



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

DOCTORADO EN QUÍMICA

TESIS

**DISEÑO DE METODOLOGÍAS DE ANÁLISIS DE
CORTICOSTEROIDES EN MUESTRAS COSMÉTICAS
Y FARMACÉUTICAS**

Para obtener el grado de

Doctor en Química

PRESENTA

M. Q. Karen Angelica Escamilla Lara

Director

Dr. José Antonio Rodríguez Ávila

Comité tutorial

Dra. Evelin Gutiérrez Moreno

Dr. Israel Samuel Ibarra Ortega

Dra. María Elena Páez Hernández

Dra. María del Sol Vega Alegre

Mineral de la Reforma, Hgo., México, octubre 2025



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

School of Engineering and Basic Sciences

Área Académica de Química

Department of Chemistry

Número de control: ICBI-AAQ/2421/2025

Asunto: Autorización de impresión

Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado
Directora de Administración Escolar de la UAEH

El Comité Tutorial del trabajo de tesis titulado **"DISEÑO DE METODOLOGÍAS DE ANÁLISIS DE CORTICOSTEROIDES EN MUESTRAS COSMÉTICAS Y FARMACÉUTICAS"**, realizado por la sustentante **Karen Angélica Escamilla Lara** con número de cuenta **184016** perteneciente al programa del **DOCTORADO EN QUÍMICA**, una vez que ha revisado, analizado y evaluado el documento recepcional de acuerdo con lo estipulado en el Artículo 110 del Reglamento de Estudios de Posgrado, tiene a bien extender la presente:

AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Por lo que la sustentante deberá cumplir los requisitos del Reglamento de Estudios de Posgrado y con lo establecido en el proceso de grado vigente.

Atentamente

"Amor, Orden y Progreso"

Mineral de la Reforma, Hidalgo a 23 de septiembre de 2025

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Mtro. Gabriel Vergara Rodríguez

Director del ICBI

Dr. José Antonio Rodríguez Ávila

Director de tesis

Dra. María Elena Páez Hernández

Miembro del Comité Tutorial

Dr. Israel Samuel Ibarra Ortega

Miembro del Comité Tutorial

Dra. Evelyn Gutiérrez Moreno

Miembro del Comité Tutorial

"Amor, Orden y Progreso"

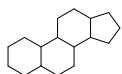
Ciudad del Conocimiento, Carretera Pachuca-Tulancingo Km. 4.5 Colonia Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México. C.P. 42184
Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 40088, 40087
aaq_icbi@uaeh.edu.mx, nandrade@uaeh.edu.mx



2025



uaeh.edu.mx



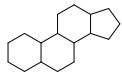
Este trabajo de investigación se realizó en el laboratorio 1 del Área Académica de Química de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo bajo la dirección del Dr. José Antonio Rodríguez Ávila

Parte de este trabajo ha sido presentado en el:

- XXXV Congreso Nacional de Química Analítica, XXV Simposio Estudiantil de la Asociación Mexicana de Química Analítica (2023) con el trabajo: “Aplicación de adsorbentes basados en carbón activado y poliestireno reciclado para la determinación de tartrazina”.
- The 29th Latin-American Capillary Electrophoresis, Microfabrication and Related Techniques Symposium-LACE Brazilian Symposium on Metabolomics-BrMet (2024) con el trabajo: “Determination of corticoids in cosmetic cream samples by micellar electrokinetic chromatography”.
- XXXVII Congreso Nacional de Química Analítica, XXVII Simposio Estudiantil de la Asociación Mexicana de Química Analítica (2025) con el trabajo: “Determinación de corticosteroides en cremas cosméticas empleando extracción en fase sólida dispersiva seguido de HPLC-DAD”.

Parte de este trabajo ha sido publicado:

- Escamilla-Lara, K. A., Ibarra, I. S., Paez-Hernandez, M. E., Gutierrez, E., y Rodriguez, J. A. (2025). Determination of prohibited corticosteroids, dexamethasone, prednisolone and triamcinolone in cosmetic creams by combination of dispersive solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD). *Analytical Letters*, doi.org/10.1080/00032719.2025.2478219.
- Escamilla-Lara, K. A., Ibarra, I. S., Lopez-Tellez, J., y Rodriguez, J. A. (2025). Use of mixed micelles in micellar electrokinetic chromatography method for determination of dexamethasone, prednisolone and triamcinolone in pharmaceutical formulations. *Separations*, 12(6), 154.



AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme culminar una etapa de mi carrera profesional de manera satisfactoria.

A Gerardo por acompañarme en este camino, por nunca dudar de mi capacidad como profesional y siempre brindarme su apoyo y comprensión para todo lo que implicó este trabajo. Por su compañía y constante motivación para ser mejor cada día, por ser una constante elección.

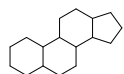
A mi madre Eloisa por ser un ejemplo constante de superación, por sus abrazos y palabras de aliento. A mi hermana Wendy por estar a mi lado en los buenos y malos momentos, por ser mi compañera de aventuras.

Al Dr. José Antonio Rodríguez Ávila por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por las incontables horas de revisiones y asesorías. Por quizás, llevar su paciencia al límite, sin embargo, lo logramos. Gracias por tu amistad y apoyo.

A los doctores que formaron parte de mi comité: Dra. Elena, Dr. Israel, Dra. Evelin, Dra. Marisol, agradezco su tiempo y dedicación para la resolución de dudas y sugerencias que enriquecieron este trabajo, los aprecio mucho.

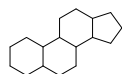
A mis amigos del laboratorio: Jorge, Enoch, Esmeralda, Sandy, Jess y Bego, gracias por todo su apoyo y los momentos compartidos durante estos años.

A mi chequesito por su compañía durante la escritura de este trabajo y desvelarse a mi lado.

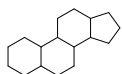


ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS	iii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	iv
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Generalidades de los corticosteroides	2
1.2 Clasificación de los corticosteroides.....	4
1.3 Técnicas instrumentales para el análisis de corticosteroides	6
1.4 Matrices analíticas y corticosteroides	7
1.4.1 Formulaciones farmacéuticas	7
1.4.2 Fluidos biológicos	8
1.4.3 Alimentos.....	10
1.4.5 Otras matrices analíticas	11
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo General	13
2.2 Objetivos Específicos	13
3. DETERMINACIÓN DE CORTICOSTEROIDES EN CREMAS COSMÉTICAS EMPLEANDO LA COMBINACIÓN DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA DISPERSIVA Y CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN.....	15
3.1. ANTECEDENTES	15
3.1.1 Crema cosmética	15
3.1.2 Tratamiento de muestras de cremas cosméticas.....	17
3.1.2.1 Desestabilización de emulsiones.....	17
3.1.2.2 Extracción en fase sólida	18
3.1.2.2.1 Extracción en fase sólida en cartuchos.....	19
3.1.2.2.2 Microextracción en fase sólida.....	22
3.1.2.2.3 Extracción en fase sólida dispersiva	24
3.1.3 Aplicación de técnicas de SPE en el análisis de corticosteroides	30
3.1.4 Análisis instrumental de corticosteroides en cosméticos	33
3.2 PARTE EXPERIMENTAL.....	34
3.2.1 Reactivos y disoluciones.....	34
3.2.2 Condiciones cromatográficas	35

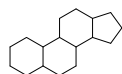


3.2.3 Preparación de adsorbentes basados en AC y PS	36
3.2.4 Evaluación de la capacidad adsorbente de las fases sólidas	37
3.2.5 Caracterización de las películas PS-AC	37
3.2.6 Análisis de cremas cosméticas	38
3.2.7 Validación de la metodología	39
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
3.3.1 Separación cromatográfica	40
3.3.2 Evaluación y selección de la fase adsorbente	41
3.3.3 Caracterización de las películas PS-AC	45
3.3.4 Optimización de las condiciones del protocolo QuEChERS (primera etapa)	47
3.3.5 Evaluación de las condiciones de extracción-elución	48
3.3.6 Validación de la metodología y análisis de muestras de cremas cosméticas	51
3.4 CONCLUSIONES	57
4. DETERMINACIÓN DE CORTICOSTEROIDES EN MUESTRAS FARMACÉUTICAS Y COSMÉTICAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA ELECTROKINÉTICA MICELLAR	59
4.1 ANTECEDENTES	59
4.1.1 Electroforesis capilar	59
4.1.1.1 Electroforesis capilar de zona (CZE).....	61
4.1.1.2 Cromatografía electrokinética micelar (MEKC)	62
4.1.2 Análisis de corticosteroides mediante MEKC.....	65
4.1.2.1 Sales biliares y micelas mixtas	65
4.1.2.2 Otras estrategias para separación electroforética de corticosteroides.....	69
4.2 PARTE EXPERIMENTAL.....	71
4.2.1 Reactivos y disoluciones.....	71
4.2.2 Condiciones MEKC.....	72
4.2.3 Selección de los componentes del BGE.....	73
4.2.4 Optimización de la composición del BGE	73
4.2.5 Análisis de muestras.....	75
4.2.6 Validación de la metodología	76
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	77
4.3.1 Selección de los componentes del BGE.....	77
4.3.2 Optimización de la composición del BGE	80
4.3.3 Validación de la metodología y análisis de muestras de cremas cosméticas	88



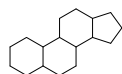
ÍNDICE GENERAL

4.4 CONCLUSIONES	98
5. REFERENCIAS	100



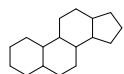
ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estructura química de algunos corticosteroides más comunes.	3
Figura 2	Cartuchos tradicionales empleados en la SPE y las etapas involucradas en el proceso.	20
Figura 3	Dispositivo utilizado en la SPME y las etapas involucradas en el proceso.	23
Figura 4	Dispositivo utilizado en la DSPE y las etapas involucradas en el proceso.	25
Figura 5	Representación esquemática para el proceso de extracción-elución de corticosteroides en muestras de cremas cosméticas mediante DSPE-HPLC-DAD.	39
Figura 6	Fases adsorbentes elaboradas a partir de PS y AC; a) esferas, b) columna monolítica y c) películas.	42
Figura 7	Gráfico de medias para factores involucrados en la evaluación de la fase adsorbente.	454
Figura 8	Remoción de colorante utilizando las películas PS-AC.	45
Figura 9	Isoterma de adsorción para TRI, PRE y DEX en el adsorbente PS-AC. Condiciones experimentales: 50.0 mg de adsorbente y 5.0 mL de disolución acuosa de corticosteroides (5.0-30.0 mg L ⁻¹), temperatura ambiente y tiempo de contacto de 30.0 min.	46
Figura 10	Microscopía electrónica de barrido de a) corte transversal a película PS-AC y b) recubrimiento de la superficie de la película PS-AC.	47
Figura 11	Efecto de los factores de control sobre el proceso de extracción de corticosteroides.	48
Figura 12	(a) Efecto de la cantidad de adsorbente y (b) del tiempo de extracción en el tanto por ciento de extracción de corticosteroides. Se utilizó 500.0 mg de una muestra de crema cosmética enriquecida con 100.0 mg kg ⁻¹ de analitos y 30.0 mg kg ⁻¹ de estándar interno; la mezcla se agitó a temperatura ambiente.	49
Figura 13	(a) Efecto del eluyente y (b) tiempo de elución en el tanto por ciento de elución de corticosteroides. Se utilizaron 500.0 mg de muestra enriquecida con 100.0 mg kg ⁻¹ de analitos y 30.0 mg kg ⁻¹ de estándar interno. La mezcla se agitó durante 5 minutos a temperatura ambiente.	51
Figura 14	Cromatogramas obtenidos del análisis de: (a) disolución estándar de corticosteroides 50.0 mg kg ⁻¹ (1; TRI, 2; PRE, 3; DEX y el estándar interno), (b) muestra enriquecida con 50.0 mg kg ⁻¹ de corticosteroides y (c) muestra adicionada con 50.0 mg kg ⁻¹ de corticosteroides y analizada empleando la metodología propuesta en este trabajo.	53
Figura 15	Migración de las moléculas en el proceso de separación electroforética bajo condiciones de polaridad normal.	60
Figura 16	Representación gráfica de una micela básica formada por un surfactante iónico.	63
Figura 17	Representación gráfica de a) una sal biliar, b) la formación de un agregado y c) la formación de un agregado de forma elipsoidal (Garidel et al., 2007).	66
Figura 18	Micela SDS-sal biliar a) esférica y b) cilíndrica.	67
Figura 19	Análisis de una disolución estándar que contiene 30.0 mg L ⁻¹ de los analitos (TRI, PRE, DEX) y del estándar interno empleando un electrolito compuesto por [B(OH) ₄] ⁻ =40.0 mM, pH=10.0 y a) SDS 10.0 mM, b) SLES 3.0 mM y c) dodecilsulfonato de sodio 4.0 mM.	78
Figura 20	Análisis de una disolución estándar que contiene 30.0 mg L ⁻¹ de los analitos (TRI, PRE, DEX) y del estándar interno empleando un electrolito compuesto por [B(OH) ₄] ⁻ =40.0 mM, pH=10.0 y a) ácido cólico, b) STC y c) una mezcla de sales biliares (60.0 mM).	79
Figura 21	Análisis de una disolución estándar que contiene 30.0 mg L ⁻¹ de los analitos (TRI, PRE, DEX) y del estándar interno empleando un electrolito	80



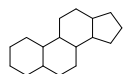
ÍNDICE DE FIGURAS

	compuesto por $[B(OH)_4^-]=40.0$ mM, pH=10.0 y a) α -ciclodextrina, b) β -ciclodextrina y c) γ -ciclodextrina (10 mM).	
Figura 22	Análisis de una disolución estándar que contiene 30.0 mg L^{-1} de los analitos (TRI, PRE, DEX) y del estándar interno empleando un electrolito compuesto por 15.0 mM (par ácido-base), 5.0 mM SDS, 15.0 mM de STC y 5.0 mM β -CD establecido un valor de: a) pH=6.0, b) pH=7.0, c) pH=8.0 y d) pH=9.0.	81
Figura 23	Análisis de una disolución estándar que contiene 30.0 mg L^{-1} de los analitos (TRI, PRE, DEX) y del estándar interno empleando un electrolito con pH=7.0, 5.0 mM SDS, 15.0 mM de STC, 5.0 mM β -CD y PO_4^{3-} ; a) 5.0 mM, b) 15.0 mM, c) 25.0 mM.	82
Figura 24	Análisis de una disolución estándar que contiene 30.0 mg L^{-1} de los analitos (TRI, PRE, DEX) y del estándar interno empleando un electrolito con pH=7.0, 25.0 mM PO_4^{3-} , 15.0 mM de STC, 5.0 mM β -CD y SDS; a) 0.0 mM, b) 2.0 mM, c) 5.0 mM y d) 8.0 mM.	83
Figura 25	Análisis de una disolución estándar que contiene 30.0 mg L^{-1} de los analitos (TRI, PRE, DEX) y del estándar interno empleando un electrolito con pH=7.0, 25.0 mM PO_4^{3-} , 5.0 mM de SDS, 5.0 mM β -CD y STC; a) 0.0 mM, b) 10.0 mM, c) 30.0 mM y d) 40.0 mM.	84
Figura 26	Análisis de una disolución estándar que contiene 30.0 mg L^{-1} de los analitos (TRI, PRE, DEX) y del estándar interno empleando un electrolito con pH=7.0, 25.0 mM PO_4^{3-} , 5.0 mM de SDS, 30 mM de STC y β -CD; a) 0.0 mM, b) 2.0 mM, c) 5.0 mM y d) 8.0 mM.	85
Figura 27	Efecto de los factores de control sobre la variable de salida (N) usando los electrolitos (a) SDS-STC y (b) SLES-STC.	88
Figura 28	Cromatogramas electrocinéticos obtenidos del análisis de: a) muestra de crema, b) disolución estándar de 60 mg kg^{-1} de corticosteroides y estándar interno c) muestra enriquecida con 60 mg kg^{-1} de los analitos. 1; TRI, 2; PRE, 3; DEX y el estándar interno. Voltaje de separación 14 kV, detección a 254 nm.	90
Figura 29	Cromatogramas electrocinéticos obtenidos con el electrolito SDS-STC para el análisis de (a) disolución estándar con 10.0 mg L^{-1} de corticosteroides (1; TRI, 2; PRE y 3; DEX) y estándar interno (metilprednisolona, MEP), (b) muestra número 5 y (c) muestra número 4. Composición de BGE: $[PO_4^{3-}] = 20.0$ mM, $[SDS] = 6.0$ mM, $[STC] = 30.0$ mM y pH = 8.0 , voltaje de separación de 14.0 kV, corriente eléctrica de 100.0 μA , $25^\circ C$.	94
Figura 30	Cromatogramas electrocinéticos obtenidos con el electrolito SLES-STC para el análisis de (a) disolución estándar con 10.0 mg L^{-1} de corticosteroides (1; TRI, 2; PRE y 3; DEX) y estándar interno (metilprednisolona, MEP), (b) muestra número 5 y (c) muestra número 4. Composición de BGE: $[PO_4^{3-}] = 30.0$ mM, $[SDS] = 6.0$ mM, $[STC] = 35.0$ mM y pH = 7.0 , voltaje de separación de 14.0 kV, corriente eléctrica de 100.0 μA , $25^\circ C$.	95
Figura 31	Puntuación de impacto ambiental según el software AGREE (v. 0.5 beta) para (a) la metodología propuesta (MEKC) y (b) el método HPLC (Farmacopea Mexicana, 2014).	96



ÍNDICE DE TABLAS

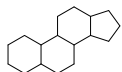
Tabla 1	Clasificación de corticosteroides acorde a su potencia.	5
Tabla 2	Proporciones evaluadas en la composición de esferas PS-AC.	36
Tabla 3	Proporciones evaluadas en la composición de columnas monolíticas PS-AC.	36
Tabla 4	Niveles y factores evaluados para determinar la capacidad adsorbente de las fases sólidas.	37
Tabla 5	Matriz de diseño obtenida para la evaluación de la capacidad adsorbente de las fases diseñadas.	43
Tabla 6	Parámetros calculados obtenidos mediante el análisis de Scatchard para el adsorbente de carbón activado y poliestireno (PS-AC): el número máximo de moles de corticosteroide que se pueden adsorber (Q_{max}) en PS-AC y las constantes de disociación (K_d).	46
Tabla 7	Parámetros de regresión obtenidos a partir de las curvas de calibración para cada uno de los corticosteroides evaluados.	52
Tabla 8	Concentración de corticosteroides determinada en una muestra de crema cosmética enriquecida, utilizando la metodología propuesta (evaluación de la precisión).	54
Tabla 9	Ensayos de recuperación de corticosteroides en muestras de crema cosmética enriquecida (40.0, 60.0 y 80.0 mg kg ⁻¹) empleando el método propuesto.	55
Tabla 10	Comparación entre los métodos aplicados a la determinación de corticosteroides en muestras cosméticas.	56
Tabla 11	Metodologías MEKC desarrolladas para el análisis de corticosteroides.	68
Tabla 12	Factores y niveles evaluados en la optimización de la composición del BGE.	74
Tabla 13	Descripción de las formulaciones farmacéuticas analizadas.	77
Tabla 14	Matriz ortogonal y su correspondiente N para cada experimento.	86
Tabla 15	Parámetros analíticos obtenidos para los corticosteroides a partir del análisis de la curva de calibrado.	89
Tabla 16	Concentración de corticosteroides determinada en una muestra de crema cosmética aplicando la metodología propuesta para determinar su precisión (%DER).	89
Tabla 17	Ensayos de recuperación de corticosteroides en muestras de crema cosmética enriquecida (80.0, 110.0 y 140.0 mg kg ⁻¹) empleando el método propuesto.	90
Tabla 18	Parámetros analíticos obtenidos en el análisis electroforético de corticosteroides empleado los electrolitos SDS-STC y SLES-STC.	91
Tabla 19	Concentración de corticosteroides determinada mediante la metodología propuesta para determinar la precisión empleando los electrolitos SDS-STC y SLES-STC.	92
Tabla 20	Contenido de corticosteroide (promedio y %DER, n=3) en formulaciones farmacéuticas determinado mediante la metodología propuesta (MEKC) y HPLC.	92
Tabla 21	Comparación entre las metodologías usadas para la determinación de corticosteroides en formulaciones farmacéuticas.	97



ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AC	Carbón activado
ACN	Acetonitrilo
BGE	Electrolito de trabajo
CD	Ciclodextrina
CE	Electroforesis capilar
CMC	Concentración micelar crítica
CZE	Electroforesis capilar de zona
DAD	Detector con arreglo de diodos
DER	Desviación estándar relativa
DEX	Dexametasona
DMF	N,N-dimetilformamida
DSPE	Extracción en fase sólida dispersiva
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EOF	Flujo electroosmótico
FDA	Administración de alimentos y medicamentos
GC	Cromatografía de gases
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
I.S.	Estándar interno
ICH	Consejo internacional para la armonización de los requisitos técnicos de productos farmacéuticos de uso humano
ESI	Electroionización en spray
LC	Cromatografía de líquidos
LLE	Extracción líquido-líquido
LODs	Límites de detección
LOQs	Límites de cuantificación
MEKC	Cromatografía electrocinética micelar
MEP	Metilprednisolona
MIPs	Polímeros molecularmente impresos
MS	Espectrometría de masas
N	Número de platos teóricos
PET	Tereftalato de polietileno
PRE	Prednisolona
PS	Poliestireno
PSA	Amina primaria-secundaria
QuEChERS	Rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe)
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SLES	Lauril diéter sulfato de sodio
SPE	Extracción en fase sólida
SPME	Microextracción en fase sólida
STC	Taurocolato de sodio
THF	Tetrahidrofurano
TRI	Triamcinolona
UV	Espectrofotometría ultravioleta
UV-Vis	Espectrofotometría ultravioleta-visible

INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

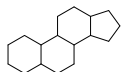
1.1 Generalidades de los corticosteroides

Los corticosteroides son hormonas esteroideas que participan en diversas funciones fisiológicas como la homeostasis inmunitaria y la funcionalidad de la presión arterial, la regulación del apetito y la supresión de la inflamación (Harding y Harding, 2021). La terapia de corticosteroides con fines médicos fue introducida en la década de 1950, empleando la cortisona, primer corticosteroide empleado y precursor de muchos de los corticosteroides sintéticos desarrollados hasta la fecha (Benedek, 2011).

La estructura química de los corticosteroides está formada por 17 átomos de carbono (C) organizados en 4 anillos; 3 anillos de 6 C (A, B y C) y un anillo de 5 C (D) unidos entre sí. Diversas modificaciones han sido realizadas a la estructura base de los corticosteroides, entre ellas destacan la adición de sustituyentes (-F o -OH) y la introducción de dobles enlaces en los ciclohexanos, estos cambios han dado lugar a la síntesis de varios fármacos de esta familia con diferentes actividades y efectos positivos y negativos sobre la salud humana (Anastassakis, 2022).

La Figura 1 presenta la estructura química de algunos de los corticosteroides más utilizados como metilprednisolona (MEP), dexametasona (DEX), prednisolona (PRE) y triamcinolona (TRI) (Giaccone et al., 2017; Xu et al., 2014). Estos compuestos presentan polaridad media (valores de log P entre 0.8 y 1.9) lo que les permite ser solubles en disolventes como el acetonitrilo (ACN), metanol (MeOH), etanol (EtOH) y acetona. Debe resaltarse que no presentan propiedades ácido-base que influyan de forma significativa en el reparto en medio acuoso (valores de pKa cercanos a 12) (Volmer y Hui, 1997).

El mecanismo de acción de los corticosteroides inicia cuando el fármaco atraviesa la membrana de la célula hospedadora e interactúa con los receptores de glucocorticoides. El complejo formado entre el receptor y el glucocorticoide se traslada al núcleo de la célula y se une a los elementos de respuesta de los corticosteroides. Esta última etapa regula la expresión de varios genes dentro del organismo, por ejemplo se inhibe la



producción de agentes proinflamatorios (Fosfolipasa A2) en macrófagos, linfocitos y mastocitos. Además, inhiben la extravasación de células inmunitarias, la adhesión de células epiteliales, la quimiotaxis y la fagocitosis en la célula hospedadora (Gopaldaswamy y Subbian, 2021).

Los corticosteroides son capaces de inducir genes antiinflamatorios e inmunomoduladores mediante transactivación y transrepresión a nivel molecular, inhibiendo la transcripción de factores (NF-Kb y proteína activadora 1) involucrados en los genes proinflamatorios. Adicionalmente, son inhibidores de vasodilatadores como la histamina y prostaglandinas generando una importante vasoconstricción en el organismo (Anastassakis, 2022).

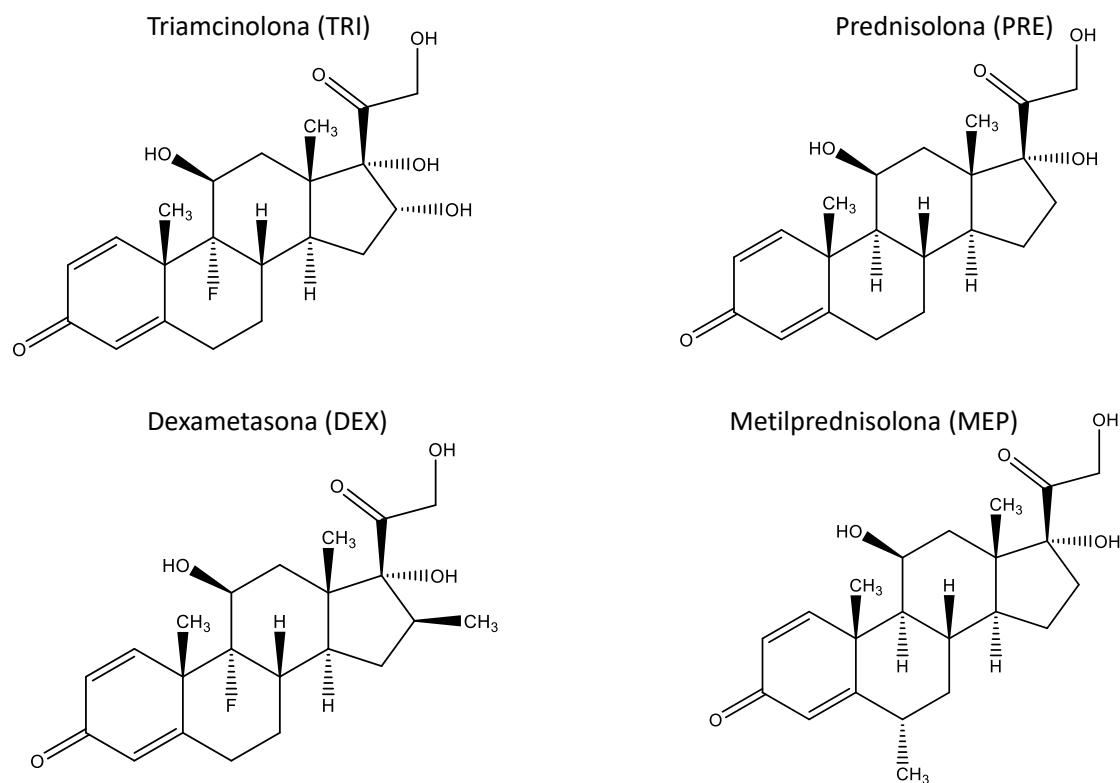
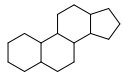


Figura 1. Estructura química de algunos corticosteroides más comunes.



1.2 Clasificación de los corticosteroides

La clasificación más común descrita para los corticosteroides es en función a su actividad biológica dividiéndose en glucocorticoides y mineralocorticoides. Los primeros son moléculas involucradas en el metabolismo de proteínas, carbohidratos y grasas, controlan la circulación de células inmunes en el organismo y exhiben sobre todo propiedades antiinflamatorias. Algunos ejemplos de glucocorticoides son la betametasona, cortisona, hidrocortisona, dexametasona y triamcinolona (Caramori et al., 2019; Ericson-Neilsen y Kaye, 2014).

Por otra parte, los mineralocorticoides son responsables del balance de sales y agua en el organismo, actúan principalmente en los túbulos renales favoreciendo la reabsorción de sodio y excreción de potasio. Entre los mineralocorticoides destacan la aldosterona y la fludrocortisona (Liu et al., 2013; Kapugi y Cunningham, 2019).

Otra clasificación que se puede encontrar para los corticosteroides es acorde a su potencia dividiéndolos en 4 grupos (Tabla 1), esta característica hace referencia a la eficacia antiinflamatoria; a mayor potencia se requiere una menor dosis del fármaco. Los compuestos en cada categoría difieren estructuralmente, sin embargo; presentan actividad y potencia similar entre sí. Uno de los corticosteroides de mayor potencia es el propionato de clobetasol, por lo cual es importante la supervisión médica en su prescripción y aplicación, en contraste, la metilprednisolona y prednisolona presentan un bajo nivel de potencia lo que se traduce en su recurrente prescripción para procesos desinflamatorios de manera más prolongada que el clobetasol (Oakley et al., 2021).

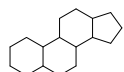
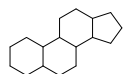


Tabla 1. Clasificación de corticosteroides acorde a su potencia.

Corticosteroide	Potencia (%p/p)	Corticosteroide	Potencia (%p/p)
Clase 1 (muy potente)		Clase 3 (moderadamente potente)	
Propionato de clobetasol	0.05	Dipropionato de alclometasona	0.05
Valerato de difluocortolona	0.30	Dipropionato de beclometasona	0.03
Acetónido de fluocinolona	0.20	Salicilato de beclometasona	0.03
Halcinonida	0.10	Benzoato de betametasona	0.03
Clase 2 (potente)		Dipropionato de betametasona	0.05
Amcinonida	0.10	Valerato de betametasona	0.03
Valerato de betametasona	0.10	Butirato de clobetasona	0.05
Budesónida	0.03	Desoximetasona	0.05
Desonida	0.05	Pivalato de flumetasona	0.02
Desoximetasona	0.25	Acetónido de fluocinolona	0.01
Diacetato de diflorasona	0.05	Pivalato de fluocortolona	0.20
Valerato de difluocortolona	0.10	Flupamerasona	0.30
Acetónido de fluclorolona	0.03	Flurandrenolona	0.01
Acetónido de fluocinolona	0.03	Halometasona	0.05
Fluocinonida	0.05	Butirato de hidrocortisona	0.10
Acetato de fluprednidenol	0.10	Aceponato de hidrocortisona	0.10
Flurandrenolona	0.05	Valerato de hidrocortisona	0.20
Propionato de fluticasona	0.05	Acetónido de triamcinolona	0.04
Butirato de hidrocortisona	0.10	Clase 4 (baja potencia)	
Aceponato de metilprednisolona	0.10	Dexametasona	0.01
Furoato de mometasona	0.10	Acetónido de fluocinolona	0.002
Prednicarbato	0.25	Éster butílico de fluocortin	0.75
Acetónido de triamcinolona	0.10	Hidrocortisona	0.10-1.00
		Metilprednisolona	0.25
		Prednisolona	0.50

(Brazzini y Pimpinelli, 2002).

Por otra parte, los corticosteroides pueden dividirse terapéuticamente en tres categorías; intravenoso/oral, inhalados y tópicos (Gopalaswamy y Subbian, 2021). La principal forma de aplicación de estos fármacos es tópica y sistémica debido a sus propiedades (Baeck y Goossens, 2022); siendo altamente efectivos en tratamientos para la artritis reumatoide,



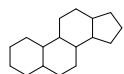
lupus eritematoso, osteoartritis, tendinitis, distrofia refleja, asma, psoriasis y rinitis (Stone et al., 2021).

Estos compuestos presentan diversas interacciones en los tejidos y fluidos del cuerpo humano de gran relevancia terapéutica, sin embargo, una aplicación prolongada de corticosteroides puede provocar importantes efectos adversos a la salud dañando el metabolismo de órganos y sistemas generando hiperglicemia, hipocalcemia, hipotiroidismo, úlceras gástricas, hipertensión arterial, edema, diabetes mellitus, acné, dermatitis y síndrome de Cushing (Williams, 2018).

Considerando que los corticosteroides pueden ser adquiridos sin receta médica (Alvarez-Hernández et al., 2008), el amplio número de tratamientos para el que son utilizados y la diversa cantidad de medios en los que pueden ser encontrados (muestras biológicas, muestras acuosas y muestras de alimentos), es importante el desarrollo de metodologías analíticas que permitan su monitoreo en diversas matrices para evaluar la efectividad de los tratamientos y los efectos secundarios producidos en los pacientes y consumidores.

1.3 Técnicas instrumentales para el análisis de corticosteroides

La cromatografía de gases (GC, por sus siglas en inglés) ha sido una de las principales técnicas instrumentales que se han utilizado para la determinación de corticosteroides en diferentes muestras. Sin embargo, la baja volatilidad de estos compuestos complica su determinación, siendo necesaria la derivatización del analito utilizando N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida, ditioeritritol o N-trimetilsilil imidazol (Amendola et al., 2003; Bowden et al., 2009). No obstante, la técnica preferida para el análisis de estos compuestos es cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés), la cual generalmente emplea una modalidad en fase inversa para su determinación, utilizando columnas de octil- u octadecil-silano (C₈, C₁₈) y fases móviles compuestas por ACN o MeOH y agua (Cirimèle et al., 2000; Quintana et al., 2001; Deventer y Delbeke, 2003; Studzińska y Buszewski, 2013; Sversut, 2014; Liu et al., 2015; Zhang, y Fent, 2018).



Estas técnicas instrumentales permiten obtener límites de detección (LODs por sus siglas en inglés) acorde con algunas regulaciones. Como resultado de sus diversas aplicaciones, los corticosteroides han sido determinados y analizados en una amplia cantidad de matrices; entre ellas las formulaciones farmacéuticas y muestras biológicas.

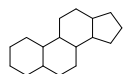
1.4 Matrices analíticas y corticosteroides

1.4.1 Formulaciones farmacéuticas

Los corticosteroides son fabricados de manera sintética para su aplicación oral, intramuscular, intraarterial, intravenosa, inhalada o tópica. En este sentido es posible encontrar este grupo de fármacos en diversas presentaciones, entre ellas, soluciones inyectables, suspensiones, emulsiones, tabletas, soluciones oftálmicas, aerosoles, cremas, cápsulas e implantes de liberación prolongada (Gaballa et al., 2021).

La mayoría de las formulaciones farmacéuticas contienen diversos componentes además de los corticosteroides lo que puede dificultar su análisis. Por ejemplo las presentaciones tópicas (ungüentos y cremas) son formulaciones semisólidas compuestas por una fase acuosa dispersa en una fase oleosa (derivados de petróleo, vaselina) estabilizadas por un emulsificante (derivados de glicérido), además contienen emolientes (aceite mineral) (Chow et al., 2023) y el principio activo (corticosteroides entre el 0.025-2.5%, 250.0-25000.0 mg kg⁻¹) (Stacey y McEleney, 2021). Las tabletas, además del principio activo (5.0%, 50000.0 mg kg⁻¹) (Mazurek y Szostak, 2006), contienen ingredientes inactivos para favorecer su asimilación en el aparato digestivo, entre ellos se ha descrito la celulosa microcristalina, estearato de magnesio, lactosa anhidra, dióxido de silicio coloidal, glicolato sódico de almidón y talco (Chauhan et al., 2010).

Para el caso de las disoluciones inyectables y oftálmicas se requiere del excipiente para la asimilación del corticosteroide, en las ampollitas el corticosteroide se encuentra en una concentración de alrededor de 4000 mg L⁻¹ mientras que para las gotas oftálmicas el principio activo se ha descrito en el intervalo de 500 a 10000 mg L⁻¹. Entre los compuestos inactivos adicionados a la formulación se encuentran el ácido



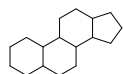
etilendiaminotetraacético (EDTA), citrato de sodio, hidróxido de sodio y agua inyectable (Abbas et al., 2020).

Inicialmente las formulaciones farmacéuticas de corticosteroides se analizaron mediante métodos espectrofotométricos, ejemplo de ello es el análisis de dexametasona en una muestra de jarabe requiere una etapa previa de extracción líquido-líquido (LLE por sus siglas en inglés). Para extraer el corticosteroide se emplearon porciones de 20.0 mL de CHCl_3 , posteriormente el extracto orgánico se evapora y se reconstituye en MeOH para su análisis mediante espectrofotometría ultravioleta (UV). Se ha descrito que la determinación de prednisolona requiere solo la dilución de la muestra con MeOH para su análisis instrumental, el corticosteroide fue determinado a 248 nm (El-Yazbi et al., 1986). Otra forma de realizar el análisis de corticosteroides utilizando espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-Vis) consiste en hacerlos reaccionar con fenilhidrazina, el producto de la reacción participa en reacciones de complejación por transferencia de carga con iones yodo y cloroanilino. Esta metodología permite el análisis de prednisona, prednisolona y dexametasona en tabletas; los complejos resultantes se analizaron a 450, 455, 460 nm respectivamente (Ayad et al., 1984). La mayoría de las metodologías de análisis de corticosteroides que emplean espectrofotometría UV-Vis presentan importantes desventajas como el análisis de un compuesto por ensayo y su baja especificidad y selectividad, por ello han sido reemplazados por los métodos cromatográficos.

