



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA



RAFAEL FEITOSA DA SILVA

**DETERMINAÇÃO DE COCAÍNA E BENZOILECGONINA EM
AMOSTRAS DE ESGOTO BRUTO DO DISTRITO FEDERAL COMO
SUPORTE À REALIZAÇÃO DE ESTIMATIVAS DE CONSUMO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Orientador: Prof. Dr. Fernando Fabríz Sodré

Co-orientador: PCF Dr. Adriano Otávio Maldaner

Brasília, novembro de 2012

RAFAEL FEITOSA DA SILVA

**DETERMINAÇÃO DE COCAÍNA E BENZOILECGONINA EM
AMOSTRAS DE ESGOTO BRUTO DO DISTRITO FEDERAL COMO
SUPORTE À REALIZAÇÃO DE ESTIMATIVAS DE CONSUMO**

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Fabríz Sodré

Co-orientador: PCF Dr. Adriano Otávio Maldaner

Brasília, novembro de 2012

DEDICATÓRIA

A Deus, pelo amor incondicional, aos meus pais e a minha esposa Jaciára, pelo apoio, e ao meu filho Gabriel pela felicidade de todos os dias.

AGRADECIMENTO

Primeiramente a Deus, pela proteção e todas as graças alcançadas ao longo da minha vida.

Aos meus pais pelo carinho e dedicação.

Ao meu amor, Jaciára, pela paciência e carinho.

A minha sogra, Dona Cida, pelo incentivo e pela ajuda nas horas difíceis.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Fernando Fabríz Sodré, pelas experiências compartilhadas e pelo esforço dedicado à elaboração deste trabalho.

Ao PCF Dr. Adriano Otávio Maldaner pelo apoio e por viabilizar a utilização das dependências do SEPLAB/INC/DITEC/DPF.

Aos professores Jez, Alexandre, Ana Cristi e Fernanda pelo empenho e a forma de trabalhar que muito me motivam.

Aos colegas do AQQUA em especial João, Tati, Daniel, Carla, Gabi, Lorena, Rosy, Janaína, Lilian, Everaldo e Joyce.

Aos colegas Marco A. F. Locatelli, Igor C. Pescara, Iolana Campestrini, Cristiane Vidal e Prof. Dr. Wilson F. Jardim do Laboratório de Química Ambiental do IQ-UNICAMP pelo apoio durante as análises de esgoto por HPLC-MS/MS.

Ao Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas (INCTAA) pelo apoio financeiro e custeio de viagem de campo.

A CAESB, em especial ao Carlos Eduardo Borges Pereira (Superintendência de Operação e Tratamento de Esgotos), Leandro da Silva Cavalcante (Superintendência de Operação e Tratamento de Esgotos) e Maxwell Simes de Souza Paiva (Coordenação de Gestão do Desempenho Empresarial). pela disponibilização das amostras e esclarecimentos necessários a realização do trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro na forma de auxílio à pesquisa e custeio de viagem de campo (Projeto 402783/2010-7).

Ao DPP/UnB e ao PPGQ pelo apoio financeiro na forma de auxílio à pesquisa e custeio de viagem à congresso, respectivamente.

A CAPES pela bolsa concedida.

Ao Instituto de Química da UnB pela oportunidade.

RESUMO

Trabalhos recentes têm buscado estabelecer uma nova abordagem para estimar de forma rápida e segura o consumo de drogas de abuso (DA) considerando-se a análise do esgoto bruto gerado por uma população quanto à concentração dessas substâncias e de seus metabólitos. Nesse contexto, o presente trabalho apresenta uma estimativa do consumo de cocaína (COC) da população do Distrito Federal (DF) obtida a partir da análise de amostras de esgoto coletadas em oito estações de tratamento de esgoto (ETE) durante uma única campanha realizada em abril de 2012. A estimativa foi realizada com base nos valores de concentração de benzoilecgonina (BE), principal metabólito urinário da COC, em amostras de esgoto bruto. A determinação envolveu etapas de extração e concentração dos analitos empregando extração em fase sólida (SPE) e determinação por HPLC-MS/MS. Para avaliar a eficiência do método SPE testes de recuperação foram realizados com base em um planejamento fatorial 2^3 . As melhores recuperações foram obtidas com cartuchos SPE Strata-X, condicionamento da fase sólida e eluição das substâncias de interesse com solução de ACN/MeOH (60:40) e passagem da amostra acidificada a pH 2. Pela primeira vez, testes de preservação das amostras foram realizados para investigar o comportamento da COC e da BE durante o envio das amostras de esgoto bruto pelos correios. A acidificação da amostra bruta a pH 2 mostrou-se a maneira mais eficaz de reduzir as variações nas concentrações dos analitos. A presença de COC e BE foi confirmada em todas as amostras analisadas e as concentrações ficaram entre 519 e 1260 ng L⁻¹ e 1228 e 4297 ng L⁻¹, respectivamente. A região correspondente a ETE Brasília Norte apresentou o maior consumo *per capita* de COC base livre (4453 doses ano⁻¹ 1000 hab⁻¹), seguida da ETE Samambaia (4049 doses ano⁻¹ 1000 hab⁻¹) e da ETE Gama (3607 doses ano⁻¹ 1000 hab⁻¹). O consumo de COC base livre para a população do DF foi estimado em 753 kg ano⁻¹, o que corresponde a um consumo *per capita* de aproximadamente 2930 doses ano⁻¹ 1000 hab⁻¹. A partir da análise de amostras de esgoto coletadas da ETE Brasília Norte durante o período de 19 a 25 de abril de 2012, também foi possível estabelecer o perfil semanal de consumo da região norte de Brasília, DF. O maior consumo de COC foi observado nos finais de semana.

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

ABSTRACT

The battle against drug use and trafficking depends on many factors. Among them, stands out the obtention of information regarding consumption trends including the amount of drugs of abuse (DA) used by a given population. In this context, recent studies aimed to establish an alternative approach for drug use estimates based on the analysis of the raw sewage generated by a population through the quantification of selected substances and their metabolites in the samples. For that reason, this work presents an estimate of cocaine (COC) use in the Brazilian Federal District (FD) obtained from the analysis of raw sewage samples collected at eight wastewater treatment plants (WTP) serving more than 70% of the FD inhabitants. The estimate was based on the quantification of benzoilecgonine (BE), the main urinary metabolite of COC, in samples of raw sewage. Solid phase extraction (SPE) and HPLC-MS/MS were employed for sample preparation and analysis, respectively. Based on a 2³ factorial design, recovery tests were carried out to evaluate the efficiency of the SPE method. Better recoveries were obtained using acidified samples (pH 2) and commercial hydrophilic/lipophilic solid phases with conditioning and elution steps based on the use of a 60:40 mixture of acetonitrile:methanol. For the first time, to the best of our knowledge, preservation tests of sewage samples were carried out to investigate the stability of COC and BE during shipment of samples through the mail. The acidification of the sample of sewage to pH 2 showed to be the most effective procedure in order to avoid analyte degradation and/or transformation. The occurrence of COC and BE was confirmed in all analyzed samples and the concentrations varied between 519 to 1260 ng L⁻¹ for COC and from 1228 to 4297 ng L⁻¹ for BE. The region corresponding to the North Brasilia WTP had the highest *per capita* consumption of COC free base (4453 doses year⁻¹ 1000 inhab⁻¹), followed by Samambaia WTP (4049 doses year⁻¹ 1000 inhab⁻¹) and Gama WTP (3607 doses year⁻¹ 1000 inhab⁻¹). The consumption of COC free base for the DF population was estimated at 753 kg year⁻¹, which corresponds to a *per capita* consumption of approximately 2930 doses year⁻¹ 1000 inhab⁻¹. The weekly consumption profile of the north region of Brasilia was established based on the analysis of sewage samples collected for seven consecutive days. The weekly profile showed concentration peaks on Saturday and valleys on Tuesday reflecting the highest COC consumption on weekends. The results also showed the possible existence of distinct groups of users who make constant and/or intermittent use of COC.

Keywords: cocaine, benzoilecgonine, sewage, drug use estimation, sewage epidemiology, forensic epidemiology.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Cocaína	3
1.1.1. <i>Metabolismo e excreção da cocaína em seres humanos</i>	4
1.2. Determinação de drogas de abuso em esgoto bruto.....	6
1.2.1. <i>Amostragem e preservação</i>.....	6
1.2.2. <i>Preparo de amostra</i>	7
1.2.3. <i>Determinação analítica</i>.....	10
1.3. Estimativa do consumo de drogas por epidemiologia do esgoto	11
1.4. Objetivos.....	15
2. MATERIAIS E MÉTODOS	16
2.1. Locais de amostragem	16
2.2. Procedimento de coleta e preservação das amostras.....	18
2.2.1. <i>Testes de preservação das amostras</i>	18
2.3. Preparo de amostra	20
2.3.1. <i>Sistema de extração</i>	20
2.3.2. <i>Extração em fase sólida</i>	23
2.3.3. <i>Otimização do método de extração em fase sólida</i>	24
2.4. Determinação analítica	26
2.4.1. <i>Análises exploratórias</i>.....	27
2.5. Análise estatística dos dados	30
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
3.1. Avaliação do novo sistema de extração	31
3.2. Otimização do método <i>SPE</i>.....	33
3.2.1. <i>Planejamento fatorial</i>	33
3.2.2. <i>Influência do pH da amostra</i>.....	37

3.3. Preservação das amostras.....	39
3.4. Determinação analítica de COC e BE em esgoto bruto	46
3.5. Estimativa do consumo	49
3.5.1. Perfil semanal	54
3.6. Análises Exploratórias.....	58
4. CONCLUSÕES	61
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

6-ACM	6-acetilmorfina
AE	Anidroecgonina
AEME	Anidroecgonina metil-éster
AMP	Anfetamina
BE	Benzoilecgonina
CBD	Canabidiol
CBN	Canabinol
CE	Cocaetileno
COC	Cocaína
DA	Droga de abuso
DI	Droga inalterada
ECG	Ecgonina
EEE	Ecginina etil-éster
EMCDDA	<i>European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction</i>
EME	Ecgonina metil-éster
EPH	Efedrina
ESI	<i>Eletrospray ionization</i>
ETE	Estação de tratamento de esgoto
EtOH	Etanol
FM	Fase móvel
HER	Heroína
HPLC-MS/MS	<i>High performance liquid chromatography in tandem with mass spectrometry</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IT	<i>Ion-trap</i>
LD	Limite de detecção

LQ	Limite de quantificação
MAMP	Metanfetamina
MBDB	Metilbenzodioxolilbutanamina
MDA	3,4-metilenodioxianfetamina
MDEA	3,4-metilenodioxietilamfetamina
MDMA	Metilenodioximetanfetamina
MeOH	Metanol
MRM	<i>Multiple reaction monitoring</i>
MTD	Metadona
NI	Não incluído
nor-BE	Nor-benzoilecgonina
nor-COC	Nor-cocaína
PTFE	<i>Polytetrafluoroethylene</i>
QqQ	Triploquadropolo
SAMHSA	<i>Substance Abuse and Mental Health Services Administration</i>
Sefeito	Erro-padrão do efeito
SPE	<i>Solid phase extraction</i>
THC-COOH	11-nor-9-carboxi- Δ -9-tetrahidrocanabinol
TOF	<i>Time-of-flight</i>
ton	Toneladas
TR	Tempo de retenção
U.S.EPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
UNODC	<i>United Nations Office of Drug and Crime</i>
UPLC	<i>Ultra performance liquid chromatography</i>
6-ACM	6-acetilmorfina
AE	Anidroecgonina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Razões e frações molares comumente adotadas para 6 drogas de abuso.	13
Tabela 2. Características das oito ETE investigadas no presente estudo.	17
Tabela 3. Condições de preservação e os respectivos tratamentos dados às alíquotas de esgoto bruto.	19
Tabela 4. Materiais utilizados para a confecção do sistema de extração.	22
Tabela 5. Fatores adotados para o planejamento fatorial 2^3 e seus respectivos níveis.	24
Tabela 6. Fatores adotados para o planejamento fatorial 2^3 e seus respectivos níveis.	25
Tabela 7. Tempos de retenção e transições íon precursor→íon produto selecionadas para a determinação de COC e BE em esgoto bruto.	27
Tabela 8. Nome, abreviatura e marca dos padrões das substâncias investigadas.	28
Tabela 9. Transições íon precursor→íon produto selecionadas para a determinação de dezesseis substâncias simultaneamente.	29
Tabela 10. Efeitos calculados para o planejamento fatorial e seus erros-padrão (%).	36
Tabela 11. Concentrações médias de COC e BE para as condições de preservação avaliadas e suas respectivas classificações ^a segundo o teste de Dunnett ($\alpha = 0,05$, $n = 3$).	45
Tabela 12. Concentrações de BE e COC em amostras de esgoto bruto de oito ETE do Distrito Federal e a razão entre elas ($n = 3$).	48
Tabela 13. Consumo de cocaína estimado via epidemiologia do esgoto em vários países.	54
Tabela 14. Concentrações de BE e COC em amostras de esgoto bruto coletadas na ETE Brasília norte no período de 19 a 25 de abril de 2012 e a razão entre elas ($n = 3$).	55
Tabela 15. Resultados obtidos a partir da análise de amostras de esgoto bruto.	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Prevalência do consumo de COC no mundo em 2010. Adaptado de UNODC (2012).	3
Figura 2. Principais produtos da metabolização da cocaína em seres humanos. Adaptado de EMCDDA, 2008b.	5
Figura 3. Esquema das etapas envolvidas em SPE. Adaptado de Lanças, 2004.	8
Figura 4. Estrutura química do copolímero utilizado como fase sólida nos cartuchos Oasis HLB. Adaptado de www.waters.com.	9
Figura 5. Estrutura química do polímero utilizado como fase sólida nos cartuchos Strata-X. Adaptado de www.phenomenex.com	10
Figura 6. Esquema geral das etapas consideradas em epidemiologia do esgoto.	12
Figura 7. Regiões atendidas pelas oito ETE investigadas. Fonte: Google <i>Earth</i>	16
Figura 8. Sistema adaptado de Sodré e colaboradores (2010) empregado na extração em fase sólida de COC e BE em amostras de esgoto bruto.	21
Figura 9. Sistema empregado na extração de COC e BE em amostras de esgoto bruto.	23
Figura 10. Sistema empregado para extração em fase sólida de COC e BE em amostras de esgoto bruto.	32
Figura 11. Sistema de extração convencional empregado para a extração em fase sólida de compostos orgânicos em matrizes aquáticas. Adaptado de Sodré <i>et al.</i> , 2010.	32
Figura 12. Porcentagens médias de recuperação de COC e BE obtidas com cartuchos C8, C18 e Oasis HLB em oito condições de extração diferentes (n = 2).	34
Figura 13. Porcentagens médias de recuperação para COC e BE obtidas com as análises utilizando cartuchos drug, Strata-SAX, C8, Oasis HLB e Strata-X em amostras com pH 2 e pH 6 (n=2).	38
Figura 14. Erro relativo em porcentagem com relação à amostra-controle quanto à concentração de COC e BE (n=3). (1) sem tratamento, (2) filtração com membrana com 0,45 µm de poro, (3) filtração com membrana com 0,22 µm de poro, (4) acidificação a pH 2, (5) filtração com membrana com 0,45 µm de poro seguida de acidificação a pH 2, (6) adição de NaN ₃ , (7) adição de formaldeído e (8) extração em fase sólida (SPE) e armazenamento do cartucho de extração sem eluir os analitos.	40
Figura 15. Equação de equilíbrio entre a COC e a BE. A reação de hidrólise da ligação éster (direta) é favorecida em meios com pH acima de 4 e a reação de esterificação (inversa) é favorecida em meios com pH abaixo de 4.	42
Figura 16. Razão entre os erros relativos nas concentrações de BE e COC para cada condição de preservação e o desvio padrão correspondente.	44
Figura 17. Curva analítica típica obtida pelo método de padronização externa para (A) COC e (B) BE.	47
Figura 18. Cromatograma típico obtido no modo MRM a partir da análise de uma amostra de esgoto bruto.	48
Figura 19. Consumo anual de COC base livre em kg ano ⁻¹ pelas comunidades servidas pelas ETE investigadas e suas respectivas classificações segundo o teste de Tukey (α = 0,05, n = 3).	50
Figura 20. Consumo de COC no Distrito Federal obtido por epidemiologia do esgoto em junho de 2010 e abril de 2012.	51

Figura 21. Consumo <i>per capita</i> da população atendida por cada ETE investigada e suas respectivas classificações segundo o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$, $n = 3$).....	52
Figura 22. Consumo <i>per capita</i> de COC no Distrito Federal obtido por epidemiologia do esgoto em junho de 2010 e abril de 2012.....	53
Figura 23. Perfil do consumo semanal de cocaína para a região atendida pela ETE Brasília Norte. .	56
Figura 24. Quantidades diárias (g dia ⁻¹) de BE e COC transportadas até a ETE Brasília Norte.	57
Figura 25. Cromatograma típico obtido no modo MRM a partir da análise da solução padrão contendo quinze das dezesseis substâncias investigadas.....	58
Figura 26. Cromatograma típico obtido a partir da análise de amostras de esgoto bruto.	59

1. INTRODUÇÃO

O consumo de substâncias psicoativas, seja para fins recreativos, religiosos ou terapêuticos, está presente na história da humanidade desde seus primórdios (Nunes e Jólluskin, 2007). Todavia, as primeiras iniciativas internacionais visando à fiscalização e o controle dessas substâncias iniciaram somente no início do século XX, primeiramente com a Conferência de Xangai, em 1909, e mais tarde com a Convenção Internacional do Ópio realizada em 1912 em Haia, na Holanda (UNODC, 2008).

Desde então, inúmeros esforços têm sido dedicados à diminuição do consumo e do tráfico de drogas de abuso em todo o mundo devido aos vários problemas de caráter político, social e econômico relacionados a esse tema. Apesar dos esforços, segundo o *World Drug Report* (UNODC, 2011), publicado pelo Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime, a quantidade de usuários de drogas de abuso tem aumentado desde a década de 1990.

Foi estimado que o número de pessoas que consumiram drogas de uso controlado ou proibido pelo menos uma vez, entre 2009 e 2010, possa chegar a 300 milhões, correspondendo a 6,6 % da população mundial com idade entre 15 e 64 anos (UNODC, 2012). Ainda de acordo com o mesmo relatório, estima-se que o número de mortes relacionadas ao uso de drogas em 2010 esteja entre 99.000 e 253.000.

Entre os usuários de drogas de abuso, aqueles que fazem uso de *cannabis* – termo genérico referente aos vários produtos derivados da planta de maconha (*Cannabis sativa L.*) – são maioria. Os consumidores de anfetamínicos, uma ampla classe de substâncias presentes em drogas de abuso como *ecstasy* ou em fármacos como os anorexígenos (medicamentos utilizados para reduzir o apetite), respondem pelo segundo maior grupo de usuários de drogas, seguido dos usuários de cocaína (COC) e opioides, respectivamente (UNODC, 2011).

Diante desse panorama, entidades nacionais e internacionais de diferentes setores da sociedade têm se dedicado à compreensão dos mecanismos relacionados ao tráfico e ao consumo de drogas e, igualmente, à repressão dessas atividades. No entanto, a implantação de estratégias eficazes e o planejamento adequado de políticas públicas estão ligados à obtenção de dados epidemiológicos a respeito das tendências de consumo, das localidades com maior ocorrência do uso

de drogas e da quantidade de drogas utilizadas num determinado país, cidade ou região (SENAD, 2006).

Tradicionalmente, esse tipo de levantamento depende de indicadores indiretos e por vezes subjetivos ou incompletos baseados em pesquisas sócio epidemiológicas, dados de apreensões de drogas, registros de internações médicas em hospitais e em clínicas de recuperação, pesquisas populacionais e entrevistas com usuários (EMCDDA, 2008a; SENAD, 2006). Além disso, essas abordagens são muito trabalhosas e o período entre a coleta dos dados e a divulgação dos mesmos é normalmente longo, dificultando o monitoramento e a identificação rápida de tendências no uso e no tráfico dessas substâncias que obedecem a dinâmicas diversas relacionadas à oferta e à demanda de drogas.

No Brasil, a Secretaria Nacional Antidrogas (SENAD) é o órgão do governo federal responsável por promover a realização de estudos e pesquisas sobre o uso de drogas. No último levantamento nacional, realizado em 2005, os dados foram obtidos por meio de entrevista. O questionário utilizado foi o do SAMHSA (sigla para o termo em inglês, *Substance Abuse and Mental Health Services Administration*), órgão vinculado ao Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos, que foi traduzido e adaptado à realidade brasileira (SENAD, 2006). A recusa em responder as perguntas, dificuldade em encontrar as residências escolhidas para a pesquisa e desinteresse por parte dos entrevistados foram algumas das dificuldades relatadas pelos aplicadores do questionário supracitado.

Nota-se, diante desse contexto, a necessidade da proposição de abordagens que possam fornecer informações de maneira rápida e segura às autoridades responsáveis por monitorar esse fenômeno. Nesse sentido, uma abordagem alternativa para estimar o consumo de drogas de uma população foi proposta por Christian G. Daughton, pesquisador da U.S.EPA (do inglês, *United States Environmental Protection Agency*), em 2001 (Daughton, 2001). Segundo ele, o consumo de drogas poderia ser estimado a partir da análise de amostras de esgoto bruto desde que, algumas informações tais como, a concentração da droga de abuso (DA) e/ou de seus metabólitos no esgoto, o metabolismo da droga no organismo, o percentual de excreção de cada metabólito e/ou da droga inalterada (DI), a vazão de entrada de esgoto na estação de tratamento e o número de

peças atendidas pela estação de tratamento de esgoto (ETE) investigada fossem conhecidas (Daughton, 2001).

Caracterizada pela rapidez e objetividade na obtenção de informações, esta nova abordagem, denominada pela comunidade científica como “*epidemiologia do esgoto*” ou “*epidemiologia forense*” tem sido utilizada no monitoramento do consumo e do tráfico de drogas, apresentando-se como mais uma ferramenta no enfrentamento às drogas (Daughton, 2011; van Nuijs *et al.*, 2011a).

1.1. Cocaína

Entre as diversas drogas de abuso existentes, a COC tem sido a substância mais investigada pela epidemiologia do esgoto em função do seu elevado padrão de consumo global. De acordo com o *World Drug Report* (UNODC, 2012), o número de pessoas com idade entre 15 e 64 anos que fizeram uso de COC pelo menos uma vez em 2010 está entre 13 e 19,5 milhões. No Brasil, a porcentagem de pessoas que fizeram o uso de algum preparado a base de COC (cloridrato de cocaína, *crack* ou merla) pelo menos uma vez na vida corresponde a 3,8% da população (SENAD, 2006). A Figura 1 mostra a prevalência do consumo de COC (base livre e cloridrato de cocaína) no mundo para o ano de 2010 de acordo com os dados oficiais mais recentes de cada país.

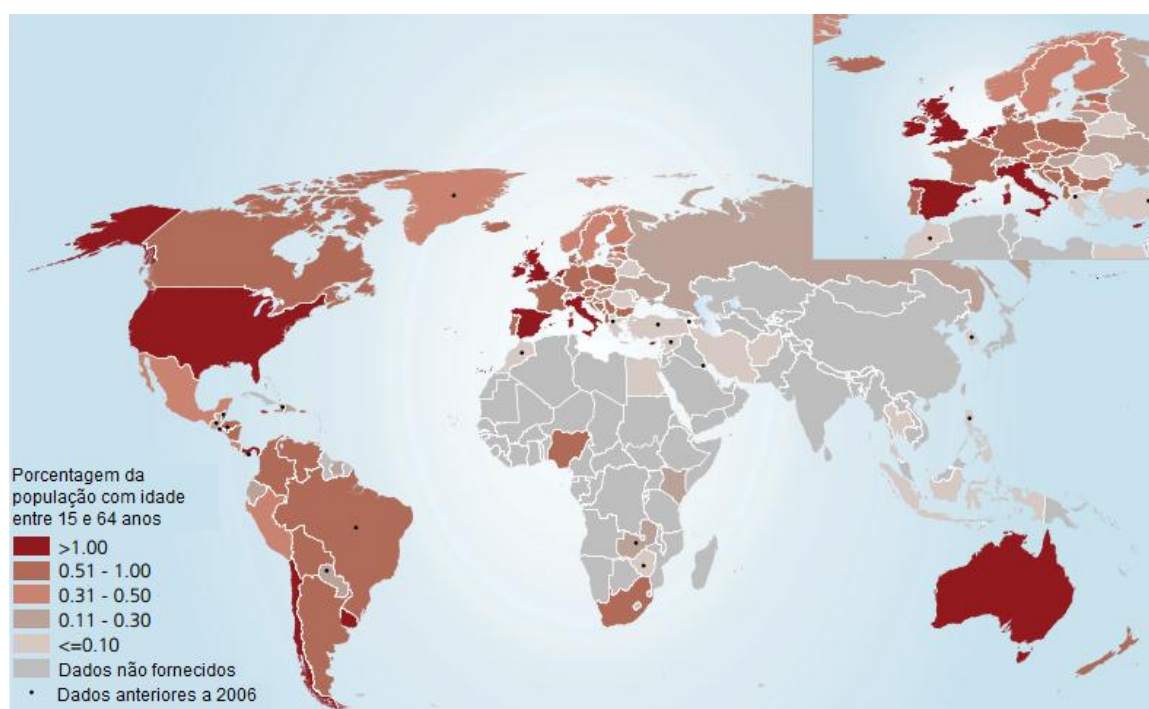


Figura 1. Prevalência do consumo de COC no mundo em 2010. Adaptado de UNODC (2012).

