



# Universidade de Brasília

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTIMATIVA DO CONSUMO E PREDIÇÃO DA  
CONCENTRAÇÃO AMBIENTAL DE DIAZEPAM VIA  
EPIDEMIOLOGIA DO ESGOTO**

Guilherme Borges Alcântara

Orientador: Dr. Fernando Fabríz Sodré

Brasília, DF

2020

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **Guilherme Borges Alcântara**, matrícula nº **18/0071904**, intitulada “*Estimativa do Consumo e Predição da Concentração Ambiental do Diazepam via Epidemiologia do Esgoto*”, apresentada no (a) Auditório Azul do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 14 de fevereiro de 2020.

Prof. Dr. Fernando Fabríz Sodré  
Presidente de Banca

Prof. Dr. Jez Willian Batista Braga  
Membro Titular

Prof. Dr. Adriano Otávio Maldaner  
Membro Titular INC/PF

Prof. Dr. Cyro Lucas Silva Chagas  
Membro Suplente

Em 14 de fevereiro de 2020.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Edson e Mary, por participarem de inúmeras formas nesta jornada, tanto no fornecimento de todo o apoio e suporte necessário, como no ensinamento de princípios e valores que fizeram parte da construção do meu ser.

Ao meu irmão, Rodrigo, por apoiar todas as minhas decisões e estar sempre ao meu lado.

A todos os meus familiares e amigos que fizeram parte nesta caminhada, apoiando todas as minhas decisões.

Aos meus melhores amigos do curso, Beatriz, Damerson, Nicolas e Stefani, por estarem sempre ao meu lado, por me apoiarem em todas as minhas decisões e por fazerem parte desta trajetória acadêmica desde a graduação.

Aos meus colegas de curso por fazerem parte desta grande jornada.

Aos amigos do laboratório, Arthur, Camila, Danielle, Diogo, Fábio, Gabriel, Hadassa, Manuela, Thiago, e os demais que tiveram uma grande contribuição neste trabalho.

À CAESB por desempenhar um papel fundamental no processo de coleta de amostras.

À ANVISA pela disposição em ajudar com o fornecimento de dados de comercialização do fármaco avaliado.

À Polícia Federal, em especial ao perito Adriano Maldaner, por disponibilizar o equipamento para realização das análises.

À CAPES pelo fornecimento da bolsa.

À FAPDF pelo auxílio financeiro

À Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de Brasília pela disposição em ajudar.

E finalmente, ao meu orientador, Fernando Fabríz Sodré, por toda a paciência, correções, ideias e por contribuir com a minha formação profissional e acadêmica.

## RESUMO

Embora as benzodiazepinas sejam drogas psicotrópicas prescritas para o tratamento de transtornos de ansiedade, podem ser usadas de modo abusivo e ilícito. Seus resíduos são encontrados no esgoto doméstico e em ambientes aquáticos impactados pelo descarte de esgoto bruto ou tratado. Este trabalho buscou quantificar o diazepam, principal representante do grupo, em duas estações de tratamento de esgotos (ETE) de Brasília para estimar (i) o consumo pela população, (ii) os índices de remoção nas ETE, (iii) a concentração no Lago Paranoá e (iv) o risco ambiental. Amostras compostas (24 h) de esgoto bruto e tratado foram coletadas nas ETE Brasília Norte e Sul, ETEBN e ETEBS, respectivamente, durante 15 dias consecutivos, incluindo o período de Carnaval. Alíquotas (100 mL, pH 2,0) foram enriquecidas com diazepam deuterado (padrão *surrogate*), filtradas (GF/C e acetato de celulose 0,45 µm), submetidas extração em fase sólida (C18) e analisadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS). O método apresentou exatidão e precisão adequadas (recuperação de  $90 \pm 4\%$ ) e limites de quantificação (LOQ) e detecção (LOD) de 0,9 e 0,3 ng L<sup>-1</sup>, respectivamente. Dentre as 30 amostras de esgoto bruto, o diazepam foi quantificado em duas (1,1 e 3,5 ng L<sup>-1</sup>), ambas da ETEBS na semana seguinte ao Carnaval. Duas estimativas de consumo (mínimo e máximo) foram feitas, considerando ausência de diazepam ou níveis de diazepam iguais aos LOD ou LOQ do método nas 28 amostras restantes. O consumo estimado de 0,3 a 1,2 mg/dia/1000hab é menor que o observado em outros estudos no mundo, mas coerente com dados históricos de comercialização disponibilizados pela ANVISA. Como o diazepam não foi detectado no efluente final, o valor de LOD foi usado para estimar o índice de remoção nas ETE e prever a concentração de 0,24 pg L<sup>-1</sup> no Lago Paranoá, bem como a ausência de efeitos adversos ao ecossistema.

Palavras-chave: benzodiazepinas, desenvolvimento de método, diazepam, estimativa de consumo, risco ambiental.

## ABSTRACT

Although benzodiazepines are psychotropic drugs prescribed for the treatment of anxiety disorders, they can be used under an abusive and illicit context. Their residues are found in domestic sewage and in aquatic environments impacted by the discharge of raw or treated sewage. This work aimed the quantification of diazepam, one of the most important benzodiazepines, in two wastewater treatment plants (WWTP) in Brasília to estimate (i) its consumption by the population, (ii) its removal rates in the WWTP, (iii) its concentrations in Paranoá Lake and (iv) its environmental risk. Composed samples (24 h) of raw and treated wastewaters were collected at North and South Brasília WWTP, NBWWTP and SBWWTP, respectively, during 15 consecutive days, including the Carnival period. Aliquots (100 mL, pH 2.0) were enriched with deuterated diazepam (surrogate standard), filtered (GF/C and 0.45  $\mu\text{m}$  cellulose acetate), submitted to solid phase extraction (C18) and analyzed by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS). The method showed adequate accuracy and precision (recovery of  $90 \pm 4\%$ ) and limits of quantification (LOQ) and detection (LOD) of 0.9 and 0.3  $\text{ng L}^{-1}$ , respectively. Among the 30 samples of raw wastewater, diazepam was quantified in two (1.1 and 3.5  $\text{ng L}^{-1}$ ), both from SBWWTP in the week following Carnival. Two consumption estimates (minimum and maximum) were made, considering the absence of diazepam or the analyte levels equal to the LOD or LOQ in the remaining 28 samples. The estimated consumption of 0.3 to 1.2  $\text{mg/day/1000inhab}$  is lower than that observed in other studies around the world, but it is consistent with historical selling data provided by ANVISA. As diazepam was not detected in the final effluent, the LOD value was used to estimate removal rates in the WWTPs and to predict the concentration of 0.24  $\text{pg L}^{-1}$  in Paranoá Lake as well as the absence of adverse effects to the ecosystem.

Keywords: benzodiazepines, method development, diazepam, consumption estimate, environmental risk.

## SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	12
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	15
2.1. Benzodiazepinas .....	15
2.1.1. A epidemiologia do abuso .....	18
2.1.2. Ocorrência ambiental.....	20
2.2. Benzodiazepina selecionada para o estudo.....	22
2.2.1. Diazepam .....	22
2.2.1.1. Detecção no meio ambiente.....	24
2.2.1.2. Remoção nas estações de tratamento de esgoto .....	25
2.2.1.3. Degradabilidade.....	26
2.2.1.4. Toxicidade .....	27
2.3. Determinação de drogas psicotrópicas no esgoto .....	27
2.3.1. Amostragem e preservação de amostras .....	28
2.3.2. Preparo de amostras .....	29
2.3.3. Quantificação .....	31
2.4. Estimativa de consumo via epidemiologia do esgoto.....	34
2.5. Avaliação de risco ambiental e PEC.....	36
3.MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1. Solventes, sorventes e padrões analíticos .....	40
3.2. Instrumentação analítica .....	40
3.3. Desenvolvimento do método analítico .....	41
3.3.1. Otimização dos parâmetros instrumentais .....	41
3.3.2. Método cromatográfico .....	42
3.3.3. Método de extração em fase sólida.....	43
3.4. Pontos amostrais e coleta de amostras .....	45
3.5. Parâmetros de Mérito Analítico.....	47
3.5.1. Linearidade .....	47
3.5.2. Exatidão .....	47
3.5.3. Precisão.....	48
3.5.4. Limites de Detecção e Quantificação .....	49
4.RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	50
4.1. Desenvolvimento do método .....	50

4.1.1. Otimização dos parâmetros instrumentais .....	50
4.1.2. Método cromatográfico .....	52
4.2. Parâmetros de mérito analítico .....	54
4.2.1. Linearidade e Curva analítica .....	54
4.2.2. Exatidão e Precisão .....	55
4.2.3. Limites de Detecção e Quantificação .....	55
4.3. Quantificação de DIA no esgoto.....	56
4.4. Estimativa de consumo via WBE .....	59
4.5. Avaliação da comercialização de DIA no DF a partir de dados da ANVISA ....	64
4.6. WBE versus ANVISA .....	66
4.7. Cálculo de PEC e Avaliação de Risco Ambiental .....	68
5.CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....	71
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	73

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química geral das benzodiazepinas e algumas das substâncias mais conhecidas do grupo .....	15
Figura 2. Consumo médio global das benzodiazepinas, avaliado em períodos médios de três anos, durante 2007 e 2015 (INCB, 2016) .....	17
Figura 3. Consumo médio das benzodiazepinas nas capitais brasileiras durante 3 anos (Azevedo et al., 2014).....	18
Figura 4. Principais fontes, vias de transporte e destino dos contaminantes emergentes no meio ambiente (Apatada, Lima et al., 2017) .....	21
Figura 5. Principais metabólitos do diazepam (Adaptada, Togni, 2018) .....	23
Figura 6. Procedimento experimental da SPE (Caldas et al., 2011).....	30
Figura 7. Esquema geral de uma fonte de ESI (Adaptada, Scherf-Clavel, 2016) .....	32
Figura 8. Esquematização geral do QqQ (Adaptada, Scherf-Clavel, 2016) .....	33
Figura 9. Etapas gerais que envolvem os estudos de epidemiologia de esgoto.....	35
Figura 10. Sistema de extração para as amostras de esgoto .....	44
Figura 11. Sistema de eluição com <i>manifold</i> utilizado.....	44
Figura 12. Espectros de massa obtidos para o DIA e DIA-d5 no UPLC-QqQ .....	50
Figura 13. Fragmentação MS/MS do DIA (Niessen and A. Correa C., 2017).....	51
Figura 14. TIC e cromatogramas referentes ao DIA e DIA-d5 .....	53
Figura 15. Curva analítica para o diazepam no UPLC-QqQ.....	54
Figura 16. Cromatogramas obtidos a partir da análise das amostras de esgoto .....	58
Figura 17. Consumo mínimo de DIA durante o período de 15 dias.....	61
Figura 18. Consumo máximo de DIA durante o período de 15 dias .....	62
Figura 19. Recorte exemplificando a planilha de comercialização do diazepam durante 2011 e 2015. Fonte: ANVISA .....	65
Figura 20. Recorte exemplificando a planilha de comercialização do diazepam durante 2016 e 2018. Fonte: ANVISA .....	65
Figura 21. Recorte exemplificando a planilha obtida após o tratamento dos dados. ....	65
Figura 22. Consumo do DIA no DF estimado por WBE e estimativa da comercialização per capita calculada com dados da ANVISA .....	67
Figura 23. QTOF modelo TripleToF5600+ (Adaptada, Andrews et al., 2011) .....	84



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Drogas mais abusadas com alprazolam e diazepam (UNODC, 2017) .....	19
Tabela 2. Propriedades físico-químicas do diazepam .....	24
Tabela 3. Razão molar, taxa de excreção e fator de correção utilizados para a estimativa de consumo do diazepam.....	36
Tabela 4. Valor de PNEC utilizado neste trabalho .....	39
Tabela 5. Características do serviço de esgotamento sanitário no DF (CAESB, 2019). 45	
Tabela 6. Vazão média do esgoto de entrada nas ETE nos dias da coleta .....	46
Tabela 7. Parâmetros otimizados e os íons selecionados para cada substância .....	52
Tabela 8. Parâmetros instrumentais da fonte de ionização otimizados .....	52
Tabela 9. Parâmetros cromatográficos otimizados.....	53
Tabela 10. Parâmetros da curva analítica obtida no UPLC-QqQ.....	54
Tabela 11. Recuperação do método para o diazepam. ....	55
Tabela 12. Limites de detecção e quantificação instrumentais .....	56
Tabela 13. Limites de detecção e quantificação do método .....	56
Tabela 14. Valores de concentração do DIA encontrados nas amostras de esgoto.....	57
Tabela 15. Valores de consumo máximo e mínimo obtidos a partir da WBE .....	60
Tabela 16. Consumo médio de DIA avaliado nas regiões de cada ETE .....	63
Tabela 17. Consumo de DIA estimado via WBE em vários países .....	63
Tabela 18. Quantidade total, número de habitantes e consumo de DIA no DF durante 2011 e 2018 (IBGE, 2019) .....	66
Tabela 19. Valor de PEC e parâmetros utilizados .....	69
Tabela 20. Valores de PEC e RQ em diversas regiões.....	69
Tabela 21. Parâmetros otimizados e os íons selecionados no UHPLC-QTOF .....	85
Tabela 22. Parâmetros da fonte de ionização otimizados no UHPLC-QTOF.....	85
Tabela 23. Parâmetros cromatográficos otimizados no UHPLC-QTOF.....	86
Tabela 24. Figuras de mérito do método desenvolvido no UHPLC-QTOF.....	86

## **LISTA DE SÍMBOLOS E ABEVIAÇÕES**

ABRACIT – Associação Brasileira de Centros de Informação e Assistência Toxicológica

AF – Assessment Factor

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BZP – Benzodiazepina

CAESB – Companhia de Saneamento Ambiental do Distrito Federal

CE – Collision Energy

CEP– Collision Cell Entrance Potential

CUR – Curtain Gas

CXP– Collision Cell Exit Potential

DIA – Diazepam

DIA-d5 – Diazepam deuterado

DHD – Dose diária definida por mil habitantes por dia

DF – Distrito Federal

DP– Declustering Potential

EP– Entrance Potential

ERA – Environmental Risk Assessment

ESI – Electrospray Ionization

ETE – Estação de tratamento de esgoto

FIA – Flow Injection Analysis

GABA – Ácido Gama-Amino Butírico

GC – Gas Chromatography

GS1 – Ion Source Gas 1

GS2 – Ion Source Gas 2

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

IQ – Instituto de Química

IS – Ion Spray Voltage

LOEC – Lowest Observed Effect Concentrations

LOD – Limit of detection

LOQ – Limit of quantification

LC – Liquid Chromatography

LC-MS/MS – Liquid Chromatography coupled to mass spectrometry in tandem

MRM – Multiple Reaction Monitoring

MS – Mass Spectrometry

MS/MS – Mass Spectrometry in tandem

NOEC – No Observed Effect Concentrations

NDIA – Nordiazepam

OXA – Oxazepam

PEC – Predicted Environmental concentration

PNEC – Predict No-Effect Concentration

QqQ – Triple quadrupole

QTOF – Hybrid Quadrupole-Time of Flight

RENAME – Relação Nacional de Medicamentos Essenciais

RSD – Relative Standard Deviation

RQ – Risk Quotient

SNC – Sistema Nervoso Central

SNGPC – Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados

SPE – Solid-Phase Extraction

S-DDD – Statistical Defined Daily Doses

TEM – Temperature

TIC – Total Ion Chromatogram

TOF – Time-of-flight

TZP – Termazepam

UHPLC – Ultra High Performance Liquid Chromatography

UHPLC-QTOF – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução

UNODC – United Nations Office on Drugs and Crime

UnB – Universidade de Brasília

UPLC – Ultra Performance Liquid Chromatography

UPLC-QqQ – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas do tipo QqQ

WBE – Wastewater-Based Epidemiology

WHO – World Health Organization

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo o Relatório Mundial sobre Drogas de 2018, publicado pelo Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime, cerca de 5,6 % da população mundial, incluindo pessoas entre 15 e 64 anos, usou drogas pelo menos uma vez em 2017. Ainda, de acordo com o mesmo relatório, estimou-se que o número de usuários de drogas aumentou em 20 milhões de 2015 a 2016 (UNODC, 2018). Esta mudança corresponde ao aumento do número de usuários de cannabis, que compreendem o maior grupo de consumidores de drogas de abuso no mundo. Outras drogas, como anfetaminas e cocaína também são amplamente consumidas (UNODC, 2018).

Concomitantemente ao abuso de drogas ilícitas, o uso não médico de drogas prescritas atingiu proporções epidêmicas em diversas regiões do mundo. Ainda que as estimativas globais não estejam disponíveis, tal uso indevido permanece bastante alastrado, principalmente entre os indivíduos que praticam o poliuso de drogas, característico de usuários recreativos que buscam potencializar os efeitos de uma droga (Karjalainen et al., 2017; UNODC, 2018). De acordo com o Programa Global de Monitoramento de Sintéticos: Análises, Relatórios e Tendências de 2017, o poliuso de drogas envolvendo sedativos e hipnóticos, como os benzodiazepínicos, tem sido associado a diversos casos de morte em muitos países, principalmente quando são consumidos juntamente com opioides prescritos (UNODC, 2017). Foi estimado que durante 2010 e 2014, 47.055 pessoas morreram por overdose nos Estados Unidos devido ao uso de Diazepam e Alprazolam em combinação com duas ou mais drogas adicionais. Os benzodiazepínicos são também os medicamentos de prescrição mais frequentemente relacionados aos casos de intoxicação aguda na Europa (UNODC, 2017). Além disso, o uso recreativo e ilícito destas substâncias tem sido reportado em diversos casos de agressões sexuais mediadas por álcool e/ou outras drogas (EMCDDA, 2008a). Sendo assim, os indícios de que o consumo destas substâncias vem aumentando, principalmente entre os jovens, são preocupantes e demandam investigação, análise das políticas e criação de métodos de prevenção (EMCDDA, 2008a).

Para combater o abuso de drogas, é necessário o desenvolvimento de novos métodos para monitorar tendências e padrões de consumo (Zuccato et al., 2008). Daughton (2001) propôs um novo conceito para avaliar o consumo de drogas de uma população através da análise do esgoto. Esta nova abordagem, posteriormente

denominada epidemiologia do esgoto (WBE, do inglês *Wastewater-Based Epidemiology*), fornece dados para identificação de tendências e taxas de uso, bem como informações sobre as regiões de maior abuso de drogas (EMCDDA, 2018; Maldaner et al., 2012; Subedi and Kannan, 2014). Desde então, esta metodologia tem sido aplicada para estimar o consumo não apenas de drogas ilícitas, mas também de diversas substâncias, como álcool, produtos farmacêuticos e drogas psiquiátricas, incluindo as benzodiazepinas (Baker et al., 2014; Mastroianni et al., 2017; Skees et al., 2018).

Além dos indiscutíveis danos socioeconômicos causados pelo abuso dos benzodiazepínicos, a presença destes compostos no ambiente pode estar associada a uma questão de risco ambiental (Cunha et al., 2017; Racamonde et al., 2014). De maneira semelhante aos demais grupos de fármacos, as drogas psiquiátricas e seus metabólitos são continuamente descarregados nas estações de tratamento de esgoto (ETE) devido à excreção humana pós-consumo, podendo atingir diversos compartimentos ambientais (Feitosa et al., 2013; Kosjek et al., 2012). Há informações ainda limitadas quanto a ocorrência, toxicologia e destino das benzodiazepinas e seus derivados no ambiente, mas há trabalhos que abordam a possibilidade destas substâncias provocarem efeitos nocivos aos ecossistemas contaminados, afetando organismos de diferentes níveis tróficos (Calisto and Esteves, 2009; Cunha et al., 2017; Kosjek et al., 2012; Racamonde et al., 2014).

Diante de toda a problemática que envolve consumo lícito e ilícito dos benzodiazepínicos e da escassez de estudos referentes ao impacto ambiental destas substâncias, este trabalho tem como objetivos gerais realizar estimativas de consumo do diazepam a fim de consolidar os estudos de epidemiologia do esgoto no Distrito Federal, bem como determinar o valor de sua concentração ambiental prevista (PEC, do inglês *Predicted Environmental Concentration*) com o propósito de avaliar o risco ambiental desta substância associado ao ecossistema aquático do Lago Paranoá.

Como objetivos específicos, o presente estudo busca:

- Desenvolver um método analítico de quantificação do diazepam em amostras de esgoto bruto e tratado provenientes de duas ETE localizadas em Brasília;
- Verificar possíveis efeitos associados ao carnaval no consumo de diazepam;
- Realizar comparações quanto aos dados de comercialização obtidos pela ANVISA

- Estimar o índice de remoção do diazepam nas estações de tratamento de esgoto investigadas para predição do valor de PEC;
- Realizar avaliação de risco ambiental a partir do valor de PEC obtido.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Benzodiazepinas

As benzodiazepinas (BZP) são drogas psicotrópicas pertencentes à classe dos fármacos ansiolíticos e recebem este nome em função de sua estrutura química constituída por um anel benzeno fundido a um anel 1,4-diazepina, o que lhes conferem um caráter termolábil e apolar (Racamonde et al., 2014). A vasta maioria destas substâncias possui um substituinte 5-aryl e se diferencia em sua atividade farmacocinética pela presença de outros grupos substituintes ligados em cinco posições específicas dos anéis. A Figura 1 apresenta a estrutura química geral do grupo farmacológico, bem como as estruturas de alguns dos benzodiazepínicos mais conhecidos.

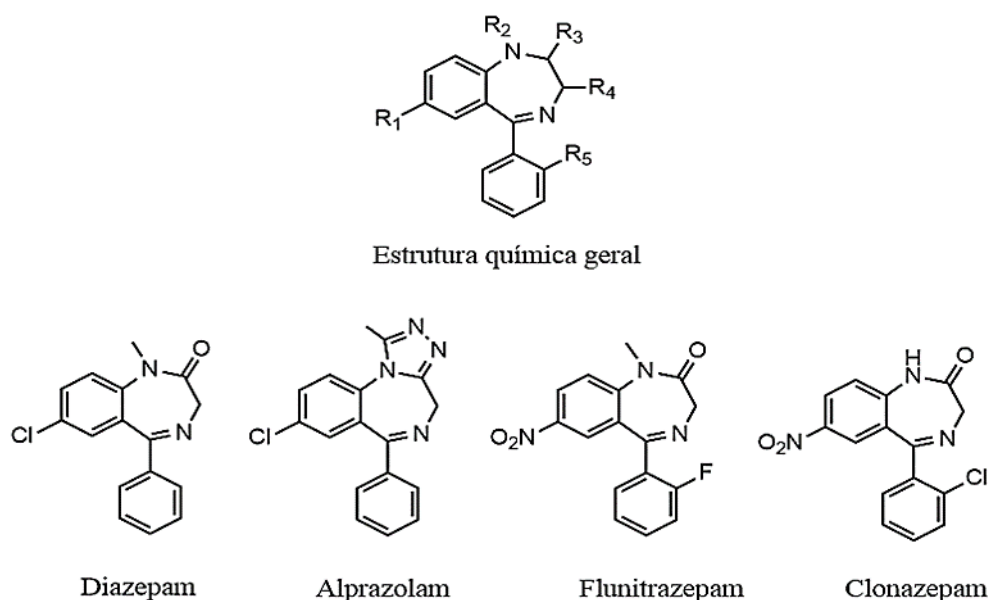


Figura 1. Estrutura química geral das benzodiazepinas e algumas das substâncias mais conhecidas do grupo

Os benzodiazepínicos são alguns dos medicamentos de prescrição mais consumidos no mundo devido à sua eficácia no tratamento de doenças e transtornos psicológicos relacionados ao sistema nervoso central (SNC), tais como ansiedade, insônia e epilepsia. Estes compostos atuam nos receptores do neurotransmissor inibidor ácido gama-amino butírico (GABA) e aumentam os níveis de sinalização cerebral inibitória. Isto causa a depressão do SNC e, conseqüentemente, gera efeitos ansiolíticos,

sedativos, hipnóticos e até mesmo anticonvulsivantes (Arshad et al., 2018; Hashmi et al., 2018; Kapczinski et al., 2001).

Os medicamentos benzodiazepínicos são classificados em três diferentes grupos de aplicação para uso terapêutico de acordo com os seus tempos de duração, sendo eles: curta (inferior a 12 h), média (de 12 h a 24 h) ou longa duração (superior a 24 h). Os tempos de duração estão diretamente relacionados à presença de produtos farmacologicamente ativos formados na metabolização humana. As BZP de curta duração são metabolizadas por conjugação com o ácido glicurônico, enquanto as de durações mais longas sofrem uma extensa biotransformação que resulta na formação de metabólitos ativos que prolongam o tempo de duração (Calisto and Esteves, 2009; Mandrioli et al., 2008).

O consumo de BZP tornou-se extremamente popular desde a sua introdução no mercado, visto que apresentavam um maior perfil de segurança do que o de seus predecessores, tais como os barbitúricos e o meprobamato. Diferentemente destes medicamentos, as BZP não provocam anestesia geral ou depressão respiratória mesmo quando utilizadas em doses diferentes das recomendadas na prescrição médica (Schmitz, 2016; Silva, 2013). Existem 35 benzodiazepinas sob controle internacional para uso terapêutico (Calisto and Esteves, 2009). No Brasil, os medicamentos benzodiazepínicos são controlados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e constam na lista de substâncias psicotrópicas sujeitas à notificação de receita. Estas substâncias também são comumente utilizadas em tratamentos veterinários para promover efeitos sedativos e induzir o aumento de apetite em animais domésticos e selvagens (Calisto and Esteves, 2009).

