



**UnB**

Instituto de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

Dissertação de Mestrado

**Estimativa do uso de cocaína e cannabis durante o Carnaval  
Brasiliense via Análise de Esgoto.**

Diogo de Jesus Soares Freire

Orientador: Prof. Dr. Fernando Fabrício Sodré

Coorientador: PCF Dr. Adriano Otávio Maldaner

Brasília DF, 2020

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiro à Deus, sem ele eu não seria nada.

Aos meus pais, pois além de serem meus heróis, tenho certeza que não importa o quanto eu caia, eu sei que eles sempre estarão lá para me ajudar.

Ao meu irmão Thiago, por ser meu conselheiro que nunca me falhou.

À minha irmãzinha Ana Carolina, que me ajudou diversas vezes em me animar sem nem saber.

À Ana Luíza, por me transformar em um homem melhor.

Ao meu grande orientador Fernando Fabríz Sodré, por me dar essa oportunidade única, pela compreensão e paciência que teve comigo, por ter me acalmado quando precisei, e pelos ensinamentos e ajudas ao longo desse trabalho.

Ao meu coorientador Adriano Otávio Maldaner, seu bom humor perpétuo é de tranquilizar até as mentes mais tempestuosas, além das excelentes dicas.

Aos membros da banca, Alexandre, Taís, Carlos e o Cyro por me ajudarem a melhorar o meu trabalho.

Ao Perito Criminal Federal, Lúcio, que me ensinou tudo o que sabia sobre o equipamento que usei e me permitiu utilizá-lo quando eu precisei.

Às queridas companheiras de laboratório, Manu e Hadassa, que me ensinaram tanto nessa área de química analítica que não sei se um dia poderei retribuir esse favor.

Ao grande Guilherme Borges, meu companheiro de mestrado, nós passamos por momentos difíceis durante o mestrado, mas pelo menos não estávamos sozinhos!

Ao Perito Criminal Federal Élvio Botelho por permitir que o meu tempo visitando o INC fosse o mais tranquilo possível.

Aos colegas de laboratório Fábio, Gabriel, Artur e muitos outros que me ajudaram.

À Equipe da CAESB que além de permitir a minha entrada, me auxiliou na coleta das amostras.

Aos melhores amigos que um homem poderia ter, João Lucas, Lucas Bigode, Matheus Veras, Bernardo, Tárik, Marcelo, Mateus da Cruz, Igor Bonomo e muitos outros.

À Capes e ao CNPQ, sem essas duas instituições teria sido impossível realizar este trabalho.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **Diogo de Jesus Soares Freire**, matrícula nº **18/0071807**, intitulada ***“Estimativa do uso de cocaína e cannabis durante o Carnaval Brasiliense via Análise de Esgoto”***, apresentada no (a) Auditório Azul do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 20 de fevereiro de 2020.

Prof. Dr. Fernando Fabriz Sodré  
Presidente de Banca

Prof. Dr. Alexandre Fonseca  
Membro Titular

Prof. Dr. Cyro Lucas Silva Chagas  
Membro Titular IQ/UnB

Prof. Dr. Carlos Martin Infante Cordova  
Membro Suplente

Em 20 de fevereiro de 2020.

**Estimativa do uso de cocaína e cannabis durante o Carnaval  
Brasiliense via Análise de Esgoto.**

Diogo de Jesus Soares Freire

Comissão julgadora da Dissertação para obtenção do grau de Mestre

---

Prof. Dr. Cyro Lucas Silva Chagas

---

Prof. Dr. Alexandre Fonseca

---

Prof. Dr. Carlos Martin Infante Cordova

Brasília (DF), 18 Dezembro de 2019

## Sumário

Agradecimentos .....	ii
Lista de Acrônimos.....	vii
Lista de Figuras .....	x
Lista de Tabelas.....	xiii
Resumo .....	xv
Abstract.....	xvi
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica .....	3
2.1. Epidemiologia do Esgoto .....	3
2.2. Drogas de abuso .....	6
2.2.1. Cannabis .....	6
2.2.2. Cocaína.....	11
2.3. Determinação de substâncias alvo em afluyente de esgoto.....	12
2.3.1. Amostragem .....	13
2.3.2. Preservação de amostras.....	13
2.3.3. Preparo de amostra .....	14
2.3.4. Quantificação das drogas de abuso alvo e seus metabólitos no esgoto.....	16
3. Objetivos.....	19
4. Materiais e desenvolvimento de método .....	20
4.1. Materiais.....	20
4.1.1. Solventes e cartuchos de extração em fase sólida .....	20
4.1.2. Padrões analíticos .....	20
4.1.3. Equipamentos e Acessórios.....	20
4.2. Desenvolvimento de método .....	21
4.2.1. Otimização dos parâmetros instrumentais.....	21
4.2.2. Método cromatográfico .....	23
4.2.3. Locais de amostragem e coleta.....	23
4.2.4. Método de extração em fase sólida .....	26
5. Resultados.....	28
5.1. Otimização dos parâmetros instrumentais.....	28
5.2. Separação Cromatográfica .....	33
5.3. Desempenho analítico .....	37
5.3.1. Linearidade das curvas analíticas .....	37
5.3.2. Detectabilidade .....	43
5.3.3. Precisão .....	44
5.3.4. Exatidão.....	45

5.4.	Quantificação dos analitos nas amostras de esgoto afluente .....	45
5.5.	Razão COC/BE e a procedência da cocaína do esgoto .....	47
5.6.	Consumo concomitante de álcool e cocaína.....	49
5.7.	Estimativa do consumo por habitante via EE.....	51
5.7.1.	Estimativa do consumo da população entre 15 e 64 anos .....	56
5.8.	Padrões de consumo dos usuários no período de Carnaval e no período subsequente.....	57
5.9.	Estimativa da carga diária de COC e THC para a população do DF .....	67
5.9.1.	Extrapolação das cargas diárias da população inteira do DF .....	68
6.	Conclusões.....	69
7.	Perspectivas .....	70
8.	Bibliografia.....	71

## Lista de Acrônimos

[M+H]<sup>+</sup> – Massa protonada

11-OH-THC – 11-hidroxi- $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol

ACN – Acetonitrila

AE - Anidroecgonina

AEME – Éster de Metilanidroecgonina

API – Atmospheric Pressure Ionization (Ionização a Pressão Atmosférica)

BE – Benzoilecgonina

BE D3 – Benzoilecgonina com três deutérios

*c* – Concentração do biomarcador no esgoto da droga de abuso em questão

*C* – Consumo da droga de abuso

CAESB – Companhia de Saneamento Ambiental do Distrito Federal

CBN – Canabinoides

CE – *Collision energy* (Energia de colisão)

CEP – *Collision cell entrance potential* (Potencial de entrada da cela de colisão)

COC – Cocaína

COC D3 – Cocaína com três deutérios

COE – Cocaetileno

COE D3 – Cocaetileno com três deutérios

CXP – *Collision cell exit potential* (Potencial de saída da cela de colisão)

DA – Dopamina

DF – Distrito Federal

DP – *Declustering potential* (Potencial de Desaglomeração)

DPa – Desvio Padrão

DQO – Demanda Química de Oxigênio

ECG – Ecgonina

EE – Epidemiologia do Esgoto

EEE – Ecgonina Etil Éster

EME – Éster Metilecgonina

EP – *Entrance Potential* (Potencial de Entrada)

ESI – *Electrospray Ionization* (Ionização por eletrospray)

ETE – Estação de Tratamento de Esgoto

*f* – Fator de correção proporcional à metabolização da droga de abuso

FM – Fase móvel

FIA – *Flow Injection Analysis* (Análise por injeção de fluxo)

FT – Fósforo Total

GHB – *Gamma Hydroxybutyrate* (ácido gama hidroxibutírico)

*hab* – Número de habitantes atendidos pela estação de tratamento de esgoto

HIV – *Human Immunodeficiency syndrome* (Vírus da imunodeficiência humana)

HLB – *Hydrophilic-lipophilic Balanced* (Equilíbrio hidrofílico-lipofílico)

INC – Instituto Nacional de Criminalística

$K_{ow}$  – *Octanol/Water partition coefficient* (coeficiente de partição octanol/água)

LSD – Lysergsäurediethylamid (Dietilamida do Ácido Lisérgico)

MDMA – Metilenodioximetanfetamina

MRM – *Multiple Reaction Monitoring* (Monitoramento de reações múltiplas)

MS – *Mass Spectrometer* (Espectrômetro de massa)

NCOC – Norcocaína

NCOE – Norcoetilenol

NIDA – *National Institute of Drug and Abuse* (Instituto Nacional do Abuso de Drogas)

PET – *Polyethylene terephthalate* (Polietileno Tereftalato)

PF – Polícia Federal

pH – Potencial hidrogeniônico

PTFE – *Polytetrafluoroethylene* (Politetrafluoretileno)

PVDF – *Polyvinylidene Fluoride* (Fluoreto de polivinilideno)

QI – Quociente de inteligência

QqQ – *Triple Quadrupole hybrid mass spectrometer* (Espectrômetro de massa híbrido do tipo triplo quadrupolo)

QToF – *Quadrupole in tandem with Time of Flight hybrid mass spectrometer* (Espectrômetro de massa híbrido do tipo quadrupolo com tempo de voo)

$Q_v$  – Vazão volumétrica do esgoto afluente da estação de tratamento de esgoto

rpm – Rotações por Minuto

SNC – Sistema Nervoso Central

SPE – *Solid Phase Extraction* (Extração em Fase Sólida)

SRM – *Selective Reaction Monitoring* (Monitoramento de reação seletiva)

SVS/MS – Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde

THC –  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol

THC D3 –  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol com três deutérios

THC-COOH – 11-nor-9-carboxi- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol

THC-COOH D3 – 11-nor-9-carboxi- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol com três deutérios

UNODC – *United Nations Office on Drug and Crime* (Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime)

UPLC – *Ultra Performance Liquid Chromatography* (Cromatógrafo líquido de ultra performance)

UPLC-MS/MS – *Ultra Performance Liquid Chromatography coupled with a in tandem mass spectrometer* (Cromatografia líquida de ultra performance acoplado a espectrometria de massa em tandem)

UPLC-QqQ – *Ultra Performance Liquid Chromatography coupled with a in tandem triple quadrupole mass spectrometer* (Cromatógrafo líquido de ultra performance acoplado ao espectrômetro de massa em tandem do tipo triplo quadrupolo)

## Lista de Figuras

Figura 1: Diagrama demonstrando os passos da Epidemiologia do esgoto (Adaptado de EMCDDA, 2018a).....	4
Figura 2: Consumo médio em mg/1000habitantes/dia de cocaína em diversas cidades da Europa (Adaptado de EMCDDA, 2018a).....	5
Figura 3: Prevalência anual em porcentagem do uso de Cannabis em 2016 (UNODC, 2018).....	7
Figura 4: Estrutura química com a nuvem eletrônica da Anandamida (endocanabinoide) à esquerda, e do THC (canabinoide) à direita (Adaptado de NIDA, 2018). ....	8
Figura 5: Via de metabolismo do THC (Adaptado de Gracia-Lor et al., 2016).....	9
Figura 6: Vias metabólicas da cocaína (Adaptado de EMCDDA, 2008). Abreviações: AE (Anidroecgonina); AEME (Anidroecgonina metil-éster); BE (Benzoilecgonina); COE (cocaetileno); ECG (ecgonina); EEE (ecgonina etil éster); EME (éster metilecgonina); NCOE (nor-cocaetileno); NCOC (nor-cocaína).....	12
Figura 7: Sorvente que preenche o cartucho de extração em fase sólida Oasis HLB. ...	15
Figura 8: Esquema geral de uma cromatógrafo líquido acoplado a um espectrômetro de massa (Adaptado de Norena-Caro, 2017).....	16
Figura 9: Esquematização da fonte Ionizadora Turbo V™ ESI da Sciex que faz a interface entre o cromatógrafo líquido e o espectrômetro de massa (Sciex, 2017).....	17
Figura 10: Esquematização básica de uma fonte de ionização por Eletrospray (ESI). ..	18
Figura 11: Esquema de diferentes Analisadores de Massas. ....	19
Figura 12: Esquematização do processo criado para a otimização de qualquer composto no UPLC-MS/MS utilizado. ....	21
Figura 13: Localização das ETES Sul e Norte do DF e as áreas atendidas por estas (da Silva et al., 2018).....	24
Figura 14: Amostrador automático utilizado pelos técnicos da CAESB para coleta de amostras nas ETES.....	25
Figura 15: Sistema de extração <i>manifold</i> utilizado para realizar a extração em fase sólida.....	27
Figura 16: Sistema de eluição <i>manifold</i> utilizado para realizar a eluição dos analitos. .	27
Figura 17: As razões <i>m/z</i> dos quatro íons produto mais intensos de todos os analitos e seus análogos deuterados.....	29

Figura 18: Cromatograma do XIC de cada analito e do TIC.....	34
Figura 19: Curva analítica da BE com padronização interna pela BE D3. ....	37
Figura 20: Curva analítica da COC com padronização interna pela COC D3. ....	38
Figura 21: Curva analítica do COE com padronização interna pela COE D3. ....	38
Figura 22: Curva analítica do THC-COOH com padronização interna pelo THC-COOH D3. ....	39
Figura 23: Curva analítica do THC com padronização interna pelo THC D3. ....	39
Figura 24: Curva analítica da BE com padronização interna pela BE D3. ....	41
Figura 25: Curva analítica da COC com padronização interna pela COC D3. ....	41
Figura 26: Curva analítica do COE com padronização interna pelo COE D3. ....	42
Figura 27: Curva analítica do THC-COOH com padronização interna pelo THC-COOH D3. ....	42
Figura 28: Projeção Boxplot dos valores obtidos da razão COC/BE das ETEs Norte e Sul.....	48
Figura 29: Gráfico das razões COC/BE obtidas de cada dia em que as amostras foram analisadas de cada estação de tratamento. ....	49
Figura 30: Gráfico Boxplot dos valores obtidos das razões COE/BE das ETEs Norte e Sul.....	50
Figura 31: Gráfico das razões COE/BE obtidas de cada dia em que as amostras foram analisadas de cada estação de tratamento. ....	51
Figura 32: Faixa de consumo da droga de abuso cannabis em g/dia/1000hab na ETE Norte, levando em consideração as porcentagens usuais de THC presentes na droga... 54	
Figura 33: Faixa de consumo da droga de abuso cannabis em g/dia/1000hab na ETE Sul, levando em consideração as porcentagens usuais de THC presentes na droga. .... 55	
Figura 34: Consumo da droga de abuso cocaína em g/dia/1000hab nas ETEs Norte e Sul, levando em consideração a porcentagem média de pureza da cocaína..... 55	
Figura 35: Consumo de THC entre os dias 01/03/2019 e 15/03/2019 em mg/dia/1000hab .....	58
Figura 36: Comparação dos perfis semanais de consumo encontrados neste estudo e estudos realizados em outros países por Bijlsma et al., 2016; Lai et al., 2011; Tschärke et al., 2016; e Zuccato et al., 2016.....	59

Figura 37: Consumo de COC entre os dias 01/03/2019 e 15/03/2019 em mg/dia/1000hab .....	60
Figura 38: Perfis semanais de consumo descobertos neste estudo em comparação com perfis semanais de consumo das mesmas comunidades descoberto em estudos prévios realizados pelo nosso grupo(da Silva et al., 2018; Sodré et al., 2018).....	61
Figura 39: Perfis semanais de consumo descobertos neste estudo em comparação com os perfis semanais descobertos em diversos estudos realizados em países distintos (EMCDDA, 2019d; Tscharke et al., 2016).....	61
Figura 40: Gráfico que demonstra as diferenças entre os padrões de consumo de THC durante o período Carnaval e o período subsequente (em mg/dia/1000hab). .....	62
Figura 41: Gráfico que demonstra as diferenças entre os padrões de consumo de COC durante o período de Carnaval e o período subsequente (em mg/dia/1000hab).....	63
Figura 42: Comparação dos resultados obtidos neste estudo com os resultados dos valores obtidos da estimativa do consumo de THC por EE de anos anteriores em uma ETE de Barcelona (ES). Dose = 125mg de THC .....	64
Figura 43: Comparação dos resultados obtidos neste estudo com os resultados dos valores obtidos da estimativa do consumo de THC por EE de anos anteriores em uma ETE de Barcelona (ES). Dose = 100mg de COC .....	64
Figura 44: Comparação dos resultados obtidos neste estudo com os resultados dos valores obtidos da estimativa do consumo de THC por EE de anos anteriores em Zagreb (HR). Dose = 125mg THC .....	65
Figura 45: Comparação dos resultados obtidos neste estudo com os resultados dos valores obtidos da estimativa do consumo de COC por EE de anos anteriores em Zagreb (HR). Dose = 30mg de COC .....	65
Figura 46: Comparação dos resultados de diversos estudos realizados no DF que utilizaram a EE para estimar o consumo de COC em mg/dia/1000hab (da Silva et al., 2018; Maldaner et al., 2012; Sodré et al., 2017). .....	66
Figura 47: Comparação entre os resultados da média das estimativas de consumo de COC (mg/dia/1000hab) deste estudo e os resultados obtidos dos estudos realizados em diversas cidades da Europa (EMCDDA, 2019d).....	66
Figura 48: Média das cargas diária de COC em g dia <sup>-1</sup> durante o período de Carnaval e o período subsequente das ETEs Norte e Sul. ....	67
Figura 49: Média das cargas diária de THC em g dia <sup>-1</sup> durante o período de Carnaval e o período subsequente das ETEs Norte e Sul. ....	68

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Média das porcentagens de excreção do tetrahydrocannabinol $\pm$ DPa e seus metabolitos na urina para vias de administrações diferentes (Adaptado de Gracia-Lor et al., 2016).....	10
Tabela 2: Média das porcentagens de excreção do tetrahydrocannabinol $\pm$ DPa e seus metabolitos em fezes para as diferentes vias de administração (Adaptado de Gracia-Lor et al., 2016).....	10
Tabela 3: Características das Estações de Tratamento de Esgoto Sul e Norte (CAESB, 2019).....	24
Tabela 4: Vazão do esgoto na estação de tratamento nos dias em que as coletas foram realizadas. ....	26
Tabela 5: Parâmetros otimizados para cada analito e seus respectivos íons-produto mais intensos. ....	32
Tabela 6: Valores dos parâmetros da fonte de ESI otimizados para o THC. ....	32
Tabela 7: Valores dos parâmetros do método cromatográfico otimizados. ....	33
Tabela 8: Tempo de retenção de cada composto. ....	36
Tabela 9: Parâmetros obtidos do método cromatográfico novo exclusivo para THC-COOH.....	37
Tabela 10: Tempos de retenção do novo método cromatográfico específico para o THC-COOH.....	37
Tabela 11: Parâmetros calculados das curvas analíticas. ....	40
Tabela 12: Parâmetros das novas curvas analíticas geradas.....	43
Tabela 13: Valores de LOD e LOQ de cada composto.....	44
Tabela 14: Coeficientes de variação (em %, n = 3) para as soluções padrões usadas na construção de curvas analíticas com padronização interna. Faixa de trabalho superior. ....	44
Tabela 15: Coeficientes de variação (em %, n = 3) para as soluções padrões usadas na construção de curvas analíticas com padronização interna. Faixa de trabalho inferior. ....	44
Tabela 16: Concentrações das substâncias alvo quantificadas (em ng L <sup>-1</sup> ) nas amostras coletadas durante o período de Carnaval de 2019 e o período subsequente das estações de tratamento norte e sul.....	46
Tabela 17: Estimativa do consumo de COC e THC (em mg/dia/1000hab) do período de carnaval e do período subsequente da população atendida pelas estações de tratamento norte e sul do DF. ....	52

Tabela 18: Cálculo da estimativa do uso das drogas de abuso a partir da sua pureza em g/dia/1000 hab de todos os dias que foram avaliados. .... 53

Tabela 19: Estimativa do consumo de COC e THC (em mg/dia/1000hab) Considerando a população na faixa etária entre de 15 a 64 anos atendida pelas estações de tratamento norte e sul do DF. .... 56

Tabela 20: Cálculo da média das cargas diária dos habitantes atendidos pelas ETEs Sul e Norte e da extrapolação para os habitantes do DF durante o período de Carnaval e período subsequente. .... 69

## Resumo

A epidemiologia do esgoto tem sido aplicada no Distrito Federal para estimar o consumo de cocaína. Porém, a determinação de biomarcadores da cannabis exige condições diferenciadas de preparo de amostras. Este trabalho buscou desenvolver um método analítico baseado em UPLC-MS/MS para quantificar  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol (THC) e 11-nor-9-carboxi- $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol (THC-COOH), além de avaliar a quantificação concomitantemente de cocaína (COC), benzoilecgonina (BE) e cocaetileno (COE). Parâmetros baseados em MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) foram obtidos visando a melhor detectabilidade para canabinoides. A análise cromatográfica distinta de cocaínicos e canabinoides foi a melhor estratégia para quantificação do THC-COOH, metabólito usado para estimar o consumo de cannabis. Amostras compostas de esgoto (24h) foram coletadas na afluência das estações de tratamento Brasília Norte (ETEN) e Sul (ETES) durante 15 dias consecutivos (01/03 a 15/03/2019), incluindo o período de Carnaval (um evento festivo). Alíquotas (100 mL) foram enriquecidas com análogos deuterados (*surrogates*), filtradas (0,45  $\mu$ m), passadas por cartuchos de extração em fase sólida (HLB Oasis 500 mg), reconstituídas em metanol, evaporadas, ajustadas a 1,0 mL (água:metanol 20:80, v/v) e filtradas novamente (PVDF 0,2  $\mu$ m). Com exceção do THC, foi possível quantificar os demais analitos após um único preparo de amostra. Estimou-se um consumo médio de cocaína de 2524 e 2154 mg/dia/1000hab pela a população atendida pelas ETEN e ETES (15 a 64 anos), respectivamente. Embora comparáveis aos obtidos previamente no DF, estes valores são maiores aos observados em outros países. Para a cannabis, estimou-se um consumo médio de 17004 e 7274 mg/dia/1000hab (15 a 64 anos) nas regiões cobertas pelas ETEN e ETES, respectivamente. O consumo na região Norte foi comparável ao observado em outros países. Observou-se maior consumo de cannabis e cocaína no período do Carnaval (33,5% e 66,6%, respectivamente) em comparação ao período subsequente. Ao contrário do esperado, não foi observado aumento no consumo de cocaína no fim de semana seguinte ao Carnaval, indicando alteração do perfil de consumo ou redução de oferta. No caso da cannabis, com exceção do período de Carnaval, a ausência de tendência temporal é corroborada por relatos da literatura indicando consumo constante e independente do dia da semana.

Palavras-chave: Canabinoides, cannabis, cocaínicos, epidemiologia do esgoto, desenvolvimento de método, tetrahydrocannabinol, carboxi-tetrahydrocannabinol, cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno.

## Abstract

The wastewater-based epidemiology has been applied at the Brazilian Federal District (FD) to estimate cocaine consumption. However, the determination of cannabis biomarkers requires unique sample preparation steps. This study aimed the development of an analytical method based on UPLC-MS/MS to quantify  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC) and 11-nor-9-carboxy- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC-COOH), with the concomitant quantification of cocaine (COC), benzoylecgonine (BE) and cocaethylene (COE). Multiple Reaction Monitoring parameters were obtained to improve the detectability of the cannabinoids in the MS/MS system. Distinct chromatographic and MRM analyses for cocainics and cannabinoids were essential to the successful quantification of THC-COOH, the THC metabolite used to estimate cannabis use. Raw wastewater composite samples (24h) were collected in the entrance of Brasília Norte and Brasília Sul wastewater treatment plants (N-WWTP and S-WWTP, respectively) for 15 consecutive days (03/01 to 03/15/2019), including the Carnival holliday. Aliquots (100 mL) were enriched with isotope-labeled standards (surrogate), filtered (0.45  $\mu\text{m}$ ), extracted using solid phase extraction (HLB Oasis 500mg, Waters), reconstituted in methanol, evaporated, adjusted to 1.0 mL (water:methanol 20:80, v/v) and filtered again (PVDF 0.2  $\mu\text{m}$ ). With the exception of THC, all analytes were assessed in the samples after a single extraction step. The average cocaine consumption was 2524 and 2154 mg/day/1000hab for the population served by N-WWTP and S-WWTP (15 to 64 years), respectively. Although comparable with previously results obtained in FD, these values are much higher than the ones observed in other countries. For cannabis, the average consumption was 17004 e 7274 mg/day/1000hab (15 to 64 years) in the regions covered by N-WWTP and S-WWTP, respectively. The consumption in the north region was comparable to other countries. A higher consumption of cannabis and cocaine was observed during the Carnival period (33.5% and 66.6%, respectively) compared to the subsequent period. Unexpectedly, the consumption of cocaine did not increase during weekend after the Carnival period, indicating alteration on the consumption pattern or reduction of drug supply. For cannabis, besides the Carnival period, the absence of a temporal trend indicates a constant consumption during the week, as seen in other studies.

Key-words: Cannabinoids, cannabis, cocainics, wastewater-based epidemiology, method development, tetrahydrocannabinol, carboxy-tetrahydrocannabinol, cocaine, benzoylecgonine, cocaethylene.

## **1. Introdução**

Em 2017 cerca de 271 milhões de pessoas (aumento de 30% desde 2009), ou 5.5% da população global com idades entre 15 e 64 anos, usaram drogas de abuso – substâncias com capacidade de alterar funções do Sistema Nervoso Central (SNC) – ao menos uma vez, e dessas pessoas, aproximadamente 42 milhões perderam suas vidas saudáveis (morte ou doenças) devido ao uso de drogas, 35 milhões sofrem de transtorno devido ao uso de substâncias, e em torno de 585 mil pessoas morreram por consequência do consumo de drogas de abuso em 2017 (um aumento de 30% desde 2015) (UNODC, 2019a).

O uso de drogas de abuso além de impactar de modo negativo o bem-estar e a saúde dos usuários e pessoas ao seu redor, também é uma ameaça concreta para a estabilidade, segurança, economia e desenvolvimento social de regiões inteiras (Causanilles et al., 2017), portanto, relatórios visando a estimativa de consumo pela comunidade são imprescindíveis para a alocação de recursos governamentais, principalmente os relacionados a segurança pública.

Atualmente, a maioria dos relatórios com estimativa de consumo de drogas de abuso por comunidades se baseiam em pesquisas feitas por questionários, dados de apreensões, overdoses e hospitalizações (UNODC, 2018). O problema desses métodos é a presença de diversas incertezas, já que os questionários dependem da honestidade de quem responde e da possibilidade do desconhecimento do produto realmente consumido, além disso, os dados de apreensão não refletem a quantidade total das drogas ilícitas – as drogas de abuso proscritas no Brasil são definidas pela portaria N° 344/98 SVS/MS – em circulação no país, pois a probabilidade da apreensão total das drogas ilícitas em circulação é ínfima, e por fim, apenas uma pequena parcela dos usuários consome droga o suficiente para haver overdose ou necessidade de hospitalização. Haja vista esses problemas, há uma clara necessidade de alguma fonte de dados sobre consumo de droga mais objetiva e mais eficiente para obter uma melhor estimativa do consumo de drogas de abuso, tanto as lícitas, como benzodiazepinas, quanto ilícitas, como cannabis e cocaína.

Pela primeira vez, em 2001, a análise de substâncias químicas presentes no esgoto foi sugerida como um novo método não intrusivo para avaliar tanto o consumo de drogas ilícitas quanto o uso indevido de fármacos a partir de efluentes gerados por

uma determinada população (Daughton, 2001). Esse método é denominado como Epidemiologia do Esgoto (EE) e envolve a amostragem de uma fonte de esgoto, comumente o afluente da estação de tratamento de esgoto (ETE), e a análise dessa amostra permite com que seja possível o cálculo da estimativa do consumo de drogas de abuso da comunidade ao quantificar os níveis dos biomarcadores de interesse de cada droga que são excretados pela urina (Zuccato et al., 2008).

Em anos mais recentes, a EE tem sido aplicada com sucesso por diversos grupos de pesquisa tanto em locais de pequena escala, como escolas (Zuccato et al., 2017), quanto em locais de grande escala, como cidades (EMCDDA, 2019a). Os resultados de diversos estudos que utilizaram a EE para estimar o consumo de drogas de abuso por uma determinada comunidade mostraram que essa ferramenta é promissora como método complementar às ferramentas convencionais que atualmente são utilizadas para estimar este consumo, por isso, os resultados obtidos a partir da EE foram utilizados no Relatório Mundial sobre Drogas de 2017 publicado pelo escritório das nações unidas sobre drogas e crime (UNODC do inglês *United Nations Office on Drugs and Crime*) e no Relatório de Drogas da Europa de 2019 publicado pelo Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência (EMCDDA do inglês *European Monitoring Centr for Drugs and Drug Addiction*) (EMCDDA, 2018; UNODC, 2017). Ainda mais, a EE fornece informações geográficas e temporais dos padrões de consumo de drogas em tempo real, ou *quasi*-real (Feitosa et al., 2013), informações que permitem ao governo alocar recursos públicos com mais eficiência.

A abordagem quantitativa dos compostos alvo e seus metabólitos é muito bem estabelecida para estimar o consumo de cocaína, anfetamina, metanfetamina e 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), porém, ao contrário dessas substâncias, a estimativa do uso de cannabis utilizando EE é extremamente problemática (Causanilles et al., 2017; EMCDDA, 2016). As dificuldades incluem um coeficiente de partição octanol/água ( $K_{ow}$ ) alto (em relação às substâncias supracitadas) (Feitosa et al., 2013); baixa taxa de excreção do metabólito primário, utilizado como marcador, da substância psicoativa da cannabis; o fato da farmacocinética das substâncias da cannabis não ser muito bem elucidada; a possível perda de analitos por sorção de substâncias nos grupos silanóis presentes na superfície de materiais de vidro; e a sorção de substâncias de interesse no biofilme e no material particulado ao longo do transporte no esgoto. Estas dificuldades demandam um preparo das amostra e um tratamento de dados diferenciado em comparação às demais substâncias (Causanilles et al., 2017).

Enquanto que métodos voltados a estimar o consumo de cocaína e estimulantes anfetamínicos já são operacionalmente definidos no âmbito das atividades do Laboratório AQQUA do Instituto de Química da UnB, a quantificação de substâncias canabinoides no esgoto ainda não foi conseguida de maneira satisfatória. Assim, este trabalho busca acessar os níveis de  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol e 11-nor-9-carboxy- $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol que corresponde à substância psicoativa da cannabis e seu biomarcador, respectivamente, e concomitantemente a quantificação das substâncias cocaínicas comumente investigadas em trabalhos anteriores desenvolvidos no Laboratório AQQUA. O desenvolvimento de método analítico para determinação simultânea de substâncias cocaínicas e canabinoides possibilita estimar o consumo de cannabis, e cocaína, além de acessar a fração de cocaína consumida junto com álcool. O método foi aplicado para amostras coletadas antes, durante e depois do feriado de Carnaval de 2019.

## **2. Revisão Bibliográfica**

### **2.1. Epidemiologia do Esgoto**

Epidemiologia do Esgoto é uma estratégia que envolve a análise de amostras do esgoto, obtidas a partir do afluente da ETE que atende a população alvo, com o intuito de quantificar os biomarcadores das drogas de abuso de interesse. A EE possui o potencial de monitoramento, em tempo *quasi-real*, das tendências de consumo de drogas da população alvo, o que é uma informação valiosa para políticas públicas que visam esta população. A Figura 1 esquematiza as etapas desta estratégia.

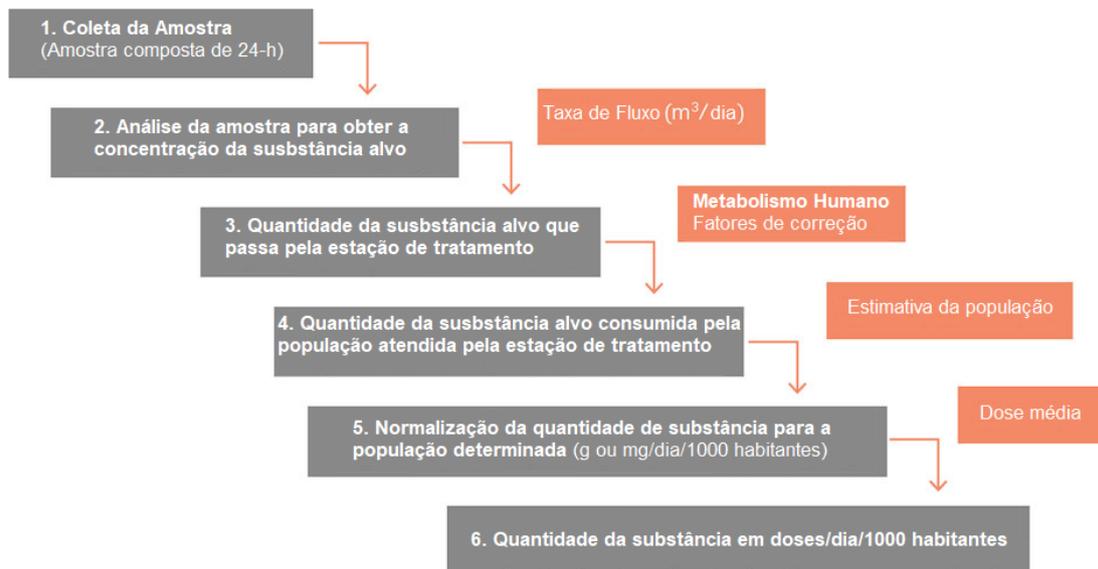


Figura 1: Diagrama demonstrando os passos da Epidemiologia do esgoto (Adaptado de EMCDDA, 2018a).