Pertencente à classe dos alcaloides tropânicos, a COC é uma substância que pode ser sintetizada a partir da ecgonina (ECG) ou obtida, majoritariamente, a partir das folhas de uma das várias espécies da planta de coca, a *Erythroxylum coca* (*E. coca*), que ocorre principalmente nas regiões andinas da América do Sul. Conseqüentemente, a maior parte da COC consumida no mundo é produzida em países tais como Colômbia, Peru, Equador e Bolívia (Goldstein *et al.*, 2009; EMCDDA, 2008a; Castiglioni *et al.*, 2011).

A forma de consumo da COC relaciona-se com sua forma química de apresentação. Devido a sua baixa solubilidade em água a COC costuma ser extraída com o auxílio de solventes orgânicos como, por exemplo, querosene (Goldstein *et al.*, 2009). Nesse processo, a COC é obtida na forma de base livre (*crack*) que costuma ser fumada devido a sua baixa solubilidade em água e, portanto, difícil absorção através das mucosas (Melis *et al.*, 2011). Por outro lado, caso o produto obtido após a extração seja tratado com ácido clorídrico há a formação de um sal, o cloridrato de cocaína, que é bastante solúvel em meio aquoso e, geralmente, é inalado ou injetado pelo usuário (Goldstein *et al.*, 2009; Melis, 2011).

Por ser um poderoso estimulante do sistema nervoso central o consumo contínuo e em longo prazo de COC, além de dependência química, pode ocasionar problemas cardiovasculares, neurológicos e psiquiátricos, assim como um aumento do risco de transmissão de doenças sexualmente transmissíveis devido à situação de vulnerabilidade¹ a qual o usuário acaba sendo exposto (EMCDDA, 2010)

1.1.1. Metabolismo e excreção da cocaína em seres humanos

Ao entrar no organismo a COC é metabolizada por hidrólise espontânea e/ou pela ação de enzimas presentes principalmente no fígado e na corrente sanguínea, denominadas esterases, que são responsáveis por catalisar a hidrólise de suas ligações éster (Goldstein *et al.*, 2009; Castiglioni *et al.*, 2011). Os principais produtos da metabolização da COC são mostrados na Figura 2.

No fígado, aproximadamente 45 % da COC absorvida pelo organismo é hidrolisada à benzoilecgonina (BE) pela enzima carboxilesterase-1 (Goldstein *et al.*, 2009). Ainda no fígado, outro processo, denominado desmetilação, pode levar a

¹ O conceito de vulnerabilidade pode ser entendido como a pouca ou nenhuma capacidade do indivíduo ou grupo social de decidir sobre sua situação de risco (SENAD, 2006).

formação da nor-cocaína (nor-COC), um metabólito comum na urina e no sangue de usuários (EMCDDA, 2008b). Todavia, quando consumida concomitantemente com bebida alcoólica, a COC é preferencialmente transformada em cocaetileno (CE) pela transesterificação da droga na presença de etanol (EtOH). Posteriormente, o CE formado é transformado em nor-cocaetileno (nor-CE) e ecgonina etil éster (EEE) (EMCDDA, 2008b; Goldstein *et al.*, 2009).

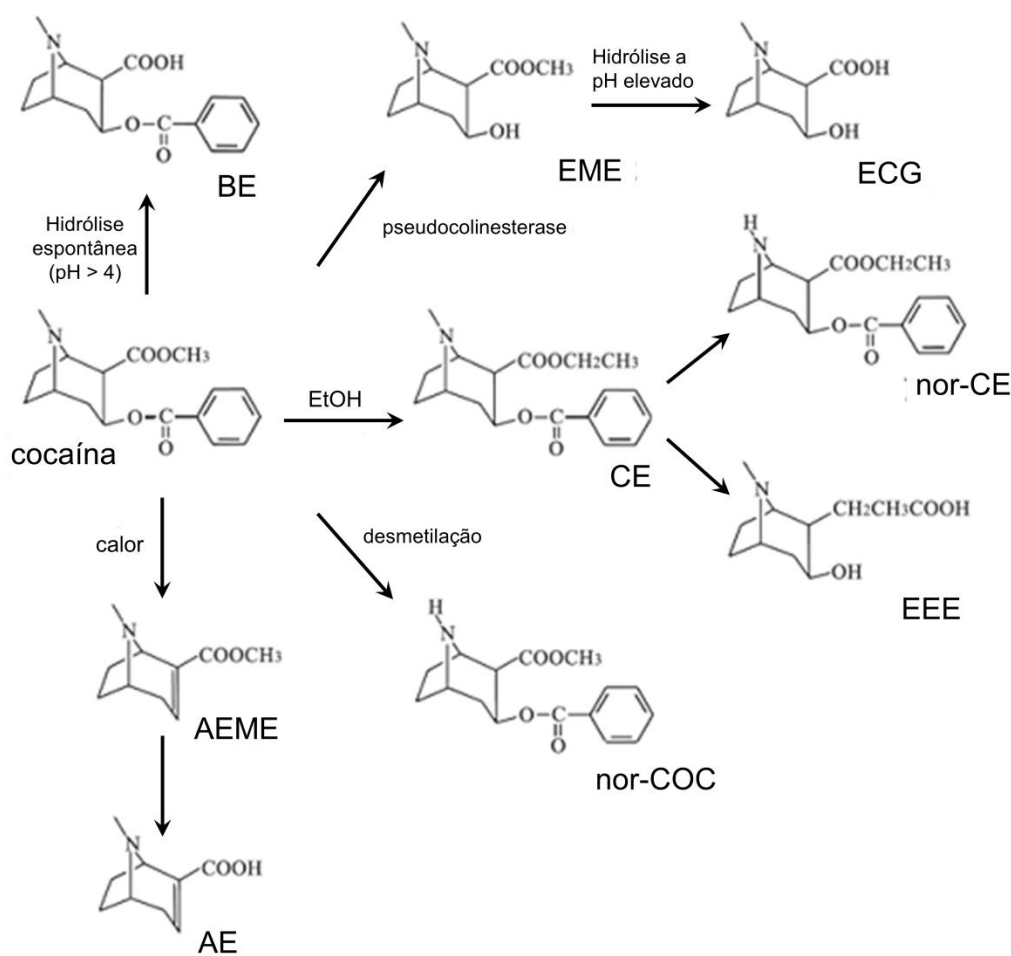


Figura 2. Principais produtos da metabolização da cocaína em seres humanos. Adaptado de EMCDDA, 2008b.

Na corrente sanguínea, as enzimas responsáveis pela metabolização da COC são a pseudocolinesterase-2 e carboxilesterase-2 que a transformam em ecgonina metil-éster (EME). Esta, por sua vez, pode ser hidrolisada levando a formação de ecgonina (ECG) (Castiglioni *et al.*, 2011). As quantidades de BE e EME excretadas na urina respondem por aproximadamente 85 % do total de COC absorvida pelo organismo (Castiglioni *et al.*, 2008; Goldstein *et al.*, 2009).

Quando consumida sob a forma de *crack* a COC é fumada e outras substâncias, além das mencionadas, são produzidas em função do processo de queima da droga denominado pirólise (Goldstein *et al.*, 2009). A anidroecgonina (AE) é o principal produto formado durante esse processo e seu principal metabólito, a anidroecgonina metil-éster (AEME), costuma ser utilizado na identificação de usuários de *crack* (EMCDDA, 2008b).

Finalmente, depois de metabolizada, apenas uma pequena fração da COC consumida (1-9 %) é excretada sob sua forma inalterada (EMCDDA, 2008; Zuccato e Castiglioni, 2009; Castiglioni *et al.*, 2011).

1.2. Determinação de drogas de abuso em esgoto bruto

A possibilidade de utilizar as informações sobre a ocorrência de DA em esgoto como indicador para a área forense e de segurança e saúde públicas aumentou o interesse com relação à presença de tais substâncias nesse tipo de matriz (Huerta-Fontela *et al.*, 2008a; van Nuijs *et al.*, 2011a; Postigo *et al.*, 2011). Nos últimos anos, diversos estudos destinados à detecção e quantificação dessas substâncias em esgoto bruto foram realizados em países como Espanha, (González-Mariño *et al.*, 2010; Postigo *et al.*, 2010; Vazquez-Roig *et al.*, 2010; Martínez Bueno *et al.*, 2011; Pedrouzo *et al.*, 2011; Fontanals *et al.*, 2011), Suíça (Castiglioni *et al.*, 2006; Berset *et al.*, 2010; Mathieu *et al.*, 2011), Alemanha (Hummel *et al.*, 2006), Bélgica (Gheorghe *et al.*, 2008; van Nuijs *et al.*, 2009a; van Nuijs *et al.*, 2009b) e Brasil (Maldaner *et al.*, 2012).

Devido a complexidade da matriz investigada e, igualmente, aos baixos níveis de concentração das substâncias de interesse, geralmente na faixa de ng L^{-1} , a determinação de drogas e de seus metabólitos em esgoto bruto requer a utilização de técnicas analíticas de alta sensibilidade e especificidade o que constitui o maior desafio do ponto de vista químico relacionado à aplicação dessa nova abordagem (van Nuijs *et al.*, 2011a). Logo, cada uma das etapas envolvidas na determinação dessas substâncias, desde a amostragem e preservação da amostra até a determinação analítica, precisam ser muito bem planejadas e executadas de modo que levem a resultados fidedignos e representativos.

1.2.1. Amostragem e preservação

Na maior parte dos trabalhos envolvendo a determinação de drogas de abuso em esgoto bruto, a amostragem é realizada de maneira composta ou acumulada durante um período pré-estabelecido, geralmente, 24 h (van Nuijs *et al.*, 2011a). A utilização da amostragem composta está relacionada ao fato de que, desta forma, a amostra obtida apresentará maior representatividade para a realização das estimativas de consumo.

Depois de coletadas, as amostras costumam ser preservadas sob refrigeração de 4°C em frascos de vidro âmbar até a extração, se for necessária, ou análise. Contudo, essas condições não garantem necessariamente a estabilidade das substâncias de interesse nas amostras de esgoto bruto haja vista a intensa atividade biológica desse tipo de matriz (Castiglioni *et al.*, 2006).

Nesse contexto, Castiglioni e colaboradores (2006) mostraram, com base em testes realizados com amostras de esgoto bruto enriquecidas com 16 resíduos de drogas de abuso, que todos os compostos sofreram variações de concentração após três dias de estocagem em frasco de vidro âmbar a 4°C. Em estudo realizado em 2010, González-Mariño e colaboradores (2010) avaliaram a estabilidade de sete DA em esgoto bruto sob três condições diferentes durante 12 semanas. Na primeira condição, depois de filtradas e enriquecidas, as amostras foram estocadas em frascos de vidro âmbar a 4°C. Na segunda, foi adicionado NaN₃ (0,2 %), um biocida potente, às amostras e estas também foram estocadas em vidro âmbar a 4°C. Por fim, cartuchos de extração em fase sólida (SPE, do inglês, *solid phase extraction*) foram utilizados na extração de alíquotas das amostras de esgoto e estocados, sem passar pela etapa de eluição, a -20°C. Os resultados revelaram que, após 12 semanas, somente as substâncias presentes nas amostras preservadas nos cartuchos de SPE a -20°C não apresentaram degradação significativa.

Atualmente, grande parte dos trabalhos emprega etapas de diminuição do pH, filtração em membranas de diferentes porosidades e estocagem a -20°C na tentativa de preservar as amostras de esgoto (van Nuijs *et al.* 2009b; Gheorghe *et al.*, 2008; Lai *et al.*, 2011; Kasprzyk-Hordern *et al.*, 2009). Entretanto, ainda não existe uma definição clara sobre a ordem de execução destas etapas que apresente melhores resultados para a preservação das substâncias de interesse.

1.2.2. Preparo de amostra

O preparo da amostra é, sem dúvida, a etapa mais crítica de qualquer método analítico que vise à determinação de substâncias em níveis de concentração traço em amostras ambientais. Devido às baixas concentrações das substâncias de interesse e à presença de interferentes da matriz, os métodos empregados para a determinação de DA e de seus metabólitos em esgoto bruto envolvem, de uma maneira geral, uma etapa de filtração com membranas de diferentes porosidades e outra etapa de pré-concentração e/ou *clean up* baseada em SPE.

Apesar de onerosa, a SPE é uma técnica de separação simples, relativamente rápida quando comparada aos métodos clássicos de separação (extração líquido-líquido, cromatografia líquida preparativa, entre outras) e de fácil automação (Valcárcel *et al.*; 2012; Jurado *et al.*, 2012; Postigo *et al.* 2011). Os mecanismos de separação envolvidos nessa técnica podem ser baseados em processos físicos (exclusão por tamanho), químicos (adsorção, partição, troca iônica, ligação química, etc.) ou ambos. De modo geral, a SPE envolve quatro etapas: (1) condicionamento do cartucho: uso de solvente adequado para disponibilizar os sítios ativos e para ajustar as forças dos solventes de eluição com o solvente da amostra; (2) extração das substâncias de interesse da amostra; (3) lavagem do cartucho para eliminar possíveis interferentes e (4) eluição das substâncias de interesse para posterior análise (Lanças, 2004). A Figura 3 apresenta um esquema das etapas envolvidas em SPE.

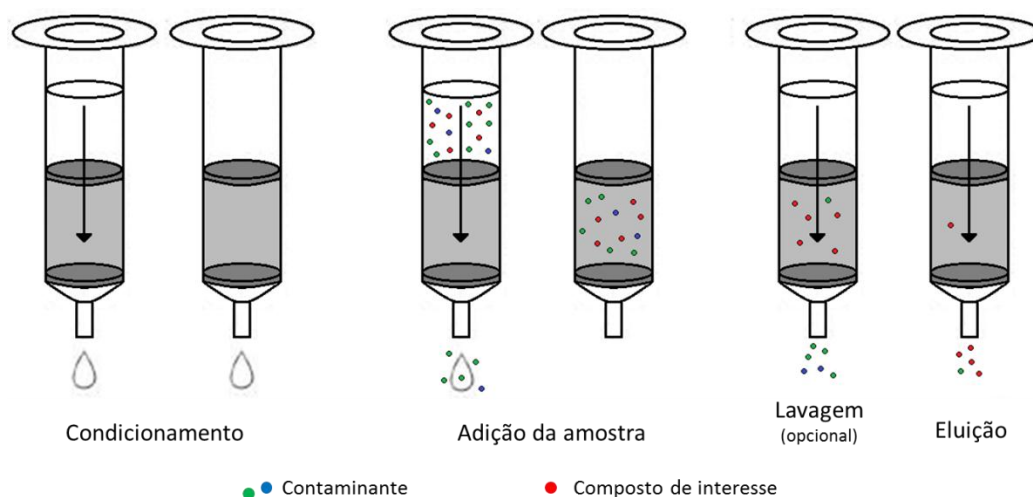


Figura 3. Esquema das etapas envolvidas em SPE. Adaptado de Lanças, 2004.

No caso da extração de DA e de seus metabólitos, os adsorventes (fases sólidas) mais utilizados são aqueles que empregam polímeros com propriedades

hidrofílicas e lipofílicas como os cartuchos Oasis HLB (Waters, Estados Unidos) e Strata-X (Phenomex, Estados Unidos) ou adsorventes mistos baseados em fase reversa e troca catiônica como a linha Oasis MCX (Waters) e Strata-XC (Phenomenex). Além destes, cartuchos com fases sólidas que possuem caráter pouco polar como, por exemplo, do tipo C8 e C18 também tem sido testadas em estudos envolvendo a extração e concentração de DA (Kasprzyk-Horden *et al.*, 2007; Gheorghe *et al.*, 2008).

Nos cartuchos do tipo Oasis HLB a fase sólida trata-se de um copolímero de n-vinilpirrolidona e divinilbenzeno com propriedades hidrofílica e lipofílica, o que faz desse cartucho um dos mais empregados no que diz respeito à extração de DA e seus metabólitos em meio aquoso (Zuccato e Castiglioni, 2009; Postigo *et al.*, 2008). A Figura 4 apresenta a estrutura do copolímero empregado nos cartuchos do tipo Oasis HLB.

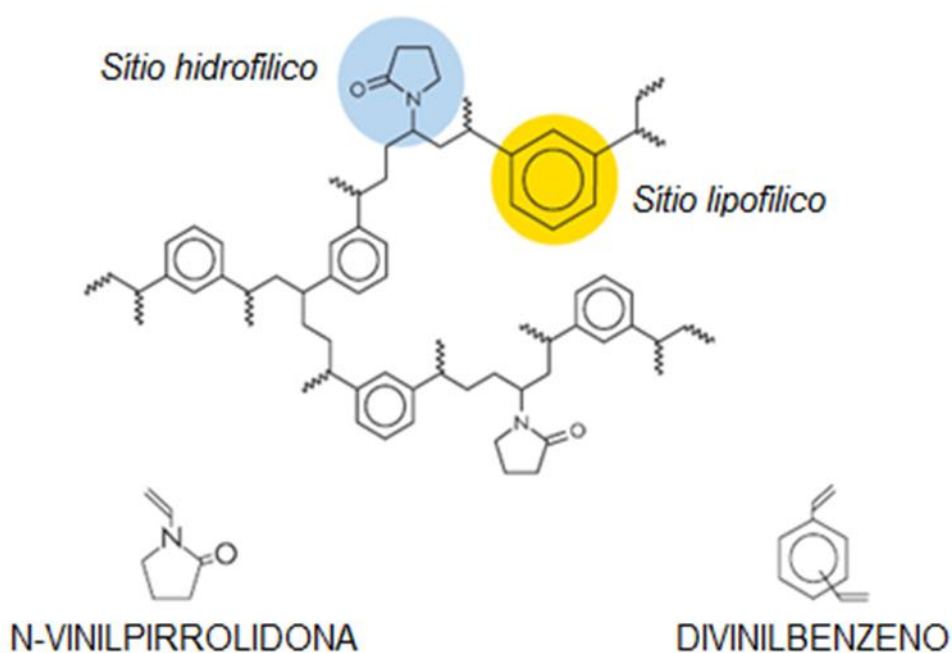


Figura 4. Estrutura química do copolímero utilizado como fase sólida nos cartuchos Oasis HLB. Adaptado de www.waters.com.

Os cartuchos Strata-X, além da similaridade de sua fase sólida com a fase dos cartuchos Oasis HLB, também têm sido empregados na concentração e recuperação de DA em matrizes aquáticas devido, principalmente, ao fato de possuírem um menor custo quando comparados aos cartuchos Oasis. Na Figura 5 é

apresentada a estrutura química do polímero empregado como fase sólida nos cartuchos Strata-X.

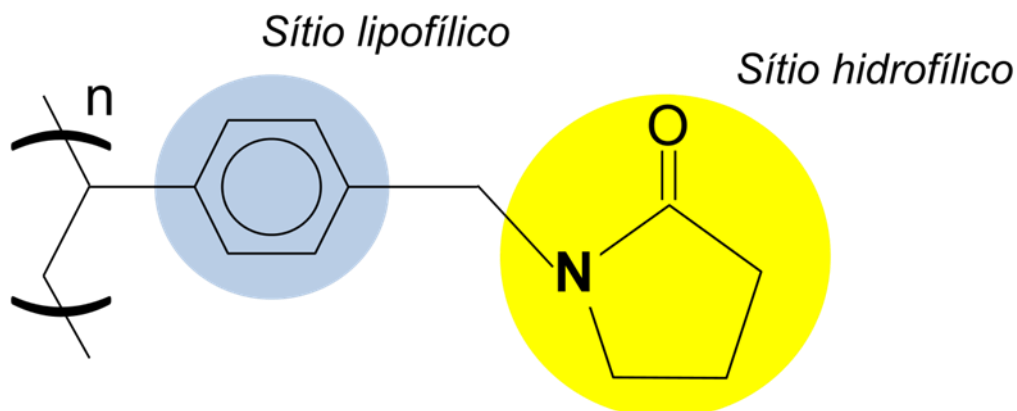


Figura 5. Estrutura química do polímero utilizado como fase sólida nos cartuchos Strata-X. Adaptado de www.phenomenex.com

Nos cartuchos do tipo C8 e C18 a fase sólida apresenta grupos alquila de oito e 18 carbonos, respectivamente, e, por isso, exibem um maior caráter apolar. A influência dos tipos de fase sólida e dos parâmetros de extração tem sido bastante investigada em estudos recentes (Castiglioni *et al.*, 2011; Vazquez-Roig *et al.*, 2010; Bisceglia *et al.*, 2010).

A configuração *on-line* da SPE, apesar de pouco frequente, também já tem sido aplicada para a determinação de drogas de abuso em esgoto. Postigo e colaboradores (2008) descreveram o primeiro método baseado em SPE *on-line* acoplado à HPLC-MS/MS para a determinação de 17 DA e metabólitos em amostras de efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETE) e esgoto bruto. Esse tipo de configuração apresenta algumas vantagens quando comparada a SPE *off-line*, como minimização de problemas relacionados à contaminação da amostra, menor exposição do analista a materiais perigosos (solventes orgânicos, por exemplo) e menor consumo de solventes e da própria amostra (Postigo *et al.*, 2008; Postigo *et al.* 2010).

1.2.3. Determinação analítica

A identificação e/ou quantificação das DA e de seus metabólitos em diferentes matrizes aquáticas tem sido realizada por meio de técnicas analíticas de separação, tais como cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*) e cromatografia líquida de ultra

eficiência (UPLC, do inglês *ultra performance liquid chromatography*) acopladas, na vasta maioria das vezes, a espectrômetros de massas.

Espectrômetros com analisadores de massas do tipo quadrupolo, captura de íons (IT, do inglês *ion-trap*), tempo de voo (TOF, do inglês *time-of-flight*), simples, híbridos ou ainda do tipo *in tandem*, como os triplo quadrupolos (QqQ), podem ser empregados para a investigação sobre o conteúdo de DA em águas superficiais e residuárias. Entretanto, grande parte dos trabalhos publicados lança mão da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em triplo quadrupolo devido, principalmente, a grande sensibilidade, seletividade e rapidez na aquisição de dados (Zuccato e Castiglioni, 2011). O diferencial desta técnica hifenada está na utilização de duas etapas de espectrometria de massas no monitoramento de íons específicos de cada substância de interesse na medida em que são eluídas pelo sistema cromatográfico. Desta maneira, a interferência de substâncias presentes na matriz é drasticamente reduzida podendo levar a limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) compatíveis com as concentrações encontradas nas amostras.

1.3. Estimativa do consumo de drogas por epidemiologia do esgoto

A presença de DA e de seus metabólitos no esgoto relaciona-se, principalmente, a excreção de tais substâncias através da urina e das fezes dos usuários, ou ainda, ao descarte direto (acidental ou não) da droga no sistema de esgoto (Zuccato e Castiglioni, 2009). Uma vez no esgoto, a concentração de tais substâncias pode ser determinada e a estimativa realizada por meio de um “retrocálculo” que leva em consideração a concentração da droga e/ou de seus metabólitos no esgoto, além de uma série de informações complementares. A Figura 6 apresenta um esquema geral das etapas consideradas em epidemiologia do esgoto desde o uso da droga pelo usuário até a realização da estimativa de consumo.

