

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA

GUSTAVO BRANDÃO SOUZA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA
DETERMINAÇÃO DE DROGAS PSICOATIVAS E SEUS
METABÓLITOS EM ESGOTO: SUPORTE AOS
ESTUDOS DE EPIDEMIOLOGIA FORENSE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Orientador: Prof. Dr. Fernando Fabríz Sodré
Co-orientador: PCF Dr. Adriano Otávio Maldaner

Brasília, Novembro de 2014

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Juscelino e Áurea, pelo exemplo de coragem, determinação, caráter e, principalmente, amor.

AGRADECIMENTO

A Deus, pela ajuda nos momentos em que ninguém mais podia ajudar.

Aos meus pais, pela inspiradora dedicação a mim e meus irmãos.

Aos meus irmão Mateus e Nívea, pelas alegrias que dão sentido à vida.

À minha linda namorada, Laryssa, pelo amor, paciência, companheirismo e, principalmente, pela inspiração.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Fernando Fabríz Sodré e PCF Dr. Adriano Otávio Maldaner, pela dedicação a este trabalho, pelas orientações e ensinamentos.

Ao PCF Me. Lúcio Paulo Lima Logrado, pelo auxílio e acompanhamento em etapas cruciais desde trabalho.

Aos amigos de IBIZA, que sempre estiveram presentes nos bons e maus momentos.

Ao Instituto Nacional de Criminalística da Polícia Federal, por viabilizar a produção deste trabalho permitindo a utilização de suas dependências e equipamentos.

A CAESB, pelo fornecimento das amostras e de informações indispensáveis a este trabalho.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

Ao DPP/UnB e ao PPGQ pelo apoio financeiro destinado a custeio de participação em congresso.

Ao Instituto de Química e à Universidade de Brasília.

RESUMO

A necessidade de uma ferramenta mais rápida, precisa e confiável para estimar o consumo de drogas de abuso tem dado espaço à abordagem conhecida como epidemiologia do esgoto. Este trabalho, por sua vez, tem o objetivo de desenvolver um método analítico baseado em UPLC-MS/MS para determinar cocaína, benzoilecgonina e 8 outros metabólitos, anfetamina, metanfetamina e outros 4 anfetamínicos, além de 3 dos principais metabólitos da *cannabis*, canabidiol, 11-nor-9-hidroxi- Δ -9-tetrahydrocannabinol e 11-nor-9-carboxi- Δ -9-tetrahydrocannabinol; com o objetivo de produzir estimativas de consumo utilizando epidemiologia do esgoto. Para o desenvolvimento do método, foi realizada otimização dos parâmetros instrumentais do espectrômetro de massa baseado em MRM para todos os analitos e foi desenvolvido método cromatográfico capaz de separar satisfatoriamente as substâncias-alvo. Planejamento fatorial 2^3 foi realizado para estudar os efeitos das seguintes variáveis – solvente de condicionamento, solvente de eluição e pH da amostra – sobre o processo de extração em fase sólida SPE. O método de extração final foi capaz de apresentar recuperações satisfatórias para 14 dos 19 analitos propostos inicialmente. Amostras de esgoto coletadas nos finais de semana dos jogos da Copa do Mundo FIFA realizados em Brasília – DF foram analisadas seguindo o método analítico desenvolvido. Foram detectadas no esgoto benzoilecgonina, cocaína, anidroecgonina, fenacetina e levamisol. A concentração de benzoilecgonina foi utilizada para estimar o consumo de cocaína, que variou de 6,3 a 22,8 doses por dia para cada 1000 habitantes. Sendo a região norte, composta por Asa Norte, Lago Norte, Varjão e Estrutural, detentora dos maiores consumos de cocaína.

Palavras-chave: drogas de abuso, cocaína, benzoilecgonina, esgoto, estimativa de consumo, epidemiologia do esgoto, epidemiologia forense.

ABSTRACT

The need for a faster, trustful and more precise tool to estimate drug abuse consumption has given space to the approach called sewage epidemiology. This work aims to develop analytical method based on UPLC-MS/MS to determine COC, BE and 8 other metabolites, AMP, MAMP and 4 other amphetamine-like substances, and 3 of the major metabolites of cannabis, CBD, OH -THC and THC-COOH; in order to estimate the consumption using sewage epidemiology. For the development of the method, an optimization of MRM parameters for all analytes was carried out and a chromatographic method to adequately separate the target substances was developed. 2^3 factorial planning was conducted to study the effects of two different levels for conditioning solvent, elution solvent and pH value for the samples. The final extraction method was able to produce satisfactory recoveries for 19 of the 14 originally proposed analytes. Sewage samples were collected on the weekends of the FIFA World Cup games that occurred in Brasilia – DF. They were analyzed using the analytical method developed in this work. BE, COC, AE, phenacetin and levamisole were detected in the sewage samples. The BE concentrations were used to produce cocaine consumption estimations, which ranged from 6.3 to 22.8 doses per day for each 1,000 habitants. Being the northern region, that comprises Lago Norte, Asa Norte, Varjão and Estrutural, holder of the largest cocaine consumption.

Keywords: drugs of abuse, cocaine, benzoilecgonine, sewage, waste water, drug use estimation, sewage epidemiology, forensic epidemiology.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Drogas de Abuso.....	3
2.2. Determinação de drogas de abuso e adulterantes em esgoto bruto.....	4
2.2.1. Amostragem e preservação	4
2.2.2. Preparo de amostra.....	5
2.2.3. Determinação analítica.....	6
2.3. Estimativa do consumo de drogas por epidemiologia do esgoto.....	6
3. OBJETIVOS.....	6
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
4.1. Otimização de parâmetros instrumentais.....	8
4.2. Locais de amostragem e coleta de esgoto.....	9
4.3. Planejamento fatorial e tratamento de amostra.....	10
4.4. Estimativas de consumo.....	12
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
5.1. Desenvolvimento do método.....	13
5.1.1. Otimização de parâmetros instrumentais.....	13
5.1.2. Planejamento Fatorial - método de extração.....	22
5.2. Análise de esgoto e estimativa de consumo.....	26
6. CONCLUSÕES.....	34
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

AE	Anidroecgonina
AEME	Anidroecgonina metil-éster
AMP	Anfetamina
BE	Benzoilecgonina
CBD	Cababidiol
CBN	Canabinol
COC	Cocaína
DA	Droga de abuso
DI	Droga inalterada
DE	Droga excretada
ECG	Ecgonina
EMCDDA	<i>European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction</i>
EME	Ecgonina metil-éster
ESI	<i>Eletrospray ionization</i>
ETE	Estação de tratamento de esgoto
HPLC-MS/MS	<i>High performance liquid chromatography in tandem with mass spectrometry</i>
MAMP	Metanfetamina
MBDM	Metilbenzodioxolilbutanamina
MDA	3,4-metilenodioxianfetamina
MDEA	3,4-metilenodioxietilamfetamina

MDMA	Metilendioximetanfetamina
MRM	<i>Multiple reaction monitoring</i>
Nor-BE	Nor-benzoilecgonina
Nor-COC	Nor-cocaína
OH-THC	11-nor-9-hidroxi- Δ -9-tetrahydrocannabinol
S_{efeito}	Erro-padrão do efeito
SPE	<i>Solid phase extraction</i>
THC-COOH	11-nor-9-carboxi- Δ -9-tetrahydrocannabinol
U.S.EPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
UNODC	<i>United Nations Office of Drug and Crime</i>
UPLC-MS/MS	<i>Ultra performance liquid chromatography in tandem with mass spectrometry</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Regiões e número total de habitantes atendidos pelas ETEs estudadas neste trabalho.....	10
Tabela 2. Variáveis estudadas no planejamento fatorial e seus respectivos níveis.....	11
Tabela 3. Características dos ensaios do planejamento fatorial.....	12
Tabela 4. Parâmetros <i>MRM</i> e transições escolhidas como resultado da otimização. Para cada analito, as transições estão apresentadas em ordem decrescente de abundância relativa do íon-produto, sendo a primeira, portanto, utilizada para quantificação.....	15
Tabela 5. Parâmetros ótimos da fonte de ionização <i>ESI</i>	18
Tabela 6. Parâmetros cromatográficos otimizados. A fase móvel é composta de água ultrapura (solvente A), metanol (solvente B) e 0,01% de ácido fórmico.....	19
Tabela 7. Tempos de retenção obtidos para as substâncias químicas investigadas neste trabalho.....	20
Tabela 8. Valores dos efeitos calculados, em porcentagem, para os cocaínicos e adulterantes, seus erros-padrão e intervalos de confiança para $t_{8,95\%}$	25
Tabela 9. Valores dos efeitos calculados, em porcentagem, para os anfetamínicos, seus erros-padrão e intervalos de confiança para $t_{8,95\%}$	25
Tabela 10. Recuperações médias observadas nas análises das amostras da copa.....	29
Tabela 11. Concentração das substâncias que foram encontradas nas amostras de esgoto. As demais substâncias não presentes na tabela não foram observadas.....	30
Tabela 12. Estimativa do consumo de cocaína para os finais de semana de jogos da copa do mundo em Brasília.....	31
Tabela 13. Consumo de cocaína em vários países do mundo estimado através de epidemiologia do esgoto.....	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química dos principais cocaínicos, canabinóides e anfetamínicos.....	5
Figura 2. Etapas da extração em fase sólida: condicionamento, carregamento, lavagem e eluição.....	7
Figura 3. Composição da fase móvel do cartucho SPE Strata X, Phenomenex.....	8
Figura 4. Princípio de funcionamento de um espectrômetro de massas em triplo-quadrupolo.....	9
Figura 5. Esquema do API 3200 ilustrando a posição dos parâmetros DP, EP, CEP, CE e CXP.....	12
Figura 6. Regiões administrativas atendidas pela ETE Brasília Norte, em preto, e Brasília Sul, em azul.....	14
Figura 7. O maior sinal é proveniente do analito com concentração conhecida em solvente. O sinal verde, geralmente menor por perdas durante a extração, corresponde ao analito na amostra de esgoto fortificada. Já o sinal vermelho indica a presença de analito na amostra de esgoto original, sem fortificação.....	16
Figuras 8 e 9. Porcentagens médias de recuperação para os cocaínicos e adulterantes, ordenadas, respectivamente, para os ensaios de 1 a 8, com destaque para o ensaio 2.....	25
Figura 10. Curvas de calibração externa para as substâncias-alvo, valores de R^2 e equações das retas.....	29
Figura 11. Consumo estimado de COC obtido por Feitosa (2012) e por este trabalho (g/dia×1000hab).....	35

1. INTRODUÇÃO

O consumo abusivo de drogas lícitas e ilícitas é responsável por problemas consideráveis de âmbito econômico, político e social, estando, por exemplo, entre os vinte maiores causadores de doenças em todo o mundo (Cobiac, 2009).

Apesar de o panorama das drogas de abuso no cenário mundial ter sido considerado estável segundo o *World Drug Report 2013*, o número total de usuários de drogas ilícitas tem aumentado anualmente. Estima-se que, somente em 2011, até 6,9 % da população global entre 15 e 64 anos, ou 315 milhões de pessoas, tenha feito uso de substâncias ilícitas em todo o mundo. Dentre estes usuários, 33,8 milhões fizeram uso de estimulantes anfetamínicos. Apreensões dessas drogas chegaram a 123 toneladas neste mesmo ano, um aumento de 66 % comparado com o ano anterior (UNODC, 2014).

Ainda assim, a *cannabis* continua sendo a droga mais utilizada no mundo, sendo produzida em praticamente todos os países. O número de usuários chegou, no ano de 2011, a 180,6 milhões de pessoas em todo o mundo, ou 3.9 % da população adulta (UNODC, 2014).

Esses dados mostram a importância da manutenção dos esforços para controlar a utilização de substâncias psicoativas. Esforços estes iniciados com a Conferência de Xangai em 1909, quando pela primeira vez se discutiu iniciativas para fiscalizar e controlar a utilização dessas substâncias (UNODC, 2008). A partir de então, em todo o mundo tem-se desenvolvido estratégias para diminuir a utilização ilícita de substâncias psicoativas. Mas, para tal, é imprescindível o acesso a dados confiáveis sobre o número de usuários de cada droga, tendências de consumo e locais com maior ocorrência de usuários.

Na maioria dos casos, estimativas de consumo e, conseqüentemente, estudos feitos utilizando tais estimativas são feitos com dados indiretos acerca do consumo, tais como pesquisas epidemiológicas, procura por tratamento médico, quantidade de droga apreendida pelos órgãos de segurança ou entrevistas com usuários. Segundo o próprio Relatório Brasileiro sobre Drogas, publicado em 2009, que apresenta dados sobre consumo de várias drogas em

todo o Brasil, suas informações devem ser analisadas com cautela, levando-se em conta as limitações nos processos de coleta de dados. (SENAD, 2009).

Em 2001, uma nova abordagem para o monitoramento do consumo de substâncias foi proposta por Christian G. Daughton. Denominada pela comunidade científica como epidemiologia do esgoto ou epidemiologia forense, tal abordagem baseia-se essencialmente na quantificação das substâncias e seus metabólitos no esgoto gerado pela população. Utilizando-se desses dados, bem como informações acerca do metabolismo da droga no organismo humano, o percentual de excreção dos metabólitos, o número de pessoas atendidas pela estação de tratamento de esgoto e a vazão de esgoto que chega à mesma, é possível estimar o consumo de substâncias de forma rápida e objetiva (Daughton, 2001).

Percebe-se, portanto, a necessidade da utilização de uma ferramenta que gere dados mais rapidamente e que possam ser analisados com mais facilidade. A epidemiologia do esgoto apresenta-se como uma alternativa aos métodos tradicionais, atendendo a essas necessidades e com o potencial de possibilitar a criação de melhores políticas públicas e estratégias de combate ao tráfico de drogas.

