

# Microextração em fase sólida no capilar (*in-tube* SPME) para automação das análises de fármacos em fluidos biológicos



**Maria Eugênia C. Queiroz**

Universidade de São Paulo  
Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto  
14040-901 – Ribeirão Preto (SP)  
Brasil.  
mariaeqn@ffclrp.usp.br

## Resumo

O sistema *in-tube* SPME, desenvolvido em conjunto com a cromatografia líquida, (LC) tem sido utilizado para a automação das análises SPME/LC de solutos menos voláteis e/ou termicamente instáveis. O sistema *in-tube* SPME/LC pode ser montado fixando um capilar de sílica fundida aberto, revestido internamente com a fase extratora (ou uma coluna capilar de cromatografia gasosa), entre a alça de amostragem e a agulha do injetor automático do LC ou, simplesmente, substituindo a alça de amostragem. A técnica *in-tube* SPME/LC, quando comparada à SPME convencional, minimiza o volume da amostra, permite a extração e concentração dos solutos em linha com a separação e detecção cromatográfica, ou seja, automação dos métodos cromatográficos, que resulta em maior precisão analítica e menor tempo de análise. Como as amostras são injetadas no sistema, praticamente em seu estado fisiológico, diminui a exposição dos analistas aos fluidos biológicos. O desenvolvimento de novas fases extratoras *in-tube* SPME, tais como polímeros impressos molecularmente (MIP), monolítica e imunossorvente resultou em maior seletividade/especificidade analítica, C-18/diol, a extração direta dos solutos com exclusão das macromoléculas,  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), formação de complexos de inclusão entre os fármacos e  $\beta$ -CD e (poli)pirrol, alta permeabilidade e interações intermoleculares ácido-base.

### Palavras-chave

Microextração em fase sólida no capilar, fármacos, fluidos biológicos.

## Abstract

The *in-tube* SPME system developed in combination with the liquid chromatography (LC) has been used for the automation of analyses SPME/LC of less volatile and/or thermally unstable solutes. The system *in-tube* SPME/LC can be done by fixing an open silica capillary column, internally coated with the phase stationary (or a capillary column gas chromatography), between the injection loop and injection needle of the LC autosampler, or simply, substituting the injection loop. The technique *in-tube* SPME/LC, when compared with the conventional SPME, minimizes the sample volume, allows automation of the chromatographic methods by means of extraction and concentration of the solutes on-line with separation and chromatographic detection that results in better analytical accuracy and

### Keywords

In-tube solid-phase microextraction; drugs; biological samples.

precision, and short analysis time. As the samples are injected in the system, practically in its physiological state, decreases the exposition of the analysts to biological fluids. The development of new in-tube SPME phases increases the ability and the potential for in-tube SPME. Molecularly imprinted polymer, monolithic and immunoaffinity phases allowed high analytical selectivity/specificity, biocompatible RP-18/diol, the direct extraction of the drugs with exclusion of proteins,  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD), interactions by inclusion complexes between drugs and  $\beta$ -CD, and polypyrrole, high permeability and acid-base intermolecular interactions.

### 1. Processo *In-Tube* SPME/LC<sup>1-18</sup>

O sistema denominado *in-tube* SPME, desenvolvido em conjunto com a cromatografia líquida, (LC) tem sido utilizado para a automação das análises SPME/LC de solutos menos voláteis e/ou termicamente instáveis.

O sistema *in-tube* SPME/LC pode ser montado fixando um capilar de sílica fundida aberto, revestido internamente com a fase extratora (ou uma coluna capilar de cromatografia gasosa), entre a alça de amostragem e a agulha do injetor automático do LC ou, simplesmente, substituindo a alça de amostragem. Como ilustra a figura 1a, uma alíquota da amostra, presente no frasco do injetor automático LC, é aspirada, transportada ao capilar e dispensada novamente no frasco, a vazão constante. Estas etapas são referidas como ciclos *aspirar/dispensar*, as quais são executadas repetitivamente, conforme programa do injetor automático. O mecanismo de extração é baseado na sorção do soluto à fase extratora. Durante o processo de extração, a válvula do injetor LC deverá estar na posição *carregar* (figura 1a). O capilar tem sido condicionado com metanol ou com a fase móvel, antes do processo de extração.

Quando atingido o equilíbrio de sorção, os solutos, pré-concentrados no capilar, são desorvidos rapidamente da fase extratora por meio da percolação da fase móvel (processo dinâmico), ou de solvente orgânico (processo estático), após posicionar a válvula do injetor LC na posição *injetar* (figura 1b). Em razão da espessura do capilar, o processo de desorção é rápido e ausente de efeito de memória.

A desorção estática deverá ser rápida e eficiente, com reduzido volume de solvente orgânico. A capacidade da

coluna e a solubilidade do solvente orgânico na fase móvel deverão ser consideradas. Para um capilar de 60 cm x 0,25 mm di, o processo de desorção tem sido realizado com 40  $\mu$ L de solvente.

Os solutos desorvidos são transportados para a coluna analítica (LC) para separação cromatográfica e posterior detecção. Desta forma, a técnica *in-tube* SPME não necessita de interface especial SPME-LC para desorção dos solutos.

