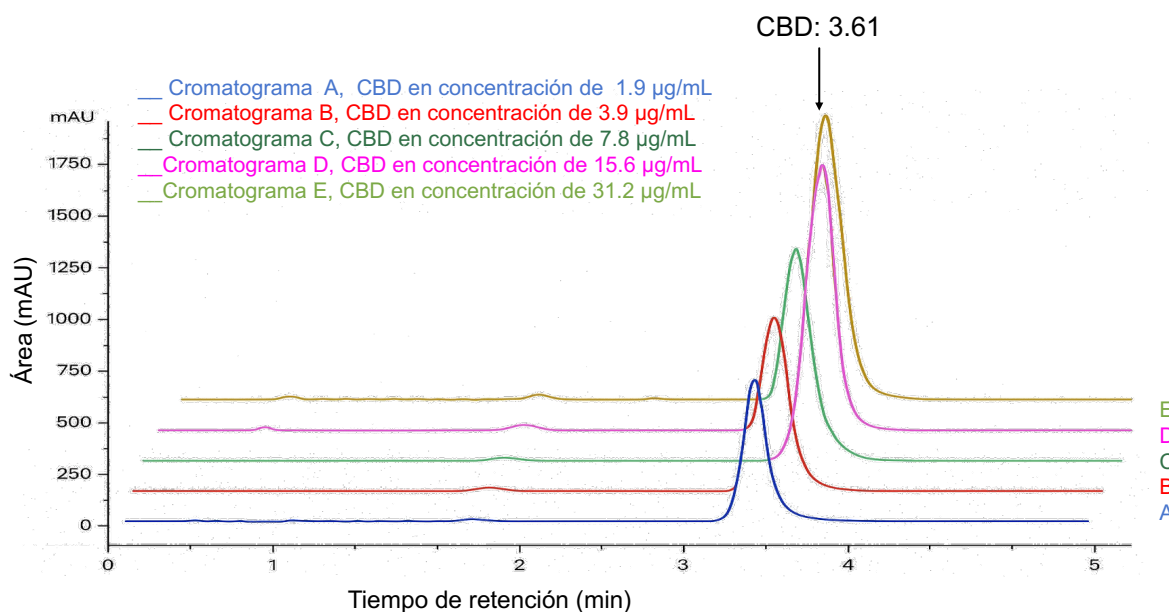
El método analítico podría mejorar al agregar un estándar interno, lo cual permitiría corregir las variaciones de la metodología de extracción y, con ello, optimizar la cuantificación. Por otro lado, es importante mencionar que la sensibilidad del DAD es menor que la de los detectores de espectroscopia de masas, lo que condiciona el límite de cuantificación.

#### **8.2.6.2 Linealidad del sistema cromatográfico para muestras de plasma equino**

La evaluación de la linealidad del sistema se realizó con tres curvas de calibración y seis niveles de concentración (ICH, 2021). El análisis de regresión y el promedio de cada nivel de las curvas de calibración se muestran en la **figura 23**; el rango de linealidad del sistema abarca concentraciones de 1.9 a 62.5 µg/mL. En la **figura 24** se presentan los cromatogramas de cinco niveles de concentración de CBD en la curva de calibración, para evaluar la linealidad del sistema. De los resultados obtenidos a partir de las curvas de calibración se determinó la ecuación de la recta, coeficiente de correlación ( $r \geq 0.99$ ), coeficiente de determinación ( $r^2 > 0.98$ ), pendiente ( $\beta_1$ ) y el porcentaje del CV para cada nivel de concentración ( $CV \leq 2.0\%$ ), ver **tabla 15**. Estos valores demuestran una linealidad aceptable y una adecuada proporcionalidad entre la señal y la concentración, que cumplen con las regulaciones nacionales e internacionales para la cuantificación de CBD (ICH, 2021).



**Figura 23.** Linealidad del sistema para las concentraciones de 1.9 a 62.5 µg/mL



**Figura 24.** Cromatogramas representativos de la linealidad del sistema cromatográfico.

**Tabla 15.** Parámetros evaluados para la linealidad del sistema.

| Parámetro                        | Curva              | Criterio de aceptación |
|----------------------------------|--------------------|------------------------|
| Pendiente ( $\beta_1$ )          | 64.20± 0.39        | NA                     |
| Ordenada al origen ( $\beta_0$ ) | 7.313598673± 11.38 | NA                     |

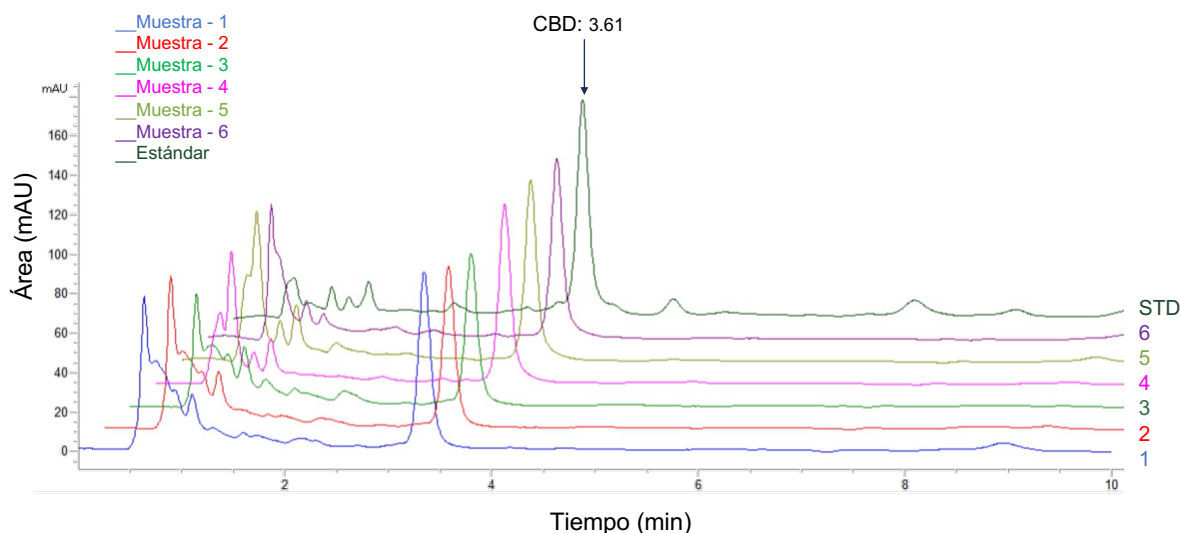
|                                          |               |                      |
|------------------------------------------|---------------|----------------------|
| Coeficiente de regresión ( $r$ )         | 0.9999        | $\geq 0.99$          |
| Coeficiente de determinación ( $r^2$ )   | 0.9998        | $\geq 0.98$          |
| Intervalo de confianza para la pendiente | 63.13 – 65.28 | No debe incluir el 0 |
| CV% por nivel                            | Cumplen       | $\leq 2\%$           |

\*Los datos se presentan como promedio y desviación estándar ( $\sigma$ ),  $n=3$ . No aplica (NA)

Especificaciones de ICH Q2(R2) (2021)

### 8.2.6.3 Exactitud del sistema cromatográfico para muestras de plasma equino

La exactitud se evaluó mediante la estimación del porcentaje de recobro de cada muestra, el cual se calculó según la metodología del estándar externo (ICH, 2010). Para este parámetro se estimó el intervalo de confianza de la media aritmética del porcentaje de recobro ( $IC \bar{x} \% \text{Recobro}$ ), el cual debe incluir la media aritmética o el 100% y el coeficiente de variación  $\leq 15.0\%$ . Los resultados obtenidos para evaluar la exactitud se presentan en la **tabla 16** y en la **figura 25** se presentan las áreas de respuesta de cada inyección independiente de la prueba de exactitud. El promedio del porcentaje de recobro fue de 91.92%, teniendo un intervalo de confianza de 88.95-94.88%, lo cual cumple con los criterios de especificación de la ICH (M10) por ser muestras biológicas (EMA, 2023; ICH, 2023, AOAC Appendix F, 2016).



**Figura 25.** Cromatogramas representativos de la evaluación correspondiente a la exactitud del método analítico para muestras biológicas (inyecciones 1-6) versus la solución estándar de CBD (0.001 mg/mL).

**Tabla 16.** Parámetros de evaluación para la exactitud del método analítico para muestras biológicas

| Criterio                 | Especificación           | Resultado    |
|--------------------------|--------------------------|--------------|
| %Recobro                 | 85-115%                  | 91.92%       |
| IC ( $\bar{x}$ %Recobro) | Incluir media aritmética | 88.95-94.88% |
| CV% recobro              | $\leq 15\%$              | 2.84%        |

Especificaciones de ICH M10 (2023), Guía AOAC (2016)

Cabe mencionar que los rangos establecidos para los criterios de aceptación de la exactitud difieren entre los métodos aplicados a fármacos y medicamentos y los aplicados a muestras biológicas ( $CV \leq 2\%$  y  $\leq 15\%$ , respectivamente). Esto se debe a que, si bien ambos criterios consideran la variabilidad inherente al método analítico, en el caso de los fármacos y medicamentos se espera un mayor control de las variables propias de la matriz, mientras que en las matrices biológicas, debido a su mayor complejidad y variabilidad entre los sujetos de estudio, se reconoce una mayor dificultad analítica. Esta diferenciación está reflejada normativamente en las guías ICH Q2 (R2) e ICH M10, donde la Q2 establece las especificaciones internacionales para el producto y la M10 establece los criterios aplicables a muestras biológicas (ICH, 2021; EMA, 2023).

Una vez concluido el proceso de validación del método analítico para muestras biológicas, es importante resaltar que el método desarrollado en el presente trabajo propone un pretratamiento mediante SPE y, con ello, obtener una muestra con menos interferencias, favoreciendo la reducción del tiempo de análisis y manteniendo los criterios de desempeño analítico acordes con los lineamientos normativos vigentes.

De esta manera, el método desarrollado con una columna Phenomenex® (Torrance, California, Estados Unidos) Luna C18, empleando como fase móvil  $CH_3CN:H_2O$  (75:25), es una alternativa analítica viable debido a que se obtiene un  $t_R$  de 3.6 minutos para CBD con tiempo total de análisis de 5 minutos para la SO y 10 minutos para las muestras de plasma equino (**Tabla 17**). Además, el método desarrollado presenta ventajas y es competitivo frente a metodologías previamente reportadas, particularmente, en las muestras biológicas en donde su matriz es

compleja y se compromete el tiempo de vida útil de la columna cromatográfica. Por ejemplo, lo reportado por Analakkattillam *et al.* (2022), los cuales trabajaron con condiciones cromatográficas similares logrando obtener  $t_R$  para CBD de 7.059 min, con un tiempo de corrida total de 20 min; así mismo, podemos mencionar el método desarrollado por Zivovinic *et al.* (2018) reporta un análisis cromatográfico aplicando elución de gradiente, con fase móvil de H<sub>2</sub>O y CH<sub>3</sub>CN ambos con 0,1 % de ácido fórmico, logrando un  $t_R$  de 6.3 min y un tiempo total de 20 min (**Tabla 17**). El método desarrollado representa una ventaja operativa relevante en términos de eficiencia analítica al disminuir el  $t_R$  y el tiempo total de análisis por muestra, con la consecuente reducción del consumo de recursos y del tiempo de uso de equipo, lo que resulta en un método más económico. Además, este método se desarrolló con un detector DAD, el cual es más asequible que los detectores de UV/Vis o los detectores de MS/MS.

**Tabla 17.** Métodos analíticos desarrollado para la cuantificación y detección de CBD

| Detector | Matriz           | $t_R$<br>CBD<br>(min) | Tiempo<br>total<br>(min) | Fase móvil                                         | Columna                                                   | Longitud de<br>onda<br>(nm) | Flujo<br>(mL/min) | Referencia                             |
|----------|------------------|-----------------------|--------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-----------------------------|-------------------|----------------------------------------|
| DAD      | Producto         | 3.6                   | 5                        | CH <sub>3</sub> CN: H <sub>2</sub> O<br>(75:25)    | Phenomenex® Luna<br>C18<br>(150 x 3.0 mm, 5 µm,<br>100 Å) | 220                         | 1.0               | Desarrollo<br>de esta<br>investigación |
| DAD      | Plasma<br>equino | 3.6                   | 10                       | CH <sub>3</sub> CN: H <sub>2</sub> O<br>(75:25)    | Phenomenex® Luna<br>C18<br>(150 x 3.0 mm, 5 µm,<br>100 Å) | 210                         | 1.0               | Desarrollo<br>de esta<br>investigación |
| UV/Vis   | Producto         | 7.1                   | 20                       | CH <sub>3</sub> CN: H <sub>2</sub> O<br>(75:25)    | SOLAS 100 Å C18 (150<br>x 4.6 mm, 5 µm)                   | 214                         | 1.5               | Analakkattill<br>am et al.,<br>2022    |
| UV/Vis   | Producto         | 6.3                   | 20                       | CH <sub>3</sub> CN:<br>H <sub>2</sub> O<br>(50:50) | Phenomenex Kinetex<br>XB-C18<br>(150 x 4.6 mm, 2.6 µm)    | 220                         | 1.8 a 0.8         | Zivovinic<br>et al., 2018              |

### 8.3 Preparación de la solución con CBD para su administración en caballos por vía intranasal

En la administración por vía intranasal se deben considerar factores de riesgo como irritación en la mucosa y posible deposición respiratoria; además, en algunos estudios que evaluaron la administración de CBD en equinos en formas

farmacéuticas como polvo y aerosoles se señalan consideraciones técnicas y conductuales como flujo respiratorio, tolerancia al manejo equino, riesgo de rechazo a las subsecuentes administraciones (Condor *et al.*, 2022; de Wasseige *et al.*, 2021). Por lo anterior, mediante una revisión bibliográfica se analizaron los principales vehículos empleados para la administración del CBD, así como la compatibilidad del CBD con algunos aceites vegetales; en la **tabla 18** se resumen las características de los principales aceites reportados para administrar el CBD.

**Tabla 18.** Principales aceites empleados como vehículos para la administración de CBD

| Característica                                        | Aceite de ajonjolí                           | Aceite de coco<br>triglicéridos de<br>cadena media (MCT) | Aceite de<br>oliva                 | Aceite de<br>girasol                               |
|-------------------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------------------|
| <b>Estabilidad<br/>oxidativa</b>                      | Buena                                        | Muy buena                                                | Baja a<br>moderada                 | Baja                                               |
| <b>Tolerancia<br/>mucosa</b>                          | Alta                                         | Alta                                                     | Moderada                           | Moderada                                           |
| <b>Viscosidad</b>                                     | Moderada                                     | Baja                                                     | Alta                               | Moderada                                           |
| <b>Riesgo de<br/>irritación</b>                       | Bajo                                         | Bajo                                                     | Leve                               | Leve                                               |
| <b>Uso tradicional<br/>en veterinaria</b>             | Común                                        | Común<br>(uso principal en<br>humanos)                   | Poco<br>frecuente                  | Poco frecuente                                     |
| <b>Propiedades<br/>farmacológicas<br/>adicionales</b> | Antioxidante<br>natural,<br>antiinflamatorio | Neutro, rápido<br>metabolismo                            | Rico en<br>compuestos<br>fenólicos | Rico en<br>omega-6<br>(susceptible a<br>oxidación) |

(Feng *et al.*, 2021; X. Wu *et al.*, 2025)

Para la selección del vehículo se analizaron factores como la viscosidad, el riesgo de irritación y la tolerancia de la mucosa, factores que influyen directamente en la absorción y distribución del compuesto a través de la mucosa nasal en caballos (Feng *et al.*, 2021; F. Wu, Ma, *et al.*, 2025). El aceite de ajonjolí presenta características favorables para la administración intranasal, como alta tolerancia de la mucosa nasal, estabilidad oxidativa y bajo riesgo de irritación. Además, se

revisaron otras propiedades, como la solubilidad del CBD en cada uno de los aceites, con el objetivo de determinar su compatibilidad y viabilidad para la administración intranasal. En la **tabla 19** se presentan los valores de solubilidad reportados para diferentes aceites comúnmente empleados como vehículos lipofílicos. Esta información reforzó la elección del aceite de ajonjolí como el vehículo más adecuado dentro del diseño experimental, asegurando la estabilidad y biodisponibilidad del CBD en la formulación propuesta (Hossain *et al.*, 2023; Lodzki *et al.*, 2003; Tavčar & Vidak, 2024).

**Tabla 19.** Solubilidad de CBD en vehículos lipofílicos

| Aceite vegetal     | Solubilidad del CBD | Valor aproximado | Comentarios                                                        |
|--------------------|---------------------|------------------|--------------------------------------------------------------------|
| Aceite de ajonjolí | Moderada            | ~30–35 mg/mL     | Buena estabilidad oxidativa, compatible con las mucosas.           |
| Aceite de coco MCT | Alta                | ~50–60 mg/mL     | Alta biodisponibilidad y ampliamente utilizado en suplementos.     |
| Aceite de oliva    | Alta                | ~40–50 mg/mL     | Buena compatibilidad con la mucosa y buena estabilidad.            |
| Aceite de cáñamo   | Alta                | ~40–50 mg/mL     | Afinidad natural por los cannabinoides; puede oxidarse fácilmente. |
| Aceite de coco     | Alta                | ~50 mg/mL        | Similar al MCT; sólido a temperatura ambiente en algunos climas.   |
| Aceite de girasol  | Moderada            | ~30–35 mg/mL     | Menor capacidad que la de MCT, pero estable y accesible.           |

(Lodzki *et al.*, 2003; Tavčar & Vidak, 2024)

Además de la revisión bibliográfica, se consideró un estudio previo relacionado con la estabilidad del CBD en diversos aceites vegetales (Morelos Cruz, 2022); en dicho estudio, se observó que tanto el aceite de oliva como el aceite de ajonjolí mantienen la estabilidad del CBD por más tiempo, contrario a los aceites de girasol y de aguacate que presentaban un viraje de color. Asimismo, se ha reportado que el aceite de ajonjolí ofrece un adecuado balance entre solubilidad, estabilidad y tolerancia de la mucosa nasal (Abourehab *et al.*, 2021; Chaturvedi *et al.*, 2025), lo que lo convierte en un candidato apropiado como vehículo del CBD en formulaciones nasales o inyectables en medicina veterinaria.