A EE consiste em diversos passos: Primeiro, a amostragem é feita a partir da coleta de diversas amostras ao longo de 24 h para gerar uma amostra composta representativa do dia; segundo, analisam-se as amostras compostas obtidas para quantificar os biomarcadores de interesse e suas concentrações são mensuradas; terceiro, o valor mensurado das concentrações das substâncias alvo são multiplicadas pela taxa de fluxo diário do esgoto para se obter a quantidade total diária da substância alvo presente no esgoto; quarto, o fator de correção calculado para cada biomarcador é aplicado ao valor da quantidade total diária para obter o consumo total diário da substância alvo; quinto, a quantidade total diária é dividida pela estimativa do número de pessoas que geraram aquele esgoto, no caso da estação de tratamento basta utilizar o número de pessoas que a ETE atende; por fim, o sexto passo é opcional mas preferível, transformar o consumo de mg/dia/1000hab para doses/dia/1000hab. Seguindo esse método se obtém um valor de consumo per capita que facilita a comparação entre comunidades (EMCDDA, 2019b).

A EE já foi aplicada para comunidades grandes, como bairros e cidades (Feitosa et al., 2013; Krizman-Matasic et al., 2019; Thomas et al., 2012), e também já foi aplicado em comunidades de pequeno porte, como prisões (Postigo et al., 2011) e escolas (Zuccato et al., 2017). Em todos estes estudos, a EE mostrou ser um método complementar importante aos métodos convencionais de estimativa de consumo de drogas ilícitas (EMCDDA, 2019c, 2018). Além disso, esse método mostrou-se eficaz em demonstrar a contribuição de eventos festivos – como carnaval, copa do mundo,

início do semestre acadêmico e dia da independência – para a mudança de tendências ou padrões do consumo de drogas de abuso durante este período (Foppe et al., 2018; Sodré et al., 2017). A Figura 2 mostra o consumo médio diário medido por EE de algumas cidades da Europa.

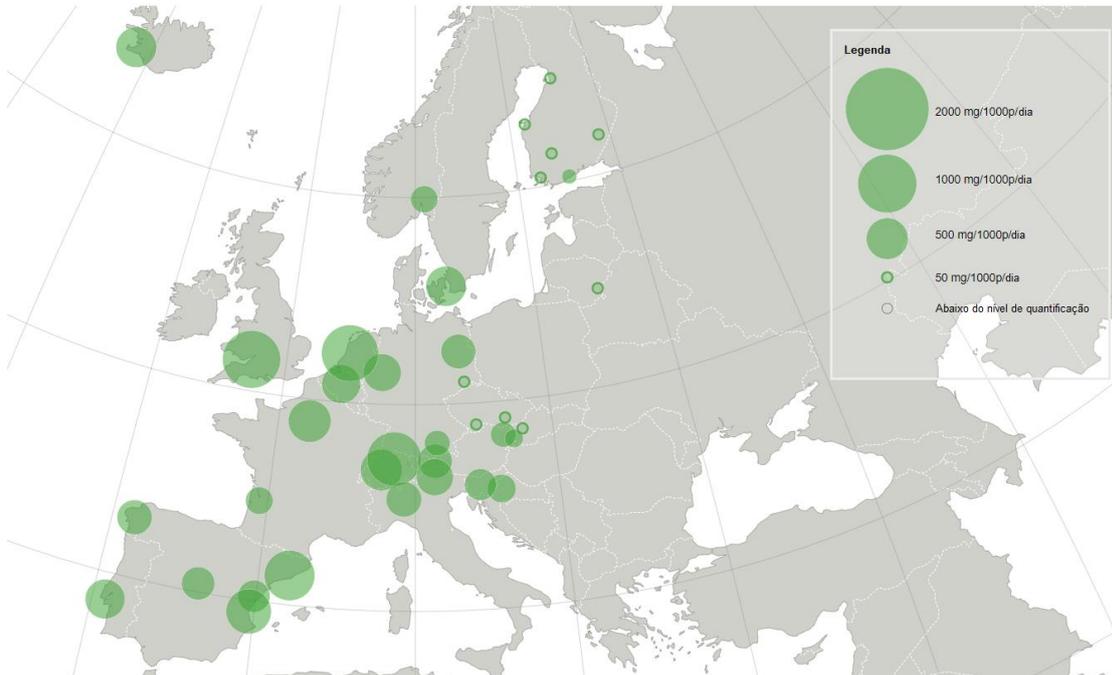


Figura 2: Consumo médio em mg/1000habitantes/dia de cocaína em diversas cidades da Europa (Adaptado de EMCDDA, 2018a)

Uma vez que a concentração da substância alvo é descoberta, esse valor é utilizado para calcular o consumo da droga de abuso ( $C$ ), através da Equação 1 mostrada abaixo.

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

Para calcular o consumo, a equação supracitada se embasa na concentração da substância alvo no esgoto ( $c$ , em  $\text{mg L}^{-1}$ ), na vazão volumétrica do esgoto afluyente da ETE ( $Q_v$  em  $\text{L dia}^{-1}$ ), no fator de correção ( $f$ ) que se baseia na divisão da razão entre a substância psicoativa e o seu biomarcador pela taxa de excreção de seu biomarcador e por fim no número de habitantes ( $hab$ ) atendidos pela ETE (Feitosa et al., 2013).

Para o estudo em questão as drogas de abuso alvo são a cannabis e a cocaína, sendo que o biomarcador utilizado para o cálculo retroativo do consumo a partir da EE são, respectivamente, THC-COOH e BE, além disso o COE será quantificado para avaliar o uso concomitante da cocaína com álcool.

## **2.2. Drogas de abuso**

Droga é um termo genérico que se dá a qualquer substância capaz de alterar o funcionamento normal do corpo, essas substâncias podem ser separadas em lícitas, as que não são proscritas, e ilícitas, as que têm o uso proscrito. As drogas de abuso são as drogas utilizadas de maneira ou quantidade não contempladas pelo previsto na medicina, podendo gerar dependência ou vício do usuário. As drogas de abuso podem ser separadas em cinco classes: narcóticos, depressores, estimulantes, alucinógenos e anabolizantes (DEA, 2017).

A cannabis é uma droga de abuso produzida a partir da planta *Cannabis Sativa L.* e não se encaixa em nenhuma dessas classes supracitadas, portanto há uma classe exclusiva para essa droga de abuso ilícita. A cannabis é uma droga capaz de alterar o SNC do usuário, porém de forma mais branda e de forma distinta das drogas de abuso das outras classes. Já a cocaína pertence ao grupo de estimulantes, substâncias simpatomiméticas, que causam aumento do rendimento físico e mental, aumento do estado de alerta, diminuição de apetite, aumento da autoestima e da sensação de satisfação (DEA, 2017).

### **2.2.1. Cannabis**

Cannabis é termo genérico que se refere aos vários produtos derivados da planta *Cannabis sativa L.* sendo que o produto mais comum é uma mistura das folhas, flores e caule secos desta planta, que possui uma coloração esverdeada. Essa droga pode ser consumida de diversas formas, fumando ao enrolar à mão no formato de cigarros, no cachimbo, cachimbo de água – mais conhecido como hookah, arguile, narguilé ou shisha – e vaporizadores; bebido como chá – geralmente nos casos quando a cannabis é usada com fins medicinais – ou comido ao misturar com comestíveis, comumente bolo, brownie, cookies ou doces (NIDA, 2018). Além disso, existem formas mais fortes de cannabis, como resinas concentradas – contendo altas concentrações dos princípios ativos da cannabis – de alta viscosidade, conhecida como óleo de haxixe ou simplesmente haxixe, apesar de não ser muito comum no Brasil, possui uma prevalência pronunciada na Europa, África Setentrional e Oriente Médio (NIDA, 2018; UNODC, 2018).

Cannabis foi a droga mais consumida em 2017, com 188 milhões de usuários entre 15 e 64 anos que consumiram ao menos uma vez no ano, o que equivale a 3,8% da população nessa faixa etária. A Figura 3 mostra as melhores estimativas das prevalências, em porcentagem, do uso de cannabis em cada país. Apesar de um declínio de 2,1% no número de usuários de cannabis entre 2016 e 2017, ainda houve um aumento de 30% do número de usuários entre 1998 e 2017. Em contrapartida, houve um declínio mundial de 27% na apreensão global da erva cannabis, para 4.386 toneladas, em 2016, esse declínio na apreensão foi principalmente na América do Norte, onde há disponibilidade de cannabis medicinal em diversas localidades e a legalização do uso recreativo de cannabis em vários estados do Estados Unidos da América, o que pode explicar em parte esse declínio (UNODC, 2018).

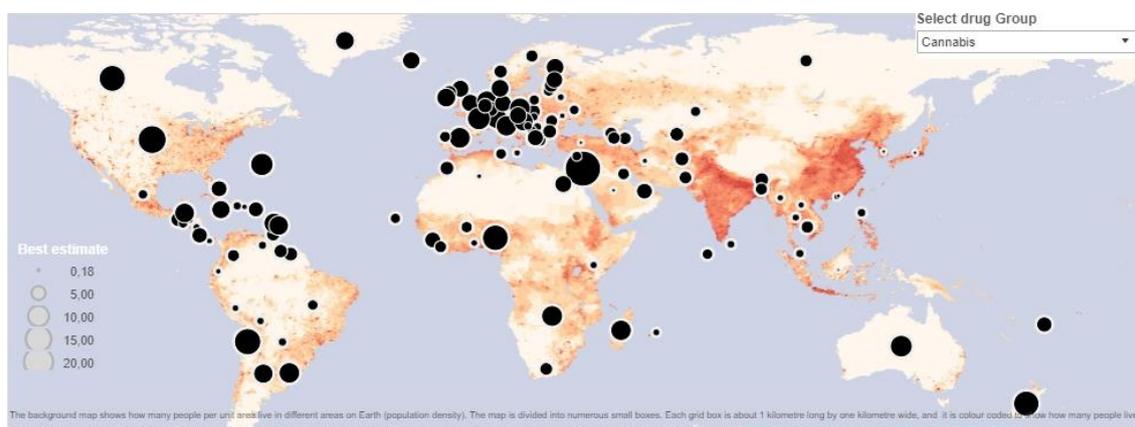


Figura 3: Prevalência anual em porcentagem do uso de Cannabis em 2016 (UNODC, 2018).

A principal substância psicoativa – substância capaz de atuar no SNC – da cannabis é o  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC), substância presente principalmente na resina das folhas e flores. Além de conter o THC ainda possuem mais 500 outras substâncias químicas, incluindo 100 compostos da mesma classe do THC, os CBN, como o canabinol e o canabidiol (NIDA, 2018).

Quando a cannabis é fumada, o THC e as outras substâncias da planta vão para o pulmão, são absorvidos pelos alvéolos e entram na corrente sanguínea produzindo efeitos quase que imediatos. Caso seja consumida na forma de comida ou bebida os efeitos são produzidos entre 30 min e 1 hora, pelo fato de passar pelo trato gastrointestinal. Os efeitos incluem euforia e tranquilidade, mas em alguns casos, normalmente quando o consumo é de grandes quantidades, os usuários podem sentir ansiedade, medo, paranoia ou pânico (NIDA, 2018).

O THC possui uma estrutura muito similar à da anandamida, um neurotransmissor da família dos CBN endógenos, a Figura 4 demonstra a similaridade das nuvens eletrônicas entre o THC e a anandamida, por conta dessa similaridade, o THC consegue ativar esses receptores, interrompendo o funcionamento normal do sistema endocanabinoide (NIDA, 2018). Os CBN endógenos se ligam aos receptores canabinoides que estão presentes em locais no cérebro que influenciam prazer, memória, pensamento, concentração, locomoção, coordenação motora, e percepção sensorial e temporal. Ao consumir cannabis os efeitos negativos de curto prazo incluem a paranoia e psicose – em doses elevadas – e o comprometimento da memória de curto prazo, da coordenação motora e da capacidade de julgamento; os efeitos negativos de longo prazo incluem o desenvolvimento cerebral alterado, risco de desenvolver psicose crônica aumentada, capacidade cognitiva comprometida – o quociente de inteligência (QI) de consumidores crônicos na adolescência diminui –, sintomas de bronquite crônica, diminuição da satisfação com a vida e conquistas, e um menor desempenho educacional, com aumento da probabilidade de abandono escolar (Volkow et al., 2014).

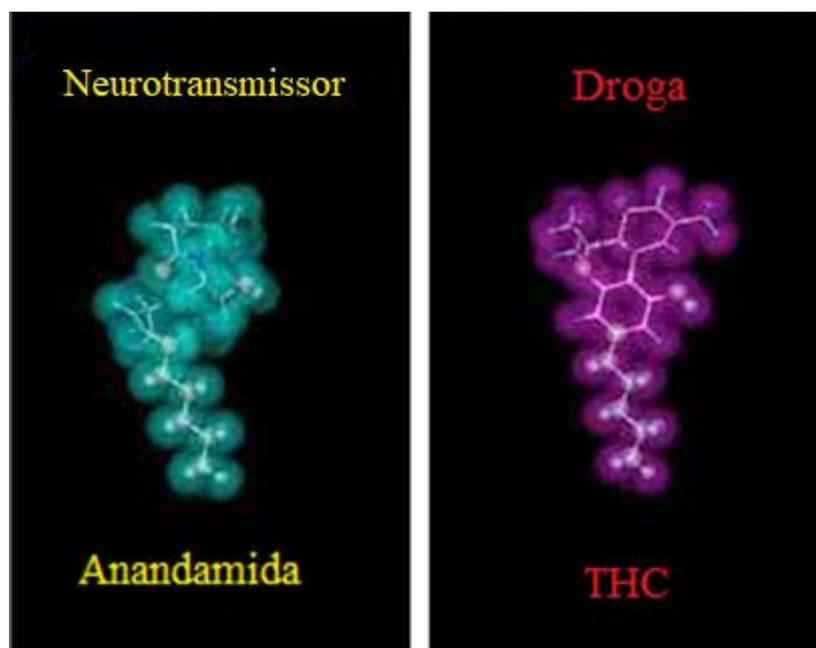


Figura 4: Estrutura química com a nuvem eletrônica da Anandamida (endocanabinoide) à esquerda, e do THC (canabinoide) à direita (Adaptado de NIDA, 2018).

Os dados farmacocinéticos mais importantes para estudos desta natureza são o metabolismo e a excreção. A Figura 5 mostra a via metabólica do THC no corpo humano. Sendo que o metabólito primário – que também contribui para o efeito da cannabis, por também ser ativo – é o 11-hidroxi- $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol (11-OH-THC) que em seguida é metabolizado, por oxidação, em 11-nor-9-carboxi- $\Delta$ 9-

tetrahydrocannabinol (THC-COOH) inativando a substância (Baselt, 2004; Gracia-Lor et al., 2016).

O THC, por ser altamente metabolizado, não é um biomarcador interessante para ser utilizado, por isso é mais interessante o uso dos metabólitos THC-COOH e 11-OH-THC (Postigo et al., 2010), e como o 11-OH-THC é rapidamente oxidado em THC-COOH e por ser um metabólito relativamente estável, o THC-COOH é o metabólito mais utilizado tanto para áreas forenses quanto para o cálculo retroativo em estudos de EE (Gracia-Lor et al., 2016). Apesar do THC-COOH ser excretado em sua forma conjugada (Baselt, 2004), a beta-glucuronidase das bactérias fecais do esgoto hidrolisam o THC-COOH conjugado com o ácido glucurônico transformando-o em sua forma livre novamente, portanto o THC-COOH em sua forma livre é o biomarcador de escolha a ser quantificado para a realização do cálculo de consumo da cannabis (Castiglioni et al., 2006; Khan and Nicell, 2012). A Figura 5 mostra a metabolização humana do THC em seus metabólitos.

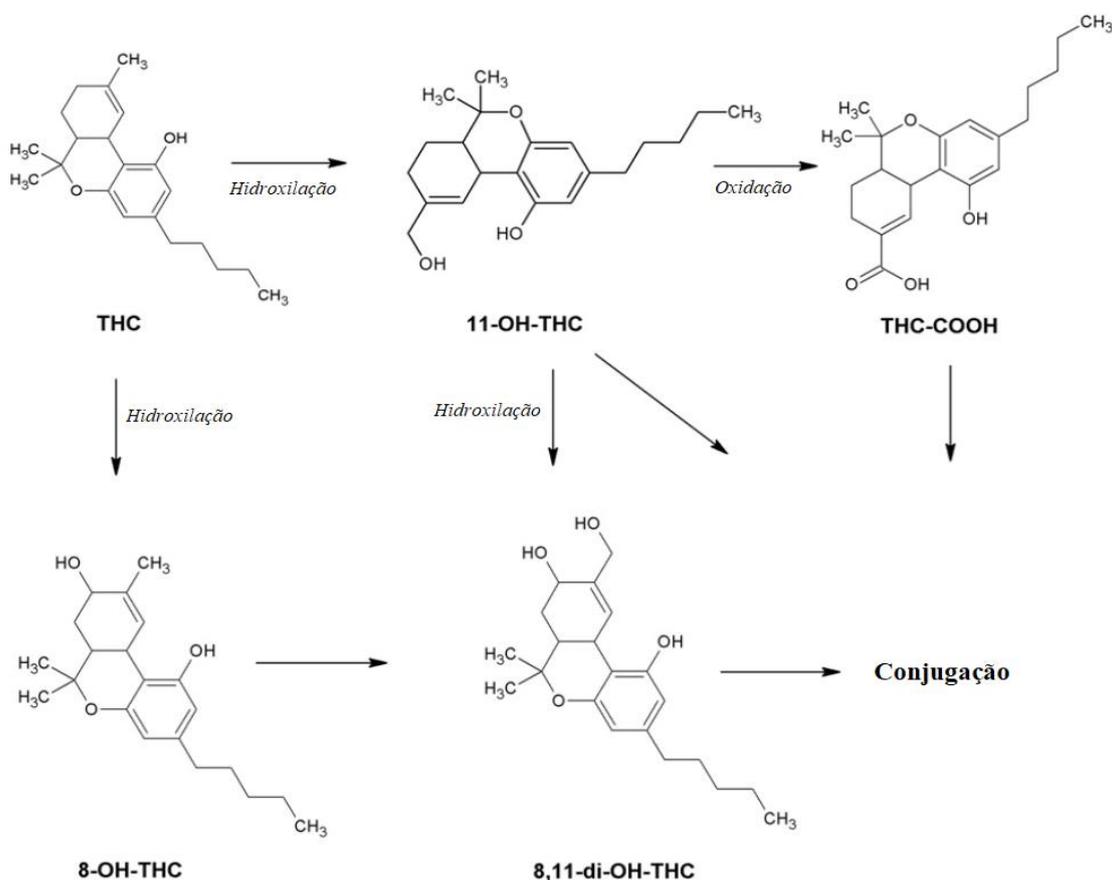


Figura 5: Via de metabolismo do THC (Adaptado de Gracia-Lor et al., 2016).

O THC-COOH possui propriedades distintas dos demais biomarcadores das outras drogas de abuso, algumas dessas propriedades irão afetar o fator de correção. As

propriedades mais importantes a serem levadas em consideração para refinar o valor do fator de correção, para minimizar a incerteza do cálculo do consumo por EE, são a taxa de excreção do biomarcador – que varia dependendo da via de administração –, e a razão molar entre a substância psicoativa e o seu biomarcador (Feitosa et al., 2013; Gracia-Lor et al., 2016). Os estudos de farmacocinética do THC e seus metabólitos no corpo humano estão resumidos nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Média das porcentagens de excreção do tetrahydrocannabinol  $\pm$  DPa e seus metabólitos na urina para vias de administrações diferentes (Adaptado de Gracia-Lor et al., 2016).

Composto	Via de Administração	Número de pesquisas	Faixa das doses (mg)	Número total de pacientes (faixa por estudo)	Média de excreção por paciente % $\pm$ DPa
THC	Oral	1	30	3	0.006 $\pm$ 0,002
THC-COOH	Oral	3	0.39-4	24 (5-7)	2.2 $\pm$ 1.2
	Intravenoso	1	2.2-4	12	4
	Fumado	1	15.8-33.8	16 (4-6)	0.5 $\pm$ 0.1
11-OH-THC	Intravenoso	1	10	4	5
Canabinoides	Oral	3	4-6	21 (4-6)	15.1 $\pm$ 1.6
	Totais	Intravenoso	4	0.5-4	29 (4-6)
Ácidos polares	Fumado	2	10-20	12 (2-9)	6.6 $\pm$ 2.1
	Inalado	1	10	3	9.6 $\pm$ 5.1
	Oral	1	15-20	12	6.5
	Intravenoso	1	2.2-4	12	5.1

Tabela 2: Média das porcentagens de excreção do tetrahydrocannabinol  $\pm$  DPa e seus metabólitos em fezes para as diferentes vias de administração (Adaptado de Gracia-Lor et al., 2016).

Composto	Via de Administração	Número de pesquisas	Faixa das doses (mg)	Número total de pacientes (faixa por estudo)	Média de excreção por paciente % $\pm$ DPa
THC	Oral	1	15-20	11	5 $\pm$ 1.8
	Intravenoso	1	2.2	9	2.1 $\pm$ 1.1
THC-COOH	Oral	1	15-20	11	9.7 $\pm$ 3.7
	Intravenoso	1	2.2-4	9	6.1 $\pm$ 4.3
11-OH-THC	Oral	1	15-20	11	3.8 $\pm$ 0.9
	Intravenoso	2	2.2-10	18 (4-9)	13.4 $\pm$ 4.2
Canabinoides	Oral	2	15-20	15 (4-6)	47.8 $\pm$ 3
Totais	Intravenoso	3	0,5-4	21 (3-5)	37.3 $\pm$ 12.9
Ácidos polares	Oral	1	15-20	11	6.1 $\pm$ 2.2
	Intravenoso	1	2.2-4	9	2.9 $\pm$ 1.8

Para refinar o fator de correção do consumo de cannabis levou-se em consideração a porcentagem média de excreção do THC-COOH na urina quando a cannabis é fumada – que é 0,5% –, já que a grande maioria do consumo de cannabis é pela via pulmonar (Passagli, 2013), além disso, o valor da razão entre o peso molecular THC/THC-COOH é de aproximadamente 0,91 e também deve ser levado em consideração. Logo, o valor proposto do fator de correção para o THC-COOH, foi de 182 (Gracia-Lor et al., 2016).

### 2.2.2. Cocaína

A cocaína – um alcaloide tropânico – é uma droga estimulante do SNC e altamente viciante. Por milhares de anos populações da América do sul – principalmente Bolívia, Colômbia e Peru – fazem o uso da folha de coca, *Erythroxylon coca* (fonte da cocaína), pelo fato de ser um estimulante que auxilia na resistência física em grandes altitudes e longas jornadas. Em 1860 a cocaína foi isolada das folhas de coca e caracterizada pelo químico alemão Albert Niemann, e passou a ser usada como medicamento para tratar a depressão, pacientes com dependência de heroína. Também foi utilizado como anestésico tópico, e como um dos ingredientes da formulação inicial da Coca-Cola® (NIDA, 2016; Passagli, 2013).

A cocaína – também conhecida por pó, neve, brisola, bright, branquinha, farinha, pico, crack, coca, basuco e pedaço – é utilizada em duas formas o cloridrato de cocaína, um pó branco e cristalino, e a base livre. As vias de administração do cloridrato de cocaína são a intranasal, intravenosa e oral. Sendo que a via oral é comumente utilizada concomitantemente com o uso de bebidas alcoólicas. O cloridrato de cocaína não pode ser fumado, pois nessa forma não se volatiliza com facilidade e se decompõe com altas temperaturas. A cocaína na sua forma de base livre – como o crack, a merla e o oxi – é fumada, tendo em vista que esta forma apresenta baixo ponto de fusão e quando aquecida permite que seus vapores sejam inalados ao ser fumado (Passagli, 2013).

Uma vez que a cocaína é absorvida os processos de metabolização pelo corpo começam, gerando diversos metabólitos, sendo que os mais importantes são o éster metilecgonina (EME) 35 a 48%, benzoilecgonina (BE) 30 a 45%, norcocaína (NCOC) 2 a 6%, éster de metilanidroecgonina (AEME do inglês *anhydroecgonine methyl ester*) que é gerado por pirólise quando a cocaína é fumada, e o cocaetileno (COE) gerado quando a cocaína é administrada juntamente com bebidas alcoólicas. Além disso, é possível que a cocaína seja eliminada em sua forma inalterada em uma concentração que varia de 2 a 14% (Passagli, 2013; Sodr e et al., 2017). Apesar da existência de todos esses metabólitos, a BE   o metabólito que será quantificado e utilizado no cálculo retroativo do consumo de cocaína, já que este possui uma taxa de excreção alta e uma boa estabilidade no esgoto, e o COE pode ser utilizado para avaliar o uso concomitante do álcool com cocaína (EMCDDA, 2016). A Figura 6 mostra a metabolização humana da COC e seus metabólitos.

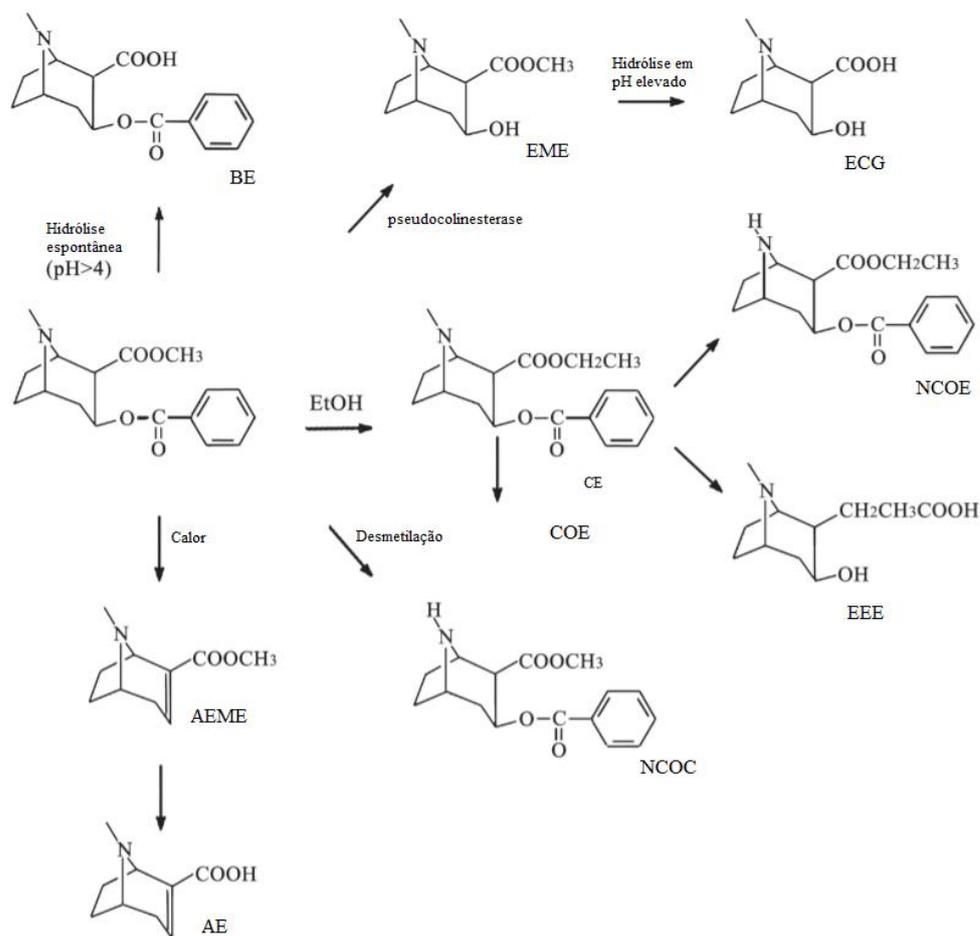


Figura 6: Vias metabólicas da cocaína (Adaptado de EMCDDA, 2008). Abreviações: AE (Anidroecgonina); AEME (Anidroecgonina mestil-éster); BE (Benzoilecgonina); COE (cocaetileno); ECG (ecgonina); EEE (ecgonina etil éster); EME (éster metilecgonina); NCOE (nor-cocaetileno); NCOC (nor-cocaína).

O fator de correção do consumo de cocaína se dá pelo cálculo a partir da excreção relativa à BE, sendo que essa taxa de excreção depende da via de administração, como no Brasil cerca de 70% da via de administração é intranasal e 30% é pela via pulmonar (fumada), a taxa de excreção ponderada é de aproximadamente 25%, e a razão da massa molecular COC/BE é de 1,048, logo o valor calculado proposto do fator de correção para o Brasil foi de 4,19 (Sodré et al., 2018).

### 2.3. Determinação de substâncias alvo em afluentes de esgoto

O esgoto é considerado uma matriz de alta complexidade, por possuir diversos tipos de compostos – que podem agir como interferentes de análises – e micro-organismos (Baker et al., 2012; Santos et al., 2015). Mesmo assim, com o estado da arte

da tecnologia instrumental é possível identificar substâncias em concentrações ínfimas. Atualmente, estudos de epidemiologia quantificam substâncias em concentrações na ordem de centenas de nanogramas por litro ( $\text{ng L}^{-1}$ ), normalmente lançando mão de técnicas de pré-concentração e análises em instrumentos baseados em cromatografia acoplada à espectrometria de massa (Causanilles et al., 2017; Krizman-Matasic et al., 2019; Zhang et al., 2019).

### **2.3.1. Amostragem**

A primeira etapa para a parte experimental de um estudo de EE consiste na amostragem, uma parte crucial no experimento que não deve ser negligenciada. Para garantir a diminuição dos erros na amostragem um planejamento deve ser feito tendo em mente que o objetivo principal é obter uma amostra representativa do todo que se está analisando.

O método de amostragem para estudos de estimativa de consumo de drogas por EE já está bem estabelecido e consiste na coleta de uma amostra composta de 24 horas do esgoto afluyente – esgoto não tratado – das estações de tratamento de esgoto, visto que existem diferenças na vazão do esgoto ao longo do dia (van Nuijs et al., 2011), portanto, o volume coletado é dependente da vazão do afluyente no momento que a coleta é feita (EMCDDA, 2019b). O mais comum é a coleta de hora em hora, por 24 horas, normalmente realizado por um amostrador automático e preferencialmente cada alíquota coletada deve ter o volume proporcional à vazão no momento da coleta, tudo isso depende da programação usada no amostrador. Assim que coletados as alíquotas são armazenadas em um mesmo recipiente para formar a amostra composta representativa do dia.

### **2.3.2. Preservação de amostras**

Idealmente a preservação da amostra deve ser feita o mais rápido possível após o término da coleta, diversas drogas de abuso e seus metabólitos sofrem degradação ou adsorção no próprio material em que a amostra está sendo armazenada (Causanilles et al., 2017; Senta et al., 2014). Muitos estudos foram realizados para analisar a estabilidade de drogas de abuso e seus biomarcadores na amostra, porém não há muitos

estudos avaliando a estabilidade dessas substâncias ao longo do transporte pelo esgoto (McCall et al., 2016).

Em uma amostra não filtrada e estocada a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , aproximadamente 50% do THC é degradado após sete dias e mais de 90% é degradado após 123 dias. Já o THC-COOH possui alta estabilidade no período de 72 horas na amostra não modificada, porém há uma degradação significativa após sete dias, mesmo sendo estocada a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Em amostras congeladas o THC-COOH é estável até quatro meses, devido à diminuição de interações intermoleculares. Além disso, diferentemente da COC, a acidificação da amostra piora a recuperação de THC-COOH, pois nestas condições o THC-COOH fica em sua forma molecular, e não iônica. Estudos indicam que se a amostra for acidificada para pH 2, há uma perda de aproximadamente 54% do THC-COOH – o THC-COOH possui um aumento de adsorção em pH baixo –, comparado com 10% de perda sem modificação do pH da amostra (Causanilles et al., 2017; McCall et al., 2016).

A estabilidade da cocaína na amostra, em diversas condições, é baixa. A hidrólise da cocaína é pH dependente, sendo que e a acidificação da amostra aumenta sua estabilidade em temperaturas baixas ou altas por pelo menos três dias (McCall et al., 2016; Sodr e et al., 2018). Conservantes como metabissulfito de s odio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) ou azida de s odio ( $\text{NaN}_3$ ) podem ser utilizados para evitar a degrada o de cocaína, além disso, os estudos indicam que a degrada o   desprez vel assim que a cocaína   extraída em cartuchos de extra o em fase-sólida (SPE do inglês *solid-phase extraction*), mais específico do tipo equilíbrio hidrofílico-lipofílico (HLB do inglês *hydrophilic-lipophilic balance*) e forem estocados corretamente    $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (McCall et al., 2016). Ao contrário da COC, a BE mostrou alta estabilidade na amostra em diversas condi es, principalmente em amostras que foram extraídas em SPE, estáveis até pelo menos três meses (McCall et al., 2016).