Para evitar o bloqueio do capilar, as amostras com partículas têm sido filtradas em filtros com microporos; já para os fluidos biológicos, as proteínas têm sido removidas por micro filtragem por

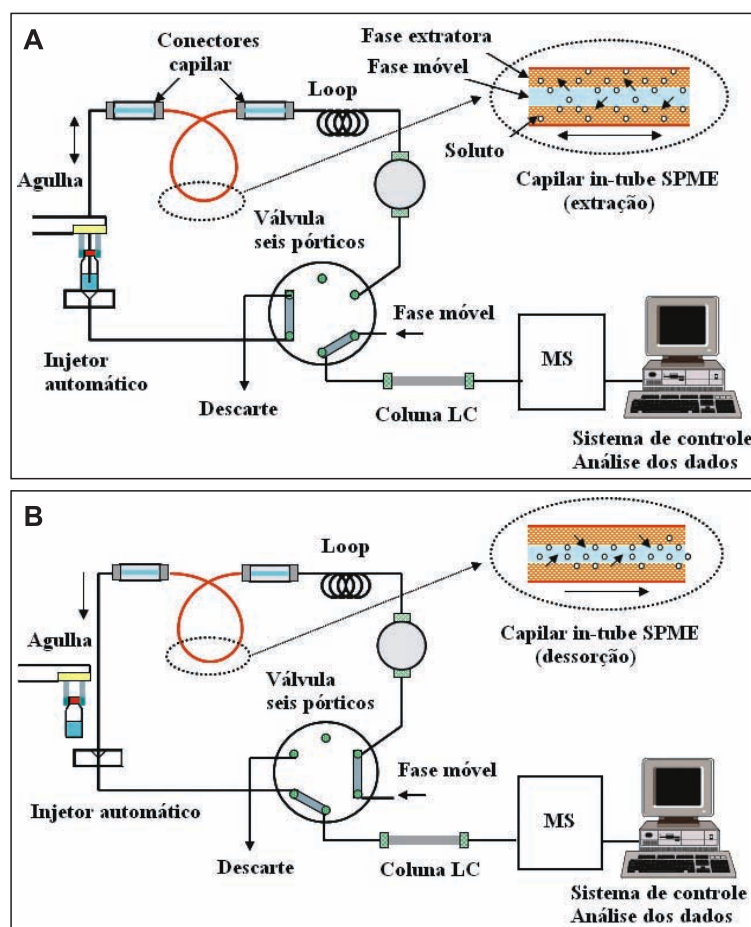


Figura 1. Esquema do processo *in-tube* SPME. (a) extração e (b) desorção.

centrifugação (Microsep<sup>TM</sup>) ou precipitação com alguns  $\mu\text{L}$  de ácidos, sais, acetonitrila ou metanol.

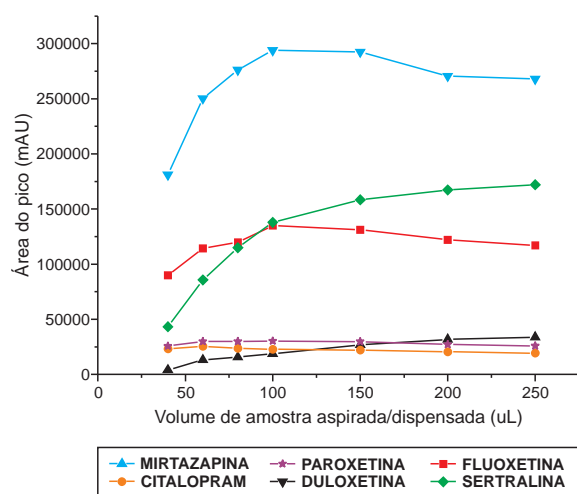
A eficiência da extração SPME tem sido determinada pelo do número de mols do soluto extraído pela fase estacionária do capilar. Para as fases extratoras, nas quais o mecanismo de extração é baseado no processo de absorção, a quantidade de soluto extraído pode ser expressa segundo a Equação 1:

$$n_A = K_A V_f V_s C_A^0 / (K_A V_f + V_s) \quad (\text{eq.1})$$

Onde  $n_A$  representa o número de mols do soluto extraído pela fase extratora, após ter estabelecido o equilíbrio de partição entre as fases.  $V_f$  e  $V_s$ : os volumes da fase extratora do capilar e da amostra, respectivamente.  $C_A^0$ : a concentração inicial de soluto na amostra, e  $K_A$ : o coeficiente de partição do soluto.

## 2. Otimização das variáveis *in-tube* SPME

O aumento da espessura da fase extratora, do diâmetro interno e do comprimento do capilar tem resultado em maiores taxas de extração, no entanto, este procedimento poderá causar picos largos, com cauda ou desorção não quantitativa dos solutos. Nas determinações de antidepressivos não tricíclicos em fluidos biológicos para fins de monitorização terapêutica<sup>16,17</sup> foram utilizados capilares de 70 a 80 cm de comprimento, finos filmes, os quais resultaram



**Figura 2.** Otimização do volume de amostra aspirada/dispensada para as análises *in-tube* SPME de antidepressivos em amostras de plasma. Condições *in-tube* SPME: amostra plasma (0,5 mL) enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL<sup>-1</sup>, diluída com 0,5 mL de solução tampão borato (0,05 mol/L, pH 9,0); 15 ciclos, vazão de 625  $\mu\text{L min}^{-1}$ .