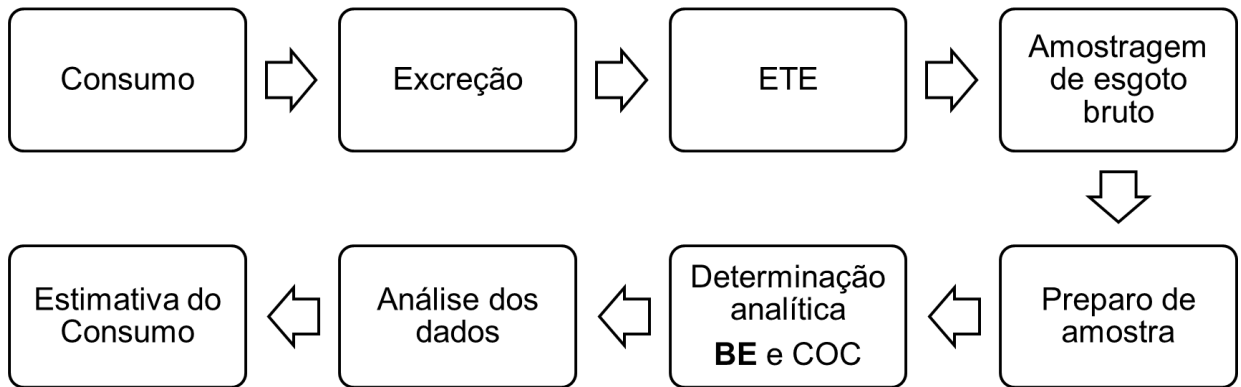


Figura 6. Esquema geral das etapas consideradas em epidemiologia do esgoto.

A Equação 1 mostra que a estimativa de consumo (C , em $\text{g dia}^{-1} 1000 \text{ hab}^{-1}$) pode ser obtida com base na concentração da substância-alvo presente no esgoto (c , em g L^{-1}), na vazão volumétrica do esgoto que aflui na ETE (Q_v , em L dia^{-1}), na razão molar (f_m) entre a droga inalterada (DI) e a substância-alvo, na fração molar da droga (x) excretada sob a forma da substância-alvo e no número de habitantes (1000 hab) atendidos pela ETE.

$$C = \frac{c \times Q_v \times f_m}{1000 \text{ hab} \times x} \quad (1)$$

A estimativa obtida a partir desse retrocálculo depende, sobremaneira, da substância-alvo investigada, isto é, da substância que terá sua concentração determinada no esgoto e da fração molar da DA excretada sob a forma de tal substância. Logo, tendo em vista que a substância-alvo pode ser qualquer metabólito ou a própria DI, diferentes valores podem ser considerados na estimativa de consumo de uma mesma DA por epidemiologia do esgoto. Na Tabela 1 são apresentadas as razões e frações molares comumente adotadas nas estimativas de consumo de diferentes DA.

Tabela 1. Razões e frações molares comumente adotadas para 6 drogas de abuso.

Droga Inalterada (DI)	Substância-alvo	Fração molar (%)	Razão Molar DI/Substância-alvo
Cocaína	BE	45 ^h ; 35 ⁱ	1,05
	EME ^a	15 ⁱ	1,52
Maconha	THC-COOH ^b	0,6 ^h	0,91
Anfetamina	AMP ^c	30 ^{h, i}	1,0
Metanfetamina	MAMP ^d	43 ^{h, i}	1,0
<i>Ecstasy</i>	MDMA ^e	65 ^h ; 20 ⁱ	1,0
	Morfina ^f	42 ^h	1,29
Heroína	6-ACM ^g	1,3 ⁱ	1,13

^aecgonina metil éster; ^b11-nor-9-carboxi- Δ -9-tetrahydrocannabinol; ^canfetamina; ^dmetanfetamina; ^emetilenedioximetanfetamina; ^fMetabólito majoritário, mas não exclusivo da heroína; ^g6-acetilmorfina; ^hvan Nuijs *et al.*, 2011a; ⁱEMCDDA, 2008.

As estimativas de consumo realizadas para COC por meio da epidemiologia do esgoto costumam adotar a BE como a substância-alvo a ser investigada e uma taxa de excreção (fração molar) de 45 % para esse metabólito. Apesar de menos frequente, alguns estudos têm adotado outros metabólitos e a própria COC na realização dos retrocálculos (van Nuijs *et al.*, 2011b).

O primeiro trabalho a colocar em prática a epidemiologia do esgoto foi realizado por Zuccato e colaboradores (2005). Nesse estudo, as concentrações de COC e BE foram determinadas em amostras de esgoto bruto de quatro cidades italianas por HPLC-MS/MS (QqQ). A quantidade de COC consumida foi estimada a partir da massa de BE encontrada nas amostras de esgoto. De acordo com os autores o consumo de COC obtido empiricamente (0,44 g dia⁻¹ 1000 hab⁻¹) foi consideravelmente superior àquele relatado em dados oficiais.

Em trabalho realizado em 2008, Huerta-Fontela e colaboradores (2008a) utilizaram aproximações semelhantes às realizadas pelo grupo de Zuccato para estimar, com base em amostras de esgoto de 42 ETE da Espanha, o consumo de COC e metilenedioximetanfetamina (MDMA). Os resultados apontaram um consumo médio de 1,4 g dia⁻¹ 1000 hab⁻¹ para COC e 0,4 g dia⁻¹ 1000 hab⁻¹ para MDMA considerando-se apenas usuários na faixa etária entre 15 e 64 anos e 15 e 34 anos, respectivamente.

Em publicação recente, van Nuijs e colaboradores (2011b) avaliaram o consumo de COC, MDMA, anfetamina (AMP), metanfetamina (MAMP), metadona (MTD) e heroína (HER) em Bruxelas (Bélgica) com base em resultados referentes a um ano de investigação. Diversas condições relacionadas ao cálculo da estimativa de consumo foram exploradas, dentre elas a estabilidade das substâncias no sistema de esgotamento sanitário, o número real de habitantes atendidos pelas ETE e a taxa de excreção do metabólito ou da droga inalterada. Os autores estimaram o consumo de COC, AMP, MDMA, MAMP, MTD e HER em 0,002, 0,138, 0,415, 0,519, 0,076 e 0,013 g dia⁻¹ 1000 hab⁻¹, respectivamente.

Postigo e colaboradores (2011) apresentaram uma nova possibilidade para a aplicação da epidemiologia do esgoto ao investigarem o consumo de DA em um complexo penitenciário localizado na região da Catalunha (Espanha). O consumo médio diário de MTD, alprazolam, efedrina (EPH), maconha e COC foi estimado em 3,9, 0,129, 1,15, 0,99 e 0,3 g dia⁻¹ 1000 presidiário⁻¹, respectivamente. Também foi constatado um consumo esporádico de HER, AMP, MAMP e MDMA.

No Brasil, o primeiro trabalho a colocar em prática a epidemiologia do esgoto foi realizado por Maldaner e colaboradores (2012). O consumo de COC foi estimado a partir da determinação de BE em amostras de esgoto bruto provenientes de seis ETE instaladas no Distrito Federal (DF), que atendem juntas cerca de 70% da população daquela região. Os resultados revelaram um consumo estimado de 0,92 g dia⁻¹ 1000 hab⁻¹.

Diante das possibilidades mencionadas, a aplicação dessa abordagem à realidade brasileira apresenta perspectivas que vão além daquelas pensadas sob o ponto de vista dos estudos realizados em outros países. Devido ao grande consumo de COC no Brasil e à localização geográfica do país – vizinho dos maiores produtores de COC do mundo (Bolívia, Peru e Colômbia) – existem rotas importantes de abastecimento interno e dos mercados europeu e norte-americano (UNODC, 2012; Maldaner *et al.*, 2012). Assim, a epidemiologia do esgoto pode ser empregada não só na realização de estimativas de consumo, mas também na identificação de possíveis locais de refino e distribuição de COC no Brasil.

1.4. Objetivos

Com base no apresentado até aqui, o presente trabalho tem como objetivo principal consolidar uma sequência analítica para a determinação de COC e BE em amostras de esgoto bruto como suporte à realização de estimativas do consumo de COC para a população do DF e fornecer, desta maneira, uma rotina analítica passível de ser aplicada em outras regiões do país.

A fim de alcançar o objetivo principal, os seguintes objetivos específicos foram delimitados:

- i. Estabelecer pontos amostrais representativos nas ETE que atendem o DF e planejar uma rotina amostral que contemple variações espaciais e temporais;
- ii. Otimizar métodos de extração e concentração de COC e BE em amostras de esgoto bruto;
- iii. Identificar e quantificar COC e BE em amostras de esgoto bruto por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em triplo quadrupolo, HPLC-MS/MS (QqQ);
- iv. Investigar o comportamento das substâncias de interesse nas amostras de esgoto e estabelecer condições de preservação que possam ser adotadas em situações de envio das amostras pelos correios;
- v. Reduzir o tempo referente ao preparo da amostra e, conseqüentemente, o tempo de análise a fim de tornar a aplicação dessa nova abordagem viável.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Locais de amostragem

A representatividade das estimativas realizadas por epidemiologia do esgoto depende, em parte, da abrangência e do tipo de sistema de esgotamento sanitário que atende a população investigada. No caso do DF, a maior parte da população urbana (88,9 %) tem seu esgoto canalizado para uma das 16 ETE que compõem o sistema de esgotamento dessa região (CAESB, 2012).

Para este trabalho, amostras de afluente de esgoto foram coletadas de oito ETE instaladas no DF em uma única campanha amostral realizada no dia 19 de abril de 2012. Para a ETE Brasília Norte foram realizadas, ainda, mais seis amostragens de esgoto bruto entre os dias 20 e 25 de abril desse mesmo ano o que permitiu o estabelecimento do perfil semanal de consumo para essa região. A população atendida pelas oito ETE investigadas corresponde a aproximadamente 73% da população total do DF (IBGE, 2010). Para a realização dos testes de recuperação e preservação das substâncias de interesse em esgoto bruto, amostras de esgoto foram coletadas na ETE Brasília Norte nos meses de maio e novembro de 2011. A Figura 7 mostra as regiões atendidas pelas oito ETE investigadas neste trabalho.

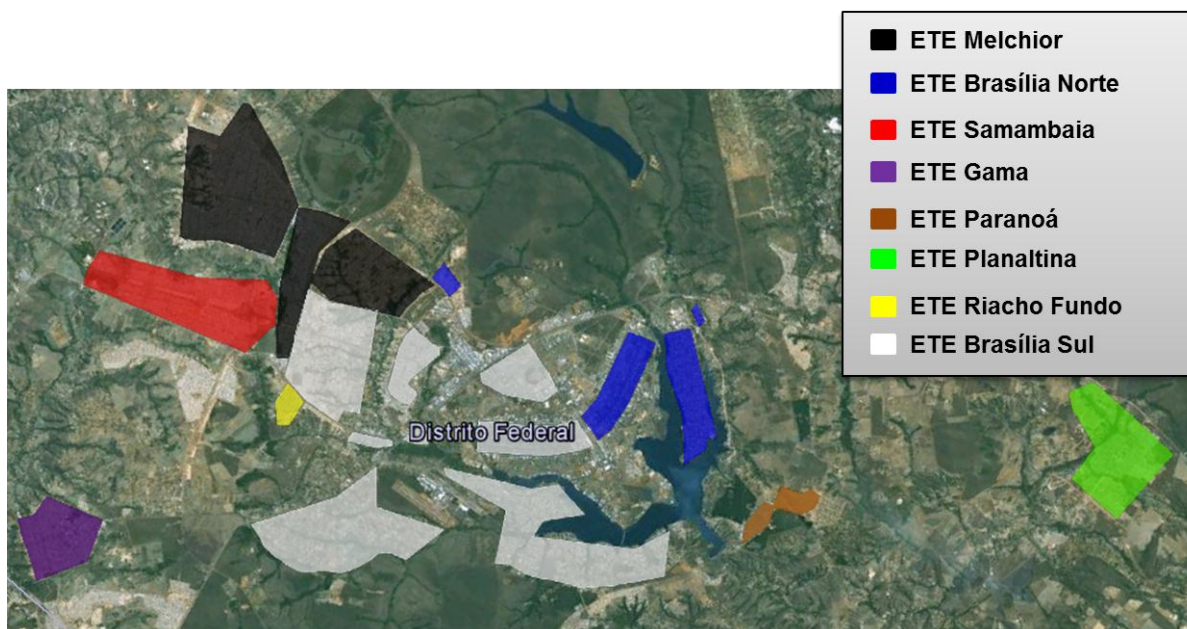


Figura 7. Regiões atendidas pelas oito ETE investigadas. Fonte: Google Earth.

Na Tabela 2 são apresentadas as regiões atendidas por cada ETE, o número total de habitantes atendidos e a vazão média de entrada do esgoto no dia 19 de abril de 2012.

Tabela 2. Características das oito ETE investigadas no presente estudo.

ETE	Regiões atendidas	nº total de habitantes ^a	Vazão média (m ³ dia ⁻¹)
Melchior	Taguatinga Samambaia Ceilândia Vicente Pires Águas Claras	575.092	72.184
Brasília Sul	Asa Sul Guará Núcleo Bandeirante Candagolândia Lago Sul Águas Claras Cruzeiro Sudoeste/Octogonal S.I.A. Park Way	500.836	104.447
Samambaia	Samambaia Taguatinga	203.808	28.530
Planaltina	Planaltina	162.480	8.098
Brasília Norte	Asa Norte Lago Norte Varjão S.C.I.A (Estrutural)	139.640	51.291
Gama	Gama	136.447	17.335
Paranoá	Paranoá Itapoã	110.980	6.704
Riacho Fundo	Riacho Fundo	37.445	4.072

^a Número estimado a partir de dados do censo 2010 (IBGE).

2.2. Procedimento de coleta e preservação das amostras

A amostragem feita no dia 19 de abril de 2012 foi realizada de maneira composta durante o período de 24 h, com início às 00h00min do dia 19 e término às 00h00min do dia 20 de abril. O mesmo procedimento foi adotado para as amostras coletadas do dia 20 ao dia 25 de abril de 2012 na ETE Brasília Norte. Para compor as amostras foram coletadas alíquotas de esgoto bruto em intervalos de 1 h. Os volumes das alíquotas foram definidos através da variação da vazão média de esgoto que afluía na ETE no momento da coleta, ou seja, quanto maior a vazão de esgoto bruto na ETE maior o volume da alíquota coletada para compor a amostra. Amostradores automáticos refrigerados modelo SD900AWR HACH-115 (Hach, Estados Unidos) foram utilizados na coleta de todas as amostras compostas.

Já a amostragem do esgoto bruto destinado aos testes de recuperação e preservação das substâncias de interesse foi realizada de maneira simples com o auxílio de frascos de cloreto de polivinil (PVC). Todos o procedimento de coleta das amostras foram realizados por funcionários da Companhia de Saneamento Ambiental do Distrito Federal (Caesb).

O volume final de todas as amostras foi de 1 L. Os frascos de vidro âmbar utilizados para armazenar as amostras foram previamente lavados com água corrente, detergente comercial e escova. Em seguida, foram enxaguados com água destilada, água ultrapura (Quartex ou osmose reversa), álcool e acetona. Por fim, os frascos foram colocados para secar na estufa sob temperatura de 100°C. Depois de armazenadas, as amostras de esgoto foram transportadas para o laboratório em caixas de isopor e preservadas em refrigerador a 4°C por no máximo 24 h até a extração.

2.2.1. Testes de preservação das amostras

Para que as estimativas de consumo obtidas por epidemiologia do esgoto sejam fidedignas e representativas é necessário que as amostras de esgoto bruto sejam processadas e analisadas pouco tempo após a coleta devido, principalmente, a rápida variação nas concentrações das substâncias de interesse presentes no esgoto (Castiglioni *et al.*, 2006). Para tanto, se faz necessário não só a disponibilidade de equipamentos, mas também de recursos humanos qualificados

próximos aos locais de amostragem e/ou condições de preservação que garantam a estabilidade das substâncias de interesse durante o transporte até o local de análise.

Nesse contexto, um dos desafios a ser considerado na aplicação da epidemiologia do esgoto à realidade brasileira relaciona-se às dimensões continentais do Brasil, isto é, como garantir estimativas fidedignas e representativas a partir de amostras de esgoto coletadas em regiões distantes dos locais de análise?

Uma possibilidade seria equipar laboratórios próximos a esses locais. Mas tal alternativa é bastante onerosa. Outra possível solução, mais factível, seria centralizar as análises em um determinado local, tratar as amostras de forma a garantir a estabilidade dos analitos e enviá-las pelos correios para esse local onde seriam realizadas as análises.

Visando consolidar a segunda alternativa, buscou-se investigar a variação na concentração das substâncias de interesse em alíquotas de uma mesma amostra de esgoto bruto tratadas de oito maneiras diferentes após enviá-las pelos correios. Na Tabela 3 são apresentadas as oito condições de preservação empregadas no tratamento das alíquotas de esgoto.

Tabela 3. Condições de preservação e os respectivos tratamentos dados às alíquotas de esgoto bruto.

Condição de Preservação	Tipo de tratamento
1	Sem tratamento.
2	Filtração com membrana com 0,45 µm de poro.
3	Filtração com membrana de polietersulfona (PES) com 0,22 µm de poro.
4	Acidificação a pH 2 com ácido clorídrico 50%.
5	Filtração com membrana de acetato de celulose com 0,45 µm de poro seguida de acidificação a pH 2.
6	Adição de azida de sódio, NaN_3 (0,2 % m/v).
7	Adição de formaldeído (5 % v/v).
8	Extração em fase sólida e armazenamento do cartucho de extração antes da eluição das substâncias de interesse.

Depois de tratadas as alíquotas foram armazenadas em frascos de vidro âmbar de 50 mL de maneira a preencher todo o recipiente, ou seja, de forma a eliminar todo o ar dentro do frasco. Em seguida, foram colocadas, juntamente com o cartucho de extração utilizado na condição de preservação (8) (Tabela 3), em uma caixa de isopor com gelo e foram enviadas pelos correios. O período entre o envio

da caixa de isopor e o seu retorno ao laboratório para a análise foi de três dias. No laboratório, as sete alíquotas armazenadas nos frascos de vidro âmbar foram submetidas ao método SPE utilizando o sistema de extração II descrito na seção 2.3 deste trabalho. O cartucho de extração utilizado no tratamento (8) teve a etapa de eluição das substâncias de interesse realizada. Os resultados obtidos depois do envio pelos correios foram comparados ao resultado obtido para uma alíquota analisada no mesmo dia da coleta e que foi denominada amostra-controle. Todos os ensaios experimentais descritos nesta seção foram realizados em triplicata.

2.3. Preparo de amostra

Neste trabalho a primeira etapa de preparo de amostras era inicialmente feita por meio da filtração do esgoto bruto em papel de filtro a fim de retirar o material particulado mais grosseiro. Em seguida, as amostras eram filtradas em membranas de fibra de vidro de 1,2 µm de poro (Schleicher & Schuell) e, finalmente, passadas por membranas de acetato de celulose de 0,45 µm de poro (Sartorius). Depois de filtradas as amostras eram submetidas à extração em fase sólida. Todavia, o tempo gasto nesse procedimento era bastante elevado – cerca de uma hora para cada 200 mL de amostra. Nesse contexto, foi proposto um novo sistema de extração em que apenas um chumaço de lã de vidro foi utilizado para retirar o material particulado mais grosseiro da amostra.

2.3.1. Sistema de extração

No presente trabalho, a extração foi realizada inicialmente empregando-se um sistema limpo em linha adaptado de Sodr e e colaboradores (2010) em que uma bomba peristáltica (Minipuls Evolution, Gilson[®]) era empregada para forçar a passagem da amostra pelo cartucho a uma vazão de aproximadamente 3 mL min⁻¹. A partir desse momento esse sistema será denominado como sistema de extração I.

Apesar do sistema de extração I apresentar vantagens em relação aos sistemas convencionais empregados nesse tipo de procedimento (Sodr e *et al.*, 2010), algumas limitações operacionais motivaram o desenvolvimento de um novo sistema de extração para o processamento das amostras de esgoto bruto. Na Figura 8 são apresentadas fotos do sistema de extração I.

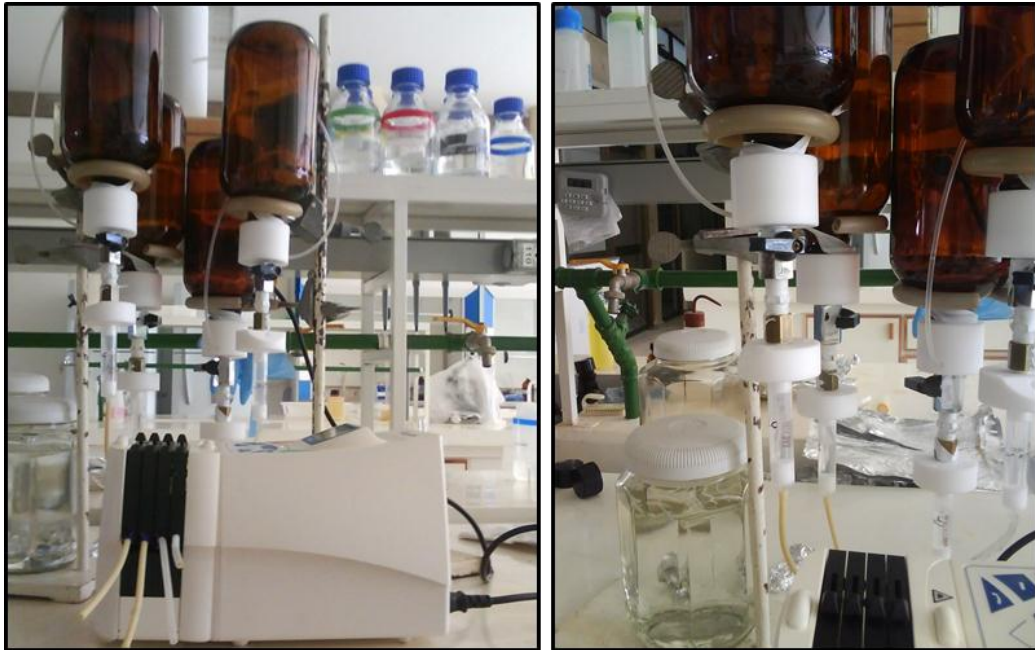


Figura 8. Sistema adaptado de Sodré e colaboradores (2010) empregado na extração em fase sólida de COC e BE em amostras de esgoto bruto.

Uma das limitações estava relacionada à escala desse sistema. No presente estudo foram utilizadas alíquotas de 50 mL de esgoto em todas as etapas do trabalho. No entanto, o sistema adaptado de Sodré e colaboradores (2010) permitia o processamento de até 1 L de amostra. Devido a essa característica, frascos de 1 L eram utilizados para armazenar as amostras durante a extração e, portanto, existia a necessidade de limpá-los e descontaminá-los o que demandava bastante tempo e esforço. Além disso, a etapa de filtração da amostra era indispensável e o número de extrações simultâneas ficava limitado à quantidade de canais da bomba peristáltica e a viabilidade de dispor cada conjunto de extração ao redor da mesma, permitindo apenas quatro extrações simultâneas.

Sendo assim, um sistema de extração próprio foi desenvolvido com os seguintes objetivos: (1) equiparar a escala do sistema à escala das amostras, (2) reduzir o número de etapas de pré-tratamento da amostra e (3) aumentar o número de extrações realizadas ao mesmo tempo sem alterar os parâmetros de mérito inerentes ao método analítico e sem aumentar o custo do processo. A partir desse momento esse novo sistema será denominado como sistema de extração II.

A fim de evitar a contaminação das amostras os materiais utilizados na confecção do novo sistema de extração incluíram peças em PTFE (sigla para o termo em inglês, *polytetrafluoroethylene*), conexões de latão e aço em inox. A

Tabela 4 traz a descrição detalhada de cada um dos materiais utilizados, a quantidade e o custo.

Tabela 4. Materiais utilizados para a confecção do sistema de extração.

Item	Descrição	Quantidade	Preço (R\$)
1	Peças em PTFE	28 um	315,00
2	Válvula esfera mini M/F ¼ BSP	14 um	147,98
3	Espigão	1 um	5,90
4	Mangueira de silicone	30 cm	8,67
5	Conector (<i>niple</i>) reto M/M ¼ NPT	14 un	49,00
6	Seringas descartáveis de 60 mL	14 un	49,00
7	Recipiente de vidro com 25 cm de diâmetro e capacidade de 2 L.	1 un	20,00
8	Tábua de polietileno 30x40x1,5 cm	1 un	50,00
9	Bomba à vácuo Primatec 121	1 un	1.132,00
10	Fita de PTFE 50 m	1 un	1,99
11	Fita adesiva dupla face de silicone 24 mmx1,5 m	1 un	13,10
12	Lã de vidro	100 g	24,90
		TOTAL	1817,54

As peças confeccionadas em PTFE foram empregadas para afixar a extremidade inferior dos cartuchos SPE a válvula esfera e a extremidade superior dos mesmos à seringa descartável utilizada para armazenar a amostra durante a extração. Na peça utilizada para afixar a parte superior do cartucho SPE existe um orifício que permite o encaixe da seringa e é especialmente útil, pois viabiliza a adição dos reagentes necessários na ativação da fase sólida dos cartuchos.