Entre los métodos cromatográficos para el análisis de corticosteroides en muestras farmacéuticas se ha establecido como metodología oficial el HPLC, generalmente se emplean columnas C_{18} en modalidad fase inversa, mientras que la fase móvil se compone de disolventes orgánicos (MeOH y ACN) y agua, con sistemas de detección UV-Vis o espectrometría de masas (MS).

1.4.2 Fluidos biológicos

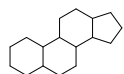
Una de las matrices biológicas donde se ha analizado el contenido de corticosteroides es la orina humana, debido a que la mayoría de los fármacos no son absorbidos en su totalidad y son excretados a través de este medio. La orina es una muestra de fácil



recolección, siendo el análisis de su composición de utilidad para diagnósticos clínicos y tratamientos de enfermedades endócrinas. La determinación y cuantificación de cortisona y corticosterona en muestras de orina ha sido posible mediante GC; para su desarrollo son necesarias dos etapas. La primera consiste en la extracción de los fármacos de la matriz analítica mediante LLE empleando dietiléter como agente extractante. La segunda etapa comprende la derivatización de los corticosteroides, para lo cual se utilizó N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida como derivatizante. Para el análisis se utilizaron dos columnas analíticas: 5.0 % y 50.0% fenilpolisilfenilsiloxano; TR-5MS (15 m, d.i. 0.25 mm, espesor de película de 0.25 μ m) y TR-50MS (15 m, d.i. 0.25 mm, espesor de película 0.25 μ m) y empleando una temperatura máxima de análisis de 330.0 °C con un tiempo total de corrida de 30.0 minutos (Poho et al., 2019).

Otra matriz analítica que se ha considerado para la determinación de corticosteroides en función a su paso por el cuerpo humano es el plasma. La determinación de prednisolona, prednisona, cortisol y cortisona en muestras de plasma ha sido de utilidad para el seguimiento de pacientes con síndrome nefrótico. El análisis de estas muestras se ha descrito mediante GC acoplado a un sistema de detección MS. Empleando anhídrido heptafluoro-n-butírico como derivatizante; la técnica permite estimar la concentración de prednisolona libre a partir de los valores de prednisolona plasmática total (Shibasaki et al., 2008).

Esta familia de compuestos ha sido incluida en la lista de sustancias restringidas de acuerdo al Comité Olímpico Internacional desde 1995. Se ha propuesto el análisis de cabello como una alternativa para pruebas antidopaje que permite el rastreo de consumo de sustancias ilícitas con meses de anterioridad. Para el análisis de triamcinolona, prednisolona, prednisona, metilprednisolona, cortisona, cortisol, betametasona, dexametasona, flumetasona y beclometasona en hebras de cabello es necesario lavar la muestra con cloruro de metileno y pulverizarla. Posteriormente se realiza la extracción de los analitos empleando una mezcla H₂O:MeOH (90:10 v/v), el extracto se analizó mediante LC-ESI-MS (Cirimèle et al., 2000).

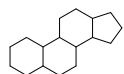


1.4.3 Alimentos

La medicina veterinaria recurre a fármacos (antimicrobianos, antibióticos y antiinflamatorios) para proporcionar una mejor calidad de vida a los animales y al mismo tiempo cumplir con los estándares de producción, destacando el uso de corticosteroides en el ganado. Adicionalmente; se ha descrito que se aplican de forma ilegal como promotores de crecimiento debido a que causa el almacenamiento de agua en los tejidos, característica que ha provocado el uso de este medicamento de manera descontrolada sin fines terapéuticos (Deceuninck et al., 2013). Debido a los riesgos a la salud que puede provocar consumir alimentos de origen animal que presenten residuos de esta clase de fármacos, la Unión Europea ha establecido los límites máximos permitidos de residuos de algunos corticosteroides como la dexametasona y la prednisolona en leche de vaca de 0.3 y 6.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ respectivamente (McDonald et al., 2007).

Entre las metodologías utilizadas para la cuantificación de corticosteroides en alimentos de origen animal se ha descrito la GC-MS, la cual permite determinar 18 hormonas anabólicas en leche bronca y leche en polvo. El análisis requiere extraer los fármacos mediante LLE empleando dietiléter, y posteriormente realizar una purificación de la muestra mediante extracción en fase sólida (SPE por sus siglas en inglés) previo a su análisis instrumental. Esta metodología ha sido acreditada como método de detección de residuos hormonales en muestras de leche comerciales dado que se obtuvieron LODs entre 0.19 a 0.75 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Matraszek-Zuchowska et al., 2017).

El uso de corticosteroides como promotores de crecimiento en los animales ha sido prohibido por la Unión Europea, sin embargo; se ha descrito su adición ilegal en el alimento de los terneros. Con el fin de procurar el bienestar animal y la salud de los consumidores es necesario contar con estrategias analíticas que monitoreen el uso de estos fármacos en los alimentos de los animales, así como en otros productos de consumo humano de origen animal. La cuantificación de corticosteroides en alimento para ganado y orina bovina (dexametasona, flumetasona y acetónido de triamcinolona) (Stolker et al., 2000) e hígado bovino (dexametasona, betametasona y flumetasona) (Draisci et al., 2001) es posible mediante LC-MS.



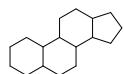
1.4.5 Otras matrices analíticas

Recientemente se ha documentado la adición ilegal de corticosteroides en productos de cuidado personal, lo cual es resultado de otorgar las propiedades de los corticosteroides a los productos cosméticos. Entre los efectos que confieren estos fármacos destacan un efecto blanqueador y rejuvenecedor en la piel, prevenir su envejecimiento y mejorar su apariencia (Wei et al., 2020). Las presentaciones que han sido sometidas a la evaluación del contenido de corticosteroides son lociones, soluciones, crema, geles y maquillaje en polvo (Kim et al., 2017).

Por otra parte, como resultado de los abundantes tratamientos donde se prescriben corticosteroides se ha documentado un aumento en las emisiones de estos compuestos hacia el medio ambiente, estos fármacos son transportados a través de efluentes domésticos y hospitalarios hacia el medio acuático, generando un importante problema de contaminación para el ecosistema. El análisis de cortisol, cortisona, prednisolona, prednisona y acetonido de triamcinolona en aguas residuales provenientes de la industria veterinaria y hospitales se realizó mediante LC-MS, el estudio reveló que los corticosteroides que tienen mayor presencia en aguas residuales son la dexametasona, prednisolona y el acetonido de triamcinolona (Schriks et al., 2010).

Considerando lo anterior el presente trabajo plantea los siguientes objetivos.

OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

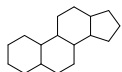
2.1 Objetivo General

Diseñar estrategias de análisis de corticosteroides en muestras cosméticas y farmacéuticas empleando técnicas de separación instrumental.

2.2 Objetivos Específicos

- Diseñar y validar una metodología de análisis basada en la combinación de extracción en fase sólida dispersiva y cromatografía de líquidos de alta resolución para la determinación de corticosteroides en muestras de cremas cosméticas.
- Diseñar y validar una metodología de análisis basada en cromatografía electrocinética micelar para la determinación de corticosteroides en muestras de cremas cosméticas y formulaciones farmacéuticas.

DETERMINACIÓN DE
CORTICOSTEROIDES EN CREMAS
COSMÉTICAS EMPLEANDO LA
COMBINACIÓN DE EXTRACCIÓN EN
FASE SÓLIDA DISPERSIVA Y
CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE
ALTA RESOLUCIÓN



3. DETERMINACIÓN DE CORTICOSTEROIDES EN CREMAS COSMÉTICAS EMPLEANDO LA COMBINACIÓN DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA DISPERSIVA Y CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

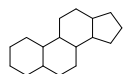
3.1. ANTECEDENTES

3.1.1 Crema cosmética

Una crema es una emulsión semisólida diseñada para su aplicación tópica; las emulsiones se definen como la dispersión de dos fases parcialmente solubles o inmiscibles entre sí, donde estas fases generalmente suelen ser agua y aceite. La fase que se encuentre en menor proporción será distribuida uniformemente en forma de pequeñas gotas (fase dispersa) a lo largo del componente mayoritario (fase continua). La fase oleosa generalmente contiene vitaminas, aceites esenciales, ceras, lanolina, ácidos grasos y algunos alcoholes de cadena larga mientras que la fase acuosa comprende los humectantes (glicerina, propilenglicol) y surfactantes (encargados de la estabilidad de la emulsión mediante la formación de micelas). Además de la fase acuosa y oleosa, su formulación se complementa con la adición de otros compuestos que garantizan su estabilidad, aplicación y función, entre ellos: colorantes, emolientes, fragancias, humectantes, y conservadores (Lalita y Shalini, 2020).

En general, las cremas forman parte de los productos cosméticos al ser destinadas a embellecer, proteger, suavizar, humectar e hidratar la parte del cuerpo donde se aplicarán. Son productos de uso frecuente dentro de la población, principalmente en cara y manos, se considera que este tipo de cremas deben ser fluidas y fáciles de aplicar, para obtener estas características es necesario que las formulaciones presenten un contenido de sólidos entre 10.0-40.0% (Wilkinson y Moore, 1990).

Acorde al tipo de emulsión, las cremas se pueden clasificar en mezclas aceite en agua (O/W) y agua en aceite (W/O), estas diferencias en su composición permite catalogarlas acorde a su textura; se han descrito cremas ligeras (son de fácil absorción con textura

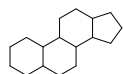


suave), medias (textura más espesa adecuada para pieles mixtas o secas) y pesadas (recomendadas para pieles muy secas, debido a su textura emoliente y propiedad de hidratación) (Mohiuddin, 2019).

Otra forma de clasificar a las cremas cosméticas es acorde a su función y propiedades, algunos ejemplos incluyen: maquillaje, limpiadoras, uso general, hidratantes, para masaje, reafirmantes y exfoliantes. Para este tipo de productos es muy importante definir el público al que son enfocados, por ello además de su función se puede encontrar una subclasificación para las cremas acorde al tipo de piel para el que son fabricadas encontrándose cremas para piel seca, grasa, mixta y sensible.

Por otra parte, un producto cosmético por definición no cuenta con fines terapéuticos, sin embargo, se ha descrito la adición ilegal de fármacos dentro de sus formulaciones para obtener beneficios adicionales (Milstein et al., 2001). En el área dermatológica, los corticosteroides se aplican para reducir la inflamación en afecciones como dermatosis, psoriasis y eccema. Dentro de este grupo de fármacos existen compuestos con potencia moderada (dexametasona y triamcinolona) o baja potencia (prednisolona y metilprednisolona), los cuales en función a su actividad en el organismo pueden usarse durante períodos prolongados (mayores a 12 semanas). Por otra parte, para los corticosteroides de alta potencia como el clobetasol, se recomienda limitar su uso (menos de 3 semanas) (Oakley et al., 2021) ya que pueden causar efectos secundarios como irritación cutánea, hipertensión, diabetes mellitus, osteoporosis y atrofia cutánea (Giaccone et al., 2017). La TRI, PRE, MEP y DEX han sido descritos como los más utilizados en formulaciones tópicas (Nam et al., 2012). En función a las alteraciones que provocan estos fármacos en el organismo es ampliamente recomendado que se administren solo en tratamientos evaluados y bajo supervisión médica.

Las autoridades reguladoras, incluidas las regulaciones de cosméticos de la Unión Europea y la Norma de Higiene para Cosméticos del Ministerio de Salud de China, han determinado que los corticosteroides son sustancias prohibidas dentro de la composición de productos cosméticos (Liu et al., 2017). Sin embargo, se ha descrito la adición de corticosteroides a diferentes formulaciones de cremas cosméticas (Nam et al., 2012), ya



que mejoran la apariencia de la piel al proporcionar un efecto rejuvenecedor y blanqueador (Wei et al., 2020). Entre los corticosteroides que han sido encontrados en muestras cosméticas no descritos en las etiquetas se puede mencionar la DEX, PRE y TRI (Desmedt et al., 2014). La presencia de estos compuestos en productos de consumo diario sin supervisión médica representa una mayor exposición asociada a riesgos para la salud de los consumidores.

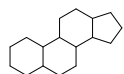
La determinación de corticosteroides ha sido ampliamente descrita en formulaciones farmacéuticas y muestras biológicas, no obstante; el análisis en muestras de productos cosméticos ha sido poco estudiado, por ello es importante desarrollar metodologías que permitan la determinación de los corticosteroides en esta clase de productos.

3.1.2 Tratamiento de muestras de cremas cosméticas

3.1.2.1 Desestabilización de emulsiones

La presencia de componentes hidrofílicos e hidrofóbicos en este tipo de muestras dificulta su análisis instrumental debido a que el reparto de los analitos está comprometido debido a la polaridad media de los analitos y a la co-extracción de los ingredientes que componen la matriz analítica, por lo tanto, es necesario realizar un tratamiento de muestra conveniente y eficaz para purificar, eliminar o reducir las interferencias en el análisis instrumental (Guo et al., 2019). El análisis de emulsiones cosméticas requiere como primera etapa su desestabilización con el objetivo de separar y transferir los compuestos de interés de la matriz (sólida o líquida) hacia una nueva fase que permita su determinación y cuantificación.

La adición de disolventes orgánicos se ha descrito como una estrategia que permite separar las fases que componen la emulsión (oleosa y acuosa). Además, desestabilizan al emulsificante y favorecen el reparto de los analitos hacia la fase orgánica (mayor afinidad de los analitos hacia el disolvente orgánico) (Zolfaghari et al., 2016). Específicamente, en matrices de cremas cosméticas se han empleado EtOH, MeOH, ACN y acetona como disolventes apropiados para la desestabilización de las muestras cosméticas (Gimeno et al., 2016; Celeiro et al., 2021). La incorporación del disolvente a



la muestra suele combinarse con agitación mecánica para facilitar la transferencia del analito hacia el disolvente.

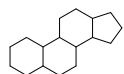
Otra forma de conseguir la desestabilización de la emulsión es mediante la adición de sales: al incrementar la salinidad de la fase acuosa se desestabiliza la interacción agua-tensioactivo impidiendo o disminuyendo la participación del compuesto responsable de la formación de las micelas. Cuando la sal es añadida en exceso se da lugar al efecto conocido como “salting-out”: el sistema se convierte en un sistema bifásico inmiscible donde las moléculas de agua rodean a los iones procedentes de las sales y dejan de estar disponibles para interactuar con los analitos favoreciendo su paso hacia el disolvente orgánico (Zolfaghari et al., 2016).

Bajo estos conceptos, se diseñó en el año 2003 la técnica QuEChERS (acrónimo en inglés: Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) (González-Curbelo et al., 2015). Esta metodología comprende dos etapas: la primera consiste en la extracción de los analitos empleando disolventes orgánicos (acetona, EtOH, ACN, MeOH) en presencia de sales (MgSO_4 , MgCl_2 , NaNO_3 , NaCl , Na_2SO_4 , LiCl , acetato de sodio), donde se obtiene una fase líquida que contiene los analitos, no obstante; solubiliza otros componentes de la muestra que podrían ser interferentes en el análisis instrumental. Por esta razón, se incorpora una segunda etapa basada en extracción en fase sólida (Ocaña-González et al., 2015), por lo que a continuación se describen algunos principios importantes que se requieren al momento de diseñar una metodología de tratamiento de análisis.

3.1.2.2 Extracción en fase sólida

La aplicación de protocolos apropiados para el tratamiento y limpieza de la muestra permite disminuir o eliminar el número de interferentes contenidos, así como incrementar la concentración de los analitos previo al análisis instrumental y como consecuencia aumentar la sensibilidad analítica (Guo et al., 2019).

Dentro de las técnicas utilizadas con este fin se han descrito técnicas basadas en extracción en fase líquida (Gimeno et al., 2016) y en fase sólida, siendo la extracción en fase sólida y sus variantes las más empleadas debido a ventajas como disminución del



consumo de disolventes orgánicos, costos y tiempos de análisis (Płotka-Wasyłka et al., 2015).

La SPE consiste en separar los analitos de la matriz, disolverlos en una fase líquida y posteriormente retenerlos en una fase adsorbente en estado sólido para concentrarlos en esta fase. Los compuestos retenidos se eluyen empleando disolventes con mayor afinidad hacia los analitos que el que presenta hacia la fase extractante (Meucci et al., 2014). Las diferentes modalidades de la SPE se pueden clasificar en función de la disposición de la fase sólida.

3.1.2.2.1 Extracción en fase sólida en cartuchos

A principios de la década de 1980 el tratamiento de muestras líquidas mediante SPE fue ampliamente utilizado mediante la aplicación de diversos formatos de la fase sólida, entre ellos se puede mencionar los discos (membranas solidas porosas), las placas de microtitulación, puntas de pipeta y los cartuchos. El formato más recurrido para la aplicación de SPE son los cartuchos desechables debido a su simplicidad de operación y la posibilidad de combinarlos con otras técnicas de extracción o análisis instrumental. El cartucho de SPE consiste en un pequeño recipiente (vidrio o polietileno) abierto en forma de jeringa que contiene el material adsorbente para el paso de la muestra mediante succión suave (Żwir-Ferenc y Biziuk, 2006). La Figura 2 se puede apreciar la forma tradicional de un cartucho y su aplicación en las diversas etapas que comprende el tratamiento de muestras mediante SPE (acondicionamiento de la fase adsorbente, carga de la muestra, lavado y elución de los analitos) (Faraji et al., 2019).

Los materiales adsorbentes empaquetados dentro de los cartuchos suelen presentar un tamaño de partícula entre 50-60 μm , empackado dentro de una columna corta. La cantidad de fase sólida contenida en el cartucho puede variar desde 35 mg a 10 g, siendo los de 100 y 500 mg los más utilizados para favorecer la extracción de los analitos; mientras que los que contienen las mayores cantidades de adsorbente empaquetado se utilizan para procesos de limpieza de muestra. Este formato es aplicable para volúmenes de muestra entre 1.0 y 50.0 mL (Poole, 2003).

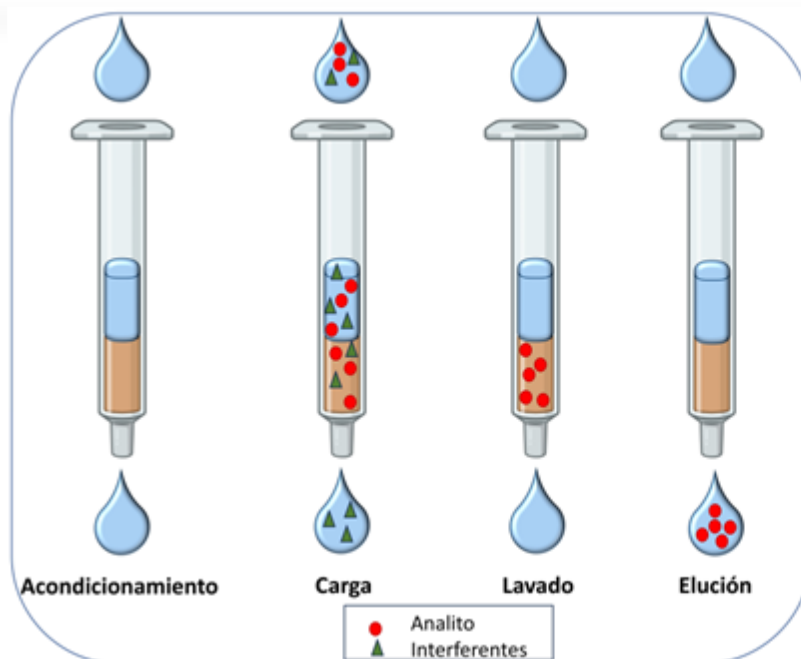
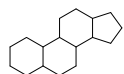
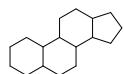


Figura 2. Cartuchos tradicionales empleados en la SPE y las etapas involucradas en el proceso.

Además de los volúmenes de muestra original y elución, para la selección apropiada del cartucho se debe considerar las características fisicoquímicas de los analitos y la matriz analítica para garantizar una adecuada capacidad de adsorción y estabilidad fisicoquímica en la fase sólida. Los mecanismos de retención involucrados en las metodologías SPE se basan en diversos tipos de interacciones analito-adsorbente, entre ellas se han descrito fuerzas de Vander Waals, interacciones π - π , enlaces de H, interacciones dipolo-dipolo e intercambio iónico. Como resultado de las interacciones entre las especies implicadas las modalidades de SPE se han clasificado en tres grupos: 1) fase normal; implica una fase sólida (sílice, florisil, alúmina, diol, $-\text{NH}_2$ y $-\text{CN}$) capaz de retener analitos polares (Wells, 2003), 2) fase inversa; la cual consiste en un adsorbente de no polar ($-\text{C}_8$ y C_{18}) para la retención de compuestos con baja polaridad y 3) intercambio iónico; para este caso tanto la fase adsorbente ($-\text{SO}_3^-$ o $-\text{NH}(\text{CH}_3)_3^{3+}$) como los analitos presentan cargas contrarias para llevar a cabo ese intercambio de partículas (Faraji et al., 2019).

La SPE ha sido aplicada en diversos análisis acoplada a diversas técnicas instrumentales para la determinación y cuantificación de los compuestos de interés. Entre las aplicaciones de la SPE se encuentra la determinación de 90 pesticidas en muestras de

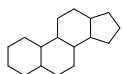


frutas y vegetales (manzanas, zanahorias, cebollas, naranjas), empleando una fase sólida compuesta por estireno y divinilbenceno. Para la elución de los analitos se utilizó una mezcla de acetato de etilo y trietilamina. El eluato fue analizado mediante GC-MS, la metodología aplicada permite el análisis de pesticidas en muestras de alimentos con LODs entre 0.01 y 0.02 mg kg⁻¹ (Štajnbaher y Zupančič-Kralj, 2003).

Por otra parte, la SPE ha sido aplicada con éxito en el análisis de muestras biológicas. Cartuchos fabricados a partir de un copolímero de N-vinilpirrolidona y divinilbenceno (Oasis HLB) han sido aplicados para la determinación simultánea de 20 antidepresivos (imipramina, amitriptilina, desipramina, trimipramina, entre otros) en muestras de plasma humano. Los fármacos son eluidos con una mezcla de MeOH y CH₃COOH (70:40, v/v). La disolución se evapora y reconstituye en la fase móvil (MeOH, Acetato de amonio y ACN, 70:20:10, v/v/v) para su análisis mediante LC-MS. El método permite la determinación de los antidepresivos con LODs entre 0.03 y 0.63 mg L⁻¹ (Shinozuka et al., 2006).

Entre los cartuchos más utilizados en análisis mediante SPE se encuentran los sólidos fabricados a partir de sílice funcionalizada con grupos -C₁₈, su aplicación ha permitido el análisis de diferentes analitos (medianamente polar o no polares) en una variedad de muestras. Se puede mencionar el análisis de ácido pentadecafluorooctanoico (C8), ácido heptadecafluorononanoico (C9), ácido nonadecafluorodecanoico (C10), ácido heneicosafluoroundecanoico (C11) y ácido pentacosafuorotridecanoico en muestras de agua. El eluato mediante LC-MS-MS permitiendo la cuantificación de los analitos en valores inferiores a 25.0 ng L⁻¹ (Risha et al., 2005).

A pesar de las grandes ventajas que ofrecen las técnicas de SPE no son lo suficientemente efectivas cuando de niveles de concentración traza se trata, además presenta algunas desventajas como la obstrucción de la fase sólida o la poca reusabilidad del cartucho. A lo largo de los años, se han desarrollado variantes de SPE para mejorar las condiciones de análisis y los resultados en los procesos de limpieza de muestra, se busca obtener metodologías con mayor selectividad y sensibilidad (Ghorbani et al., 2019).



3.1.2.2.2 *Microextracción en fase sólida*

Como una alternativa para compensar algunas limitaciones de la SPE, en 1990 Pawliszyn y Arthur proponen la microextracción en fase sólida (SPME). La SPME surge como una técnica enfocada especialmente en el análisis de trazas promoviendo la eliminación de disolventes orgánicos para la preparación de la muestra y fácil automatización; debido a que el muestreo, aislamiento y enriquecimiento de los analitos se desarrollan en una sola etapa. Esta técnica emplea como fase sólida una fibra de sílice fundida cubierta con una capa delgada de material adsorbente inmovilizada en el interior de una aguja de jeringa soportada en un dispositivo retráctil (Figura 3) (de la Guardia y Esteve-Turrillas, 2019). La SPME permite la extracción de analitos de matrices gaseosas, líquidas y sólidas, el proceso comprende dos etapas: 1) la partición de los analitos de la muestra hacia la pequeña porción de fibra modificada (1.0 o 2.0 cm de fase adsorbente), para ello se introduce la fibra en un espacio de cabeza o disolución que contiene los analitos y 2) la desorción de los compuestos para su análisis instrumental. Para esta última etapa, generalmente suele aplicarse un tratamiento de desorción térmica que facilita su acoplamiento con sistemas de GC, no obstante, también se ha descrito su acoplamiento con sistemas de cromatografía de líquidos y electroforesis capilar (Merkle et al., 2015).

La selección del recubrimiento de la fibra depende principalmente de las características de los analitos; los recubrimientos disponibles comercialmente son fabricados a partir de polímeros (polidimetilsiloxano, poliacrilato, divinilbenceno, polietilenglicol y carboxeno). Estos recubrimientos suelen fabricarse empleando un solo polímero o la combinación de dos o más compuestos (Dietz et al., 2006).

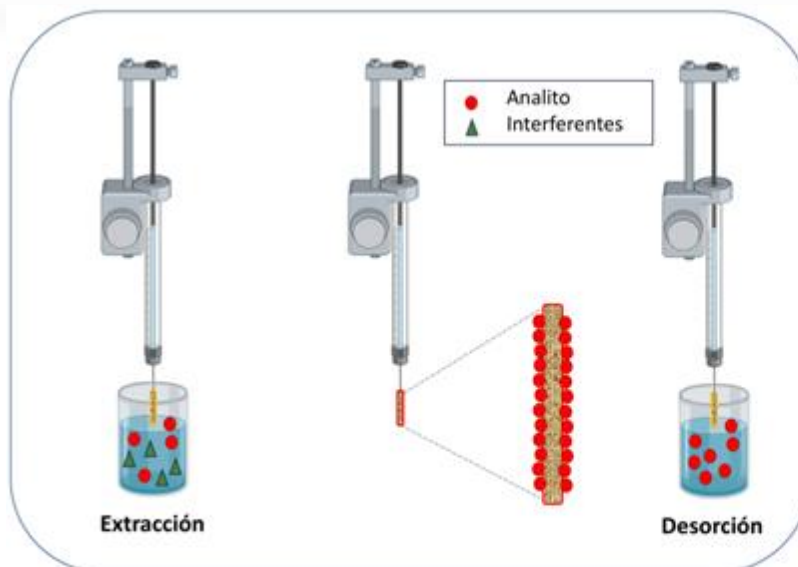
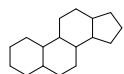
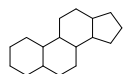


Figura 3. Dispositivo utilizado en la SPME y las etapas involucradas en el proceso.

Uno de los recubrimientos más utilizados es el polidimetilsiloxano. Como resultado de sus características fisicoquímicas, las fibras recubiertas con polidimetilsiloxano permiten el análisis de compuestos no polares, ejemplo de ello es el análisis de hexanal en pollo liofilizado. La fibra fue preconditionada en 250°C por una hora para el análisis. Una vez transcurrido el tiempo de extracción de los analitos (introducción de la fibra en el espacio de cabeza que contiene las microfibrillas de pollo) se procedió a su desorción y análisis mediante GC-MS. La metodología descrita permite la identificación de hexanal con un intervalo lineal de 0.01 a 10 mg L⁻¹ (Goodridge et al., 2003).

Otro material popular en la fabricación de recubrimientos para las fibras de SPME es el carboxeno, el cual presenta una elevada área superficial (1000- 1200 m² g⁻¹) con una estructura microporosa que facilita su aplicación en la retención de compuestos volátiles de bajo peso molecular (trazas). Por otra parte, el divinilbenceno es otro compuesto comercialmente utilizado en los recubrimientos de las fibras, es un compuesto polar con una estructura rica en macroporos apropiado para el análisis de compuestos semivolátiles polares como los disulfuros y trisulfuros (Balasubramanian y Panigrahi, 2011).

Los nanotubos de carbono son una alternativa de material carbonoso evaluado, una pasta de este material fue implementada para el análisis de pesticidas en agua de río y



aguas residuales mediante SPME seguido de su análisis instrumental mediante GC y un sistema de detección de captura de electrones. La metodología permite obtener LODs entre 0.19 y 3.77 ng L⁻¹ de los analitos (Lü et al., 2007).

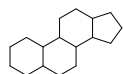
Para la retención de compuestos polares (alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos carboxílicos) se han desarrollado fibras combinadas; el recubrimiento de este material consiste en la mezcla de un compuesto polar y uno no polar (Goodridge et al., 2003). Por otra parte, el incremento en la eficiencia y selectividad de los procesos SPME ha sido consecuencia de la modificación de las fibras con diversos materiales, entre ellos se puede describir los líquidos iónicos, el grafeno, los polímeros molecularmente impresos, las estructuras metal-orgánicas y los nanotubos de carbono (Aziz-Zanjani y Mehdinia, 2014).

En los últimos años los polímeros molecularmente impresos (MIPs) han sido de gran relevancia debido a la alta selectividad y especificidad que presentan, mediante impresión molecular (sol-gel) se desarrolló un recubrimiento para su aplicación mediante SPME-GC-MS en el análisis de cafeína en suero humano. El análisis requiere colocar las fibras recubiertas del MIP dentro de su soporte, posteriormente se pone en contacto con 1.0 mL de muestra por 60.0 minutos. Posteriormente la aguja se colocó en el inyector de GC para la desorción de cafeína y su análisis, bajo estas condiciones es posible detectar al analito en concentraciones de 0.1 mg L⁻¹ (Khorrami y Rashidpur, 2012).

Una de las desventajas importantes de la SPME es la poca disponibilidad comercial de fases adsorbentes y la posibilidad de dañar la fibra debido a una incorrecta manipulación en la etapa de modificación o colocación.

3.1.2.2.3 Extracción en fase sólida dispersiva

Con el fin de mejorar las condiciones de extracción, obtener mejores resultados en los análisis y compensar algunas limitantes que presentan la SPE y la SPME, surge la extracción en fase sólida dispersiva (DSPE, por sus siglas en inglés). La DSPE es un método rápido y accesible caracterizado por la adición del adsorbente directamente en el volumen de la disolución de la muestra y la dispersión del mismo mediante agitación



mecánica favoreciendo la interacción adsorbente-analito. Una vez completado el proceso de retención de los analitos, el adsorbente se retira de la disolución de manera simple (filtración o decantación) y se procede a la elución de los analitos para su identificación y cuantificación (Figura 4) (Islas et al., 2017).

El enfoque principal de la DSPE consiste en garantizar una mayor superficie de contacto entre el analito y la fase adsorbente, lo que permite alcanzar el máximo de retención en un menor tiempo. Se ha demostrado que la DSPE ofrece resultados equivalentes o superiores a los obtenidos con las técnicas clásicas utilizando menores cantidades de muestra. Adicionalmente, disminuye el riesgo de contaminación o pérdida de la muestra, emplea un 95 % menos de disolvente orgánico y se puede realizar en menos del 90 % del tiempo que emplean otras metodologías (Barker, 2007).

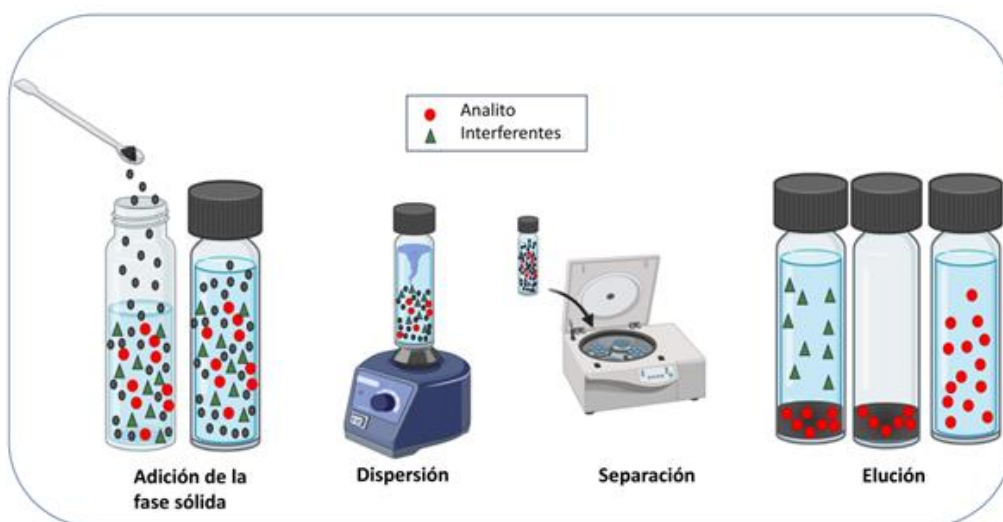
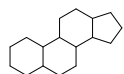


Figura 4. Dispositivo utilizado en la DSPE y las etapas involucradas en el proceso.

Como resultado de sus mínimos requerimientos de adsorbente y disolventes es considerada una técnica más ecológica que los procedimientos tradicionales de SPE. La DSPE se considera una técnica simple, económica, rápida, flexible y robusta (Ścigalski y Kosobucki, 2020). Diversos materiales han sido aplicados en metodologías DSPE; compuestos a partir de sílice (Kuo et al., 2018a), nanopartículas magnéticas (González-Sálamo et al., 2017a; González-Sálamo et al., 2017b; Jiménez-Skrzypek et al., 2020), polímeros molecularmente impresos (Kakavandi et al., 2017), compuestos carbonáceos

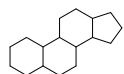


(Dimpe y Nomngongo, 2019; Niu et al., 2018), estructuras metal-orgánicas (Wang et al., 2018), polímeros porosos (Oellig y Schmid, 2019; Płotka-Wasyłka et al., 2017).

Se han evaluado diferentes morfologías de la fase sólida; columnas monolíticas fabricadas a partir de estireno y divinilbenceno para la determinación de proteínas (Svec, 2006), esferas de carbón para el análisis de antibióticos en aguas residuales (Wang et al., 2016), fibras elaboradas a partir de tereftalato de polietileno aplicadas en la filtración de muestras de agua (Zander et al., 2016) y películas de poliestireno (PS) para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en muestras acuosas (Lopez-Tellez et al., 2024).

La sílice es uno de los materiales más utilizados en procedimientos de SPE, una de las modificaciones que se ha realizado a las partículas de sílice es su funcionalización empleando polímeros. La polimerización de metacrilato de laurilo y diacrilato de etoxilato de 1,6-hexanodiol mediante radicales libres sobre partículas de sílice ha permitido obtener un adsorbente aplicado en el análisis de herbicidas de fenilurea en muestras de aguas ambientales. La mezcla de adsorbente y muestra se agita mecánicamente (20.0 minutos) y se transfiere a un cartucho de SPE vacío para su separación de la disolución. Posterior al lavado del adsorbente con H₂O, se realizó la elución de los analitos con ACN y su análisis mediante HPLC-DAD. Bajo estas condiciones la detección de los herbicidas fue viable en un intervalo de 0.027- 0.053 ng mL⁻¹, estos valores son competitivos para la determinación de los contaminantes en valores inferiores a los límites mínimos permisibles establecidos por la Unión Europea (0.10 ng mL⁻¹) (Kuo et al., 2018a).

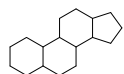
Otros adsorbentes aplicados en DSPE son los MIPs, los cuales se consideran una de las fases sólidas más selectivas. Su preparación se lleva a cabo mediante la copolimerización de un monómero funcional (capaz de interactuar con los analitos), un entrecruzante (confiere propiedades mecánicas adecuadas al polímero) y una molécula plantilla (analito o muy similar al analito que formará la cavidad apropiada para la extracción de los analitos). Sintetizado el adsorbente se retira la molécula plantilla lo que garantiza su alta especificidad hacia los compuestos de estudio.