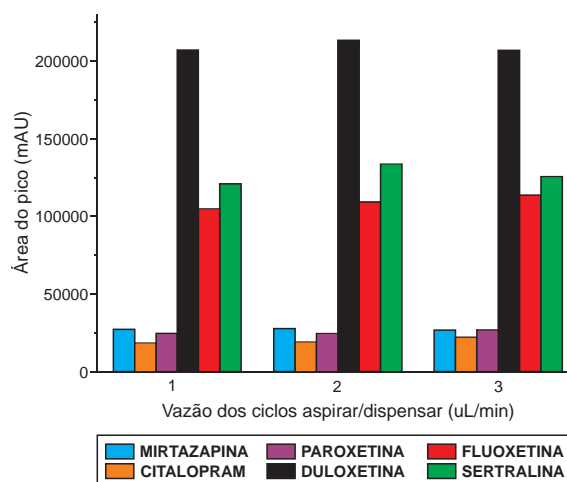
em extrações eficientes, cromatogramas bem definidos e ausência de efeito de memória, após processo de desorção. Nestes ensaios, as taxas de recuperação do processo *in-tube* SPME aumentaram com o crescimento do volume da amostra (figura 2). Os volumes do capilar e da seringa (injetor automático) foram considerados nos experimentos. O volume de amostra selecionado foi de 100  $\mu\text{L}$ , com vazão de 315  $\mu\text{L min}^{-1}$  (figuras 2 e 3). Para valores de vazão inferiores a este intervalo, as extrações apresentaram menor eficácia e aumento do tempo de análise, já para valores superiores, observamos formação de bolhas ao longo do capilar e redução da eficácia da extração.

O tempo requerido para atingir o equilíbrio de partição do soluto entre as fases durante o processo *in-tube* SPME pode ser expresso segundo a Equação 2.

$$t_e = L [1 + K_A \cdot x (V_f/V_v)] / m \quad (\text{eq.2})$$

Onde  $L$  representa o comprimento do capilar,  $K_A$ : coeficiente de partição,  $V_f$ : volume da fase extratora do capilar,  $V_v$ : volume livre do capilar,  $\mu$ : velocidade linear da amostra. Durante as extrações, as variáveis:  $L$ ,  $V_f$ ,  $V_v$  e o valor  $K_A$  são fixos; desta forma, o tempo de extração depende da velocidade linear da amostra.

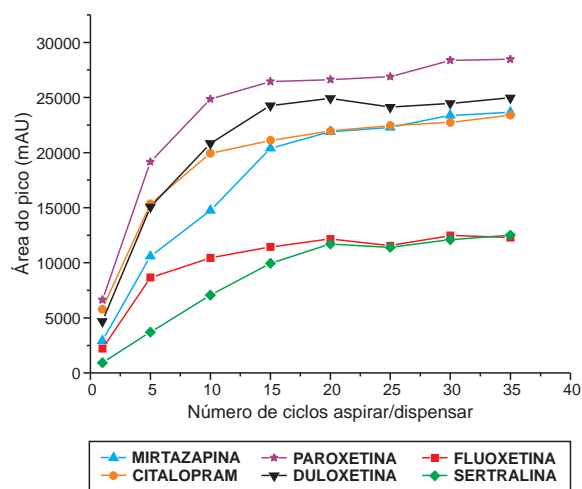
O equilíbrio de sorção entre as fases tem sido atingido rapidamente, em razão da percolação da amostra no capilar (ciclos *aspirar/dispensar*), processo equivalente à agitação na SPME convencional. Para as



**Figura 3.** Otimização da vazão para as análises *in-tube* SPME. Condições *in-tube* SPME: amostra de plasma (0,5 mL) enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL<sup>-1</sup>, diluída com 0,5 mL de solução tampão borato (0,05 mol/L, pH 9,0); 100  $\mu\text{L}$  de amostra foi aspirada/dispensada durante 15 ciclos.

análises de antidepressivos não tricíclicos em amostras de plasma<sup>17</sup>, o equilíbrio de sorção foi alcançado após 15 ciclos (figura 4). O número excessivo de ciclos poderá resultar em dessorção parcial do soluto, durante a etapa dispensar, ou em picos cromatográficos com caudas.

Em condição ideal, a percolação da amostra no capilar por meio dos ciclos *aspirar/dispensar* deverá ser realizada até atingir o equilíbrio de partição dos



**Figura 4.** Otimização do número de ciclos aspirar/dispensar para as análises *in-tube* SPME. Condições *in-tube* SPME: amostra de plasma (0,5 mL) enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL<sup>-1</sup>, diluída com 0,5 mL de solução tampão borato (0,05 mol/L, pH 9,0); 100 µL de amostra foi aspirada/dispensada com vazão de 625 µL min<sup>-1</sup>.

compostos com a fase estacionária. No entanto, quando alta sensibilidade analítica não é requerida, extrações fora do equilíbrio têm sido realizadas com o objetivo de diminuir o tempo de análise.

