



IOLANA CAMPESTRINI

**DETERMINAÇÃO DE COCAÍNA E METABÓLITOS
EM AMOSTRAS DE URINA DE USUÁRIOS DA
DROGA E EM AMOSTRAS AMBIENTAIS**

CAMPINAS

2015



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

IOLANA CAMPESTRINI

**DETERMINAÇÃO DE COCAÍNA E METABÓLITOS EM
AMOSTRAS DE URINA DE USUÁRIOS DA DROGA E EM
AMOSTRAS AMBIENTAIS**

ORIENTADOR: PROF. DR. WILSON DE FIGUEIREDO JARDIM

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTORA EM CIÊNCIAS.**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA POR
IOLANA CAMPESTRINI E ORIENTADA PELO PROF. DR. WILSON DE FIGUEIREDO
JARDIM**

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2015

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Simone Lucas Gonçalves de Oliveira - CRB 8/8144

C154d Campestrini, Iolana, 1985-
Determinação de cocaína e metabólitos em amostras de urina de usuários da droga e em amostras ambientais / Iolana Campestrini. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Wilson de Figueiredo Jardim.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Cocaína. 2. Epidemiologia do esgoto. 3. Amostras ambientais. 4. Água tratada. 5. LC-MS/MS. I. Jardim, Wilson de Figueiredo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Determination of cocaine and metabolites in users urine samples and in environmental sample

Palavras-chave em inglês:

Cocaine

Sewage Epidemiology

Environmental samples

Drinking water

LC-MS/MS

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Wilson de Figueiredo Jardim [Orientador]

André Henrique Rosa

Robson José de Cassia Franco Afonso

Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

José Alberto Fracassi da Silva

Data de defesa: 22-04-2015

Programa de Pós-Graduação: Química

Dedico este trabalho aos meus pais
Dormelho e Salvatina e aos meus
irmãos Cristiane e Fernando.

“Não vês que somos viajantes?
E tu me perguntas: Que é viajar?
Eu respondo com uma palavra: é avançar!
Experimentais isto em ti.
Que nunca te satisfaças com aquilo que és
Para que sejas um dia aquilo que ainda não és.
Avança sempre!
Não fiques parado no caminho.

Mesmo que já tenha feito uma longa
caminhada, sempre haverá mais um
caminho a percorrer.”

Santo Agostinho

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Wilson de Figueiredo Jardim pela oportunidade e orientação, pelos ensinamentos e conversas durante todo o período em que participei do grupo LQA (Laboratório de Química Ambiental).

Ao prof. Dr. Paulo Roberto Madureira e a Profa. Dra. Célia Regina Garlipp, ambos da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pela oportunidade que abriu as portas para a colaboração com o HC/UNICAMP.

Ao Rafael Lanaro, pesquisador do Centro de Controle e Intoxicação do HC/UNICAMP pela colaboração que permitiu a obtenção de um amplo número de amostras de urina de usuários de cocaína, contribuindo para o desenvolvimento de parte deste estudo.

Ao prof. Dr. Pedro Eduardo Frohlich e à profa. Dra. Renata Pereira Limberger da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul por cederem o padrão certificado da anidroecgonina.

À Companhia de Saneamento de Campinas (SANASA) pelas amostras de esgoto sanitário.

Aos meus pais Salvatina e Dormelho e aos meus irmãos Cristiane e Fernando por estarem sempre presentes. Pelas palavras de apoio e incentivo, as quais nunca faltaram. Por acreditarem em meus sonhos e me ensinarem a perseverança e a dedicação. E por todo amor e carinho.

Aos meus amigos de longe, mas sempre presentes: Giovana F. Maria, Gisele F. Maria, Karoline Hasse, Rafaeli Vendrusculo, Isabel Hoffman, Kalya P. Roux, Laize Zaramello, Heloiza, Daiana Strada e Patrícia Reffatti.

Ao Willyam Luccas, meu melhor companheiro nesse último ano, pela paciência, incentivo e apoio.

Aos amigos que fiz ao longo destes quatro anos em Campinas e São Paulo.

Aos amigos do LQA e do GIA pela amizade e companheirismo: Cristiane Vidal, Glauciene Marcone, Cassiana Montagner Raimundo, Thiago de Alencar Neves, Juliano da Silva, Manassés Zuliani Jora, Francisco Senna e Diego de Andrade.

Aos professores do Departamento de Química da UNICAMP que me acompanharam e contribuíram para a minha formação durante o doutoramento.

Ao pessoal da CPG por todo o trabalho burocrático realizado.

A todos os funcionários do IQ e da UNICAMP.

Aos professores da banca examinadora pela disposição e pela contribuição científica a este trabalho.

Ao IQ, ao INCTAA e a CAPES pelo suporte financeiro para a realização e divulgação deste trabalho em congressos científicos.

E por fim, mas não menos importante, agradeço a Deus e à Nossa Senhora por guiar todos os meus passos.

CURRICULUM VITAE

Iolana Campestrini

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Doutorado em Ciências desenvolvido no Instituto de Química / UNICAMP.

Orientação: Prof. Dr. Wilson de Figueiredo Jardim. Período: 2011 / atual.

Mestrado em Química Analítica. Departamento de Química / UFSC

Orientação: Prof. Dr. Almir Spinelli. Período: 2008/2010.

Bacharelado em Química. Departamento de Química / UFSC. Período:

2004/2007

PRODUÇÃO ACADÊMICA

Doutorado

Determinação de cocaína e seus metabólitos em amostras de urina de usuários

da droga e em amostras ambientais. Programa de Pós-Graduação em Química – Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas.

Orientação: Prof. Dr. Wilson de Figueiredo Jardim. Período: 2011/2015.

Publicações: 4 trabalhos científicos em congressos, sendo 1 apresentação oral em congresso internacional.

Mestrado Acadêmico

Determinação eletroanalítica de estanho e sulfadiazina usando eletrodo de

filme de bismuto. Programa de Pós-Graduação em Química – Departamento de Química Analítica. Universidade Federal de Santa

Catarina. Orientação: Prof. Dr. Almir Spinelli. Período: 2008/2010.

Publicações: 3 artigos científicos publicados em revistas indexadas e 1 trabalho científico em congresso nacional.

Iniciação Científica:

Caracterização morfológica de nanoagregados formados por surfactantes e derivados de poli(etilenoimina): Contribuição no entendimento da formação e caracterização dos nanoagregados formados por surfactantes e poli(etilenoimina) com o emprego de técnicas físico-químicas e de espalhamento de luz.. Laboratório de polímeros e surfactantes em solução. Departamento de Físico-Química / UFSC. Orientação: Prof. Dr. Edson Minatti. Período: 2005/2006. Publicações: 6 trabalhos científicos apresentados em congressos nacionais.

Desenvolvimento de metodologia eletroanalítica para a determinação de nitrito utilizando ferricianeto de potássio como mediador. Grupo de estudos em processos eletroquímicos e eletroanalíticos. Departamento de Química Analítica da Universidade Federal de Santa Catarina. Orientação: Prof. Dr. Almir Spinelli. Período: 2006/2007. Publicações: 2 trabalhos científicos publicados em congressos nacionais.

PRINCIPAIS PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

Artigos Científicos

Frena, M.;Campestrini, I.; Braga, O. C. Spinelli, A. In situ bismuth-filmelectrode for square-waveanodicstrippingvoltammetricdeterminationoftin in biodiesel. *ElectrochimicaActa* 56 (2011) 4678 - 4684.

Campestrini, I., Braga, O. C. Vieira, I. C. Spinelli, A. Application of bismuth-film electrode for cathodic electroanalytical determination of sulfadiazine. *ElectrochimicaActa* 55 (2010) 4970 - 4975.

Braga, O. C. Campestrini, I. Vieira, I. C. e Spinelli, A. Sulfadiazine Determination in Pharmaceuticals by Electrochemical Reduction on a Glassy Carbon Electrode. *Journal of Brazilian Chemical Society* 21 (2010) 813 - 820.

Trabalhos científicos publicados em congressos nacionais e internacionais

Campestrini, I.; Jardim, W. F. Occurrence of cocaine in wastewater, surface and tap water in Campinas, São Paulo-Brazil.2014 (Oral)

Campestrini, I; Jardim,W. F. Método analítico para a determinação de cocaína e metabólitos em urina por LC-MS/MS: foco em epidemiologia forense. 37 SBQ, 2014, Natal-RS (Pôster)

Campestrini, I; Jardim, W. F. Desenvolvimento de método analítico baseado em LC-MS/MS para determinação de cocaína e metabólitos em urina. XIV COLACRO, 2012. Florianópolis (Pôster).

Campestrini, I.; Braga, O. C.; Spinelli, A.; Vieira, I. C. Aplicação de um eletrodo de Filme de Bismuto para determinação eletroanalítica catódica de Sulfadiazina. XVIII SIBEE, 2011. Bento Gonçalves-RS.

Campestrini, I.; Braga, O. C.; Spinelli, A.. Desenvolvimento de metodologia eletroanalítica para determinação de nitrito em amostras de inibidores de corrosão. XVII SBQ Sul, 2009. Rio Grande - RS (Oral)

Campestrini, I.;Felippe, A. C.; Minatti, E. Coagulação de soluções aquosas de PEI (um polycation) promovida pela adição de SDS (um surfactante aniônico) investigadas por espalhamento de raios-X, turbidimetria e mobilidade eletroforética. 30ª SBQ, 2007. Águas de Lindóia-SP.

Campestrini, I.;Minatti, E ; Zanette, D.; Felippe, A. C. Morfologia de nanoagregados de PEO e misturas de surfactantes(colato e SDS) investigada por espalhamento de raios-X (SAXS). 29ª SBQ, 2006. Águas de Lindóia-SP (Oral).

Campestrini, I.;Felippe, A. C.; Minatti, E. Complexos Supramoleculares de PEI (um polycation) e SDS (um surfactante aniônico) investigados por SAXS. 14º SBQSul, 2006, Erechim-RS.

Outras Atividades Acadêmicas (IQ-Unicamp)

Participação no programa de estágio de docência. Disciplina: Período: 2/2012

Membro da Associação dos Pós-Graduandos da Química da UNICAMP (APGQ). Período: 2011/2012.

Membro da Comissão Organizadora do VI Fórum da Pós-Graduação em Química da UNICAMP. Ano: 2012.

RESUMO

DETERMINAÇÃO DE COCAÍNA E METABÓLITOS EM AMOSTRAS DE URINA DE USUÁRIOS DA DROGA E EM AMOSTRAS AMBIENTAIS

Este trabalho apresenta a determinação de sete subprodutos da cocaína (COC), incluindo a benzoilecgonina (BE), em amostras de urina de usuários da droga. Com os dados obtidos foi avaliada a incerteza no cálculo da razão entre a BE e o somatório dos demais metabólitos da COC, sendo que a razão média encontrada foi utilizada para inferir sobre o consumo de COC aplicando a epidemiologia do esgoto. Os resultados dessa razão apresentaram grande amplitude de valores e mostraram elevada influência sobre a estimativa do consumo. Apresenta, também, a avaliação da eficiência de remoção (ER) para a COC e BE nas estações de tratamento de esgoto (ETE) Anhumas e Capivari e da qualidade de mananciais e de águas de abastecimento do estado de São Paulo. Os melhores índices de remoção foram observados para a ETE Capivari, os quais variaram entre 96 e 99%. Tanto nas amostras de mananciais como nas amostras de água de abastecimento, a BE foi determinada em maiores concentrações do que a COC. Nos rios Piracicaba, Capivari e Anhumas observaram-se os maiores níveis de BE, os quais variaram entre 300 e 1000ng L⁻¹. Nas amostras de água de abastecimento do rio Capivari e do rio Atibaia foram determinadas as maiores concentrações de BE, chegando a 650 ng L⁻¹. Para a análise dessas amostras foi utilizada a extração em fase sólida (SPE) seguida de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS). No geral, o método apresentou exatidão superior a 70%, com coeficiente de variação menor do que 15% no nível de ng L⁻¹.

Palavras-chave: Cocaína, excreção urinária, epidemiologia do esgoto, urina de usuários, esgoto sanitário, mananciais, água tratada, LC-MS/MS

ABSTRACT

DETERMINATION OF COCAINE AND METABOLITES IN USERS URINE SAMPLES AND IN ENVIRONMENTAL SAMPLES

This work describes the determination of seven cocaine (COC) metabolites, including the major one benzoylecgonine (BE), in urine of cocaine users. These determinations allowed the calculation of the ratio between BE concentration and the sum of the other COC metabolites concentration, as well as allowed an assessment of the uncertainty involved in this ratio. The ratios were used to estimate cocaine consumption applying sewage epidemiology yielding high amplitude of values among the ratios calculated. The work also presents COC and BE removal efficiency (RE) in two wastewater treatment plant (WWTP), namely Anhumas and Capivari, where the best RE were obtained for the Capivari WWTP, which varied between 96% and 99%. Also the assessment of water quality, for both surface and drinking waters of the State of São Paulo, Brazil, was evaluated. The metabolite BE occurred more frequently and at higher concentrations when compared to COC, considering the same samples. For surface water, the highest BE concentrations were found in the Piracicaba, Capivari and Anhumas rivers, and the results varied from 300 to 1000 ng L⁻¹. For drinking waters, the highest BE concentration was found in waters from Capivari and Atibaia rivers, at 650 ng L⁻¹. Solid phase extraction and the liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) were used for the determination of the compounds. In general, the method presented accuracy above 70% and relative standard deviation below 15%, at ng L⁻¹ level.

Keywords: cocaine, urine excretion, sewage epidemiology, cocaine users urine, sewage, source water, served water, LC-MS/MS.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS.....	XXV
LISTA DE TABELAS.....	XXIX
LISTA DE FIGURAS.....	XXXIII
CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO- -----	1
CAPÍTULO II: CONCEITOS GERAIS E OBJETIVOS - -----	5
II - 1. DROGAS ILÍCITAS -----	7
II - 2. OCORRÊNCIA DE COCAÍNA E METABÓLITOS EM AMOSTRAS AMBIENTAIS -----	8
II - 3. ESTIMANDO CONSUMO DE COCAÍNA: INCERTEZAS ASSOCIADAS À EPIDEMIOLOGIA DO ESGOTO-----	13
II - 4. DETERMINAÇÃO DE COCAÍNA E SEUS METABÓLITOS ----	19
II - 4.1. Coleta e amostragem -----	20
II - 4.2. Preparo de amostra -----	21
II - 4.3. Determinação analítica empregando LC-MS/MS -----	24
II - 5. OBJETIVOS GERAIS -----	30
CAPÍTULO III: OCORRÊNCIA DE COCAÍNA E SEUS METABÓLITOS EM AMOSTRAS DE URINA DE USUÁRIOS DA DROGA E DE AFLUENTE SANITÁRIO: EPIDEMIOLOGIA DE ESGOTO-----	31
III - 1. INTRODUÇÃO -----	33
III - 2. OBJETIVOS -----	36
III - 3. PARTE EXPERIMENTAL-----	37
III - 3.1. Reagentes e padrões analíticos -----	37
III - 3.2. Coleta e amostragem de urina de usuários de cocaína e de afluente sanitário-----	37

III - 3.3. Preparo de amostra -----	43
III - 3.4. Método analítico: LC-MS/MS -----	45
III - 3.5. Avaliação da estabilidade dos analitos nas amostras de urina -	52
III - 3.6. Avaliação da estabilidade da cocaína e da benzoilecgonina no	
afluente sanitário-----	54
III - 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	56
III - 4.1. Método analítico baseado em LC-MS/MS para determinação de	
cocaína e metabólitos em amostras de urina e afluentes sanitários -----	56
III - 4.2. Estabilidade da cocaína e metabólitos em urina humana -----	62
III - 4.3. Estabilidade da cocaína e da benzoilecgonina no afluente	
sanitário -----	64
III - 4.4. Determinação de cocaína e metabólitos nas amostras de urina e	
de afluentes sanitários-----	66
III - 4.5. Comparação da excreção urinária da COC e da BE com a	
determinação em amostras de afluentes sanitários -----	73
III - 5. ESTIMATIVA DO CONSUMO DE COCAÍNA	
EMPREGANDO A EPIDEMIOLOGIA DO ESGOTO-----	85
III - 5.2. Estimando as incertezas da epidemiologia do esgoto -----	91
CAPÍTULO IV - -----	95
OCORRÊNCIA DE COCAÍNA E BENZOILECGONINA EM AMOSTRAS	
AMBIENTAIS -----	95
IV - 1. INTRODUÇÃO-----	97
IV - 2. OBJETIVOS-----	99
IV - 3. PARTE EXPERIMENTAL-----	100
IV - 3.1. Amostragem e coleta das amostras ambientais -----	100
IV - 3.2. Preparo das amostras ambientais -----	108

IV - 3.3. Análise das amostras por LC-MS/MS -----	109
IV - 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	110
IV - 4.1. Método analítico para determinação de cocaína e benzoilecgonina em amostras ambientais -----	110
IV - 4.2. Ocorrência de cocaína e benzoilecgonina em amostras de afluente e efluente sanitário de ETE: avaliando a eficiência de remoção nas ETE -----	115
IV - 4.3. Cocaína e benzoilecgonina em águas superficiais -----	121
IV - 4.4. Cocaína e benzoilecgonina em águas de abastecimento público -----	125
CAPÍTULO V: CONCLUSÃO -----	129
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	135

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ACN – Acetonitrila

AE – Anidroecgonina

AEME – Éster metílico da anidroecgonina

AS – Afluente sanitário

BE – Benzoilecgonina

BE/COC – Razão entre a concentração de BE e a concentração de cocaína

BE-d3 – Benzoilecgonina deuterada

$\%BE_{AS}$ – Porcentagem da benzoilecgonina em relação ao somatório das concentrações dos demais metabólitos da cocaína, determinados em amostras de afluente sanitário

$\%BE_{exct}$ – Porcentagem da benzoilecgonina excretada via urina em relação ao somatório das concentrações dos demais metabólitos da cocaína determinados em amostras de urina de usuários da droga.

$[BE]_{aflluETE}$ – Concentração de BE no afluente sanitário na ETE

°C – Graus Celsius

CC1 – Concentração controle 1: Nível de concentração baixo

CC2 – Concentração controle 2: Nível de concentração intermediário

CC3 – Concentração controle 3: Nível de concentração alto

CCI – Centro de controle de intoxicação do Hospital das Clínicas da UNICAMP

CE –Cocaetileno

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

COC– Cocaína

COC-d3 – Cocaína deuterada

COC_{eq} – Cocaína equivalente consumida ($mg\ dia^{-1}\ hab^{-1}$);

CV – Coeficiente de variação

ECG – Ecgonina
EEE– Éster etílico da ecgonina
EF – Efluente sanitário
EM – Efeito matriz
EMA – Eficiência do método analítico
EME– Éster metílico da ecgonina
EME-d3 – Ester etílico da ecgonina deuterado
ER – Eficiência de remoção do processo de tratamento utilizando na ETE
ESI – Ionização por *electrospray* (do inglês,*electrosprayionization*)
ETA – Estação de tratamento de água
ETE – Estação de tratamento de esgoto
EV – Endovenosa
IN – Intranasal
LC-MS/MS – do inglês,*liquidchromatography–massspectrometry*
LD – Limite de detecção
LQ – Limite de quantificação
m/z – Razão massa/carga
MM_{BE} – Massa molar da BE (g mol⁻¹);
MM_{COC} – Massa molar da COC(g mol⁻¹);
MRM – do inglês *multiplereactionmonitoring*
P – Número de habitantes atendidos pela ETE.
PCJ – Rios Piracicaba, Capivari, Jundiá
R – Recuperação do processo de extração em fase sólida
SABESP - Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo
SPE – Extração em fase sólida (do inglês,*SolidPhaseExtraction*)
TDH – Tempo de detenção hidráulico
TIC – Cromatograma de íons totais (do inglês *total ionchromatogram*)

t_R – Tempo de retenção da corrida cromatográfica

V_{ETE} – Vazão do aporte de esgoto sanitário na ETE ($L s^{-1}$);

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos de interesse ambiental para a cocaína e benzoilecgonina, a 25 °C (Domènechet <i>al.</i> , 2009).	11
Tabela 2. Volumes da alíquotade afluyente sanitário coletados para compor a amostra cumulativa de 24 horas na ETE Anhumas	42
Tabela 3. Data, número de amostras e sazonalidades das campanhas de coleta de amostras de afluyente sanitário nas ETE estudadas.	43
Tabela 4. Programa de gradiente empregado na separação cromatográfica para a COC e seus metabólitos	46
Tabela 5. Íons precursores e íons fragmentos utilizados para a quantificação (Q) e confirmação (C) da COC, de seus metabólitos e dos compostos deuterados.	47
Tabela 6. Concentrações no nível baixo (CC1) e no nível alto (CC2) dos padrões analíticos dos analitos adicionados à amostra de urina isenta dos analitos, e concentrações no nível baixo (CC1), intermediário (CC2) e alto (CC3) dos padrões dos analitos deuterados adicionados à amostra de afluyente sanitário, utilizadas nos ensaios de desempenho analítico do método.	49
Tabela 7. Concentrações de cocaína e de seus metabólitos utilizadas nos ensaios de estabilidade da cocaína e de seus metabólitos na urina humana.	53
Tabela 8. Resultados obtidos para a recuperação do processo de SPE para cocaína e seus metabólitos nas amostras de urina e nas amostras de afluentes sanitários das ETE, nos níveis de concentração estudados.	56
Tabela 9. Efeito matriz para a cocaína e metabólitos nas amostras de urina e nas amostras de afluentes sanitários, em diferentes níveis de concentração.	58
Tabela 10. Precisão e exatidão do método analítico na determinação da cocaína e seus produtos de biotransformação em amostras de urina, em dois níveis de concentração.	59

Tabela 11. Precisão e exatidão do método analítico na determinação da cocaína e seus produtos de biotransformação em amostras de afluentes sanitários, em três níveis de concentração.....	59
Tabela 12. Parâmetros da curva analítica por padronização interna para a cocaína e metabólitos	62
Tabela 13. Divisão das amostras do conjunto amostral de urina de usuários da droga em grupos de acordo com a concentração de BE determinada.	74
Tabela 14. %BE média calculada para as diferentes vias de administração da cocaína nas amostras de urina de usuários da droga (n=97).....	79
Tabela 15. Dados utilizados para estimativa da prevalência dos usuários de cocaína entre a população com idade entre 15 e 69 anos nas regiões atendidas pela ETE Anhumas e ETE Capivari. Estimativa com base no consumo <i>per capita</i> no sábado, do final de semana estudado (21/07/2013), e na segunda-feira de Carnaval (03/03/2014).	89
Tabela 16. Fatores e suas incertezas de medição sobre o cálculo da estimativa do consumo de cocaína utilizando a epidemiologia do esgoto	92
Tabela 17. Locais dos pontos de coleta das amostras de águas superficiais da Bacia Hidrográfica do PCJ e data da realização das coletas.....	105
Tabela 18. Locais dos pontos de coleta das amostras de águas de abastecimento público do estado de São Paulo e datas da realização das coletas.	107
Tabela 19. Volume das amostras ambientais submetidos à SPE e à análise por LC-MS/MS.....	108
Tabela 20. Concentrações controles utilizadas nos ensaios para avaliação do método analítico na determinação de cocaína (COC-d3) e benzoilecgonina (BE-d3) nas amostras ambientais:	110
Tabela 21. Recuperação da COC-d3 e BE-d3 no processo de SPE nas amostras ambientais em dois níveis de concentração.	111
Tabela 22. Efeito matriz para os padrões analíticos COC-d3 e BE-d3 nas amostras ambientais em dois níveis de concentração.	112

Tabela 23. Exatidão do método analítico e repetitividade para a determinação da COC-d3 e da BE-d3 nas amostras ambientais, em dois níveis de concentração.....	113
Tabela 24. Precisão intermediária (inter-corrída) para a determinação de COC-d3 e BE-d3 nas amostras ambientais no nível baixo de concentração ..	114
Tabela 25. Parâmetros analíticos das curvas de calibração interna para a cocaína e para a benzoilecgonina.....	115
Tabela 26. Concentração de COC e BE determinada nas amostras de águas superficiais	123
Tabela 27. Concentração de cocaína e benzoilecgonina determinada nas campanhas amostrais de águas de abastecimento público em pontos da Bacia do PCJ e da Bacia do Mogi-Guaçu.....	126

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ilustração das possíveis vias de transporte da cocaína no ambiente (figura adaptada Feitosa *et al.*, 2013).....9
- Figura 2. Biotransformação da cocaína sob a forma de cloridrato de cocaína, na presença e ausência de consumo de álcool, e da cocaína sob a forma de pasta base..... 17
- Figura 3. Esquema ilustrativo das etapas envolvidas em SPE: (x) interferentes; (•) analitos; porção em azul claro ilustra a amostra; em cinza, a fase extratora e em branco, o solvente.....22
- Figura 4. Estruturas químicas dos polímeros utilizados como fase sólida nos cartuchos Oasis HLB, Oasis MCX e Oasis WCX. Adaptado de Waters ®.24
- Figura 5. Ilustração da análise de íons MRM em um analisador espectrômetro de massas triplo quadrupolo.....29
- Figura 6. Mapa ilustrativo das bacias de esgotamento e suas subdivisões do município de Campinas-SP (fonte: SANASA, 2015)..... 39
- Figura 7. Mapa do município de Campinas com as regiões contempladas pelas bacias de esgotamento do município em destaque e a localização da sub-região atendida pela ETE Capivari e pela ETE Anhumas (Fonte: SANASA, 2015).....40
- Figura 8. Estações de tratamento de esgoto selecionadas para o estudo: A) ETE Capivari. B) ETE Anhumas42
- Figura 9. A) Sistema utilizado para a filtração das amostras de afluentes sanitários das ETE. B) Sistema utilizado para a SPE. C) Extrato das amostras analisado por LC-MS/MS.....45
- Figura 10. Cromatogramas MRM para a transição de quantificação “íon precursor → íon fragmento” para COC e seus metabólitos a $70 \mu\text{g L}^{-1}$. (Coluna Zorbax SB-C18, 2,1 x 30 mm e 3,5 μm de tamanho de partícula; fase móvel ácido fórmico 0,1%/ACN)..... 61
- Figura 11. Estabilidade da cocaína e de seus metabólitos na urina após armazenamento da amostra fortificada a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 (T1) e 3 (T3) dias e

- após ciclo de congelamento e descongelamento (C/D). Porcentagem residual em relação à determinação da amostra imediatamente após a fortificação.63
- Figura 12. Variações na concentração de cocaína e benzoilecgonina no afluente sanitário de uma ETE, antes (caixa em cinza) e após a adição de urina (fator de diluição da urina no afluente de 500 vezes), ao longo de 5 horas. Condições experimentais: temperatura ambiente, pH6,8, agitação branda e ausência de luz.....65
- Figura 13. Concentrações encontradas e frequência de detecção para a COC e seus metabólitos nas amostras de urina analisadas. Valores das medianas descritos em cada *Box Plot*.68
- Figura 14. Concentrações de cocaína e seus metabólitos determinadas em amostras de afluente sanitário, coletadas na ETE Capivari (n=8) e na ETE Anhumas (n=9). Valores das medianas inseridas em cada *Box Plot*.72
- Figura 15. Concentrações de BE e de COC e frequência de detecção para a cocaína nos grupos de amostras de urina de usuários com concentrações de BE entre: Grupo I: inferior a $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$; Grupo II: entre 1.000 e $10.000 \mu\text{g L}^{-1}$; Grupo III: entre 10.001 e $25.000 \mu\text{g L}^{-1}$; Grupo IV: entre 25.000 e $100.000 \mu\text{g L}^{-1}$ e Grupo V: superior a $100.001 \mu\text{g L}^{-1}$ 75
- Figura 16. Histograma da porcentagem de BE, em relação aos demais metabólitos da cocaína e à droga parental, com exceção da AE, encontrada nas amostras do conjunto amostral de urina de usuários.77
- Figura 17. Histogramas da %BE para as diferentes opções de vias de consumo da cocaína (A) por via IN ou EV sob a forma de pó; (B) com bebida alcoólica e (C) fumada sob a forma de pasta base.78
- Figura 18. Histograma da %BE_{AS} no conjunto de amostra de afluentes sanitários: amostras de afluente sanitário coletadas na campanha 1 e na campanha 2 (n=15).80
- Figura 19. Distribuição da razão BE/COC no conjunto amostral de urina de usuários da droga. ND COC: cocaína não determinada.82
- Figura 20. Distribuição da razão BE/COC no conjunto de amostras de afluentes sanitários da ETE Anhumas e da ETE Capivari coletadas durante a Campanha 1, 2 e 3.83

Figura 21. Variação semanal na razão BE/COC nas amostras de afluentes sanitários da ETE Anhumas (símbolos em preto) e na ETE Capivari (símbolos em vermelho), durante a campanha amostral 2. N= 3	85
Figura 22. Estimativa do consumo de cocaína per capita durante a segunda semana de julho de 2013 e durante a segunda feira de carnaval de 2014, estimada com base na epidemiologia do esgoto.	86
Figura 23. Cocaína equivalente calculada utilizando a epidemiologia do esgoto em diferentes países. Campinas, BRA: região atendida da ETE Capivari do município de Campinas-SP.	90
Figura 24. Contribuição das incertezas individuais na incerteza total da estimativa do consumo de cocaína (COC_{eq}) através da epidemiologia do esgoto: %BE - excreção metabólica; P - Número de hab. Atendidos pela ETE; DA - determinação analítica da BE no esgoto; E - estabilidade no esgoto sanitário; D - descarga da urina no sistema sanitário; Am – tipo de amostragem do afluente sanitário da ETE.	93
Figura 25. Ilustração dos pontos de coletas das amostras de efluente sanitário nas ETE	101
Figura 26. Ilustração da Bacia do PCJ localizada no estado de São Paulo....	102
Figura 27. Ilustração da localização dos pontos de coleta das amostras de água superficial na Bacia Hidrográfica do PCJ e na Bacia Hidrográfica de Mogi-Guaçu	104
Figura 28. Represa de Guarapiranga.....	106
Figura 29. Ilustração do procedimento de coleta das amostras de águas superficiais	107
Figura 30. Sistemas utilizados para auxiliar a SPE das amostras ambientais: (A) SPE das amostras de efluente sanitário utilizando <i>Manifold</i> (PrepSep™) e seringas plásticas com capacidade para 70 mL (B) SPE das amostras de águas superficiais e de abastecimento público utilizando bomba peristáltica, conectores de PTFE (Teflon®), válvula metálica e suportes universais.....	109

- Figura 31. Frequência de detecção e concentrações de COC eBE determinadas nas amostras de afluente e efluente sanitária da ETE Capivari e da ETE Anhumas durante as campanhas amostrais; n=17. 116
- Figura 32. Concentrações para cocaína (triângulos em azul escuro) e benzoilecgonina (círculos em cinza) nas amostras de afluente sanitário (AS - símbolos fechados) e de efluente sanitário (ES - símbolos abertos) da ETE Anhumas e da ETE Capivari, nas três campanhas de amostragem – C1, campanha 1; C2, campanha 2 e C3, campanha 3. ... 117
- Figura 33. Eficiência de remoção para a COC e para a BE na ETE Anhumas e na ETE Capivari, durante as três campanhas amostrais: C1, campanha 1; C2, campanha 2 e C3, campanha 3 120

CAPÍTULO I -

INTRODUÇÃO

O consumo de drogas faz parte da história da humanidade e, inúmeros problemas de caráter político, social e econômico estão relacionados a esse tema. Atualmente, o amplo consumo dessas substâncias é motivo de preocupação entre entidades de âmbito nacional e internacional, as quais dedicam esforços na tentativa de controlar o consumo e o tráfico de drogas.

As estratégias para o planejamento e desenvolvimento de políticas públicas antidrogas relacionam-se a dados epidemiológicos sobre as tendências de consumo e o mapeamento do consumo em um determinado país, cidade ou região (SENAD, 2009).

A distribuição de questionários entre a população tem sido o método mais utilizado para o mapeamento do consumo de drogas ilícitas. Porém, por depender da resposta de usuários de drogas, o método fornece dados subjetivos, além de demandar tempo demasiadamente longo. Visando suprir essas limitações, uma nova abordagem foi recentemente proposta: a epidemiologia do esgoto.

A epidemiologia do esgoto consiste da coleta de informações sobre o consumo de drogas ilícitas através da determinação do metabólito mais estável da excreção urinária da droga, em amostras de afluentes sanitários¹ nas estações de tratamento de esgoto (ETE). Consequentemente, os dados obtidos são de maneira mais objetiva e rápida, quando comparada aos métodos tradicionais.

Em decorrência da excreção corpórea e do lançamento dos resíduos na rede coletora de esgoto sanitário, os metabólitos de drogas ilícitas têm como destino final o ambiente aquático. As ETE existentes foram, em sua maioria, projetadas para cumprir a legislação vigente e, para muitos compostos não

¹ “afluente sanitário”: termo utilizado para definir o esgoto sanitário afluente à estação de tratamento de esgoto; esgoto sanitário bruto.

legislados, como os objetos deste estudo, a remoção prévia ao lançamento nos corpos aquáticos não é garantida.

A presença de drogas ilícitas e de seus metabólitos em cursos d'água pode ameaçar a preservação dos organismos aquáticos e comprometer a saúde humana, considerando que muitos deles são utilizados como mananciais para o abastecimento da população. Mas a ocorrência dessas substâncias no ambiente tem sido pouco estudada entre a comunidade científica e menor atenção tem sido dispensada aos efeitos deletérios causados por essa exposição indireta.

Este trabalho foi estimulado e fundamentado no propósito de contribuir com a temática das drogas ilícitas, tanto no estabelecimento da epidemiologia do esgoto como uma ferramenta complementar para o mapeamento e enfrentamento às drogas ilícitas, como no conhecimento do cenário atual da contaminação dos corpos aquáticos e das águas de abastecimento público do estado de São Paulo. Este estudo teve a cocaína (COC) como foco principal por ser uma das drogas ilícitas mais nocivas ao usuário e que tem grande prevalência de uso entre a população mundial, inclusive no Brasil.

Para a apresentação deste trabalho, a tese foi dividida em cinco capítulos: esta introdução geral do assunto foi definida como capítulo I. Na sequência, o capítulo II apresenta uma contextualização dos temas abordados, os conceitos gerais do tema e os objetivos do projeto. O capítulo III aborda um estudo voltado para a epidemiologia do esgoto, e o capítulo IV apresenta um estudo relacionado às questões ambientais da cocaína. Para a melhor definição desses estudos, os objetivos do capítulo III e do Capítulo IV serão retomados antes da apresentação de cada estudo. Por fim, o capítulo V mostra a conclusão do trabalho realizado.