Estimativas de consumo utilizando epidemiologia do esgoto já foram produzidas com sucesso no DF (Feitosa, 2012). No entanto, o método analítico desenvolvido na ocasião só permite determinar cocaína e benzoilecgonina, um de seus principais metabólitos. Neste trabalho, espera-se desenvolver método analítico para quantificar 19 diferentes analitos, entre eles outros 6 metabólitos da cocaína, anfetamínicos comumente presentes em comprimidos de *ecstasy*, 3 metabólitos da *Cannabis* e 2 adulterantes da cocaína que podem ajudar a distinguir suas formas de utilização (inalada ou fumada).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Drogas de abuso

O termo droga de abuso refere-se a qualquer substância, psicotrópica ou não, que é utilizada de forma abusiva por motivos não-medicinais. Podem ser incluídas nesses grupos, além de substâncias como cocaína, anfetamínicos e *cannabis*, derivados do ópio como heroína e morfina assim como benzodiazepínicos. As drogas de abuso mais consumidas mundialmente ainda são a *cannabis*, a cocaína e os anfetamínicos presentes, por exemplo, nos comprimidos de *ecstasy* (UNODC, 2014).

2.1.1. Cenário das drogas

O Relatório Mundial sobre Drogas 2013 (UNODC, 2014) aponta uma redução do uso de drogas tradicionais e um aumento significativo do consumo de novas substâncias psicoativas, consideradas como novas drogas, muitas das quais ainda não estão sob controle internacional. Ainda segundo o relatório, no Brasil observa-se um crescimento do uso de cocaína e uma redução no uso de anfetamínicos.

A Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas é o órgão responsável por apresentar informações sobre consumo de drogas no Brasil. Avaliando o relatório brasileiro sobre drogas 2010, percebe-se que os levantamentos sobre consumo dependem de indicadores indiretos e subjetivos, principalmente pesquisas socio-epidemiológicas, onde muitas vezes, segundo o próprio relatório, os entrevistados podem não falar a verdade ao responder os questionários (SENAD, 2009).

2.1.2. Cocaína, anfetamínicos e cannabis

A cocaína (COC) é um poderoso estimulante do sistema nervoso central, capaz de provocar dependência química. Pode ser consumida de forma inalada ou fumada. No primeiro caso, a substância encontra-se na forma de sal cloridrato

e, quando fumada, encontra-as na forma de base livre, como no *crack*. A cocaína é metabolizada principalmente no fígado, onde cerca de 45% dela é convertida em benzoilecgonina (BE) por hidrólise, parcela esta que é excretada através da urina. Outros metabólitos também podem ser gerados em quantidades menores, como a ecgonina metil-éster (EME) e a nor-cocaína (Nor-COC) (Goldstein et. al., 2009).

Já os anfetamínicos são excretados na sua forma original pois não sofrem alteração considerável no organismo do usuário. Cerca de 30% da anfetamina (AMP) consumida não é absorvida e é eliminada através da urina. Para a metanfetamina, essa porcentagem chega a 43% e para a metilenodioximetanfetamina (MDMA), uma das principais substâncias constituintes do *ecstasy*, aproximadamente 65% da quantidade consumida é excretada pelo organismo (van Nuijs et. al., 2011).

Em contato com o THC, o organismo do usuário pode eliminar 4 diferentes metabólitos: canabinol (CBN), canabidiol (CBD), 11-nor-9-hidroxi- Δ -9-tetrahydrocanabinol (OH-THC) e 11-nor-9-carboxi- Δ -9-tetrahydrocanabinol (THC-COOH). No entanto somente este último, o THC-COOH, tem valores conhecidos de taxa de excreção, que ainda assim é muito baixa e corresponde somente a 0,6% da quantidade de THC inicial consumida. Essa baixa taxa de excreção pode dificultar bastante a determinação dessa substância no esgoto, já que resultarão em baixíssimas concentrações mesmo com consumo elevado (Nefau et. al., 2013).

A Figura 1 apresenta as estruturas químicas da cocaína, anfetamínicos, THC e seus principais metabólitos.

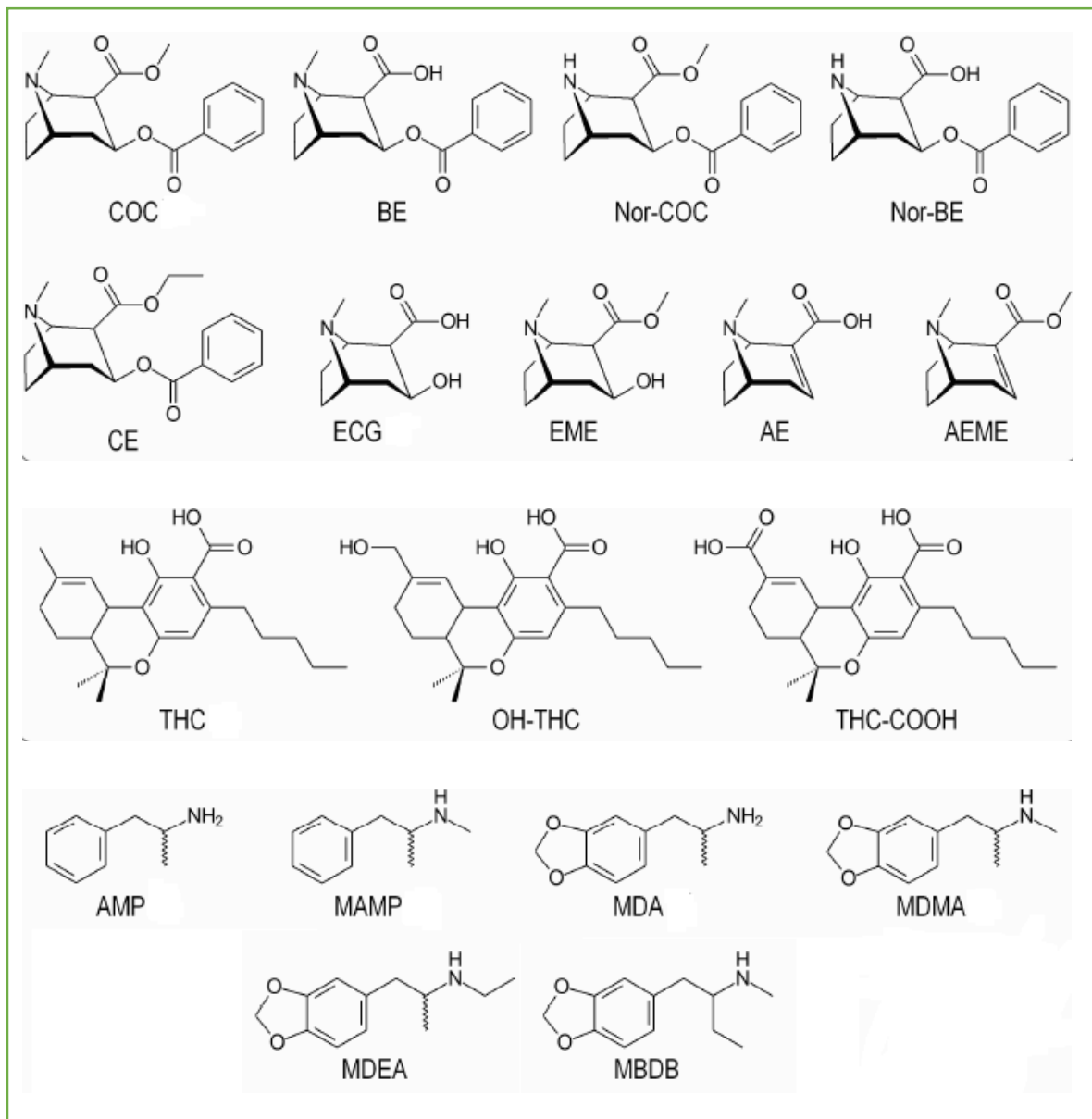


Figura 1. Estrutura química dos principais cocaínicos, canabinóides e anfetamínicos.

2.2. Determinação de drogas de abuso e adulterantes em esgoto bruto

Nos últimos anos, a análise de esgoto bruto para quantificar metabólitos de drogas de abuso e posterior utilização dessas concentrações para estimar o consumo dessas drogas tem sido aplicada em todo o mundo, mostrando o interesse da comunidade científica pela epidemiologia do esgoto (Bijlsma *et. al.*, 2014; Nefau *et. al.*, 2013; Senta *et. al.*, 2014; Khan *et. el.*, 2014; Heuett *et. al.*, 2015; Subedi *et. al.*, 2015).

2.2.1. Amostragem e preservação

Dentre as técnicas de amostragem mais utilizadas estão coleta simples e coleta composta por um certo período de tempo, sendo esta última mais interessante para estudos de epidemiologia do esgoto por gerar uma amostra com maior representatividade (Pal *et al.*, 2013). No entanto, Ort e colaboradores (2010) indica amostragem proporcional à vazão de chegada de esgoto à ETE como melhor técnica de coleta.

Após o esgoto ser levado ao laboratório, é indicado que os procedimentos de extração sejam iniciados o quanto antes, já que diferentes estudos demonstram que, mesmo sendo armazenado em frasco de vidro âmbar e refrigerado a 4 °C, ou mesmo com adição de biocida antes do armazenamento, as concentrações das drogas de abuso e seus metabólitos apresentam variações já nas primeiras 24h. Entretanto, os mesmos estudos demonstram que os cartuchos *SPE*, depois de carregados com esgoto, podem ser congelados e armazenados por muitos dias sem que haja perda dos analitos (Castiglioni *et al.*, 2006; González-Mariño *et al.*, 2010).

Recentemente, Senta e colaboradores determinaram a meia-vida de diferentes metabólitos de drogas em esgoto bruto. É possível observar que todos os biomarcadores sofrem degradação considerável já nas primeiras 72h, sendo que a COC, por exemplo, tem $t_{1/2}$ igual a 35h a uma temperatura ambiente de 20 °C. O estudo aponta também que a degradação pode ser diminuída e, para algumas substâncias, até controlada se as amostras forem armazenadas a baixas temperaturas e pH reduzido. No entanto, para trabalhos analisando muitos analitos simultaneamente, é difícil controlar a degradação de todas as substâncias de interesse, já que elas reagem de forma diferente às condições de armazenamento. Como é o caso do THC-COOH, por exemplo, que degrada mesmo a pH reduzido (Senta *et al.*, 2014).

2.2.2. Preparo de amostra

A extração em fase sólida é sem dúvida o método de extração mais utilizado em estudos de epidemiologia do esgoto. Diversos trabalhos, com

diferentes substâncias sendo estudadas, utilizam cartuchos *SPE* (do inglês, *solid phase extraction*) (Loganathan *et. al.*, 2009; Harman *et. al.*, 2011; Langford *et. al.*, 2011; Hall *et. al.*, 2012; Muckulak *et. al.*, 2014).

A extração em fase sólida pode ser dividida em até 4 etapas. São elas: condicionamento do cartucho, etapa em que solvente adequado é utilizado para liberar os sítios ativos da fase sólida; carregamento do cartucho, etapa onde a amostra é passada para que os analitos sejam extraídos; etapa de lavagem, onde um solvente é utilizado para eliminar interferentes e a última etapa de eluição, onde o objetivo é retirar todos os analitos do cartucho.

A figura 2 ilustra as etapas geralmente utilizadas na extração em fase sólida.

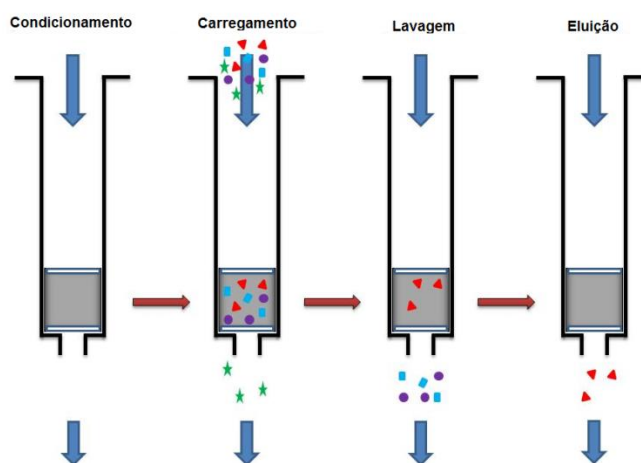


Figura 2. Etapas da extração em fase sólida: condicionamento, carregamento, lavagem e eluição.

Dentre as drogas de abuso, existem substâncias com características muito polares, como é o caso de alguns cocaínicos e outras com menores polaridades, como os canabinóides. Por esse motivo, em estudos onde se procura analisar muitas drogas de abuso simultaneamente, é comum a utilização de cartuchos com fases sólidas compostas por co-polímeros de propriedades hidrofílicas e lipofílicas, como o Oasis HLB®, da marca Waters, e o Strata-X®, da marca Phenomenex. Utilizando fases sólidas com essas características, é possível ajustar o método para que se consiga obter boas recuperações para

diferentes substâncias (Muckulak *et. al.*, 2014; Ort *et. al.*, 2014; Vazquez-Roig *et. al.*, 2010).

A figura 3 demonstra a estrutura da fase sólida do cartucho Strata-X®. É possível observar o sítio hidrofílico em vermelho, onde predominam interações dipolo-dipolo; e o sítio lipofílico em preto.

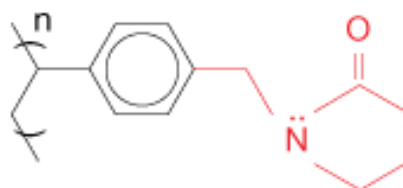


Figura 3. Composição da fase móvel do cartucho SPE Strata X®, Phenomenex.