Estima-se que o uso das BZP tende a aumentar com a idade e que as mulheres consomem estes medicamentos duas vezes mais que os homens (Olfson et al., 2015). Segundo o Relatório Técnico sobre Substâncias Psicotrópicas de 2016, publicado pela Junta Internacional de Fiscalização de Entorpecentes, os maiores índices de consumo médio anual de benzodiazepínicos durante o período de 2007 a 2015 foram de países do continente europeu e do continente americano (INCB, 2016). A Figura 2 ilustra o consumo médio global de benzodiazepinas, medido em doses diárias definidas para fins estatísticos (S-DDD, do inglês *Statistical Defined Daily Doses*) por 1000 habitantes, para cada continente.



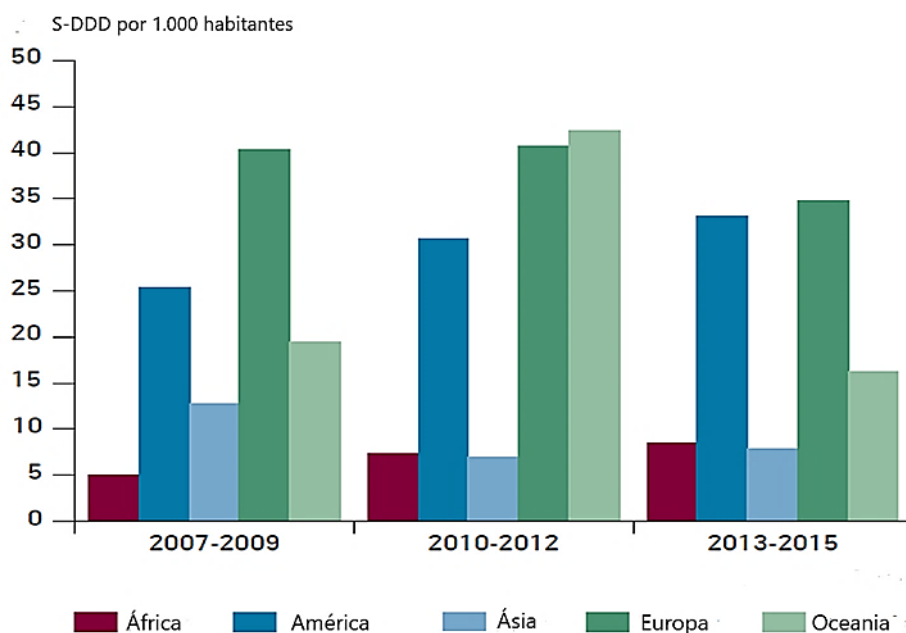


Figura 2. Consumo médio global das benzodiazepinas, avaliado em períodos médios de três anos, durante 2007 e 2015 (INCB, 2016)

Ainda, de acordo com o mesmo relatório, os Estados Unidos, a França e o Brasil foram os países que apresentaram os maiores índices de consumo das benzodiazepinas, das quais o alprazolam, o diazepam e o lorazepam foram as substâncias mais comercializadas em 2015 (INCB, 2016). Alguns dos principais fatores associados ao consumo das BZP estão relacionados a determinantes sociais acerca do padrão de vida da sociedade moderna. Os paradigmas sociais, caracterizados por incerteza, insegurança, privação socioeconômica e violência, favorecem o desenvolvimento de doenças e transtornos psicológicos relacionados ao SNC e, conseqüentemente, apresentam uma grande influência nas taxas de consumo destes medicamentos. Segundo a Organização Mundial da Saúde, o Brasil possui a maior taxa de transtornos de ansiedade no mundo com 9,3% de prevalência na população, apresentando-se como um dos países que mais consome medicamentos ansiolíticos no mundo (WHO, 2017). Além disso, os programas sociais de assistência médica facilitam o acesso a estes medicamentos e também exercem uma grande influência no consumo das BZP no Brasil (Kapczinski et al., 2001). Um estudo realizado por Azevedo *et al.* (2014) avaliou o consumo de cinco benzodiazepínicos, estimado em dose diária definida por mil habitantes por dia (DHD), para Brasília e outras 26 cidades brasileiras. A Figura 3 mostra o consumo médio de Alprazolam, Bromazepam, Clonazepam, Diazepam e Lorazepam durante 2010 e 2012.

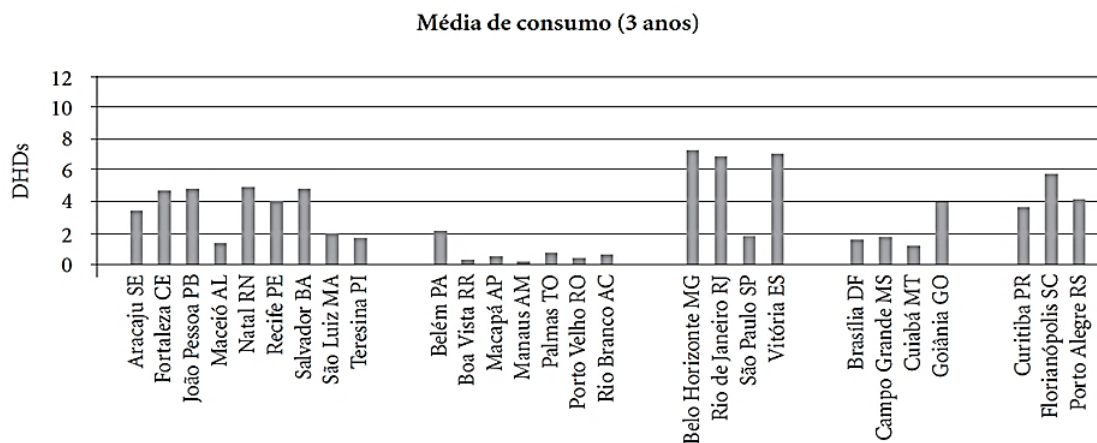


Figura 3. Consumo médio das benzodiazepinas nas capitais brasileiras durante 3 anos (Azevedo et al., 2014)

O consumo destes benzodiazepínicos variou de 0,24 DHD em Manaus até 7,29 DHD em Belo Horizonte e apresentou um aumento de 72 % durante os três anos. No que diz respeito ao consumo médio por medicamento, o diazepam, no entanto, foi o único que teve um decréscimo no consumo e apresentou a menor média de 0,11 DHD em relação aos outros compostos no período investigado (Azevedo et al., 2014).

Contudo, o consumo destas substâncias tem sido cada vez mais restringido devido à incidência de efeitos colaterais. Está bem documentado que o uso a longo prazo destas substâncias pode causar problemas associados ao sistema cognitivo, bem como propiciar a dependência e o abuso destes medicamentos. Sendo assim, embora os benzodiazepínicos apresentem uma ampla aplicação terapêutica e sejam relativamente seguros, sua utilização deve ser feita com cuidado e sob avaliação médica de acordo com as suas propriedades psicofarmacológicas (Auchewski et al., 2004; Olfson et al., 2015).

### 2.1.1. A epidemiologia do abuso

O conceito de epidemiologia pode ser definido como o estudo da distribuição quantitativa de fenômenos associados à saúde de uma dada população. Em se tratando das BZP, a epidemiologia diz respeito ao estudo dos problemas relacionados ao seu uso. Por trás do uso terapêutico, o uso recreativo e ilícito das BZP atingiu proporções epidemiológicas globais, visto que o abuso destas substâncias tem sido relatado em muitos casos de dependência, intoxicação e mortes por overdose em diversas regiões do mundo, principalmente na América do Norte e na Europa (UNODC, 2017).

O consumo abusivo dos benzodiazepínicos é comumente realizado em conjunto com outras drogas a fim de modular seus efeitos psicotrópicos, ou seja, para intensificar efeitos eufóricos, evitar ou aliviar sintomas de abstinência ou para reduzir sintomas de insônia provocados pelo uso de estimulantes (Kurtz et al., 2011). Os perfis de segurança destas substâncias levam usuários praticantes de poliuso de drogas a acreditarem que o abuso dos benzodiazepínicos não apresenta riscos à saúde. Todavia, o abuso das BZP em combinação com outras drogas depressoras do SNC, tais como opioides prescritos, é extremamente perigoso devido aos potenciais riscos de fatalidade. As BZP, quando combinadas com opioides e/ou álcool, podem causar depressão respiratória e, conseqüentemente, a morte. Estima-se que o número de casos de morte por overdose envolvendo o abuso de BZP em combinação com opioides aumentou 13% de 2004 para 2011 nos Estados Unidos. Além disso, reporta-se na literatura que o álcool está envolvido em um de cada cinco casos de morte por overdose causados pelo abuso dos benzodiazepínicos (Olfson et al., 2015; Schmitz, 2016)

Segundo o Programa Global de Monitoramento de Sintéticos: Análises, Relatórios e Tendências de 2017, os medicamentos psicotrópicos alprazolam e diazepam estão entre as benzodiazepinas mais frequentemente desviadas e abusadas. Estas substâncias podem ser encontradas no mercado de drogas ilícitas após serem desviadas do mercado legítimo de medicamentos ou sintetizadas/modificadas em laboratórios clandestinos (UNODC, 2017). A Tabela 1 mostra as drogas mais frequentemente associadas a casos de morte por overdose que envolvem o abuso com diazepam e alprazolam nos Estados Unidos.

Tabela 1. Drogas mais abusadas com alprazolam e diazepam (UNODC, 2017)

Benzodiazepinas	Drogas mais comumente abusadas em conjunto com as benzodiazepinas envolvidas em casos de morte por overdose				
	Primeira	Segunda	Terceira	Quarta	Quinta
Alprazolam	Oxicodona	Heroína	Hidrocodona	Metadona	Morfina
Diazepam	Oxicodona	Hidrocodona	Alprazolam	Heroína	Morfina

O abuso das BZP ocorre predominantemente em combinação com opioides prescritos, dos quais a oxicodona é o mais relatado em casos de mortes por overdose. Além do mais, a prática de poliuso de benzodiazepínicos envolve também o abuso de outras drogas que estão associadas a fatalidades, tais como heroína e morfina (UNODC, 2017).

As BZP também se destacam por serem alguns dos medicamentos mais envolvidos em casos de intoxicação em diversas regiões do mundo (UNODC, 2017). No Brasil, segundo dados disponibilizados pela Associação Brasileira de Centros de Informação e Assistência Toxicológica (ABRACIT), as BZP foram apontadas como uma das classes de medicamentos mais frequentemente associadas à intoxicação em pessoas de todas as faixas etárias em diversos estados brasileiros, dentre as quais o clonazepam e o diazepam foram as substâncias mais reportadas em análises toxicológicas (ABRACIT, 2019). Além disso, as BZP são citadas como substâncias facilitadoras de crimes quando são consumidas em combinação com outras drogas, principalmente com o álcool. Dentre os diversos crimes praticados, os mais recorrentes são os de estupro e agressão sexual que são mediados, principalmente, pelo abuso do flunitrazepam (EMCDDA, 2008b).

Embora a aplicação terapêutica destas substâncias apresente um papel fundamental na medicina humana para o tratamento de diversas doenças psicotrópicas, o seu consumo abusivo pode trazer consequências imensuráveis para sociedade. Desta maneira, torna-se importante a realização de estudos que abordam não apenas os fatores e riscos associados, mas também as tendências e taxas de abuso para promover a criação de medidas eficazes de intervenção e fiscalização comercial destas substâncias.

### *2.1.2. Ocorrência ambiental*

As benzodiazepinas, assim como outros medicamentos, são produzidas em grandes quantidades para uso frequente nas áreas de medicina humana e veterinária. Contudo, estas substâncias podem ser descartadas no ambiente através de diferentes vias de exposição (Calisto and Esteves, 2009). Por não serem regulamentadas em legislação ambiental, são consideradas contaminantes de interesse emergente (Kosjek et al., 2012). Além do mais, embora suas concentrações sejam extremamente baixas nos compartimentos ambientais, podem apresentar riscos à saúde humana e/ou animal devido à sua exposição (Kosjek et al., 2012). Estes contaminantes podem alcançar diversos compartimentos ambientais, principalmente, os ecossistemas aquáticos através do descarte de esgoto de origem doméstica, industrial ou hospitalar sem o devido tratamento, de origem agropecuária através de lixiviados de aterro ou por efluentes de ETE com baixa ou moderada eficiência de remoção (Lima et al., 2017). A Figura 4 ilustra um esquema da contaminação de corpos hídricos por contaminantes emergentes.

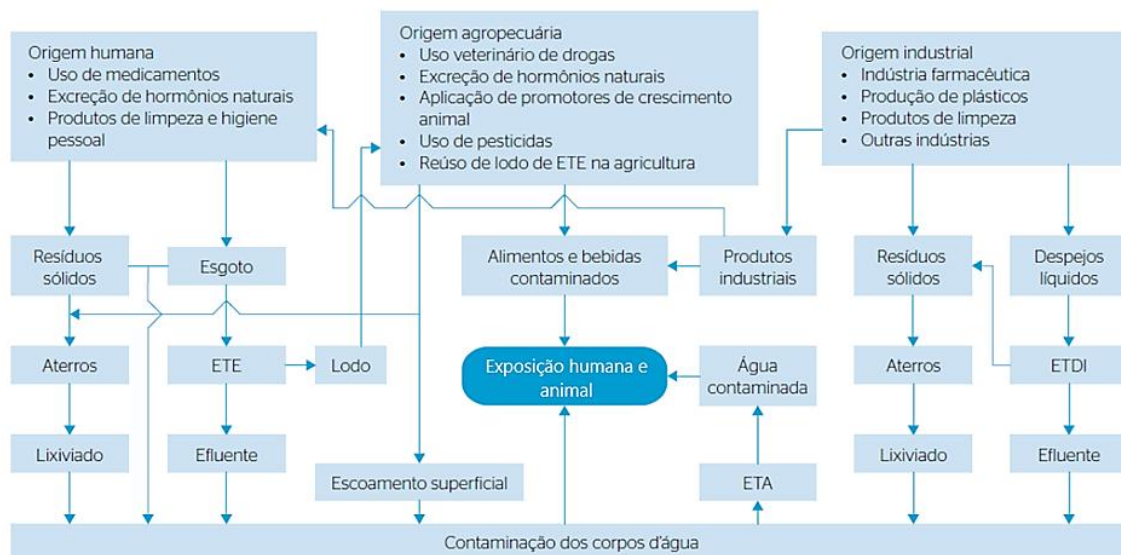


Figura 4. Principais fontes, vias de transporte e destino dos contaminantes emergentes no meio ambiente (Apatada, Lima et al., 2017)

Benzodiazepínicos são detectados em concentrações na ordem de  $\text{ng L}^{-1}$  em águas residuárias e águas superficiais, mas também podem infiltrar no subsolo e contaminar aquíferos (Calisto and Esteves, 2009). Relata-se que a presença das BZP em corpos hídricos pode afetar diretamente o SNC de organismos aquáticos e romper a sinalização neuroendócrina, provocando mudanças de comportamento e alterando os seus padrões de reprodução (Calisto and Esteves, 2009).

No Distrito Federal, o corpo hídrico que recebe as maiores quantidades de efluentes é o Lago Paranoá. Este compartimento aquático é localizado na capital do Brasil, Brasília (Distrito Federal-DF), e foi projetado com o objetivo de aumentar a umidade das regiões em suas proximidades, mas atualmente recebe efluentes de duas estações de tratamento de esgoto localizadas nos bairros da Asa Norte e da Asa Sul em Brasília, sendo elas ETE Brasília Norte e ETE Brasília Sul, respectivamente. Considerando não apenas a importância histórica deste ecossistema para a cidade, mas também as grandes quantidades de esgoto tratado que são despejadas, os trabalhos envolvendo a presença de contaminantes emergentes em ecossistemas aquáticos no DF foram realizados preferencialmente no Lago Paranoá (Sodré et al., 2018a).

Atualmente, como na maioria dos países, a legislação brasileira não exige que as BZP sejam monitoradas nos ecossistemas aquáticos. A ausência de programas de monitoramento que incluem estas substâncias pode estar associada à complexidade em determinar níveis de segurança atribuídos a cada composto, bem como à escassez de

estudos sobre a ocorrência ambiental e toxicidade de contaminantes. Sendo assim, torna-se importante a realização de estudos que avaliam o monitoramento de águas superficiais, em especial aqueles corpos hídricos receptores de esgotamento sanitário, para promover a criação de leis e garantir a integridade e sobrevivência de organismos de diferentes níveis tróficos.

## ***2.2. Benzodiazepina selecionada para o estudo***

A benzodiazepina selecionada para o desenvolvimento do presente trabalho foi o diazepam. Esta substância foi escolhida de acordo com a sua relevância no grupo farmacológico e com a disponibilidade de dados na literatura bibliográfica, sendo a benzodiazepina mais avaliada tanto nos trabalhos que abordam estimativas de consumo, como nos que retratam avaliação de risco ambiental (Mastroianni et al., 2017; Skees et al., 2018; Stuer-Lauridsen et al., 2000).

### ***2.2.1. Diazepam***

O diazepam (DIA), também conhecido comercialmente como Valium, é o princípio ativo mais popular do grupo farmacológico das benzodiazepinas. Este fármaco é um dos medicamentos de prescrição mais comercializados no mundo e é utilizado, em geral, para o tratamento de ansiedade, espasmos musculares, convulsão e insônia. Suas doses recomendadas para adultos variam de 5 a 20 mg/dia e sua administração pode ser feita por via oral ou por injeções intramuscular e intravenosa (ANVISA, 2019). Este medicamento é classificado como um benzodiazepínico de longa duração, visto que, no processo de metabolização humana, produz metabólitos farmacologicamente ativos que prolongam seu tempo de ação. Os principais metabólitos formados são o nordiazepam (NDIA), o termazepam (TZP) e o oxazepam (OXA), dado que o TZP e o OXA são também utilizados como medicamentos ansiolíticos em diversos países (Wang et al., 2017). A Figura 5 ilustra estes metabólitos.

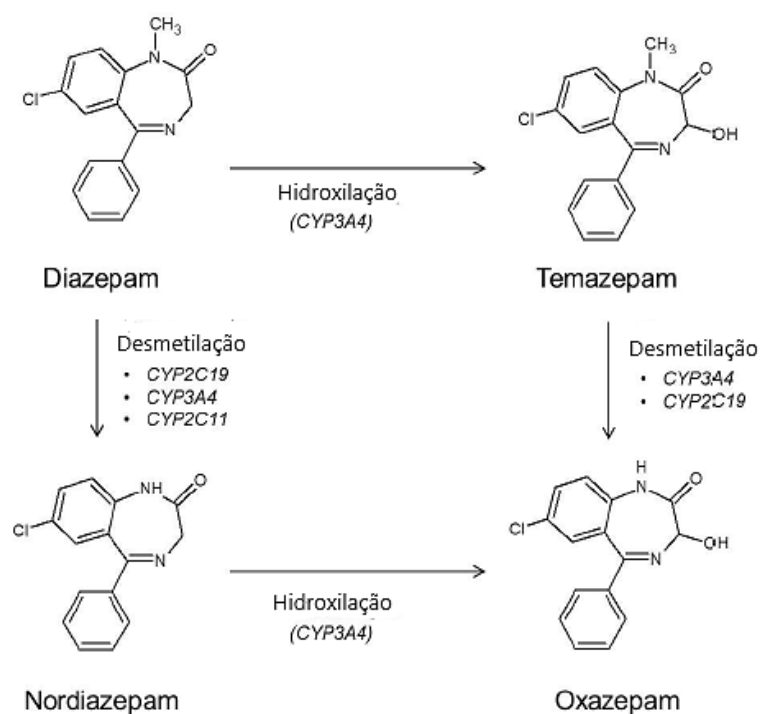


Figura 5. Principais metabólitos do diazepam (Adaptada, Togni, 2018)

A produção destes metabólitos ocorre a partir de reações de biotransformação enzimática do diazepam. O NDIA é formado por reações de desmetilação (biotransformação de fase I), enquanto o TZP e o OXA são formados por reações de hidroxilação (biotransformação de fase II) do diazepam e do nordiazepam, respectivamente (Togni, 2018). Estas substâncias são excretadas por conjugação com o ácido glicurônico juntamente com quantidades que variam de 5 a 50% do diazepam sob a forma inalterada pela urina (West and Rowland, 2012).

No grupo dos fármacos benzodiazepínicos, o DIA é o composto mais extensivamente estudado como um possível contaminante ambiental. Desta maneira, é importante ter conhecimento sobre suas propriedades físico-químicas para melhor compreensão do seu comportamento no ambiente. Dentre as propriedades de um contaminante ambiental, destacam-se a constante de dissociação ácida (pKa), o coeficiente de partição octanol/água (log Kow) e a solubilidade em água (Feitosa et al., 2013; Lima et al., 2017). A Tabela 2 mostra as propriedades físico-químicas do diazepam.

Tabela 2. Propriedades físico-químicas do diazepam

Fórmula	$C_{16}H_{13}ClN_2O$
Peso molecular ( $g\ mol^{-1}$ )	284,73
pKa	3,4 <sup>a</sup>
Log Kow	2,82 <sup>a</sup>
Solubilidade em água ( $mg\ L^{-1}$ a 25°C)	50 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Thiebault et al., 2017; <sup>b</sup>Carballa et al., 2005

Estas propriedades são comumente empregadas para prever fatores relacionados ao destino do contaminante no ambiente. O valor de pKa indica se a substância está dissociada ou não em meios aquáticos. Considerando que o valor do pH de águas naturais e residuárias varia entre 4 e 9, é possível prever que o DIA encontra-se majoritariamente sob sua forma neutra nestes compartimentos (Feitosa et al., 2013). O log Kow aponta o grau de hidrofobicidade da substância e a solubilidade em água denota, de maneira geral, a tendência de sua distribuição entre sólidos e líquidos. Estas propriedades são frequentemente utilizadas para prever se o contaminante pode ser acumulado em materiais hidrofóbicos, tais como solos, sedimentos e biota. O valor de log Kow e sua baixa solubilidade em água indicam que o DIA apresenta uma moderada tendência de adsorção em sólidos e bioacumulação, o que pode representar risco à biota terrestre (Calisto and Esteves, 2009; Lima et al., 2017).

Entretanto, embora as propriedades do diazepam forneçam uma breve contribuição para a compreensão do seu comportamento em matrizes ambientais, não elucidam, de maneira específica, o seu risco ambiental associado a um ecossistema. Desta maneira, deve-se avaliar sua ocorrência, remoção no tratamento de esgotos, degradabilidade e toxicidade para investigar os possíveis riscos associados a este fármaco.

### 2.2.1.1. Detecção no meio ambiente

Da mesma forma que a vasta maioria dos fármacos, o DIA pode ser encontrado em águas residuárias devido à excreção pela urina após o seu consumo, podendo alcançar ecossistemas aquáticos (Quintana et al., 2017). Diversos estudos reportaram a presença desta substância em afluentes e efluentes municipais ou hospitalares de diversas regiões do mundo sob concentrações que variaram de 40  $ng\ L^{-1}$ , em uma ETE localizada na Alemanha, a 1180  $ng\ L^{-1}$  em uma ETE na Bélgica (Calisto and Esteves, 2009). Em águas superficiais, o DIA foi detectado em concentrações que variaram de 21



ng L<sup>-1</sup> em rios na cidade de Madrid, até 33 ng L<sup>-1</sup> em rios na Alemanha (Calisto and Esteves, 2009; Kosjek et al., 2012). No Brasil, Almeida *et al.*(2013) detectaram o DIA em efluentes hospitalares provenientes do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) localizado no estado do Rio Grande do Sul, com concentração média de 645 ng L<sup>-1</sup>.

No entanto, alguns trabalhos mostram baixa ou nenhuma frequência de detecção deste fármaco no esgoto e/ou em compartimentos hídricos (Moura et al., 2020; Togunde et al., 2012). Huerta-fontela *et al.* (2010) realizaram um estudo para determinação de 49 fármacos em amostras de afluente e efluente de diferentes ETE na Espanha. O DIA foi detectado apenas em amostras de afluente provenientes de uma das seis ETE investigadas. Togunde *et al.* (2012) avaliou a quantificação de alguns fármacos selecionados em amostras de efluente de uma ETE nos EUA e constatou que o DIA foi detectado apenas em concentrações abaixo do limite de quantificação. Já no estudo realizado por Baker *et al.*(2014) que teve o objetivo de quantificar drogas e fármacos em amostras de afluente de uma ETE na Inglaterra, o DIA não foi detectado nas amostras analisadas e a quantificação foi feita a partir do seu metabólito oxazepam.

A detecção do DIA em matrizes ambientais está relacionada, sobretudo, com o seu padrão de consumo pela população e com sua taxa de remoção nas estações de tratamento de esgoto.

#### 2.2.1.2. Remoção nas estações de tratamento de esgoto

A ocorrência do DIA em efluentes demonstra que esta substância não é completamente removida pelos métodos tradicionais de tratamento do esgoto. A vasta maioria dos trabalhos que abordam a eficiência de remoção desta substância em ETE reportam valores que atingem até 10 % de remoção ao final de todo o tratamento biológico clássico (Calisto and Esteves, 2009; Kosjek et al., 2012). A baixa eficiência de remoção está de acordo com estudo realizado por Suarez et al. (2010), que avaliou a persistência de diferentes fármacos e classificou o DIA como resistente à transformação biológica. Em contrapartida, alguns trabalhos apontam remoções mais eficientes do DIA com valores que chegam até 50% de remoção sob tratamentos realizados com lodo anaeróbio (Löfler et al., 2005; Ternes et al., 2004). A eficiência de adsorção no lodo é evidenciada pelo estudo realizado por Jelic *et al.* (2011) que avaliou o comportamento

de 43 fármacos durante o tratamento de esgoto e verificou que 20% do DIA foi adsorvido ao lodo.

Além disso, tratamentos inovadores como o de ozonização mostram taxas de remoção do DIA superiores a 90 %, uma vez que ele pode ser oxidado por radicais hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ) durante o tratamento (Kosjek et al., 2012; Snyder, 2008). Desta forma, observa-se que a remoção do DIA por métodos de tratamento convencionais, principalmente o tratamento biológico, não apresenta boas eficiências de remoção. É esperado que a remoção ocorra principalmente por adsorção a sólidos em suspensão e métodos inovadores, como o tratamento por ozonização.