Para la determinación de fluoroquinolonas en diversas muestras de agua se fabricó un MIP a partir de ácido metacrílico y dimetacrilato de etilenglicol utilizando norfloxacin y enrofloxacin como moléculas plantilla. La muestra se mezcló con el MIP mediante ultrasonido y se retiró de la disolución mediante centrifugación, para la desorción de los analitos se utilizó una mezcla de MeOH:CH₃COOH (9:1) para su análisis mediante HPLC. Los LODs obtenidos para las moléculas plantilla son entre 0.22 y 0.36 µg L⁻¹, el método ofrece una alternativa para el análisis de fluoroquinolonas viable y altamente selectivo (Lu et al., 2019). Su alta afinidad hacia los analitos se ha convertido en una desventaja para este tipo de materiales ya que dificultan el proceso de desorción de los analitos dificultando su elución y cuantificación.

Por otra parte, los materiales carbonosos se han descrito como materiales porosos con alta capacidad adsorbente, excelente estabilidad química, mecánica y térmica, con un costo de preparación bajo. Estas características favorecen las interacciones de manera moderada entre los analitos y la fase adsorbente garantizando una apropiada desorción de los mismos. Como resultado de las propiedades de estos materiales, diferentes alótropos del carbono han sido evaluados como posibles adsorbentes en DSPE, entre las que destacan los nanotubos de carbón, grafeno, grafito y carbón activado (Rodríguez et al., 2015).

Los nanotubos de carbono forman estructuras tridimensionales compuestas por átomos de carbono ordenados en una red hexagonal con forma de tubos, los cuales se pueden encontrar en forma de pared simple (lámina enrollada en un tubo) y pared múltiple (una lámina sobre otra). Esta clase de adsorbentes ha sido utilizada en el análisis de hidrocarburos aromáticos policíclicos, metales pesados y fármacos. El contenido de diclofenaco, naproxeno y metronidazol en muestras de aguas ambientales ha sido determinado mediante la implementación de nanotubos de carbono para la DSPE seguido del análisis instrumental mediante LC-MS. La eficiencia del material puede observarse con respecto a la cantidad de adsorbente requerido para promover la máxima adsorción de los analitos, en este caso únicamente 4.0 mg del sólido es suficiente para obtener un 100.0 % de extracción, además se obtuvieron LODs entre 0.01- 0.08 µg L⁻¹. El material adsorbente es considerado más económico y amigable con el medio ambiente

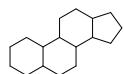


en comparación con materiales tradicionales como los cartuchos Oasis HLB (Jakubus et al., 2019).

Otro de los materiales carbonosos utilizados en este tipo de metodologías es el carbón activado (AC, por sus siglas en inglés), el cual es un material carbonáceo de bajo costo con estructura microcristalina laminar, formado por capas paralelas de anillos de 6 átomos de carbono con una capacidad de adsorción de entre 500.0 y 1500.0 m² g⁻¹. Químicamente, el AC está compuesto de carbono y una pequeña porción de minerales, hidrógeno y oxígeno, que se unen para formar diversos grupos funcionales como el carbonilo y el fenol (Daud. y Houshamnd, 2010). A pesar de su versatilidad y las ventajas estructurales que presenta, el AC presenta la desventaja de ser difícil de separar del medio líquido donde ha sido dispersado. Con el fin de compensar esta limitación, se han desarrollado estrategias para incorporar el AC en un adsorbente sólido mediante su modificación, inmovilización o deposición.

Una estrategia para resolver el problema de aislamiento de los adsorbentes ha sido conferir propiedades paramagnéticas al material, dando lugar a las nanopartículas magnéticas. Como resultado de sus características son de fácil y rápido aislamiento mediante la aplicación de un campo magnético externo. Con base en sus propiedades fisicoquímicas la magnetita es el compuesto más utilizado en este tipo de materiales, la modificación de AC con nanopartículas de Fe₃O₄ ha sido aplicado en el análisis de tartrazina en bebidas no alcohólicas. La fabricación del adsorbente consiste principalmente en adicionar el AC al recipiente donde se ha sintetizado el compuesto magnético. Un volumen de 10.0 mL de muestra se diluyó a 25.0 mL con H₂O y se mezcló mecánicamente con 75.0 mg del adsorbente magnético por 30 minutos. El sólido se aisló rápidamente con el apoyo de un imán de neodimio para proceder a la elución del colorante con MeOH basificado. El análisis del eluato se llevó a cabo mediante espectroscopía UV-vis permitiendo detectar el analito en 1.0 mg L⁻¹. La metodología es rápida, simple y económica (Rodríguez et al., 2015).

Otra aplicación para este tipo de partículas es el análisis de ftalatos en muestras de arena y agua de mar. Con la finalidad de proteger las características de las nanopartículas se

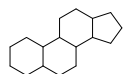


recubren con polidopamina, 25.0 mL de muestra son mezclados con 60 mg del adsorbente por 1 minuto, mediante el acercamiento de un imán al vial se separó la fase sólida. Finalmente se eluyeron los compuestos adicionando diclorometano al adsorbente y agitando suavemente 30 segundos. El extracto se evaporó y se reconstituyó en 50.0 μL de ciclohexano para su análisis instrumental mediante GC-MS, se obtuvieron límites de cuantificación (LOQs, por sus siglas en inglés) entre 9.0 y 20.0 ng L^{-1} (González-Sálamo et al., 2017b).

Una segunda estrategia para retirar fácilmente los adsorbentes del medio de extracción ha sido la inmovilización sobre superficies poliméricas de mayor tamaño. La remoción de As en muestras de agua contaminada es viable mediante la aplicación de un adsorbente que consiste en la inmovilización de TiO_2 sobre botellas de tereftalato de polietileno (PET, por sus siglas en inglés) reutilizadas. La presencia del TiO_2 permite la oxidación de As (III) a As (V) aprovechando la presencia de luz solar, mientras que el adsorbente es de fácil aislamiento debido a su tamaño macroscópico y eficiente para la determinación de las concentraciones de As(III) y As(V) mediante voltamperometría catódica diferencial de pulso. Transcurrido el proceso de adsorción, las botellas se mantuvieron 12 horas en ausencia de luz para promover la precipitación coloidal del material y facilitar su filtración. La metodología permite obtener LOD para As (III) de 2.0 $\mu\text{g L}^{-1}$, con porcentajes de extracción del 99.0% (Fostier et al., 2008).

A su vez, existen procedimientos para el tratamiento de muestras que han combinado la DSPE con otras estrategias para obtener fases líquidas más limpias que puedan ser inyectadas directamente a los instrumentos analíticos. Hoy en día la segunda etapa del método QuEChERS utiliza adsorbentes compuestos por una amina primaria-secundaria (N-propil etilenediamina, PSA), sílice modificada con grupos octadecil (C_{18}) o negro de humo grafitizado (González-Curbelo et al., 2015).

Inicialmente este método fue propuesto para la determinación de pesticidas en muestras de alimentos, sin embargo, debido a las importantes ventajas que ha demostrado (elevados valores de tanto por ciento de extracción y disminución de compuestos co-extraídos) rápidamente ha sido aplicado en el análisis de formulaciones farmacéuticas,



hidrocarburos aromáticos policíclicos y micotoxinas (Vela-Soria et al., 2018) en matrices analíticas como: frutas, vegetales, semillas, cacahuates, harinas, cereales, vinos, huevo, queso, carne, suelo, sangre humana, té, miel y fragancias (González-Curbelo et al., 2015). El éxito de este protocolo ha permitido su aplicación en normas oficiales (CSN EN 15562 y AOAC 2007.01) para determinación de plaguicidas. Sin embargo, es necesario el desarrollo de nuevos materiales para su aplicación en DSPE en nuevas metodologías (Ścigalski y Kosobucki, 2020).

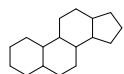
El método original ha sido una herramienta útil en el análisis de pesticidas en matrices alimentarias, no obstante, se han desarrollado ajustes para mejorar su rendimiento y facilitar su aplicación. Las primeras modificaciones fueron enfocadas a la aplicación del método a otro tipo de pesticidas, para ello se incorporó el uso de disoluciones amortiguadoras de pH que permiten asegurar la preservación de los analitos en diversas condiciones de trabajo. Posteriormente se modificaron las cantidades y proporciones de los sólidos utilizados (C_{18} , PSA) para obtener extractos más limpios. En años recientes se incrementó la diversidad de analitos y muestras que pueden ser analizados mediante el método QuEChERS, esto fue posible debido a la incorporación de nuevos materiales adsorbentes en la etapa de limpieza de muestra (DSPE). Se han evaluado columnas de aminopropil ($-NH_2$), PSA, columnas de carbón grafitizado y PSA, partículas magnéticas, nanotubos de carbono entre otros (González-Curbelo et al., 2015).

La selección de la variante de SPE apropiada para el análisis de una muestra depende de las características de los analitos y de la muestra, además de la accesibilidad a los instrumentos y materiales requeridos. Diversas metodologías basadas en SPE han sido descritas para el análisis de corticosteroides.

3.1.3 Aplicación de técnicas de SPE en el análisis de corticosteroides

El análisis de corticosteroides en diversas matrices analíticas ha permitido la evaluación de diversas fases adsorbentes aplicados en metodologías basadas en SPE.

Los corticosteroides son moléculas medianamente polares y su análisis mediante SPE requiere implementar la modalidad en fase inversa, donde la fase adsorbente debe ser

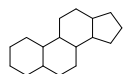


no polar para favorecer la interacción y retención de los compuestos con carácter hidrofóbico. Los cartuchos C_{18} , son la fase sólida mayormente utilizada para el análisis de corticosteroides mediante SPE, ejemplo de ello es la determinación de 51 corticosteroides en muestras cosméticas. En una primera etapa, los analitos son extraídos de la muestra hacia una fase metanólica, el extracto es sometido a su tratamiento mediante SPE. Los analitos fueron eluidos y analizados mediante HPLC (Gagliardi et al., 2002).

Otra aplicación de estos cartuchos es el análisis de hormonas esteroideas en muestras de suelo, el tratamiento mediante SPE acoplado a HPLC-MS permite identificar los analitos en concentraciones entre $0.08\text{--}0.89\text{ ng g}^{-1}$ (Gineys et al., 2010).

Con el desarrollo de diversos materiales adsorbentes se ha propiciado la combinación de materiales y variantes de la SPE. Se fabricó un polímero molecularmente impreso a partir de ácido metacrílico y divinilbenceno empleando dexametasona y flumetasona como moléculas plantilla. El adsorbente fue colocado dentro de un cartucho de SPE vacío, a través del cual se trataron muestras de leche para la determinación de prednisolona, metilprednisolona, cortisona e hidrocortisona mediante LC-MS. Este nuevo adsorbente fue comparado con los cartuchos empleados tradicionalmente para este tipo de analitos (Oasis HLB, Strata X; N-vinilpirrolidona). El MIP demostró mejores resultados en los ensayos de recuperación en comparación con los sólidos comerciales. Esto puede atribuirse a la alta selectividad que presentan este tipo de materiales (Díaz-Bao et al., 2012).

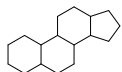
Otro material novedoso aplicado para el análisis de corticosteroides son las fibras electrohiladas. Para el análisis de dexametasona y betametasona en muestras de orina se fabricaron fibras a partir de la disolución de poliestireno en dimetilformamida. Dos variantes de la SPE fueron evaluadas empleando este sólido; para la SPME 10.0 mg de fibra fueron empacados en una punta de micropipeta (microcolumna), mientras que para la SPE la fibra se colocó en un cartucho vacío (disco). La fase adsorbente requiere de un acondicionamiento y lavado previo al paso de $100.0\text{ }\mu\text{L}$ de la muestra. Para la elución de los corticosteroides se utilizó MeOH, mientras que para su determinación y cuantificación



se utilizó HPLC-MS. El sistema de microcolumna permitió obtener valores superiores en los ensayos de recuperación en comparación al sistema de disco, esto puede atribuirse a la diferencia de platos teóricos de cada sistema como resultado de las diferentes geometrías de los dispositivos. El LOD de los analitos fue estimado en 10.0 ng mL^{-1} , lo cual es inferior a los valores mínimos requeridos en una prueba de dopaje en los laboratorios (30.0 ng mL^{-1}) (Possi-Pezzali et al., 2013).

Los materiales carbonosos han sido ampliamente utilizados en procesos de tratamiento de muestra aplicando diversas variantes de la SPE debido a las propiedades fisicoquímicas que presentan y la flexibilidad de funcionalización. Entre estos materiales se pueden describir los nanotubos de carbono. Estos materiales presentan una elevada área superficial así como estabilidad térmica y química, sin embargo, presentan la desventaja de formar agregados lo que reduce considerablemente su capacidad de extracción. Una solución a esta limitante ha sido la deposición de estos materiales sobre una membrana polimérica. La extracción y análisis de nueve glucocorticosteroides ha sido evaluada mediante la aplicación de membranas de polipropileno recubiertas de nanotubos de carbono de pared múltiple. Para la preparación del adsorbente se cortaron trozos de membrana de polipropileno de $1.7 \times 1.0 \text{ cm}$ y posteriormente se depositó sobre la membrana una disolución de nanotubos de carbono (20.0 mg) en MeOH (10.0 mL). Para la extracción de los analitos la membrana recubierta es depositada en la disolución de la muestra de agua, se agita mecánicamente por 30.0 minutos y se retira el adsorbente con unas pinzas. Para la elución de los analitos se utilizó MeOH como eluyente, el extracto fue inyectado a un sistema HPLC-MS-MS para la cuantificación de los analitos. El método ofrece una alternativa a los métodos tradicionales de SPE, la cual presenta un adsorbente de fácil y rápida preparación y elimina etapas adicionales en el proceso de separación del adsorbente (centrifugación o filtración) disminuyendo los tiempos de análisis. Además presenta buenos valores de precisión (desviación estándar relativa, $\%DER < 10.0\%$) y describe LODs entre $0.019\text{-}0.098 \text{ ng mL}^{-1}$ (Goh et al., 2021).

Acorde a la revisión bibliográfica, diversos materiales han sido evaluados en la fabricación de fases adsorbentes para el análisis de corticosteroides, entre ellos compuestos carbonosos y poliméricos, entre ellos el poliestireno (PS) (Possi-Pezzali et

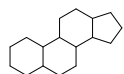


al., 2013; Nebot et al., 2012; Gineys et al., 2010). Debido a sus buenas propiedades físicas y químicas, el PS es uno de los materiales poliméricos más utilizados en la industria alimentaria, de construcción, electrónica, entre otras (Yang et al., 2019). Con base en su alta demanda y producción se ha convertido en uno de los principales desechos y contaminantes ambientales, una estrategia para minimizar sus residuos es mediante el reciclaje y reutilización. Actualmente, se han desarrollado diversos materiales adsorbentes basados en PS, estos adsorbentes han sido fabricados en diversas morfologías como las películas, partículas y fibras (Ríos-Gómez et al., 2017), los cuales han demostrado ser materiales de fácil y económica preparación adecuados para la adsorción de compuestos orgánicos en matrices complejas (Su et al., 2015). Una de las ventajas del PS es su fácil modificación con la adición de grupos funcionales, por otra parte puede fungir como soporte para el desarrollo de nuevos adsorbentes. Además, su adquisición a partir de desechos de embalaje permite la producción de materiales sostenibles y amigables con el medio ambiente (Lopez-Tellez et al., 2024).

Considerando que el tratamiento de muestra de cremas cosméticas involucra una etapa de desestabilización de la emulsión (adición de disolventes y sales) y una etapa de limpieza de muestra (DSPE), el presente trabajo propone el análisis de corticosteroides en cremas cosméticas mediante la aplicación de un método QuEChERS modificado, el cual se basa en la aplicación de estas dos etapas para el análisis de muestras. Para la etapa de limpieza de muestra se propone un material adsorbente de fácil y económica preparación, fabricado a partir de la deposición de AC sobre una matriz polimérica (PS-AC) que garantice la afinidad analito-sólido y además permita su fácil aislamiento de la matriz donde ha sido dispersado.

3.1.4 Análisis instrumental de corticosteroides en cosméticos

El análisis instrumental de corticosteroides en muestras de productos cosméticos se ha desarrollado principalmente mediante técnicas cromatográficas, prefiriéndose la cromatografía de líquidos sobre la cromatografía de gases debido a que esta última requiere de una etapa adicional de derivatización. La determinación de 43 glucocorticoides en muestras cosméticas (cremas, lociones, maquillaje en polvo y geles)



se realizó mediante cromatografía de líquidos empleando una columna C₁₈, una fase móvil compuesta por agua y ACN y un espectrómetro de masas-masas (MS/MS) como sistema de detección. El análisis de 95 muestras demostró que alrededor del 25% de las muestras fueron adulteradas con algún corticosteroide evaluado; los tres compuestos mayormente encontrados en las muestras fueron acetono de triamcinolona, betametasona y propionato de clobetasol (Kim et al., 2017).

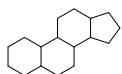
Por otra parte, el análisis de corticosteroides y otras hormonas esteroideas en muestras líquidas de cosméticos se desarrolló empleando la combinación HPLC-DAD, los analitos son separados empleando una columna C₁₈ como fase estacionaria y una fase móvil compuesta por agua y ACN (Zhai et al., 2014). La determinación de corticosteroides en productos cosméticos mediante técnicas cromatográficas se ha limitado debido a la complejidad de la matriz analítica.

En este capítulo se describe el desarrollo y aplicación de una metodología basada en DSPE-HPLC empleando el adsorbente PS-AC seguido de HPLC-DAD para la determinación de corticosteroides adicionados ilegalmente en muestras de cremas cosméticas empleando un protocolo QuEChERS modificado, lo que constituye un método de análisis sostenible, fácil de implementar y de bajo costo.

3.2 PARTE EXPERIMENTAL

3.2.1 Reactivos y disoluciones

Los residuos de PS se obtuvieron de materiales de embalaje utilizados previamente para el transporte de reactivos químicos. Se utilizó papel de filtro Whatman 41 para la fabricación de las películas del adsorbente. La metilprednisolona (MEP, estándar interno; I.S. por sus siglas en inglés), la dexametasona (DEX), la prednisolona (PRE), la triamcinolona (TRI), el tetrahidrofurano (THF), la N,N-dimetilformamida (DMF) y el rojo allura fueron adquiridos de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). El acetonitrilo (ACN), el acetato de sodio (NaAcO), el sulfato de sodio, el ácido acético y el metanol (MeOH) fueron obtenidos de J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, EE. UU.). Se utilizó carbón vegetal activado comercial (88% C y el resto es una mezcla de O, S, N, H y minerales) de

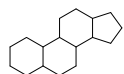


Clarimex S.A. de C.V. (México). Para todas las disoluciones, se utilizó agua desionizada del sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EE. UU.) con una resistividad no inferior a 18.0 MΩ·cm. Todas las muestras de cremas cosméticas (faciales y corporales) se adquirieron en tiendas locales de Pachuca, Hidalgo, México. En general, las muestras presentan una textura semisólida compuesta por agua, conservadores (metilparabeno o propilparabeno), humectantes (glicerina o ácido hialurónico), espesantes (carbopol), surfactantes (polisorbato 60) colorantes (óxidos de titanio o colorantes azoicos), aceites (aceite de coco o aceite de almendras), derivados de petróleo (dimeticona, parafinas o vaselinas), ácidos grasos (palmítico o mirístico) y fragancias.

Se preparó una disolución madre de corticosteroides (1000.0 mg L⁻¹) mezclando 10.0 mg de TRI, PRE y DEX en 10.0 mL de MeOH. Para la determinación de rojo allura se utilizó UV/Vis, el Perkin Elmer Lambda 40 (Waltham, MA, EE. UU.), utilizando el software Perkin Elmer UVWinLab. Para el análisis de la morfología de las películas se utilizó un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-820.

3.2.2 Condiciones cromatográficas

El análisis de corticosteroides se realizó mediante HPLC con un equipo Agilent Technologies 1260 Infinity (Agilent, DE, Waldbronn, Alemania) equipado con una columna analítica Agilent Zorbax Eclipse XDB-C8 de 4.6 x 150.0 mm y 5.0 μm. Como fase móvil se empleó una disolución acuosa de ácido acético al 1.0 % v:v (A) y ACN (B), y se utilizó un flujo de 1.0 mL min⁻¹. La separación de los corticosteroides se realizó empleando el siguiente gradiente de elución: iniciando con 20.0 % B, 0.0-2.0 min 25.0 % B, 2.0-13.0 min 35.0 % B, 13.0-16.0 min 35.0 % B, 16.0-19.0 min 20.0 % B y 19.0-22.0 min 20.0 % B, con un volumen de inyección de 20.0 μL. Las señales analíticas asociadas a los corticosteroides evaluados fueron detectadas utilizando un detector de arreglo de diodos (DAD) a 250.0 nm (para todos los analitos, la señal analítica del máximo de absorbancia fue a esta longitud de onda). El equipo utilizó el software Agilent Open LAB Control Panel (ChemStation A.01.05) para su operación.



3.2.3 Preparación de adsorbentes basados en AC y PS

Con base en las diferentes morfologías descritas en las metodologías DSPE, en el presente trabajo se fabricaron tres fases adsorbentes distintas mediante la combinación de AC y PS.

1. Esferas (PS-CA): Se disolvieron 0.15 g de PS reciclado en 0.80 mL de DMF; a la disolución se adicionó el AC y se agitó hasta obtener una mezcla homogénea. La mezcla fue goteada en un vaso de precipitado que contenía agua en agitación para la formación de las esferas. Se evaluaron tres composiciones de esferas, las proporciones que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Proporciones evaluadas en la composición de esferas PS-AC.

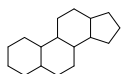
Composición	PS (mg)	AC (mg)
1:1	150	150
2:1	150	75
1:2	150	300

2. Columnas monolíticas: Se disolvieron 0.5 g de PS reciclado en 2.0 mL de acetona y se agregó la cantidad necesaria de AC. La mezcla fue homogenizada con un agitador de vidrio y se depositó dentro de un cartucho SPE de vidrio vacío. El cartucho se colocó en una estufa a 60.0°C por 12 horas para secar la mezcla. Tres columnas distintas fueron fabricadas de acuerdo con las proporciones que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Proporciones evaluadas en la composición de columnas monolíticas PS-AC.

Composición	PS (mg)	AC (mg)
2:1	500	250
1.5:1	500	330
1:1	500	500

3. Películas: fueron preparadas en dos etapas. Primero, se sumergió un trozo de papel de filtro (2.0 x 1.0 cm) tres veces en 5.0 mL de una disolución de PS en THF al 15 %; tras



cada inmersión, se permite que la película seque por completo. Posterior a la fabricación de la película de PS sobre el papel filtro, la película fue sumergida en 5.0 mL de DMF por 5 segundos para disolver parcialmente la película de PS, transcurrido este tiempo se introdujo en un vial con AC. Finalmente, el adsorbente se lavó con agua desionizada y se reservó para las pruebas posteriores.

3.2.4 Evaluación de la capacidad adsorbente de las fases sólidas

Los colorantes son unos de los aditivos utilizados en la formulación de cremas cosméticas, adicionalmente, se ha observado su co-extracción en el tratamiento de cremas cosméticas. Entre los colorantes más populares en este tipo de formulaciones se encuentra el colorante rojo allura (Topal et al., 2024). Debido a su presencia en la muestra y que la evaluación de retención sobre una fase sólida es sencilla y visualmente identificable, fue seleccionado como molécula modelo para evaluar la capacidad de adsorción de los adsorbentes elaborados.

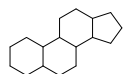
Para identificar la fase adsorbente que posee una mayor capacidad de adsorción se aplicó un diseño experimental Taguchi L_9 (3^4), la Tabla 4 muestra los factores y niveles evaluados; como variable de salida fue seleccionada el tanto por ciento de extracción obtenido. Para los experimentos se empleó una disolución de 10.0 mg L^{-1} de rojo allura, el remanente fue analizado mediante espectroscopía UV-vis a 504 nm.

Tabla 4. Niveles y factores evaluados para determinar la capacidad adsorbente de las fases sólidas.

Factor	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
Tiempo de contacto (min)	15.0	30.0	45.0
Masa adsorbente (mg)	100.0	200.0	200.0
Volumen muestra (mL)	10.0	20.0	30.0
Fase adsorbente	Esfera (E)	Columna (C)	Película (P)

3.2.5 Caracterización de las películas PS-AC

El análisis morfológico de la película se realizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) con un equipo JEOL JSM-820.



La capacidad de retención del adsorbente PS-AC se evaluó mediante isothermas de adsorción. Los experimentos se realizaron mezclando 50.0 mg de adsorbente y 5.0 mL de soluciones acuosas de corticosteroides (5.0-30.0 mg L⁻¹). La mezcla se agitó durante 30.0 min, y se retiró el adsorbente PS-AC. La fase líquida fue analizada mediante HPLC-DAD.

3.2.6 Análisis de cremas cosméticas

Para el análisis de las muestras se empleó un protocolo de tratamiento QuEChERS modificado (Gonçalves et al., 2020). Inicialmente, se pesaron 500.0 mg de muestra de crema cosmética en tubos cónicos de polipropileno (capacidad de 15 mL) a la cual se le adicionó 50 mg kg⁻¹ de MEP (estándar interno, I.S.) y 5.0 mL de ACN. La mezcla se agitó durante 5 min empleando un vórtex, posteriormente, se añadieron 500.0 mg de NaAcO y 500.0 mg de Na₂SO₄. La mezcla se agitó durante 5 min y, a continuación, se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min. La mezcla se separó en dos fases, reservando la fase líquida (ACN) para el siguiente paso.

El extracto en ACN fue sometido a un procedimiento de purificación. Se optimizaron las condiciones de limpieza del extracto de manera univariable evaluándose los siguientes factores: cantidad de adsorbente PS-AC (100.0-300.0 mg), el tiempo de extracción (0.0-240.0 min), el eluyente (ACN, MeOH y una mezcla 1:1 de ambos disolventes) y el tiempo de elución (3.0-20.0 min).

El proceso de extracción-elución de corticosteroides se muestra en la Figura 5. Un volumen de 4.0 mL del extracto de ACN se diluyó a 100.0 mL con agua desionizada, a la mezcla se adicionó 100.0 mg de adsorbente PS-AC, previamente lavado y activado con agua desionizada y ACN. La mezcla se agitó mecánicamente durante 120.0 min, se separó el adsorbente PS-AC y se lavó con 2.0 mL de agua desionizada. Los corticosteroides se eluyeron de la fase sólida añadiendo 2.0 mL de MeOH:ACN (1:1, v:v). La fase líquida se separó, se evaporó y el residuo se reconstituyó en 0.5 mL de ACN previo a su análisis mediante HPLC-DAD.

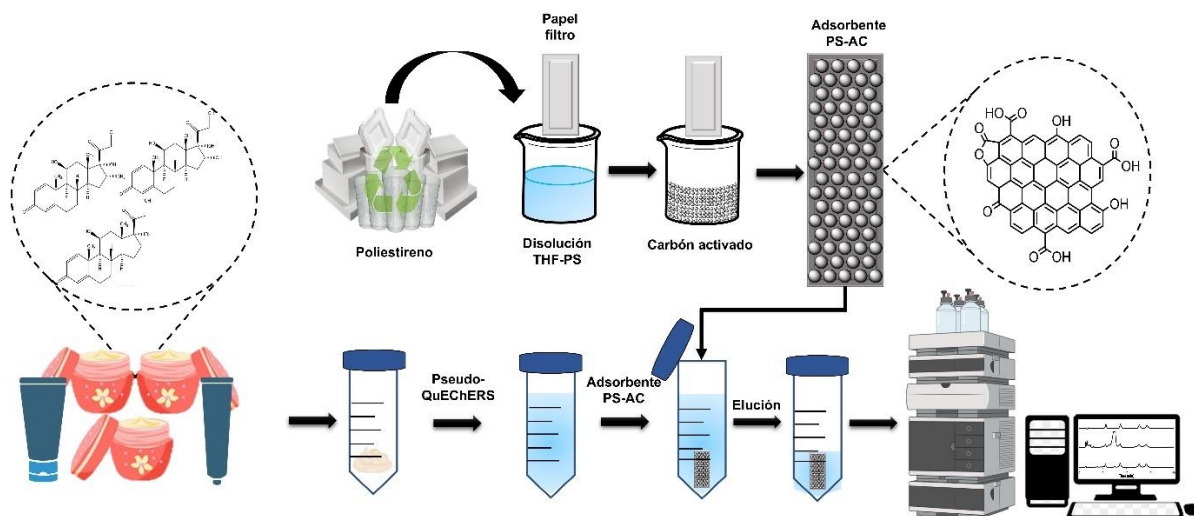
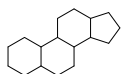
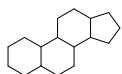


Figura 5. Representación esquemática para el proceso de extracción-elución de corticosteroides en muestras de cremas cosméticas mediante DSPE-HPLC-DAD.

3.2.7 Validación de la metodología

Se construyó la curva de calibrado bajo las condiciones óptimas, para ello se empleó una muestra de crema cosmética enriquecida con los analitos ($20.0\text{-}100.0\text{ mg kg}^{-1}$) y el estándar interno. La muestra de crema utilizada para la validación de la metodología fue previamente analizada, ninguna de las señales asociadas a los analitos fue identificada en esta matriz (muestra de crema blanco).

Se obtuvo la regresión lineal a partir del análisis de la relación entre $([\text{Corticosteroide}]/[\text{I.S.}])$ y $(\text{Área pico de corticosteroide}/\text{Área pico de I.S.})$. El límite de detección (LOD, por sus siglas en inglés) y el límite de cuantificación (LOQ, por sus siglas en inglés) se evaluaron según las directrices del Consejo Internacional para la Armonización de los Requisitos Técnicos para Productos Farmacéuticos de Uso Humano (ICH) de Suiza (2022), calculados como $3.3\sigma/S$ y $10\sigma/S$ respectivamente, donde σ es la desviación estándar de la respuesta y S es la sensibilidad analítica de la curva de calibrado.



La precisión fue evaluada en términos de repetibilidad y precisión intermedia en muestras de crema enriquecida con los analitos. Se analizaron tres niveles de concentración de corticosteroides (30.0, 50.0 y 70.0 mg kg⁻¹) por triplicado durante tres días, la concentración se calculó mediante interpolación en la curva de calibrado. Los resultados de repetibilidad y precisión intermedia fueron expresados como desviación estándar relativa (%DER, n = 3 y n = 9).

La exactitud fue evaluada mediante ensayos de recuperación de los corticosteroides evaluados en muestras de crema cosmética. Se evaluaron tres niveles de concentración de corticosteroides (40.0, 60.0 y 80.0 mg kg⁻¹) por triplicado; la recuperación fue expresada como:

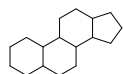
$$\%Recuperación = \frac{[Corticosteroides]_{obtenida}}{[Corticosteroides]_{adicionada}} \times 100 \quad \text{Ecuación (1)}$$

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Separación cromatográfica

Empleando una fase móvil compuesta por una disolución acuosa de ácido acético al 1 % v:v (A) y ACN (B) se optimizaron las condiciones de separación cromatográfica para el análisis de muestras de crema cosmética enriquecida con los tres analitos y el estándar interno (50.0 mg kg⁻¹ cada uno). Las siguientes columnas fueron evaluadas como fases estacionarias en modalidad isocrática (65 % A y 35 % B): Agilent Zorbax Eclipse XDB-C8 Analytical de 4.6 x 150.0 mm, 5.0 µm (columna 1) y Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 Analytical de 4.6 x 150.0 mm, 5.0 µm (columna 2).

El tiempo total de análisis fue de 15 y 25 minutos para las columnas 1 y 2, respectivamente, por lo cual fue seleccionada la columna 1 como fase estacionaria para el análisis de corticosteroides. Bajo una modalidad isocrática no fue posible obtener una resolución adecuada para las señales asociadas a MEP y DEX, lo que puede atribuirse a sus valores de log P similares. Con el fin de obtener una mejor resolución para todas



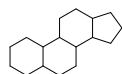
las señales de interés un modo de separación en gradiente fue evaluado (condiciones óptimas del gradiente descritas en la sección 3.2.2). Los resultados mostraron una resolución adecuada para todas las señales asociadas a los corticosteroides, con tiempos de retención de 5.6 min (TRI), 8.9 min (PRE), 12.8 min (MEP) y 14.4 min (DEX).

3.3.2 Evaluación y selección de la fase adsorbente

Las metodologías tradicionales para el tratamiento de emulsiones presentan la desventaja de extracción de compuestos adicionales a los analitos presentes en la formulación, por ello es necesario mejorar la etapa de limpieza de muestra y así obtener perfiles cromatográficos más simples con la menor cantidad de señales interferentes. Se prepararon tres adsorbentes a partir de la mezcla de PS-AC para su aplicación en la etapa DSPE, los cuales se muestran en la Figura 6.

Las tres morfologías fabricadas fueron seleccionadas con base en una revisión bibliográfica y los resultados obtenidos a partir de su aplicación en el tratamiento de muestras.

- Las esferas de AC presentan alta área superficial y distribución de poros adecuada además de una excelente estabilidad química (Sun et al., 2012), lo que permite ser adecuados adsorbentes dirigidos hacia contaminantes de interés (Yang et al., 2002). Se evaluaron distintos disolventes para la preparación de las fases adsorbentes mencionadas (acetona, THF, DMF), siendo la DMF la que permitió la formación de las esferas PS-AC en medio acuoso como resultado de una inversión de fases (de una disolución líquida del polímero a la formación de un material sólido mediante precipitación por inmersión) (Holda y Vankelecom, 2015), ya que la mezcla de PS-AC precipita adoptando la forma esférica (Yu y Eisenberg, 1997).
- Las columnas monolíticas son fases sólidas comúnmente utilizadas en metodologías de extracción en fase sólida, típicamente son fabricadas a partir de polímeros orgánicos, sin embargo, han demostrado baja eficiencia de adsorción. Con la finalidad de incrementar la capacidad de adsorción se han incorporado compuestos carbonosos a la matriz polimérica (Shih et al., 2016), las cuales han sido aplicadas en el análisis de compuestos orgánicos en frutas, vinos y jugos (Kuo et al., 2018b). Para la fabricación de columnas monolíticas se empleó acetona para



- la disolución de los desechos de PS. Este disolvente cuenta con bajos valores de densidad y punto de ebullición (Casasola et al., 2014) lo que facilita su evaporación permitiendo la formación de poros en la superficie.
- La fabricación de películas a partir de la combinación de materiales poliméricos y carbonosos para la adsorción de colorantes, estos materiales presentan buena capacidad de adsorción además de la posibilidad de retirarlos fácilmente del medio donde se han depositado (Somsesta et al., 2020; de Freitas et al., 2021). Para la disolución de los desechos de PS empleada en la formación de la película sobre el papel filtro se utilizó THF, el cual se ha descrito como un disolvente adecuado para la formación de películas (Lopez-Tellez et al., 2024). Para la deposición de AC sobre la película, esta se introdujo en DMF, el disolvente que permite la disolución parcial de la película de PS y el depósito del AC sin pasar por su encapsulación en el polímero. El PS es más soluble en tetrahidrofurano que en dimetilformamida, por lo cual se emplea el primer disolvente para la fabricación de la película y el segundo para la deposición de carbón donde se requiere que el polímero se disuelva de manera superficial.

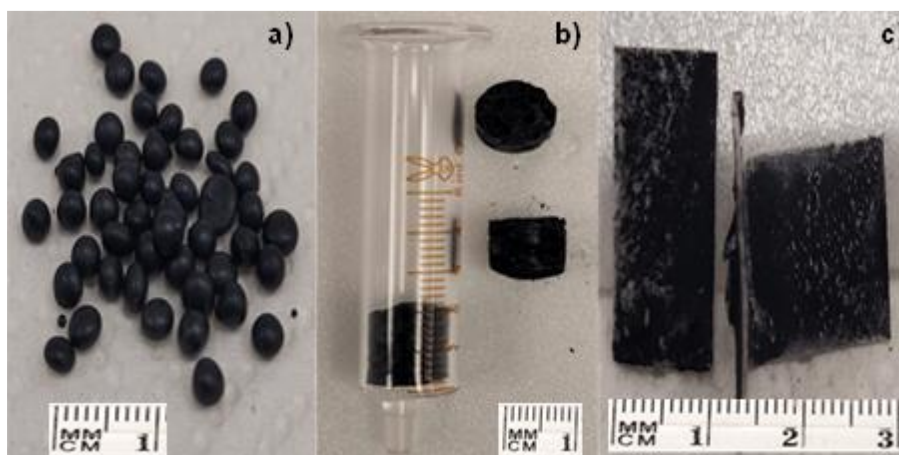
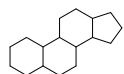


Figura 6. Fases adsorbentes elaboradas a partir de PS y AC; a) esferas, b) columna monolítica y c) películas.