Portanto, para garantir uma alta recupera o dos analitos, recomenda-se extra o em cartuchos de SPE do tipo HLB e estocadas a pelo menos  $-10^{\circ}\text{C}$ , assim que a amostra for adquirida, já que alguns analitos podem sofrer perda na recupera o se permanecerem na amostra sem modifica es (McCall et al., 2016; Senta et al., 2014).

### **2.3.3. Preparo de amostra**

O preparo da amostra   uma etapa fundamental para garantir uma análise exata e precisa, principalmente quando se trata de uma matriz complexa como esgoto

juntamente com substâncias em concentrações ultra-traço, que estão na faixa de  $\text{ng L}^{-1}$ , o que demanda alguma técnica de pré-concentração.

Primeiro passo a ser realizado é o enriquecimento da amostra com padrões surrogate, técnica muito utilizada em análises ambientais. Esse tipo de padronização consiste em substâncias com propriedades similares aos seus analitos e que não estão presentes na amostra. Em sua grande maioria essas substâncias são versões isotopicamente modificadas de seus analitos, comumente deutérios no lugar de hidrogênios. Com essa similaridade entre os analitos e seus análogos deuterados, é possível assumir que perdas na recuperação, efeitos de matriz, ou qualquer outra variável que possa interferir na exatidão ou precisão das análises irão ocorrer em ambos. Portanto, ao se utilizar a razão entre o sinal do analito e o sinal de seu deuterado para calcular a concentração do analito na amostra, todas essas variáveis já estarão sendo levadas em consideração, melhorando a exatidão e precisão das análises.

Em seguida filtrações prévias destas amostras enriquecidas devem ser feitas, utilizando-se membranas hidrofóbicas de  $1,2 \mu\text{m}$  e  $0,45 \mu\text{m}$ , para reterem os materiais particulados de grandes dimensões, em seguida a extração em um cartucho de SPE e estocagem em um refrigerador é recomendada, para evitar degradação dos analitos (Causanilles et al., 2017). Os cartuchos de SPE mais utilizados, e que resultam os melhores resultados para diversos analitos – incluindo canabinoides e cocaínicos –, são os que possuem sorvente com grupos funcionais hidrofílicos e lipofílicos, o que facilita a extração de substâncias com diferentes polaridades em um mesmo cartucho. A Figura 7 mostra o sorvente utilizado no cartucho Oasis HLB da Waters (MA, EUA).

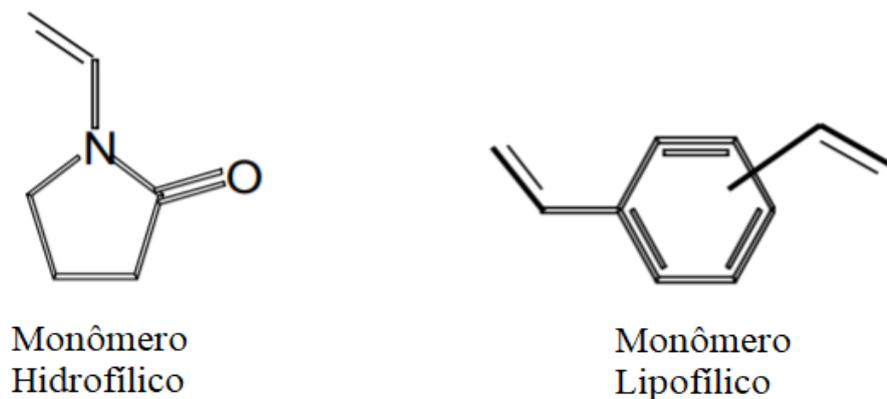


Figura 7: Sorvente que preenche o cartucho de extração em fase sólida Oasis HLB.

O modelo de preparo de amostra utilizando cartuchos de extração em fase sólida mostrou ser o mais adequado (Causanilles et al., 2017; EMCDDA, 2016; Thomas et al., 2012).

#### 2.3.4. Quantificação das drogas de abuso alvo e seus metabólitos no esgoto

Levando em consideração que as substâncias alvo estão na faixa de concentração de ultra-traço; que as substâncias quantificadas são relativamente similares – já que são metabólitos das substâncias psicoativas –; e que a matriz é extremamente complexa, é necessário lançar mão de uma técnica extraordinariamente sensível, seletivo e um limite de quantificação excepcionalmente baixa. Nas centenas de estudos que utilizaram EE, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa é a técnica mais utilizada para este tipo de análise (Causanilles et al., 2017; EMCDDA, 2019b, 2019c, 2019a). A Figura 8 esquematiza uma visão geral de um instrumento baseado nesta técnica.

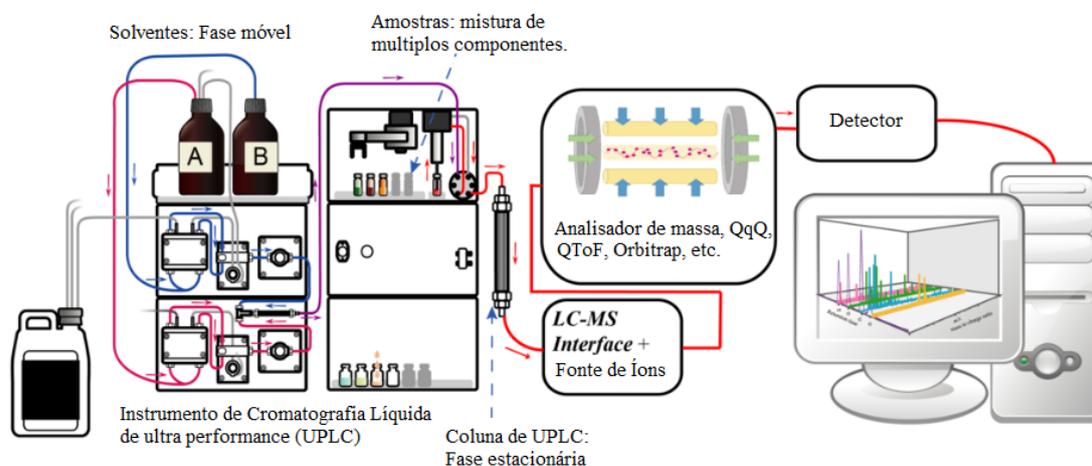


Figura 8: Esquema geral de uma cromatógrafo líquido acoplado a um espectrômetro de massa (Adaptado de Norena-Caro, 2017).

Quando se acopla um cromatógrafo líquido a um espectrômetro de massa uma fonte de ionização capaz de fazer a interface entre esses dois equipamentos é necessária, já que a análise pelo espectrômetro de massa é na fase gasosa e em alto vácuo há uma necessidade de vaporização e ionização simultânea na fonte de ionização do espectrômetro de massa (Gross, 2011; Hoffmann and Stroobant, 2007). A interface de comunicação mais utilizada quando há esse tipo de acoplamento é a Ionização por Electrospray (ESI do inglês *Electrospray ionization*), que consiste em uma técnica de Ionização à pressão atmosférica (API do inglês *atmospheric pressure ionization*). A Figura 9 mostra o esquema da fonte de ionização utilizada para realizar essa interface.

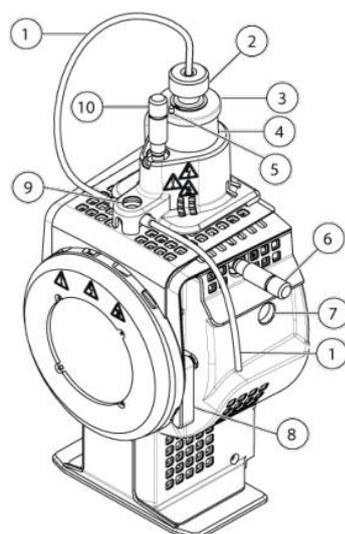


Figura 9: Esquemática da fonte Ionizadora Turbo V™ ESI da Sciex que faz a interface entre o cromatógrafo líquido e o espectrômetro de massa (Sciex, 2017).

1. Tubo de amostra; 2. Porca de ajuste do eletrodo; 3. Anel retentor; 4. Torre da sonda; 5. Parafuso de ajuste da agulha de descarga corona; 6. Micrômetro usado para posicionar a sonda no eixo horizontal; 7. Porta da janela; 8. trava que prende a fonte de íons ao espectrômetro de massa; 9. União de aterramento; 10. Micrômetro usado para posicionar a sonda no eixo vertical.

O ESI é produzido quando se aplica um campo elétrico forte, sob pressão atmosférica, em um líquido passando por um tubo capilar com um fluxo baixo. O campo elétrico formado é da ordem de  $10^6 \text{ V m}^{-1}$ , esse campo elétrico induz um acúmulo de cargas na superfície do líquido ao mesmo tempo em que o líquido evapora pela alta temperatura e gases de secagem, aumentando a razão carga/volume do líquido, que gera uma repulsão de cargas até que essa repulsão seja forte o suficiente para gerar um fenômeno denominado explosão coulômbica, esse fenômeno irá gerar os íons precursor dos analitos na forma gasosa para serem analisados pelo analisador de massa do espectrômetro de massa (Gross, 2011; Hoffmann and Stroobant, 2007). A Figura 10 esquematiza o funcionamento de uma fonte de ionização do tipo Eletrospray.

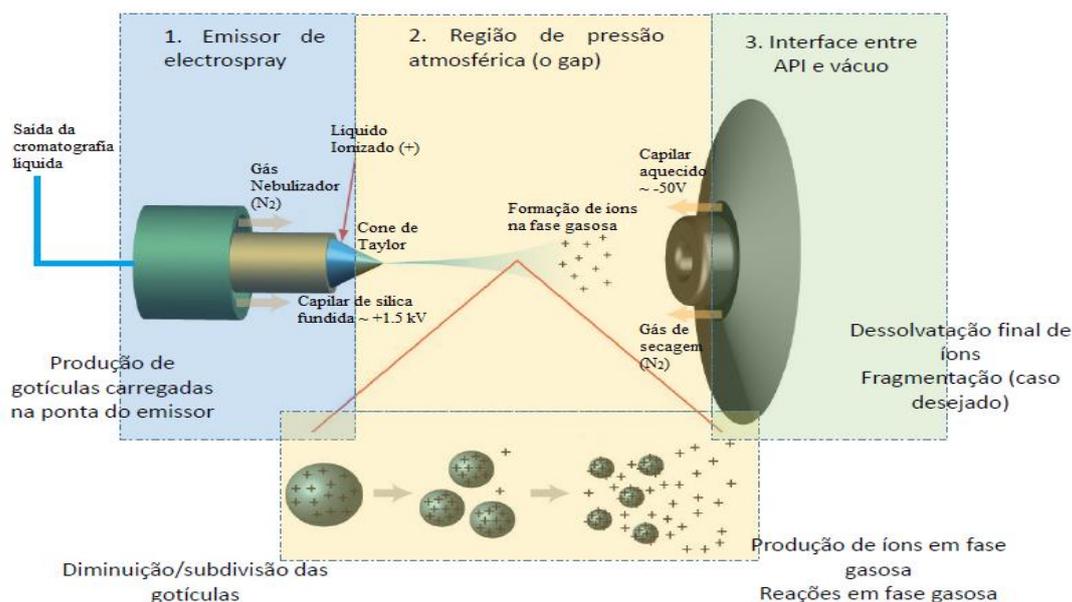


Figura 10: Esquemática básica de uma fonte de ionização por Eletrospray (ESI).

Os analisadores de massa mais utilizados em estudos de analitos em nível de ultra-traço e em matrizes complexas, são: o triplo quadrupolo (QqQ); o híbrido duplo quadrupolo com tempo de voo (QToF); e em alguns estudos utilizam-se o Orbitrap (Causanilles et al., 2017). Cada analisador de massa possui suas vantagens, o QqQ é o mais utilizado por sua grande sensibilidade e reprodutibilidade, já que é um analisador de massa contínuo não há muita perda de analitos durante a análise, porém a resolução é baixa (resolução unitária); o QToF e o Orbitrap possuem uma alta resolução e acurácia de massa, permitindo uma identificação mais exata e confiável, porém como a análise de ambos é de forma pulsada, uma análise contínua não é possível gerando eventuais perdas dos íons de interesse (Gross, 2011; Hoffmann and Stroobant, 2007). A Figura 11 demonstra a arquitetura básica de cada analisador de massa supracitado.

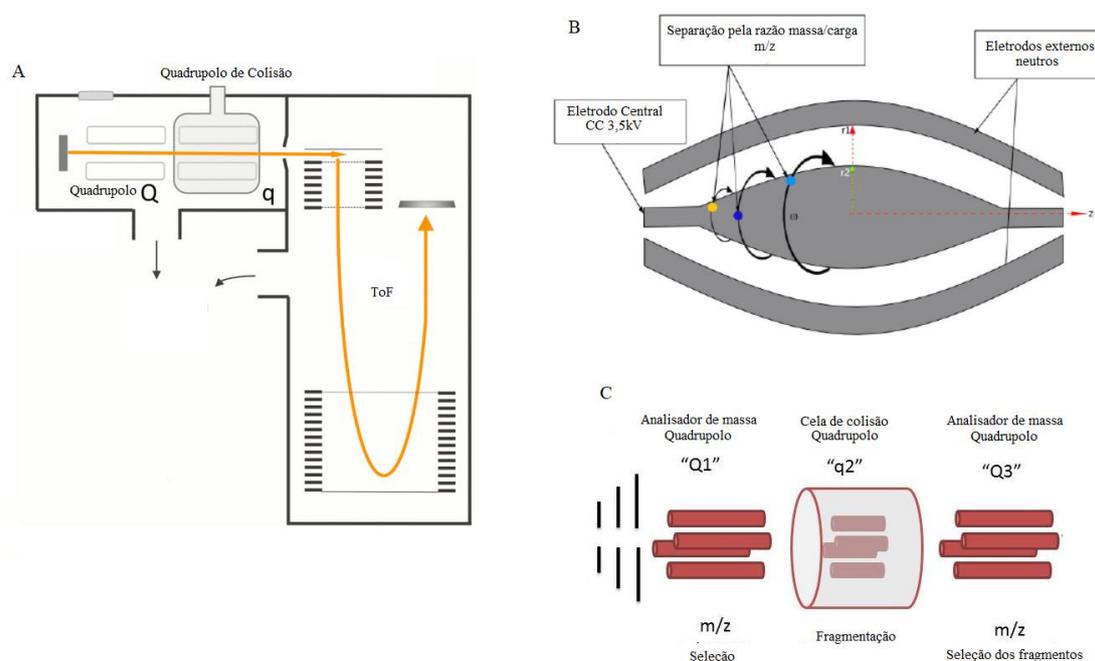


Figura 11: Esquema de diferentes Analisadores de Massas.

A. QToF (Adaptado de Murray, 2017); B. Orbitrap (Adaptado de Thermo Fisher Scientific, 2011); C. QqQ (Adaptado de Jackson, 2015).

No caso de análises MS/MS com o QqQ, o modo monitoramento de reações múltiplas (MRM) é o mais indicado. Neste modo o primeiro quadrupolo atua como um filtro de massa, selecionando o íon precursor de cada analito. O íon precursor segue para o segundo quadrupolo, que atua como uma célula de colisão, local em que os íons precursores são fragmentados e geram os íons produto. No terceiro quadrupolo, esses íons produto são filtrados e finalmente detectados por uma placa multiplicadora de elétrons que gera amplificação do sinal elétrico.

### 3. Objetivos

Este trabalho foi dividido em objetivo geral e específicos. O objetivo geral consiste no desenvolvimento de um método capaz de quantificar canabinoides (THC e THC-COOH) e cocainicos (COC, BE e COE) em amostras de esgoto afluyente. Os objetivos específicos incluem a otimização dos parâmetros instrumentais para a determinação e quantificação das substâncias alvo; a otimização do método de separação cromatográfica; a avaliação da viabilidade da quantificação de cannabis e cocaína com o mesmo preparo de amostra; quantificação efetiva dos analitos no esgoto afluyente das ETEs Sul e Norte do DF; e a estimativa do consumo de cannabis e cocaína durante o período de carnaval (01/03/2019 até 05/03/2019) e o período após o carnaval (06/03/2019 até 15/03/2019) utilizando a EE.

## **4. Materiais e desenvolvimento de método**

### **4.1. Materiais**

#### **4.1.1. Solventes e cartuchos de extração em fase sólida**

Ácido fórmico 98%-100% grau MS LiChropur Merck (Darmstadt, Alemanha). Metanol (MeOH) de grau HPLC adquirido da Tedia (OH, EUA). Acetonitrila (ACN) grau HPLC J.T. Baker (PA, EUA). Água ultrapura foi obtida purificando-se água destilada em um sistema Milli-Q (MA, USA). Cartuchos de extração em fase sólida Oasis® HLB 6 cc 500 mg adquiridos da Waters.

#### **4.1.2. Padrões analíticos**

Soluções padrões utilizadas foram adquiridas da Cerilliant (TX, EUA) através da Sigma-Aldrich, compreendendo os padrões de THC (concentração de 1 g L<sup>-1</sup>); THC com três deutérios (THC D3) (concentração de 100 mg L<sup>-1</sup>); THC-COOH (concentração de 100 mg L<sup>-1</sup>); THC-COOH D3 (concentração de 100 mg L<sup>-1</sup>); COC (concentração de 1 g L<sup>-1</sup>); COC D3 (concentração de 100 mg L<sup>-1</sup>); BE (concentração de 1 g L<sup>-1</sup>); BE D3 (concentração de 100 mg L<sup>-1</sup>); COE (concentração de 1 g L<sup>-1</sup>); e COE D3 (concentração de 100 mg L<sup>-1</sup>). As substâncias deuteradas foram utilizadas como padrão interno na curva analítica e como padrão surrogate nas amostras.

#### **4.1.3. Equipamentos e Acessórios**

O instrumento híbrido de cromatografia líquida de ultra performance acoplado à espectrometria de massa em tandem (UPLC-MS/MS) utilizado para a análise das amostras foi um 1290 Infinity da Agilent (MA, EUA) acoplado ao API 3200 da AB Sciex (CA, EUA), instalado no Instituto Nacional de Criminalística (INC) da Polícia Federal (PF) em Brasília. A coluna cromatográfica utilizada foi a Kinetex® C18, da marca Phenomenex (CA, EUA), com 50mm de comprimento por 2,1mm de diâmetro interno e partículas de 1,3 µm. Amostrador automático refrigerado AUTO REFR AS950 HACH 115VAC (CO, EUA). Os sistemas de filtração, extração e eluição são do tipo *manifold* construídas no laboratório. Filtro 1,2µm de microfibras de vidro GF/C Whatman (Maidstone, Reino Unido), filtro de 0,45 µm de mistura de ésteres de celulose

(MCE), filtro de seringa 0,22  $\mu\text{m}$  de fluoreto de polivinilideno (PVDF) hidrofílico da Merck e o filtro de 0,2 de politetrafluoretileno (PTFE) da Sartorius Stedim Biotech (Gottingen, Alemanha).

## 4.2. Desenvolvimento de método

### 4.2.1. Otimização dos parâmetros instrumentais

A Figura 12 esquematiza os passos utilizados para realizar a otimização instrumental. Essa otimização foi imprescindível para garantir os sinais com as maiores razões de sinal/ruído instrumentais possíveis, conferindo uma exatidão e precisão adequadas ao método.



Figura 12: Esquematização do processo criado para a otimização de qualquer composto no UPLC-MS/MS utilizado.

O primeiro passo para essa otimização consiste na determinação do íon precursor de cada analito através de uma injeção direta no instrumento (sem método cromatográfico). O passo dois consiste na seleção dos íons-produto de cada íon precursor via injeção direta, sendo que o mais abundante é utilizado para a quantificação e o segundo para a identificação do analito, com o intuito de aumentar a confiabilidade da identificação e quantificação.

Assim que os íons de maior intensidade são selecionados, o passo três é iniciado, que consiste na otimização dos parâmetros dependentes do composto via injeção direta. Esses parâmetros são: potencial de desaglomeração (DP do inglês *declustering potential*); potencial de entrada (EP do inglês *entrance potential*); potencial de entrada da cela de colisão (CEP do inglês *collision cell entrance potential*); energia de colisão (CE do inglês *collision energy*); e potencial de saída da cela de colisão (CXP do inglês *collision cell exit potential*).

O DP é o parâmetro utilizado para minimizar as aglomerações do solvente da amostra depois que já tenham entrado na câmara de vácuo. EP é o parâmetro que guia e foca os íons através do quadrupolo focalizador. CEP é o parâmetro utilizado para focalizar os íons para entrarem na cela de colisão. CE parâmetro que controla a quantidade de energia que o íon precursor recebe assim que é acelerado para a cela de colisão, onde ocorre colisão com gás inerte e o fragmenta nos íons produto. Por último, o CXP é o parâmetro que controla a diferença de potencial dos íons que saem da cela de colisão.

Após a otimização dos parâmetros dependentes do composto, quarto passo pôde ser iniciado, que consiste na otimização do método cromatográfico (necessário para o quarto passo). Este passo só foi completado assim que os padrões geraram picos separados e de formato adequado. É importante salientar que não queremos a separação do padrão do seu análogo deuterados, os sinais destes devem sair juntos. Com o método cromatográfico ideal em mãos, realizamos o quinto passo, que consiste na otimização dos parâmetros da fonte de ionização para o íon menos intenso via cromatografia. Os parâmetros da fonte são o suprimento do curtain gas (CUR do inglês *curtain gas*); gás de colisão (CAD); tensão do ionspray (IS do inglês *ionspray*); temperatura (TEM); gás nebulizador (GS1); e gás auxiliar (GS2).

CUR é o parâmetro que auxilia na evaporação do solvente e previne que gotículas do solvente entrem e contaminem a ótica iônica. CAD é o parâmetro que define a pressão do gás de colisão dentro da cela de colisão. IS depende da polaridade e afeta a estabilidade e sensibilidade do spray. TEM parâmetro que controla a temperatura do gás auxiliar da fonte. GS1 gás que ajuda na formação de pequenas gotículas da amostra, afeta estabilidade e sensibilidade do spray. GS2 gás que auxilia na evaporação do solvente para produzir íons da amostra na fase gasosa.

Com os parâmetros da fonte otimizados, o sexto passo é realizado, que consiste na otimização dos parâmetros dependentes do composto para cada transição via

cromatografia. Após o sexto passo um ciclo entre o quinto e o sexto passo foi realizado até se obter sinais com a melhor razão sinal/ruído. Este ciclo foi necessário visto que os sinais gerados pelo THC e THC-COOH estavam com a razão sinal/ruído abaixo do adequado, mesmo em concentrações altas.

#### **4.2.2. Método cromatográfico**

O método cromatográfico foi definido a partir dos estudos que obtiveram os melhores resultados nas quantificações de THC e THC-COOH (Causanilles et al., 2017). A fase orgânica (fase B) utilizada foi acetonitrila e o modificador foi o ácido fórmico a 0,1%, já a fase aquosa (fase A) foi composta de água ultrapura e ácido fórmico a 0,1%. O modificador das fases móveis foi o ácido fórmico, visto que a análise no espectrômetro de massa foi feita no modo positivo. A separação cromatográfica foi feita em fase reversa, utilizando uma coluna Kinetex® C18, da marca Phenomenex, com 50mm de comprimento por 2,1mm de diâmetro interno e partículas de 1,3 µm. Os parâmetros que foram otimizados foram o volume de injeção, o fluxo da fase móvel, o modo de eluição, a temperatura, o tempo de condicionamento e a limpeza da coluna.

#### **4.2.3. Locais de amostragem e coleta**

Das quinze estações de tratamento do DF, as estações Sul e Norte foram escolhidas em função da praticidade da coleta e por atenderem aproximadamente 700.000 pessoas. Logo pode se afirmar que as amostras coletadas do esgoto afluyente dessas estações correspondem à população atendida, permitindo uma extrapolação para a população do DF. Na Tabela 3 e Figura 13 são mostradas as cidades atendidas pelas estações de tratamento de esgoto Norte e Sul.

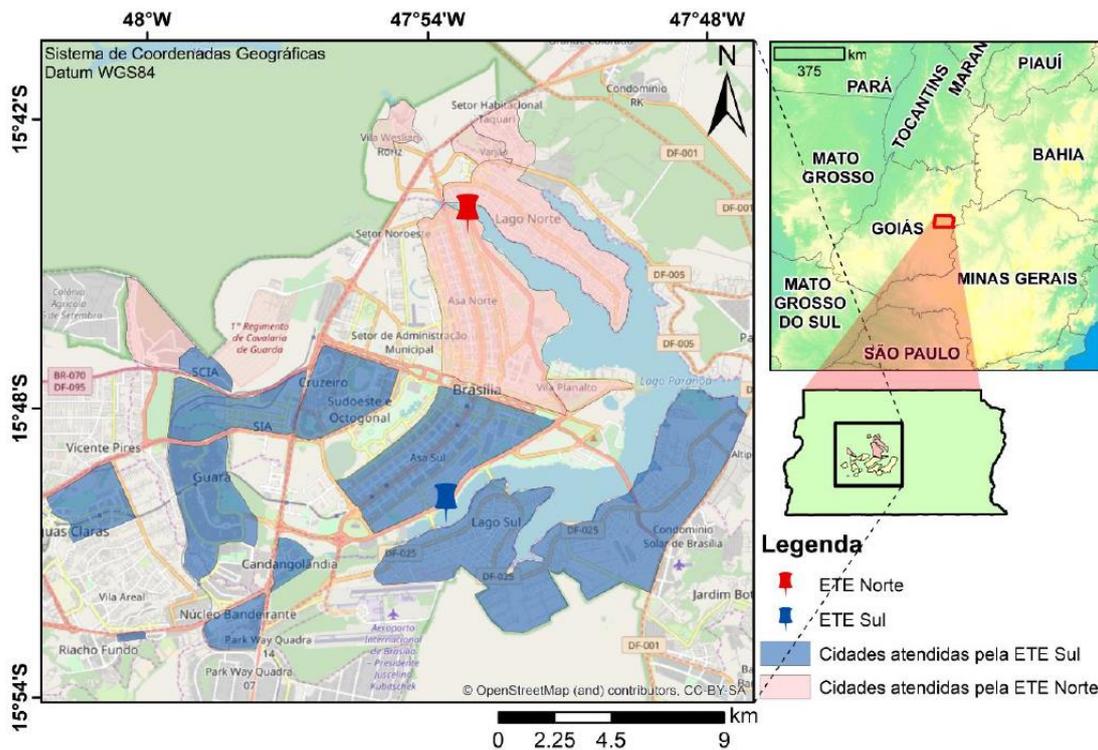


Figura 13: Localização das ETEs Sul e Norte do DF e as áreas atendidas por estas (da Silva et al., 2018).

Tabela 3: Características das Estações de Tratamento de Esgoto Sul e Norte (CAESB, 2019)

ETE	Vazão média ( $L s^{-1}$ )	Área de atendimento	População atendida
Sul	1319	Asa Sul/ Parte da Área Central de Brasília, Núcleo Bandeirante, Guará I e II, Cruzeiro/Octogonal/Sudoeste, Lago Sul (parte), Riacho Fundo (Quadra QN1), S.I.A., Parte de Águas Claras, Candangolândia, cidade do automóvel e setor de inflamáveis.	492.733
Norte	450	Asa Norte/ Vila Planalto/ Parte da Área Central de Brasília, Lago Norte, Taquari, Vila Estrutural, Vila Varjão, Torto.	196.011

As coletas das amostras foram realizadas por técnicos da CAESB, com o auxílio de um amostrador automático refrigerado AUTO REFR AS950 HACH 115VAC (HACH, Colorado, USA) mostrado na Figura 14.



Figura 14: Amostrador automático utilizado pelos técnicos da CAESB para coleta de amostras nas ETEs

As coletas foram realizadas do dia 1 ao dia 15 de março de 2019, que corresponderam ao período de Carnaval, e o período subsequente ao Carnaval. Por se tratar de um material contínuo – esgoto afluyente à estação –, usou-se a frequência amostral acumulada para a obtenção de amostras representativas dos dias em questão. No caso desse estudo uma coleta foi feita a cada 60 minutos, a partir das 00h00min – do dia que se quer a amostra a ser analisada – até as 00h00min do dia seguinte, para assim obter-se uma amostra composta representativa de 24 horas. Na Tabela 4 temos os valores de vazão média do esgoto nos dias de coleta, valores necessário para realizar o cálculo retroativo do consumo via Equação (1).

Tabela 4: Vazão do esgoto na estação de tratamento nos dias em que as coletas foram realizadas.

Data da Coleta	Vazão ETE Sul (m <sup>3</sup> dia <sup>-1</sup> )	Vazão ETE Norte (m <sup>3</sup> dia <sup>-1</sup> )
01*/03/2019	133513,2	53294,4
02*/03/2019	117720,0	53938,8
03*/03/2019	124919,2	53834,4
04*/03/2019	118472,4	46400,4
05*/03/2019	120265,2	44049,6
06/03/2019	103618,8	46220,4
07/03/2019	109339,2	47116,8
08/03/2019	110386,8	45147,6
09/03/2019	108021,6	38901,6
10/03/2019	97610,4	41677,2
11/03/2019	91498,0	42616,8
12/03/2019	108086,4	49100,4
13/03/2019	108936	48855,6
14/03/2019	122169,6	46976,4
15/03/2019	119098,8	49665,6

\*: Período do Carnaval de 2019, os outros dias foram classificados como período subsequente ao Carnaval.

#### 4.2.4. Método de extração em fase sólida

As amostras compostas foram levadas ao laboratório e extraídas por extração em fase sólida conforme o protocolo proposto por Causanilles et al. (2017). Alíquotas de 100 mL das amostras foram enriquecidas com 4 µg L<sup>-1</sup> dos padrões deuterados de cada analito, filtradas em membranas de microfibras de vidro 1.2 µm, seguida de uma membrana de mistura de ésteres de celulose 0.45 µm. Para o processo de SPE primeiramente o sorvente do cartucho foi condicionado com 10 mL de metanol e 10 mL de água ultrapura, então as amostras filtradas foram percoladas através de cartuchos HLB Oasis 6cc com 500mg de sorvente sob baixo fluxo – cerca de 3 a 4 mL min<sup>-1</sup> – por meio de um sistema *manifold* de extração construído no laboratório, demonstrado na Figura 15.



Figura 15: Sistema de extração *manifold* utilizado para realizar a extração em fase sólida.

Após o término da extração, os cartuchos foram centrifugados a 4000 rpm por 8 min para realizar a secagem. Os cartuchos foram então embalados à vácuo e estocados à -20 °C para evitar a degradação dos analitos até o momento das análises (Causanilles et al., 2017; Senta et al., 2014)

Imediatamente antes da análise, os analitos foram eluidos dos cartuchos. Para a eluição, 10 mL de metanol foram passados por cada cartucho sob baixa vazão em um sistema *manifold* à vácuo, mostrado na Figura 16.



Figura 16: Sistema de eluição *manifold* utilizado para realizar a eluição dos analitos.

Em seguida os eluatos foram submetidos à secagem em sistema de evaporação paralela Syncore® Analyst, para redução do volume de 10 mL para cerca de 200 µL.

Por fim, o volume final do extrato foi completado para 1,0 mL com água ultrapura para obter um fator de pré-concentração de 100 vezes. Antes das injeções, os extratos foram filtrados em membrana de PVDF com porosidade de 0,22  $\mu\text{m}$ .

## **5. Resultados**

### **5.1. Otimização dos parâmetros instrumentais**

Tendo como base os trabalhos que envolveram a aquisição das concentrações dos biomarcadores das drogas de abuso cannabis e cocaína por MRM, o íon precursor de cada analito e padrão desse estudo foi a sua molécula protonada –  $[\text{M}+\text{H}]^+$  –, já que o ESI está no modo positivo de ionização (Causanilles et al., 2017). O primeiro passo foi utilizar a infusão direta para analisar a solução contendo todos os analitos no espectrômetro de massa no modo de aquisição de íons produto para saber quais são os íons produto com os sinais mais intensos de cada íon precursor, a Figura 17 mostra qual a razão massa/carga ( $m/z$ ) de cada íon produto selecionado.