### 2.2.1.3. Degradabilidade

A avaliação da degradabilidade de contaminantes emergentes em matrizes ambientais possui uma grande relevância na análise do destino destas substâncias no meio ambiente. Estudos que abordam a degradabilidade do DIA enfatizam a possibilidade deste medicamento estar sendo acumulado em compartimentos aquáticos e sedimentos devido a sua alta persistência e resistência à degradação através de processos bióticos e abióticos (Calisto and Esteves, 2009). Sugere-se que o diazepam, assim como os outros benzodiazepínicos, apresenta uma baixa susceptibilidade à biodegradação devido à presença de halogênio em sua estrutura química (Kosjek et al., 2012). Um estudo realizado por Redshaw *et al.* (2008) sobre a biodegradabilidade do diazepam em matrizes líquidas e sólidas que possuíam culturas bacterianas típicas de lodo de esgoto, relatou que o benzodiazepínico mais persistente em ecossistemas aquáticos foi o diazepam, que não apresentou nenhuma perda durante sessenta dias de análise. Löfler *et al.* (2005) avaliaram a persistência de 10 fármacos durante o processo de tratamento de esgoto e reportaram a alta persistência do DIA, que se adsorveu rapidamente em sedimentos e permaneceu estável durante o tratamento.

Desta maneira, a persistência do DIA no ambiente releva a importância da análise de outros benzodiazepínicos em matrizes ambientais, visto que, de acordo com a literatura, estes compostos podem estar sendo acumulados no ambiente (Calisto and Esteves, 2009).

#### 2.2.1.4. Toxicidade

A presença de fármacos psicotrópicos no meio ambiente pode prejudicar a qualidade dos recursos hídricos, provocando uma série de mudanças na biodiversidade e alterando equilíbrio de ecossistemas aquáticos através de efeitos tóxicos causados aos organismos. No que se refere aos medicamentos benzodiazepínicos, a única substância avaliada de acordo com a sua toxicidade foi o DIA (Calisto and Esteves, 2009). Diversos trabalhos reportam que o diazepam apresenta uma série de efeitos adversos a organismos de diferentes níveis tróficos quando é encontrado com concentrações na ordem de  $\text{ng L}^{-1}$  (Almeida et al., 2013; Calisto and Esteves, 2009; Fent et al., 2006). Um estudo realizado por Lorenzi et al. (2014) mostrou que peixes da espécie *Pimephales promelas* apresentaram mudanças no comportamento devido à exposição ao diazepam presente a  $1 \text{ ng L}^{-1}$ . Pascoe et al. (2003) constaram efeitos nocivos do DIA sob concentração de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  ao invertebrado aquático *Hydra vulgaris* após realizarem estudos de toxicidade aguda e crônica. Além disso, reporta-se a toxicidade do DIA ao microcrustáceo *Daphnia magna* sob concentrações que variam de 8,8 a  $100 \text{ ng L}^{-1}$  (Cunha et al., 2017).

A obtenção de dados ecotoxicológicos associados ao DIA em ecossistemas aquáticos servem como parâmetro para elucidar os efeitos nocivos provocados a diferentes organismos e reforçam a necessidade da realização de programas de monitoramento ambiental de contaminantes.

### 2.3. Determinação de drogas psicotrópicas no esgoto

A determinação de drogas psicotrópicas em amostras de esgoto envolve uma série de desafios. Um deles refere-se à demanda por métodos analíticos capazes de quantificar substâncias sob níveis de concentração traço em amostras complexas, tais quais as ambientais. O esgoto é uma amostra extremamente complexa devido a sua elevada carga orgânica e intensa atividade biológica. Para situações como esta, avanços analíticos e tecnológicos permitiram o desenvolvimento de técnicas que possibilitaram a detecção destas substâncias farmacologicamente ativas no esgoto (Calisto and Esteves, 2009; Feitosa et al., 2013).

### *2.3.1. Amostragem e preservação de amostras*

O processo de amostragem pode ser definido como a seleção de uma pequena, representativa e suficiente parte de um todo, a partir de qual será feita a análise. Esta é a primeira etapa da parte experimental e contempla planejamento para coleta de uma amostra representativa. Um planejamento amostral inapropriado é, muitas vezes, uma fonte de erro dominante em uma análise química devido à falta de representatividade das amostras coletadas. Sendo assim, deve-se utilizar uma estratégia adequada para realizar a amostragem de acordo com os objetivos da investigação (Petrovic, 2014).

De modo geral, a vasta maioria dos trabalhos que envolvem a determinação de drogas em matrizes aquáticas utiliza uma amostragem simples, de forma que a coleta da amostra é feita instantaneamente. Entretanto, para amostras de esgoto bruto e tratado, utiliza-se uma amostragem acumulada a fim de obter amostras compostas em um período pré-determinado, geralmente, de 24h (Feitosa et al., 2013). A amostragem acumulada consiste na realização da coleta por um único recipiente em um mesmo ponto amostral, buscando uma avaliação média do sistema e garantindo uma maior representatividade da amostra. Esta abordagem associa-se principalmente às aplicações epidemiológicas, já que apresenta resultados mais fidedignos para estimar o consumo de drogas (Feitosa et al., 2013).

Após a coleta, as amostras devem ser preservadas de tal forma que a metodologia aplicada reduza possíveis perdas e transformações do analito antes da análise. Alguns trabalhos têm demonstrado que a acidificação (pH 2,0) e o resfriamento da amostra (-20 °C ou 4°C) auxiliam na estabilização do diazepam no esgoto (Almeida et al., 2015; Sulaiman et al., 2014). O armazenamento é comumente feito em frascos de vidro âmbar, no entanto estudos mostram que cartuchos de SPE, após serem carregados com as amostras, podem ser congelados e armazenados por muitos dias sem que haja perda dos analitos (González-Mariño et al., 2018; Jardim, 2010). Baker and Kasprzyk-Hordern (2011) avaliaram a estabilidade do diazepam e de diversas outras substâncias no esgoto durante um período de três dias sob diferentes condições de pH (2,0 e 7,0) e temperatura (2 °C e 19 °C). Os testes foram feitos em duplicata e, após serem filtradas e enriquecidas, as amostras foram estocadas em frascos de vidro âmbar no escuro. Por fim, as amostras foram submetidas à extração em fase sólida e os cartuchos foram armazenados a -20 °C até o processo de eluição. O estudo de estabilidade mostrou que as melhores condições para armazenamento são resfriamento e acidificação da amostra.

### 2.3.2. Preparo de amostras

O preparo de amostras é fundamental para determinação de drogas em amostras ambientais, tornando-se a etapa mais crítica dentre as demais operações analíticas. Os níveis de concentração de drogas psicotrópicas no esgoto são tão baixos que não permitem análise direta, demandando uma etapa de pré-concentração. Além disso, o esgoto é uma amostra que apresenta diversos interferentes de matriz, sendo necessária também a realização de uma etapa de “*clean-up*”, ou seja, de limpeza da amostra. Tratando-se da determinação destes compostos através de técnicas hífenadas que aplicam separação cromatográfica, o preparo de amostras evita a coeluição dos analitos com os interferentes da matriz, garantindo um maior tempo de vida das colunas cromatográficas e assegurando uma maior confiabilidade dos resultados (Jardim, 2010).

A técnica de preparação de amostras mais amplamente utilizada para este tipo de abordagem é a de extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid-Phase Extraction*), uma vez que é capaz de concentrar os analitos no extrato final, eliminar interferentes da matriz e, a depender dos materiais utilizados, permitir a estocagem/preservação de amostras. A SPE baseia-se em processos químicos e/ou físicos que determinam o isolamento dos analitos de acordo com suas propriedades físico-químicas. A grande maioria das drogas psiquiátricas apresenta caráter apolar e, portanto, podem ser pré-concentradas por meio de mecanismos de adsorção. Em geral, emprega-se uma fase sólida extratora, denominada de sorvente, que é usualmente compactada em colunas descartáveis na forma de cartuchos. O sorvente deve possuir grupos quimicamente ligados capazes de reter analitos através de interações de van der Waals ou dipolo-dipolo (Arbeláez et al., 2015; Dean, 2009; Jardim, 2010).

O procedimento de extração consiste, basicamente, de quatro etapas e deve ser realizado de acordo com as características do analito, da fase extratora e dos solventes a serem utilizados. A primeira etapa consiste no condicionamento da fase extratora através da passagem de um solvente que seja adequado para ativar os grupos funcionais capazes de interagir com o analito. Após o condicionamento do sorvente, a amostra é percolada através do cartucho e o analito é extraído da amostra pelo sorvente. Em seguida, realiza-se uma etapa de lavagem para eliminação de possíveis interferentes. Finalmente, o analito é eluído com a passagem de pequenos volumes de um solvente adequado, resultando em um extrato final concentrado (Dean, 2009; Jardim, 2010). A Figura 6 ilustra as etapas do procedimento de extração por SPE.

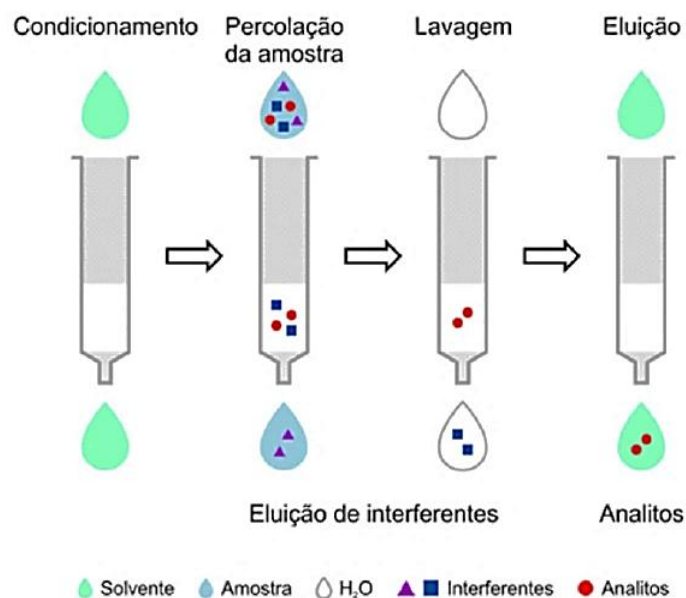


Figura 6. Procedimento experimental da SPE (Caldas et al., 2011)

A extração de drogas psiquiátricas em amostras complexas geralmente envolve a utilização de cartuchos formados por copolímeros com propriedades hidrofílicas e lipofílicas que possibilitam a determinação de espécies polares e apolares, tais como Oasis HLB (Waters, MA, EUA) e Strata-X (Phenomenex, CA, EUA). Contudo, a aplicação destes cartuchos está frequentemente associada à análise multirresíduos de drogas e/ou fármacos e apresenta um alto custo (Dean, 2009; Racamonde et al., 2014). Em se tratando da determinação de apenas um analito apolar, torna-se preferível a aplicação de cartuchos mais economicamente viáveis, tais como os de C18. Nestes tipos de cartuchos, o sorvente é composto por grupos alquila de 18 carbonos quimicamente ligados a partículas de sílica granulada formando a fase extratora, o que permite a retenção de compostos hidrofóbicos. Os cartuchos de C18 têm sido bastante aplicados em alguns trabalhos para determinação de benzodiazepinas, incluindo o diazepam, em amostras de esgoto e tem demonstrado boas recuperações (Almeida et al., 2015).

### 2.3.3. Quantificação

Diversos trabalhos descrevem métodos e procedimentos analíticos voltados à determinação de fármacos psicotrópicos em amostras de esgoto a fim de avaliar sua ocorrência ambiental e estimar o seu consumo por uma população (Arbeláez et al., 2015; Almeida et al., 2013; Mastroianni et al., 2017; Skees et al., 2018; Stuer-Lauridsen et al., 2000). A determinação destas substâncias geralmente envolve a utilização de técnicas de separação cromatográfica, tais como a cromatografia gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*) e cromatografia líquida (LC, do inglês *Liquid Chromatography*), acopladas à espectrometria de massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) ou à MS sequencial (MS/MS, do inglês *Mass Spectrometry in tandem*) para identificação e/ou quantificação dos analitos (Borova et al., 2014; Wille et al., 2012).

A técnica de GC-MS pode ser aplicada na determinação de diversos compostos apolares e voláteis. Entretanto, a análise de substâncias com diferentes propriedades físico-químicas requer uma etapa de derivatização que é, muitas vezes, demorada e irreproduzível. Neste contexto, as metodologias utilizadas envolvendo a técnica hifenada de LC-MS/MS tornaram-se preferíveis e são mais extensivamente aplicadas para este tipo de abordagem devido à sua boa seletividade e sensibilidade (Buchberger, 2007; Gros et al., 2006). Além disso, avanços tecnológicos permitiram o desenvolvimento de métodos cromatográficos mais eficientes, tais como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*), de ultra eficiência (UPLC, do inglês *Ultra Performance Liquid Chromatography*) e de ultra alta eficiência (UHPLC, do inglês *Ultra High Performance Liquid Chromatography*), proporcionando melhores separações com maior resolução e velocidade na aquisição dos dados (Bade et al., 2015; Wille et al., 2012).

Os equipamentos de LC-MS/MS devem apresentar uma interface capaz de transferir os íons em solução da amostra líquida para a fase gasosa, promovendo a ionização dos analitos e permitindo o acoplamento do cromatógrafo líquido ao espectrômetro de massas. A interface mais extensivamente utilizada para determinação de fármacos em amostras ambientais é a fonte de ionização por *electrospray* (ESI, do inglês *Electrospray Ionization*). A Figura 7 mostra a esquematização geral desta fonte de ionização.

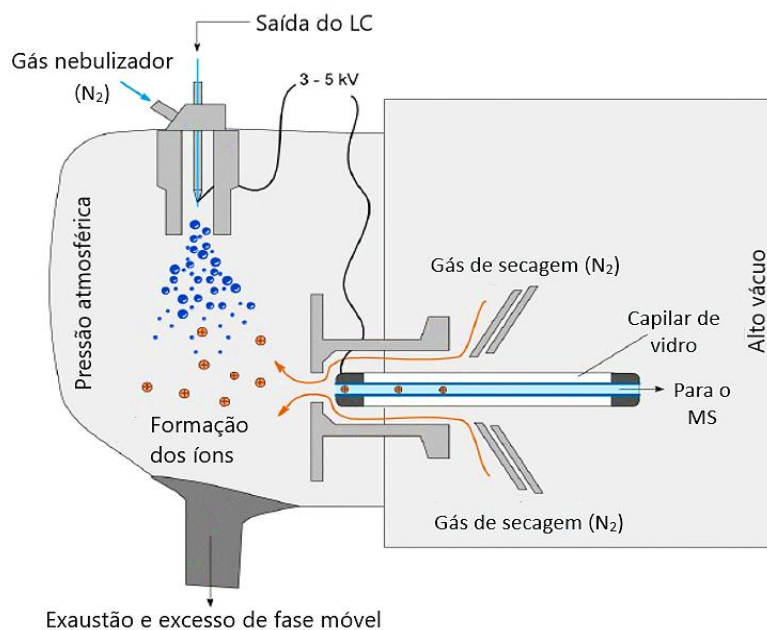


Figura 7. Esquema geral de uma fonte de ESI (Adaptada, Scherf-Clavel, 2016)

Nesta fonte, a solução líquida da amostra é pressurizada por um tubo capilar metálico, sob pressão atmosférica, onde recebe a aplicação de uma alta voltagem (geralmente, de 3 a 5 kV) para produção de um aerossol com gotículas carregadas. As gotículas formadas entram em contato com um gás de secagem em uma região de campo elétrico forte e são dessolvatadas. Este processo diminui a tensão superficial das gotas devido à evaporação do solvente e, conseqüentemente, provoca o aumento gradual da repulsão eletrostática entre as cargas até que ocorra o fenômeno chamado de “explosão coulômbica”, quando há a formação dos íons. Esses íons são gradualmente transferidos para o analisador de massas em alto vácuo (Crotti et al., 2006; Lanças, 2009).

Entretanto, a ESI está frequentemente associada a efeitos de supressão de sinal quando aplicada para amostras complexas, uma vez que íons com múltiplas cargas são formados e dificultam a análise. Uma prática usual capaz de reduzir estes efeitos é a utilização de substâncias denominadas de padrões *surrogate*. Estas substâncias apresentam um comportamento bastante similar ao do analito e, conseqüentemente, coeluem com tempos de retenção muito próximos. Os padrões *surrogate* são adicionados antes do procedimento de preparo de amostras e são igualmente afetados pelos efeitos de matriz, permitindo a correção de supressão do sinal referente ao analito (Gonzalez-Marino et al., 2016). Alguns trabalhos verificaram o sucesso da aplicação da técnica de LC-MS/MS com a fonte de ESI para determinação de benzodiazepinas,



incluindo o diazepam, em amostras de esgoto (Almeida et al., 2013; López-serna et al., 2010).

No que diz respeito aos espectrômetros de massa, os equipamentos mais amplamente empregados na análise de fármacos psiquiátricos são aqueles que apresentam analisadores de massa do tipo triplo quadrupolo (QqQ, do inglês *triple quadrupole*), visto que fornecem uma quantificação precisa e alta sensibilidade. As análises realizadas nestes equipamentos geralmente envolvem a aplicação do modo de aquisição denominado de monitoramento de reações múltiplas (MRM, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*). Esta técnica avalia as transições específicas entre os íons precursores (íons selecionados) e os íons produtos (íons formados após a fragmentação), sendo capaz de pré-selecionar os íons do analito e garantir uma maior seletividade ao método (Arbeláez et al., 2015; Hernández et al., 2011; Wille et al., 2012). A Figura 8 ilustra o esquema geral do analisador do tipo QqQ.

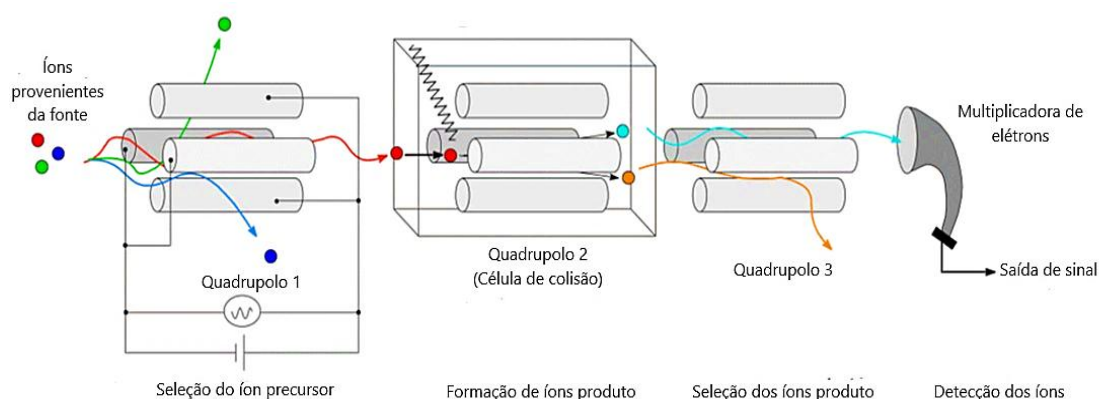


Figura 8. Esquemática geral do QqQ (Adaptada, Scherf-Clavel, 2016)

Neste analisador, os íons formados na fonte de ionização são conduzidos até o primeiro quadrupolo, que atua como um filtro de massas e seleciona os íons precursores. Em seguida, estes íons são fragmentados no segundo quadrupolo, que atua como uma célula de colisão para formação dos íons produto. Finalmente, os íons produto são selecionados no terceiro quadrupolo e detectados por uma placa multiplicadora de elétrons que produz um sinal elétrico que descreve a intensidade do íon com base na sua relação massa/carga ( $m/z$ ).

Outros analisadores, como o híbrido quadrupolo-tempo de voo (QTOF, do inglês *Hybrid Quadrupole-Time-of-Flight*) e o Orbitrap têm se apresentado como excelentes alternativas devido ao alto alcance e acurácia de massa, permitindo a determinação de

um número virtualmente ilimitado de substâncias e, conseqüentemente, um aumento da seletividade assegurado pela redução de falsos positivos. Estas vantagens fornecem ao método uma maior confiabilidade na identificação e quantificação de fármacos em matrizes ambientais. Contudo, por envolverem análises pulsadas, estes analisadores apresentam uma perda de sensibilidade se comparadas às análises realizadas pelo QqQ (Arbeláez et al., 2015; Wille et al., 2012).

#### ***2.4. Estimativa de consumo via epidemiologia do esgoto***

O consumo abusivo de drogas lícitas e ilícitas apresenta conseqüências sociais inestimáveis, uma vez que envolve problemas relacionados à saúde física e mental, violência e economia. Neste contexto, é importante ter conhecimento sobre a prevalência e o consumo destas substâncias para desenvolver campanhas de prevenção e realizar intervenções efetivas. A obtenção destas informações é comumente realizada por meio de pesquisas socioepidemiológicas, dados de comercialização, estatísticas criminais e registros médicos. Embora forneçam uma visão geral sobre o consumo de drogas, estes métodos são caracterizados por falta de objetividade dos dados, longos tempos de análise e, geralmente, não abordam a quantidade real consumida (Mastroianni et al., 2017; van Nuijs et al., 2011).

Uma abordagem alternativa capaz de superar as limitações dos métodos tradicionais de estimativas de consumo é a epidemiologia do esgoto, que se baseia na quantificação de drogas, inalteradas ou sob a forma de metabólitos, presentes nas ETE depois de serem excretadas pelas fezes e urina após o consumo. A quantificação destas substâncias envolve a aplicação de uma série de operações analíticas capazes de determinar os seus valores de concentração e fornecer análises rápidas e objetivas. Subseqüentemente, é feito um retrocálculo com base nos dados de concentração obtidos para ter acesso ao consumo na população atendida pelo sistema de tratamento de esgoto (Baker et al., 2014; Maldaner et al., 2012; Skees et al., 2018; van Nuijs et al., 2011; Zuccato et al., 2008). A Figura 9 ilustra as etapas envolvidas nos estudos de WBE.

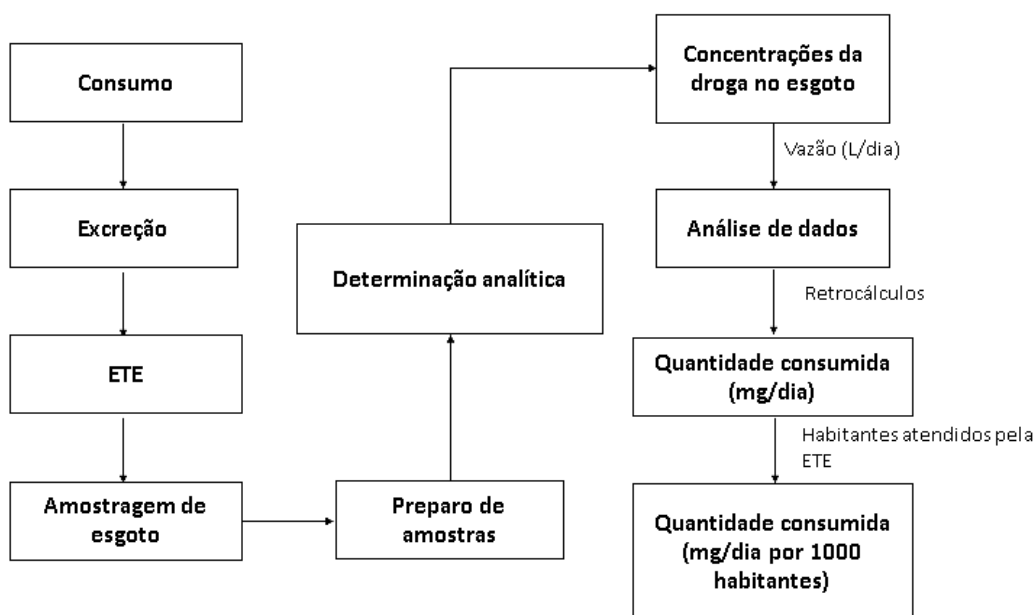


Figura 9. Etapas gerais que envolvem os estudos de epidemiologia de esgoto

As estimativas de consumo dependem, sobretudo, não apenas da concentração da substância-alvo determinada pelo método analítico, mas também de fatores que influenciam na confiabilidade dos resultados obtidos através do retrocálculo. Os principais fatores referem-se aos padrões de excreção e metabolização do analito e às características do sistema de esgotamento sanitário, tais como a vazão do esgoto de entrada na estação de tratamento e o número de habitantes atendidos (van Nuijs et al., 2011). A Equação 1 mostra o retrocálculo para estimativa do consumo ( $C$ ) do analito presente no esgoto.

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

O cálculo envolve a concentração da substância alvo presente no esgoto ( $c$ , em  $\text{mg L}^{-1}$ ), a vazão volumétrica de esgoto que aflui na ETE ( $Q_v$ , em  $\text{L dia}^{-1}$ ), um fator de correção ( $f$ ) referente à taxa de excreção da droga e o número de habitantes ( $hab$ ) atendidos pela ETE. Os resultados obtidos pelo cálculo da estimativa de consumo são comumente expressos em  $\text{kg/dia}/1000\text{habitantes}$ ,  $\text{mg/dia}/1000\text{habitantes}$  ou  $\text{doses/dia}/1000\text{habitantes}$  (Baker et al., 2014; Feitosa et al., 2013; van Nuijs et al., 2011).

Esta metodologia tem sido aplicada em diversas regiões do mundo para estimar o consumo de drogas lícitas e ilícitas (Baker et al., 2014; Baker and Kasprzyk-Hordern, 2011; EMCDDA, 2008a; Skees et al., 2018). Mastroianni et al. (2017) avaliaram os padrões e taxas de consumo de diversas substâncias, tais como álcool, drogas ilícitas e medicamentos, durante cinco anos de pesquisa em Barcelona, na Espanha. No Brasil, Sodré *et al.* (2017) realizaram estimativas de consumo de 16 substâncias, incluindo drogas ilícitas e seus metabólitos, no estado do Distrito Federal durante a copa do mundo de 2014.