CAPÍTULO II -

CONCEITOS GERAIS E OBJETIVOS

II - 1. DROGAS ILÍCITAS

O escritório das nações unidas sobre drogas e crimes (UNODC – do inglês *United Nations Office on Drugs and Crime*), órgão internacional que implementa medidas para o combate e controle do uso de drogas, ao definir o termo droga ilícita considera não apenas a identidade química da substância, mas todo o seu ciclo desde a intenção da produção até o seu consumo (UNODC, 2004).

Segundo o UNODC (2004), a *cannabis*, as anfetaminas, a cocaína e os opiáceos são as classes de drogas ilícitas mais consumidas no mundo, correspondendo a aproximadamente 90% do consumo mundial. Entretanto, a prevalência e os padrões de uso variam entre países. No Brasil, os últimos dados publicados pelo observatório brasileiro de informações sobre drogas (OBID) e pelo UNODC relataram a *cannabis* e a COC como as classes de maior consumo entre os usuários (CEBRID, 2006; SENAD, 2009; UNODC, 2013; UNODC, 2014).

Em 2004, estimou-se que 2,7% dos brasileiros com idade entre 15 e 64 anos eram usuários de *cannabis* e que 0,7% deles eram usuários de COC. Em 2011, a prevalência dos consumidores de cocaína entre 15 e 64 anos chegou a 1,75%, e a 3% dos brasileiros estudantes universitários. Nesse ano, o Brasil foi reconhecido como o segundo maior consumidor de COC no mundo, atrás apenas dos Estados Unidos. Ainda em 2011, foi estimado que o número de pessoas que usaram COC sob a forma de pasta base (*crack* ou *merla*) ao menos uma vez no ano chegou a 340.000, considerando apenas a população das capitais brasileiras (CEBRID & UNIFESP, 2006; SENAD, 2009; UNODC, 2013; UNODC, 2014; FIOCRUZ, 2014).

O alto consumo de COC no Brasil decorre principalmente das fronteiras terrestres com os três principais países produtores da droga (Bolívia, Colômbia e Uruguai) e da extensa costa acessível ao Oceano Atlântico. Com uma posição geográfica que facilita o transporte ilegal de drogas em direção à África e à Europa, o Brasil desempenha um papel ativo no mercado global de drogas, tanto como um país de destino quanto como um país de distribuição.

A cocaína é obtida a partir das folhas da planta de coca *Erythroxylum coca* (*E. coca*), que ocorre principalmente nas regiões andinas da América do Sul. Após ser processada é distribuída na forma de cloridrato de cocaína (pó) ou na forma de pasta base (*crack*).

II - 2. OCORRÊNCIA DA COCAÍNA E METABÓLITOS EM AMOSTRAS AMBIENTAIS

Após ser consumida, a cocaína é biotransformada no organismo resultando em metabólitos ligeiramente mais hidrofílicos do que o composto parental. Esses metabólitos são eliminados principalmente via urina e posteriormente são lançados no ambiente, atingindo os compartimentos ambientais.

Na Figura 1, a rota 1 representa o lançamento dos subprodutos do consumo da COC nos sistemas sanitários locais e a contribuição do descarte direto da droga não consumida em pias, ralos e vasos sanitário. Esses subprodutos alcançam as ETE (rota 2), onde são submetidos a processos de tratamento e, posteriormente, são lançados nos corpos aquáticos (rota 4). Na falta de tratamento prévio o lançamento ocorre diretamente nos compartimentos aquáticos (rota 3). Estudos têm demonstrado a ação, muitas vezes, ineficaz dos tratamentos de esgoto sobre as drogas ilícitas.

Consequentemente, a contaminação dos corpos aquáticos pela droga ilícitas pode ocorrer devido ao lançamento do efluente das ETE nos compartimentos ambientais (rota 4) ou, ainda, pela disposição do lodo residual das ETE no solo (rota 5) (Snyder *et al.*, 2001; Postigo *et al.*, 2008).

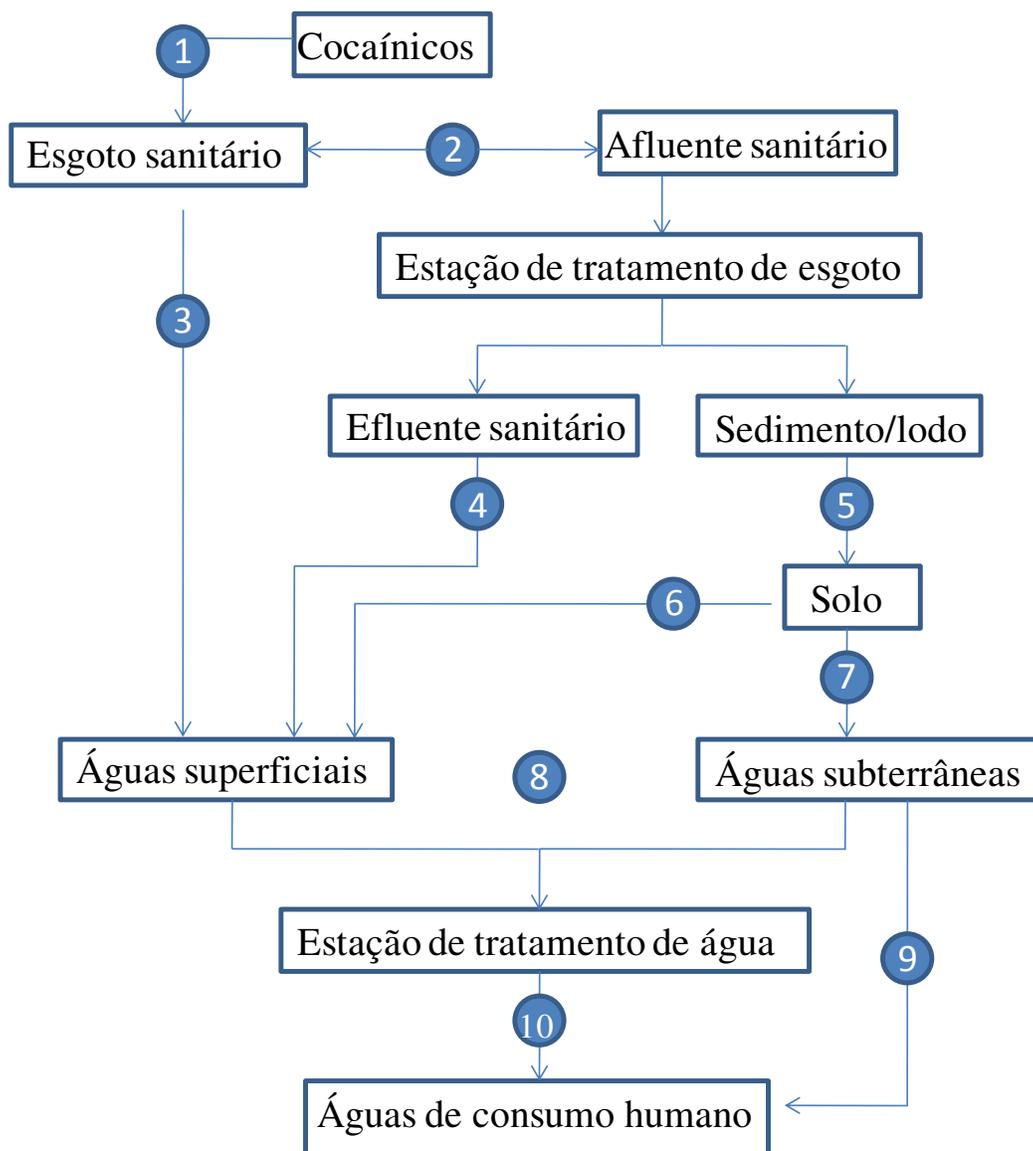


Figura 1. Ilustração das possíveis vias de transporte da cocaína no ambiente (figura adaptada Feitosa *et al.*, 2013).

As rotas 6 a 8 ilustram o transporte dos subprodutos da COC que interagem com o lodo do esgoto das ETE e através dele podem chegar às

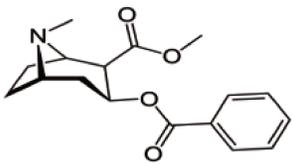
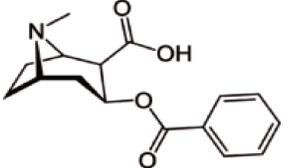
águas superficiais e às águas de abastecimento da população. Frequentemente, a porção do lodo do esgoto sanitário que é descartada nas ETE tem sido utilizada como fertilizantes dos solos na agricultura (rota 5) e, uma vez presente no solo, podem ser carregados até as águas superficiais por escoamento (rota 6) ou até às águas subterrâneas por lixiviação (rota 7). Das águas subterrâneas, podem chegar aos corpos aquáticos por meio da interface existente entre esses dois compartimentos (rota 8) e às águas de abastecimento público, por bombeamento (rota 9). O tratamento ineficaz realizado pelas companhias de tratamento de água pode resultar na contaminação das águas de abastecimento (rota 10).

O estudo sobre a ocorrência das drogas ilícitas no ambiente ganhou enfoque na última década. A COC e seus metabólitos têm sido as substâncias predominantemente estudadas nos trabalhos sobre drogas ilícitas disponíveis na literatura, sendo investigadas em amostras de esgotos sanitários, águas superficiais, lodo da ETE, água de abastecimento público e, em menor número, no ar atmosférico. Devido à elevada frequência de detecção no ambiente, as drogas ilícitas, inclusive a COC, são atualmente reconhecidas como contaminantes emergentes (Zuccato *et al.*, 2005; Cecinato *et al.*, 2009; Kaleta *et al.*, 2006; Jones-Lepp, 2007; Huerta-Fontela *et al.*, 2008a; Zuccato *et al.*, 2008).

A ocorrência da COC e de seus metabólitos nos compartimentos ambientais, assim como os níveis encontrados, variam em função de inúmeros fatores. Citam-se: as propriedades físico-químicas das substâncias e do meio em que estão inseridas, a prevalência e o padrão de uso de drogas, a sazonalidade, a eficiência de remoção das ETE e das estações de tratamento de água (ETA), dentre outras. Na Tabela 1 estão apresentadas algumas propriedades físico-químicas da COC e de seu metabólito benzoilecgonina

(BE). Esses parâmetros podem ser utilizados para prever os aspectos relacionados à distribuição (*i.e.* transporte, persistência e destino) dos cocaínicos nas interfaces ar/água/matéria orgânica (*i.e.* solo, sedimento/lodo da ETE, material particulado e biota).

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos de interesse ambiental para a cocaína e benzoilecgonina, a 25 °C (Domènech *et al.*, 2009).

Parâmetro	Cocaína	Benzoilecgonina
Estrutura		
K_H (mol m ⁻³ atm ⁻¹)*	$7,9 \times 10^{-13}$	$2,06 \times 10^{-17}$
Log Kow	2,65	2,56
Koc (L kg ⁻¹)	19	0,032
pKa	8,6	3,5 (pKa1); 8,6 (pKa2)

* K_H : Constante de Henry

A volatilidade da COC e da BE, avaliada pela constante de Henry, mostra uma tendência muito pequena de transferência da fase líquida para o ar atmosférico. Porém, a COC tem sido encontrada no ar atmosférico de algumas cidades do mundo, no nível de pg m⁻³ ou menor (Cecinato *et al.*, 2009). Concentrações mais elevadas de COC e BE têm sido encontradas na fase líquida das matrizes ambientais, aonde concentrações entre ng L⁻¹ e µg L⁻¹ vêm sendo observadas. Os níveis elevados observados em águas naturais para COC e BE, ocorrem devido ao baixo grau de bioacumulação ou adsorção no ambiente aquático dessas substâncias, demonstrado pelas constantes K_{ow} e K_{oc} , respectivamente (Tabela 1).

O pH das águas de esgotos domésticos e superficiais influencia diretamente do grau de dissociação das moléculas e, conseqüentemente, na afinidade pela fase líquida ou pela fase sólida (orgânica). Com base nos valores de pKa da COC e da BE (Tabela 1) e no pH das águas naturais, geralmente entre 4 e 9 (Feitosa *et al.*, 2013), tais substâncias encontram-se ionizadas. Conseqüentemente, a afinidade pela fase sólida é reduzida.

Estudos que avaliaram a ocorrência da COC e da BE na fase aquosa e no sedimento de amostras de esgotos sanitários mostraram a adsorção da COC no sedimento de apenas 1,4 a 2,0%. Para a BE, essa porcentagem foi menor do que 0,01%. Devido à maior afinidade da COC e de seus metabólitos pela fase aquosa, os estudos nesta área têm se concentrado em matrizes aquáticas, sendo considerada a adsorção na matéria orgânica negligenciável (Metcalf *et al.*, 2010; Baker e Kasprzyk-Hordern, 2011a e 2011b; Domènech, 2009).

Pesquisas mostraram a presença da COC em amostras de águas coletadas em corpos aquáticos que receberam ou não aporte de esgoto sanitário. Estudos foram conduzidos em cidades localizadas em países Europeus (*e.g.* Espanha, Inglaterra, Bélgica, Holanda, Finlândia, Alemanha, Suíça, dentre outras) e encontraram concentrações de BE na ordem de ng L⁻¹. Os níveis de BE mais elevados foram observados nos corpos aquáticos receptores de esgoto sanitário (Kasprzyk-Hordern *et al.*, 2008a; Kasprzyk-Hordern *et al.*, 2008b; Rosi-Marshall *et al.*, 2015; Berset *et al.*, 2010; Postigo *et al.*, 2010; Huerta-Fontela *et al.*, 2007; Zuccato *et al.*, 2005; Zuccato *et al.*, 2008).

Os processos de tratamento de esgoto sanitário têm apresentado eficiência de remoção de COC e de BE entre 65 e 99%. Mas a remoção de drogas ilícitas pelos processos de tratamento de água não tem sido reportada (Postigo *et al.*, 2010; Huerta-Fontela, *et al.*, 2007; Castiglioni *et al.*, 2006;

Kasprzyk-Hordern *et al.*, 2009b). Ressalta-se que as ETE e as ETA foram projetadas para atender a legislação local vigente, a qual não enquadra substâncias ilícitas e não legisladas. Assim, níveis residuais desses grupos de compostos vêm sendo encontrados também em águas de abastecimento público. Na América Latina, por exemplo, a BE foi determinada entre 0,6 e 15 ng L⁻¹; na Espanha a concentração média encontrada foi de 60,2 ng L⁻¹ (Boleda *et al.*, 2011; Jurado *et al.*; 2012; Huerta-Fontela *et al.*, 2008b).

Estudos voltados para o conhecimento da ecotoxicidade da COC vêm demonstrando efeitos deletérios à vida aquática. Alterações no DNA e no perfil das proteínas, estresse oxidativo e alterações na locomoção de moluscos e micro-organismos de água doce foram alguns desses efeitos observados. Estudos relacionados às consequências da exposição crônica humana a resíduos de drogas ilícitas ainda são inexistentes (Parolini *et al.*, 2013a; Binelli *et al.*, 2013; Parolini *et al.*, 2013b; Nathaniel *et al.*, 2013; Stuart *et al.*, 2012; van der Aa *et al.*, 2013; Rosi-Marshall *et al.*, 2015).

II - 3. ESTIMANDO CONSUMO DE COCAÍNA: INCERTEZAS ASSOCIADAS À EPIDEMIOLOGIA DO ESGOTO

A epidemiologia do esgoto parte da premissa de que o esgoto sanitário corresponde, dentre outros resíduos, a um conjunto de excretas urinárias dos usuários de drogas atendidos pela ETE e, assim, possivelmente refletem o consumo de drogas ilícitas por essa população. Assim, a partir da análise do afluente sanitário coletado em uma ETE, é possível determinar a concentração do metabólito majoritário das drogas ilícitas no afluente sanitário, a qual irá refletir a quantidade da droga consumida pela população atendida pela ETE.

No cálculo utilizado para a estimativa do consumo de drogas ilícitas, (Equação 1) são utilizadas, além da concentração do metabólito, informações sobre a ETE, tais como: vazão média diária do afluente, número de habitantes servidos pela ETE. São utilizados, ainda, dados sobre a excreção urinária das drogas, uma vez que a estimativa parte da concentração de um metabólito da droga, ao invés da droga parental (Zuccato *et al.*, 2005).

$$\text{Equação 1:} \quad \text{COC}_{\text{eq}} = \frac{[\text{BE}]_{\text{afluETE}} \times V_{\text{ETE}} \times \frac{\left(\frac{\text{MM}_{\text{COC}}}{\text{MM}_{\text{BE}}}\right)}{\% \text{BE}_{\text{exct.}}}}{P}$$

Sendo:

COC_{eq} : cocaína equivalente consumida ($\text{mg dia}^{-1} \text{ hab}^{-1}$);

$[\text{BE}]_{\text{afluETE}}$: concentração de BE no afluente sanitário da ETE (mg L^{-1});

V_{ETE} : vazão do aporte do afluente na ETE estudada (L s^{-1});

MM_{COC} : massa molar da COC (g mol^{-1});

MM_{BE} : massa molar da BE (g mol^{-1});

$\% \text{BE}_{\text{exct.}}$: porcentagem da droga absorvida pelo organismo e excretada como BE;

P: número de habitantes servidos pela ETE.

Proposta na década de 90 (Ternes, 1998; Daughton, 2001), a epidemiologia do esgoto como uma ferramenta alternativa aos métodos tradicionais para obtenção de dados sobre o consumo de drogas ilícitas intensificou-se a partir de 2008 (Zucatto *et al.*, 2005.; Zucatto *et al.*, 2011).

Caracterizada como uma abordagem direta, não invasiva, representativa da população estudada, independente da resposta do usuário e capaz de fornecer resultados em um menor intervalo de tempo, a epidemiologia do esgoto apresenta um caráter inovador e vantajoso frente aos métodos tradicionais atualmente utilizados. Contudo, para torná-la uma ferramenta mais confiável, alguns fatores que interferem no cálculo da

estimativa do consumo tiveram e ainda precisam ser elucidados, tais como: estimativa do número de habitantes servidos pela ETE; procedimento de amostragem do afluente sanitário; estabilidade dos metabólitos utilizados como biomarcadores das drogas no afluente sanitário; vazão do afluente da ETE (Castiglioni *et al.*, 2013; van Nuijs *et al.*, 2011a; van Nuijs *et al.*, 2012).

Além dos fatores mencionados acima, uma das principais questões, ainda desprovida de elucidação, é o estabelecimento das proporções entre os metabólitos biomarcadores e os demais subprodutos das drogas encontradas na urina de usuários de drogas. Devido à ampla variação da excreção metabólica entre diferentes indivíduos, a relação metabólica das drogas ilícitas na urina vem sendo frequentemente discutida nos trabalhos sobre a epidemiologia do esgoto e apontada como um dos principais desafios dessa nova abordagem (Mathieu *et al.*, 2011; Castiglioni *et al.*, 2013; Castiglioni *et al.*, 2014)

A BE é o metabólito da COC utilizado como biomarcador para inferir sobre o consumo da droga através da epidemiologia do esgoto (Equação 1). Além de ser o metabólito majoritário da excreção urinária, a BE apresenta maior estabilidade no afluente sanitário quando comparado aos demais metabólitos da cocaína (Castiglioni *et al.*, 2011). A proporção da BE excretada via urina, em relação à quantidade da droga absorvida pelo organismo, pode variar entre 35 e 54%, enquanto que para a droga parental essa proporção varia entre 1 e 9%.

A COC pode ser consumida sob a forma de pasta base ou *crack*, fumada em cachimbos, ou sob a forma de cloridrato de cocaína ou pó, por via intranasal (IN) ou endovenosa (EV). Dependendo da forma de administração escolhida pelo usuário, diferentes metabólitos da COC são gerados no organismo e excretados via urina em diferentes proporções (Figura 2).

Independente da via de uso, os principais metabólitos gerados a partir da ação enzimática no fígado são: a BE, o éster metílico da ecgonina (EME) e a ecgonina (ECG). A BE pode ser formada ainda por hidrólise em pH acima de 4 (EMDDA, 2008).

Quando ingerida em conjunto com álcool, ocorre a transesterificação da COC no fígado, pela ação da enzima carboxiesterase, produzindo o cocaetileno (CE). Essa reação inibe a formação da BE, devido à conversão da COC ao CE. Ainda no fígado e na presença de álcool, o CE é convertido ao éster etílico da ecgonina (EEE).

A queima da pasta base produz o produto éster metílico da anidroecgonina (AEME), que após ser inalado pelo usuário, é hidrolisado à anidro ecgonina (AE) (Cone *et al.*, 2003; EMCDDA. 2008).

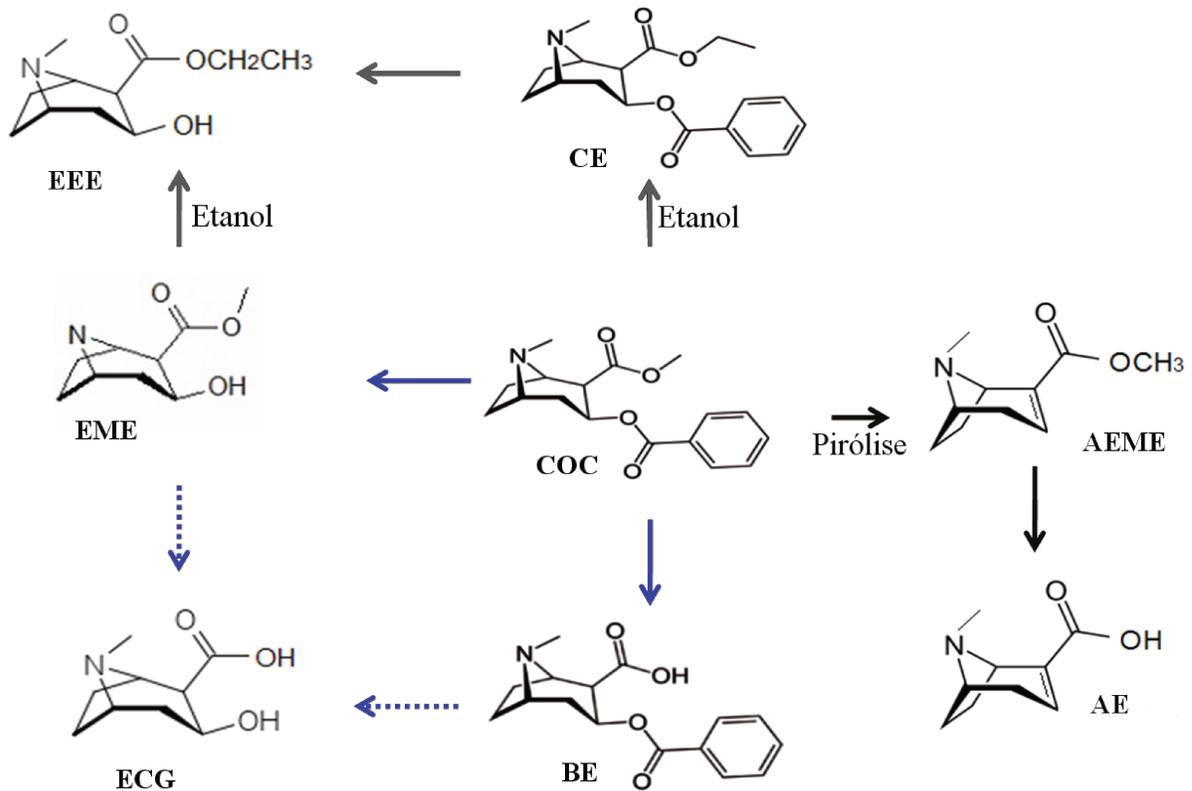


Figura 2. Biotransformação da cocaína sob a forma de cloridrato de cocaína, na presença e ausência de consumo de álcool, e da cocaína sob a forma de pasta base.

Estudos relacionados à excreção da cocaína mostram que a concentração dos metabólitos encontrados na urina de usuários e os picos de concentração (farmacocinética) são determinados por fatores como: forma de administração da droga, histórico de consumo e, principalmente, quantidade de droga consumida. Os picos de concentração da BE na urina variam entre 6 e 8 horas após o uso da droga; e para a COC, os picos de concentração ocorrem entre 2 e 4 horas (EMCDDA, 2008). De acordo com a via de administração, os picos de concentração na urina ocorrem em intervalos cada vez mais curtos, devido à diferente cinética de absorção e de eliminação das substâncias no organismo. A via fumada resulta na eliminação mais rápida da droga pela urina, sendo mais lenta para as vias de administração injetada (EV) e inalada (IN), nessa ordem.

Uma vez que o cálculo da estimativa do consumo de cocaína, utilizando a epidemiologia do esgoto (Equação 1), faz uso de um dado metabólico, as variações na excreção urinária da cocaína entre diferentes usuários e diferentes vias de administração da droga levam a uma incerteza inevitável. Esta incerteza irá refletir no resultado do cálculo, sendo o consumo da droga sub ou sobre estimado. A maioria dos trabalhos voltados à epidemiologia do esgoto endossa uma proporção média entre a BE excretada via urina e a quantidade de droga consumida pelo usuário de 45%. Entretanto, essa informação é questionável, pois foi obtida a partir de estudos realizados em laboratório, com um número pequeno de indivíduos e sob condições específicas (Cone *et al.*, 2003; EMCDDA, 2008; van Nuijs *et al.*, 2011b). Assim, a incerteza sobre a porcentagem de excreção devido ao distinto metabolismo entre usuários de cocaína ainda é desconhecida.

A proporção entre a concentração de BE e de COC na urina de usuários da droga vem também sendo utilizada como um parâmetro para inferir sobre a origem dessas substâncias no aflente sanitário. Isso porque, o descarte direto da cocaína no sistema sanitário tende a aumentar os níveis de COC no aflente, alterando a proporção entre a BE e COC resultante de despejos de cocaína consumida (via urina). Estudos mostram que ao comparar a razão BE/COC, obtida com base nos dados farmacocinéticos, àquela encontrada em amostras de afluentes sanitários, não é observada uma correlação entre os dados: enquanto os dados farmacocinéticos indicam uma razão BE/COC entre 4 e 60 (média 25) na urina de usuário, as razões encontradas no afluentes sanitários variam entre 1,4 e 6 (média 4) (van Nuijs *et al.*, 2009a e b; Kasprzyk-Hordern *et al.*, 2009a e b; Postigo *et al.*, 2008; Castiglioni *et al.*, 2006).

A ausência de correlação entre os dados da excreção urinária da cocaína e os dados obtidos por meio da análise de amostras de afluentes sanitários reforça a necessidade por estudos que venham a contribuir para a elucidação da excreção urinária da cocaína, e que possam aumentar a confiabilidade dos dados gerados pela epidemiologia do esgoto. O interesse dessa nova abordagem para o Brasil é motivado pelas suas diversas aplicações, tais como: auxiliar no mapeamento de locais de produção/distribuição da cocaína; indicar a prevalência do consumo da cocaína *crack* no país, além de gerar dados sobre o consumo da cocaína em tempo real (Feitosa *et al.*, 2013; Maldaner *et al.*, 2012; EMCDDA, 2008). Essas informações obtidas em tempo real contribuiriam, expressivamente, no desenvolvimento de políticas antidrogas mais efetivas no país.

II - 4. DETERMINAÇÃO DE COCAÍNA E SEUS METABÓLITOS

Devido à complexidade das amostras de urina humana e das amostras ambientais e aos baixos níveis de concentração da cocaína e seus metabólitos nas amostras ambientais, geralmente na faixa de ng L^{-1} , a determinação dessas substâncias requer a utilização de técnicas analíticas de alta detectabilidade e seletividade (van Nuijs *et al.*, 2011a). Cada uma das etapas envolvidas na determinação dessas substâncias, desde a amostragem e preservação da amostra até a determinação analítica, precisam ser planejadas e executadas de modo a gerarem resultados representativos e confiáveis.

Para fins da epidemiologia do esgoto, existe um consenso sobre os procedimentos para a determinação de drogas em amostras de afluentes sanitários, tais como processo de amostragem, armazenamento, preparo de

amostra e técnicas analíticas empregadas, os quais serão abordados a seguir (Thomas *et al.*, 2012).

II - 4.1. Coleta e amostragem

A coleta de amostras de urina de usuários de droga deve ser realizada em recipiente plástico descartável apropriado. No recipiente deve conter apenas data, sexo e idade. A identificação da amostra deve ser realizada por código, sendo vedada a identificação dos indivíduos pelos Comitês de Ética.

As amostras de esgoto sanitário apresentam uma variação amostral bastante expressiva ao longo do dia, devido à alteração na frequência e no volume de pulsos de descarga e à ocorrência de chuvas pontuais. Trabalhos disponíveis na literatura têm enfatizado a realização de uma amostragem cumulativa ao longo de 24 horas, na qual são consideradas variações referentes à vazão do aporte de esgoto na ETE (Ort *et al.*, 2010; Lai *et al.*, 2011). A utilização desse tipo de amostragem, principalmente para as amostras de esgotos sanitários afluentes à ETE, está relacionada às aplicações epidemiológicas já que, desta forma, a amostra obtida apresentará maior representatividade para a realização de estimativas de consumo.

Corpos d'água, águas subterrâneas e águas de abastecimento público não apresentam variações tão expressivas ao longo do dia quanto aos esgotos sanitários. Assim, na grande maioria dos trabalhos são realizadas coletas simples (instantâneas) de 0,5 a 2 litros de amostra (Feitosa *et al.*, 2013).

Caso as análises não sejam realizadas logo após a coleta, alguns cuidados com as amostras são indispensáveis antes e depois da coleta, tais como a limpeza e a escolha da vidraria adequada, o armazenamento em refrigerador e procedimentos que visem à conservação da amostra. Logo após a coleta, as amostras são preservadas sob refrigeração, geralmente a 4 °C, e

em frascos de vidro âmbar até a extração ou análise direta. Na necessidade de armazenamento por mais de 24 horas, são recomendadas a acidificação das amostras, a filtração em membranas de diferentes porosidades e estocagem a -20°C (Castiglioni *et al.*, 2006; Gheorghe *et al.*, 2008; Lai *et al.*, 2011; Baker e Kasprzyk-Hordern *et al.*, 2011b).

II - 4.2. Preparo de amostra

A extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*) tem sido o preparo de amostra preferencialmente empregado. Além da limpeza da amostra, a SPE possibilita também a concentração das substâncias de interesse (Baker and Kasprzyk-Hordern, 2011b, van Nuijs *et al.*, 2011a)

A possibilidade de automação da SPE e o uso de pequenos volumes de solventes orgânicos são algumas das conveniências que a tornaram uma alternativa frente à extração líquido-líquido. Além das vantagens citadas, a disponibilidade de fases extratoras diversificadas possibilita extrações seletivas para determinada classe de compostos (Baker e Kasprzyk-Hordern, 2011b, van Nuijs *et al.*, 2011a). Os mecanismos de separação envolvidos podem ser baseados em processos químicos (adsorção, partição, troca iônica).

As etapas da SPE consistem em (Figura3):

I- Condicionamento: percolação de solventes apropriados pela fase extratora do cartucho, preparando-a para reter os analitos;

II- Adição da amostra: percolação da amostra pela fase extratora condicionada, reterdo os analitos com afinidade pela fase extratora presentes na amostra;

III- Lavagem: passagem de um solvente pelo cartucho para retirar interferentes e manter os analitos de interesse na fase extratora.

IV- Eluição: percolação de baixo volume de solvente apropriado pela fase extratora, recuperando os analitos de interesse retidos.

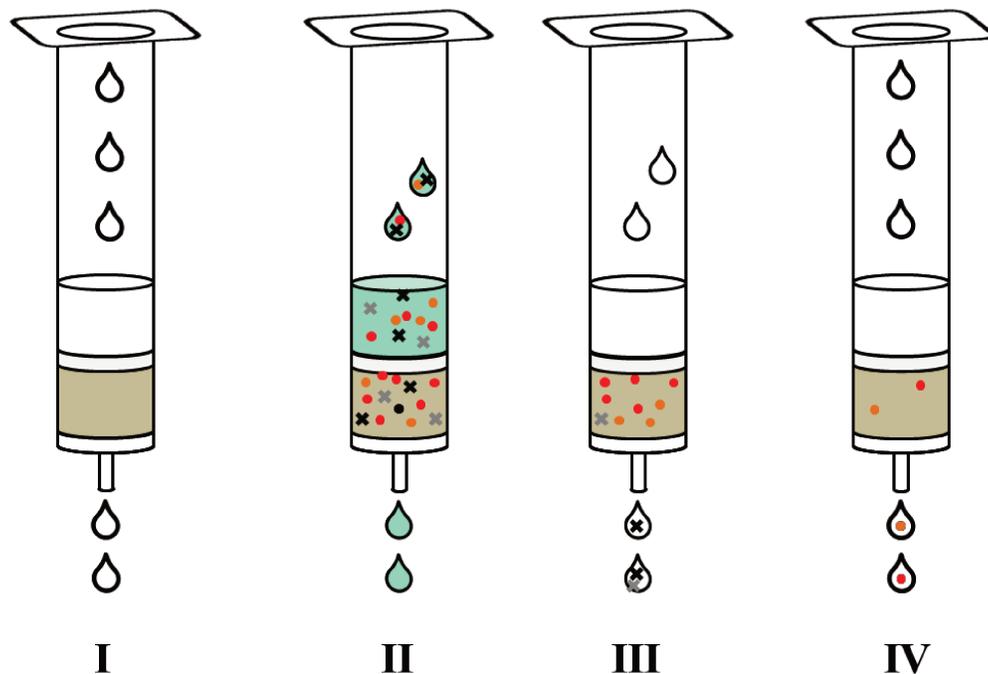


Figura3. Esquema ilustrativo das etapas envolvidas em SPE: (x) interferentes; (•) analitos; porção em azul claro ilustra a amostra; em cinza, a fase extratora e em branco, o solvente.

Na necessidade de um fator de pré-concentração mais alto dos analitos ou no preparo do extrato da amostra em um solvente apropriado para a análise, o volume de solvente utilizado na eluição pode ser evaporado e o extrato seco dissolvido em volume e solvente desejados. O fator de concentração resultante depende do volume inicial da amostra e do volume final do extrato (Caldas *et al.*, 2011; van Nuijs *et al.*, 2011a).

A escolha da fase extratora depende das propriedades físico-químicas das substâncias a serem determinadas e da matriz de interesse. Para a extração de cocaína e seus metabólitos, as fases extratoras usualmente empregadas são a fase mista e a fase de troca catiônica. Os cartuchos de fase mista (Figura 4) são constituídos por um polímero com grupamento orgânico polar (*e.g.* *N*-

vinilpirrolidona), responsável pela retenção dos analitos por interação hidrofílica, e grupamento orgânico apolar (*e.g.* divinilbenzeno), o qual é responsável pela retenção dos analitos por interação lipofílica. As fases de troca catiônica (*e.g.* Oasis MCX[®] e Oasis WCX[®]) são formadas pela adição de funções ácidas ao grupo divinilbenzeno (Vazquez-Roig *et al.* 2010; González-Mariño *et al.*, 2009, Caldas *et al.*, 2011).