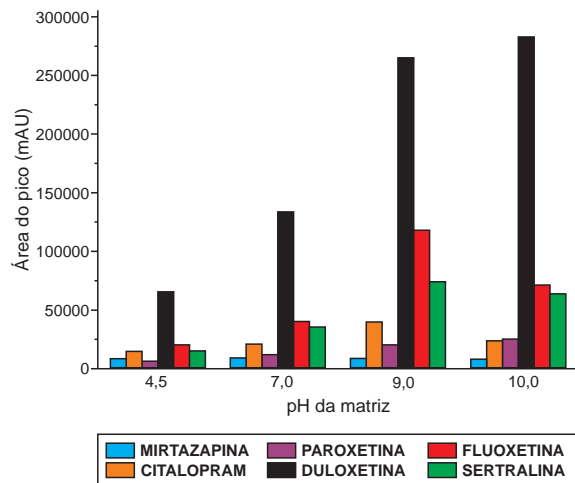
Queiroz *et al.*<sup>17</sup>, na tentativa de aumentar a eficiência da extração *in-tube* SPME com o capilar OV-1701 (14% cianopropilfenil metilpolisiloxano) e/ou diminuir o número de ciclos *aspirar/dispensar*, inseriram uma etapa *aguardar* entre os comandos *aspirar e dispensar* no programa (tabela 1). No entanto, não foi observado aumento significativo nas taxas de extração.

Embora as colunas capilares GC convencionais, com fase líquida quimicamente ligada (entrecruzada), sejam estáveis na presença de água ou solventes orgânicos, elas podem ser facilmente deterioradas na presença de ácidos inorgânicos ou bases fortes. Desta forma, torna-se necessário a avaliação da estabilidade da fase estacionária, quando exposta à fase móvel durante o processo de dessorção. A robustez das fases, OV-1701<sup>17</sup> e imunossorvente<sup>16</sup> foram confirmadas após 100 e 20 extrações, respectivamente, sem variações significativas nas taxas de recuperação.

Como a fase extratora OV-1701 não é trocadora de íons, extrai somente espécies não iônicas presentes na amostra, o pH da amostra de plasma foi ajustado com a adição de solução tampão borato, 0,05 mol L<sup>-1</sup> pH = 9,0<sup>17</sup>. A diluição da amostra com solução tampão resultou na diminuição da viscosidade da matriz biológica, favorecendo a difusão dos solutos na fase extratora (figura 5).

**Tabela 1.** Programa utilizado nas extrações *in-tube* SPME.

AÇÃO	POSIÇÃO	QUANTIDADE	VAZÃO	ALTURA DA AGULHA* / PASSOS
LAVAR AGULHA	—	250 µL (água metanol, 50:50 v/v)	—	—
VÁLVULA INJETOR	CARREGAR	—	—	—
ASPIRAR DE	FRASCO A	200 µL de água	625 µL min <sup>-1</sup>	5 mm
DISPENSAR EM	FRASCO B	200 µL de água	625 µL min <sup>-1</sup>	5 mm
REPETIR	—	2 VEZES	625 µL min <sup>-1</sup>	2 ANTERIORES
ASPIRAR DE	AMOSTRA	100 µL	315 µL min <sup>-1</sup>	5 mm
AGUARDAR	—	2 MINUTOS	—	—
DISPENSAR EM	AMOSTRA	100 µL	315 µL min <sup>-1</sup>	5 mm
REPETIR	—	9 VEZES	—	3 ANTERIORES
ASPIRAR DE	AMOSTRA	100 µL	315 µL min <sup>-1</sup>	5 mm
AGUARDAR	—	2 MINUTOS	—	—
DISPENSAR EM	AMOSTRA	100 µL	315 µL min <sup>-1</sup>	5 mm
REPETIR	—	9 VEZES	—	3 ANTERIORES
VÁLVULA INJETOR	INJETAR	—	—	—
AJUSTAR A SAÍDA	INJETAR	—	—	—



**Figura 5.** Otimização do pH da matriz para as análises *in-tube* SPME. Condições *in-tube* SPME: amostra de plasma (0,5 mL) enriquecida com os antidepressivos na concentração de 500 ng mL<sup>-1</sup>, diluída com 0,5 mL de solução tampão; 100 µL de amostra foi aspirada/dispensada durante 15 ciclos com vazão de 625 µL min<sup>-1</sup>.

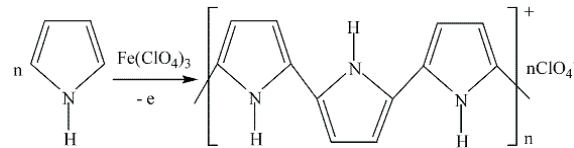
Para evitar a obstrução do capilar, pela deposição dos sais, a adição de sal à amostra de plasma (efeito *salting out*) tem sido pouco avaliada nas análises *in-tube* SPME.

### 3. Fases seletivas e aplicações da técnica *in-tube* SPME/LC para análise de fármacos em fluidos biológicos

Várias colunas capilares GC encontram-se disponíveis no comércio com diferentes fases estacionárias, diâmetros internos, comprimentos e espessuras de filme, as quais podem ser utilizadas como capilar extrator. A seleção da fase extratora (líquidas), como em SPME, baseia-se na regra *similar solubiliza similar*. Por exemplo, em coluna apolar como a fase líquida, polidimetilsiloxano, compostos hidrofóbicos são retidos de forma seletiva; no entanto, os compostos hidrofílicos apresentam maior afinidade com a fase polietileno glicol.