Para o estudo em questão, a substância-alvo a ser investigada é o diazepam e, portanto, deve-se ter conhecimento sobre o seu fator de correção para realização do retrocálculo. O valor de  $f$  depende dos padrões de metabolização e excreção do analito e pode ser determinado a partir da relação entre a razão molar da droga e de seu metabólito e a taxa de excreção média da droga pela urina. A Tabela 3 apresenta o fator de correção utilizado para estimativas de consumo do diazepam, como também a sua razão molar e taxa de excreção.

Tabela 3. Razão molar, taxa de excreção e fator de correção utilizados para a estimativa de consumo do diazepam

Composto	Substância-alvo	Razão Molar <sup>a</sup>	Taxa de excreção (%) <sup>b, c</sup>	Fator de correção $f^b$
DIA	DIA	1,0	10	10

<sup>a</sup>Baker *et al.*, 2014; <sup>b</sup>Mastroianni *et al.*, 2017; <sup>c</sup>Carballa *et al.*, 2008.

As estimativas de consumo realizadas para o DIA por meio da WBE costumam adotar o próprio fármaco sob sua forma inalterada como a substância-alvo, uma taxa de excreção de 10 % e, conseqüentemente, um fator de correção igual a 10 (Baker et al., 2014; Mastroianni et al., 2017). Apesar de menos frequente, alguns estudos têm optado pela utilização de metabólitos, como o TZP e o OXA na realização dos retrocálculos (Baker et al., 2014).

## 2.5. Avaliação de risco ambiental e PEC

A presença de contaminantes, incluindo as benzodiazepinas, no ambiente demonstra a necessidade da realização de estudos que determinem os riscos ambientais associados à exposição destas substâncias. Avaliar estes riscos é uma tarefa árdua, pois envolve a obtenção de informações relacionadas à ocorrência, ecotoxicologia e destino

destas substâncias nos compartimentos ambientais que são, na vasta maioria das vezes, escassas. Além do mais, a avaliação também envolve a utilização de métodos analíticos validados capazes de quantificar estas substâncias em amostras ambientais para definir padrões de consumo e os perfis de riscos associados a cada composto através de sua concentração.

A abordagem mais amplamente empregada para ponderar o impacto ambiental destas substâncias é a Avaliação de Risco Ambiental (ERA, do inglês *Environmental Risk Assessment*), que se baseia na relação entre a concentração ambiental prevista (PEC) e a concentração ambiental prevista que não causa efeito (PNEC, do inglês *Predict No-Effect Concentration*). A relação baseia-se no cálculo do quociente de risco (RQ, do inglês *Risk Quotient*) a partir da razão de PEC por PNEC. A Equação 2 mostra o cálculo de RQ (Riva et al., 2019; Sodré et al., 2018b).

$$RQ = \frac{PEC}{PNEC} \quad (2)$$

O valor de PNEC para determinado contaminante em ecossistemas aquáticos   comumente estabelecido através de dados provenientes de testes laboratoriais de toxicidade aguda ou cr nica em organismos de três diferentes níveis tróficos, sendo eles: algas, crustáceos e peixes. Os dados referentes aos testes de toxicidade aguda são normalmente expressos como concentra es necessárias para causar efeitos de curto prazo ( $EC_{50}$ ) ou matar ( $LC_{50}$ ) 50% dos organismos da popula o investigada no teste após um tempo pré-determinado. Já os testes de toxicidade cr nica fornecem dados expressos em concentra es de efeitos não observáveis (NOEC, do inglês *No Observed Effect Concentrations*) ou em menores concentra es de efeitos observáveis (LOEC, do inglês *Lowest Observed Effect Concentrations*). Contudo, estes dados toxicológicos estão associados a uma série de incertezas devido   necessidade de extrapola o das condi es laboratoriais para condi es reais. Desta forma, os dados são relacionados com um fator de avalia o (AF, do inglês *Assessment Factor*) que considera aspectos de variabilidade analítica e biológica, bem como extrapola es de curto a longo prazo e de uma espécie para múltiplas espécies com o objetivo de corrigir estas incertezas. Os valores do fator de avalia o variam de 1 a 1000 e dependem das incertezas associadas (Hernando et al., 2006; Hommen et al., 2010; Riva et al., 2019; Sodré et al., 2018b).

Sob outra perspectiva, o valor de PEC pode ser calculado a partir da obtenção de informações que consideram dados referentes à substância, às estações de tratamento de esgoto e à população investigada. A Equação 3 mostra o cálculo de PEC (em g L<sup>-1</sup>) em compartimentos aquáticos (Stuer-Lauridsen et al., 2000).

$$PEC = \frac{A \times (100 - R)}{365 \times P \times D \times V \times 100} \quad (3)$$

A determinação de PEC envolve a quantidade consumida da substância-alvo por ano ( $A$ , em kg ano<sup>-1</sup>), a taxa remoção nas estações de tratamento de esgoto ( $R$ , em %), o número de habitantes da população investigada ( $P$ ), o volume de esgoto que aflui nas ETE per capita, por dia ( $V$ , em m<sup>3</sup>/hab/dia) e o fator de diluição do efluente ao atingir as águas superficiais do compartimento hídrico investigado ( $D$ ). O valor da taxa de remoção na estação de tratamento envolve, sobretudo, a análise de amostras de afluente e efluente. Todavia, o cálculo deste parâmetro deve considerar não somente a concentração da substância-alvo nas amostras de esgoto, mas também a sua carga no esgoto de acordo com os dados de vazão (Thiebault et al., 2017). A Equação 4 mostra o cálculo da carga (em mg dia<sup>-1</sup>) do analito nas amostras de esgoto.

$$Carga = c \times Qv \quad (4)$$

O cálculo da carga do analito considera a sua concentração ( $c$ , em mg L<sup>-1</sup>) nas amostras de afluente e efluente e a vazão de esgoto que aflui na ETE ( $Qv$ , em L dia<sup>-1</sup>) (Thiebault et al., 2017).

Após a determinação do valor das cargas do analito nas amostras de afluente e efluente, as taxas de remoção podem ser calculadas. A Equação 5 mostra o cálculo realizado para determinar a remoção (em %) da substância-alvo no esgoto.

$$R = 100 - \frac{(Carga\ no\ efluente \times 100)}{Carga\ no\ afluente} \quad (5)$$

Já o fator de diluição pode ser determinado pela razão da vazão do compartimento hídrico investigado ( $Qvch$ , em m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup>) pela vazão total dos efluentes

( $Q_{vef}$ , em  $m^3 s^{-1}$ ) na saída das estações de tratamento (Keller et al., 2014). A Equação 6 mostra o cálculo do fator de diluição.

$$D = \frac{Q_{vch}}{Q_{vef}} \quad (6)$$

Sendo assim, a partir da obtenção dos valores de PEC e PNEC, o quociente de risco é calculado para determinada substância. Se a razão PEC/PNEC for menor que 1, considera-se que a substância não apresenta risco ao ecossistema investigado e nenhuma avaliação adicional é necessária. Entretanto, se o valor da razão for maior ou igual a 1, associa-se um potencial risco ecotoxicológico à substância e novas avaliações acerca dos dados são necessárias (Gros et al., 2010).

No presente estudo, a benzodiazepina a ser investigada é o diazepam e, portanto, deve-se conhecer o valor de PNEC para realização de estudos sobre a avaliação de risco ambiental desta substância. A Tabela 4 mostra o valor de PNEC utilizado neste trabalho, bem como o fator de avaliação e os dados toxicológicos empregados no cálculo de PNEC.

Tabela 4. Valor de PNEC utilizado neste trabalho

Grupo principal	Substância	PNEC (ng L <sup>-1</sup> )	Cálculo do PNEC	Referência
Benzodiazepinas	Diazepam	14100	EC50; AF=1000	Sodré et al., 2018b

De maneira conjunta, o compartimento hídrico investigado é o Lago Paranoá. Portanto, deve-se ter conhecimento sobre o valor de sua vazão média para realização do cálculo do fator de diluição e, conseqüentemente, do PEC do DIA neste compartimento. A vazão do Lago Paranoá de valor igual a  $18,20 m^3 s^{-1}$  foi obtida pelo trabalho desenvolvido por Pires (2014). As vazões dos efluentes na saída das estações apresentam os mesmos valores das vazões de entrada, conforme será apresentado na Tabela 6 posteriormente.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Solventes, sorventes e padrões analíticos

Ácido clorídrico (37%) foi adquirido da Dinâmica Química (SP, BR). Ácido fórmico 98-100% grau MS foi adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha). Metanol (MeOH) de grau HPLC foi adquirido da Tedia (OH, EUA). A água ultrapura utilizada foi obtida pelo sistema de purificação Milli-Q da Millipore (MA, EUA). O padrão analítico de diazepam (DIA) foi adquirido pela polícia civil do Distrito Federal (DF) e o padrão analítico de diazepam deuterado (DIA-d5), em solução de metanol  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ , foi adquirido da Sigma–Aldrich (MO, EUA). Cartuchos extratores Supelclean™ ENVI™-18, com volume de 6 mL e 500 mg de fase extratora, foram adquiridos da Supelco (MO, EUA).

#### 3.2. Instrumentação analítica

O presente estudo envolveu a utilização de dois equipamentos distintos de LC-MS/MS para identificação e quantificação do diazepam em esgoto. O primeiro equipamento foi um sistema de UHPLC-QTOF, instalado no Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB), que consistiu de um cromatógrafo UHPLC Eksigent Ultra-LC 100 XL da Agilent (MA, EUA) acoplado ao espectrômetro de massas TripleToF5600+ da AB Sciex (CA, EUA) com fonte de ionização Dual-Spray da AB Sciex (CA, EUA) e coluna cromatográfica Zorbax RRHD Eclipse Plus® C18 da Agilent (MA, EUA) com 50 mm de comprimento por 2,1 mm de diâmetro interno e partículas de  $1,8 \mu\text{m}$ .

O segundo foi um sistema de UPLC-QqQ, instalado no Instituto Nacional de Criminalística (INC) da Polícia Federal (PF), que consiste de um cromatógrafo UPLC 1290 Infinity (Agilent, MA, EUA) acoplado ao espectrômetro de massas API 3200 (AB Sciex, CA, EUA) com fonte de ionização Turbo V (AB Sciex, CA, EUA) e coluna cromatográfica Kinetex® C18 (Phenomenex, CA, EUA) com 50 mm de comprimento por 2,1 mm de diâmetro interno e partículas de  $1,3 \mu\text{m}$ .

O uso de dois equipamentos foi necessário, pois o UHPLC-QTOF, utilizado no início do trabalho, apresentou problemas na placa de voltagem do sistema de espectrometria de massas, no autoamostrador do UHPLC e no sistema de bombas do mesmo módulo que impossibilitaram o funcionamento do equipamento de maneira



contínua. Os problemas foram primeiramente observados em dezembro de 2018 e imediatamente foi solicitada manutenção frente a existência de recursos financeiros. Houve, porém, muita morosidade na tramitação nos processos de compra, tanto por parte da UnB, mas principalmente por parte da Sciex, sendo que a manutenção foi agendada para junho de 2019. Porém, mediante uma sequência de novos problemas, todos no sistema cromatográfico, o sistema UHPLC-QTOF está inoperante até a data de finalização deste documento. Neste equipamento, desenvolveu-se um método para quantificação do DIA em esgoto a avaliaram-se as figuras de mérito referentes ao procedimento de extração em fase sólida.

Decidiu-se, portanto, pela análise das amostras em outro equipamento (UPLC-QqQ) mediante a otimização dos parâmetros instrumentais cabíveis mostrada ao longo deste documento. A otimização dos parâmetros instrumentais no UHPLC-QTOF, por outro lado, é mostrada no apêndice.

### **3.3. Desenvolvimento do método analítico**

#### *3.3.1. Otimização dos parâmetros instrumentais*

A quantificação de substâncias em sistemas LC-MS/MS é comumente realizada pelo modo de aquisição MRM, tornando-se necessária a otimização dos parâmetros instrumentais do espectrômetro de massas para determinação do analito. A primeira etapa de otimização consiste na seleção do íon precursor e dos íons produto do analito. O íon precursor é frequentemente a molécula protonada ( $[M+H]^+$ ) ou desprotonada ( $[M-H]^-$ ) do analito a depender da polaridade da ionização por electrospray nos modos positivo ( $ESI^+$ ) ou negativo ( $ESI^-$ ), respectivamente. Os íons produtos são selecionados a partir da fragmentação do íon precursor na célula de colisão. Geralmente, são escolhidos os dois íons produto mais abundantes para cada analito, sendo que o primeiro é utilizado para quantificação e o segundo para confirmação, a fim de conferir uma maior confiabilidade na identificação do composto. Após a seleção dos íons, a otimização dos parâmetros instrumentais dependentes do analito deve ser realizada.

No UPLC-QqQ, os parâmetros dependentes do analito são: potencial de orifício (DP, do inglês Declustering Potential), potencial de entrada (EP, do inglês *Entrance Potential*), potencial de entrada da cela de colisão (CEP, do inglês *Collision Cell Entrance Potential*), energia de colisão (CE, do inglês Collision Energy) e potencial de

saída da cela de colisão (CXP, do inglês *Collision Cell Exit Potential*). O DP é o parâmetro utilizado para reduzir a formação de agrupamentos de íons no solvente da amostra e favorecer a formação do íon precursor a ser fragmentado. O EP é o parâmetro empregado para guiar a entrada dos íons no primeiro quadrupolo. O CEP é utilizado para direcionar os íons para cela de colisão. Já o CE é aplicado para aprimorar a fragmentação e, conseqüentemente, a formação dos íons produto através do controle da quantidade de energia de colisão dos íons com o gás inerte fornecida. Finalmente, o CXP é aplicado para controlar a diferença de potencial dos íons que saem da célula de colisão em direção ao terceiro quadrupolo.

Logo em seguida, deve-se otimizar os parâmetros da fonte de ionização para assegurar que o íon precursor seja efetivamente produzido pelo método de ionização. Os parâmetros da fonte são descritos a seguir:

- *Curtain Gas* (CUR): controla fluxo de gás que impede que gotas do solvente obstruam a passagem de íons.
- *Gás de colisão* (CAD): determina a pressão do gás de colisão na cela de colisão.
- *Ion Source Gas 1* (GS1): controla o fluxo de gás inerte para formação do aerossol da amostra.
- *Ion Source Gas 2* (GS2): controla o fluxo do gás auxiliar de secagem para eliminar as gotas do solvente.
- *Ion Spray Voltage* (IS): controla a voltagem aplicada na agulha da fonte.
- *Temperature* (TEM): controla a temperatura aplicada na ionização e permite que o solvente seja praticamente todo vaporizado.

A otimização dos parâmetros foi feita de forma automática e univariada pelo equipamento a partir da realização de injeções sucessivas de soluções dos padrões analíticos com concentrações de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ .

### 3.3.2. Método cromatográfico

O método cromatográfico em análises por LC-MS/MS com fonte ESI deve ser desenvolvido de acordo com as propriedades da matriz e do analito, visando a minimização do efeito de matriz e a maior resolução possível dos picos. No que se refere à determinação de fármacos, o método cromatográfico mais utilizado é envolve colunas de fase reversa, geralmente C18, além de fases móveis compostas por água e

solventes orgânicos, tais como acetonitrila e metanol. A modificação da fase móvel é comumente realizada para aprimorar o processo de ionização na fonte a partir do uso de aditivos, sendo os ácidos fórmico e acético e os tampões de acetato e formiato de amônio os mais utilizados (Dębska et al., 2004).

Os tipos de cromatografia, coluna e fase móvel usados neste trabalho foram definidos com base em trabalhos anteriores que abordam a determinação de diazepam por LC-MS/MS em amostras de esgoto (Almeida et al., 2015; Arbeláez et al., 2015; van der Ven et al., 2004). Assim, optou-se pela separação cromatográfica em fase reversa com coluna C18 e fase móvel utilizada constituída de água e metanol, ambos enriquecidos com 0,1 % de ácido fórmico. Os parâmetros cromatográficos foram otimizados e serão mostrados na seção de Resultados e Discussão.

### 3.3.3. Método de extração em fase sólida

O método de SPE seguiu o protocolo de preparo de amostras proposto por Almeida *et al.* (2015) e foi otimizado de acordo com os materiais e instrumentos disponíveis. Brevemente, alíquotas de 100 mL das amostras foram acidificadas a pH 2,0, enriquecidas com  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  de diazepam deuterado (padrão *surrogate*), filtradas em membranas de microfibras de vidro (GF/C,  $1,2 \mu\text{m}$ ) e de acetato de celulose com  $0,45 \mu\text{m}$  de porosidade (Millipore). As amostras filtradas foram submetidas ao processo de extração empregando-se cartuchos ENVY-18 contendo 500 mg de C18. A fase sólida extratora foi primeiramente condicionada com 10 mL de água ultrapura a pH 2,0 (ajustado com ácido clorídrico) e 10 mL de metanol. Em seguida, as amostras foram percoladas através dos cartuchos sob baixa vazão ( $3 - 4 \text{ mL min}^{-1}$ ) por meio de um sistema construído no laboratório. Este sistema de extração permite o controle manual da vazão e requer certo cuidado para manter o fluxo de solventes contínuo, evitando que os cartuchos sequem. A Figura 10 ilustra o sistema de extração utilizado para as amostras de esgoto.

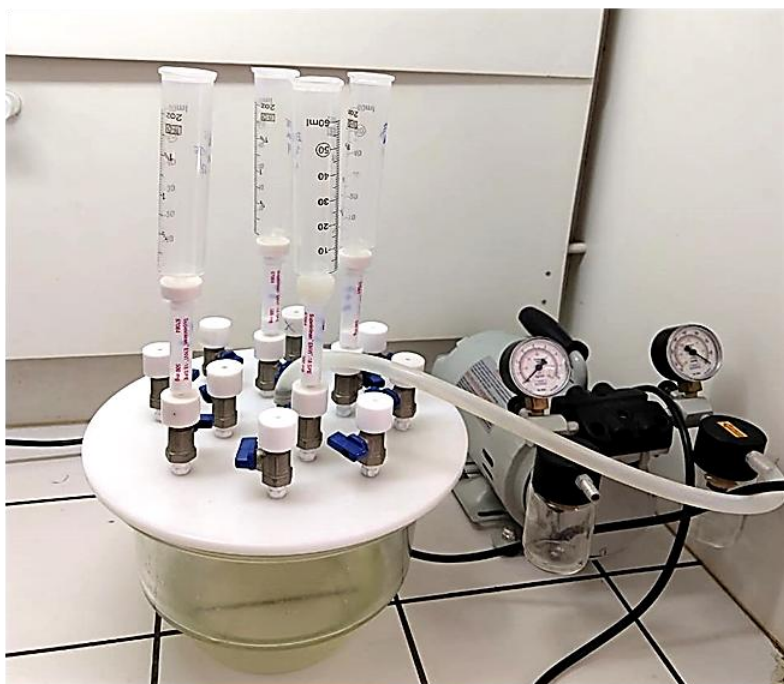


Figura 10. Sistema de extração para as amostras de esgoto

Subsequentemente, os cartuchos foram centrifugados a 4000 rpm por 8 minutos com o objetivo retirar qualquer líquido residual. O procedimento seguinte, de eluição dos analitos, foi realizado em *manifold* a vácuo com duas alíquotas de 5 mL de metanol:0.1 % ácido acético (80:20, v/v). A Figura 11 ilustra o sistema de eluição com *manifold*.

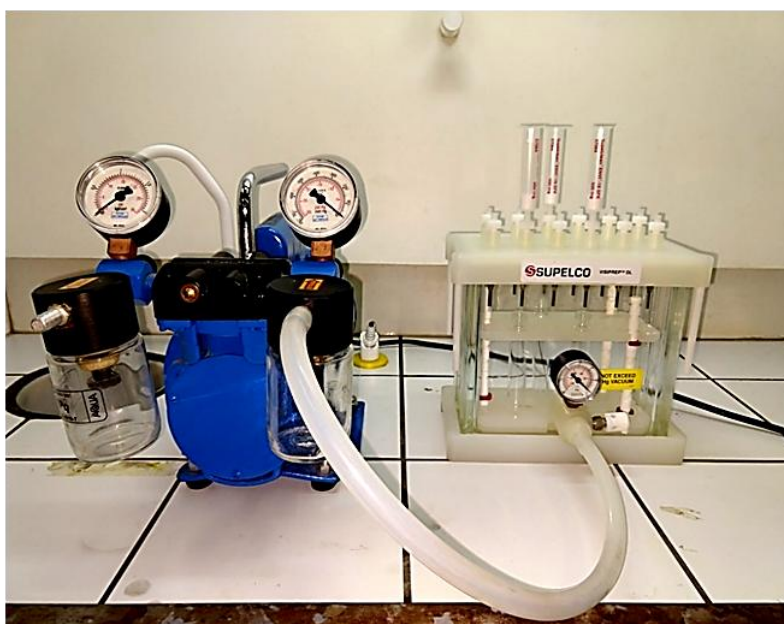


Figura 11. Sistema de eluição com *manifold* utilizado

Finalmente, os extratos foram submetidos à secagem em sistema de evaporação paralela Syncore® Analyst (Buchi) para que o volume fosse reduzido de 10 mL para 500 µL e, posteriormente, completado até 1 mL com água Milli-Q.

### 3.4. Pontos amostrais e coleta de amostras

Neste trabalho, amostras de afluente e efluente foram coletadas em duas estações de tratamento de esgoto, localizadas nos bairros da Asa Norte e Asa Sul em Brasília, denominadas ETE Brasília Norte (ETEBN) e ETE Brasília Sul (ETEBS). Estas estações servem uma população com cerca de 700 mil habitantes (CAESB, 2019). O Distrito Federal possui o maior índice de cobertura de saneamento no Brasil, visto que 88,9% das residências urbanas possuem saneamento adequado e 10,9 % semi-adequado (IBGE, 2011). Desta forma, pode-se considerar que as amostras de esgoto coletadas estão diretamente relacionadas às populações atendidas pelas estações de tratamento. A Tabela 5 mostra as cidades e o número total de habitantes atendidos pelas duas estações, bem como a vazão média de esgoto.

Tabela 5. Características do serviço de esgotamento sanitário no DF (CAESB, 2019)

ETE	Cidades	População atendida	Vazão média (L s <sup>-1</sup> )
ETEBS	Asa Sul, parte da Área Central de Brasília, Núcleo Bandeirante, Guará I e II, Cruzeiro, Octogonal, Sudoeste, Lago Sul (parte), Riacho Fundo (Quadra QN1), SIA, Águas Claras (parte), Candangolândia, Cidade do Automóvel e Setor de inflamáveis	525055	1319
ETEBN	Asa Norte, Vila Planalto, parte da Área Central de Brasília, Lago Norte, Taquari, Estrutural, Varjão e Torto	144287	450

A coleta das amostras foi realizada por técnicos da CAESB. As amostras de afluentes foram coletadas entre os dias 1 e 15 de março de 2019, o que inclui o Feriado de Carnaval (5 de março de 2019, terça-feira). Amostras de afluente foram coletadas em

todos os dias do período designado, enquanto as amostras de efluente foram coletadas apenas nos dias 7, 10, 12 e 14 de março devido às regras estabelecidas pela CAESB, que permitem a coleta de efluente apenas nos domingos, terças e quintas-feiras de cada semana.

O procedimento de coleta foi realizado a partir de uma amostragem composta, onde as alíquotas da amostra são coletadas de hora a hora até atingir o período pré-estabelecido de 24 h. As alíquotas de afluente e efluente correspondentes aos dias de coleta apresentaram o volume de 1 L e foram armazenadas em frascos de vidro âmbar sob refrigeração.

A vazão média de entrada do esgoto nas estações de tratamento, essencial ao cálculo de consumo usando a Equação 1, é mostrada na Tabela 6 para cada dia de coleta.

Tabela 6. Vazão média do esgoto de entrada nas ETE nos dias da coleta

Data da coleta	ETE BN	ETE BS
	Vazão (m <sup>3</sup> dia <sup>-1</sup> )	Vazão (m <sup>3</sup> dia <sup>-1</sup> )
01/03/2019*	53294	117720
02/03/2019*	53939	124909
03/03/2019*	53834	118472
04/03/2019*	46400	120265
05/03/2019*	44050	103619
06/03/2019	46220	109339
07/03/2019	47117	110387
08/03/2019	45147	108021
09/03/2019	38902	97610
10/03/2019	41677	90198
11/03/2019	42617	108086
12/03/2019	49100	108936
13/03/2019	48855	122169
14/03/2019	46976	119099
15/03/2019	49665	113371

\*Carnaval

Devido ao período de manutenção do sistema UHPLC-QTOF e à expectativa de resolução dos problemas observado no equipamento, todas as amostras foram submetidas às etapas de extração, conforme procedimento descrito no subitem 3.3.3, com exceção da etapa de eluição. Ou seja, os analitos foram preservados nos cartuchos ENVI-18<sup>TM</sup> à -20 °C, procedimento este amplamente adotado na literatura como uma das principais formas de armazenamento, preservação e transporte de amostras (McCall et al., 2016; Sodré et al., 2018a). As amostras foram armazenadas durante cerca de 7

meses e os analitos foram eluídos imediatamente antes das análises do sistema UPLC-QqQ.

### **3.5. Parâmetros de Mérito Analítico**

#### **3.5.1. Linearidade**

A linearidade é uma figura de mérito analítico que consiste na capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância a ser determinada, dentro de uma faixa de aplicação específica (Valderrama et al., 2009). Este parâmetro envolve a construção de curvas analíticas e é normalmente avaliado através do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtido a partir da análise de regressão linear.