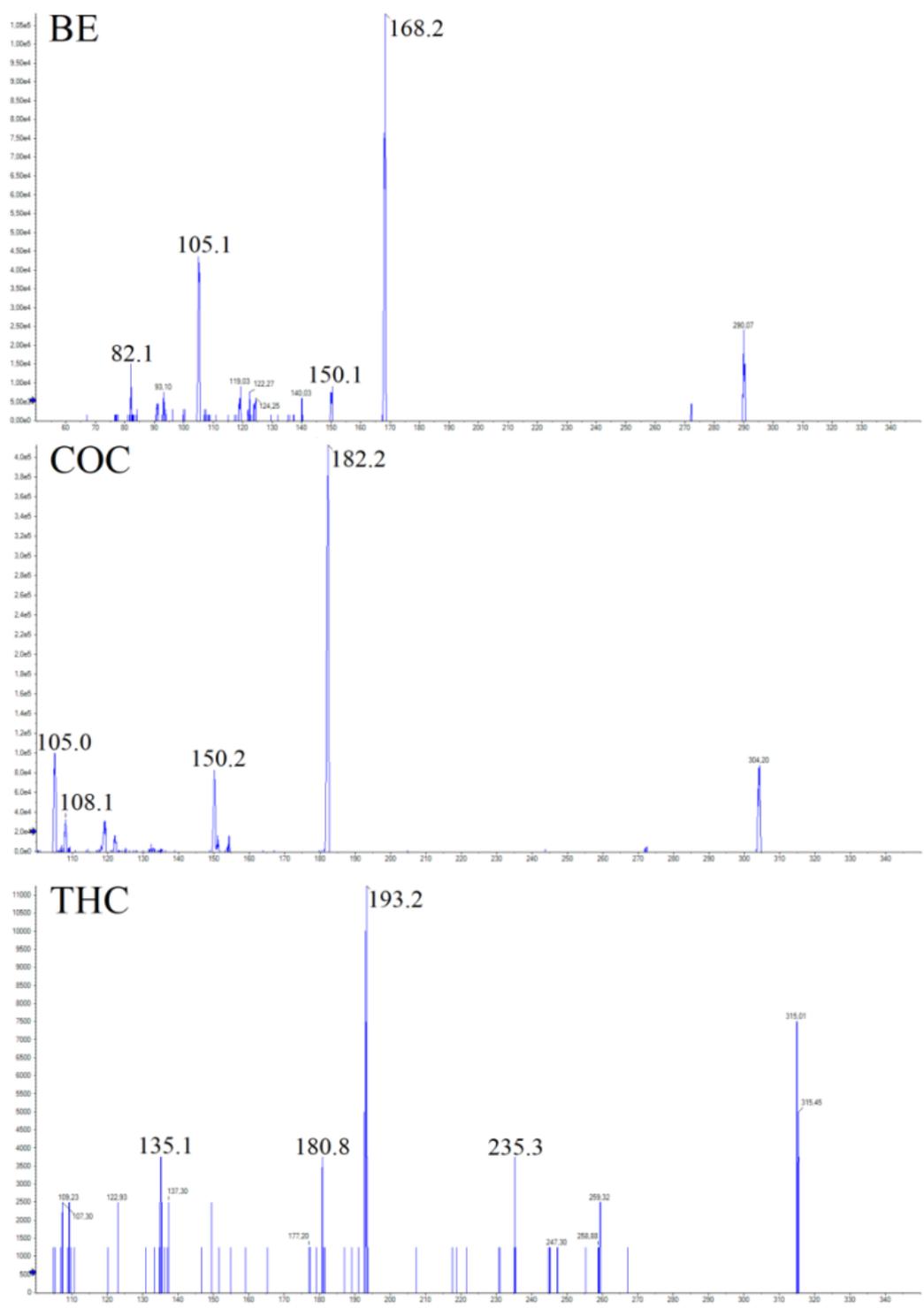


Figura 17: As razões  $m/z$  dos quatro íons produto mais intensos de todos os analitos e seus análogos deuterados.

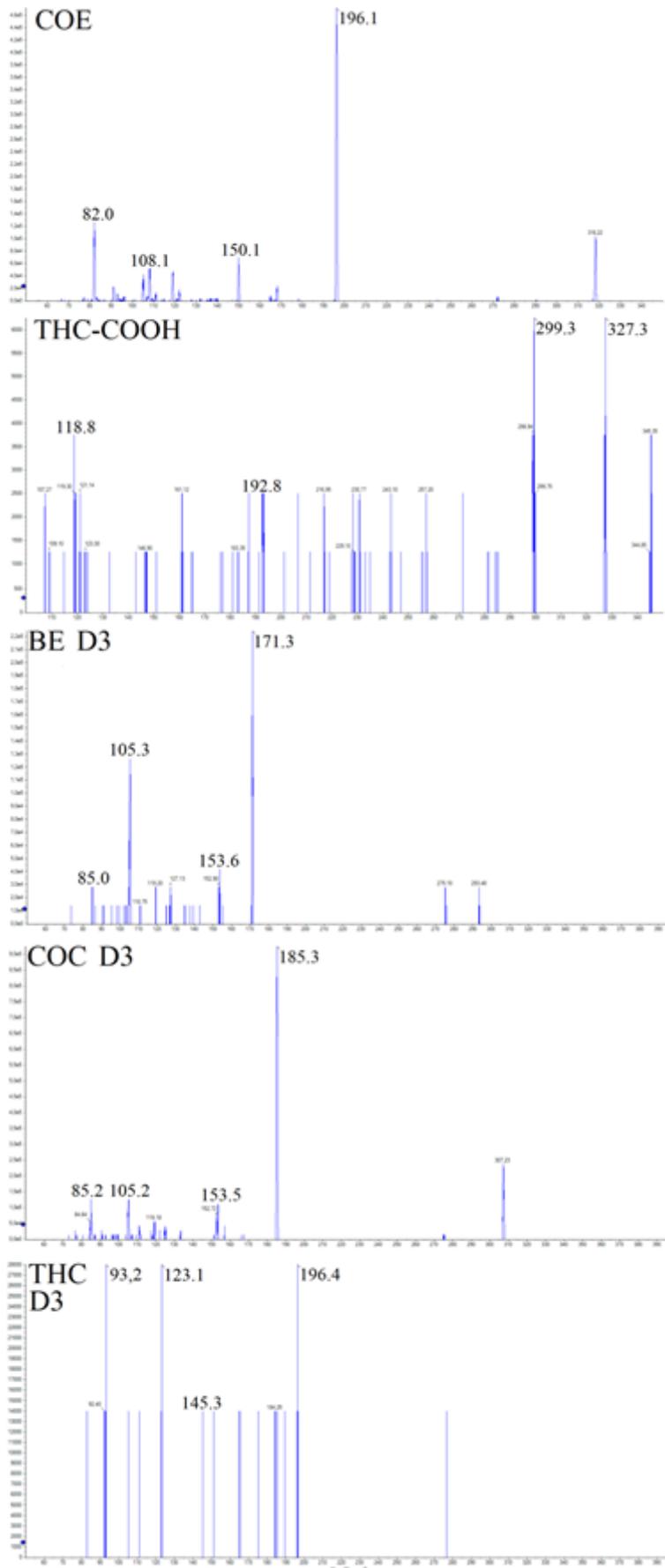


Figura 17: As razões  $m/z$  dos quatro íons produto mais intensos de todos os analitos e seus análogos deuterados (continuação).

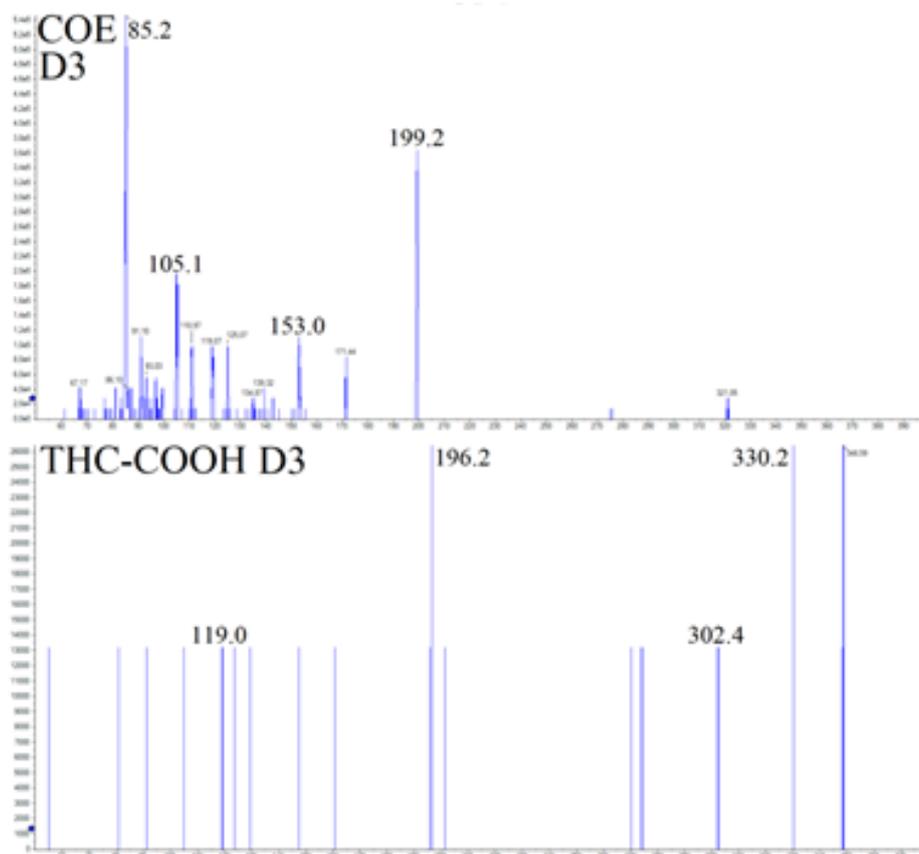


Figura 17 As razões  $m/z$  dos quatro íons produto mais intensos de todos os analitos e seus análogos deuterados (continuação).

Logo que os valores dos íons produto foram selecionados, ainda na infusão direta, o modo de aquisição MRM com rampa dos parâmetros DP, EP, CEP, CE e CXP foi utilizado para obter os melhores valores desses parâmetros. Estes novos valores obtidos foram utilizados no modo de análise por injeção de vazão (FIA do inglês *flow injection analysis*) automático para fazer a última otimização desses parâmetros, já que pelo FIA esses parâmetros são otimizados utilizando o fluxo e porcentagens das fases móveis da cromatografia. Das quatro transições que foram otimizadas, apenas as duas transições mais intensas e seus parâmetros otimizados foram escolhidos. Os valores obtidos das transições e seus parâmetros estão na Tabela 5.

Tabela 5: Parâmetros otimizados para cada analito e seus respectivos íons-produto mais intensos.

Analito	DP (V)	EP (V)	CEP (V)	Transições MRM ( <i>m/z</i> )	CE (eV)	CXP (V)
THC	36,0	4,0	12,0	315,2→193,1	30,00	2,3
				315,2→135,2	25,00	4,0
THC D3	46,0	5,0	21,0	318,1→196,3	32,00	4,0
				318,1→123,1	42,00	4,0
THC-COOH	36,0	4,0	12,0	345,3→327,4	21,50	4,3
				345,3→299,1	27,00	12,3
THC-COOH D3	50,0	5,0	24,0	348,2→330,2	16,00	6,7
				348,2→302,4	22,52	5,5
COC	37,0	4,0	12,	304,2→182,3	24,00	3,7
				304,2→105,2	47,70	3,0
COC D3	31,0	5,0	21,0	307,2→185,3	22,00	3,0
				307,2→105,3	44,00	3,0
BE	37,0	4,0	12,0	290,1→168,4	27,00	3,0
				290,1→105,2	40,70	3,6
BE D3	35,0	5,0	21,0	293,1→171,4	27,00	5,0
				293,1→105,3	46,00	4,0
COE	39,0	4,0	12,0	318,2→196,2	46,00	2,3
				318,2→82,1	27,40	7,7
COE D3	31,0	5,0	21,7	321,1→199,3	23,00	3,5
				321,1→85,2	44,00	2,3

Em seguida a otimização dos parâmetros da fonte de ESI foi realizada de forma automática e univariada pelo equipamento ao realizar injeções sucessivas, para determinar o melhor valor de cada um dos parâmetros. Os parâmetros da fonte de ESI foram otimizados para o analito de menor intensidade, que no caso as análises mostraram ser o THC e seus íons-produto. A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos dessa otimização específica para o THC e seus íons-produto.

Tabela 6: Valores dos parâmetros da fonte de ESI otimizados para o THC.

Parâmetro	Valor
Suprimento da Curtain Gas (psi)	10
Gás de colisão (psi)	6
Tensão do Ionspray (V)	5500
Temperatura (°C)	550
Gás 1 (psi)	40
Gás 2 (psi)	45

## 5.2. Separação Cromatográfica

A otimização dos parâmetros cromatográficos foi realizada através da injeção sucessiva de uma mistura de todos os padrões analíticos até se adquirir um cromatograma ideal, ou seja, aquele que apresenta os seguintes requisitos:

- Não apresentar nenhum sinal nos segundos iniciais ou finais do cromatograma, momentos em que há muitos interferentes polares e apolares, respectivamente.
- Apresentar sinais separados, com exceção dos sinais dos padrões e de seus deuterados, já que a coeluição é um pré-requisito quando se utiliza um deuterado como padrão surrogate
- Condicionamento e limpeza da coluna para análises subsequentes, otimização necessária para garantir a reprodutibilidade desse tipo de análises;
- Elevada resolução dos sinais no menor tempo possível, de modo a aumentar a frequência de análise e ainda permitir uma separação adequada dos sinais para aumentar a frequência de análise e ainda possuir uma separação boa dos sinais.

Os valores otimizados no método cromatográfico estão mostrados na Tabela 7.

Tabela 7: Valores dos parâmetros do método cromatográfico otimizados.

Parâmetro	Valor
Vazão da fase móvel	200 µL/min
Temperatura da coluna	30 °C
Volume de injeção	10 µL
Gradiente de fase móvel	0-1,0 min: 20% B 1,0-6,0 min: 20-95% B 6,0-10,0 min: 95% B
Tempo de condicionamento da coluna	5 min

O método cromatográfico possui 15 min de duração, já que há 5 min de condicionamento da coluna, e foi capaz de apresentar um cromatograma com uma separação satisfatória de todos os analitos. A Figura 18 ilustra o cromatograma da contagem total de íons (TIC do inglês *total ion count*) e da contagem dos íons extraídos (XIC do inglês *extracted ion count*) das transições escolhidas.

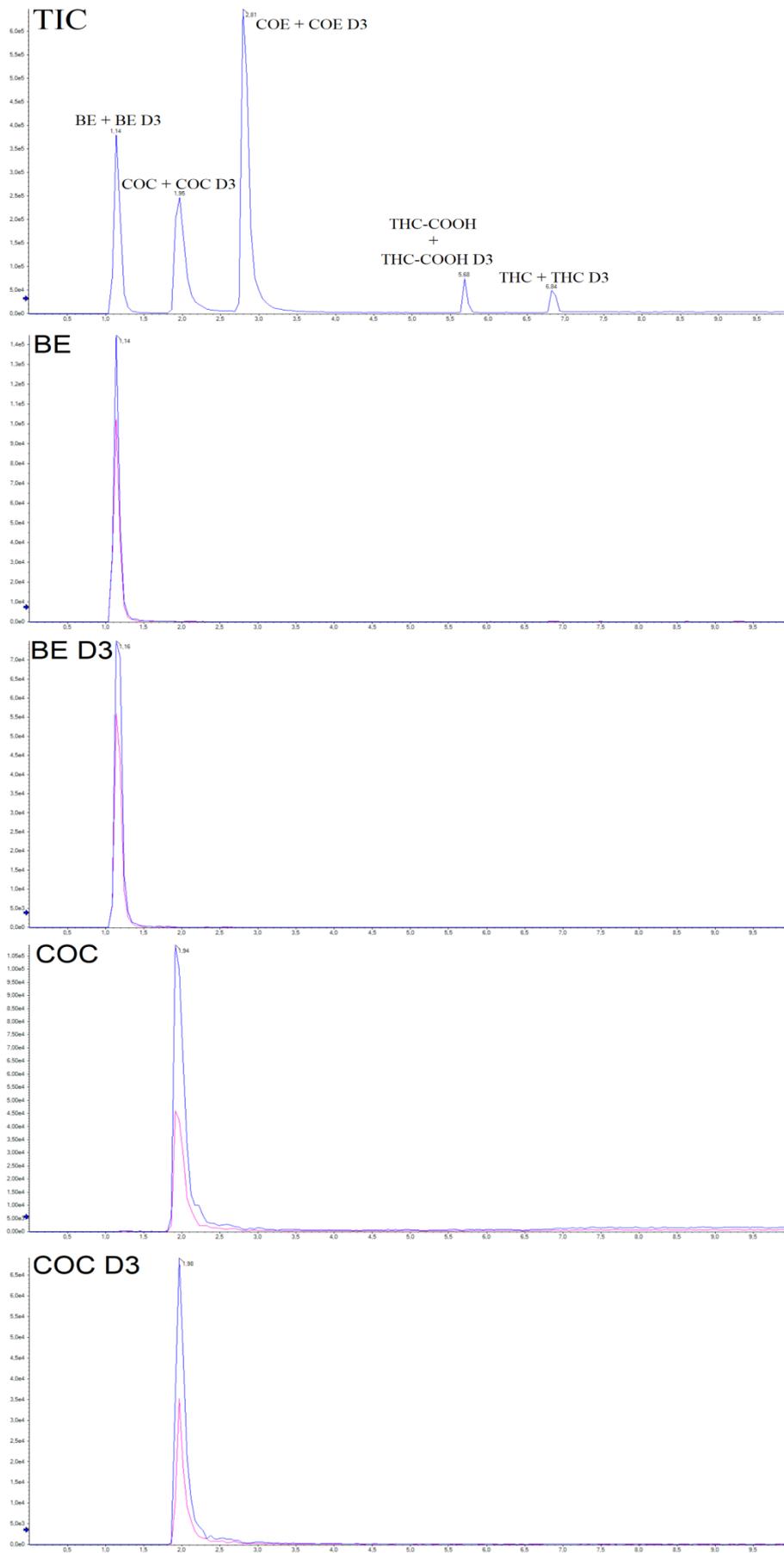


Figura 18: Cromatograma do XIC de cada analito e do TIC.

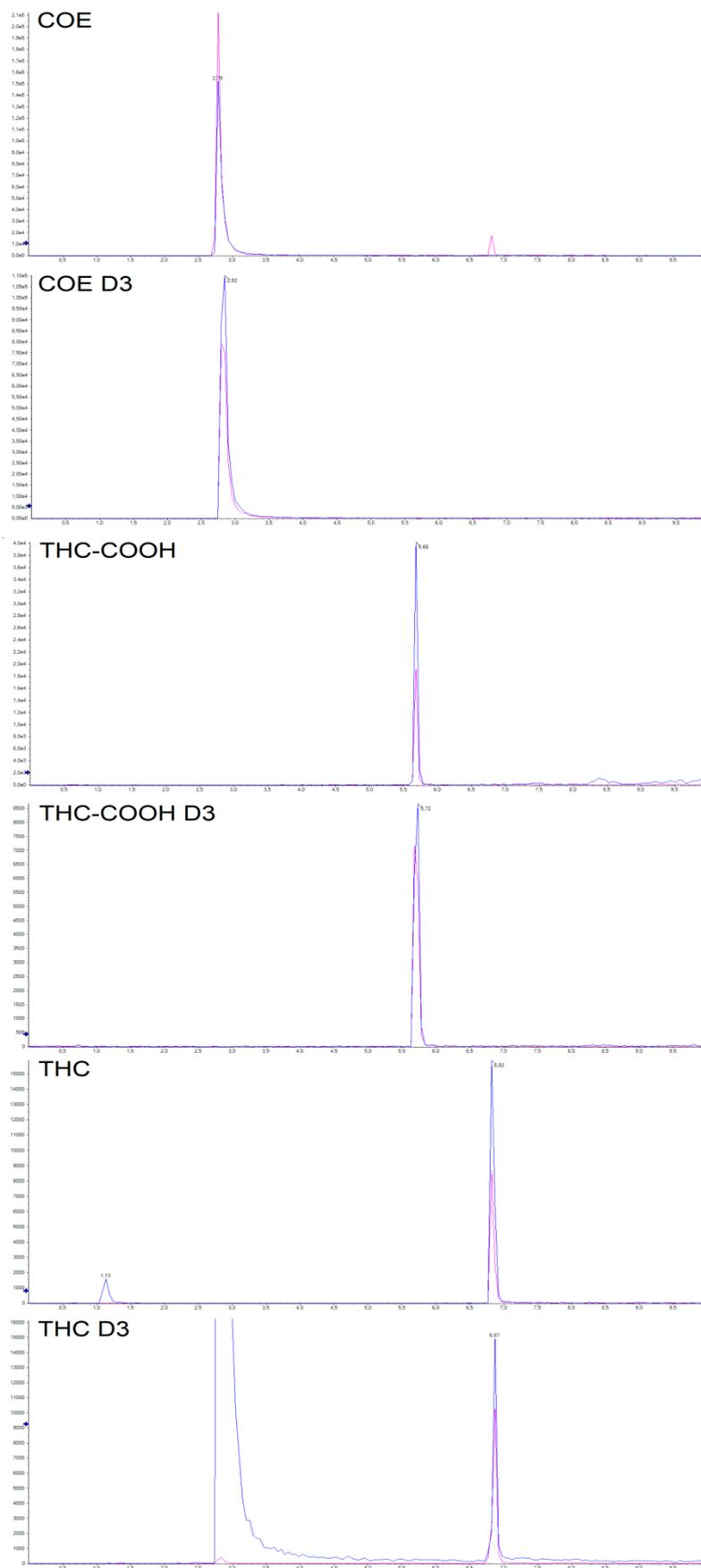


Figura 18: Cromatograma do XIC de cada analito e do TIC (continuação).

Nos cromatogramas é possível notar que houve coeluição dos analitos e seus deuterados, mas mesmo assim foi possível identifica-los separadamente. Isso é possível já que o modo MRM fornece transições distintas para cada substância. Além disso, a coeluição do padrão e seu deuterado é ideal para corroborar à afirmação de que os deuterados estão submetidos às mesmas variáveis ao longo do método analítico. Já que os deuterados estão sendo usados como padrões surrogate essa afirmação é de suma importância. Na Tabela 8 estão os tempos de retenção de cada composto.

Tabela 8: Tempo de retenção de cada composto.

Analito	Tempo de retenção (min)
THC	6,87
THC D3	6,87
THC-COOH	5,70
THC-COOH D3	5,74
COC	1,93
COC D3	1,95
BE	1,14
BE D3	1,15
COE	2,79
COE D3	2,81

Ao se analisarem as amostras, notou-se que os sinais de THC-COOH e THC estavam muito baixos. Assim, foi necessário revisar as condições instrumentais de modo a buscar a maior detectabilidade possível. Dois novos métodos cromatográficos e do MRM foram desenvolvidos, um específico para THC e THC D3 e outro específico para THC-COOH e THC-COOH D3. Esta abordagem foi necessária visto que o monitoramento de várias transições em uma mesma análise MRM, pode promover uma queda inerente do sinal das transições, pois quanto maior o número de transições monitoradas, maior o tempo necessário para o sistema retornar ao campo elétrico específico para cada transição, podendo acarretar em perda de íons, ou seja, perda de sinal.

O método dedicado e específico para THC e THC D3 não resultou em melhoria na intensidade do sinal. Porém, o método dedicado ao THC-COOH e seu deuterado gerou uma melhoria substancial para os sinais. A Tabela 9 mostra os parâmetros utilizados para o método dedicado e a Tabela 10 os tempos de retenção dos compostos analisados.

Tabela 9: Parâmetros obtidos do método cromatográfico novo exclusivo para THC-COOH

Parâmetro	Valor
Vazão da fase móvel	300 $\mu\text{L}/\text{min}$
Temperatura da coluna	30 $^{\circ}\text{C}$
Volume de injeção	10 $\mu\text{L}$
Gradiente de fase móvel	0 – 1 min: 20% B 1 – 2 min: 20-95% B 2 – 3 min: 95% B
Tempo de condicionamento da coluna	5 min

Tabela 10: Tempos de retenção do novo método cromatográfico específico para o THC-COOH

Analito	Tempo de retenção (min)
THC-COOH	1,53
THC-COOH D3	1,52

### 5.3. Desempenho analítico

#### 5.3.1. Linearidade das curvas analíticas

Para avaliar a linearidade do método, uma curva analítica foi construída com padronização interna, empregando-se doze pontos de 20 a 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ . As Figuras 19 a 23 mostram as curvas analíticas obtidas para cada composto.

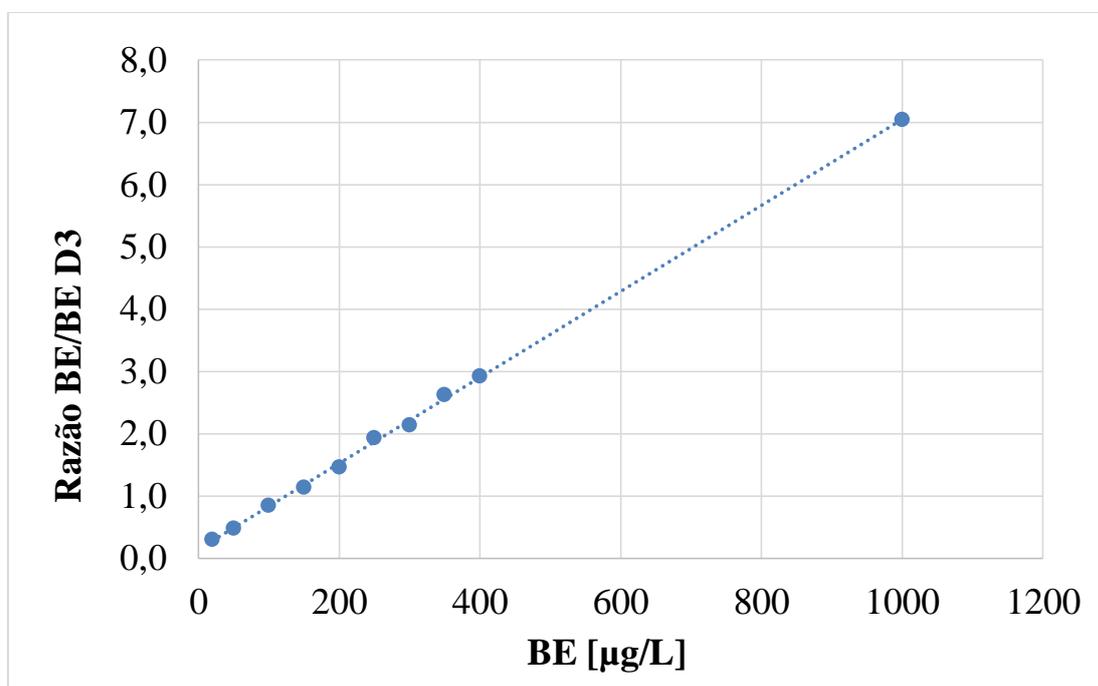


Figura 19: Curva analítica da BE com padronização interna pela BE D3.

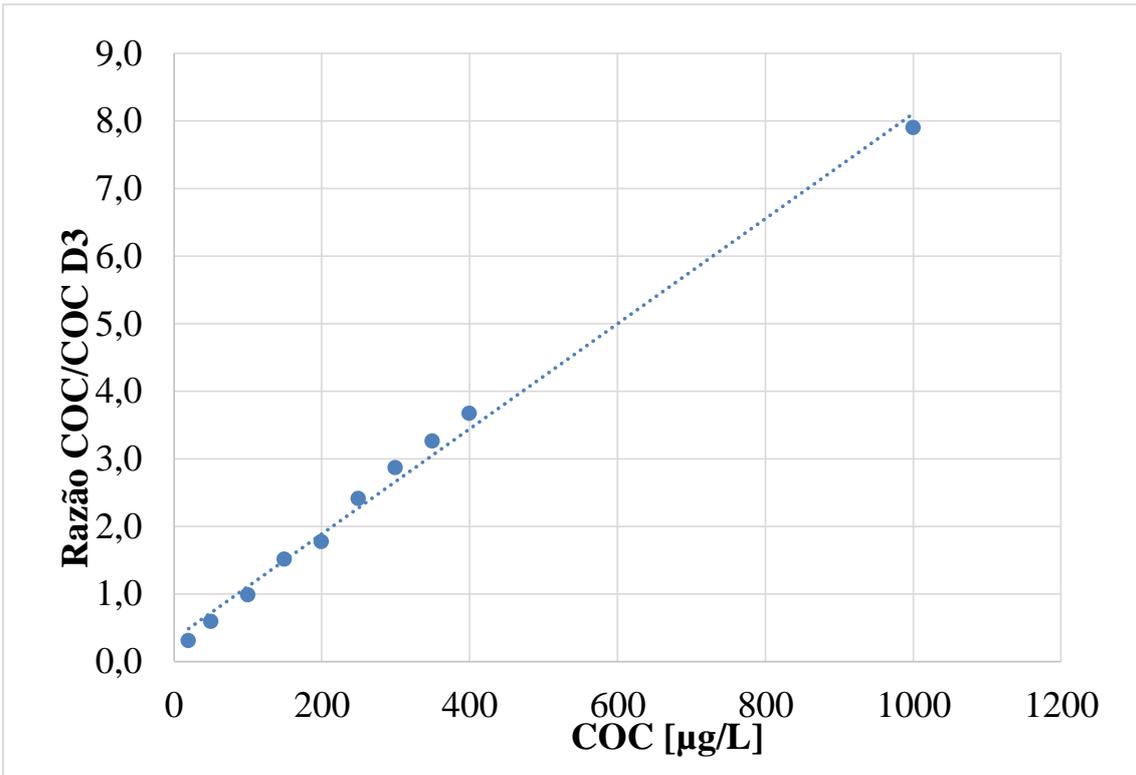


Figura 20: Curva analítica da COC com padronização interna pela COC D3.

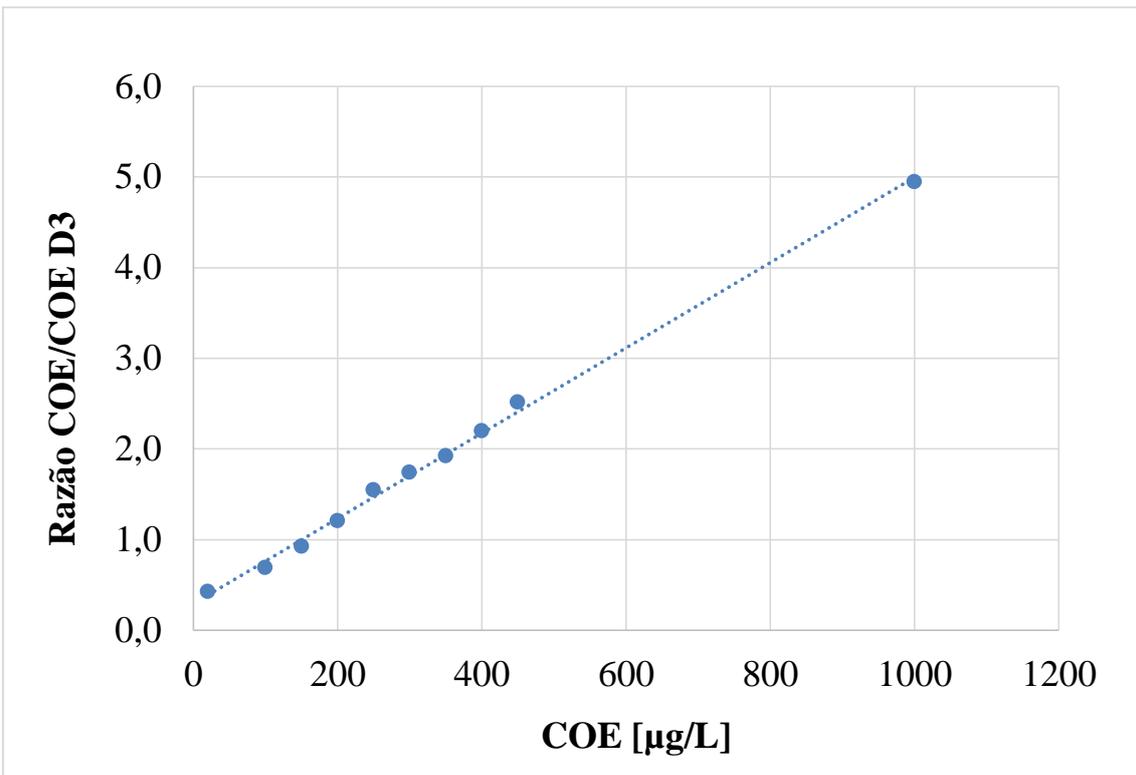


Figura 21: Curva analítica do COE com padronização interna pela COE D3.