Um conector (*niple*) reto de latão foi utilizado para interligar a válvula esfera a tábua de polietileno. Esta, por sua vez, foi colocada como uma tampa no recipiente de vidro e fixada com a fita dupla face. O vácuo necessário para forçar a passagem da amostra através do cartucho SPE foi criado com o auxílio de uma bomba à vácuo conectada a tampa de polietileno por meio de uma mangueira plástica e um espigão de latão.

Diante do baixo volume de amostra empregado nas análises, a etapa de filtração pode ser eliminada empregando-se um pequeno chumaço de lã de vidro à extremidade da seringa de maneira a evitar a passagem do material particulado

mais grosseiro para o interior do cartucho SPE. A Figura 9 mostra um esquema representativo do sistema de extração proposto neste trabalho.

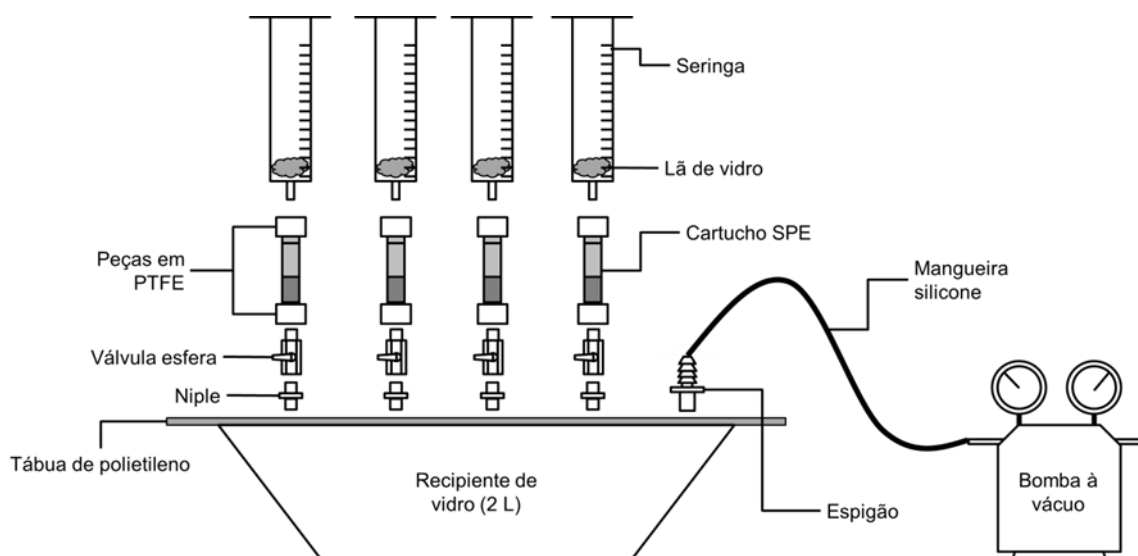


Figura 9. Sistema empregado na extração de COC e BE em amostras de esgoto bruto.

2.3.2. Extração em fase sólida

O método SPE foi escolhido após duas etapas de otimização e empregou cartuchos Strata-X (Phenomex, Estados Unidos) contendo 500 mg de fase sólida e 6 mL de volume interno. O condicionamento da fase sólida foi realizado com 6 mL de uma solução de acetonitrila (ACN)/metanol (MeOH) 60:40 (v/v) e 3 mL de água ultrapura a pH 2. Os cartuchos foram carregados com alíquotas de 50 mL de amostra (previamente filtradas quando o sistema de extração I foi empregado) e ajustadas a pH 2,0 com HCl 50 % (v/v). A eluição das substâncias de interesse também foi feita com 6 mL da solução de ACN/MeOH 60:40 (v/v) e não foi realizada nenhuma lavagem após a extração.

O extrato obtido foi seco sob fluxo de nitrogênio, lacrado e conservado no congelador (-20°C) até a análise cromatográfica. No momento da análise, os extratos secos foram avolumados para 1,0 mL em solução de ácido fórmico 0,1 % em água/MeOH, 90:10 (v/v) e colocados no ultrassom por 3 minutos. Feito isso, todos os extratos foram diluídos na proporção de 1:10 (v/v) em solução de ácido fórmico 0,1 % em água/MeOH, 90:10 (v/v) e, finalmente, alíquotas de 5 µL foram injetadas em um sistema de cromatografia líquida acoplada *in tandem* a espectrometria de massas (HPLC-MS/MS, do termo em inglês *High performance liquid chromatography in tandem with mass spectrometry*).

2.3.3. Otimização do método de extração em fase sólida

No desenvolvimento do método SPE testes de recuperação foram empregados com o intuito de avaliar a eficiência de extração para as substâncias de interesse. Para tanto, depois de filtradas, alíquotas de 50 mL de esgoto bruto foram enriquecidas à concentração de $2 \mu\text{g L}^{-1}$ com padrões de COC (National Measure Institute, Austrália) e BE (Lipomed, Estados Unidos) de pureza superior a 98 %. Após a extração, as substâncias de interesse foram eluídas e os extratos obtidos foram secos sob fluxo de nitrogênio, lacrados e conservados no congelador (-20°C) até a análise cromatográfica.

Na primeira etapa de otimização as alíquotas de esgoto foram empregadas sem ajuste de pH. Os cartuchos SPE empregados foram o Oasis HLB (500 mg, 6 mL) da fabricante Waters (Estados Unidos), SPE-ed C18/22 % (500 mg, 6 mL) da Applied Separations (Estados Unidos) e AccuBond II C8 (1000 mg, 6 mL) da Agilent Technologies (Estados Unidos). Nessa etapa, a otimização do método SPE foi realizada por meio de um planejamento fatorial 2^3 .

Os fatores adotados para o planejamento fatorial, bem como seus respectivos níveis são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Fatores adotados para o planejamento fatorial 2^3 e seus respectivos níveis.

Níveis/Fatores	1 – Solvente	2 – Lavagem	3 – Fator de concentração
Nível alto (+)	MeOH	Lavagem com MeOH 5 % em água	5x
Nível Baixo (-)	MeOH/ACN (40:60)	Sem	50x

O fator 1 refere-se ao tipo de solvente empregado no condicionamento da fase sólida e eluição das substâncias de interesse. O fator 2 está relacionado a realização de uma etapa de lavagem da fase sólida com 6 mL MeOH 5 % em água ultrapura após o carregamento da amostra. Por fim, o fator 3 refere-se a concentração do extrato injetado no cromatógrafo que, apesar de não ter relação direta com a eficiência da extração, tem influência na determinação por HPLC-MS/MS (QqQ) – o qual é detalhado na seção 2.4 (página 23) –, pois quanto mais concentrado o extrato maiores são as chances de ocorrer supressão do sinal analítico devido ao efeito de matriz.

Ao todo foram realizados 24 ensaios em duplicata. A Tabela 6 apresenta os oito ensaios experimentais realizados com os três cartuchos SPE mencionados acima. Os ensaios experimentais foram realizados de forma aleatória e durante uma semana.

Tabela 6. Fatores adotados para o planejamento fatorial 2^3 e seus respectivos níveis.

Ensaio	1 – Solvente	2 – Lavagem	3 – Fator de concentração
1	ACN/MeOH (60:40)	Sem	50x
2	MeOH	Sem	50x
3	ACN/MeOH (60:40)	Com	50x
4	MeOH	Com	50x
5	ACN/MeOH (60:40)	Sem	5x
6	MeOH	Sem	5x
7	ACN/MeOH (60:40)	Com	5x
8	MeOH	Com	5x

O condicionamento da fase sólida foi realizado com 6 mL do solvente indicado na Tabela 6 e 3 mL de água ultrapura. A lavagem após a extração, quando realizada, empregou 3 mL MeOH a 5 % em água ultrapura e a eluição das substâncias de interesse foi feita com 6 mL do mesmo solvente utilizado no condicionamento.

Na segunda etapa de otimização do método *SPE*, além dos cartuchos C8 e Oasis HLB, empregados na primeira etapa de testes, foram utilizados mais três tipos de cartuchos SPE, a saber, Strata-X (500 mg, 6 mL) e Strata-SAX (500 mg, 6mL) ambos da fabricante Phenomenex e CHROMABOND Drug (200 mg, 3 mL) da fabricante Macherey-Nagel (Alemanha). O cartucho Strata-X foi escolhido pelo fato de empregar uma fase sólida semelhante àquela dos cartuchos Oasis HLB, com a vantagem de possuir um custo menor quando comparado aos primeiros. O cartucho CHROMABOND Drug foi incluído nos testes devido ao fato de ser bastante utilizado na extração e concentração de COC e BE em amostras biológicas (Weinmann *et al.*, 2000) e o Strata-SAX devido à possibilidade de ser utilizado em uma etapa de *clean-up* da amostra em que as substâncias de interesse passam pelo cartucho e os interferentes ficam retidos.

Nesta etapa, buscou-se inicialmente realizar um planejamento fatorial 2^2 para avaliar, além da eficiência dos cartuchos incluídos nos testes, a influência do pH e da matéria orgânica na recuperação das substâncias de interesse. Nesse sentido, para simular a presença de matéria orgânica nas amostras foram adicionadas quantidades conhecidas de ácido húmico comercial (Aldrich - 35% de C) a alíquotas de esgoto. Porém, nos ensaios experimentais em que o esgoto bruto contendo ácido húmico comercial foi acidificado a pH 2 observou-se a precipitação deste, o que comprometeu a realização do planejamento fatorial proposto. Diante do observado, apenas a influência do pH da amostra na recuperação das substâncias de interesse foi avaliada nesta etapa de otimização. Para tanto, depois de filtrar o esgoto bruto, algumas alíquotas de 50 mL de esgoto bruto tiveram o pH ajustado para 2,0 e outras para 6,0.

O condicionamento da fase sólida foi realizado com 6 mL de ACN/MeOH 60:40 (v/v) e 3 mL de água ultrapura. Os cartuchos foram carregados com 50 mL das alíquotas preparadas de acordo com o descrito no parágrafo anterior. A eluição das substâncias de interesse também foi feita com 6 mL de ACN/MeOH 60:40 (v/v) e não foi realizada nenhuma lavagem após a extração.

2.4. Determinação analítica

A análise dos extratos foi realizada em um cromatógrafo líquido modelo Agilent 1200 acoplado a um espectrômetro de massas modelo Agilent 6410 equipado com analisador de massas do tipo triploquadrupolo e ionização por *eletrospray* (ESI). A separação cromatográfica foi feita utilizando uma coluna Zorbax SB-C18 com 30 mm de comprimento por 2,1 mm de diâmetro interno e tamanho de partícula de 3,5 μm (Agilent Technologies).

A fase móvel (FM) utilizada na eluição das substâncias de interesse empregou soluções de ácido fórmico 0,1 % (v/v) preparadas em água ultrapura e MeOH a uma vazão de 0,3 mL min^{-1} . Inicialmente, a concentração relativa de MeOH em água foi mantida em 10 % por 4 minutos. Em seguida, essa proporção aumentou para 100 % de MeOH em 6 minutos e foi mantida durante 1 minuto até o final da análise, totalizando 11 minutos de corrida cromatográfica. Encerrada a corrida o sistema foi reequilibrado por 7 minutos nas condições iniciais do gradiente, isto é, água/MeOH 90:10 (v/v). O gradiente de eluição utilizado, bem como as

características da corrida cromatográfica foram adaptadas de Locatelli (2011) e Maldaner e colaboradores (2012).

Depois da separação cromatográfica, a COC e a BE foram ionizadas na fonte ESI operando no modo positivo. A determinação das substâncias de interesse foi realizada no modo MRM (sigla para o termo em inglês, *multiple reaction monitoring*) que permite o monitoramento dos produtos de fragmentação gerados a partir dos íons moleculares de cada substância. A identificação e quantificação da COC e da BE foram realizadas utilizando as três transições íon precursor → íon produto de maior abundância. Na Tabela 7 são apresentadas as condições utilizadas na determinação de COC e de BE no modo MRM.

A quantificação da COC e da BE nas amostras de esgoto bruto foi realizada por meio de calibração externa conforme método desenvolvido por Locatelli (2011). As soluções padrão foram preparada a partir de uma solução estoque de 20 mg L⁻¹ obtida pela pesagem dos padrões sólidos.

Tabela 7. Tempos de retenção e transições íon precursor→íon produto selecionadas para a determinação de COC e BE em esgoto bruto.

Substância	Tempo de retenção (min)	Fragmentador (V)	Transições (m/z)	Energia de colisão (V)
COC	8,8	120	304,2→182,2	15
			304,2→105,1	30
			304,2→82,2	30
BE	7,7	110	290,2→168,2	15
			290,2→105,1	30
			290,2→77,2	35

2.4.1. Análises exploratórias

Visando estudos posteriores, buscou-se investigar a presença de outras 16 substâncias nas amostras de esgoto bruto com o intuito de se obter informações preliminares sobre a possível ocorrência de tais substâncias nesse tipo de matriz. A Tabela 8 apresenta informações sobre os padrões analíticos utilizados nessa análise.

As substâncias apresentadas na Tabela 8 e classificadas como cocaínicos referem-se a metabólitos urinários da COC. A AMP e a MAMP representam os estimulantes anfetamínicos enquanto o MDMA e seus análogos –

metilbenzodioxolilbutanamina (MBDB), o 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA), o 3,4-metilenodioxietilamfetamina (MDEA) – são substâncias utilizadas como princípio ativo do *ecstasy* (UNODC, 2012). O canabinol (CBN) é uma substância encontrada na planta de maconha (*Cannabis sativa*) e exibe atividade biológica. Já o THC-COOH é o principal metabólito excretado pela urina de pessoas que fazem uso de preparados a base de maconha. Por fim, o levamisol (fármaco empregado como anti-helmíntico²) e a fenacetina (analgésico de uso e comercialização controlados no Brasil) também foram investigadas por serem bastante empregados como adulterantes do cloridrato de cocaína (Botelho, 2011).

Tabela 8. Nome, abreviatura e marca dos padrões das substâncias investigadas.

Nome	Abreviatura	Marca
<i>Cocáinicos</i>		
Anidroecgonina metil-éster	AEME	Cerilliant (Estados Unidos)
Ecgonina	ECG	NMI ^a
Ecgonina metil-éster	EME	Lipomed
Nor-benzoilecgonina	nor-BE	Cerilliant
Nor-cocaína	nor-COC	NMI
<i>Anfetamínicos e outros alucinógenos</i>		
Anfetamina	AMP	Lipomed
Metanfetamina	MAMP	Lipomed
Metilbenzodioxolilbutanamina	MBDB	Lipomed
3,4-metilenodioxianfetamina	MDA	Lipomed
3,4-metilenodioxietilamfetamina	MDEA	Lipomed
3,4-metilenodioximetanfetamina	MDMA	Lipomed
<i>Canabinoides</i>		
Canabinol	CBN	Lipomed
11-nor-9-carboxi-delta-9-tetrahydrocannabinol	THC-COOH	Cerilliant
<i>Adulterantes</i>		
Levamisol	-	-
Fenacetina	-	-

^aNational Measurement Institute, Austrália.

Esta etapa do trabalho não envolveu a otimização de parâmetros instrumentais, etapa esta essencial ao desenvolvimento de métodos analíticos, mas

² Anti-helmínticos são fármacos (naturais ou sintéticos) que agem localmente para expelir os vermes do trato gastrointestinal.

sim procurou prover condições para que uma análise exploratória sobre a presença de possível analitos de interesse fosse realizada. As condições cromatográficas utilizadas foram as mesmas empregadas por Locatelli (2011) e Maldaner e colaboradores (2012). Já os parâmetros adotados para a determinação no modo MRM foram adaptados de trabalhos disponíveis na literatura (Locatelli, 2011; Castiglioni *et al.*, 2008; Castiglioni *et al.*, 2006; González-Mariño *et al.*, 2010; Vazquez-Roig *et al.*, 2010). Procurou-se investigar a presença das 16 substâncias por meio da construção de curvas analíticas de oito pontos com concentração inicial de 5 µg L⁻¹ e final de 80 µg L⁻¹. As soluções padrão foram preparadas a partir de uma solução estoque de 20 mg L⁻¹. A Tabela 9 traz as condições empregadas na determinação por HPLC-MS/MS (QqQ) no modo MRM.

Tabela 9. Transições íon precursor→íon produto selecionadas para a determinação de dezesseis substâncias simultaneamente.

Substância	Modo de ionização no ESI	Fragmentador (V)	Transições (<i>m/z</i>)	Energia de colisão (V)
<i>Cocaínicos</i>				
AEME	positivo	120	182,0→118,0	20
			182,0→122,0	20
			182,0→105,1	15
ECG	Positivo	120	186,0→168,1	15
			186,0→81,9	30
EME	Positivo	120	200,0→182,0	15
			200,0→82,1	20
nor-BE	Positivo	150	276,6→136,0	10
			276,6→153,8	15
nor-COC	Positivo	120	289,9→168,0	10
			289,9→136,0	15
<i>Anfetamínicos</i>				
AMP	Positivo	70	136,1→91,1	10
			136,1→119,1	5
			136,1→65,1	40
MAMP	Positivo	80	150,1→91,2	20
			150,1→119,2	5
			150,1→65,2	35

MBDB	Positivo	80	208,0→134,9	15
			208,0→162,9	5
			208,0→104,9	20
MDA	Positivo	70	180,1→163,1	5
			180,1→105,1	20
			180,1→77,1	40
MDEA	Positivo	90	208,1→163,1	5
			208,1→105,1	20
			208,1→77,2	50
MDMA	Positivo	80	194,1→163,1	5
			194,1→135,1	20
			194,1→105,1	20
<i>Canabinoides</i>				
CBD	Positivo	60	312,9→245,1	28
CBN	Negativo	61	311,2→223,1	81
			343,2→299,2	18
			343,2→245,1	30
THC-COOH	Positivo	135	343,2→191,1	33
<i>Adulterantes</i>				
Levamisol	Positivo	116	205,1→177,9	21
			205,1→90,9	45
Fenacetina	Positivo	96	180,1→109,9	21
			180,1→137,9	13

2.5. Análise estatística dos dados

Os testes de Tukey e Dunnett utilizados neste trabalho foram realizados por meio do software livre Action 2.3 (www.portalaction.com.br).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, o método analítico envolveu a extração e a concentração de COC e BE e sua determinação por HPLC-MS/MS (QqQ) em amostras de esgoto bruto. Com base nos resultados obtidos, o consumo de COC em diferentes regiões do Distrito Federal (DF) foi estimado. Dessa maneira, primeiramente serão discutidos os resultados dos testes e das adaptações realizadas na definição do método analítico para, em seguida, serem apresentadas as concentrações de COC e BE determinadas nas amostras e os perfis de consumo da população atendida pelas oito ETE investigadas.

3.1. Avaliação do novo sistema de extração

O sistema de extração II desenvolvido neste trabalho apresentou os mesmos resultados do sistema de extração I utilizado inicialmente e atendeu todos os objetivos propostos. Com o novo sistema foi possível realizar a extração de 14 amostras simultaneamente e a etapa de filtração foi eliminada, o que reduziu o tempo de preparo das amostras de uma hora e meia para apenas 20 min para cada 200 mL de esgoto bruto.

A utilização das válvulas esfera para cada conjunto de extração possibilitou o controle individual da passagem da amostra e da vazão. Além disso, a vazão do sistema pode ser mantida constante numa faixa de vazão de 3,0 a 23 mL min⁻¹ e não foram observados vazamentos. Dessa maneira, o nível hidrostático da amostra no cartucho permaneceu constante durante todo o procedimento de extração, permitindo, assim, uma extração ininterrupta e sem a intervenção do analista. A Figura 10 mostra fotos do sistema de extração proposto.



Figura 10. Sistema empregado para extração em fase sólida de COC e BE em amostras de esgoto bruto.

Um sistema convencional de extração em fase sólida costuma empregar três equipamentos principais: uma bomba de vácuo (que estabelece o vácuo no interior do *manifold*), uma bomba peristáltica (que promove o gotejamento contínuo da amostra no cartucho SPE) e um *manifold* à vácuo de 12 portas (onde o cartucho SPE é afixado e a amostra é recolhida em recipientes acondicionados em seu interior após serem processadas). O custo estimado para esse conjunto é de aproximadamente R\$ 15.000,00. O sistema de extração descrito é detalhado no esquema mostrado na Figura 11.

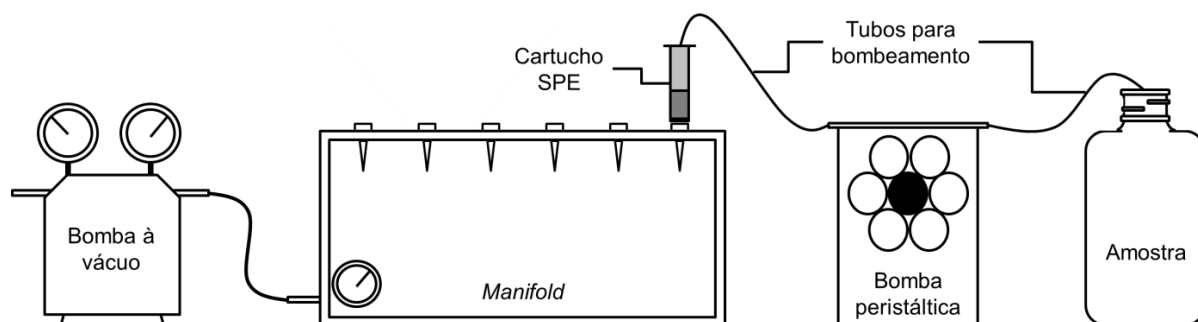


Figura 11. Sistema de extração convencional empregado para a extração em fase sólida de compostos orgânicos em matrizes aquáticas. Adaptado de Sodré *et al.*, 2010.

O custo total do sistema de extração desenvolvido neste trabalho foi de aproximadamente R\$ 1.817,54, valor próximo ao do sistema de extração I (R\$ 1775,40) adaptado de Sodré e colaboradores (2010). Comparado ao sistema apresentado na Figura 11, o sistema proposto teve um custo 8 vezes menor.

3.2. Otimização do método SPE

O estabelecimento de um método de preparo de amostras é crucial na determinação de DA e de seus metabólitos em esgoto bruto devido, principalmente, aos baixos níveis de concentração e a complexidade da matriz. Logo, para este trabalho optou-se por utilizar um método de extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*) na preparação das amostras, já que este tem sido empregado com sucesso na extração e concentração de DA e de seus metabólitos em diversos estudos desse tipo (González-Mariño *et al.*, 2010; Postigo *et al.*, 2008; Huerta-Fontela, *et al.*, 2008a).

A eficiência do método de SPE foi avaliada com base nas porcentagens de recuperação de BE e COC a partir da análise, por HPLC-MS/MS (QqQ), de alíquotas de 50 mL de esgoto bruto enriquecidas com concentrações conhecidas dessas substâncias ($2 \mu\text{g L}^{-1}$). Para obter o método mais eficiente diversos testes de recuperação foram realizados. A primeira etapa de otimização foi realizada por meio de um planejamento fatorial 2^3 e a segunda através da análise univariada da influência do pH da amostra na recuperação das substâncias de interesse.

3.2.1. Planejamento fatorial

Na Figura 12 é apresentado um gráfico com as porcentagens médias de recuperação para todos os ensaios experimentais realizados de acordo com o planejamento fatorial 2^3 . O gráfico foi dividido em três grupos (C8, C18 e HLB) e colocado em ordem crescente das porcentagens de recuperação para melhor visualização dos resultados. Nesta etapa de otimização do método SPE foi empregado o sistema de extração I (Seção 2.3.1).