A recuperação dos analitos na extração em fase sólida depende da complexidade da matriz e do equilíbrio químico do analito entre a fase polimérica e o solvente. Os compostos interferentes presentes na matriz competem com os analitos pelos sítios ativos da fase extratora, podendo causar baixos valores de recuperação da SPE (Cassiano *et al.*, 2009; Ribani *et al.*, 2004).

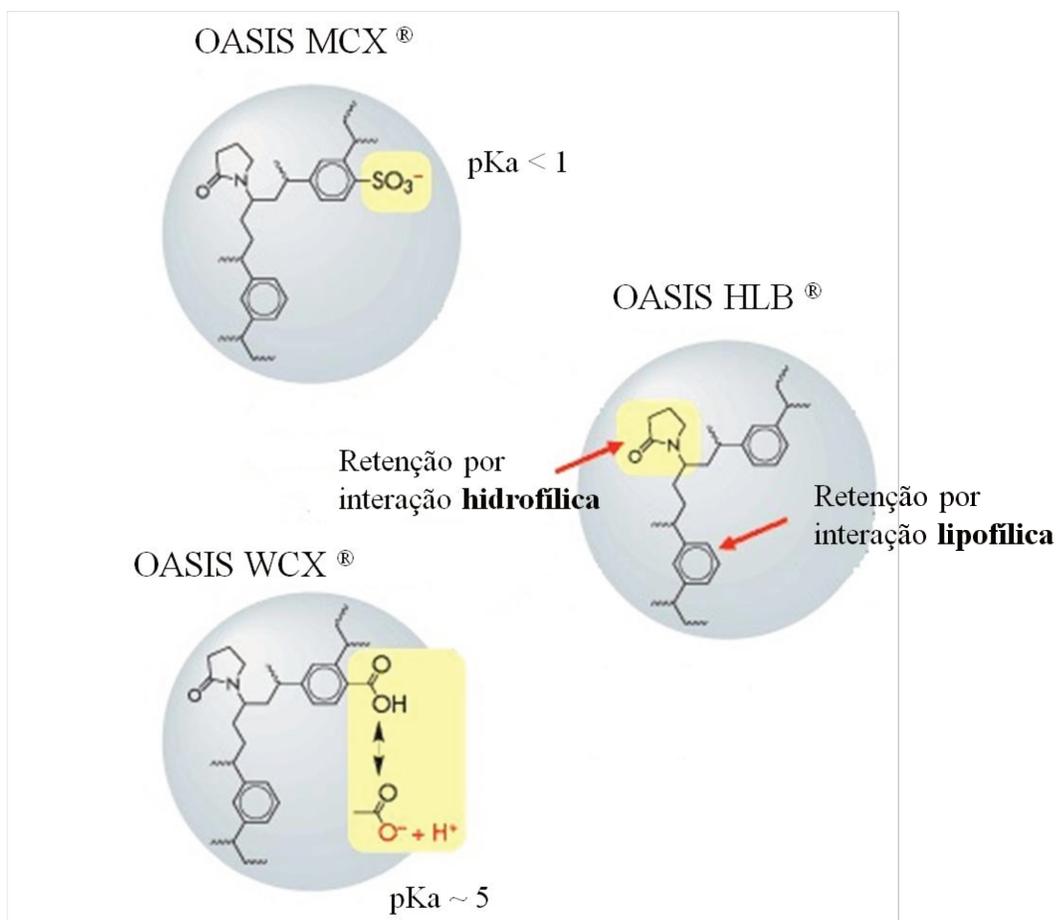


Figura 4. Estruturas químicas dos polímeros utilizados como fase sólida nos cartuchos Oasis HLB, Oasis MCX e Oasis WCX. Adaptado de Waters[®].

II - 4.3. Determinação analítica empregando LC-MS/MS

O estabelecimento da técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS, do inglês *liquid chromatography tandem mass spectrometry*) foi um avanço analítico de extrema importância na área ambiental, pois proporcionou a investigação de compostos no ambiente aquático com elevado grau de detectabilidade, seletividade e confiabilidade analítica. Equipamentos de LC-MS/MS são constituídos por um cromatógrafo a líquido, uma fonte de ionização e por analisadores espectrômetro de massas.

Dentre os analisadores disponíveis, o analisador triplo quadrupolo vem sendo preferencialmente empregado devido à simplicidade, à facilidade de ser operado e ao baixo custo. Entretanto, a escolha do analisador é baseada, entre outros fatores, na resolução e na exatidão de massas. O analisador quadrupolo apresenta baixa resolução (entre 1.000 – 4.000) e exatidão de massa, geralmente, entre 0,1 e 0,2 unidades de massa atômica. Sua aplicação é limitada quando o objetivo da análise é a identificação da espécie eluída do sistema cromatográfico pelo espectrômetro de massas, sendo empregado, principalmente para fins quantitativos. O analisador do tipo *ion trap* (aprisionadores de íons) apresenta resolução similar à do quadrupolo (unitária), sendo que resoluções próximas de 5.000 podem ser alcançadas, empregando-se varreduras lentas e em uma faixa de massas estreita. Frente aos analisadores citados, os analisadores baseados em tempo de voo (TOF, do inglês *time off light*) e em transformada de Fourier (FT, do inglês *Fourier transform*) apresentam alta resolução de razão massa/carga (m/z), podendo alcançar resoluções na ordem de 10^6 , sendo assim, frequentemente empregados para a identificação de íons.

II-4.3.1. Cromatografia líquida

Em cromatografia a líquido, a separação das espécies ocorre em função do equilíbrio de partição entre a fase estacionária e a fase móvel dos analitos na coluna cromatográfica. Para as drogas ilícitas, inclusive a cocaína, a cromatografia em fase reversa é a mais utilizada. As colunas analíticas empregadas geralmente utilizam fase estacionária C_8 (octil) ou C_{18} (octadecil) e tamanho da partícula variável entre 3 e 5 μm . Acetonitrila (ACN) ou metanol (MeOH) são utilizados como solventes orgânicos e água ultrapura enriquecida com um eletrólito (*e.g.* ácido fórmico, hidróxido de amônio) é utilizada como

solvente aquoso; o aditivo eletrolítico tem por finalidade favorecer a ionização dos analitos antes de serem direcionados à fonte de ionização, proporcionando maior eficiência na formação de moléculas protonadas ou desprotonadas. A ionização dos analitos ainda na fase líquida do sistema cromatográfico, tende a proporcionar maior detectabilidade à determinação por LC-MS/MS (Valcárcel *et al.*, 2012; Baker e Kasprzyk-Hordern, 2011b e Zuccato *et al.*, 2011).

Alguns avanços nesta técnica podem ser destacados: o desenvolvimento da cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC, do inglês *Ultra Performance Liquid Chromatography*) e a cromatografia de interação hidrofílica (HILIC, do inglês *Hydrophilic Interaction Chromatography*). A primeira emprega fases estacionárias com partículas de diâmetro inferior a 2 μm , permitindo separações mais rápidas, além de utilizar menor volume de fase móvel e de amostra, sem perder a resolução da separação cromatográfica. Entretanto, exigem equipamentos que suportem pressões mais elevadas do que os equipamentos de cromatografia líquida convencionais. A HILIC emprega fase estacionária mais polar que a cromatografia em fase reversa e fase móvel de baixa polaridade (*i.e.* baixa porcentagem de fase aquosa e alta porcentagem de fase orgânica), sendo mais eficiente na retenção de compostos orgânicos polares frente à cromatografia em fase reversa. Essas modalidades têm sido pouco empregadas para a determinação de drogas ilícitas frente à cromatografia em fase reversa (Maldaner *et al.*, 2010; Bijilma *et al.*, 2009; Baker e Kasprzyk-Hordern, 2011a; Kasprzyk-Hordern *et al.*, 2007; Boleda *et al.*, 2009, Castiglioni *et al.*, 2011)

II-4.3.2. Espectrometria de massas: fonte de ionização

A fonte de ionização é a parte do espectrômetro de massas que produz íons dessolvatados dos analitos. A partir da fonte de ionização, os íons são conduzidos ao analisador, onde serão analisados de acordo com a razão massa/carga (m/z). Dentre as fontes de ionização disponíveis para equipamentos de LC-MS/MS, as mais empregadas são a fonte de ionização por *electrospray* (ESI, do inglês *electro spray ionization*), a ionização química à pressão atmosfera (APCI, do inglês *atmospheric pressure chemical ionization*) e a fotoionização à pressão atmosfera (APPI, do inglês *atmospheric pressure photoionization*).

Dentre as técnicas de ionização citadas, a ESI tem sido predominantemente utilizada para a determinação de drogas ilícitas (Vazquez-Roig *et al.*, 2013; Feitosa *et al.*, 2013). A formação de íons na ESI ocorre por reações em fase líquida de perda ou ganho de prótons à molécula neutra, gerando moléculas protonadas (*i.e.* $[M+H_n]^{n+}$) ou desprotonadas (*i.e.* $[M-H_n]^{n-}$) (Crotti *et al.*, 2006).

A cocaína e os seus metabólitos apresentam grupamentos aminas aceptores de prótons na estrutura molecular, e a ionização por ESI ocorre, predominantemente, por ganho de próton à molécula neutra. Assim, para induzir a formação dos íons ainda em fase líquida, aditivos eletrolíticos doadores de prótons (*i.e.* ácidos orgânicos) são utilizados na fase móvel do sistema cromatográfico.

Durante a ionização dos analitos por ESI, compostos semi-voláteis e não voláteis presentes na amostra competem com o analito nos mecanismos de ionização. Essa interferência é denominada de efeito matriz e será mais pronunciada conforme maior a complexidade da matriz e a dificuldade do analito em ser ionizado e/ou dessolvatado na fonte de ionização. O efeito matriz pode levar a supressão de ionização ou ao incremento de ionização. O

tratamento prévio da amostra tende a minimizar o efeito matriz, e o uso de padrão interno para a quantificação dos analitos é uma alternativa para normalizá-lo, proporcionando maior confiabilidade dos resultados quantitativos (Annesley, 2003; Crotti *et al.*, 2006; Chiaradia *et al.*, 2008; Ribani *et al.*, 2004).

II-4.3.3. Espectrômetro de massas: analisador

Um analisador triplo quadrupolo consiste em um conjunto de três módulos funcionais dispostos em sequência (Figura 5). O primeiro e o terceiro módulo são formados por quadrupolos e o segundo módulo. Ao invés de um quadrupolo, a célula de colisão é geometricamente um hexapolo, preenchida com um gás neutro, tais como nitrogênio, hélio e argônio.

A análise de íons é realizada no modo de aquisição de monitoramento de reações múltiplas (MRM, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*) (Figura 5). O primeiro quadrupolo (Q1) atua como um filtro de massas, selecionando os íons precursores referentes aos analitos de interesse, ionizados na fonte de ionização. Os íons precursores selecionados são direcionados à célula de colisão (Q2), aonde são fragmentados, formando íons fragmentos. Os íons fragmentos são direcionados ao segundo quadrupolo (terceiro módulo – Q3), onde os íons fragmentos mais intensos de cada íon precursor são selecionados. Assim, múltiplas transições “íon precursor → íon fragmento” podem ser monitoradas em uma única análise. A resultante é um sinal analítico de intensidade relativa em função da concentração de cada íon precursor de interesse presente na amostra, formando cromatogramas de íons totais (TIC, do inglês *total ion chromatogram*) e os cromatogramas de MRM são obtidos a partir do TIC (Chiaradia *et al.*, 2008).

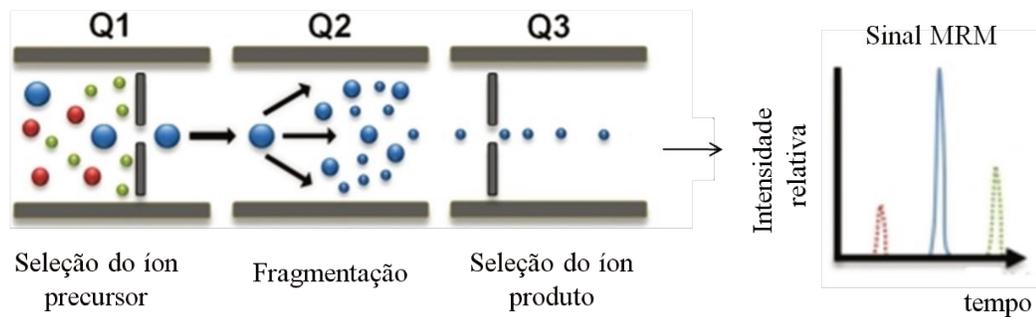


Figura 5. Ilustração da análise de íons MRM em um analisador espectrômetro de massas triplo quadrupolo

O MRM confere elevada seletividade para a análise química, e um ajuste fino dos parâmetros do espectrômetro de massas para cada transição garante a melhor resposta analítica da técnica.

II - 5. OBJETIVOS GERAIS

- Estudar a excreção urinária da cocaína em um conjunto amostral de urina de usuários da droga, com foco na epidemiologia do esgoto;
- Comparar um conjunto amostral de urina de usuários de cocaína com um conjunto amostral de afluente sanitário, em relação aos dados metabólitos da droga;
- Inferir sobre o consumo de cocaína em diferentes regiões do município de Campinas, utilizando a epidemiologia do esgoto;
- Avaliar o cenário da contaminação pela cocaína e benzoilecgonina de águas superficiais e de águas de abastecimento público, do estado de São Paulo.

CAPÍTULO III -

OCORRÊNCIA DE COCAÍNA E SEUS METABÓLITOS EM
AMOSTRAS DE URINA DE USUÁRIOS DA DROGA E DE
AFLUENTE SANITÁRIO: EPIDEMIOLOGIA DE ESGOTO

III - 1. INTRODUÇÃO

A epidemiologia do esgoto tem sido estudada como uma abordagem alternativa aos métodos convencionais (*i.e.* distribuição de questionários domiciliares), utilizados atualmente para a obtenção de dados sobre a quantidade e a prevalência do uso de drogas ilícitas em diferentes locais. Essa nova abordagem vem sendo utilizada em alguns países do mundo, como Espanha (Huerta-Fontela *et al.*, 2008a, França (Karolak *et al.*, 2010), Itália (Castiglioni *et al.*, 2006), Bélgica (van Nuijs *et al.*, 2009a), Estados Unidos (Bisceglia *et al.*, 2010) e mais recentemente Canadá (Yargeau *et al.*, 2014), Portugal (Lopes *et al.*, 2014), China (Khan *et al.*, 2014) e Finlândia (Kankaanpää *et al.*, 2014). Na Europa a epidemiologia do esgoto foi utilizada num estudo comparativo, avaliando o consumo de drogas ilícitas em 19 municípios de diferentes países (Thomas *et al.*, 2012).

Os resultados obtidos com esses trabalhos reforçam a aplicabilidade da epidemiologia do esgoto como uma ferramenta auxiliar no planejamento e desenvolvimento de políticas públicas, voltadas para o enfrentamento de drogas ilícitas. Entretanto, para aumentar a confiabilidade dessa nova abordagem, ainda é necessária a elucidação de alguns desvios que podem estar associados ao cálculo do consumo, tais como flutuações na população servida pelas ETE, no tempo de residência das substâncias no sistema sanitário, dentre outros. Além dessas questões, um dos principais desafios abordado pela comunidade científica é o estabelecimento das proporções dos metabólitos excretados após o uso, adotados no cálculo da epidemiologia do esgoto (Castiglioni *et al.*, 2013; Feitosa *et al.*, 2013).

O estudo da excreção urinária da cocaína pode fornecer informações importantes que venham a suprir esta lacuna da epidemiologia do esgoto,

gerando dados sobre os produtos da biotransformação da cocaína, que podem ser utilizados como biomarcadores para as diferentes opções de consumo da droga (*i.e.* IN, EV, fumada ou em conjunto com bebida alcoólica). Podem ser gerados também, dados sobre as proporções dos subprodutos excretados por via urinária, após o consumo da droga (*e.g.* razão BE/COC). Esses dados são essenciais para se interpretar a influência da forma de administração de COC sobre a proporção dos produtos da biotransformação da droga na urina e no aflente sanitário, e para se avaliar a correlação entre estes dois conjuntos amostrais.

Pesquisas envolvendo usuários de drogas ilícitas são vetadas pelos comitês de ética, dificultando o desenvolvimento de estudos relacionados à excreção urinária. Para fins da epidemiologia do esgoto, uma alternativa é estudar um amplo número de amostras de urina de usuários da droga, sendo que o aflente sanitário consiste, dentre outros resíduos, por um conjunto de urinas oriundas de diferentes usuários e excretadas em diferentes intervalos de tempo, após o consumo da droga (Paul *et al.*, 2005).

Em face ao que se tem conhecimento, não se encontram na literatura trabalhos que reportem estudos similares a estes. Castiglioni *et al.* (2011) compararam a porcentagem de BE em relação aos demais produtos da biotransformação da cocaína obtida por meio de estudos farmacocinéticos, com a mesma porcentagem encontrada em amostras de afluentes sanitários, coletadas em ETE de Milão e Como (Itália) e de Chicago (Estados Unidos). Embora os resultados tenham apresentado porcentagens de BE correlativas, os dados farmacocinéticos utilizados nesse trabalho foram gerados a partir de estudos realizados em laboratório, envolvendo menos de 10 indivíduos e sob condições específicas de administração da droga. Assim, os dados gerados apresentam representatividade limitada.

A aplicação da epidemiologia à realidade brasileira é interessante sob a ótica de que o Brasil corresponde ao segundo maior consumidor de COC no mundo e um dos principais países de transição da droga por meio do mercado ilícito de cocaína. Ademais, pouquíssimos trabalhos que utilizam essa abordagem foram publicados no Brasil, incentivando o desenvolvimento de pesquisas voltadas para esse tema no país (Locatelli, 2011; Silva, 2013).

III - 2. OBJETIVOS

III-2.1.1. Objetivo Geral

Estudar a excreção urinária da cocaína em amostras de urina de usuários da droga para estimar o desvio do cálculo da proporção da BE com relação ao somatório dos demais metabólitos da COC excretados via urina e utilizar a epidemiologia do esgoto para inferir sobre o consumo de cocaína em duas diferentes regiões socioeconômicas de Campinas-SP.

III-2.1.2. Objetivos específicos:

- Avaliar os métodos utilizados para a determinação de cocaína e seus metabólitos em amostras de urina humana e de afluente sanitário.
- Determinar cocaína e seus metabólitos em amostras de urina de usuários da droga e inferir sobre os biomarcadores das diferentes formas de administração da droga;
- Estabelecer a proporção de BE excretada via urina em relação aos demais metabólitos da COC e estimar o desvio associado ao cálculo dessa proporção;
- Estabelecer a razão $[BE] / [COC]$ característica do consumo de cocaína;
- Determinar a concentração de BE em amostras de afluente sanitário de duas ETE de Campinas, visando inferir consumo de cocaína em diferentes regiões socioeconômicas e em diferentes sazonalidades.
- Estimar a incerteza do cálculo do consumo de cocaína por meio da epidemiologia do esgoto, utilizando dados da literatura e o desvio associado ao cálculo da proporção de BE excretada via urina.

III - 3. PARTE EXPERIMENTAL

III - 3.1. Reagentes e padrões analíticos

Os solventes utilizados no preparo das soluções e da fase móvel para a análise cromatográfica foram acetonitrila (ACN) (Mallinckrodt), grau cromatográfico e água ultrapura (MilliQ Plus, Millipore). Ácido fórmico de grau LC-MS (Fluka) foi utilizado como aditivo da fase móvel.

Padrões analíticos de COC, BE, EME, AEME, CE e EEE e os padrões analíticos deuterados COC-d₃, BE-d₃ e EME-d₃ foram adquiridos da Cerilliant® *Analytical Reference Standards*, mediante autorização de importação de produtos controlados pelo Ministério da Saúde e pela agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA) (processo 848916/11-5). Os padrões foram obtidos em solução de metanol (MeOH) ou de ACN nas concentrações 0,1 g L⁻¹ e 1,0g L⁻¹. A AE foi obtida na forma de material certificado sólido, produzido e fornecido pelos professores Dra. Renata Pereira Limberger e Dr. Pedro Eduardo Frohlich, ambos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

III - 3.2. Coleta e amostragem de urina de usuários de cocaína e de afluentes sanitários

III-3.2.1. Amostras de urina de usuários de cocaína

As amostras de urina foram obtidas a partir da colaboração do hospital das clínicas da UNICAMP (HC/UNICAMP). Em um primeiro momento, foi estabelecida uma colaboração com o laboratório de líquidos biológicos da divisão de patologia clínica (LLB) para a obtenção de amostras de urinas de diferentes indivíduos. Entre o segundo semestre de 2011 e o primeiro semestre

de 2012 foram analisadas 123 amostras de urinas, das quais apenas duas apresentaram concentrações de BE acima dos limites de detecção do método analítico. No segundo semestre de 2012 iniciou-se uma nova colaboração com o laboratório de análises toxicológicas do centro de controle de intoxicação (CCI) do HC/UNICAMP. Dessa nova colaboração, 97 amostras de urina de diferentes usuários de cocaína foram analisadas.

A utilização das amostras de urina para fins deste estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (nº doc. 0278.0.146.000-11).

As amostras de urina foram armazenadas em caixas de isopor e mantidas resfriadas durante o transporte do CCI até o laboratório, onde foram armazenadas a -20°C até a análise.

III-3.2.2. Amostras de afluentes sanitário

III-3.2.2.1. Seleção dos locais de coleta

O sistema de esgotamento sanitário do município de Campinas atende 88% da população urbana do município, através de 24 estações de tratamento de esgoto localizadas em três bacias de drenagem: bacia do rio Atibaia, do ribeirão Quilombo e do rio Capivari (Figura 6).

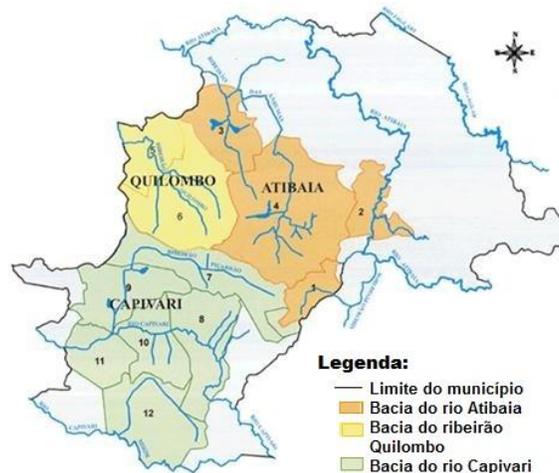


Figura 6. Mapa ilustrativo das bacias de esgotamento e suas subdivisões do município de Campinas-SP (fonte: SANASA, 2015)

Duas das 24 ETE do município de Campinas foram selecionadas para estudo com base no número de habitantes atendidos e nas características socioeconômica de cada região: a ETE Capivari e a ETE Anhumas. A Figura 7 mostra a localização no mapa de Campinas das sub-regiões atendidas pela ETE Capivari e pela ETE Anhumas.

ETE Capivari: A ETE Capivari está localizada na região sudoeste do município de Campinas, às margens do rio Capivari, fazendo parte da bacia de esgotamento do rio Capivari (Figura 7). A região atendida é uma das regiões de menor poder aquisitivo do município, onde menos de 1% dos domicílios particulares permanentes recebem mais de 5 salários mínimo (IBGE, 2010a). Contempla uma região residencial e um pequeno centro comercial, num total de 60 mil habitantes. Até o momento deste estudo, essa ETE tratava em média 80 L s^{-1} de esgoto sanitário, sendo projetada para tratar em média 86 L s^{-1} (SANASA, 2015).

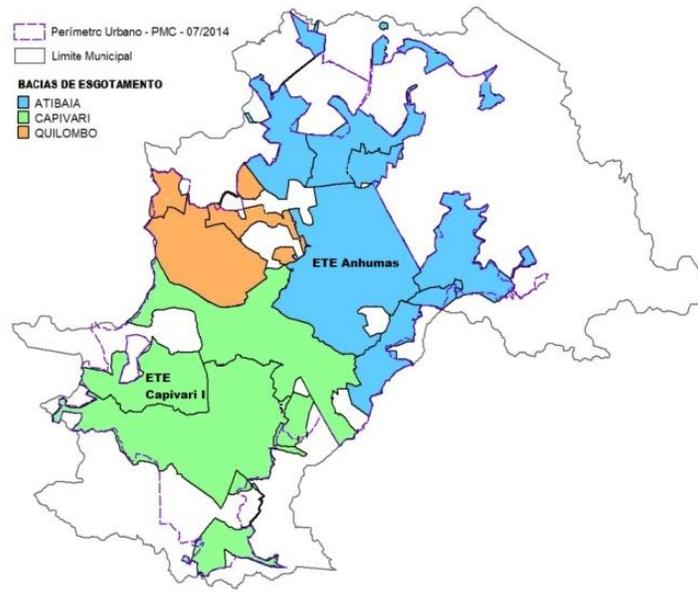


Figura 7. Mapa do município de Campinas com as regiões contempladas pelas bacias de esgotamento do município em destaque e a localização da sub-região atendida pela ETE Capivari e pela ETE Anhumas (Fonte: SANASA, 2015)

ETE Anhumas: Considerada a maior estação de tratamento de Campinas, além de uma das maiores ETE do interior do estado de São Paulo, foi projetada para tratar em média 1200 L s^{-1} de esgoto sanitário. Atende a maior região do município de Campinas, aproximadamente 250 mil habitantes, onde se localizam bairros universitários, centros comerciais e bairros residenciais. Representa uma região de médio-alto poder aquisitivo do município, onde 17% dos domicílios particulares permanentes recebem mais de 5 salários mínimo (IBGE, 2010a). Está localizada à beira do ribeirão Anhumas, fazendo parte da bacia de esgotamento do mesmo ribeirão (Figura 7). Até o momento deste estudo, a ETE Anhumas tratava em média 650 L s^{-1} de efluente sanitário (SANASA, 2015).

III-3.2.2.2. Coleta das amostras de afluentes sanitários

Os frascos âmbar (1 L) utilizados para a coleta das amostras nas ETE foram previamente lavados com detergente de uso profissional, enxaguados com água destilada, água deionizada e, posteriormente, com etanol e com acetona. Após a lavagem, os frascos foram submetidos a um tratamento térmico a 400°C por 4 horas.

As amostras de esgotos sanitários das regiões atendidas pelas ETE Capivari e ETE Anhumas foram coletadas na entrada da ETE após o tratamento preliminar (*i.e.* gradeamento e retenção de areia). Realizou-se uma amostragem cumulativa de 24 horas do afluente sanitário de cada ETE, conforme procedimento detalhado a seguir:

Amostragem cumulativa de 24 horas na ETE Capivari (Figura 8A): Cada amostra cumulativa de 24 horas foi obtida por meio da coleta de uma alíquota de 200 mL do afluente sanitário dessa ETE em intervalos de 2 horas. A coleta iniciou-se às 8:00 h e finalizou-se às 8:00 h do dia seguinte. Cada alíquota de 200 mL foi transferida para um frasco plástico com capacidade para 5 litros e em seguida armazenada em refrigerador a 4°C. Ao final da amostragem, a amostra cumulativa foi homogeneizada e 1 litro desta amostra foi transferido para um frasco âmbar (1 L) e transportada sob refrigeração até o laboratório.

Amostragem composta de 24 horas na ETE Anhumas (Figura 8B): A alíquota do afluente sanitário foi coletada em intervalos de 2 horas, sendo que o volume da alíquota coletado foi estabelecido de acordo com a vazão instantânea do aporte do afluente sanitário na ETE. A Tabela 2 mostra os volumes das amostras e horários estabelecidos para a coleta. A amostra

composta foi homogeneizada, transferida para um frasco âmbar (1 L) e transportada sob refrigeração até o LQA.

Tabela 2. Volumes da alíquota de afluentes sanitários coletados para compor a amostra cumulativa de 24 horas na ETE Anhumas

Hora	Volume de amostra (mL)	Hora	Volume de amostra (mL)	Hora	Volume de amostra (mL)
00:00	380	08:00	360	16:00	540
02:00	340	10:00	540	18:00	460
04:00	200	12:00	560	20:00	460
06:00	200	14:00	560	22:00	560
				24:00	380
Volume total (mL)					5920



Figura 8. Estações de tratamento de esgoto selecionadas para o estudo: A) ETE Capivari. B) ETE Anhumas

(Fonte A: PAC, 2009; Fonte B: <http://www.panoramio.com/photo/972413>)

III-3.2.2.3. Descrição das campanhas de coleta

Três campanhas de amostragem cumulativa de 24 horas foram realizadas (Tabela 3).

Tabela 3.Data, número de amostras e sazonalidades das campanhas de coleta de amostras de afluentes sanitário nas ETE estudadas.

	Campanha 1	Campanha 2	Campanha 3
Data	10/07/2013	15 a 21/07/2013	3/03/2014
Número de amostras	1	7	1
Local	ETE Capivari ETE Anhumas	ETE Capivari ETE Anhumas	ETE Anhumas
Sazonalidade de chuvas*	Seco	Seco	Chuvoso
Sazonalidade de período	Semanal	Dia da semana	Evento festivo (Carnaval)

*Fonte: CEPAGRI/UNICAMP

III - 3.3. Preparo de amostra

Para as etapas da SPE foi utilizado um dispositivo para controle de extração em fase sólida *manifold*(marca PrepSepTM). Protocolos de extração similares foram aplicados para ambas amostras, os quais se basearam no método desenvolvido por Feitosa *et al.* (2013).

III-3.3.1. Protocolo da extração em fase sólida para as amostras de urina de usuários

Cartuchos de extração Oasis HLB (Waters ®) constituídos de 60 mg de fase extratora foram empregados para a SPE. A etapa de condicionamento do cartucho foi realizada pela percolação de 2 mL de metanol, 3 mL de ACN e 4 mL de água ultrapura. Para a extração das amostras de urina utilizou-se um volume de 250 µL de amostra, previamente diluídos em 7,5 mL água ultrapura (fator de diluição de 30 vezes). O excesso de água adsorvido à fase extratora pela percolação da amostra diluída foi removido sob baixa pressão (10

mmHg) por 5 minutos, e a eluição dos analitos foi realizada com 6 mL de solução MeOH:ACN 40:60 ($v v^{-1}$). O eluato obtido foi seco sob fluxo de N_2 , resultando no extrato seco da amostra. Antes da análise por LC-MS/MS, o extrato seco foi dissolvido em 1 mL de solução de ácido fórmico 0,1%/ACN, 90:10 ($v v^{-1}$), resultando na diluição dos analitos em relação à amostra em um fator de 4 vezes.

III-3.3.2. Protocolo da extração em fase sólida para as amostras de afluentes sanitários

A ilustração do processo de SPE para as amostras de afluentes sanitários encontra-se na Figura 9. A etapa de condicionamento do cartucho (Oasis HLB, 500 mg) foi realizada com a percolação de 3 mL de MeOH, seguidos de 4 mL de ACN e 5 mL de água ultrapura pela fase extratora. As amostras de afluentes sanitários das ETE foram filtradas em membrana de fibra de vidro (diâmetro do poro de 1,7 μm —Schleicher & Schuell) e de acetato de celulose (diâmetro do poro de 0,45 μm - Sartorius) para a retirada do material particulado, previamente a etapa de extração. Um volume de 70 mL da amostra filtrada foi passado pelo cartucho de SPE, com o auxílio de seringas plásticas com capacidade para 60 mL. A limpeza da amostra foi realizada com 3 mL de água ultrapura e o excesso de água restante foi removido sob baixa pressão (10 mmHg) por 10 minutos. A eluição dos analitos foi realizada com 6 mL de solução MeOH:ACN 40:60 ($v v^{-1}$) e o extrato da amostra foi preparado pela dissolução do extrato seco em 1 mL de solução de ácido fórmico 0,1%/ACN, 90:10 ($v v^{-1}$), antes da análise.

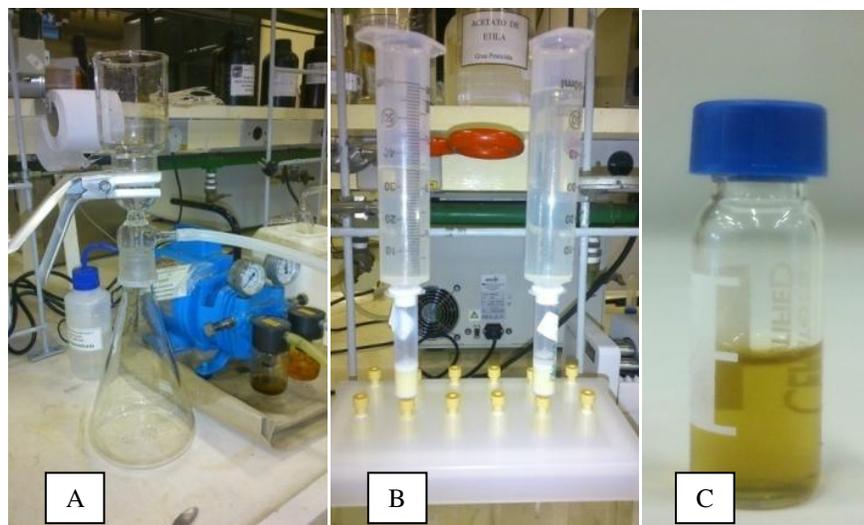


Figura 9. A) Sistema utilizado para a filtração das amostras de afluente sanitário das ETE. B) Sistema utilizado para a SPE. C) Extrato das amostras analisado por LC-MS/MS

III - 3.4. Método analítico: LC-MS/MS

Empregou-se um cromatógrafo a líquido (modelo 1200, *Agilent technology*®), constituído de bomba binária, acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo sequencial (modelo 6410B, *Agilent technology*®) e ionização por ESI.

Para a cromatografia líquida em fase reversa, utilizou-se coluna analítica C18 de 2,1x30 mm e 3,5 μm de tamanho de partícula (*Zorbax SB-Agilent Technology*, Brasil). A fase móvel foi composta por solução de ácido fórmico 0,1% (v v^{-1}) e ACN, previamente filtrados em membranas de 0,22 μm de poro. A Tabela 4 apresenta o programa de gradiente utilizado para a separação cromatográfica.

Tabela 4. Programa de gradiente empregado na separação cromatográfica para a COC e seus metabólitos

Tempo(min)	ACN(%)	Vazão(mL min ⁻¹)
0-0,5	10	0,3
0,5-5	10-80	0,3
5-7	80	0,3
7-11	80-10	0,3
11-16	10	0,3

Os analitos foram ionizados no modo positivo. As condições da fonte de ionização foram cuidadosamente ajustadas: o gás N₂ no nebulizador foi mantido a 325 °C, a 10L min⁻¹ e a30 psi; o potencial do cone aplicado foi de 120 V e o potencial do capilar de seleção de íons +2500 V.