Para determinar o coeficiente de determinação, utilizou-se o método de calibração com padronização interna. Esta abordagem consiste no preparo de soluções padrão do analito com a adição de uma quantidade fixa e conhecida de uma substância denominada padrão interno. Subsequentemente, avalia-se a relação de sinais entre o padrão e o padrão interno para corrigir flutuações instrumentais e erros associados à introdução da amostra (Ribani et al., 2004). No que se refere às análises realizadas por aplicação de técnicas de separação cromatográfica com detecção por espectrometria de massas, geralmente utilizam-se padrões internos deuterados que apresentam bastante similaridade ao analito e tempos de retenção muito próximos. Sendo assim, construiu-se uma curva analítica de padrão interno que apresentou uma faixa de trabalho de 0,1 a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  para avaliação da linearidade e posterior quantificação do analito pelo método desenvolvido no UPLC-QqQ.

#### **3.5.2. Exatidão**

A exatidão de um método analítico corresponde à concordância entre o valor medido e o valor de referência aceito convencionalmente como verdadeiro, podendo ser avaliada por intermédio da comparação de métodos e de ensaios de recuperação (Valderrama et al., 2009). A recuperação consiste na eficiência do método em manter a quantidade do analito proporcional após a realização de várias etapas do procedimento experimental sujeitas a erro e pode expressar a exatidão em termos de porcentagem.

Neste trabalho, avaliou-se a exatidão do método através de ensaios de recuperação do analito em amostra de esgoto bruto. Uma amostra com 1 L de afluente foi coletada na ETEBN no dia 14 de janeiro de 2019. Em seguida, duas alíquotas de 100 mL desta amostra foram retiradas e submetidas ao processo de extração, em triplicata, descrito no subitem 3.3.3. No entanto, uma alíquota foi enriquecida com o analito antes do processo de SPE e outra foi enriquecida depois da SPE. Os extratos foram analisados no UHPLC-QTOF e a recuperação foi calculada a partir da correlação entre os sinais das áreas de pico obtidos para cada situação (Matuszewski et al., 2003). A Equação 9 demonstra o cálculo realizado:

$$\text{Recuperação Total (\%)} = \frac{R1}{R2} \times 100 \quad (9)$$

O cálculo da recuperação envolveu a correlação entre a média dos sinais de área dos picos referentes à alíquota enriquecida antes da SPE (R1) e a média dos sinais de área dos picos referentes à alíquota enriquecida após a SPE (R2). O enriquecimento com o analito foi feito para três diferentes níveis de concentração, sendo eles: 0,1  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 0,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 1  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

### 3.5.3. Precisão

Diferentemente da exatidão, a precisão do método consiste na estimativa da dispersão de resultados entre ensaios individuais e repetitivos de uma mesma amostra sob as mesmas condições definidas. Uma das maneiras de se avaliar esta figura de mérito analítico é partir da estimativa do desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*), que é determinado através da razão do desvio padrão (s) pela média ( $\bar{x}$ ) das medidas (Valderrama and Braga, 2009). A Equação 10 mostra o cálculo da estimativa do RSD.

$$\text{RSD (\%)} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (10)$$

Os valores de RSD são comumente avaliados a partir da repetibilidade do procedimento analítico de acordo com os objetivos da análise, sendo necessário



considerar o método analítico utilizado, a concentração do analito na amostra e as características da matriz. Estes valores não devem ser superiores a 5 % (ANVISA, 2017).

No presente trabalho, a precisão foi avaliada através da análise dos valores de RSD obtidos através dos ensaios de recuperação para o diazepam citados no subitem 3.5.3.

#### 3.5.4. Limites de Detecção e Quantificação

O limite de detecção (LOD, do inglês *Limit of Detection*) de um método analítico é definido como a menor concentração possível do analito a ser detectada, mas não necessariamente quantificada, pelo método analítico após um determinado procedimento experimental. O limite de quantificação (LOQ, do inglês *Limit of Quantification*) do método corresponde à menor concentração do analito na amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis. Estas figuras de mérito podem ser calculadas experimentalmente com base na relação sinal-ruído para análises que mostram o ruído da linha de base (Valderrama and Braga, 2009). Neste trabalho, os valores de LOD e LOQ instrumentais foram calculados experimentalmente, considerando-se as proporções de 3:1 e 10:1 da relação sinal-ruído dos cromatograma obtidos, respectivamente. Porém, para determinar os valores de LOD e LOQ do método analítico, deve-se considerar o fator de pré-concentração (*FC*) avaliado na etapa de preparo de amostras e os índices de recuperação (*rec*) obtidos para o método. As equações 7 e 8 mostram os cálculos realizados para determinação dos valores de LOD e LOQ do método.

$$LOD_{\text{método}} = \frac{LOD_{\text{instrumental}} \times rec}{FC} \quad (7)$$

$$LOQ_{\text{método}} = \frac{LOQ_{\text{instrumental}} \times rec}{FC} \quad (8)$$

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1. Desenvolvimento do método

#### 4.1.1. Otimização dos parâmetros instrumentais

Seguindo a abordagem reportada em alguns trabalhos que envolvem a aquisição de dados do diazepam por MRM, os íons precursores selecionados para o DIA e o DIA-d5 foram as suas respectivas moléculas protonadas para serem avaliadas no modo positivo de ionização por electrospray (Almeida et al., 2015; Borova et al., 2014; Racamonde et al., 2014). No que diz respeito à seleção dos íons produto referentes a cada íon precursor selecionado, foi feita uma infusão direta dos padrões analíticos no espectrômetro de massas com o objetivo de avaliar a intensidade dos sinais dos íons. A Figura 12 ilustra os sinais dos íons produto observados nos espectros do DIA e DIA-d5 obtidos no UPLC-QqQ.

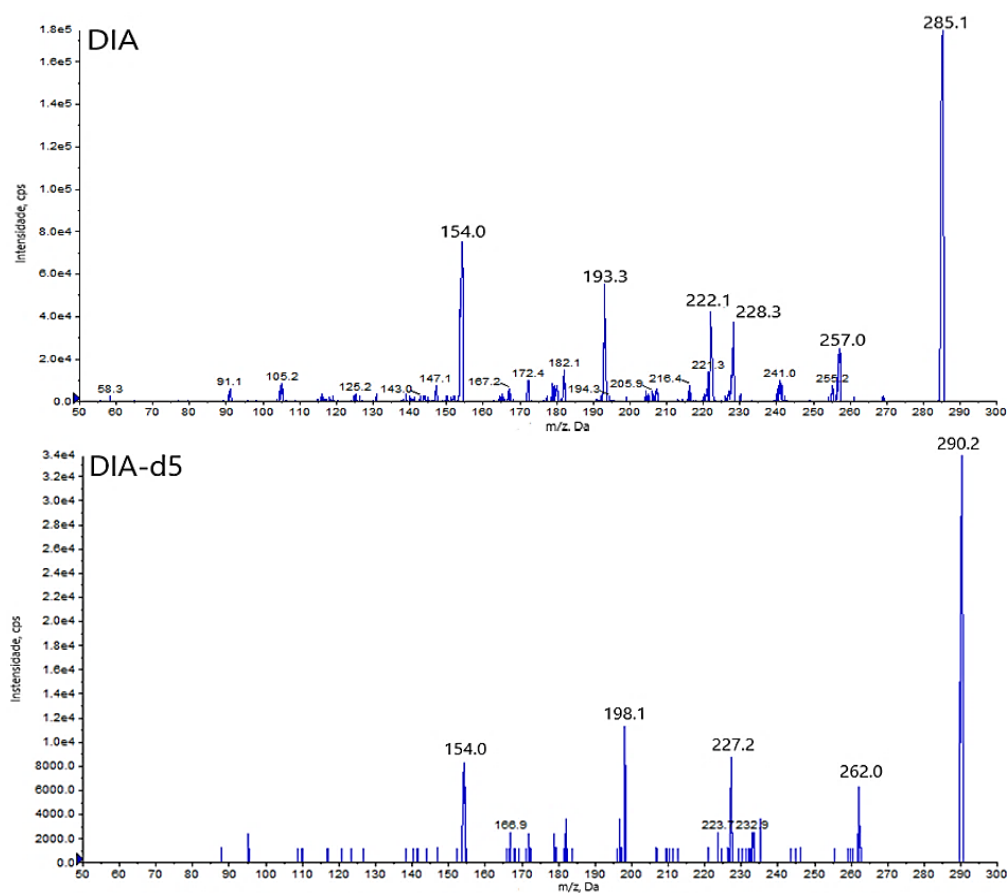


Figura 12. Espectros de massa obtidos para o DIA e DIA-d5 no UPLC-QqQ

Após a avaliação da intensidade dos sinais dos íons obtidos, foram selecionados dois íons produto para cada íon precursor, sendo o mais abundante para quantificação e o segundo para confirmação. Os íons produtos foram selecionados de acordo com a abundância dos fragmentos apresentados no espectro. Para o DIA, o íon produto de quantificação selecionado correspondeu ao íon que possui  $m/z$  154,0 Da e o íon produto de confirmação foi o de  $m/z$  193,3 Da. Estes íons são formados a partir da fragmentação da molécula protonada de diazepam ( $m/z$  285,1 Da). Primeiramente, ocorre a perda de 28 Da correspondente a molécula de monóxido de carbono (CO) e o íon de  $m/z$  257 Da é formado. Em seguida, pode ocorrer a formação tanto do íon de  $m/z$  154 devido à perda de benzonitrila ( $C_6H_5-C\equiv N$ ), como a do íon de  $m/z$  228 em consequência da eliminação de metanimina ( $H_2C=NH$ ). Finalmente, o íon de  $m/z$  193 pode ser formado a partir da perda de 35 Da correspondente ao radical cloro ( $Cl\cdot$ ) (Niessen and A. Correa C., 2017). A Figura 13 ilustra a fragmentação do DIA.

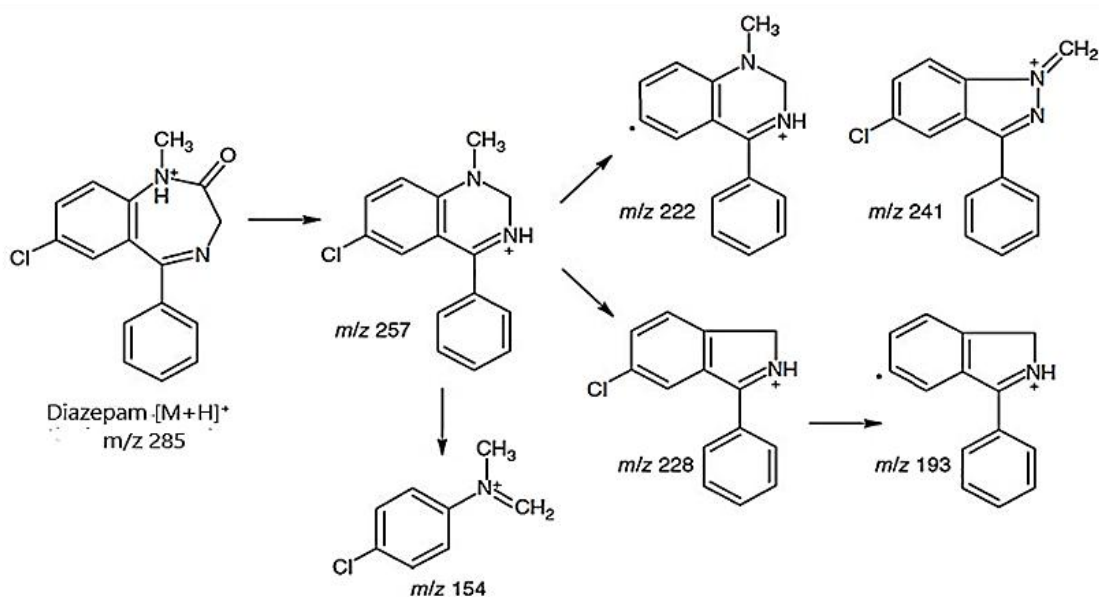


Figura 13. Fragmentação MS/MS do DIA (Niessen and A. Correa C., 2017)

Em seguida, os parâmetros instrumentais de DP, EP, CEP, CE e CXP foram otimizados a partir da utilização do modo de aquisição MRM com rampa destes parâmetros para obtenção dos melhores valores. Os valores ajustados foram empregados em uma análise por injeção de fluxo (FIA, do inglês *Flow Injection Analysis*) automático para realizar a otimização dos parâmetros considerando o fluxo e as

porcentagens de fase móvel na cromatografia. As transições MRM para o DIA e o DIA-d5 foram devidamente avaliadas e os parâmetros otimizados encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7. Parâmetros otimizados e os íons selecionados para cada substância

Analito	DP (V)	EP (V)	CEP (V)	Transição MRM (m/z)	CE (eV)	CXP (V)
DIA	54	10	10	285,1 → 154,0*	35	2
				285,1 → 193,3	35	2
DIA-d5	34	11	8	290,2 → 198,1*	36	5
				290,2 → 154,0	34	5

\*Transição utilizada para quantificação

Por fim, os parâmetros da fonte de ionização foram otimizados através de uma análise automática e univariada realizada pelo equipamento para obtenção dos valores mais satisfatórios. A Tabela 8 mostra os parâmetros otimizados para modo positivo de ionização.

Tabela 8. Parâmetros instrumentais da fonte de ionização otimizados

Parâmetro	Valor
CUR (psi)	45
CAD (psi)	4
IS (V)	7000
TEM (°C)	400
GS1(psi)	56
GS2 (psi)	50

Considerando os trabalhos que abordam a quantificação do DIA por LC-MS/MS no modo ESI+, os valores dos íons produto selecionados e as transições de quantificação e confirmação obtidas nestes estudos encontraram-se similares aos reportados da literatura (Almeida et al., 2015; Borova et al., 2014; López-Serna et al., 2011; Racamonde et al., 2014).

#### 4.1.2. Método cromatográfico

Os parâmetros cromatográficos foram otimizados após a realização de injeções sucessivas dos padrões analíticos para obtenção de cromatogramas que apresentassem resolução de intensidade de sinal com menor tempo de análise, prezando por rápida frequência analítica. A Tabela 9 mostra os parâmetros estabelecidos após a otimização, da qual apresentou melhor resolução cromatográfica e maior intensidade de sinal

conforme é possível observar na Figura 14, que ilustra o cromatograma de íons totais (TIC, do inglês *Total Ion Chromatogram*) obtido e os cromatogramas referentes ao DIA e DIA-d5.

Tabela 9. Parâmetros cromatográficos otimizados

Parâmetro	Valor
Volume de injeção ( $\mu\text{L}$ )	6
Vazão da fase móvel ( $\mu\text{L min}^{-1}$ )	0,3
Gradiente de fase móvel	0-1 min: 20% B; 1-2,5 min: 95% B
Temperatura da coluna ( $^{\circ}\text{C}$ )	30

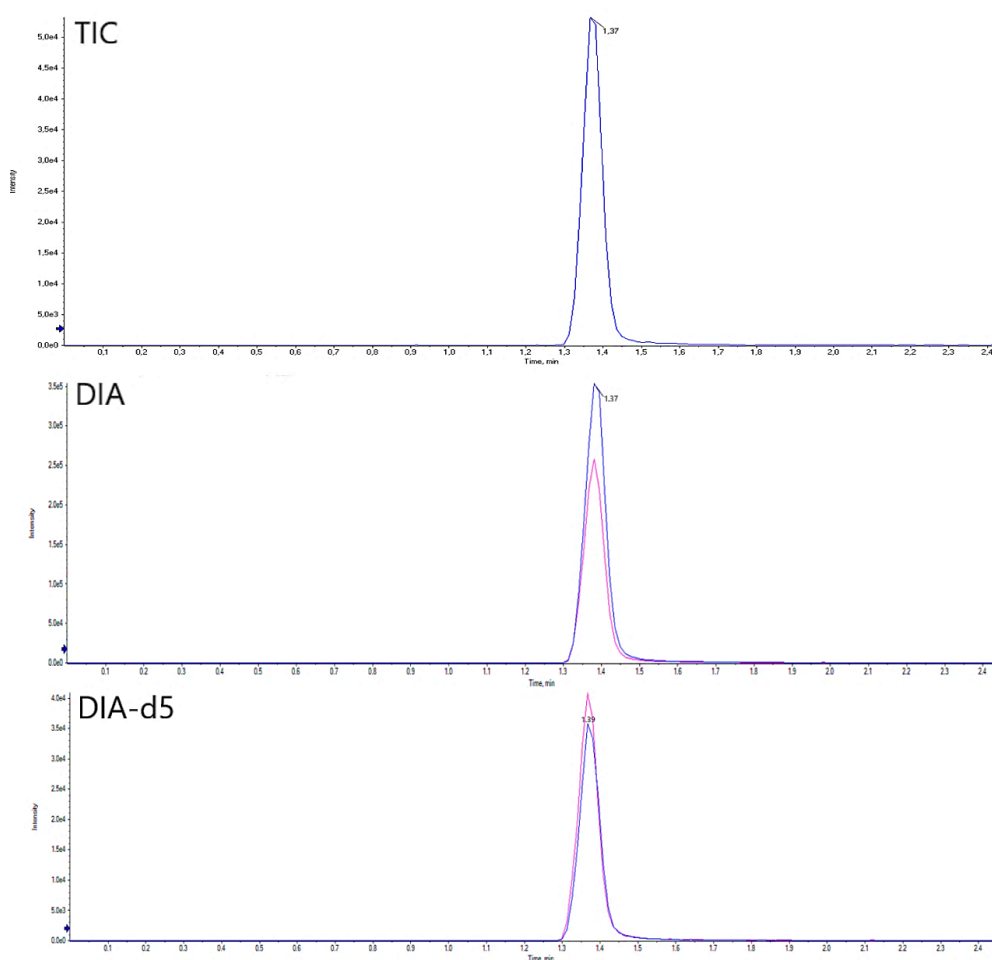


Figura 14. TIC e cromatogramas referentes ao DIA e DIA-d5

Durante a corrida cromatográfica com duração total de dois minutos e meio, o DIA e o DIA-d5 apresentaram tempos de retenção iguais a 1,37 e 1,39 min, respectivamente. Mesmo com a proximidade nos tempos de retenção, foi possível especificar cada substância a partir da análise individual de cada uma das transições íon

precursor-íon produto atribuídas aos diferentes compostos, que foi proporcionada pelo modo MRM.

## 4.2. Parâmetros de mérito analítico

### 4.2.1. Linearidade e Curva analítica

Para inferir a linearidade do método desenvolvido no UPLC-QqQ, foi construída uma curva analítica com correção de padrão interno deuterado empregando-se sete pontos com uma faixa de trabalho de 0,1 a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Na Figura 15 está exposta a curva analítica para o DIA obtida no sistema UPLC-QqQ.

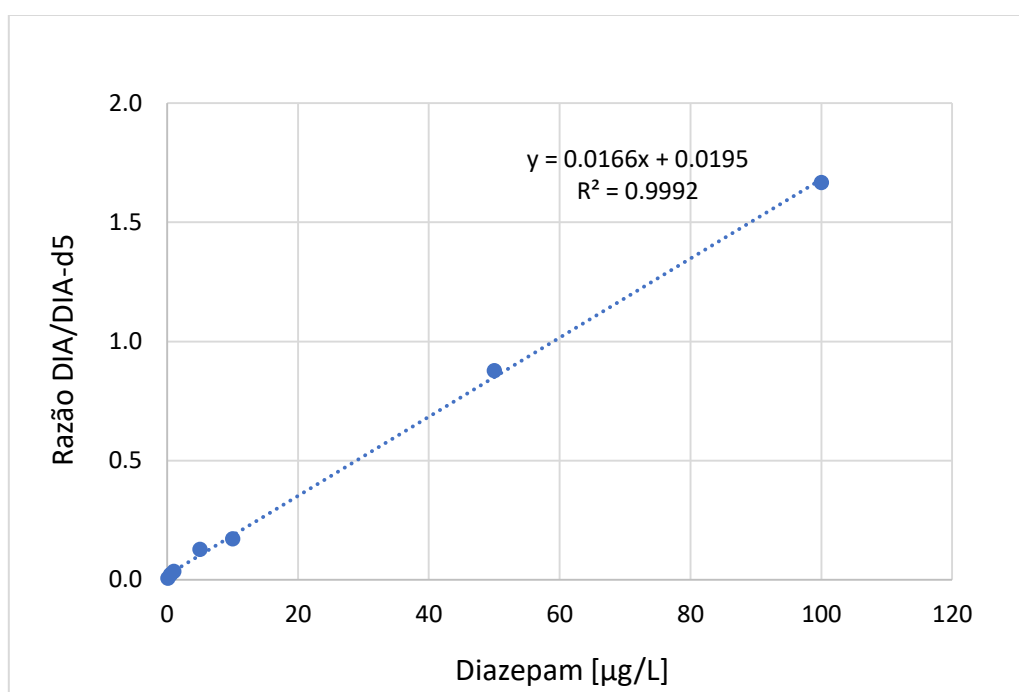


Figura 15. Curva analítica para o diazepam no UPLC-QqQ

O ajuste de dados foi feito pelo modelo de regressão linear simples e os parâmetros obtidos a partir da curva estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Parâmetros da curva analítica obtida no UPLC-QqQ

Composto	Padrão Interno	Equação da reta	R <sup>2</sup>	Faixa Linear ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
DIA	DIA-d5	$y = 0,0166x + 0,0195$	0,9992	0,1 - 100

Observa-se que, através dos resultados obtidos, a linearidade do método apresentou-se adequada devido ao ajuste apropriado dos dados. O coeficiente de determinação apresentou um valor maior que 0,99 e se encontra de acordo com os valores designados pelas normas da ANVISA e do Inmetro, bem como com outros trabalhos que apresentaram a mesma determinação reportados na literatura (Almeida et al., 2015; ANVISA, 2017; CGCRE and INMETRO, 2016; Mastroianni et al., 2017; Racamonde et al., 2014).

#### 4.2.2. Exatidão e Precisão

A exatidão e a precisão do método foram avaliadas simultaneamente através da realização de ensaios de recuperação para três diferentes níveis de concentração do DIA. Após a realização dos ensaios, os extratos foram analisados no UHPLC-QTOF e a recuperação foi calculada através da Equação 9. Os resultados de recuperação são mostrados na Tabela 13.

Tabela 11. Recuperação do método para o diazepam.

Nível de concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Recuperação do analito (%)	RSD (n = 3, %)
0,1	90,15	1,66
0,5	86,75	2,24
1	93,44	2,40
Média	90,1	3,8

Os valores de recuperação obtidos variaram de 87% a 93%, enquanto os valores de desvio padrão relativo apresentaram-se inferiores a 5% para três diferentes níveis de concentração. Estes valores mostram-se suficientes para assegurar o efetivo isolamento do analito frente a possíveis interferentes da matriz e, embora o efeito de matriz não tenha sido calculado, foi possível garantir exatidão e precisão satisfatórias para determinação. A recuperação média de  $90 \pm 4\%$  obtida apresentou concordância com os valores comumente encontrados na literatura (Almeida et al., 2015; Arbeláez et al., 2015; Racamonde et al., 2014; Togunde et al., 2012).

#### 4.2.3. Limites de Detecção e Quantificação

Os valores dos limites de detecção e quantificação instrumentais foram determinados experimentalmente a partir da relação sinal-ruído do cromatograma obtido

para o diazepam. A Tabela 11 mostra os valores de LOD e LOQ instrumentais obtidos no UPLC-QqQ.

Tabela 12. Limites de detecção e quantificação instrumentais

Substância	LOQ <sub>instrumental</sub> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOD <sub>instrumental</sub> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
DIA	0,1	0,03

Já os valores de LOD e LOQ do método foram determinados com base na recuperação e no fator de pré-concentração do procedimento de preparo de amostras. O fator de pré-concentração apresentou um valor igual a 100, uma vez que o volume da amostra é reduzido de 100 para 1 mL. A Tabela 12 apresenta os valores obtidos para os limites de detecção e quantificação do método.

Tabela 13. Limites de detecção e quantificação do método

Substância	LOQ <sub>método</sub> ( $\text{ng L}^{-1}$ )	LOD <sub>método</sub> ( $\text{ng L}^{-1}$ )
DIA	0,9	0,3

Os limites de detecção e quantificação do método apresentaram-se próximos aos de outros valores reportados na literatura para determinação de DIA no esgoto por LC-MS/MS (Baker et al., 2014; Borova et al., 2014; González-Mariño et al., 2018; Racamonde et al., 2014).

#### **4.3. Quantificação de DIA no esgoto**

Os extratos finais obtidos após a eluição dos analitos foram analisados no UPLC-QqQ empregando-se a curva analítica com padronização interna apresentada no subitem 4.3.1. As concentrações de DIA encontradas nas amostras de esgoto, em  $\text{ng L}^{-1}$ , são apresentadas na Tabela 14.



Tabela 14. Valores de concentração do DIA encontrados nas amostras de esgoto

Dia da semana	Afluentes	
	ETEBN	ETEBS
	DIA (ng/L $\pm$ SD)	
Sexta (01/03/2019)*	ND	ND
Sábado (02/03/2019)*	ND	ND
Domingo (03/03/2019)*	ND	ND
Segunda (04/03/2019)*	ND	ND
Terça (05/03/2019)*	ND	ND
Quarta (06/03/2019)	ND	ND
Quinta (07/03/2019)	ND	ND
Sexta (08/03/2019)	ND	ND
Sábado (09/03/2019)	< 0,9	< 0,9
Domingo (10/03/2019)	ND	ND
Segunda (11/03/2019)	ND	ND
Terça (12/03/2019)	ND	1,1 $\pm$ 0,02
Quarta (13/03/2019)	ND	3,5 $\pm$ 0,4
Quinta (14/03/2019)	ND	ND
Sexta (15/03/2019)	ND	ND
Dia da semana	Efluente	
	DIA (ng/L $\pm$ SD)	
	DIA (ng/L $\pm$ SD)	DIA (ng/L $\pm$ SD)
Quinta (07/03/2019)	ND	ND
Domingo (10/03/2019)	ND	ND
Terça (12/03/2019)	ND	ND
Quinta (14/03/2019)	ND	ND

\*Carnaval

ND: não detectado

Foi observado que, durante o período de 15 dias de coleta, o DIA apresentou uma baixa frequência de detecção e de quantificação nas amostras. No que diz respeito às amostras de afluentes, o DIA foi detectado em quatro de 30 amostras coletadas, sendo que apresentou concentrações acima do LOQ em apenas duas delas. Já nas amostras de efluente, o DIA não foi detectado em nenhuma das amostras coletadas. A Figura 16 mostra alguns dos cromatogramas obtidos no ULPC-QqQ que evidenciam situações de quantificação (> LOQ), de somente detecção (< LOQ) e de não detecção (ND ou < LOD) do DIA nas amostras analisadas.