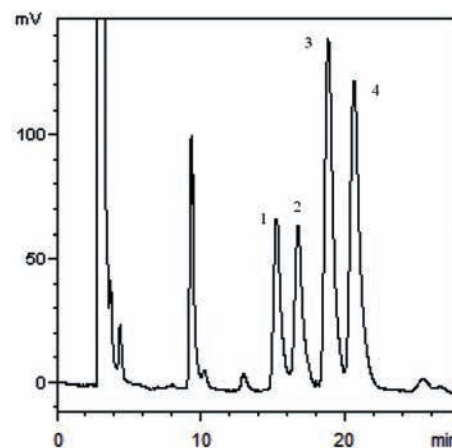
O poli(pirrol) (PPY), em razão de sua permeabilidade (estrutura porosa) e propriedades multifuncionais, que resultam em interações intermoleculares ácido-base, dipolo-dipolo, hidrofóbica,  $\pi$ - $\pi$ , ligação de hidrogênio com os solutos, tem sido avaliado como fase extratora SPME para análises /LC de fármacos em fluidos biológicos<sup>4, 8, 11</sup>.

O filme de (poli)pirrol tem sido polimerizado no interior do capilar de sílica pela passagem da solução do monômero, solução oxidante e N<sub>2</sub>. Durante a polimerização química, a cor do capilar muda gradualmente de amarelo para preto, indicando a formação do filme (revestimento) de PPY, no interior da superfície do capilar (figura 6). Embora, o filme de PPY possa ser facilmente formado pela polimerização química, o revestimento terá firme aderência, somente na superfície de capilar polar.



**Figura 6.** Oxidação química da polimerização do (poli)pirrol.

Queiroz *et al.* têm avaliado o (poli)pirrol nas análises *in-tube* SPME/LC com detecção fluorescente, para separação enantiosseletiva de fluoxetina e norfluoxetina em amostras de plasma (figura 7).



**Figura 7.** Cromatograma *in-tube* SPME/LC com detecção fluorescente (lex: 230 nm e lem: 290 nm) de amostra de plasma enriquecida com os antidepressivos na concentração de 300 ng mL<sup>-1</sup>. 1: S-norfluoxetina, 2: R-norfluoxetina, 3: S-fluoxetina, 4: R-fluoxetina. Coluna: Chiralcel OD-R (250 x 4,6 mm) - Chiralcel Tech®.

O (poli)pirrol, quando comparado às fases convencionais GC, apresentou extrações mais eficientes para as análises de anfetaminas em urina e cabelo<sup>8</sup>, de

$\beta$ -bloqueadores em urina e soro <sup>4</sup> e de verapamil e principais metabólitos em várias matrizes biológicas, como plasma, urina e cultura de célula <sup>11</sup>. O capilar PPY mostrou-se estável nas condições de análise, permitindo a utilização em centenas de determinações.

Pawliszyn *et al.* <sup>7</sup> desenvolveram um capilar de (poli) éter-éter-cetona (PEEK) empacotado com fase de acesso restrito, ou seja, superfície hidrofílica biocompatível (diol, ADS) na parte externa e hidrofóbica (octadecilsilano, C<sub>18</sub>) no interior dos poros da partícula do sorvente. As macromoléculas, tais como as proteínas dos fluidos biológicos, não penetraram nos poros (barreira física) e foram excluídas rapidamente, ao passo que as moléculas hidrofóbicas penetraram nos poros e foram retidas, pelo processo de partição. O material ADS biocompatível permitiu análise direta de benzodiazepínicos em amostras de soro, sem remoção prévia de proteínas.

Os polímeros impressos molecularmente (MIP) foram sintetizados, como sorvente, para análises *in-tube* SPME/LC de propanolol em amostras de soro <sup>7</sup>. Os MIP têm sido obtidos por polimerização na presença de uma molécula molde a ser impressa, ou seja, esqueleto polimérico formado ao redor do soluto, ou de uma molécula com estrutura análoga. Após a polimerização, a molécula impressa é removida por dissolução ou evaporação (quando são solutos voláteis), revelando sítios de ligação, ou seja, cavidades sintéticas equivalentes em forma e tamanho do analito. Em razão da *memória* molecular do polímero, o método *in-tube* SPME/LC padronizado apresentou alta seletividade e em limites de detecção de 0,32  $\mu\text{g/mL}$ , com detecção LC-UV. O capilar MIP foi utilizado em mais de 500 extrações, sem perda significativa da eficiência, demonstrando excelente robustez, estabilidade mecânica e química <sup>7</sup>.

As ciclodextrinas possuem em sua estrutura grupos hidroxila primários e secundários orientados para o exterior. Assim, possuem exterior hidrofílico e uma cavidade interna hidrofóbica. Tal cavidade permite às ciclodextrinas complexarem moléculas que apresentem dimensões compatíveis.

O capilar  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), preparado pela técnica sol-gel, foi utilizado para análises *in-tube* SPME/LC de anti-inflamatórios em urina, pelo reconhecimento molecular, ou seja, formação de complexos de inclusão entre os fármacos e  $\beta$ -CD. A robustez do capilar  $\beta$ -CD foi confirmada após 250 extrações, sem perda significativa da eficiência das extrações.