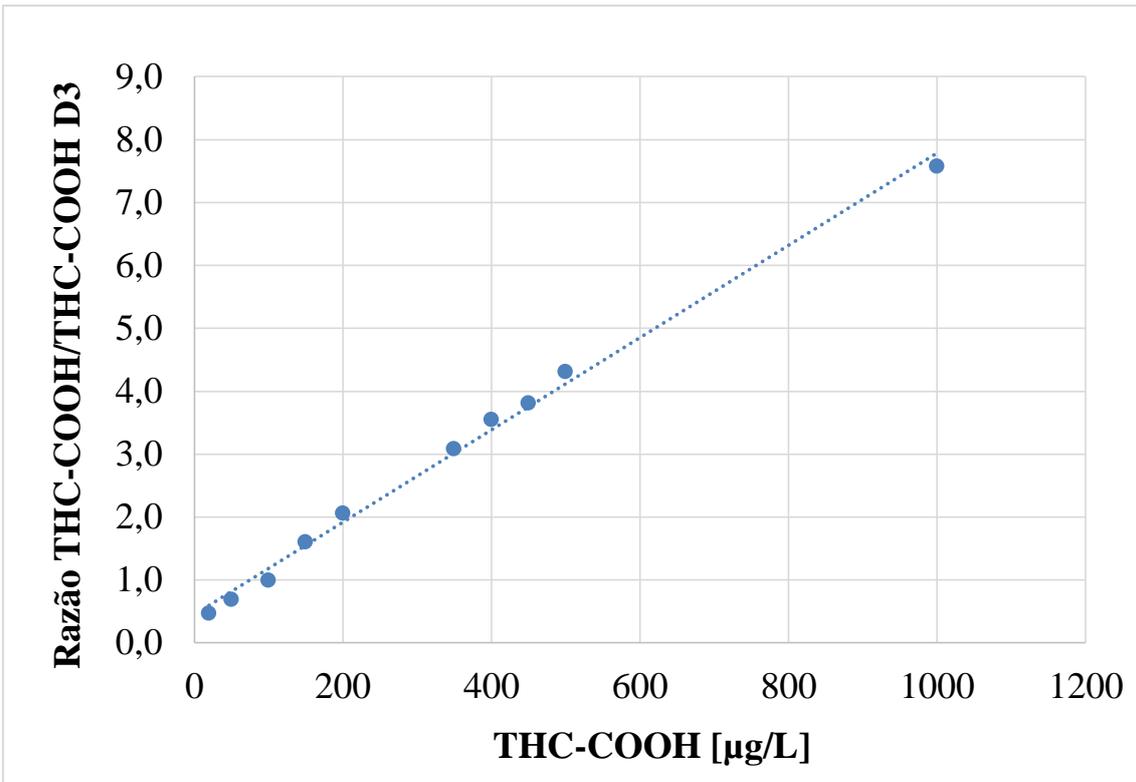


Figura 22: Curva analítica do THC-COOH com padronização interna pelo THC-COOH D3.

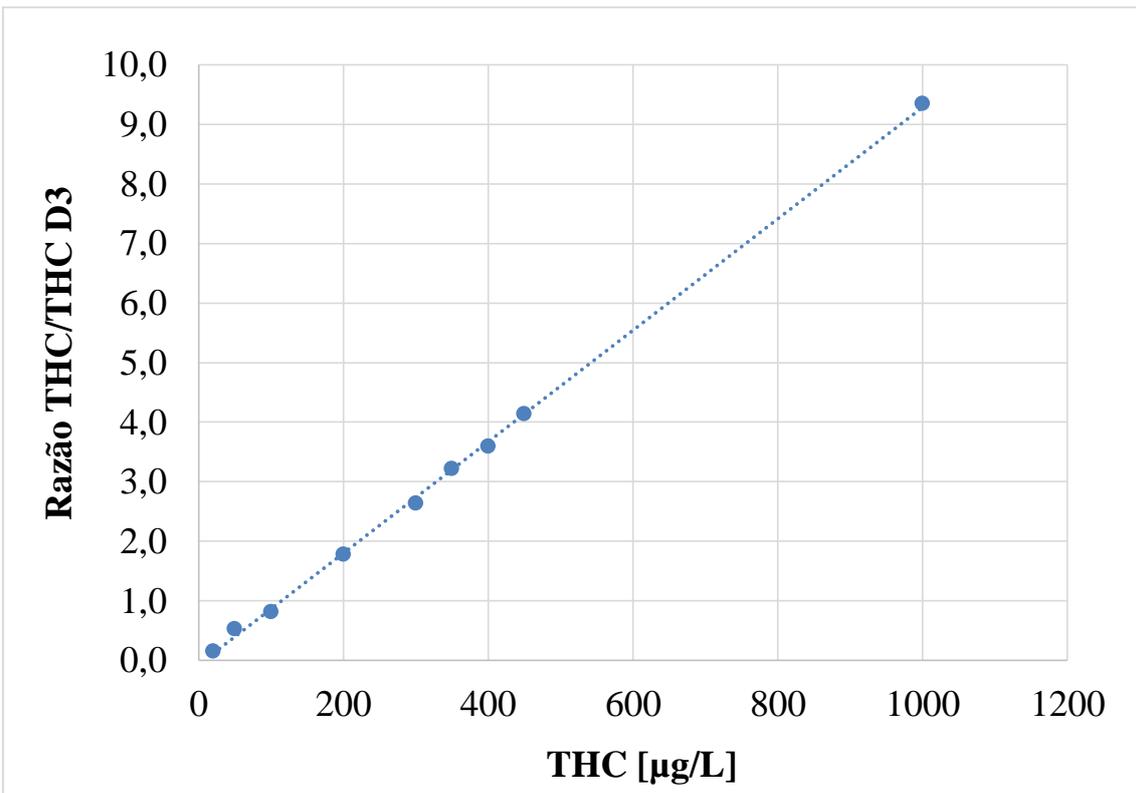


Figura 23: Curva analítica do THC com padronização interna pelo THC D3.

Nota-se que as curvas não possuem, necessariamente, os doze pontos que foram adquiridos, isso se deu pelo fato de que em alguns pontos os valores obtidos foram muito anômalos, o que gerou uma necessidade da realização do teste Q. Foi necessário eliminar os seguintes pontos: no caso da BE e COC retirou-se o 450 e o 500; do COE o 50 e 500; do THC-COOH o 250 e 300; e do THC o 150, 250 e 500.

Os dados utilizados para calcular essa curva foram tratados pelo modelo de regressão linear simples, a Tabela 11 apresenta os parâmetros adquiridos.

Tabela 11: Parâmetros calculados das curvas analíticas.

Analito	Padrão Interno	Equação da reta	R <sup>2</sup>	Faixa Linear (µg/L)
BE	BE D3	$y = 0,0069x + 0,1397$	0,992	20 – 1000
COC	COC D3	$y = 0,0078x + 0,3327$	0,997	20 – 1000
COE	COE D3	$y = 0,0047x + 0,2954$	0,996	20 – 1000
THC-COOH	THC-COOH D3	$y = 0,0073x + 0,4498$	0,973	20 – 1000
THC	THC D3	$y = 0,0094x - 0,0748$	0,970	20 – 1000

Os resultados mostram que a linearidade do método está adequada em virtude dos valores de R<sup>2</sup> obtidos pelo ajuste de dados. O R<sup>2</sup>, pelas normas da ANVISA, deve ser superior à 0,99, e nota-se que as curvas do THC-COOH e THC não alcançaram esse requisito, porém ao levar em consideração que esses compostos não possuem uma ionização boa (diferente dos outros três analitos), um R<sup>2</sup> de aproximadamente 0,97 é considerado adequado.

Ao realizar as análises das amostras, notou-se que as faixas de trabalho das curvas analíticas geradas não estavam adequadas às concentrações do analito na amostra após tratamento. As concentrações estavam menores do que os limites das curvas, o que demandou a confecção de novas curvas analíticas usando concentrações menores para todas as substâncias, com exceção do THC, haja vista que não houve detecção desta substância em nenhuma das amostras. Nas Figuras 24 a 27 estão as curvas geradas e a Tabela 12 mostram os novos parâmetros obtidos.

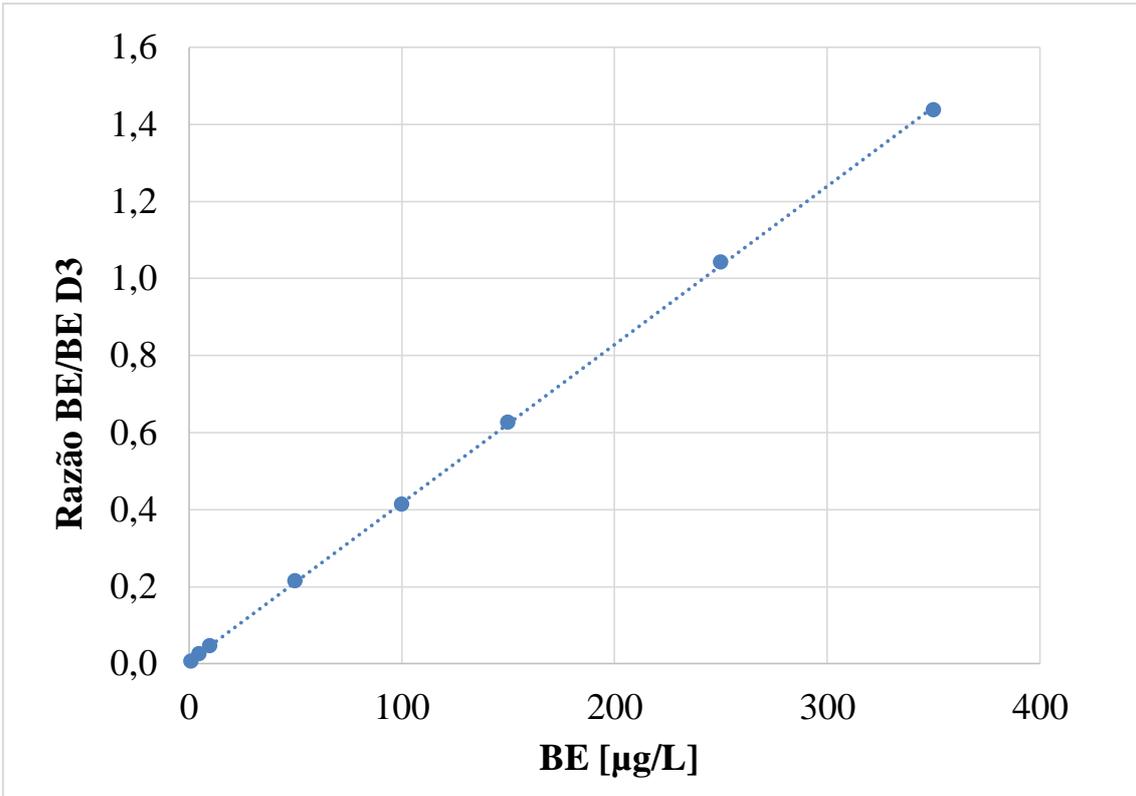


Figura 24: Curva analítica da BE com padronização interna pela BE D3.

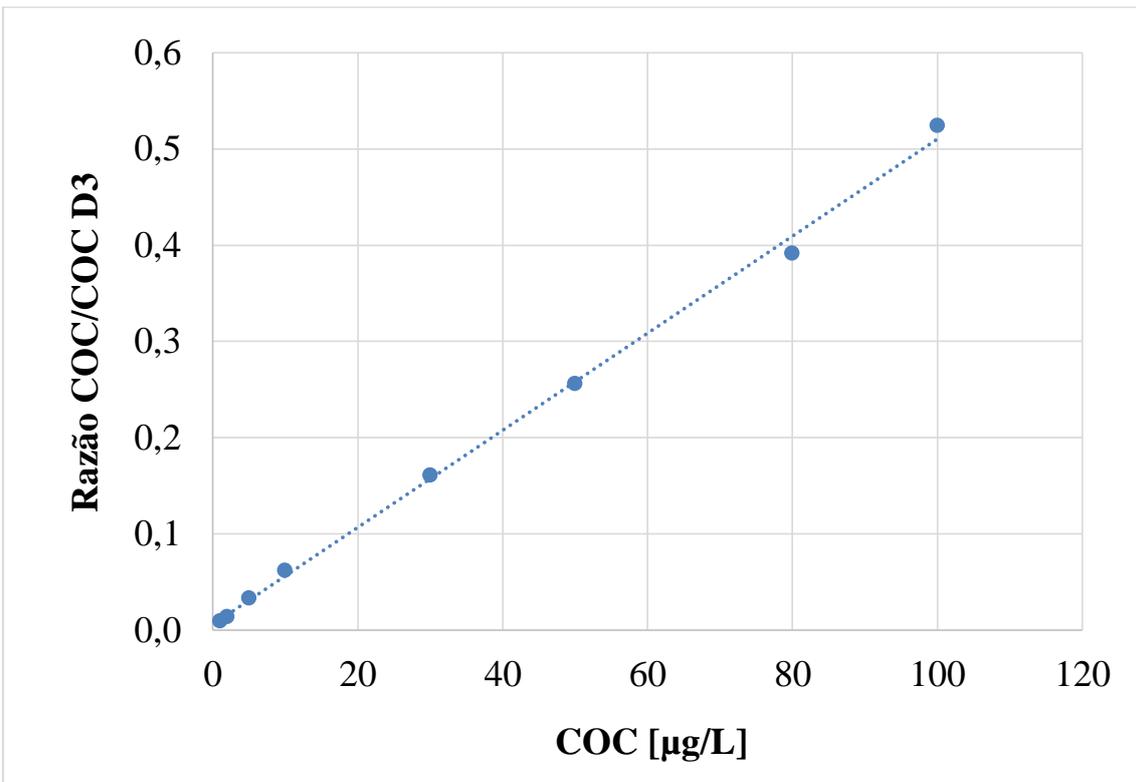


Figura 25: Curva analítica da COC com padronização interna pela COC D3.

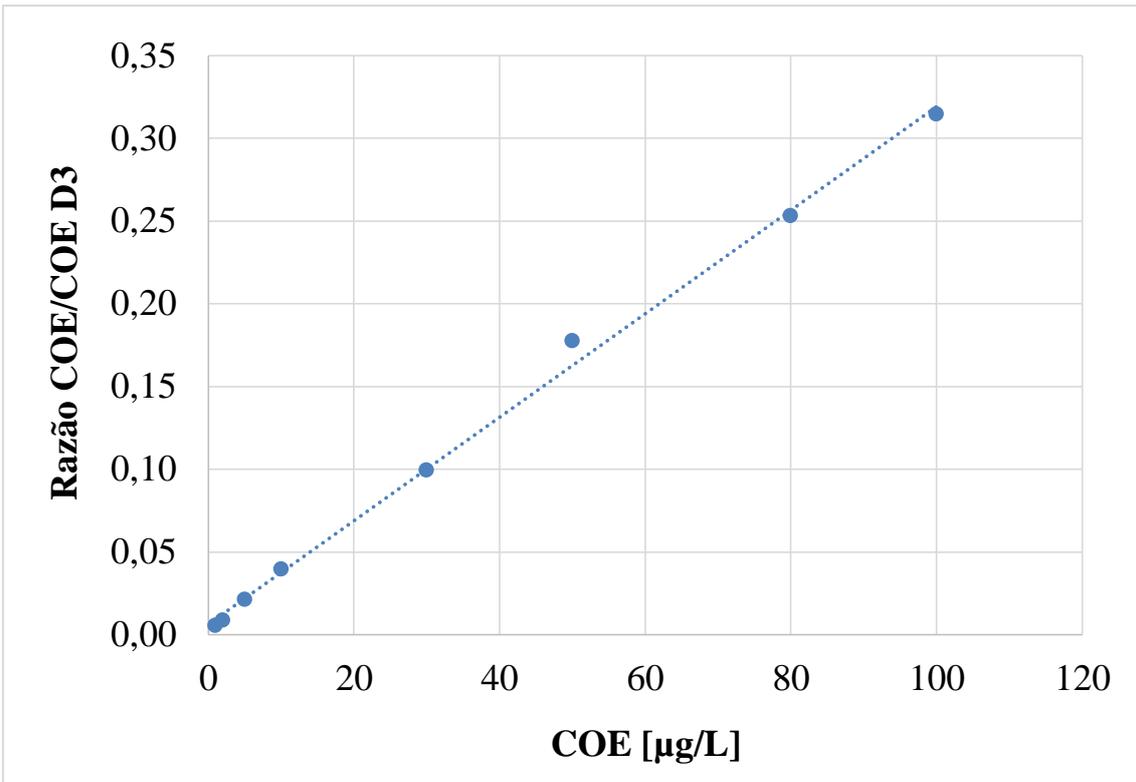


Figura 26: Curva analítica do COE com padronização interna pelo COE D3.

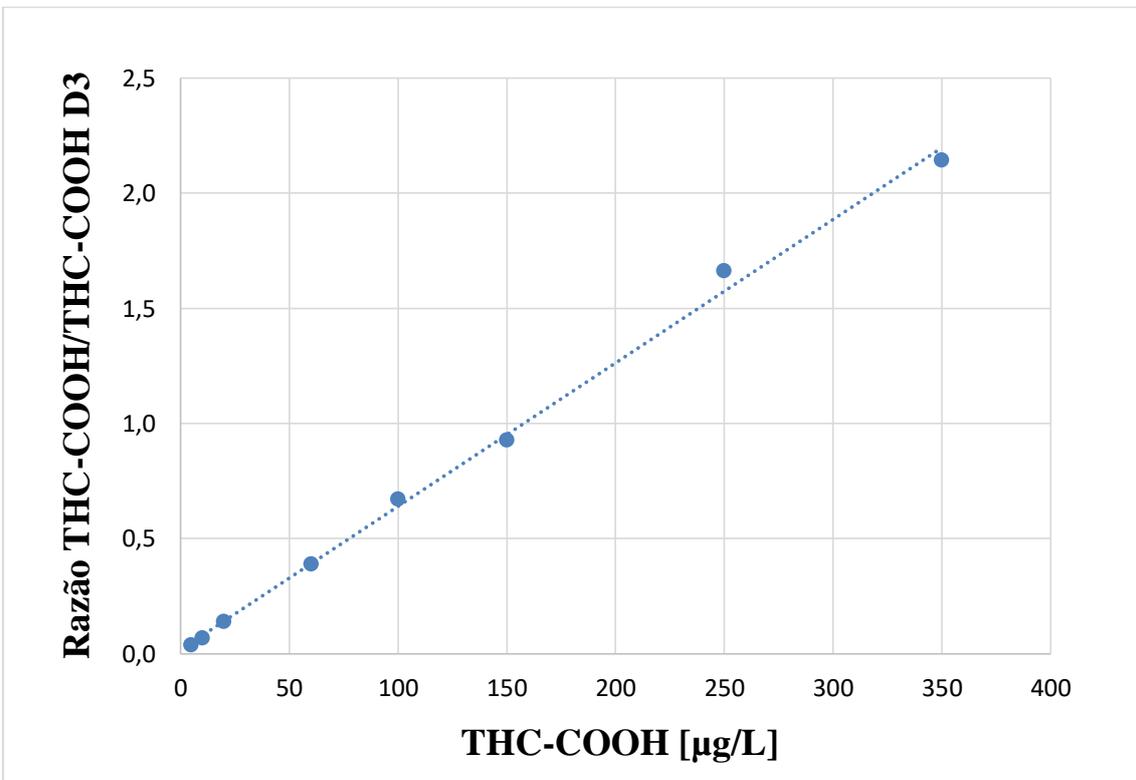


Figura 27: Curva analítica do THC-COOH com padronização interna pelo THC-COOH D3.

Tabela 12: Parâmetros das novas curvas analíticas geradas

Analito	Padrão Interno	Equação da reta	R <sup>2</sup>	Faixa Linear (µg/L)
BE	BE D3	$y = 0,00411x + 0,00439$	0,998	1 – 350
COC	COC D3	$y = 0,00503x + 0,00632$	0,996	1 – 100
COE	COE D3	$y = 0,00312x + 0,00619$	0,995	1 – 100
THC-COOH	THC-COOH D3	$y = 0,00623x + 0,01739$	0,995	5 – 350

Além da faixa de trabalho ter sido deslocada para valores menores, também houve uma melhora substancial no R<sup>2</sup> das curvas analíticas, notadamente para o THC-COOH e do BE, se comparado às curvas geradas anteriormente, permitindo uma maior confiabilidade para os cálculos de concentração. Cabe mencionar que o THC-COOH foi analisado usando um método cromatográfico dedicado.

### 5.3.2. Detectabilidade

A capacidade de detecção do método deste trabalho foi calculada a partir do limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ). Como neste trabalho o cálculo da concentração é realizado a partir das áreas dos sinais gerados pelo equipamento, o LOQ é o mais importante, pois sua definição consiste na menor concentração do analito que pode ser quantificada na amostra com precisão e exatidão aceitáveis. Neste estudo existem dois tipos de LOQ e LOD, o instrumental e o do método. O instrumental é exclusivo da técnica utilizada (LC-MS/MS), sem levar em consideração o preparo de amostra, em que houve uma pré-concentração de 100 vezes da amostra. Já o LOQ e o LOD do método, levam em consideração a técnica utilizada e o preparo de amostra, por isso estes dois são 100 vezes menor que os LOQ e LOD instrumentais.

Neste estudo, os LOD e LOQ do instrumento (LODI e LOQI respectivamente) foram calculados a partir do menor ponto de cada curva analítica. Para realizar esse cálculo, levou-se em consideração que a concentração do ponto mais baixo da curva analítica corresponde ao LOQ, e que o LOD é 0,3 vezes do LOQ.

Uma vez que os LODI e LOQI são calculados, os LOD e LOQ do método (LODM e LOQM) são obtidos considerando-se que no preparo de amostra há uma pré-concentração em 100 vezes. A Tabela 13 mostra os valores de LODI, LODM, LOQI e LOQM que foram calculados.

Tabela 13: Valores de LOD e LOQ de cada composto

Analito	LODI $\mu\text{g L}^{-1}$	LOQI $\mu\text{g L}^{-1}$	LODM $\text{ng L}^{-1}$	LOQM $\text{ng L}^{-1}$
THC	6	20	60	200
THC-COOH	1,5	5	15	50
COC	0,3	1	3	10
BE	0,3	1	3	10
COE	0,3	1	3	10

### 5.3.3. Precisão

A precisão do instrumento corresponde à reprodutibilidade dos resultados obtidos de uma série de medidas de diversas replicatas de uma amostra homogênea sob as mesmas condições. Nas Tabelas 14 e 15 estão os coeficientes de variação (CV) de alguns pontos das primeiras curvas analíticas e das últimas curvas analíticas produzidas, respectivamente.

Tabela 14: Coeficientes de variação (em %, n = 3) para as soluções padrão usadas na construção de curvas analíticas com padronização interna. Faixa de trabalho superior.

Compostos	CV (%)						
	20 $\mu\text{g/L}$	100 $\mu\text{g/L}$	200 $\mu\text{g/L}$	300 $\mu\text{g/L}$	400 $\mu\text{g/L}$	500 $\mu\text{g/L}$	1000 $\mu\text{g/L}$
BE	7,75	5,07	3,85	3,19	4,45	2,68	6,02
COC	3,49	2,93	3,42	2,51	3,53	2,36	3,76
COE	4,01	3,67	8,32	3,43	3,68	3,40	0,93
THC	10,68	7,20	4,78	7,67	7,53	6,83	4,08
THC-COOH	9,01	7,72	7,56	6,33	6,27	9,90	8,53

Tabela 15: Coeficientes de variação (em %, n = 3) para as soluções padrão usadas na construção de curvas analíticas com padronização interna. Faixa de trabalho inferior.

Composto	CV (%)					
	1 $\mu\text{g/L}$	10 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$	100 $\mu\text{g/L}$	150 $\mu\text{g/L}$	350 $\mu\text{g/L}$
BE	3,61	4,37	2,99	1,56	2,78	3,9
COC	1,26	1,10	1,77	3,55	*	*
COE	2,26	1,91	1,30	5,57	*	*
THC-COOH	*	1,56	*	2,25	3,94	3,34

\*: Não analisada

Os CVs, das curvas que foram usadas para a quantificação, ficaram menores que 10%, portanto a precisão obtida é aceitável em níveis de ultra-traço.

#### 5.3.4. Exatidão

A exatidão de um método analítico é definida pelo grau de concordância entre os valores obtidos de uma medida com um método analítico em estudo e os valores obtidos de referência tidos como verdadeiros. No caso deste estudo as variáveis que irão afetar a exatidão dos resultados obtidos são a recuperação dos analitos no preparo da amostra e a supressão de sinal gerada pela matriz, por se tratar de uma matriz tão complexa como o esgoto afluyente.

Para circundarmos essas variáveis, padrões surrogate (substâncias deuteradas de cada analito) foram utilizados. Esses padrões surrogate utilizados são idênticos aos analitos, salvo pelos deutérios no lugar dos hidrogênios. Portanto é possível assumir que todas as variáveis que afetam a recuperação e a magnitude do sinal analítico das substâncias de interesse também irão afetar os padrões surrogate. Por isso que a curva analítica é construída com a razão entre sinal mais intenso do analito e o sinal mais intenso de seu análogo deuterado.

#### 5.4. Quantificação dos analitos nas amostras de esgoto afluyente

As amostras laboratoriais foram analisadas e as áreas dos sinais foram calculadas através do algoritmo SignalFinder1 do Multiquant 3.0.3, que é o software de quantificação da Sciex. Com as áreas calculadas, as integrações feitas pelo programa foram checadas individualmente para corrigir eventuais erros de integração por parte do algoritmo. A Equação 2 foi utilizada para calcular a concentração dos analitos no esgoto.

$$C_{analito} = \frac{(A_{sinal} - b) \times 1000}{a \times f_c} \quad (2)$$

Sendo que a ( $C_{analito}$ ) corresponde à concentração do analito em ng L<sup>-1</sup>; ( $A_{sinal}$ ) é a razão entre a área do sinal gerada pelo analito e a área do sinal gerada pelo seu análogo deuterado; ( $b$ ) é coeficiente linear da curva analítica produzida para o analito; ( $a$ ) corresponde ao coeficiente angular da curva analítica produzida para o analito; ( $f_c$ ) é

o fator de concentração no preparo da amostra – que no caso deste trabalho foi de 100 –; e a multiplicação por 1000 é para transformar a concentração de  $\mu\text{g L}^{-1}$  para  $\text{ng L}^{-1}$ , visto que a curva analítica foi construída em  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Na Tabela 16 estão as concentrações em  $\text{ng L}^{-1}$  de cada dia, já levando em consideração o fator de concentração de 100 vezes utilizado no preparo das amostras.

Tabela 16: Concentrações das substâncias alvo quantificadas (em  $\text{ng L}^{-1}$ ) nas amostras coletadas durante o período de Carnaval de 2019 e o período subsequente das estações de tratamento norte e sul.

Dia da Semana	Data	BE ( $\text{ng L}^{-1}$ )	COC ( $\text{ng L}^{-1}$ )	COE ( $\text{ng L}^{-1}$ )	THC( $\text{ng L}^{-1}$ )	THC-COOH ( $\text{ng L}^{-1}$ )
ETE Norte						
Sexta-feira*	01/03/2019	2945,4	1161,0	15,2	< LOD	244,6
Sábado*	02/03/2019	2453,3	1092,3	37,4	< LOD	446,3
Domingo*	03/03/2019	2436,4	822,8	26,4	< LOD	351,4
Segunda-feira*	04/03/2019	1703,9	867,2	10,4	< LOD	327,7
Terça-feira*	05/03/2019	2843,6	779,4	20,0	< LOD	375,2
Quarta-feira	06/03/2019	2181,4	676,9	5,6	< LOD	304,0
Quinta-feira	07/03/2019	2125,8	610,7	9,4	< LOD	313,4
Sexta-feira	08/03/2019	2036,4	778,1	9,3	< LOD	269,1
Sábado	09/03/2019	1537,9	1093,8	53,3	< LOD	303,7
Domingo	10/03/2019	1752,5	943,6	45,3	< LOD	243,1
Segunda-feira	11/03/2019	1426,7	646,9	25,3	< LOD	251,4
Terça-feira	12/03/2019	1283,5	718,5	13,2	< LOD	280,8
Quarta-feira	13/03/2019	1211,3	631,1	< LOQ	< LOD	311,2
Quinta-feira	14/03/2019	1423,8	543,8	12,6	< LOD	256,4
Sexta-feira	15/03/2019	1904,1	730,1	5,2	< LOD	279,8
ETE Sul						
Sexta-feira*	01/03/2019	2087,9	838,5	5,8	< LOD	106,9
Sábado*	02/03/2019	3680,1	1190,2	29,5	< LOD	279,8
Domingo*	03/03/2019	1902,3	1012,9	17,5	< LOD	190,9
Segunda-feira*	04/03/2019	1387,0	730,0	8,2	< LOD	218,3
Terça-feira*	05/03/2019	1971,7	753,6	7,4	< LOD	163,6
Quarta-feira	06/03/2019	1565,9	606,9	< LOQ	< LOD	108,9
Quinta-feira	07/03/2019	1537,7	616,0	< LOQ	< LOD	149,9
Sexta-feira	08/03/2019	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Sábado	09/03/2019	1264,4	825,7	14,5	< LOD	172,7
Domingo	10/03/2019	1200,9	576,8	13,8	< LOD	168,2
Segunda-feira	11/03/2019	1182,5	572,8	13,9	< LOD	165,5
Terça-feira	12/03/2019	1036,4	500,2	< LOQ	< LOD	196,9
Quarta-feira	13/03/2019	1395,2	491,4	6,5	< LOD	167,6
Quinta-feira	14/03/2019	1811,7	711,9	2,8	< LOD	139,8

Sexta-feira	15/03/2019	2238,1	688,2	8,8	< LOD	208,3
-------------	------------	--------	-------	-----	-------	-------

\*: Período do Carnaval de 2019, os outros dias foram classificados como período subsequente ao Carnaval.

< LOD: Valores menores que o LOD.

< LOQ: Valores menores que o LOQ.

N/A: Amostra não-analisada por erro durante a eluição.

Os valores destas concentrações estão semelhantes às concentrações encontradas por estudos prévios realizados pelo nosso grupo nas mesmas ETEs (da Silva et al., 2018; Maldaner et al., 2012; Sodr e et al., 2018, 2017).   importante salientar que nestes estudos o método de prepara o de amostra era focado na extra o de BE e COC, método que não gera bons resultados para o THC-COOH. Portanto, pode-se inferir que o método de prepara o deste trabalho foi eficiente em extrair simultaneamente THC-COOH, COC, BE e COE de amostras de esgoto bruto. Essa extra o simultânea não   trivial, visto que os canabinoides e cocaínicos possuem propriedades físico-químicas distintas que normalmente demandam preparo de amostra específico para cada um desses grupos de substâncias psicoativas.

### **5.5. Razão COC/BE e a procedência da cocaína do esgoto**

Outro dado importante que   possível obter a partir da quantifica o dos compostos da cocaína no esgoto afluyente   saber qual a procedência da cocaína presente no esgoto, se essa cocaína prov m da metaboliza o por consumo humano ou por despejo direto no esgoto por locais em que a cocaína   manuseada. Os estudos realizados por Van Nuijs et al., 2009 propuseram um valor limite de 0,75 para essa razão, sendo que valores abaixo de 0,75 sugerem que a fonte foi de metaboliza o humana da cocaína e valores acima indicam o despejo direto da cocaína no esgoto. A Figura 28 demonstra as razões COC/BE adquiridas nesse estudo.

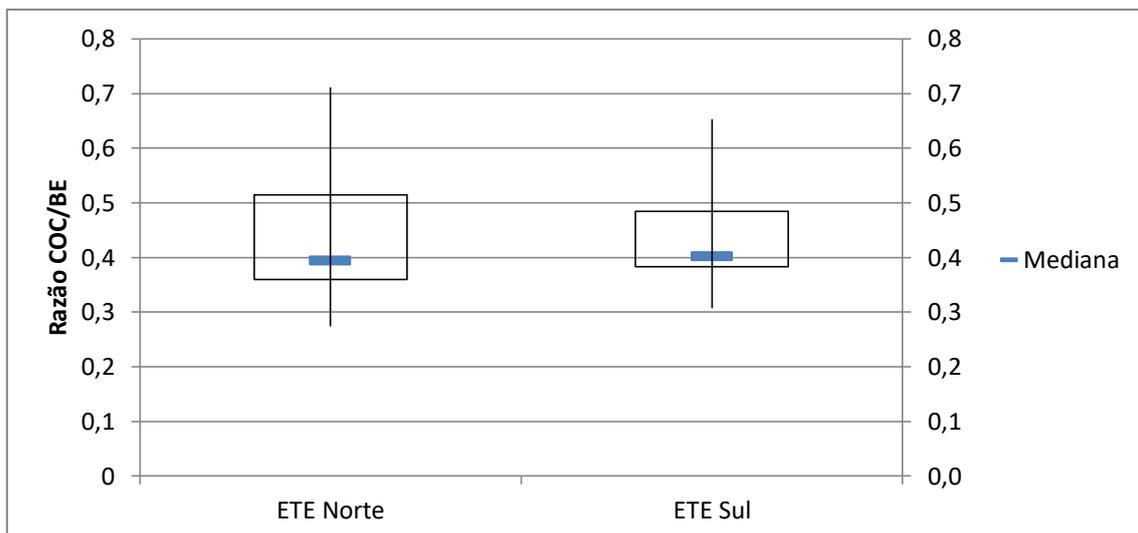


Figura 28: Projeção Boxplot dos valores obtidos da razão COC/BE das ETEs Norte e Sul.

Apesar de utilizarem os valores das razões COC/BE como um indício da procedência da cocaína no esgoto, este indicador não está sendo muito utilizado nos últimos anos, visto que a metabolização e estabilidade dessas moléculas no esgoto serem de difícil determinação ainda, esse indicador vem com muitas incertezas. Apesar da situação deste indicador, as razões obtidas de COC/BE estão abaixo do valor de 0,75 estabelecido por Van Nuijs et al., 2009, portanto pode indicar um predomínio do consumo humano para explicar de onde está vindo a cocaína presente no esgoto, em detrimento do despejo direto por manuseio. A Figura 29 mostra os dados dessa razão de todos os dias em que as amostras foram avaliadas.