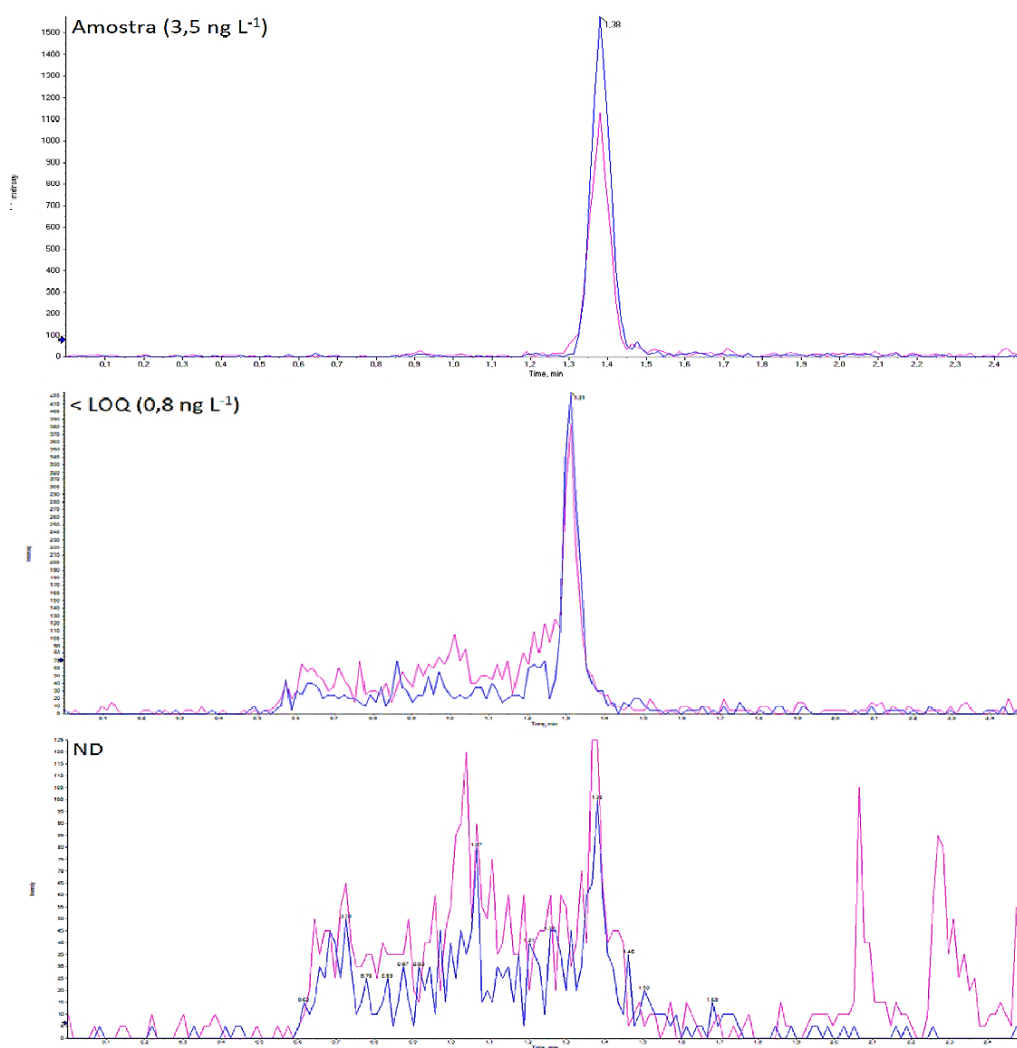


Figura 16. Cromatogramas obtidos a partir da análise das amostras de esgoto

Embora o DIA tenha sido quantificado em duas amostras de afluentes (Tabela 14), as concentrações encontradas apresentaram valores baixos, mas que são condizentes com os níveis encontrados em diversos trabalhos da literatura, constatando baixa frequência de quantificação deste fármaco no esgoto (Baker et al., 2014; Huerta-fontela et al., 2010; Skees et al., 2018; Ternes et al., 2001; Togunde et al., 2012; Wang et al., 2017).

Os valores encontrados podem ser consequência do baixo consumo do DIA pela população do DF, da elevada metabolização desse fármaco pela urina, visto que alguns trabalhos reportam concentrações mais elevadas de seus metabólitos TZP e OXA no esgoto, também usados para estimar o consumo deste medicamento (Racamonde et al., 2014).

Outra possibilidade é a degradação do DIA durante o período de armazenamento dos cartuchos. Embora o método tenha previsto o uso de padrão surrogate deuterado como forma de prevenir resultados inexatos, cabe mencionar que para algumas amostras o DIA-d5 não se apresentou sinal quantificável. Isso significa que tanto o DIA-d5 quanto o DIA podem ter se degradado. Embora isto não implique em perda de exatidão do método, já que se espera que a razão do sinal de ambas as substâncias se mantenha, pode ter ocorrido perda de detectabilidade do método.

#### **4.4. Estimativa de consumo via WBE**

Em virtude da baixa frequência de quantificação do DIA nas amostras investigadas neste estudo, duas estratégias distintas foram usadas para estimar o consumo deste fármaco nas regiões atendidas pelas ETE. A primeira considerou um consumo mínimo ( $C_{mín}$ ) de DIA, onde apenas os valores numéricos resultantes da quantificação do analito foram usados para se gerar uma média de consumo. Assim, o DIA foi considerado ausente nas amostras reportadas como ND ou <LOQ. A segunda estratégia retratou um consumo máximo ( $C_{máx}$ ) desta substância, considerando a presença de DIA sob concentrações iguais ao LOD ( $0,3 \text{ ng L}^{-1}$ ) nas amostras reportadas como ND e sob concentrações iguais ao LOQ ( $0,9 \text{ ng L}^{-1}$ ) nas amostras que apresentaram concentrações abaixo do LOQ do método. As estimativas de consumo foram então realizadas aplicando-se o fator de correção  $f$  de 10 (Tabela 3). A Tabela 15 mostra as vazões volumétricas do esgoto em cada dia investigado (em  $\text{L dia}^{-1}$ ) e o consumo máximo e mínimo estimados, em  $\text{mg/dia}/1000\text{hab}$ , nas regiões atendidas por cada uma das ETE.

Tabela 15. Valores de consumo máximo e mínimo obtidos a partir da WBE

Dia da semana	ETEBN			ETEBS		
	Afluente					
	Vazão média (L/dia)	<i>C<sub>máx</sub></i> (mg/dia/1000hab)	<i>C<sub>mín</sub></i>	Vazão média (L/dia)	<i>C<sub>máx</sub></i> (mg/dia/1000hab)	<i>C<sub>mín</sub></i>
Sexta (01/03/2019)*	53294281	1,11	–	117719736	0,67	–
Sábado (02/03/2019)*	53938679	1,12	–	124908920	0,71	–
Domingo (03/03/2019)*	53834279	1,12	–	118472135	0,68	–
Segunda (04/03/2019)*	46400296	0,96	–	120264931	0,69	–
Terça (05/03/2019)*	44049501	0,92	–	103618568	0,59	–
Quarta (06/03/2019)	46220296	0,96	–	109338955	0,62	–
Quinta (07/03/2019)	47116694	0,98	–	110386553	0,63	–
Sexta (08/03/2019)	45147499	0,94	–	108021358	0,62	–
Sábado (09/03/2019)	38901513	2,42	–	97610181	1,67	–
Domingo (10/03/2019)	41677107	0,87	–	90197798	0,52	–
Segunda (11/03/2019)	42616705	0,89	–	108086158	0,62	–
Terça (12/03/2019)	49100290	1,02	–	108935756	2,13	2,13
Quarta (13/03/2019)	48855491	1,02	–	122169326	8,18	8,18
Quinta (14/03/2019)	46976295	0,98	–	119098533	0,68	–
Sexta (15/03/2019)	49665489	1,03	–	113370946	0,65	–
Média		1,1	–		1,3	0,7

\*Carnaval

Verificou-se na Tabela 15 que, devido a não quantificação do DIA nas amostras de afluente oriundas da ETEBN, não houve um *C<sub>mín</sub>* deste medicamento nas regiões atendidas por esta estação durante o período de 15 dias. Por outro lado, nas regiões atendidas pela ETEBS, o *C<sub>mín</sub>* médio foi de 0,7 mg/dia/1000hab. Este valor advém do consumo estimado somente em dois dias da semana seguinte a do carnaval. A Figura 17 ilustra a variação diária de *C<sub>mín</sub>* de DIA estimado nas regiões atendidas pelas ETE durante o período de 15 dias.

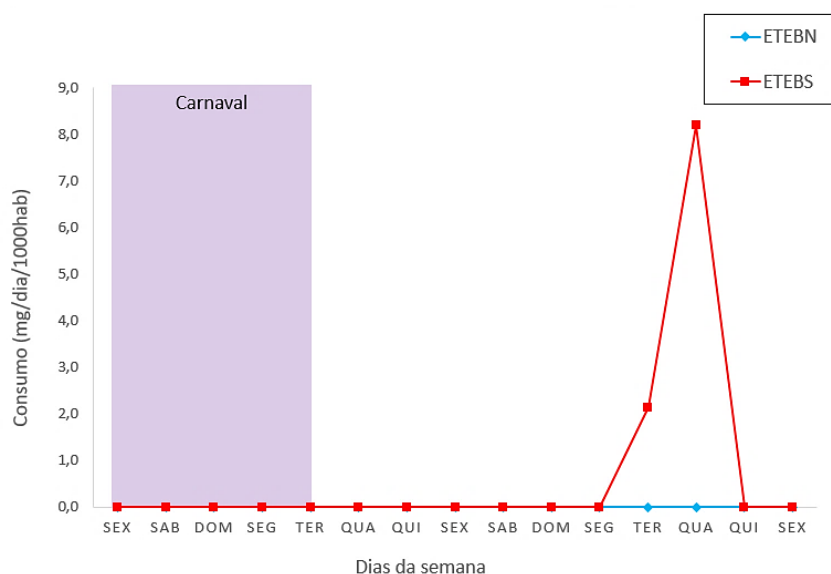


Figura 17. Consumo mínimo de DIA durante o período de 15 dias

A Figura 17 evidencia que o consumo de DIA nas duas regiões investigados foi pouco significativo durante o carnaval. Contudo, uma semana após este evento festivo foi estimado um  $C_{mín}$  desta substância nas regiões atendidas pela ETEBS e avaliou-se que pico máximo de consumo se concentrou na quarta-feira (13/03/2019).

Acerca dos dados de  $C_{máx}$ , foi verificado que as regiões atendidas pela ETEBS apresentaram um consumo (1,3 mg/dia/1000hab) ligeiramente superior ao das regiões servidas pela ETEBN (1,1 mg/dia/1000hab). Tal qual para o  $C_{mín}$ , em ambas as regiões, constatou-se um baixo  $C_{máx}$  de DIA durante o carnaval e um aumento deste consumo nos dias seguintes. A Figura 18 mostra a variação diária do  $C_{máx}$  de DIA estimado durante o período de 15 dias.

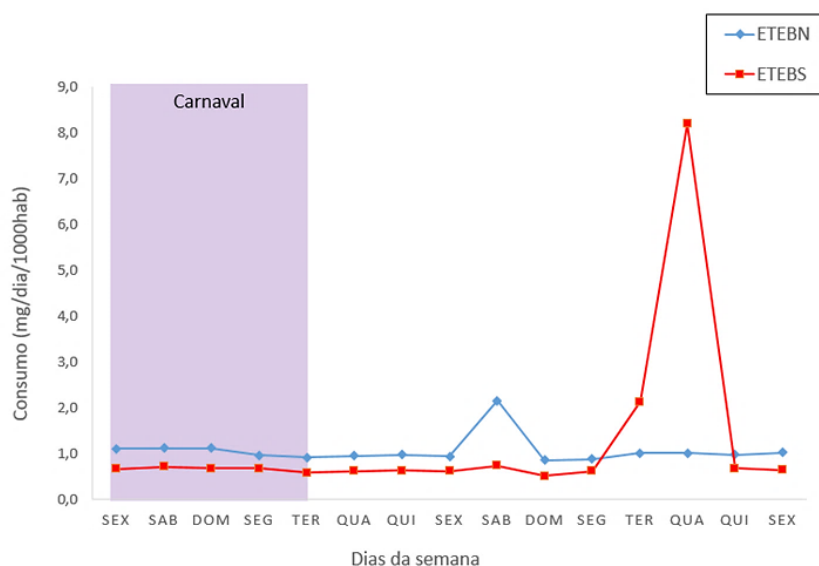


Figura 18. Consumo máximo de DIA durante o período de 15 dias

Nas regiões atendidas pela ETEBN, observou-se um leve aumento de consumo 4 dias após o carnaval, no fim de semana. Já nas regiões atendidas pela ETEBS, observou-se apenas o aumento de consumo na semana seguinte ao evento, com pico máximo concentrado na quarta-feira (13/03/2019).

De acordo com estes resultados foi verificado, não apenas um baixo consumo de DIA durante o carnaval, mas também um aumento de consumo nos dias seguintes ao evento. Ainda que alguns trabalhos reportem o uso recreativo desta substância em eventos festivos, não foi possível associar qualquer tipo de influência do carnaval no aumento do consumo do diazepam nas regiões investigadas (Causanilles et al., 2017; Hoegberg et al., 2018). Por outro lado, cabe mencionar que o aumento do consumo verificado após o carnaval pode estar associado ao fim da euforia ocasionada pelo evento e o retorno à rotina social exaustiva que pode favorecer o desenvolvimento de doenças e transtornos psicológicos e, conseqüentemente, impactar diretamente no consumo de medicamentos ansiolíticos (Ferreira et al., 2017).

A Tabela 16 mostra os valores médios de consumo de DIA nas regiões investigadas e o valor médio total considerando-se todas as amostras investigadas.

Tabela 16. Consumo médio de DIA avaliado nas regiões de cada ETE

ETE	<i>Cmáx</i>	<i>Cmín</i>
	(mg/dia/1000hab)	
ETE BN	1,089	–
ETE BS	1,318	0,695
Média	1,204	0,348

Observa-se na Tabela 16 que, ao avaliar as regiões atendidas pelas duas ETE, estimou-se um *Cmín* de 0,348 mg/dia/1000hab e um *Cmáx* de 1,204 mg/dia/1000hab, que correspondem a 0,03 e 0,1 doses/dia/1000hab, respectivamente, considerando que uma dose média apresenta 10 mg de DIA (Mastroianni et al. 2017).

Realizando uma extrapolação para 100 % da população total do DF em 2019 (3.015.268 habitantes, IBGE, 2019), tem-se uma carga consumida de DIA entre 0,38 e 1,32 kg ano<sup>-1</sup>. Considerando que a população entre 15 a 64 anos do DF corresponde a 79% dos habitantes, estes valores podem alcançar uma faixa entre 0,5 e 1,7 kg ano<sup>-1</sup>, respectivamente. Na Tabela 17, os valores de consumo de DIA no DF são comparados a valores de consumo estimados por WBE em outras regiões do mundo.

Tabela 17. Consumo de DIA estimado via WBE em vários países

País	Nº de ETE investigadas	Ano	Consumo (mg/dia/1000hab)	Referência
Inglaterra	1	2011	28 <sup>a</sup>	Baker et al., 2014
Espanha	1	2011 - 2015	35 – 221 <sup>b</sup>	Mastroianni et al., 2017
China	13	2013	7,6 - 10,6	Wang et al., 2016
Estados Unidos	1	2018	6	Skees et al., 2018
Brasil	2	2019	0,3 – 1,2	Este trabalho

<sup>a</sup>valor estimado considerando a quantificação pelo metabólito oxazepam; <sup>b</sup>valor estimado para a população com idade entre 15 e 64 anos

Verificou-se que o consumo de DIA estimado no DF foi menor do que em outros países, principalmente aqueles situados no continente europeu. Nestes países, o consumo de benzodiazepínicos tem aumentado, principalmente na Espanha, desde 2000 com ápice de aumento durante o período de 2009 a 2012 devido à crise econômica (Mastroianni et al., 2017; Racamonde et al., 2014).

De acordo com Azevedo et al. (2014) observa-se no Brasil uma diminuição no consumo de DIA nas principais capitais brasileiras nos últimos anos, incluindo Brasília, notadamente relacionada à tendência de opção por medicamentos ansiolíticos de curta duração, visto que os de longa duração são frequentemente associados a casos de dependência e abuso. Os autores ainda verificaram que o alprazolam e o bromazepam

têm sido os benzodiazepínicos mais prescritos por médicos no Brasil, seguindo a preferência por estes medicamentos de curta duração.

#### ***4.5. Avaliação da comercialização de DIA no DF a partir de dados da ANVISA***

De acordo com os objetivos propostos neste trabalho, fez-se necessário ter conhecimento sobre a quantidade de DIA comercializada no Distrito Federal para avaliar o seu padrão de consumo e realizar comparações com os dados obtidos por epidemiologia do esgoto. Para avaliar o consumo deste medicamento, foi feita uma consulta ao Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados (SNGPC), controlado pela ANVISA, a fim de obter informações referentes à venda dos medicamentos contendo o princípio ativo diazepam no DF durante o período de 2011 a 2018. Foram fornecidas duas planilhas contendo os dados da quantidade dos medicamentos comercializada de acordo com o período designado. A primeira apresentava os dados de comercialização entre os anos de 2011 e 2015 e uma série de informações, destacando-se as variadas formas e regiões de venda em todo Brasil. A segunda exibia os dados referentes aos anos de 2016 a 2018, contendo as formas de venda no Distrito Federal. Desta maneira, foi necessária a realização de um tratamento das planilhas para obtenção dos dados de massa de princípio ativo comercializada por ano na região do DF.

Os dados apresentados na primeira planilha estão organizados em onze colunas, sendo elas: ano; número do produto; nome do princípio ativo; descrição da unidade farmacotécnica; unidade federativa da venda; conselho da unidade federativa; quantidade vendida na unidade federativa; nome da cidade e quantidade vendida na cidade. A segunda planilha estava organizada em 7 colunas, sendo elas: ano; mês; nome do princípio ativo; descrição da unidade farmacotécnica; quantidade vendida; nome da cidade e conselho da unidade federativa. As Figuras 19 e 20 mostram as planilhas de dados fornecidas pela ANVISA.



A	B	C	D	E	F	G
ANO	NO_PRODUTO	DS_SUBSTANCIA	NU_REGISTRO	DS_APRESENTACAO_PRODUTO	SG_CONSELHO	CO_UF_CONSELHO
2011	ANSILIVE	DIAZEPAM	1003300020015	5 MG COM REV CT BL AL/PLAS TRANS X 20	CRMV	AL
2011	ANSILIVE	DIAZEPAM	1003300020015	5 MG COM REV CT BL AL/PLAS TRANS X 20	CRM	AL
2011	ANSILIVE	DIAZEPAM	1003300020015	5 MG COM REV CT BL AL/PLAS TRANS X 20	CRM	PE
2011	ANSILIVE	DIAZEPAM	1003300020015	5 MG COM REV CT BL AL/PLAS TRANS X 20	CRM	AP
2011	ANSILIVE	DIAZEPAM	1003300020015	5 MG COM REV CT BL AL/PLAS TRANS X 20	CRM	BA
2011	ANSILIVE	DIAZEPAM	1003300020015	5 MG COM REV CT BL AL/PLAS TRANS X 20	CRM	PA
2011	ANSILIVE	DIAZEPAM	1003300020015	5 MG COM REV CT BL AL/PLAS TRANS X 20	CRM	CE
2011	ANSILIVE	DIAZEPAM	1003300020015	5 MG COM REV CT BL AL/PLAS TRANS X 20	CRO	CE
2011	ANSILIVE	DIAZEPAM	1003300020015	5 MG COM REV CT BL AL/PLAS TRANS X 20	CRM	DF
2011	ANSILIVE	DIAZEPAM	1003300020015	5 MG COM REV CT BL AL/PLAS TRANS X 20	CRM	SP
2011	ANSILIVE	DIAZEPAM	1003300020015	5 MG COM REV CT BL AL/PLAS TRANS X 20	CRM	ES
2011	ANSILIVE	DIAZEPAM	1003300020015	5 MG COM REV CT BL AL/PLAS TRANS X 20	CRM	GO
2011	ANSILIVE	DIAZEPAM	1003300020015	5 MG COM REV CT BL AL/PLAS TRANS X 20	CRM	MA
2011	ANSILIVE	DIAZEPAM	1003300020015	5 MG COM REV CT BL AL/PLAS TRANS X 20	CRM	PI
2011	ANSILIVE	DIAZEPAM	1003300020015	5 MG COM REV CT BL AL/PLAS TRANS X 20	CRMV	MG
2011	ANSILIVE	DIAZEPAM	1003300020015	5 MG COM REV CT BL AL/PLAS TRANS X 20	CRM	MG
2011	ANSILIVE	DIAZEPAM	1003300020015	5 MG COM REV CT BL AL/PLAS TRANS X 20	CRM	SP

Figura 19. Recorte exemplificando a planilha de comercialização do diazepam durante 2011 e 2015. Fonte: ANVISA

A	B	C	D	E	F	G	H
ANO	MES	NO_PRINCIPIO_ATIVO	DS_APRESENTACAO_PRODUTO	QT_PRODUTO_VENDIDO	NO_CIDADE	CO_UF	
2016	1	DIAZEPAM	10 MG COM CT BL AL PLAS INC X 20	59	BRASILIA	DF	
2016	1	DIAZEPAM	10 MG COM CT BL AL PLAS INC X 20	18	BRASILIA	DF	
2016	1	DIAZEPAM	10 MG COM CT BL AL PLAS INC X 30	212	BRASILIA	DF	
2016	1	DIAZEPAM	10 MG COM CT BL AL PLAS TRANS X 20	11	BRASILIA	DF	
2016	1	DIAZEPAM	10 MG COM CT BL AL PLAS TRANS X 30	341	BRASILIA	DF	
2016	1	DIAZEPAM	5 MG COM CT BL AL PLAS INC X 20	27	BRASILIA	DF	
2016	1	DIAZEPAM	5 MG COM CT BL AL PLAS INC X 20	3	BRASILIA	DF	
2016	1	DIAZEPAM	5 MG COM CT BL AL PLAS INC X 30	164	BRASILIA	DF	
2016	1	DIAZEPAM	5 MG COM CT BL AL PLAS TRANS X 20	3	BRASILIA	DF	
2016	1	DIAZEPAM	5 MG COM CT BL AL PLAS TRANS X 30	164	BRASILIA	DF	
2016	2	DIAZEPAM	10 MG COM CT BL AL PLAS INC X 20	54	BRASILIA	DF	
2016	2	DIAZEPAM	10 MG COM CT BL AL PLAS INC X 20	17	BRASILIA	DF	
2016	2	DIAZEPAM	10 MG COM CT BL AL PLAS INC X 30	250	BRASILIA	DF	
2016	2	DIAZEPAM	10 MG COM CT BL AL PLAS TRANS X 20	8	BRASILIA	DF	
2016	2	DIAZEPAM	10 MG COM CT BL AL PLAS TRANS X 30	352	BRASILIA	DF	
2016	2	DIAZEPAM	5 MG COM CT BL AL PLAS INC X 20	28	BRASILIA	DF	
2016	2	DIAZEPAM	5 MG COM CT BL AL PLAS INC X 20	1	BRASILIA	DF	
2016	2	DIAZEPAM	5 MG COM CT BL AL PLAS INC X 30	150	BRASILIA	DF	
2016	2	DIAZEPAM	5 MG COM CT BL AL PLAS TRANS X 20	6	BRASILIA	DF	
2016	2	DIAZEPAM	5 MG COM CT BL AL PLAS TRANS X 30	148	BRASILIA	DF	

Figura 20. Recorte exemplificando a planilha de comercialização do diazepam durante 2016 e 2018. Fonte: ANVISA

O tratamento dos dados foi realizado com o ajuste de mais de 15000 linhas, selecionando apenas os medicamentos vendidos na região do Distrito Federal a fim de obter as informações sobre a quantidade total comercializada. A Figura 21 ilustra a planilha contendo os dados após da realização do tratamento.