2.2.3. Determinação analítica

A determinação analítica de drogas de abuso (DA) em esgoto tem sido realizada, quase que na totalidade dos trabalhos, utilizando cromatógrafo líquido, HPLC (*high performance liquid chromatography*) ou UPLC (*ultra performane liquid chromatography*), acoplado a espectrômetro de massas em triploquadrupolo.

Outros analisadores de massas podem ser utilizados. No entanto, devido à complexidade da matriz esgoto, que apresenta normalmente muitos interferentes, e às baixa concentrações em que as DA são encontradas, o analisador de massas em triploquadrupolo é a melhor opção por apresentar alta seletividade e sensibilidade (Gheorghe *et. al.*, 2007; Huerta-Fontela *et. al.*, 2007).

A figura 4 ilustra o caminho percorrido pelos analitos no espectrômetro de massas em triploquadrupolo.

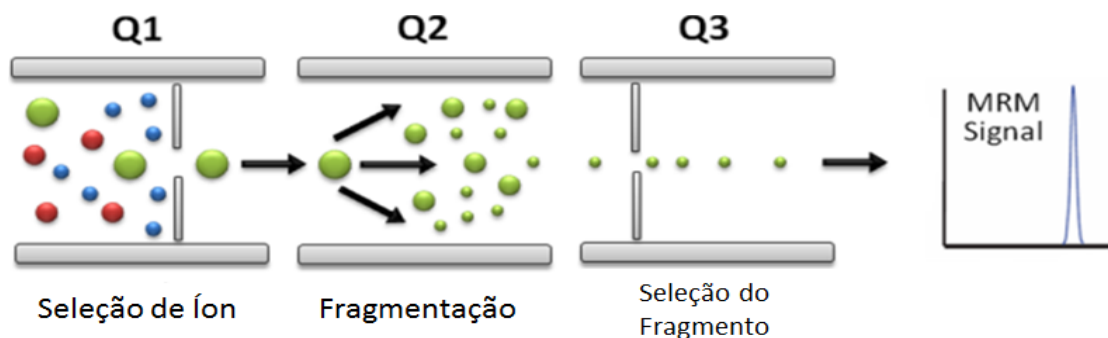


Figura 4. Princípio de funcionamento de um espectrômetro de massas em triplo-quadrupolo.

No quadrupolo 1 (Q1), os íons que chegam são selecionados de forma que somente o íon-precursor seja direcionado ao Q2, onde ocorre a fragmentação. O Q3 é responsável por selecionar os fragmentos mais abundantes. O equipamento monitora toda o processo e daí vem sua seletividade, pois mesmo que um íon com mesma massa molecular que o íon-precursor chegasse simultaneamente ao Q1, ele teria que apresentar as mesmas fragmentações para provocar erros na leitura do equipamento.

Os parâmetros MRM controlam desde a entrada das moléculas à fragmentação e à chegada dos íons-produto no Q3. Sendo assim, a otimização é feita com o objetivo de identificar os principais fragmentos e aumentar a sua abundância no último quadrupolo, possibilitando melhores condições para a quantificação e identificação dos analitos. Como o equipamento é capaz de monitorar a fragmentação de cada íon de forma independente, os parâmetros que influenciam tal processo são individuais para cada íon-precursor.

A seguir, uma descrição de cada um desses parâmetros:

- DP (*Declustering Potencial*): É utilizado para minimizar a formação de *clusters*, que são agrupamentos de íons e solvente.
- EP (*Entrance Potencial*): Diferença de potencial que orienta a entrada do íon no Q1.
- CEP (*Collision Cell Entrance Potencial*): Orienta a entrada do íon na célula de colisão (Q2).
- CE (*Collision Energy*): Potencial que controla a energia de colisão dos íons com o gás de colisão, influenciando diretamente na formação dos íons-produto.

- CXP (*Collision Cell Exit Potencial*): Potencial que guia e força os fragmentos para fora da célula de colisão, levando-os ao Q3.

2.3. Estimativa do consumo de drogas por epidemiologia do esgoto

Inicialmente, é importante considerar que a qualidade de estimativas de consumo de DA para uma população atendida por ETE está diretamente ligada à qualidade do sistema de esgoto da região. No caso do Distrito Federal, 88,9% das residências possuem saneamento adequado e 10,9% delas possuem saneamento semi-adequado, demonstrando uma vasta cobertura feita pelas estações de tratamento de esgoto (CAESB, 2014).

Após o consumo de DA, o organismo do usuário metaboliza essas substâncias que, quando excretadas, em suas formas inalteradas ou não, irão compor o esgoto da região e chegarão como afluentes de uma estação de tratamento de esgoto. Ao analisar amostras desses afluentes de esgoto, pode-se determinar a concentração dessas substâncias e, através de um retro-cálculo, estimar o consumo da droga para a população que compõe o esgoto da ETE. Para tal, utiliza-se também dados de vazão de afluente de esgoto na ETE, taxa de excreção da droga ou metabólito, razão molar entre a droga excretada (DE) e a droga inalterada (DI) e também o número de habitantes atendidos pela ETE.

A equação 1 a seguir demonstra como o consumo pode ser calculado utilizando cada uma das informações (Zuccato, 2008).

$$C = \frac{c \times Q_v \times F_m}{X \times hab} \quad (1)$$

Utilizando-se c (g/L), Q_v (L/dia), F_m (razão molar entre DE e DI), X (taxa de excreção da DI ou DE) e hab (número de habitantes atendidos dividido por 1000) pode-se obter o consumo C em gramas por dia para cada 1000 habitantes ($\text{g dia}^{-1} 1000 \text{ hab}^{-1}$).

3. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo principal desenvolver um método analítico para determinação de Cocaína, 7 de seus principais metabólitos e 2 adulterantes, bem como Anfetamina, Metanfetamina e 4 derivados anfetamínicos encontrados comumente no *ecstasy*, e 3 dos principais metabólitos da *Cannabis* em amostras de esgoto bruto, para auxílio em estudos de epidemiologia do esgoto e produção de estimativas de consumo de drogas de abuso em regiões do Distrito Federal.

Para realização deste trabalho, foram traçados os seguintes objetivos parciais:

- Realizar otimização dos parâmetros instrumentais do espectrômetro de massas para cada um dos compostos de interesse;
- Desenvolver método cromatográfico adequado e capaz de separar satisfatoriamente os compostos com mesma massa molecular;
- Desenvolver método de extração baseado em *SPE* capaz de extrair os 19 compostos;
- Realizar análise de amostras reais de esgoto coletadas em diferentes ETEs do Distrito Federal para produção de estimativas de consumo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Otimização de parâmetros instrumentais

O equipamento utilizado para realização das análises deste trabalho é um cromatógrafo líquido de ultraeficiência acoplado a espectrômetro de massas (UPLC-MS/MS) da marca ABSciex e modelo API 3200 presente no Instituto Nacional de Criminalística da Polícia Federal em Brasília, cujo analisador de massas é do tipo triploquadrupolo com fonte de ionização por *electrospray* (ESI) operando em modo positivo. Como coluna cromatográfica, foi utilizada uma

coluna modelo Zorbax RRHD SB-C18, da marca Agilent, com 50 mm de comprimento por 2.1 mm de diâmetro interno e partículas de tamanho 1.8 µm.

Para os propósitos deste trabalho, soluções-estoque a 20 mg/L de todos os analitos foram preparadas. Soluções e *spikes* citados no decorrer deste trabalho foram preparados a partir destas soluções-estoque.

Na otimização dos parâmetros *MRM* (*multiple reaction monitoring*), seguiu-se método automático indicado pelo fabricante do equipamento, onde soluções de cada analito em metanol, a uma concentração de 400 µg/L, são injetadas separadamente direto no analisador de massas. A otimização é feita de forma univariada, ou seja, cada parâmetro é otimizado separadamente sem que seja considerada a influência de um parâmetro sobre o outro. O resultado são os valores ótimos para cada analito. O objetivo é potencializar a ionização das moléculas-alvo, a fragmentação dos íons-precusores e a passagem desses íons através dos quadrupolos.

A figura 5 ilustra o triploquadrupolo do API 3200 e mostra a posição de cada um dos parâmetros otimizados.

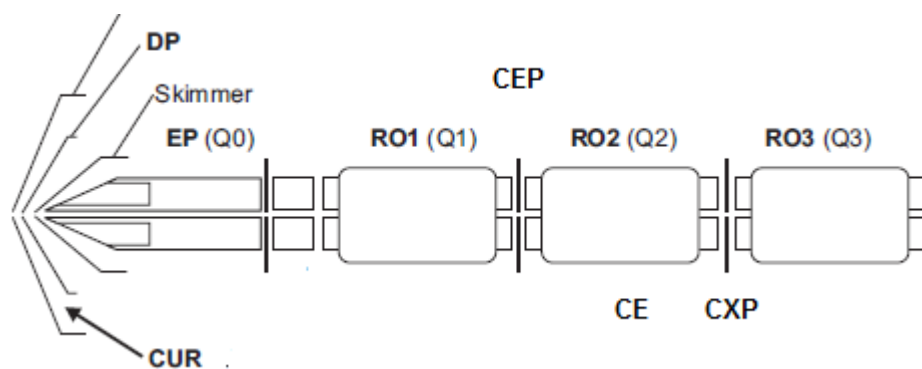


Figura 5. Esquema do API 3200 ilustrando a posição dos parâmetros DP, EP, CEP, CE e CXP.

Além dos parâmetros *MRM*, foi necessário otimizar os parâmetros da fonte de ionização *eletronspray* (*ESI*).

A seguir, uma descrição de cada um dos parâmetros da fonte de ionização:

- *Curtain Gas*: Fluxo de gás que impede que gotas de solvente atrapalhem a passagem dos íons.
- *Ion Spray Voltage*: Controla a voltagem aplicada na agulha da fonte de íons.
- *Ion Source Gas 1*: Pressão do gás de eletronebulização.
- *Ion Source Gas 2*: Pressão do gás responsável por evaporar o solvente das gotas de amostra.
- *Temperature*: Temperatura aplicada durante a eletronebulização.

O método cromatográfico foi otimizado variando-se vazão e gradiente da fase móvel, volume de injeção e temperatura da coluna cromatográfica. Um mix com todos os analitos a 200 µg/L foi preparado para ser utilizado nesta etapa. Os valores considerados ótimos foram escolhidos por possibilitarem uma separação satisfatória dos analitos, com baixo tempo de retenção.

4.2. Locais de amostragem e coleta de esgoto

As amostras de esgoto utilizadas neste trabalho foram coletadas dos afluentes de esgoto que chegam às ETEs (acrônimo para estações de tratamento de esgoto). As coletas são do tipo composta, onde de hora a hora, uma alíquota de esgoto é coletada dos afluentes e armazenada para que, ao fim de 24 horas, possam formar uma amostra representativa daquele dia. A alíquota coletada para composição da amostra representativa do dia tem seu volume definido de acordo com a vazão média de esgoto que chega à ETE no momento da coleta. Tais coletas foram realizadas por técnicos da CAESB nas ETEs Norte e Sul.

Alíquotas finais representativas de cada dia, com volume de 1L, foram levadas ao laboratório em frascos de vidro âmbar armazenados em isopor. Os frascos foram previamente lavados com água e detergente, e enxaguados com água ultrapura e etanol. O procedimento de tratamento de amostra e extração foi iniciado imediatamente após a chegada ao laboratório.

A tabela 1 apresenta as regiões atendidas por cada ETE, bem como o número de habitantes e a vazão média de esgoto que chega à ETE.

Tabela 1. Regiões e número total de habitantes atendidos pelas ETEs estudadas neste trabalho.

ETE	Regiões atendidas	Total de habitantes*
Brasília Norte	Asa Norte	186493
	Lago Norte	
	Varjão	
	S.C.I.A (Estrutural)	
Brasília Sul	Asa Sul	522819
	Lago Sul	
	Águas Claras	
	Sudoeste/Octogonal	
	Cruzeiro	
	S.I.A	
	Park Way	
	Guará	
	Núcleo Bandeirante	
Candangolândia		

*Número de habitantes estimado pela CAESB.

A figura 6 traz um mapa de Brasília e ilustra as áreas atendidas pelas ETEs Brasília Norte e Sul.