En contraste, aunque el aceite de coco MCT presenta características favorables como vehículo lipídico, su menor viscosidad y su composición en triglicéridos de cadena media pueden favorecer una absorción más rápida y potencialmente variable, además de aumentar el riesgo de pérdida por goteo en administración intranasal (Gao et al., 2020). Por lo anterior, se seleccionó el aceite de ajonjolí con el objetivo de promover un perfil de absorción más controlado y reducir la variabilidad interindividual. Adicionalmente, se ha descrito que el aceite de ajonjolí contiene compuestos antioxidantes naturales, como sesamol y sesamina, que podrían contribuir a la estabilidad del CBD frente a procesos de oxidación (Cheng et al., 2024; Rahmanian et al., 2024).

Cabe señalar que actualmente la literatura no describe que el aceite de ajonjolí presente alguna actividad terapéutica asociada a las manifestaciones de estereotipias o a comportamientos asociados al estrés y la ansiedad. El aceite de ajonjolí en caballos solo se ha empleado como un complemento alimenticio para modificar el tránsito intestinal. Cabe señalar que, de manera teórica, se reconoce que el sesamol y la sesamina presentes en el aceite de ajonjolí, al ser antioxidantes, pueden mostrar efectos neuroprotectores a nivel celular (Ramazani et al., 2023).

Una vez seleccionado el aceite de ajonjolí, en la **figura 26** se observan soluciones oleosa homogéneas y todas a una concentración de 120 mg/mL de CBD, con un control de aceite de ajonjolí (placebo), la concentración de las soluciones se evaluaron mediante cromatografía por HPLC-DAD previo a su administración intranasal en los caballos, los resultados de la valoración de la SO de CBD se presentan en el **apartado 8.2.5** correspondiente al análisis del CBD y solución oleosa de CBD.



**Figura 26.** CBD en aceite de ajonjolí. Se observa una solución translúcida a base de aceite de ajonjolí junto con diversas muestras de aceite de ajonjolí con CBD a una concentración de 120 mg/mL.

#### **8.4 Evaluación del efecto ansiolítico del CBD administrado por vía intranasal en caballos**

Para descartar un efecto del vehículo se evaluó la respuesta conductual con la EM de los caballos al administrar aceite de ajonjolí (2.5 mL por narina); no se observaron modificaciones en la UAF por la administración del aceite de ajonjolí.

Para evaluar el efecto ansiolítico de CBD administrado por vía intranasal en caballos, se realizó una prueba piloto en la que se emplearon: dos dosis de CBD (sólido, blanco cristalino) de 0.6 y 1.2 mg/kg, 2 ejemplares por dosis y 5 tiempos de muestreo (0, 15, 30, 60 y 120 min), modificado de Ryan *et al.* (2021). El objetivo de esta prueba piloto fue la estandarización de la metodología para la evaluación del estado ansioso en caballos, que incluye la elaboración de la escala de mueca y la toma de muestras para el análisis cuantitativo de CBD en plasma.

Después de administrar la dosis de 0.6 mg/kg, no se observaron cambios en las UAF ni en las constantes fisiológicas evaluadas (temperatura, frecuencia respiratoria y frecuencia cardíaca); además, en las muestras de plasma no se encontró respuesta analítica por HPLC-DAD. Mientras que con la dosis de 1.2 mg/kg sí se observaron cambios en el comportamiento, específicamente en las UAF, así

como en las constantes fisiológicas, además de observarse respuesta analítica por HPLC-DAD. Por lo anterior, se estableció la dosis de 1.2 mg/kg para la evaluación de la fase experimental.

#### 8.4.1 Evaluación de la Escala de la Mueca equina (EM)

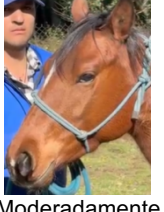
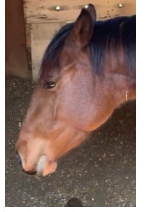
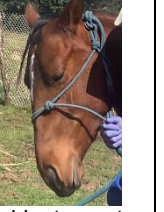
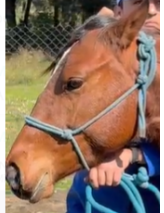
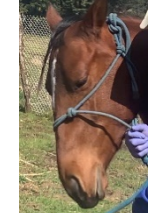
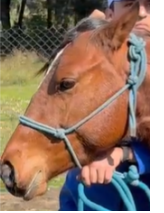
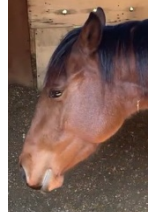
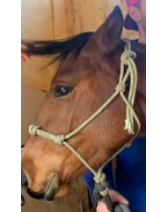
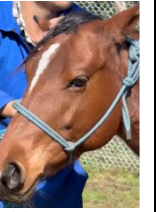
Para realizar la evaluación del estado de ansioso en caballos, se realizaron pruebas preliminares orientadas a optimizar las condiciones experimentales para la implementación de la EM como la selección, respuesta al estímulo estresor y la intensidad de la respuesta (**Figura 27**), para esto se registraron imágenes y videos de la región facial en condiciones de manejo controladas; integrando imágenes representativas de las seis unidades de acción facial (UAF) y su correspondiente puntuación en 3 niveles (no presente, moderadamente presente y evidentemente presente) (**apartado 2.2**).



**Figura 27.** Respuesta del caballo al estímulo estresor. Se observa la tensión generalizada y la respuesta de huida del caballo.

En la **tabla 20** se presenta la escala de la mueca en equinos, representada con imágenes, junto con una breve descripción de la UAF.

**Tabla 20.** Desarrollo de la Escala de la Mueca equina

| Orejas rígidas hacia atrás                                                                                                                                                                               |                                                                                     |                                                                                     | Endurecimiento orbital                                                                                                                                                                            |                                                                                       |                                                                                       |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                                         |    |    |                                                                                                                  |    |    |
| No presente (0)                                                                                                                                                                                          |                                                                                     |                                                                                     | Moderadamente presente (1)                                                                                                                                                                        |                                                                                       |                                                                                       |
| Moderadamente presente (1)                                                                                                                                                                               |                                                                                     |                                                                                     | Evidentemente presente (2)                                                                                                                                                                        |                                                                                       |                                                                                       |
| Evidentemente presente (2)                                                                                                                                                                               |                                                                                     |                                                                                     | No presente (0)                                                                                                                                                                                   |                                                                                       |                                                                                       |
| Moderadamente presente (1)                                                                                                                                                                               |                                                                                     |                                                                                     | Evidentemente presente (2)                                                                                                                                                                        |                                                                                       |                                                                                       |
| Evidentemente presente (2)                                                                                                                                                                               |                                                                                     |                                                                                     | El párpado presenta un cierre parcial o total. Se debe registrar cualquier cierre que reduzca significativamente el tamaño del ojo.                                                               |                                                                                       |                                                                                       |
| Tensión por encima del área de los ojos                                                                                                                                                                  |                                                                                     |                                                                                     | Músculos masticatorios prominentes y tensos                                                                                                                                                       |                                                                                       |                                                                                       |
|                                                                                                                         |    |    |                                                                                                                  |    |    |
| No presente (0)                                                                                                                                                                                          |                                                                                     |                                                                                     | Moderadamente presente (1)                                                                                                                                                                        |                                                                                       |                                                                                       |
| Moderadamente presente (1)                                                                                                                                                                               |                                                                                     |                                                                                     | Evidentemente presente (2)                                                                                                                                                                        |                                                                                       |                                                                                       |
| Evidentemente presente (2)                                                                                                                                                                               |                                                                                     |                                                                                     | Cuando los músculos superciliares se contraen, el hueso de la cresta temporal se vuelve más visible. Si este hueso es claramente perceptible, se debe registrar como "obviamente presente" o "2". |                                                                                       |                                                                                       |
| La tensión en los músculos de la masticación se manifiesta como una mayor contracción en la zona bucal. Si estos músculos son claramente visibles, se deben codificar como "obviamente presentes" o "2". |                                                                                     |                                                                                     | Boca tensa y mentón pronunciado                                                                                                                                                                   |                                                                                       |                                                                                       |
| Boca tensa y mentón pronunciado                                                                                                                                                                          |                                                                                     |                                                                                     | Fosas nasales tensas y aplanamiento del perfil                                                                                                                                                    |                                                                                       |                                                                                       |
|                                                                                                                       |  |  |                                                                                                                |  |  |
| No presente (0)                                                                                                                                                                                          |                                                                                     |                                                                                     | Moderadamente presente (1)                                                                                                                                                                        |                                                                                       |                                                                                       |
| Moderadamente presente (1)                                                                                                                                                                               |                                                                                     |                                                                                     | Evidentemente presente (2)                                                                                                                                                                        |                                                                                       |                                                                                       |
| Evidentemente presente (2)                                                                                                                                                                               |                                                                                     |                                                                                     | La tensión bucal se evidencia por un labio superior retraído y un labio inferior prominente, lo que forma una especie de "barbilla".                                                              |                                                                                       |                                                                                       |
| Las fosas nasales están dilatadas y tensas; la nariz parece aplanada y los labios se estiran.                                                                                                            |                                                                                     |                                                                                     |                                                                                                                                                                                                   |                                                                                       |                                                                                       |

Contar con una EM con imágenes ilustrativas de cada UAF reduce la variabilidad en la interpretación del evaluador, lo que permite aumentar la precisión del índice conductual para cada estudio en el cual se emplee esta escala.

Con la finalidad de estandarizar la EM y captar de manera óptima las unidades de acción facial, se evaluaron dinámicamente los ángulos de grabación que cubrieran adecuadamente dichas unidades. La literatura sugiere que la colocación de dos

cámaras dentro del establo del ejemplar es suficiente para registrar los UAF (Dalla Costa *et al.*, 2014) (**Figura 28**); sin embargo, esta configuración no resulta óptima en la práctica, ya que el movimiento constante del caballo genera puntos ciegos que pueden impedir la obtención de la evidencia visual necesaria para la evaluación. Por ello, en este trabajo se determinó que la posición de las cámaras debía ajustarse directamente al posicionamiento del ejemplar unos minutos antes de cada evaluación.



**Figura 28.** Imagen ejemplificativa del posicionamiento de cámaras recomendado.

Un aspecto clave en el desarrollo de la escala de la muela fue la definición del estímulo estresor, el cual es fundamental debido a que los caballos presentan una elevada sensibilidad a estímulos ambientales y sociales, la respuesta emocional observada puede variar no solo en función del estímulo estresor aplicado, sino también por características individuales tales como temperamento, fin zootécnico, el tipo de manejo al que está acostumbrado y la interacción con el personal humano, entre otras. Por tal motivo, se consideraron y aplicaron distintos estímulos comúnmente asociados a respuestas de estrés en esta especie, incluyendo sonidos estridentes (wail), movimientos abruptos de objetos (costal), la presencia de otros

individuos con comportamiento de dominancia territorial (equino macho), así como la presencia de personas ajenas al manejo habitual de los animales.

La aplicación de estos estímulos permitió evaluar el nivel de reactividad de los ejemplares y, a partir de ello, identificar un estímulo estresor común al que todos los sujetos eran susceptibles, sin inducir respuestas excesivas ni comprometer el bienestar animal ni la seguridad de los manejadores. De esta manera, se garantizó la aplicación de un estímulo estresor estandarizado y éticamente aceptable (Christensen et al., 2005), como la agitación del costal, para evaluar el estado emocional mediante la escala de la mueca.

Aunque el presente estudio fue una prueba piloto orientada a estandarizar la implementación de la EM como herramienta para evaluar el estado de ansiedad en los caballos y, a su vez, analizar el efecto del CBD en ellos. Es relevante destacar que las evaluaciones preliminares aportaron información adicional de gran utilidad para el desarrollo metodológico del proyecto. Durante esta fase, además de desarrollar la EM, se obtuvieron muestras sanguíneas destinadas al desarrollo del método analítico por HPLC-DAD.

#### **8.4.2 Evaluación del comportamiento de caballos administrados con CBD mediante escala de la mueca asociada a la ansiedad**

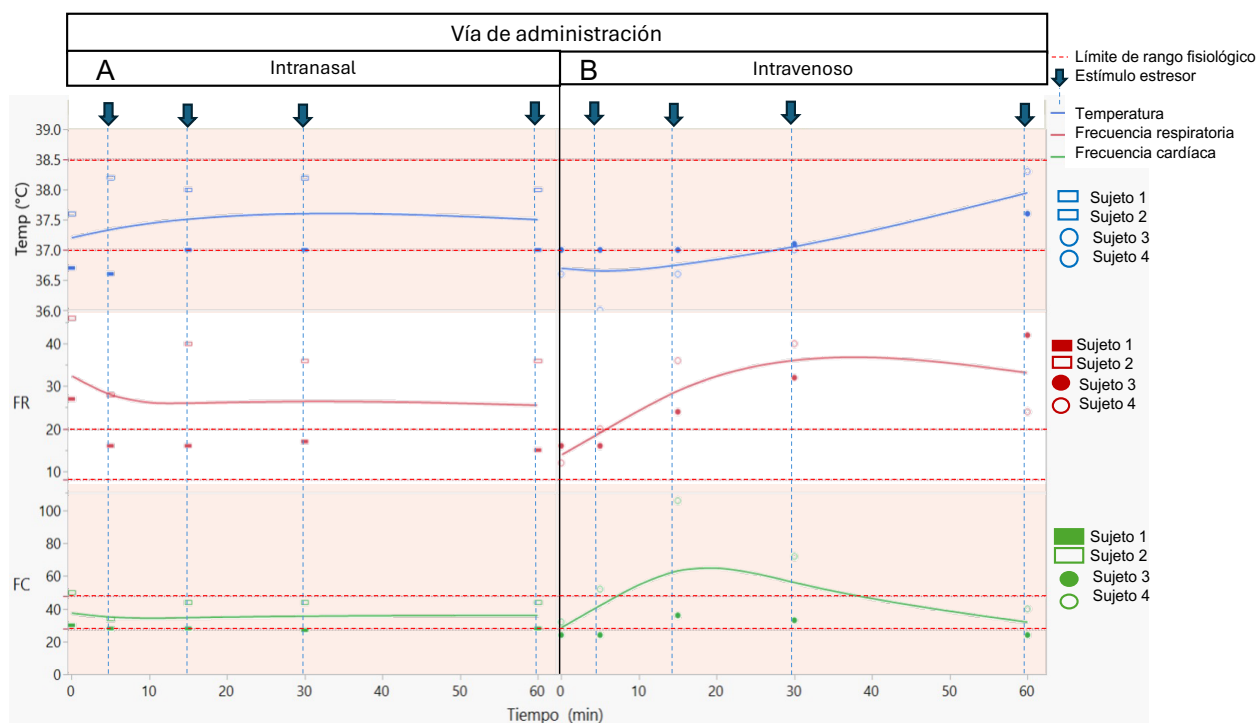
Una vez desarrollada la EM y determinada la posición de las cámaras, se continuó con la siguiente fase del experimento, la cual consistió en la administración vía intranasal e intravenosa de CBD (1.2 mg/kg) en dos ejemplares por cada vía de administración, con tiempos de muestreo de 0, 5, 15, 30, 60 minutos, con tres observaciones por caballo.

Para un caballo Cuarto de Milla, las constantes fisiológicas para la temporada otoño-invierno en zonas altas como en el Ajusco, CDMX, en estado de reposo son: frecuencia respiratoria (FR) de 8 a 20 respiraciones por minuto (rpm), frecuencia cardíaca (FC) de 28 a 48 palpitaciones por minuto (ppm) y una temperatura ( $T^{\circ}\text{C}$ ) de 37-38.5  $^{\circ}\text{C}$  (Romero Rojo, 2021).

Previo a la administración de CBD (1.2 mg/kg) por vía intranasal, se obtuvieron las medias de las constantes fisiológicas para cada caballo (n=2 por vía de administración): T (°C) ( $37.15 \pm 0.64$ ), FR ( $36.5 \pm 13.44$  rpm) y FC ( $40 \pm 14.14$  ppm) y la mayoría de las constantes fisiológicas, excepto la FR, permanecieron dentro de los rangos fisiológicos normales.

Posteriormente, se administró la SO de CBD (1.2 mg/kg) a cada caballo. En la primera evaluación (5 min) se registró una disminución de la FR ( $22 \pm 8.49$  rpm), logrando establecerse dentro de los valores fisiológicos basales. Cabe señalar que, por vía intranasal, cada vez que se aplicó el estímulo estresor, la T°C, FR y FC se mantuvieron sin cambios a partir de los 5 min y hasta los 60 min (**Figura 29A**). Lo anterior sugiere que el CBD podría ejercer un efecto ansiolítico al prevenir el incremento de las respuestas fisiológicas evaluadas. Esta respuesta fisiológica puede estar asociada a que la administración intranasal favorece un acceso directo al SNC a través de las vías olfatorias y del nervio del trigemino, modulando de manera diferencial la cinética de distribución y el perfil de respuesta fisiológica (Deiana *et al.*, 2012; Paudel *et al.*, 2010).