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	
ANO	NO_PRODUTO	DS_SUBSTANCIA	NU_REGISTRO	DS_APRESENTACAO_PRODUTO	DUTO_VENHO	UF_VEND	NO_CIDADE	IT0_VENDII	Total consumido (mg)	Ano	Total (mg)	Kg	
2011	ANSILIVE	DIAZEPAM	1003300020015	5 MG COM REV CT BL AL/PLAS TRANS X 20	38	DF	BRASILIA	36	3800	2011	15399630	15,39963	
2011	CALMOCITENO	DIAZEPAM	1018102820056	10 MG COM CT BL AL PLAST INC X 20	2	DF	BRASILIA	2	400	2012	10515400	10,5154	
2011	CALMOCITENO	DIAZEPAM	1018102820021	5 MG COM CT BL AL PLAST INC X 20	2	DF	BRASILIA	2	200	2013	8083120	8,08312	
2011	DIAZEPAM	DIAZEPAM	1058302720135	10 MG COM CT BL AL PVDC LEIT X 20	16	DF	BRASILIA	16	3200	2014	17044100	17,0441	
2011	DIAZEPAM	DIAZEPAM	1058302720038	5 MG COM CT BL AL PVDC LEIT X 20	10	DF	BRASILIA	10	1000	2015	6939500	6,9395	
2011	DIAZEPAM	DIAZEPAM	1058302720046	5 MG COM CT BL AL PVDC LEIT X 20	6	DF	BRASILIA	6	600	2016	3243200	3,2432	
2011	DIAZEPAM	DIAZEPAM	1058307130018	5 MG COM CT BL AL PLAS INC X 20	6	DF	BRASILIA	6	600	2017	4548650	4,54865	
2011	DIAZEPAM	DIAZEPAM	1023505000037	5 MG COM CT BL AL PLAS INC X 30	4576	DF	BRASILIA	2906	686400	2018	4197900	4,1979	
2011	DIAZEPAM	DIAZEPAM	1023505000010	5 MG COM CT BL AL PLAS INC X 20	930	DF	BRASILIA	480	93000				
2011	DIAZEPAM	DIAZEPAM	1023505000045	10 MG COM CT BL AL PLAS INC X 30	8	DF	BRASILIA	8	240				
2011	DIAZEPAM	DIAZEPAM	1356904360024	10 MG COM CT BL AL PLAS INC X 20	2652	DF	BRASILIA	1790	530400				
2011	DIAZEPAM	DIAZEPAM	1356904360024	10 MG COM CT BL AL PLAS INC X 20	6	DF	BRASILIA	6	1200				
2011	DIAZEPAM	DIAZEPAM	1023505000029	10 MG COM CT BL AL PLAS INC X 20	10	DF	BRASILIA	10	2000				
2011	DIAZEPAM	DIAZEPAM	1023505000045	10 MG COM CT BL AL PLAS INC X 30	10	DF	BRASILIA	4	3000				
2011	DIAZEPAM	DIAZEPAM	1023505000037	5 MG COM CT BL AL PLAS INC X 30	6	DF	BRASILIA	6	900				
2011	DIAZEPAM	DIAZEPAM	1023505000037	5 MG COM CT BL AL PLAS INC X 30	18	DF	BRASILIA	18	2700				
2011	DIAZEPAM	DIAZEPAM	1023505000037	5 MG COM CT BL AL PLAS INC X 30	8	DF	BRASILIA	8	1200				
2011	DIAZEPAM	DIAZEPAM	1058307130026	10 MG COM CT BL AL PLAS INC X 20	212	DF	BRASILIA	180	4240				
2011	DIAZEPAM	DIAZEPAM	1235201040027	5 MG COM CT BL AL PLAS INC X 20	98	DF	BRASILIA	62	9800				
											<b>Total (mg)</b>	69971500	
											<b>Média (mg/ano)</b>	8746437,5	

Figura 21. Recorte exemplificando a planilha obtida após o tratamento dos dados.

Em função deste tratamento dos dados, tornou-se possível a determinação da quantidade total de princípio ativo comercializada (em mg), bem como a realização de estimativas de comercialização anual e per capita do diazepam no DF durante o período designado. A Tabela 18 mostra a quantidade total de DIA comercializado em cada ano, o número de habitantes e a quantidade comercializada per capita (em mg/dia/1000hab) no DF durante os anos de 2011 e 2018.

Tabela 18. Quantidade total, número de habitantes e consumo de DIA no DF durante 2011 e 2018 (IBGE, 2019)

Ano	Quantidade total (mg)	Habitantes	Comercialização <i>per capita</i> (mg/dia/1000hab)
2011	15399,6	2609998	16,1651
2012	10515,4	2648532	10,8775
2013	8083,10	2789761	7,9381
2014	8141,63	2852372	7,8201
2015	6939,50	2914830	6,5226
2016	3243,20	2977216	2,9845
2017	4548,63	3039444	4,1001
2018	4197,90	2974703	3,8663

Verifica-se que, de acordo com as estimativas realizadas, houve um decréscimo da comercialização de DIA no DF nos últimos anos, evidenciando a de opção por medicamentos benzodiazepínicos de curta duração nesta capital.

#### **4.6. WBE versus ANVISA**

O presente estudo buscou realizar comparações entre o consumo de DIA no DF estimado através da epidemiologia do esgoto e a quantidade comercializada per capita estimada a partir dos dados fornecidos pela ANVISA a fim de verificar a concordância entre os resultados obtidos. A Figura 22 ilustra a comercialização per capita de DIA durante os anos de 2011 e 2018 com base nos dados da ANVISA, bem como os consumos mínimo e máximo obtidos por WBE no DF em 2019.

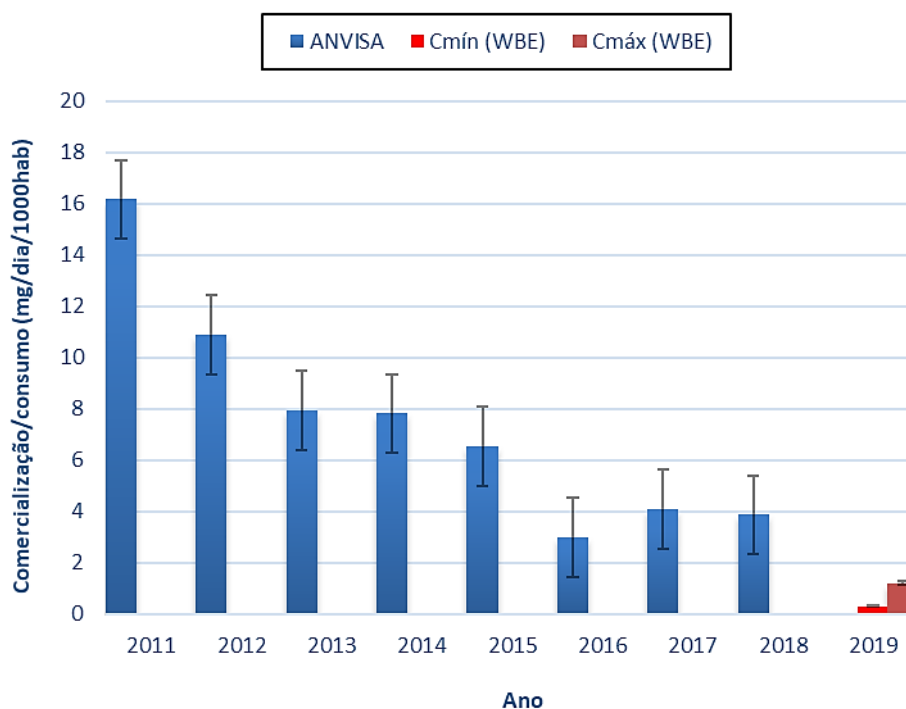


Figura 22. Consumo do DIA no DF estimado por WBE e estimativa da comercialização per capita calculada com dados da ANVISA

Na Figura 22, o *Cmáx* de DIA estimado por WBE durante o período investigado foi menor que os valores calculados com base nos dados fornecidos pela ANVISA, porém coerente ao se comparar com o decréscimo histórico da comercialização per capita entre 2011 e 2018. Cabe destacar ainda que os valores de *Cmín* e *Cmáx* baseiam-se em uma estimativa de consumo, enquanto que os dados da ANVISA se referem, exclusivamente, à comercialização de medicamentos contendo o princípio ativo. Desta forma, é plausível sugerir que esta diferença esteja associada à comercialização de medicamentos que não são consumidos pelos usuários. Destacam-se aqui diversos motivos, dentre os quais a interrupção de tratamentos, a distribuição gratuita, a prescrição e compra excessiva, e o vencimento de medicamentos (Glassmeyer et al., 2009; Ruhoy and Daughton, 2007; Tong et al., 2011). Por outro lado, medicamentos não usados podem ser descartados inadequadamente, gerando uma expectativa de aumento da concentração em amostras diversas, dentre as quais às de esgoto e águas superficiais. No Brasil, o descarte indevido de medicamentos em desuso é comumente feito pelo depósito em lixo comum ou pela descarga em pias e vasos sanitários (Medeiros et al., 2014). Destaca-se que apenas a última forma de descarte pode contribuir efetivamente para a presença de fármacos esgotos e águas superficiais.

Cabe mencionar ainda que as informações obtidas por meio do banco de dados SNGPC da ANVISA são provenientes apenas de farmácias e drogarias privadas, não incluindo a quantidade comercializada por farmácias e drogarias de natureza pública, por estabelecimentos de assistência hospitalar e por meios ilícitos de obtenção desta substância.

A concordância entre as estimativas realça a aplicabilidade da WBE para obtenção de informações sobre o consumo de drogas psiquiátricas e a consolidação desta ferramenta de análise que se soma aos métodos tradicionais de coleta de dados.

#### ***4.7. Cálculo de PEC e Avaliação de Risco Ambiental***

A concentração ambiental do DIA foi prevista no compartimento hídrico do Lago Paranoá. Conforme mostrado na Equação 3, a predição deste valor é feita mediante o uso de informações diversas, dentre elas a quantidade consumida do medicamento nas regiões investigadas. Desta maneira, foi utilizado o valor de  $C_{máx}$  para se estimar a concentração ambiental no Lago.

Outra informação importante para o cálculo de PEC é a taxa de remoção (R) do DIA nas estações de tratamento de esgoto. Neste caso, convém mencionar que o DIA não foi detectado em nenhuma das oito amostras de efluente investigadas neste trabalho. Para fins de cálculo do PEC, considerou-se a presença de DIA nestas amostras com concentração igual ao valor de LOD, ou seja,  $0,3 \text{ ng L}^{-1}$ . Assim, com base na Equação 4 e utilizando-se os dados de vazão durante o período amostral, calculou-se cargas média de DIA no afluente e no efluente final de  $99$  e  $54 \text{ mg dia}^{-1}$ . Mais uma vez, é importante mencionar que tais dados se referem a uma superestimativa quanto à presença de DIA nas amostras.

As cargas de DIA no afluente e no efluente foram usadas para estimar a taxa de remoção do DIA nas ETE. Estimou-se uma remoção de, pelo menos, 45%. Embora estes dados tenham sido usados para o cálculo do PEC, é importante mencionar que outros trabalhos da literatura sugerem uma remoção de DIA de cerca de 10% para tratamentos biológicos convencionais (Calisto and Esteves, 2009; Kosjek et al., 2012). Finalmente, foi considerado um fator de diluição de 19,7 para fins de cálculo do PEC, considerando-se tanto a vazão média do esgoto nas ETE (Tabela 15) quanto à vazão de  $18,20 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$  do Lago Paranoá (Pires, 2014).

A Tabela 19 mostra o valor de PEC, em  $\text{ngL}^{-1}$ , obtido pela Equação 3 a partir do  $C_{\text{máx}}$  médio nas regiões atendidas pelas duas ETE e dos demais parâmetros utilizados.

Tabela 19. Valor de PEC e parâmetros utilizados

$C_{\text{máx}}$ ( $\text{kg ano}^{-1}$ )	R (%)	D	PEC ( $\text{pg L}^{-1}$ )
1,67	45	19,7	0,24

O PEC obtido, na faixa de picogramas por litro, apresentou-se significativamente menor que as concentrações ambientais medidas (MEC, do inglês *Measured Environmental Concentrations*) do DIA em águas superficiais reportadas na literatura, na faixa de nanogramas por litro (Calisto and Esteves, 2009). No entanto, esta discrepância está diretamente relacionada ao baixo consumo  $C_{\text{máx}}$  estimado neste trabalho. Cabe mencionar, entretanto, que o valor encontrado de PEC é condizente com resultados recentemente gerados no âmbito das atividades de pesquisa do grupo AQQUA que também contemplam a análise de amostras do Lago Paranoá quanto a presença de diversos contaminantes de interesse emergente como os fármacos. Dados ainda não publicados (Moura et al., 2020) revelam a não-detecção do DIA em, pelo menos, 28 amostras do Lago coletadas em diferentes épocas do ano mediante o uso de um método com LOQ de  $2,5 \text{ ng L}^{-1}$ .

Após o cálculo de PEC, foi feita a avaliação de risco ambiental para o ecossistema do Lago Paranoá com base na razão PEC/PNEC apresentada na Equação 2. O valor de PNEC igual a  $14100 \text{ ng L}^{-1}$ , sugerido por Stuer-Lauridsen et al. (2000), foi utilizado no cálculo do quociente de risco (RQ). Na Tabela 20, os valores de PEC e RQ calculados para o DIA neste trabalho são comparados com os valores obtidos em outras regiões do mundo.

Tabela 20. Valores de PEC e RQ em diversas regiões

Região	Ano	PEC ( $\text{ng/L}$ )	RQ	Referência
Europa	2000	55	0,013	Stuer-Lauridsen et. al., 2000
Suécia	2002	6	0,0014	Carlsson et. al., 2006
Espanha	2008	10	-	Carballa et al., 2008
Brasil	2013	1820 <sup>a</sup>	0,9	Almeida et. al., 2013
Brasil	2019	$0,24 \times 10^{-3}$	$1,7 \times 10^{-8}$	Este trabalho

<sup>a</sup>Valor calculado para efluentes hospitalares

Observou-se que os valores de PEC e RQ determinados para o DIA neste trabalho foram significativamente menores do que os reportados em outros países.

Novamente, estes valores apresentaram-se menores devido ao baixo consumo verificado neste trabalho, uma vez que o DIA não foi detectado em grande parte das amostras.

Além disso, embora menos provável no presente estudo, deve-se considerar a variabilidade temporal e espacial entre cada situação abordada para predição da concentração ambiental de determinada substância. Fatores como superestimação ou subestimação das quantidades consumidas, eficiência de remoção durante o tratamento de esgoto, flutuações na população das regiões investigadas e características da matriz podem gerar discrepâncias entre os valores de PEC determinados (Carballa et al., 2008).

No trabalho realizado por Almeida et al. (2013), foi determinado um valor de PEC do DIA no Brasil. Contudo, este valor apresentou-se maior do que os avaliados em outros países por envolver a análise de efluentes hospitalares. Os hospitais são fontes de elevados volumes de águas residuais que consistem de uma matriz muito complexa composta por misturas de diferentes fármacos e, portanto, espera-se que a concentração de fármacos nestas matrizes seja maior do que em efluentes domésticos (Gautam et al., 2007).

Contudo, apesar das diferenças observadas, todos os valores de RQ avaliados nos outros países se apresentaram abaixo de 1 e, conseqüentemente, indicaram que esta substância não apresentou risco aos ecossistemas investigados. No Lago Paranoá, de acordo com a abordagem realizada neste trabalho, verificou-se que o DIA não apresenta riscos a este compartimento aquático sob as concentrações assumidas.

## 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Tendo-se em vista a necessidade de conhecer os padrões consumo das benzodiazepinas e a carência de estudos relacionados ao seu impacto ambiental, este trabalho veio contribuir com os estudos de epidemiologia do esgoto e de avaliação de risco ambiental referentes a estas substâncias. Foi desenvolvido um método analítico para identificar e quantificar o diazepam, substância mais importante do grupo das benzodiazepinas, em amostras de esgoto bruto e tratado no DF empregando-se SPE seguida de análise por LC-MS/MS. O método de SPE, já validado, com aplicação de cartuchos C18 mostrou-se eficiente na extração do DIA. A determinação analítica envolveu a utilização de dois equipamentos. Os parâmetros instrumentais foram devidamente otimizados. O método final, baseado em UPLC-QqQ foi aplicado para quantificação do DIA nas amostras de esgoto

Os resultados da aplicação mostraram baixa frequência de detecção e de quantificação do DIA nas amostras analisadas. O DIA foi encontrado sob concentração máxima de 3,5 ng L<sup>-1</sup> em amostras de afluente e não foi detectado em amostras de efluente.

Em razão da baixa frequência de quantificação do DIA nas amostras investigadas, foram consideradas duas estratégias distintas para estimar o consumo deste fármaco por WBE. Observou-se que houve baixo consumo de DIA durante o carnaval, não sendo possível associar qualquer tipo de influência deste evento no consumo deste medicamento. Trabalhos futuros podem investigar os seus metabólitos para avaliar possíveis situações de abuso e poliuso desta substância. Além do mais, observou-se um aumento de consumo nos dias seguintes a este evento. Isso pode estar relacionado ao fim da euforia gerada pelo evento e retorno à rotina exaustiva que pode favorecer o desenvolvimento de transtornos psicológicos e impactar diretamente no consumo de ansiolíticos.

O consumo de DIA na população do DF foi estimado em um valor mínimo de 0,3 mg/dia/1000hab (0,4 kg ano<sup>-1</sup>) e um valor máximo de 1,2 mg/dia/1000hab (1,3 kg ano<sup>-1</sup>). Estes dados foram comparados com estimativas de comercialização per capita realizadas com dados fornecidos pela ANVISA e observou-se uma concordância entre os resultados. A coerência dos valores de consumo de DIA com o decréscimo histórico de comercialização per capita verificado realça a aplicabilidade da WBE para obtenção de dados sobre consumo de drogas psicotrópicas.

Finalmente, foi realizada uma avaliação de risco ambiental referente ao compartimento hídrico do Lago Paranoá. Esta avaliação baseou-se na determinação do valor de PEC e, posteriormente, do valor de RQ. O valor de PEC obtido ( $0,24 \text{ pg L}^{-1}$ ) apresentou-se significativamente menor do que os valores ambientais do DIA para águas superficiais, mas foi coerente com estudos prévios realizados no Lago Paranoá. O valor de RQ apresentou-se abaixo de 1 evidenciando que o DIA não apresenta risco adverso à biota do Lago Paranoá sob as concentrações avaliadas.

Este trabalho foi importante para consolidar a aplicabilidade da epidemiologia do esgoto na realização de estimativas quanto ao consumo de DIA além de ter contribuído com prover dados a serem usados para produzir outras estimativas, como o PEC e o RQ.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRACIT, 2019. Estatísticas dos Centros. [WWW Document]. URL <http://abracit.org.br/wp/estatisticas-dos-centros/> (acessado em 14.5.19).
- Almeida, C.A.A., Oliveira, M.S., Mallmann, C.A., Martins, A.F., 2013. Determination of anti-anxiety and anti-epileptic drugs in hospital effluent and a preliminary risk assessment. *Chemosphere* 93, 2349–2355. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.08.032>
- Almeida, C.A.A. De, Oliveira, M.S., Mallmann, C.A., Martins, A.F., 2015. Determination of the psychoactive drugs carbamazepine and diazepam in hospital effluent and identification of their metabolites. *Env. Sci Pollut Res Int* 22, 17192–17201. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4948-y>
- Andrews, G.L., Simons, B.L., Young, J.B., Hawkrigde, A.M., Muddiman, D.C., 2011. Performance Characteristics of a New Hybrid Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometer (TripleTOF 5600). *Anal. Chem.* 83, 5442–5446. <https://doi.org/dx.doi.org/10.1021/ac200812d>
- ANVISA, 2019. Bulário eletrônico [WWW Document]. URL [http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/index.asp](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/index.asp) (acessado em 19.6.19).
- ANVISA, 2017. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 166, de 24 de junho de 2017 [WWW Document]. URL [http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC\\_166\\_2017\\_COMP.pdf](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf) (acessado em 19.12.19).
- Arbeláez, P., Borrull, F., Pocurull, E., Marcé, R.M., 2015. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine sedative hypnotic drugs in river water and wastewater. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 95, 669–684. <https://doi.org/10.1080/03067319.2015.1055474>
- Arshad, S., Butt, J., Iqbal, J., Saeed, S., 2018. Abuses and Misuses of Benzodiazepines and Antidepressants ; A Review. *Mod. Appl. Pharm. Pharmacol.* 1, 1–6. <https://doi.org/10.31031/MAPP.2018.01.000521>
- Auchewski, L., Andreatini, R., Carlos, J., Galduróz, F., Boerngen, R., Lacerda, D., 2004. Avaliação da orientação médica sobre os efeitos colaterais de benzodiazepínicos. *Rev Bras Psiquiatr* 26, 24–31. <https://doi.org/10.1590/S1516-44462004000100008>
- Azevedo, Â., Araújo, A., Ferreira, M., 2014. Consumo de ansiolíticos

- benzodiazepínicos : uma correlação entre dados do SNGPC e indicadores sociodemográficos nas capitais brasileiras. *Ciênc. saúde coletiva* 21, 83–90. <https://doi.org/10.1590/1413-81232015211.15532014>
- Bade, R., Rousis, N.I., Bijlsma, L., Gracia-Lor, E., Castiglioni, S., Sancho, J. V., Hernandez, F., 2015. Screening of pharmaceuticals and illicit drugs in wastewater and surface waters of Spain and Italy by high resolution mass spectrometry using UHPLC-QTOF MS and LC-LTQ-Orbitrap MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 8979–8988. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9063-x>
- Baker, D.R., Barron, L., Kasprzyk-Hordern, B., 2014. Illicit and pharmaceutical drug consumption estimated via wastewater analysis. Part A: Chemical analysis and drug use estimates. *Sci. Total Environ.* 487, 629–641. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.11.107>
- Baker, D.R., Kasprzyk-Hordern, B., 2011. 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. *J. Chromatogr. A* 1218, 8036–8059. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.09.012>
- Borova, V.L., Maragou, N.C., Gago-Ferrero, P., Pistos, C., Thomaidis, N.S., 2014. Highly sensitive determination of 68 psychoactive pharmaceuticals, illicit drugs, and related human metabolites in wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 4273–4285. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7819-3>
- Buchberger, W.W., 2007. Novel analytical procedures for screening of drug residues in water , waste water , sediment and sludge. *Anal. Chim. Acta.* 593, 129–139. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.05.006>
- CAESB, 2019. Estações de tratamento de esgoto. [WWW Document]. URL <https://www.caesb.df.gov.br/lai/3-portal/esgoto/25-unidades-de-tratamento-de-esgoto.html> (acessado em 6.2.19).
- Caldas, S.S., Gonçalves, F.F., Primel, E.G., Prestes, O.D., Martins, M.L., Zanella, R., 2011. Principais técnicas de preparo de amostra para determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. *Quim. Nov.* 34, 1604–1617. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000900021>
- Calisto, V., Esteves, V.I., 2009. Psychiatric pharmaceuticals in the environment.

- Chemosphere 77, 1257–1274. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.09.021>
- Carballa, M., Omil, F., Lema, J.M., 2008. Comparison of predicted and measured concentrations of selected pharmaceuticals, fragrances and hormones in Spanish sewage. *Chemosphere* 72, 1118–1123. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.04.034>
- Carballa, M., Omil, F., Lema, J.M., 2005. Removal of cosmetic ingredients and pharmaceuticals in sewage primary treatment. *Water Res.* 39, 4790–4796. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.09.018>
- Causanilles, A., Kinyua, J., Ruttkies, C., van Nuijs, A.L.N., Emke, E., Covaci, A., de Voogt, P., 2017. Qualitative screening for new psychoactive substances in wastewater collected during a city festival using liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *Chemosphere* 184, 1186–1193. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.06.101>
- CGCRE, INMETRO, 2016. Orientação Sobre Validação De Métodos Analíticos.
- Crotti, A., Vessicchi, R., Lopes, J., Lopes, N., 2006. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. *Quim. Nov.* 29, 287–292. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000200020>
- Cunha, D.L., Araujo, F.G. De, Marques, M., 2017. Psychoactive drugs : occurrence in aquatic environment, analytical methods, and ecotoxicity — a review. *Env. Sci Pollut Res* 24, 24076–24091. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0170-4>
- Daughton, C.G., 2001. Illicit Drugs in Municipal Sewage. *Pharm. Care Prod. Environ.* 20, 348–364. <https://doi.org/10.1021/bk-2001-0791.ch020>
- de Azevedo, Â., de Araújo, A., Ferreira, M., 2014. Consumo de ansiolíticos benzodiazepínicos : uma correlação entre dados do SNGPC e indicadores sociodemográficos nas capitais brasileiras. *Ciênc. saúde coletiva* 21, 83–90. <https://doi.org/10.1590/1413-81232015211.15532014>
- Dean, J., 2009. *Extraction Techniques in Analytical Sciences.*
- Dębska, J., Kot-Wasik, A., Namieśnik, J., 2004. Fate and analysis of pharmaceutical residues in the aquatic environment. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 34, 51–67. <https://doi.org/10.1080/10408340490273753>
- EMCDDA, 2018. Perspectives on drugs - Wastewater analysis and drugs: a European multi-city study.[WWW Document]. URL [http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/2757/POD\\_Wastewater%2](http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/2757/POD_Wastewater%2)

- Oanalysis\_update2019.pdf (acessado em 14.5.19).
- EMCDDA, 2008a. EMCDDA INSIGHTS - Assessing Illicit Drugs in Wastewater: Potential and limitations of a new monitoring approach, *Drugs and Alcohol Today*. [WWW Document]. URL [http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/2273/TDXD16022ENC\\_4.pdf](http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/2273/TDXD16022ENC_4.pdf) (acessado em 20.5.19).
- EMCDDA, 2008b. Sexual assaults facilitated by drugs or alcohol Sexual assaults facilitated by drugs or alcohol. [WWW Document]. URL [http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/507/TDS\\_sexual\\_assault\\_94378.pdf](http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/507/TDS_sexual_assault_94378.pdf) (acessado em 22.5.19).
- Feitosa, R.S., Sodré, F.F., Maldaner, A.O., 2013. Drogas de abuso em águas naturais e residuárias urbanas: Ocorrência, determinação e aplicações forenses. *Quim. Nova* 36, 291–305. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000200016>
- Fent, K., Weston, A.A., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 76, 122–159. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.09.009>
- Ferreira, C., Monteiro, D.S., Costa, S., Felipe, R., Soares, S., 2017. Prevalência dos transtornos de ansiedade como causa de afastamento de trabalhadores. *Rev. Bras. Enferm.* 71, 2344–2351.
- Gautam, A.K., Kumar, S., Sabumon, P.C., 2007. Preliminary study of physico-chemical treatment options for hospital wastewater. *J. Environ. Manage.* 83, 298–306. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2006.03.009>
- Glassmeyer, S.T., Hinchey, E.K., Boehme, S.E., Daughton, C.G., Ruhoy, I.S., Conerly, O., Daniels, R.L., Lauer, L., McCarthy, M., Nettesheim, T.G., Sykes, K., Thompson, V.G., 2009. Disposal practices for unwanted residential medications in the United States. *Environ. Int.* 35, 566–572. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.10.007>
- González-Mariño, I., Castro, V., Montes, R., Rodil, R., Lores, A., Cela, R., Quintana, J.B., 2018. Multi-residue determination of psychoactive pharmaceuticals, illicit drugs and related metabolites in wastewater by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1569, 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.07.045>
- Gonzalez-Marino, I., Gracia-Lor, E., Bagnati, R., Martins, C.P.B., Zuccato, E., Castiglioni, S., 2016. Screening new psychoactive substances in urban wastewater using high resolution mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 408, 4297–4309.