As fases monolíticas possuem estrutura sólida e altamente porosa, de micro (< 2 nm) ou mesoporosos (2 a 50 nm) e canais relativamente grandes (2  $\mu\text{m}$ ), que favorecem altas permeabilidade e retenção.

Yi Fan *et al.* <sup>12</sup> sintetizaram cilindros monolíticos poliméricos orgânicos, polimerização *in situ* no capilar de sílica fundida de ácido metacrílico-dimetacrilato de etilenoglicol por meio do aquecimento de uma mistura de monômero, agente de entrecruzamento, um iniciador e agentes porogênicos. A funcionalização da fase monolítica, pela incorporação de moléculas hidrofóbicas e de grupos ácidos, favoreceu a extração de fármacos básicos em amostras de soro, resultando em limites de detecção (detecção UV) de 6,5 a 12,8  $\text{ng mL}^{-1}$ . O aumento da eficiência das extrações permitiu a utilização de capilares com menor comprimento, 20 cm.

Queiroz *et al.* <sup>16</sup> avaliaram a especificidade das interações antígeno-anticorpo nas análises *in-tube* SPME/LC-MS de fluoxetina em amostras de plasma, com capilar imunosorvente com anticorpos antifuoxetina imobilizados. Os anticorpos antifuoxetina foram obtidos por meio de imunizações em coelhos. Os compostos de baixa massa molar, não são capazes de obter ou iniciar uma resposta imune. Em razão deste fato, antes da imunização, as moléculas de fluoxetina foram modificadas pelas ligações às moléculas de albumina de soro bovino. O imunosoro policlonal resultante, mistura complexa de anticorpos distintos, gerados por diferentes clones de células, foi purificado em coluna DEAE-Sefarose.

Para a imobilização dos anticorpos junto à superfície interna do capilar de sílica fundida, esta foi inicialmente ativada com (amino)propil trietoxissilano (APTES), resultando em grupos de aminas primárias. O reagente glutaraldeído, em sequência, foi utilizado para modificar esta superfície, permitindo a ligação das moléculas dos anticorpos, pelas reações entre o grupo amina da proteína e o grupo aldeído da superfície (figura 8).

A fase imunosorvente apresentou reatividade para fluoxetina e seu metabólito norfluoxetina, no entanto, com o aumento da concentração deste fármaco em amostras de soro na faixa de concentração de 100 a 500  $\text{ng/mL}$ , não foi observado aumento linear na massa extraída. Desta forma, o método "*in-tube*" SPME/LC-MS é capaz de identificar a presença de norfluoxetina, permitindo a análise qualitativa em amostras de soro, mas não apresenta resposta linear para as análises quantitativas.

A extração imunosorvente é baseada no processo de adsorção. As fases extratoras, nas quais o processo de adsorção é predominante, têm sido caracterizadas pelas isotérmicas de adsorção (massa extraída *versus* concentração adicionada nas amostras), com faixa não linear próxima a máxima capacidade do sorvente. As isotérmicas de adsorção têm apresentado faixa linear para baixas concentrações e platô de saturação em concentrações que excedem a concentração de saturação crítica. O método *in-tube* SPME-LC/MS para as determinações

de fluoxetina em amostras de soro apresentou linearidade na faixa de 5 a 50 ng mL<sup>-1</sup>.<sup>16</sup>

A estabilidade da fase imunosorvente foi avaliada após duas semanas de armazenamento do capilar em solução tampão fosfato e 0.05% de azida sódica. Não foi observada mudança significativa nos resultados, quando comparados aos obtidos com o capilar recentemente desenvolvido.<sup>16</sup>

Algumas aplicações da técnica *in-tube* SPME, para análise de fármacos em fluidos biológicos, são ilustradas na tabela 2.