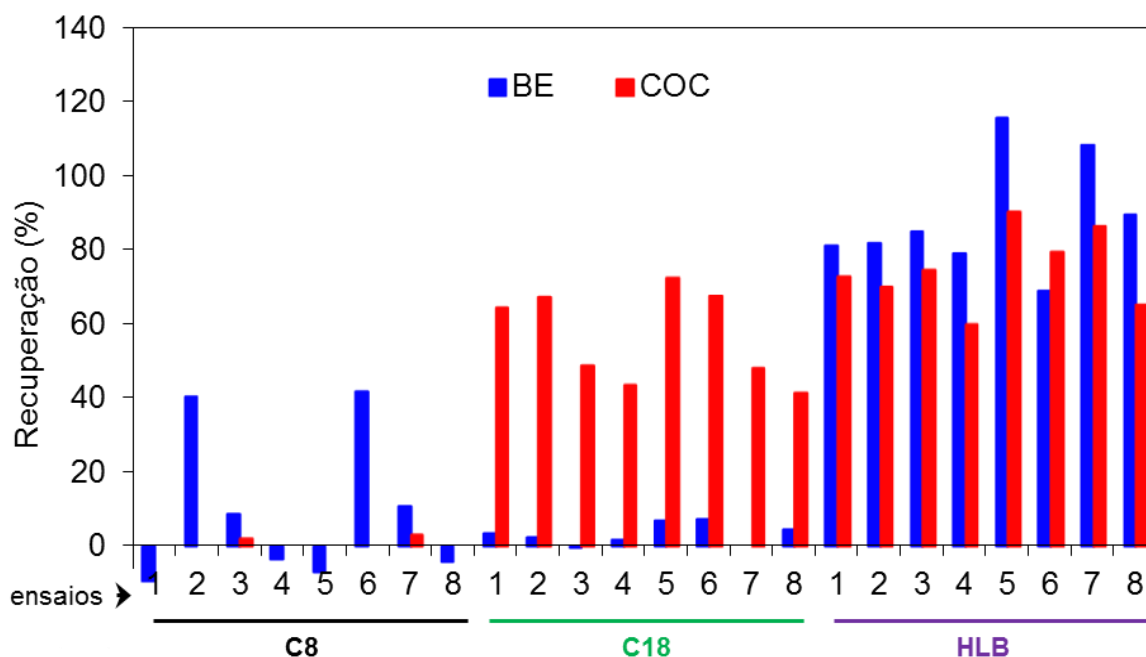


Figura 12. Porcentagens médias de recuperação de COC e BE obtidas com cartuchos C8, C18 e Oasis HLB em oito condições de extração diferentes (n = 2).

O primeiro grupo (C8) corresponde aos ensaios realizados com cartuchos do tipo C8. Pela Figura 12 observa-se que as recuperações obtidas foram inferiores a 43 % e 4 % para BE e COC, respectivamente. Para os ensaios realizados com cartuchos do tipo C18 – segundo grupo (C18) mostrado na Figura 12 – as porcentagens de recuperação para COC ficaram entre 41 % e 67 % e não passaram de 8 % para BE. Com base nesses resultados, pode-se afirmar que tais cartuchos são pouco eficientes na extração e concentração das substâncias de interesse. Todavia, diante da baixa eficiência do cartucho C8 é possível que este, em condições específicas de extração, possa ser empregado em uma etapa de *clean up* que anteceda a passagem da amostra por um cartucho de maior eficiência visando eliminar interferentes da matriz e assim melhorar as recuperações com o segundo cartucho.

Já nos ensaios em que foram empregados cartuchos Oasis HLB, as recuperações encontradas foram satisfatórias para ambas as substâncias de interesse. Com porcentagens de recuperação que variaram entre 69 % a 116 % para BE e de 79 % a 90 % para COC, o cartucho em questão mostrou-se o mais indicado para a extração de tais substâncias. Esse perfil de recuperação está relacionado, sobretudo, com as propriedades químicas do material utilizado como fase sólida em cada um dos cartuchos e, conseqüentemente, com o tipo de interação química

(van der Waals, ligação de hidrogênio, forças eletrostáticas) existente entre a superfície da fase sólida e as substâncias de interesse (Bäuerlein *et al.*, 2012).

Conclusões semelhantes às observadas no presente trabalho foram discutidas em estudo realizado por Gheorghe e colaboradores (2008). Neste, a eficiência de extração de sete cartuchos SPE diferentes, entre eles os cartuchos Oasis HLB (500 mg, 6 mL) e Insolute C18 (500 mg, 6 mL) da fabricante Biotage (Suécia), foi avaliada. Para os cartuchos Oasis HLB foram testadas duas condições de extração/eluição. As porcentagens médias de recuperação apresentadas por Gheorghe e colaboradores (2008) para COC e BE foram superiores a 91,8 % nas duas condições de extração/eluição em que foram empregados cartuchos Oasis HLB enquanto que nos ensaios realizados com cartuchos do tipo C18 as porcentagens médias foram de 86,0 % para COC e 80,6 % para BE (Gheorghe *et al.*, 2008). Apesar das recuperações para os cartuchos C18 terem sido melhores do que as obtidas no presente trabalho, os resultados obtidos por Gheorghe e colaboradores (2008) também indicaram o cartucho Oasis HLB como o mais indicado para a extração e concentração de COC e BE presentes em amostras de esgoto.

De acordo com os resultados obtidos a partir do planejamento fatorial realizado no presente estudo também foram observadas diferenças entre as recuperações a depender da condição de extração adotada. Como o cartucho Oasis HLB foi o único a apresentar porcentagens de recuperação satisfatórias, a discussão a respeito das médias de recuperação e da influência dos três fatores avaliados foi restringida aos oito ensaios experimentais realizados com esse cartucho.

Como mostrado na Figura 12, o ensaio 5 com cartucho Oasis HLB apresentou as melhores porcentagens de recuperação para COC (90 %) e BE (116 %). Nesse ensaio, 6 mL de uma solução de ACN/MeOH (60:40) e 3 mL de água ultrapura foram utilizados no condicionamento da fase sólida e eluição das substâncias de interesse, não foi realizada lavagem após a extração e o extrato foi injetado no cromatógrafo com fator de concentração de 5 vezes. O ensaio experimental 7 também apresentou bons resultados. Com recuperações de 108 % e 86 % para BE e COC, respectivamente, as condições de extração utilizadas incluíram o condicionamento e eluição das substâncias de interesse com 6 mL de ACN/MeOH (60:40) e 3 mL de

água ultrapura, lavagem com 6 mL de solução 5% MeOH em água ultrapura e injeção do extrato com fator de concentração de 5 vezes.

Para avaliar quais fatores e quais interações entre eles exibiram influência estatisticamente significativa nas porcentagens de recuperação, seus efeitos – a variação causada na resposta devido a um fator ou interação entre eles – foram calculados. A Tabela 10 apresenta os efeitos calculados para o planejamento fatorial 2^3 e seus respectivos erros-padrão (s_{efeito}).

Os efeitos considerados estatisticamente significativos, com 95% de confiança, são aqueles cujos valores absolutos diferem do produto entre o erro-padrão de um efeito (s_{efeito}) e o valor do t de *Student* para 95% de confiança e oito graus de liberdade. Assim, entre os efeitos principais foram considerados significativos o efeito do solvente e do fator de concentração para ambas as substâncias de interesse e o efeito da lavagem para a COC. Já para as interações foram considerados significativos o efeito da interação solvente/fator de concentração para ambas as substâncias de interesse, o efeito da interação solvente/lavagem/fator de concentração para a BE e o efeito da interação solvente/lavagem para a COC.

Tabela 10. Efeitos calculados para o planejamento fatorial e seus erros-padrão (%).

Efeitos	BE	COC
<i>Principais</i>		
1 (Solvente)	-17,7 ± 2,8	-12,4 ± 1,5
2 (Lavagem)	3,5 ± 2,8	-6,5 ± 1,5
3 (Fator de conc.)	14,0 ± 2,8	10,9 ± 1,5
<i>De interação</i>		
12	5,2 ± 2,8	-5,5 ± 1,5
13	-15,1 ± 2,8	-3,7 ± 1,5
23	3,0 ± 2,8	-2,6 ± 1,5
123	8,5 ± 2,8	0,4 ± 1,5
$t_{8 \times S_{efeito}}$	6,4	3,6

Com base nos resultados obtidos e nos efeitos calculados observou-se que:

1. A utilização de ACN/MeOH (60:40) como solvente promove um aumento de $17,7 \pm 2,8 \%$ e $12,4 \pm 1,5 \%$ na recuperação de BE e COC, respectivamente.
2. Com exceção do ensaio 6 para BE, ao injetar o extrato menos concentrado, ou seja, com fator de concentração de 5 vezes as porcentagens de recuperação para BE aumentam $14,0 \pm 2,8 \%$ e as de COC $10,9 \pm 1,5 \%$ devido, possivelmente, a uma diminuição do efeito de matriz durante a análise cromatográfica.
3. Realizar uma etapa de lavagem com 5% de MeOH em água ultrapura leva a perdas de $6,5 \pm 1,5 \%$ na recuperação de COC.

Assim, dos testes de recuperação realizados, o correspondente ao ensaio experimental 5 (ACN/MeOH, sem lavagem e fator de concentração de 5 vezes) foi o que se mostrou mais indicado para ser utilizado na extração de COC e BE devido as elevadas porcentagens de recuperação, ao menor número de etapas envolvidas na extração e por apresentar recuperações dentro dos intervalos aceitáveis (70% a 130%) para substâncias em concentração-traço (U.S.EPA, 2010).

3.2.2. Influência do pH da amostra

Os testes de recuperação realizados nesta etapa de otimização tiveram por objetivo avaliar a influência do pH das amostras nas porcentagens de recuperação de COC e BE e a eficiência de cartuchos SPE de menor custo quando comparado aos cartuchos Oasis HLB. Logo, partindo do melhor resultado obtido para o planejamento fatorial (ensaio 5 com cartuchos Oasis HLB), dez ensaios experimentais foram realizados em duplicata. Todos os resultados apresentados deste momento em diante foram obtidos empregando-se o sistema de extração II (Seção 2.3.1) na etapa de preparação das amostras. As porcentagens médias de recuperação são mostradas na Figura 13.

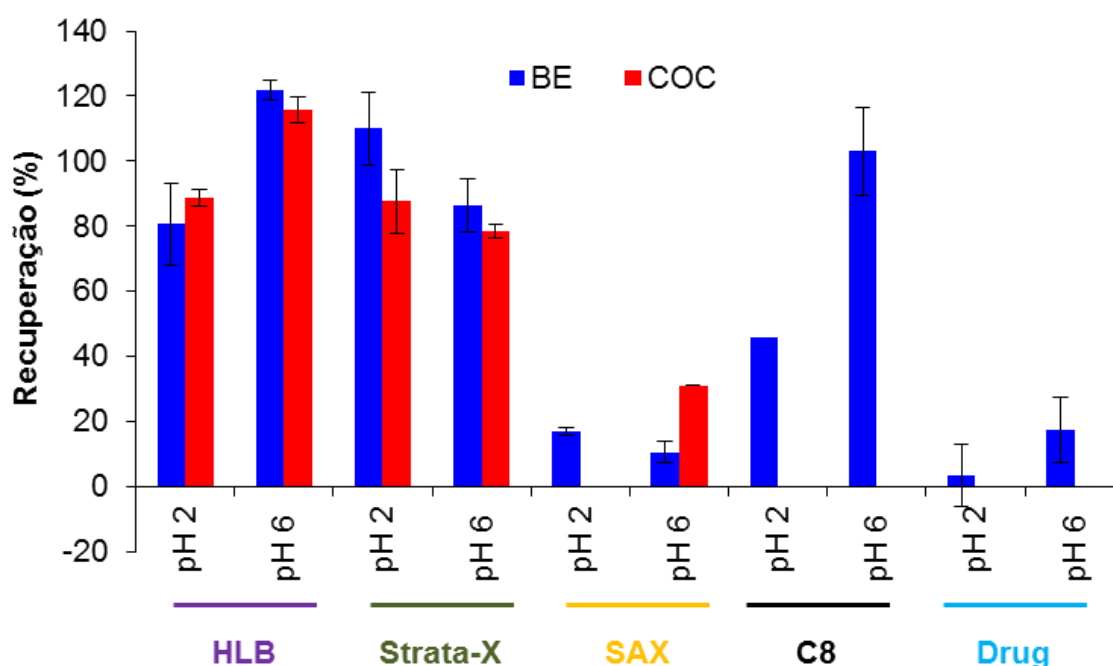


Figura 13. Porcentagens médias de recuperação para COC e BE obtidas com as análises utilizando cartuchos drug, Strata-SAX, C8, Oasis HLB e Strata-X em amostras com pH 2 e pH 6 (n=2).

Pela Figura 13 observa-se que apenas os ensaios realizados com cartuchos Oasis HLB e Strata-X apresentaram recuperações na faixa aceitável de 70 a 130 % para ambas as substâncias de interesse. Para os ensaios realizados com cartuchos Oasis HLB as recuperações foram de 81 e 89 % para BE e COC, respectivamente, quando o pH da amostra foi ajustado 2,0. Já a pH 6 as recuperações foram de 122 % para BE e 116 % para a COC.

Os resultados obtidos com a utilização de cartuchos Strata-X foram comparáveis aos obtidos com cartuchos Oasis. Os melhores resultados foram obtidos a pH 2,0 (110 % para BE e 88 % para COC). As recuperações obtidas com os cartuchos Strata-SAX e Drug foram inferiores a 17 e 31 % para BE e COC, respectivamente. No que se refere aos resultados obtidos com cartuchos C8, nota-se um comportamento bastante distinto do observado na primeira etapa de otimização do método SPE quanto à recuperação de BE. Na primeira etapa de ensaios, a recuperação de BE não superou os 45 %. No entanto, com a amostra ajustada a pH 6 a recuperação dessa substância com cartuchos C8 foi de 103 %. Apesar desse resultado não é possível afirmar que essa melhora na recuperação esteja relacionada ao ajuste do pH da amostra haja vista que o pH do esgoto bruto *in natura* é bastante próximo de 6.

Diante dos resultados obtidos optou-se por empregar cartuchos Strata-X na extração das substâncias de interesse, já que estes possuem custo menor que os cartuchos Oasis HLB e apresentaram recuperações relativamente melhores quando as amostras foram ajustadas a pH 2. Além disso, a acidificação das amostras a pH 2 contribui para a preservação das mesmas como será evidenciado na seção seguinte deste capítulo. Sendo assim, o método SPE escolhido para o processamento das amostras de esgoto bruto empregou cartuchos Strata-X (500 mg, 6 mL). O condicionamento da fase sólida foi realizado com 6 mL de uma solução de ACN/MeOH 60:40 (v/v) e 3 mL de água ultrapura. Os cartuchos foram carregados com alíquotas de 50 mL de amostra previamente ajustadas a pH 2,0 com HCl 50% (v/v). A eluição das substâncias de interesse também foi feita com 6 mL da solução de ACN/MeOH 60:40 (v/v) e não foi realizada nenhuma lavagem após a extração.

3.3. Preservação das amostras

Quando a análise de amostras de esgoto bruto não é realizada imediatamente após a coleta, estas costumam ser armazenadas a temperatura de 4°C em frascos de vidro âmbar até a extração, se for necessária, e análise (Hummel *et al.*, 2006; Huerta-Fontela *et al.*, 2008a). No entanto, tais condições não garantem a preservação das substâncias de interesse devido a possíveis perdas mediante a ocorrência de degradação, biotransformação, hidrólise, partição, etc. (Castiglioni *et al.*, 2006). Logo, estabelecer um método eficiente de preservação das amostras de esgoto representa um entre os vários desafios no sentido de consolidar a epidemiologia do esgoto como ferramenta forense.

Tendo-se em vista a aplicação dessa abordagem às dimensões continentais brasileiras, testes para avaliar diferentes condições de preservação das amostras foram realizados a fim de estabelecer uma rotina de coleta e preservação capaz de garantir a menor alteração nas concentrações de COC e BE no esgoto bruto. Para tanto, alíquotas de uma mesma amostra de esgoto foram tratadas de oito maneiras distintas e submetidas à extração em fase sólida.

Os resultados obtidos para cada uma das condições de preservação são apresentados na Figura 14. Com exceção da condição de preservação 1, todas as condições investigadas tiveram por objetivo principal eliminar ou diminuir a atividade biológica da amostra.

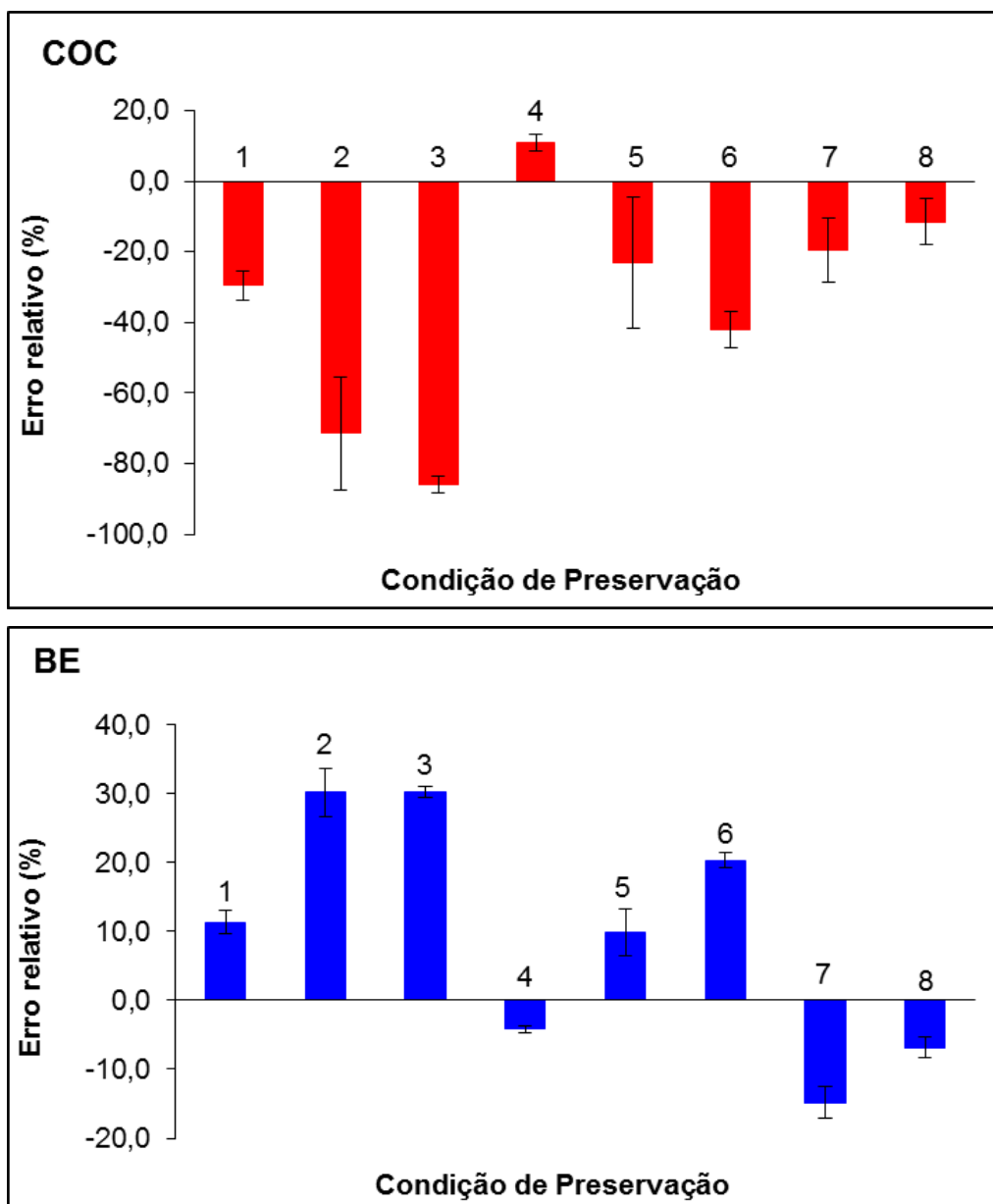


Figura 14. Erro relativo em porcentagem com relação à amostra-controle quanto à concentração de COC e BE (n=3). (1) sem tratamento, (2) filtração com membrana com 0,45 μm de poro, (3) filtração com membrana com 0,22 μm de poro, (4) acidificação a pH 2, (5) filtração com membrana com 0,45 μm de poro seguida de acidificação a pH 2, (6) adição de NaN_3 , (7) adição de formaldeído e (8) extração em fase sólida (SPE) e armazenamento do cartucho de extração sem eluir os analitos.

Analisando a Figura 14 observa-se que os ensaios experimentais apresentaram variações entre $-86,0\%$ e $30,3\%$ na concentração das substâncias de interesse frente à amostra-controle, isto é, com relação à amostra que foi submetida à extração e eluição das substâncias de interesse imediatamente após a coleta.

Na condição de preservação 1, a amostra foi armazenada na sua forma bruta, ou seja, sem qualquer pré-tratamento, a fim de avaliar o comportamento “natural”

das substâncias de interesse em esgoto bruto. Nessa condição, foi observada uma diminuição de $29,4 \pm 4,2$ % na concentração de COC e um aumento de $11,3 \pm 1,7$ % na concentração de BE. Esse comportamento pode estar relacionado a fatores como, por exemplo, a hidrólise espontânea da COC à BE em sistemas com pH acima de 4 (EMCDDA, 2008), a possível metabolização da COC por micro-organismos presentes no esgoto ou, ainda, a processos de foto e biodegradação que também podem ocasionar alterações na concentração das substâncias de interesse.

O mesmo padrão de variação nas concentrações foi observado para as condições 2, 3, 5 e 6. No entanto, para as condições de preservação 2 e 3, nas quais foram realizadas etapas de filtração com membranas de $0,45 \mu\text{m}$ e $0,22 \mu\text{m}$ de poro, respectivamente, as variações com relação à amostra-controle foram muito superiores ao observado na condição 1 (Figura 14). Tais observações sugerem que a realização de etapas de filtração das amostras de esgoto bruto ocasiona a aceleração dos processos de degradação da COC ou, até mesmo, perdas de massa das substâncias de interesse, comprometendo, portanto, a representatividade dos resultados e das estimativas de consumo realizadas com base nas concentrações de BE presentes no esgoto.

Comparando os resultados para estas duas condições de preservação nota-se, ainda, que para a condição 3 a diminuição na concentração de COC foi relativamente maior ($-86,0 \pm 18,5$ %). Tendo em vista esse maior desvio na concentração de COC para a condição de preservação em que foi empregada a membrana de menor porosidade ($0,22 \mu\text{m}$), é possível supor que a perda de massa seja consequência de processos de adsorção e/ou absorção da COC ao material da própria membrana ou, mais provável, ao material particulado retido por ela.

No ensaio referente à condição de preservação 4, a amostra de esgoto bruto foi acidificada a pH 2 antes de ser armazenada. Com base no mostrado na Figura 14, observa-se que a condição de preservação 4 apresentou as menores variações de concentração com relação a amostra-controle e, portanto, é a mais indicada caso seja necessário realizar o envio das amostras do ponto de coleta para o local de análise.

Gheorghe e colaboradores (2008) apontaram resultado semelhante ao investigar a estabilidade de COC e BE em amostras de água superficial. De acordo

com esse estudo quando acidificadas a pH 2 as concentrações de BE e COC mantiveram-se praticamente inalteradas durante cinco dias de armazenamento sob diferentes temperaturas. Assim, apesar do esgoto bruto apresentar características bastante diferentes quando comparado a amostras de águas superficiais, a acidificação desse tipo de amostra também se mostrou eficiente na preservação de COC e BE.

Outro ponto importante é que para a condição de preservação 4 houve uma inversão na direção das variações. Enquanto a concentração de BE sofreu um decréscimo de $4,2 \pm 0,5 \%$ a de COC aumentou $10,9 \pm 2,5 \%$. Isso pode ser explicado considerando o equilíbrio envolvendo a hidrólise da COC à BE. A degradação espontânea da COC envolve uma hidrólise de éster em que o grupo metóxi ($-\text{OCH}_3$) da COC é substituído por um grupo hidroxila ($-\text{OH}$) (EMCDDA, 2008). Em meio ácido a reação inversa é catalisada e o equilíbrio deslocado, levando a esterificação da BE à COC e, portanto, à variação no sentido de formação da COC. A Figura 15 mostra a equação de equilíbrio entre a COC e a BE.

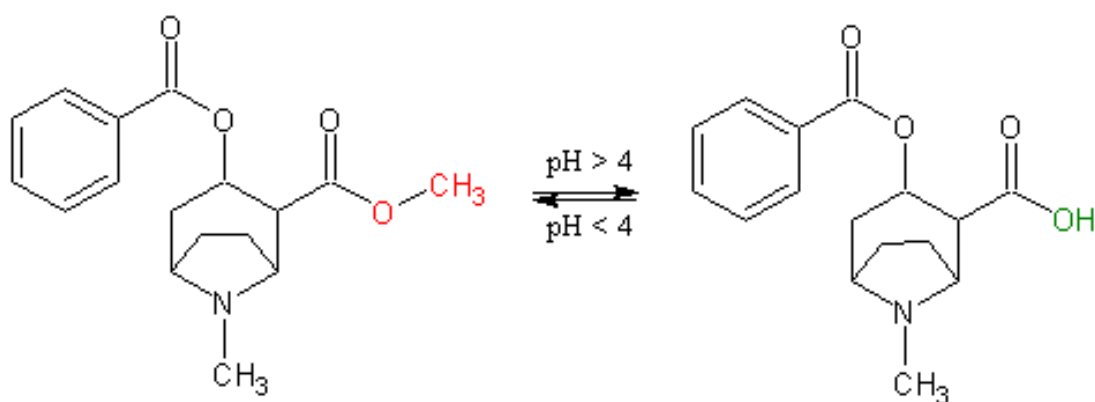


Figura 15 Equação de equilíbrio entre a COC e a BE. A reação de hidrólise da ligação éster (direta) é favorecida em meios com pH acima de 4 e a reação de esterificação (inversa) é favorecida em meios com pH abaixo de 4.