Una de las desventajas que presentan los tratamientos de muestra tradicionales es la co-extracción de compuestos presentes en las formulaciones que pueden interferir en el análisis instrumental. La co-extracción de colorantes ha sido apreciada como resultado del tratamiento de muestras cosméticas, entre ellos los colorantes azoicos. El rojo allura



es un compuesto aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) para su uso cosmético debido a la presencia de tonos rosados frecuentes en la industria cosmética (Guerra et al., 2018). Este colorante fue seleccionado como molécula modelo de compuestos co-extraídos en el tratamiento de cremas cosméticas para evaluar la capacidad adsorbente de las fases elaboradas, su análisis mediante espectroscopía UV-vis es simple y rápida.

La columna con proporción 1:1 y las esferas 1:1 fueron seleccionadas para esta evaluación debido a que presentan mejores características morfológicas, así como mayor estabilidad y capacidad de retención en comparación con sus análogos.

Para la identificación del sólido con mayor capacidad de adsorción se aplicó un diseño factorial Taguchi L_9 (3^4), la matriz de diseño y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5. El análisis de los datos obtenidos permite obtener el gráfico de medias que se presenta en la Figura 7.

Tabla 5. Matriz de diseño obtenida para la evaluación de la capacidad adsorbente de las fases diseñadas.

Experimento	Tiempo (min)	Masa adsorbente (g)	Volumen muestra (mL)	Adsorbente*	%Extracción
1	15	100	10	E	28.29
2	15	200	20	C	31.79
3	15	300	30	P	51.38
4	30	100	20	P	39.63
5	30	200	30	E	34.27
6	30	300	10	C	50.35
7	45	100	30	C	31.59
8	45	200	10	P	95.51
9	45	300	20	E	45.40

E; esferas, C; columnas monolíticas, P; películas.

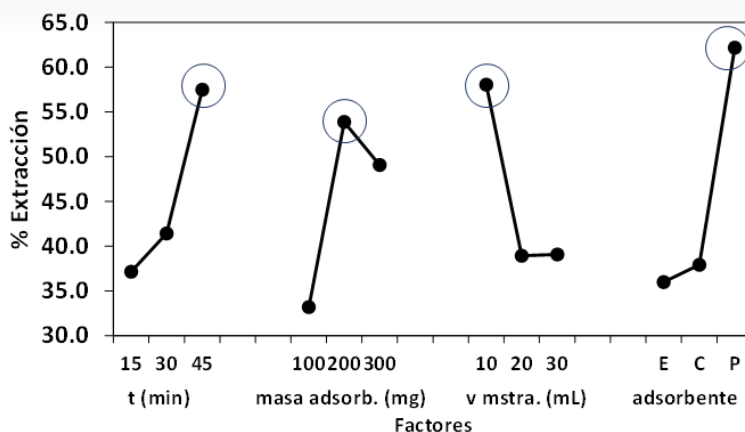
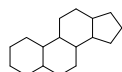


Figura 7. Gráfico de medias para factores involucrados en la evaluación de la fase adsorbente.

Las mejores condiciones para la extracción de rojo allura se obtuvieron a partir del análisis de los resultados e interpretación del gráfico de medias, no obstante la aplicación del diseño experimental permite seleccionar la fase adsorbente con mayor capacidad de adsorción. Las películas soportadas en papel filtro recubiertas con carbón activado proporcionan los mayores porcentajes de extracción del colorante. Por otra parte, es el adsorbente con menor contenido de AC (4.0%) en comparación con las columnas y esferas (50.0%), sin embargo, permite la retención del colorante en mayor proporción a los otros sólidos. Esto puede atribuirse a que en las películas el AC se encuentra mayormente disponible en comparación a su localización en las columnas y esferas (se observa un encapsulamiento del AC).

Por lo anterior, las películas fueron la fase adsorbente seleccionada para el análisis de una muestra de crema con la finalidad de evaluar su aplicación en el proceso de limpieza, en la Figura 8 se puede apreciar el proceso de adsorción del colorante sobre la película al momento de introducirlas en la disolución.

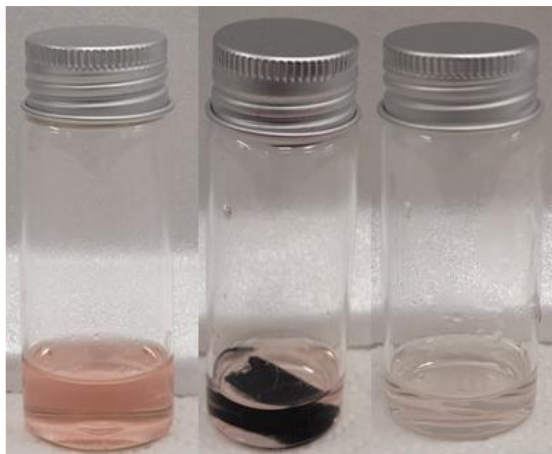
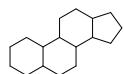


Figura 8. Remoción de colorante utilizando las películas PS-AC.

3.3.3 Caracterización de las películas PS-AC

Previo a la aplicación del adsorbente PS-AC para el análisis mediante DSPE, los valores de afinidad entre el adsorbente PS-AC y los corticosteroides (DEX, PRE y TRI) fueron evaluados. La determinación de las isothermas de adsorción (Figura 9), seguida del análisis de Scatchard de los gráficos, es una estrategia útil para estimar la constante de disociación entre los analitos y PS-AC mediante la Ecuación (2).

$$\frac{[\text{Corticosteroide-S}]}{[\text{Corticosteroide}]} = \frac{Q_{\max}}{K_d} - \frac{[\text{Corticosteroide-S}]}{K_d} \quad \text{Ecuación (2)}$$

Donde $[\text{Corticosteroide-S}]$ (mmol kg^{-1}) corresponde a la cantidad de corticosteroide adsorbida en el adsorbente PS-AC; $[\text{Corticosteroide}]$ ($\mu\text{mol L}^{-1}$) es la concentración de corticosteroide disponible en solución, $Q_{\max}$ (mmol kg^{-1}) es el número máximo de moles de corticosteroide que se pueden adsorber, y K_d ($\mu\text{mol L}^{-1}$) representa la constante de disociación para el equilibrio $\text{PS-AC-Corticosteroide} \leftrightarrow \text{PS-AC} + \text{Corticosteroide}$. La linealidad obtenida en el análisis de Scatchard demuestra que el mecanismo de adsorción se realizó mediante una sola fase (Lopez-Tellez et al., 2024).

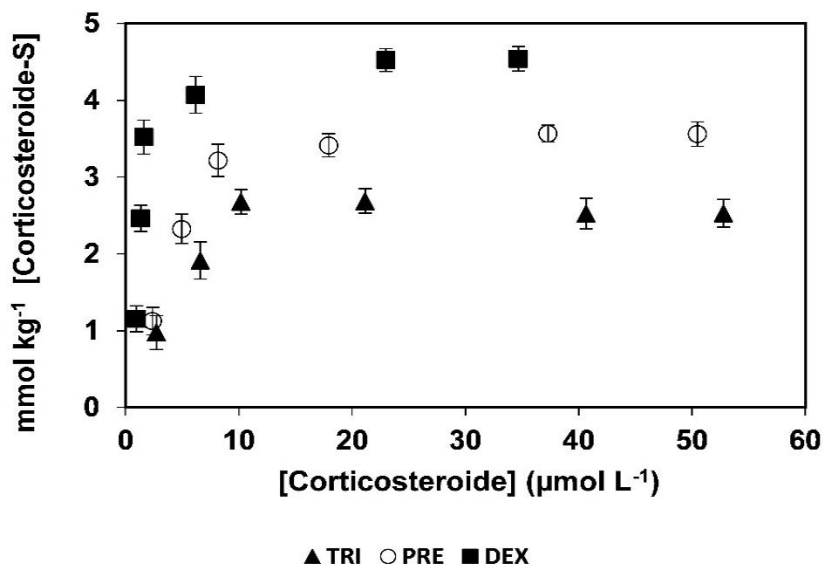
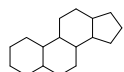


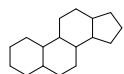
Figura 9. Isotherma de adsorción para TRI, PRE y DEX en el adsorbente PS-AC. Condiciones experimentales: 50.0 mg de adsorbente y 5.0 mL de disolución acuosa de corticosteroides (5.0-30.0 mg L⁻¹), temperatura ambiente y tiempo de contacto de 30.0 min.

La Tabla 6 muestra los valores de K_d obtenidos. Estos valores se situaron entre 1.3×10^{-1} y 8.5×10^{-1} mol L⁻¹, lo que indica una interacción moderada entre el PS-AC y los corticosteroides. Esta condición es necesaria para el proceso de retención-elución en SPE (Davenport, 2008). DEX (log P = 1.9) presentó la mayor afinidad por el adsorbente (valor de K_d más bajo), mientras que PRE (log P = 1.6) y TRI (log P = 0.8) presentaron afinidades menores, lo que puede atribuirse a la hidrofobicidad del analito.

Tabla 6. Parámetros calculados obtenidos mediante el análisis de Scatchard para el adsorbente de carbón activado y poliestireno (PS-AC): el número máximo de moles de corticosteroide que se pueden adsorber (Q_{max}) en PS-AC y las constantes de disociación (K_d).

Corticosteroide	K_d ($\times 10^{-6}$ M)	Q_{max} (mmol kg ⁻¹)
Triamcinolona	8.0±0.1	4.0±0.4
Prednisolona	8.5±0.4	4.4±0.1
Dexametasona	1.3±0.2	4.8±0.3

Estimada la capacidad adsorbente de las películas PS-AC, se realizó un análisis morfológico de la estructura microscópica del adsorbente mediante un estudio SEM. La fabricación de las películas comprende el recubrimiento de un trozo de papel filtro por una película de PS y la deposición superficial del AC.



Las diversas capas formadas se pueden apreciar a partir de un corte transversal en la película (Figura 10a), al centro del corte se observa la parte correspondiente al papel filtro (rectángulo) cubierto por una capa sólida que corresponde al recubrimiento de PS. Sobre esta segunda fase se observa una capa de menor espesor y de morfología amorfa que corresponde al depósito superficial de AC (Figura 10b). Se observa que la superficie de la película fue cubierta por el AC garantizando su funcionalidad y capacidad de adsorción consistente con el análisis Scatchard.

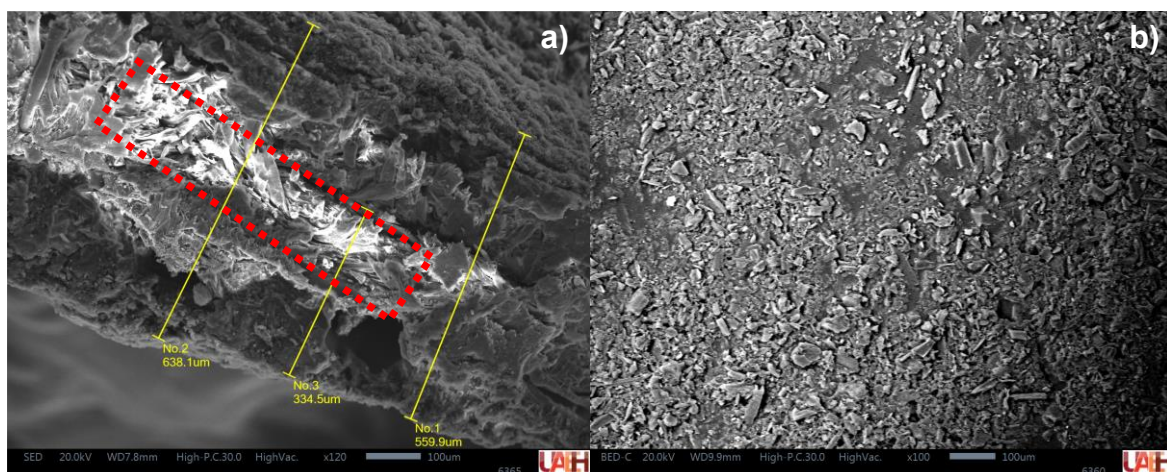
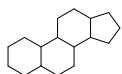


Figura 10. Microscopía electrónica de barrido de a) corte transversal a película PS-AC y b) recubrimiento de la superficie de la película PS-AC.

3.3.4 Optimización de las condiciones del protocolo QuEChERS (primera etapa)

Las condiciones de la etapa de extracción se optimizaron mediante un diseño experimental (2^n), utilizando un diseño factorial de dos niveles. Los factores evaluados fueron el disolvente de extracción (evaluando MeOH y ACN) y el efecto “salting out” (empleando NaCl o NaAcO), la respuesta analítica seleccionada fue la cantidad de recuperación de los analitos (%).

El mayor porcentaje de extracción se obtuvo empleando ACN y NaAcO. La polaridad del disolvente de extracción fue el factor que presentó mayor influencia en la respuesta analítica, con una contribución total a la varianza del 89.6 % (Figura 11). Los corticosteroides muestran una mayor afinidad por el ACN y, por lo tanto, su extracción de muestras de cremas cosméticas mejora utilizando este disolvente (Li et al., 2015). Por



otro lado, se prefiere la adición de NaAcO al NaCl debido a su mayor tamaño de esfera de solvatación, lo que mejora el reparto de los analitos hacia la fase de ACN (Ramette, 1983).

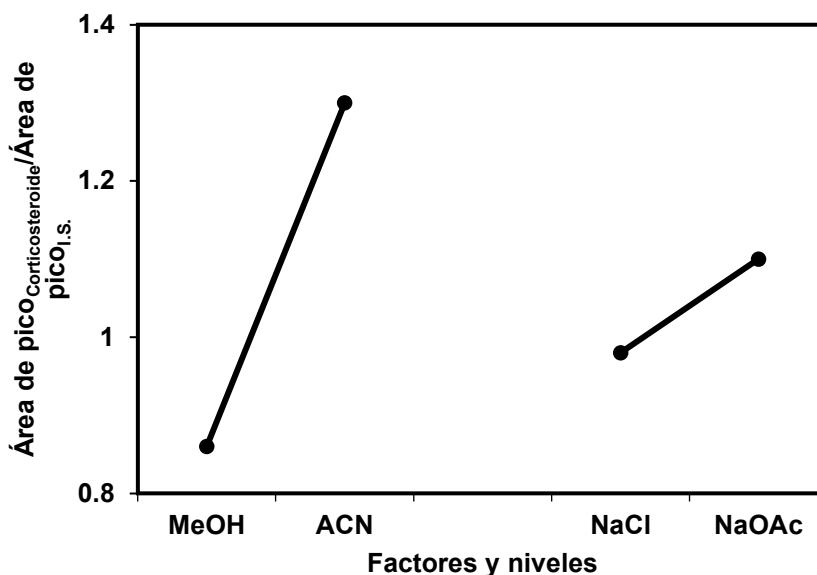


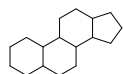
Figura 11. Efecto de los factores de control sobre el proceso de extracción de corticosteroides.

3.3.5 Evaluación de las condiciones de extracción-elución

Diversos factores intervienen en el proceso de extracción-elución, entre ellos: el tiempo de extracción, la cantidad de adsorbente, el eluyente y el tiempo de elución (Ruiz et al., 2019). Considerando la importancia de cada uno de los factores involucrados, se optimizaron las condiciones de extracción y elución de forma univariable.

Proceso de extracción

Una de las variables que influye significativamente en los procesos de DSPE es la cantidad de adsorbente que se pone en contacto con la disolución, ya que este es el medio que contribuye directamente en la separación de los analitos de la muestra (crema blanco) (Ghorbani et al., 2019). La cantidad de PS-AC necesaria para la extracción de corticosteroides fue evaluada mediante el análisis de 500.0 mg de muestra enriquecida con 100.0 mg kg⁻¹ de los analitos y 30.0 mg kg⁻¹ de estándar interno. La muestra se trató utilizando el protocolo QuEChERS modificado mencionado en la sección 3.2.6. Para el



siguiente paso, se diluyeron 4.0 mL de la fase líquida sobrenadante a 100.0 mL con agua desionizada y se añadieron a la mezcla 100.0, 200.0 y 300.0 mg de adsorbente PS-AC pretratado (lavado y activado con agua desionizada y ACN). La mezcla se agitó durante 60.0 minutos y, transcurrido el tiempo de extracción, se retiró el PS-AC y la fase líquida se analizó mediante HPLC-DAD. El tanto por ciento de extracción de los analitos no mostró diferencias en función a las cantidades de adsorbentes empleadas; por lo tanto, 100.0 mg de PS-AC fue seleccionado como la cantidad de adsorbente suficiente para retener los analitos en la fase sólida y sus posteriores análisis (Figura 12a).

Otra variable que afecta significativamente el proceso de extracción es el tiempo de contacto entre los analitos y el adsorbente, la variación de este factor permite incrementar las interacciones entre los analitos y el PS-AC, favoreciendo el proceso de extracción. El tiempo de contacto fue evaluado entre 30.0 y 240.0 minutos, utilizando la cantidad de adsorbente seleccionada en la primera prueba (100.0 mg) para todos los experimentos. El mecanismo de adsorción entre el PS-AC y los corticosteroides se atribuye a diversos fenómenos entre ellos: interacciones electrostáticas, formación de enlaces de hidrógeno e interacciones del tipo π - π (Jian et al., 2024). En la Figura 12b se puede observar un incremento en la transferencia de masa hacia el PS-AC a medida que se incrementa el tiempo de extracción (Wei et al., 2020), alcanzando su valor máximo después de 120.0 minutos.

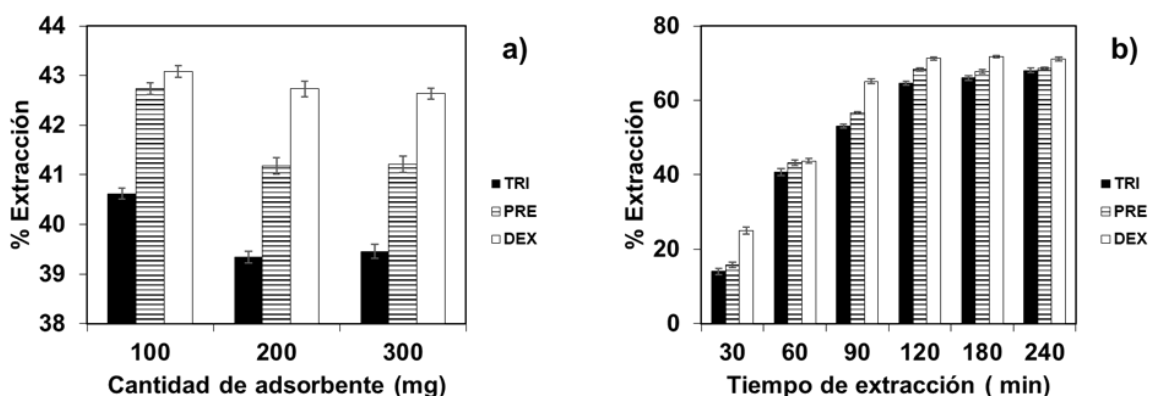
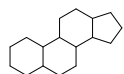


Figura 12. (a) Efecto de la cantidad de adsorbente y (b) del tiempo de extracción en el tanto por ciento de extracción de corticosteroides. Se utilizó 500.0 mg de una muestra de crema cosmética enriquecida con 100.0 mg kg^{-1} de analitos y 30.0 mg kg^{-1} de estándar interno; la mezcla se agitó a temperatura ambiente.



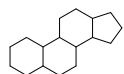
La metodología propuesta presentó tantos porcentos de extracción cercanos al 80 %; estos resultados son comparables a los valores descritos en la aplicación de protocolos QuEChERS para muestras de cosméticos (80.0-90.0 %) (Martín-Pozo et al., 2021; Gonçalves et al., 2020; Capela et al., 2016; Klinsunthorn et al., 2011).

Proceso de elución

Posterior a la extracción de los analitos con PS-AC es necesaria una etapa de elución para retirar a los corticosteroides del adsorbente y proceder a su cuantificación. El MeOH y el ACN se han descrito como eluyentes apropiados para el análisis de corticosteroides debido a la alta solubilidad y afinidad de estos compuestos por estos disolventes (Wei et al., 2020; Tong et al., 2012). MeOH, ACN y una mezcla 1:1 (v:v) de ambos disolventes fueron evaluados como eluyentes. Las pruebas se realizaron con 500.0 mg de muestra enriquecida con 100.0 mg kg⁻¹ de analitos y 30.0 mg kg⁻¹ del estándar interno. Seguido del tratamiento de la muestra, se diluyeron 4.0 mL de la fase sobrenadante a 100.0 mL con agua desionizada.

A la mezcla, se añadieron 100.0 mg de PS-AC a la dilución y se agitó durante 120.0 min. El adsorbente se retiró, se adicionaron 2.0 mL de eluyente al recipiente con el adsorbente y se agitó durante 3.0 min, la fase líquida se evaporó y se reconstituyó en 0.5 mL de ACN antes del análisis cromatográfico. La Figura 13a muestra el tanto por ciento de elución de los analitos utilizando diferentes disolventes. La mezcla MeOH:ACN (1:1) proporcionó los mejores resultados en comparación con los otros eluyentes. La polaridad del ACN favorece la solubilidad de los analitos (Serrano et al., 2016), mientras que el MeOH es útil para romper interacciones múltiples formadas entre los corticosteroides y el PS-AC (π - π , δ - π , enlaces de hidrógeno e interacciones dipolo-dipolo) (Huang et al., 2021). Consecuentemente, la mezcla ACN:MeOH fue seleccionada como eluyente para las pruebas posteriores.

Considerando que el tiempo de contacto para la elución es una variable crítica, se evaluó el tiempo para la máxima desorción de analitos. Bajo las condiciones previamente seleccionadas, el tiempo de elución se evaluó de 1.0 a 20.0 minutos. La Figura 13b



muestra el % de elución obtenido de los analitos. El % de elución aumentó con el tiempo de elución, manteniéndose constante después de 5.0 min. Para tiempos de elución menores de 5.0 min, los valores de desorción se reducen, mientras que los tiempos de elución mayores a este valor mostraron una disminución en el % de elución. La disminución del tanto por ciento de elución a tiempos superiores a 5.0 min generalmente se puede atribuir a la readsorción de analitos, un fenómeno común en los procesos de extracción-elución (Goh et al., 2021). Por lo tanto, 5.0 min fue seleccionado como el tiempo de elución óptimo.

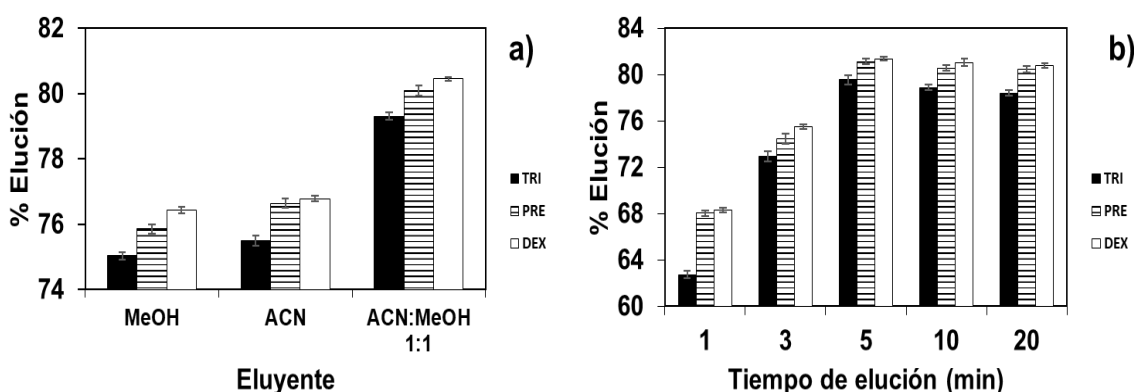
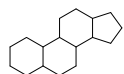


Figura 13. (a) Efecto del eluyente y (b) tiempo de elución en el tanto por ciento de elución de corticosteroides. Se utilizaron 500.0 mg de muestra enriquecida con 100.0 mg kg⁻¹ de analitos y 30.0 mg kg⁻¹ de estándar interno. La mezcla se agitó durante 5 minutos a temperatura ambiente.

3.3.6 Validación de la metodología y análisis de muestras de cremas cosméticas

Las condiciones óptimas para el proceso de retención-elución de corticosteroides empleando el PS-AC se utilizaron para validar el método y realizar el análisis de muestras de cremas cosméticas. La metodología consta de los siguientes pasos: se pesaron 500.0 mg de una muestra de crema cosmética blanco que se trató acorde a lo indicado en la sección 3.2.6. La dilución acuosa del extracto obtenido (fase ACN) se mezcló con 100.0 mg de PS-AC durante 2.0 h. Posteriormente, se eluyeron los corticosteroides añadiendo 2.0 mL de una solución de MeOH:ACN (1:1) al adsorbente y se agitó durante 5.0 minutos. La mezcla de disolventes orgánicos se evaporó y se reconstituyó en 0.5 mL de ACN previo a su análisis instrumental. Se construyó una curva de calibrado utilizando una crema cosmética enriquecida (20.0-100.0 mg kg⁻¹). La Tabla 7 muestra los parámetros analíticos obtenidos acorde con los criterios del Consejo Internacional para la



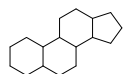
Armonización de los Requisitos Técnicos de Productos Farmacéuticos de Uso Humano (ICH, por sus siglas en inglés).

La especificidad del método fue evaluada analizando la separación y resolución de TRI, PRE, DEX y MEP en muestras de cremas cosméticas. La resolución y el número de platos teóricos calculados para todos los analitos fueron ≥ 2.0 y > 1000 , respectivamente. Estos valores demuestran la especificidad de la metodología propuesta. Las respuestas analíticas de cinco concentraciones de corticosteroides entre 20.0 y 100.0 mg kg⁻¹ fueron medidas en una muestra de crema cosmética enriquecida, con los resultados fue posible obtener los valores de regresión lineal. El coeficiente de determinación obtenido confirmó la buena linealidad del método ($r^2 > 0.99$), todas las sensibilidades analíticas fueron similares (1.1-1.3 mUA.s.kg⁻¹) para todos los analitos. Los valores de LOD se obtuvieron en el intervalo de 8.6 – 10.4 mg kg⁻¹, este parámetro es adecuado para detectar los analitos en concentraciones inferiores a los niveles descritos para dosis terapéuticas (0.01 y 1.0 % p/p) y a su vez permite detectar concentraciones habitualmente asociadas a adiciones ilegales de corticosteroides a muestras de cremas cosméticas (0.002 y 0.06 % p/p) (Kim et al., 2017; Desmedt et al., 2014; Fiori y Andrisano, 2014; Nam et al., 2012).

Tabla 7. Parámetros de regresión obtenidos a partir de las curvas de calibración para cada uno de los corticosteroides evaluados.

Corticosteroide	Coeficiente de determinación	Sensibilidad analítica (mUA.s.kg mg ⁻¹)	Ordenada (mUA.s)	Límite de detección (mg kg ⁻¹)	Límite de cuantificación (mg kg ⁻¹)	Límite de detección (% p/p)
Triamcinolona	0.9998	1.3 ± 0.2	0.3 ± 0.4	8.6	26.3	0.001
Prednisolona	0.9979	1.2 ± 0.2	0.3 ± 0.3	10.2	30.9	0.001
Dexametasona	0.9980	1.1 ± 0.2	0.2 ± 0.3	10.1	30.6	0.001

La Figura 14 muestra los cromatogramas obtenidos a partir del análisis de una disolución estándar de corticosteroides (Figura 14a), una muestra enriquecida con 50.0 mg kg⁻¹ de corticosteroides (Figura 14b) y una muestra enriquecida con 50.0 mg kg⁻¹ de corticosteroides y analizada mediante la metodología propuesta en este trabajo (Figura 14c). Se puede apreciar que el tratamiento aplicado para la limpieza de muestra es



eficiente ya que las señales de compuestos adicionales presentes en la Figura 14b (tiempos de retención entre 6 y 8 minutos) no se aprecian en la Figura 14c.

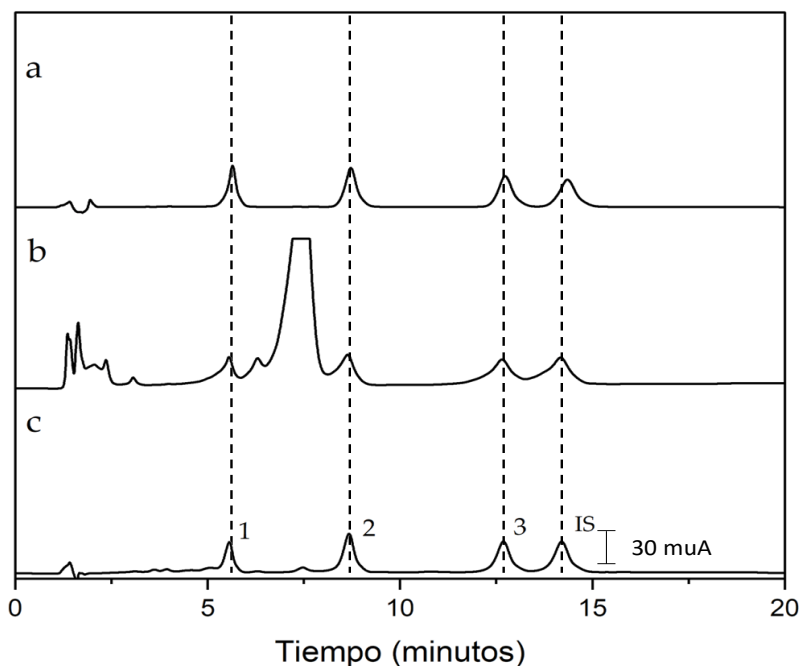
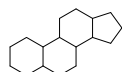


Figura 14. Cromatogramas obtenidos del análisis de: (a) disolución estándar de corticosteroides 50.0 mg kg⁻¹ (1; TRI, 2; PRE, 3; DEX y el estándar interno), (b) muestra enriquecida con 50.0 mg kg⁻¹ de corticosteroides y (c) muestra enriquecida con 50.0 mg kg⁻¹ de corticosteroides y analizada empleando la metodología propuesta en este trabajo.

La precisión de la metodología fue evaluada en términos de repetibilidad y precisión intermedia analizando tres niveles de concentración (30.0, 50.0 y 70.0 mg kg⁻¹) por triplicado. Las concentraciones de corticosteroides se determinaron por interpolación en la curva de calibrado construida con una muestra de crema cosmética enriquecida con los analitos. La repetibilidad se evaluó en condiciones homogéneas (%DER, n=3), mientras que la precisión intermedia se evaluó durante tres días por triplicado (%DER, n=9). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 8. En todos los casos los valores de DER fueron inferiores al 5.0 %, lo cual demuestra que la metodología propuesta en este trabajo tiene una precisión adecuada para el análisis de corticosteroides en muestras de cremas cosméticas (González y Herrador, 2007). Un total de 16 muestras de cremas cosméticas fueron analizadas empleando la metodología propuesta (DSPE-HPLC-DAD).



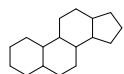
Los contenidos encontrados de corticosteroides en todos los casos fueron inferiores a los LODs obtenidos.

Tabla 8. Concentración de corticosteroides determinada en una muestra de crema cosmética enriquecida, utilizando la metodología propuesta (evaluación de la precisión).

[Corticosteroide] adicionada	Repetitividad, (% DER, n=3)			Precisión intermedia, (% DER, n=9)		
	30.0	50.0	70.0	30.0	50.0	70.0
	(mg kg ⁻¹)	(mg kg ⁻¹)	(mg kg ⁻¹)	(mg kg ⁻¹)	(mg kg ⁻¹)	(mg kg ⁻¹)
Triamcinolona	27.9 (3.4)	46.0 (2.1)	65.3 (3.7)	28.6 (5.0)	47.6 (3.9)	66.6 (4.6)
Prednisolona	27.0 (3.2)	46.2 (2.1)	65.2 (3.4)	28.2 (4.3)	47.0 (4.1)	66.8 (4.8)
Dexametasona	27.6 (3.9)	45.4 (2.8)	63.2 (3.4)	27.6 (4.8)	46.4 (3.3)	65.9 (4.2)

La exactitud de la metodología propuesta fue determinada mediante ensayos de recuperación de los tres corticosteroides evaluados en tres niveles diferentes concentración (40.0, 60.0 y 80.0 mg kg⁻¹) en muestras de crema cosmética, realizando las mediciones por triplicado. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 9, expresados como tanto por ciento de recuperación. En todos los casos, los resultados muestran valores superiores al 90.0%, este valor es aceptable cuando la concentración del analito se encuentra entre 10 y 100 mg kg⁻¹ en la muestra (González y Herrador, 2007). Los resultados obtenidos en este estudio demuestran la capacidad y viabilidad de la metodología propuesta para la limpieza y el análisis de muestras cosméticas (Gonçalves et al., 2020).

La robustez fue determinada mediante la evaluación del impacto de pequeñas variaciones introducidas en el proceso analítico sobre el rendimiento analítico, la validación completa del método se llevó a cabo durante varias semanas. Las siguientes variables fueron identificadas como factores que podrían afectar la robustez del método: tiempo de almacenamiento de las disoluciones estándar de corticosteroides (una semana, un mes), composición de la muestra (se analizaron 16 muestras de crema cosmética diferentes), cantidad de muestra (0.48 g o 0.52 g), volumen de ACN añadido (4.8 mL o 5.2 mL), cantidad de NaAcO incorporado (0.48 g o 0.520 g) y cantidad de adsorbente empleado (100.2 mg o 99.8 mg). Las variaciones observadas en las áreas de los picos de los analitos no mostraron diferencias significativas (%DER < 2,0%), en



consecuencia, el procedimiento puede considerarse robusto. Considerando la complejidad de la matriz analítica evaluada, la metodología propuesta demostró ser confiable para el análisis de TRI, PRE y DEX en muestras de cremas cosméticas.

Tabla 9. Ensayos de recuperación de corticosteroides en muestras de crema cosmética enriquecida (40.0, 60.0 y 80.0 mg kg⁻¹) empleando el método propuesto.

[Corticosteroide] adicionada	Porcentaje de recuperación (%), (%DER, n=3)		
	40.0 mg kg ⁻¹	60.0 mg kg ⁻¹	80.0 mg kg ⁻¹
Triamcinolona	93.5 (3.0)	92.2 (1.4)	93.7 (2.3)
Prednisolona	90.0 (3.0)	92.6 (2.6)	92.5 (3.1)
Dexametasona	90.2 (3.9)	92.9 (3.1)	92.7 (3.6)

La Tabla 10 muestra una comparación entre los resultados obtenidos con la metodología propuesta y otros métodos descritos para la determinación de corticosteroides en muestras de productos cosméticos. La etapa de limpieza con PS-AC propuesta por la metodología desarrollada reduce la co-extracción de componentes adicionales presentes en la formulación, en consecuencia, se obtuvieron perfiles cromatográficos sin señales de interferencia, lo que garantiza la fiabilidad del análisis (Guo et al., 2019). La metodología DSPE-HPLC-DAD propuesta presenta límites de detección competitivos con los descritos en la literatura, con las ventajas de simplificar la etapa de pretratamiento, reducir reactivos necesarios y los costos de análisis. Además, la aplicación de un absorbente a base de poliestireno reciclado en consecuencia proporciona una metodología económica y amigable con el medio ambiente.

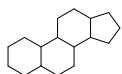
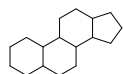


Tabla 10. Comparación entre los métodos aplicados a la determinación de corticosteroides en muestras cosméticas.