Antes de la administración de CBD por vía intravenosa (1.2 mg/kg), las constantes fisiológicas obtenidas fueron T°C ( $36.8 \pm 0.28$ ), FR ( $14 \pm 2.8$  rpm) y FC ( $28 \pm 6.6$  ppm); una vez aplicado el estímulo estresor, se observó un aumento de la FR y en la FC a partir de los 5 minutos ( $36.5 \pm 0.271$ ,  $38 \pm 19.8$ ); a los 60 minutos todas las constantes fisiológicas se elevaron: T°C ( $37.95 \pm 0.5$ ), FR ( $33 \pm 12.73$  rpm) y FC ( $32 \pm 11.31$  ppm). Por lo tanto, al incrementarse la frecuencia respiratoria y la frecuencia cardíaca en los primeros minutos tras la aplicación de cada estímulo estresor, se sugiere que los animales muestran signos de estrés y ansiedad. Lo anterior podría deberse a que la dosis de CBD (1.2 mg/kg, intravenoso) no es suficiente para inducir efecto ansiolítico en equinos (**Figura 29 B**).

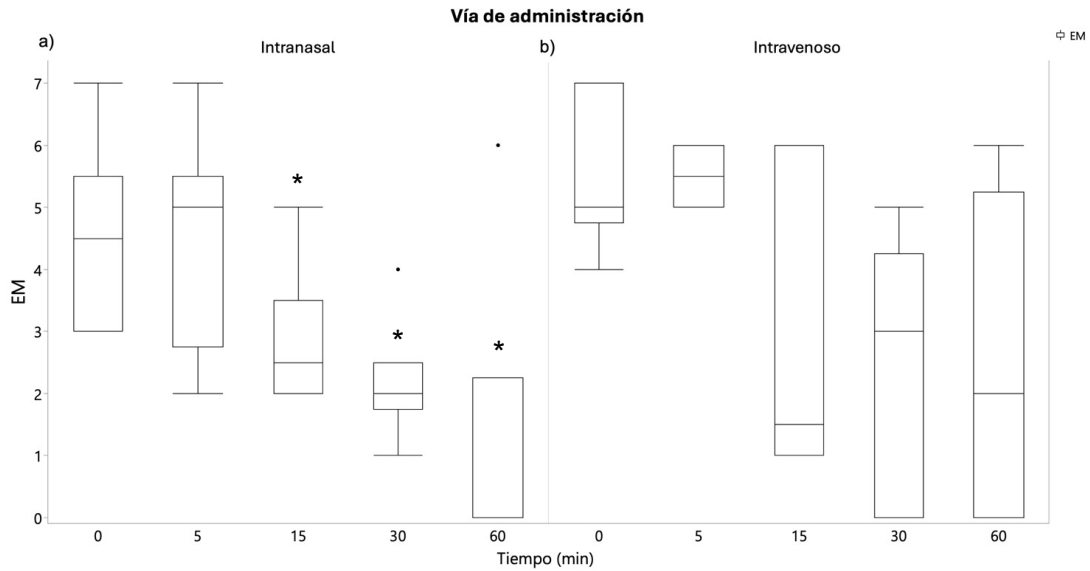


FR: Frecuencia respiratoria; FC: Frecuencia cardíaca;

**Figura 29.** Comportamiento temporal de la T°C, FR y FC tras la administración de CBD por vía intranasal e intravenosa en equinos.

Para la evaluación de la EM en la vía intranasal en estado basal (tiempo cero) se observó una media de  $4.5 \pm 0.62$ , a los 15 minutos después de la aplicación del estímulo estresor la puntuación de la EM disminuye ( $2.83 \pm 0.477$ ), alcanzando la puntuación más baja a los 60 minutos ( $1.17 \pm 0.98$ ), lo cual es estadísticamente significativo de acuerdo con la prueba de Wilcoxon- Kruskal-Wallis ( $\chi^2 = 13.5563$ ,  $gl = 4$ ,  $p = 0.0089$ ). Este patrón, en la reducción sostenida de las UAF, sugiere un estado de relajación inducido por el CBD y, en consecuencia, un potencial efecto ansiolítico (**Figura 30a**).

Por otra parte, en la evaluación de la EM para la vía intravenosa no se presenta una diferencia estadísticamente significativa ( $\chi^2 = 10.4572$ ,  $gl = 4$ ,  $p = 0.0334$ ), aunque sí se observa una tendencia a disminuir las UAF a través del tiempo (**Figura 30b**), por lo que resulta interesante evaluar un mayor número de animales con el objetivo de diferenciar si la carencia de efecto ansiolítico se debe a esta dosis administrada de CBD.



**Figura 30.** Distribución de los puntajes de la EM en función de la vía de administración de CBD en los diferentes tiempos de muestreo.

El correlato entre los cambios fisiológicos y la evolución de las puntuaciones de la EM refuerza la validez convergente de la escala, lo que sugiere que la disminución de la evaluación de las UAF se asocia con modificaciones fisiológicas compatibles con un estado de menor activación o de menor estrés (Eichler, Ehrle, et al., 2023; Eichler, Poźniak, et al., 2023). Farmacológicamente, las diferencias observadas respecto a la magnitud del efecto observado de CBD sobre marcadores de estrés entre las vías de administración pueden explicarse por variaciones en la velocidad de absorción, la distribución y el acceso al SNC, aspectos ampliamente documentados para las vías intranasal e intravenosa (Novack *et al.*, 2023; Richmond *et al.*, 2017).

En conjunto, estos resultados indican que la administración intranasal induce una modulación progresiva y sostenida de la respuesta conductual, reflejada en la disminución de la puntuación de la EM y previniendo el cambio en las respuestas de T°C, FR y FC inducidas por el estímulo estresor. El correlato entre el análisis estadístico y la representación gráfica respalda la sensibilidad de la EM como herramienta para detectar cambios temporales y su pertinencia para evaluar el efecto farmacológico por esta vía de administración. Asimismo, los hallazgos

sugieren que la vía intranasal podría favorecer una reducción gradual del nivel de tensión, evitando cambios abruptos en la respuesta fisiológica y conductual, lo cual puede resultar favorable en contextos clínicos o experimentales donde se busca una respuesta más estable, particularmente en la evaluación del efecto ansiolítico de compuestos con acción sobre el SNC (Crowe & Hsu, 2022; Upadhyay *et al.*, 2025).

El presente trabajo constituye el primer estudio piloto que evalúa el potencial efecto ansiolítico del CBD administrado por vía intranasal en caballos; la evidencia recopilada indica que la administración de CBD por vía intranasal presenta un patrón conductual y fisiológico compatible con un posible efecto ansiolítico; mientras que la administración por vía intravenosa no refleja una respuesta comparable bajo las condiciones del estudio. Hasta la fecha, la evidencia disponible en equinos se limita a un reporte de caso que describe el uso de CBD por vía oral para modificar conductas estereotipadas, como el mordisqueo de cuna y la aerofagia, lo que resultó en un efecto favorable después de 30 días de terapia sin regresión en el comportamiento después de finalizar el tratamiento (Cunha *et al.*, 2023). No se identificaron estudios previos que hayan evaluado de manera sistemática el efecto ansiolítico del CBD ni su administración por vía intranasal en esta especie. En equinos, la evidencia disponible se centra mayormente en la caracterización farmacocinética y la tolerabilidad, sin que aún exista una dosis terapéutica claramente establecida para patologías específicas (Eichler, Poźniak, *et al.*, 2023; Sánchez de Medina *et al.*, 2023).

Esta ausencia de evidencia en equinos contrasta con la amplia investigación desarrollada en otras especies, particularmente en roedores y humanos. En humanos, los efectos ansiolíticos agudos se han observado con dosis únicas cercanas a 300–600 mg/kg en contextos experimentales de ansiedad inducida (Bergamaschi *et al.*, 2011; Bolsoni *et al.*, 2022; Guimarães *et al.*, 1994). En roedores, la dosis ansiolítica efectiva es de 2.5, 5 y 10 mg/kg (Melas *et al.*, 2021).

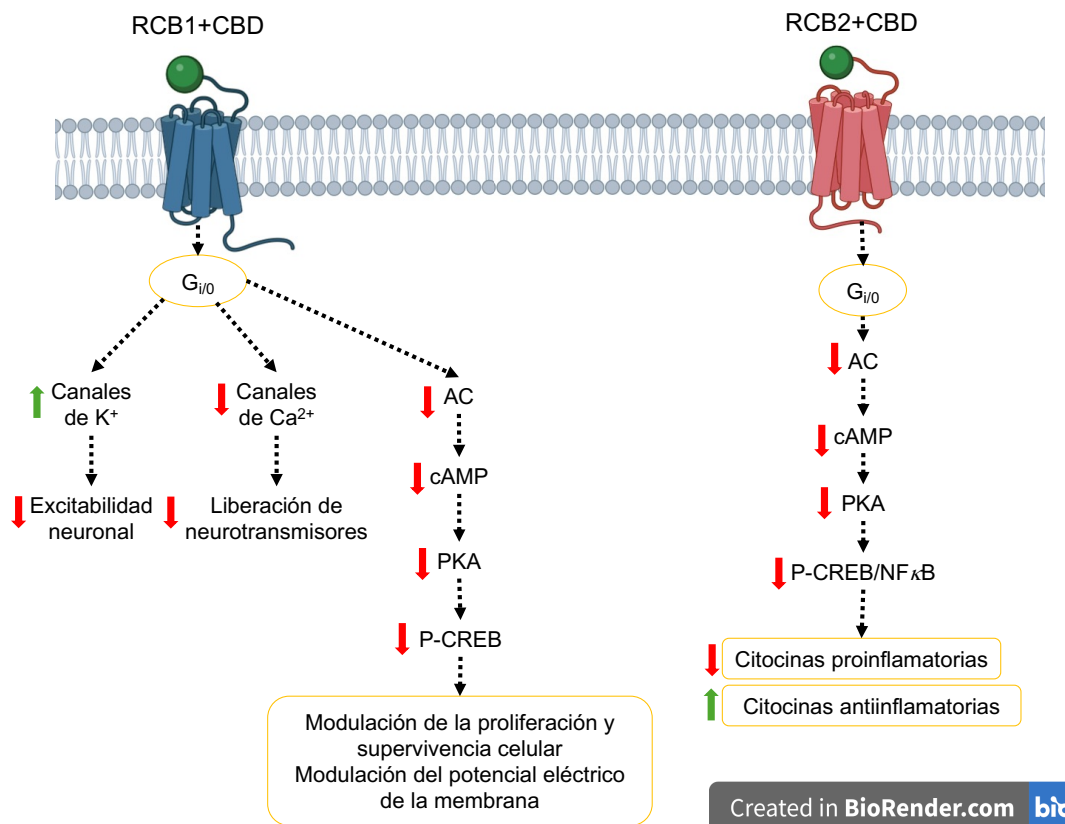
#### 8.4.3 Efecto ansiolítico del CBD sobre la EM

La expresión facial en los caballos constituye un componente conductual sensible a los estados emocionales (Hernández-Avalos *et al.*, 2021; Mota-Rojas *et al.*, 2025). La EM se basa en la evaluación de las UAF mismas que reflejan la actividad del sistema nervioso que se asocia con alteraciones de la emoción y del bienestar en distintas especies, incluyendo a los equinos (Hernández-Avalos *et al.*, 2021). Si bien las distintas EM fueron inicialmente validadas para el dolor agudo en animales mediante cambios faciales específicos, se reconoce que la EM también capta cambios conductuales vinculados a estados de ansiedad o estrés, sobre todo cuando estos no están acompañados de estímulos nociceptivos claros, lo que ayuda a distinguir entre ambos fenómenos mediante un contexto integral de signos conductuales y fisiológicos (Evangelista *et al.*, 2022).

La diferenciación entre dolor y ansiedad en equinos es clínicamente relevante, pues ambos estados comparten activación del sistema nervioso autónomo y pueden inducir signos faciales similares, distinguiéndose principalmente por la presencia de comportamientos complementarios (Hernández-Avalos *et al.*, 2021). En condiciones de dolor, los caballos exhiben posturas protectoras, disminución de la exploración del ambiente y conductas orientadas a evitar el estímulo nocivo; mientras que la ansiedad se manifiesta como hipervigilancia y tensión muscular generalizada. Esta diferenciación es fundamental para interpretar adecuadamente las puntuaciones de la EM (Hernández-Avalos *et al.*, 2021).

Como ya se describió anteriormente, el CBD ejerce sus efectos biológicos en equinos mediante un perfil farmacológico multimodal que implica la activación de diversos receptores y vías de señalización relacionados con la regulación de la ansiedad y la modulación de la respuesta inmune. Entre los mecanismos más descritos se encuentra la modulación directa del SEC, es decir, la señalización a través de los receptores RCB<sub>1</sub> y RCB<sub>2</sub> (**Figura 31**) (Blebea *et al.*, 2025). El CBD actúa principalmente como antagonista y modulador alostérico negativo del receptor RCB<sub>1</sub>, reduciendo la señalización inducida por agonistas como el THC y el 2-arquidonoilglicerol (2-AG), lo que contribuye a la ausencia de efectos psicoactivos y

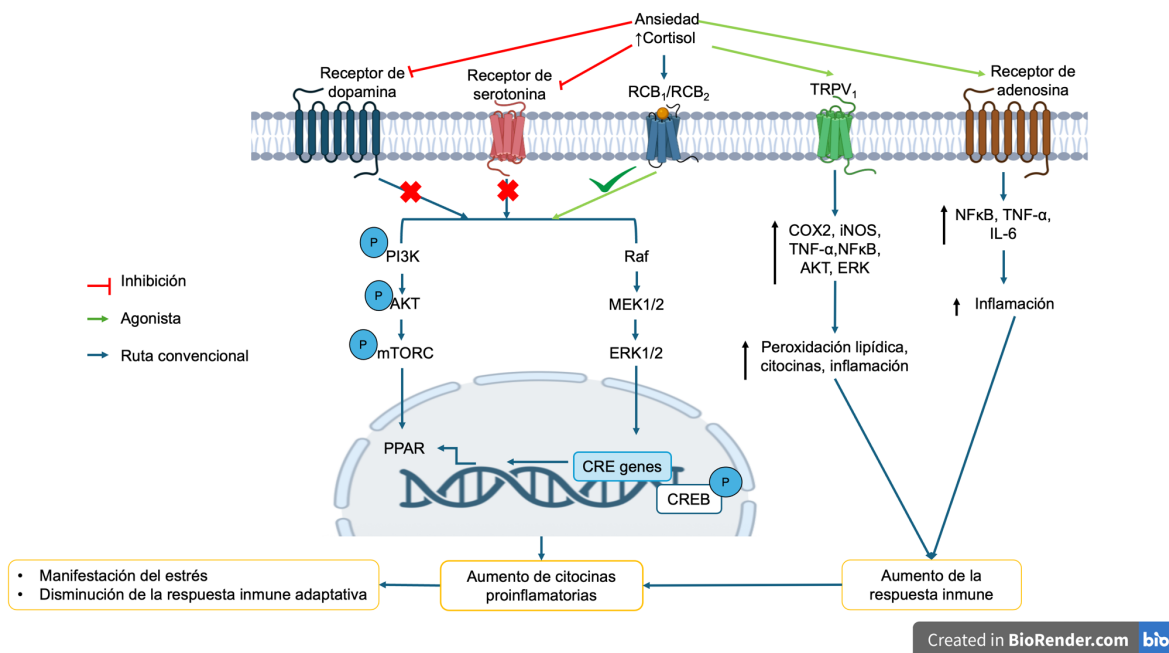
a la modulación de la excitabilidad neuronal, con consecuencia en la supervivencia celular (Blebea *et al.*, 2025). De manera similar, el CBD disminuye la activación del receptor RCB<sub>2</sub> inducida por agonistas exógenos, lo que sugiere un papel regulador en procesos inflamatorios y neuroinmunes (Almeida & Devi, 2020). De forma complementaria, la presencia de CBD en el espacio sináptico inhibe la actividad enzimática de amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH), responsable de la degradación de la anandamida (AEA), lo que incrementa la disponibilidad de este endocannabinoide y potencia la señalización endógena del sistema cannabinoide; esto es importante debido a que AEA puede actuar como un inhibidor retrógrado de la actividad neuronal a través de su unión a los receptores RCB<sub>1</sub> presinápticos regulando las respuestas emocionales y atenuando la reactividad autonómica al estrés (Eichler, Ehrle, *et al.*, 2023; Mayo *et al.*, 2020; Schmidt *et al.*, 2021).



**Figura 31.** Vías de señalización de los receptores RCB<sub>1</sub> y RCB<sub>2</sub> (Blebea *et al.*, 2025). Se observa la cascada de señalización mediada por estos receptores

Sobre el sistema endocannabinoide ampliado, se describió que el CBD puede actuar como modulador alostérico positivo de los receptores GABA<sub>A</sub>, potenciando la neurotransmisión inhibitoria asociada a efectos ansiolíticos; estos receptores se encargan de disminuir la capacidad de una célula nerviosa para recibir, crear o enviar mensajes químicos a otras células nerviosas (Ghit *et al.*, 2021). Además, el CBD interactúa con receptores nucleares como PPAR $\gamma$ , involucrados en la regulación de la expresión génica relacionada con procesos de transcripción neuroprotectores y antiinflamatorios (Barakat *et al.*, 2025; Blebea *et al.*, 2025; Marsch *et al.*, 2007; Terzian *et al.*, 2009).