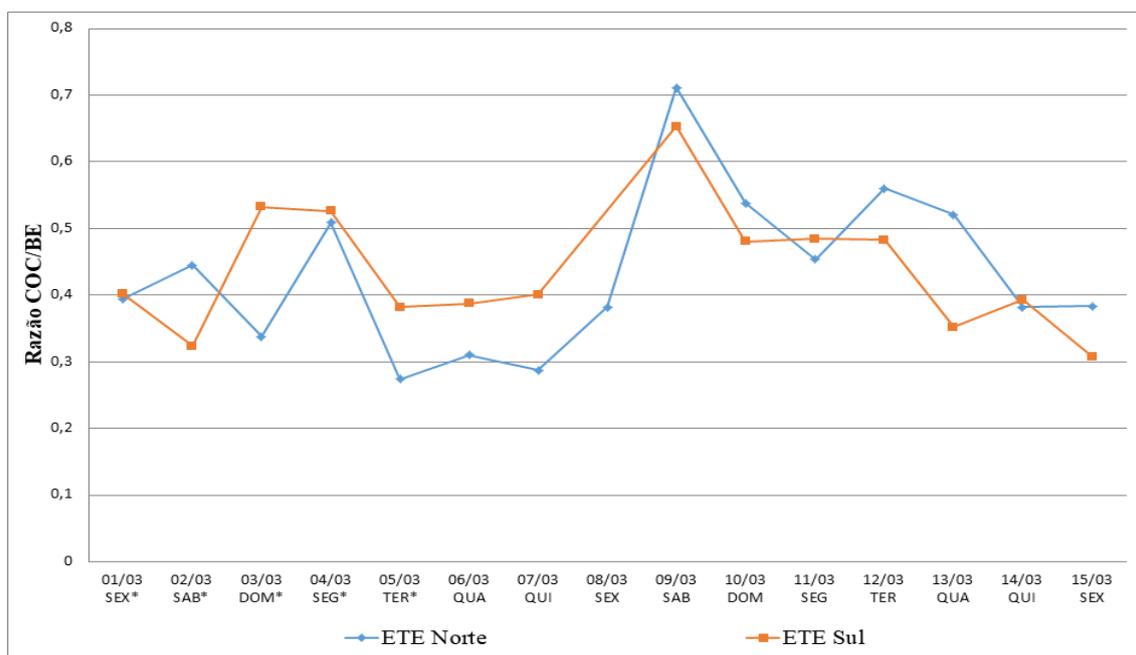


Figura 29: Gráfico das razões COC/BE obtidas de cada dia em que as amostras foram analisadas de cada estação de tratamento.

\*: Período do Carnaval de 2019, os outros dias foram classificados como período subsequente ao Carnaval.

Os resultados das razões COC/BE obtidos neste estudo estão similares aos que foram encontrados por estudos prévios pelo nosso grupo nas mesmas ETEs (da Silva et al., 2018; Maldaner et al., 2012; Sodré et al., 2018, 2017) quanto em trabalhos realizados em outros países (Ratola et al., 2012; van Nuijs et al., 2009). Mais um resultado que corrobora para a utilização desse método para a quantificação destes cocaínicos.

Na Figura 29 podemos ver que no dia 09/03/2019, um sábado, houve um pico dessa razão COC/BE em ambas ETEs, indicando um possível aumento do despejo de cocaína não consumida no esgoto, e uma diminuição da cocaína consumida, para explicarmos a procedência da cocaína presente no esgoto.

## 5.6. Consumo concomitante de álcool e cocaína

O uso concomitante de álcool e cocaína é bastante comum, e muito nocivo, visto que o metabólito gerado específico deste uso é o COE, um metabólito ativo, ou seja, este composto também possui alguma ação no corpo humano, que no caso é muito similar ao da COC.

A farmacocinética da cocaína muda quando há uso com o álcool, a porcentagem de excreção de BE diminui entre 20 e 40% e a taxa de excreção do COE varia entre 0,1 e 0,7%, sendo que essa última taxa está diretamente ligada à proporção de álcool e cocaína ingeridos, com essas informações é possível avaliar se houve uma preferência pelo consumo concomitante de cocaína com álcool ao calcular a razão COE/BE (Rodríguez-Álvarez et al., 2015). A Figura 30 mostra a razão de COE/BE em cada dia avaliado neste estudo.

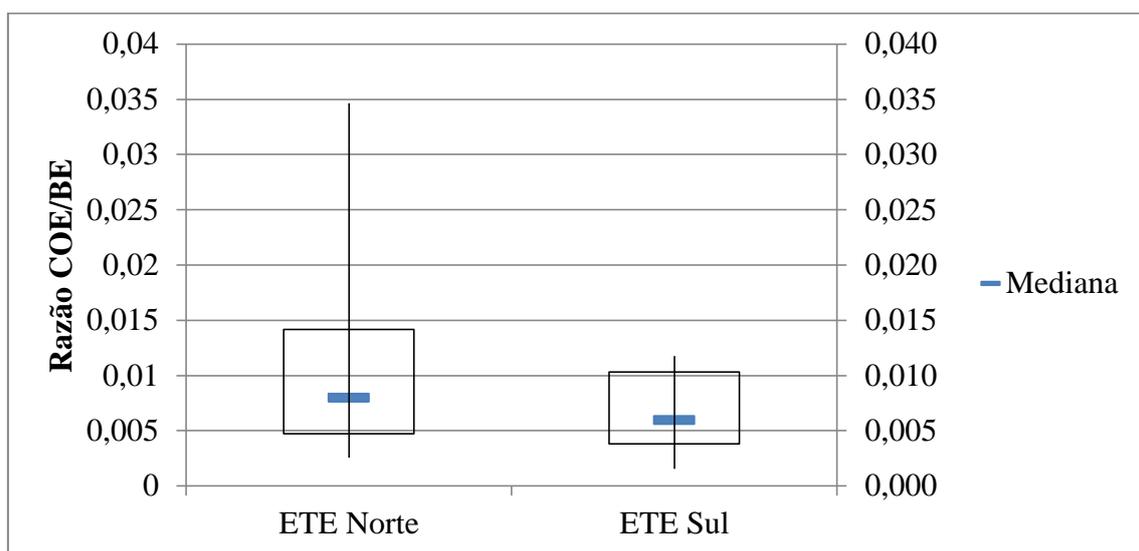


Figura 30: Gráfico Boxplot dos valores obtidos das razões COE/BE das ETEs Norte e Sul.

No caso desse estudo a maioria dos valores das razões COE/BE obtidos foram abaixo do esperado, visto que Cami et al. (1998) obtiveram valores entre 0,025 e 0,033, Harris et al. (2003) observaram valores entre 0,031 e 0,055 e da Silva et al., 2018 reportaram valores entre 0,015 e 0,074 para amostras coletadas em Brasília, sendo uma delas proveniente do Carnaval de 2018. A Figura 31 mostra as razões obtidas de COE/BE nos dias avaliados neste estudo para avaliar se há alguma variação ao longo do período de coleta.

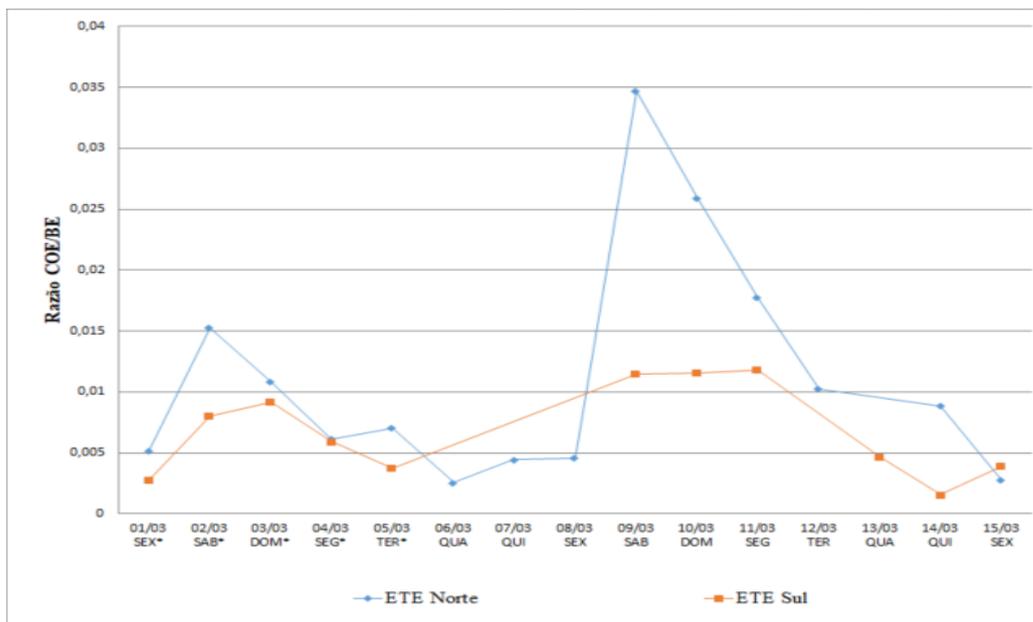


Figura 31: Gráfico das razões COE/BE obtidas de cada dia em que as amostras foram analisadas de cada estação de tratamento.

\*: Período do Carnaval de 2019, os outros dias foram classificados como período subsequente ao Carnaval.

A partir da Figura 31, é possível notar um pico dessa razão no fim de semana do período carnaval e no fim de semana do período subsequente, fenômeno mais proeminente na ETE Norte. Estes resultados estão de acordo com os resultados gerados pelo nosso grupo em estudos anteriores (da Silva et al., 2018), corroborando para a eficiência deste método. Este fenômeno pode ser explicado pela maior frequência do uso concomitante de álcool e cocaína durante os fins de semana, e eventos festivos.

Além disso, mais especificamente, é possível notar um aumento exacerbado da razão COE/BE na ETE Norte no dia 09/03/2019, similar ao que ocorreu com a razão COC/BE neste mesmo dia. Visto que o consumo de álcool com cocaína gera uma diminuição na excreção de BE, podemos inferir que esse poli uso possa ter contribuído para esses picos no dia 09/03/2019 de ambas as razões, já que esse poli uso acarreta em uma diminuição substancial da concentração presente no esgoto do denominador de ambas as razões.

### 5.7. Estimativa do consumo por habitante via EE

Assim que as concentrações das substâncias foram obtidas, foi possível realizar o cálculo da estimativa de consumo de cocaína e cannabis pela Equação (1), além disso, a unidade foi normalizada para mg/dia/1000hab. Apesar de não ser um passo

obrigatório é recomendado pela EMCDDA, pois permite a comparação entre estudos distintos. Na Tabela 17 podemos ver as estimativas de consumo em cada dia que amostras foram coletadas.

Tabela 17: Estimativa do consumo de COC e THC (em mg/dia/1000hab) do período de carnaval e do período subsequente da população atendida pelas estações de tratamento norte e sul do DF.

Dia da Semana	Data	COC (mg/dia/1000hab)	THC (mg/dia/1000hab)
ETE Norte			
Sexta-feira*	01/03/2019	3355,53	12102,79
Sábado*	02/03/2019	2828,74	22351,22
Domingo*	03/03/2019	2803,73	17567,32
Segunda-feira*	04/03/2019	1690,08	14119,95
Terça-feira*	05/03/2019	2677,58	15344,08
Quarta-feira	06/03/2019	2155,23	13047,63
Quinta-feira	07/03/2019	2141,08	13710,14
Sexta-feira	08/03/2019	1965,28	11281,07
Sábado	09/03/2019	1278,93	10970,45
Domingo	10/03/2019	1561,32	9408,53
Segunda-feira	11/03/2019	1299,73	9949,33
Terça-feira	12/03/2019	1347,15	12800,85
Quarta-feira	13/03/2019	1264,97	14118,37
Quinta-feira	14/03/2019	1429,72	11184,71
Sexta-feira	15/03/2019	2021,47	12905,00
ETE Sul			
Sexta-feira*	01/03/2019	2370,47	5275,79
Sábado*	02/03/2019	3683,92	12167,97
Domingo*	03/03/2019	2020,58	8810,53
Segunda-feira*	04/03/2019	1397,34	9553,75
Terça-feira*	05/03/2019	2016,45	7267,60
Quarta-feira	06/03/2019	1379,85	4167,39
Quinta-feira	07/03/2019	1429,72	6054,87
Sexta-feira	08/03/2019	N/A	N/A
Sábado	09/03/2019	1161,47	6891,58
Domingo	10/03/2019	996,87	6063,26
Segunda-feira	11/03/2019	906,99	5514,22

Terça-feira	12/03/2019	952,57	7859,79
Quarta-feira	13/03/2019	1292,47	6743,35
Quinta-feira	14/03/2019	1882,10	6306,66
Sexta-feira	15/03/2019	2266,72	9164,72

\*: Período do Carnaval de 2019, os outros dias foram classificados como período subsequente ao Carnaval.

N/A: Amostra não-analisada por erro durante a eluição.

Considerando que a pureza média da cocaína no Brasil é de 71% (Botelho et al., 2014) e a pureza da cannabis fumada varia de 0,5% até 10% (Passagli, 2013), podemos calcular o consumo dessas duas drogas de abuso. Na Tabela 18 estão as estimativas de consumo calculadas das drogas de abuso cocaína e cannabis, sendo que a unidade de medida foi alterada para g/dia/1000hab para facilitar a visualização dos resultados.

Tabela 18: Cálculo da estimativa do uso das drogas de abuso a partir da sua pureza em g/dia/1000 hab de todos os dias que foram avaliados.

Dia da Semana	Data	Cannabis 0,5% (g/dia/1000hab)	Cannabis 10% (g/dia/1000hab)	Cocaína 71% (g/dia/1000hab)
ETE Norte				
Sexta-feira*	01/03/2019	2420,6	121,0	4,7
Sábado*	02/03/2019	4470,2	223,5	3,9
Domingo*	03/03/2019	3513,5	175,7	3,9
Segunda-feira*	04/03/2019	2823,9	141,2	2,4
Terça-feira*	05/03/2019	3068,8	153,4	3,8
Quarta-feira	06/03/2019	2609,5	130,5	3,0
Quinta-feira	07/03/2019	2742,0	137,1	3,0
Sexta-feira	08/03/2019	2256,2	112,8	2,8
Sábado	09/03/2019	2194,1	109,7	1,8
Domingo	10/03/2019	1881,7	94,1	2,2
Segunda-feira	11/03/2019	1989,9	99,5	1,8
Terça-feira	12/03/2019	2560,2	128,0	1,9
Quarta-feira	13/03/2019	2823,7	141,2	1,8
Quinta-feira	14/03/2019	2236,9	111,8	2,0
Sexta-feira	15/03/2019	2581,0	129,1	2,8
ETE Sul				
Sexta-feira*	01/03/2019	1055,2	52,8	3,3

Sábado*	02/03/2019	2433,6	121,7	5,2
Domingo*	03/03/2019	1762,1	88,1	2,8
Segunda-feira*	04/03/2019	1910,8	95,5	1,9
Terça-feira*	05/03/2019	1453,5	72,7	2,8
Quarta-feira	06/03/2019	833,5	41,7	1,9
Quinta-feira	07/03/2019	1210,9	60,6	2,0
Sexta-feira	08/03/2019	N/A	N/A	N/A
Sábado	09/03/2019	1378,3	68,9	1,6
Domingo	10/03/2019	1212,7	60,6	1,4
Segunda-feira	11/03/2019	1102,8	55,1	1,3
Terça-feira	12/03/2019	1571,9	78,6	1,3
Quarta-feira	13/03/2019	1348,7	67,4	1,8
Quinta-feira	14/03/2019	1261,3	63,1	2,6
Sexta-feira	15/03/2019	1832,9	91,7	3,2

\*: Período do Carnaval de 2019, os outros dias foram classificados como período subsequente ao Carnaval.

N/A: Amostra não-analisada por erro durante a eluição.

A partir dos resultados obtidos, mostrados na tabela 18, as Figuras 32, 33 e 34 foram construídas.

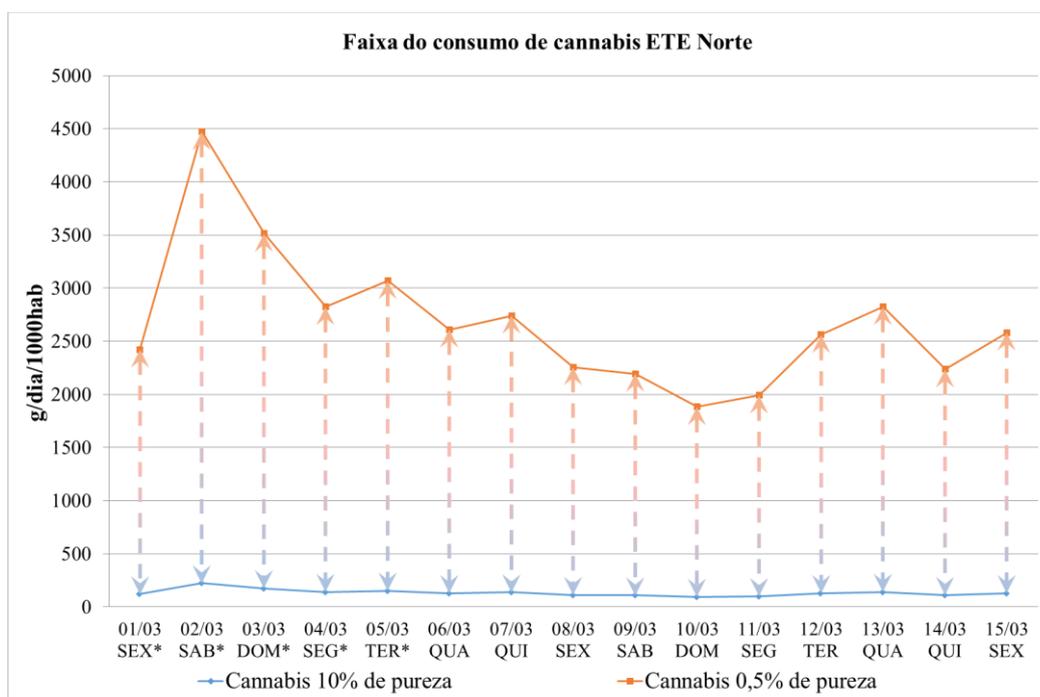


Figura 32: Faixa de consumo da droga de abuso cannabis em g/dia/1000hab na ETE Norte, levando em consideração as porcentagens usuais de THC presentes na droga.

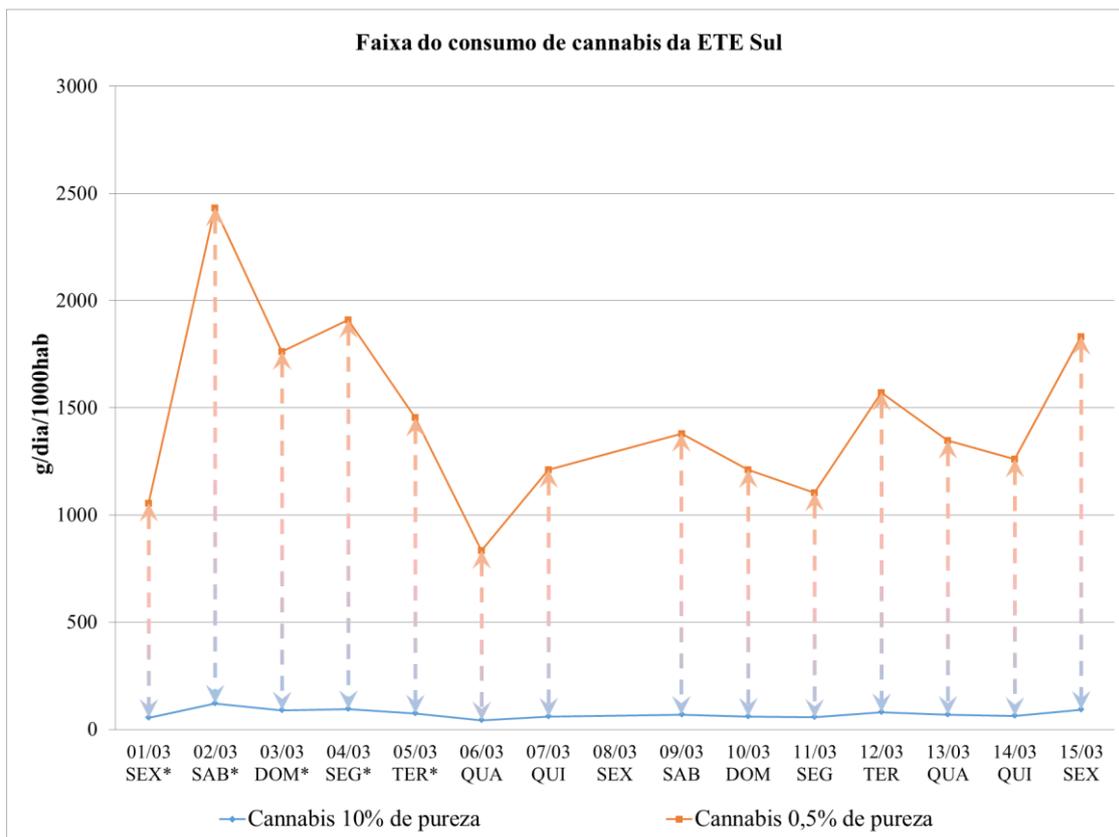


Figura 33: Faixa de consumo da droga de abuso cannabis em g/dia/1000hab na ETE Sul, levando em consideração as porcentagens usuais de THC presentes na droga.

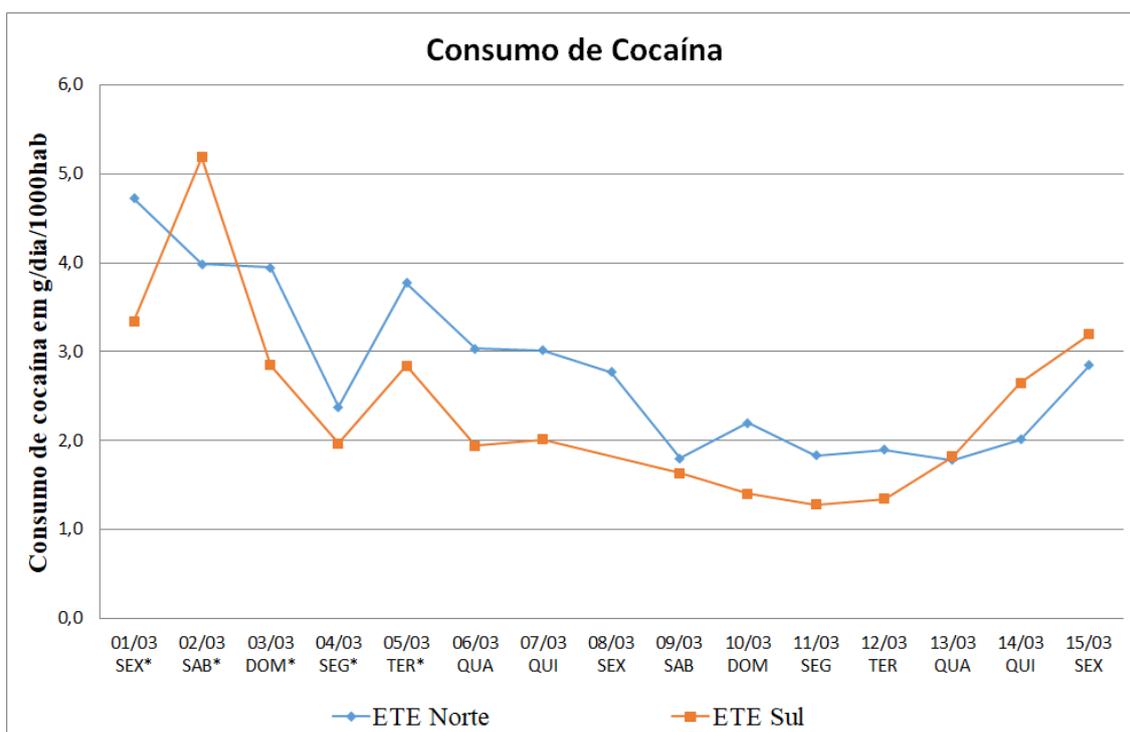


Figura 34: Consumo da droga de abuso cocaína em g/dia/1000hab nas ETES Norte e Sul, levando em consideração a porcentagem média de pureza da cocaína.

### 5.7.1. Estimativa do consumo da população entre 15 e 64 anos

Levar em consideração a população inteira que é atendida pelas ETEs pode ser outra fonte de incerteza que pode afetar a exatidão do resultado gerado, visto que nessa população existem pessoas de certas idades que não contribuem para a concentração dos biomarcadores no esgoto afluyente. Para fazer uma estimativa mais exata, levando em consideração esse fato, faz-se o cálculo de consumo com a Equação 1 utilizando o valor de habitantes na faixa etária de 15 a 64 anos (UNODC, 2019b). Segundo o IBGE a porcentagem da população no DF que está nesta faixa é de 78,75% (IBGE, 2020), fazendo com que o número estimado de habitantes nesta faixa etária que é atendida pela ETE Norte seja de 154350 e pela ETE Sul seja de 388027. Na Tabela 19 podemos ver a alteração na estimativa de consumo ao levar a faixa etária em consideração.

Tabela 19: Estimativa do consumo de COC e THC (em mg/dia/1000hab) Considerando a população na faixa etária entre de 15 a 64 anos atendida pelas estações de tratamento norte e sul do DF.

Dia da Semana	Data	COC (mg/dia/1000hab)	THC (mg/dia/1000hab)
ETE Norte			
Sexta-feira*	01/03/2019	4261,0	15368,7
Sábado*	02/03/2019	3592,1	28382,6
Domingo*	03/03/2019	3560,3	22307,8
Segunda-feira*	04/03/2019	2146,1	17930,2
Terça-feira*	05/03/2019	3400,1	19484,6
Quarta-feira	06/03/2019	2736,8	16568,5
Quinta-feira	07/03/2019	2718,8	17409,8
Sexta-feira	08/03/2019	2495,6	14325,2
Sábado	09/03/2019	1624,0	13930,8
Domingo	10/03/2019	1982,6	11947,4
Segunda-feira	11/03/2019	1650,5	12634,1
Terça-feira	12/03/2019	1710,7	16255,1
Quarta-feira	13/03/2019	1606,3	17928,2
Quinta-feira	14/03/2019	1815,5	14202,9
Sexta-feira	15/03/2019	2567,0	16387,4
ETE Sul			
Sexta-feira*	01/03/2019	3010,1	5275,8
Sábado*	02/03/2019	4678,0	12168,0

Domingo*	03/03/2019	2565,8	8810,5
Segunda-feira*	04/03/2019	1774,4	9553,7
Terça-feira*	05/03/2019	2560,6	7267,6
Quarta-feira	06/03/2019	1752,2	4167,4
Quinta-feira	07/03/2019	1815,5	6054,9
Sexta-feira	08/03/2019	N/A	N/A
Sábado	09/03/2019	1474,9	6891,6
Domingo	10/03/2019	1265,9	6063,3
Segunda-feira	11/03/2019	1151,7	5514,2
Terça-feira	12/03/2019	1209,6	7859,8
Quarta-feira	13/03/2019	1641,2	6743,3
Quinta-feira	14/03/2019	2390,0	6306,7
Sexta-feira	15/03/2019	2878,4	9164,7

\*: Período do Carnaval de 2019, os outros dias foram classificados como período subsequente ao Carnaval.

N/A: Amostra não-analisada por erro durante a eluição

Na Tabela 19 podemos observar que a queda do valor dos habitantes em 21,25% acarretou em um aumento de 27% na estimativa do consumo de ambas substâncias psicotrópicas. Uma estimativa mais fidedigna que leva em consideração a faixa etária que faz o uso de drogas de abuso.

### **5.8. Padrões de consumo dos usuários no período de Carnaval e no período subsequente**

Segundo o III Levantamento nacional sobre o uso de drogas pela população brasileira (ICICT/FIOCRUZ, 2017), a prevalência do uso de cannabis é cerca de 7,7% e o de cocaína é 3,1%. Portanto é de se esperar que o consumo estimado de THC pela EE seja significativamente superior ao consumo da COC, e é exatamente isso que observamos nas Tabelas 17 e 19 e nas Figuras 35 e 37. Estes resultados indicam que a EE é uma estratégia promissora para a estimativa do consumo de drogas de abuso, visto que são resultados similares aos encontrados em outras estratégias convencionais de estimativa de consumo.

Como foi possível observar, houve um aumento do consumo das duas drogas de abuso durante o Carnaval – principalmente no segundo dia de Carnaval 02/03/2019, um sábado –. Nota-se também que houve uma espécie de veialgia pós Carnaval, em que

nos primeiros dias depois do Carnaval houve uma queda de consumo das duas drogas, inclusive durante o fim de semana, período em que o consumo tende a ser maior (da Silva et al., 2018). Além disso, a partir dos dias 11/03/2019 e 12/03/2019 houve um aumento gradual no consumo, provavelmente o que estamos vendo é o perfil de consumo voltando ao seu normal.

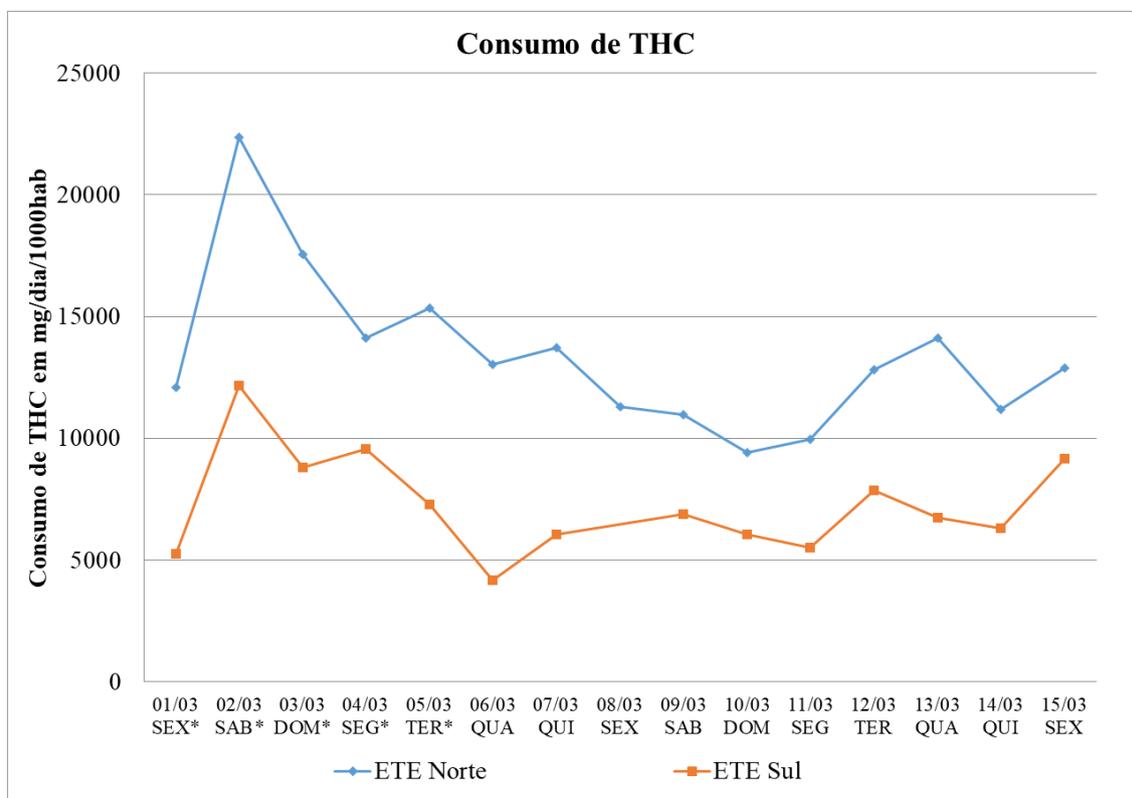


Figura 35: Consumo de THC entre os dias 01/03/2019 e 15/03/2019 em mg/dia/1000hab  
\*: Período do Carnaval de 2019, os outros dias foram classificados como período subsequente ao Carnaval.

O primeiro fenômeno notável é o fato de que na ETE Norte o consumo de THC é significativamente maior do que na ETE Sul. Já para a cocaína ocorre algo semelhante, porém a diferença não é tão exacerbada como podemos ver no THC. Tendo em vista que o maior consumo de drogas se dá por adolescentes, jovens adultos e adultos (UNODC, 2019a), essa grande diferença entre os consumos de THC das ETES pode se dar pelo fato de que há uma maior população de estudantes atendida pela ETE Norte.

Além disso, é possível notar que há um maior consumo de THC nos período de Carnaval do que no período subsequente principalmente no sábado e no domingo de Carnaval. Este fenômeno foi visto em outro festival de música no verão por Nefau et al., 2013, isso pode ser explicado pelo fato de que ambos os eventos são populares entre os

juvens, causando um aumento no consumo de THC. É importante salientar que outros estudos realizados por Foppe et al., 2018 e Mackul'ak et al., 2014 não reportaram esse fenômeno em situações similares.