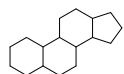
Corticosteroide	Cantidad de muestra (g)	Volumen de pretratamiento (mL)	Condiciones de pretratamiento de muestra	Limpieza de muestra	Método analítico	LOD (mg kg ⁻¹)	REF
Corticosteroides (39)	1.0	25.0	60° C, 5 min	-	HPLC-UV	100.0-500.0	(Gimeno et al., 2016)
21 acetato de hidrocortisona, dexametasona, acetonido de fluocinolona	0.5	10.0	70° C, 25 min	-	HPLC-DAD	1.6-5.0	(Arif y Ata, 2020)
Dexametasona, acetonido de triamcinolona, acetato de hidrocortisona, valerato de betametasona.	0.5	5.0	--	-	HPLC-PDA	19.6-25.9	(Rahmayuni et al., 2018)
Triamcinolona, prednisolona, dexametasona	0.5	10.0	QuEChERS	PS-AC	HPLC-DAD	8.6-10.4	Este trabajo



3.4 CONCLUSIONES

- Se fabricó un adsorbente a base de carbón activado y poliestireno reciclado para el análisis de corticosteroides en muestras de cremas cosméticas mediante extracción dispersiva en fase sólida.
- Las películas PS-AC demostraron ser un adsorbente de fácil y económica preparación eficiente en el proceso de limpieza de muestra para la determinación de corticosteroides en cremas cosméticas.
- Se analizaron diversas muestras de cremas cosméticas con diferentes composiciones y propiedades fisicoquímicas empleando la metodología propuesta. En todos los casos, los cromatogramas obtenidos fueron simples, similares, confiables, sin señales interferentes y fáciles de interpretar.
- Todos los corticosteroides analizados mostraron un comportamiento y parámetros analíticos similares, por lo que el método desarrollado puede extrapolarse al análisis de otros corticosteroides.
- La metodología propuesta es económica, sencilla, rápida, requiere pequeñas cantidades de muestra y disolventes orgánicos. Asimismo, permite la detección de corticosteroides con valores de precisión y exactitud adecuados.
- El método desarrollado permitió la detección de corticosteroides por debajo de los niveles descritos para dosis terapéuticas y de las cantidades adicionadas ilegalmente en muestras cosméticas (descritas en la bibliografía).

**DETERMINACIÓN DE
CORTICOSTEROIDES EN MUESTRAS
FARMACÉUTICAS Y COSMÉTICAS
MEDIANTE CROMATOGRAFÍA
ELECTROKINÉTICA MICELAR**



4. DETERMINACIÓN DE CORTICOSTEROIDES EN MUESTRAS FARMACÉUTICAS Y COSMÉTICAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA ELECTROCINÉTICA MICELLAR

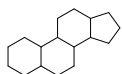
4.1 ANTECEDENTES

4.1.1 Electroforesis capilar

Los corticosteroides son aplicados con éxito en el tratamiento de diversas enfermedades (psoriasis, eccema, artritis, rinitis, asma, hepatitis, lupus eritematoso sistémico) debido a sus propiedades antiinflamatorias, antipiréticas e inmunosupresoras, no obstante; una administración prolongada y sin supervisión médica provoca graves efectos adversos a la salud de los pacientes (diabetes, hipertensión, obesidad, osteoporosis, atrofia cutánea, síndrome de Cushing, etc.) (Yadav et al., 2022).

Debido a las importantes consecuencias descritas del consumo irregular de corticosteroides, es necesario desarrollar técnicas analíticas que permitan su adecuada identificación y cuantificación en diversas muestras para garantizar la seguridad del paciente y/o consumidor. La mayoría de los métodos desarrollados para el análisis instrumental de corticosteroides en diversas muestras (orina humana, cosméticos, formulaciones farmacéuticas (Görög, 2011) son cromatográficos, entre ellos GC (Pujos et al., 2005; Amendola et al., 2003) o HPLC (Arif y Ata, 2020; Liu et al., 2017; Fiori y Andrisano, 2014). La técnica preferida es HPLC, sin embargo; estas estrategias requieren instrumentación sofisticada, un operador cualificado, un alto consumo de disolvente orgánico grado HPLC y una preparación compleja de la muestra (Flor et al., 2010).

La Electroforesis Capilar (CE, por sus siglas en inglés) ha sido descrita como una alternativa a los métodos cromatográficos debido a su versatilidad, consumo limitado de muestra (nL) y reactivos, corto tiempo de análisis y posibilidad de modificar la composición del electrolito de trabajo (BGE, por sus siglas en inglés) para garantizar una adecuada separación de los corticosteroides (Sirén et al., 2008).



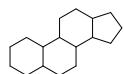
El fundamento de las técnicas electroforéticas consiste en la migración de moléculas que poseen carga bajo la aplicación de un campo eléctrico. La separación de los analitos ocurre a través de un capilar de sílice fundida recubierto externamente de poliamida, con diámetros internos $<100\ \mu\text{m}$ que contiene grupos silanol (SiOH). El instrumento para análisis electroforético consiste en un sistema de inyección (hidrodinámica o electrocinética), el capilar de separación ($20\text{-}100\ \mu\text{m}$ D.I. y longitudes $20.0\text{-}100.0\ \text{cm}$), una fuente de alto voltaje, los electrodos, el medio conductor y el sistema de detección.

Las diferentes velocidades de migración de cada compuesto están asociadas a su tamaño y carga. Su desplazamiento es impulsado por la aplicación de un voltaje, como resultado de la dirección en la que se aplica el campo eléctrico existen dos tipos de polaridades en CE. La polaridad normal; donde el electrodo positivo es el más lejano al detector mientras que el electrodo negativo es localizado cerca del detector, bajo estas condiciones los primeros en ser separados son las especies cargadas positivamente, seguidas de las especies neutras para finalizar con las especies aniónicas (Figura 15). Por otra parte, cuando se invierte la configuración de los electrodos da como resultado la polaridad inversa, en este caso los primeros en migrar son los analitos cargados negativamente (Ewing et al., 1989). La aplicación de la CE se ha evaluado en diversas áreas: análisis químico, biomédico, farmacéutico y bioquímico (Tagliaro et al., 1998).



Figura 15. Migración de las moléculas en el proceso de separación electroforética bajo condiciones de polaridad normal.

Existen diversas modalidades de las técnicas electroforéticas, algunas de ellas son: electroforesis capilar de zona (CZE), electroforesis capilar en gel (CGE), electroforesis capilar con enfoque isoeléctrico (CIEF) y cromatografía electrocinética micelar (MEKC), el modo de electromigración es seleccionado en función de las características del analito y la composición de la muestra (Natishan, 2005).

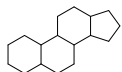


4.1.1.1 Electroforesis capilar de zona (CZE)

La CZE es la modalidad más sencilla de la CE, la separación de los analitos mediante CZE se debe a sus diferentes velocidades de electromigración en función a su tamaño y carga. La implementación de altos voltajes de separación permite tiempos de análisis cortos como resultado de la relación inversamente proporcional que existe entre los tiempos de migración y los voltajes de separación. Para establecer el valor de pH de trabajo apropiado, se utilizan disoluciones de iones PO_4^{3-} y B(OH)_4^- en los BGEs y regularmente se emplean voltajes de separación entre 10 y 30 kV (Dong et al., 2009). Esta modalidad de CZE ha sido aplicada en la separación de especies cargadas en muestras farmacéuticas (Pomponio et al., 2005), algunos medicamentos analizados mediante esta técnica son antiinflamatorios no esteroideos (Hamoudová y Pospíšilová, 2006; Chen y Wu, 2005), antivirales (Breadmore et al., 2004), inhibidores de proteasa 11 (Gutleben et al., 2003) y descongestionantes (Marchesini et al., 2003).

Otra clase de compuestos analizados mediante CZE son los tioles, los cuales son compuestos de gran relevancia en el metabolismo de fármacos a través de los fluidos biológicos. La determinación de cisteína y glutatión mediante CZE ha sido descrita mediante la implementación de un electrodo de carbono de 500 μm de diámetro, con un voltaje de separación de 27 kV y un sistema de detección amperométrica. Los analitos fueron detectados en muestras de sangre a un valor de pH de 7.4 utilizando un BGE compuesto por una disolución de PO_4^{3-} 20.0 mM para establecer dichas condiciones (Wang et al., 2000).

La CZE también ha sido aplicada en muestras de alimentos. El análisis de tartrazina, amarillo ocaso y rojo allura en bebidas no alcohólicas, jarabes y jaleas mediante CZE requiere la implementación de un electrolito de trabajo compuesto por iones PO_4^{3-} 10.0 mM a un pH de trabajo de 11.0. La muestra fue inyectada hidrodinámicamente por 4.0 s y el análisis se llevó a cabo a 20.0 kV. La metodología electroforética permite obtener LODs entre 3.0 y 6.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Perez-Urquiza y Beltran, 2000).



4.1.1.2 Cromatografía electrocinética micelar (MEKC)

La mayoría de las modalidades de CE son aplicadas a la separación de compuestos cargados, sin embargo en 1981 fue propuesta la idea de separar compuestos neutros mediante técnicas electroforéticas utilizando micelas iónicas, no obstante, fue en 1984 cuando el enfoque de la técnica fue demostrado mediante CE por Terabe y sus colaboradores (Terabe, 2009).

La MEKC se basa en el reparto de los analitos entre una fase acuosa y una fase “pseudoestacionaria” micelar adicionada al BGE, esta última interactúa con los analitos siguiendo mecanismos de reparto semejantes a los que describen las técnicas cromatográficas. La migración de los compuestos es proporcional a su interacción con las micelas como resultado de su hidrofobicidad, mientras que el flujo electroosmótico (EOF, por sus siglas en inglés) actúa como una “fase móvil” (Rizvi et al., 2011).

La formación de las micelas se desarrolla mediante la adición de tensoactivos al BGE (Xu et al., 2014) en una concentración mínima requerida para la formación de los agregados; su concentración micelar crítica (CMC). Bajo estas condiciones los compuestos iónicos comienzan a agregarse y formar partículas con forma esférica. En la Figura 16 se puede apreciar el arreglo de una micela normal en disolución acuosa. En este arreglo, las colas de naturaleza hidrofóbica se orientan hacia el interior de la esfera mientras el extremo cargado (cabeza hidrofílica) se orienta hacia la periferia e interactúa con el medio acuoso. Acorde al ordenamiento de los extremos de la molécula de los surfactantes existe otro tipo de micelas, las micelas invertidas en disolventes no polares; los grupos polares (hidrofílicos) son orientados al interior del agregado mientras que la parte hidrofóbica interactúa con el medio no polar (Wu et al., 2022).

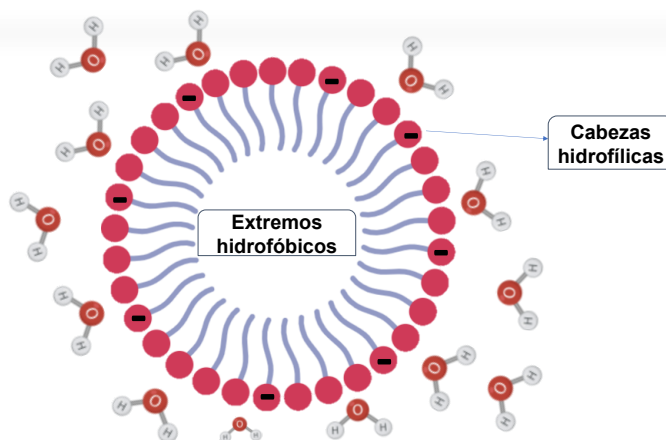
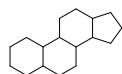
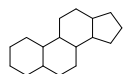


Figura 16. Representación gráfica de una micela básica formada por un surfactante iónico.

El tensoactivo iónico más utilizado para la formación de micelas en MEKC es el dodecilsulfato de sodio (SDS) (Kuo y Wu, 2005; Abubaker et al., 1995) con un valor de CMC de 8.3 mM. Las micelas (aniónicas) de SDS son atraídas electrostáticamente hacia el ánodo, no obstante, debido a la velocidad que impone el EOF las micelas tienden a migrar lentamente en dirección del detector (cátodo). Los agregados solubilizan parcialmente a los compuestos neutros mediante la interacción analito-núcleo hidrofóbico (micela), el tiempo de migración de los analitos se define en función a los mecanismos de partición analito-micela, en ausencia de agregados los analitos neutros migran a la misma velocidad que el EOF. Lo anterior se resume en que los analitos más polares migran más rápido que los compuestos no polares o hidrofóbicos (Tan et al., 2010).

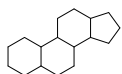
La selectividad en MEKC puede ser fácilmente modificada variando las propiedades fisicoquímicas de las micelas (tamaño, carga y geometría), por ello se ha evaluado la incorporación de otros componentes. Entre las modificaciones se puede describir el uso de surfactantes aniónicos (dodecil sulfato de litio y octano sulfonato de sodio), catiónicos (bromuro de cetiltrimetilamonio y bromuro de dodeciltrimetilamonio), zwitteriónicos (3-[(3-cocamidopropil)-dimetil-amonio]-2-hidroxi-1-ropanosulfonato) y las sales biliares. Recientemente se ha evaluado la adición de disolventes orgánicos (MeOH, iPrOH y ACN) para reducir las interacciones analito-micela e incrementar la velocidad de migración (disminución de tiempos de análisis) (Deeb et al., 2011).



Metodologías basadas en MEKC han sido aplicadas en análisis de herbicidas en muestras medioambientales. El análisis electroforético de siamazina, atrazina, paraquat y diquat en muestras de agua ha sido desarrollado utilizando un BGE compuesto por las siguientes disoluciones: tetraborato de sodio 10.0 mM, SDS 25.0 mM, perclorato de sodio 40.0 mM y 15.0% de ACN (v/v) ajustado a un valor de pH=9.3. La muestra previamente tratada mediante SPE (cartucho C₁₈) fue inyectada durante 11.0 s a 50 mbar, empleando una polaridad normal y un voltaje de separación de 30.0 kV. Para la separación de estos analitos mediante CZE se requieren medios de separación muy ácidos lo que conlleva mayores tiempos de activación para el capilar. No obstante, la adición del SDS al BGE permite obtener tiempos de análisis menores con señales más estrechas y mejor definidas en comparación a las obtenidas mediante CZE y LODs entre 0.6 y 1.9 µg L⁻¹ (Acedo-Valenzuela et al., 2004).

La MEKC también ha sido aplicada en muestras de alimentos. El análisis de melamina en muestras de leche ha sido desarrollado mediante la combinación de MEKC y un sistema de detección amperométrica. El método involucra un electrolito compuesto por SDS (8.0 mM) y iones B(OH)₄⁻ (20.0 mM) ajustado a un valor de pH de trabajo de 7.4. El método describe un tiempo total de análisis de 9.0 minutos con valores de precisión adecuados (3.8%), tantos porcentos de recuperación cercanos al 100 % y LOD de 2.1 µg mL⁻¹ (Wang et al., 2010).

Una de las aplicaciones más frecuentes de la metodología MEKC es el análisis de principios activos en formulaciones farmacéuticas, específicamente para el control de calidad. Ejemplo de lo anterior es la determinación de melamina en fórmulas infantiles mediante la aplicación de un método basado en MEKC y preconcentración en línea empleando un BGE compuesto por SDS (175.0 mM) y H₃PO₄ (50.0 mM). Las muestras fueron tratadas empleando un cartucho SPE de intercambio iónico previo a su análisis electroforético para el cual se aplicó un voltaje de separación de 20.0 kV. Los valores de (DER) asociados a la precisión y exactitud del método fueron inferiores al 5.0% en ambos casos y fue posible obtener un LOD de 10.9 ng mL⁻¹ (Tsai et al., 2009).



Las técnicas electroforéticas basadas en MEKC han sido utilizadas en la determinación de una amplia variedad de fármacos, sin embargo, la separación de una mezcla de corticosteroides no es posible empleando únicamente SDS como formador de micelas debido a una deficiente interacción analito-micela promoviendo que todos los analitos migren a la misma velocidad como consecuencia de su alta hidrofobicidad y similitud estructural (Abubaker et al., 1995).

4.1.2 Análisis de corticosteroides mediante MEKC

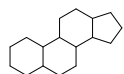
Los corticosteroides son una familia de compuestos que presentan alta similitud estructural y elevados valores de pKa (compuestos neutros), por estas razones la separación electroforética es factible únicamente bajo condiciones MEKC (Kravchenko et al., 2021).

Una de las primeras metodologías desarrolladas para la separación de hormonas esteroideas (1-dehidroaldosterona, 17-isoaldosterona, cortisona, aldosterona, cortisol, 21-desoxicortisol y corticosterona) emplea un electrolito compuesto por iones $B(OH)_4^-$ con pH=9.2 y SDS, el surfactante iónico más utilizado en este tipo de separaciones (Tan et al., 2010; Kuo y Wu, 2005). La incorporación del surfactante junto con el voltaje elevado de trabajo favorece las condiciones para la separación de los analitos, los cuales difieren estructuralmente en sustituyentes y su localización dentro de la estructura base, sin embargo, el uso de voltajes elevados en la separación puede provocar un desgaste significativo en los componentes del instrumento (Jumppanen et al., 1994).

No obstante, cuando los analitos están estructuralmente correlacionados, su separación no es viable con la adición de surfactantes lineales. La adición de sales biliares al BGE es una de las modificaciones descritas para el análisis de corticosteroides.

4.1.2.1 Sales biliares y micelas mixtas

Las sales biliares son surfactantes iónicos poco solubles en agua (Holm et al., 2013), la estructura química de una sal biliar está formada por un esqueleto esteroideo de naturaleza lipofílica y algunos sustituyentes hidrofílicos (Figura 17a).



Las sales biliares son estructuras planares faciales que poseen una cara polar (α) y una cara no polar (β , el esqueleto esteroideo), tienden a formar agregados primarios y secundarios. Los agregados primarios adquieren la forma de dímeros a partir de la interacción entre las zonas hidrofóbicas del anión (espalda con espalda) como se muestra en la Figura 17b, al mismo tiempo los extremos hidrofílicos se encuentran orientados hacia el entorno acuático. La formación de las especies diméricas desempeñan un papel importante en la formación de los agregados secundarios mediante el mecanismo de autoasociación dando lugar a la formación de micelas con forma de recubrimiento de un rodillo donde los grupos metilos están orientados hacia el interior del cuerpo cilíndrico y los grupos -OH se orientan hacia la fase acuosa (Figura 17c) (Poša, 2023; Malik, 2016).

En medios acuosos, las sales biliares forman micelas mediante interacciones hidrofóbicas sobre su cara no polar formando una cavidad hidrófoba. Mientras que en medios apolares, los agregados (micelas inversas) se forman a partir de enlaces de H dando lugar a la formación de un núcleo hidrofílico (Malik, 2016).

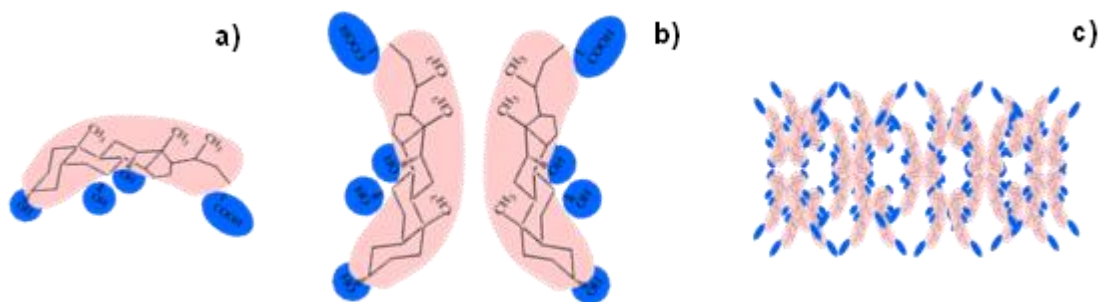
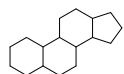


Figura 17. Representación gráfica de a) una sal biliar, b) la formación de un agregado y c) la formación de un agregado de forma elipsoidal (Garidel et al., 2007).

Estos surfactantes son ampliamente utilizados para la solubilización y separación de compuestos de naturaleza hidrófoba (corticosteroides) (Kuo y Wu, 2005).

La combinación de una sal biliar con un surfactante iónico de cadena lineal da como resultado la formación de *micelas mixtas*, una estrategia eficaz para el análisis de mezclas de corticosteroides mediante MEKC. Se ha descrito que el tamaño de las micelas



mixtas es superior en comparación a las micelas formadas por un solo surfactante, lo que se traduce en una menor movilidad electroforética. Sin embargo, favorecen interacciones adicionales con los analitos incrementando la selectividad del proceso de separación electroforética (Terabe, 1992).

En presencia de surfactantes convencionales, los grupos polares de las sales biliares se encuentran distribuidos entre las cabezas hidrofílicas de los surfactantes convencionales como se observa en la Figura 18a (Malik, 2016). Como resultado de lo anterior las micelas formadas mediante la combinación de SDS y sales biliares (1:1 mol/mol) generalmente son de forma esférica; orientándose los grupos polares hacia la disolución y las zonas hidrófobas hacia el interior de la esfera. No obstante, si la relación molar SDS:sal biliar es distinta a 1, se obtendrá una micela con forma cilíndrica (Figura 18b) (Jórárt et al., 2014; Courraud et al., 2013).

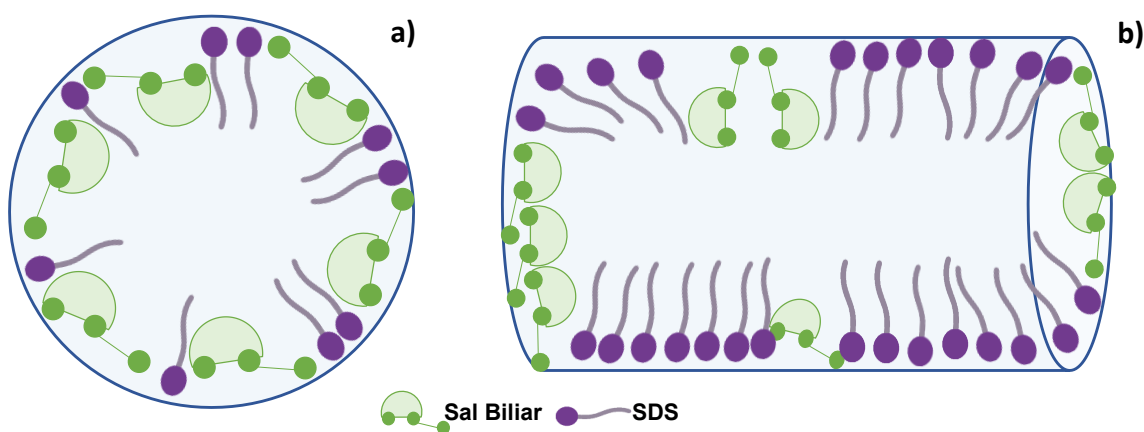
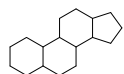


Figura 18. Micela SDS-sal biliar a) esférica y b) cilíndrica.

Ambas micelas poseen un núcleo con carácter hidrofóbico que le permite solubilizar eficientemente a compuestos lipofílicos como los corticosteroides, en concreto, el BGE apropiado para la separación de compuestos esteroideos se compone de dos surfactantes y el ion amortiguador de pH. Algunas de las sales biliares evaluadas en el análisis de corticosteroides son taurocolato de sodio (STC) para análisis de orina humana (Sirén, 2008), taurodesoxicolato de sodio para análisis de píldoras anticonceptivas (Britz-

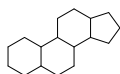


McKibbin et al., 2003) y una mezcla de colato de sodio y desoxicolato de sodio para muestras de tabletas farmacéuticas (Kuo y Wu, 2005).

La Tabla 11 presenta una recopilación de diversas metodologías aplicadas en el análisis de hormonas esteroideas empleando técnicas electroforéticas, se puede observar que además de las sales biliares se han evaluado otros componentes en el medio de separación (ciclodextrinas (CD) (Bessonova et al., 2016), disolventes orgánicos (Kartsova y Bessonova, 2007) y líquidos iónicos (Kravchenko et al., 2021).

Tabla 11. Metodologías MEKC desarrolladas para el análisis de corticosteroides.

Corticosteroide	Composición del electrolito	Condiciones de análisis	Referencia
1-deshidroaldosterona, 17-isoaldosterona, cortisona, aldosterona, cortisol, 21-desoxicortisol, corticosterona	$[B(OH)_4^-]$ 60.0 mM, pH=9.2, SDS 10.0 mM.	22.0 kV, 20.0 min, capilar 57.0 cm x 50 μ m D.I.	(Jumppanen et al., 1994)
Prednisona, cortisona, prednisolona e hidrocortisona	$[B(OH)_4^-] + [PO_4^{3-}]$ 50.0 mM, pH=9.0; SDS, DHC y STC 50.0 mM.	15.0 kV, 35.0 min, capilar 50.0 cm x 50 μ m D.I.	(Noe et al., 1998)
Hidrocortisona, 21-hemisuccinato de hidrocortisona y 21-cipionato de hidrocortisona	$[B(OH)_4^-]$ 10.0 mM, pH=11.0, SDS 100.0 mM, 50.0 mM HP- β -CD.	20.0 kV, 5.0 min, capilar 27.0 cm x 50 μ m D.I.	(Simms et al., 2001)
Testosterona, corticosterona, prednisona, hidrocortisona	$[B(OH)_4^-]$ 160.0 mM, pH=11.0, 80.0 mM STDC, 10.0 mM γ -CD	22.0 kV, 40.0 min, capilar 87.0 cm x 75 μ m D.I.	(Britz-McKibbin et al., 2003)
cortisona, acetato de cortisona, hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, prednisolona y acetato de prednisolona	$[PO_4^{3-}]$ 50.0 mM, pH 2.5, 1.4% (v/v) n-heptano, 6.6% (v/v) n-butanol, 2.5% (v/v) Brij 76, 4.0% (v/v) STDC, 85.5% (v/v). de una solución 5.0 mM β -CD.	10.0 kV, 30.0 min, capilar 24.0 cm x 50 μ m D.I., 40° C	(Pomponio et al., 2005)
cortisona, corticosterona, 11-desoxicortisol, 11-desoxicorticosterona	$[AcONH_4]$ 25.0 mM, pH 4.0, 15.0 mM C16MImCl, 12.0 mM HP- β -CD.	20.0 kV, 16.0 min, capilar 50.0 cm x 50 μ m D.I.	(Bessonova et al., 2016)



cortisona, hidrocortisona, 11-desoxicortisol, corticosterona, 21- hidroxiprogesterona	[PO ₄ ³⁻] 5.0mM, pH= 3.2, 3-Me-1-β- CD-ImOTs 0.7Mm.	20.0 kV, 5.0 min, capilar 27.0 cm x 50 μm D.I.	(Kravchenko et al., 2021)
--	---	---	------------------------------

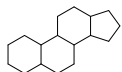
β-CD; beta-ciclodextrina, HP-β-CD; hidroxipropil-beta-ciclodextrina, γ-CD; gamma-ciclodextrina, 3-Me-1-β-CD-ImOTs; tosilato de 3-metil-1-β-ciclodextrinimidazol, C₁₆MImCl;cloruro de 3-metil-1-cetilimidazolio, STDC; taurodesoxicolato de sodio, DHC; ácido deshidrocolico, TC; ácido taurocolico de sodio

Se desarrolló una metodología de análisis para prednisona, cortisona, prednisolona e hidrocortisona empleando un BGE compuesto por una mezcla de iones B(OH)₄⁻ y PO₄³⁻ (50.0 mM) ajustando el valor de pH 9.0; SDS (50.0 mM) y una mezcla de ácido deshidrocolico (50.0 mM; DHC) y ácido taurocolico de sodio (50.0 mM; TC). El BGE empleado permite separar todas las señales de interés en un tiempo de 40.0 minutos con buena resolución, el método permite alcanzar LODs de 20.0 mg L⁻¹, lo que permite su aplicación en procesos de control de calidad en la fabricación de reactivos químicos y fármacos (Noe et al., 1998).

4.1.2.2 Otras estrategias para separación electroforética de corticosteroides

Para muestras que contienen una mezcla de corticosteroides más compleja donde estructuralmente difieren únicamente en la orientación y/o un grupo funcional, se desarrollaron métodos en los que se emplea una mezcla de sales biliares y ciclodextrinas (separadores quirales). Cada aditivo favorece la separación de estos compuestos a pesar de su similitud estructural al formar diversas interacciones entre los componentes y corticosteroides. Un electrolito que contiene B(OH)₄⁻ (160.0 mM), taurodesoxicolato de sodio (80.0 mM) y γ-CD (10.0 mM) se utiliza en la separación de testosterona, corticosterona, prednisona, hidrocortisona. La muestra fue inyectada a 0.5 psi de 2 a 30 segundos, los analitos fueron detectados mediante UV-vis a 254nm. El incremento de la viscosidad en el medio de separación (alta concentraciones de iones) reduce la movilidad electroforética lo que se traduce en un incremento en el tiempo de análisis (40 min) permitiendo la separación de los analitos en píldoras anticonceptivas orales (Britz-McKibbin et al., 2003).

Los corticosteroides son compuestos mayormente solubles en disolventes orgánicos. Esta característica permite su análisis mediante cromatografía electrocinética en

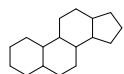


microemulsión. Se realizó la separación de cortisona, acetato de cortisona, hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, prednisolona y acetato de prednisolona empleando un BGE compuesto por PO_4^{3-} (50.0 mM), β -CD (5.0 mM), STDC (4% v/v), n-heptano (1.4 v/v) y n-butanol (6.6 v/v), Brij 76 (2.5 % v/v) estableciendo un pH de trabajo de 2.5. El reparto de los corticosteroides dentro de las micelas formadas en la microemulsión favorece la separación de los analitos permitiendo su detección en el orden de 1.5 mg L^{-1} , sin embargo, además de implementar un electrolito bastante complejo y costoso, requiere de tiempos de análisis extensos ($> 30.0 \text{ min}$) (Pomponio et al., 2005).

Entre las modificaciones más recientes que se han realizado al electrolito de separación para el análisis de corticosteroides se encuentra la adición de líquidos iónicos. Por otra parte, se ha descrito el análisis de derivados de corticosterona y cortisona utilizando un electrolito compuesto por: cloruro de 3-metil-1-cetilimidazolio (0.5 mM), acetato de amonio (25.0 mM) pH 4.0, SDS (25.0 mM), 15.0% (v/v) MeOH. Este tipo de análisis permite obtener LODs entre 0.20 y 0.25 mg L^{-1} , sin embargo, es limitado debido al costo de los líquidos iónicos. Por ello, se continua en la búsqueda de alternativas en la separación electroforética con la finalidad de obtener metodologías adecuadas (Bessonova et al., 2016).

El análisis de corticosteroides ha sido ampliamente enfocado al análisis de formulaciones farmacéuticas. Se pueden encontrar de forma simple (solo un corticosteroide) o combinada (adición de otro principio activo) y son administradas a los pacientes en diferentes presentaciones (comprimidos, soluciones, ungüentos y suspensiones) (Gaballa et al., 2021). En la industria farmacéutica el análisis de compuestos con estructuras y propiedades similares siempre es requerido, disminuir tiempos y costos de análisis para garantizar la calidad de los fármacos representa un importante reto para este sector.

Se ha evaluado la incorporación de surfactantes etoxilados no iónicos en metodologías MEKC (tween 80 o el tritón X100) (Xiao et al., 2015; Wu et al., 2008). Sin embargo, para



la determinación de compuestos neutros como los corticosteroides es imprescindible la carga en la micela.

La incorporación de surfactantes etoxilados iónicos ha sido poco estudiado, no obstante, se ha descrito que estos tensoactivos presentan valores de CMC menores en comparación a los surfactantes no etoxilados. La presencia del grupo etoxi incrementa la solubilidad de las micelas en medio acuoso como resultado de los grupos polares que posee en su estructura química (Khosharay et al., 2020).

Acorde con la Agencia Danesa de protección ambiental el lauril diéter sulfato de sodio (SLES) es un surfactante etoxilado iónico más amigable con el medio ambiente en comparación con el SDS, presenta una CMC de 0.82 M, este valor indica que se requiere una menor cantidad de reactivo para la formación de micelas (Hoeman y Culbertson, 2008).

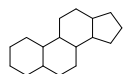
La mayoría de los métodos desarrollados para el análisis de corticosteroides en diversas matrices (orina humana, cosméticos, formulaciones farmacéuticas (Görög, 2011) son basadas en técnicas cromatográficas. En general, estos métodos permiten el análisis de uno o dos corticosteroides de manera simultánea y requieren de grandes volúmenes de disolventes orgánicos lo que se traduce en un aumento de los costos de análisis. Por otra parte, el análisis multianalito de corticosteroides mediante MEKC ha sido muy poco explorado (Esposito et al., 2020).

En esta sección se describe el desarrollo de un método analítico basado en MEKC rápido, de bajo costo y robusto para la determinación y cuantificación de corticosteroides en muestra de cremas cosméticas y formulaciones farmacéuticas mediante la evaluación y comparación de surfactantes etoxilados y no etoxilados.

4.2 PARTE EXPERIMENTAL

4.2.1 Reactivos y disoluciones

Todas las disoluciones se prepararon con agua desionizada (Milli-Q Merck, Millipore Darmstadt, Hesse, Alemania) con una resistividad no menor a 18.2 MΩ·cm. Todos los

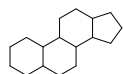


productos químicos utilizados fueron de grado analítico. La metilprednisolona (MEP, estándar interno), la dexametasona (DEX), la prednisolona (PRE), la triamcinolona (TRI), el hidrato de taurocolato de sodio hidrogenado (STC), el SDS, el hidróxido de sodio (NaOH) y el fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4) se obtuvieron de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). El borato de sodio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), el metanol (MeOH) y el ácido clorhídrico (HCl) se adquirieron de J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, EE. UU.). El SLES se obtuvo de DPS Mexicana (CDMX, México), con un peso molecular de $420.54 \text{ g mol}^{-1}$. Las disoluciones estándar de los tres analitos (TRI, PRE y DEX) y la disolución del estándar interno (MEP) se prepararon en MeOH grado HPLC (1000.0 mg L^{-1}) y se almacenaron a 4°C . El BGE óptimo se preparó con Na_2HPO_4 (20.0 mM), SDS (6.0 mM) y STC (30.0 mM), ajustado a un pH de 8.0 ± 0.02 con HCl (0.1 M).

Todas las muestras de cremas cosméticas y formulaciones farmacéuticas se adquirieron en Pachuca de Soto, Hidalgo (México).

4.2.2 Condiciones MEKC

Los experimentos electroforéticos se realizaron con un instrumento Beckman Coulter PA 800 plus (Fullerton, CA, EE. UU.) con detector de arreglo de diodos. Los cromatogramas electrocinéticos obtenidos se analizaron con el software 32 Karat (Beckman Coulter, Brea, CA, EE. UU.). Se utilizó un analizador de pH/iones Oakton pH510 (Vernon Hills, IL, EE. UU.) para ajustar el pH de las disoluciones. Se empleó un capilar de sílice fundida ($30.0 \text{ cm} \times 75.0 \text{ }\mu\text{m}$ de diámetro interior). El ciclo de activación del capilar se realizó de la siguiente forma: se hizo pasar NaOH 1.0 M durante 10 minutos, seguido de 10 minutos de NaOH 0.1 M, agua desionizada durante 10 minutos y finalmente el BGE durante 10 minutos. Entre cada análisis el capilar se lavó con NaOH 1.0 M durante 2 minutos, NaOH 0.1 M durante 2 minutos, agua desionizada durante 2 minutos y el BGE durante 2 minutos. El voltaje de separación fue de 14.0 kV a 25.0°C , la muestra se introdujo en el capilar hidrodinámicamente utilizando una presión de 3447.37 Pa (0.5 psi) durante 5.0 segundos. Se preparó una disolución estándar que contiene 1000 mg L^{-1} de los analitos (TRI, MEP, PRE, DEX) en MeOH grado HPLC.



4.2.3 Selección de los componentes del BGE

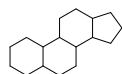
Con base en pruebas preliminares un BGE ($\text{pH}=10.0$, $[\text{B}(\text{OH})_4^-]=40.0 \text{ mM}$) fue seleccionado para la evaluación de los elementos que compondrían al BGE (ion amortiguador de pH, surfactante, sal biliar y ciclodextrina). Dodecilmenceno sulfonato de sodio (4.0 mM), lauril éter sulfato de sodio (3.0 mM) y SDS (10.0 mM) fueron evaluados como surfactantes. α -ciclodextrina, β -ciclodextrina, γ -ciclodextrina fueron evaluadas en una concentración de 10.0 mM . Por otra parte, la influencia de diversas sales biliares en la separación electroforética fue evaluada mediante su adición al BGE (ácido cólico, STC y una mezcla de sales biliares; 60.0 mM).

4.2.4 Optimización de la composición del BGE

Seleccionados los componentes del electrolito (ion amortiguador de pH, SDS, STC y β -CD se procedió a la optimización de cada uno de ellos de forma univariable. La evaluación consiste en mantener fija la concentración de tres componentes y variar la concentración del cuarto componente.