Para a identificação dos analitos nas amostras, foram monitoradas duas ou três transições “íon precursor → íon fragmento” para todos os compostos, além do tempo de retenção da separação cromatográfica. Os íons fragmentos que apresentaram a maior intensidade de sinal foram utilizados para a quantificação dos compostos, e os demais foram utilizados para confirmar a identificação dos compostos nas amostras. Na Tabela 5 estão expostos os íons precursores, os íons fragmentos, a função analítica e a energia de colisão necessária para a formação do íon fragmento.

Tabela 5. Íons precursores e íons fragmentos utilizados para a quantificação (Q) e confirmação (C) da COC, de seus metabólitos e dos compostos deuterados.

Composto	Íon Precursor (m/z)	Íon Fragmento (m/z)	Função Analítica	Energia de colisão (eV)
COC	304,1 ⁺	182,1 ⁺	Q	15
		105,0 ⁺	C	30
		82,1 ⁺	C	30
COC-d3	307,2 ⁺	185,2 ⁺	Q	15
		85,2 ⁺	C	30
BE	290,1 ⁺	168,0 ⁺	Q	15
		105,1 ⁺	C	30
		82,2 ⁺	C	30
BE-d3	293,1 ⁺	171,2 ⁺	Q	15
		105,2 ⁺	C	20
EME	200,1 ⁺	182,1 ⁺	Q	15
		82,0 ⁺	C	30
EME-d3	203,1 ⁺	185,0 ⁺	Q	15
		85,0 ⁺	C	25
EEE	214,1 ⁺	196,1 ⁺	Q	15
		82,1 ⁺	C	25
AEME	182,1 ⁺	150,0 ⁺	Q	15
		118,0 ⁺	C	20
AE	168,1 ⁺	91 ⁺	Q	15
		71 ⁺	C	15
CE	318,1 ⁺	196,1 ⁺	Q	15
		82,2 ⁺	C	25

III-3.4.1. Avaliação do método analítico para a determinação de cocaína e seus metabólitos

O método analítico utilizado para a determinação da cocaína e seus metabólitos em amostras de urina de usuários da droga e em amostras de afluente sanitário foi avaliado com base nos parâmetros de desempenho analítico, tais quais: recuperação do processo de SPE, efeito matriz, exatidão, precisão, linearidade e faixa de trabalho.

Para a avaliação desses parâmetros em amostras de urina humana, foram realizados ensaios de desempenho analítico do método, nos quais o padrão dos analitos foi adicionado em uma amostra de urina isenta dos analitos. Em amostras de afluente sanitário, estes ensaios foram realizados por meio da adição do padrão deuterado da COC (COC-d3), da BE (BE-d3) e da EME (EME-d3) a uma amostra de afluente sanitário, em decorrência da ausência de amostra isenta dos analitos e de amostra certificada (Ribani *et al.*, 2004; Cassiano *et al.*, 2009; SWGTOX, 2013). Os parâmetros foram avaliados em dois níveis de concentração para a amostra de urina (*i.e.* nível baixo, CC1, e nível alto, CC2) e em três níveis de concentração para a amostra de afluente sanitário (*i.e.* nível baixo, CC1, intermediário, CC2, e alto, CC3) (Tabela 6).

A seguir estão descritos o procedimento geral utilizado nos ensaios de desempenho analítico para a avaliação dos parâmetros mencionados a cima.

Tabela 6. Concentrações no nível baixo (CC1) e no nível alto (CC2) dos padrões analíticos dos analitos adicionados à amostra de urina isenta dos analitos, e concentrações no nível baixo (CC1), intermediário (CC2) e alto (CC3) dos padrões dos analitos deuterados adicionados à amostra de afluente sanitário, utilizadas nos ensaios de desempenho analítico do método.

Nível de Concentração	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)									
	Urina isenta das substâncias							Afluente sanitário		
	COC	BE	EME	AEME	AE	CE	EEE	COC-d3	BE-d3	EME-d3
CC1	200	500	500	50	50	200	200	35	70	10
CC2	2000	5000	5000	250	250	2000	2000	105	350	70
CC3	-	-	-	-	-	-	-	210	700	100

III-3.4.2. Recuperação do processo de extração em fase sólida

Para a avaliação da recuperação do processo de SPE (R), alíquotas de uma amostra de urina, isenta dos analitos, e de uma amostra de afluente sanitário foram fortificadas com os padrões analíticos dos analitos descritos acima, antes da SPE (Tabela 6). E alíquotas das mesmas amostras foram fortificadas nos mesmos níveis de concentração, após a SPE. Após a SPE, as amostras fortificadas antes e após a SPE foram analisadas por LC-MS/MS. As áreas dos picos cromatográficos obtidas na determinação de cada analito nas amostras fortificadas antes da SPE foram comparadas com as áreas obtidas nas amostras fortificadas após a SPE (Equação 2).

$$\text{Equação 2: } R(\%) = \frac{\text{área do analito na amostra antes da SPE}}{\text{área do analito na amostra após a SPE}} \times 100$$

III-3.4.3. Efeito matriz

Para avaliar o efeito matriz (EM), alíquotas de uma amostra de urina, isenta dos analitos, e de uma amostra de afluente sanitário foram fortificadas após a etapa de SPE (Tabela 6). Uma solução idêntica à fase móvel do sistema cromatográfico, nas condições iniciais do gradiente de eluição, foi fortificada

com os analitos, nas mesmas concentrações. Tanto as amostras fortificadas após a SPE e a solução de solventes (fase móvel) fortificadas foram analisadas por LC-MSMS. As áreas dos picos cromatográficos obtidas na determinação de cada analito nas amostras fortificadas após a SPE foram comparadas com as áreas obtidas na solução de solventes (Equação 3).

Equação 3:

$$EM(\%) = \frac{(\text{área do analito na amostra após a SPE} - \text{área do analito no solvente})}{\text{área do analito no solvente}} \times 100$$

III-3.4.4. Precisão do método analítico

Alíquotas de uma amostra de urina, isenta dos analitos, e de uma amostra de afluentes sanitário foram fortificadas com os analitos nos níveis de concentração apresentados na Tabela 6. As alíquotas fortificadas foram submetidas à SPE e os analitos determinados por LC-MS/MS. A precisão foi avaliada em termos do coeficiente de variação (CV) (Equação 4) da determinação dos analitos em preparações repetidas das amostras fortificadas no mesmo nível de concentração.

A repetitividade do método analítico (precisão intra-dia) foi avaliada através da determinação dos analitos em preparações das amostras fortificadas repetidas em um mesmo dia. Para avaliar a precisão intermediária (precisão inter-dia), foram realizadas a determinação dos analitos em preparações das amostras fortificadas repetidas em três dias alternados.

Equação 4: $CV(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$ onde $s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$

Sendo:

CV(%): coeficiente de variação da determinação;

s: estimativa do desvio padrão da determinação;
 \bar{x} : determinação média nas amostras fortificadas;
 x_i : determinação em cada amostra fortificada ($i = 1, 2, 3 \dots n$);
n: número de repetições da preparação das amostras fortificadas com os analitos.

III-3.4.5. Exatidão do método analítico

A exatidão do método foi avaliada em termos da eficiência do método analítico (EMA) por meio de ensaios de recuperação (Ribani *et al.*, 2004). Esse ensaio consistiu da fortificação de alíquotas de amostras de urina, isenta dos analitos, e de afluente sanitário antes da SPE (Tabela 6). Uma solução idêntica à fase móvel do sistema cromatográfico, nas condições iniciais do gradiente de eluição, foi fortificada com os analitos nas mesmas concentrações. Tanto as amostras fortificadas antes da SPE e a solução de solventes (fase móvel) fortificadas foram analisadas por LC-MSMS. As áreas dos picos cromatográficos obtidas na determinação de cada analito nas amostras fortificadas após a SPE foram comparadas com as áreas obtidas na solução de solventes (Equação 5).

$$\text{Equação 5: EMA(\%)} = \frac{\text{área do analito na amostra antes da SPE}}{\text{área do analito no solvente}} \times 100$$

III-3.4.6. Curva analítica e faixa de trabalho

Prepararam-se soluções padrão de concentrações conhecidas da cocaína e de seus metabólitos, às quais se adicionou $50 \mu\text{g L}^{-1}$ do padrão analítico EME-d3 e $100 \mu\text{g L}^{-1}$ BE-d3 como padrão interno. O padrão EME-d3 foi utilizado como padrão interno dos compostos AEME, AE, EME e EEE e o padrão BE-d3 dos compostos COC, BE e CE. Após a análise dessas soluções

por LC-MS/MS, foi construído um gráfico, relacionando a razão de áreas (área do pico do analito/área do pico do padrão interno que tem concentração constante) com a concentração (variada) do analito (Ribani *et al.*, 2004). A partir desse gráfico e da aplicação da regressão linear, foi obtida a curva analítica, da qual foi extraído o coeficiente linear (A), o coeficiente angular (B), o coeficiente de correlação (r), além do desvio padrão do coeficiente linear e do coeficiente angular. A partir desses parâmetros foram calculados o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) para cada composto (Miller & Miller, 2005) (Equação 6 e Equação 7):

$$\text{Equação 6} \quad LD = \frac{3 \times S_A}{B}$$

$$\text{Equação 6:} \quad LQ = \frac{10 \times S_A}{B}$$

Sendo:

LD: limite de detecção;

LQ: limite de quantificação;

S_A : desvio padrão do coeficiente linear da curva analítica;

B: coeficiente angular

A partir do LQ foi estabelecida a faixa de trabalho para a determinação de cada substância nas amostras de interesse.

III - 3.5. Avaliação da estabilidade dos analitos nas amostras de urina

A estabilidade da cocaína e dos seus produtos da biotransformação na urina foi avaliada, uma vez que a análise das amostras foi realizada até uma semana após a sua coleta. Embora as amostras fossem mantidas a

aproximadamente -20°C, procedimentos para evitar possível degradação dos analitos não foram realizados.

III-3.5.1. Estabilidade de armazenamento

Para verificar a estabilidade dos analitos quando mantidos a -20°C por até uma semana, alíquotas de uma mesma amostra de urina isenta dos analitos, aqui denominadas como “sub-amostras”, foram separadas. A essas sub-amostras foram adicionados os padrões analíticos dos analitos, nos níveis de concentrações descritos na Tabela 7. Posteriormente, as sub-amostras foram submetidas aos protocolos descritos a seguir:

1. 2 sub-amostras de 250µL cada foram submetidas à SPE e analisadas;
2. 2 sub-amostras, de 2 mL cada, foram armazenadas a -20 °C por 1 dia;
3. 2 sub-amostras, de 2 mL cada, foram armazenadas a -20 °C por 3 dias.

Após o tempo de armazenamento indicado, as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente. Alíquotas de 250µL foram retiradas, submetidas ao protocolo de SPE e analisadas por LC-MS/MS. As concentrações dos analitos determinadas nas sub-amostras foram comparadas com as concentrações determinadas em uma solução, recém preparada, dos padrões analíticos, na mesma amostra de urina e nas mesmas concentrações (Tabela 7).

Tabela 7. Concentrações de cocaína e de seus metabólitos utilizadas nos ensaios de estabilidade da cocaína e de seus metabólitos na urina humana.

Analito	COC	BE	EME	AE	AEME	CE	EEE
Concentração (µg L⁻¹)	200	500	500	200	200	200	200

III-3.5.2. Estabilidade de ciclos de congelamento e descongelamento

A amostra de urina isenta dos analitos foi fortificada com os padrões analíticos nas concentrações descritas na Tabela 7. A amostra fortificada foi levada ao congelador e, após 24 h, a mesma amostra foi descongelada a temperatura ambiente. Após o total descongelamento da amostra, a mesma amostra foi congelada e descongelada seguindo o mesmo protocolo (24 h em *freezer*; descongelada a temperatura ambiente). Este procedimento corresponde a um ciclo de congelamento/descongelamento.

Completado o ciclo, uma alíquota de 250 µL da amostra descongelada foi submetida ao protocolo de SPE e, posteriormente, analisada por LC-MS/MS. As concentrações dos analitos determinados na amostra após o ciclo de congelamento/descongelamento foram comparadas com as concentrações determinadas em uma solução, recém preparada, dos padrões analíticos, na mesma amostra de urina e nas mesmas concentrações (Tabela 7).

III - 3.6. Avaliação da estabilidade da cocaína e da benzoilecgonina no afluente sanitário

Um litro de amostra de afluente sanitário foi transferido para um béquer com capacidade para 2 litros. A amostra foi mantida na ausência de luz, sob agitação branda e à temperatura ambiente, na tentativa de mimetizar as condições do sistema sanitário. Uma amostra de urina, contendo concentrações previamente determinadas de COC e BE, foi adicionada ao afluente sanitário, resultando num fator de diluição da amostra de urina de 500 vezes. Alíquotas de 70 mL foram retiradas do béquer antes da adição da

amostra de urina e após 0, $\frac{1}{2}$, 1, 2, 3, 4 e 5 horas da adição da urina, completando 5 horas de experimento. Cada alíquota retirada do sistema foi submetida ao protocolo de SPE e analisada por LC-MS/MS. Este ensaio foi realizado em duplicata, simultaneamente.

III - 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

III - 4.1. Método analítico baseado em LC-MS/MS para determinação de cocaína e metabólitos em amostras de urina e afluentes sanitários

A seguir serão abordados os resultados sobre a avaliação dos métodos empregados para a análise das amostras de interesse.

III-4.1.1. Recuperação do processo de extração em fase sólida

A recuperação do processo de SPE é um dos fatores que afetam a exatidão do método analítico, pois se houver perda dos analitos durante a SPE, o valor quantificado não será condizente com o valor real presente na amostra antes do procedimento de extração. Os resultados obtidos para os ensaios da recuperação estão mostrados na Tabela 8.

Tabela 8. Resultados obtidos para a recuperação do processo de SPE para cocaína e seus metabólitos nas amostras de urina e nas amostras de afluentes sanitários das ETE, nos níveis de concentração estudados.

Nível de Concentração	Recuperação do processo de SPE (%)									
	Urina humana							Afluente sanitário		
	COC	BE	EME	AEME	AE	CE	EEE	COC-d3	BE-d3	EME-d3
CC1	94	92	75	120	4	106	61	86	94	67
CC2	96	101	85	94	4	94	85	87	96	80
CC3	-	-	-	-	-	-	-	92	97	74

Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, podendo ser de até 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$ (GARP, 1999 *apud* Ribani *et al.*, 2004).

Observa-se pela Tabela 8 que a AE apresentou valores de recuperação menores do que 5%, muito abaixo dos valores recomendados pelo GARP, não sendo viável a sua determinação analítica. A recuperação mínima para o AE está relacionada à sua alta polaridade e solubilidade em meio aquoso, sendo o metabólito da cocaína mais polar (Figura 2). Em meio aquoso a interação hidrofílica entre este analito e a fase extratora não foi suficiente para a retenção da AE e, praticamente, todo o analito foi eluído pelo solvente da amostra. Neste caso, cartuchos com fase extratora de troca catiônica podem apresentar maiores valores de recuperação da SPE, porém, não foram testados para fins deste estudo.

Para os demais analitos, a recuperação da SPE nas amostras de urina e nas amostras de afluentes sanitários foi adequada, pois variaram entre 61 e 101%, com CV menor do que 15%. Estes valores encontram-se dentro dos limites aceitáveis.

III-4.1.2. Avaliação do efeito matriz

A literatura recomenda a investigação do efeito matriz, em virtude da influência sobre o desempenho do método analítico (CDER, 2001; SWGTOX, 2013). Os resultados para a avaliação do efeito matriz estão mostrados na Tabela 9. Um valor negativo significa um efeito de supressão de ionização, enquanto um valor positivo indica um efeito de incremento de ionização. Quanto mais próximo de zero (0) menor o efeito matriz.

Tabela 9. Efeito matriz para a cocaína e metabólitos nas amostras de urina e nas amostras de afluentes sanitários, em diferentes níveis de concentração.

Concentração controle	Efeito matriz, %									
	Amostras de urina							Amostras de AS		
	COC	BE	EME	AEME	AE	CE	EEE	COC-d3	BE-d3	EME-d3
CC1	-10	-20	-70	-20	-80	-30	-80	-28	-25	-61
CC2	-10	-1	-50	-10	-80	-20	-50	-20	-25	-58
CC3								-24	-19	-54

Nos níveis de concentração estudados, foi observado um efeito matriz de supressão de ionização para todos os analitos. Para os compostos menos polares, COC, BE, CE, e para a AEME a supressão de ionização foi menor de 30%. Para estes analitos, o uso de padrão interno pode garantir a confiabilidade da determinação dos analitos, caso a imprecisão do método seja inferior a 15% (Cassiano *et al.*, 2009). Para os compostos mais polares, tais quais a AE, EME e EEE, a supressão de ionização foi superior a 50%, podendo comprometer a detectabilidade do método.

III-4.1.2.1. Precisão e exatidão do método analítico

Na Tabela 10 e Tabela 11 estão apresentados os resultados obtidos para a precisão e exatidão do método analítico, na determinação dos analitos em amostras de urina humana e de afluentes sanitários.

Em análises de amostras complexas e em determinações nos níveis abaixo de 10 mg L⁻¹, o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) recomenda que o coeficiente de variação não exceda 30%, porém os guias de validação analítica para métodos bioanalíticos e para análises toxicológicas forense recomendam imprecisões menores de 20% e exatidão a cima de 80% (MAPA, 2011; CDER, 2001; SWGTOX, 2013).

Tabela 10. Precisão e exatidão do método analítico na determinação da cocaína e seus produtos de biotransformação em amostras de urina, em dois níveis de concentração.

Analito	Nível de precisão				Exatidão	
	Repetitividade (CV, %)		Intermediária (CV, %)		(%)	
	CC1*	CC2**	CC1*	CC2*	CC1*	CC2*
COC	15	13	10	5	85	83
BE	9	4	8	6	83	94
EME	14	10	16	16	5	15
AEME	12	3	9	11	102	82
AE	12	9	9	8	1	5
CE	16	12	12	7	72	78
EEE	9	6	15	12	30	23

*n=3; **n=6

Tabela 11. Precisão e exatidão do método analítico na determinação da cocaína e seus produtos de biotransformação em amostras de afluentes sanitários, em três níveis de concentração.

Analito	Nível de precisão				Exatidão		
	Repetitividade (CV, %)			Intermediária	(%)		
	CC1*	CC2**	CC3*	(CV, %)	CC1*	CC2*	CC3*
COC-d3	5	2	1	11	79	79	70
BE-d3	4	2	1	3	71	72	78
EME-d3	17	11	13	20	26	34	34

*n=3; **n=6

Observa-se na Tabela 10 e na Tabela 11, que em termos de precisão o método analítico respondeu adequadamente, pois os valores obtidos encontraram-se dentro os limites aceitáveis. Em termos de exatidão, para os compostos COC, BE, CE e AEME o método analítico apresentou valores entre 70 e 102%, com CV inferior a 15%, considerando as duas matrizes estudadas, ou seja, dentro dos limites recomendados. Para o EME, a AE e o

EEE a exatidão do método encontrou-se fora dos limites recomendados, principalmente para a AE (exatidão menor de 5%).

Especificamente para a AE, o método analítico deve ser empregado apenas para fins qualitativos. Para os demais, o uso de padrões interno na determinação poderá ser utilizado para garantir a confiabilidade aos resultados, normalizando o efeito matriz. O comprometimento da exatidão do método analítico para esses metabólitos mais polares da COC foi resultante dos baixos valores de recuperação da SPE e, principalmente, pelo efeito matriz, como mostrado anteriormente. Para a obtenção de resultados quantitativos com maior confiabilidade, a determinação dos analitos foi realizada com base na curva analítica por padronização interna.

III-4.1.3. Linearidade e faixa de trabalho

A Figura 10 mostra os cromatogramas de MRM da transição de quantificação “íon precursor → íon fragmento” obtidos por LC-MS/MS.

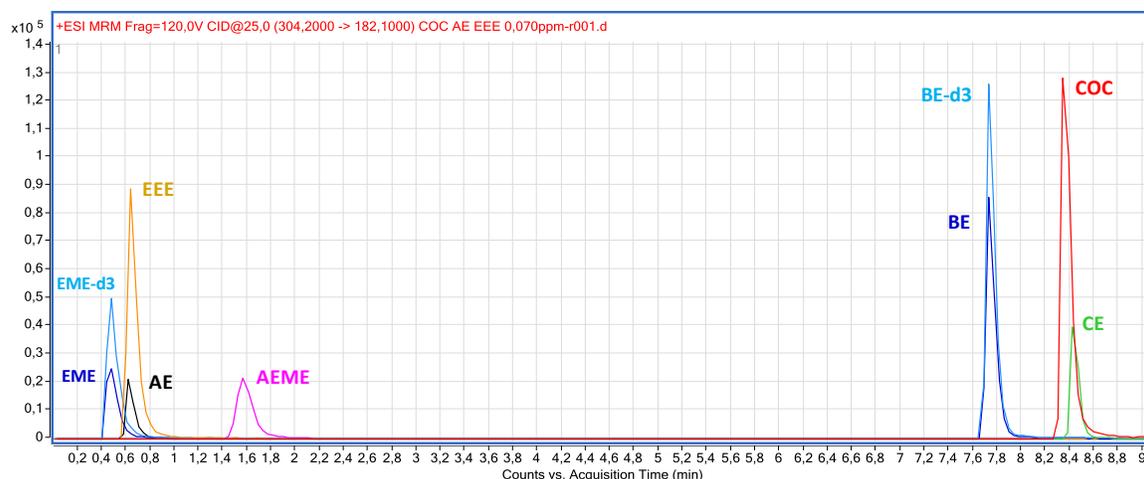


Figura 10. Cromatogramas MRM para a transição de quantificação “íon precursor→íon fragmento” para COC e seus metabólitos a $70\mu\text{g L}^{-1}$. (Coluna Zorbax SB-C18, 2,1 x 30 mm e $3,5\mu\text{m}$ de tamanho de partícula; fase móvel ácido fórmico 0,1%/ACN).

Para a construção da curva analítica utilizou-se o padrão interno EME-d3 para quantificar os analitos mais polares (*i.e.* EME, EEE, AEME e AE) e o padrão interno BE-d3 para os compostos menos polares (*i.e.* COC, BE e CE). Os padrões internos foram adicionados no solvente (fase móvel) e no extrato das amostras, antes da determinação por LC-MS/MS. Na Tabela 12 estão expostos os parâmetros obtidos para a linearidade do método. Para a COC e BE, duas faixas lineares foram empregadas, dependendo da concentração desses compostos nas amostras.

Tabela 12. Parâmetros da curva analítica por padronização interna para a cocaína e metabólitos

Parâmetros	COC	BE	EME	AEME	AE	CE	EEE
$t_R(\text{min})$	8,3	7,8	0,5	1,5	0,6	8,5	0,6
Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,5 - 150 150-1000	0,5 - 150 150 - 1000	0,5 - 150	0,5 - 150	0,5 - 150	1 - 150	1 - 150
R^2	0,999 0,998	0,999 0,999	0,999	0,998	0,995	0,994	0,998
Coef. Angular	0,019 0,036	0,039 0,060	0,010	0,013	0,003	0,100	0,078
DP do Coef. Linear	0,012 0,590	0,020 0,285	0,004	0,013	0,009	0,114	0,102
LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2	2	1	3	8	4	4
LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	6 162	5 174	4	10	28	12	13
Faixa de trabalho ($\mu\text{g L}^{-1}$)	6 - 150 162 - 1000	5 - 150 174 - 1000	4 - 150	10 - 150	28 - 150	12 - 150	13 - 150

III - 4.2. Estabilidade da cocaína e metabólitos em urina humana

A Figura 11 apresenta os resultados do estudo da estabilidade da cocaína e de seus produtos de biotransformação, em termos de porcentagem residual, sob as condições de armazenamento das amostras de urina empregadas neste estudo.

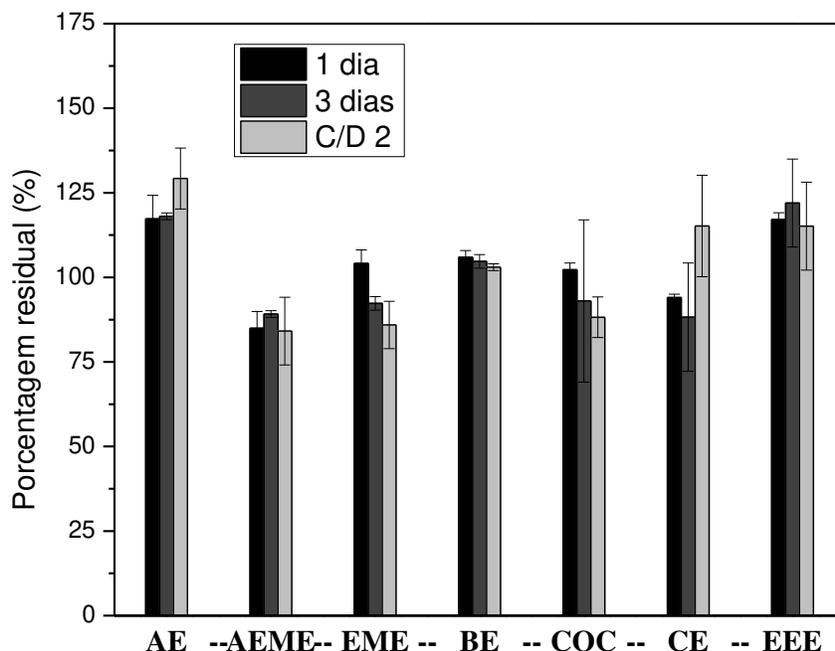


Figura 11. Estabilidade da cocaína e de seus metabólitos na urina após armazenamento da amostra fortificada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 (T1) e 3 (T3) dias e após ciclo de congelamento e descongelamento (C/D). Porcentagem residual em relação à determinação da amostra imediatamente após a fortificação.

O primeiro teste de estabilidade envolveu a determinação em duplicata dos analitos na amostra de urina fortificada após 1 (T1) e 3 (T3) dias de armazenamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 11). O segundo ensaio consistiu da determinação dos analitos, em duplicata, após dois ciclos de congelamento e descongelamento sucessivos. A concentração residual encontrada foi comparada com a concentração determinada das substâncias imediatamente após a fortificação da amostra (CDER, 2001).

Observou-se que a BE, a COC, o EME e o CE foram estáveis após 1 dia de armazenamento. O AEME apresentou uma diminuição na concentração de aproximadamente 16%, e a AE e o EEE apresentaram um aumento próximo de 20%. Após 3 dias de armazenamento, ocorreu uma diminuição da concentração da COC e da EME, a qual foi observada também após ciclos de

congelamento e descongelamento. E a variação na concentração de AE e da AEME foi ainda maior.

A diminuição na concentração do AEME e o aumento na concentração da AE podem estar relacionados à hidrólise da AEME, formando a AE, reação esta favorecida em pH acima de 7 (Preston *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2010). A perda na concentração da COC e do EME pode estar relacionada à ocorrência de reações de hidrólise no grupo éster metílico destas moléculas, levando a formação da BE e da ecgonina (produto da biotransformação não investigado), respectivamente (Peterson *et al.*, 1995). Variações nas concentrações de CE e EEE foram observadas. *In vivo*, a conversão do CE ao EEE ocorre por reações de transesterificação através de ação enzimática no fígado, sendo provável que esta transesterificação continue *in vitro* (Peterson *et al.*, 1995).

Os resultados descritos indicam possíveis alterações na concentração de cocaína e de seus produtos de biotransformação em amostras de urina humana, quando armazenadas sem procedimentos apropriados para evitar a degradação/formação dos analitos. Para evitar etapas de armazenamento ou ciclos de congelamento e descongelamento das amostras, bem como a degradação/formação dos analitos após a coleta, procurou-se analisá-la sem até uma semana após serem alocadas no laboratório.

III - 4.3. Estabilidade da cocaína e da benzoilecgonina no afluente sanitário

A Figura 12 mostra a variação da concentração de COC e da BE no afluente sanitário, antes e após a adição de uma amostra de urina positiva para esses analitos, durante 5 horas. O afluente foi mantido à temperatura ambiente (variável entre 22 e 25°C) e pH 6,8, sob agitação branda e na ausência de luz.

O objetivo deste estudo foi avaliar a estabilidade da COC e da BE durante a permanência e o transporte no sistema sanitário, até alcançarem a ETE. O tempo total do experimento (*i.e.* 5 horas) foi estabelecido de acordo com o tempo de residência de uma amostra de urina na rede de esgoto. Esta informação foi concedida pelo responsável técnico da companhia de saneamento de Campinas.

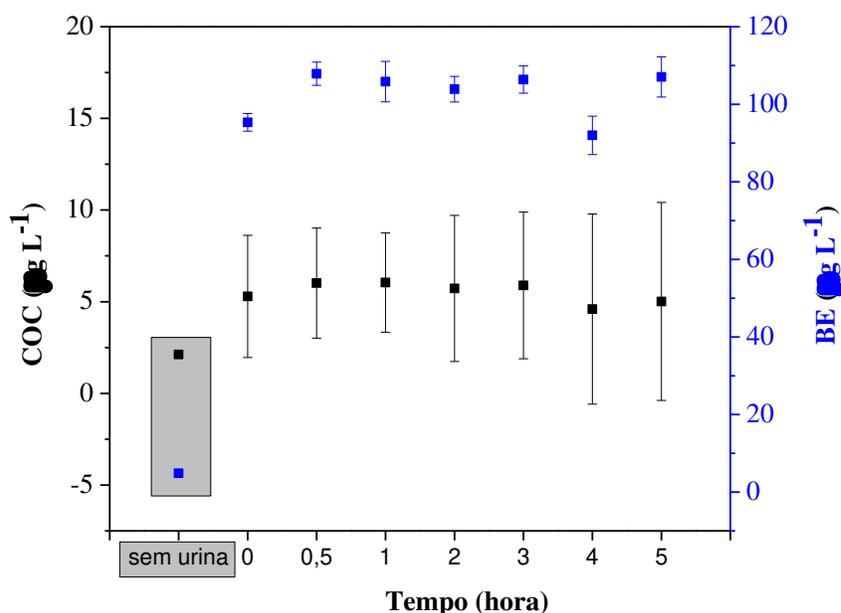


Figura 12. Variações na concentração de cocaína e benzoilecgonina no aflente sanitário de uma ETE, antes (caixa em cinza) e após a adição de urina (fator de diluição da urina no aflente de 500 vezes), ao longo de 5 horas. Condições experimentais: temperatura ambiente, pH6,8, agitação branda e ausência de luz.

Após a adição da amostra de urina no aflente sanitário, a concentração de COC no aflente aumentou cerca de 5 vezes, e a concentração de BE aumentou aproximadamente 20 vezes. Esse deslocamento nos níveis de concentração para valores mais concentrados foi proporcional à diluição da amostra de urina adicionada ao aflente (*i.e.* aproximadamente 500 vezes). No período de realização do experimento, as concentrações de COC e de BE não sofreram alterações significativas, como mostra a Figura

12. Embora o ensaio não represente uma reprodução fiel do sistema sanitário, os resultados indicam que no tempo avaliado e nas condições experimentais estudadas, os analitos apresentaram estabilidade.

Estudos de estabilidade da COC e da BE no afluente sanitário, conduzidos por tempos mais longos do que 5 horas, foram realizados por outros grupos de pesquisa. Em 12 horas de experimento, a 20 °C e pH entre 6,0 e 7,5, a COC degrada entre 40 a 50% de sua concentração inicial, levando a um aumento nas concentrações de BE entre 6 e 15% (Bisceglia *et al.*, 2010; van Nuijs *et al.*, 2012; Gheorghe *et al.*, 2008).

O tempo em que as drogas ilícitas permanecem no sistema sanitário varia amplamente, dependendo da extensão da rede coletora do esgoto local. A natureza biológica, a temperatura e a composição do afluente sanitário apresentam elevada variação entre diferentes regiões, em função da precipitação de chuvas, cultura de consumo, clima, dentre outros fatores. Em função de tais variações, a degradação das drogas ilícitas deve ser considerada na estimativa de consumo. Para a estimativa do consumo de cocaína através da epidemiologia do esgoto, assume-se uma incerteza de 10% na determinação da concentração da BE, em função da estabilidade da COC e da BE (Castiglioni *et al.*, 2013).

III - 4.4. Determinação de cocaína e metabólitos nas amostras de urina e de afluentes sanitários

As amostras de urina objetos de estudo deste trabalho correspondem as 99 amostras obtidas a partir da colaboração com o CCI e o LLB (HC/UNICAMP), que apresentaram concentrações de BE acima do limite de quantificação do método analítico. Dados sobre a quantidade de droga

consumida e o intervalo entre o uso da substância e a coleta da urina não foram informados pelos usuários. Durante as campanhas amostrais de afluentes sanitários da ETE Anhumas e da ETE Capivari, obteve-se 16 amostras cumulativas de 24 horas, as quais foram incluídas neste estudo. Os resultados da determinação dos analitos nos conjuntos amostrais citados serão apresentados e discutidos nos tópicos a seguir.

III-4.4.1. Estudo da ocorrência da cocaína e metabólitos nas amostras de urina

A Figura 13 mostra as concentrações e as frequências de detecção de COC e seus produtos de biotransformação nas amostras de urina analisadas. No gráfico *Box plot* da Figura 13, a caixa mostra a menor e a maior concentração, onde se encontram 50% das amostras; a linha central (—) representa a concentração mediana e as linhas acima e abaixo da caixa correspondem à maior e à menor concentração encontrada no conjunto amostral. Os *outliers* estão marcados por asteriscos. A concentração média é representada pelo símbolo □.

Os produtos de biotransformação da cocaína de interesse e a droga parental foram encontrados em mais de 50% das amostras de urina analisadas, com exceção do AEME, o qual apresentou frequência de detecção de 22%. Os analitos mais abundantes foram a BE e a EME. Em relação à BE, as concentrações de COC encontradas foram em média 30 vezes mais baixas. Estes resultados concordam com os estudos farmacocinéticos da excreção urinária da cocaína, os quais reportaram a BE e o EME como os produtos majoritários da ingestão da droga. De acordo com estes estudos, 45% da quantidade total de droga consumida são excretados como BE, e 40%

como EME. Para a COC, essa porcentagem varia entre 1 e 9% (Ambre, 1985 e Baselt, 2004 *apud* EMDDA, 2008; Smith *et al.*, 2010).