Também podemos ver que depois do Carnaval o consumo de THC fica relativamente constante ao longo dos dias da semana, fenômeno muito bem documentado pela literatura (Bijlsma et al., 2016; Lai et al., 2011; Mastroianni et al., 2017; Tscharke et al., 2016; Zuccato et al., 2016), logo, podemos inferir que a maconha não é uma droga de abuso ocasional, igual à Cocaína, e sim uma droga de uso constante, similar ao perfil de consumo do cigarro. Na Figura 36 podemos ver a comparação do perfil de consumo diário de diversos estudos.

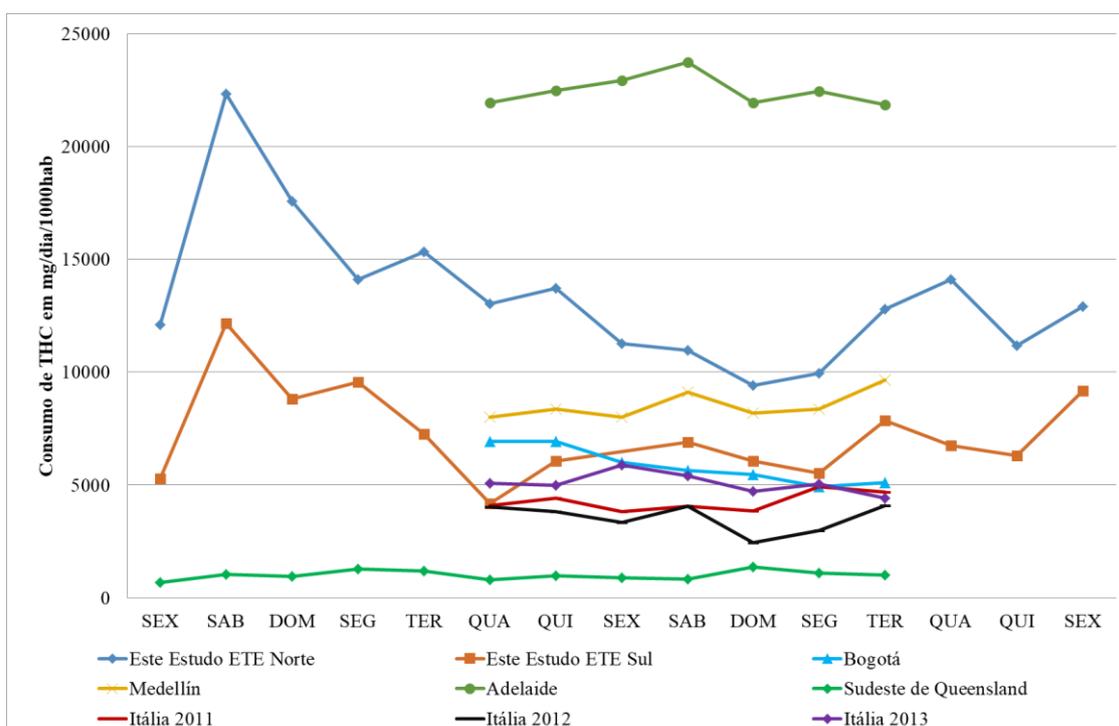


Figura 36: Comparação dos perfis semanais de consumo encontrados neste estudo e estudos realizados em outros países por Bijlsma et al., 2016; Lai et al., 2011; Tscharke et al., 2016; e Zuccato et al., 2016.

A Figura 37 nos trás o perfil de consumo da COC no período de 15 dias que foram analisados neste estudo.

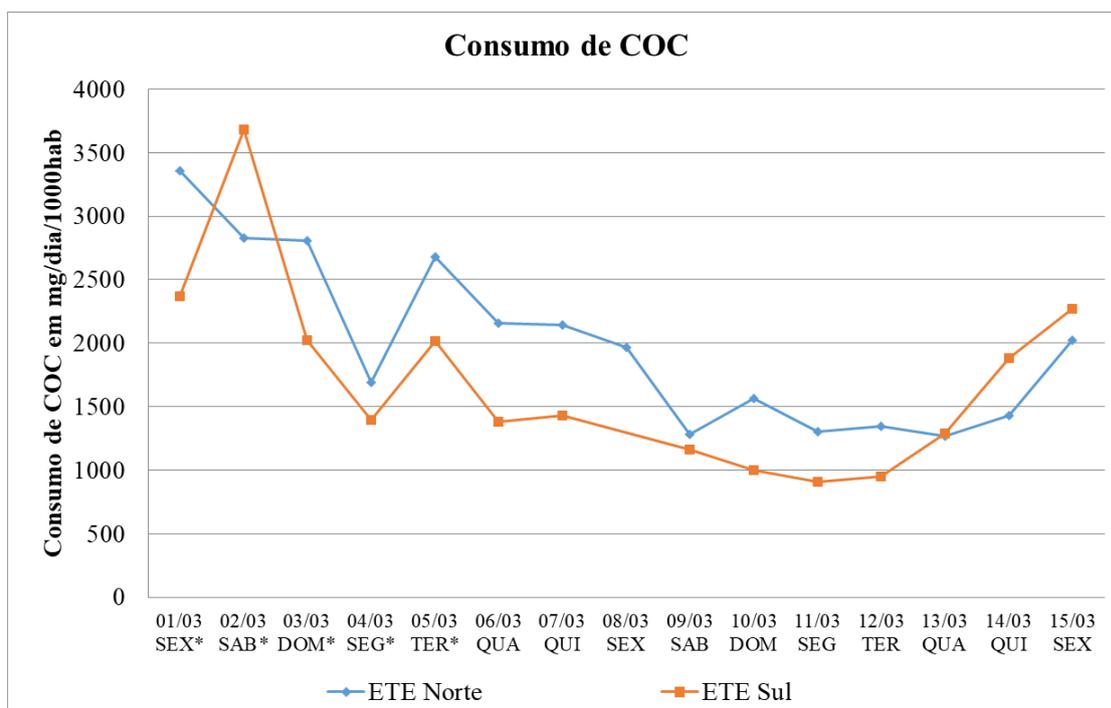


Figura 37: Consumo de COC entre os dias 01/03/2019 e 15/03/2019 em mg/dia/1000hab

\*: Período do Carnaval de 2019, os outros dias foram classificados como período subsequente ao Carnaval.

No caso da COC, podemos notar que o consumo durante o período do Carnaval é maior que o consumo do período subsequente, o que já era de se esperar segundo os resultados de estudos prévios realizados pelo nosso grupo (da Silva et al., 2018). Além disso, podemos notar uma queda acentuada no dia 04/03/2019, uma segunda. Este fenômeno pode ser explicado pelo fato de que o único dia de feriado oficial era na terça, dia 05/03/2019, e o fato de que normalmente as segundas e terças são as detentoras dos menores consumos (da Silva et al., 2018; EMCDDA, 2019d; Sodr e et al., 2018). Portanto essa queda brusca seguida de um novo aumento na terça j a era algo de se esperar.

Outro fato que podemos extrair da Figura 37   uma diminui o gradual do consumo de cocaína a partir do dia 06/03/2019 at e o dia 12/03/2019, seguida de um aumento mais acentuado a partir do dia 13/03/2019 at e 15/03/2019. Esse fenômeno pode se dar ao fato de que o uso exacerbado de cocaína durante o Carnaval cause uma espécie de “veisalgia coca nica”, incapacitando o usuário por algum tempo. J a o aumento acentuado a partir do dia 13/03/2019 pode ser decorrente da recupera o dos usuários após o uso agudo no Carnaval, acarretando na normaliza o do perfil de consumo semanal de cocaína. Na Figura 38 e 39 podemos ver uma compara o entre os perfis de consumo semanal da COC deste estudo e de outros estudos realizados.

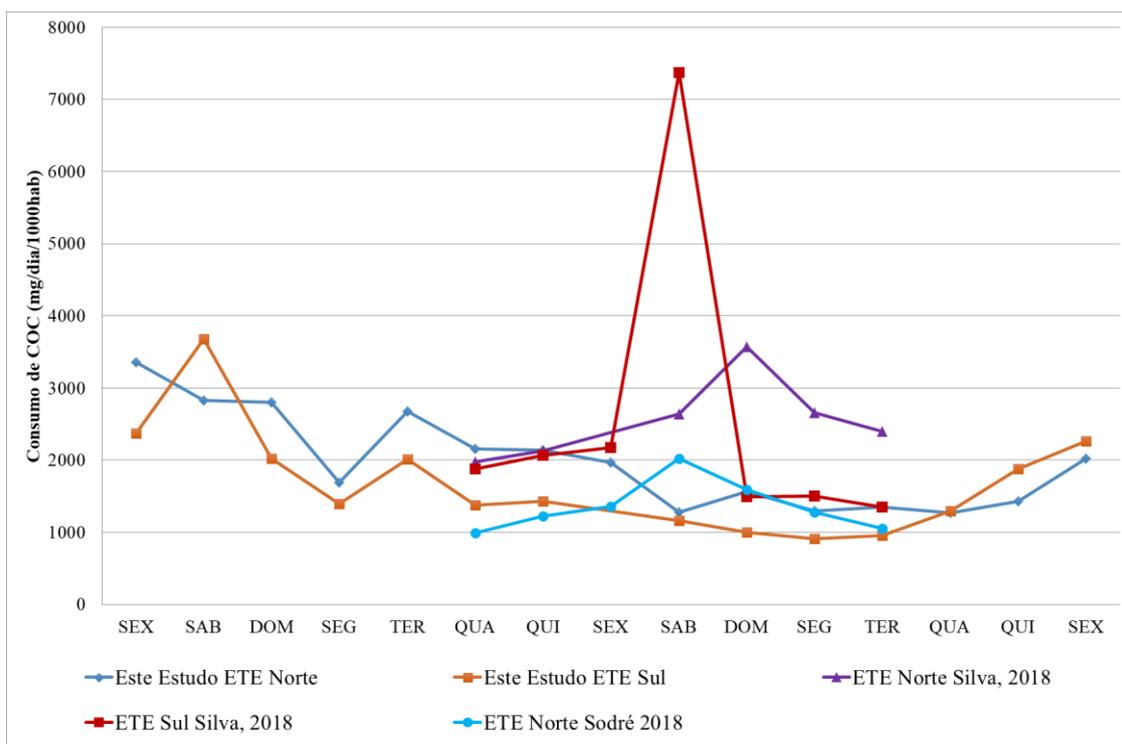


Figura 38: Perfis semanais de consumo descobertos neste estudo em comparação com perfis semanais de consumo das mesmas comunidades descoberto em estudos prévios realizados pelo nosso grupo (da Silva et al., 2018; Sodré et al., 2018).

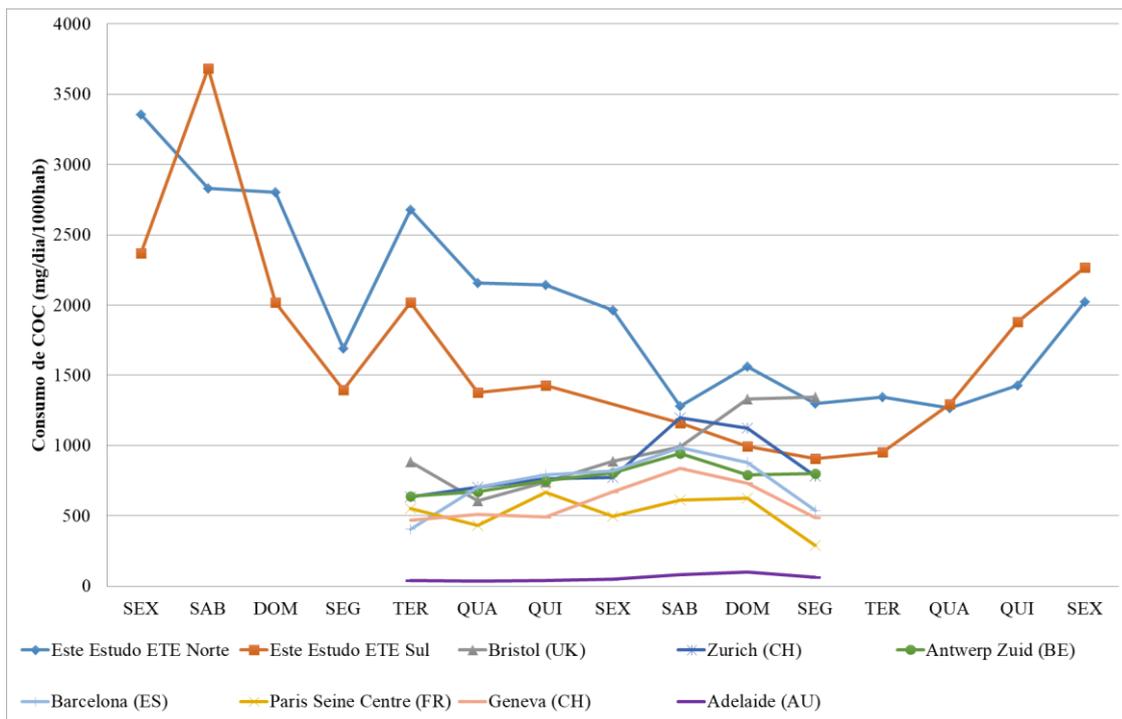


Figura 39: Perfis semanais de consumo descobertos neste estudo em comparação com os perfis semanais descobertos em diversos estudos realizados em países distintos (EMCDDA, 2019d; Tschärke et al., 2016)

Como podemos notar nos outros estudos, em uma semana comum, o usual do perfil é ter um aumento gradual do consumo de COC a partir do primeiro dia útil até o último dia útil, e no fim de semana ter um pico de consumo. Fenômeno que não observamos depois do Carnaval de 2019, em que o sábado e domingo subsequentes ao carnaval possuem um dos menores valores de consumo calculados no período de 15 dias, tornando o período subsequente ao Carnaval atípico.

A fim de realizar a comparação entre o consumo durante o período Carnaval e o período subsequente, fizemos a divisão dos 15 dias avaliados em 2 grupos, o período de Carnaval e o período subsequente. O grupo Carnaval corresponde do dia 01/03/2019 até o dia 05/03/2019 – sendo que este último dia é o oficial de Carnaval –, o grupo período subsequente ao Carnaval corresponde do dia 06/03/2019 até o dia 15/03/2019. Com essa separação foi possível avaliar a diferença entre o consumo durante o período de Carnaval e o período Subsequente. As Figuras 40 e 41 foram montadas a fim de facilitar a visualização desta diferença entre estes dois grupos.

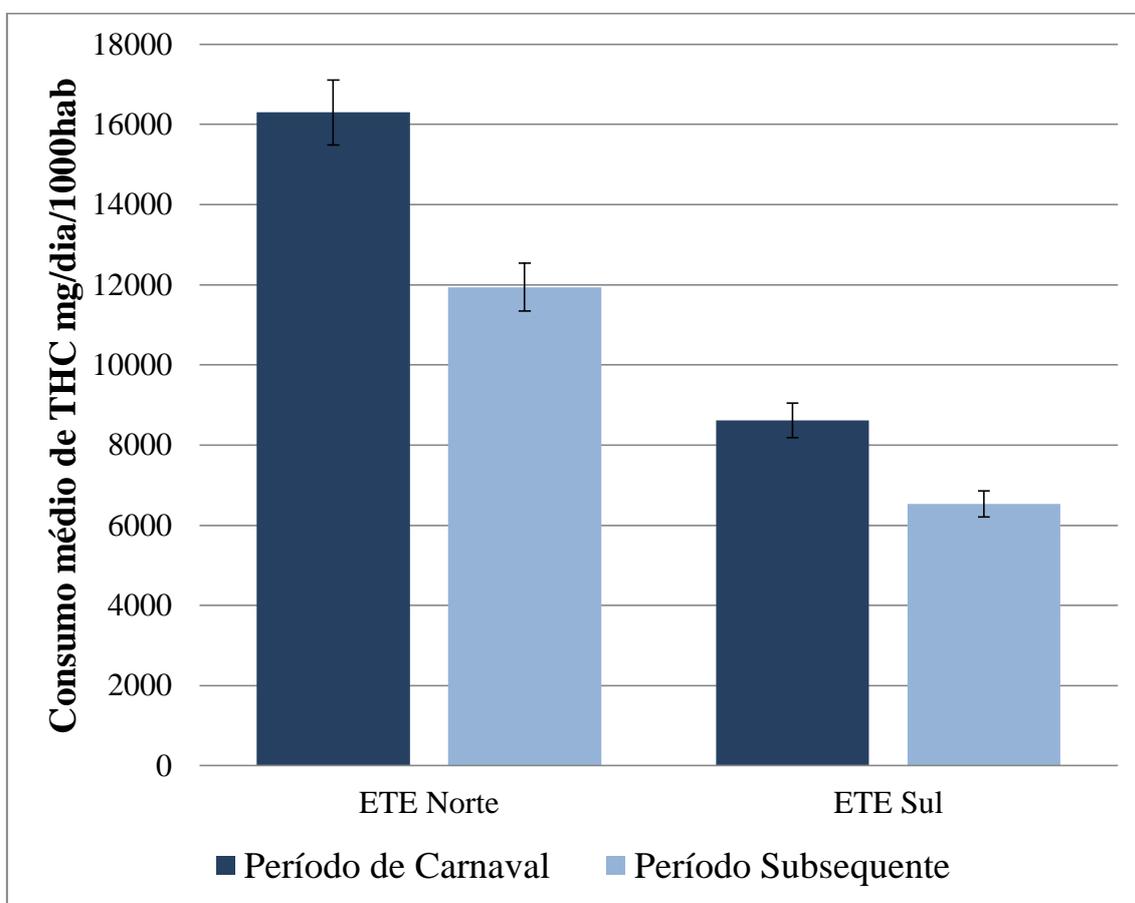


Figura 40: Gráfico que demonstra as diferenças entre os padrões de consumo de THC durante o período Carnaval e o período subsequente (em mg/dia/1000hab).

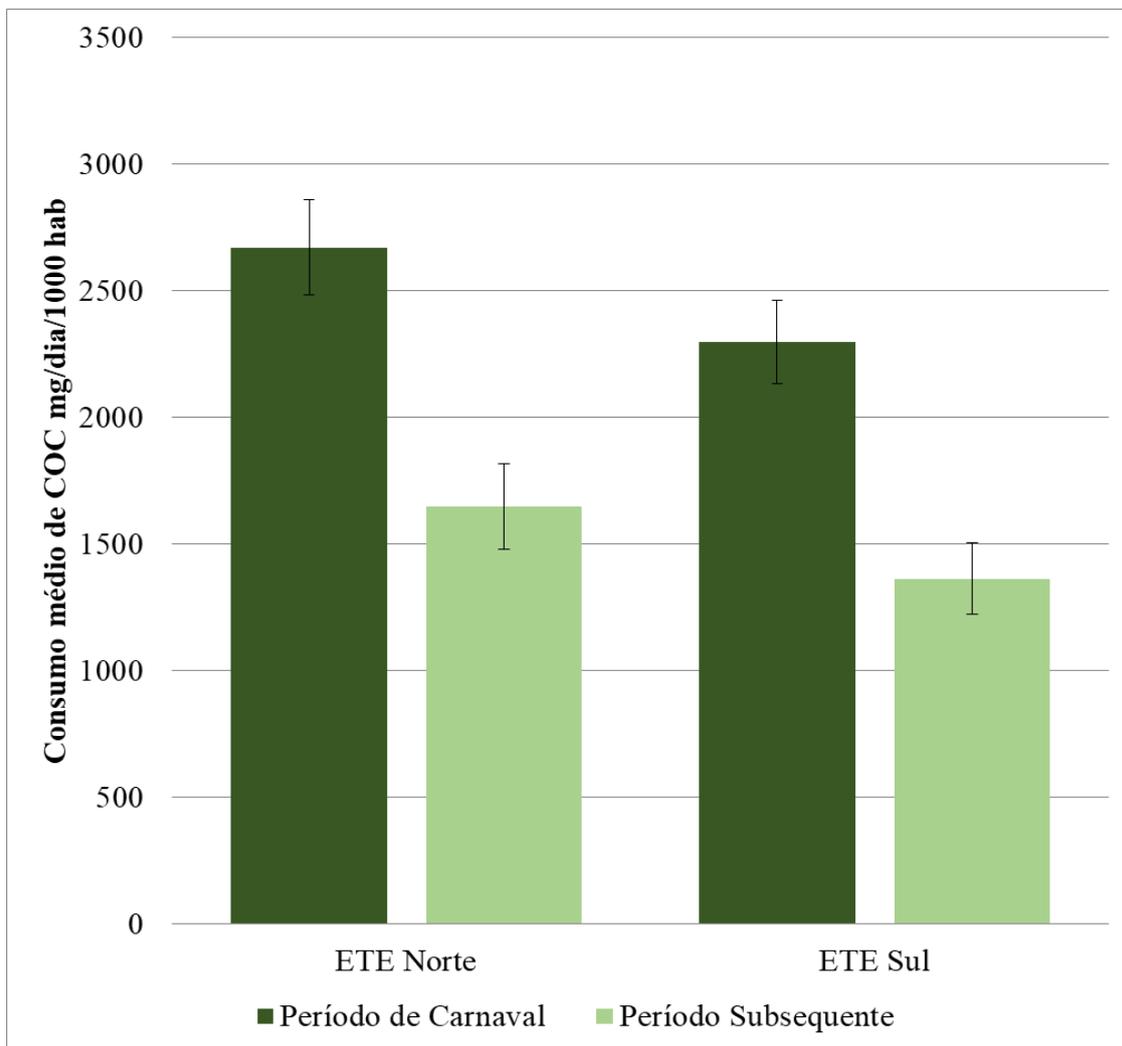


Figura 41: Gráfico que demonstra as diferenças entre os padrões de consumo de COC durante o período de Carnaval e o período subsequente (em mg/dia/1000hab).

Nas Figuras 40 e 41 podemos ver claramente que a média do consumo do período de Carnaval é superior ao do período subsequente ao Carnaval. Para a COC este fenômeno já foi documentado em diversos estudos (da Silva et al., 2018; Foppe et al., 2018). Além disso também é notável um aumento relevante de THC durante o período de Carnaval e o período subsequente. Este resultado é semelhante ao que foi encontrado por Nefau et al., 2013.

Nas Figuras 42 a 45 podemos avaliar a similaridade dos valores obtidos em outros estudos que englobaram estimativa de consumo de THC e COC, para ser possível realizar essa comparação foi necessário a transformação de mg/dia/1000hab para doses/dia/1000hab, sendo que o valor considerado para a dose irá depender do estudo em questão, por exemplo, Mastroianni et al., 2017 e Krizman-Matasic et al., 2019 consideraram que a dose é de 125mg de THC, porém escolheram 100mg e 30mg para a dose de COC, respectivamente.

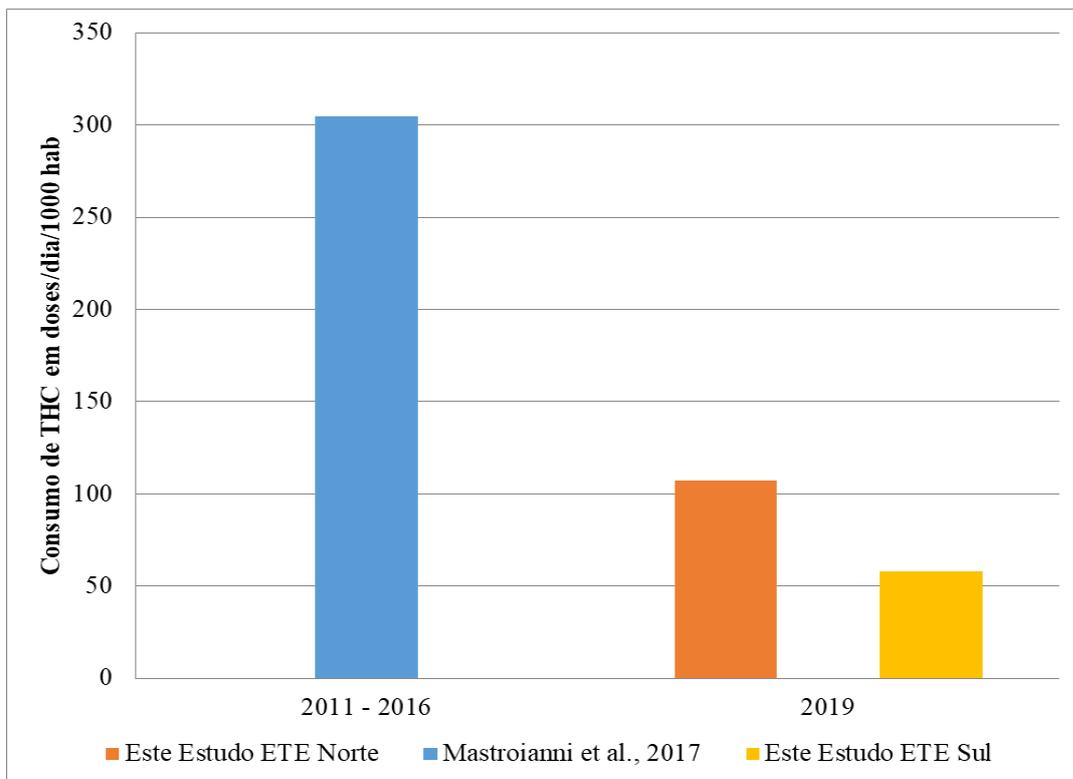


Figura 42: Comparação dos resultados obtidos neste estudo com os resultados dos valores obtidos da estimativa do consumo de THC por EE de anos anteriores em uma ETE de Barcelona (ES). Dose = 125mg de THC

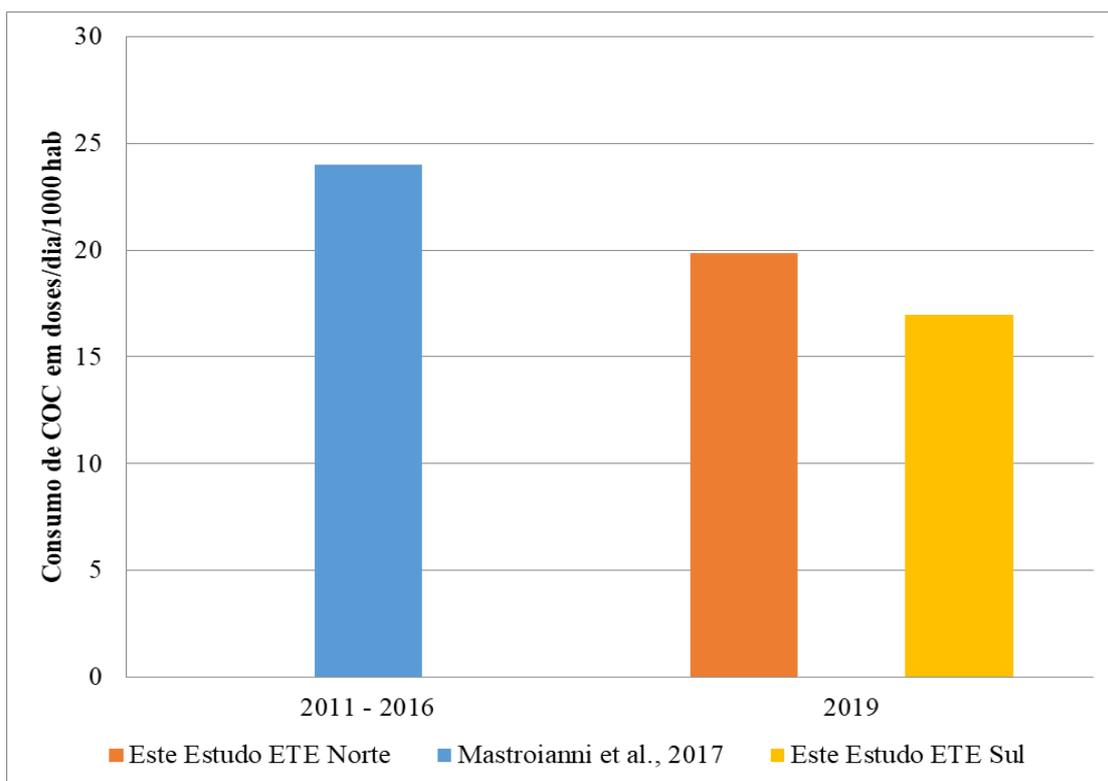


Figura 43: Comparação dos resultados obtidos neste estudo com os resultados dos valores obtidos da estimativa do consumo de THC por EE de anos anteriores em uma ETE de Barcelona (ES). Dose = 100mg de COC

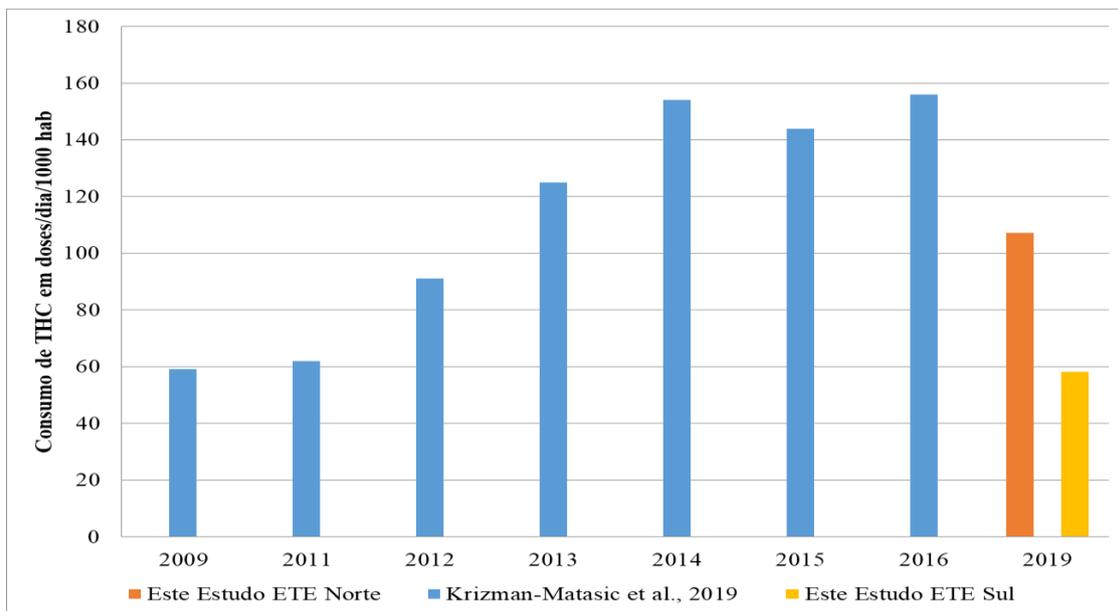


Figura 44: Comparação dos resultados obtidos neste estudo com os resultados dos valores obtidos da estimativa do consumo de THC por EE de anos anteriores em Zagreb (HR). Dose = 125mg THC

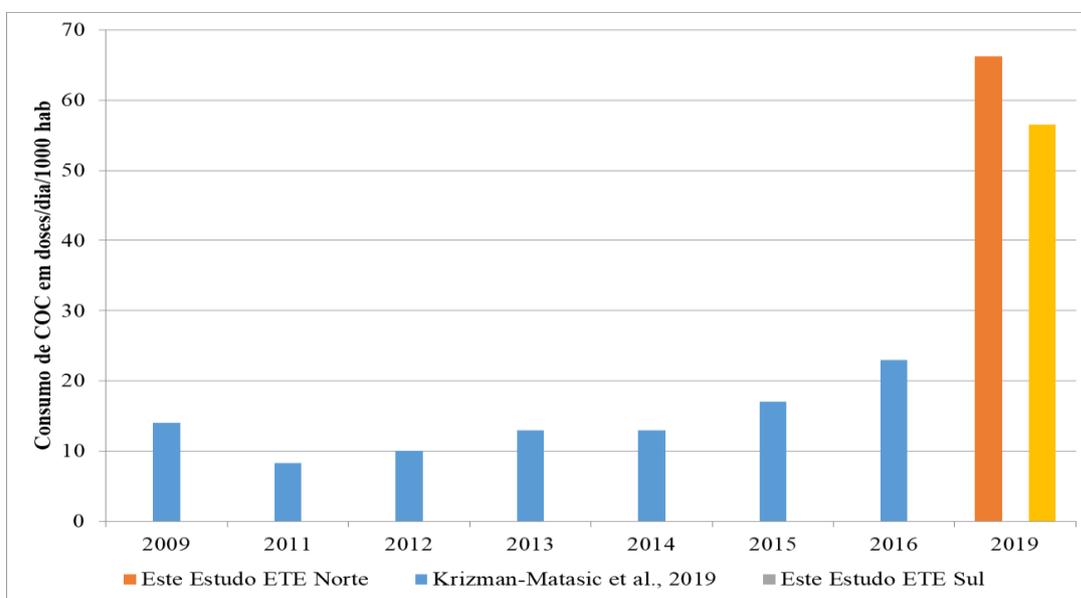


Figura 45: Comparação dos resultados obtidos neste estudo com os resultados dos valores obtidos da estimativa do consumo de COC por EE de anos anteriores em Zagreb (HR). Dose = 30mg de COC

Como podemos observar, apesar de existirem diferenças, os resultados estão dentro dos que se encontram na literatura, dando mais confiabilidade aos resultados obtidos. Ao que os estudos indicam, em Zagreb o consumo de cocaína é menor que em Brasília, porém o consumo de cannabis em Zagreb, a partir de 2013 é significativamente superior ao de Brasília, mesmo durante o Carnaval de 2019. Já em Barcelona as estimativas de consumo de cocaína se equiparam, porém o consumo de cannabis é substancialmente maior do que a estimativa de consumo de cannabis em Brasília. Portanto aparenta existir uma diferença entre a utilização de drogas pelos usuários.