Existen receptores clave cuya respuesta se ve alterada por el microambiente inflamatorio generado por los procesos de ansiedad, particularmente por el aumento de cortisol; entre ellos, destacan los receptores de dopamina (D<sub>2</sub>), serotonina (5-HT<sub>1A</sub>), adenosina (A<sub>1</sub>), el potencial transitorio vanilloide (TRPV1) y los del SEC (RCB<sub>1</sub>-RCB<sub>2</sub>) (Almeida & Devi, 2020). Se describe que estos receptores, durante el proceso fisiológico de ansiedad, mantienen una activación sostenida de vías intracelulares como PI<sub>3</sub>K/AKT/mTOR y MAPK/ERK, acompañada de un aumento en la expresión de mediadores proinflamatorios como NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , COX-2 e iNOS (**Figura 32**), lo que favorece un estado de hiperreactividad fisiológica, incrementa la liberación de citocinas proinflamatorias y disminuye la capacidad adaptativa. Estas rutas culminan en la activación de factores de transcripción, como la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB), y en modificaciones en la expresión génica asociada a la manifestación física y conductual del estrés (Blebea *et al.*, 2025; Guidotti *et al.*, 2013; Marsch *et al.*, 2007; Terzian *et al.*, 2009). En la **figura 32** se muestra un diagrama en donde se indican los mecanismos de señalización durante un proceso de ansiedad.



**Figura 32.** Vías de señalización involucradas en la respuesta fisiológica de ansiedad (Blebea et al., 2025; Marsch et al., 2007; Terzian et al., 2009).

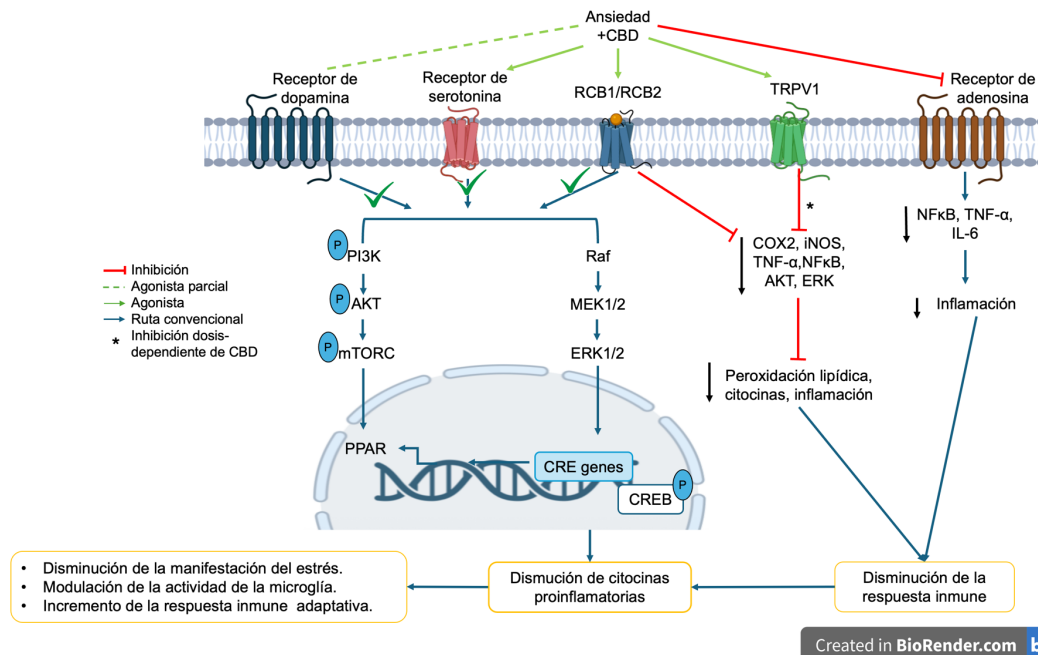
Estos receptores son particularmente relevantes debido a que los cannabinoides presentan la capacidad de interactuar y modificar su actividad: el CBD puede actuar como un agonista parcial del receptor de dopamina (D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>) (Stark *et al.*, 2020), teniendo como respuesta fisiológica el aumento en la señalización de adenosina monofosfato cíclico (AMPC), trifosfato de inositol (PI<sub>3</sub>), generando un aumento en la liberación de Ca<sup>2+</sup> intracelular y con ello, la liberación de neurotransmisores; además promueve la activación de proteína cinasa C (PKC) que conlleva la modulación negativa de los canales de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>. A nivel conductual, el sistema dopaminérgico participa en múltiples funciones neurológicas; sin embargo, en el contexto de la ansiedad, su papel se relaciona principalmente con la modulación de la salida de estímulos potencialmente amenazantes, el estado de alerta, la atención y la regulación de la conducta exploratoria e inhibitoria (Bromberg-Martin *et al.*, 2010; Kibret *et al.*, 2023; Zarrindast & Khakpai, 2015).

Asimismo, el CBD puede actuar como agonista parcial del receptor serotoninérgico 5-HT<sub>1A</sub>; la activación de este receptor disminuye la activación de la adenilato ciclasa

(AC), AMPc, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , la liberación de neurotransmisores como glutamato; y conlleva a un aumento en la apertura de canales de  $\text{K}^+$ , generando una hiperpolarización de la membrana celular; teniendo como resultado la disminución de la excitabilidad neuronal y con ello una modulación en el control sobre respuestas emocionales exagera, reflejándose en la conducta como una disminución en la hipervigilancia, en el comportamiento de huida y relajación muscular, signos medibles a través de la EM (Claire *et al.*, 2025; Melas *et al.*, 2021).

Por otra parte, cabe señalar que el receptor  $\text{TRPV}_1$  es un canal iónico no selectivo altamente permeable a  $\text{Ca}^{2+}$ , cuando se da su activación genera el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, promoviendo la excitabilidad neuronal y la liberación de glutamato, favoreciendo la respuesta exacerbada al estrés; con dosis elevadas de CBD, la activación del canal  $\text{TRPV}_1$  por el CBD puede incrementar la excitabilidad neuronal en circuitos límbicos, contrarrestando el efecto ansiolítico mediado por  $5\text{-HT}_{1A}$  y favoreciendo respuestas conductuales asociadas a mayor reactividad al estrés. Este fenómeno explica la curva dosis-respuesta en U invertida descrita para el CBD en modelos de ansiedad (Linares *et al.*, 2019).

En resumen, la administración de CBD modifica este entorno molecular (**Figura 33**). A través de la activación parcial de  $5\text{-HT}_{1A}$ , la modulación de  $\text{RCB}_1/\text{RCB}_2$  por aumento del tono endocannabinoide, la potenciación de la neurotransmisión GABAérgica, la activación de  $\text{PPAR}\gamma$ , en dosis bajas, la inhibición de  $\text{TRPV}_1$  y de la señalización mediada por  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , el CBD favorece una regulación negativa de las rutas proinflamatorias y una modulación positiva de los mecanismos asociados a la respuesta adaptativa. Este efecto combinado se traduce en una disminución de la expresión fisiológica del estrés, una menor producción de citocinas proinflamatorias y una modulación de la respuesta inmune (Barakat *et al.*, 2025; Blebea *et al.*, 2025; Marsch *et al.*, 2007; Terzian *et al.*, 2009).



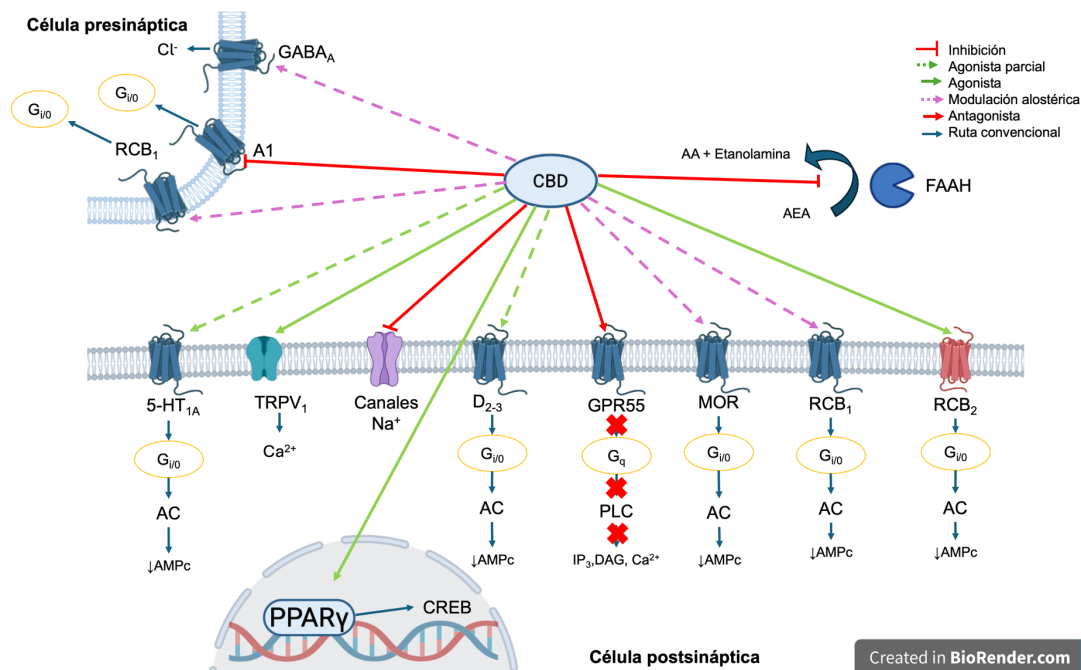
**Figura 33.** Modulación por CBD de las vías de señalización implicadas en la respuesta fisiológica de ansiedad (Blebea *et al.*, 2025; Marsch *et al.*, 2007; Terzian *et al.*, 2009).

Aunque estos mecanismos han sido descritos principalmente en humanos (Blebea *et al.*, 2025) y en otras especies como los caninos y roedores (Vries & Cornejo, 2025; Austrich-Olivares *et al.*, 2022; Huffstetler *et al.*, 2023), en equinos la evidencia disponible continúa siendo limitada y se basa en observaciones conductuales, como la disminución de la reactividad o la frecuencia de estereotipias (Cunha *et al.*, 2023). Asimismo, es importante destacar que los hallazgos reportados en otras especies no siempre pueden extrapolarse a equinos, debido principalmente a diferencias fisiológicas y de tamaño.

Aún no existen estudios que vinculen directamente las concentraciones sistémicas alcanzadas con CBD con la expresión de estos mecanismos moleculares en caballos, lo que impide considerar al CBD como un ansiolítico clínicamente probado en esta especie; pero cabe señalar que el mecanismo de acción que se describe en humanos y la manifestación conductual observada en los caballos puede dar un indicio de la modulación que se presenta tras la administración de CBD, esto debido

a que cualquier alteración de las condiciones que se encuentran en el ejemplar puede conducir a la aparición o modulación de comportamientos específicos, como lo son las estereotipias (Dezfouli *et al.*, 2014).

De esta manera, el presente estudio integra el comportamiento observado mediante la EM con las vías de señalización descritas para el CBD en otras especies, proponiendo un modelo mecanístico que permita interpretar los hallazgos conductuales desde una perspectiva farmacodinámica. En la **figura 34** se ilustra la convergencia de las principales vías de señalización moduladas por el CBD, indicando que este interactúa directa o indirectamente con receptores acoplados a proteínas  $G_{i/o}$  ( $RCB_1$ ,  $A_1$ ,  $5-HT_{1A}$ ,  $D_{2-3}$ , MOR y  $RCB_2$ ), generando disminución de AMPc y reducción de la entrada de  $Ca^{2+}$ , lo que culmina en menor liberación de glutamato. Asimismo, antagoniza funcionalmente GPR55 (acoplado a  $G_q$ ), reduciendo la señalización dependiente de PLC e  $IP_3$  y modula canales de sodio dependientes de voltaje. En paralelo, puede activar  $TRPV_1$  (a concentraciones elevadas), aumentando el  $Ca^{2+}$  intracelular, lo que explica el posible perfil bifásico del efecto. A nivel nuclear, la activación de PPAR $\gamma$  contribuye a la regulación transcripcional y a la modulación antiinflamatoria. La integración de estas vías converge en la disminución de la hiperexcitabilidad límbica asociada a la respuesta ansiosa.



**Figura 34.** Convergencia mecánica de la actividad ansiolítica de CBD (Barakat et al., 2025; Blebea et al., 2025; Marsch et al., 2007; SEIC, 2002; Terzian et al., 2009).

En este marco farmacodinámico, la diferenciación entre las vías de administración adquiere relevancia, ya que la vía intravenosa favorece una distribución sistémica homogénea e inmediata del compuesto, mientras que la vía intranasal ofrece la posibilidad de un acceso más directo al SNC a través de las vías olfatorias y del nervio trigémino, con menor impacto en el metabolismo de primer paso. Estas diferencias farmacocinéticas podrían modificar la concentración cerebral alcanzada y la duración de la exposición a los blancos moleculares descritos, alterando así la relación entre la dosis administrada y el efecto ansiolítico observado, como lo descrito por Deiana *et al.* (2012) y Paudel *et al.* (2010).

## 9. Limitaciones y perspectivas del estudio

A partir de estas evaluaciones, fue posible establecer lineamientos y especificaciones preliminares para la implementación de la metodología de administración intranasal de CBD en caballos. Sin embargo, debido al número de ejemplares incluidos en cada prueba, se considera indispensable incrementar el tamaño muestral con el fin de conferir mayor poder estadístico a las evaluaciones. Esto permitirá delinear con precisión el perfil farmacocinético del CBD administrado por esta vía, así como establecer correlaciones estadísticas robustas entre los datos obtenidos por cromatografía y las manifestaciones fisiológicas y conductuales registradas mediante la EM.

En esta etapa del estudio, aún no es posible establecer la farmacocinética completa, la biodisponibilidad relativa, la equivalencia entre vías de administración ni una eficacia clínica ansiolítica concluyente.

Asimismo, el análisis conjunto de las respuestas cromatográficas y de las manifestaciones conductuales evaluadas mediante la EM sugiere un posible efecto terapéutico asociado a la dosis de 1.2 mg/kg; sin embargo, este hallazgo deberá confirmarse en estudios posteriores con diseños experimentales más robustos. En este sentido, se recomienda la implementación de un estándar interno con el fin de mejorar la precisión analítica.

A partir de estos datos, también es posible concluir que, si bien la resina de CBD mostró ciertos efectos observables relacionados con la disminución de comportamientos vinculados a procesos ansiosos, su grado de pureza sugiere la presencia de compuestos secundarios que podrían estar interfiriendo con la respuesta fisiológica del organismo. De manera concordante, en el análisis cromatográfico se identificaron interferencias en las muestras de caballos que recibieron esta formulación, lo que dificulta la interpretación de los perfiles obtenidos y limita su aplicabilidad en estudios farmacocinéticos formales. Por ello, el empleo de CBD en forma pura es la alternativa más adecuada para futuras fases experimentales.

## 10. Conclusiones

Se logró el desarrollo y validación de un método analítico para la detección y cuantificación de CBD en muestras de plasma equino por HPLC-DAD, un método robusto, que cumple con los criterios establecidos por la ICH M10 ; por lo cual, se puede afirmar que el método analítico es selectivo, preciso, exacto y lineal; siendo un método con eficiencia analítica, con bajo consumo de recursos y tiempo uso de equipo; lo que resulta en un método altamente eficiente y económico comparados con los métodos previamente reportados.

La incorporación de un sistema de purificación de la muestra mediante extracción en fase sólida permitió reducir las interferencias derivadas de la matriz biológica, optimizar el desempeño cromatográfico y disminuir el tiempo total de análisis, cumpliendo con los criterios de aceptación establecidos para métodos bioanalíticos. Estos resultados confirman la confiabilidad del método para su aplicación en estudios farmacocinéticos y de monitoreo plasmático de CBD en esta especie.

Por otra parte, se diseñó e implementó un método de administración de CBD por vía intranasal, que resultó factible y seguro para su aplicación en caballos bajo las condiciones evaluadas. La elección de esta vía de administración representa una alternativa no invasiva que podría ofrecer ventajas en cuanto a la rapidez de absorción y la facilidad de manejo, aspectos relevantes en el contexto de la medicina veterinaria equina.

La evidencia preliminar indica que la administración intranasal induce una modulación progresiva y sostenida de la respuesta conductual, reflejada en la disminución de la puntuación de las UAF, indicando que la EM es sensible para detectar cambios temporales y su pertinencia para evaluar el efecto farmacológico por esta vía de administración. Asimismo, los hallazgos sugieren que la vía intranasal presenta mejor efecto ansiolítico de CBD con respecto a la vía intravenosa. Cabe mencionar que los resultados obtenidos permiten considerar este

trabajo como un estudio piloto que aporta evidencia preliminar para el diseño de investigaciones posteriores de mayor alcance.

En conjunto, los hallazgos de este estudio piloto sugieren que la administración intranasal de CBD, evaluada mediante herramientas conductuales y respaldada por un método analítico validado, constituye un enfoque viable para el estudio de la ansiedad en caballos. No obstante, al tratarse de un estudio piloto, se reconoce la necesidad de investigaciones futuras con un mayor número de individuos, diseños experimentales controlados y evaluaciones cuantitativas complementarias que permitan confirmar y ampliar los resultados. De esta manera, el presente trabajo contribuye al avance del conocimiento sobre el uso de los cannabinoides en medicina veterinaria y al desarrollo de metodologías aplicables al estudio del bienestar animal.