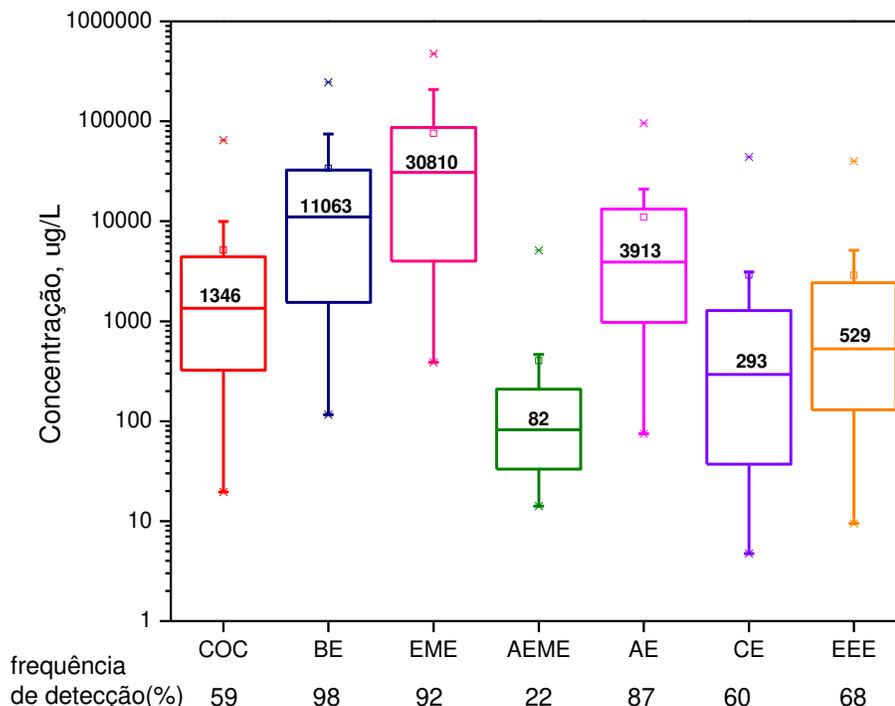


Figura 13. Concentrações encontradas e frequência de detecção para a COC e seus metabólitos nas amostras de urina analisadas. Valores das medianas descritos em cada *Box Plot*.

Esses resultados concordam, também, com os trabalhos que indicam a BE como biomarcador do consumo de cocaína para fins da epidemiologia do esgoto (Zuccato *et al.*, 2005). Além de ser um dos produtos da biotransformação da cocaína majoritários, a BE apresentou-se mais estável do que o EME e a droga parental, tanto em amostras de urina como em amostras de afluente sanitário. O uso da droga parental, indicado por alguns trabalhos (Bones *et al.*, 2007), pode fornecer resultados super ou sub estimados do consumo da droga, em decorrência, principalmente, da descarga da droga sem

ser consumida no sistema sanitário e da instabilidade no esgoto sanitário (Kasprzyk-Hordern *et al.*,2009a).

A Figura 13 mostra ainda a ocorrência dos produtos característicos do consumo da cocaína na forma de pasta base (*i.e.* AEME e AE). A frequência de detecção foi maior para a AE do que para o AEME, e os níveis encontrados para a AE foram maiores do que os níveis encontrados para o AEME, muito embora o desempenho do método analítico para a determinação da AE não permite uma conclusão livre de dúvidas. Estes resultados concordam com o estudo da excreção urinária da cocaína *crack* conduzido por Shimamura *et al.*, 2001, no qual foram observados níveis de AE cerca de sete vezes acima dos níveis de AEME. Os maiores níveis de AE em relação ao AEME, pode estar relacionado à instabilidade do AEME no pH da urina, o que favorece a hidrólise do grupo éster metílico e leva à formação de AE. Embora sejam resultados preliminares, devido à aplicação qualitativa do método analítico para a AE, os dados obtidos inferem a AE como um biomarcador para a estimativa do uso de cocaína sob a forma de pasta base.

O CE e o EEE, metabólitos característicos do consumo de cocaína com ingestão concomitante de bebida alcoólica, foram detectados em 60% e 68% das amostras analisadas, respectivamente. As concentrações determinadas foram similares para ambos, considerando diferenças na exatidão do método analítico para cada um destes compostos. Entretanto, os ensaios de estabilidade em amostras de urina mostraram uma tendência no sentido de formação do EEE, a partir do CE presente na urina. Esta mesma tendência pode ser observada no afluente sanitário, devido às condições biológicas e de pH do meio. O estudo conduzido por Castiglioni *et al.*(2011) observa-se a degradação do CE no esgoto sanitário em cerca de 30% após 3 dias de armazenamento a -4 °C; o EEE não foi incluído neste estudo. Com os

resultados encontrados neste trabalho, ambos podem ser detectados no afluente sanitário, mas o EEE parece ser o biomarcador mais adequado.

III-4.4.2. Estudo da ocorrência da cocaína e seus produtos de biotransformação nas amostras de afluente sanitário

A Figura 14 mostra as concentrações de COC e seus produtos de biotransformação nas amostras de afluente sanitário analisadas. A COC, BE, EME, CE e EEE foram detectados em 100% delas, e o AEME e a AE não foram detectados. Em geral, as concentrações dos analitos determinadas nas amostras coletadas nas ETE estudadas apresentaram níveis semelhantes. Os níveis variaram entre 0,1 e 15 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo que os níveis determinados nas amostras da ETE Capivari foram ligeiramente mais elevados do que aqueles determinados nas amostras da ETE Anhumas.

Observando as concentrações determinadas de COC, BE e EME, os níveis de BE foram, na maioria dos casos, maiores do que as concentrações de COC e EME, corroborando com os resultados encontrados no estudo com as amostras de urina de usuários da droga. Em relação aos níveis determinados no conjunto amostral de urina, as concentrações de COC no afluente sanitário mostraram-se elevadas. Enquanto os níveis de COC nas amostras de urina foram em média 30 vezes menores do que os níveis de BE, no afluente sanitário as concentrações de COC foram, em média, 2,5 vezes menores. Estes resultados indicam uma discrepância entre os conjuntos amostrais estudados.

A não detectabilidade dos produtos da biotransformação da cocaína *crack*, não significa ausência de consumo dessa forma de cocaína nas regiões estudadas. Tanto a AEME como a AE ocorrem no afluente sanitário em níveis de algumas dezenas de ng L^{-1} , sendo necessários procedimentos de pré-

concentração seletivos para os analitos. No trabalho realizado por Castiglioni *et al.* (2011) foram utilizados cartuchos de troca catiônica para a pré-concentração desses analitos, em 70 amostras de afluente sanitário de Milão e Como (Itália) e de Chicago (Estados Unidos). A AEME não foi detectada em nenhuma das amostras analisadas no trabalho, enquanto a AE foi determinada em 100% delas, em concentrações que variaram entre 1 e 45 ng L⁻¹. Cartuchos para SPE que utiliza fase extratora baseadas em interação eletrostática tendem a apresentar maior eficiência de extração para analitos polares e de baixo peso molecular. Métodos analíticos voltados para a determinação da AE são necessários, para se obter dados fidedignos sobre a ocorrência de AE no afluente sanitário. A partir destes dados, torna-se possível a estimativa da prevalência do uso de cocaína *crack* no Brasil, utilizando a epidemiologia do esgoto.

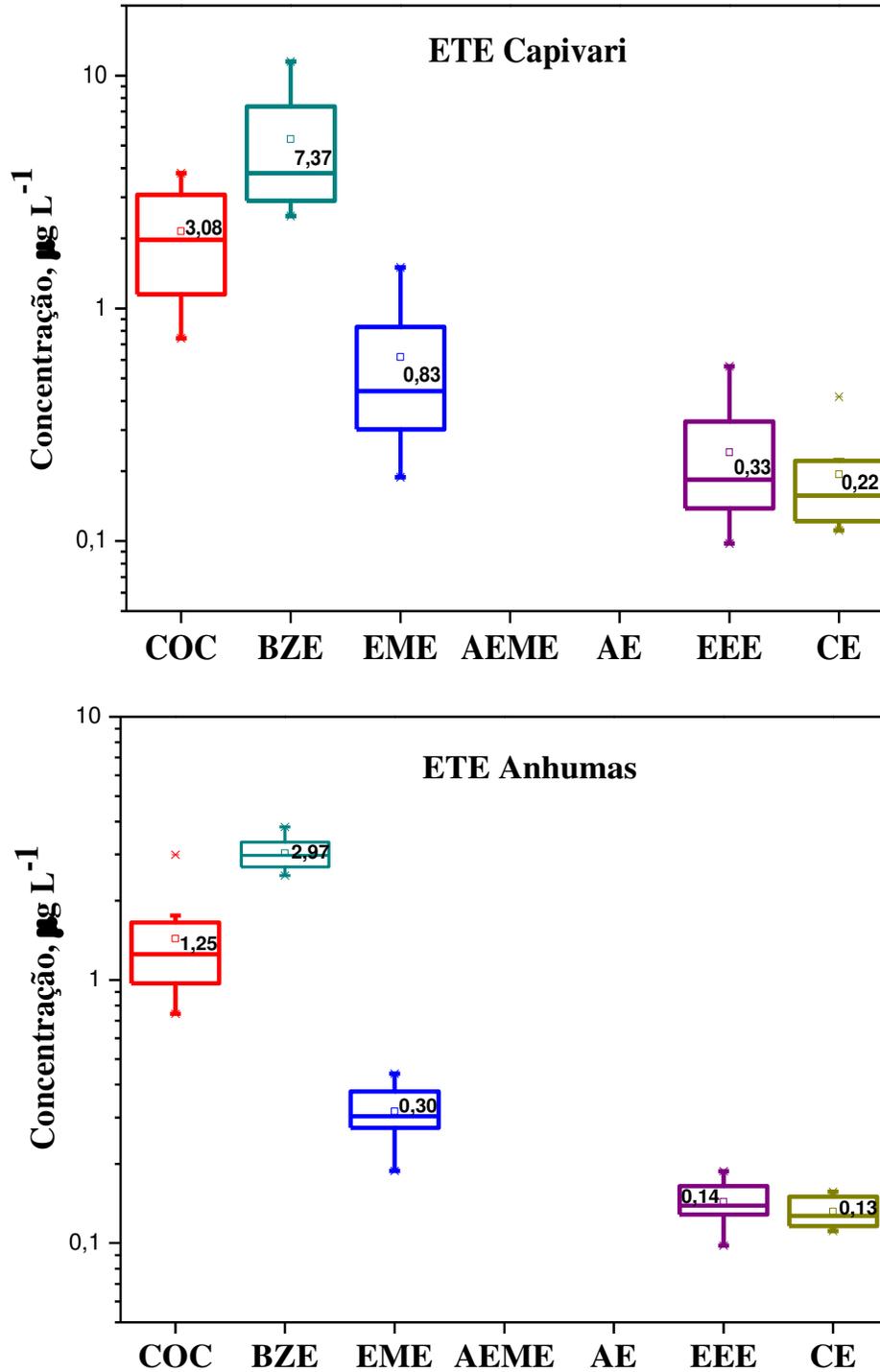


Figura 14. Concentrações de cocaína e seus metabólitos determinadas em amostras de afluentes sanitário, coletadas na ETE Capivari (n=8) e na ETE Anhumas (n=9). Valores das medianas inseridas em cada *Box Plot*.

O CE e o EEE foram quantificados em níveis entre 100 e 500 ng L⁻¹, aproximadamente 2500 vezes mais diluídas em relação aos níveis encontrados no conjunto amostral de urina de usuários. Em geral, tanto o EEE como o CE puderam ser identificados e determinados em todas as amostras de afluentes sanitário analisadas, confirmando os resultados obtidos a partir do estudo com amostras de urina. A razão entre o biomarcador para o consumo de cocaína e o biomarcador para o consumo da droga com bebida alcoólica (*i.e.* BE/EEE) na urina de usuários foi em média 27, enquanto que a mesma razão no afluentes sanitário foi em média o dobro (*i.e.* 50). Essa diferença na razão BE/EEE pode estar relacionada à degradação da EEE no afluentes, ou a uma menor prevalência do uso da droga por essa via do que aquela observada no conjunto amostral de urina de usuários.

O estudo da determinação de COC e BE nas amostras de urina de usuários mostrou que, de maneira geral, os resultados foram correspondentes aos dados da excreção urinária disponíveis na literatura. Porém, observou-se uma grande amplitude de valores nas concentrações desses analitos, os quais não corresponderam àqueles determinados nas amostras de afluentes sanitário. A partir dessa observação, as concentrações de COC e de BE determinadas nos conjuntos amostrais foram utilizadas para estudar a relação entre eles. Nesse estudo, foram consideradas apenas amostras positivas para a BE

III - 4.5. Comparação da excreção urinária da COC e da BE com a determinação em amostras de afluentes sanitários

Para avaliar se existe uma correlação entre os níveis de COC e de BE nas amostras de urina de usuários, o conjunto amostral de urina foi dividido

em cinco grupos, de acordo com a concentração de BE determinada em cada amostra (Tabela 13). Em cada um dos grupos foi avaliada a frequência de detecção de cocaína e as concentrações de cocaína determinadas em cada um das amostras.

Tabela 13. Divisão das amostras do conjunto amostral de urina de usuários da droga em grupos de acordo com a concentração de BE determinada.

[BE], $\mu\text{g L}^{-1}$	<1000	1000– 10000	10001 – 25000	25001 – 100000	>100001
Grupo	I	II	III	IV	V

Na Figura 15 estão apresentadas as concentrações de COC, sua frequência de detecção e as concentrações de BE em cada grupo.

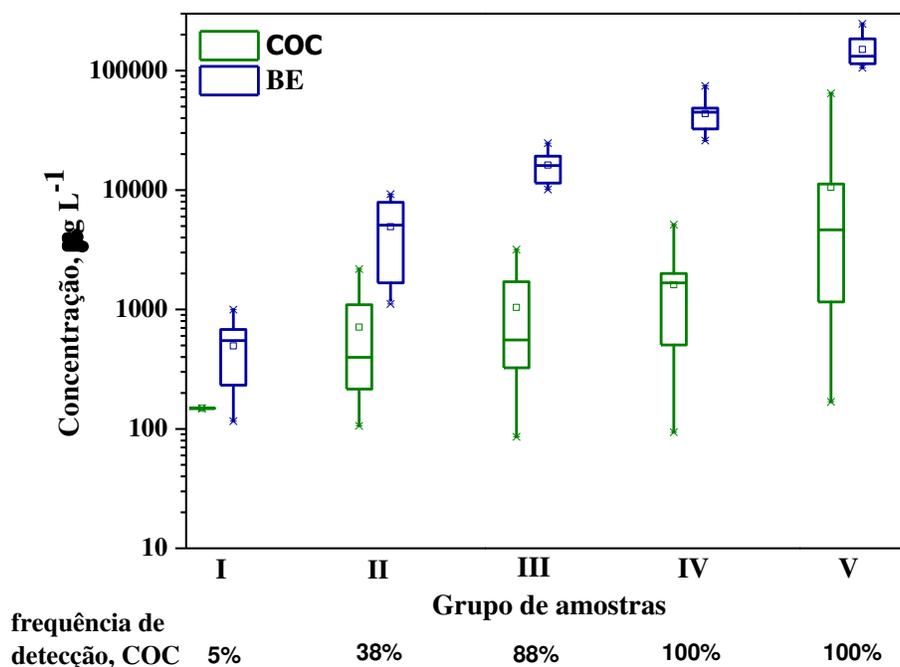


Figura 15. Concentrações de BE e de COC e frequência de detecção para a cocaína nos grupos de amostras de urina de usuários com concentrações de BE entre: Grupo I: inferior a $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$; Grupo II: entre 1.000 e $10.000 \mu\text{g L}^{-1}$; Grupo III: entre 10.001 e $25.000 \mu\text{g L}^{-1}$; Grupo IV: entre 25.000 e $100.000 \mu\text{g L}^{-1}$ e Grupo V: superior a $100.001 \mu\text{g L}^{-1}$.

Observa-se que quanto maior a concentração de BE determinada em uma amostra de urina, maior é a probabilidade de a cocaína ser detectada na mesma amostra. Entretanto, observa-se que, entre os grupos de amostras, a amplitude de concentração de COC é menor do que a amplitude de concentração de BE. Consequentemente, não foi observada uma relação entre a ocorrência de COC e de BE no conjunto de amostras de urina de usuários estudado. E, portanto, o valor médio para a proporção da droga consumida excretada como BE não necessariamente irá refletir a excreção da cocaína como BE dos usuários da droga.

De acordo com a literatura, a quantidade de droga parental e de BE excretada via urina é proporcional à quantidade de droga consumida pelo usuário. O pico de concentração na urina, após o consumo da droga, é mais tardio para a BE do que para a COC, em decorrência da lenta transformação da COC à BE *in vivo*, fazendo com que diferentes proporções entre a BE e a COC podem ser encontradas ao longo da excreção urinária da droga (Preston *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2010).

A COC é eliminada sob a forma inalterada até 24 horas após o consumo da droga, e após esse tempo, a droga consumida é excretada somente na forma de outros produtos da biotransformação. Enquanto a COC é determinada na urina em até 24 horas, a BE pode ser encontrada até 4 dias após o consumo. Apenas entre 1 e 9% da droga consumida é excretada como COC, e cerca de 45% é excretada como BE (Preston *et al.*, 2002; Smith *et al.*,

2010). Em razão disso, concentrações mais elevadas de BE serão determinadas com maior frequência do que concentrações elevadas de COC.

Pra estimar qual é a variação da proporção de BE excretada, em relação aos demais produtos de biotransformação de cocaína, foi calculada a razão entre a concentração de BE e a concentração total dos metabólitos da COC mais a droga parental (*i.e.* $\frac{BE}{\sum_{\text{met.}+COC}}$) em cada amostra de urina disponível para este estudo. Além dessa razão, a razão entre a concentração de BE e a concentração de COC (*i.e.* BE/COC) em cada amostra foi também estimada. Essas razões foram comparadas com as mesmas razões estimadas em amostras de afluentes sanitário.

III-4.5.1. Estudo da proporção de BE excretada em relação ao somatório dos produtos de biotransformação da cocaína nas amostras de urina de usuários da droga e de afluentes sanitários

A Figura 16 mostra o histograma da distribuição da razão $\frac{BE}{\sum_{\text{met.}+COC}}$, expressa como porcentagem de BE (%BE), nas amostras de urina de usuários da droga. Na ausência de informações sobre a quantidade da cocaína consumida pelo usuário, considerou-se que toda a droga consumida é excretada via urina na forma de produtos de biotransformação e da droga parental. Considerando a aplicabilidade qualitativa do método analítico para a AE, este produto não foi considerado no cálculo.

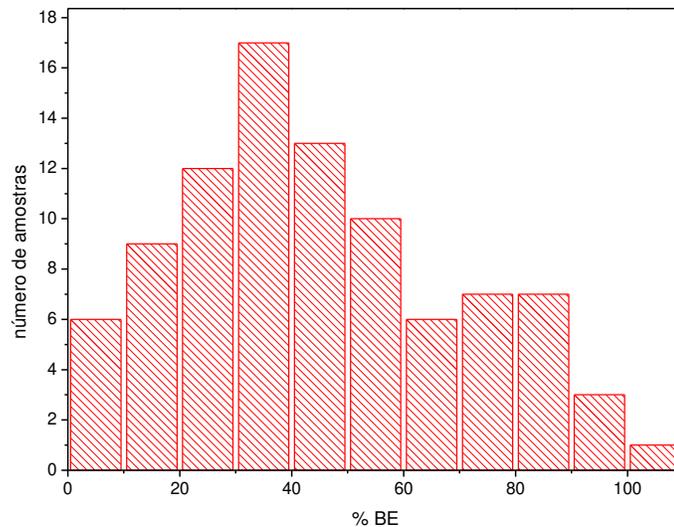


Figura 16. Histograma da porcentagem de BE, em relação aos demais metabólitos da cocaína e à droga parental, com exceção da AE, encontrada nas amostras do conjunto amostral de urina de usuários.

Observa-se que as amostras estão distribuídas entre 0 e 100% de BE excretada e que a maioria delas, cerca de 70%, apresentou valores de %BE entre 10 e 60%. O valor médio para a %BE entre todas as amostras foi de 48%, com coeficiente de variação de 52%. Ao considerar apenas as amostras que ocupam a região central do histograma, a média cai para 35%, com coeficiente de variação de 46%. Esses resultados mostraram que a %BE média no conjunto amostral estudado corrobora os estudos farmacocinéticos disponíveis na literatura (Ambre, 1985 e Baselt, 2004 *apud* EMDDA, 2008) e utilizados para estimar consumo de cocaína através da análise de afluentes sanitários (Zuccato *et al.*, 2005). Entretanto, os dados indicam um desvio associado ao cálculo da %BE entre 46 e 52%.

Além da quantidade de droga consumida pelos usuários e do diferente perfil de excreção dos metabólitos da cocaína, especula-se que a via de administração da droga escolhida pelo usuário também pode influenciar na excreção urinária da droga, sendo assim um dos fatores que proporcionam essa alta variabilidade entre os resultados para a %BE obtidos. Os estudos

conduzidos por Harris *et al.* (2003) e Smith *et al.*(2010) mostraram que a via de administração tem influência sobre a cinética da biotransformação da COC, mas não interfere na concentração dos produtos excretados, para uma mesma dose da droga administrada por via EV e fumada. Contudo, a ingestão de bebida alcoólica tende a diminuir a quantidade de BE por inibição da enzima responsável pela biotransformação da COC à BE, produzindo o metabólito CE a partir da COC (Harris *et al.*, 2003).

A Figura 17 mostra o histograma da %BE nas amostras de urina de usuários, nas quais foi detectada a presença dos biomarcadores para inferir diferentes vias de consumo de cocaína.

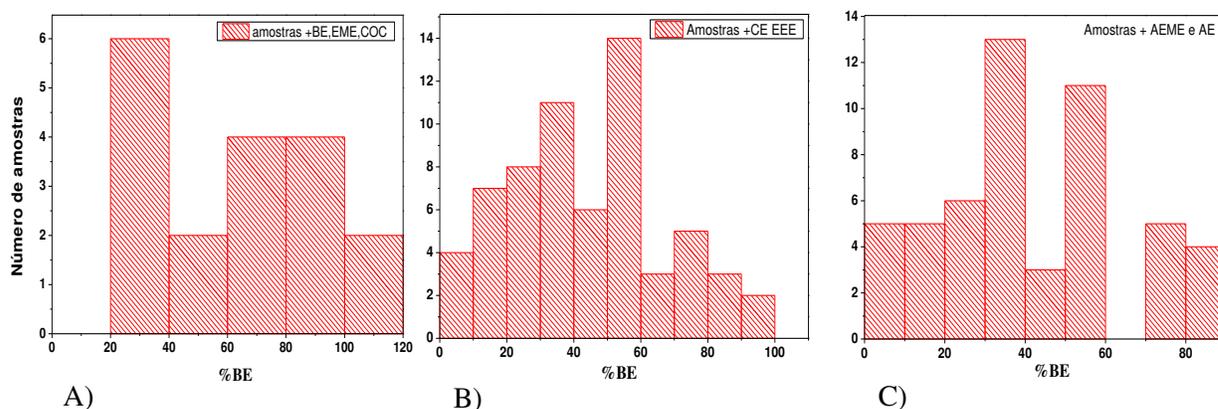


Figura 17. Histogramas da %BE para as diferentes opções de vias de consumo da cocaína(A) por via IN ou EV sob a forma de pó;(B) com bebida alcoólica e (C) fumada sob a forma de pasta base.

A Figura 17 mostra uma distribuição desigual da %BE entre as diferentes vias de uso de cocaína. Esse resultado proporcionou valores para a %BE média distintos para cada via de administração da droga na seguinte ordem: IV ou EV > com bebida alcoólica > fumada > fumada com bebida alcoólica (Tabela 14), concordando com a literatura (Harris *et al.*, 2003; Castiglioni *et al.*, 2013).

Tabela 14. %BE média calculada para as diferentes vias de administração da cocaína nas amostras de urina de usuários da droga (n=97).

Via de uso	IN ou EV	Fumada	Com etanol	Fumada Com etanol
%BE _{média} ± CV	63 ± 39	41 ± 60	51± 49	39 ± 55
Número de amostras	21	52	24	40

Observa-se que enquanto a %BE média calculada para o consumo de COC por via IN ou EV foi 15% maior do que aquela observada para o conjunto amostral sem distinção de via, para os demais subconjuntos de amostras a %BE média foi entre 3 e 10% menor. Esse resultado confirma que a via de administração da cocaína escolhida pelo usuário interfere na %BE excretada via urina.

Considerando o conjunto de amostras de usuários estudado, em mais de 80% das amostras foram detectados os biomarcadores da cocaína *crack*, e em cerca de 60% e 20% delas, foi detectada a presença dos biomarcadores do consumo da droga com bebida alcoólica e por via IN ou EV, respectivamente. Essa distribuição das amostras indica uma contribuição significativa da via de administração da droga no conjunto amostral estudado, sendo razoável afirmar que a %BE média calculada através da análise desse conjunto de amostras é representativa das diferentes vias de administração de cocaína. Assim, considerou-se que no desvio estimado para a %BE média, está considerada a incerteza relacionada às distintas excreções metabólicas da cocaína.

Conhecendo a excreção metabólica da cocaína, estudou-se a proporção de BE determinada em um conjunto de amostras de afluentes sanitários, em relação ao somatório dos demais subprodutos da cocaína determinados nas mesmas amostras (%BE_{AS}). A Figura 18 mostra a distribuição das %BE_{AS} calculadas.

Observa-se que para a maioria das amostras, mais de 90% delas, a $\%BE_{AS}$ variou entre 55 e 70%, enquanto que em apenas 1 amostra um valor inferior a 45% foi estimado. Para todo o conjunto amostral, a $\%BE_{AS}$ média foi de 63%, com coeficiente de variação de 10%, ou seja, 15% maior do que a $\%BE$ média observada para o conjunto amostral de urina de usuários da droga. Não é possível avaliar se essa diferença nas médias da $\%BE$ calculadas é significativa, pois conforme o teste estatístico F no nível de confiança de 95% ($F_{crítico}: 1,84$) (Skoog *et al.*, 2007), as variâncias dos conjuntos amostrais são estatisticamente distintas ($F_{calculado}: 27,04$). Não é possível avaliar, também, se a relação dos metabólitos da COC determinada no afluente sanitário reflete ou não a excreção urinária dos usuários da droga.

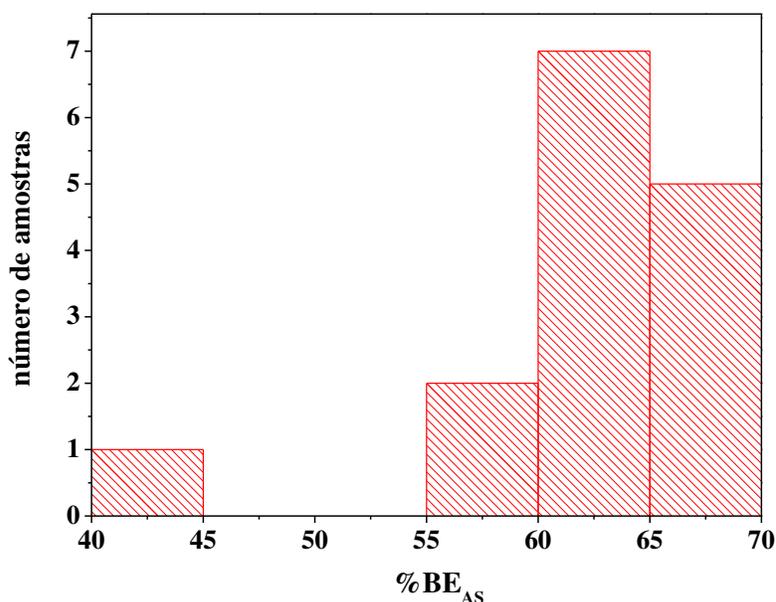


Figura 18. Histograma da $\%BE_{AS}$ no conjunto de amostra de afluentes sanitários: amostras de afluente sanitário coletadas na campanha 1 e na campanha 2 (n=15).

O esgoto doméstico, bem como os afluentes sanitários das estações de tratamento de esgoto, consiste de um amplo conjunto, de certa forma, homogêneo de despejos líquidos residenciais, comerciais, águas de infiltração na rede coletora, etc. Além da rota por excreção humana, a cocaína, bem como

outros compostos, pode chegar aos sistemas sanitários por lançamento direto em ralos, pias, vasos sanitários, seja de maneira intencional (traficantes se livrando da droga em abordagens policiais, por exemplo) ou involuntária (resíduos presentes em embalagens descartadas, limpeza de utensílios em locais de produção ou distribuição da droga, dentre outros).

O descarte direto da COC na rede coletora, além da biodegradação da COC no afluente mencionada em outros tópicos, pode alterar as proporções desses analitos no afluente sanitário, em relação à proporção oriunda da descarga de urinas na mesma rede de coleta de esgoto. Essa alteração tende a proporcionar resultados sobre ou subestimados, a partir do cálculo da estimativa de consumo da droga. Embora as diferenças entre os conjuntos amostrais não permitam uma comparação estatística entre os conjuntos amostrais, a razão BE/COC tem sido utilizada para avaliar possíveis alterações nas concentrações de COC ou de BE no afluente sanitário, em função dos aspectos mencionados.

III-4.5.2. Estudo da razão BE/COC nas amostras de urina de usuários e de afluentes sanitários

Ao considerar que entre 1 - 9 % da droga consumida pelo usuário é excretada via urina na forma da droga parental, e que entre 35 e 54% é excretada na forma de BE, a razão BE/COC característica do consumo humano poderia variar a entre 4 e 54(EMCDDA,2008; Postigo *et al.*, 2010). Essa faixa para a razão BE/COC tem sido considerada como um parâmetro para inferir sobre a origem dessas substâncias no afluente sanitário das ETE.

Buscou-se avaliar se essa mesma faixa de razão é predominante no conjunto amostral de urinas de usuários de cocaína e no conjunto amostras de afluentes sanitários nas ETE de Campinas estudadas.

A Figura 19 mostra a distribuição da razão BE/COC no conjunto amostral de urinas de usuários; as amostras foram divididas em grupos de acordo com razões BE/COC, tais quais: < 1; 1 – 5; 6 – 20; 21 – 100; >101 e negativas para COC (ND COC).

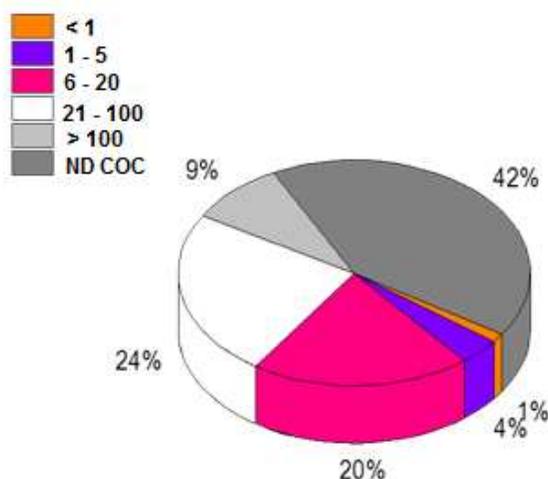


Figura 19. Distribuição da razão BE/COC no conjunto amostral de urina de usuários da droga. ND COC: cocaína não determinada.

Considerando apenas o conjunto de amostras nas quais foi determinada concentrações de BE e também de COC, a razão BE/COC variou entre 0,1 e 650, mostrando uma amplitude de variação superior àquela reportada na literatura. Para a maioria das amostras do conjunto amostral de usuários da droga (44%), a razão BE/COC variou entre 6 e 100 e para uma parcela semelhantes delas, 42%, a COC não foi determinada. Enquanto que para apenas 1 amostra, ou 1% delas, observou-se concentração de COC maior do que a concentração de BE.

De acordo com os dados supracitados, a faixa de razão BE/COC entre 6 e 100 representa o conjunto amostral de urinas de usuários, apresentando

uma tendência para valores acima de 20, considerando o amplo número de amostras nas quais a BE foi determinada em concentrações bem maiores do que as concentrações de COC. De maneira geral, os dados apresentaram uma grande amplitude de variação e mostram uma tendência para razões BE/COC superiores aquelas reportadas pela literatura.

A Figura 20 apresenta a distribuição da razão BE/COC nas amostras de afluentes sanitários das ETE Anhumas e da ETE Capivari.

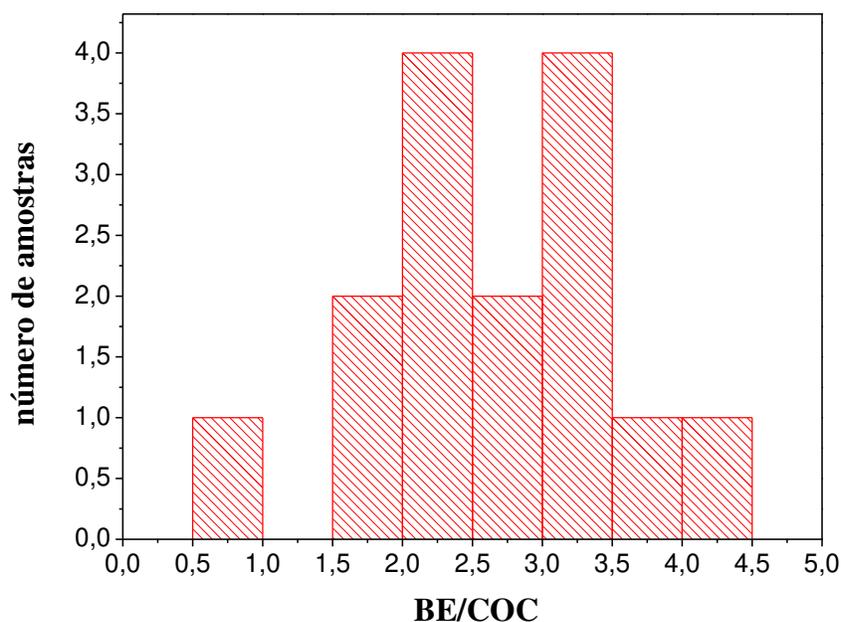


Figura 20. Distribuição da razão BE/COC no conjunto de amostras de afluentes sanitários da ETE Anhumas e da ETE Capivari coletadas durante a Campanha 1, 2 e 3.

Observou-se que para a maioria das amostras, região central do histograma (Figura 20) a razão BE/COC encontrada nas amostras estão distribuídas entre 1,5 e 3. A partir desses valores e dos dados supracitados, é possível observar concentrações de COC elevadas em relação às concentrações de BE, indicando que a ocorrência da COC nessas amostras tem a contribuição de descarte *in natura* da droga.

Os resultados encontrados foram similares àqueles observados por trabalhos desenvolvidos na Itália, nos Estados Unidos e na Bélgica. Nesses países, a razão BE/COC encontrada foram 3,3, 1,8 e 2,5, respectivamente (Castiglioni *et al.*, 2011; van Nuijs *et al.*, 2009a). Razões BE/COC muito próximas de 1 ou menores sugerem o lançamento de grandes quantidades de cocaína *in natura* no sistema sanitário e podem indicar descarte direto em grandes quantidades de droga (Maldaner *et al.*, 2012).