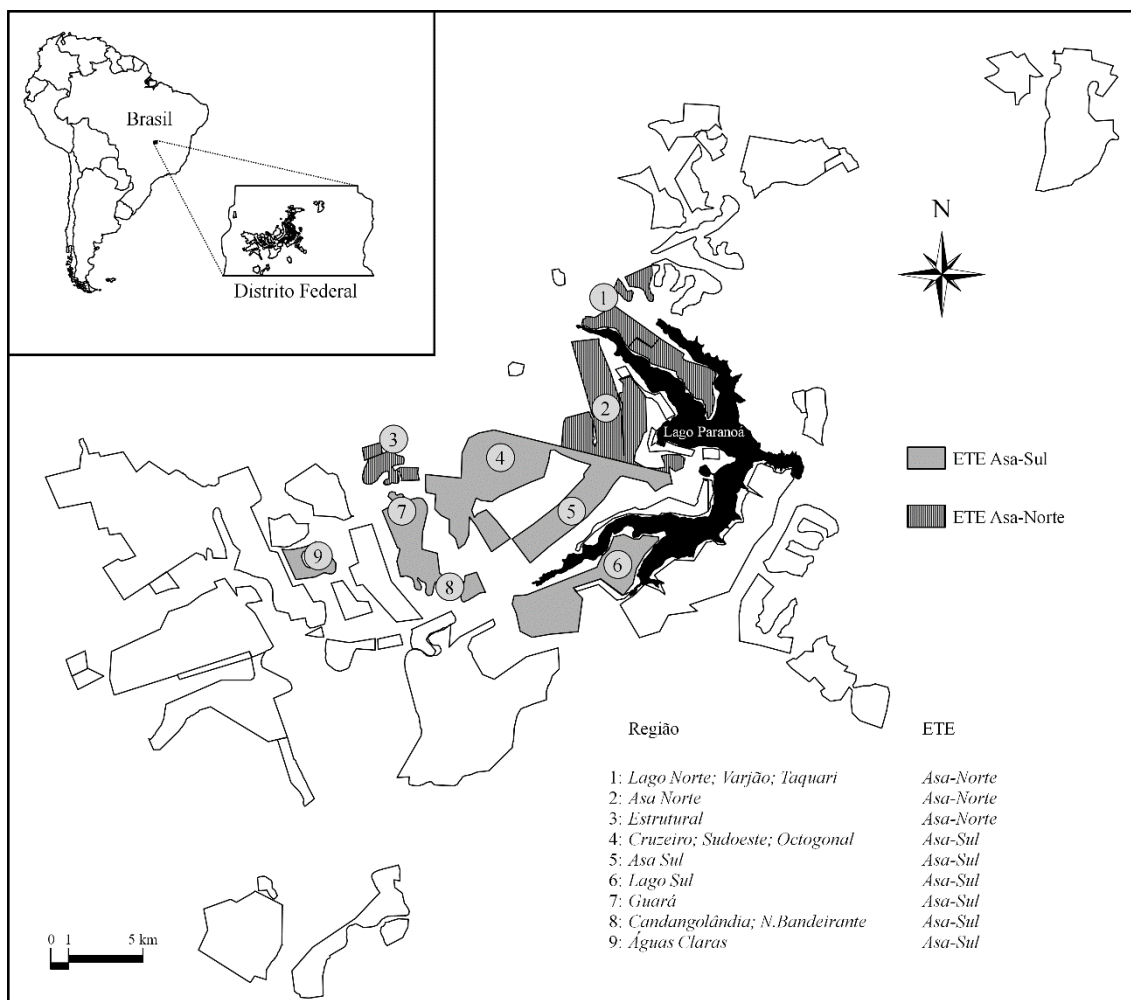


Figura 6. Regiões administrativas atendidas pela ETE Brasília Norte, em preto, e Brasília Sul, em azul.

4.3. Planejamento fatorial e tratamento de amostra

Para desenvolvimento de método de extração adequado aos propósitos deste trabalho, foi realizado um planejamento fatorial 2^3 . As amostras de esgoto para esta etapa foram coletadas na ETE Brasília Norte.

O planejamento fatorial avaliou os efeitos do solvente utilizado para o condicionamento e para a eluição, e o pH da amostra. A tabela 2 apresenta os níveis aplicados a cada uma das variáveis estudadas.

Tabela 2. Variáveis estudadas no planejamento fatorial e seus respectivos níveis.

Níveis	Efeito 1 – Condicionamento	Efeito 2 – Eluição	Efeito 3 – pH
Nível alto (+)	Metanol/Acetonitrila (60/40)	Metanol/Acetonitrila (60/40)	2
Nível baixo (-)	Metanol	Metanol	6

As amostras de esgoto bruto, logo que chegaram ao laboratório, foram divididas em duas porções as quais foram ajustadas a pH 2 e 6 para a realização do planejamento fatorial. Em seguida, as amostras foram fortificadas com padrões dos analitos de interesse, de forma que adquirissem concentrações de 1 mg/L dos mesmos. A recuperação do método de extração foi determinada tomando a concentração obtida nas amostras fortificadas, subtraindo-a da concentração encontrada nas amostras correspondentes sem fortificação e comparando com a concentração esperada (1 mg/L).

A figura 7 mostra como a recuperação para os analitos é calculada.

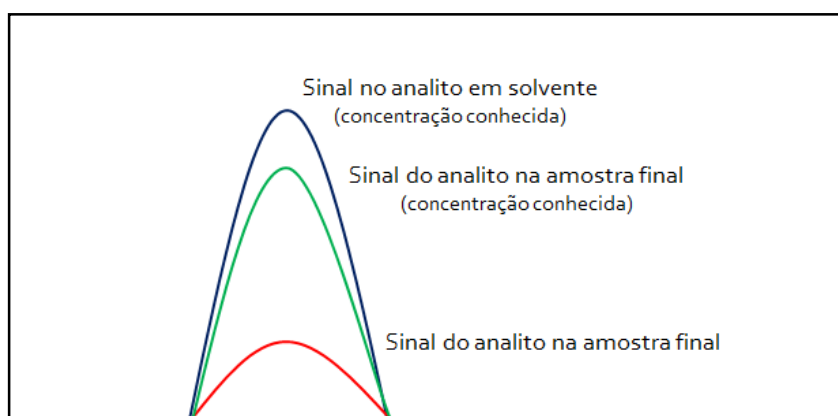


Figura 7. O maior sinal é proveniente do analito com concentração conhecida em solvente. O sinal verde, geralmente menor por perdas durante a extração, corresponde ao analito na amostra de esgoto fortificada. Já o sinal vermelho indica a presença de analito na amostra de esgoto original, sem fortificação.

Para a extração, 50 mL de esgoto são eluídas pelo cartucho de extração SPE (*solid phase extraction*), sendo ele moledo Phenomenex Strata X® (500 mg,

6 mL) composto por co-polímero com grupamentos hidrofílicos e lipofílicos. O condicionamento é feito com 6 mL de solvente e 3 mL de água ultrapura, e a eluição também utilizou 6 mL do solvente correspondente. Nos casos em que o procedimento não pôde ser feito sem interrupções, os cartuchos foram centrifugados por 5 minutos a 15 mil rpm e armazenados em congelador até que se pudesse dar continuidade com a eluição. Após a eluição, as amostras foram levadas à secura em concentrador utilizando atmosfera de gás nitrogênio e aquecimento a 40 °C, e reavolumados para 5 mL em metanol, o que equivale a um fator de contração de 10 vezes, já que desses 5 mL foram tiradas as alíquotas levadas ao UPLC-MS/MS.

A tabela 3 apresenta as características de cada ensaio do planejamento fatorial.

Tabela 3. Características dos ensaios do planejamento fatorial.

Ensaio	Efeito 1 – Condicionamento	Efeito 2 – Eluição	Efeito 3 – pH
1	Metanol/Acetonitrila (60/40)	Metanol/Acetonitrila (60/40)	2
2	Metanol/Acetonitrila (60/40)	Metanol	2
3	Metanol	Metanol/Acetonitrila (60/40)	2
4	Metanol	Metanol	2
5	Metanol/Acetonitrila (60/40)	Metanol/Acetonitrila (60/40)	6
6	Metanol/Acetonitrila (60/40)	Metanol	6
7	Metanol	Metanol/Acetonitrila (60/40)	6
8	Metanol	Metanol	6

4.4. Estimativas de consumo

Para a produção das estimativas de consumo, foram coletadas amostras de esgoto das ETEs Brasília Norte e Brasília Sul. As coletas foram realizadas, segundo método já descrito, nos dias 6, 7, 13 e 14 de julho. O objetivo é analisar amostras de esgoto dos dias seguintes aos jogos da Copa do Mundo FIFA que ocorreram em Brasília nos dias 5 e 12 de julho.

As amostras coletadas foram analisadas seguindo método desenvolvido neste trabalho. Para o tratamento de amostra, as condições do ensaio 2, que podem ser vistas na tabela 3, foram aplicadas por apresentarem melhor recuperação média para o maior número de analitos, como será discutido mais

adiante. Ou seja, as amostras foram ajustadas a pH 2, o condicionamento do cartucho foi feito com 6 mL de metanol/acetonitrila 60/40 e 3 mL de água, 50 mL de esgoto foram utilizados na fase de carregamento do cartucho, 6 mL de metanol foram utilizados na eluição e a amostra foi levada à secar e reavolumada para 5 mL com metanol. Para reavaliar as recuperações, também foram extraídas e analisadas amostras com spike dos analitos a 0,1 mg/L e 1 mg/L.

Já para as análises, os parâmetros MRM, da fonte ESI e cromatográficos utilizados estão apresentados, respectivamente, nas tabelas 4, 5 e 6 e foram também resultado das otimizações descritas anteriormente. A quantificação é feita através de curva analítica produzida por calibração externa.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, as determinações analíticas foram realizadas utilizando-se UPLC-MS/MS e a extração dos analitos foi baseada em *SPE*. Com essas etapas otimizadas, amostras de esgoto de diferentes ETEs foram analisadas e o consumo de cocaína foi estimado para as correspondentes regiões do Distrito Federal. Desta forma, inicialmente serão discutidos os resultados das otimizações dos parâmetros instrumentais e do método de extração e, em seguida, os resultados das análises das amostras de esgoto bruto e as estimativas de consumo para as populações atendidas pelas ETEs investigadas.

5.1. Desenvolvimento do método

5.1.1. Otimização de parâmetros instrumentais

Os primeiros resultados obtidos neste trabalho são advindos das otimizações dos parâmetros *MRM* (*Multiple Reaction Monitoring*) para os compostos investigados. Após sofrerem ionização, os íons-precusores entram no primeiro quadrupolo, seguem para o fragmentador e chegam ao terceiro quadrupolo em forma de fragmentos - os íons-produto - onde um sinal é gerado.

Seguindo outros trabalhos utilizando *MRM* (Huerta-Fontela *et. al.*, 2008; Kasprzyk-Hordern *et. al.*, 2008) optou-se por operar o *EletronSpray* em modo positivo (*ESI+*). Portanto, o íon-precursor corresponde sempre à molécula protonada de cada analito, ou seja $[M+H]^+$. Ao final da otimização obteve-se, além dos parâmetros, os fragmentos com maior abundância relativa, dos quais foram escolhidos um para quantificação e dois para confirmação, sendo estes os 3 íons-produto monitorados nas análises subsequentes.

As otimizações foram realizadas de forma automática e univariada pelo equipamento, que varia cada parâmetro, um a um, e determina o valor ótimo. Apesar de desconsiderar a influência de um parâmetro no outro, o método univariado é bastante praticado e apresenta resultados satisfatórios, já que a sensibilidade do equipamento é muito boa para a maioria das substâncias (Bartelt-Hunt *et. al.*, 2009). Não há até esta data estudos avaliando a diferença proporcionada por um método multivariado.

Na Tabela 4, observa-se os íons-precusores, os parâmetros *MRM* e os íons-produto resultados da etapa de otimização.

Tabela 4. Parâmetros *MRM* e transições escolhidas como resultado da otimização. Para cada analito, as transições estão apresentadas em ordem decrescente de abundância relativa do íon-produto, sendo a primeira, portanto, utilizada para quantificação.

Analito	DP (V)	EP (V)	CEP (V)	Massas dos íons (Da)	CE (eV)	CXP (V)
COC*	41	3,5	20	304,2→182,2	23	4
				304,2→105,2	43	4
				304,2→119,0	39	4
AEME*	81	3	10	182,2→108,2	21	4
				182,2→119,1	23	4
				182,2→122,1	25	4
BE*	46	5,5	16	290,2→168,2	27	4
				290,2→77,2	79	4
				290,2→105,1	45	4
Nor-BE*	56	7	12	276,2→154,1	19	4
				276,2→136,1	29	4
				276,2→105,1	39	4
Nor-COC*	61	6,5	18	290,2→168,2	19	4
				290,2→136,2	31	4
				290,2→77,2	67	4
EME*	36	6	12	200,2→182,2	19	4
				200,2→82,1	37	4
				200,2→94,1	49	4
AE*	56	9,5	10	168,2→136,2	13	4
				168,2→91,1	29	4
				168,2→108,1	23	4
ECG*	36	5,5	8	186,2→168,2	19	4
				186,2→136,1	29	4
				186,2→68,1	39	4
Levamisol	61	9	12	205,2→91,2	45	4
				205,2→178,1	27	4
				205,2→123,1	39	4
Fenacetina	51	9,5	10	180,2→110,2	27	4
				180,2→138,1	21	4
				180,2→65,1	47	4
AMP*	16	4	12	136,2→119,1	13	4
				136,2→90,9	23	4
MAMP*	26	6	10	150,2→91,1	27	4
				150,2→119,0	13	6
MDA*	21	5	10	180,2→163,2	13	4

				180,2→105,1	29	4
				180,2→77,1	49	4
MDMA*	26	5	10	194,2→163,2	15	4
				194,2→105,1	33	4
				194,2→77,1	57	4
MDEA*	36	7	12	208.3→163,2	17	6
				208.3→105,2	31	4
				208.3→77,2	57	4
MBDB*	36	6	12	208.3→135,1	27	4
				208.3→77,2	55	4
				208.3→177,2	13	4
THC-COOH*	61	6	24	345,2→327,2	19	6
				345,2→299,1	33	6
				345,2→91,1	91	4
OH-THC*	51	6,5	18	331,2→313,1	17	6
				331,2→193,1	31	4
				331,2→105,2	47	4
CBD*	51	7	22	315,2→123,1	43	4
				315,2→193,1	25	4
				315,2→135,2	25	4

*COC: Cocaína; AEME: anidroecgonina metil-éster; BE: benzoilecgonina; Nor-BE: nor-benzoilecgonina; Nor-COC: nor-cocaína; EME: ecgonina metil-éster; AE: anidroecgonina; ECG: ecgonina; AMP: anfetamina; MAMP: metanfetamina; MDA: 3,4-metilenodioxianfetamina; MDMA: metilenodioximetanfetamina; MDEA: 3,4-metilenodioxietilanfetamina; MBDB: metilbenzodioxolilbutanamina; THC-COOH: 11-nor-9-carboxi- Δ -9-tetrahydrocanabinol; OH-THC: 11-nor-9-hidroxi- Δ -9-tetrahydrocanabinol; CBD: canabidiol.