**Tabela 2.** Aplicações da técnica *in-tube* SPME na análise de fármacos em fluidos biológicos.

Fármacos (matriz)	Ciclos, volume e vazão	Capilar	Deteção (LD)	Referências
Ranitidina (urina)	10 ciclos - 30 µL 100 µL min <sup>-1</sup>	Omegawax 250	LC-UV (1,4 ng mL <sup>-1</sup> )	Kataoka <i>et al.</i> 1999 <sup>2</sup>
Antidepressivos (urina)	80 µL min <sup>-1</sup> t = 10 min	DB-1	µLC-UV (5 ng mL <sup>-1</sup> )	Saito <i>et al.</i> 2000 <sup>3</sup>
β-bloqueadores (urina, soro)	15 ciclos - 30 µL 100 µL min <sup>-1</sup>	Polipirrol	LC-MS (0,1 ng mL <sup>-1</sup> )	Wu <i>et al.</i> 2000 <sup>4</sup>
Anfetaminas (urina)	15 ciclos - 30 µL 100 µL min <sup>-1</sup>	Omegawax 250	LC-MS (0,3-0,8 ng mL <sup>-1</sup> )	Kataoka <i>et al.</i> 2000 <sup>5</sup>
Benzodiazepínicos (soro, urina)	10 ciclos - 30 µL 0,3 mL min <sup>-1</sup>	Supelco-Q PLOT	LC-MS (0,02-2,0 ng mL <sup>-1</sup> )	Yuan <i>et al.</i> 2000 <sup>6</sup>
Propranolol (soro)	10 ciclos - 45 µL 50 µL min <sup>-1</sup>	MIP	LC-UV (0,3 µg mL <sup>-1</sup> )	Mullett <i>et al.</i> 2001 <sup>7</sup>
Anfetaminas (urina, cabelo)	10 ciclos - 40 µL 100 µL min <sup>-1</sup>	Polipirrol	LC-MS (8-56 ng L <sup>-1</sup> )	Wu <i>et al.</i> 2001 <sup>8</sup>
Antidepressivos (urina)	80 µL min <sup>-1</sup>	DB-5	CE-UV (44-153 ng mL <sup>-1</sup> )	Jinno <i>et al.</i> 2001 <sup>9</sup>
Benzodiazepínicos (soro)	4 ciclos - 20 µL 20 µL min <sup>-1</sup>	RAM / ADS	LC-UV (24 - 26 ng mL <sup>-1</sup> )	Mullett <i>et al.</i> 2002 <sup>10</sup>
Verapamil e metabólitos (plasma, urina)	40 ciclos - 30 µL 100 µL min <sup>-1</sup>	Polipirrol	LC-MS (5-8 ng mL <sup>-1</sup> )	Walles <i>et al.</i> 2002 <sup>11</sup>
Teobromina, teofilina e cafeína (urina)	4-6 min - 1 µg mL <sup>-1</sup> (amostra) 0,04 mL min <sup>-1</sup>	Poli (MAA-EGDMA)	LC-UV (6,6-12 ng mL <sup>-1</sup> )	Fan <i>et al.</i> 2004 <sup>12</sup>
Anti-inflamatórios (urina)	50 s - 250 µL (amostra) 300 µL min <sup>-1</sup>	β-ciclodextrina	LC-UV (18-38 ng mL <sup>-1</sup> )	Wang <i>et al.</i> 2005 <sup>13</sup>
Propranolol enantiômeros (urina)	0,04 mL min <sup>-1</sup>	β-ciclodextrina	CEC-UV (4-7 ng mL <sup>-1</sup> )	Feng <i>et al.</i> 2007 <sup>14</sup>
Cortisol (saliva)	20 ciclos - 40 µL (amostra) 150 µL min <sup>-1</sup>	Supelco Q PLOT	LC-MS (5 pg mL <sup>-1</sup> )	Kataoka <i>et al.</i> 2007 <sup>15</sup>
Fluoxetina (soro)	15 ciclos - 100 µL (amostra) 315 µL min <sup>-1</sup>	Imunosorvente	LC-MS (5 ng mL <sup>-1</sup> )	Queiroz <i>et al.</i> 2008 <sup>16</sup>
Antidepressivos não tricíclicos (plasma)	2 ciclos - 50 µL (amostra) 400 µL min <sup>-1</sup>	OV-1701	LC-UV (20 a 50 ng mL <sup>-1</sup> )	Queiroz <i>et al.</i> 2008 <sup>17</sup>
Nicotina, cotinina, normicotina, anabasina e anatabina (urina e saliva)	25 ciclos - 40 µL (amostra) 150 µL min <sup>-1</sup>	CP-Pora PLOT amina	LC-MS (15-40 pg mL <sup>-1</sup> )	Saito <i>et al.</i> 2009 <sup>18</sup>

LD: limite de detecção, LC-UV: cromatografia líquida com detector ultravioleta, MIP: polímero molecularmente impresso, µLC:micro LC, LC-MS: cromatografia líquida com detector de espectrometria de massas, RAM/ADS: material de acesso restrito / aquil diol sílica. MAA-EGDMA: ácido metacrílico-dimetacrilato de etilenoglicol, β-bloqueadores: nadolol, pindolol, acebutolol, timolol, metoprolol, oxprenolol, labetalol, propranolol, alprenolol. Benzodiazepínicos: clonazepam, axazepam, temazepam, nordazepam, diazepam. Antidepressivos: desipramina, nortriptilina, imipramina e amitriptilina, anti-inflamatórios: cetoprofen, fenbufem e ibuprofen; Antidepressivos não tricíclicos: mirtazapina, citalopram, paroxetina, duloxetina, fluoxetina e sertralina; .OV1701: 14% cianopropil fenil metil polisiloxano.

#### 4. Conclusões

O sistema *in-tube* SPME/LC pode ser facilmente montado, fixando-se o capilar de sílica fundida revestido internamente com a fase extratora entre a alça de amostragem e a agulha do injetor automático do LC ou, simplesmente, substituindo a alça de amostragem.

As variáveis (volume da amostra, número de ciclos aspirar/dispensar, vazão da amostra e pH da amostra) deverão ser otimizadas, para que as extrações *in-tube* SPME ocorram em condições correspondentes ao equilíbrio de sorção.

A técnica *in-tube* SPME/LC, quando comparada à SPME, além de minimizar o volume da amostra, permite a extração e concentração dos solutos em linha com a separação e detecção cromatográfica, ou seja, automação dos métodos cromatográficos, resultando em maior precisão analítica e menor tempo de análise. Como as amostras são injetadas no sistema, praticamente em seu estado fisiológico, diminui a exposição dos analistas aos fluidos biológicos.

Considerando o processo de dessorção, a técnica SPME, com dessorção em fase líquida (*off-line*) é bem simples e pouco dispendiosa, no entanto, não é possível injetar 100% do soluto dessorvido, já a técnica *in-tube* SPME, além de minimizar perdas do soluto, durante o processo de extração, todo o soluto extraído é introduzido no sistema analítico, aumentando a sensibilidade analítica.