Observando a razão BE/COC nas amostras de afluentes sanitários da ETE Capivari e da ETE Anhumas durante a campanha 2 (perfil semanal) (Figura 21), valores entre 0,8 e 3,5 foram encontrados, sendo a menor razão observada na amostra de terça-feira, coletada na ETE Anhumas. Supõe-se, assim, que nesse dia possivelmente houve descarte de quantidades consideráveis de droga na rede coletora de esgoto, levantando suspeita de haver locais de refino ou distribuição da droga na região atendida pela ETE Anhumas.

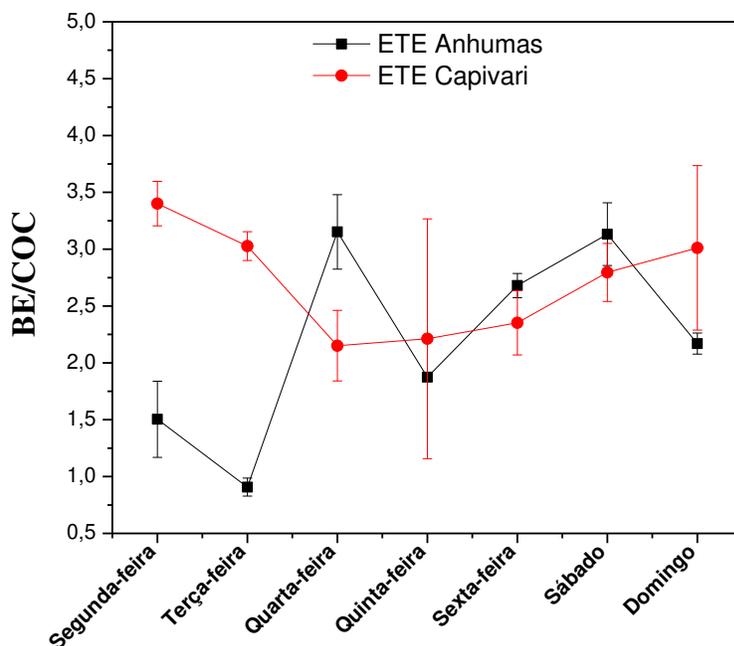


Figura 21. Variação semanal na razão BE/COC nas amostras de afluentes sanitários da ETE Anhumas (símbolos em preto) e na ETE Capivari (símbolos em vermelho), durante a campanha amostral 2. N= 3

III - 5. ESTIMATIVA DO CONSUMO DE COCAÍNA EMPREGANDO A EPIDEMIOLOGIA DO ESGOTO

Na Figura 22 encontram-se os resultados para a estimativa do consumo de cocaína nas amostras de afluentes sanitários das ETE Anhumas e Capivari, durante a campanha 2 e campanha 3 (carnaval), empregando a Equação 1. Visando uma análise comparativa com outros países, onde a epidemiologia do esgoto também foi utilizada para inferir consumo de cocaína, a estimativa foi calculada utilizando a porcentagem de excreção metabólica média como 45% de BE (Zuccato *et al.*, 2005), ao invés de 48% como calculado neste trabalho.

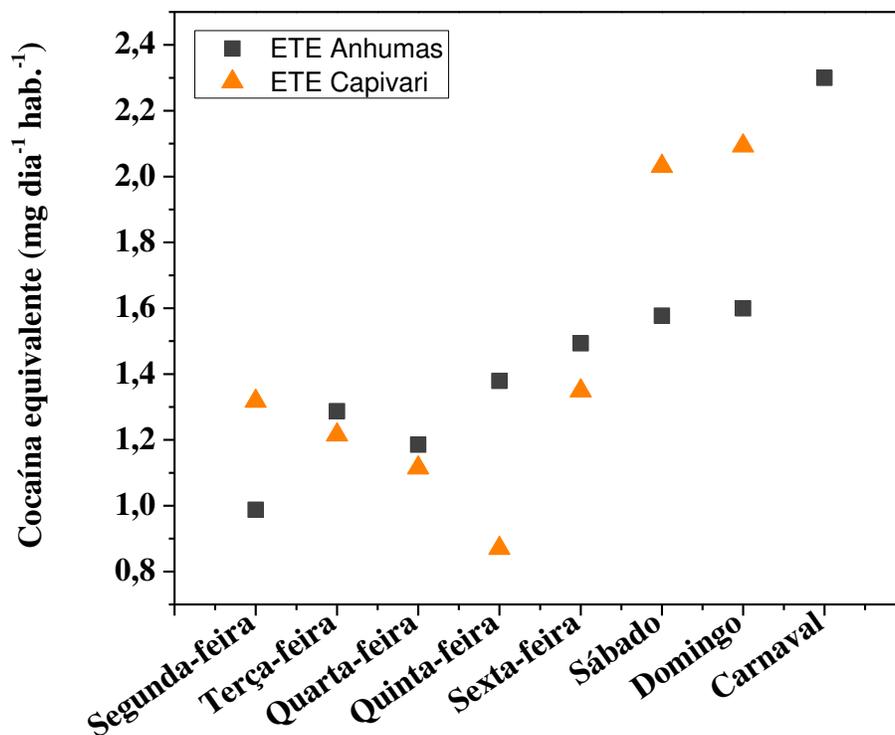


Figura 22. Estimativa do consumo de cocaína per capita durante a segunda semana de julho de 2013 e durante a segunda feira de carnaval de 2014, estimada com base na epidemiologia do esgoto.

A Figura 22 mostra maior quantidade de cocaína equivalente consumida durante os finais de semana do que em dias semanais para ambas as regiões estudadas. Esses resultados confirmam o padrão de consumo recreacional da cocaína, o qual é caracterizado por ser maior aos finais de semana. Resultados semelhantes foram encontrados em outros municípios, a exemplo do Distrito Federal, onde o consumo de cocaína nos finais de semana foi praticamente o dobro (Maldaner *et al.*, 2012). A região atendida pela ETE Capivari mostrou um consumo mais elevado do que a região atendida pela ETE Anhumas, o que mostra que a prevalência de consumo da droga varia entre diferentes regiões socioeconômicas do município de Campinas.

Durante a terça-feira de Carnaval foi registrado um consumo cerca de 50% maior daquele observado durante o final de semana entre os dias 20

e21/07/2013, na mesma região. Esse maior consumo pode estar associado ao evento festivo de três maneiras: ou a população local consome maior quantidade de droga ou a região recebe maior quantidade de usuários ou ambos os casos, considerando que dentro a região atendida pela ETE Anhumas há locais onde acontece aumento na concentração de pessoas vindas de outras regiões do município para participar do evento. Variações no consumo de cocaína em função de eventos festivos ou esportivos foram observadas sem outros países. Na Espanha, o consumo de cocaína estimado, utilizando dados epidemiológicos, foi aproximadamente 5 vezes maior durante um evento musical do que num final de semana sem eventos festivos (Bijlsma *et al.*, 2009). Nos Estados Unidos o consumo de cocaína também foi maior durante o *Super Bowl* quando comparado ao consumo durante um final de semana em que não houve o evento (Gerrity *et al.*, 2011).

A ocorrência de precipitações elevadas em períodos chuvosos tende a diluir o afluente sanitário, diminuindo as concentrações dos analitos em relação a um período de seca. Essa diluição do afluente pode resultar em uma subestimativa do consumo de drogas por meio da epidemiologia do esgoto. Em Campinas-SP, o período entre os meses de fevereiro e março é caracterizado por um período chuvoso e o período entre de junho e setembro por um período de seca (CEPAGRI/UNICAMP). De maneira atípica, no período de Carnaval de 2014, quando as amostras da Campanha 3 foram coletadas, foi registrado um período de estiagem pela Defesa Civil de Campinas, e durante o período de coleta não foi observada a presença de precipitações. Assim, possíveis variações na concentração da BE determinada nas amostras devido à diluição por chuvas foram descartadas.

III-5.1.1. Estimando a prevalência de usuários de cocaína entre a população servida pelas ETE estudadas.

A cocaína equivalente calculada utilizando a epidemiologia do esgoto corresponde ao consumo da droga 100% pura, ou seja, sem nenhuma adulteração ou diluição. A pureza da cocaína distribuída aos usuários no Brasil varia entre 10 e 97%, sendo a grande maioria da droga distribuída com pureza inferior a 20% (Silva *et al.*, 2008; Magalhães *et al.*, 2013).

A pureza média da cocaína de 20% foi utilizada para avaliar a prevalência do consumo médio diário *per capita* entre a população servida pela ETE Anhumas (250.000 habitantes) e pela ETE Capivari (60.000 habitantes). Utilizaram-se dados do último censo demográfico brasileiro, o qual mostrou que as pessoas entre 15 e 69 anos no município de Campinas-SP correspondem a 70,2% da população (1.154.617 habitantes)(IBGE, 2010b).

O cálculo foi realizado com base no consumo de cocaína, estimado empregando a epidemiologia do esgoto no sábado (Campanha 2) e na segunda-feira de carnaval (Campanha 3). Considerou-se que uma dose de droga consumida pelo usuário equivale a 100 mg de droga com 20% de pureza (UNODC, 2004).

A Tabela 15 apresenta a estimativa da prevalência de usuários de cocaína nas regiões estudadas, bem como um resumo dos dados utilizados nessa estimativa.

Tabela 15. Dados utilizados para estimativa da prevalência dos usuários de cocaína entre a população com idade entre 15 e 69 anos nas regiões atendidas pela ETE Anhumas e ETE Capivari. Estimativa com base no consumo *per capita* no sábado, do final de semana estudado (21/07/2013), e na segunda-feira de Carnaval (03/03/2014).

Dados	ETE ANHUMAS		ETE CAPIVARI
	Carnaval	Sábado	Sábado
Consumo (cocaína pura) mg dia ⁻¹ hab ⁻¹	2,3	1,6	2,1
Consumo droga(20% pureza) mg dia ⁻¹ hab ⁻¹	11,5	8	10,5
Consumo na região* g dia ⁻¹	2.020	1.405	442
Número de doses (100 mg)*	20.200	14.050	4.422
Prevalência* (%)	12	8	10
*Habitantes entre 15-69 anos	175.622		42.120

De acordo com os resultados, a prevalência de consumo nas regiões mostrou que entre 8 e 12 pessoas a cada 100 fazem uso de, ao menos, uma dose (100 mg) de cocaína por dia. Em comparação com dados oficiais publicados pela OBID e pela UNODC, os quais relataram a prevalência entre 0,7 a 1,7% entre os brasileiros com idade entre 15 e 64 anos, os dados encontrados neste estudo indicam prevalência aproximadamente 10 vezes maior. Segundo depoimentos de usuários de cocaína em blogs disponíveis na internet, um usuário de cocaína consome, na maioria dos casos, entre 2 e 5 g de droga não pura por dia de uso. Considerando que o consumo médio seja de 2g entre os usuários, a prevalência de usuários na região diminui para 0,6 - 1,0%, concordando com os dados oficiais (SENAD, 2009; UNODC, 2013; UNODC, 2014).

Em comparação com outras regiões onde a epidemiologia do esgoto foi também utilizada para estimar consumo de cocaína (Figura 23), a

população atendida pela ETE Capivari apresentou um consumo, em média, 4,5 vezes maior de cocaína do que a população de Londres, Milão e Paris (Thomas *et al.*, 2012). O consumo observado na região atendida pela ETE Capivari foi semelhante ao observado em Antuérpia (Bélgica) (Thomas *et al.*, 2012) e Amsterdam (Holanda) (Prichard *et al.*, 2014), locais onde um elevado consumo de cocaína vem sendo registrado pela UNODC. Em relação ao consumo registrado em Brasília, o consumo na mesma região foi praticamente o dobro (Maldaner *et al.*, 2012).

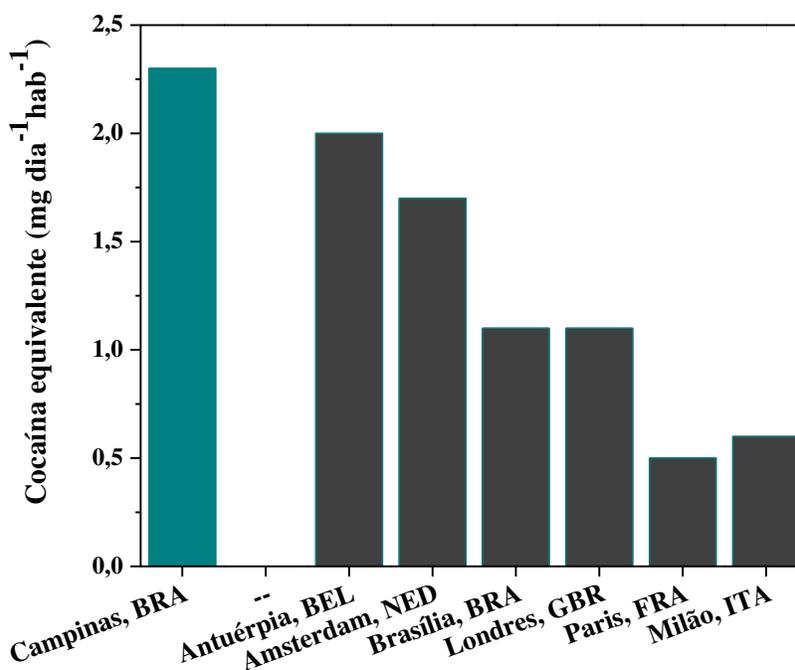


Figura 23. Cocaína equivalente calculada utilizando a epidemiologia do esgoto em diferentes países. Campinas, BRA: região atendida da ETE Capivari do município de Campinas-SP.

Uma melhor comparação entre diferentes municípios dar-se-ia por meio da extensão da estimativa para todo o município de Campinas, mas essa estimativa seria bastante grosseira, uma vez que a população atendida pelas duas ETE estudadas corresponde a apenas 27% da população do município. Todavia, esses dados mostraram um indício do elevado consumo da cocaína

no município, quando comparado com o consumo da droga observado em outros países, e demonstram, ainda, a aplicabilidade da epidemiologia do esgoto para mapear o consumo de cocaína em diferentes localidades.

III - 5.2. Estimando as incertezas da epidemiologia do esgoto

As principais incertezas associadas à epidemiologia do esgoto abordadas pela literatura são: determinação analítica; processo de amostragem de esgoto doméstico; estabilidade dos analitos BE e COC no sistema sanitário; estimativa da população atendida pela ETE; e excreção metabólica da cocaína entre diferentes usuários. Estas incertezas interferem no resultado final do cálculo da estimativa do consumo da cocaína, segundo a Equação 1, proposta por Zuccato *et al.* (2005). Através de uma revisão bibliográfica, foram adquiridos alguns dados sobre tais incertezas, os quais estão apresentados na Tabela 16.

Neste trabalho foi avaliada a incerteza associada à excreção metabólica da COC entre diferentes usuários de droga, com base no cálculo da %BE. Avaliou-se, também, a incerteza relacionada à determinação dos níveis de BE no afluente sanitário, em função da estabilidade dos analitos COC e BE durante a permanência no sistema sanitário. Com esses dados, a incerteza da epidemiologia do esgoto foi estimada com base no cálculo de progressão da incerteza de variáveis independentes (Equação 7). A Tabela 16 apresenta as incertezas individuais utilizadas no cálculo.

Tabela 16. Fatores e suas incertezas de medição sobre o cálculo da estimativa do consumo de cocaína utilizando a epidemiologia do esgoto

Fator de incerteza	Faixa de Incerteza (%)	Incerteza utilizada para o cálculo (%)	Referência
Descarga (D)	1 – 10	10	Mathieu <i>et al.</i> (2011)
Determinação analítica (DA)	15 – 20	20	Mathieu <i>et al.</i> (2011); Castiglioni <i>et al.</i> , 2013
Tipo de amostragem (Am)	0,8 – 3	3	Mathieu <i>et al.</i> (2011)
Estabilidade no afluente sanitário (E)	6 – 20	10	Castiglioni <i>et al.</i> , 2013; Este trabalho
Excreção metabólica (%BE)	46 – 52	52	Este trabalho
Número de hab. Atendidos (P)	7 – 55	55	Castiglioni <i>et al.</i> , 2013;

Equação 7

$$u_{CO_{Ceq}} = \sqrt{(u_D)^2 + (u_{DA})^2 + (u_{Am})^2 + (u_E)^2 + (u_{\%BE})^2 + (u_P)^2}$$

Na Equação 8, foram utilizadas as incertezas máximas de cada um dos fatores interferentes no cálculo do consumo de cocaína (Tabela 16) (*i.e.* amostragem, determinação analítica, estimativa da população atendida pela ETE), sendo estimada a incerteza máxima associada à epidemiologia do esgoto. A Figura 24 mostra o diagrama das incertezas e suas contribuições na incerteza total.

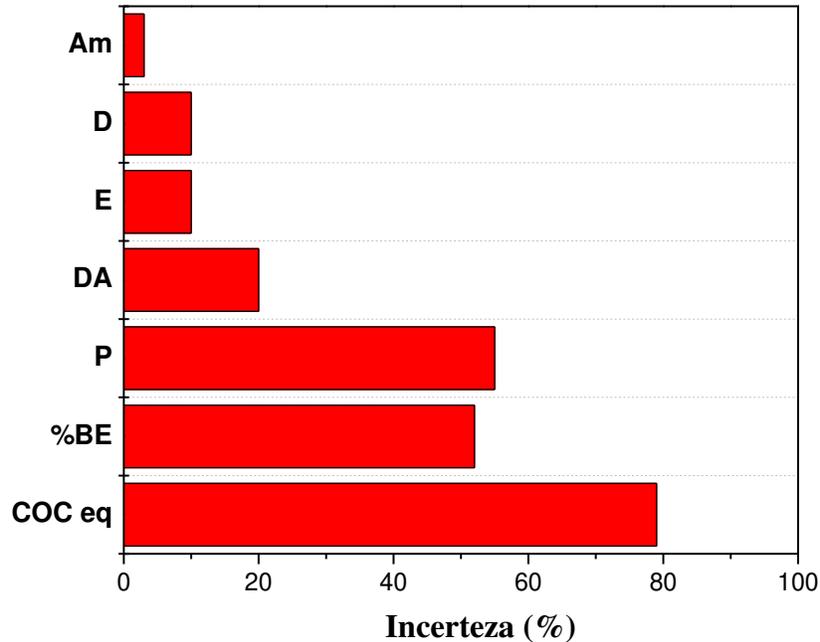


Figura 24. Contribuição das incertezas individuais na incerteza total da estimativa do consumo de cocaína (COC_{eq}) através da epidemiologia do esgoto: %BE - excreção metabólica; P - Número de hab. Atendidos pela ETE; DA - determinação analítica da BE no esgoto; E - estabilidade no esgoto sanitário; D - descarga da urina no sistema sanitário; Am - tipo de amostragem do afluente sanitário da ETE.

Observa-se, na Figura 24, que a incerteza máxima associada ao cálculo da epidemiologia do esgoto é de 79%. Os desvios relacionados à estimativa da população atendida pela ETE e ao cálculo %BE correspondem às maiores contribuições à incerteza total do cálculo (79%). A incerteza da determinação analítica apresentou contribuição cerca de 30% menor, mas significativa, na incerteza total.

O valor de 79% de incerteza pode ser minimizado aprimorando-se as etapas da epidemiologia do esgoto. Para algumas delas, a incerteza está relacionada a desvios aleatórios e são extremamente difíceis de minimizar. A exemplo deste tipo de incerteza é a excreção metabólica, a qual é um parâmetro intrínseco de cada indivíduo. Por ser um dos fatores predominantes

na incerteza total, mesmo que a incerteza dos demais parâmetros fosse reduzida ao mínimo, a incerteza da excreção metabólica é em média 50%.

Apesar da incerteza da excreção metabólica ser irreduzível, métodos alternativos para inferir sobre o número de habitantes atendidos pelas ETE vêm sendo propostos (Lai *et al.*, 2011; Brewer *et al.*, 2012; Daughton, 2012). Geralmente, a população atendida é estimada a partir da medição da demanda bioquímica de oxigênio no aflente sanitário, da vazão e pulsos de descarga de efluente na rede coletora e, principalmente, a partir de dados recolhidos por meio de censos demográficos (Lai *et al.*, 2011; Castiglioni *et al.*, 2013). Uma alternativa que vem sendo proposta e utilizada por alguns autores é a determinação de biomarcadores no aflente sanitário, que apresentam consumo e excreção conhecidos, tais como alguns fármacos e creatinina. Minimizar a incerteza da estimativa da população parece ser o meio mais adequado e eficaz para reduzir a incerteza total da epidemiologia do esgoto, uma vez que juntamente com a excreção metabólica, é um dos fatores predominantes na incerteza total (Figura 24).

De maneira geral, a incerteza do cálculo da estimativa do consumo utilizando a epidemiologia do esgoto pode ser estimada de acordo com os procedimentos do método utilizados, e deve ser considerada para fins comparativos do consumo de cocaína em diferentes localidades.

CAPÍTULO IV -
OCORRÊNCIA DE COCAÍNA E BENZOILECGONINA EM
AMOSTRAS AMBIENTAIS

IV - 1. INTRODUÇÃO

Segundo o último levantamento realizado pelo sistema nacional de informações sobre saneamento (SNIS - 2013), apenas 48% do esgoto gerado no Brasil é coletado pelas companhias de saneamento básico. Dessa parcela coletada, apenas 39% recebem algum tratamento, demonstrando o elevado volume de esgoto sanitário lançado diretamente nos corpos d'água, sem qualquer tratamento prévio.

O despejo de esgoto sanitário nos corpos receptores tem como consequência o descarte de diversas substâncias utilizadas pela população, cujos efeitos deletérios à saúde humana e aos demais seres vivos ainda não são completamente elucidados. Dentre essas substâncias encontram-se as drogas ilícitas, as quais não estão inclusas nas legislações de saneamento vigentes e não são rotineiramente monitoradas pelas companhias de tratamento de esgoto e de águas. Como consequência, os corpos d'água e possivelmente as águas destinadas ao consumo humano são contaminadas por inúmeras substâncias.

Apesar das drogas ilícitas serem atualmente reconhecidas como possíveis contaminantes deletérios, a ocorrência em amostras de águas superficiais e em águas para consumo humano ainda é pouco explorada. Alguns trabalhos recentes têm encontrado a cocaína, droga ilícita objeto de estudo deste trabalho, em amostras de águas superficiais em concentrações na ordem de ng L^{-1} (Huerta-Fontela *et al.*, 2007.; Huerta-Fontela *et al.*, 2008b; Kasprzyk-Hordern *et al.*, 2009b; Kasprzyk-Hordern *et al.*, 2008b). Pesquisas voltadas ao conhecimento do cenário atual da contaminação dos mananciais brasileiros são escassas. Recentemente, um estudo relatou concentrações de BE entre 5 e 170ng L^{-1} em amostras de mananciais formadores da Bacia Hidrográfica do Rio Atibaia, localizada no estado de São

Paulo (Locatelli, 2011). Ao que se tem conhecimento, o estudo foi um dos trabalhos pioneiros no Brasil e veio enfatizar a importância de novas pesquisas voltadas para a problemática ambiental das drogas ilícitas no país.

Tendo em vista o exposto, este trabalho visou contribuir para o conhecimento da contaminação ambiental pela COC e BE no estado de São Paulo, ampliando a área estudada em relação ao trabalho anterior e acrescentando um estudo a respeito da eficiência de remoção pelos processos usuais de tratamento de esgoto sanitário.

IV - 2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Estudar a ocorrência de cocaína e benzoilecgonina em amostras ambientais aquosas coletadas em diferentes regiões no estado de São Paulo, e avaliar o cenário da contaminação ambiental de águas superficiais e de abastecimento público.

Objetivos específicos

- Avaliar o método analítico baseado em LC-MS/MS para a determinação de COC e BE em amostras ambientais aquosas;
- Obter dados sobre a remoção da COC e da BE em duas ETE de Campinas;
- Avaliar a ocorrência de COC e de BE em amostras de águas superficiais e de águas de abastecimento público coletadas em pontos amostrais localizados no estado de São Paulo.

IV - 3. PARTE EXPERIMENTAL

IV - 3.1. Amostragem e coleta das amostras ambientais

As amostras ambientais de interesse deste estudo são: esgoto sanitário (*i.e.* afluente e efluente sanitário), águas superficiais e água de abastecimento público.

IV-3.1.1. Amostras de esgoto sanitário

As ETE do município de Campinas elencadas para este estudo foram as mesma ETE descritas no capítulo anterior: ETE Capivari e ETE Anhumas. Os processos de tratamento utilizado nessas ETE são distintos, possibilitando um estudo sobre a eficiência de remoção dos analitos, por meio de diferentes processos de tratamento.

ETE Capivari: A ETE Capivari trata apenas esgoto sanitário doméstico. Após a etapa de tratamento pré-eliminar por gradeamento e remoção da areia, o processo de tratamento inicia-se com reatores de tratamento biológico anaeróbio (Reatores UASB), seguido de câmara anóxica(desnitrificação autotrófica e heterotrófica). Após esta etapa, filtros biológicos aerados submersos fazem o tratamento aeróbio do efluente do reator UASB. A desinfecção com hipoclorito finaliza o processo de tratamento, previamente ao lançamento do efluente no Rio Capivari. Em média, o tratamento é realizado em 21 horas, podendo variar de acordo com a vazão do aporte de afluente na ETE (SANASA, 201).

ETE Anhumas: A ETE Anhumas atende apenas esgoto sanitário doméstico. Após a etapa de gradeamento, o tratamento do afluente inicia-se com reatores de tratamento biológico anaeróbio (Reatores UASB). Em

seguida, ocorre a floculação química, e a flotação finaliza o processo de tratamento. O efluente tratado é lançado no ribeirão Anhumas. A desinfecção com hipoclorito não é utilizada nesta ETE. Em média, o TDH leva 20 horas, variável de acordo com a vazão do aporte de efluente na ETE.

IV-3.1.1.1. Coletas das amostras de esgoto sanitário

A Figura 25 ilustra os pontos de coleta do afluente e do efluente das ETE.

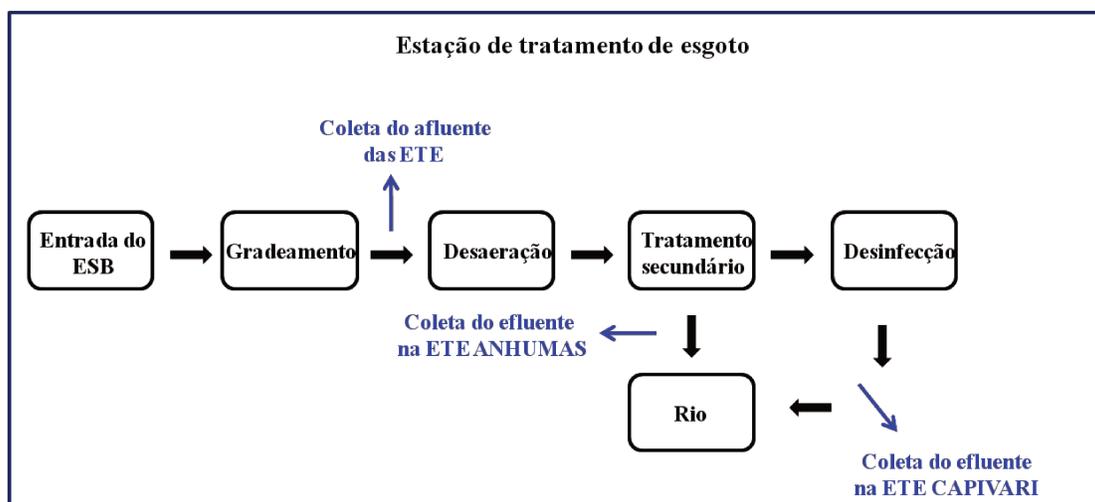


Figura 25. Ilustração dos pontos de coletas das amostras de efluente sanitário nas ETE

Em cada ponto de coleta realizou-se a amostragem cumulativa de 24 horas de afluente e de efluente das ETE. Após a coleta, as amostras foram transferidas para o laboratório e armazenadas sob refrigeração a 4 °C. Todas as amostras foram submetidas à SPE até 24 horas após a coleta.

As coletas de esgoto foram realizadas durante as campanhas de amostragem descritas no capítulo anterior, sendo duas campanhas em julho de 2013, incluindo a campanha semanal, e uma coleta em março de 2014, na segunda-feira de Carnaval (Tabela 3; pág. 43 deste trabalho).

Foram selecionados os principais rios formadores da Bacia do PCJ, assim como a bacia do Ribeirão do Pinhal, inserida na Bacia do PCJ, por abranger uma região predominantemente rural. A Bacia do Ribeirão do Pinhal localiza-se no município de Limeira-SP e tem 90% de sua área ocupada pelo plantio da cana-de-açúcar. Seus principais afluentes são o ribeirão Pires, o ribeirão Pinhal e ribeirão Tabajara, os quais formam a represa do Tatu.

Bacia Hidrográfica do Mogi-Guaçu: Esta Bacia está localizada na região nordeste do estado de São Paulo, sendo que ao sul faz divisa com a Bacia Hidrográfica do PCJ. Com uma extensão de 18.938 km², abrange municípios tais como Mogi-Guaçu e Mogi-Mirim e atende mais de 1.300.000 habitantes. O rio Mogi-Guaçu é o principal rio formador desta Bacia, tendo como principal afluente o rio Mogi-Mirim, ambos incluídos neste estudo.

A Figura 27 ilustra os rios e os pontos de coleta distribuídos nas Bacias Hidrográficas citadas. Amostras de águas foram coletadas em 17 pontos amostrais, distribuídos em 13 corpos d'água da Bacia do PCJ (simbolizados por um círculo em azul) e 2 corpos d'água localizados na Bacia de Mogi-Guaçu (simbolizados por um círculo em laranja).

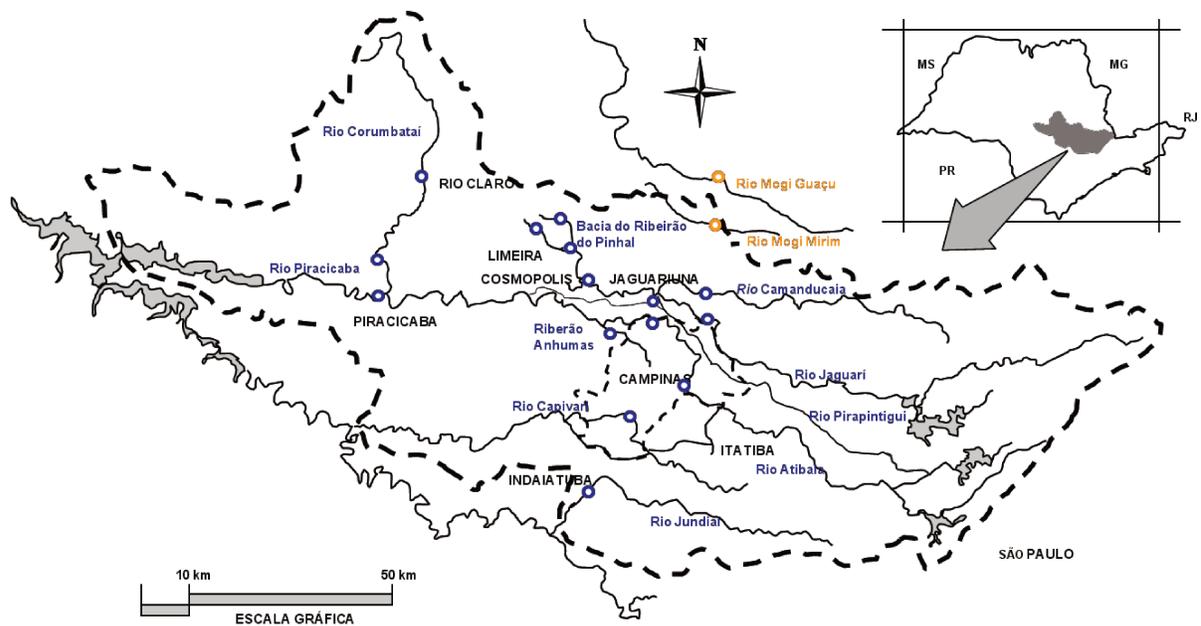


Figura 27. Ilustração da localização dos pontos de coleta das amostras de água superficial na Bacia Hidrográfica do PCJ e na Bacia Hidrográfica de Mogi-Guaçu

Realizaram-se duas campanhas amostrais: uma em fevereiro de 2014, em meio a um período de estiagem, e outra em setembro de 2014, no início do período chuvoso, embora tenha sido caracterizado por um período atípico, devido a pouca quantidade de chuva registrada na região (Defesa Civil, Campinas-SP). Somente no Rio Atibaia em Campinas-SP, foi realizada uma coleta em outubro de 2014. A Tabela 17 apresenta a localização dos pontos de amostragem e as datas das realizações de coleta.

Tabela 17. Locais dos pontos de coleta das amostras de águas superficiais da Bacia Hidrográfica do PCJ e data da realização das coletas.

Rio	Cidade	Campanha 1	Campanha 2
Ribeirão Pires	Limeira	24/02/2014	
Ribeirão do Pinhal	Limeira	24/02/2014	
Ribeirão Tabajara	Limeira	24/02/2014	
Represa do Tatu	Limeira	24/02/2014	
Rio Capivari	Campinas	14/02/2014	26/09/2014
Rio Atibaia	Campinas	14/02/2014	18/09/14; 17 e 23/10/14
Rio Atibaia	Jaguariúna		25/09/2014
Rio Jaguari	Cosmópolis	24/02/2014	
Rio Jaguari	Jaguariúna		25/09/2014
Rio Corumbataí	Rio Claro	26/02/2014	
Rio Corumbataí	Piracicaba	26/02/2014	25/09/2014
Rio Camanducaia	Jaguariúna	26/02/2014	25/09/2014
Ribeirão Anhumas	Campinas	26/02/2014	25/09/2014
Rio Piracicaba	Piracicaba	26/02/2014	25/09/2014
Rio Pirapitingui	Jaguariúna		25/09/2014
Rio Jundiá	Indaiatuba		26/09/2014
Rio MogiGuaçu	Mogi-Guaçu	26/02/2014	
Rio MogiMirim	Mogi-Mirim	26/02/2014	

Represa de Guarapiranga: A represa de Guarapiranga (Figura 28) situa-se na região sul do município de São Paulo e é abastecida pelos rios Guarapiranga, Embu-Mirim, Embu-Guaçu, Santa Rita, Vermelho, Ribeirão Itaim, Capivari e Parelheiros. Junto com a Represa Billings, abastece cerca de 4.900.000 pessoas das zonas sul e sudoeste da capital paulista. Ao todo, três pontos de diferentes graus de intervenção antrópica foram amostrados no

interior desta represa. As coletas foram realizadas nos dias 19 de fevereiro e 01 de outubro de 2014.