El primer factor evaluado fue el valor de pH de trabajo, para las pruebas se utilizó un electrolito compuesto de la siguiente forma: 15.0 mM (par ácido-base), 5.0 mM SDS, 15.0 mM de STC y 5.0 mM β -CD. Se evaluaron diversos valores de pH (6.0 , 7.0 , 8.0 , 9.0 , 10.0 , 11.0 y 12.0); para amortiguar valores de pH 9.0 y 10.0 se utilizó un electrolito compuesto por iones $\text{B}(\text{OH})_4^-$, mientras que para los valores de pH restantes se empleó una disolución de iones PO_4^{3-} para ajustar su valor. Seleccionado el pH de trabajo y por lo tanto el par ácido-base se procedió a la evaluación de la concentración del mismo: 5.0 , 10.0 , 15.0 , 20.0 , 25.0 y 30.0 mM .

Posterior a la evaluación del electrolito amortiguador de pH se continuó con la evaluación de la concentración de SDS ($0.0, 2.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, 10.0 \text{ mM}$). Establecida la concentración del par ácido-base y SDS se procedió a evaluar la influencia de la concentración de STC ($0.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0, 35.0 \text{ mM}$), para finalizar con la evaluación de la concentración de β -CD ($0.0, 2.0, 4.0, 6.0$ y 8.0 mM). El electrolito que



permite obtener las mejores condiciones de separación de los corticosteroides evaluados se compone de: $[\text{PO}_4^{3-}] = 25.0 \text{ mM}$, $\text{pH} = 7.0$, $[\text{STC}] = 30.0 \text{ mM}$, $[\text{SDS}] = 5.0 \text{ mM}$.

Acorde a los resultados de los experimentos de selección de componentes del BGE, se consideró evaluar la influencia de dos surfactantes iónicos (SLES y SDS) en la separación electroforética de los corticosteroides mediante la optimización de su composición. Para conocer la composición óptima del BGE se aplicó un diseño experimental Taguchi $L_9 (3^4)$. Cuatro factores (pH , $[\text{PO}_4^{3-}]_{\text{mM}}$, $[\text{Surfactante}]_{\text{mM}}$ y $[\text{STC}]_{\text{mM}}$) fueron evaluados en tres niveles (Tabla 12), y el número de platos teóricos (N) fue seleccionado como variable de respuesta. Los resultados obtenidos fueron analizados utilizando el software estadístico Minitab 17.

Las pruebas se realizaron mediante el análisis de una solución que contiene 30.0 mg L^{-1} de los analitos y estándar interno.

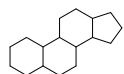
Tabla 12. Factores y niveles evaluados en la optimización de la composición del BGE.

Factor	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
pH	7.0	7.5	8.0
$[\text{PO}_4^{3-}] \text{ mM}$	20.0	25.0	30.0
$[\text{Surfactante}] \text{ mM}^*$	4.0	5.0	6.0
$[\text{STC}] \text{ mM}$	25.0	30.0	35.0

*Surfactante; SDS o SLES.

Para el análisis de formulaciones farmacéuticas fue evaluada la influencia de dos surfactantes iónicos (SLES y SDS) en la separación electroforética de los corticosteroides, para ello se preparó un segundo BGE sustituyendo el SDS por SLES. La optimización del electrolito SLESS-STC se realizó aplicando nuevamente un diseño experimental Taguchi $L_9 (3^4)$, se evaluaron los mismos factores, niveles y variable de salida que en la optimización del electrolito SDS-STC, solo presenta el cambio de surfactante lineal empleado.

Las pruebas se realizaron mediante el análisis de una solución que contiene 30.0 mg L^{-1} de los analitos y estándar interno.



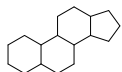
4.2.5 Análisis de muestras

En esta sección se describirá el análisis para muestras de crema cosméticas y formulaciones farmacéuticas.

- Todas las muestras de crema cosmética requieren de un tratamiento previo (desestabilización de la emulsión), para ello se aplicó el protocolo mencionado en la sección 3.2.6; se pesó 500.0 mg de muestra de crema cosmética y se le adicionó una concentración de 30.0 mg kg⁻¹ del estándar interno. A la muestra se le agregó 5.0 mL de ACN, 500.0 mg de Na₂SO₄ y 500.0 mg de NaAcO, la mezcla se agitó en vortex por 5 minutos y se centrifugó por 15 minutos a 3000 r.p.m. Posterior a este tratamiento, la fase líquida se reservó para la siguiente etapa.

La etapa de limpieza de la muestra (extracción-elución) consta de las siguientes etapas: 1) Se tomaron 4.0 mL de la fase líquida (pretratamiento de la muestra) y se evaporaron a sequedad mediante la incorporación de una corriente de aire. 2) Se adicionaron 10.0 mL de agua desionizada al vial para disolver el remanente. 3) La dilución se hizo pasar a través de un cartucho C₁₈ previamente lavado y activado (agua desionizada y MeOH respectivamente). 4) Se lavó nuevamente el cartucho con 5.0 mL de agua desionizada y se eluyeron los analitos con 2.0 mL de ACN. 5) El ACN se evaporó y se reconstituyó la muestra en 2.0 mL de agua desionizada para su análisis electroforético.

- Para las formulaciones farmacéuticas en presentación líquida (soluciones inyectable y oftálmica), se transfirió una alícuota equivalente a 8.0 mg de corticosteroide a un matraz volumétrico de 100.0 mL y se aforó con una mezcla de MeOH:H₂O [36].
- Para las formulaciones en sólido (ungüentos), 1.0 g de la muestra se pesó, se le adicionó 2.0 mL de MeOH y se mezcló. Posteriormente, la muestra se calentó a 40° C y se centrifugó a 3000 r.p.m. La fase sobrenadante se filtró y se aforó a 50.0 mL con MeOH:H₂O (1:1) (Esposito et al., 2020).



4.2.6 Validación de la metodología

➤ Para las cremas cosméticas:

Se construyó la curva de calibrado bajo las condiciones óptimas del BGE, para ello se empleó una muestra de crema cosmética enriquecida con los analitos (50.0-200.0 mg kg⁻¹) y el estándar interno. Se obtuvo la regresión lineal a partir del análisis de la relación entre ([Corticosteroide]/[I.S.]) y (Área pico de corticosteroide/Área pico de I.S.). El LOD y LOQ se evaluaron acorde con los criterios de ICH (ICH, 2022), calculados como $3.3 \sigma/S$ y $10 \sigma/S$ respectivamente, donde σ es la desviación estándar de la respuesta y S es la pendiente de la curva de calibrado.

La precisión fue evaluada en términos de repetibilidad y precisión intermedia en muestras de crema enriquecida con los analitos. Se analizaron tres niveles de concentración de corticosteroides (70.0, 90.0 y 120.0 mg kg⁻¹) por triplicado durante tres días, la concentración se calculó mediante interpolación en la curva de calibrado. Los resultados de repetibilidad y precisión intermedia fueron expresados como %DER, n = 3 y n = 9.

La exactitud fue evaluada mediante ensayos de recuperación de los corticosteroides evaluados en muestras de crema cosmética. Se evaluaron tres niveles de concentración de corticosteroides (80.0, 110.0 y 140.0 mg kg⁻¹) por triplicado.

➤ Para las formulaciones farmacéuticas:

La validación del método se realizó acorde a los lineamientos del ICH (descrito en la validación para cremas cosméticas). La línea de calibrado se construyó a partir de las relaciones de $A_{\text{Corticosteroide}}/A_{\text{IS}}$ en un intervalo de concentraciones de 2.0-10.0 mg L⁻¹. La precisión se evaluó en términos de repetibilidad y reproducibilidad (precisión intermedia) analizando tres niveles de concentración (5.0, 7.0 y 9.0 mg L⁻¹) por triplicado durante tres días. Los resultados se determinaron como %DER. La exactitud fue evaluada mediante la comparación de los resultados del análisis de 5 formulaciones farmacéuticas (Tabla 13) mediante MEKC y HPLC.

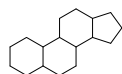


Tabla 13. Descripción de las formulaciones farmacéuticas analizadas.

Muestra	Descripción
1	Solución inyectable con fosfato sódico de dexametasona.
2	Solución oftálmica con acetato de prednisolona.
3	Solución oftálmica con fosfato sódico de dexametasona, neomicina y fenilefrina.
4	Ungüento con acetono de triamcinolona y nistatina.
5	Ungüento con dexametasona y sulfato de tobramicina

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1 Selección de los componentes del BGE

El análisis de corticosteroides mediante MEKC requiere la adición de surfactantes para la formación de las micelas, el SDS es uno de los surfactantes más utilizados en estas metodologías (Jumppanen et al., 1994), se evaluó la influencia de tres surfactantes lineales en el BGE: SDS, SLES, ($[B(OH)_4^-]=40.0$ mM, pH=10.0). Los surfactantes se adicionaron en concentraciones dos unidades superiores a su CMC para garantizar la formación de micelas. La Figura 19 presenta los cromatogramas electrocinéticos resultado de la adición de los tres surfactantes lineales, donde se observa que no existe la separación de ninguna señal de interés con la adición del dodecilsulfonato de sodio y SLES, mientras que la adición de SDS muestra una señal adicional al EOF; por esta razón el SDS fue seleccionado para formar parte del electrolito de separación.

Como resultado de la semejanza estructural que presentan los analitos entre sí, la adición de SDS al BGE no proporciona la separación de todas las señales esperadas, por esta razón fue necesaria la evaluación de otros componentes en el BGE.

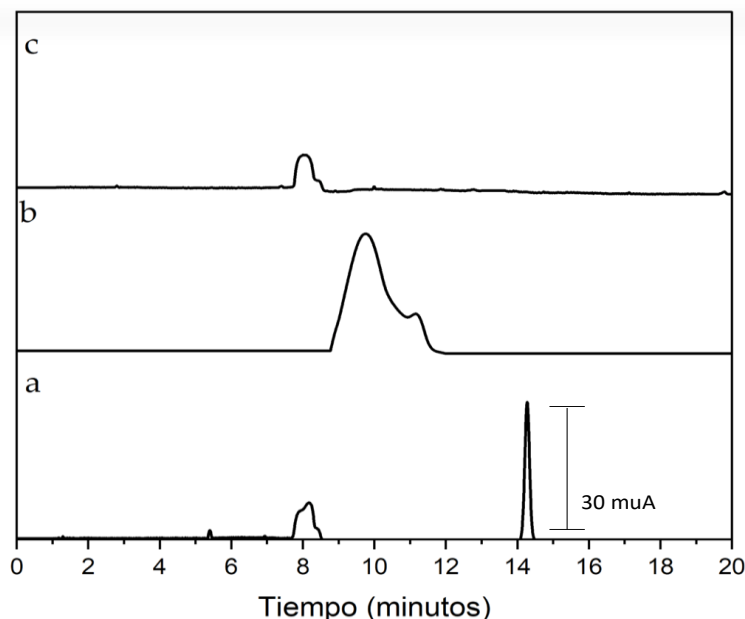
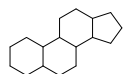


Figura 19. Análisis de una disolución estándar que contiene 30.0 mg L⁻¹ de los analitos (TRI, PRE, DEX) y del estándar interno empleando un electrolito compuesto por [B(OH)₄]⁻=40.0 mM, pH=10.0 y a) SDS 10.0 mM, b) SLES 3.0 mM y c) dodecilbencensulfonato de sodio 4.0 mM.

Las sales biliares, se caracterizan por ser surfactantes aniónicos que presentan diferentes propiedades de agregación y estructura en comparación con el SDS. Su estructura química formada por un esqueleto esteroide de naturaleza lipofílica y baja solubilidad en agua contribuye a la solubilización y separación de compuestos hidrofóbicos (Castillo et al., 2005; Britz-McKibbin et al., 2003). Se evaluó la adición de ácido cólico, STC y una mezcla de sales biliares en una concentración de 60.0 mM al BGE ([B(OH)₄]⁻=40.0 mM, pH=10.0). La Figura 20 muestra la influencia de cada de las sales biliares en la separación de corticosteroides, el STC permite identificar el mayor número de señales en comparación con los otros dos surfactantes, por ello fue seleccionado como componente del BGE. Sin embargo, no fue posible obtener una resolución apropiada en las señales identificadas. Por ello se evaluó la incorporación de un separador quiral; entre los que se han descrito se encuentran las ciclodextrinas (Pieckowski et al., 2022).

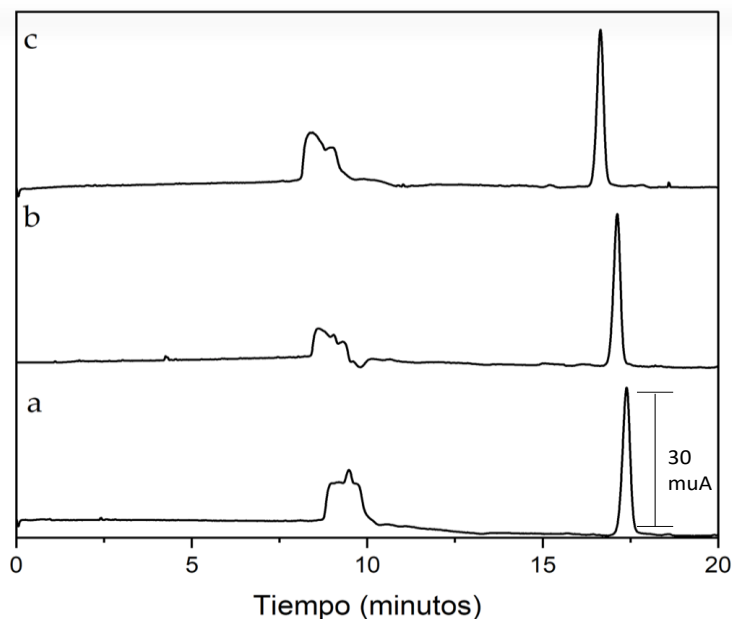
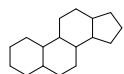


Figura 20. Análisis de una disolución estándar que contiene 30.0 mg L^{-1} de los analitos (TRI, PRE, DEX) y del estándar interno empleando un electrolito compuesto por $[\text{B}(\text{OH})_4^-]=40.0 \text{ mM}$, $\text{pH}=10.0$ y a) ácido cólico, b) STC y c) una mezcla de sales biliares (60.0 mM).

Se evaluó la influencia de tres ciclodextrinas en la separación de corticosteroides, α -, β - y γ -CD fueron incorporadas al BGE ($[\text{B}(\text{OH})_4^-]=40.0 \text{ mM}$, $\text{pH}=10.0$) en una concentración de 10.0 mM . La Figura 21 muestra los cromatogramas electrocinéticos obtenidos de la adición de las ciclodextrinas al electrolito, la β -CD proporciona el perfil electroforético más completo al observarse cuatro señales identificables por ello fue seleccionada como aditivo en el BGE.

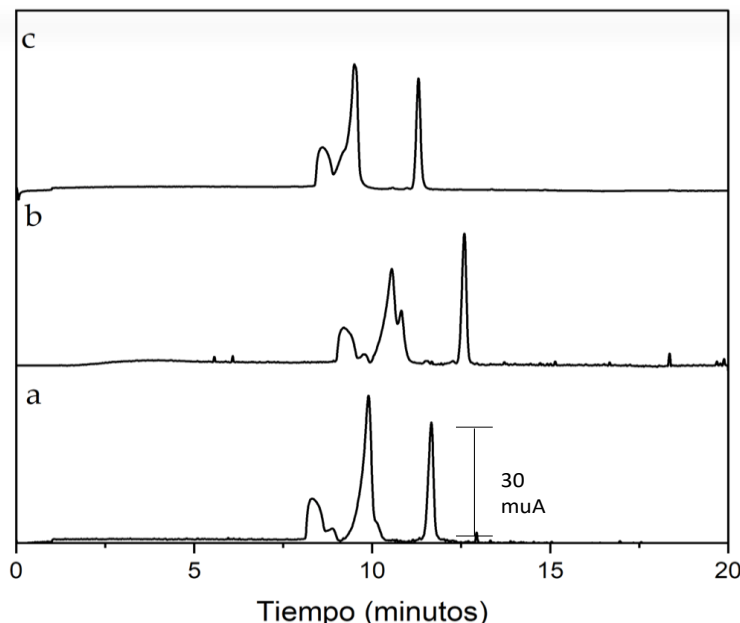
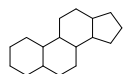
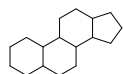


Figura 21. Análisis de una disolución estándar que contiene 30.0 mg L⁻¹ de los analitos (TRI, PRE, DEX) y del estándar interno empleando un electrolito compuesto por [B(OH)⁴⁻]=40.0 mM, pH=10.0 y a) α -ciclodextrina, b) β -ciclodextrina y c) γ -ciclodextrina (10 mM).

4.3.2 Optimización de la composición del BGE

Seleccionados los componentes del BGE (par ácido-base, SDS, STC y β -CD) se optimizó su composición de forma univariable. La evaluación se realizó de la siguiente forma: se mantiene fija la concentración de tres componentes y se varía la concentración del cuarto componente hasta obtener las mejores condiciones de separación. Inicialmente se preparó el siguiente electrolito: 15.0 mM (par ácido-base), 5.0 mM SDS, 15.0 mM de STC y 5.0 mM β -CD.

El primer parámetro evaluado fue el pH de trabajo (6.0-12.0) unidad por unidad, en la Figura 22 se muestran los cromatogramas electrocinéticos obtenidos para 6.0, 7.0, 8.0, 9.0. Cuando se establece un pH=6.0 se observan dos señales identificables de las cuatro deseadas, debido a la baja resolución que presentan las señales bajo estas condiciones junto con los ciclos de activación exhaustivos para evitar la desactivación del capilar, valores de pH inferiores a 6.0 no se evaluaron. Para valores de pH mayores a 7.0 se observa que a mayor valor de pH la resolución de las señales disminuye. También se observó que un aumento del flujo electroosmótico en función del incremento de pH,



provoca baja resolución y traslape de las señales disminuyendo la cantidad de señales identificables. Un pH de trabajo de 7.0 fue seleccionado para continuar con la evaluación del electrolito debido a que bajo estas condiciones se observa la mejor resolución para cuatro señales identificables.

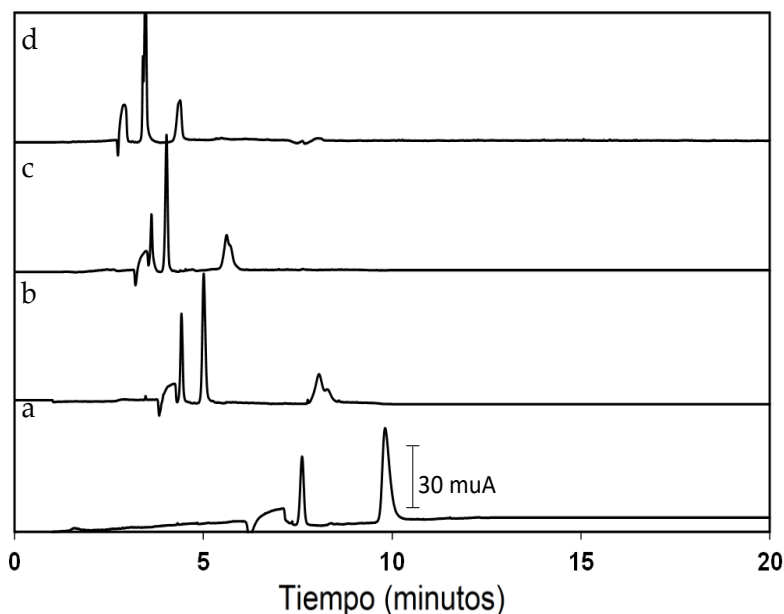


Figura 22. Análisis de una disolución estándar que contiene 30.0 mg L⁻¹ de los analitos (TRI, PRE, DEX) y del estándar interno empleando un electrolito compuesto por 15.0 mM (par acido-base), 5.0 mM SDS, 15.0 mM de STC y 5.0 mM β-CD establecido un valor de: a) pH=6.0, b) pH=7.0, c) pH=8.0 y d) pH=9.0.

Establecido el pH de trabajo se evaluó la [PO₄³⁻] (5.0 a 30.0 mM) en intervalos de 5 unidades empleando el siguiente electrolito: 5.0 mM SDS, 15.0 mM de STC y 5.0 mM β-CD. En la Figura 23 se muestran los cromatogramas electrocinéticos obtenidos para 5.0, 15.0 y 25.0 mM de ion PO₄³⁻. Al incrementar la concentración de PO₄³⁻ existe un aumento en los tiempos de migración que favorece la resolución para las señales de los analitos, esto se atribuye al aumento de la viscosidad del medio al aumentar la concentración de PO₄³⁻. Una concentración de 25.0 mM del ion amortiguador de pH fue seleccionada para proceder con la evaluación de los componentes restantes; bajo estas condiciones se observa la mejor resolución para las señales esperadas.

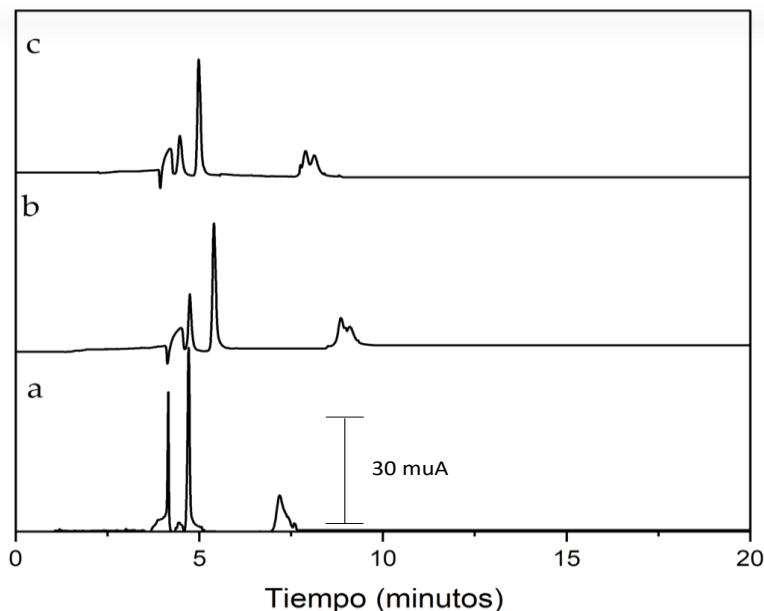
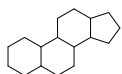


Figura 23. Análisis de una disolución estándar que contiene 30.0 mg L⁻¹ de los analitos (TRI, PRE, DEX) y del estándar interno empleando un electrolito con pH=7.0, 5.0 mM SDS, 15.0 mM de STC, 5.0 mM β-CD y [PO₄³⁻]; a) 5.0 mM, b) 15.0 mM, c) 25.0 mM.

Establecido el pH de trabajo y [PO₄³⁻] se procedió a la evaluación de la concentración de SDS (0.0 a 10 mM) en intervalos de dos unidades (valores inferiores y superiores a su valor de CMC). El análisis se realizó utilizando un electrolito compuesto por 25.0 mM (PO₄³⁻, pH=7.0), STC (15.0 mM) y β-CD (5.0 mM). Los cromatogramas electrocinéticos obtenidos para 0.0, 2.0, 5.0, 8.0 mM de SDS se muestran en la Figura 24, se confirma la necesidad de adicionar SDS al BGE observándose el traslape de las señales obtenidas en ausencia de SDS. Por otra parte, al aumentar [SDS] se comienzan a definir las señales de interés hasta un valor de 5.0 mM y cuando la [SDS] supera estos valores se observa una disminución en los tiempos de migración provocando nuevamente el traslape de las señales de los corticosteroides, por ello 5.0 mM de SDS fue seleccionado para continuar con la evaluación. Una concentración mayor de SDS (>CMC) no es necesaria debido a la contribución del STC en la formación de micelas. Se ha descrito que mientras las sales biliares favorecen la solubilidad de compuestos hidrófobos (corticosteroides), el SDS permite la solubilidad de las micelas formadas en medio acuoso (Maswal y Dar, 2013).

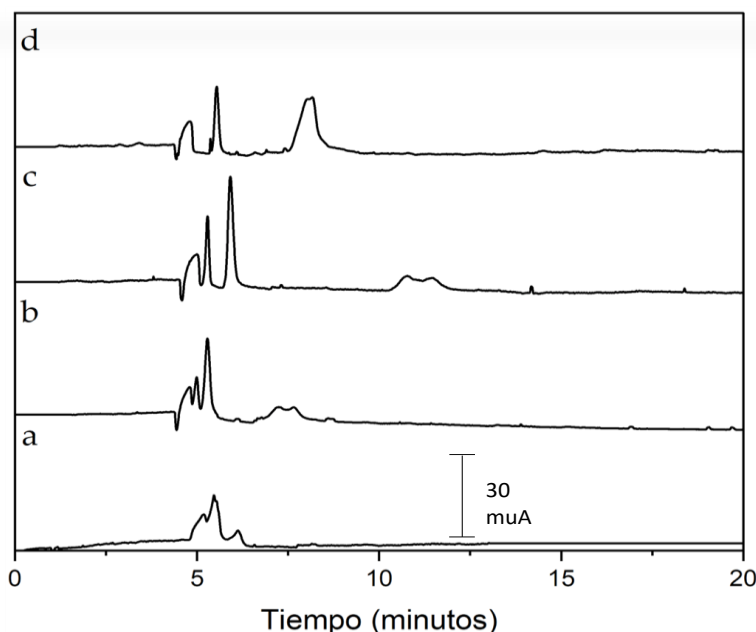
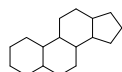


Figura 24. Análisis de una disolución estándar que contiene 30.0 mg L⁻¹ de los analitos (TRI, PRE, DEX) y del estándar interno empleando un electrolito con pH=7.0, PO₄³⁻=25.0 mM, 15.0 mM de STC, 5.0 mM β-CD y SDS; a) 0.0 mM, b) 2.0 mM, c) 5.0 mM y d) 8.0 mM.

El siguiente componente evaluado fue STC (0.0 a 35.0 mM) en intervalos de 5 unidades empleando un electrolito que contiene: [PO₄³⁻]=25.0 mM (pH=7.0), 5.0 mM SDS y 5.0 mM β-CD. La Figura 25 muestra los cromatogramas electrocinéticos obtenidos para 0.0, 10.0, 30.0 y 40.0 mM de STC. El STC es el componente que presenta mayor aporte en la separación electroforética como resultado de la alta solubilidad que presentan los corticosteroides en esta clase de compuestos. Lo anterior se confirma con la Figura 25a, en ausencia de STC no hay interacción de los corticosteroides con el BGE identificándose sólo una señal asociada al EOF. También se observa una relación proporcional entre la resolución y la concentración del STC: al aumentar su concentración hasta 30.0 mM se obtiene la mayor resolución en las señales de interés, por lo que es necesario adicionar el surfactante en una concentración superior a su CMC (12 mM) para asegurar la formación de micelas. Concentraciones superiores a 30.0 mM de STC provoca el traslape de dos señales y aumenta significativamente el tiempo de migración del último analito, lo que se debe a la capacidad del STC para formar agregados en concentraciones elevadas. Este fenómeno disminuye la movilidad electroforética de algunos analitos. 30.0 mM de STC fue la concentración seleccionada para conformar el BGE.

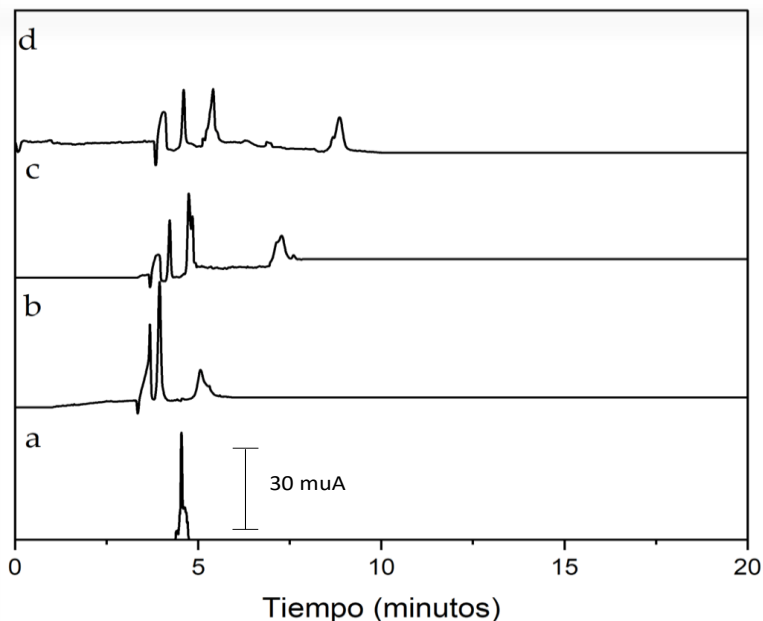
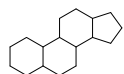


Figura 25. Análisis de una disolución estándar que contiene 30.0 mg L^{-1} de los analitos (TRI, PRE, DEX) y del estándar interno empleando un electrolito con $\text{pH}=7.0$, $25.0 \text{ mM PO}_4^{3-}$, 5.0 mM de SDS, 5.0 mM β -CD y STC; a) 0.0 mM , b) 10.0 mM , c) 30.0 mM y d) 40.0 mM .

El último componente evaluado fue la β -CD (0.0 a 8.0 mM) en intervalos de 2 unidades, se utilizó un electrolito que contiene $[\text{PO}_4^{3-}]=25.0 \text{ mM}$ ($\text{pH}=7.0$), 5.0 mM SDS y 30.0 mM STC. La Figura 26 muestra los cromatogramas electrocinéticos obtenidos para 0.0 , 2.0 , 5.0 y 8.0 mM de STC, la ausencia de este separador quiral en el BGE muestra el cromatograma electrocinético con mayor resolución para los cuatro analitos, por ello se descarta su adición al BGE. El incremento en la concentración STC favorece la formación de las micelas y su interacción con los analitos, por lo tanto la presencia de β -CD es prescindible en el BGE.

Se ha descrito que las CDs son utilizadas como separadores quirales en las metodologías MEKC, por ello fue importante evaluar su incorporación al BGE. Sin embargo, las micelas conformadas por STC y SDS cuentan con las características fisicoquímicas (forma y composición) adecuadas para la separación de los corticosteroides. Al prescindir de la β -CD en el BGE se disminuye el número de reactivos necesarios para la separación electroforética, traduciéndose en menores costos de análisis.

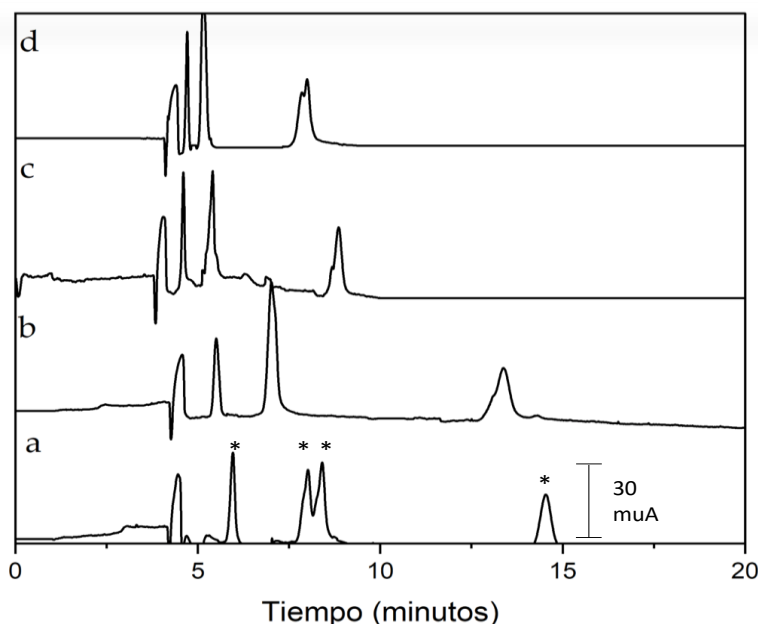
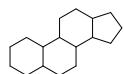
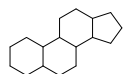


Figura 26. Análisis de una disolución estándar que contiene 30.0 mg L⁻¹ de los analitos (TRI, PRE, DEX) y del estándar interno empleando un electrolito con pH=7.0, [PO₄³⁻]=25.0 mM, 5.0 mM de SDS, 30mM de STC y β-CD; a) 0.0 mM, b) 2.0 mM, c) 5.0 mM y d) 8.0 mM.

Como resultado de la evaluación univariable se estableció que la composición del BGE que permite el perfil electroforético con mayor resolución para las señales deseadas es: [PO₄³⁻]= 25.0 mM, pH=7.0, [STC] 30.0 mM y [SDS]= 5.0 mM. Bajo estas condiciones (concentraciones y composición) se forman micelas cilíndricas cuyo núcleo hidrofóbico interactúa con los corticosteroides favoreciendo el proceso de separación electroforética. Se realizó la identificación de cada una de las señales así como el orden de migración para los analitos.

La evaluación de micelas mixtas en la separación de corticosteroides se realizó a partir de preparación de dos electrolitos de trabajo compuestos de: 1) SDS-STC y 2) SLES-STC. La composición del BGE fue optimizada mediante la aplicación de un diseño experimental Taguchi L₉ (3⁴), el cual permite la evaluación robusta de factores de control con un mínimo de experiencias (Olvera-Ureña et al., 2023), las variables de control que deben ser incluidas son el pH de trabajo, la concentración de ion amortiguador, la concentración de los tensioactivos que afectan la fuerza iónica, la forma química de las especies, la viscosidad del medio y por lo tanto la movilidad electroforética. La separación es evaluada en sistemas de separación empleando como variable de respuesta el



número de platos teóricos (N). El diseño de parámetros de Taguchi ha sido empleado en la evaluación de la composición del electrolito de trabajo y su efecto en la separación para mezclas racémicas (levocabastina, galantamina, mitratapida) donde se evaluaron las variables: pH, concentración del electrolito, el tipo y concentración de aditivos (ciclodextrinas y solventes orgánicos) (Chakraborty y Sarkar, 2004).

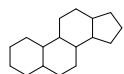
El diseño de experimentos y los resultados obtenidos de cada experiencia se muestran en la Tabla 14. Se puede observar que N es mayor en el caso del electrolito de trabajo compuesto de SLES-STC, no obstante, es posible la separación de los analitos de trabajo en ambas condiciones.

Tabla 14. Matriz ortogonal y su correspondiente N para cada experimento.

Experimento	pH	[PO ₄ ³⁻] _{mM}	[Surfactante] _{mM}	[STC] _{mM}	SDS-STC (N)	SLES-STC (N)
1	7	20	4	25	2346	5337
2	7	25	5	30	1736	6697
3	7	30	6	35	1622	9638
4	7.5	20	5	35	3780	6105
5	7.5	25	6	25	1314	5977
6	7.5	30	4	30	591	6555
7	8	20	6	30	4160	7032
8	8	25	4	35	2531	6961
9	8	30	5	25	2405	6055

A partir del análisis de los resultados del diseño experimental se obtuvo el gráfico de medias para ambos electrolitos (Figura 27), considerando que se desea maximizar la eficiencia en la separación electroforética. Las condiciones que proporcionaron el mayor valor en variable de salida (N) para el electrolito SDS-STC son: [PO₄³⁻] = 20.0 mM, [SDS] = 6.0 mM y [STC] 30.0 mM ajustado a un valor de pH de 8.0, mientras que para el electrolito SLES-STC se requiere establecer un pH de trabajo igual a 7.0, [PO₄³⁻] = 30.0 mM, [SLES] = 6.0 mM y [STC] 35.0 mM.

Ambos electrolitos optimizados permiten la separación de los analitos, no obstante, se muestra una diferencia significativa en el valor de N siendo superior la eficiencia en la separación empleando el electrolito SLES-STC. La diferencia en la magnitud de N está



asociado al surfactante adicionado a cada electrolito; el SLES posee la capacidad de formar partículas de menor tamaño debido a que posee un menor tamaño de micela (3 nm) en comparación con el SDS (6 nm). Al promover la formación de partículas pequeñas, se genera una mayor oposición al flujo electroosmótico incrementando los tiempos de migración, dando como resultado una mejor resolución y definición para las señales de interés (Jimidar et al., 2004).

Por otra parte, la Figura 27 muestra que todas las variables evaluadas son significativas en la separación electroforética, sin embargo, la variable de mayor contribución es distinta para cada uno de los electrolitos evaluados.