Ao comparar esses parâmetros com os encontrados em trabalhos semelhantes, geralmente observam-se variações nas abundâncias de cada fragmento devido à grande dependência das condições do equipamento utilizado. Entretanto, de um modo geral, os fragmentos gerados a partir dos íons precursores são os mesmos e, conseqüentemente as transições precursor-produto, também. Dessa forma, é possível encontrar trabalhos que confirmam os fragmentos apresentados na tabela 4 (Locatelli *et. al.*, 2011; Melis *et. al.*, 2011).

Uma segunda etapa de otimização envolveu a fonte de ionização. Todas as moléculas presentes na amostra são ionizadas da mesma forma. Não há como identificá-las antes do espectrômetro de massas e, portanto, não é possível gerar uma ionização ótima para cada analito. Dessa forma, após a otimização dos parâmetros MRM, escolhe-se um analito que apresentou sinais de menor intensidade e otimiza-se a ionização tomando por base este analito.

Novamente o processo é univariado e automático. A tabela 5 apresenta os resultados desta otimização.

Tabela 5. Parâmetros ótimos da fonte de ionização *ESI*.

Parâmetro	Valor
<i>Curtain Gas</i> (psi)	12
<i>Collision Gas</i> (psi)	6
<i>Ion Spray Voltage</i> (V)	5500
<i>Temperature</i> (°C)	450
<i>Ion Source Gas 1</i> (psi)	50
<i>Ion Source Gas 2</i> (psi)	45

A última etapa de otimização envolveu o método cromatográfico. O objetivo era variar parâmetros como vazão e gradiente da fase móvel, volume de injeção e temperatura da coluna cromatográfica para que se obtivesse um cromatograma capaz de apresentar todos os analitos satisfatoriamente separados com um baixo tempo total de análise. Somando-se a isto, o espectrômetro de massas empregado neste trabalho é altamente seletivo, o que implica na possibilidade de avaliação individual de cada uma das transições atribuídas ao analito sem a interferência das demais transições precursor-produto, tanto do próprio analito quanto de outras substâncias investigadas. Portanto, não houve, durante a etapa inicial de desenvolvimento do método, necessidade de separar cromatograficamente todos os analitos. Os parâmetros instrumentais, bem como as condições finais utilizadas para obtenção de uma análise cromatográfica satisfatória são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6. Parâmetros cromatográficos otimizados. A fase móvel é composta de água ultrapura (solvente A), metanol (solvente B) e 0,01% de ácido fórmico.

Parâmetro	Valor
Vazão da fase móvel	300 µL/min

Temperatura da coluna	20 °C
Volume de injeção	2 µL
Gradiente de fase móvel	0-3 min: 10-50% B; 3.1 min: 100% B*

*A porcentagem de metanol sobe gradativamente de 10% a 50% nos primeiros 3 min e em 3.1 min é elevada instantaneamente a 100%, ficando assim até o fim da corrida.

A tabela 7 mostra os valores obtidos para os tempos de retenção cromatográficos.

Tabela 7. Tempos de retenção obtidos para as substâncias químicas investigadas neste trabalho.

Substância	Tempo de retenção (min)
EME	0,36
ECG	0,46
AMP	0,94
MAMP	1,12
MDEA	1,59
Levamisol	1,75
MBDB	1,88
MDA	2,16
MDMA	2,17
COC	2,28
AEME	2,29
AE	3,06
Nor-COC	3,07
BE	3,07
Nor-BE	3,18
Fenacetina	3,96
CBD	4,79
OH-THC	4,79
THC-COOH	4,86

Ao se utilizar as propriedades de separação combinadas do método cromatográfico e do equipamento de espectrometria de massas, convém mencionar que, mesmo que dois ou mais analitos diferentes coeluem cromatograficamente e cheguem ao primeiro quadrupolo no mesmo instante, o

equipamento irá monitorar a fragmentação de cada analito de forma separada levando-se em conta a massa/carga do íon produto gerado, bem como a do íon precursor. Sendo assim, em uma última análise, os únicos analitos que não poderiam coeluir durante a análise cromatográfica seriam aqueles que apresentassem mesma relação massa carga do íon-precursor e o mesmo perfil de fragmentação, o que iria culminar na geração de transições precursor-produto idênticas. Como exemplo, é possível observar na Tabela 4 que tanto a fenacetina quanto o MDA apresentam íon precursor com m/z de 208,2. Entretanto, além de não coeluirem, as transições formadas para ambas substâncias à partir do íon precursor são diferentes entre si.

A figura 8 apresenta os cromatogramas das transições de quantificação de cada um dos 19 reagentes.

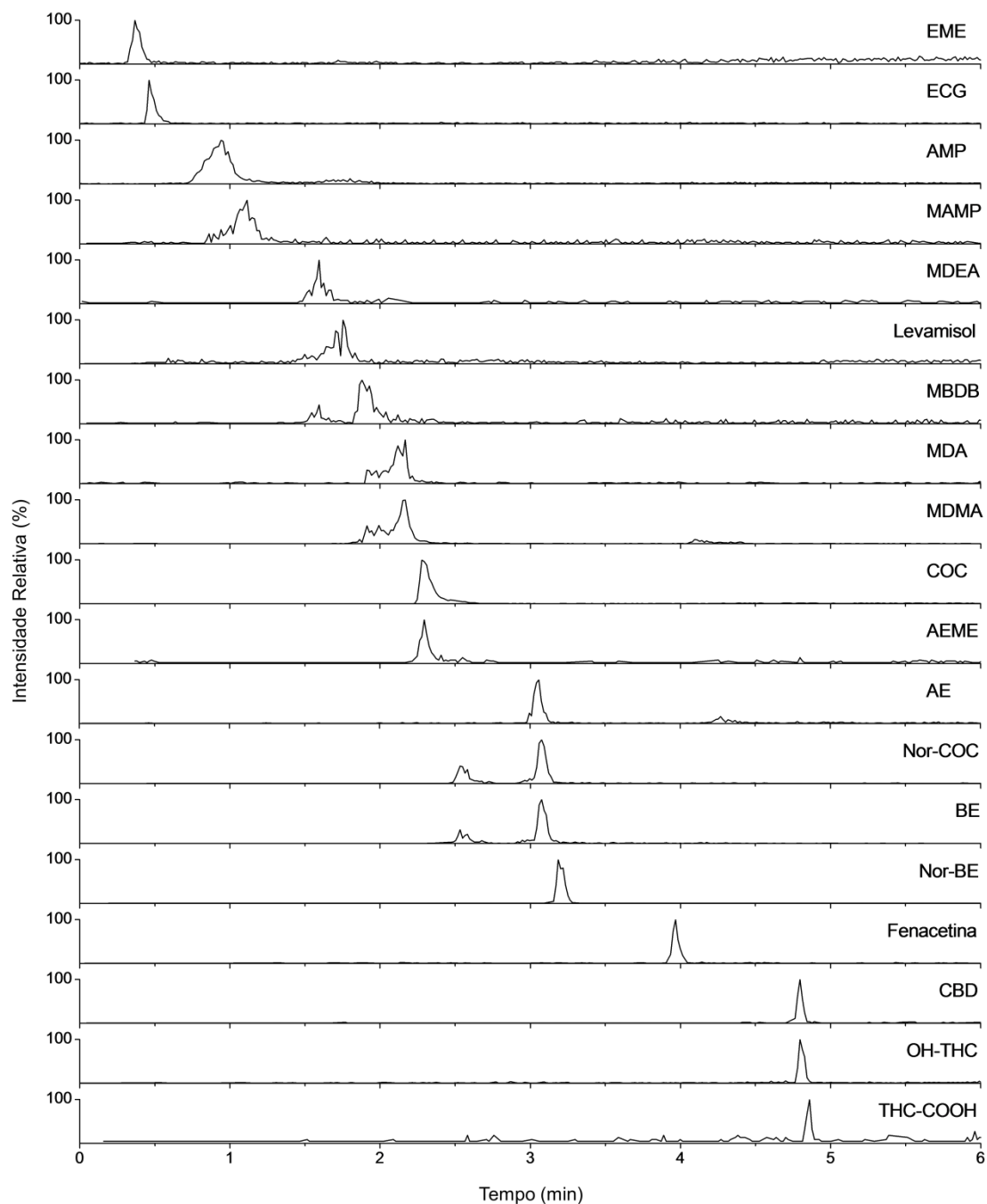


Figura 8. Cromatogramas das transições de quantificação, segundo tabela 4, para os analitos estudados neste trabalho.

Ao se avaliar as 55 transições atribuídas aos 19 analitos mostrados na Tabela 4, é possível observar que existem duas transições precursor-produto idênticas. A transição com m/z 208.3 \rightarrow 77,2 aparece para MDEA e MBDB. Neste caso, as substâncias não coeluem cromatograficamente e as transições não são empregadas para quantificação, o que não implica em nenhum tipo de problema para a análise. Entretanto, esta mesma condição não é satisfeita ao se avaliar a

transição com m/z 290,2 \rightarrow 168,2. Esta transição precursor-produto é empregada para quantificação dos analitos BE e Nor-COC, substâncias estas que apresentam tempo de retenção bastante próximos, como é possível observar na Tabela 7. Desta maneira, houve uma preocupação mais intensificada com relação à otimização dos parâmetros cromatográficos de modo que ambas as substâncias não apresentassem picos sobrepostos.

Os parâmetros da Tabela 6 foram obtidos através de algumas repetições onde os mesmos foram variados para que se obtivesse uma corrida cromatográfica com as características requeridas.

Os solventes água e metanol, bem como o ácido fórmico utilizado como aditivo da fase móvel, têm sido empregados em trabalhos semelhantes (Ort *et. al.*, 2014) e têm se mostrado adequados para a determinação de substâncias pertencentes às mesmas classes investigadas neste trabalho. O propósito do aditivo é melhorar a ionização dos analitos sob o modo de polarização positivo da fonte de ionização por eletronebulização. A opção de elevar instantaneamente a porcentagem de metanol de 50% para 100% aos 3,1 min foi feita com objetivo de diminuir o tempo final da corrida cromatográfica. Em testes preliminares, observou-se uma janela de vários minutos entre a maioria dos analitos e os canabinóides. Provavelmente, estes últimos ligam-se mais fortemente à fase estacionária da coluna cromatográfica devido à sua menor polaridade em comparação aos demais analitos.

5.1.2. Planejamento Fatorial - método de extração

Com a definição de todos os parâmetros instrumentais necessários para se detectar e quantificar os analitos, a etapa de preparo da amostra representa a etapa seguinte para que se construa um método analítico capaz de quantificar drogas de abuso e seus metabólitos em amostras de esgoto bruto. Devido à complexidade da matriz e às baixas concentrações esperadas dos compostos-alvo nas amostras naturais, esta etapa foi de suma importância para o desenvolvimento do método. A extração em fase sólida foi o procedimento escolhido para a extração dos analitos considerando-se a ampla utilização desta

etapa em inúmeros trabalhos semelhantes que obtiveram sucesso na determinação de drogas em esgoto (Bisceglia *et. al.*, 2013; Castiglioni *et. al.*, 2006; Gheorghe *et. al.*, 2007).

Apesar de muitos trabalhos realizarem uma etapa de filtração do esgoto bruto antes da extração em fase sólida, alguns estudos demonstram perdas na recuperação advindas dessa etapa (Heuett *et. al.*, 2015), motivo pelo qual optou-se por utilizar apenas chumaços de lã para reter o material particulado mais grosseiro.

Para desenvolver um método de extração baseado em *SPE* (do inglês, *solid phase extraction*) é essencial que o mesmo seja capaz de extrair diferentes analitos de interesse do esgoto bruto, com boa exatidão em termos de recuperação. Considerando-se que os analitos selecionados neste trabalho pertencem a diferentes classes optou-se por utilizar uma fase adsorvente em *SPE* constituída de um co-polímero com grupamento hidrofílicos e lipofílicos. Além disso, foi realizado um planejamento fatorial 2^3 para se estudar diferentes condições de pH da amostra, de condicionamento da fase sólida e eluição dos analitos de interesse. Para o condicionamento e para a eluição, os dois níveis escolhidos foram metanol e mistura de metanol e acetonitrila 60/40. Para o pH, optou-se por testar os valores 2 e 6. Tais valores foram escolhidos tomando por base trabalhos que obtiveram bons resultados para drogas de abuso em esgoto. Feitosa demonstrou em seu trabalho boas recuperações para COC e BE utilizando a mistura metanol/acetonitrila e valores de pH 2 e 6. Demonstrou também uma diminuição nas recuperações causada pela adição de uma etapa de lavagem, motivo pelo qual se decidiu não utilizar lavagem neste trabalho (Feitosa, 2012).

As figuras 9 e 10 mostram as recuperações obtidas para cada analito de interesse, obtidas em cada um dos 8 ensaios realizados para o planejamento fatorial.