## Bibliografía

- Abourehab, M. A. S., Khames, A., Genedy, S., Mostafa, S., Khaleel, M. A., Omar, M. M., & El Sisi, A. M. (2021). Sesame Oil-Based Nanostructured Lipid Carriers of Nicergoline, Intranasal Delivery System for Brain Targeting of Synergistic Cerebrovascular Protection. *Pharmaceutics*, 13(4), 581. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040581>
- Abuhelwa, A. Y., Williams, D. B., Upton, R. N., & Foster, D. J. R. (2017). Food, gastrointestinal pH, and models of oral drug absorption. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 112, 234–248. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.11.034>
- Agorastos, A., Mansueto, A. C., Hager, T., Pappi, E., Gardikioti, A., & Stiedl, O. (2023). Heart Rate Variability as a Translational Dynamic Biomarker of Altered Autonomic Function in Health and Psychiatric Disease. *Biomedicines*, 11(6), 1591. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11061591>
- Almeida, D. L. de, & Devi, L. A. (2020). Diversity of molecular targets and signaling pathways for CBD. *Pharmacology Research & Perspectives*, 8(6), e00682. <https://doi.org/10.1002/prp2.682>
- Alvarenga, I. C., Panickar, K. S., Hess, H., & McGrath, S. (2023). Scientific Validation of Cannabidiol for Management of Dog and Cat Diseases. *Annual Review of Animal Biosciences*, 11(Volume 11, 2023), 227–246. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-081122-070236>
- Alves, P., Amaral, C., Teixeira, N., & Correia-da-Silva, G. (2020). *Cannabis sativa*: Much more beyond  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol. *Pharmacological Research*, 157, 104822. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104822>
- Ambach, L., Penitschka, F., Broillet, A., König, S., Weinmann, W., & Bernhard, W. (2014). Simultaneous quantification of delta-9-THC, THC-acid A, CBN and CBD in seized drugs using HPLC-DAD. *Forensic Science International, The 51st Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT)*, 243, 107–111. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.06.008>
- Analakkattillam, S., Langsi, V. K., Hanrahan, J. P., & Moore, E. (2022). Analytical method validation for assay determination of cannabidiol and tetrahydrocannabinol in hemp oil infused products by RP-HPLC. *Scientific Reports*, 12(1), 12453. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13737-6>
- Andre, C. M., Hausman, J.-F., & Guerriero, G. (2016). *Cannabis sativa*: The Plant of the Thousand and One Molecules. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00019>
- AOAC. (2016). Guidelines for Standard Method Performance Requirements. AOAC International. <https://www.aoac.org/resources/guidelines-for-standard-method-performance-requirements/>
- Austrich-Olivares, A., García-Gutiérrez, M. S., Illescas, L., Gasparyan, A., & Manzanares, J. (2022). Cannabinoid CB1 Receptor Involvement in the Actions of CBD on Anxiety and Coping Behaviors in Mice. *Pharmaceutics*, 15(4), 473. <https://doi.org/10.3390/ph15040473>

- Babington, S., Tilbrook, A. J., Maloney, S. K., Fernandes, J. N., Crowley, T. M., Ding, L., Fox, A. H., Zhang, S., Kho, E. A., Cozzolino, D., Mahony, T. J., & Blache, D. (2024). Finding biomarkers of experience in animals. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 15(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s40104-023-00989-z>
- Barakat, M., Thiab, S., Alzaghari, L. F., Abdulrazzaq, S. B., Hasen, E., Abuarab, S. F., Nasereddin, L., Omar, A., Barakat, Y., Chellappan, D. K., & Al-Najjar, M. A. A. (2025). Cannabis and the immune response: A comprehensive review of therapeutic potential and concerns. *Phytomedicine Plus*, 5(4), 100876. <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2025.100876>
- Barnes, A. (2021, Agosto 2). Stereotypic Behaviors In Horses: Part 1. *The Open Sanctuary Project*. <https://opensanctuary.org/stereotypic-behaviors-in-horses-part-1/>
- Bazzano, M., Marchegiani, A., Gualana, F. L., Petriti, B., Petrucelli, M., Accorroni, L., & Laus, F. (2024). Competition and stereotypic behavior in Thoroughbred horses: The value of saliva as a diagnostic marker of stress. *PLOS ONE*, 19(10), e0311697. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0311697>
- Bergamaschi, M. M., Queiroz, R. H. C., Chagas, M. H. N., de Oliveira, D. C. G., De Martinis, B. S., Kapczinski, F., Quevedo, J., Roesler, R., Schröder, N., Nardi, A. E., Martín-Santos, R., Hallak, J. E. C., Zuardi, A. W., & Crippa, J. A. S. (2011). Cannabidiol Reduces the Anxiety Induced by Simulated Public Speaking in Treatment-Naïve Social Phobia Patients. *Neuropsychopharmacology*, 36(6), 1219–1226. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.6>
- Blebea, N.-M., Pușcașu, C., Hancu, G., Stănișu, A. M., & Chiriță, C. (2025). Recent Preclinical Evidence on Phytocannabinoids in Neurodegenerative Disorders: A Focus on Parkinson's and Alzheimer's Disease. *Pharmaceuticals*, 18(6), 890. <https://doi.org/10.3390/ph18060890>
- Blessing, E. M., Steenkamp, M. M., Manzanares, J., & Marmar, C. R. (2015). Cannabidiol as a Potential Treatment for Anxiety Disorders. *Neurotherapeutics*, 12(4), 825–836. <https://doi.org/10.1007/s13311-015-0387-1>
- Bolsoni, L. M., Crippa, J. A. S., Hallak, J. E. C., Guimarães, F. S., & Zuardi, A. W. (2022). The anxiolytic effect of cannabidiol depends on the nature of the trauma when patients with post-traumatic stress disorder recall their trigger event. *Brazilian Journal of Psychiatry*, 44, 298–307. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/1516-4446-2021-2317>
- Bromberg-Martin, E. S., Matsumoto, M., & Hikosaka, O. (2010). Dopamine in Motivational Control: Rewarding, Aversive, and Alerting. *Neuron*, 68(5), 815–834. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.022>
- Camargo, B. de. (2010). Estrés, Síndrome General de Adaptación o Reacción General de Alarma. *Revista Médico Científica*, 17(2), 78–86.
- Campos, A. C., Fogaça, M. V., Sonogo, A. B., & Guimarães, F. S. (2016). Cannabidiol, neuroprotection and neuropsychiatric disorders. *Pharmacological Research, Country in focus: Pharmacology in Brasil*, 112, 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.033>
- Castaneto, M. S., Wohlfarth, A., Desrosiers, N. A., Hartman, R. L., Gorelick, D. A., & Huestis, M. A. (2015). Synthetic cannabinoids pharmacokinetics and detection methods in

- biological matrices. *Drug Metabolism Reviews*, 47(2), 124–174. <https://doi.org/10.3109/03602532.2015.1029635>
- Chaturvedi, S., Karandikar, M., Mundada, P., Tripathy, S., Kolhe, R., Yadav, B., Rana, R., Gautam, P. C., Satoor, S., Phalke, T., Suryawanshi, P., Khanduri, S., Rao, B., Srikanth, N., & Patwardhan, B. (2025). Daily intranasal sesame oil instillation to improve nasal barrier function and mucosal immunity for respiratory health: A pilot randomized trial in healthy adults. *Complementary Therapies in Medicine*, 93, 103210. <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2025.103210>
- Chayasirisobhon, S. (2020). Mechanisms of Action and Pharmacokinetics of Cannabis. *The Permanente Journal*, 25, 19.200. <https://doi.org/10.7812/TPP/19.200>
- Cheng, Q., Bao, Y., Lin, Q., Qi, T., & Zhang, X. (2024). The effect of sesamol on endogenous substances and oxidative stability of walnut oil. *Frontiers in Nutrition*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnut.2024.1476734>
- Christensen, J. W., Keeling, L. J., & Nielsen, B. L. (2005). Responses of horses to novel visual, olfactory and auditory stimuli. *Applied Animal Behaviour Science*, 93(1), 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2005.06.017>
- Chu, B., Marwaha, K., Sanvictores, T., Awosika, A. O., & Ayers, D. (2025). Physiology, Stress Reaction. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541120/>
- Citti, C., Braghiroli, D., Vandelli, M. A., & Cannazza, G. (2018). Pharmaceutical and biomedical analysis of cannabinoids: A critical review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Review issue 2017*, 147, 565–579. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.06.003>
- Claire, A., Jeon, J., Nickerson, K., Hassler, S., & Vasefi, M. (2025). CBD and the 5-HT<sub>1A</sub> receptor: A medicinal and pharmacological review. *Biochemical Pharmacology*, 233, 116742. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2025.116742>
- Clark, E. A., Kessinger, J., Duncan, S. E., Bell, M. A., Lahne, J., Gallagher, D. L., & O'Keefe, S. F. (2020). The Facial Action Coding System for Characterization of Human Affective Response to Consumer Product-Based Stimuli: A Systematic Review. *Frontiers in Psychology*, 11, 920. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2020.00920>
- Clementino, A., Climani, G., Bianchera, A., Buttini, F., & Sonvico, F. (2025). Polysaccharides: New Frontiers for Nasal Administration of Medicines. *Polysaccharides*, 6(1), 6. <https://doi.org/10.3390/polysaccharides6010006>
- CNQFB, Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de M, A. C., Soberón, E., Cortés, M., Rodríguez, R., Herrera, J. L., & Alcántara, A. (2023). *Serie Técnica 5 – Validación de Métodos Analíticos de Fármacos*. <https://colegioqfb.org.mx/product/serie-tecnica-5-validacion-de-metodos-analiticos-de-farmacos-digital/>
- Condor, L., Marza, S. M., Ardelean, A., Dragomir, M., Papuc, I., Martonos, C., Purdoi, R. C., Tataru, M., Codea, R., & Lacatus, R. (2022). The effect of dry saline aerosol therapy on arterial blood gas parameters in horses with mild equine asthma. *Rev Rom Med Vet*, 32(2), 52–58.
- Cornett, E. M., Nemomsa, M. A., Turbeville, B., Busby, M. A., Kaye, J. S., Kaye, A. J., Choi, J., Ramírez, G. F., Varrassi, G., Kaye, A. M., Kaye, A. D., Wilson, J., & Ganti, L.

- (2022). Midazolam nasal spray to treat intermittent, stereotypic episodes of frequent seizure activity: Pharmacology and clinical role, a comprehensive review. *Health Psychology Research*, 10(5), 38536. <https://doi.org/10.52965/001c.38536>
- Crowe, T. P., & Hsu, W. H. (2022). Evaluation of Recent Intranasal Drug Delivery Systems to the Central Nervous System. *Pharmaceutics*, 14(3), 629. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030629>
- Cruz, J. C., Rosa, M. A., Morés, L., Carasek, E., Crippa, J. A. de S., Figueiredo, E. C., & Queiroz, M. E. C. (2022). Magnetic restricted-access carbon nanotubes for SPME to determine cannabinoids in plasma samples by UHPLC-MS/MS. *Analytica Chimica Acta*, 1226, 340160. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.340160>
- Cunha, R. Z., Felisardo, L. L., Salamanca, G., Marchioni, G. G., Neto, O. I., & Chiocchetti, R. (2023). The use of cannabidiol as a novel treatment for oral stereotypic behaviour (crib-biting) in a horse. *Veterinary and Animal Science*, 19, 100289. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2023.100289>
- Currie, G. M. (2018). Pharmacology, Part 2: Introduction to Pharmacokinetics. *Journal of Nuclear Medicine Technology*, 46(3), 221–230. <https://doi.org/10.2967/jnmt.117.199638>
- Dalla Costa, E., Bracci, D., Dai, F., Lebelt, D., & Minero, M. (2017). Do Different Emotional States Affect the Horse Grimace Scale Score?: A Pilot Study. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2017.03.221>
- Dalla Costa, E., Minero, M., Lebelt, D., Stucke, D., Canali, E., & Leach, M. C. (2014). Development of the Horse Grimace Scale (HGS) as a Pain Assessment Tool in Horses Undergoing Routine Castration. *PLOS ONE*, 9(3), e92281. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092281>
- Dalla Costa, E., Stucke, D., Dai, F., Minero, M., Leach, M. C., & Lebelt, D. (2016). Using the Horse Grimace Scale (HGS) to Assess Pain Associated with Acute Laminitis in Horses (*Equus caballus*). *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 6(8), 47. <https://doi.org/10.3390/ani6080047>
- de Almeida, D. L., & Devi, L. A. (2020). Diversity of molecular targets and signaling pathways for CBD. *Pharmacology Research & Perspectives*, 8(6), e00682. <https://doi.org/10.1002/prp2.682>
- de Wasseige, S., Picotte, K., & Lavoie, J.-P. (2021). Nebulized dexamethasone sodium phosphate in the treatment of horses with severe asthma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 35(3), 1604–1611. <https://doi.org/10.1111/jvim.16113>
- Deiana, S., Watanabe, A., Yamasaki, Y., Amada, N., Arthur, M., Fleming, S., Woodcock, H., Dorward, P., Pigliacampo, B., Close, S., Platt, B., & Riedel, G. (2012). Plasma and brain pharmacokinetic profile of cannabidiol (CBD), cannabidivarin (CBDV),  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabivarin (THCV) and cannabigerol (CBG) in rats and mice following oral and intraperitoneal administration and CBD action on obsessive–compulsive behaviour. *Psychopharmacology*, 219(3), 859–873. <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2415-0>
- Deidda, R., Avohou, H. T., Baronti, R., Davolio, P. L., Pasquini, B., Del Bubba, M., Hubert, C., Hubert, P., Orlandini, S., & Furlanetto, S. (2019). Analytical quality by design: Development and control strategy for a LC method to evaluate the cannabinoids

- content in cannabis olive oil extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 166, 326–335. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.01.032>
- del Río García, J. C. (2020, enero 31). *Fisiopatología del estrés—BM Editores*. <https://bmeditores.mx/avicultura/fisiopatologia-del-estres/>
- Dezfouli, M. M., Tavanaeimanesh, H., Naghadeh, B. D., Bokaei, S., & Corley, K. (2014). Factors associated with stereotypic behavior in Iranian stabled horses. *Comparative Clinical Pathology*, 23(5), 1651–1657. <https://doi.org/10.1007/s00580-013-1840-3>
- Dhopeshwarkar, A., & Mackie, K. (2014). CB2 Cannabinoid receptors as a therapeutic target-what does the future hold? *Molecular Pharmacology*, 86(4), 430–437. <https://doi.org/10.1124/mol.114.094649>
- Diario Oficial de la Federación. (2001). *NOM 062 ZOO 1999*. gob.mx. <http://www.gob.mx/senasica/documentos/nom-062-zoo-1999?state=published>
- Dybowski, M. P., Dawidowicz, A. L., Rombel, M., & Typek, R. (2023). GC vs. HPLC in quantitation of CBD, CBG,  $\Delta^9$ -THC and CBN in plasma using different sample preparation methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 234, 115563. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115563>
- Eichler, F., Ehrle, A., Jensen, K. C., Baudisch, N., Petersen, H., Bäumer, W., Lischer, C., & Wiegand, M. (2023). Behavioral observations, heart rate and heart rate variability in horses following oral administration of a cannabidiol containing paste in three escalating doses (part 1/2). *Frontiers in Veterinary Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1305868>
- Eichler, F., Poźniak, B., Machnik, M., Schenk, I., Wingender, A., Baudisch, N., Thevis, M., Bäumer, W., Lischer, C., & Ehrle, A. (2023). Pharmacokinetic modelling of orally administered cannabidiol and implications for medication control in horses. *Frontiers in Veterinary Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1234551>
- EMA. (2011). *Guideline on bioanalytical method validation*. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf)
- England, R. J. A., Homer, J. J., Knight, L. C., & Ell, S. R. (1999). Nasal pH measurement: A reliable and repeatable parameter. *Clinical Otolaryngology & Allied Sciences*, 24(1), 67–68. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2273.1999.00223.x>
- Evangelista, M. C., Monteiro, B. P., & Steagall, P. V. (2022). Measurement properties of grimace scales for pain assessment in nonhuman mammals: A systematic review. *PAIN*, 163(6), e697. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002474>
- Farach, F. J., Pruitt, L. D., Jun, J. J., Jerud, A. B., Zoellner, L. A., & Roy-Byrne, P. P. (2012). Pharmacological treatment of anxiety disorders: Current treatments and future directions. *Journal of Anxiety Disorders*, 26(8), 833–843. <https://doi.org/10.1016/j.janxdis.2012.07.009>
- Feng, W., Qin, C., Chu, Y., Berton, M., Lee, J. B., Zgair, A., Bettonte, S., Stocks, M. J., Constantinescu, C. S., Barrett, D. A., Fischer, P. M., & Gershkovich, P. (2021). Natural sesame oil is superior to pre-digested lipid formulations and purified triglycerides in promoting the intestinal lymphatic transport and systemic bioavailability of cannabidiol. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 162, 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.02.013>