Já na condição 5, antes de ser acidificada a pH 2, a amostra passou por uma etapa de filtração com membrana de $0,45 \mu\text{m}$ de poro. O desvio nas concentrações de COC e BE foram maiores do que o apresentado na condição 4 e, assim como nas condições de preservação 1, 2 e 3, houve um aumento na concentração de BE ($9,8 \pm 1,1 \%$) e um decréscimo na de COC ($-23,0 \pm 5,2 \%$). Tais observações evidenciam a interação entre a influência da acidificação e da filtração nos erros relativos. Mesmo a acidificação contribuindo para a preservação das substâncias de

interesse, a forte influência da filtração causou um desvio intermediário entre aquele apresentado na condição de preservação 2 e o apresentado na condição 4 (Figura 14).

Na condição 8 a amostra bruta foi extraída e o cartucho foi armazenado sem passar pela etapa de eluição das substâncias de interesse. Um decréscimo de $6,8 \pm 1,6 \%$ e $11,5 \pm 6,6 \%$ foi observado para BE e COC, respectivamente. Considerando que o efeito da matriz foi eliminado no processo de extração supõe-se que os erros relativos apresentados sejam consequência de variações na recuperação de tais substâncias.

Nas condições de preservação 6 e 7, reagentes com reconhecida atividade antibacteriana foram adicionados às amostras. Na condição 6, a adição de NaN_3 não contribuiu para a preservação das substâncias de interesse, pelo contrário, ocasionou uma variação maior do que a apresentada na condição de preservação 1 ($20,3 \pm 2,3 \%$ para BE e $-42,1 \pm 9,6 \%$). Em estudo realizado em 2010, González-Mariño e colaboradores também empregaram NaN_3 como agente de preservação em testes com amostras de esgoto bruto. Assim como evidenciado no presente trabalho, a adição de NaN_3 não impediu alterações nas concentrações de BE e COC. Porém, no estudo mencionado, as amostras de esgoto foram previamente filtradas com membranas de acetato de celulose com $0,45 \mu\text{m}$ de poro antes da adição do NaN_3 e os resultados, quando comparados a amostras que foram apenas filtradas, revelaram uma menor degradação das substâncias de interesse.

Na condição de preservação 7 houve um decréscimo nas concentrações de ambas substâncias de interesse ($-14,8 \pm 2,3 \%$ para a BE e $-19,4 \pm 9,1 \%$ para COC). O erro relativo nas concentrações apresentou um padrão bastante diferente daquele exibido pelos demais ensaios experimentais. Esta constatação fica evidente ao se comparar as razões entre as variações de BE e COC em cada condição de preservação. Um gráfico indicando a razão entre os erros relativos das concentrações das substâncias de interesse para cada uma das condições de preservação é apresentado na Figura 16.

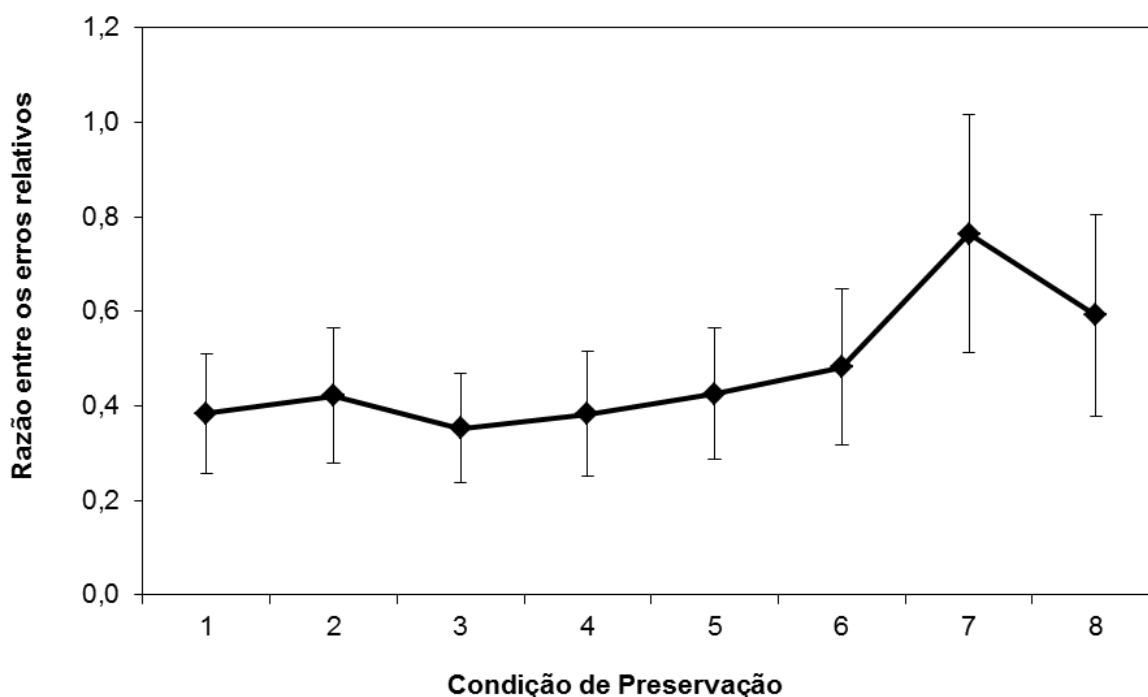


Figura 16. Razão entre os erros relativos nas concentrações de BE e COC para cada condição de preservação e o desvio padrão correspondente.

Analisando a Figura 16 observa-se pouca variação na razão entre os erros relativos para as condições de 1 a 6. Isso evidencia que independentemente do erro observado e das condições de preservação empregadas as concentrações de BE e COC mantiveram uma mesma proporção entre si, ou seja, os mesmos processos de degradação observados na condição de preservação 1 possivelmente ocorreram nos demais ensaios em maior ou menor extensão. Já na condição de preservação 7 a adição de formaldeído deve ter ocasionado processos diferentes daqueles observados para as condições de 1 a 6. Somente um estudo detalhado quanto a essa condição poderia de fato esclarecer o motivo desse comportamento.

Para estabelecer quais condições diferem estatisticamente da amostra-controle, lançou-se mão do teste de Dunnett para comparar as concentrações médias de COC e BE nos oito ensaios experimentais com a concentração dessas substâncias na amostra-controle. O teste de Dunnett serve exclusivamente para comparações desse tipo, em que se pretende avaliar se existe diferença entre um tratamento controle ou testemunha e outros tratamentos. A Tabela 11 mostra os resultados do teste de Dunnett para as oito condições de preservação estudadas.

Tabela 11. Concentrações médias de COC e BE para as condições de preservação avaliadas e suas respectivas classificações^a segundo o teste de Dunnett ($\alpha = 0,05$, $n = 3$).

Condição de preservação	Concentração média de BE (ng L ⁻¹)	Concentração média de COC (ng L ⁻¹)	Razão BE/COC
<i>Controle</i>	3124,2a	964,6a	3,2a
1	3477,3a	680,6b	5,1b
2	4065,4b	276,0b	14,7b
3	4069,6b	135,4b	30,0b
4	2993,8a	1069,6a	2,8 ^a
5	3430,0a	743,0a	4,6b
6	3758,5b	558,5b	6,7b
7	2661,3a	777,6a	3,4 ^a
8	2911,2a	853,4a	3,4 ^a

^aAs médias de uma mesma coluna seguidas por letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si com 95% de confiança. As médias seguidas pela mesma letra são estatisticamente iguais.

De acordo com os resultados mostrados na Tabela 11, as amostras submetidas às condições de preservação 2 (filtração com membrana 0,45 μm), 3 (filtração com membrana 0,22 μm) e 6 (adição de NaN_3) apresentaram concentrações de BE estatisticamente diferentes, com 95% de confiança, da concentração apresentada pela amostra-controle. Já as amostras submetidas às condições 1 (esgoto bruto), 4 (acidificação pH 2), 5 (filtração com membrana 0,45 μm e acidificação pH 2), 7 (formaldeído) e 8 (extração em fase sólida e armazenamento do cartucho) apresentaram concentrações de BE iguais, estatisticamente, à concentração da amostra-controle com 95% de confiança.

Para as concentrações de COC, observa-se, por meio da Tabela 11, que as amostras submetidas às condições de preservação 1, 2, 3 e 6 apresentaram concentrações diferentes da concentração determinada na amostra-controle com 95 % de confiança, enquanto as concentrações das amostras submetidas às condições, 4, 5, 7 e 8 são igual a da amostra-controle.

Comparando as razões entre as concentrações de BE/COC, observa-se que as condições 4, 7 e 8 apresentaram razões iguais, com 95% de confiança, a razão da amostra-controle. Isto indica que ao considerar tanto a BE quanto a COC, as três condições mencionadas foram as que apresentaram o melhor resultado do ponto de vista estatístico. No entanto, nota-se pela Figura 16 que a adição de formaldeído a amostra (condição de preservação 7) alteraram o comportamento das substâncias de interesse no esgoto bruto haja vista que o comportamento esperado é um

aumento na concentração de BE quando há uma diminuição na de COC e vice-versa. Já extração com armazenamento do cartucho (condição de preservação 8) envolve um maior número de etapas dificultando sua aplicação em uma rotina que vise agilidade no envio das amostras.

Como mostrado na Figura 16 para estas duas condições de preservação houve diminuição das concentrações de ambas as substâncias de interesse. Além disso, o esgoto bruto acidificado a pH 2 (condição de preservação 4) foi o tratamento que apresentou o menor erro relativo tanto para a COC quanto para a BE, assim como o menor custo e número de etapas quando comparado aos demais tratamentos. Devido a todos esses fatores a condição de preservação 4 apresentou-se como a melhor opção de preservação e pode ser incluída na sequência analítica possibilitando a aplicação da epidemiologia do esgoto em localidades diferentes daquela na qual a análise será realizada.

3.4. Determinação analítica de COC e BE em esgoto bruto

No presente trabalho, a determinação de COC e BE foi realizada por cromatografia líquida acoplada *in tandem* a espectrometria de massas empregando-se o método de padronização externa que compara a área das substâncias a serem quantificadas com as áreas obtidas com soluções padrão de concentração conhecidas. A Figura 17 mostra curvas analíticas típicas obtidas para COC e BE a partir do método de padronização externa. Observa-se pela Figura 17 a existência de correlação linear entre a área do pico e a massa injetada no cromatógrafo tanto para COC ($R^2 = 0,989$) quanto para a BE ($R^2 = 0,9985$).

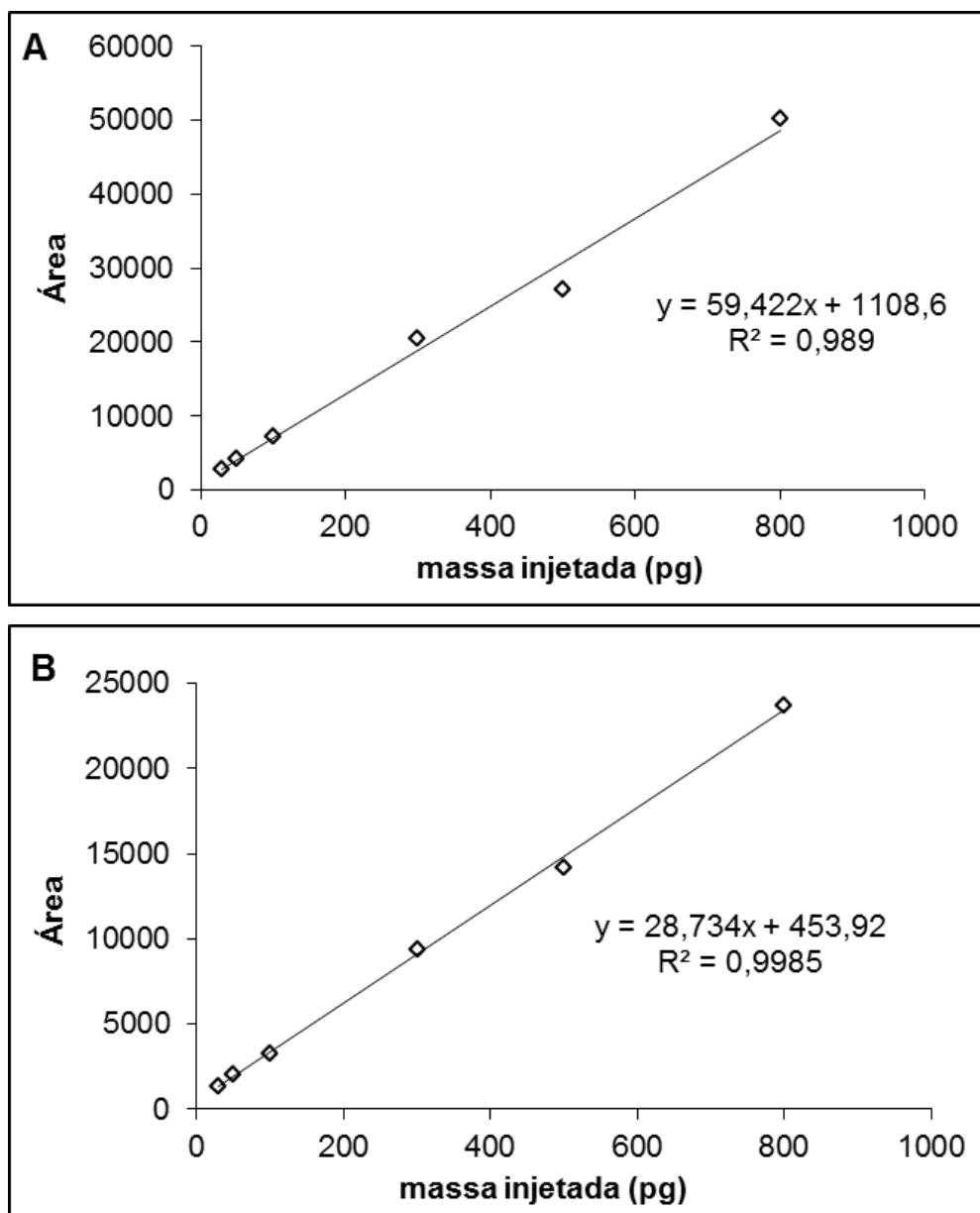


Figura 17. Curva analítica típica obtida pelo método de padronização externa para (A) COC e (B) BE.

A Figura 18 traz um cromatograma típico de uma amostra de esgoto bruto enriquecida com $2 \mu\text{g L}^{-1}$ das substâncias de interesse e analisada por HPLC-MS/MS (QqQ), bem como as transições íon precursor \rightarrow íon produto selecionadas para realizar a quantificação das substâncias de interesse. Nota-se, no entanto, que o tempo de residência da BE na coluna cromatográfica foi um pouco elevado (quase 1 minuto). Apesar desse fato, a quantificação não foi comprometida.

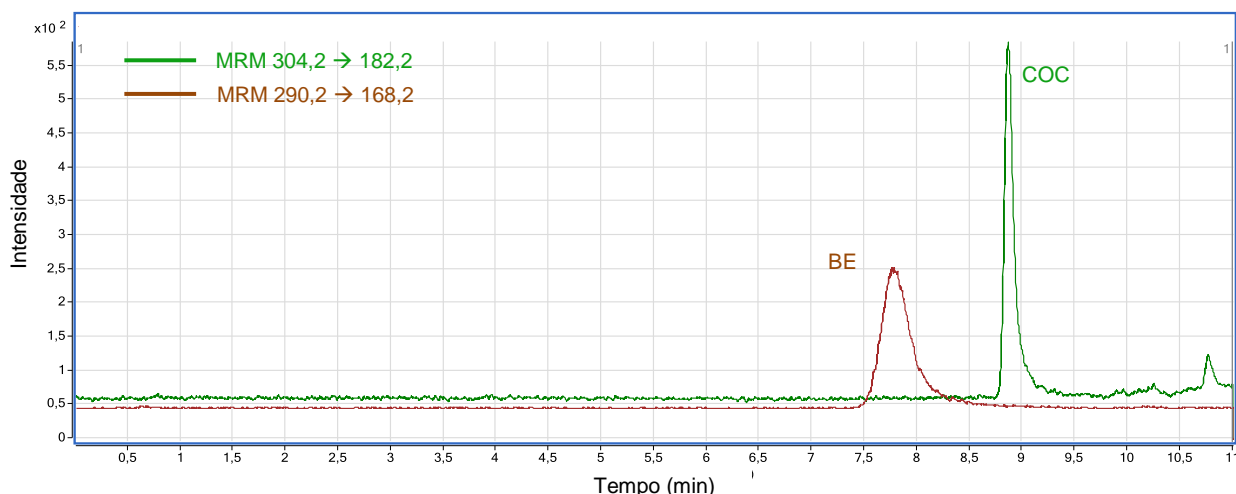


Figura 18. Cromatograma típico obtido no modo MRM a partir da análise de uma amostra de esgoto bruto.

As concentrações de COC e BE encontradas nas amostras de esgoto bruto analisadas são apresentadas na Tabela 12. Na Tabela 12 observa-se que as substâncias de interesse foram determinadas em todas as amostras analisadas. As concentrações variaram entre 1228 ng L⁻¹ e 4297 ng L⁻¹ para BE e 519 ng L⁻¹ e 1260 ng L⁻¹ para COC. As concentrações de BE foram superiores as determinadas para a COC em todas as amostras.

Tabela 12. Concentrações de BE e COC em amostras de esgoto bruto de oito ETE do Distrito Federal e a razão entre elas (n = 3).

ETE	BE (ng L ⁻¹)	COC (ng L ⁻¹)	Razão BE/COC
Brasília Sul	1228	520	2,4
Brasília Norte	1426	519	2,7
Riacho Fundo	1754	1239	1,4
Melchior	3053	1181	2,6
Gama	3338	1175	2,8
Samambaia	3404	1260	2,7
Planaltina	3778	893	4,2
Paranoá	4297	1080	4,0

Na Tabela 12 também são apresentadas as razões entre a concentração de BE e COC (razão BE/COC) para cada amostra. Em cinco das oito amostras analisadas as razões BE/COC ficaram entre 2,4 e 2,8. Nas amostras da ETE Planaltina e da ETE Paranoá as razões foram de 4,2 e 4,0, respectivamente, enquanto para ETE Riacho Fundo a razão foi de 1,4. Assumindo taxas de excreção por volta de 9 % para COC e 45 % para BE (van Nuijs *et al.*, 2011a) e considerando a excreção como a única fonte de entrada de COC e BE no esgoto bruto, era

esperado razões BE/COC próximas a 5,0, ou seja, as concentrações encontradas para BE deveriam ser, de acordo com tais considerações, pelo menos cinco vezes mais elevadas que as concentrações de COC no esgoto.

No entanto, observa-se que todas as razões BE/COC das amostras de esgoto analisadas foram inferiores a razão esperada com base no perfil de excreção urinária presente na literatura. Tais discordâncias têm sido observadas em outros trabalhos envolvendo epidemiologia do esgoto (Castiglioni *et al.*, 2011) e sugerem a existência de outras fontes de entrada de COC no sistema de esgotamento sanitário. Essas fontes secundárias podem estar relacionadas com atividades de refino, preparo ou distribuição da droga. Assim, razões de BE/COC próximas a 5,0 como no caso da ETE Planaltina (4,2) e da ETE Paranoá (4,0) podem indicar regiões em que prevalece o consumo de COC. Por outro lado, razões muito inferiores a esse valor, caso da ETE Riacho Fundo (1,4), podem indicar a existência de laboratórios clandestinos destinados à manipulação de COC.

3.5. Estimativa do consumo

A estimativa da quantidade de COC base livre consumida no Distrito Federal (DF) foi realizada com base na proposta sugerida por Zuccato e colaboradores (2005) a partir das concentrações de BE nas amostras de esgoto analisadas e de informações a respeito da taxa de metabolização da COC, da vazão do esgoto que aflui em cada ETE e da população atendidas por elas.

Considerando os valores de concentração de BE (Tabela 12) e as vazões médias de esgoto apresentadas na Tabela 2, a quantidade em massa de BE que aflui em cada uma das ETE em $g\text{ dia}^{-1}$ foi estabelecida. A utilização das concentrações de BE no retrocálculo para estimar o consumo de COC é preferível, pois a presença desse metabólito no esgoto é uma comprovação do consumo humano, ele é o metabólito majoritário da COC e o mais estável no esgoto quando comparado a outros produtos de metabolização dessa droga (van Nuijs *et al.*, 2011a).

Assumindo que toda BE encontrada no esgoto provém do consumo, a quantidade de COC consumida na forma de base livre foi calculada a partir da equação 1 (Seção 1.3, página 12). A partir desse momento todas as estimativas apresentadas se referem ao consumo de COC base livre. A Figura 19 mostra a

estimativa do consumo anual de COC da população atendida por cada ETE investigada e o resultado do teste de Tukey para a comparação das médias.

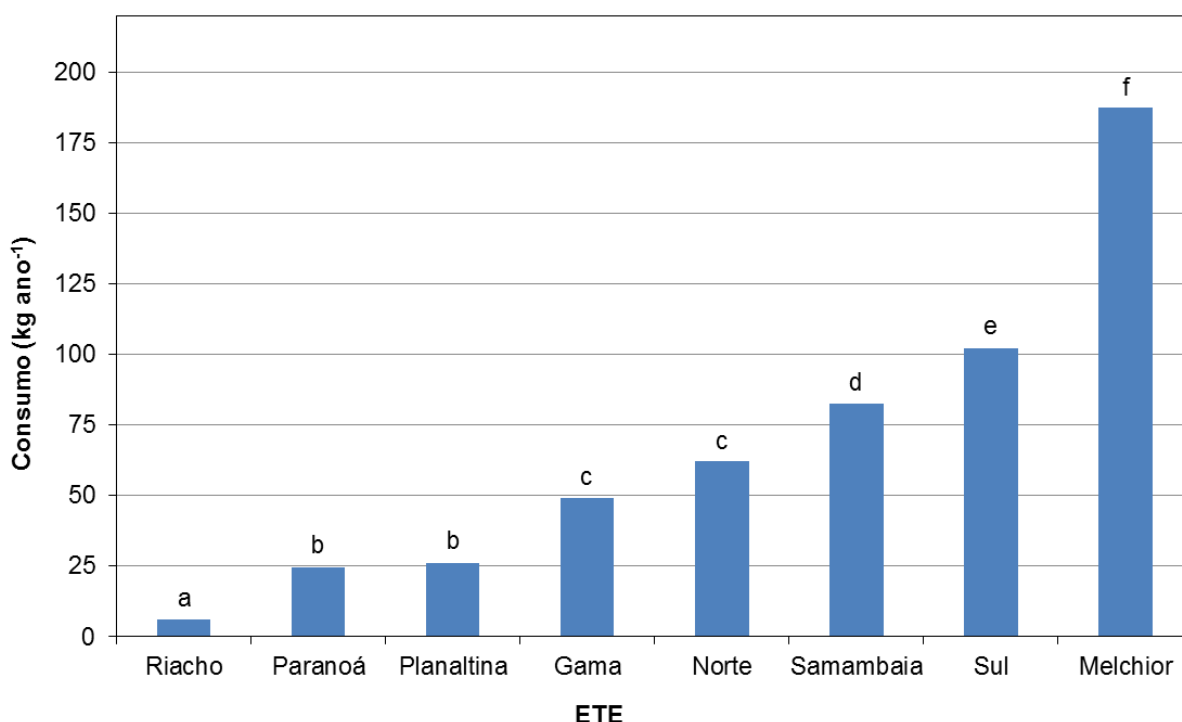


Figura 19. Consumo anual de COC base livre em kg ano⁻¹ pelas comunidades servidas pelas ETE investigadas e suas respectivas classificações segundo o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$, $n = 3$).

Pela Figura 19 observa-se que das ETE estudadas a maior parcela da COC consumida (35 %) é atribuída à região atendida pela ETE Melchior que concentra a maior parte da população atendida pelas oito ETE estudadas (575.092 habitantes). As regiões atendidas pelas ETE Brasília Sul, Samambaia e Brasília Norte também apresentaram consumo elevado de COC contribuindo com 19 %, 15 % e 12 % do total, respectivamente. Com 1 % do total estimado, a população atendida pela ETE Riacho Fundo apresentou a menor contribuição para o consumo de COC. Sabendo que as oito ETE investigadas atendem a aproximadamente 73 % da população do DF (IBGE, 2010) foi possível, por extrapolação, estimar que o consumo anual de COC no DF possa chegar a 753 kg ano⁻¹ ou 2930 doses ano⁻¹ 1000 hab⁻¹.