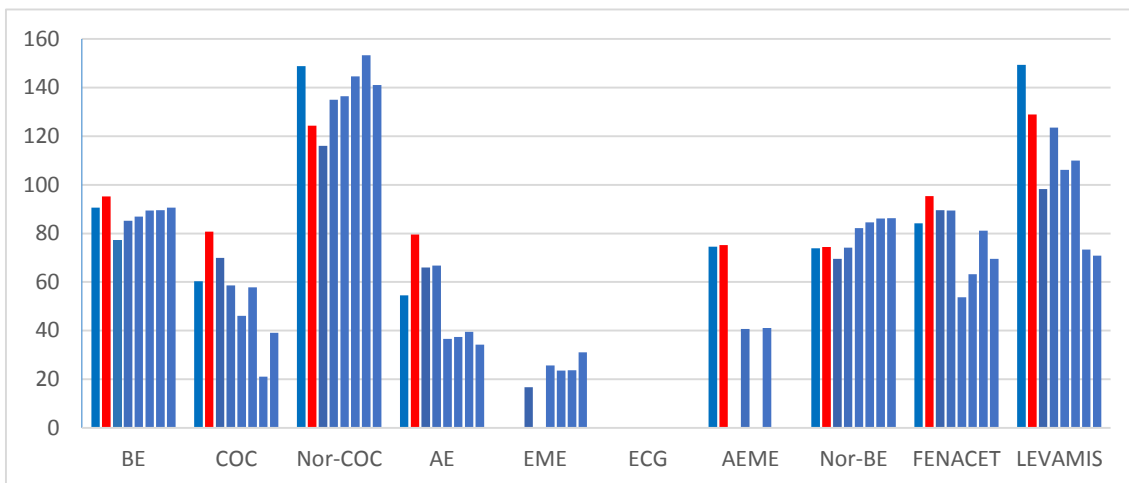


Figura 9. Percentagens médias de recuperação para os cocaínicos e adulterantes, ordenadas, respectivamente, para os ensaios de 1 a 8, com destaque para o ensaio 2.

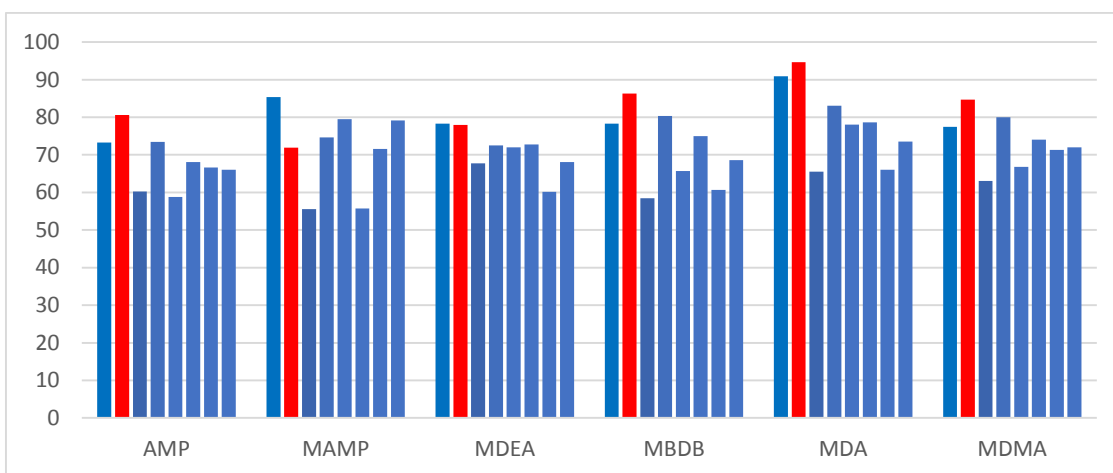


Figura 10. Percentagens médias de recuperação para os anfetamínicos, ordenadas, respectivamente, para os ensaios de 1 a 8, com destaque para o ensaio 2.

O principal objetivo do planejamento fatorial, além de avaliar os efeitos de cada variável testada sobre as recuperações dos analitos, é encontrar o método de tratamento de amostra que apresente melhores recuperações para o máximo de compostos possível, já que se quer extraí-los de uma só vez. O ensaio 2, no qual foi utilizado metanol/acetonitrila para o condicionamento, metanol para a eluição e pH da amostra igual a 2, foi escolhido para ser utilizado nas análises seguintes por apresentar melhores recuperações para a maioria dos analitos. Nos casos em que o ensaio 2 não se apresenta como melhor opção (Nor-COC, MAMP e MDEA), este ainda apresenta valores de recuperação aceitáveis, sendo estes de 70% a 130% para substâncias em concentração-traço (U.S.EPA, 2010).

Observando as figuras 9 e 10 pode-se perceber que o ensaio 1, no qual foi utilizada a mistura metanol/acetonitrila tanto no condicionamento quanto na eluição e pH 2 para a amostra, também apresentou resultados satisfatórios para alguns dos analitos. No entanto, para COC e AE observou-se recuperações abaixo de 70%. Percebe-se ainda que, para alguns analitos, como COC, AEME, fenacetina e levamisol, há uma menor recuperação nos últimos 4 ensaios, onde foi utilizado pH 6 nas amostras de esgoto.

Não se obteve valores de recuperação satisfatórios para a substância EME e a ECG bem como os canabinóides não foram recuperados. Os cocaínicos EME e ECG provavelmente não puderam ser recuperados devido à sua alta polaridade, fator desfavorável à recuperação em caso de matriz aquosa e cartucho Strata X®, incapaz de reter analitos através de interações eletrostáticas. Outros trabalhos obtiveram resultados satisfatórios para tais substâncias utilizando cartuchos de troca catiônica (Vazquez-Roig *et. al.*, 2010). Já para os canabinóides imagina-se que tenha ocorrido o contrário. Devido à sua baixa polaridade, é provável que estes tenham ficado retidos à fase sólida do cartucho e sua eluição com os solventes testados não tenha sido possível. Observa-se em trabalhos com canabinóides em esgoto que solventes mais apolares são utilizados na eluição, ou que cartuchos mais adequados especificamente a este grupo de substâncias são utilizados (Vazquez-Roig *et. al.*, 2010; Nefau *et. al.*, 2013)

Os efeitos de cada variável estudada, bem como suas interações, foram calculados com o objetivo de demonstrar quais desses fatores têm influência estatisticamente significativa sobre os valores de recuperação. O valor de um efeito representa a influência causada pela passagem do nível 1 para o nível 2 das variáveis do planejamento fatorial. Sendo assim, se o valor de um efeito é positivo e considerável, quer dizer que a utilização do nível 2 daquela variável traz melhoras às recuperações.

As tabelas 8 e 9 trazem os valores calculados dos efeitos e de suas interações acompanhados de seus erros-padrão.

Tabela 8. Valores dos efeitos calculados, em porcentagem, para os cocaínicos e adulterantes, seus erros-padrão e intervalos de confiança para $t_{8,95\%}$.

Efeito	BE	COC	Nor-COC	AE	EME	AEME	Nor-BE	Fenac.	Levam.
<i>Principais</i>									
1 (Condic.)	-4,9	-4,9	-31,5	-6,8	-23,1	5,5	-49,6	0,2	8,3
2 (Eluição)	4,1	27,2	2,2	28,1	-2,9	32,7	1,9	2,3	7,8
3 (pH)	2,0	-8,9	8,2	-7,0	21,8	-25,3	11,8	-22,7	-41,1
<i>Interação</i>									
12	0,5	11,1	1,2	2,7	-1,8	-12,3	0,5	-8,1	3,6
13	6,8	9,7	13,5	10,5	-2,8	4,9	2,6	8,5	2,4
23	-2,3	-12,3	-4,2	-17,8	5,5	12,0	-0,7	-3,2	-7,1
123	-1,2	-8,0	-11,4	-18,2	6,6	-32,3	-1,6	-2,4	-6,8
S _{efeito}	2,9	2,3	2,1	2,7	1,3	6,3	2,3	8,0	9,7
I.C	6,7	5,3	4,7	6,2	3	14,5	5,4	18,6	22,4

Tabela 9. Valores dos efeitos calculados, em porcentagem, para os anfetamínicos, seus erros-padrão e intervalos de confiança para $t_{8,95\%}$.

Efeito	AMP	MAMP	MDEA	MBDB	MDA	MDMA
<i>Principais</i>						
1 (Condic.)	-3,6	-2,9	-8,1	-9,3	-13,5	-4,2
2 (Eluição)	7,3	-2,6	3,3	11,8	7,3	8,0
3 (pH)	7,3	-2,6	3,3	11,8	7,3	8,0
<i>Interação</i>						
12	-1,0	16,0	3,0	3,1	5,2	0,8
13	6,5	10,7	-0,1	3,6	4,9	5,4
23	-3,0	-5,5	1,1	-3,2	-3,3	-4,1
123	-4,0	-0,3	0,5	-3,8	-1,7	-4,1
S _{efeito}	1,8	8,3	2,7	2,3	2,9	2,3
I.C	4,3	19,2	6,3	5,2	6,7	5,2

Considera-se estatisticamente significativo o efeito que tiver valor maior que o intervalo de confiança. Este, por sua vez, é o resultado do produto entre o erro-padrão do efeito e o valor do t de *Student*, que neste caso foi tomado como 2,3 por corresponder a 95% de confiança e 8 graus de liberdade.

Observando então as tabelas 8 e 9, percebe-se que para a maioria dos cocaínicos o condicionamento ou eluição apresentam efeitos significativos, o que também se observa nos anfetamínicos. Tais efeitos, quando significativos, são negativos para o condicionamento e positivos para a eluição, demonstrando novamente que a mistura metanol/acetona no condicionamento e metanol na

eluição apresentam melhores resultados de recuperação no contexto onde se quer extrair todos os analitos ao mesmo tempo.

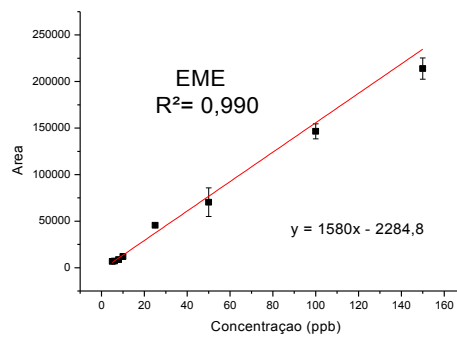
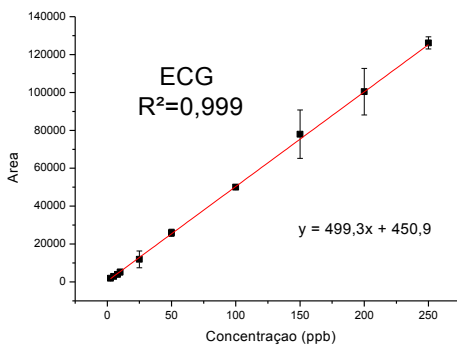
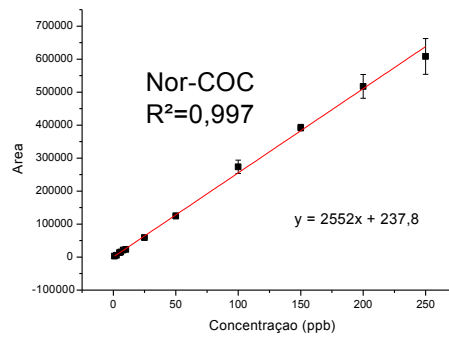
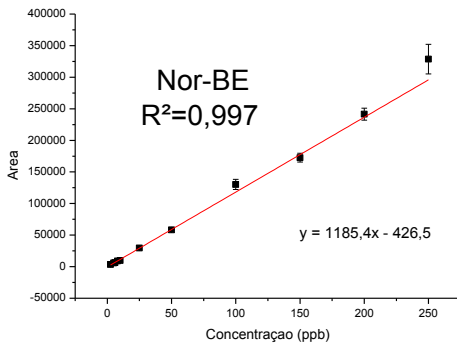
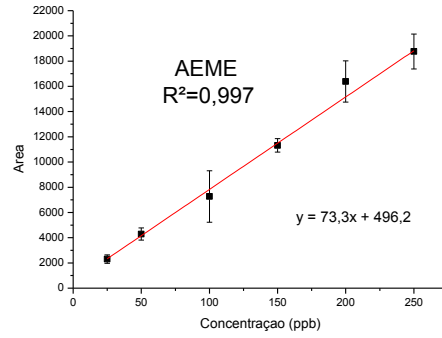
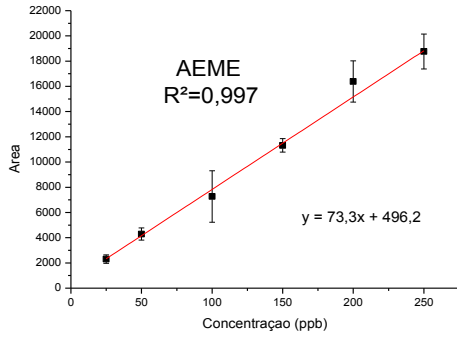
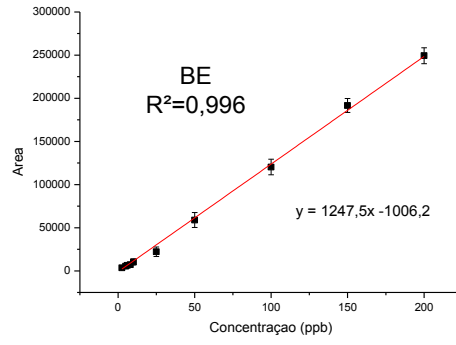
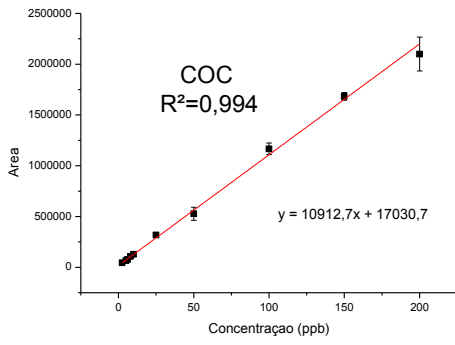
O pH apresenta efeitos positivos em alguns anfetamínicos mas influencia negativamente, e com valores maiores, os analitos COC, AEME, Fenacetina e Levamisol.

Concluiu-se, portanto, que o método de extração otimizado para os propósitos deste trabalho deveria ter um condicionamento com metanol/acetonitrila 60/40 e eluição com metanol. A amostra deve ter o pH ajustado a 2 antes do processo de extração.