O desenvolvimento de novas fases extratoras *in-tube* SPME, tais como MIP, monolítica e imunosorvente permitiu maior seletividade/especificidade analítica, C-18/ADS, a extração direta dos solutos com exclusão das macromoléculas,  $\beta$ -CD, formação de complexos de inclusão entre os fármacos e  $\beta$ -CD e PPY, alta permeabilidade e interações intermoleculares ácido-base.

#### 5. Referências Bibliográficas

- Kataoka H. Automated sample preparation using *in-tube* solid-phase microextraction and its application. **Anal Bioanal Chem.**, v. 373, n. (1-2), p. 31, 2002.
- Kataoka H, Lord H, Pawliszyn J. Automated *in-tube* solid-phase microextraction-liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for the determination of ranitidine. **J. Chromatogr B**, v. 731, p. 353, 1999.
- Saito Y, Kawazoe M, Hayashida M, Jinno K. Direct coupling of microcolumn liquid chromatography with *in-tube* solid-phase microextraction for the analysis of antidepressant drugs. **Analyst**, v. 125, p. 807, 2000.
- Wu J, Lord H, Pawliszyn J, Kataoka H. Polypyrrole-coated capillary *in-tube* solid phase microextraction coupled with liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for the determination of  $\beta$ -blockers in urine and serum samples. **J Microcol Sep.**, v. 12, p. 255, 2000.
- Kataoka H, Lord HL. Simple and rapid determination of amphetamine, methamphetamine, and their methylenedioxy derivatives in urine by automated *in-tube* solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **J. Anal. Toxicol.**, v. 24, p. 257, 2000.
- Yuan H, Mester Z, Lord H, Pawliszyn J. Automated *In-tube* solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for the determination of selected benzodiazepines. **J Anal Toxicol.**, v. 24, p. 718, 2000.
- Mullett WM, Martin P, Pawliszyn. *In-tube* molecularly imprinted polymer solid-phase microextraction for the selective determination of propranolol. **Anal Chem.**, v.73, p. 2383, 2001.
- Wu J, Lord H, Pawliszyn J. Determination of stimulants in human urine and hair samples by polypyrrole coated capillary *in-tube* solid phase microextraction coupled with liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. **Talanta**, v. 54, p. 655, 2001.
- Jinno K, Kawazoe M, Saito Y, Takeichi T, Hayashida M. Sample preparation with fiber- *in-tube* solid-phase microextraction for capillary electrophoretic separation of tricyclic antidepressant drugs in human urine. **Eletrophoresis**, v. 22, p. 3785, 2001.
- Mullett WM, Levsen K, Lubda D, Pawliszyn. J. Bio-compatible *in-tube* solid-phase microextraction capillary for the direct extraction and high-performance liquid chromatographic determination of drugs in human serum. **J Chromatogr A**, v. 963, p. 325, 2002.
- Walles M, Mullet WM, Levsen K, Borlak J, Wunsch G, Pawliszyn J. Verapamil drug metabolism studies by automated *in-tube* solid phase microextraction. **J Pharm Biomed Anal.**, v. 30, p. 307, 2002.
- Fan Y, Feng YQ, Da SL, Shi ZG. Poly (methacrylic acid-ethylene glycol dimethacrylate) monolithic capillary for *in-tube* solid phase microextraction coupled to high performance liquid chromatography and its application to determination of basic drugs in human serum. **Anal Chim Acta**, v. 523, p. 251, 2004.



13. Yi Fan, Yu-Qi Feng, Shi-Lu Da, Zhong-Hua Wang. *In-tube* solid phase microextraction using a beta-cyclodextrin coated capillary coupled to high performance liquid chromatography for determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in urine samples. **Talanta**, v. 65, n. 1, p. 111, 2005.
14. B. Lin, M. M. Zheng, S. C. Ng, Yu-Qi Feng. Development of *in-tube* solid-phase microextraction coupled to pressure-assisted CEC and its application to the analysis of propranolol enantiomers in human urine. **Electrophoresis**, v. 28, p. 2771, 2007.
15. H. Kataoka, R. Inoue, K. Yagi, K. Saito. Determination of nicotine, cotinine, and related alkaloids in human urine and saliva by automated *in-tube* solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–mass spectrometry. **J Pharm Biomed Anal.** v. 49, n. 1, p. 108, 2009.
16. M.E. C. Queiroz, E.B. Oliveira, F. Breton, J. Pawliszyn. Immunoaffinity *in-tube* solid phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry for analysis of fluoxetine in serum samples. **J Chromatogr A.** v. 1174, n. 1-2, p. 72, 2007.
17. B. J. Silva, Lanças F. M., M. E. C. Queiroz. *In-tube* solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography (*in-tube* SPME/LC) analysis of nontricyclic antidepressants in human plasma. **J Chromatogr B**, v. 862, n. 1-2, p. 181, 2008.
18. H. Kataoka, E. Matsuura, K. Mitani. Determination of cortisol in human saliva by automated *in-tube* solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–mass spectrometry. **J Pharm Biomed Anal.** v. 44, p. 160-165, 2007.