Figura 28. Represa de Guarapiranga

(Fonte: sabesp.com.br)

IV-3.1.2.1. Coletas das amostras de água superficiais

A coleta das amostras de águas superficiais foi realizada conforme o Guia de coleta da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) e conforme a ilustração da Figura 29. Utilizaram-se frascos de âmbar (1 L) para o transportadas amostras até o laboratório, os quais foram mantidos sob refrigeração ao longo do transporte. Uma vez no laboratório, as amostras foram mantidas a 4°C até o procedimento de preparo de amostra, o qual foi realizado até 24 horas após a coleta (CETESB, 2011).



Figura 29. Ilustração do procedimento de coleta das amostras de águas superficiais

IV-3.1.3. Amostras de águas de abastecimento público

Realizaram-se coletas de amostras de águas de abastecimento público em cinco municípios abastecidos pelos principais mananciais da Bacia Hidrográfica do PCJ. As amostras foram coletadas em fevereiro e setembro de 2014. Além destas campanhas de coleta, amostras de água tratada proveniente do rio Atibaia em Campinas-SP foram coletadas nos dias 17 e 23 de outubro de 2014 (Tabela 18)

Tabela 18. Locais dos pontos de coleta das amostras de águas de abastecimento público do estado de São Paulo e datas da realização das coletas.

Rio	Cidade	Campanha 1	Campanha 2
Jaguari	Limeira	24/02/2014	
Capivari	Campinas	14/02/2014	26/09/2014
Atibaia	Campinas	14/02/2014	18/09/14; 17 e 23/10/14
Ribeirão da cachoeira	Espírito Santo do Pinhal	16/02/2014	
Piracicaba	Santa Bárbara D'Oeste	23/02/2014	
Corumbataí	Piracicaba		25/09/2014

O procedimento de coleta foi realizado conforme o guia de coleta da CETESB, utilizando frascos de vidro âmbar, previamente descontaminados, com capacidade para 1 litro (CETESB, 2011).

IV - 3.2. Preparo das amostras ambientais

As extrações das amostras ambientais, cujos volumes empregados estão apresentados na Tabela 19, foram realizadas empregando cartuchos Oasis HLB (500 mg), seguindo o protocolo de extração apresentado no item III-3.3.2 (pág.44). Para a percolação das amostras pela fase extratora, utilizaram-se os sistemas para extração mostrados na Figura 30. O extrato seco resultante do protocolo de SPE foi dissolvido em 1 mL de solução BE-d₃ 100 µg L⁻¹, preparada em ácido fórmico 0,1%:ACN, 90:10 (v v⁻¹).

Tabela 19. Volume das amostras ambientais submetidos à SPE e à análise por LC-MS/MS

Amostra ambiental	Água de abastecimento	Água Superficial	Efluente Sanitário	Afluente sanitário
Volume de amostra (mL)	1000	1000	100	70

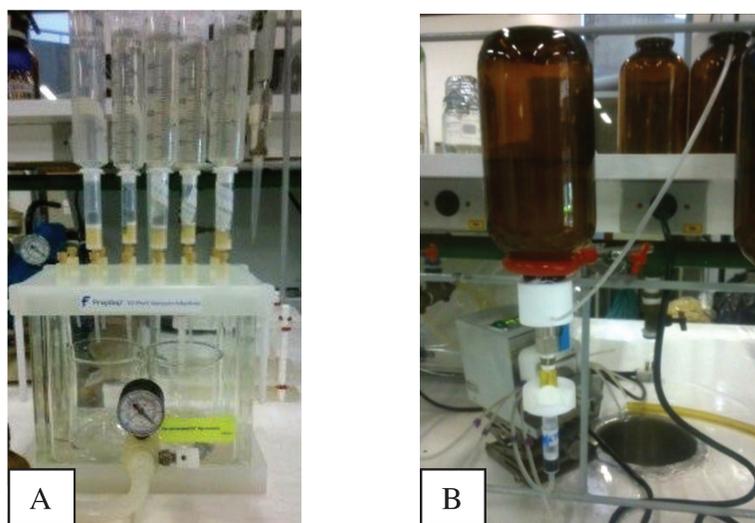


Figura 30. Sistemas utilizados para auxiliar a SPE das amostras ambientais: (A) SPE das amostras de efluente sanitário utilizando *Manifold* (PrepSep™) e seringas plásticas com capacidade para 70 mL e (B) SPE das amostras de águas superficiais e de abastecimento público utilizando bomba peristáltica, conectores de PTFE (Teflon®), válvula metálica e suportes universais.

IV - 3.3. Análise das amostras por LC-MS/MS

As amostras ambientais pré-concentradas foram analisadas empregando um método analítico baseado em LC-MS/MS, descrito no item III - 3.4. (pág. 45). Para a determinação de COC e de BE nas amostras de interesse, curvas analíticas por padronização interna foram construídas, empregando o padrão interno BE-d3 a $100 \mu\text{g L}^{-1}$.

O método analítico desenvolvido para a determinação de COC e BE nas amostras ambientais foi avaliado quanto à recuperação do processo de SPE, ao efeito matriz, à exatidão (eficiência do método analítico) e à precisão (repetibilidade e precisão intermediária), conforme procedimentos descritos no capítulo anterior. Na ausência de amostras certificadas e na indisponibilidade de se obter um branco das amostras ambientais, os ensaios para a avaliação do

método foram realizados por meio da adição dos padrões analíticos deuterados COC-d3 e BE-d3 às amostras ambientais de interesse.

IV - 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV - 4.1. Método analítico para determinação de cocaína e benzoilecgonina em amostras ambientais

A Tabela 20 apresenta as concentrações controles dos padrões deuterados COC-d3 e BE-d3 adicionados às amostras ambientais para a avaliação do método analítico.

Tabela 20. Concentrações controles utilizadas nos ensaios para avaliação do método analítico na determinação de cocaína (COC-d3) e benzoilecgonina (BE-d3) nas amostras ambientais:

Nível de concentração	Concentração Controle ($\mu\text{g L}^{-1}$)							
	Água de abastecimento		Água superficial		Efluente Sanitário		Afluente Sanitário	
	COC-d3	BE-d3	COC-d3	BE-d3	COC-d3	BE-d3	COC-d3	BE-d3
CC1*	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	1,5	5,0
CC2*	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	2,0	3,0	10,0

*n=2

IV-4.1.1. Recuperação dos compostos do processo de extração em fase sólida

A recuperação da COC-d3 e da BE-d3 no processo de extração em fase sólida está apresentada na Tabela 21.

Tabela 21. Recuperação da COC-d3 e BE-d3 no processo de SPE nas amostras ambientais em dois níveis de concentração.

Nível de concentração	Recuperação no processo de SPE (%)							
	Amostras ambientais							
	Água de Abastecimento		Água superficial		Efluente Sanitário		Afluente Sanitário	
	COC-d3	BE-d3	COC-d3	BE-d3	COC-d3	BE-d3	COC-d3	BE-d3
CC1*	100	99	100	90	87	93	87	96
CC2*	99	98	91	91	92	98	92	97

*n=2

Para ambos analitos, a recuperação variou entre 87 e 100%, considerando os dois níveis de concentração estudados. Observou-se que a recuperação, tanto para a COC como para a BE, foi similar para todas as amostras ambientais (entre 87 e 100%).

Os resultados obtidos demonstram que os cartuchos HLB responderam de forma adequada para SPE da COC e BE nas amostras ambientais, pois apresentou recuperação entre os limites aceitáveis pela literatura (*i.e.* entre 70 e 120%)

IV-4.1.2. Avaliação do efeito matriz

Na Tabela 22 está apresentado o efeito matriz sobre os analitos, expresso em porcentagem, nas concentrações mencionadas na Tabela 20.

Tabela 22. Efeito matriz para os padrões analíticos COC-d3 e BE-d3 nas amostras ambientais em dois níveis de concentração.

Nível de concentração	Efeito matriz (%)							
	Amostras ambientais							
	Água de abastecimento		Água superficial		Efluente Sanitário		Afluente Sanitário	
	COC-d3	BE-d3	COC-d3	BE-d3	COC-d3	BE-d3	COC-d3	BE-d3
CC1	-22	-15	-25	-11	-24	-19	-20	-25
CC2	-14	-10	-15	-8	-20	-15	-24	-19

O efeito matriz ocasionou a supressão de ionização dos analitos, e variou entre 8 e 25%, considerando todas as amostras ambientais estudadas e os dois níveis de concentração avaliados. Esse efeito matriz é característico de compostos básicos polares na ionização por ESI (Bonfiglio *et al.*, 1999 *apud* Cassiano *et al.*, 2009), principalmente em amostras complexas como o caso das amostras ambientais. Para contornar esse efeito matriz e garantir a confiabilidade dos resultados obtidos, a quantificação das substâncias foi realizada por meio da curva analítica de calibração interna.

IV-4.1.3. Exatidão e precisão do método analítico

Na Tabela 23 está apresentada a exatidão do método, reportada como eficiência do método analítico, para a COC-d3 e para a BE-3, nos dois níveis de concentração estudados, bem como a repetitividade (precisão intra-corrída), expressa como coeficiente da variação.

Tabela 23. Exatidão do método analítico e repetitividade para a determinação da COC-d3 e da BE-d3 nas amostras ambientais, em dois níveis de concentração.

Nível de concentração	Eficiência do método analítico (CV)							
	Amostras ambientais							
	Água de abastecimento público		Água superficial		Efluente Sanitário		Afluente sanitário	
	COC-d3	BE-d3	COC-d3	BE-d3	COC-d3	BE-d3	COC-d3	BE-d3
CC1*	77(9)	85 (3)	69(8)	97(3)	70(5)	70(4)	70(5)	72(6)
CC2**	80 (1)	96 (1)	79 (2)	85(2)	77(3)	76(2)	70(3)	78(3)

*n=6

**n=3

A exatidão do método analítico variou entre 69 e 97%, considerando todas as amostras ambientais e os dois níveis de concentração avaliados. Como mostrado anteriormente, a exatidão do método foi influenciada tanto pela recuperação do processo de SPE como pelo efeito matriz de supressão de ionização. Os valores encontram-se dentre os limites aceitáveis para determinações em baixas concentrações (entre 70 e 120%, com precisão superior a 80%), demonstrando a aplicabilidade do método para a determinação de COC e BE nas amostras de interesse (GARP, 1999 apud Ribani *et al.*, 2004).

OCV para a repetitividade do método analítico foi menor do que 10% no nível de concentração CC1 e menor do que 5% no nível CC2. Para a precisão intermediária (Tabela 24) o coeficiente de variação foi menor do que 15%, no nível de concentração CC1.

Tabela 24. Precisão intermediária (inter-corrída) para a determinação de COC-d3 e BE-d3 nas amostras ambientais no nível baixo de concentração

Nível de concentração	Precisão intermediária, %							
	Amostras ambientais							
	Águas para abastecimento		Águas Superficiais		Efluente Sanitário		Afluente sanitário	
	COC-d3	BE-d3	COC-d3	BE-d3	COC-d3	BE-d3	COC-d3	BE-d3
CC1*	6	3	4	11	10	5	11	3

*n=3

Valores de exatidão próximos de 100% são desejáveis, porém, aceitam-se valores entre 70 e 120%, com coeficiente de variação de até 20%, ou entre 50 e 120%, com coeficiente de variação de até 15% (Ribani *et al.*, 2004). Com base nos dados da eficiência do método e da precisão apresentados, o método analítico para a determinação de COC e BE apresentou-se dentro dos limites aceitáveis, assegurando assim a confiabilidade dos resultados gerados.

IV-4.1.4. Linearidade e faixa de trabalho

Como o efeito matriz pode apresentar variações em função da complexidade da matriz, interferindo na precisão da determinação entre diferentes amostras de uma mesma matriz ambiental, a determinação da COC e da BE foi realizada por padronização interna. Na Tabela 25 estão apresentados a linearidade da curva analítica, o LD e LQ instrumentais, calculados conforme Miller & Miller (2005). Duas faixas de concentração foram utilizadas para a determinação de COC e de BE, dependendo da concentração dos analitos nas amostras. As faixas de trabalho foram estabelecidas a partir do LQ da curva analítica.

Tabela 25. Parâmetros analíticos das curvas de calibração interna para a cocaína e para a benzoilecgonina

Parâmetros	COC	BE
$t_R(\text{min})$	8,3	7,8
Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,5-150 / 150-1000	0,5-150 / 150-1000
R^2	0,999 / 0,998	0,999/0,999
LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2	2
LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	6 / 162	5 / 174
Faixa de trabalho	6-150 / 162-1000	5-150 / 174-1000

IV - 4.2. Ocorrência de cocaína e benzoilecgonina em amostras de afluentes e efluentes sanitários de ETE: avaliando a eficiência de remoção nas ETE

A Figura 31 mostra a frequência de detecção e os níveis de COC e de BE encontrados nas amostras de afluentes e efluentes sanitários da ETE Anhumas e da ETE Capivari, provenientes das campanhas amostrais descritas anteriormente. Considerando as duas ETE estudadas, analisaram-se 18 amostras de esgoto doméstico.

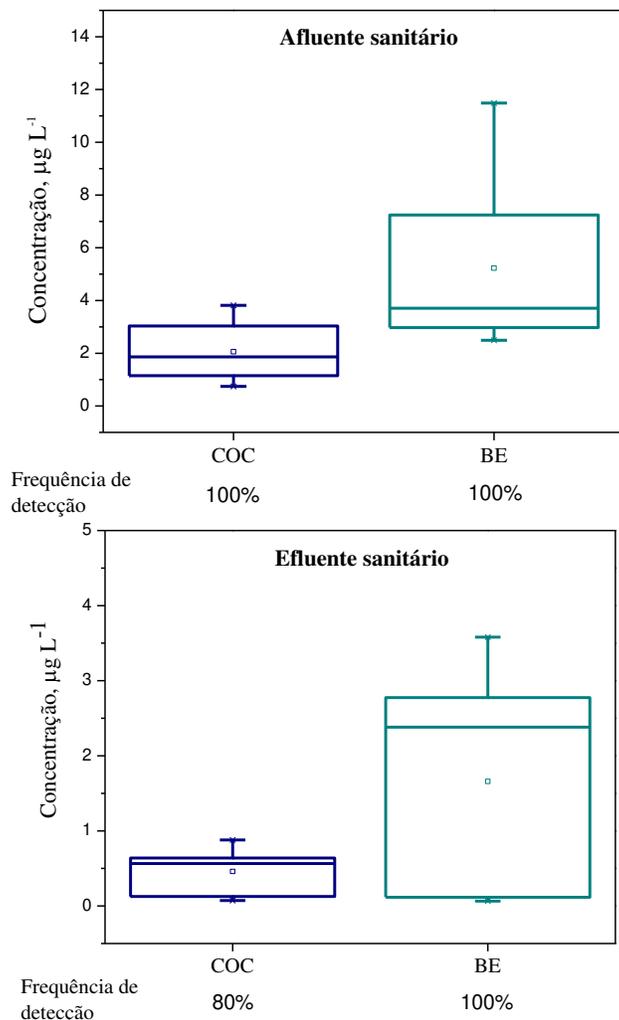


Figura 31. Frequência de detecção e concentrações de COC e BE determinadas nas amostras de afluente e efluente sanitário da ETE Capivari e da ETE Anhumas durante as campanhas amostrais; n=17.

ACOC foi encontrada em 100% das amostras de afluente, e em 80% das amostras de efluente sanitário analisadas. Enquanto que a BE apresentou uma frequência de detecção de 100% em ambas amostras. Os níveis encontrados para a COC foram, em média, 5 vezes maiores no afluente do que os níveis mensurados no efluente sanitário. Para a BE, essa diferença foi em média de 4 vezes, o que pode estar relacionada a degradação durante o tratamento de esgoto.

A Figura 32 mostra as concentrações de COC e de BE determinadas nas amostras de afluente e efluente sanitário das ETE, durante as três campanhas de amostragem. Cada amostra está identificada pelo dia da semana, seguido da letra C e do número referente a campanha 1, 2 ou 3.

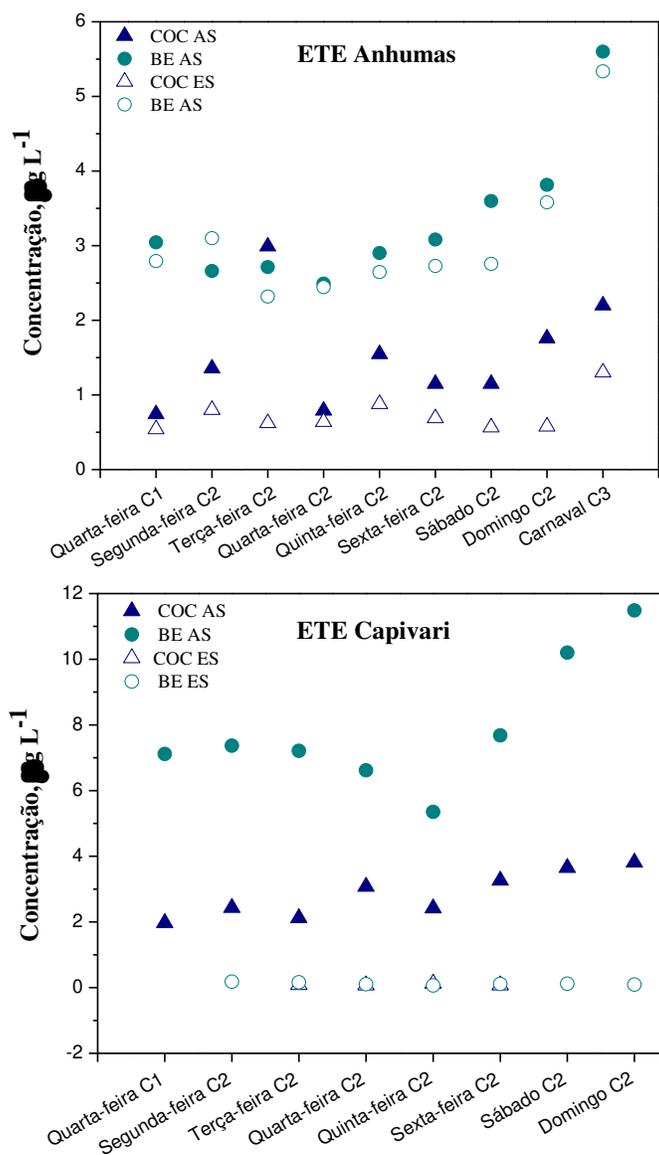


Figura 32. Concentrações para cocaína (triângulos em azul escuro) e benzoilecgonina (círculos em cinza) nas amostras de afluente sanitário (AS - símbolos fechados) e de efluente sanitário (ES - símbolos abertos) da ETE Anhumas e da ETE Capivari, nas três campanhas de amostragem – C1, campanha 1; C2, campanha 2 e C3, campanha 3.

Através da Figura 32 é possível verificar variações nos níveis encontrados para a BE entre as diferentes campanhas de amostragem: entre a campanha 1 (quarta-feira C1) e a campanha 2, considerando o mesmo dia da semana (quarta-feira C2), os níveis de BE e de COC foram similares nas amostras de efluente e de afluente sanitário, coletadas nas duas ETE. Na semana de Carnaval, os níveis de BE foram entre 40 e 50% maiores do que na semana de julho de 2013 (campanha 2).

Os resultados apresentados mostraram que em um mesmo mês as variações nos níveis de BE e de COC não foram significativas, mas observou-se uma variação sazonal entre a campanha 2 e a campanha 3 nas amostras de afluente sanitário das duas ETE, a qual provavelmente está associada ao evento festivo do Carnaval (campanha 3). No período de realização da campanha 3, a Defesa Civil de Campinas registrou um período de estiagem atípico. Entre 01/01/2014 e 30/9/2014, foram registrados apenas 21 dias com chuvas, totalizando 141,7 mm. Isso significa precipitação mensal inferior àquelas observadas em períodos típicos de seca na região, quando a precipitação mensal é inferior a 50 mm (CEPAGRI/UNICAMP, 2015).

Precisamente nos dias de coleta, durante a campanha 2 e a campanha 3, não foram observadas precipitações na região. Conclui-se que as variações observadas refletem, provavelmente, alterações na quantidade de droga consumida entre um período e outro.

Observa-se ainda que os níveis de BE e de COC encontrados no afluente da ETE Capivari foi praticamente o dobro dos níveis encontrados no afluente da ETE Anhumas. Em contrapartida, os níveis no efluente da ETE Capivari foram até 5 vezes menores àqueles observados no efluente da ETE Anhumas. Essas variações estão relacionadas à prevalência de cocaína nas diferentes localidades do município de Campinas estudadas, como apresentado

no capítulo III deste trabalho, e aos processos de tratamento desiguais empregados em cada uma das ETE. Diferentes processos de tratamento podem resultar na degradação/remoção das substâncias com maior ou menor eficiência.

A Figura 33 mostra a eficiência de remoção expressa em porcentagem (ER) para a COC e para a BE na ETE Anhumas e na ETE Capivari (Equação 8), ao longo de uma semana (campanha 2). Para o cálculo, compararam-se as concentrações dos analitos encontradas nas amostras de afluente sanitário, com aquelas determinadas nas amostras de efluente sanitário, coletadas após um TDH médio de 24 horas. O cálculo foi aplicado para as amostras coletadas em ambas as ETE de interesse.

$$\text{Equação 8} \quad \%ER = \left[\left(\frac{\text{Concentração no efluente da ETE}}{\text{Concentração no afluente da ETE}} \right) - 1 \right] \times 100$$

Observa-se na Figura 33, que os diferentes tratamentos utilizados em cada uma das ETE apresentaram eficiências de remoção distintas, tanto para a COC, como para a BE. Na ETE Anhumas a eficiência de remoção variou entre 20 e 70% (média de 55%) para COC e entre 2 e 50% (média de 8%) para a BE, considerando as três campanhas amostrais. Na ETE Capivari a eficiência de remoção manteve-se praticamente constante entre 95 e 97%, para ambos analitos. Esses resultados indicam a influência do processo de tratamento na eficiência de remoção dos analitos.

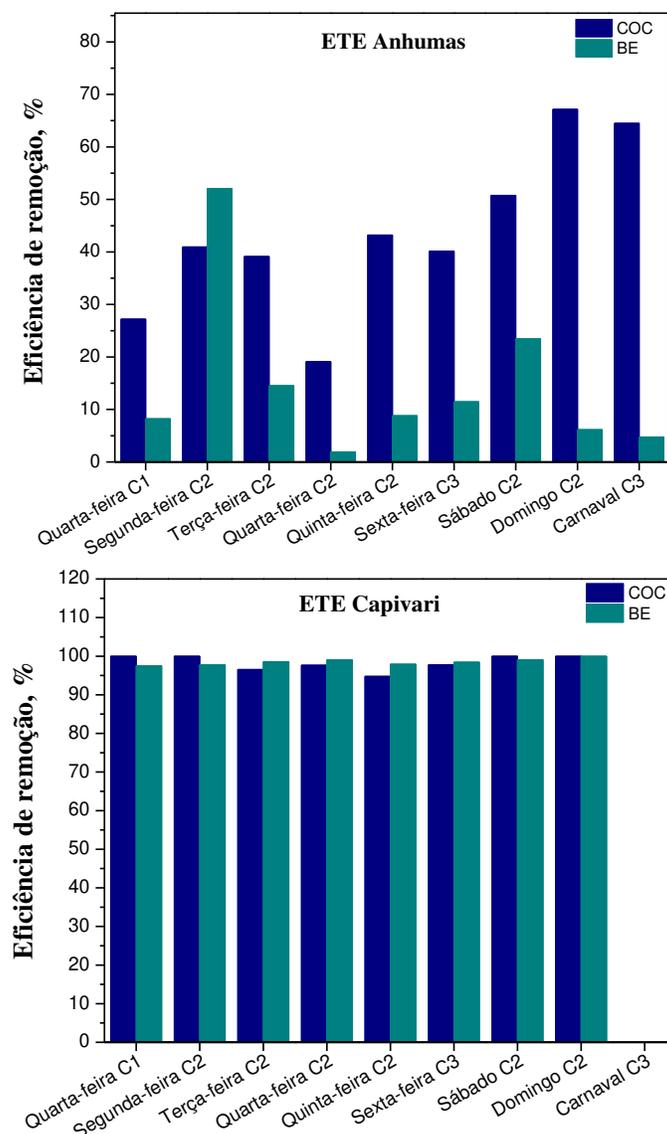


Figura 33. Eficiência de remoção para a COC e para a BE na ETE Anhumas e na ETE Capivari, durante as três campanhas amostrais: C1, campanha 1; C2, campanha 2 e C3, campanha 3

A ETE Anhumas e a ETE Capivari diferem, basicamente, no processo de tratamento secundário e no TDH do tratamento completo: na ETE Anhumas, o tratamento secundário consiste de tratamento físico-químico, com 21 horas de TDH, e na ETE Capivari, consiste de tratamento anaeróbio, seguido de tratamento aeróbio, totalizando 21 horas de TDH. Como foi considerado um TDH médio de 24 h, existe uma incerteza associada ao

cálculo da ER apresentado neste trabalho. Entretanto, para a ETE Anhumas, a qual apresentou os valores mais baixos de ER, a incerteza do cálculo é mínima, considerando que o TDH médio da ETE é 21 horas.

A eficiência de remoção observada na ETE Anhumas para a COC e BE foram as mais baixas observadas entre os valores reportados em trabalhos disponíveis na literatura. Um estudo realizado por e Huerta-Fontela *et al.*(2008b), o qual avaliou ETE da Espanha, reportou ER superiores a 88% para ambos os compostos. Na Irlanda, a ER da BE foi superior a 90%, enquanto para a COC, a ER foi aproximadamente de 70% (Boneset *al.*, 2007). Eficiências de remoção menores foram observadas para a COC no estudo conduzido por Postigo *et al.* (2010) em diferentes cidades da Espanha. Nesse estudo, a ER reportada foi de 65% para a COC e maiores do que 80% para a BE.

A maior porcentagem de remoção observa para a ETE Capivari, a qual utilizada reator aeróbio no tratamento, está relacionada aos processos envolvidos na degradação da cocaína. A remoção da COC e da BE durante o tratamento de esgoto ocorre, principalmente, por reações de hidrólise química nos grupos ésteres, em função do pH alto do meio. Tais reações são catalisadas pela ação de micro-organismos aeróbios dos processos das ETE. A adsorção destes analitos no material particulado suspenso ou no lodo do afluente é inferior a 2%, em decorrência da elevada solubilidade em água nas condições do meio. Esta adsorção não é significativa na remoção da cocaína frente à degradação aeróbia (Thaiet *al.*, 2014 Bijlsma *et al.*, 2014).

IV - 4.3. Cocaína e benzoilecgonina em águas superficiais

Os níveis de COC e BE encontrados nas amostras de águas superficiais, provenientes das duas campanhas amostrais, estão apresentados

na Tabela 26. As amostras dos rios/ribeirões localizados nos municípios estudados estão identificadas pela cidade e pelo nome do rio/ribeirão, e estão agrupadas de acordo com a Bacia Hidrográfica ou Represa.

Considerando as duas campanhas amostrais, a BE foi detectada em 24 das 30 amostras, e a COC em 15 delas. Isso corresponde a uma frequência de detecção de 80% para a BE e de 43% para cocaína. Nas amostras positivas para BE e para COC, os níveis encontrados de BE (entre 10 e 1019 ng L⁻¹) foram maiores do que os níveis de COC (entre 6 e 62ng L⁻¹), corroborando com os resultados encontrados nas amostras de esgoto sanitário.

Os níveis para BE determinados nos rios e ribeirões do estado de São Paulo amostrados foram mais elevados do que aqueles encontrados em rios europeus. Em amostras do Rio Ebro coletadas em pontos distribuídos em todo o leito do rio, por exemplo, a BE foi encontrada em concentrações entre 0,1 e 350 ng L⁻¹ (Postigo *et al.*, 2010). Na Bélgica, os níveis de BE em amostras de águas superficiais coletadas em 28 rios variaram entre 2 e 530 ng L⁻¹ (van Nuijs *et al.*; 2009a). Na Itália, a concentração média encontrada para a BE foi 22 ± 12 ng L⁻¹ no rio Arno e 4 ± 2 ng L⁻¹ no rio Po (Zuccato *et al.*, 2008).

Tabela 26. Concentração de COC e BE determinada nas amostras de águas superficiais

Cidade	Amostra	Concentração (ng L ⁻¹)			
		Campanha 1		Campanha 2	
		BE	COC	BE	COC
Bacia do Ribeirão do Pinhal					
Limeira	Pires	10	NQ	n. c.	n. c.
	Pinhal	ND	NQ	n. c.	n. c.
	Tabajara	<NQ	NQ	n. c.	n. c.
	Tatu	<NQ	NQ	n. c.	n. c.
Bacia do PCJ					
Campinas	Capivari	522	NQ	127	10
	Atibaia	292	8	70	8
	Anhumas	655	12	305	13
Jaguariúna	Atibaia	n. c.	n. c.	ND	ND
	Camanducaia	143	7	64	ND
	Jaguari	n. c.	n. c.	37	ND
	Pirapitingui	n. c.	n. c.	ND	ND
Cosmópolis	Jaguari	95	8	n.c	n. c.
Rio Claro	Corumbataí	284	40	n.c	n. c.
Piracicaba	Corumbataí	117	6	57	10
	Piracicaba	1019	21	55	ND
Indaiatuba	Jundiaí	n. c.	n. c.	90	10
Bacia do Mogi Guaçu					
Mogi-Guaçu	MogiGuaçu	47	NQ	27	ND
Mogi-Mirim	MogiMirim	329	62	307	48
Espírito Santo do Pinhal	Cachoeira	10	ND	ND	ND
Represa de Guarapiranga					
São Paulo	Guarapiranga	58	9	10	ND

n. c.: amostra não coletada

NQ: analito detectado abaixo do limite de quantificação

ND: analito não detectado pelo método analítico

Os níveis de BE e COC apresentaram grande variação, sendo que as maiores concentrações foram observadas nas regiões urbanas servidas pelos principais rios da Bacia do PCJ, tais quais: rios Capivari, Anhumas e Atibaia em Campinas e rio Piracicaba, no município de Piracicaba. De acordo com o relatório de águas superficiais de 2013 da CETESB (CETESB, 2014), esses rios receberam grande quantidade de esgoto sanitário em seus leitos, sejam eles tratados ou não, justificando os altos níveis de BE encontrados. As variações nas concentrações de BE nesses rios concordam com a variação na qualidade das águas superficiais registradas pela companhia. Em 2013, a CETESB registrou a ocorrência de concentrações muito baixas de oxigênio dissolvido e de elevadas concentrações de matéria orgânica no leito do rio Capivari, em Campinas. O rio Atibaia, em Paulínia, foi classificado como de qualidade ruim pela companhia, onde foi registrado o pior cenário de poluição do rio. No rio Piracicaba, a maior descarga de matéria orgânica foi observada em fevereiro de 2013, quando foi registrada carga diária de DBO (demanda bioquímica de oxigênio) na ordem de 16000 kg h^{-1} , contra 2000 kg h^{-1} em setembro do mesmo ano, e também quando foi registrada a maior concentração de BE ($>1000 \text{ ng L}^{-1}$).

Somente em uma das amostras coletadas na região rural da Bacia do Ribeirão do Pinhal foi detectada a presença de BE. Contudo, a concentração encontrada foi até 100 vezes menor em relação às regiões urbanas. Na Bacia do Mogi-Guaçu e na Represa de Guarapiranga, a BE foi determinada em concentrações inferiores a 100 ng L^{-1} , com exceção da amostra do Rio Mogi Mirim, onde a BE foi determinada em concentrações próximas daquelas observadas nos principais Rios da Bacia do PCJ (329 ng L^{-1}).

Apenas em 10 dos 22 pontos amostrais foram coletadas águas superficiais durante as duas campanhas. E avaliando as concentrações

encontradas nesses 10 pontos amostrais, variações sazonais foram observadas em alguns dos pontos estudados. Como exemplo deste comportamento, as amostras de águas superficiais coletadas no rio Atibaia em Campinas, no mês de outubro de 2014 (58 ng L^{-1}), apresentaram concentrações de BE ligeiramente menores do que aquelas observadas em setembro do mesmo ano (80 ng L^{-1}). E aproximadamente 5 vezes menor em comparação à concentração determinada em fevereiro de 2014 (292 ng L^{-1}). Essa variação sazonal corresponde à alteração na qualidade das águas registrada pela CETESB em 2013. No rio Mogi Mirim não se observou alterações significativas nas concentrações de BE e de COC entre as campanhas amostrais de fevereiro e setembro de 2014 (Tabela 26) (CETESB, 2014).

Os resultados apresentados mostram altos níveis de BE encontrados nas amostras de águas superficiais do estado de São Paulo em relação àqueles encontrados em diferentes regiões da Europa, embora grandes variações sazonais tenham sido observadas. Esses altos níveis de BE confirmam a influência do aporte de esgoto sanitário nos mananciais sem o tratamento prévio adequado e ressaltam a importância do saneamento básico para evitar o comprometimento dos corpos d'água brasileiros.

IV - 4.4. Cocaína e benzoilecgonina em águas de abastecimento público

Os níveis de COC e BE encontrados nas amostras de águas de abastecimento público estão apresentados na Tabela 27.

Tabela 27. Concentração de cocaína e benzoilecgonina determinada nas campanhas amostrais de águas de abastecimento público em pontos da Bacia do PCJ e da Bacia do Mogi-Guaçu.

Cidade	Amostra	Concentração (ng L ⁻¹)			
		Campanha 1		Campanha 2	
		BE	COC	BE	COC
Bacia do PCJ					
Limeira	Jaguari	62	NQ	n.c	n.c.
Campinas	Capivari	652	22	105	NQ
Campinas	Atibaia	394	14	89	6
Santa Bárbara do Oeste	Piracicaba	10	NQ	n.c.	n.c.
Piracicaba	Corumbataí	n.c	n.c	60	NQ
Bacia do Mogi-Guaçu					
Espírito Santo do Pinhal	Cachoeira	NQ	NQ	n.c	n.c

n. c.: amostra não coletada

NQ: analito detectado abaixo do limite de quantificação

Observa-se que a BE foi determinada em quatro dos cinco pontos amostrados na Bacia do PCJ, enquanto que a presença da COC foi determinada em dois deles. Nas amostras positivas para os analitos, os níveis encontrados foram próximos daqueles observados em águas superficiais (média 215 ng L⁻¹ e 19 ng L⁻¹ para BE e COC, respectivamente), indicando que os tratamentos adotados nas ETA da região de Campinas não removem adequadamente estes compostos.

Para as amostras positivas para BE e COC, os níveis encontrados de BE foram, em média, 30 vezes mais elevados do que aqueles encontrados para a COC. Os níveis mais elevados de BE foram encontrados nas amostras de águas de abastecimento público dos rios Capivari e Atibaia, coletas em pontos localizados no município de Campinas. Variações nos níveis de BE e de COC encontrados nas amostras oriundas de diferentes campanhas amostrais também

foram observadas. As amostras de águas de abastecimento público coletadas em fevereiro de 2014 apresentaram concentrações aproximadamente 5 vezes mais elevadas do que aquelas encontradas nas amostras coletadas em setembro de 2014, concordando com os resultados obtidos nas águas superficiais da região.