5.2. Análise de esgoto e estimativa de consumo

As amostras de esgoto coletadas nas ETEs Norte e Sul passaram por extração segundo metodologia otimizada através do planejamento fatorial. As análises foram realizadas utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas e todos os parâmetros instrumentais utilizados foram os do método analítico desenvolvido neste trabalho.

Na figura 12 estão expostas as curvas analíticas de cada analito obtidas por calibração externa, em que são utilizadas soluções-padrão das substâncias estudadas. As equações destas curvas foram posteriormente utilizadas para quantificar os analitos no esgoto.



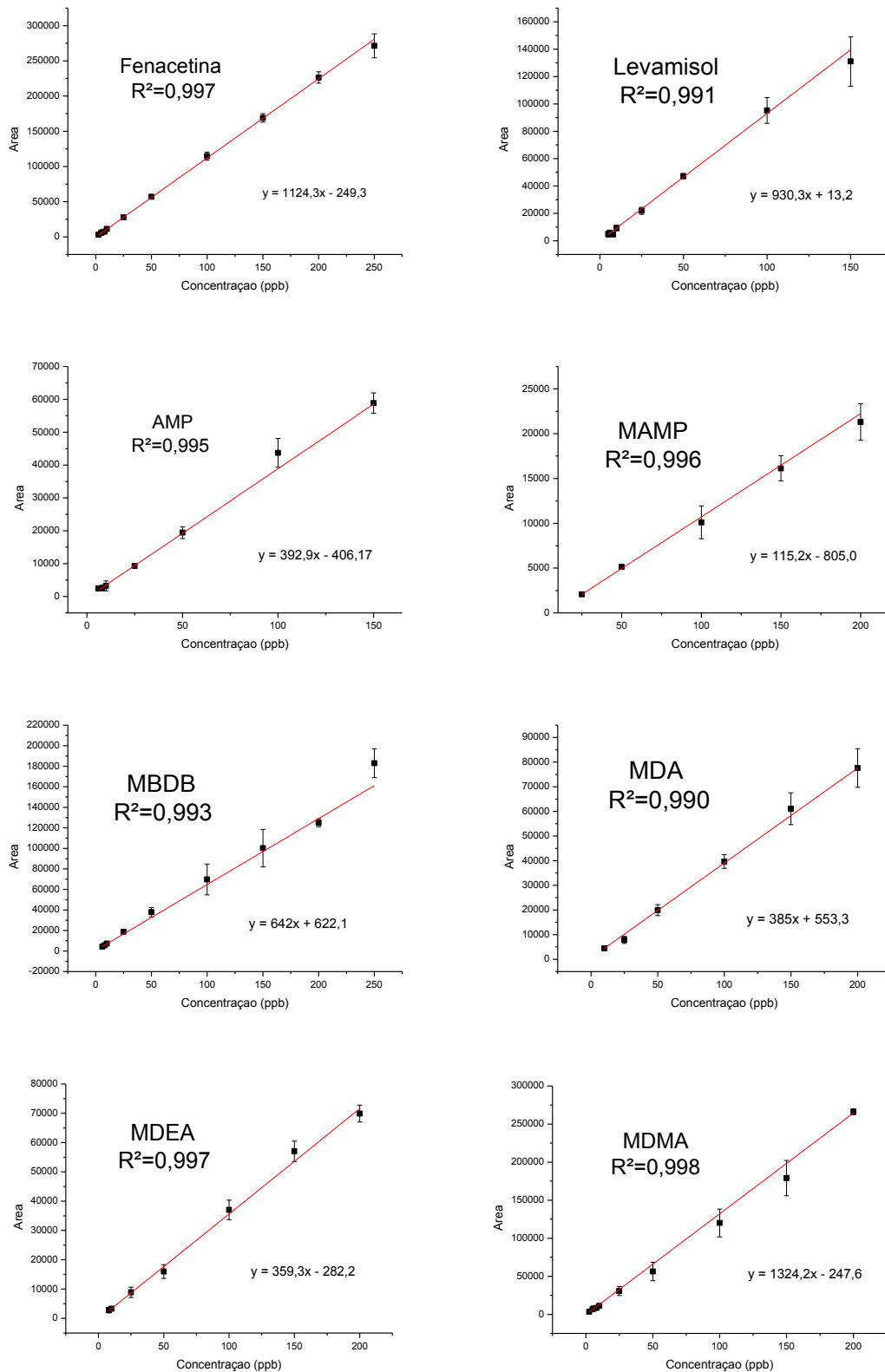


Figura 11. Curvas de calibração externa para as substâncias-alvo, valores de R^2 e equações das retas.

Como mostra a figura 11, há relação de linearidade entre a área dos picos e as concentrações das substâncias, com valores de R^2 variando de 0,990 a 0,999.

Foram coletadas amostras de esgoto bruto das ETEs Norte e Sul correspondentes ao sábado e domingo posteriores aos jogos da copa do mundo de futebol que ocorreram nas sextas-feiras dos dias 5 e 12 de Julho. Para que se pudesse novamente observar a recuperação, as amostras da copa também foram analisadas com prévia fortificação das substâncias-alvo. Dessa forma foi possível comparar o sinal obtido das amostras originais com as fortificadas e observar quanto da concentração dos analitos estava sendo recuperada. A tabela 10 apresenta as recuperações médias calculadas para as amostras da copa.

Tabela 10. Recuperações médias observadas nas análises das amostras da copa.

Analito	Recuperação
BE	86%
COC	72%
AE	71%
AEME	90%
Nor-BE	95%
Nor-COC	70%
Fenacetina	85%
Levamisol	74%
AMP	67%
MAMP	62%
MDA	78%
MDMA	76%
MDEA	72%
MBDB	87%

Como se pode observar na Tabela 10, os mesmos analitos recuperados no planejamento fatorial apresentaram novamente valores satisfatórios de recuperação. Portanto, o fato de alguns dos analitos não terem sido encontrado nas amostras da copa só pode ser atribuído à ausência destes no esgoto ou à concentração abaixo do limite de detecção do método.

Neste sentido, a Tabela 11 apresenta os limites de detecção do método para as substâncias investigadas.

Tabela 11. Limites de detecção do método para os 19 analitos investigados.

Substância	Limite de detecção (µg/L)
BE	2,5
COC	2,5
AE	6,0
AEME	25
Nor-BE	2,5
Nor-COC	2,5
ECG	6,0
EME	5,0
Fenacetina	2,5
Levamisol	5
AMP	10
MAMP	25
MDA	10
MDMA	5,0
MDEA	8,0
MBDB	6,0
CBD	25
OH-THC	50
THC-COOH	60

**Valores de L.O.D determinados experimentalmente e correspondentes à relação sinal/ruído maior que 3.*

As concentrações encontradas nas amostras de esgoto são apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12. Concentração das substâncias que foram encontradas nas amostras de esgoto. As demais substâncias não presentes na tabela não foram observadas.

Região	BE (µg/L)	COC (µg/L)	AE (µg/L)	Fenacetina (µg/L)	Levamisol (µg/L)
Norte, dia 6	5,1	0,4	2,1	0,4	0,9
Norte, dia 7	3,2	0,5	2,0	0,5	0,7
Sul, dia 6	3,9	0,4	1,7	0,4	0,4
Sul, dia 7	2,8	0,3	1,2	0,5	0,3
Norte, dia 13	3,4	0,3	2,0	0,4	0,6
Norte, dia 14	3,8	0,3	2,4	0,4	0,3
Sul, dia 13	1,8	0,2	1,4	0,8	0,4
Sul, dia 14	2,7	0,2	2,5	0,4	0,4

Dentre os 16 analitos investigados nas amostras de esgoto bruto, apenas cinco foram encontrados: os cocaínicos BE, COC e AE e os dois principais adulterantes da cocaína investigados. Apesar de nenhuma outra substância ter sido detectada, convém observar que as cinco substâncias relacionadas ao uso de cocaína foram encontradas em todas as amostras investigadas, evidenciando a ubiquidade das mesmas, bem como o padrão de uso de cocaína pela sociedade. Enquanto que a concentração de BE é comumente utilizada para se estimar o consumo de cocaína (van Nuijs *et al.*, 2011), a presença de AE em amostras de esgoto pode ser utilizada para diferenciar as formas de consumo desta droga, uma vez que a AE está diretamente associada a desidratação da cocaína e, conseqüentemente, ao consumo da droga na forma de base livre fumada (como no *crack*).

Entretanto, diferentemente das situações nas quais é possível estimar o consumo total de cocaína empregando-se a BE, ainda existem poucos dados na literatura que suportem o uso de AE para possibilitar seu uso para se estimar o consumo de crack. Isto ocorre por dois motivos principais. Primeiramente, a AE tem sido pouco investigada em trabalhos ao redor do mundo, já que a perspectiva de consumo de cocaína na forma de base livre fumada tem sido restrito a países sul-americanos, já que o custo desta droga é menor em comparação à droga na forma de sal cloridrato (inalável). Em segundo lugar, existe uma carência de informações na literatura associadas à AE que permitam a realização de cálculos de estimativa de consumo, tais como taxa de metabolização e proporção de produção de AEME, precursor da AE, durante a queima do crack. Neste último caso, é importante mencionar que a produção de

AEME poderá depender de aspectos pouco passíveis de controle, tais como condições e/ou habilidade do usuário em manusear e fumar a droga.

A fenacetina e o levamisol são adulterantes que podem ajudar os órgãos públicos responsáveis a identificar a origem da cocaína consumida. O projeto PeQui, desenvolvido pela Polícia Federal, tem o objetivo de traçar o perfil químico das impurezas da cocaína e tais fármacos já foram identificados como adulterantes da cocaína consumida no Brasil (Botelho *et al.*, 2014. Zacca *et al.*, 2014). De maneira geral, tais trabalhos indicam uma prevalência de fenacetina utilizada como adulterante em amostras de cocaína base livre, isto é, que poderiam ser utilizadas diretamente na forma fumada e, de forma complementar, o levamisol como adulterante presente em amostras de cocaína sal cloridrato. Como o comércio lícito de tais adulterantes é virtualmente inexistente no Brasil, os resultados obtidos neste trabalho propõem que outros indicadores de forma de uso de cocaína e que poderiam orientar políticas de segurança e saúde pública.

Para se estimar o consumo de cocaína nas regiões atendidas pelas ETEs Norte e Sul, nos finais de semana de dois jogos da copa do mundo, utiliza-se as concentrações de BE em um retrocálculo proposto por Zuccato (2005), o qual também leva em conta a vazão de esgoto que chega à ETE bem como o número de habitantes atendidos por ela e a taxa de metabolização da COC em BE.

A tabela 13 apresenta o consumo de cocaína estimado baseado nas concentrações de BE da tabela 12.

Tabela 13. Estimativa do consumo de cocaína para os finais de semana de jogos da copa do mundo em Brasília.

Região Atendida	Vazão (L/dia)	Consumo (g/dia×1000hab)	Consumo (doses/dia×1000hab)
Norte, dia 6	35620000	2,28	22,8
Norte, dia 7	34032000	1,36	13,6
Sul, dia 6	79221600	1,39	13,9
Sul, dia 7	71377669	0,90	9,1
Norte, dia 13	53782000	2,28	22,8
Norte, dia 14	58160000	2,75	27,5
Sul, dia 13	76643999	0,62	6,3
Sul, dia 14	69091200	0,82	8,25

É possível observar, nos dois finais de semana, um consumo consideravelmente mais concentrado na região norte, que abrange Asa Norte, Lago Norte, Varjão e S.C.I.A (Estrutural). No entanto, esse maior consumo na região norte já havia sido observado em estudos realizados em 2010 e 2012 (Maldaner *et al.*, 2012. Feitosa, 2012).

Feitosa (2012) estimou também o perfil de consumo semanal de cocaína na região norte de Brasília por meio do cálculo da estimativa de consumo da droga em todos os dias de uma semana, entre 19 a 25 de abril de 2012. Neste estudo, observou picos de consumo nos finais de semana e vales durante a semana, evidenciando que existem variações significativas ao se comparar o consumo durante uma semana típica. Considerando-se apenas os dados calculados por Feitosa (2012) para os dias de sábado e domingo, é possível estabelecer um comparativo entre os resultados calculados neste trabalho e aqueles gerados durante um final de semana em que não houve um evento social de grandes proporções, tal quais aqueles que ocorreram durante a Copa do Mundo da FIFA. A Figura 12 mostra os resultados obtidos em 2012 e aqueles produzidos neste trabalho.

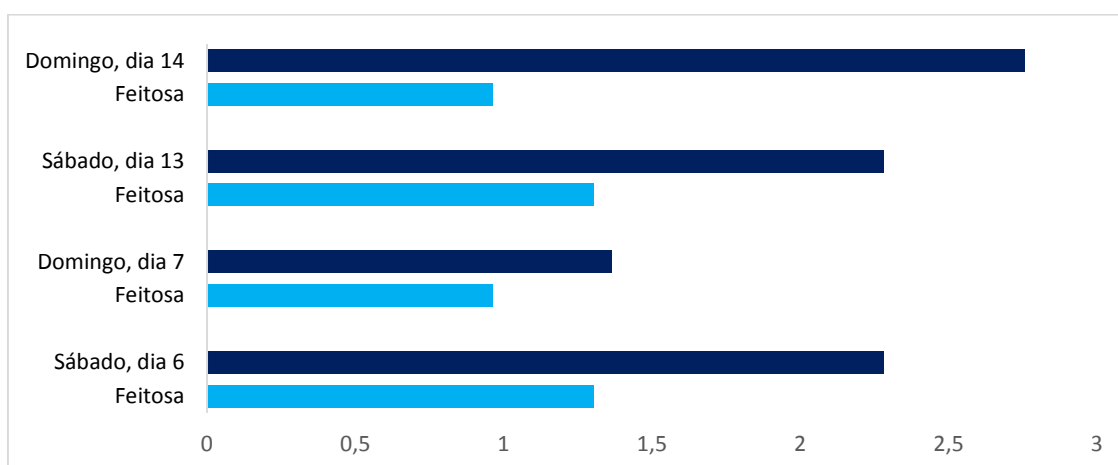


Figura 12. Consumo estimado de COC obtido por Feitosa (2012) e por este trabalho para a ETE Norte (g/dia x 1000 hab).