- Ferlini Agne, G., May, B. E., Lovett, A., Simon, O., Steel, C., Santos, L., Guedes do Carmo, L., Barbosa, B., Werner, L. C., Daros, R. R., Somogyi, A. A., Sykes, B., & Franklin, S. (2023). Horse Grimace Scale Does Not Detect Pain in Horses with Equine Gastric Ulcer Syndrome. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 13(10), 1623. <https://doi.org/10.3390/ani13101623>
- Finn, D. P. (2010). Endocannabinoid-mediated modulation of stress responses: Physiological and pathophysiological significance. *Immunobiology, Special Issue: Cannabinoids and Immunology*, 215(8), 629–646. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2009.05.011>
- Francke, N. M., Schneider, F., Baumann, K., & Bunjes, H. (2021). Formulation of Cannabidiol in Colloidal Lipid Carriers. *Molecules*, 26(5), 1469. <https://doi.org/10.3390/molecules26051469>
- Franco, V., Palmisani, M., Marchiselli, R., Crema, F., Fattore, C., De Giorgis, V., Varesio, C., Rota, P., Dibari, V. F., & Perucca, E. (2022). On-Line Solid Phase Extraction High Performance Liquid Chromatography Method Coupled With Tandem Mass Spectrometry for the Therapeutic Monitoring of Cannabidiol and 7-Hydroxycannabidiol in Human Serum and Saliva. *Frontiers in Pharmacology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.915004>
- Franco, V., & Perucca, E. (2019). Pharmacological and Therapeutic Properties of Cannabidiol for Epilepsy. *Drugs*, 79(13), 1435–1454. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01171-4>
- Fu, Y., Li, W., & Picard, F. (2024). Assessment of matrix effect in quantitative LC-MS bioanalysis. *Bioanalysis*, 16(12), 631–634. <https://doi.org/10.4155/bio-2024-0047>
- Galiazzo, G., De Silva, M., Giancola, F., Rinnovati, R., Peli, A., & Chiocchetti, R. (2022). Cellular distribution of cannabinoid-related receptors TRPV1, PPAR-gamma, GPR55 and GPR3 in the equine cervical dorsal root ganglia. *Equine Veterinary Journal*, 54(4), 788–798. <https://doi.org/10.1111/evj.13499>
- Gamble, L.-J., Boesch, J. M., Frye, C. W., Schwark, W. S., Mann, S., Wolfe, L., Brown, H., Berthelsen, E. S., & Wakshlag, J. J. (2018a). Pharmacokinetics, Safety, and Clinical Efficacy of Cannabidiol Treatment in Osteoarthritic Dogs. *Frontiers in Veterinary Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00165>
- Gamble, L.-J., Boesch, J. M., Frye, C. W., Schwark, W. S., Mann, S., Wolfe, L., Brown, H., Berthelsen, E. S., & Wakshlag, J. J. (2018b). Pharmacokinetics, Safety, and Clinical Efficacy of Cannabidiol Treatment in Osteoarthritic Dogs. *Frontiers in Veterinary Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00165>
- Gao, M., Shen, X., & Mao, S. (2020). Factors influencing drug deposition in the nasal cavity upon delivery via nasal sprays. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 50(3), 251–259. <https://doi.org/10.1007/s40005-020-00482-z>
- Ghit, A., Assal, D., Al-Shami, A. S., & Hussein, D. E. E. (2021). Receptores GABAA: Estructura, función, farmacología y trastornos relacionados. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), 123. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00224-0>
- Godge, G. R., Shaikh, A. B., Bharat, S. C., Randhawan, B. B., Raskar, M. A., & Hiremath, S. N. (2023). Nasal Drug Delivery System and its Applicability in Therapeutics: A

- Review. *RGUHS Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(4).  
[https://doi.org/10.26463/rjps.13\\_4\\_7](https://doi.org/10.26463/rjps.13_4_7)
- González-Pinto, A. (2020). Esketamina intranasal: Un nuevo abordaje para el tratamiento de la depresión resistente al tratamiento. *Psiquiatría Biológica*, 27(1), 9–15.  
<https://doi.org/10.1016/j.psiq.2020.01.001>
- Guidotti, G., Calabrese, F., Anacker, C., Racagni, G., Pariante, C. M., & Riva, M. A. (2013). Glucocorticoid Receptor and FKBP5 Expression Is Altered Following Exposure to Chronic Stress: Modulation by Antidepressant Treatment. *Neuropsychopharmacology*, 38(4), 616–627. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.225>
- Guimarães, F. S., de Aguiar, J. C., Mechoulam, R., & Breuer, A. (1994). Anxiolytic effect of cannabidiol derivatives in the elevated plus-maze. *General Pharmacology*, 25(1), 161–164. [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(94\)90027-2](https://doi.org/10.1016/0306-3623(94)90027-2)
- Hädener, M., König, S., & Weinmann, W. (2019). Quantitative determination of CBD and THC and their acid precursors in confiscated cannabis samples by HPLC-DAD. *Forensic Science International*, 299, 142–150.  
<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.03.046>
- Hajrulai-Musliu, Z., Dimitreska Stojkovikj, E., Gusheski, D., Musliu, D., & Velkovski, D. (2024). High-Performance Liquid Chromatography with DAD Detection for the Determination of Cannabinoids in Commercial Veterinary CBD Oil. *Pharmacy*, 12(6), 181. <https://doi.org/10.3390/pharmacy12060181>
- Harro, J. (2018). Animals, anxiety, and anxiety disorders: How to measure anxiety in rodents and why. *Behavioural Brain Research, Animal Model of the Year 2036: Novel Perspectives in Behavioral Neuroscience*, 352, 81–93.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.10.016>
- Hasbi, A., Madras, B. K., & George, S. R. (2023). Endocannabinoid System and Exogenous Cannabinoids in Depression and Anxiety: A Review. *Brain Sciences*, 13(2), 325. <https://doi.org/10.3390/brainsci13020325>
- Health Canada. (2022, julio 28). *Review of cannabidiol: Report of the Science Advisory Committee on Health Products Containing Cannabis* [Report on plans and priorities]. <https://www.canada.ca/en/health-canada/corporate/about-health-canada/public-engagement/external-advisory-bodies/health-products-containing-cannabis/review-cannabidiol-health-products-containing-cannabis.html>
- Henson, J. D., Vitetta, L., Quezada, M., & Hall, S. (2021). Enhancing Endocannabinoid Control of Stress with Cannabidiol. *Journal of Clinical Medicine*, 10(24), 5852. <https://doi.org/10.3390/jcm10245852>
- Hernández-Avalos, I., Mota-Rojas, D., Mendoza-Flores, J. E., Casas-Alvarado, A., Flores-Padilla, K., Miranda-Cortes, A. E., Torres-Bernal, F., Gómez-Prado, J., & Mora-Medina, P. (2021). *Nociceptive pain and anxiety in equines: Physiological and behavioral alterations*. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.2984-2995>
- Hill, M. N., & Gorzalka, B. B. (2009). The Endocannabinoid System and the Treatment of Mood and Anxiety Disorders. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 8(6), 451–458. <https://doi.org/10.2174/187152709789824624>

- Hintze, S., Smith, S., Patt, A., Bachmann, I., & Würbel, H. (2016). Are Eyes a Mirror of the Soul? What Eye Wrinkles Reveal about a Horse's Emotional State. *PLOS ONE*, 11(10), e0164017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164017>
- Hossain, K. R., Alghalayini, A., & Valenzuela, S. M. (2023). Current Challenges and Opportunities for Improved Cannabidiol Solubility. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(19), 14514. <https://doi.org/10.3390/ijms241914514>
- Huffstetler, C. M., Cochran, B., May, C. A., Maykut, N., Silver, C. R., Cedeno, C., Franck, E., Cox, A., & Fadool, D. A. (2023). Single cannabidiol administration affects anxiety-, obsessive compulsive-, object memory-, and attention-like behaviors in mice in a sex and concentration dependent manner. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 222, 173498. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2022.173498>
- ICH M10, (2022, mayo 24) on bioanalytical method validation—Scientific guideline |. <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m10-bioanalytical-method-validation-scientific-guideline>
- ICH Q2(R1), (2021, septiembre 17). Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Guidance for Industry. FDA. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/q2r1-validation-analytical-procedures-text-and-methodology-guidance-industry>
- James, K. A., Stromin, J. I., Steenkamp, N., & Combrinck, M. I. (2023). Understanding the relationships between physiological and psychosocial stress, cortisol and cognition. *Frontiers in Endocrinology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1085950>
- Josefson, C. C., De Moura Pereira, L., & Skibieli, A. L. (2023). Chronic Stress Decreases Lactation Performance. *Integrative and Comparative Biology*, 63(3), 557–568. <https://doi.org/10.1093/icb/icad044>
- Kenda, M., Kočevár Glavač, N., Nagy, M., & Sollner Dolenc, M. (2022). Medicinal Plants Used for Anxiety, Depression, or Stress Treatment: An Update. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(18), 6021. <https://doi.org/10.3390/molecules27186021>
- Kibret, B. G., Canseco-Alba, A., Onaivi, E. S., & Engidawork, E. (2023). Crosstalk between the endocannabinoid and mid-brain dopaminergic systems: Implication in dopamine dysregulation. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 17, 1137957. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2023.1137957>
- Kosović, E., Sýkora, D., & Kuchař, M. (2021). Stability Study of Cannabidiol in the Form of Solid Powder and Sunflower Oil Solution. *Pharmaceutics*, 13(3), 412. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13030412>
- Kulpa, J. E., Paulionis, L. J., Eglit, G. M., & Vaughn, D. M. (2021). Safety and tolerability of escalating cannabinoid doses in healthy cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 23(12), 1162–1175. <https://doi.org/10.1177/1098612X211004215>
- Lainesse, C. (2009, noviembre 1). TDM: Basic pharmacokinetics for dosage adjustments (Proceedings). DVM 360. <https://www.dvm360.com/view/tdm-basic-pharmacokinetics-dosage-adjustments-proceedings>
- Lebel, P., Furtos, A., & Waldron, K. C. (2026, enero 7). Rapid Determination of 24 Synthetic and Natural Cannabinoids for LC–MS–MS Screening in Natural Products and Drug Inspection Applications | LCGC International.

- <https://www.chromatographyonline.com/view/rapid-determination-24-synthetic-and-natural-cannabinoids-lc-ms-ms-screening-natural-products-and-0>
- Lin, L., Amaratunga, P., Reed, J., Huang, P., Lemberg, B. L., & Lemberg, D. (2022). Quantitation of  $\Delta^8$ -THC,  $\Delta^9$ -THC, Cannabidiol and 10 Other Cannabinoids and Metabolites in Oral Fluid by HPLC–MS–MS. *Journal of Analytical Toxicology*, 46(1), 76–88. <https://doi.org/10.1093/jat/bkaa184>
- Linares, I. M., Zuardi, A. W., Pereira, L. C., Queiroz, R. H., Mechoulam, R., Guimarães, F. S., & Crippa, J. A. (2019). Cannabidiol presents an inverted U-shaped dose-response curve in a simulated public speaking test. *Brazilian Journal of Psychiatry*, 41, 9–14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/1516-4446-2017-0015>
- Lodzki, M., Godin, B., Rakou, L., Mechoulam, R., Gallily, R., & Touitou, E. (2003). Cannabidiol—Transdermal delivery and anti-inflammatory effect in a murine model. *Journal of Controlled Release*, 93(3), 377–387. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2003.09.001>
- Lu, H.-C., & Mackie, K. (2016). An Introduction to the Endogenous Cannabinoid System. *Biological Psychiatry*, 79(7), 516–525. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.07.028>
- Maldonado, R., Cabañero, D., & Martín-García, E. (2020). The endocannabinoid system in modulating fear, anxiety, and stress. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 22(3), 229–239. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2020.22.3/rmaldonado>
- Marcantonio Coneglian, M., Duarte Borges, T., Weber, S. H., Godoi Bertagnon, H., & Michelotto, P. V. (2020). Use of the horse grimace scale to identify and quantify pain due to dental disorders in horses. *Applied Animal Behaviour Science*, 225, 104970. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2020.104970>
- Marsch, R., Foeller, E., Rammes, G., Bunck, M., Kössl, M., Holsboer, F., Zieglgänsberger, W., Landgraf, R., Lutz, B., & Wotjak, C. T. (2007). Reduced Anxiety, Conditioned Fear, and Hippocampal Long-Term Potentiation in Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 Receptor-Deficient Mice. *Journal of Neuroscience*, 27(4), 832–839. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3303-06.2007>
- Martinez Naya, N., Kelly, J., Corna, G., Golino, M., Polizio, A. H., Abbate, A., Toldo, S., & Mezzaroma, E. (2024). An Overview of Cannabidiol as a Multifunctional Drug: Pharmacokinetics and Cellular Effects. *Molecules*, 29(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/molecules29020473>
- Mayo, L. M., Asratian, A., Lindé, J., Morena, M., Haataja, R., Hammar, V., Augier, G., Hill, M. N., & Heilig, M. (2020). Elevated Anandamide, Enhanced Recall of Fear Extinction, and Attenuated Stress Responses Following Inhibition of Fatty Acid Amide Hydrolase: A Randomized, Controlled Experimental Medicine Trial. *Biological Psychiatry, Stress Mechanisms and Fear Memories*, 87(6), 538–547. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.07.034>
- McLennan, K. M. (2018). Why Pain Is Still a Welfare Issue for Farm Animals, and How Facial Expression Could Be the Answer. *Agriculture*, 8(8), 127. <https://doi.org/10.3390/agriculture8080127>
- Melas, P. A., Scherma, M., Fratta, W., Cifani, C., & Fadda, P. (2021a). Cannabidiol as a Potential Treatment for Anxiety and Mood Disorders: Molecular Targets and

- Epigenetic Insights from Preclinical Research. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1863. <https://doi.org/10.3390/ijms22041863>
- Melas, P. A., Scherma, M., Fratta, W., Cifani, C., & Fadda, P. (2021b). Cannabidiol as a Potential Treatment for Anxiety and Mood Disorders: Molecular Targets and Epigenetic Insights from Preclinical Research. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1863. <https://doi.org/10.3390/ijms22041863>
- Meneses, T., Robinson, J., Rose, J., Vernick, J., & Overall, K. L. (2021). Development of and pharmacological treatment options and future research opportunities for separation anxiety in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 259(10), 1130–1139. <https://doi.org/10.2460/javma.20.10.0602>
- Meng, Q., Buchanan, B., Zuccolo, J., Poulin, M.-M., Gabriele, J., & Baranowski, D. C. (2018). A reliable and validated LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of 4 cannabinoids in 40 consumer products. *PLOS ONE*, 13(5), e0196396. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196396>
- Meyer, K., Hayman, K., Baumgartner, J., & Gorden, P. J. (2022a). Plasma Pharmacokinetics of Cannabidiol Following Oral Administration of Cannabidiol Oil to Dairy Calves. *Frontiers in Veterinary Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.789495>
- Meyer, K., Hayman, K., Baumgartner, J., & Gorden, P. J. (2022b). Plasma Pharmacokinetics of Cannabidiol Following Oral Administration of Cannabidiol Oil to Dairy Calves. *Frontiers in Veterinary Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.789495>
- Micalizzi, G., Vento, F., Alibrando, F., Donnarumma, D., Dugo, P., & Mondello, L. (2021). Cannabis Sativa L.: A comprehensive review on the analytical methodologies for cannabinoids and terpenes characterization. *Journal of Chromatography A*, 1637, 461864. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461864>
- Millar, S. A., Stone, N. L., Yates, A. S., & O'Sullivan, S. E. (2018). A Systematic Review on the Pharmacokinetics of Cannabidiol in Humans. *Frontiers in Pharmacology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01365>
- Mohamed, M. K., Takyi-Williams, J., Baudot, B., & Grobler, A. (2021). Development and validation of a LC-HRMS method for the quantification of cannabinoids and their metabolites in human plasma. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 159, 105705. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.105705>
- More, S., Kadam, S., & K.Redasani, D. (2025). A Review on Analytical Method Development And Validation. *International Journal of Pharmaceutical Research and Applications*, 10, 1177–1195. <https://doi.org/10.35629/4494-100111771195>
- Morelos Cruz, E. R. (2022). *Formulación de dos presentaciones farmacéuticas de Cannabidiol (CBD) para uso en caballos y evaluación de la aceptabilidad*. Informe de servicio social para la Licenciatura, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. <https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/handle/123456789/37903>
- Morera, L. P., Tempesti, T. C., Pérez, E., & Medrano, L. A. (2019). Biomarcadores en la medición del estrés: Una revisión sistemática. *Ansiedad y Estrés*, 25(1), 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.anyes.2019.02.001>
- Mota-Rojas, D., Whittaker, A. L., Coria-Avila, G. A., Martínez-Burnes, J., Mora-Medina, P., Domínguez-Oliva, A., Hernández-Avalos, I., Olmos-Hernández, A., Verduzco-Mendoza, A., Casas-Alvarado, A., & Grandin, T. (2025). How facial expressions

- reveal acute pain in domestic animals with facial pain scales as a diagnostic tool. *Frontiers in Veterinary Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fvets.2025.1546719>
- Muñoz-Alonzo, L. E., Vera, M.-P. M., Leal, J. C., & Luengo, M. B. (2015). Frecuencia de estereotipias clásicas en caballos de enduro. *Scientia Agropecuaria*, 6(2), 119–124. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2015.02.04>
- Novack, L. I., Schnell-Peskin, L., Feuerbacher, E., & Fernandez, E. J. (2023). The Science and Social Validity of Companion Animal Welfare: Functionally Defined Parameters in a Multidisciplinary Field. *Animals*, 13(11), 1850. <https://doi.org/10.3390/ani13111850>
- Ocque, A. J., Hagler, C. E., DiFrancesco, R., Lombardo, J., & Morse, G. D. (2019). Development and validation of an assay to measure cannabidiol and  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol in human EDTA plasma by UHPLC-MS/MS. *Journal of Chromatography B*, 1112, 56–60. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.03.002>
- Oke, Stacey. (2021, septiembre 7). Navigating the Sea of CBD and Its Use In Horses. *The Horse*. <https://thehorse.com/192956/navigating-the-sea-of-cbd-and-its-use-in-horses/>
- Pan, L., Nian, H., Zhang, R., Liu, H., Li, C., Wei, H., Yi, R., Li, J., Li, X., & Bao, J. (2022). Stereotypic behaviors are associated with physiology and immunity differences in long-term confined sows. *Physiology & Behavior*, 249, 113776. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2022.113776>
- Patel, B., Wene, D., & Fan, Z. (Tina). (2017). Qualitative and quantitative measurement of cannabinoids in cannabis using modified HPLC/DAD method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 146, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.021>
- Paudel, K. S., Hammell, D. C., Agu, R. U., Valiveti, S., & Stinchcomb, A. L. (2010). Cannabidiol bioavailability after nasal and transdermal application: Effect of permeation enhancers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 36(9), 1088–1097. <https://doi.org/10.3109/03639041003657295>
- Pereira Pía, M. M. (2025, mayo 11). CORTISOL: Cómo afecta al estrés, la ansiedad, la obesidad y el insomnio. Respuestas prácticas. *Fapsgal*. <https://fapsgal.org/cortisol-ansiedad-fatiga-farmacia-fapsgal/>
- Pichini, S., Malaca, S., Gottardi, M., Pérez-Acevedo, A. P., Papaseit, E., Perez-Maña, C., Farré, M., Pacifici, R., Tagliabracci, A., Mannocchi, G., & Busardò, F. P. (2021a). UHPLC-MS/MS analysis of cannabidiol metabolites in serum and urine samples. Application to an individual treated with medical cannabis. *Talanta*, 223, 121772. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121772>
- Pichini, S., Malaca, S., Gottardi, M., Pérez-Acevedo, A. P., Papaseit, E., Perez-Maña, C., Farré, M., Pacifici, R., Tagliabracci, A., Mannocchi, G., & Busardò, F. P. (2021b). UHPLC-MS/MS analysis of cannabidiol metabolites in serum and urine samples. Application to an individual treated with medical cannabis. *Talanta*, 223, 121772. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121772>
- Pires, A., Fortuna, A., Alves, G., & Falcão, A. (2009). Intranasal drug delivery: How, why and what for? *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences: A Publication of the*

- Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe Canadienne Des Sciences Pharmaceutiques, 12(3), 288–311. <https://doi.org/10.18433/j3nc79>
- Qian, L., Beers, J. L., Jackson, K. D., & Zhou, Z. (2024). CBD and THC in Special Populations: Pharmacokinetics and Drug–Drug Interactions. *Pharmaceutics*, 16(4), 484. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16040484>
- Radwan, M. M., Wanas, A. S., Chandra, S., & ElSohly, M. A. (2017). Natural Cannabinoids of Cannabis and Methods of Analysis. En *Cannabis sativa L. - Botany and Biotechnology* (pp. 161–182). Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-54564-6\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-54564-6_7)
- Rahmania, H., Nakanishi, T., Oi, S., Onishi, R., Yamagami, E., Yamane, K., Otoki, Y., Kato, S., & Nakagawa, K. (2024). Effects of Different Manufacturing Processes on Thermal and Photo-oxidative Stability of Sesame Oil. *Journal of Oleo Science*, 73(10), 1267–1276. <https://doi.org/10.5650/jos.ess24084>
- Ramazani, E., Ebrahimpour, F., Emami, S. A., Shakeri, A., Javadi, B., Sahebkar, A., & Tayarani-Najaran, Z. (2023). Neuroprotective Effects of Sesamum indicum, Sesamin and Sesamol Against 6-OHDA-induced Apoptosis in PC12 Cells. *Recent Advances in Food, Nutrition & Agriculture*, 14(2), 126–133. <https://doi.org/10.2174/2772574X14666230804151124>
- Reddy, A. C., Hampton, J. M., Park, S. J., Dickerson, F., Shah, J., Chewning, B., Schmitz, N., & Trentham-Dietz, A. (2025). Measuring the Effects of Cannabis on Anxiety and Depression Among Cancer Patients. *Cancer Medicine*, 14(21), e71342. <https://doi.org/10.1002/cam4.71342>
- Richmond, S. E., Wemelsfelder, F., de Heredia, I. B., Ruiz, R., Canali, E., & Dwyer, C. M. (2017). Evaluation of Animal-Based Indicators to Be Used in a Welfare Assessment Protocol for Sheep. *Frontiers in Veterinary Science*, 4, 210. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00210>
- Riva, M. G., Dai, F., Huhtinen, M., Minero, M., Barbieri, S., & Dalla Costa, E. (2022). The Impact of Noise Anxiety on Behavior and Welfare of Horses from UK and US Owner's Perspective. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 12(10), 1319. <https://doi.org/10.3390/ani12101319>
- Riviere, J., & Papich, M. (2018). *Veterinary Pharmacology and Therapeutics* (10th ed.). Wiley-Blackwell, Wiley-Blackwell.
- Romero Rojo, J. M. (2021). *Manual de práctica de medicina y zootecnia para équidos I*. UNAM. [https://fmvz.unam.mx/fmvz/licenciatura/coepa/archivos/manuales\\_2013/Manual\\_Practicas\\_Medicina\\_Zootecnia\\_Equidos.pdf](https://fmvz.unam.mx/fmvz/licenciatura/coepa/archivos/manuales_2013/Manual_Practicas_Medicina_Zootecnia_Equidos.pdf)
- Ruehle, S., Rey, A. A., Remmers, F., & Lutz, B. (2012). The endocannabinoid system in anxiety, fear memory and habituation. *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)*, 26(1), 23–39. <https://doi.org/10.1177/0269881111408958>
- Ryan, D., McKemie, D. S., Kass, P. H., Puschner, B., & Knych, H. K. (2021). Pharmacokinetics and effects on arachidonic acid metabolism of low doses of cannabidiol following oral administration to horses. *Drug Testing and Analysis*, 13(7), 1305–1317. <https://doi.org/10.1002/dta.3028>

- SADER. (2021). *NORMA Oficial Mexicana NOM-012-SAG/ZOO-2020, Especificaciones para la regulación de productos para uso o consumo animal*. <https://www.dof.gob.mx/normasOficiales/9371/sader/sader.html>
- Sánchez de Medina, A., Serrano-Rodríguez, J. M., Díez de Castro, E., García-Valverde, M. T., Saitua, A., Becero, M., Muñoz, A., Ferreiro-Vera, C., & Sánchez de Medina, V. (2023). Pharmacokinetics and oral bioavailability of cannabidiol in horses after intravenous and oral administration with oil and micellar formulations. *Equine Veterinary Journal*, 55(6), 1094–1103. <https://doi.org/10.1111/evj.13923>
- Sarrafchi, A., & Blokhuis, H. J. (2013). Equine stereotypic behaviors: Causation, occurrence, and prevention. *Journal of Veterinary Behavior*, 8(5), 386–394. <https://doi.org/10.1016/j.jveb.2013.04.068>
- Schmidt, M. E., Liebowitz, M. R., Stein, M. B., Grunfeld, J., Van Hove, I., Simmons, W. K., Van Der Ark, P., Palmer, J. A., Saad, Z. S., Pemberton, D. J., Van Nueten, L., & Drevets, W. C. (2021). The effects of inhibition of fatty acid amide hydrolase (FAAH) by JNJ-42165279 in social anxiety disorder: A double-blind, randomized, placebo-controlled proof-of-concept study. *Neuropsychopharmacology*, 46(5), 1004–1010. <https://doi.org/10.1038/s41386-020-00888-1>
- Schwoppe, D. M., Scheidweiler, K. B., & Huestis, M. A. (2011). Direct quantification of cannabinoids and cannabinoid glucuronides in whole blood by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(4), 1273–1283. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5197-7>
- Schwotzer, D., Kulpa, J., Trexler, K., Dye, W., Jantzi, J., Irshad, H., Ware, M. A., Bonn-Miller, M., McDonald, J., & TimLefever. (2023). Pharmacokinetics of Cannabidiol in Sprague-Dawley Rats After Oral and Pulmonary Administration. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 8(2), 360–373. <https://doi.org/10.1089/can.2022.0121>
- SEIC, S. E. de I. sobre C. (2002). *Guía Básica sobre los Cannabinoides*. <https://www.seic.es/wp-content/uploads/2013/10/guiabasicacannab.pdf>
- Shannon, S., Lewis, N., Lee, H., & Hughes, S. (2019). Cannabidiol in Anxiety and Sleep: A Large Case Series. *The Permanente Journal*, 23, 18–041. <https://doi.org/10.7812/TPP/18-041>
- Shinfuku, M., Kishimoto, T., Uchida, H., Suzuki, T., Mimura, M., & Kikuchi, T. (2019). Effectiveness and safety of long-term benzodiazepine use in anxiety disorders: A systematic review and meta-analysis. *International Clinical Psychopharmacology*, 34(5), 211. <https://doi.org/10.1097/YIC.0000000000000276>
- Sin, J. E. V., Shen, P., Huang, L., Wu, Y., & Chan, S. H. (2024). Determination of Cannabinoids in Meat Products and Animal Feeds in Singapore Using Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Foods*, 13(16), 2581. <https://doi.org/10.3390/foods13162581>
- Soria-Lara, D. M., Gaitán-Vélez, B. V., Jiménez-Islas, H., Miranda-López, R., Soria-Lara, D. M., Gaitán-Vélez, B. V., Jiménez-Islas, H., & Miranda-López, R. (2019). El Sistema de Endocannabinoides como regulador de la lipogénesis y su posible modulación por la Mangiferina. *Revista biomédica*, 30(2), 83–102. <https://doi.org/10.32776/revbiomed.v30i2.638>

- Spinella, T. C., Stewart, S. H., Naugler, J., Yakovenko, I., & Barrett, S. P. (2021). Evaluating cannabidiol (CBD) expectancy effects on acute stress and anxiety in healthy adults: A randomized crossover study. *Psychopharmacology*, 238(7), 1965–1977. <https://doi.org/10.1007/s00213-021-05823-w>
- Stark, T., Di Bartolomeo, M., Di Marco, R., Drazanova, E., Platania, C. B. M., Iannotti, F. A., Ruda-Kucerova, J., D'Addario, C., Kratka, L., Pekarik, V., Piscitelli, F., Babinska, Z., Fedotova, J., Giurdanella, G., Salomone, S., Sulcova, A., Bucolo, C., Wotjak, C. T., Starcuk, Z., ... Micale, V. (2020). Altered dopamine D3 receptor gene expression in MAM model of schizophrenia is reversed by peripubertal cannabidiol treatment. *Biochemical Pharmacology*, 177, 114004. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114004>
- Tatemoto, P., Broom, D. M., & Zanella, A. J. (2022). Changes in Stereotypies: Effects over Time and over Generations. *Animals*, 12(19), 2504. <https://doi.org/10.3390/ani12192504>
- Tavčar, E., & Vidak, M. (2024). Experimental investigation and thermodynamic modelling of cannabidiol and curcumin in different solvents. *Journal of Molecular Liquids*, 410, 125511. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2024.125511>
- Terzian, A. L. B., Aguiar, D. C., Guimarães, F. S., & Moreira, F. A. (2009). Modulation of anxiety-like behaviour by Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 (TRPV1) channels located in the dorsolateral periaqueductal gray. *European Neuropsychopharmacology*, 19(3), 188–195. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2008.11.004>
- Touchon, J., Bertin, L., Pilgrim, A. J., Ashford, E., & Bes, A. (1996). A comparison of subcutaneous sumatriptan and dihydroergotamine nasal spray in the acute treatment of migraine. *Neurology*, 47(2), 361–365. <https://doi.org/10.1212/WNL.47.2.361>
- Toutain, P.-L., Ferran, A., & Bousquet-Mélou, A. (2010). Species Differences in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. En F. Cunningham, J. Elliott, & P. Lees (Eds.), *Comparative and Veterinary Pharmacology* (pp. 19–48). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-10324-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-10324-7_2)
- Upadhyay, G., Fihurka, O., Patel, P., & Sanchez-Ramos, J. (2025). Quantitation of Cannabidiol (CBD) in brain regions and plasma following intranasal administration of a CBD nanoformulation. *Journal of Cannabis Research*, 7(1), 63. <https://doi.org/10.1186/s42238-025-00308-5>
- van Loon, J. P. A. M., & Van Dierendonck, M. C. (2017). Monitoring equine head-related pain with the Equine Utrecht University scale for facial assessment of pain (EQUUS-FAP). *The Veterinary Journal*, 220, 88–90. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.01.006>
- Vidal, M. A., Trinidad, J. M., & Torres, L. M. (2014). Intranasal fentanyl in the treatment of oncological pain. *Revista de la Sociedad Española del Dolor*, 21(2), 106–111. <https://doi.org/10.4321/S1134-80462014000200008>
- Villafuerte Robles, L. V. (2011). *Los excipientes y su funcionalidad en productos farmacéuticos sólidos*.
- Viswanathan, C. T., Bansal, S., Booth, B., DeStefano, A. J., Rose, M. J., Sailstad, J., Shah, V. P., Skelly, J. P., Swann, P. G., & Weiner, R. (2007). Workshop/conference report—Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: Best practices for

- chromatographic and ligand binding assays. *The AAPS Journal*, 9(1), 4. <https://doi.org/10.1208/aapsj0901004>
- Vries, E. J. D., & Cornejo, M. E. M. (2025). Uso de cannabidiol como agente reductor de ansiedad en caninos con Hiperapego. *Arandu UTIC*, 12(3), 4369–4386. <https://doi.org/10.69639/arandu.v12i3.1631>
- Wang, Z., Xiong, G., Tsang, W. C., Schätzlein, A. G., & Uchegbu, I. F. (2019). Nose-to-Brain Delivery. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 370(3), 593–601. <https://doi.org/10.1124/jpet.119.258152>
- Weather, A. (2025). *Anual y Mensual del Tiempo—San Miguel Ajusco, México*. Weather Atlas. <https://www.weather-atlas.com/es/mexico/san-miguel-ajusco-clima>
- Williams, M. R., Holbrook, T. C., Maxwell, L., Croft, C. H., Ientile, M. M., & Cliburn, K. (2022). Pharmacokinetic Evaluation of a Cannabidiol Supplement in Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 110, 103842. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2021.103842>
- Wormald, D., Lawrence, A. J., Carter, G., & Fisher, A. D. (2017). Reduced heart rate variability in pet dogs affected by anxiety-related behaviour problems. *Physiology & Behavior*, 168, 122–127. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.11.003>
- Wu, F., Ma, Q., Tian, G., Chen, K., Yang, R., & Shen, J. (2025). Formulation and Evaluation of Solid Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System of Cannabidiol for Enhanced Solubility and Bioavailability. *Pharmaceutics*, 17(3), 340. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17030340>
- Wu, F., Tilbrook, A., Maloney, S. K., & Blache, D. (2025). The intricate relationship between stress and animal welfare: From historical perspective to new avenues. *Biological Reviews*, n/a(n/a). <https://doi.org/10.1111/brv.70057>
- Wu, X., Zang, R., Qiu, Y., Zhang, Y., Peng, J., Cheng, Z., Wei, S., Liu, M., & Diao, Y. (2025). Intranasal Drug Delivery Technology in the Treatment of Central Nervous System Diseases: Challenges, Advances, and Future Research Directions. *Pharmaceutics*, 17(6), 775. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17060775>
- Yocom, A. F., O'Fallon, E. S., Gustafson, D. L., & Contino, E. K. (2022). Pharmacokinetics, Safety, and Synovial Fluid Concentrations of Single- and Multiple-Dose Oral Administration of 1 and 3 mg/kg Cannabidiol in Horses☆. *Journal of Equine Veterinary Science*, 113, 103933. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2022.103933>
- Yu, C. H. J., & Rupasinghe, H. P. V. (2021). Cannabidiol-based natural health products for companion animals: Recent advances in the management of anxiety, pain, and inflammation. *Research in Veterinary Science*, 140, 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.08.001>
- Zarrindast, M.-R., & Khakpai, F. (2015). The Modulatory Role of Dopamine in Anxiety-like Behavior. *Archives of Iranian Medicine*, 18(9), 591–603.
- Zgair, A., Wong, J. C. M., Sabri, A., Fischer, P. M., Barrett, D. A., Constantinescu, C. S., & 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. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 114, 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.05.019>
- Zivovinic, S., Alder, R., Allenspach, M. D., & Steuer, C. (2018). Determination of cannabinoids in Cannabis sativa L. samples for recreational, medical, and forensic

purposes by reversed-phase liquid chromatography-ultraviolet detection. *Journal of Analytical Science and Technology*, 9(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s40543-018-0159-8>

Zou, S., & Kumar, U. (2018). Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 833. <https://doi.org/10.3390/ijms19030833>

# Anexos

## Anexo 1



### TÍTULO DEL TRABAJO: LA ESCALA DE LA MUECA: UN MÉTODO PARA EVALUAR EL EFECTO DE SUSTANCIAS CON ACTIVIDAD ANTIESTRÉS

TEMA: Otros temas de relevancia en las ciencias químico-farmacéuticas.

AUTOR (ES): Elba Rebeca Morelos Cruz; Rubria Marlen Martínez Casares; Beatriz Godínez Chaparro; Ismael Martínez Cortés, Aida Solís Oba, Marcela Vergara Onofre.

Los dos principales: Elba Rebeca Morelos Cruz; Ismael Martínez Cortés.

Trabajo de Licenciatura ( ) Trabajo Maestría (X) Trabajo Doctorado ( ) Semestre: 3°  
Servicio Social ( )

Modalidad: Presencial (X) En línea ( )

DIRECCIÓN COMPLETA, TELEFONO Y FAX Y/O E-MAIL DEL RESPONSABLE DEL TRABAJO  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM-Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Coapa, colonia Villa Quietud, Coyoacán, C. P. 04960, CDMX. Tel: 5613015373 email: [2233800650@alumnos.xoc.uam.mx](mailto:2233800650@alumnos.xoc.uam.mx)  
RESUMEN:

#### LA ESCALA DE LA MUECA: UN MÉTODO PARA EVALUAR EL EFECTO DE SUSTANCIAS CON ACTIVIDAD ANTIESTRÉS

Elba Rebeca Morelos Cruz<sup>1</sup> MVZ., Rubria Marlen Martínez Casares<sup>2</sup>, Dr. en C., Beatriz Godínez Chaparro<sup>2</sup>, Dr. en C., Ismael Martínez Cortés<sup>3</sup>  
Dr. en C., Aida Solís Oba<sup>2</sup> Dr. en C., Marcela Vergara Onofre<sup>3</sup> Dr. en C.