- <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9521-0>
- Gros, M., Petrovi, M., Ginebreda, A., Barceló, D., 2010. Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. *Environ. Int.* 36, 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.09.002>
- Gros, M., Petrović, M., Barceló, D., 2006. Multi-residue analytical methods using LC-tandem MS for the determination of pharmaceuticals in environmental and wastewater samples: A review. *Anal. Bioanal. Chem.* 386, 941–952. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0586-z>
- Hashmi, A.M., Han, J.Y., French-rosas, L., Jabbar, Q., 2018. Benzodiazepine Use and Abuse. *Psychiatr. Ann.* 48, 360–365. <https://doi.org/10.3928/00485713-20180718-02>
- Hernández, F., Bijlsma, L., Sancho, J. V, Díaz, R., Ibá, M., 2011. Rapid wide-scope screening of drugs of abuse , prescription drugs with potential for abuse and their metabolites in influent and effluent urban wastewater by ultrahigh pressure liquid chromatography – quadrupole-time-of-flight-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 684, 96–106. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.10.043>
- Hernando, M.D., Mezcua, M., Fern, A.R., Barcel, D., 2006. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents , surface waters and sediments 69, 334–342. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.09.037>
- Hoegberg, L.C.G., Christiansen, C., Soe, J., Telving, R., Andreasen, M.F., Staerk, D., Christrup, L.L., Kongstad, K.T., 2018. Recreational drug use at a major music festival: trend analysis of anonymised pooled urine. *Clin. Toxicol.* 56, 245–255. <https://doi.org/10.1080/15563650.2017.1360496>
- Hommen, U., Baveco, H., Galic, N., Brink, P.J. Van Den, 2010. Potential Application of Ecological Models in the European Environmental Risk Assessment of Chemicals I : Review of Protection Goals in EU Directives and Regulations. *Integr. Env. Assess Manag* 6, 325–337. <https://doi.org/10.1002/ieam.69>
- Huerta-fontela, M., Teresa, M., Ventura, F., 2010. Fast liquid chromatography – quadrupole-linear ion trap mass spectrometry for the analysis of pharmaceuticals and hormones in water resources. *J. Chromatogr. A* 1217, 4212–4222. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.007>
- IBGE, 2019. População residente das Unidades da Federação e Grandes Regiões, enviada ao Tribunal de Contas da União - 2001-2019. [WWW Document]. URL [ftp://ftp.ibge.gov.br/Estimativas\\_de\\_Populacao/Estimativas\\_2014/serie\\_2001\\_201](ftp://ftp.ibge.gov.br/Estimativas_de_Populacao/Estimativas_2014/serie_2001_201)

- 4\_TCU.pdf (acessado em 28.2.19).
- IBGE, 2010. Atlas de Saneamento [WWW Document]. URL [www.ibge.gov.br/home/estatistica](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica) (acessado em 25.2.19).
- INCB, 2016. Psychotropic Substances. [WWW Document]. URL [https://www.incb.org/documents/Psychotropics/technicalpublications/2016/Technical\\_Publication\\_2016.pdf](https://www.incb.org/documents/Psychotropics/technicalpublications/2016/Technical_Publication_2016.pdf) (acessado em 12.3.19).
- Jardim, C., 2010. Extração em Fase Sólida : Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. *Sci. Chromatogr.* 2, 13–25.
- Jelic, A., Gros, M., Ginebreda, A., Cespedes-Sánchez, R., Ventura, F., Petrovic, M., Barcelo, D., 2011. Occurrence, partition and removal of pharmaceuticals in sewage water and sludge during wastewater treatment. *Water Res.* 45, 1165–1176. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.11.010>
- Kapczinski, F., Amaral, O.B., Madruga, M., Quevedo, J., Busnello, J. V., De Lima, M.S., 2001. Use and misuse of benzodiazepines in Brazil: A review. *Subst. Use Misuse* 36, 1053–1069. <https://doi.org/10.1081/JA-100104489>
- Karjalainen, K., Kuussaari, K., Kataja, K., Tigerstedt, C., Hakkarainen, P., 2017. Measuring Concurrent Polydrug Use in General Populations: A Critical Assessment. *Eur. Addict. Res.* 23, 163–169. <https://doi.org/10.1159/000477802>
- Keller, V.D.J., Williams, R.J., Lofthouse, C., Johnson, A.C., 2014. Worldwide estimation of river concentrations of any chemical originating from sewage-treatment plants using dilution factors. *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 447–452. <https://doi.org/10.1002/etc.2441>
- Kosjek, T., Perko, S., Zupanc, M., Zanoški Hren, M., Landeka Dragičević, T., Žigon, D., Kompare, B., Heath, E., 2012. Environmental occurrence , fate and transformation of benzodiazepines in water treatment. *Water Res.* 46, 355–368. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.10.056>
- Kurtz, S.P., Levi-minzi, M.A.S., Mooss, A.D., 2011. Benzodiazepine dependence among multidrug users in the club. *Natl. Institutes Heal.* 119, 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2011.05.036>
- Lanças, F.M., 2009. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas : finalmente “ compatíveis ”? *Sci. Chromatogr.* 1, 35–61.
- Lima, D., Tonucci, M., Libânio, M., Aquino, S., 2017. Fármacos e desreguladores endócrinos em águas brasileiras : ocorrência e técnicas de remoção. *Eng Sanit Ambient* 22, 1043–1054. <https://doi.org/10.1590/S1413-41522017165207>

- Löfler, D., Römbke, J., Meller, M., Ternes, T.A., 2005. Environmental Fate of Pharmaceuticals in Water/Sediment Systems. *Environ. Sci. Technol.* 39, 5209–5218. <https://doi.org/10.1021/es0484146>
- López-serna, R., Pérez, S., Ginebreda, A., Petrovi, M., 2010. Fully automated determination of 74 pharmaceuticals in environmental and waste waters by online solid phase extraction – liquid chromatography-electrospray – tandem mass spectrometry 83, 410–424. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.09.046>
- López-Serna, R., Petrović, M., Barceló, D., 2011. Development of a fast instrumental method for the analysis of pharmaceuticals in environmental and wastewaters based on ultra high performance liquid chromatography (UHPLC)-tandem mass spectrometry (MS/MS). *Chemosphere* 85, 1390–1399. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.07.071>
- Lorenzi, V., Choe, R., Schlenk, D., 2014. Effects of Environmental Exposure to Diazepam on the Reproductive Behavior of Fathead Minnow , *Pimephales promelas*. *Environ. Toxicol.* 31, 561–8. <https://doi.org/10.1002/tox.22069>
- Mandrioli, R., Mercolini, L., Raggi, M.A., 2008. Benzodiazepine Metabolism : An Analytical Perspective. *Curr. Drug Metab.* 9, 827–844.
- Mastroianni, N., López-García, E., Postigo, C., Barceló, D., de Alda, M.L., 2017. Five-year monitoring of 19 illicit and legal substances of abuse at the inlet of a wastewater treatment plant in Barcelona (NE Spain) and estimation of drug consumption patterns and trends. *Sci. Total Environ.* 609, 916–926. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.126>
- Matuszewski, B.K., Constanzer, M.L., Chavez-Eng, C.M., 2003. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal. Chem.* 75, 3019–3030. <https://doi.org/10.1021/ac020361s>
- McCall, A.-K., Bade, R., Kinyua, J., Lai, F.Y., Thai, P.K., Covaci, A., Bijlsma, L., van Nuijs, A.L.N., Ort, C., 2016. Critical review on the stability of illicit drugs in sewers and wastewater samples. *Water Res.* 88, 933–947. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.10.040>
- Medeiros, M.S.G., Moreira, L.M.F., Lopes, C.C.G.O., 2014. Descarte de medicamentos: Programas de recolhimento e novos desafios. *Rev. Ciências Farm. Basica e Apl.* 35, 651–662.
- Moura, H. de S.R.P., Sodré, F.F., Nascimento, F., 2020. Quantificação de micropoluentes emergentes em amostras do Lago Paranoá. Dados não publicados.

- Niessen, W.M.A., A. Correa C., R., 2017. Interpretation of MS-MS Mass Spectra of Drugs and Pesticides.
- Olfson, M., King, M., Schoenbaum, M., 2015. Benzodiazepine Use in the United States 72, 136–142. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2014.1763>
- Pascoe, D., Karntanut, W., Müller, C.T., 2003. Do pharmaceuticals affect freshwater invertebrates? A study with the cnidarian *Hydra vulgaris*. *Chemosphere* 51, 521–528. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00860-3](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00860-3)
- Petrovic, M., 2014. Methodological challenges of multi-residue analysis of pharmaceuticals in environmental samples. *Trends Environ. Anal. Chem.* 1, e25–e33. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2013.11.004>
- Pires, V.A. de C., 2014. Metodologia para apoio à gestão estratégica de reservatórios de usos múltiplos: o caso do Lago Paranoá no Distrito Federal.
- Quintana, B., Cela, R., Carpinteiro, I., Rodil, R., 2017. Reaction of diazepam and related benzodiazepines with chlorine . Kinetics , transformation products and in-silico toxicological assessment 120, 280–289. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.04.063>
- Racamonde, I., Rodil, R., Quintana, J.B., Villaverde-de-sáa, E., Cela, R., 2014. Determination of benzodiazepines , related pharmaceuticals and metabolites in water by solid-phase extraction and liquid-chromatography – tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1352, 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.05.064>
- Redshaw, C.H., Cooke, M.P., Talbot, H.M., McGrath, S., Rowland, S.J., 2008. Low biodegradability of fluoxetine HCl, diazepam and their human metabolites in sewage sludge-amended soil. *J. Soils Sediments*. <https://doi.org/10.1007/s11368-008-0024-2>
- Ribani, M., Bottoli, C.B.G., Collins, C.H., Jardim, I.C.S.F., Melo, L.F.C., 2004. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova* 27, 771–780.
- Riva, F., Zuccato, E., Davoli, E., Fattore, E., Castiglioni, S., 2019. Risk assessment of a mixture of emerging contaminants in surface water in a highly urbanized area in Italy. *J. Hazard. Mater.* 361, 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.07.099>
- Ruhoy, I.S., Daughton, C.G., 2007. Types and quantities of leftover drugs entering the environment via disposal to sewage - Revealed by coroner records. *Sci. Total*



- Environ. 388, 137–148. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.08.013>
- Scherf-Clavel, O., 2016. Impurity Profiling of Challenging Active Pharmaceutical Ingredients without Chromophore.
- Schmitz, A., 2016. Benzodiazepine use , misuse , and abuse : A review. <https://doi.org/10.9740/mhc.2016.05.120>
- Silva, S.R.F. da, 2013. Farmacocinética do diazepam. Monografia de mestrado.
- Skees, A.J., Foppe, K.S., Loganathan, B., Subedi, B., 2018. Contamination profiles, mass loadings, and sewage epidemiology of neuropsychiatric and illicit drugs in wastewater and river waters from a community in the Midwestern United States. *Sci. Total Environ.* 631–632, 1457–1464. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.060>
- Snyder, S.A., 2008. Ozone : Science & Engineering : The Journal of the International Ozone Association Occurrence , Treatment , and Toxicological Relevance of EDCs and Pharmaceuticals in Water Occurrence , Treatment , and Toxicological Relevance of EDCs and Pharmaceuticals i. *Ozone Sci. Eng. J. Int. Ozone Assoc.* 30, 65–69. <https://doi.org/10.1080/01919510701799278>
- Sodré, F. F., Santana, J., Sampaio, T., 2018. Seasonal and Spatial Distribution of Caffeine, Atrazine, Atenolol and DEET in Surface and Drinking Waters from the Brazilian Federal District. *J. Braz. Chem. Soc.* 29, 1854–1865.
- Sodré, F.F., Almeida, F. V., Pereira, C.E.B., Schmidt, L.L., Locatelli, M.A.F., Jardim, W.F., Silva, C.M., Maldaner, A.O., 2012. Estimating cocaine consumption in the Brazilian Federal District (FD) by sewage analysis. *J. Braz. Chem. Soc.* 23, 861–867. <https://doi.org/10.1590/s0103-50532012000500011>
- Sodré, F. F., Dutra, P.M., Dos Santos, V.P., 2018. Pharmaceuticals and personal care products as emerging micropollutants in Brazilian surface waters: a preliminary snapshot on environmental contamination and risks. *Eclética Química J.* 43, 22. <https://doi.org/10.26850/1678-4618eqj.v43.1si.2018.p22-34>
- Sodré, F.F., Feitosa, R.S., Jardim, W.F., Maldaner, A.O., 2018. Wastewater-based epidemiology of cocaine in the Brazilian Federal District: spatial distribution, weekly variation and sample preservation strategies. *J. Braz. Chem. Soc.* 29, 2287–2298. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20180105>
- Sodré, F.F., Souza, G.B., Feitosa, R.S., Pereira, C.E.B., Maldaner, A.O., 2017. Illicit drugs, metabolites and adulterants in wastewater: Monitoring community drug abuse in the Brazilian federal district during the 2014 soccer world cup. *J. Braz.*

- Chem. Soc. 28, 2146–2154. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20170063>
- Stuer-Lauridsen, F., Birkved, M., Hansen, L.P., Lützhøft, H.-C.H., Halling-Sørensen, B., 2000. Environmental risk assessment of human pharmaceuticals in Denmark after normal therapeutic use. *Chemosphere* 40, 783–793.  
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00453-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00453-1)
- Subedi, B., Kannan, K., 2014. Mass loading and removal of select illicit drugs in two wastewater treatment plants in New York State and estimation of illicit drug usage in communities through wastewater analysis. *Environ. Sci. Technol.* 48, 6661–6670. <https://doi.org/10.1021/es501709a>
- Sulaiman, S., Khamis, M., Nir, S., Scrano, L., Bufo, S.A., Karaman, R., 2014. Diazepam stability in wastewater and removal by advanced membrane technology, activated carbon, and micelle-clay complex. *Desalin. Water Treat.* 57, 1–9.  
<https://doi.org/10.1080/19443994.2014.981225>
- Ternes, T. a, Janex-Habibi, M.-L., Knacker, T., Kreuzinger, N., Siegrist, H., 2004. Assessment of technologies for the removal of pharmaceuticals and personal care products in sewage and drinking water facilities to improve the indirect potable water reuse.
- Ternes, T., Bonerz, M., Schmidt, T., 2001. Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 938, 175–185. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01205-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01205-5)
- Thiebault, T., Boussa, M., Milbeau, C. Le, 2017. Occurrence and removal efficiency of pharmaceuticals in an urban wastewater treatment plant: Mass balance, fate and consumption assessment. *J. Environ. Chem. Eng.* 5, 2894–2902.  
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.05.039>
- Togni, L.R., 2018. Uso da microextração por sorbente empacotado (MEPS) para preparo de amostras em análises toxicológicas envolvendo fármacos benzodiazepínicos.
- Togunde, O.P., Cudjoe, E., Oakes, K.D., Mirnaghi, F.S., Servos, M.R., Pawliszyn, J., 2012. Determination of selected pharmaceutical residues in wastewater using an automated open bed solid phase microextraction system. *J. Chromatogr. A* 1262, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.09.011>
- Tong, A.Y.C., Peake, B.M., Braund, R., 2011. Disposal practices for unused medications around the world. *Environ. Int.* 37, 292–298.

- <https://doi.org/10.1016/j.envint.2010.10.002>
- Suarez, S., Lema, J.M., Omil, F., 2010. Removal of Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) under nitrifying and denitrifying conditions. *Water Res.* 44, 3214–3224. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.02.040>
- UNODC, 2018. Global overview of drug demand and supply, World Drug Report 2018.
- UNODC, 2017. Non-medical use of benzodiazepines : a growing threat to public health ? *Glob. Smart Updat.* Volumen 18.
- Valderrama, P., Braga, J.W.B., 2009. Estado da arte das figuras de mérito em calibração multivariada. *Quim. Nov.* 32, 1278–1287. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000500034>.
- van der Ven, K., Dongen, W. Van, Maes, B.U.W., Esmans, E.L., Blust, R., Coen, W.M. De, 2004. Determination of diazepam in aquatic samples by capillary liquid chromatography – electrospray tandem mass spectrometry. *Chemosphere* 57, 967–973. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.08.062>
- van Nuijs, A.L.N., Castiglioni, S., Tarcomnicu, I., Postigo, C., de Alda, M.L., Neels, H., Zuccato, E., Barcelo, D., Covaci, A., 2011. Illicit drug consumption estimations derived from wastewater analysis: A critical review. *Sci. Total Environ.* 409, 3564–3577. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.05.030>
- Wang, C., Hou, L., Li, J., Xu, Z., Gao, T., Yang, J., 2017. Occurrence of diazepam and its metabolites in wastewater and surface waters in Beijing. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 15379–15389. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8922-8>
- West, C.E., Rowland, S.J., 2012. Aqueous Phototransformation of Diazepam and Related Human Metabolites under Simulated Sunlight. *Am. Chem. Soc.* 46, 4749–4756.
- WHO, 2017. Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates.
- Wille, K., Brabander, H.F. De, Wulf, E. De, Caeter, P. Van, Janssen, C.R., Vanhaecke, L., 2012. Coupled chromatographic and mass-spectrometric techniques for the analysis of emerging pollutants in the aquatic environment. *Trends Anal. Chem.* 35, 87–108. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.12.003>
- Zuccato, E., Chiabrando, C., Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, R., 2008. Estimating community drug abuse by wastewater analysis. *Environ. Health Perspect.* 116, 1027–1032. <https://doi.org/10.1289/ehp.11022>

## APÊNDICE

O equipamento previamente selecionado para este estudo consistiu de um sistema de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-QTOF). A Figura 23 ilustra o esquema geral do QTOF utilizado neste trabalho.

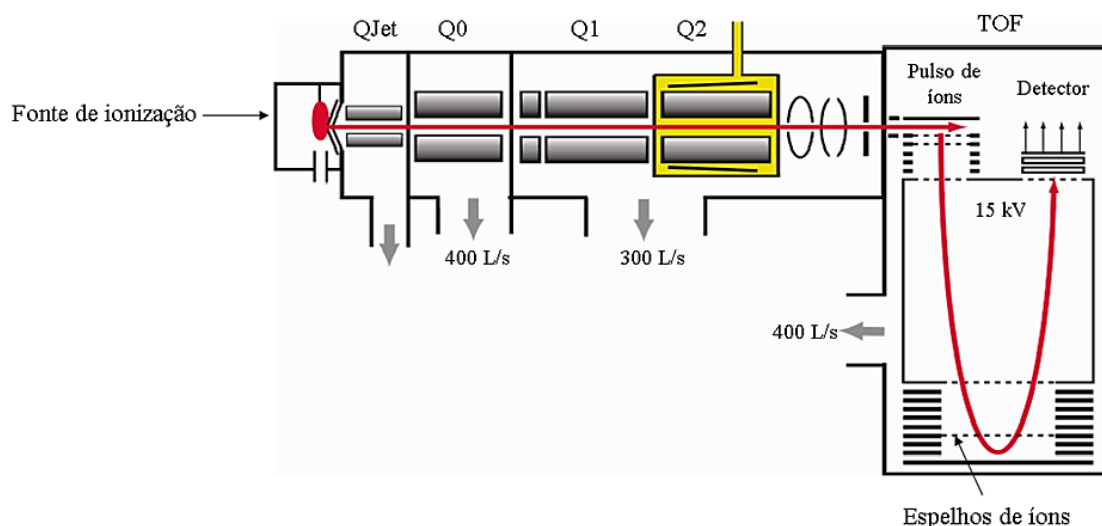


Figura 23. QTOF modelo TripleToF5600+ (Adaptada, Andrews et al., 2011)

Acerca da realização de análises com o QTOF, os íons formados na fonte de ionização são conduzidos até o quadrupolo de focalização (Q0). Os íons são focalizados e direcionados até o quadrupolo em sequência (Q1) que atua como filtro de massas e seleciona os íons precursores. Em seguida, estes íons são fragmentados na célula de colisão (Q2) e os fragmentos produzidos são analisados no TOF. Neste analisador, íons de diferentes  $m/z$  são acelerados através de um pulso elétrico aplicado para que iniciem a trajetória em uma região livre de campo com a mínima diferença de tempo possível. Posteriormente, os íons são desviados em direção ao detector por meio de refletores eletrônicos, denominados espelhos de íons. A separação dos íons baseia-se no tempo de voo de cada íon, desde a aplicação do pulso até a chegada ao detector. Sendo assim, íons mais leves, ou seja, com menores valores de razão entre a massa e o número de cargas ( $m/z$ ) chegarão ao detector antes dos íons mais pesados.

O método analítico para determinação de diazepam em amostras de afluente e efluente desenvolvido no UHPLC-QTOF seguiu as mesmas etapas descritas no item 3.3 deste trabalho. Para o espectrômetro de massas desse sistema, os parâmetros

instrumentais dependentes do analito otimizados foram o DP e o CE. A otimização destes parâmetros foi feita através da infusão direta de soluções dos padrões analíticos com concentrações de 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  em um fluxo de 4  $\mu\text{L min}^{-1}$  para seleção do íon precursor e íons produto referentes ao diazepam. A Tabela 21 mostra os parâmetros otimizados, os íons selecionados e as transições no MRM para o diazepam e seu respectivo padrão deuterado.

Tabela 21. Parâmetros otimizados e os íons selecionados no UHPLC-QTOF

Analito	Massa exata ( $\text{g mol}^{-1}$ )	Massa [MH] <sup>+</sup>	Transição MRM (m/z)	DP (V)	CE (V)
DIA	284,0716	285,0789	285,0789 → 193,0904 285,0789 → 154,0430	80	38
DIA-d5	289,1030	290, 1145	290, 1145 → 198,1204 290, 1145 → 154,0430	80	38

Em seguida, os parâmetros da fonte de ionização otimizados foram: CUR, GS1, GS2, IS e TEM. A otimização foi realizada a partir da injeção de soluções do padrão do analito com concentrações de 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  no sistema cromatográfico a partir da aplicação de uma fase móvel constituída por metanol/água (50:50, v/v) em um fluxo 4  $\mu\text{L min}^{-1}$ . A Tabela 22 mostra os melhores valores encontrados para o modo positivo de ionização.

Tabela 22. Parâmetros da fonte de ionização otimizados no UHPLC-QTOF

Parâmetro	Valor
CUR (psi)	25
GS1(psi)	40
GS2(psi)	40
IS (V)	5500
TEM (°C)	600

A separação cromatográfica do DIA foi realizada em fase reversa. A fase móvel consistiu em água com 0,1% de ácido fórmico (fase aquosa) e metanol com 0,1% de ácido fórmico (fase orgânica). A coluna cromatográfica utilizada foi uma Zorbax RRHD Eclipse Plus® C18 da Agilent (MA, EUA), com 50 mm de comprimento por 2,1 mm de diâmetro interno e partículas de 1,8  $\mu\text{m}$ . Os parâmetros cromatográficos de volume de injeção, vazão da fase móvel, gradiente de eluição e temperatura da coluna foram

otimizados a partir da injeção de soluções dos padrões analíticos a  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  para obtenção de método cromatográfico satisfatório. Os parâmetros cromatográficos utilizados encontram-se na Tabela 23.

Tabela 23. Parâmetros cromatográficos otimizados no UHPLC-QTOF

Parâmetro	Valor
Volume de injeção ( $\mu\text{L}$ )	6
Vazão da fase móvel ( $\mu\text{L min}^{-1}$ )	0,3
Gradiente de fase móvel	0-2 min: 50% B; 2-3 min: 80% B; 3-4 min: 100% B; 4-5 min: 50% B
Temperatura da coluna ( $^{\circ}\text{C}$ )	35

O método desenvolvido foi validado de acordo com a análise dos parâmetros de mérito analítico. A linearidade foi avaliada a partir da construção de uma curva analítica com correção de padrão interno deuteroado empregando-se dez pontos com uma faixa linear de trabalho de 0,1 a  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ . O ajuste de dados foi feito pelo modelo de regressão linear simples. Os limites de quantificação e detecção foram determinados pelo mesmo procedimento descrito no subitem 3.5.2 deste trabalho e apresentaram os mesmos valores que os limites determinados no UPLC-QqQ. A Tabela 24 as figuras de mérito obtidas para o método desenvolvido no UHPLC-QTOF.

Tabela 24. Figuras de mérito do método desenvolvido no UHPLC-QTOF

Composto	Padrão Interno	Curva analítica	$R^2$	Faixa Linear	LOQ	LOD
		$y = a + bx$		$\mu\text{g L}^{-1}$	$\text{ng L}^{-1}$	$\text{ng L}^{-1}$
DIA	DIA-d5	$y = 0,0142 + 0,0011x$	0,998	0,1 - 1000	0,9	0,3