Para el electrolito SDS-STC el factor que presenta mayor influencia es $[\text{PO}_4^{3-}]$ con un 39.0% de contribución, esto se atribuye a un aumento en la viscosidad del medio de separación debido al incremento en la concentración del ion PO_4^{3-} . Al incrementar la viscosidad del medio se produce una reducción de la movilidad electroforética incrementando ligeramente los tiempos de migración y en consecuencia mejorar la resolución para las señales asociadas a los corticosteroides (Terabe, 1992). Por otra parte, el electrolito SLES-STC la $[\text{STC}]$ es el factor de mayor contribución para el electrolito (33.5%), al incorporar un surfactante que presenta menor tamaño de micela y menor concentración micelar crítica se requiere adicionar una mayor cantidad de STC para la formación y estabilidad de las micelas mixtas responsables de la partición de los corticosteroides (Maher et al., 2015).

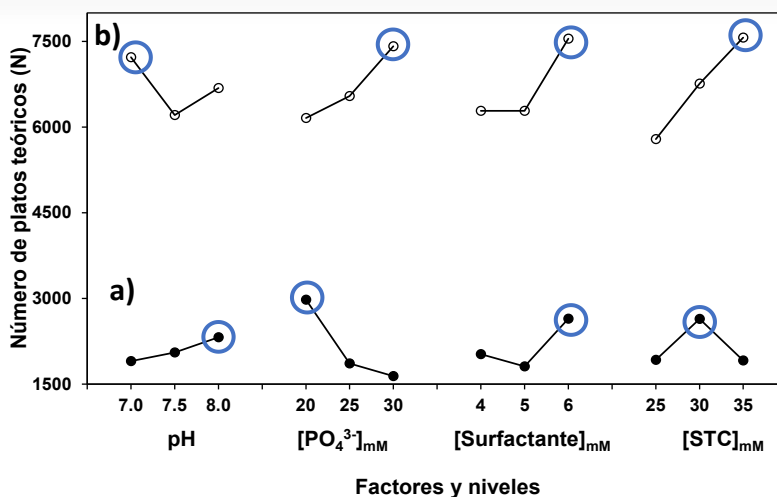
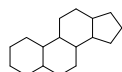


Figura 27. Efecto de los factores de control sobre la variable de salida (N) usando los electrolitos (a) SDS-STC y (b) SLES-STC.

4.3.3 Validación de la metodología y análisis de muestras de cremas cosméticas

➤ Para las muestras de crema cosmética:

Utilizando la composición óptima del electrolito SDS-STC se construyó una curva de calibrado (50.0, 75.0, 100.0, 125.0, 150.0, 175.0 y 200.0 mg kg⁻¹), una muestra de crema cosmética fue tratada acorde con lo descrito en la sección 4.2.5. La Tabla 15 muestra los parámetros analíticos obtenidos según los criterios de la ICH, la metodología propuesta permite obtener LODs en promedio de 0.002% p/p (19.02-22.57 mg kg⁻¹). Estos valores permiten la detección de los analitos debajo de los contenidos de corticosteroides descritos para dosis terapéuticas (0.01 y 1.0% p/p) y los contenidos que han sido determinados en muestras cosméticas adicionados de forma ilegal (0.002 y 0.06% p/p) (Desmedt et al., 2014; Fiori y Andrisano, 2014; Nam et al., 2012).

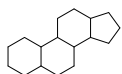


Tabla 15. Parámetros analíticos obtenidos para los corticosteroides a partir del análisis de la curva de calibrado.

Corticosteroide	Coefficiente de determinación	Sensibilidad analítica (mUA·s·kg mg ⁻¹)	Ordenada (mUA·s)	Límite de detección (mg kg ⁻¹)	Límite de cuantificación (mg kg ⁻¹)
Triamcinolona	0.99	0.81 ± 0.59	-0.07 ± 0.09	22.57	68.52
Prednisolona	0.99	1.02 ± 0.43	-0.10 ± 0.14	19.02	57.83
Dexametasona	0.99	0.85 ± 0.11	-0.03 ± 0.04	19.63	59.69

La precisión fue evaluada en términos de repetitividad y precisión intermedia; las concentraciones de corticosteroides se determinaron mediante interpolación a partir de la curva de calibrado previamente construida. Los analitos se adicionaron en tres niveles de concentración (70.0, 90.0 y 120.0 mg kg⁻¹) a una muestra de crema cosmética; los resultados se expresan como DER. La repetitividad se evaluó en condiciones homogéneas por triplicado (n = 3), mientras que la precisión intermedia se evaluó en tres niveles de concentración por triplicado durante tres días, n = 9 (Tabla 16). En todos los casos se obtuvieron valores < 5.0%, los cuales son adecuados para muestras que contienen analitos estudiados en el intervalo de 1.0 a 10.0 mg kg⁻¹ (Escamilla-Lara et al., 2025).

Tabla 16. Concentración de corticosteroides determinada en una muestra de crema cosmética aplicando la metodología propuesta para determinar su precisión (%DER).

[Corticosteroide] adicionada	Repetitividad (%DER n=3)			Precisión Intermedia (%DER, n=9)		
	70.0 (mg kg ⁻¹)	90.0 (mg kg ⁻¹)	120.0 (mg kg ⁻¹)	70.0 (mg kg ⁻¹)	90.0 (mg kg ⁻¹)	120.0 (mg kg ⁻¹)
Triamcinolona	65.2(4.5)	84.2(3.1)	110.2(3.6)	63.9(4.9)	82.4(4.3)	108.9(4.6)
Prednisolona	63.3(4.3)	84.7(3.1)	109.3(3.5)	62.8(4.4)	83.1(3.6)	107.9(3.8)
Dexametasona	65.6(4.4)	83.8(3.0)	109.8(4.2)	64.1(4.9)	82.6(4.2)	108.2(4.5)

La exactitud para la metodología propuesta fue determinada mediante ensayos de recuperación de los 3 analitos (80.0, 110.0 y 140.0 mg kg⁻¹) en muestras de crema cosmética, n=3. Los resultados se expresan en la Tabla 17 como tanto por ciento de recuperación calculado mediante interpolación en la curva de calibrado, en todos los casos se obtuvieron valores superiores al 90.0%.

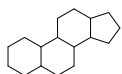


Tabla 17. Ensayos de recuperación de corticosteroides en muestras de crema cosmética enriquecida empleando el método propuesto.

[Corticosteroide] adicionada	Porcentaje de recuperación (%), (%DER, n=3)		
	80.0 mg kg ⁻¹	110.0 mg kg ⁻¹	140.0 mg kg ⁻¹
Triamcinolona	90.1 (4.7)	91.3 (3.8)	90.1 (4.4)
Prednisolona	91.3 (3.6)	92.8 (3.3)	92.5 (3.9)
Dexametasona	90.9 (3.9)	92.7 (4.4)	91.6 (4.7)

Se analizaron un total de 14 muestras de cremas cosméticas empleando la metodología propuesta, la Figura 28 presenta los cromatogramas electrocinéticos obtenidos del análisis de una muestra de crema blanco, una solución estándar de corticosteroides y una muestra enriquecida con los corticosteroides y el estándar interno (60.0 mg kg⁻¹).

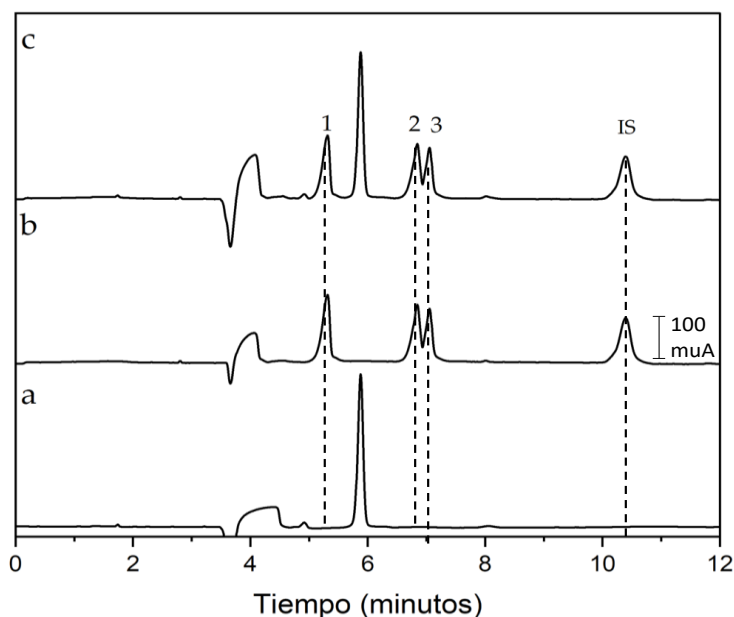
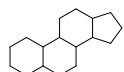


Figura 28. Cromatogramas electrocinéticos obtenidos del análisis de: a) muestra de crema, b) disolución estándar de 60 mg kg⁻¹ de corticosteroides y estándar interno c) muestra enriquecida con 60 mg kg⁻¹ de los analitos. 1; TRI, 2; PRE, 3; DEX y el estándar interno. Voltaje de separación 14 kV, detección a 254 nm.

La metodología propuesta es viable para el análisis de corticosteroides en muestras de cremas cosméticas en función a que cuenta con valores de precisión y exactitud adecuados, permitiendo disminuir la presencia de interferentes en el perfil electroforético.



➤ Para las muestras de formulaciones farmacéuticas:

Empleando la composición del electrolito optimizada para ambos electrolitos (SDS-STC y SLES-STC) se construyó una línea de calibrado ($2.0\text{-}10.0\text{ mg L}^{-1}$). La Tabla 18 muestra los parámetros analíticos obtenidos acorde con los criterios de la ICH. La metodología propuesta permite obtener LODs en el intervalo de 0.95 a 1.13 mg L^{-1} para el electrolito SDS-STC. Por otra parte, el electrolito SLES-STC tiene LODs menores ($0.26\text{-}0.35\text{ mg L}^{-1}$). Ambos BGE permiten la separación y detección de los corticosteroides acorde con los contenidos descritos para dosis terapéuticas ($0.01 - 1.00\%$ p/p).

Tabla 18. Parámetros analíticos obtenidos en el análisis electroforético de corticosteroides empleado los electrolitos SDS-STC y SLES-STC.

Corticosteroide	SDS-STC			SLES-STC		
	TRI	PRE	DEX	TRI	PRE	DEX
Coefficiente de determinación	0.9912	0.9938	0.9934	0.9991	0.9995	0.9994
Sensibilidad Analítica	0.81 ± 0.14	1.01 ± 0.15	0.86 ± 0.13	0.96 ± 0.11	1.25 ± 0.16	0.97 ± 0.13
Ordenada	0.07 ± 0.09	0.10 ± 0.13	0.12 ± 0.15	0.12 ± 0.15	0.10 ± 0.12	0.10 ± 0.11
Límite de detección (LOD, mg L^{-1})	1.13	0.95	0.98	0.35	0.26	0.28
Límite de cuantificación (LOQ, mg L^{-1})	3.43	2.89	2.98	1.05	0.78	0.87
Intervalo lineal (mg L^{-1})	3.43–10.00	2.89–10.00	2.98–10.00	1.05–10.00	0.78–10.00	0.87–10.00

La precisión fue evaluada en términos de repetibilidad y precisión intermedia, la concentración de los corticosteroides fue determinada mediante interpolación en la curva de calibrado construida previamente. Se analizaron los corticosteroides en tres niveles de concentración (5.0 , 7.0 y 9.0 mg L^{-1}), los resultados son expresados en términos de % DER. La repetibilidad fue evaluada en condiciones homogéneas por triplicado ($n=3$), mientras que la precisión intermedia se evaluó en tres niveles de concentración por triplicado durante tres días, $n=9$ (Tabla 19).

La precisión del método mejora como resultado de la obtención de cromatogramas electrocinéticos mejor resueltos y mayormente definidos (electrolito SLES-STC), sin embargo, para ambos electrolitos los valores de % DER obtenidos fueron menores al 5.0% . Los resultados obtenidos son adecuados para muestras que contienen los analitos estudiados en el intervalo de $1.0 - 10.0\text{ mg L}^{-1}$ (Escamilla-Lara et al., 2025).

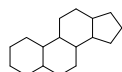


Tabla 19. Concentración de corticosteroides determinada mediante la metodología propuesta para determinar la precisión empleando los electrolitos SDS-STC y SLES-STC.

Repetitividad (%DER, n=3)	TRI¹	PRE¹	DEX¹	TRI²	PRE²	DEX²
5.0 (mg L⁻¹)	4.5	4.3	4.4	3.1	3.8	3.2
7.0 (mg L⁻¹)	3.1	3.1	3	3	3.3	3.1
9.0 (mg L⁻¹)	3.6	3.5	4.2	3.6	3.7	3.2
Precisión Intermedia (%DER n=9)	TRI¹	PRE¹	DEX¹	TRI²	PRE²	DEX²
5.0 (mg L⁻¹)	4.9	4.4	4.9	4.1	4.4	4.2
7.0 (mg L⁻¹)	4.3	3.6	4.2	3.5	3.7	3.6
9.0 (mg L⁻¹)	4.6	3.8	4.5	3.7	3.8	3.7

¹, Análisis con electrolito SDS-STC; ², Análisis con electrolito SLES-STC.

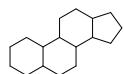
La exactitud para la metodología propuesta fue determinada mediante el análisis de 5 muestras farmacéuticas mediante HPLC y MEKC (empleando ambos electrolitos). Los resultados obtenidos para cada una de las muestras se muestran en la Tabla 20. La concentración determinada se presenta como la media de 3 determinaciones independientes.

Para cada muestra se obtuvo el promedio de las concentraciones del corticosteroide contenido usando ambos métodos y comparándose mediante una prueba estadística t. Los valores de $t_{calculada}$ para el análisis con el electrolito SDS-STC (1.1) y SLES-STC (1.0) fueron comparados con $t_{tabulada}$ (2.8), grados de libertad=4 al 95% de confianza. Este análisis reveló que no hay diferencias significativas entre los resultados provenientes de cada método, por lo tanto la metodología propuesta (MEKC) es exacta y comparable con la metodología establecida (HPLC).

Tabla 20. Contenido de corticosteroide (promedio y %DER, n=3) en formulaciones farmacéuticas determinado mediante la metodología propuesta (MEKC) y HPLC.

Muestra	MEKC (SDS)	MEKC (SLES)	HPLC
1 ^a [DEX]	3672.1 (3.7)	3872.1 (2.3)	3786.8
2 ^a [PRE]	8891.9 (3.8)	9007.9 (1.5)	9174
3 ^a [DEX]	482.5 (3.9)	452.5 (2.1)	448
4 ^b [TRI]	901.5 (3.1)	907.5 (1.8)	918.9
5 ^b [DEX]	931.9 (4.1)	943.9 (0.9)	4952

^a: muestra líquida (unidades de concentración mg L⁻¹); ^b: muestra sólida (unidades de concentración mg kg⁻¹).

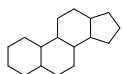


En ambos casos se observan señales adicionales a los compuestos evaluados, las cuales son asociadas a otros componentes presentes en las muestras farmacéuticas, sin embargo, no interfieren con la identificación y cuantificación de las señales asociadas a los corticosteroides garantizando un análisis selectivo y confiable.

La robustez de la metodología propuesta se evaluó calculando el impacto de variaciones menores introducidas deliberadamente en el proceso analítico y su influencia en los resultados. La validación del método consiste en experimentos realizados durante varias semanas, lo que permite la evaluación de variables que se identificaron como factores que podrían afectar la robustez: el tiempo de almacenamiento de las disoluciones estándar de corticosteroides (una semana o un mes) y la composición de la muestra (se analizaron 5 formulaciones farmacéuticas diferentes). La composición de la muestra es un factor relevante en la evaluación del método, ya que cada formulación evaluada contiene diferentes excipientes y fármacos, además de corticosteroides, que pueden interferir en la determinación de los analitos. Sin embargo, las variaciones observadas en las áreas de los picos y los tiempos de migración de los analitos no fueron significativas ($\%DER < 3.0\%$) y, en consecuencia, el procedimiento puede considerarse robusto.

Los cromatogramas electrocinéticos obtenidos para el análisis de muestras farmacéuticas utilizando ambos electrolitos SDS-STC y SLES-STC se presentan en las Figuras 29 y 30, respectivamente. En ambos casos, se observan señales adicionales a los compuestos evaluados, asociadas con otros componentes presentes en las muestras farmacéuticas; sin embargo, no interfieren con la identificación y cuantificación de las señales asociadas con los corticosteroides, lo que garantiza un análisis selectivo y fiable.

Por otro lado, el electrolito SLES-STC es el preferido para el análisis de corticosteroides en muestras farmacéuticas, ya que facilita la obtención de perfiles electroforéticos con mejor resolución de señal y límites de detección más bajos en comparación con los resultados obtenidos con el electrolito SDS-STC. Desafortunadamente, el tiempo de retención del estándar interno es mucho mayor que el de los analitos, lo que prolonga el tiempo de análisis de 11.0 minutos a 18.0 minutos. Además, según la Agencia Danesa de Protección Ambiental, el SLES es un surfactante más respetuoso con el medio ambiente



en comparación con el SDS (Hoeman y Culbertson, 2008); esto es coherente con el principio de la química verde, que describe el uso de solventes y auxiliares más seguros (Anastas y Eghbali, 2010).

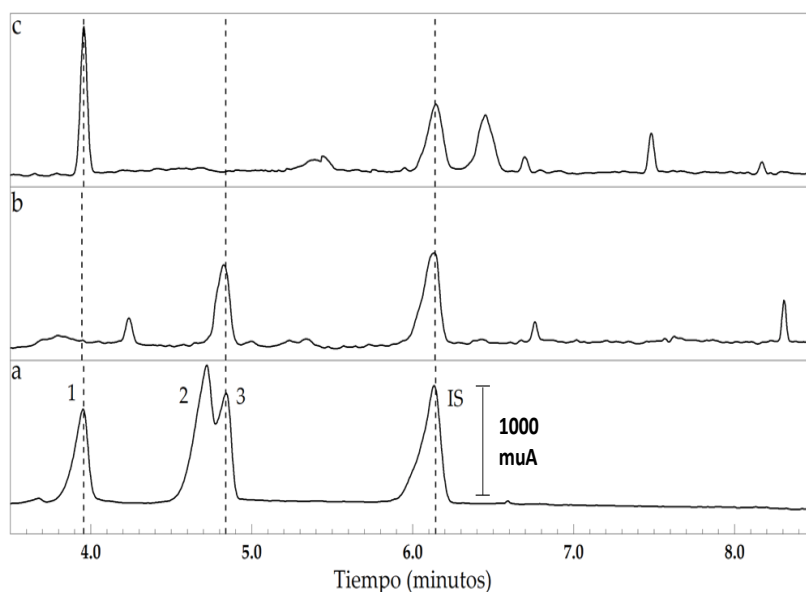


Figura 29. Cromatogramas electrocinéticos obtenidos con el electrolito SDS-STC para el análisis de (a) disolución estándar con 10.0 mg L^{-1} de corticosteroides (1; TRI, 2; PRE y 3; DEX) y estándar interno (metilprednisolona, MEP), (b) muestra número 5 y (c) muestra número 4. Composición de BGE: $[\text{PO}_4^{3-}] = 20.0 \text{ mM}$, $[\text{SDS}] = 6.0 \text{ mM}$, $[\text{STC}] = 30.0 \text{ mM}$ y $\text{pH} = 8.0$, voltaje de separación de 14.0 kV , corriente eléctrica de $100.0 \text{ }\mu\text{A}$, 25°C .

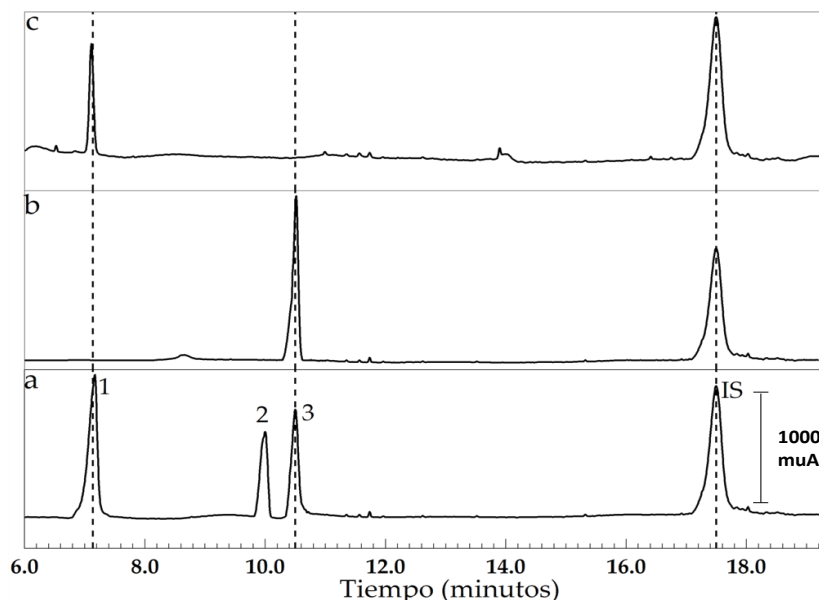
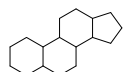


Figura 30. Cromatogramas electrocinéticos obtenidos con el electrolito SLES-STC para el análisis de (a) disolución estándar con 10.0 mg L^{-1} de corticosteroides (1; TRI, 2; PRE y 3; DEX) y estándar interno (metilprednisolona, MEP), (b) muestra número 5 y (c) muestra número 4. Composición de BGE: $[\text{PO}_4^{3-}] = 30.0 \text{ mM}$, $[\text{SDS}] = 6.0 \text{ mM}$, $[\text{STC}] = 35.0 \text{ mM}$ y $\text{pH} = 7.0$, voltaje de separación de 14.0 kV , corriente eléctrica de 100.0 µA , 25°C .

La metodología propuesta en este trabajo resulta viable y sencilla, con un consumo mínimo de disolventes orgánicos y una alternativa económica para el análisis de corticosteroides en muestras farmacéuticas individuales o combinadas. La metodología MEKC se comparó con el método HPLC utilizando el software de medición de química analítica verde (AGREE, Software documentation for the Analytical Greenness Calculator v.0.5). La Figura 31 muestra los 12 principios de la química analítica verde evaluados por el software; la metodología propuesta (MEKC) tiene un impacto ambiental más favorable que el método HPLC, ya que requiere una menor cantidad de muestra, además de reducir el volumen de residuos y eliminar el uso de disolventes organoclorados.

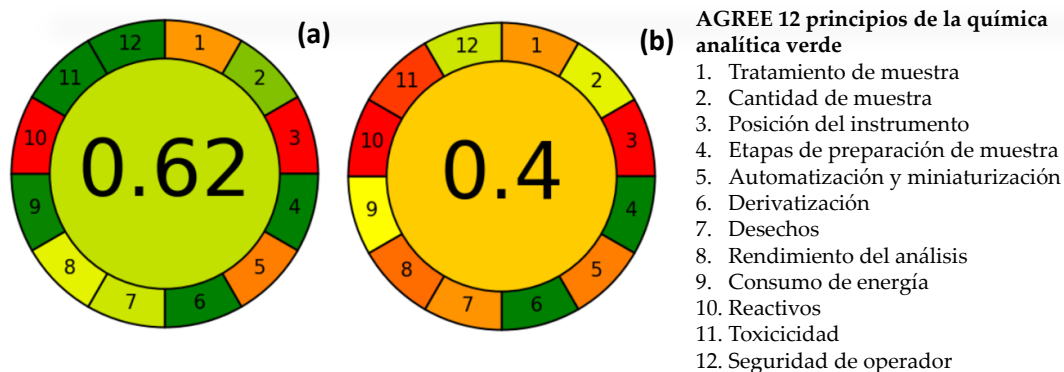
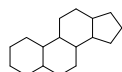


Figura 31. Puntuación de impacto ambiental según el software AGREE (v. 0.5 beta) para (a) la metodología propuesta (MEKC) y (b) el método HPLC (Farmacopea Mexicana, 2014).

Existen pocas metodologías analíticas basadas en MEKC para la determinación de corticosteroides en muestras farmacéuticas; sin embargo, la MEKC desarrollada que utiliza el BGE SLES-STC presenta LODs, precisión y valores de exactitud adecuados para el contenido de ingrediente activo contenido en las muestras de formulación farmacéutica (0.05-1.0 % p/p) (González y Herrador, 2007).

En general, los métodos descritos en la bibliografía consisten en la determinación de un solo corticosteroide (Tabla 21); sin embargo, este trabajo propone una alternativa para analizar tres corticosteroides simultáneamente, donde la matriz de cada muestra no representa una interferencia.

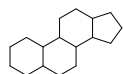
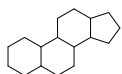


Tabla 21. Comparación entre las metodologías usadas para la determinación de corticosteroides en formulaciones farmacéuticas.

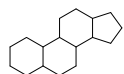
Corticosteroide analizado	Muestra	Composición del electrolito	pH	Voltaje de separación (kV)	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)	REF
Acetato de Prednisolona	Gotas oftálmicas y ungüentos	[PO ₄ ³⁻]= 5.0 mM, [B(OH) ₄ ⁻]= 5.0 mM [SDS]= 40.0 mM	8.2	30.0	0.34	1.21	Lemus y Arroyo, (2003).
Hidrocortisona, hemisuccinato de hidrocortisona y acetato de hidrocortisona	Solución ocular, aerosol y tableta	[PO ₄ ³⁻]= 15.0 mM, [B(OH) ₄ ⁻]= 15.0 mM [SDS]= 60.0 mM MeOH:H ₂ O 10:1 v/v	8.2	25.0	0.12-0.50	0.41-1.60	(Lemus Gallego, y Pérez Arroyo, 2002)
Dexametasona o prednisolona	Solución oftálmica	[B(OH) ₄ ⁻]= 20.0 mM [SDS]= 50.0 mM	10.0	20.0	0.65-0.89	1.99-2.70	(Essam et al., 2020)
Dexametasona, prednisolona y triamcinolona	Solución Inyectable, gotas oftálmicas y ungüentos	[PO ₄ ³⁻]= 30.0 mM, [SLES]= 6.0 mM [STC]= 35.0 mM	7.0	14.0	0.28-0.35	0.78-1.05	Este trabajo



4.4 CONCLUSIONES

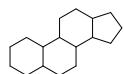
- Se desarrolló una metodología basada en MEKC, que emplea un electrolito de separación compuesto por un electrolito de iones PO_4^{3-} y una fase pseudoestacionaria micelar constituida por una mezcla de surfactantes (SDS-STC), para el análisis de una mezcla de corticosteroides (correlacionados estructuralmente) en muestras de cremas cosméticas.
- La metodología propuesta es simple, robusta y reduce significativamente el uso de disolventes orgánicos en comparación con las técnicas establecidas (HPLC). Además, requiere volúmenes inferiores a 2.0 mL de BGE para el análisis de un gran número de muestras, lo que se traduce en una reducción de reactivos, costos y tiempo requeridos para el análisis de una mezcla de corticosteroides.
- Una metodología basada en MEKC empleando un electrolito de separación compuesto por micelas mixtas (SLES-STC) fue desarrollada para el análisis de una mezcla de corticosteroides en diferentes formulaciones (simples o combinadas) y presentaciones (líquido, suspensión y semisólido) farmacéuticas.
- La metodología requiere un tratamiento de muestra simple requiriendo un mínimo consumo de la misma y disminuye los factores de contaminación o pérdida, cuenta con parámetros analíticos apropiados para su implementación en el control de calidad de la industria farmacéutica.
- La metodología es rápida, simple, amigable con el medio ambiente que disminuye significativamente el gasto de disolventes orgánicos en comparación con las técnicas establecidas (HPLC).

REFERENCIAS

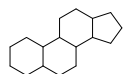


5. REFERENCIAS

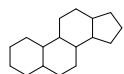
- Abbas, A. A., Shaheed, D. Q. y Bader, Q. A. (2020). Chemical analysis of dexamethasone sodium phosphate in pharmaceutical preparations utilizing the standard addition method. *International Journal of Pharmaceutical Research*, 12(3). doi:10.31838/ijpr/2020.12.03.498.
- Abubaker, M. A., Petersen, J. R. y Bissell, M. G. (1995). Micellar electrokinetic capillary chromatographic separation of steroids in urine by trioctylphosphine oxide and cationic surfactant. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 674(1), 31-38.
- Acedo-Valenzuela, M. I., Galeano-Díaz, T., Mora-Díez, N. y Silva-Rodríguez, A. (2004). Determination of neutral and cationic herbicides in water by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 519(1), 65-71.
- Alvarez-Hernández, E., Vázquez-Mellado, J., Casasola-Vargas, J. C., Moctezuma-Ríos, J. F., García-García, C., Medrano-Ramírez, G. y Burgos-Vargas, R. (2008). The use of glucocorticoids by rheumatologic patients before attending a specialized department in México. *JCR: Journal of Clinical Rheumatology*, 14(3), 148-152.
- Amendola, L., Garribba, F. y Botrè, F. (2003). Determination of endogenous and synthetic glucocorticoids in human urine by gas chromatography-mass spectrometry following microwave-assisted derivatization. *Analytica Chimica Acta*, 489(2), 233-243.
- Anastas, P. y Eghbali, N. (2010). *Green chemistry: principles and practice*. Chemical Society Reviews, 39(1), 301-312.
- Anastassakis, K. (2022). *Androgenetic Alopecia from A to Z* (Vol. 1). Switzerland: Springer.
- Arif, S. y Ata, S. (2020). Stability-indicating HPLC-DAD assay for simultaneous quantification of hydrocortisone 21 acetate, dexamethasone, and fluocinolone acetonide in cosmetics. *Open Chemistry*, 18(1), 962-973.
- Ayad, M. M., Belal, S., Sobhi, M. y Al Kheir, A. A. (1984). Spectrophotometric determination of some corticosteroid drugs through charge-transfer complexation. *Analyst*, 109(11), 1417-1422.
- Aziz-Zanjani, M. O. y Mehdinia, A. (2014). A review on procedures for the preparation of coatings for solid phase microextraction. *Microchimica Acta*, 181(11), 1169-1190.
- Baeck, M., y Goossens, A. (2022). Corticosteroids. In *Cutaneous Drug Hypersensitivity: Clinical Features, Mechanisms, Diagnosis, and Management* (pp. 239-250). Cham: Springer International Publishing.



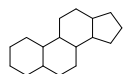
- Balasubramanian, S. y Panigrahi, S. (2011). Solid-phase microextraction (SPME) techniques for quality characterization of food products: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 4(1), 1-26.
- Barker, S. A. (2007). Matrix solid phase dispersion (MSPD). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(2), 151-162.
- Benedek, T. G. (2011). History of the development of corticosteroid therapy. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 29(5 Suppl 68), 5-12.
- Bessonova, E. A., Kartsova, L. A. y Gallyamova, V. F. (2016). Effect of 3-methyl-1-cetylimidazolium chloride ionic liquid on the electrophoretic preconcentration of steroid hormones. *Journal of Analytical Chemistry*, 71(7), 696-702.
- Bowden, J. A., Colosi, D. M., Mora-Montero, D. C., Garrett, T. J., y Yost, R. A. (2009). Enhancement of chemical derivatization of steroids by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). *Journal of Chromatography B*, 877(27), 3237-3242.
- Brazzini, B., y Pimpinelli, N. (2002). New and established topical corticosteroids in dermatology: clinical pharmacology and therapeutic use. *American Journal of Clinical Dermatology*, 3(1), 47-58.
- Breadmore, M. C., Theurillat, R. y Thormann, W. (2004). Determination of ribavirin in human serum and plasma by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 25(10-11), 1615-1622.
- Britz-McKibbin, P., Ichihashi, T., Tsubota, K., Chen, D. D. y Terabe, S. (2003). Complementary on-line preconcentration strategies for steroids by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1013(1-2), 65-76.
- Capela, D., Homem, V., Alves, A. y Santos, L. (2016). Volatile methylsiloxanes in personal care products-using QuEChERS as a "green" analytical approach. *Talanta*, 155, 94-100.
- Caramori, G., Mumby, S., Girbino, G., Chung, K. F., y Adcock, I. M. (2019). Corticosteroids. In Nijkamp and Parnham's *Principles of Immunopharmacology* (pp. 661-688). Cham: Springer International Publishing.
- Casasola, R., Thomas, N. L., Trybala, A. y Georgiadou, S. (2014). Electrospun poly lactic acid (PLA) fibres: Effect of different solvent systems on fibre morphology and diameter. *Polymer*, 55(18), 4728-4737.
- Castillo, M., Revilla, A., López, R., y Rivera, P. (2005). *Fundamentos de Electroforesis Capilar*. Universidad Nacional Autónoma de México, 1ª edición, México. PP 74
- Celeiro, M., Garcia-Jares, C., Llompарт, M. y Lores, M. (2021). Recent advances in sample preparation for cosmetics and personal care products analysis. *Molecules*, 26(16), 4900.



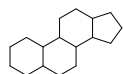
- Chakraborty, H. y Sarkar, M. (2004). Optical spectroscopic and TEM studies of catanionic micelles of CTAB/SDS and their interaction with a NSAID. *Langmuir*, 20(9), 3551-3558.
- Chauhan, C. S., Naruka, P. S., Rathore, R. S. y Badadwal, V. (2010). Formulation and evaluation of Prednisolone tablet for colon targeted drug delivery system. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2(4), 993-998.
- Chen, Y. L. y Wu, S. M. (2005). Capillary zone electrophoresis for simultaneous determination of seven nonsteroidal anti-inflammatory drugs in pharmaceuticals. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381(4), 907-912.
- Chow, P. S., Lim, R. T. Y., Cyriac, F., Shah, J. C., Badruddoza, A. Z. M., Yeoh, T. y Wang, G. (2023). Influence of manufacturing process on the microstructure, stability, and sensorial properties of a topical ointment formulation. *Pharmaceutics*, 15(9), 2219.
- Cirimèle, V., Kintz, P., Dumestre, V., Goullé, J. P., y Ludes, B. (2000). Identification of ten corticosteroids in human hair by liquid chromatography-ionspray mass spectrometry. *Forensic Science International*, 107(1-3), 381-388.
- Courraud, J., Charnay, C., Cristol, J. P., Berger, J. y Avallone, S. (2013). In vitro lipid peroxidation of intestinal bile salt-based nanoemulsions: Potential role of antioxidants. *Free Radical Research*, 47(12), 1076-1087.
- Daud, W. M. A. W. y Houshamnd, A. H. (2010). Textural characteristics, surface chemistry and oxidation of activated carbon. *Journal of Natural Gas Chemistry*, 19(3), 267-279.
- Davenport, A. P. (Ed.). (2008). *Receptor binding techniques* (Vol. 306). Springer Science and Business Media.
- de Freitas, F. P., Carvalho, A. M. M. L., Carneiro, A. D. C. O., de Magalhães, M. A., Xisto, M. F. y Canal, W. D. (2021). Adsorption of neutral red dye by chitosan and activated carbon composite films. *Heliyon*, 7(7).
- de la Guardia, M. y Esteve-Turrillas, F. A. (Eds.). (2019). *Handbook of smart materials in analytical chemistry*. John Wiley and Sons.
- Deceuninck, Y., Bichon, E., Monteau, F., Dervilly-Pinel, G., Antignac, J. P. y Le Bizec, B. (2013). Fast and multiresidue determination of twenty glucocorticoids in bovine milk using ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1294, 76-86.
- Deeb, S. E., Iriban, M. A. y Gust, R. (2011). MEKC as a powerful growing analytical technique. *Electrophoresis*, 32(1), 166-183.