Para estabelecer quais valores de consumo são iguais ou diferentes entre si estatisticamente lançou-se mão do teste de Tukey a 95 % de confiança para comparar as médias de consumo em cada ETE. Observa-se pela Figura 19 que o consumo das regiões servidas pelas ETE Paranoá e Planaltina é igual com 95 % de confiança. O mesmo é observado para o consumo das regiões atendidas pelas ETE

Gama e Brasília Norte. Já o consumo de COC referente a população servida pela ETE Melchior é de fato maior visto que, de acordo com o teste de Tukey, o valor observado para essa região difere estatisticamente do consumo estimado nas demais regiões.

Comparando as estimativas realizadas no presente trabalho com as obtidas por Maldaner e colaboradores (2012) em junho de 2010 a partir de amostras de esgoto de seis ETE do DF é possível observar proximidade entre os valores apresentados, o que indica certa reprodutibilidade e consistência das estimativas realizadas por epidemiologia do esgoto. A Figura 20 mostra os resultados obtidos por Maldaner e colaboradores (2012) e os gerados no presente estudo.

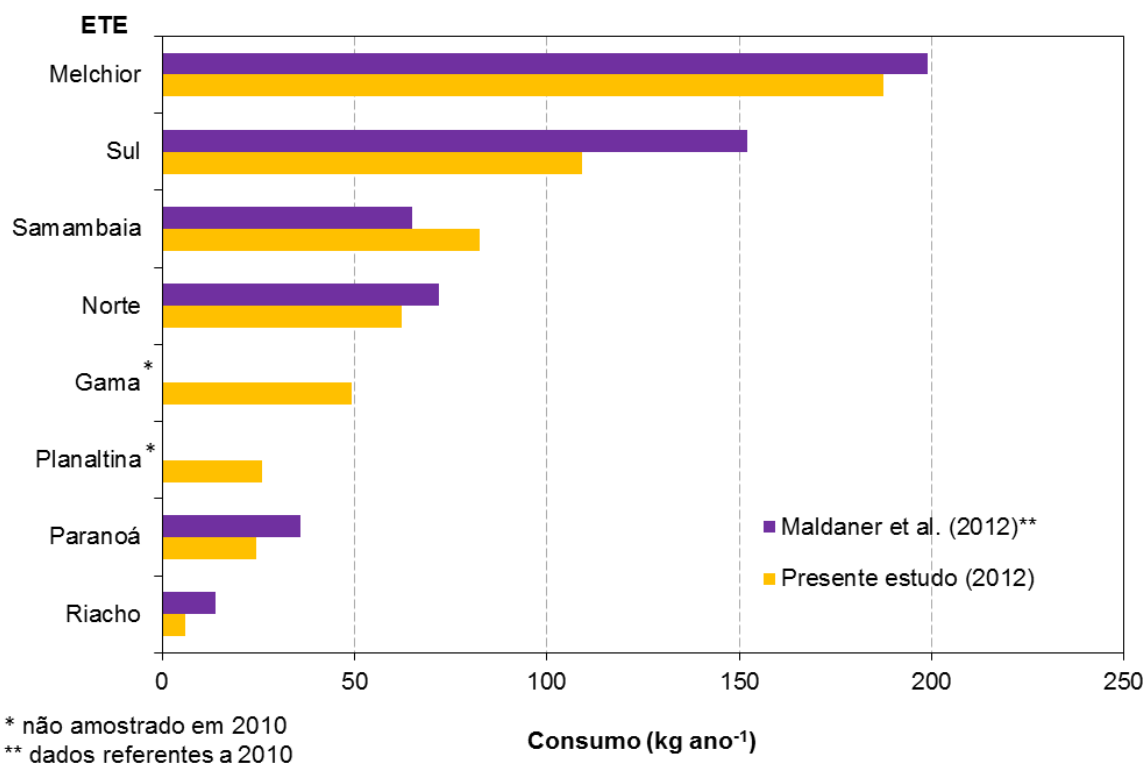


Figura 20. Consumo de COC no Distrito Federal obtido por epidemiologia do esgoto em junho de 2010 e abril de 2012.

Observa-se pela Figura 20 que, de acordo com as estimativas realizadas em abril de 2012, houve uma redução no consumo anual de COC em todas as regiões investigadas, exceto na ETE Samambaia em que o consumo em 2012 foi 28 % maior que o consumo estimado para o ano de 2010³ (Maldaner *et al.*, 2012). Para as

³ O consumo de COC reportado por Maldaner e colaboradores (2012) para a ETE Samambaia foi corrigido, pois a vazão considerada para esta ETE não correspondia a unidade das demais (L s⁻¹).

demais regiões, a redução no consumo ficou entre 6% (ETE Melchior) e 28% (ETE Sul).

Considerando que uma dose padrão de COC equivale a 100 mg da droga (EMCDDA,2008), na Figura 21 é apresentada uma estimativa do consumo anual *per capita* de COC para a população servida por cada uma das ETE investigadas. A região correspondente à ETE Brasília Norte foi a que apresentou o maior consumo anual de COC em doses por 1000 habitantes (4453 ± 209 doses ano⁻¹ 1000 hab⁻¹), seguida das regiões atendidas pela ETE Samambaia (4049 ± 13 doses ano⁻¹ 1000 hab⁻¹) e pela ETE Gama (3607 ± 79 doses ano⁻¹ 1000 hab⁻¹).

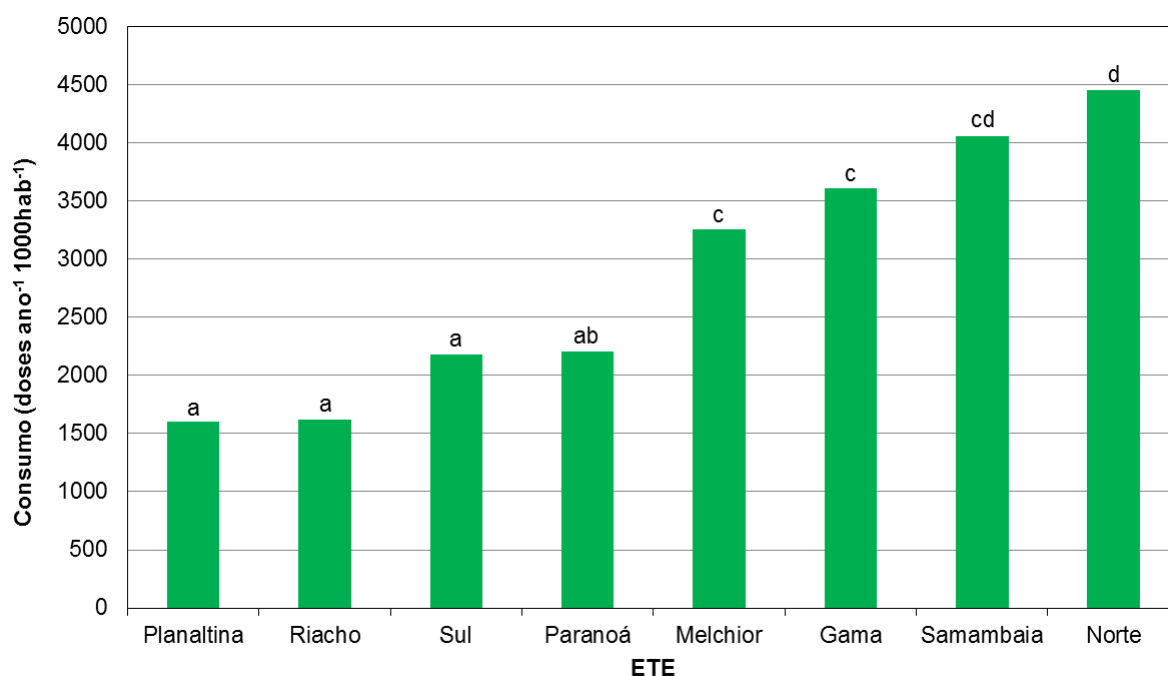


Figura 21. Consumo *per capita* da população atendida por cada ETE investigada e suas respectivas classificações segundo o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$, $n = 3$).

Com base no teste de Tukey, observa-se que o consumo das regiões atendidas pelas ETE Planaltina, Riacho Fundo e Brasília Sul é estatisticamente igual com 95 % de confiança (Figura 21). As regiões atendidas pelas ETE Melchior, Gama e Samambaia também apresentaram o mesmo consumo de COC segundo o teste de Tukey realizado. Já o consumo da região servida pela ETE Brasília Norte foi estatisticamente diferente do consumo de seis regiões estudadas. No entanto, em relação ao consumo estimado a partir das amostras de esgoto da ETE Samambaia,

não é possível rejeitar a hipótese de que as estimativas de consumo *per capita* nessas duas regiões sejam iguais.

Na Figura 22 é apresentado um gráfico comparativo entre os resultados deste trabalho e os reportados por Maldaner e colaboradores (2012), o consumo *per capita* apresentado neste trabalho foi menor que o consumo estimado em junho de 2010 (Maldaner *et al.*, 2012) em todas as regiões, com exceção das regiões atendidas pelas ETE Melchior e Samambaia que apresentaram um aumento de aproximadamente 5 % e 17 % no consumo de COC, respectivamente.

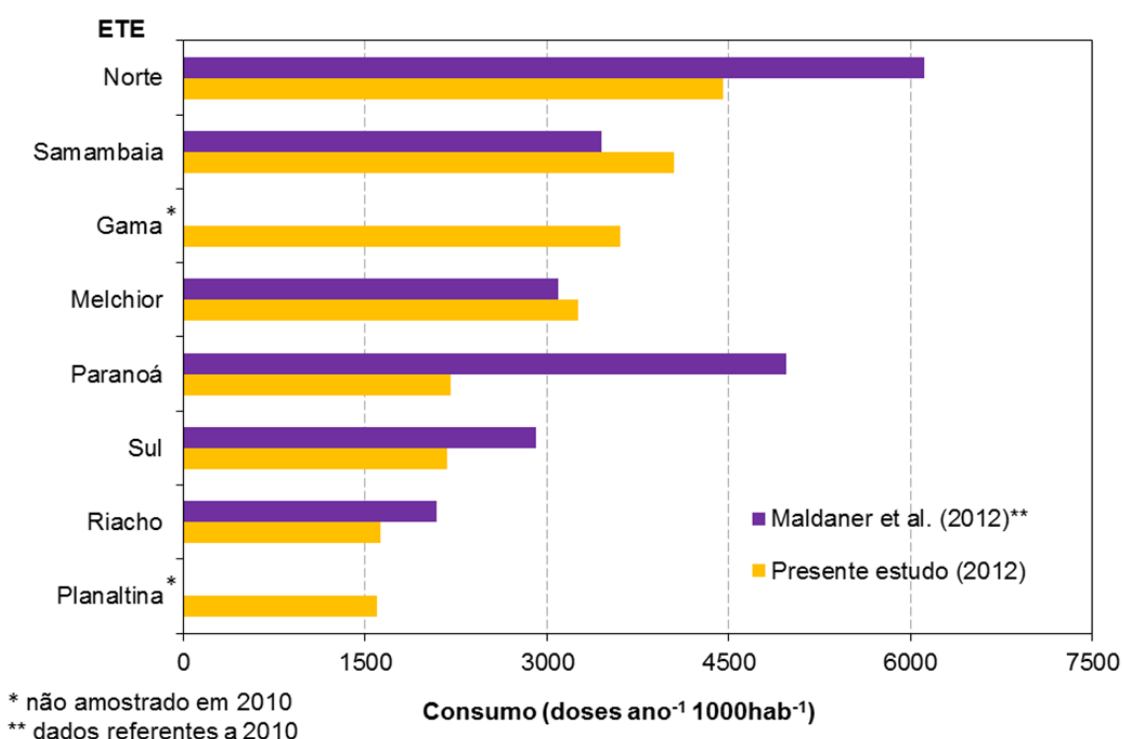


Figura 22. Consumo *per capita* de COC no Distrito Federal obtido por epidemiologia do esgoto em junho de 2010 e abril de 2012.

Considerando o total de COC consumida e a população total atendida por todas as ETE, o consumo médio de COC foi de $0,8 \text{ g dia}^{-1} 1000 \text{ hab}^{-1}$, que equivale a 8 doses $\text{dia}^{-1} 1000 \text{ hab}^{-1}$. Extrapolando esse consumo para 100 % da população do DF (2.570.160 habitantes) o consumo médio de COC pode chegar a $1,08 \text{ g dia}^{-1} 1000 \text{ hab}^{-1}$. A Tabela 13 mostra estimativas para o consumo de COC obtidas por epidemiologia de esgoto em diferentes países.

Tabela 13. Consumo de cocaína estimado via epidemiologia do esgoto em vários países.

País	Consumo (g dia ⁻¹ 1000 hab ⁻¹)	Nº de ETE investigadas	Referência
Itália	0,44	4	Zuccato <i>et al.</i> , 2005
Espanha	1,4 ^a	42	Huerta-Fontela <i>et al.</i> , 2008a
Reino Unido	0,9	2	Kasprzyk-Hordern <i>et al.</i> , 2009
Bélgica	0,053-1,828	30	van Nuijs <i>et al.</i> , 2009
Espanha	1,79 ^a	7	Postigo <i>et al.</i> , 2010
Bélgica	0,52	1	van Nuijs <i>et al.</i> , 2011b
Brasil	0,92	6	Maldaner <i>et al.</i> 2012
Brasil	1,08	8	Presente estudo

^a Estimado para a população com idade entre 15 e 64 anos.

Observa-se pela Tabela 13 que o consumo de COC estimado no presente estudo é comparável aos resultados obtidos em outros países. Isso indica que as estimativas obtidas por epidemiologia do esgoto podem ser utilizadas na realização de estudos relacionados ao consumo de COC em diferentes partes do mundo. No entanto, é necessário ressaltar que para isso um grande número de amostras de esgoto deve ser analisado e, além disso, as amostras devem ser representativas de toda a população o que configura um grande desafio no contexto brasileiro haja vista as dimensões e diferenças regionais do Brasil. Mesmo assim, assumindo a hipótese de que o resultado obtido nesse estudo seja representativo de toda a população brasileira (193.946.886 habitantes) estima-se que o consumo de COC no Brasil possa chegar a 57 ton ano⁻¹. Extrapolações semelhantes foram reportadas por Postigo e colaboradores (2010), que estimaram o consumo de COC de toda a população da Espanha com idade entre 15 e 64 anos (31.869.008 habitantes) a partir de resultados obtidos pela análise de amostras de esgoto de sete ETE localizadas na região da Catalunha. O consumo de COC na Espanha foi estimado em 21 ton ano⁻¹.

3.5.1. Perfil semanal

O perfil semanal para o consumo de COC foi estabelecido a partir da análise de amostras de esgoto bruto coletadas da ETE Brasília Norte. As coletas foram realizadas entre os dias 19 e 25 de abril de 2012. Em todas as amostras analisadas

foi possível quantificar as substâncias de interesse. As concentrações de BE e COC, bem como as razões entre elas para cada amostra são mostradas na Tabela 14.

Tabela 14. Concentrações de BE e COC em amostras de esgoto bruto coletadas na ETE Brasília norte no período de 19 a 25 de abril de 2012 e a razão entre elas (n = 3).

Dia da semana	BE (ng L ⁻¹)	COC (ng L ⁻¹)	Razão BE/COC
Quinta (19/04/2012)	1426	519	2,7
Sexta (20/04/2012)	1750	610	2,9
Sábado (21/04/2012)	2929	1039	2,8
Domingo (22/04/2012)	2258	699	3,2
Segunda (23/04/2012)	1669	617	2,7
Terça (24/04/2012)	1291	602	2,1
Quarta (25/04/2012)	1293	547	2,4

Por meio dos resultados mostrados na Tabela 14 é possível observar que as concentrações de BE foram superiores as concentrações de COC em todas as amostras. Nota-se ainda, analisando as razões entre as concentrações de BE e COC (Razão BE/COC), que na amostra referente ao domingo a razão BE/COC apresentou o maior valor, o que indica um maior aporte de BE em relação ao aporte de COC na ETE nesse dia. Considerando que o comportamento das substâncias de interesse no sistema de esgotamento sanitário seja parecido durante toda a semana, tal resultado indica que esse maior aporte de BE é consequência do aumento no consumo de COC durante o final de semana.

A Figura 23 traz o consumo de COC para cada dia da semana estudada. O perfil semanal para a região atendida pela ETE Brasília Norte mostra um aumento no consumo de COC a partir de quinta-feira, com o máximo no sábado e o mínimo na terça-feira. Estima-se que o consumo durante o final de semana estudado foi de cerca de 7000 doses ou 50 doses 1000 hab⁻¹, o que está de acordo com o fato de que grande parte do consumo de COC ocorre durante festas e outras atividades de recreação (EMCDDA, 2009). Além disso, o perfil de consumo observado sugere a existência de grupos distintos de usuários. Um correspondente as pessoas que fazem uso constante da droga, isto é, são dependentes químicos, e outro referente às pessoas que fazem uso intermitente da droga e contribuem com aumento do consumo de COC em aproximadamente duas vezes durante o final de semana.

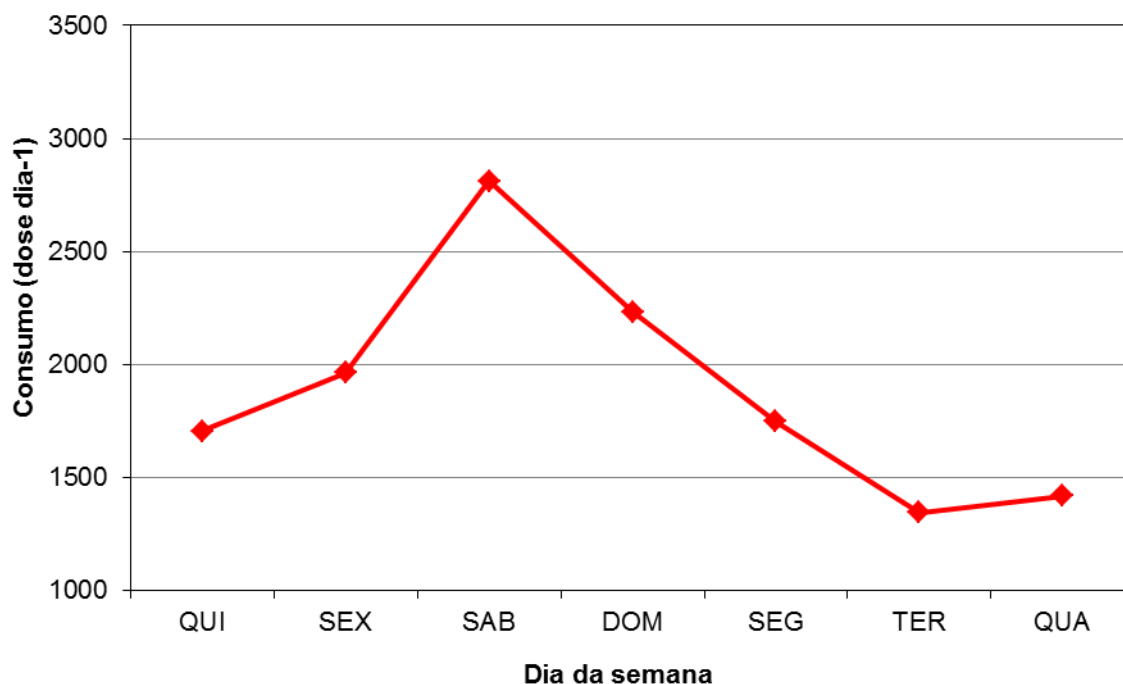


Figura 23. Perfil do consumo semanal de cocaína para a região atendida pela ETE Brasília Norte.

Em estudo realizado por van Nuijs e colaboradores (2011b), o perfil semanal do consumo de COC na cidade de Bruxelas (Bélgica) foi estabelecido. Assim como no presente estudo, os resultados apontaram para um maior consumo de COC nos finais de semana. O mesmo perfil de consumo também foi reportado por Zuccato e colaboradores (2008) para a cidade de Milão (Espanha).

No entanto, durante o final de semana a ingestão de bebida alcoólica juntamente ao uso de drogas também é comum e a literatura mostra que ocorre uma diminuição significativa na excreção de COC na forma de BE quando o uso dessa droga é realizado concomitantemente ao uso de álcool (Harris *et al.*, 2003⁴ *apud* van Nuijs *et al.* 2011; Goldstein *et al.*, 2009). Nesse sentido, a fim de realizar uma estimativa mais fiel do consumo de COC durante o final de semana estudado, um retrocálculo considerando uma taxa de excreção de 35 % para BE também foi realizado. Nessas condições, o consumo de COC no final de semana em que o estudo foi feito pode chegar a 9000 doses ou 65 doses 1000 hab⁻¹.

Outro ponto importante observado a partir do perfil semanal é que os consumos anuais apresentados nas figuras 20 e 22 (páginas 50 e 52,

⁴ HARRIS, D. S.; EVERHART, E. T.; MENDELSON, J.; JONES, R. T. The pharmacology of cocaethylene in humans following cocaine and ethanol administration. **Drug Alcohol Depend.** v. 72, n. 2, p. 169–82, 2003.

respectivamente) podem estar subestimados dado que todas essas estimativas foram realizadas a partir das concentrações de BE determinadas em amostras coletadas numa quinta-feira, ou seja, em um dia da semana em que o consumo é bastante baixo (Figura 23). Sendo assim, considerando o perfil semanal de consumo apresentado para a região atendida pela ETE Brasília Norte foi possível estimar o consumo anual para essa região com base na concentração média de BE no esgoto durante a semana e a concentração máxima obtida no sábado.

Considerando a concentração média de BE no esgoto o consumo anual foi de 69 kg ano⁻¹ ou 4937 doses ano⁻¹ 1000 hab⁻¹. Por outro lado, com base na concentração máxima dessa substância no esgoto o consumo anual foi de 103 kg ano⁻¹ ou 7349 doses ano⁻¹ 1000 hab⁻¹. Comparando tais estimativas aos resultados obtidos a partir da concentração de BE no esgoto coletado na quinta-feira (62 kg ano⁻¹ ou 4453 doses ano⁻¹ 1000 hab⁻¹) de fato o consumo foi subestimado. Admitindo ainda que o perfil semanal de consumo para as demais ETE devem ser parecidos ao observado para a região atendida pela ETE Brasília Norte é de se esperar um consumo de COC base livre superior a 753 kg ano⁻¹ para a população do DF.

A Figura 24 mostra as quantidades diárias (g dia⁻¹) de BE e COC que foram transportadas até a ETE Brasília Norte no período de estudo.

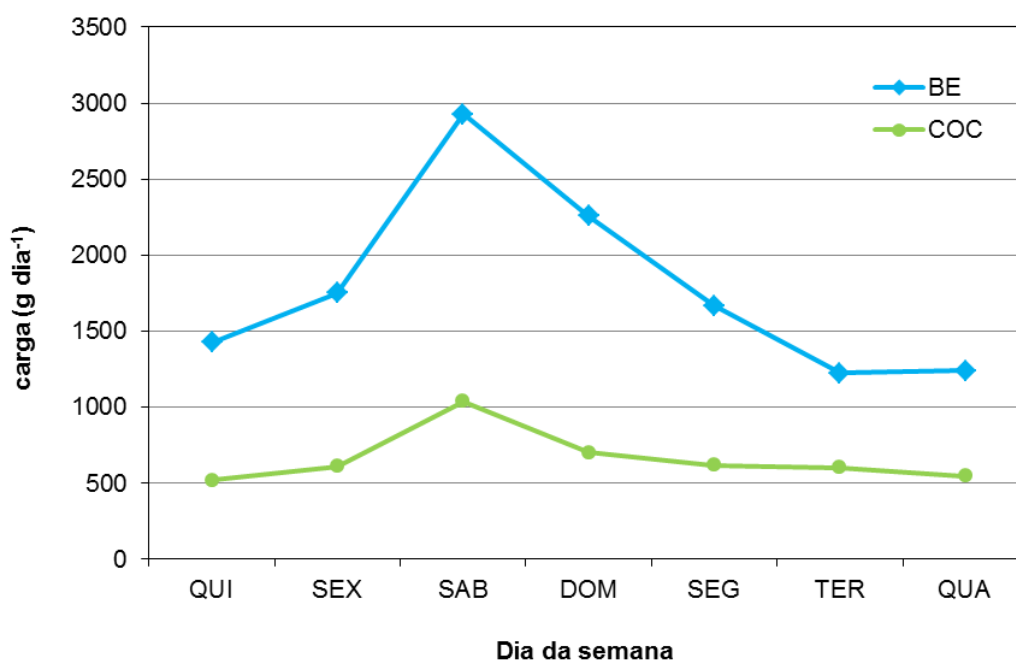


Figura 24. Quantidades diárias (g dia⁻¹) de BE e COC transportadas até a ETE Brasília Norte.