Esses valores estão similares às estimativas por métodos convencionais para estimar a prevalência. Visto que no Brasil a prevalência do uso de Cannabis é 7,7% e de cocaína é 3,1% (ICICT/FIOCRUZ, 2017), já na Espanha, Cannabis chega a 18.3% e cocaína a 2.8%, e na Croácia a prevalência de Cannabis é de 16% e da cocaína de 1,6%.

As Figuras 46 e 47 comparam resultados de consumo médio obtidos de diversos estudos com os resultados obtidos neste trabalho.

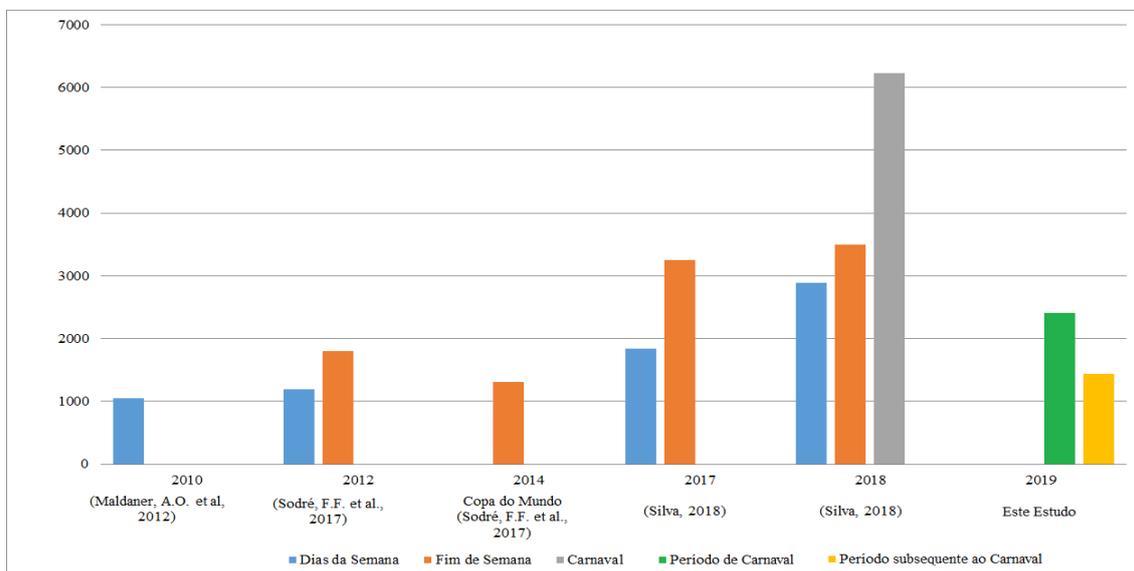


Figura 46: Comparação dos resultados de diversos estudos realizados no DF que utilizaram a EE para estimar o consumo de COC em mg/dia/1000hab (da Silva et al., 2018; Maldaner et al., 2012; Sodré et al., 2017).

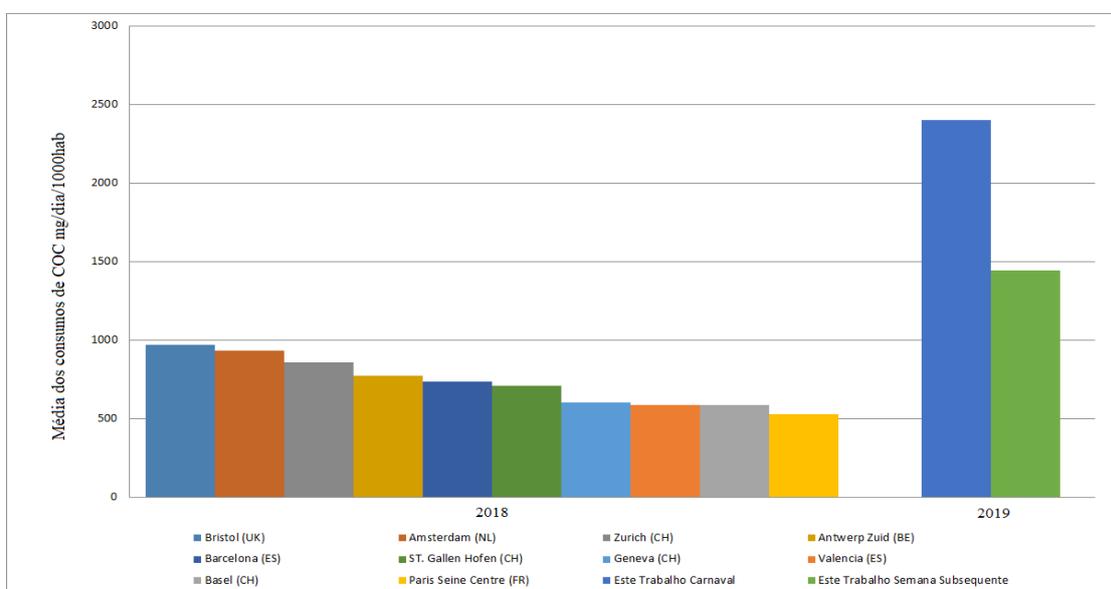


Figura 47: Comparação entre os resultados da média das estimativas de consumo de COC (mg/dia/1000hab) deste estudo e os resultados obtidos dos estudos realizados em diversas cidades da Europa (EMCDDA, 2019d).

Como podemos observar nas Figuras 46 e 47 os resultados obtidos da cocaína estão na mesma ordem de magnitude de estudos prévios realizados pelo grupo, corroborando para a eficácia deste método. Além disso, na Figura 47 é possível ver que a média do consumo durante o período Carnaval e o período subsequente de 2019 no DF está bem superior às médias anuais de consumo de COC em cidades na Europa. Este fenômeno é esperado, visto que é senso comum a maior utilização de drogas de cocaína em eventos festivos de grande porte, porém agora possuímos uma confirmação objetiva.

### 5.9. Estimativa da carga diária de COC e THC para a população do DF

A carga diária de uma substância psicotrópica é a quantidade, dada em  $\text{g dia}^{-1}$ , que corresponde à quanto desta substância passou pela ETE em questão. É preciso lembrar que para realizar esses cálculos estamos usando os metabólitos como biomarcadores para realizar os cálculos de estimativa de consumo. Portanto para fazer o cálculo de carga diária utilizamos a concentração do biomarcador da substância psicotrópica e o fator de correção relativo ao biomarcador. Na Figura 48 e 49 podemos ver a média das cargas diárias das duas ETEs nos períodos do Carnaval o período subsequente.

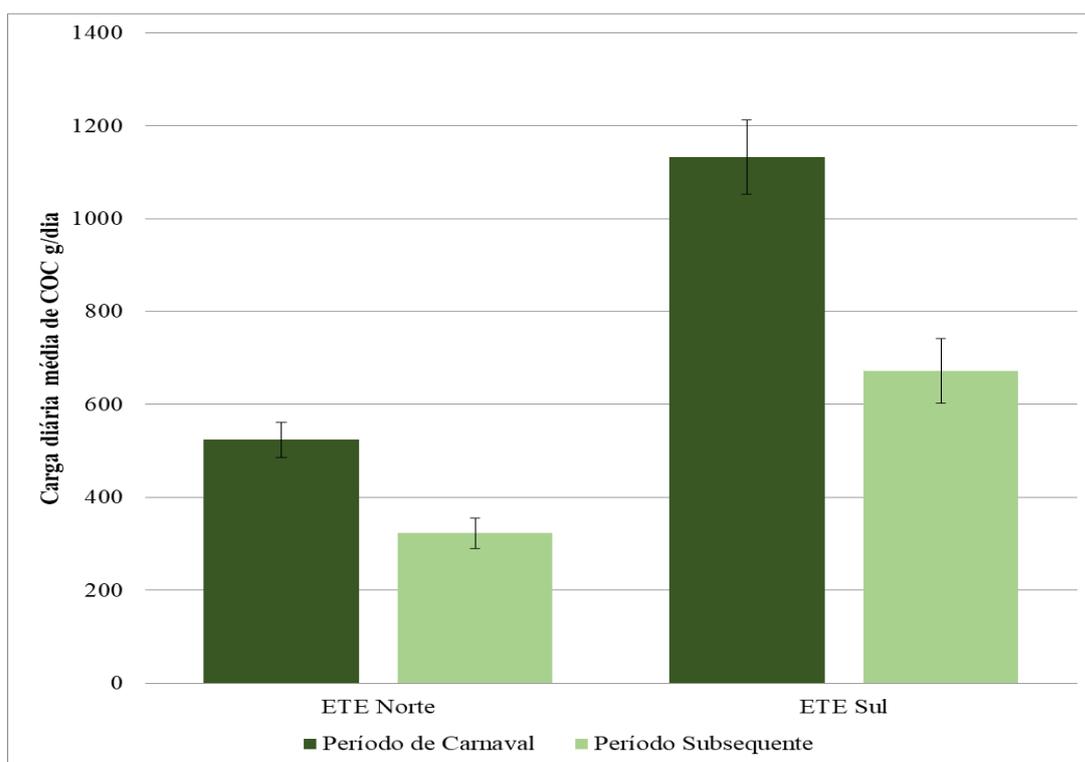


Figura 48: Média das cargas diárias de COC em  $\text{g dia}^{-1}$  durante o período de Carnaval e o período subsequente das ETEs Norte e Sul.

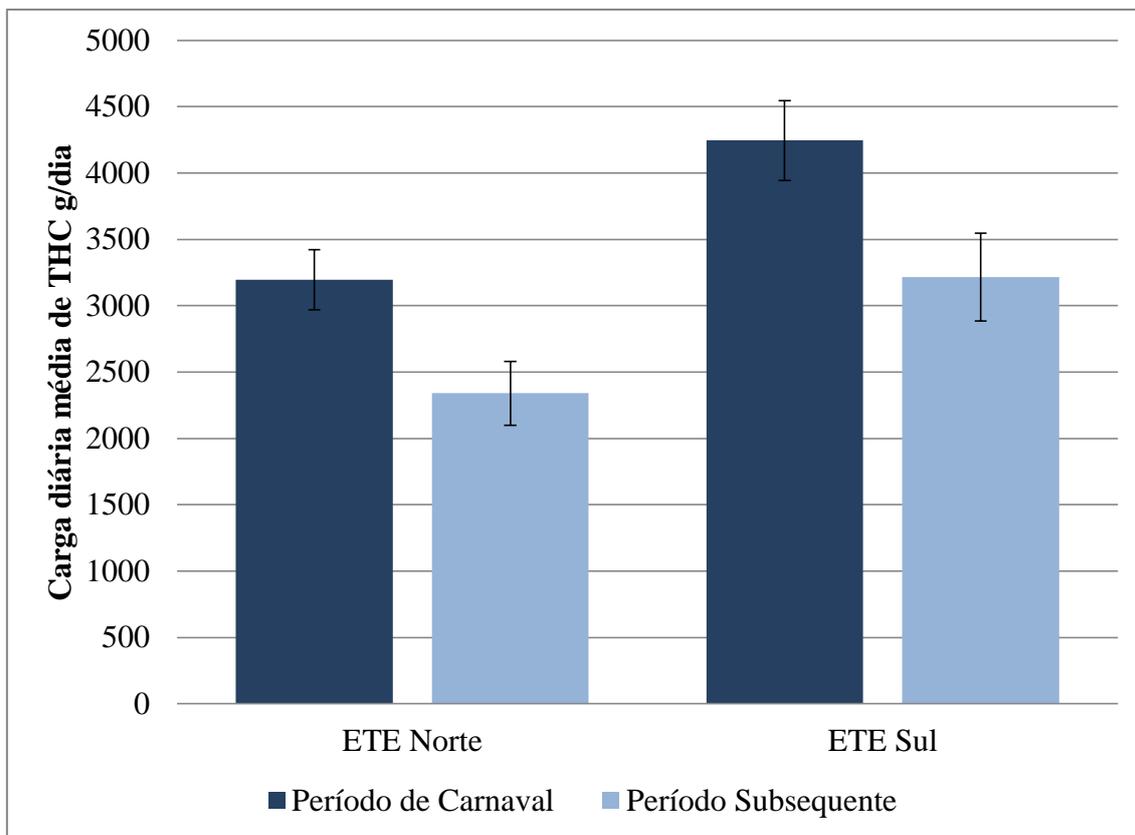


Figura 49: Média das cargas diárias de THC em  $\text{g dia}^{-1}$  durante o período de Carnaval e o período subsequente das ETES Norte e Sul.

Nas Figuras 48 e 49 podemos ver que a carga diária da ETE Sul é superior à da ETE Norte, o que corrobora para os resultados anteriores encontrados pelo nosso grupo (Sodré et al., 2017). Esta diferença se dá principalmente pelo fato de que na ETE Sul há 251,38% da população atendida pela ETE Norte, porém quando há a normalização da carga diária em relação à população que gerou essa carga, notamos que a ETE Norte possui o maior consumo dessas substâncias psicotrópicas, como foi mostrado anteriormente.

### 5.9.1. Extrapolação das cargas diárias da população inteira do DF

Como não pudemos realizar as coletas em todas as ETES para estimarmos o consumo de COC e THC da população do DF inteiro fazemos um cálculo com extrapolações proporcionais ao aumento da população. Levando em consideração que o número de habitantes estudados foi de 688744 e que a população total do DF estimada é de 3036117 (IBGE, 2020), sabemos que este estudo abrangeu 22,68% da população total do DF. Na Tabela 20 estão os resultados das cargas diárias e da extrapolação.

Tabela 20: Cálculo da média das cargas diárias dos habitantes atendidos pelas ETEs Sul e Norte e da extrapolação para os habitantes do DF durante o período de Carnaval e período subsequente.

Período	Habitantes atendidos pelas ETEs Sul e Norte		Extrapolação para Habitantes do DF	
	COC (g dia <sup>-1</sup> )	THC (g dia <sup>-1</sup> )	COC (g dia <sup>-1</sup> )	THC (g dia <sup>-1</sup> )
Período de Carnaval	958,1	3866,5	4223,7	17044,3
Período subsequente	571,9	2966,4	2521,0	13076,4

Com esses valores mostrados na Tabela 20, podemos estimar que entre os dias do período de Carnaval, 01/03/2019 e 05/03/2019, 4790,5g de COC e 19332,5 passaram pelas ETEs Norte e Sul. Já no período subsequente ao Carnaval, entre 06/03/2019 e 15/03/2019, 5719g de COC e 29664g de THC passaram pelas ETEs Norte e Sul. Ao extrapolar para a população inteira do DF, 21118,5g de COC e 85221,5g de THC passaram nas ETEs do DF durante o período de Carnaval. E no período subsequente ao Carnaval um total de 25210g de COC e 130,8Kg de THC passaram por ETEs do DF.

## 6. Conclusões

O objetivo geral – e por consequência os específicos – foi alcançado, já que os resultados mostraram que é possível analisar as amostras com o mesmo método de preparo para a quantificação dos cocaínicos e canabinoides. Porém, esse método não aparenta ser eficiente na extração de THC, já que o THC ficou abaixo do LOD, não houve nenhum sinal, apenas do THC D3. Ainda houve a tentativa de outra otimização, incluindo um método cromatográfico somente para o THC e o THC D3, porém não surtiu efeito para reverter a falta de sinal do THC. De qualquer forma, a estratégia melhorou substancialmente o sinal gerado pelo THC-COOH e THC-COOH D3.

Essa grande dificuldade em se quantificar os canabinoides já era de se esperar, em decorrer de propriedades da metabolização do THC e algumas fontes de incerteza. A dificuldade já começa com a taxa de excreção ínfima de 0,5% do melhor biomarcador que temos. Além disso, existem diversas incertezas que ainda não se tem uma resposta objetiva, por exemplo, a dinâmica dos canabinoides no esgoto ainda não está completamente elucidada;  $K_{ow}$  do THC-COOH é alto, o que indica que existe um potencial químico forte da fase aquosa para os materiais particulados do esgoto; a estabilidade do biomarcador no esgoto até a sua chegada na estação de tratamento; e a

ionização dos canabinoides, o que gera um aumento exagerado do LOD e LOQ. Outro problema é o fato de estar presente em uma amostra complexa, com diversos interferentes capazes de diminuir ainda mais a ionização de compostos.

Este estudo foi o primeiro a conseguir quantificar com sucesso THC-COOH em amostras de esgoto em nosso grupo de pesquisa. Além disso, esse método de preparo de amostra mostrou que é possível a quantificação de BE, COC e COE mesmo sendo um método que não acidifica em momento algum as amostras, passo muito importante, segundo a literatura, para manter a recuperação de BE e COC altos. O que permitiu esse resultado foi o fato de utilizarmos padrões surrogate deuterados. A vantagem de se usar deuterados é o fato de que qualquer perda que o deuterado sofrer ao longo do preparo de amostra, o composto análogo também irá sofrer, por isso que na quantificação se utiliza a razão entre o composto e seu análogo deuterado.

Os resultados mostraram algo que já se imaginava, porém agora se tem uma comprovação objetiva. Observamos um maior consumo de ambas as drogas de abuso durante o período de Carnaval, se comparado ao período subsequente, sendo que o aumento relativo do consumo de cocaína foi superior ao de cannabis. Há também uma grande diferença entre as quantidades de consumo de cannabis das ETEs Sul e Norte, provavelmente devido à uma diferença na população jovem atendida por estas ETEs.

## **7. Perspectivas**

Tendo tudo isso em vista, este estudo abre as portas para mais estudos de EE focada não somente em cannabis, mas em cocaína também. E é de suma importância que outros estudos nesta área surjam, estudos que serão realizados para melhorar ainda mais esses resultados. Outros estudos a serem realizados de maior importância para sanar as dúvidas sobre as incertezas que envolvem os canabinoides e sua interação com esgoto, talvez assim, a estimativa consiga ser mais exata e precisa, e o preparo de amostra simplificado ainda mais.

Mesmo a EE sendo uma estratégia relativamente nova, já se mostrou capaz de realizar boas estimativas dos consumos de diversas drogas. Ao que tudo indica, quando estudos mais aprofundados endereçarem e sanarem as fontes de incerteza dessa estratégia, a EE pode ser usada como única estratégia para se estimar o consumo de drogas de abuso de qualquer população que gere esgoto bruto coletável.

## 8. Bibliografia

- Baker, D.R., Očenášková, V., Kvicálová, M., Kasprzyk-Hordern, B., 2012. Drugs of abuse in wastewater and suspended particulate matter — Further developments in sewage epidemiology. *Environ. Int.* 48, 28–38. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2012.06.014>
- Baselt, R.C., 2004. *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man*, 7th ed. Biochemical Publications, California, USA.
- Bijlsma, L., Botero-Coy, A.M., Rincón, R.J., Peñuela, G.A., Hernández, F., 2016. Estimation of illicit drug use in the main cities of Colombia by means of urban wastewater analysis. *Sci. Total Environ.* 565, 984–993. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.078>
- Botelho, É.D., Cunha, R.B., Campos, A.F.C., Maldaner, A.O., 2014. Chemical profiling of cocaine seized by Brazilian Federal Police in 2009-2012: major Components. *J. Braz. Chem. Soc.* 25, 611–618.
- CAESB, 2019. Estações de Tratamento de Esgoto [WWW Document]. URL <https://www.caesb.df.gov.br/images/unidades/ete.pdf> (accessed 6.8.19).
- Cami, J., Farré, M., González, M.L., Segura, J., de la Torre, R., 1998. Cocaine metabolism in humans after use of alcohol. Clinical and research implications. *Recent Dev. Alcohol.* [https://doi.org/10.1007/0-306-47148-5\\_22](https://doi.org/10.1007/0-306-47148-5_22)
- Castiglioni, S., Zuccato, E., Crisci, E., Chiabrando, C., Fanelli, R., Bagnati, R., 2006. Identification and measurement of illicit drugs and their metabolites in urban wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 78, 8421–9. <https://doi.org/10.1021/ac061095b>
- Causanilles, A., Baz-Lomba, J.A., Burgard, D.A., Emke, E., González-Mariño, I., Krizman-Matasic, I., Li, A., Löve, A.S.C., McCall, A.K., Montes, R., van Nuijs, A.L.N., Ort, C., Quintana, J.B., Senta, I., Terzic, S., Hernandez, F., de Voogt, P., Bijlsma, L., 2017. Improving wastewater-based epidemiology to estimate cannabis use: focus on the initial aspects of the analytical procedure. *Anal. Chim. Acta* 988, 27–33. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.08.011>
- da Silva, K.M., Quintana, J.B., González-Mariño, I., Rodil, R., Gallassi, A.D., Arantes, L.C., Sodr , F.F., 2018. Assessing cocaine use patterns in the Brazilian Capital by wastewater-based epidemiology. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 98, 1370–1387. <https://doi.org/10.1080/03067319.2018.1554743>
- Daughton, C.G., 2001. Emerging pollutants, and communicating the science of environmental chemistry and mass spectrometry: pharmaceuticals in the environment. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1067–1076.
- DEA, 2017. *Drugs of Abuse - A DEA Resource Guide*. Drug Enforcement Administration - U.S. Department of Justice.
- EMCDDA, 2019a. PERSPECTIVES ON DRUGS - Wastewater analysis and drugs: a European multi-city study. *Eur. Monit. Cent. Drugs Drug Addict.* 10.
- EMCDDA, 2019b. Frequently asked questions (FAQ): wastewater-based epidemiology and drugs [WWW Document]. URL [http://www.emcdda.europa.eu/publications/topic-overviews/content/wastewater-faq\\_en](http://www.emcdda.europa.eu/publications/topic-overviews/content/wastewater-faq_en) (accessed 5.28.19).
- EMCDDA, 2019c. *European Drug Report 2019*.
- EMCDDA, 2019d. *Wastewater analysis and drugs: a European multi-city study*.
- EMCDDA, 2018. *European Drug Report 2018*.
- EMCDDA, 2016. *Assessing illicit drugs in wastewater Advances in wastewater-based drug epidemiology*.

- Feitosa, R.S., Sodr , F.F., Maldaner, A.O., 2013. Drogas de abuso em águas naturais e residu rias urbanas: Ocorr ncia, determina o e aplica es forenses. *Quim. Nova* 36, 291–305. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000200016>
- Foppe, K.S., Hammond-Weinberger, D.R., Subedi, B., 2018. Estimation of the consumption of illicit drugs during special events in two communities in Western Kentucky, USA using sewage epidemiology. *Sci. Total Environ.* 633, 249–256. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.175>
- Gracia-Lor, E., Zuccato, E., Castiglioni, S., 2016. Refining correction factors for back-calculation of illicit drug use. *Sci. Total Environ.* 573, 1648–1659. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.179>
- Gross, J.H., 2011. *Mass Spectrometry A Textbook*, 2nd ed, Springer. Springer, Berlin, Heidelberg, Berlin, Germany. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-10711-5>
- Harris, D.S., Everhart, E.T., Mendelson, J., Jones, R.T., 2003. The pharmacology of cocaethylene in humans following cocaine and ethanol administration. *Drug Alcohol Depend.* 72, 169–82. [https://doi.org/10.1016/s0376-8716\(03\)00200-x](https://doi.org/10.1016/s0376-8716(03)00200-x)
- Hoffmann, E. De, Stroobant, V., 2007. *Mass Spectrometry - Principles and Applications.*, 3rd ed. John Wiley & Sons, West Sussex. <https://doi.org/10.1002/mas.20296>
- IBGE, 2020. Proje o da popula o do Brasil e das Unidades da Federa o [WWW Document]. URL <https://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/> (accessed 2.1.20).
- ICICT/FIOCRUZ, 2017. III Levantamento Nacional Sobre o Uso De Drogas Pela Popula o Brasileira.
- Jackson, M., 2015. Schematic of a triple quadrupole mass spectrometer [WWW Document]. URL <https://en.wikipedia.org/wiki/User:MiaJ601> (accessed 6.13.19).
- Khan, U., Nicell, J.A., 2012. Sewer epidemiology mass balances for assessing the illicit use of methamphetamine, amphetamine and tetrahydrocannabinol. *Sci. Total Environ.* 421–422, 144–162. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.01.020>
- Krizman-Matasic, I., Senta, I., Kostanjevecki, P., Ahel, M., Terzic, S., 2019. Long-term monitoring of drug consumption patterns in a large-sized European city using wastewater-based epidemiology: Comparison of two sampling schemes for the assessment of multiannual trends. *Sci. Total Environ.* 647, 474–485. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.441>
- Lai, F.Y., Ort, C., Gartner, C., Carter, S., Prichard, J., Kirkbride, P., Bruno, R., Hall, W., Eaglesham, G., Mueller, J.F., 2011. Refining the estimation of illicit drug consumptions from wastewater analysis: Co-analysis of prescription pharmaceuticals and uncertainty assessment. *Water Res.* 45, 4437–4448. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.05.042>
- Mackul ak, T.,  kub k, J., Grabic, R., Ryba, J., Biro ov , L., Fedorova, G.,  palkov , V., Bod k, I., 2014. National study of illicit drug use in Slovakia based on wastewater analysis. *Sci. Total Environ.* 494–495, 158–165. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.089>
- Maldaner, A.O., Schmidt, L.L., Locatelli, M.A.F., Jardim, W.F., Sodr , F.F., Almeida, F. V., Pereira, C.E.B., Silva, C.M., 2012. Estimating cocaine consumption in the brazilian federal district (FD) by sewage analysis. *J. Braz. Chem. Soc.* 23, 861–867. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532012000500011>
- Mastroianni, N., López-García, E., Postigo, C., Barceló, D., de Alda, M.L., 2017. Five-year monitoring of 19 illicit and legal substances of abuse at the inlet of a wastewater treatment plant in Barcelona (NE Spain) and estimation of drug consumption patterns and trends. *Sci. Total Environ.* 609, 916–926.

- <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.126>
- McCall, A.-K., Bade, R., Kinyua, J., Lai, F.Y., Thai, P.K., Covaci, A., Bijlsma, L., van Nuijs, A.L.N., Ort, C., 2016. Critical review on the stability of illicit drugs in sewers and wastewater samples. *Water Res.* 88, 933–947. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.10.040>
- Murray, K.K., 2017. File:QTOF Schematic.gif [WWW Document]. URL [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:QTOF\\_Schematic.gif](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:QTOF_Schematic.gif) (accessed 6.13.19).
- Nefau, T., Karolak, S., Castillo, L., Boireau, V., Levi, Y., 2013. Presence of illicit drugs and metabolites in influents and effluents of 25 sewage water treatment plants and map of drug consumption in France. *Sci. Total Environ.* 461–462, 712–722. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.05.038>
- NIDA, 2018. Marijuana.
- NIDA, 2016. Cocaine.
- Passagli, M.F., 2013. *Toxicologia Forense Teoria e Prática*, 4th editio. ed. Millenium, Campinas, SP.
- Postigo, C., de Alda, M.J.L., Barceló, D., 2010. Drugs of abuse and their metabolites in the Ebro River basin: Occurrence in sewage and surface water, sewage treatment plants removal efficiency, and collective drug usage estimation. *Environ. Int.* 36, 75–84. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.10.004>
- Postigo, C., de Alda, M.L., Barceló, D., 2011. Evaluation of drugs of abuse use and trends in a prison through wastewater analysis. *Environ. Int.* 37, 49–55. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envint.2010.06.012>
- Ratola, N., Cincinelli, A., Alves, A., Katsoyiannis, A., 2012. Occurrence of organic microcontaminants in the wastewater treatment process. A mini review. *J. Hazard. Mater.* 239–240, 1–18. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.05.040>
- Rodríguez-Álvarez, T., Racamonde, I., González-Mariño, I., Borsotti, A., Rodil, R., Rodríguez, I., Zuccato, E., Quintana, J.B., Castiglioni, S., 2015. Alcohol and cocaine co-consumption in two European cities assessed by wastewater analysis. *Sci. Total Environ.* 536, 91–98. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.016>
- Santos, J.M., Jurban, M., Kim, H., 2015. Could sewage epidemiology be a strategy to assess lifestyle and wellness of a large scale population? *Med. Hypotheses* 85, 408–411. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2015.06.020>
- Senta, I., Krizman, I., Ahel, M., Terzic, S., 2014. Assessment of stability of drug biomarkers in municipal wastewater as a factor influencing the estimation of drug consumption using sewage epidemiology. *Sci. Total Environ.* 487, 659–665. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.054>
- Sodré, F.F., Feitosa, R.S., Jardim, W.F., Maldaner, A.O., 2018. Wastewater-based epidemiology of cocaine in the Brazilian Federal District: spatial distribution, weekly variation and sample preservation strategies. *J. Braz. Chem. Soc.* 00, 12.
- Sodré, F.F., Souza, G.B., Feitosa, R.S., Pereira, C.E.B., Maldaner, A.O., 2017. Illicit drugs, metabolites and adulterants in wastewater: Monitoring community drug abuse in the Brazilian federal district during the 2014 soccer world cup. *J. Braz. Chem. Soc.* 28, 2146–2154. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20170063>
- Thermo Fisher Scientific, 2011. Schematic of an orbitrap analyzer [WWW Document]. URL [https://www.researchgate.net/figure/Schematic-of-an-orbitrap-analyzer-Adapted-from-58-by-permission-from-THERMO-FISHER\\_fig7\\_321277853](https://www.researchgate.net/figure/Schematic-of-an-orbitrap-analyzer-Adapted-from-58-by-permission-from-THERMO-FISHER_fig7_321277853)
- Thomas, K. V., Bijlsma, L., Castiglioni, S., Covaci, A., Emke, E., Grabic, R.,

- Hernández, F., Karolak, S., Kasprzyk-Hordern, B., Lindberg, R.H., Lopez de Alda, M., Meierjohann, A., Ort, C., Pico, Y., Quintana, J.B., Reid, M., Rieckermann, J., Terzic, S., van Nuijs, A.L.N., de Voogt, P., 2012. Comparing illicit drug use in 19 European cities through sewage analysis. *Sci. Total Environ.* 432, 432–439. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.06.069>
- Tscharke, B.J., Chen, C., Gerber, J.P., White, J.M., 2016. Temporal trends in drug use in Adelaide, South Australia by wastewater analysis. *Sci. Total Environ.* 565, 384–391. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.183>
- UNODC, 2019a. World Drug Report 2019.
- UNODC, 2019b. World Drug Report 2019 Methodology Report.
- UNODC, 2018. World Drug Report 2018.
- UNODC, 2017. World Drug Report 2017.
- van Nuijs, A.L.N., Castiglioni, S., Tarcomnicu, I., Postigo, C., Lopez de Alda, M., Neels, H., Zuccato, E., Barcelo, D., Covaci, A., 2011. Illicit drug consumption estimations derived from wastewater analysis: A critical review. *Sci. Total Environ.* 409, 3564–3577. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2010.05.030>
- Van Nuijs, A.L.N., Pecceu, B., Theunis, L., Dubois, N., Charlier, C., Jorens, P.G., Bervoets, L., Blust, R., Meulemans, H., Neels, H., Covaci, A., 2009. Can cocaine use be evaluated through analysis of wastewater? A nation-wide approach conducted in Belgium. *Addiction* 104, 734–741. <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2009.02523.x>
- van Nuijs, A.L.N., Pecceu, B., Theunis, L., Dubois, N., Charlier, C., Jorens, P.G., Bervoets, L., Blust, R., Neels, H., Covaci, A., 2009. 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.* 43, 1341–1349. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.12.020>
- Volkow, N.D., Baler, R.D., Compton, W.M., Weiss, S.R.B., 2014. Adverse health effects of marijuana use. *N. Engl. J. Med.* 370, 2219–2227. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1402309>
- Zhang, Y., Duan, L., Wang, B., Du, Y., Cagnetta, G., Huang, J., Blaney, L., Yu, G., 2019. Wastewater-based epidemiology in Beijing, China: Prevalence of antibiotic use in flu season and association of pharmaceuticals and personal care products with socioeconomic characteristics. *Environ. Int.* 125, 152–160. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.01.061>
- Zuccato, E., Castiglioni, S., Senta, I., Borsotti, A., Genetti, B., Andreotti, A., Pieretti, G., Serpelloni, G., 2016. Population surveys compared with wastewater analysis for monitoring illicit drug consumption in Italy in 2010–2014. *Drug Alcohol Depend.* 161, 178–188. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2016.02.003>
- Zuccato, E., Chiabrando, C., Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, R., 2008. Estimating community drug abuse by wastewater analysis. *Environ. Health Perspect.* 116, 1027–1032. <https://doi.org/10.1289/ehp.11022>
- Zuccato, E., Gracia-Lor, E., Rousis, N.I., Parabiaghi, A., Senta, I., Riva, F., Castiglioni, S., 2017. Illicit drug consumption in school populations measured by wastewater analysis. *Drug Alcohol Depend.* 178, 285–290. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2017.05.030>