Poucos trabalhos na literatura reportam a ocorrência de cocaína em amostras de águas de abastecimento público. Mendoza *et al.*, 2014 investigaram a ocorrência de drogas ilícitas, incluindo a cocaína, em amostras de águas de abastecimento públicos coletadas em Madri, entretanto, os analitos não foram determinados nessas amostras. Boleda *et al.*, (2011) conduziram um estudo com 50 amostras de águas de abastecimento público da Europa, América do Sul (Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, Panamá, Peru e Uruguai) e Japão. A BE foi encontrada em 46% das amostras analisadas neste trabalho, em concentrações entre $0,2 \text{ ng L}^{-1}$, na Europa, e 15 ng L^{-1} na América do Sul. No Japão, a cocaína e metabólitos não foram detectados.

CAPÍTULO V - CONCLUSÃO

O desenvolvimento deste trabalho teve como foco a utilização da epidemiologia do esgoto para inferir sobre o consumo sazonal de cocaína em diferentes regiões socioeconômicas de Campinas, abordando também um estudo sobre a incerteza envolvida no cálculo da excreção metabólica da cocaína, a qual é fundamental para estimar o consumo dessa droga usando esta ferramenta. Para o Brasil, segundo maior consumidor de cocaína no mundo, este trabalho veio aprimorar essa nova metodologia para a realidade do país, na expectativa de gerar dados que norteassem o mapeamento de locais de distribuição de cocaína, a estimativa do consumo da cocaína *crack*, além da estimativa das fontes de incerteza associada ao cálculo do consumo de cocaína pela epidemiologia do esgoto.

Em colaboração com o CCI do HC/UNICAMP, estudou-se um número representativo de amostras de urina de usuários da droga, o que permitiu avaliar as variações da proporção entre o metabólito majoritário da cocaína (BE) e seus demais metabólitos excretados na urina por diferentes indivíduos, e em função de diferentes vias de administração da droga (IN e EV, fumada ou com bebida alcoólica). Embora diversos fatores, tais como o procedimento de amostragem do afluente sanitário, o método analítico utilizado na determinação da BE, a estimativa da população atendida pela ETE, dentre outros, também interferem nos resultados obtidos pelo cálculo da epidemiologia do esgoto, a razão entre a BE e os demais metabólitos apresentou um desvio próximo de 50%.

A incerteza total resultante de todas as fontes identificadas na epidemiologia do esgoto foi influenciada principalmente pelo desvio do cálculo da razão metabólica da droga e pela estimativa da população atendida pela ETE, e atingiu 79%. Esse valor é bastante expressivo no resultado final obtido. Enquanto o desvio associado à excreção urinária é inerente aos

aspectos metabólicos, portanto inevitável, procedimentos que estimem a população atendida pela ETE de forma mais precisa podem ser aperfeiçoados. Um exemplo seria o monitoramento de biomarcadores bem estabelecidos da excreção humana, como um determinado fármaco que tenha seu comportamento e prescrição conhecidos. De maneira geral, ao se conhecer a incerteza do resultado final do consumo de cocaína *per capita*, é possível comparar os dados obtidos entre diferentes regiões e países e, assim, gerar informações úteis para o direcionamento das políticas públicas antidrogas.

O método analítico utilizado neste trabalho para a determinação de BE e COC nas amostras analisadas proporcionou resultados confiáveis, ainda que não tenha atendido aos limites aceitáveis para a determinação do metabólito da cocaína consumida sob a forma de pasta base (*crack*), o AE. Assim, muito embora tenham sido gerados os dados sobre a relação BE/COC, a qual pode sugerir a localização de pontos de distribuição da droga na região atendida pela ETE estudada, este mesmo conjunto não permitiu inferir sobre o consumo específico da cocaína *crack* usando o AE como biomarcador. Métodos de extração em fase sólida mais seletivos para esse composto podem ser desenvolvidos, permitindo assim um estudo futuro específico sobre o consumo de *crack* entre diferentes regiões brasileiras. Quanto ao consumo da droga, seja ela na forma de pó ou de pasta base, o uso da epidemiologia do esgoto possibilitou a comparação da prevalência de uso da cocaína entre diferentes regiões socioeconômicas do município de Campinas e em diferentes sazonalidades.

A determinação dos biomarcadores da cocaína em amostras de afluentes sanitários das ETE pode ser considerada uma ferramenta alternativa aos métodos oficiais para a obtenção de dados sobre o consumo da droga, de maneira rápida, de cunho social e investigativo. A exemplo da versatilidade da

aplicação da epidemiologia do esgoto, esta ferramenta pode ser usada na estimativa da quantidade da droga em circulação, no perfil do consumo entre diferentes regiões socioeconômicas, bem como no mapeamento de locais de refino e distribuição da droga, informações úteis para o desenvolvimento e direcionamento de ações antidrogas em tempo real. Todavia, para o Brasil, a utilização dessa abordagem ainda é limitada pelos baixos índices de coleta e de tratamento do esgoto sanitário gerado no país. Sem um investimento intenso realizado pelo Estado na área de saneamento, a implementação da epidemiologia do esgoto de maneira universal fica impossibilitada no Brasil.

O desenvolvimento deste trabalho também teve como foco a problemática ambiental da cocaína no estado de São Paulo. Muito embora um maior número de ETE precise ser estudado, a fim de se conhecer a eficiência dos tratamentos de esgoto utilizados, foram verificados baixos índices de remoção da COC e da BE em uma das maiores ETE do interior do estado de São Paulo, apresentando, ao que se tem conhecimento, os menores índices de remoção observados entre os trabalhos disponíveis na literatura. Constatou-se ainda uma alta frequência de detecção e elevadas concentrações de COC e principalmente de BE em várias amostras de águas superficiais e de abastecimento do estado de São Paulo. Embora não sejam os primeiros dados levantados sobre a ocorrência destas substâncias em águas superficiais brasileiras, o trabalho ampliou a área de estudo, abordando os principais rios e mananciais do estado de São Paulo, além de ter gerado os primeiros dados sobre a contaminação pela cocaína de águas de abastecimento públicos do estado.

Observou-se um cenário de contaminação preocupante em alguns pontos estudados. Embora o conhecimento sobre a ecotoxicidade da BE aos organismos aquáticos e ao ser humano não permite ainda inferir sobre a

gravidade da sua ocorrência nas amostras ambientais, os níveis de concentração determinados nas amostras de águas chegaram a ser 100 vezes maiores do que em outros países como Espanha e Itália. Esses resultados atentam para a necessidade por aprimoramento do saneamento básico do Brasil, sendo que o despejo direto de esgoto sanitário ou mesmo de efluentes de ETE com baixa eficiência implica na contaminação dos corpos d'água e dos mananciais e, conseqüentemente, na contaminação das águas de abastecimento público.

Ressalta-se que a contaminação ambiental constatada pela presença de drogas ilícitas tende a se agravar caso a escassez do saneamento básico e a baixa eficiência das ETE e das ETA persista ao longo dos anos, principalmente em períodos prolongados de seca, como o período vivido na região Sudeste do país nos últimos 2 anos. A escassez de chuvas tende a causar uma deterioração ainda maior nos corpos d'água, devido à diminuição da vazão dos rios, o que não é acompanhada pela diminuição proporcional da descarga de esgoto sanitário, dentre outros fatores, aumentando o risco aos organismos aquáticos e à saúde humana. Além disso, o estresse hídrico vem estimulando o desenvolvimento de projetos para a utilização de águas de reuso para o abastecimento das grandes cidades, intensificando a exposição humana a essas substâncias. Embora sejam substâncias “proibidas”, as drogas ilícitas fazem parte da sociedade atual, e por não serem legisladas em águas naturais e de abastecimento público, fazem parte desta ampla classe de substâncias consideradas contaminantes emergentes, demandando um estudo mais aprofundado e que vise à proteção da saúde humana e de outros organismos vivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ambre, J. The urinary excretion of cocaine and metabolites in humans: a kinetic analysis of published data. *Journal of Analytical Toxicology* 9 (1985) 241- 245.
- Annesley T. M. Ion Suppression in Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry* 49:7 (2003) 1041 - 1044.
- Baker D. R.; Kasprzyk-Horderna, B. Multi-residue analysis of drugs of abuse in wastewater and surface water by solid-phase extraction and liquid chromatography–positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1218 (2011a) 1620 - 1631.
- Baker, D. R.; Kasprzyk-Hordern, B. Critical evaluation of methodology commonly used in sample collection, storage and preparation for the analysis of pharmaceuticals and illicit drugs in surface water and wastewater by solid phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1218(2011b) 8036 - 8059.
- Berset, J-D.; Brenneisen, R.; Mathieu, C. Analysis of licit and illicit drugs in waste, surface and lake water samples using large volume direct injection high performance liquid chromatography – Electrospray tandem mass spectrometry (HPLC–MS/MS). *Chemosphere* 81 (2010) 859 - 866.
- Bijlsma, L.; Sancho, J. V.; Pitarch, E.; Ibáñez M.; Hernández, F. Simultaneous ultra-high-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry determination of amphetamine and amphetamine-like stimulants, cocaine and its metabolites, and a cannabis metabolite in surface water and urban wastewater. *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 3078 - 3089.
- Bijlsma, L.; Serrano, R.; Ferrer, C.; Tormos, I.; Hernández, F. Occurrence and behavior of illicit drugs and metabolites in sewage water from the Spanish Mediterranean coast (Valencia region). *Science of the Total Environment* 48.7 (2014) 703 - 709.

- Binelli, A.; Marisa, I.; Fedorova, M.; Hoffman, R.; Riva, C. First evidence of protein profile alteration due to the main cocaine metabolite (benzoylecgonine) in a freshwater biological model. *Aquatic Toxicology* 268 (2013) 140 - 141.
- Bisceglia, K. J.; Roberts, A. L.; Schantz, M. M.; Lippa, K. A. Quantification of drugs of abuse in municipal wastewater via SPE and direct injection liquid chromatography mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398 (2010) 2701 - 2712.
- Boleda, M. R.; Galceran M.; Ventura, F. Monitoring of opiates, cannabinoids and their metabolites in wastewater, surface water and finished water in Catalonia, Spain. *Water Research* 43 (2009) 1126 - 1136.
- Boleda, M. R.; Huerta-Fontela, M.; Ventura, F.; Galceran, M. T. Evaluation of the presence of drugs of abuse in tap waters. *Chemosphere* 84 (2011) 1601 - 1607.
- Bones, J.; Thomas K. V.; Paull, B. Using environmental analytical data to estimate levels of community consumption of illicit drugs and abused pharmaceuticals. *Journal of Environmental Monitoring* 9 (2007) 701 - 707.
- Brewer, A. J.; Ort, C.; Banta-Green, C. J.; Berset, J-D.; Field, J. A. Normalized diurnal and between-day trends in illicit and legal drug loads that account for changes in population. *Environmental Science & Technology* 46 (2012) 8305 - 8314.
- Caldas, S. S.; Gonçalves, F. F.; Primel, E. G.; Prestes, O. D.; Martins. M. L.; Zanella, R. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. *Química Nova* 34 (2011) 1604 - 1617.

- Cassiano, N.M.; Barreiro, J. C.; Martins, L.R.R.; Oliveira, R. V.; Cass, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. *Química Nova* 32 (2009) 1021 - 1030.
- Castiglioni, S.; Zuccato, E.; Crisci, E.; Chiabrando, Fanelli, R.; Bagnati, R. Identification and measurement of illicit drugs and their metabolites in urban wastewater by liquid chromatography–tandem mass spectroscopy. *Analytical Chemistry* 78 (2006) 8421 - 8429.
- Castiglioni, S.; Bagnati, R.; Melis, M.; Panawennage, D.; Chiarelli, P.; Fanelli, R.; Zuccato, E. Identification of cocaine and its metabolites in urban wastewater and comparison with the human excretion profile in urine. *Water Research* 45 (2011) 5141 -5150.
- Castiglioni, S.; Bijlsma, L.; Covaci, A.; Emke, E.; Hernández, F.; Reid, M.; Ort, C.; Thomas, K. V.; van Nuijs, A.; de Voogt, P.; Zuccato, E. Evaluation of uncertainties associated with the determination of community drug use through the measurement of sewage drug biomarkers. *Environmental Science & Technology* 47 (2013) 1452 - 1460.
- Castiglioni, S.; Griffiths, P.; Kasprzyk-Hordern, B.; Me, A.; Thomas, K. V. Preface. Special Issue. Testing the waters: A selection of papers from the first international multidisciplinary conference on detecting illicit drugs in wastewater. *Science of the Total Environment* 487 (2014) 611 - 612.
- Cecinato, A.; Balducci, C.; Nervegna, G. Occurrence of cocaine in the air of the worlds cities. *Science of the Total Environment* 407 (2009) 1683 - 1690.
- Center for Drug Evaluation and Research (CDER), (2001). Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. Disponível em: <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>. Acesso em 01 de janeiro de 2015.

Centro Brasileiro de Informação sobre Drogas Psicotrópicas, CEBRID, Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP. *II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país: 2005*. Carlini, E. A. *et al.*, (supervisão) São Paulo, (2006).

Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura da UNICAMP – CEPAGRI/UNICAMP Disponível em: <http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima-de-campinas.html>. Acesso em 11 de março de 2015.

Chiaradia, M. C.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Química Nova* 3 (2008) 623 - 636.

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), Governo do Estado de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente (2011). Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos. Organizadores: Carlos Jesus Brandão *et al.* São Paulo: Agencia Nacional de Águas, Brasília.

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), Governo do Estado de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente (2014). *Qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo 2013* [recurso eletrônico].

Cone, E. J.; Cone-Sampson, A. H.; Darwin, W. D.; Huestis, M. A.; Jonathan M. Oyler, J. M. Urine Testing for Cocaine Abuse: Metabolic and Excretion Patterns following Different Routes of Administration and Methods for Detection of False-Negative Results. *Journal of Analytical Toxicology* 27 (2003) 386 - 401.

Crotti, A. E. M, Vessecchi, R.; Lopes, J. L. C. e Lopes, N. P. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. *Química Nova* 29 (2006) 287 - 292.

Daughton, C.G. Pharmaceuticals in the environment: Overarching issues and overview, in: C.G. Daughton, T. Jones-Lepp (Eds.), *Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Scientific and Regulatory Issues*, Symposium Series 791, *American Chemical Society*, Washington, D.C., 2001, pp. 2 - 38.

Daughton, C. G. Real-time estimation of small-area populations with human biomarkers in sewage. *Science of the Total Environment* 414 (2012) 6 - 21.

Defesa Civil de Campinas, Prefeitura Municipal de Campinas. *Defesa Civil apresenta balanço da Operação Estiagem 2014*. Disponível em: <http://www.campinas.sp.gov.br/noticias-integra.php?id=24973>. Acesso em 11 de março de 2015.

Domènech, X.; Peral, J.; Muñoz, I. Predicted environmental concentrations of cocaine and benzoylecgonine in a model environmental system. *Water Research* 43 (2009) 5236 - 5242.

European Monitoring Center for Drugs and Drug Addiction – EMCDDA Insights Series No 9. *Assessing illicit drugs in sewage: potential and limitations of a new monitoring approach*. Project leaders: Frost, N.; Griffiths, Paul. Luxembourg: 2008

European Commission. Commission Decision 2002/657/EC. Disponível em: <http://eur-ex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32002D0657:EN:NOT>. Acesso em 20 de dezembro de 2014.

Feitosa, R.; Sodr , F. F.; Maldaner, A. O. Drogas de abuso em águas naturais e residuárias urbanas: ocorrência, determina o e aplica es forenses. *Química Nova* 36 (2013) 291 - 305.

Funda o Osvaldo Cruz - FIOCRUZ - *Pesquisa Nacional sobre o uso de crack: quem são os usuários de crack e/ou similares do Brasil? quantos são nas capitais brasileiras?* organizadores: Francisco In cio Bastos, Neilane Bertoni. Rio de Janeiro: Editora ICICT (2014).

- Gerrity, D.; Trenholm, R. A.; Snyder, S. A. Temporal variability of pharmaceuticals and illicit drugs in wastewater and the effects of a major sporting event. *Water Research* 45 (2011) 5399 - 5411.
- Gheorghe, A.; van Nuijs, A. L. N.; Pecceu, B.; Bervoets, L.; Jorens, P. G.; Blust, R.; Neels H.; Covaci, A. Analysis of cocaine and its principal metabolites in waste and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography–ion trap tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391 (2008) 1309 - 1319.
- González-Mariño, I.; Quintana, J. B.; Rodríguez, I.; Rodil, R.; González-Peñas J.; Cela, R. Comparison of molecularly imprinted, mixed-mode and hydrophilic balance sorbents performance in the solid-phase extraction of amphetamine drugs from wastewater samples for liquid chromatography–tandem mass spectrometry determination. *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 8435 - 8441.
- Harris, D. S.; Everhart, E. T.; Mendelson, J.; Jones, R. T. The pharmacology of cocaethylene in humans following cocaine and ethanol administration. *Drug Alcohol Dependence* 72 (2003) 169 - 182.
- Huerta-Fontela, M.; Galceran, M. T.; Ventura, F. Ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of stimulatory drugs of abuse in wastewater and surface water. *Analytical Chemistry* 79 (2007) 3821 - 3829.
- Huerta-Fontela, M.; Galceran, M. T.; Martin-Alonso, J.; and Ventura, F. Occurrence of psychoactive stimulatory drugs in wastewaters in north-eastern Spain. *Science of the total Environment* 397 (2008a) 31 - 40.
- Huerta-Fontela, M., Galceran, M. T.; Ventura, F. Stimulatory drugs of abuse in surface waters and their removal in a conventional drinking water treatment plant. *Environmental Science and Technology* 42 (2008b) 6809 - 6816.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, IBGE. *Censo Demográfico: Totalizações para o município de Campinas*. Disponível em: <http://www.campinas.sp.gov.br/governo/seplama/publicacoes/censo-2010.php>. (2010a). Acesso em: 31 de janeiro de 2015.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, IBGE. *Censo demográfico: característica da população*. Disponível em: <http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/temas.php?lang=&codmun=350950&idtema=90&search=sao-paulo|campinas|censo-demografico-2010:-resultados-da-amostra-caracteristicas-da-populacao->. (2010b). Acesso em: 31 de janeiro de 2015.

Jones-Lepp, T. L.; Stevens, R.; Pharmaceuticals and personal care products in biosolids/ sewage sludge: the interface between analytical chemistry and regulation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387 (2007) 1173 - 1183.

Jurado, A.; Mastroianni, N.; Vázquez-Suñé, E.; Carrera, J.; Tubau, I.; Pujades, E.; Postigo, C.; López de Alda, M.; Barceló, D. Drugs of abuse in urban groundwater. A case study: Barcelona. *Science of the Total Environment* 424 (2012) 280 - 288.

Kaleta, A.; Ferdig, M.; Buchberger, W.; Semiquantitative determination of residues of amphetamine in sewage sludge sample. *Journal of Separation Science* 29 (2006) 1662 - 1666.

Kankaanpää, A.; Ariniemi, K.; Heinonen, M.; Kuoppasalmi, K.; Gunnar, T. Use of illicit stimulant drugs in Finland: A wastewater study in ten major cities. *Science of the Total Environment* 487 (2014) 696 - 702.

Kasprzyk-Hordern, B.; Dinsdale, R. M.; Guwy, A. J. Multi-residue method for the determination of basic/neutral pharmaceuticals and illicit drugs in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography–positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1161 (2007) 132 - 145.

- Kasprzyk-Hordern B, Dinsdale RM, Guwy AJ. Illicit drugs and pharmaceuticals in the environment - forensic applications of environmental data. Part 1: estimation of the usage of drugs in local communities. *Environmental Pollution* 157 (2009a) 1773 - 1777.
- Kasprzyk-Hordern, B.; Dinsdale, R.; Guwy, A. The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. *Water Research* 43 (2009b) 363 - 380.
- Kasprzyk-Hordern, B.; Dinsdale, R. M.; Guwy, A. J. Multiresidue methods for the analysis of pharmaceuticals, personal care products and illicit drugs in surface water and wastewater by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391 (2008a) 1293 - 1308.
- Kasprzyk-Hordern, B.; Dinsdale, R. M.; Guwy, A. J. The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. *Water Research* 42 (2008b) 3498 - 3518.
- Karolak, S.; Nefau, T.; Bailly, E.; Solgadi, A.; Levi, Yves. Estimation of illicit drugs consumption by wastewater analysis in Paris area (France). *Forensic Science International* 200 (2010) 153 - 160.
- Khan, U.; van Nuijs, A. L. N.; Li, J.; Maho, W.; Du, P.; Li, K.; Hou, L.; Zhang, J.; Meng, X.; Li, X.; Covaci, A. Application of a sewage-based approach to assess the use of ten illicit drugs in four Chinese megacities. *Science of the Total Environment* 487 (2014) 710 - 721.
- Lai, F. Y.; Ort, C.; Gartner, C.; Carter, S.; Prichard, J.; Kirkbride, P.; Bruno, R.; Hall, W.; Eaglesham, G.; Mueller, J. F. Refining the estimation of illicit drug consumptions from wastewater analysis: Co-analysis of prescription pharmaceuticals and uncertainty assessment. *Water Research* 45 (2011) 4437 - 4448.

- Locatelli, M. A. F. *Avaliação da presença de antibióticos e drogas ilícitas na bacia do Rio Atibaia*. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011. p. 164
- Lopes, A.; Silva, N.; Bronze, M. R.; Ferreira, J.; Morais, J. Analysis of cocaine and nicotine metabolites in wastewater by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Cross abuse index patterns on a major community. *Science of the Total Environment* 487 (2014) 673 - 680
- Magalhães, E, J.; Nascentes, C. C.; Pereira, L. S. A.; Guedes, M, L. O.; Lordeiro, R. A.; Auler, L. M. L. A.; Augusti, R.; Queiroz, M. E. L. R. Evaluation of the composition of street cocaine seized in two regions of Brazil. *Science and Justice* 53 (2013) 425 - 432.
- Maldaner, A. O.;Schmidt, L. L.; Locatelli, M. A. F.;Jardim, W. F.;Sodré, F. F.; Almeida F. V.; Pereira C. E. B.SilvaC. M. Estimating cocaine consumption in the Brazilian Federal District (FD) by sewage analysis.*JournalofBrazilianChemicalSociety* 23 (2012) 861 - 867.
- Maldaner, A.; Collins C. H. and Jardim, I. C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. *Química Nova* 33 (2010) 1559 - 1568.
- Mathieu C.; Jörg R.; Berset, J-D.; Schürch, S.; Brenneisen, R. Assessment of total uncertainty in cocaine and benzoylecgonine wastewater load measurements. *Water Research* 45 (2011) 6650 - 6660.
- Mendoza, A.; Rodríguez-Gil, J. L.; González-Alonso,S.; MastroianniN.; López de AldaM.; Barceló,D.;Valcárcel,Y. Drugs of abuse and benzodiazepines in the Madrid Region(Central Spain): Seasonal variation in river waters, occurrencein tap water and potential environmental and human risk. *Environment International* 70 (2014) 76 - 87.

- Metcalf, C.; Tindale, K.; Li, H.; Rodayan, A.; Yargeau, V. Illicit drugs in Canadian municipal wastewater and estimates of community drug use. *Environmental Pollution* 158 (2010) 3179 - 3185.
- Miller, J. N.; Miller, J. C. *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. Ed. Pearson, 285 pp
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA/ACS). Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília, Brasil (2011).
- Nathaniel, T.; Huber, R.; Panksepp, J. Specific locomotion behavioral patterns associated with drug: cocaine alters active multifarious behavior in crayfish. *Integrative and Comparative Biology* 52 (2013) 302 - 310.
- Ort, C.; Lawrence, M. G.; Riekermann J.; Joss, A. Sampling for pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and illicit drugs in wastewater systems: are your conclusions valid? A critical review. *Environmental Science & Technology* 44 (2010) 6024 - 6035.
- Parolini, M.; Pedriali, A.; Riva, C.; Binelli, A. Sub-lethal effects caused by the cocaine metabolite benzoylecgonine to the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. *Science of The Total Environment* 444 (2013a) 43 - 50.
- Parolini M.; Binelli, A. Adverse effects induced by ecgonine methyl ester to the zebra mussel: a comparison with the benzoylecgonine. *Environmental Pollution* 182 (2013b) 371 - 378.
- Paul, B. D.; Lalani, S.; Bosy, T.; Jacobs, A. J.; Huestis, M. A. Concentration profiles of cocaine, pyrolytic methyl ecgonidine and thirteen metabolites in human blood and urine: determination by gas chromatography–mass spectrometry. *Biomedical Chromatography* (2005) 677 - 688.

- Peterson, K. L.; Logan, B. K.; Christiana, G. D. Detection of cocaine and its polar transformation products and metabolites in human urine. *Forensic Science International* 73 (1995) 183 - 196.
- Postigo, C.; López de Alde, J. M.; Barceló, D. Fully automated determination in the low nanogram per liter level of different classes of drugs of abuse in sewage water by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 80 (2008) 3123 - 3134.
- Postigo, C.; López de Alde, M. J.; Barceló D. Drugs of abuse and their metabolites in the Ebro River basin: Occurrence in sewage and surface water, sewage treatment plants removal efficiency, and collective drug usage estimation. *Environment International* 36 (2010) 75 - 84.
- Preston, K. L.; Epstein, D. H.; Cone, E. J.; Wtsadik, A. T.; Huestis, M. A.; Moolchan, E. T. Urinary Elimination of Cocaine Metabolites in Chronic Cocaine Users during Cessation. *Journal of Analytical Toxicology* 26 (2002) 393 - 400.
- Prichard, J.; Hall, W.; de Voogt, P.; Zuccato, E. Sewage epidemiology and illicit drug research: The development of ethical research guidelines. *Science of the Total Environment* 472 (2014) 550 - 555.
- Programa de Aceleração do Crescimento. Governo Federal, Brasil. São Paulo, 7º Balanço, janeiro a abril de 2009. Disponível em: <http://pt.slideshare.net/Mercadante/balano-do-pac-em-sp-janeiro-a-abril-de-2009>. Acesso em: 20 de janeiro de 2015.
- Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova* 27 (2004) 771 - 780.
- Rosi-Marshall, E. J.; Snow, D.; Bartelt-Hunt, S. L.; Paspalof, A.; Tank, J. L. A review of ecological effects and environmental fate of illicit drugs in aquatic ecosystems. *Journal of Hazardous Materials* 282 (2015) 18 - 25.

Secretaria nacional de políticas sobre drogas – SENAD. Duarte, P. C. A. V., Stempliuk, V. A.; Barroso, L. P.(Org.); *Relatório Brasileiro sobre Drogas*. (2009) Brasília. Disponível em: <http://www.obid.senad.gov.br/portais/OBID/biblioteca/documentos/Relatorios/328379.pdf>. Acesso em: 15 de dezembro de 2014.

Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX). Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. *Journal of Analytical Toxicology* 37 (2013) 452 - 474.

Silva, M. J.; Anjos, E. V.; Honorato, R. S.; Pimentel, M. F.; Paim, A. P. S. Spectrophotometric cocaine determination in a biphasic medium employing flow-batch sequential injection analysis. *Analytica Chimica Acta* 629 (2008) 98 - 103.

Silva, R. F. *Determinação de cocaína e benzoilecgonina em amostras de esgoto bruto do Distrito Federal como suporte à realização de estimativas de consumo*. 2012. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade de Brasília, Brasília, 2013, p. 81.

Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS). Diagnóstico dos serviços de água e esgoto, 2013. Disponível em: <http://www.snis.gov.br/PaginaCarrega.php?EWRErterterTERTer=105>. Acesso em: 12 de fevereiro de 2015.

Shimamura, E. T.; Hodge, G. D.; Paul, B. D. Examination of post mortem fluids and tissues for the presence of methylecgonidine, exgonidine, cocaine, and benzoylecgonine using solid-phase extraction and gas-chromatography-mass spectrometry. *Clinical Chemistry* 47 (2001) 1040 - 1047.

Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. *Fundamentos de Química Analítica*. 8 ed. São Paulo: Thomson, 2007

Smith, M. L.; Shimomura, E. T.; Paul, B. D.; Cone, E. J.; David W. D. D.; Huestis, M. A. Urinary Excretion of ecgonine and Five Other Cocaine

- Metabolites Following Controlled Oral, Intravenous, Intranasal, and Smoked Administration of Cocaine. *Journal of Analytical Toxicology* 34 (2010) 57 - 63.
- Snyder, S. A.; Villeneuve, D. L.; Snyder, E. M., Giesy, J. P. Identification and quantification of estrogen receptor agonists in wastewater effluents. *Environmental Science & Technology* 35 (2001) 3620 - 3625.
- Sociedade de Abastecimento de Água e Saneamento de (SANASA). Dados gerais. Disponível em: http://www.sanasa.com.br/conteudo/conteudo2.aspx?f=I&par_nrod=572&flag=TS. Acesso em: 03 de janeiro de 2015.
- Stuart, M.; Lapworth, D.; Crane, E.; Hart, A. Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. *Science of the Total Environment* 416 (2012) 1 - 21.
- Ternes, T. A. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research* 32 (1998) 3245 - 3260.
- Thai, P. K.; Jiang, G.; Gernjak, W.; Yuan, Z.; Lai, F. Y.; Mueller, J. F. Effects of sewer conditions on the degradation of selected illicit drug residues in wastewater. *Water Research* 48 (2014) 538 - 547.
- Thomas, K. V.; Bijlsma, L.; Castiglioni, S.; Covaci, A.; Emke, E.; Grabic, R.; Hernández, F.; Karolak, S.; Kasprzyk-Hordern, B.; Lindberg, R. H.; de Alda, M. L.; Meierjohann, A.; Ort, C.; Pico, Y.; Quintana, J. B.; Reid, M.; Rieckermann, L.; Terzic, S.; van Nuijs, A. L. N.; de Voogt, P. Comparing illicit drug use in 19 European cities through sewage analysis. *Science of the Total Environment* 432 (2012) 432 - 439.
- UNODC - UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. *World Drugs Report. 2004*. Disponível em <http://www.unodc.org/wdr2004>. Acesso em 10 de dezembro de 2014.

UNODC - UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. *Word Drugs Report. 2013*. Disponível em <http://www.unodc.org/wdr2013>. Acesso em: 10 de dezembro de 2014.

UNODC - UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. *Word Drugs Report. 2014*. Disponível em <http://www.unodc.org/wdr2014>. Acesso em: 10 de dezembro de 2014.

US EPA, 2000. *Interim Guidance for Using Ready and Inherent Biodegradability Tests to Derive Input Data for Multimedia Models and Wastewater Treatment Plants Models*. Disponível em <http://www.epa.gov/oppt/exposure/pubs/halflife.htm>. Acesso em: 15 de janeiro de 2015.

Valcárcel, Y.; Martínez, F.; González-Alonso, S.; Segura, Y.; Catalá, M.; Molina, R.; Montero-Rubio, J.; Mastroianni, N.; López de Alda, M.; Postigo C. and Barceló, D. Drugs of abuse in surface and tap waters of the Tagus River basin: Heterogeneous photo-Fenton process is effective in their degradation. *Environment International* 41 (2012) 35 - 43.

van Der Aa, M.; Bijlsma, L.; Emke, E.; Dijkman, E.; Van Nuijs, A. L. N.; Van de Vem, B.; Hernández, F.; Versteegh A.; De Voogt, P. Risk assessment for drugs of abuse in the Dutch watercycle. *Water Research* 47 (2013) 1848 - 1857.

van Nuijs, A. L.; Pecceu, B., Theunis, L.; Dubois, N.; Charlier, C.; Jorens, P.G.; Bervoets, L.; Blust, R.; Neels, H.; Covaci, A. Spatial and temporal variations in the occurrence of cocaine and benzoylecgonine in waste- and surface water from Belgium and removal during wastewater treatment. *Water Research* 43 (2009a) 1341 - 1349.

van Nuijs, A. L. N.; Pecceu, B.; Theunis, L.; Dubois, N.; Charlier, C.; Jorens, P. G.; Bervoets, L.; Blust, R.; Neels H.; Covaci, A. Cocaine and metabolites in waste and surface water across Belgium. *Environmental pollution* 157 (2009b) 123 - 129.

- van Nuijs, A. L. N.; Castiglioni, S.; Tarcomnicu, I.; Postigo, C.; Alda, M. L. D.; Neels, H.; Zuccato, E.; Barcelo D. and Covaci, A. Illicit drug consumption estimations derived from wastewater analysis: A critical review. *Science of the Total Environment* 409 (2011a) 3564 - 3577.
- van Nuijs, A. L. N.; Mougel, J-F.; Tarcomnicu, I.; Bervoets, L.; Blust, R.; Jorens, P. G.; Neels, H.; Covaci, A. Sewage epidemiology — A real-time approach to estimate the consumption of illicit drugs in Brussels, Belgium. *Environment International* 37 (2011b) 612 - 621.
- van Nuijs A. L. N.; Abdellati, K.; Bervoets, L., Blust, R.; Jorens, P. G.; Neels, H. Covaci, A. The stability of illicit drugs and metabolites in wastewater, an important issue for sewage epidemiology? *Journal of Hazardous Materials* 239 (2012) 19 - 23.
- Vazquez-Roig, P.; Andreu, V.; Blasco C.; Picó, Y. SPE and LC-MS/MS determination of 14 illicit drugs in surface waters from the Natural Park of L'Albufera (Valencia, Spain). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397 (2010) 2851 - 2864.
- Vazquez-Roig, P.; Blasco C.; Picó, Y. Advances in the analysis of legal and illegal drugs in the aquatic environment. *Trends in Analytical chemistry* 50 (2013) 65 - 77.
- Yargeau, V.; Taylor, B.; Li, H.; Rodayan, A.; Metcalfe, C. D. Analysis of drugs of abuse in wastewater from two canadian cities. *Science of the Total Environment* 487 (2014) 722 - 730.
- Zuccato, E.; Castiglioni, S.; Tettamanti, M.; Olandese, R.; Bagnati, R.; Melis M.; Fanelli, R. Changes in illicit drug consumption patterns in 2009 detected by wastewater analysis. *Drug and Alcohol Dependence* 118(2011) 464 - 469.
- Zuccato, E.; Chiabrando, C.; Castiglioni, S.; Calamari, Davide.; Bagnati, Renzo.; Schiarea, S. and Fanelli, R. Cocaine in surface waters: a new

evidence-based tool to monitor community drug abuse. *Environmental Health: A Global Access Science Source* 4 (2005) 14 - 20.

Zuccato, E.; Castiglioni, S.; Bagnati, R.; Chiabrando C.; Grassi, P.; Fanelli R. Illicit drugs, a novel group of environmental contaminants. *Water Research* 42 (2008) 961 - 968.