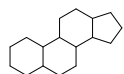
- Desmedt, B., Van Hoeck, E., Rogiers, V., Courselle, P., De Beer, J. O., De Paepe, K., y Deconinck, E. (2014). Characterization of suspected illegal skin whitening cosmetics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 90, 85-91.
- Deventer, K. y Delbeke, F. T. (2003). Validation of a screening method for corticosteroids in doping analysis by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 17(18), 2107-2114.
- Díaz-Bao, M., Barreiro, R., Regal, P., Cepeda, A. y Fente, C. (2012). Evaluation of molecularly imprinted polymers for the simultaneous SPE of six corticosteroids in milk. *Chromatographia*, 75(5), 223-231.
- Dietz, C., Sanz, J. y Cámara, C. (2006). Recent developments in solid-phase microextraction coatings and related techniques. *Journal of Chromatography A*, 1103(2), 183-192.
- Dimpe, K. M. y Nomngongo, P. N. (2019). Application of activated carbon-decorated polyacrylonitrile nanofibers as an adsorbent in dispersive solid-phase extraction of fluoroquinolones from wastewater. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 9(2), 117-126.
- Dong, S., Chi, L., Yang, Z., He, P., Wang, Q. y Fang, Y. (2009). Simultaneous determination of dihydroxybenzene and phenylenediamine positional isomers using capillary zone electrophoresis coupled with amperometric detection. *Journal of Separation Science*, 32(18), 3232-3238.
- Draisci, R., Marchiafava, C., Palleschi, L., Cammarata, P. y Cavalli, S. (2001). Accelerated solvent extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry quantitation of corticosteroid residues in bovine liver. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 753(2), 217-223.
- El-Yazbi, F. A., Korany, M. A., Abdel-Razak, O. y Elsayed, M. A. (1986). Derivative spectrophotometric determination of some corticosteroids in combinations with other drugs. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 69(4), 614-618.
- Ericson-Neilsen, W., y Kaye, A. D. (2014). Steroids: pharmacology, complications, and practice delivery issues. *Ochsner Journal*, 14(2), 203-207.
- Escamilla-Lara, K. A., Ibarra, I. S., Paez-Hernandez, M. E., Gutierrez, E. y Rodriguez, J. A. (2025). Determination of prohibited corticosteroids, dexamethasone, prednisolone and triamcinolone in cosmetic creams by combination of dispersive solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD). *Analytical Letters*, doi.org/10.1080/00032719.2025.2478219.
- Esposito, M. C., Santos, A. L. A., Bonfilio, R. y de Araújo, M. B. (2020). A critical review of analytical methods in pharmaceutical matrices for determination of corticosteroids. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 50(2), 111-124.



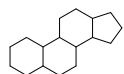
- Essam, H. M., Saad, M. N., Elzanfaly, E. S. y Amer, S. M. (2020). Stepwise optimization and sensitivity improvement of green micellar electrokinetic chromatography method to simultaneously determine some fluoroquinolones and glucocorticoids present in various binary ophthalmic formulations. *Biomedical Chromatography*, 34(11), e4941.
- Ewing, A. G., Wallingford, R. A. y Olefirowicz, T. M. (1989). Capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 61(4), 292A-303A.
- Faraji, M., Yamini, Y. y Gholami, M. (2019). Recent advances and trends in applications of solid-phase extraction techniques in food and environmental analysis. *Chromatographia*, 82(8), 1207-1249.
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos; Undécima edición; Secretaría de Salud, Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Mexico, 2014.
- Fiori, J. y Andrisano, V. (2014). LC-MS method for the simultaneous determination of six glucocorticoids in pharmaceutical formulations and counterfeit cosmetic products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 91, 185-192.
- Flor, S., Lucangioli, S., Contin, M. y Tripodi, V. (2010). Simultaneous determination of nine endogenous steroids in human urine by polymeric-mixed micelle capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 31(19), 3305-3313.
- Fostier, A. H., Pereira, M. D. S. S., Rath, S. y Guimarães, J. R. (2008). Arsenic removal from water employing heterogeneous photocatalysis with TiO₂ immobilized in PET bottles. *Chemosphere*, 72(2), 319-324.
- Gaballa, S. A., Kompella, U. B., Elgarhy, O., Alqahtani, A. M., Pierscionek, B., Alany, R. G. y Abdelkader, H. (2021). Corticosteroids in ophthalmology: drug delivery innovations, pharmacology, clinical applications, and future perspectives. *Drug Delivery and Translational Research*, 11(3), 866-893.
- Gagliardi, L., De Orsi, D., Del Giudice, M. R., Gatta, F., Porrà, R., Chimenti, P. y Tonelli, D. (2002). Development of a tandem thin-layer chromatography-high-performance liquid chromatography method for the identification and determination of corticosteroids in cosmetic products. *Analytica Chimica Acta*, 457(2), 187-198.
- Garidel, P., Hildebrand, A., Knauf, K. y Blume, A. (2007). Membranolytic activity of bile salts: influence of biological membrane properties and composition. *Molecules*, 12(10), 2292-2326.
- Ghorbani, M., Aghamohammadhassan, M., Chamsaz, M., Akhlaghi, H. y Pedramrad, T. (2019). Dispersive solid phase microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 118, 793-809.



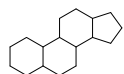
- Giaccone, V., Polizzotto, G., Macaluso, A., Cammilleri, G., y Ferrantelli, V. (2017). Determination of ten corticosteroids in illegal cosmetic products by a simple, rapid, and high-performance LC-MS/MS method. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2017(1), 3531649.
- Gimeno, P., Maggio, A. F., Bancelhon, M., Lassu, N., Gornes, H., Brenier, C. y Lempereur, L. (2016). HPLC-UV method for the identification and screening of hydroquinone, ethers of hydroquinone and corticosteroids possibly used as skin-whitening agents in illicit cosmetic products. *Journal of Chromatographic Science*, 54(3), 343-352.
- Gineys, N., Giroud, B. y Vulliet, E. (2010). Analytical method for the determination of trace levels of steroid hormones and corticosteroids in soil, based on PLE/SPE/LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(6), 2295-2302.
- Goh, S. X. L., Goh, E. X. Y. y Lee, H. K. (2021). Sodium dodecyl sulfate-multi-walled carbon nanotubes-coated-membrane solid phase extraction of glucocorticoids in aqueous matrices. *Talanta*, 221, 121624.
- Gonçalves, R. A., Nagata, N. y Peralta-Zamora, P. G. (2020). Optimization and validation of QuEChERS based method for determination of preservatives in cosmetics by HPLC-DAD. *Química Nova*, 43, 175-180.
- González, A. G. y Herrador, M. Á. (2007). A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26(3), 227-238.
- González-Curbelo, M. Á., Socas-Rodríguez, B., Herrera-Herrera, A. V., González-Sálamo, J., Hernández-Borges, J. y Rodríguez-Delgado, M. Á. (2015). Evolution and applications of the QuEChERS method. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, 169-185.
- González-Sálamo, J., Socas-Rodríguez, B., Hernández-Borges, J. y Rodríguez-Delgado, M. Á. (2017a). Core-shell poly (dopamine) magnetic nanoparticles for the extraction of estrogenic mycotoxins from milk and yogurt prior to LC-MS analysis. *Food chemistry*, 215, 362-368.
- González-Sálamo, J., Socas-Rodríguez, B., Hernández-Borges, J., y Rodríguez-Delgado, M. Á. (2017b). Determination of phthalic acid esters in water samples using core-shell poly (dopamine) magnetic nanoparticles and gas chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1530, 35-44.
- Goodridge, C. F., Beaudry, R. M., Pestka, J. J. y Smith, D. M. (2003). Solid phase microextraction-gas chromatography for quantifying headspace hexanal above freeze-dried chicken myofibrils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(15), 4185-4190.
- Gopalaswamy, R., y Subbian, S. (2021). Corticosteroids for COVID-19 therapy: potential implications on tuberculosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3773.



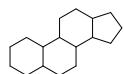
- Görög, S. (2011). Advances in the analysis of steroid hormone drugs in pharmaceuticals and environmental samples (2004-2010). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55(4), 728-743.
- Guerra, E., Alvarez-Rivera, G., Llompart, M. y Garcia-Jares, C. (2018). Simultaneous determination of preservatives and synthetic dyes in cosmetics by single-step vortex extraction and clean-up followed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta*, 188, 251-258.
- Guideline, I.H.T. Validation of analytical procedures Q2 (R1). ICH: (2022). Geneva, Switzerland. Available online: https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q2-R2_Document_Step2_Guideline_2022_0324.pdf (accessed on 17 February 2025).
- Guo, P., Chen, G., Shu, H., Li, P., Yu, P., Chang, C., y Fu, Q. (2019). Monodisperse molecularly imprinted microsphere cartridges coupled with HPLC for selective analysis of dexamethasone and hydrocortisone in cosmetics by using matrix solid-phase dispersion. *Analytical Methods*, 11(29), 3687-3696.
- Gutleben, W., Scherer, K., Tuan, N. D., Stoiber, H., Dierich, M. P. y Zemmann, A. (2003). Separation of 11 protease and reverse transcriptase inhibitors by capillary zone electrophoresis. *Journal of Separation Science*, 26(12-13), 1198-1202.
- Hamoudová, R. y Pospíšilová, M. (2006). Determination of ibuprofen and flurbiprofen in pharmaceuticals by capillary zone electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(4), 1463-1467.
- Harding, T., y Harding, A. (2021). Multiple short courses of corticosteroids in children. *Australian Journal of General Practice*, 50(3), 151-156.
- Hoeman, K. W. y Culbertson, C. T. (2008). A novel, environmentally friendly sodium lauryl ether sulfate-, cocamidopropyl betaine-, cocamide monoethanolamine-containing buffer for MEKC on microfluidic devices. *Electrophoresis*, 29(24), 4900-4905.
- Holda, A. K. y Vankelecom, I. F. (2015). Understanding and guiding the phase inversion process for synthesis of solvent resistant nanofiltration membranes. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(27).
- Holm, R., Müllertz, A. y Mu, H. (2013). Bile salts and their importance for drug absorption. *International Journal of Pharmaceutics*, 453(1), 44-55.
- Huang, Y., Li, Y., Luo, Q. y Huang, X. (2021). One-step preparation of functional groups-rich graphene oxide and carbon nanotubes nanocomposite for efficient magnetic solid phase extraction of glucocorticoids in environmental waters. *Chemical Engineering Journal*, 406, 126785.



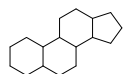
- Islas, G., Ibarra, I. S., Hernandez, P., Miranda, J. M. y Cepeda, A. (2017). Dispersive solid phase extraction for the analysis of veterinary drugs applied to food samples: A review. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2017(1), 8215271.
- Jakubus, A., Godlewska, K., Gromelski, M., Jagiello, K., Puzyn, T., Stepnowski, P. y Paszkiewicz, M. (2019). The possibility to use multi-walled carbon nanotubes as a sorbent for dispersive solid phase extraction of selected pharmaceuticals and their metabolites: effect of extraction condition. *Microchemical Journal*, 146, 1113-1125.
- Jian, H. J., Chiou, Y. R., Anand, A., Chen, C. F., Ma, D. H. K., Lai, J. Y. y Chang, H. T. (2024). Carbon-in-carbon: hybrid carbonized nanomaterials with multifunctional activities for the treatment of endophthalmitis. *Chemical Engineering Journal*, 491, 151997.
- Jiménez-Skrzypek, G., González-Sálamo, J., Varela-Martínez, D. A., González-Curbelo, M. Á. y Hernández-Borges, J. (2020). Analysis of phthalic acid esters in sea water and sea sand using polymer-coated magnetic nanoparticles as extraction sorbent. *Journal of Chromatography A*, 1611, 460620.
- Jimidar, M. I., Van Ael, W., Van Nyen, P., Peeters, M., Redlich, D. y De Smet, M. (2004). A screening strategy for the development of enantiomeric separation methods in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 25(16), 2772-2785.
- Jójárt, B., Poša, M., Fiser, B., Szőri, M., Farkaš, Z. y Viskolcz, B. (2014). Mixed micelles of sodium cholate and sodium dodecylsulphate 1: 1 binary mixture at different temperatures-experimental and theoretical investigations. *Plos One*, 9(7), e102114.
- Jumppanen, J. H., Wiedmer, S. K., Sirén, H., Riekkola, M. L. y Haario, H. (1994). Optimized separation of seven corticosteroids by micellar electrokinetic chromatography. *Electrophoresis*, 15(1), 1267-1272.
- Kakavandi, M. G., Behbahani, M., Omid, F. y Hesam, G. (2017). Application of ultrasonic assisted-dispersive solid phase extraction based on ion-imprinted polymer nanoparticles for preconcentration and trace determination of lead ions in food and water samples. *Food Analytical Methods*, 10(7), 2454-2466.
- Kapugi, M., y Cunningham, K. (2019). Corticosteroids. *Orthopaedic Nursing*, 38(5), 336-339.
- Kartsova, L. A. y Bessonova, E. A. (2007). Determination of steroids in biological samples by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Analytical Chemistry*, 62(1), 68-75.
- Khorrami, A. R., y Rashidpur, A. (2012). Development of a fiber coating based on molecular sol-gel imprinting technology for selective solid-phase micro extraction of caffeine from human serum and determination by gas chromatography/mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 727, 20-25.



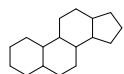
- Khosharay, S., Rahmanzadeh, M. y ZareNezhad, B. (2020). Surface Behavior of Aqueous Solutions of Sodium Lauryl Ether Sulfate, Additives and Their Mixtures: Experimental and Modeling Study. *International Journal of Thermophysics*, 41(12), 166.
- Kim, N. S., Yoo, G. J., Lee, J. H., Park, H. J., Cho, S., Shin, D. W. y Baek, S. Y. (2017). Determination of 43 prohibited glucocorticoids in cosmetic products using a simultaneous LC-MS/MS method. *Analytical Methods*, 9(13), 2104-2115.
- Klinsunthorn, N., Petsom, A. y Nhujak, T. (2011). Determination of steroids adulterated in liquid herbal medicines using QuEChERS sample preparation and high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55(5), 1175-1178.
- Kravchenko, A. V., Kolobova, E. A. y Kartsova, L. A. (2021). Usage of 3-methyl-1- β -cyclodextrinimidazole tosylate for electrophoretic separation and preconcentration of corticosteroids by capillary electrophoresis. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 152(9), 1067-1074.
- Kuo, C. Y. y Wu, S. M. (2005). Micellar electrokinetic chromatography for simultaneous determination of six corticosteroids in commercial pharmaceuticals. *Journal of Separation Science*, 28(2), 144-148.
- Kuo, P. H., Lin, S. L. y Fuh, M. R. (2018a). Poly (lauryl methacrylate-co-1, 6-hexanediol ethoxylate diacrylate) modified silica-based dispersive solid-phase extraction for determination of phenylurea herbicides in environmental water samples. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 98(9), 830-843.
- Kuo, Y. C., Heish, W. Q., Huang, H. Y. y Liu, W. L. (2018b). Application of mesoporous carbon-polymer monolith for the extraction of phenolic acid in food samples. *Journal of Chromatography A*, 1539, 12-18.
- Lalita, C. y Shalini, G. (2020). Creams: A review on classification, preparation methods, evaluation and its applications. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 10, 281-289.
- Lemus Gallego, J. M., y Pérez Arroyo, J. (2002). Micellar electrokinetic capillary chromatography as an alternative method for determination of hydrocortisone and its most important associated compounds in local pharmaceutical preparations. *Chromatographia*, 56(7), 455-462.
- Lemus, J. M. y Arroyo, G. J. (2003). Determination of prednisolone acetate, sulfacetamide and phenylefrine in local pharmaceutical preparations using micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 31, 873-884.
- Li, N., Yang, X., Nian, L., Wang, Z., Lei, L., Wang, K. y Zhang, Z. (2015). Determination of steroid hormones in milk using aqueous two-phase extraction coupled to liquid chromatography. *Analytical Methods*, 7(6), 2514-2522.



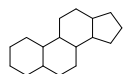
- Liu, D., Ahmet, A., Ward, L., Krishnamoorthy, P., Mandelcorn, E. D., Leigh, R. y Kim, H. (2013). A practical guide to the monitoring and management of the complications of systemic corticosteroid therapy. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*, 9(1), 30.
- Liu, M., Li, X., Li, J., Wu, Z., Wang, F., Liu, L. y Lei, F. (2017). Selective separation and determination of glucocorticoids in cosmetics using dual-template magnetic molecularly imprinted polymers and HPLC. *Journal of Colloid and Interface Science*, 504, 124-133.
- Liu, X., Feng, J., Sun, X., Li, Y., y Duan, G. (2015). Three-layer structure graphene/mesoporous silica composites incorporated with C8-modified interior pore-walls for residue analysis of glucocorticoids in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 884, 61-69.
- Lopez-Tellez, J., Rodriguez, J. A., Miranda, J. M., Mondragon, A. C. e Ibarra, I. S. (2024). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples using recycled polystyrene for pipette tip-solid phase extraction followed by HPLC-FLD. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 104(15), 3486-3495.
- Lü, J., Liu, J., Wei, Y., Jiang, K., Fan, S., Liu, J. y Jiang, G. (2007). Preparation of single-walled carbon nanotube fiber coating for solid-phase microextraction of organochlorine pesticides in lake water and wastewater. *Journal of Separation Science*, 30(13), 2138-2143.
- Lu, W., Liu, J., Li, J., Wang, X., Lv, M., Cui, R. y Chen, L. (2019). Dual-template molecularly imprinted polymers for dispersive solid-phase extraction of fluoroquinolones in water samples coupled with high performance liquid chromatography. *Analyst*, 144(4), 1292-1302.
- Maher, H. M., Alzoman, N. Z., Alshehri, M. M., Aljohar, H. I. y Sultan, M. A. (2015). Microemulsion electrokinetic chromatography with polarity switching stacking mode for the determination of dexamethasone and dexamethasone sodium phosphate: application to pharmacokinetic studies in rabbit plasma. *Analytical Methods*, 7(7), 3260-3267.
- Malik, N. A. (2016). Solubilization and interaction studies of bile salts with surfactants and drugs: a review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 179(2), 179-201.
- Marchesini, A. F., Williner, M. R., Mantovani, V. E., Robles, J. C. y Goicoechea, H. C. (2003). Simultaneous determination of naphazoline, diphenhydramine and phenylephrine in nasal solutions by capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 31(1), 39-46.
- Martín-Pozo, L., del Carmen Gómez-Regalado, M., Moscoso-Ruiz, I. y Zafra-Gómez, A. (2021). Analytical methods for the determination of endocrine disrupting chemicals in cosmetics and personal care products: A review. *Talanta*, 234, 122642.



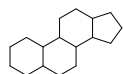
- Maswal, M. y Dar, A. A. (2013). Mixed micelles of sodium cholate and Brij30: Their rheological behaviour and capability towards solubilization and stabilization of rifampicin. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 436, 704-713.
- Matraszek-Zuchowska, I., Wozniak, B. y Posyniak, A. (2017). Determination of hormones residues in milk by gas chromatography-mass spectrometry. *Food Analytical Methods*, 10(3), 727-739.
- Mazurek, S. y Szostak, R. (2006). Quantitative determination of captopril and prednisolone in tablets by FT-Raman spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40(5), 1225-1230.
- McDonald, M., Granelli, K. y Sjöberg, P. (2007). Rapid multi-residue method for the quantitative determination and confirmation of glucocorticosteroids in bovine milk using liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 588(1), 20-25.
- Merkle, S., Kleeberg, K. K. y Fritsche, J. (2015). Recent developments and applications of solid phase microextraction (SPME) in food and environmental analysis-a review. *Chromatography*, 2(3), 293-381.
- Meucci, V., Minunni, M., Vanni, M., Sgorbini, M., Corazza, M. y Intorre, L. (2014). Selective and simultaneous determination of NSAIDs in equine plasma by HPLC with molecularly imprinted solid-phase extraction. *Bioanalysis*, 6(16), 2147-2158.
- Milstein, S. R., Bailey, J. E. y Halper, A. R. (2001). Primera edición, CRC Press. Definition of Cosmetics. In *Handbook of Cosmetic Science and Technology* (pp. 21-34).
- Mohiuddin, A. K. (2019). Skin care creams: formulation and use. *Dermatology Clinics and Research*, 5(1), 238-271.
- Nam, Y. S., Kwon, I. K., Lee, Y. y Lee, K. B. (2012). Quantitative monitoring of corticosteroids in cosmetic products manufactured in Korea using LC-MS/MS. *Forensic Science International*, 220(1-3), e23-e28.
- Natishan, T. K. (2005). Recent progress in the analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 28(7-8), 1115-1160.
- Nebot, C., Iglesias, A., Regal, P., Miranda, J., Cepeda, A. y Fente, C. (2012). Development of a multi-class method for the identification and quantification of residues of antibiotics, coccidiostats and corticosteroids in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *International Dairy Journal*, 22(1), 78-85.
- Niu, J., Zhang, X., Qin, P., Yang, Y., Tian, S., Yang, H. y Lu, M. (2018). Simultaneous determination of melatonin, L-tryptophan, and two L-tryptophan-derived esters in food by HPLC with graphene oxide/SiO₂ nanocomposite as the adsorbent. *Food Analytical Methods*, 11(9), 2438-2446.



- Noe, S., Böhler, J., Keller, E. y Frahm, A. W. (1998). Evaluation and optimisation of separation buffers for the determination of corticosteroids with micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 18(4-5), 911-918.
- Oakley, R., Arents, B. W. M., Lawton, S., Danby, S., y Surber, C. (2021). Topical corticosteroid vehicle composition and implications for clinical practice. *Clinical and Experimental Dermatology*, 46(2), 259-269.
- Ocaña-González, J. A., Villar-Navarro, M., Ramos-Payán, M., Fernández-Torres, R. y Bello-López, M. A. (2015). New developments in the extraction and determination of parabens in cosmetics and environmental samples. A review. *Analytica Chimica Acta*, 858, 1-15.
- Oellig, C. y Schmid, S. (2019). Polyethyleneimine as weak anionic exchanger adsorbent for clean-up in pesticide residue analysis of fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1597, 9-17.
- Olvera-Ureña, E., Lopez-Tellez, J., Vizuetto, M. M., Hidalgo-Ledezma, J. G., Martinez-Quiroz, B. y Rodriguez, J. A. (2023). Lipase-assisted synthesis of alkyl stearates: Optimization by Taguchi design of experiments and application as defoamers. *Molecules*, 29(1), 195.
- Perez-Urquiza, M. y Beltran, J. L. (2000). Determination of dyes in foodstuffs by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 898(2), 271-275.
- Pieckowski, M., Kowalski, P., Olędzka, I., Miękus-Purwin, N., Plenis, A., Roszkowska, A. y Bączek, T. (2022). Simultaneous determination of mitotane, its metabolite, and five steroid hormones in urine samples by capillary electrophoresis using β -CD2SDS1 complexes as hydrophobic compounds solubilizers. *Electrophoresis*, 43(9-10), 990-997.
- Płotka-Wasyłka, J., Marć, M., Szczepańska, N. y Namieśnik, J. (2017). New polymeric materials for solid phase extraction. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 47(5), 373-383.
- Płotka-Wasyłka, J., Szczepańska, N., de la Guardia, M. y Namieśnik, J. (2015). Miniaturized solid-phase extraction techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 73, 19-38.
- Poho, P., Scholz, K., Karkkanen, N., Haapala, M., Raikkonen, H., Kostinen, R. y Vaikkinen, A. (2019). Analysis of steroids in urine by gas chromatography-capillary photoionization-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1598, 175-182.
- Pomponio, R., Gotti, R., Fiori, J. y Cavrini, V. (2005). Microemulsion electrokinetic chromatography of corticosteroids: Effect of surfactants and cyclodextrins on the separation selectivity. *Journal of Chromatography A*, 1081(1), 24-30.
- Poole, C. F. (2003). New trends in solid-phase extraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22(6), 362-373.



- Poša, M. (2023). Self-Association of the Anion of 7-Oxodeoxycholic Acid (Bile Salt): How Secondary Micelles Are Formed. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14), 11853.
- Possi-Pezzali, T., Chigome, S., Rodríguez-Haralambides, A. y Torto, N. (2013). Evaluation of electrospun fibers as solid phase extraction sorbents for sample preparation in HPLC-MS/MS confirmatory doping control analysis of dexamethasone and betamethasone. *Analytical Methods*, 5(16), 4230-4237.
- Pujos, E., Flament-Waton, M. M., Paisse, O. y Grenier-Loustalot, M. F. (2005). Comparison of the analysis of corticosteroids using different techniques. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381(1), 244-254.
- Quintana, M. C., Blanco, M. H., Lacal, J., y Hernández, L. (2001). Analysis of pharmaceutical residues in bovine liver by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 24(5), 735-745.
- Rahmayuni, E., Harmita, H. y Suryadi, H. (2018). Development and validation method for simultaneous analysis of retinoic acid, hydroquinone and corticosteroid in cream formula by high-performance liquid chromatography. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8(9), 087-092.
- Ramette, R. W. 1983. *Equilibrio y análisis químico*. Fondo Educativo Interamericano, E.U.A.
- Ríos-Gómez, J., Lucena, R. y Cárdenas, S. (2017). Paper supported polystyrene membranes for thin film microextraction. *Microchemical Journal*, 133, 90-95.
- Risha, K., Flaherty, J., Wille, R., Buck, W., Morandi, F. e Isemura, T. (2005). Method for trace level analysis of C8, C9, C10, C11, and C13 perfluorocarbon carboxylic acids in water. *Analytical Chemistry*, 77(5), 1503-1508.
- Rizvi, S. A. A., Do, D. P. y Saleh, A. M. (2011). Fundamentals of micellar electrokinetic chromatography (MEKC). *European Journal of Chemistry*, 2(2), 276-281.
- Rodríguez, J. A., Escamilla-Lara, K. A., Guevara-Lara, A., Miranda, J. M. y Páez-Hernández, M. E. (2015). Application of an activated carbon-based support for magnetic solid phase extraction followed by spectrophotometric determination of tartrazine in commercial beverages. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2015(1), 291827.
- Ruiz, F. J., Ripoll, L., Hidalgo, M. y Canals, A. (2019). Dispersive micro solid-phase extraction (D μ SPE) with graphene oxide as adsorbent for sensitive elemental analysis of aqueous samples by laser induced breakdown spectroscopy (LIBS). *Talanta*, 191, 162-170.
- Schriks, M., Van Leerdam, J. A., Van Der Linden, S. C., Van Der Burg, B., Van Wezel, A. P. y De Voogt, P. (2010). High-resolution mass spectrometric identification and quantification of glucocorticoid



compounds in various wastewaters in the Netherlands. *Environmental Science and Technology*, 44(12), 4766-4774.

Ścigalski, P. y Kosobucki, P. (2020). Recent materials developed for dispersive solid phase extraction. *Molecules*, 25(21), 4869.

Serrano, M., Chatzimitakos, T., Gallego, M. y Stalikas, C. D. (2016). 1-Butyl-3-aminopropyl imidazolium-functionalized graphene oxide as a nanoadsorbent for the simultaneous extraction of steroids and β -blockers via dispersive solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1436, 9-18.

Shibasaki, H., Nakayama, H., Furuta, T., Kasuya, Y., Tsuchiya, M., Soejima, A. y Nagasawa, T. (2008). Simultaneous determination of prednisolone, prednisone, cortisol, and cortisone in plasma by GC-MS: estimating unbound prednisolone concentration in patients with nephrotic syndrome during oral prednisolone therapy. *Journal of Chromatography B*, 870(2), 164-169.

Shih, Y. H., Lirio, S., Li, C. K., Liu, W. L. y Huang, H. Y. (2016). Determination of imidazole derivatives by micellar electrokinetic chromatography combined with solid-phase microextraction using activated carbon-polymer monolith as adsorbent. *Journal of Chromatography A*, 1428, 336-345.

Shinozuka, T., Terada, M. y Tanaka, E. (2006). Solid-phase extraction and analysis of 20 antidepressant drugs in human plasma by LC/MS with SSI method. *Forensic Science International*, 162(1-3), 108-112.

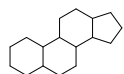
Simms, P. J., Jeffries, C. T., Huang, Y., Zhang, L., Arrhenius, T. y Nadzan, A. M. (2001). Analysis of combinatorial chemistry samples by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 3(5), 427-433.

Sirén, H., Seppänen-Laakso, T. y Orešič, M. (2008). Capillary electrophoresis with UV detection and mass spectrometry in method development for profiling metabolites of steroid hormone metabolism. *Journal of Chromatography B*, 871(2), 375-382.

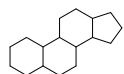
Somsesta, N., Sricharoenchaikul, V. y Aht-Ong, D. (2020). Adsorption removal of methylene blue onto activated carbon/cellulose biocomposite films: Equilibrium and kinetic studies. *Materials chemistry and physics*, 240, 122221.

Stacey, S. K. y McEleney, M. (2021). Topical corticosteroids: choice and application. *American Family Physician*, 103(6), 337-343.

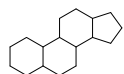
Štajnbaher, D. y Zupančič-Kralj, L. (2003). Multiresidue method for determination of 90 pesticides in fresh fruits and vegetables using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1015(1-2), 185-198.



- Stolker, A. A. M., Schwillens, P. L. W. J., Van Ginkel, L. A. y Brinkman, U. T. (2000). Comparison of different liquid chromatography methods for the determination of corticosteroids in biological matrices. *Journal of Chromatography A*, 893(1), 55-67.
- Stone, S., Malanga, G. A., y Capella, T. (2021). Corticosteroids: review of the history, the effectiveness, and adverse effects in the treatment of joint pain. *Pain Physician*, 24(S1), S233.
- Studzińska, S., y Buszewski, B. (2013). Fast method for the resolution and determination of sex steroids in urine. *Journal of Chromatography B*, 927, 158-163.
- Su, R., Ruan, G., Nie, H., Xie, T., Zheng, Y., Du, F. y Li, J. (2015). Development of high internal phase emulsion polymeric monoliths for highly efficient enrichment of trace polycyclic aromatic hydrocarbons from large-volume water samples. *Journal of Chromatography A*, 1405, 23-31.
- Sun, G., Wang, J., Li, K., Li, Y. y Xie, L. (2012). Polystyrene-based carbon spheres as electrode for electrochemical capacitors. *Electrochimica Acta*, 59, 424-428.
- Svec, F. (2006). Less common applications of monoliths: Preconcentration and solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B*, 841(1-2), 52-64.
- Sversut, R. A., do Amaral, M. S., de Moraes Baroni, A. C., Rodrigues, P. O., Rosa, A. M., Gerlin, M. C. G. y Kassab, N. M. (2014). Stability-indicating HPLC-DAD method for the simultaneous determination of fluoroquinolones and corticosteroids in ophthalmic formulations. *Analytical Methods*, 6(7), 2125-2133.
- Tagliaro, F., Manetto, G., Crivellente, F. y Smith, F. P. (1998). A brief introduction to capillary electrophoresis. *Forensic Science International*, 92(2-3), 75-88.
- Tan, C. H., Huang, Z. J. y Huang, X. G. (2010). Rapid determination of surfactant critical micelle concentration in aqueous solutions using fiber-optic refractive index sensing. *Analytical Biochemistry*, 401(1), 144-147.
- Terabe, S. (1992). Selectivity manipulation in micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 10(10-12), 705-715.
- Terabe, S. (2009). Capillary separation: micellar electrokinetic chromatography. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2(1), 99-120.
- Tong, S., Liu, Q., Li, Y., Zhou, W., Jia, Q. y Duan, T. (2012). Preparation of porous polymer monolithic column incorporated with graphene nanosheets for solid phase microextraction and enrichment of glucocorticoids. *Journal of Chromatography A*, 1253, 22-31.
- Topal, M. B., Saglam, H. K., Ertugrul, M., Tasgin, E. y Nadaroglu, H. (2024). Na-doped ZnO thin film by USP method for amperometric detection of Alura Red (E129) azo dye. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 35(30), 1962.



- Tsai, I. L., Sun, S. W., Liao, H. W., Lin, S. C. y Kuo, C. H. (2009). Rapid analysis of melamine in infant formula by sweeping-micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1216(47), 8296-8303.
- Vela-Soria, F., Iribarne-Durán, L. M., Mustieles, V., Jiménez-Díaz, I., Fernández, M. F. y Olea, N. (2018). QuEChERS and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of parabens and ultraviolet filters in human milk samples. *Journal of Chromatography A*, 1546, 1-9.
- Volmer, D. A., y Hui, J. P. (1997). Rapid determination of corticosteroids in urine by combined solid phase microextraction/liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 11(17), 1926-1934.
- Wang, A., Zhang, L., Zhang, S. y Fang, Y. (2000). Determination of thiols following their separation by CZE with amperometric detection at a carbon electrode. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 23(2-3), 429-436.
- Wang, J., Jiang, L., Chu, Q. y Ye, J. (2010). Residue analysis of melamine in milk products by micellar electrokinetic capillary chromatography with amperometric detection. *Food Chemistry*, 121(1), 215-219.
- Wang, X., Du, Y. y Ma, J. (2016). Novel synthesis of carbon spheres supported nanoscale zero-valent iron for removal of metronidazole. *Applied Surface Science*, 390, 50-59.
- Wang, Y., Tong, Y., Xu, X. y Zhang, L. (2018). Metal-organic framework-derived three-dimensional porous graphitic octahedron carbon cages-encapsulated copper nanoparticles hybrids as highly efficient enrichment material for simultaneous determination of four fluoroquinolones. *Journal of Chromatography A*, 1533, 1-9.
- Wei, A., Muhammad, T., Aihebaier, S., Muhammad, I., Wu, B., Ge, J. y Ayupbek, A. (2020). In-situ preparation of porous monolithic polymer inside hollow fiber as a micro-solid phase extraction device for glucocorticoids in cosmetics. *Journal of Separation Science*, 43(5), 936-945.
- Wells, M. J. (2003). Principles of extraction and the extraction of semivolatile organics from liquids. *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*, 162, 37-138.
- Wilkinson, J. B. y Moore, R. J. (1990). *Cosmetología de Harry*. Ediciones Díaz de Santos. pp 79.
- Williams, D. M. (2018). Clinical pharmacology of corticosteroids. *Respiratory Care*, 63(6), 655-670.
- Wu, R., Tian, M., Shu, C., Zhou, C. y Guan, W. (2022). Determination of the critical micelle concentration of surfactants using fluorescence strategies. *Soft Matter*, 18(47), 8920-8930.
- Wu, Y. W., Jiang, Y. Y., Xiao, T. X. y Zhang, H. L. (2008). Determination of triptonide by cloud point extraction combined with MEKC. *Journal of Separation Science*, 31(5), 865-871.



- Xiao, W., Chen, C., Zhang, Q., Zhang, Q. H., Hu, Y. J., Xia, Z. N. y Yang, F. Q. (2015). Separation study of eight isoflavones by MEKC with different surfactants. *Chromatographia*, 78(21), 1385-1393.
- Xu, X., Ni, X., Cao, Y., Zhuo, X., Yang, X., y Cao, G. (2014). Amphiphilic polymeric micelle as pseudostationary phase in electrokinetic chromatography for analysis of eight corticosteroids in cosmetics. *Electrophoresis*, 35(6), 827-835.
- Yadav, J. P., Lodhi, L., Fatma, T., Dey, K. K. y Ghosh, M. (2022). Investigation of the influence of various functional groups on the dynamics of glucocorticoids. *ACS Omega*, 7(47), 43190-43209.
- Yang, J. B., Ling, L. C., Liu, L., Kang, F. Y., Huang, Z. H. y Wu, H. (2002). Preparation and properties of phenolic resin-based activated carbon spheres with controlled pore size distribution. *Carbon*, 40(6), 911-916.
- Yang, J., Li, S., Jiang, H., Su, C., Shao, Y., Gao, Y. y Li, J. (2019). Preparation of recycled graphite/expanded polystyrene by a facile solvent dissolution method. *Journal of Materials Science*, 54(2), 1197-1204.
- Yu, Y. y Eisenberg, A. (1997). Control of morphology through polymer-solvent interactions in crew-cut aggregates of amphiphilic block copolymers. *Journal of the American Chemical Society*, 119(35), 8383-8384.
- Zander, N. E., Gillan, M. y Sweetser, D. (2016). Recycled PET nanofibers for water filtration applications. *Materials* 9, (4): 247.
- Zhai, Y., Li, N., Lei, L., Yang, X. y Zhang, H. (2014). Dispersive micro-solid-phase extraction of hormones in liquid cosmetics with metal-organic framework. *Analytical Methods*, 6(23), 9435-9445.
- Zhang, K., y Fent, K. (2018). Determination of two progestin metabolites (17 α -hydroxypregnanolone and pregnanediol) and different classes of steroids (androgens, estrogens, corticosteroids, progestins) in rivers and wastewaters by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). *Science of the Total Environment*, 610, 1164-1172.
- Zolfaghari, R., Fakhru'l-Razi, A., Abdullah, L. C., Elnashaie, S. S. y Pendashteh, A. (2016). Demulsification techniques of water-in-oil and oil-in-water emulsions in petroleum industry. *Separation and Purification Technology*, 170, 377-407.
- Żwir-Ferenc, A. y Biziuk, M. (2006). Solid Phase Extraction Technique-Trends, Opportunities and Applications. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(5).