Observando a figura 12 percebe-se que, em dias da semana equivalentes, o consumo de COC estimado para os finais de semana de jogos

da copa são consideravelmente maiores que os de um final de semana normal de 2012. Um aumento tão grande não era esperado para um período de apenas 2 anos, já que, segundo o Relatório Mundial sobre drogas (UNODC, 2014), o consumo de cocaína na América do Sul não teve aumento considerável, seguindo apenas o aumento populacional. Além disso, comparando-se as estimativas de consumo realizadas em 2010 por Maldaner e colaboradores (2012) e em 2012 por Feitosa (2012) observa-se que as estimativas de 2012 são menores na maioria das regiões de Brasília. Sendo assim, é possível que esse grande consumo observado nos finais de semana de jogos da copa tenha relação com o grande número de visitantes atraídos pelo evento. Entretanto, esta prerrogativa ainda precisa ser balizada em função do possível aumento da população flutuante durante os períodos de jogos da Copa do Mundo da FIFA em Brasília, já que muitos turistas certamente ficaram hospedados nos Setores Hoteleiros Sul e Norte, regiões estas que também fazem parte daquelas atendidas pelas ETE Brasília Sul e Norte.

A tabela 14 mostra o consumo de COC estimado em vários países no mundo através da epidemiologia do esgoto.

Tabela 14. Consumo de cocaína em vários países do mundo estimado através de epidemiologia do esgoto.

País	Consumo (g/dia×1000hab)	Referência
Espanha	1,79	Postigo <i>et. al.</i> , 2010
China	2,8	Khan <i>et. al.</i> , 2014
França	0,1 a 2,4*	Nefau <i>et. al.</i> , 2013
Reino Unido	0,9	Kasprzyk-Hordern <i>et. al.</i> , 2008
Brasil	0,92	Maldaner <i>et. al.</i> , 2012
Brasil	1,08	Feitosa, 2012
Brasil	2,18	Presente trabalho

*Consumo variando e tendo picos nos fins de semana.

Observando a Tabela 14 é possível perceber que o consumo no Brasil se equipara a outros países, como China e Espanha. Isso indica que a epidemiologia do esgoto pode ser aplicada em diferentes localidades e a diferentes situações. Como é o caso deste trabalho, que estimou o consumo de cocaína durante um evento de grande magnitude. No entanto, há sempre que se considerar as limitações da ferramenta, que giram em torno da necessidade da existência de amostras de esgoto com boa representatividade e regiões bem atendidas por estações de tratamento de esgoto.

Mais recentemente, Bijlsma e colaboradores estimaram o consumo de diferentes drogas de abuso durante um grande festival de música em Valencia – Espanha, que reuniu cerca de 40 mil jovens. Os resultados mostraram aumentos consideráveis nas concentrações de BE, COC, MDMA e THC-COOH no esgoto (Bijlsma *et. al.*, 2014). Em 2011, Gerrity e colaboradores já haviam sugerido uma elevação no consumo de cocaína durante o final de semana do evento esportivo *Super Bowl* (Gerrity *et. al.*, 2011). Dessa forma, o elevado consumo observado nos finais de semana da Copa do Mundo Fifa pode ser atribuído ao grande número de visitantes atraídos pelo evento.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi desenvolvido com sucesso um método analítico capaz de quantificar simultaneamente 14 analitos diferentes, dentre eles drogas de abuso inalteradas e alguns de seus metabólitos, em amostras de esgoto bruto. Das 19 substâncias avaliadas inicialmente, apenas os canabinóides e 2 metabólitos da cocaína, ECG e EME, não puderam ser recuperados no método de extração em fase sólida desenvolvido aqui. No entanto, os parâmetros instrumentais e cromatográficos que possibilitam a determinação analítica foram otimizados para as 19 substâncias. Tais parâmetros instrumentais são úteis para futuros trabalhos que utilizem equipamento semelhantes.

O planejamento fatorial demonstrou que a extração com pH da amostra ajustado a 2, o condicionamento com 6 mL de metanol/acetonitrila 60/40 e 3 mL de água e a eluição com 6 mL de metanol apresenta resultados satisfatórios de recuperação para 14 dos 19 analitos propostos para este trabalho.

5 diferentes substâncias foram detectadas em todas as amostras de esgoto analisadas: COC, BE, AE, fenacetina e levamisol, evidenciando o consumo de cocaína pelas populações investigadas. A presença de AE e fenacetina indica o consumo de cocaína na forma fumada (*crack*). A concentração de BE foi utilizada para estimar o consumo de cocaína, que variou de 6,3 a 27,5 doses de 100 mg por dia para cada 1000 habitantes

Sendo assim, este trabalho contribui de maneira geral para consubstanciar a epidemiologia do esgoto como alternativa viável à produção de estimativas de consumo de drogas de abuso.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAKER, D. R; KASPRZYK-HORDERN, B. Critical evaluation of methodology commonly used in sample collection, storage and preparation for the analysis of pharmaceuticals and illicit drugs in surface water and wastewater by solid phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of chromatography**. v.218, p. 8036–8059, 2011.

BARTELT-HUNT, S., SNOW, D., DAMON, T., SHOCKLEY, J. & HOAGLAND, K. The occurrence of illicit and therapeutic pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters in Nebraska. **Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)** v.157, p. 786–791, 2009.

BIJLSMA, L., SERRANO, R., FERRER, C., TORMOS, I. & HERNÁNDEZ, F. Occurrence and behavior of illicit drugs and metabolites in sewage water from the Spanish Mediterranean coast (Valencia region). **Science of The Total Environment**. 487, p. 703-709, 2014.

BISCEGLIA, K.; LIPPA, K. Stability of cocaine and its metabolites in municipal wastewater – the case for using metabolite consolidation to monitor cocaine utilization. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 21, p. 4453-4460, 2013.

BOTELHO, E. D.; CUNHA, R. B.; CAMPOS, A. F. C.; MALDANER, A. O. Chemical Profiling of Cocaine Seized by Brazilian Federal Police in 2009-2012: Major Components. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 25, n. 4, p. 611-618, 2014.

CASTIGLIONI, S.; ZUCCATO, E.; CHIABRANDO, C.; FANELLI, R.; BAGNAT, R. Identification and measurement of illicit drugs and their metabolites in urban wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Anal. Chem.** v. 78, p. 8421-8429, 2006.

COBIAC, L.; VOS, T.; DORAN, C.; WALLACE, A. Cost-effectiveness of interventions to prevent alcohol-related disease and injury in Australia. **Addiction**. v. 104, p. 1646, 2009.

DAUGHTON, C. G.; JONES-LEPP, T. L. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Scientific and Regulatory Issues. **American Chemical Society**. Cap 20, p. 348-364, 2001.

European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). **Assessing illicit drugs in wastewater – potential and limitations of a new monitoring approach**. Luxemburgo, 2010.

FEITOSA, R. S. **Determinação de cocaína e benzoilecgonina em amostras de esgoto bruto do Distrito Federal como suporte a realização de estimativas de consumo**. Dissertação (mestrado em química) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2012.

GHEORGHE, A. *et al.* Analysis of cocaine and its principal metabolites in waste and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography–ion trap tandem mass spectrometry. **Anal. and Bioanal. Chem.**, v. 391, p. 1309-1319, 2007.

GOLDSTEIN, R. A; DESLAURIERS, C.; BURDA, A. M. Cocain: history, social implications and toxicity – a review. **Dis. Mon.** v. 55, p. 6-38, 2009.

GONZÁLEZ-MARIÑO, I.; QUINTANA, J. B.; RODRÍGUEZ, I.; CELA, R. Determination of drugs of abuse in water by solid-phase extraction, derivatisation and gas chromatography- ion trap- tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**. v. 1217, p. 1748-1760, 2010.

HALL, W. *et. al.* An analysis of ethical issues in using wastewater analysis to monitor illicit drug use. **Addiction**, v. 107, p. 1767–1773, 2012.

HARMAN, C.; REID, M.; THOMAS, K. In situ calibration of a passive sampling device for selected illicit drugs and their metabolites in wastewater, and subsequent year-long assessment of community drug usage. **Environmental science & technology**, v. 45, p. 5676–5682, 2011.

HUERTA-FONTELA, M., GALCERAN, M.; VENTURA, F. Stimulatory Drugs of Abuse in Surface Waters and Their Removal in a Conventional Drinking Water Treatment Plant. **Environmental Science & Technology**, v. 42, p. 6809-6816, 2008.

HEUETT, N. V., RAMIREZ, C. E., FERNANDEZ, A., GARDINALI, P. R. Analysis of drugs of abuse by online SPE-LC high resolution mass spectrometry: Communal assessment of consumption. **Science of The Total Environment**. 515, p. 319-330, 2015.

HUERTA-FONTELA, M., GALCERAN, M.; VENTURA, F. Ultra performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Analysis of Stimulatory Drugs of Abuse in Wastewater and Surface Waters. **Analytical Chemistry**, v. 79, p. 3821-3829, 2007.

KHAN, U. *et al.* Application of a sewage-based approach to assess the use of ten illicit drugs in four Chinese megacities. **Science of The Total Environment**. 487, p. 710-721, 2014.

KASPRZYK-HORDERN, B.; DINSDALE, R.; GUWY, A. The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. **Water Research**, v. 42, p. 3498–3518, 2008.

LANGFORD, K.; REID, M.; THOMAS, K. Multi-residue screening of prioritised human pharmaceuticals, illicit drugs and bactericides in sediments and sludge. **Journal of environmental monitoring** : v.13, p. 2284–2291, 2011.

LOCATELLI, M. A. F. **Avaliação da presença de antibióticos e drogas ilícitas na bacia de Rio Atibaia**. 2011. Tese (doutorado em ciências) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2011.

LOGANATHAN, B.; PHILLIPS, M.; MOWERY, H.; JONES-LEPP, T. Contamination profiles and mass loadings of macrolide antibiotics and illicit drugs from a small urban wastewater treatment plant. **Chemosphere**, v. 75, p. 70–77, 2009.

MACKULAK, T. *et al.* National study of illicit drug use in Slovakia based on wastewater analysis. **The Science of the total environment**, v. 494-495, p. 158–165, 2014.

MALDANER, A. O.; SHIMIDT, L. L.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F.; SODRÉ, F. F.; ALMEIDA, F. V.; PEREIRA, C. E. B.; SILVA, C. M. Estimating cocaine consumption in the Brazilian Federal District (FD) by sewage analysis. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 23, n. 5, p. 861-867, 2012.

NEFAU, T.; KAROLAK, S.; CASTILLO, L.; BOIREAU, V.; LEVI, Y. Presence of illicit drugs and metabolites in influents and effluents of 25 sewage water treatment plants and map of drug consumption in France. **The Science of the total environment.** v. 461-462, p. 712–722, 2013.

NEFAU, T., KAROLAK, S., CASTILLO, L., BOIREAU, V. & LEVI, Y. Corrigendum to 'Presence of illicit drugs and metabolites in influents and effluents of 25 sewage water treatment plants and map of drug consumption in France'. **Sci. Total Environ.** 461–462 (2013) 712–722]. **Science of The Total Environment.** 472, 2014.

NUIJS, A. L. N.; CASTIGLIONI, S.; TARCOMNICU, I.; POSTIGO, C.; LÓPEZ DE ALDA, M.; NEELS, H.; ZUCCATO, E.; BARCELÓ, D.; COVACI, A. Illicit drug consumption estimations derived from wastewater analysis: a critical review. **Sci. Total Environ.** v. 409, p 3564-3577, 2011.

ORT, C.; LAWRENCE, M. G.; REUNGOAT, J.; MUELLER, J. F. Sampling for PPCPs in wastewater systems: comparison of different sampling modes and optimization strategies. **Environmental science & technology.** v. 44, p. 6289–6296, 2010.

PAL, R.; MEGHARAJ, M.; KIRKBRIDE, K. P.; Naidu, R. Illicit drugs and the environment- a review. **The Science of the total environment.** v. 463-464, p. 1079–1092, 2013.

POSTIGO, C.; LÓPEZ DE ALDA, M. L.; BARCELÓ, D. Drugs of abuse and their metabolites in the Ebro river basin: Occurrence in sewage and surface water, sewage treatment plants removal efficiency, and collective drug usage estimation. **Environ. Int.** 36, p. 75-84, 2010.

Secretaria Nacional Antidrogas (SENAD). **I Relatório brasileiro sobre drogas 2010.** Brasília, SENAD, 2009, 364 p.

SENTA, I., KRIZMAN, I., AHEL, M. & TERZIC, S. Assessment of stability of drug biomarkers in municipal wastewater as a factor influencing the estimation of drug consumption using sewage epidemiology. **Science of The Total Environment**. 487, p 659-665, 2014.

SUBEDI, B. & KANNAN, K. Occurrence and fate of select psychoactive pharmaceuticals and antihypertensives in two wastewater treatment plants in New York State, USA. **Science of The Total Environment**. 514, p. 273-280, 2015.

United Nations Office of Drug and Crime (UNODC). **The world drug report 2013**. Viena, 2014.

VAZQUEZ-ROIG, P.; ANDREU, V.; BLASCO, C.; PICÓ, Y. SPE and LC-MS/MS determination of 14 illicit drugs in surface waters from the Natural Park of L'Albufera (Valencia, Spain). **Anal. and Bioanal. Chem.**, v. 397, p. 2851–2864, 2010.