Observa-se, claramente, por meio da Figura 24, que a quantidade de COC e BE que entra na ETE varia de acordo com o dia da semana. Durante o final de semana ocorre um aumento no aporte dessas substâncias na ETE. Além disso, nota-se um aumento mais pronunciado do aporte de BE, fato que condiz com as razões BE/COC observadas (Tabela 14).

3.6. Análises Exploratórias

Além da COC e da BE, buscou-se investigar no presente estudo a presença de outras 16 substâncias nas amostras de esgoto bruto analisadas, a saber: AEME, ECG, EME, nor-BE, nor-COC, AMP, MAMP, MBDB, MDA, MDEA, MDMA, CBD, CBN, THC-COOH, levamisol e fenacetina. Cromatogramas típicos da solução padrão contendo 15 das 16 substâncias mencionadas são apresentados na Figura 25.

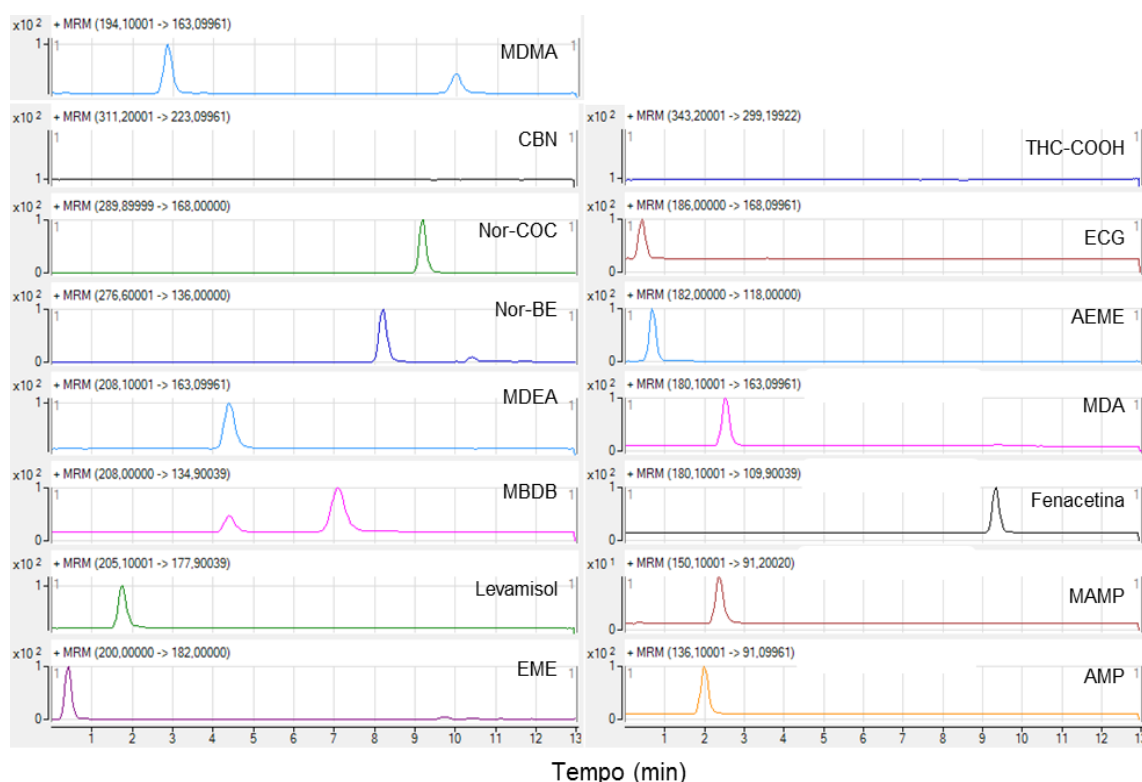


Figura 25. Cromatograma típico obtido no modo MRM a partir da análise da solução padrão contendo quinze das dezesseis substâncias investigadas.

Observa-se pela Figura 25 que o CBN e o THC-COOH não foram detectados pelo método empregado. Tal observação relaciona-se possivelmente ao fato dessas substâncias, ao contrário das outras, serem substâncias reconhecidamente ácidas.

Como a fase móvel empregada utiliza ácido fórmico para favorecer a formação de íons positivos acredita-se que tais substâncias não foram ionizadas e, portanto, não foi possível detectá-las. Com exceção do MDMA e MBDB que apresentaram picos em dois tempos de retenção e do MDEA que possui transições muito próximas das transições do MBDB, curvas analíticas foram construídas para as demais substâncias a partir das soluções padrão. Na Figura 26 é mostrado um cromatograma típico obtido por meio da análise de amostras de esgoto bruto.

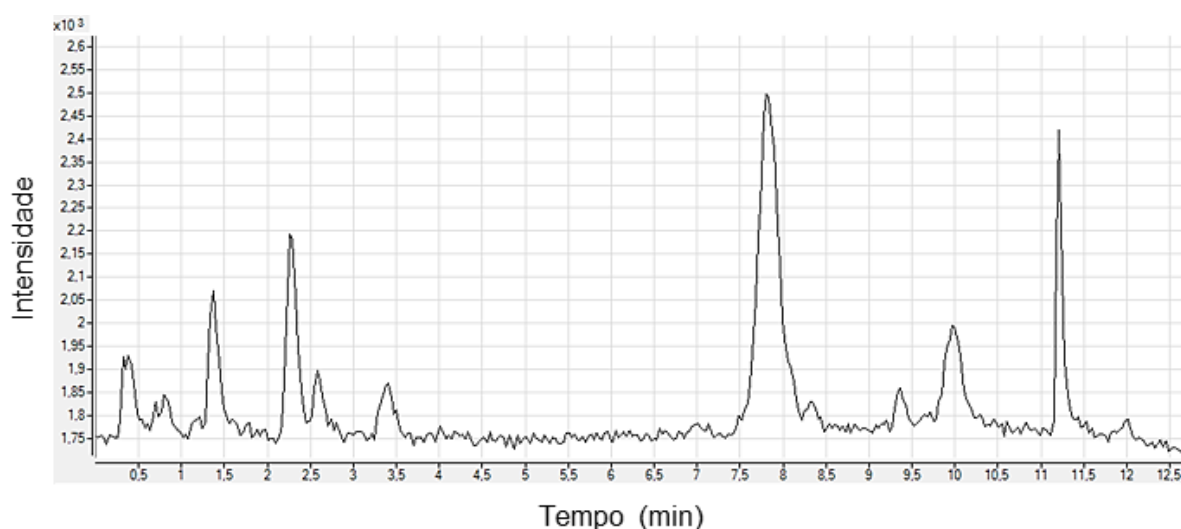


Figura 26. Cromatograma típico obtido a partir da análise de amostras de esgoto bruto.

Na Tabela 15 são apresentados os resultados obtidos a partir da análise de amostras de esgoto bruto coletadas da ETE Melchior. O “X” na Tabela 15 significa que a transição foi incluída no método e foi observada na análise. O hífen (-) significa que a transição foi incluída no método, mas não foi observada na análise.

Observa-se pela Tabela 15 que apenas algumas transições íon precursor → íon produto foram observadas nas amostras de esgoto bruto. A fenacetina foi a única substância que apresentou todas as transições incluídas no método em concordância com o tempo de retenção (TR) apresentado pelo padrão. Mesmo assim, não foi possível determinar sua concentração na amostra. O interesse em determinar tanto a fenacetina quanto o levamisol em amostras de esgoto bruto surge da possibilidade de inferir, caso sejam encontradas concentrações elevadas destas substâncias no esgoto, se a COC consumida foi adulterada caracterizando o consumo por parte dos usuários finais da droga, ou se a COC apresenta-se “pura” o que indica uma possível região de distribuição da droga vinda dos países produtores (Peru, Colômbia e Bolívia). Tal possibilidade baseia-se no fato dessas substâncias

estarem sendo comumente encontradas em amostras de COC apreendidas no Brasil, como tem sido mostrado pelo programa de perfil de impurezas de COC da Polícia Federal, também conhecido como projeto PeQui (sigla para Perfil Químico de Drogas) (Botelho, 2011).

Tabela 15. Resultados obtidos a partir da análise de amostras de esgoto bruto.

Substância	1ª transição (quantificação)	2ª transição (confirmação)	3ª transição (confirmação)	Concordância entre TR do padrão e da amostra
<i>Cocaínicos</i>				
AEME	-	X	X	Não observado
ECG	-	-	NI ^a	-
EME	X	-	NI	Não observado
nor-BE	X	X	NI	Não observado
nor-COC	X	-	NI	Não observado
<i>Anfetamínicos</i>				
AMP	X	-	X	Não observado
MAMP	X	X	X	Não observado
MBDB	-	-	-	-
MDA	X	X	X	Parcialmente observado
MDEA	-	-	X	Não observado
MDMA	X	-	-	Não observado
<i>Canabinoides</i>				
CBD	-	NI	NI	-
CBN	-	NI	NI	-
THC-COOH	-	-	-	-
<i>Adulterantes</i>				
Levamisol	-	X	NI	Observado
Fenacetina	X	X	NI	Observado

^aNão incluído no método.

O MDA apresentou as três transições incluídas no método, mas apenas as transições de confirmação apresentaram TR em concordância com o padrão (Tabela 15). Assim como foi observado para os padrões, nenhuma transição referente aos canabinoides foi identificada nas amostras de esgoto. O mesmo resultado foi apresentado para o MBDB. Quanto às demais substâncias, pelo menos uma das transições incluídas no método foi identificada, porém os TR obtidos foram bastante diferentes dos observados para os padrões. Logo, as transições observadas não correspondem às substâncias investigadas.

4. CONCLUSÕES

Este trabalho contribuiu para consolidar uma sequência analítica para a determinação de COC e BE com vistas à realização de estimativas do consumo de COC em cidades brasileiras. Pela primeira vez, testes de preservação para avaliar a estabilidade das substâncias de interesse durante o envio das amostras de esgoto pelos correios foram realizados. O esgoto bruto acidificado a pH 2 apresentou a menor variação nas concentrações de COC e BE.

Tal resultado mostrou-se bastante importante do ponto de vista da aplicação futura desta ferramenta forense na realização de estimativas do consumo de COC em todo o Brasil. Logo, acidificar as amostras a pH 2 e enviá-las pelos correios para uma central de análises responsável por gerar os dados a respeito do consumo pode contribuir não só com a logística da aplicação desta ferramenta, mas também com a redução de custos.

O sistema de extração desenvolvido neste trabalho mostrou-se adequado para o processamento de pequenos volumes de esgoto bruto (cerca de 50 mL). Além disso, possibilitou a eliminação da etapa de filtração e permitiu a realização de 14 extrações simultâneas o que reduziu o tempo de preparo das amostras de uma hora e meia para apenas 20 min para cada 200 mL de amostra. Essa redução no tempo de preparo da amostra refletiu na redução do tempo de análise como um todo contribuindo de fato para a obtenção de estimativas em tempo real.

O método SPE empregando cartuchos Strata-X (500 mg, 6 mL), condicionamento da fase sólida com 6 mL de uma solução de ACN/MeOH 60:40 (v/v) e 3 mL de água ultrapura, amostra com pH 2,0 previamente ajustado com HCl 50% (v/v) e eluição com 6 mL da solução de ACN/MeOH 60:40 (v/v) mostrou-se o mais eficiente e barato na extração das substâncias de interesse.

A análise dos extratos por HPLC-MS/MS (QqQ) apresentou bons resultados quanto a determinação de COC e BE. As substâncias investigadas foram encontradas em todas as amostras analisadas e as concentrações de BE foram superiores as de COC na totalidade destas.

Com base nas concentrações de BE, o consumo de COC base livre da população do Distrito Federal foi estimado em 753 kg ano⁻¹. A região atendida pela ETE Brasília Norte apresentou o maior consumo *per capita* de COC base livre com relação às outras sete regiões (4453 doses ano⁻¹ 1000 hab⁻¹). As estimativas obtidas

no presente estudo apresentaram bastante coerência com relação aos resultados obtidos por Maldaner e colaboradores (2012) a partir de amostras coletadas de seis ETE do DF em 2010, evidenciando a reprodutibilidade dos resultados obtidos por epidemiologia do esgoto. Além disso, no presente estudo as estimativas foram estendidas para outras duas regiões do DF (Planaltina e Gama) e a partir da análise de amostras de esgoto bruto coletadas no período de 19 a 25 de abril, o perfil semanal para região atendida pela ETE Brasília Norte também foi estabelecido.

De acordo com o perfil semanal foi estimado que o consumo no final de semana estudado possa ter chegado a 9000 doses, que é praticamente o dobro do consumido durante a semana. Os resultados também evidenciaram a possível existência de grupos distintos de usuários que fazem uso constante e intermitente da droga. Sendo assim, foram obtidas informações em tempo real sobre a quantidade de COC consumida no DF e, igualmente, a respeito da dinâmica envolvida no uso e na oferta da droga na região estudada.

Por fim, este trabalho foi importante para consolidar a aplicação da epidemiologia do esgoto na realização de estimativas quanto ao consumo de COC no DF ou em qualquer cidade brasileira além de ter contribuído não só para a geração de dados, mas também para disponibilização de estratégias que possam tornar a utilização desta ferramenta pelas autoridades competentes viável do ponto de vista financeiro e logístico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BÄUERLEIN, P. S.; MANSELL, J. E.; TER LAAK, T. L.; DE VOOGT, P. Sorption behavior of Charged and Neutral Polar Organic Compounds on Solid Phase Extraction Materials: Which Functional Group Governs Sorption? **Environ. Sci. Technol.** v. 46, p. 954-961, dez. 2011.

BERSET, J. D.; BRENNEISE, R.; MATHIEU, C. Analysis of Illicit and illicit drugs in waste, surface and lake water samples using large volume direct injection high performance liquid chromatography – Electrospray tandem mass spectrometry (HPLC–MS/MS). **Chemosphere.** v. 81, p. 859-866, ago. 2010.

BISCEGLIA, K. J.; ROBERTS, A. L.; SCHANTZ, M. M.; LIPPA, K. A. Quantification of drugs of abuse in municipal wastewater via SPE and direct injection liquid chromatography mass spectrometry. **Anal. Bioanal. Chem.** v. 398, p. 2701-2712, set. 2010.

BOTELHO, E. D. **Desenvolvimento de uma nova metodologia analítica para identificação e quantificação de truxilinas em amostras de cocaína baseada em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-MS).** 2011. 156 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2011.

CASTIGLIONI, S.; BAGNATI, R.; MELIS, M.; PANAWENNAGE, D.; CHIARELLI, P.; FANELLI, R.; ZUCCATO, E. Identification of cocaine and its metabolites in urban wastewater and comparison with the human excretion profile in urine. **Water Res.**, v. 45, p. 5141-5150, jul. 2011.

CASTIGLIONI, S.; ZUCCATO, E.; CHIABRANDO, C.; FANELLI, R.; BAGNATI, R. Mass Spectrometric Analysis of Illicit Drugs in Wastewater and Surface Water. **Mass Spectrom. Rev.** v. 27, p. 378-394, abr. 2008.

CASTIGLIONI, S.; ZUCCATO, E.; CRISCI, E.; CHIABRANDO, C.; FANELLI, R.; BAGNATI, R. Identification and Measurement of Illicit Drugs and Their Metabolites in Urban Wastewater by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Anal. Chem.** v. 78, p. 8421-8429, dez. 2006.

DAUGHTON, C. G. In: DAUGHTON, C. G.; JONES-LEPP, T. L. (Eds.) **Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Scientific and Regulatory Issues.** Washington, D.C.: American Chemical Society, 2001, cap. 20, p. 348-364.

European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). **Assessing illicit drugs in wastewater – Potential and limitations of a new monitoring approach.** Luxemburgo, 2008b. 97 p.

_____. **2008 Annual Report: the state of the drug problem in Europe.** Lisbon, 2008a. 98 p.

_____. **2009 Annual Report: the state on the drug problem in Europe.** Lisbon, 2009. 99 p.

_____. **2010 Annual Report: the state of the drug problem in Europe**. Lisbon, 2010. 108 p.

FONTANALS, N.; MARCÉ, R. M.; BORRULL, F. On-line solid-phase extraction coupled to hydrophilic interaction chromatography-mass spectrometry for the determination of polar drugs. **J. Chromatogr. A.**, v. 1218, p. 5975-5980, set. 2011.

GHEORGHE, A.; VAN NUIJS, A.; PECCEU, B.; BERVOETS, L.; JORENS, P. G.; BLUST, R.; NEELS, H.; COVACI, A. Analysis of cocaine and its principal metabolites in waste and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 391, p. 1309-1319, dez. 2008.

GOLDSTEIN, R. A.; DESLAURIERS, C.; BURDA, A. M. Cocaine: History, Social Implications, and Toxicity – A Review. **Dis. Mon.**, v. 55, p. 6-38, jan. 2009.

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

<http://water.epa.gov/scitech/drinkingwater/labcert/upload/met539.pdf>, acessada em novembro 2012.

<http://www.caesb.df.gov.br/index.php/esgoto/conheca-as-unidades.html>, acessada em setembro 2012.

http://www.crianca.caop.mp.pr.gov.br/arquivos/File/publi/senad/glossario_de_alcool_drogas.pdf, acessada em maio 2012.

<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/default.shtm>, acessada em setembro 2012.

<http://www.portalaction.com.br/>, acessada em abril 2012.

HUERTA-FONTELA, M.; GALCERAN, M. T.; MARTIN-ALONSO, J.; VENTURA, F. Occurrence of psychoactive stimulatory drugs in wastewaters in north-eastern Spain **Sci. Total Environ.** v. 397, p. 31-40, fev. 2008a.

HUMMEL, D.; LÖFFLER, D.; FINK, G.; TERNES, T. A. Simultaneous Determination of Psychoactive Drugs and Their Metabolites in Aqueous Matrices by Liquid Chromatography Mass Spectrometry. **Environ. Sci. Technol.** v. 40, 7321-7328, nov. 2006.

JURADO, A.; MASTROIANNI, N.; VÁZQUEZ-SUÑÉ, E.; CARRERA, J.; TUBAU, I.; PUJADES, E.; POSTIGO, C.; LÓPEZ DE ALDA, M.; BARCELÓ, D. Drugs of abuse in urban groundwater. A case study: Barcelona. **Sci. Total Environ.** v. 424, p. 280-288, mai. 2012.

KASPRZYK-HORDERN, B.; DINSDALE, R. M.; GUWY, A. J. The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during

wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. **Water Res.** v. 43, p. 363-380, nov. 2009.

LAI, F. Y.; ORT, C.; GARTNER, C.; CARTER, S.; PRICHARD, J.; KIRKBRIDE, P.; BRUNO, R.; HALL, W.; EAGLESHAM, G.; MUELLER, J. F. **Water Res.** v. 45, p. 4437-4448, jun. 2011.

LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)**, São Carlos: Rima, 2004. 91 p.

LOCATELLI, M. A. F. **Avaliação da Presença de Antibióticos e Drogas Ilícitas na Bacia do Rio Atibaia**. 2011. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2011.

MALDANER, A. O., SCHMIDT, L. L., LOCATELLI, M. A. F., JARDIM, W. F., SODRÉ, F. F., ALMEIDA, F. V., PEREIRA, C. E. B., SILVA, C. M. Estimating Cocaine Consumption in the Brazilian Federal District (FD) by Sewage Analysis. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 23, n. 5, p. 861-867, 2012

MARTÍNEZ-BUENO, M. J.; UCLÉS, S.; HERNANDO, M. D.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Development of a solvent-free method for the simultaneous identification/quantification of drugs of abuse and their metabolites in environmental water by LC-MS/MS. **Talanta.** v. 85, p. 157-166, jul. 2011.

MATHIEU, C.; RIECKERMANN, J.; BERSET, J. D.; SCHÜRCH, S.; BRENNEISEN, R. Assessment of total uncertainty in cocaine and benzoylecgonine wastewater load measurements. **Water Res.** v. 45, p. 6650-6660, out. 2011.

MELIS, M.; CASTIGLIONI, S.; ZUCCATO, E. In: CASTIGLIONI, S.; ZUCCATO, E.; FANELLI, R. (Eds.) **Illicit Drug in the Environment: Occurrence, Analysis, and Fate Using Mass Spectrometry**. New Jersey: Wiley, 2011, cap. 2, p.31-52.

NUNES, L. M.; JÓLLUSKIN, G.; O uso de drogas: Breve análise histórica e social. **Revista da Faculdade de Ciências Humanas e Sociais.** 2007, 4, 230.

PEDROUZO, M.; BORRULL, F., POCURULL, E.; MARCÉ, R. M. Drugs of abuse and their metabolites in waste and surface waters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J. Sep. Sci.** v. 34, p. 1091-1101, fev. 2011.

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

POSTIGO, C.; LÓPEZ DE ALDA, M. J.; BARCELÓ, D. Fully Automated Determination in the Low Nanogram per Liter Level of Different Classes of Drugs of Abuse in Sewage Water by On-Line Solid-Phase Extraction-Liquid Chromatography-Electrospray-Tandem Mass Spectrometry. **Anal. Chem.** v. 80, p. 3123-3134, mai. 2008.

POSTIGO, C.; LÓPEZ DE ALDA, M.; BARCELÓ, D. Evaluation of drugs of abuse use and trends in a prison through wastewater analysis. **Environ. Int.**, v. 7, p. 49-55, jul. 2011.

Secretaria Nacional Antidrogas (SENAD). **II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país: 2005**. CEBRID - Centro Brasileiro de Informação sobre Drogas Psicotrópicas: UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo: São Paulo, 2006. 404 p.

SODRÉ, F. F.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. Sistema limpo para a extração em fase sólida de contaminantes emergentes em águas naturais. **Quim. Nova**. v. 33, n. 1, p. 216-219, 2010.

United Nations Office of Drug and Crime (UNODC). **The world drug report 2011**. Viena, 2011. 266 p.

_____. **The world drug report 2008**. Viena, 2008. 303 p.

_____. **The world drug report 2012**. Viena, 2012. 100 p.

VALCÁRCEL, Y.; MARTÍNEZ, F.; GONZÁLEZ-ALONSO, S.; SEGURA, Y.; CATALÁ, M.; MOLINA, R.; MONTERO-RUBIO, J. C.; MASTROIANNI, N.; LÓPEZ DE ALDA, M.; POSTIGO, C.; BARCELÓ, D. Drugs of abuse in surface and tap waters of the Tagus River basin: Heterogeneous photo-Fenton process is effective in their degradation. **Environ. Int.**, v. 41, p. 35-43, fev. 2012.

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

VAN NUIJS, A. L. N.; MOUGEL, J-F.; TARCOMNICU, I.; BERVOETS, L.; BLUST, R.; JORENS, P. G.; NEELS, H.; COVACI, A. Sewage epidemiology – A real-time approach to estimate the consumption of illicit drugs in Brussels, Belgium. **Environ. Int.**, v. 37, p. 612-621, jan. 2011b.

VAN NUIJS, A. L. N.; PECCEU, B.; THEUNIS, L.; DUBOIS, N.; CHARLIER, C.; JORENS, P. G.; BERVOETS, L.; BLUST, R.; NEELS, H.; COVACI, A. Spatial and temporal variations in the occurrence of cocaine and benzoylecgonine in waste- and surface water from Belgium and removal during wastewater treatment. **Water Res.** v. 43, p. 1341-1349, dez. 2009a.

VAN NUIJS, A. L. N.; PECCEU, B.; THEUNIS, L.; DUBOIS, N.; CHARLIER, C.; JORENS, P. G.; BERVOETS, L.; BLUST, R.; NEELS, H.; COVACI, A. Cocaine and metabolites in waste and surface water across Belgium. **Environ. Pollut.**, v. 157, p. 123-129, jul. 2009b.

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

WEINMANN, W.; RENZ, M.; VOGT, S.; POLLAK, S. Automated solid-phase extraction and two-step derivatisation for simultaneous analysis of basic illicit drugs in serum by GC/MS. **Int. J. Legal Med.** v. 113, p. 229-235, ago. 2000.

ZUCCATO, E.; CASTIGLIONI, S. Illicit drugs in the environment. **S. Philos. T R Soc. A.** v. 367, p. 3965-3978, 2009.

_____. In: CASTIGLIONI, S.; ZUCCATO, E.; FANELLI, R. (Eds.) **Illicit Drug in the Environment: Occurrence, Analysis, and Fate Using Mass Spectrometry.** New Jersey: Wiley, 2011, cap. 16, p.291-304.

ZUCCATO, E.; CHIABRANDO C.; CASTIGLIONI, S.; CALAMARI, D.; BAGNATI, R.; SCHIAREA, S.; FANELLI, R. Cocaine in surface waters: a new evidence-based tool to monitor community drug abuse. **Environ. Health-Glob.** v. 4, p. 14-20. ago. 2005.