1. Maestría en Ciencias Farmacéuticas; 2. Departamento de Sistemas Biológicos y 3. Departamento de Producción Agrícola y Animal, División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM-Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Coapa, colonia Villa Quietud, Coyoacán, C. P. 04960.  
Tel.: 5613015373. Email del autor: [2233800650@alumnos.xoc.uam.mx](mailto:2233800650@alumnos.xoc.uam.mx)

**Introducción:** Con el objetivo de satisfacer la demanda de métodos de evaluación no invasivos que cumplan con los protocolos de bienestar animal y, a su vez, respeten las cinco libertades de los animales, se han desarrollado nuevas estrategias de monitoreo de estrés-bienestar animal. Entre estas, destaca la evaluación y el monitoreo de unidades de acción facial, también conocidas como Escala de la Mueca (EM). En modelos animales, esta metodología representa una herramienta de observación que permite obtener información sobre el estado fisiológico y emocional de los ejemplares sin intervenir ni influir directamente en ellos. En este trabajo, se evaluó la utilidad de la EM en un modelo equino bajo condiciones de estrés y su aplicación en la evaluación de un prototipo farmacológico de Cannabidiol (CBD). La relevancia de la EM tiene implicaciones en diversos ámbitos y facilita la evaluación de estrés en esta especie con aplicabilidad en el desarrollo farmacéutico para el manejo del estrés y la ansiedad en caballos. Se ha descrito la EM teóricamente pero su interpretación es subjetiva de acuerdo con el aplicador que la implementa, por lo que para su correcta utilización el desarrollo de evidencia visual permitiría homogenizar los criterios de interpretación. **Objetivo:** Determinar la viabilidad de la aplicación de la EM como método de evaluación de estrés en modelos equinos y generar evidencia visual que describa la escala para mejorar el empleo de esta. **Metodología:** Para generar evidencia fotográfica sobre la EM se trabajó con cinco caballos Cuarto de Milla, con un peso aproximado de 500 kg cada uno, a los cuales se les aplicó la EM de forma previa a la exposición a un estresor. Posteriormente se administró una dosis única de CBD suspendido en aceite de ajonjolí a una concentración de 1.2mg/mL; se realizó la evaluación de estresor en los tiempos 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 40 45 50 55 7 60 min, periodo de tiempo en el cual se tomaron evidencias fotográficas y de video. **Resultados:** Se obtuvieron evidencias fotográficas de los parámetros evaluados mediante la escala de la mueca, así como videos que permitieron generar una guía visual. En esta guía se observan los cambios en las unidades de acción facial evaluadas con la escala, así como las modificaciones en la postura de los caballos. **Conclusiones:** La escala de la mueca ya ha sido utilizada en diversos protocolos para evaluar el bienestar animal, demostrando su efectividad como método de evaluación en condiciones de dolor, estrés y ansiedad en caballos. En el presente estudio se generó evidencia visual de la EM facilitando la interpretación de la misma; se comprobó que también puede ser útil para evaluar la efectividad de fármacos que tengan actividad sobre estos estadios fisiológicos. Es importante destacar que este método no requiere inversión económica para su implementación, lo que contribuye a reducir los costos de investigación.



F-012308

# El Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C. y la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

Otorgan la presente

## CONSTANCIA

a: MVZ. Elba Rebeca Morelos Cruz, Dr. en C. Rubria Marlen Martínez Casares,  
Dr. en C. Beatriz Godínez Chaparro, Dr. en C. Ismael Martínez Cortés,  
Dr. en C. Aida Solís Oba, Dr. en C. Marcela Vergara Onofre

Por su participación como PONENTES del trabajo titulado:

“La escala de la mueca: un método para evaluar el efecto de sustancias  
con actividad antiestrés”

en el XXXIII Congreso de Educación Químico Farmacéutica Biológica  
y la XXIX Reunión de Estudiantes de Farmacia,  
realizado los días 12 al 14 de marzo de 2025.

CDMX, Mex., a 14 de marzo de 2025



*Elba Rebeca Morelos Cruz*  
**Dra. Liliana Schifter Aceves**  
Jefa del Departamento de Sistemas Biológicos  
UAM Unidad Xochimilco

*DAR Juan José Díaz Esquivel*  
**DAR Juan José Díaz Esquivel**  
Presidente Comisión de Educación  
del CNQFBM, A.C.

*Dr. Roberto Díaz Torres*  
**Dr. Roberto Díaz Torres**  
Presidente Comisión de Reunión  
de Estudiantes de Farmacia del CNQFBM, A.C.

*QFB Agustín Azcatl Romero*  
**QFB Agustín Azcatl Romero**  
Presidente  
Colegio Nacional de Químicos  
Farmacéuticos Biólogos México, A.C.

CRC's = Créditos para el Refrendo de la Certificación (0.6 Crc's por hora de capacitación), avalado por la Subcomisión de Educación Continua del COMECEP. Registro de Idoneidad DGP-SEP: SEP/DGP/CP089/17.

NOTA: Para ser válida en términos de certificación, esta constancia deberá estar impresa, contar con el sello del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C. y cuando menos, una firma autógrafa.

## Anexo 2



TÍTULO DEL TRABAJO: Desarrollo de un método analítico por HPLC para cuantificación y detección de CBD a partir de muestras de plasma equino.

TEMA: Otros temas de relevancia en las ciencias químico-farmacéuticas.

AUTOR (ES): Elba Rebeca Morelos Cruz, Rubria Marlen Martínez Casares, Beatriz Godínez Chaparro, Ismael Martínez Cortés, Aida Solís Oba, José Antonio Martínez García.

Los dos principales: Elba Rebeca Morelos Cruz; Rubria Marlen Martínez Casares

Trabajo de Licenciatura ( ) Trabajo Maestría (X) Trabajo Doctorado ( ) Semestre: 3°  
Servicio Social ( )

Modalidad: Presencial (X) En línea ( )

DIRECCIÓN COMPLETA, TELEFONO Y FAX Y/O E-MAIL DEL RESPONSABLE DEL TRABAJO

División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM-Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Coapa, colonia Villa Quietud, Coyoacán, C. P. 04960, CDMX. Tel: 5613015373 email: [2233800650@alumnos.xoc.uam.mx](mailto:2233800650@alumnos.xoc.uam.mx)

RESUMEN:

### DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA CUANTIFICACIÓN Y DETECCIÓN DE CBD A PARTIR DE MUESTRAS DE PLASMA EQUINO

Elba Rebeca Morelos Cruz<sup>1</sup> MVZ., Rubria Marlen Martínez Casares<sup>2</sup> Dr. en C., Beatriz Godínez Chaparro<sup>2</sup> Dr. en C., Ismael Martínez Cortés<sup>3</sup> Dr. en C., Aida Solís Oba<sup>2</sup> Dr. en C., José Antonio Martínez García<sup>3</sup> Dr. en C.

1. Maestría en Ciencias Farmacéuticas; 2. Departamento de Sistemas Biológicos y 3. Departamento de Producción Agrícola y Animal, División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM-Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Coapa, colonia Villa Quietud, Coyoacán, C. P. 04960.

Tel.: 5613015373. Email del autor: [2233800650@alumnos.xoc.uam.mx](mailto:2233800650@alumnos.xoc.uam.mx)

**Introducción:** El empleo de compuestos derivados de *Cannabis sativa*, principalmente el Cannabidiol (CBD), comienza a emplearse en una amplia variedad de patologías, principalmente en alteraciones del sistema nervioso central; sin embargo, debido al desconocimiento parcial de sus efectos y mecanismos de acción en diferentes especies, ha llevado a su prohibición en diversos ámbitos; como en las actividades ecuestres, ya que seguirían que podrían representar una ventaja competitiva. Así también, se debe considerar que en México no existe ningún método validado que pueda emplearse como mecanismo de detección y cuantificación en casos de dopaje en estas disciplinas. **Objetivo:** Desarrollar un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la cuantificación y detección de CBD en muestras de plasma equino. **Metodología:** Se trabajó con cuatro caballos Cuarto de Milla, con un peso aproximado de 500 kg cada uno, a los cuales se les administró una dosis única de CBD suspendido en aceite de ajonjolí (1.2mg/mL). Para obtener el plasma se recolectaron muestras de sangre blanco y posteriores a la administración, estas se centrifugaron durante 15 minutos a 3300 rpm, el plasma se almacenó en congelación hasta su análisis. Se evaluaron dos métodos de extracción de CBD, el método A a 500µL de plasma se le adicionó acetonitrilo (ACN) se agitó en vortex y se centrifugó; el método B consistió en una extracción líquido-líquido utilizando como disolvente terbutil metil éter (2 x 5mL), el cual se llevó a sequedad mediante presión reducida y el sólido recuperado fue reconstituido en ACN. Todas las muestras fueron filtradas a través de nylon de 0.45 µm y se inyectaron en un HPLC, utilizando una columna C18 (150 x 3.0 mm), en un sistema isocrático con ACN y agua como fase móvil, el método fue validado y se evaluó la especificidad, precisión, linealidad del sistema, los límites de cuantificación (LC) y detección (LD). **Resultados:** El método de extracción B demostró mayor eficacia para la detección de CBD. Se desarrolló un método rápido y específico para la cuantificación e identificación de CBD con tiempo de retención ( $t_R$ ) de 3.5 min, el método fue validado obteniendo una linealidad en el rango de concentración de 250 a 31.25 µg/mL, con  $R^2$  de 0.9995 y coeficientes de variación (CV) < 2 % por nivel; en la precisión se obtuvo un CV < 2%. Los límites de cuantificación y detección fueron calculados mediante curva de calibración en un rango de 250–3.65 µg/mL, el LC y LD calculados fueron de 20.38 y 6.76 µg/mL, respectivamente. **Conclusiones:** El método analítico desarrollado demostró ser específico, preciso y eficiente para la detección de CBD en muestras de plasma equino, su aplicación podría considerarse como una alternativa útil para la detección de CBD en muestras de equinos, así como una prueba de dopaje en competencias ecuestres. Este método se destaca por ser rápido y confiable, además de reducir significativamente los costos por reactivos, tiempo de procesamiento de las muestras y el uso de equipo en comparación con otras metodologías analíticas. Con la metodología propuesta logramos obtener un método de detección de CBD en plasma equino con un LC calculado de 20.38 µg/mL que con algunas modificaciones al método de extracción podría optimizarse.



UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA  
METROPOLITANA  
Unidad Xochimilco



F-012309

## El Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C.

y la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

Otorgan la presente

### CONSTANCIA

a: MVZ. Elba Rebeca Morelos Cruz, Dr. en C. Rubria Marlen Martínez Casares,  
Dr. en C. Beatriz Godínez Chaparro, Dr. en C. Ismael Martínez Cortés,  
Dr. en C. Aida Solís Oba, Dr. en C. José Antonio Martínez García

Por su participación como PONENTES del trabajo titulado:  
“Desarrollo de un método analítico por HPLC para cuantificación y detección de CBD  
a partir de muestras de plasma equino”

en el XXXIII Congreso de Educación Químico Farmacéutica Biológica  
y la XXIX Reunión de Estudiantes de Farmacia,  
realizado los días 12 al 14 de marzo de 2025.

CDMX, Mex., a 14 de marzo de 2025



Dra. Liliana Schifter Aceves  
Jefa del Departamento Sistemas Biológicos  
UAM Unidad Xochimilco

DAR Juan José Díaz Esquivel  
Presidente Comisión de Educación  
del CNQFBM, A.C.

Dr. Roberto Díaz Torres  
Presidente Comisión de Reunión  
de Estudiantes de Farmacia del CNQFBM, A.C.

QFB Agustín Azcatl Romero  
Presidente  
Colegio Nacional de Químicos  
Farmacéuticos Biólogos México, A.C.

- CRC's = Créditos para el Refrendo de la Certificación (0.6 Crc's por hora de capacitación), avalado por la Subcomisión de Educación Continua del COMECEP. Registro de Idoneidad DGP-SEP: SEP/DGP/CP089/17.

NOTA: Para ser válida en términos de certificación, esta constancia deberá estar impresa, contar con el sello del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C. y cuando menos, una firma autógrafa.

## Analysis of the effect of cannabidiol on the immune response in horses

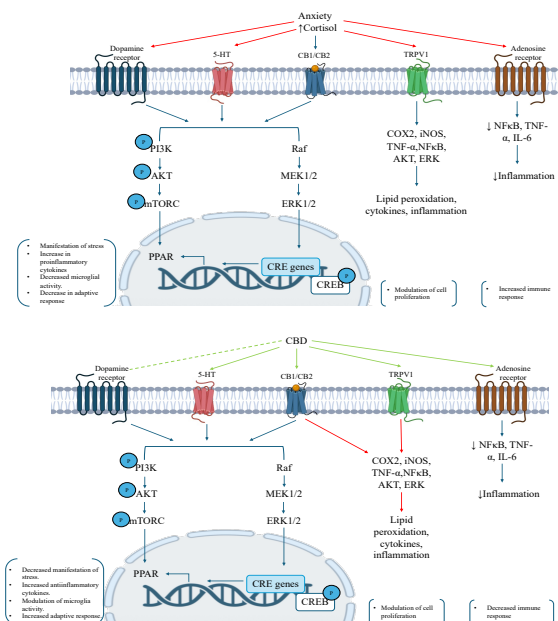
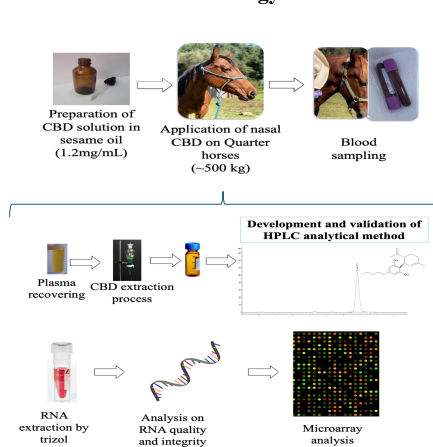
Elba Rebeca Morelos Cruz<sup>1</sup>, Rubria Marlen Martínez Casares<sup>2</sup>, Beatriz Godínez Chaparro<sup>3</sup>, Ismael Martínez Cortés<sup>4</sup>, Marcia Campillo Navarro<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Maestría en Ciencias Farmacéuticas, Mexico City, Mexico. <sup>2</sup> Departamento de Producción Agrícola y Animal, Laboratorio de Farmacología y Toxicología molecular, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Mexico City, Mexico. <sup>3</sup> Departamento de Sistemas Biológicos, Laboratorio de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Mexico City, Mexico. <sup>4</sup> Departamento de Sistemas Biológicos, Laboratorio de Dolor, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Mexico City, Mexico. <sup>5</sup> Oficina de Apoyo Sistemático para la Investigación Superior, Instituto Nacional de Cardiología.

### Introduction

With the need to find new therapeutic alternatives for various pathological cases, different methods of extraction from natural products have been developed. Among them, compounds derived from Cannabis, known as cannabinoids, have gained relevance in various fields. In particular, cannabidiol (CBD) has been shown to possess anxiolytic, anti-inflammatory, anticonvulsant and neuroprotective properties. The health effects of *Cannabis* remain poorly understood, especially in the case of products administered intranasally. Therefore, the objectives of this work are a) The development and validation of HPLC-DAD analytical method for CBD, b) evaluate the immunomodulatory activity of CBD administered by intranasally route, considering its affinity for the CB2 receptor predominant in cells of the immune system.

### Methodology



### Expected results

a) The analytical method for the detection and quantification of CBD from the oil solution, as well as for the evaluation of plasma samples, complied with the validation parameters established by the ICH (2005, 2022). The established limits of detection and quantification 0.6 and 1.8 µg/mL, respectively.

### Conclusions

The analytical method developed proved to be specific, accurate, and efficient for the detection and quantification of CBD in oil solution samples and equine plasma. Its application could be considered a useful alternative for the detection of CBD in equine samples in various fields, such as doping tests in equestrian competitions. On the other hand, tests related to the microarray have yet to be completed, which are expected to identify the genetic expression involved between CBD use and immune system modulation.

### Referencias:

1. International Conference on Harmonisation (ICH). (2005). ICH Q2(R1): Validation of analytical procedures: Text and methodology. <https://www.ema.europa.eu>
2. International Council for Harmonisation. (2022). ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. <https://www.ema.europa.eu>

### Agradecimientos:

- SECIHTI por la beca de posgrado CVU 2000738
- Laboratorio de Biotecnología, CBS-DAS, UAM Xochimilco.
- Laboratorio de Farmacología y toxicología, CBS-DPAA, UAM Xochimilco
- Laboratorio de Ensayos metabólicos, CBS-DPAA, UAM Xochimilco



SOCIEDAD MEXICANA  
DE INMUNOLOGÍA  
En la lucha contra las enfermedades  
infecciosas, autoinmunes, alergias y el cáncer



Valida esta constancia

**La Sociedad Mexicana de Inmunología A.C.**

**Otorga la presente**

**CONSTANCIA**

**a**

**ELBA REBECA MORELOS CRUZ**

por participar como **PONENTE** del cartel titulado:

**Analysis of the effect of cannabidiol on the immune response in horses**

**XXVI CONGRESO NACIONAL DE INMUNOLOGÍA**

Chihuahua, Chihuahua, del 28 de septiembre al 2 de octubre del 2025.

DRA. YVONNE ROSENSTEIN AZOULAY  
Presidenta SMI 2023-2025

DRA. DIANA PATRICIA PORTALES PÉREZ  
Secretaría SMI 2023-2025