



Universidade de Brasília
Instituto de química

**Discriminação de amostras de Cannabis Sativa L. por complexação com
Fast Blue B e espectroscopia no UV-Vis.**

ÍCARO NOÉ CAIXÊTA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Orientador: Dr. Jez Willian Batista Braga

Coorientador: Msc Luciano Chaves Arantes

Brasília, 2022

**Discriminação de amostras de Cannabis Sativa L. por complexação com
Fast Blue B e espectroscopia no UV-Vis**

Trabalho de conclusão de curso apresentado para a
obtenção do título de bacharel em de Química
Tecnológica da Universidade de Brasília.

Orientador: Dr. Jez Willian Batista Braga
Coorientador: Msc Luciano Chaves Arantes

Brasília, 2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me abençoou e me capacitou em todo momento. Agradeço à minha mãe Inácia e ao meu pai Antônio, que me apoiaram, educaram aconselharam e advertiram ao longo da minha vida. Agradeço à minha namorada Victoria que sempre me incentivou, me escutou e me consolou em diversos momentos. Agradeço aos meus irmãos Aisllon e Uellerson, e também a toda minha família, por todos momentos juntos que me ajudaram a chegar até aqui.

Agradeço aos meus amigos da faculdade, Fernanda, João e Pedro, que estiveram comigo, do início ao fim do curso, dividindo e compartilhando conhecimentos. E aos amigos de mais longa data Davi, Matheus, Vitor e Wesley, que sempre me trazem momentos descontraídos.

Agradeço ao meu professor orientador Jez, e ao coorientador perito Luciano, que me auxiliaram durante toda a pesquisa, proporcionando muita sabedoria e conhecimento e sanando todas as dúvidas. E também às colegas Fabiana, Laiz e Rafaela, que estiveram juntas na equipe de pesquisa.

Agradeço aos órgãos FINEP, CNPq, FAPDF, CAPES/Proforense e INCTBio que ajudaram na compra dos equipamentos e reagentes. E também à Agilent, pela cessão do uso do equipamento UV-Vis durante o trabalho. Agradeço à SPAL/PCDF que cedeu os laboratórios e amostras para a realização da pesquisa.

Agradeço à Universidade de Brasília, que proporcionou ótimos professores e servidores, e uma ótima estrutura educacional ao longo dos meus seis anos e meio de curso.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Principais canabinóides presentes na maconha.	13
Figura 2 – (A) Maconha no formato de prensado. (B) Planta de maconha. (C) Haxixe.....	13
Figura 3 – Aspectos morfológicos da Cannabis Sativa L.....	14
Figura 4 – Reação do Fast Blue B com duas moléculas de Δ^9 -THC.	15
Figura 5 – A – Estrutura dos sais Fast Blue B (1) e Fast Blue BB (2). B – Mecanismo proposto para o produto do teste colorimétrico de maconha usando o FBBBS.	16
Figura 6 – Níveis de energia eletrônica e transições.	18
Figura 7 – Representação de uma PCA.	19
Figura 8 – Esquema da decomposição da matriz de dados em componentes principais.....	20
Figura 9 – Foto de um ependorff com o resultado da reação para uma amostra (A) de maconha. (B) de coentro em grãos. (C) de noz moscada em pó.....	27
Figura 10 – Espectros brutos das amostras das quatro classes.	28
Figura 11 – Espectros das amostras das quatro classes na região selecionada de 350 a 700 nm.....	29
Figura 12 – Gráfico de escores da primeira componente principal da PCA de caráter classificatório.	31
Figura 13 – Gráfico de pesos da primeira componente principal da PCA de caráter classificatório....	31
Figura 14 – Gráfico de escores das três primeiras componentes principais da PCA de caráter classificatório.	32
Figura 15 – Gráfico de pesos da segunda componente principal da PCA de caráter classificatório.	33
Figura 16 – Gráfico de pesos da terceira componente principal da PCA de caráter classificatório.	34
Figura 17 – Gráfico de escores das duas primeiras componentes principais da PCA de caráter discriminatório, sem exclusão de amostras.	35
Figura 18 – Gráfico de T2 de Hotelling x resíduos Q da PCA de caráter discriminatório considerando as duas primeiras componentes principais.....	35
Figura 19 – Gráfico de escores das duas primeiras componentes principais da PCA de caráter discriminatório, com a exclusão de amostras anômalas.	36
Figura 20 – Gráfico de pesos da primeira componente principal da PCA de caráter discriminatório, após a exclusão de amostras anômalas.....	37
Figura 21 – Aplicação dos parâmetros de Hotelling T2 e resíduos Q às amostras de maconha e interferentes.....	38
Figura 22 – Aplicação do parâmetro de escores utilizando o limite com intervalo de 95 % de confiança.	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Vegetais, produtos vegetais e outros materiais utilizados para desafiar o teste colorimétrico baseado na complexação do sal Fast Blue B com fitocanabinoides.	23
Tabela 2 – Variância explicada por cada uma das duas componentes principais e variância acumulada.	30
Tabela 3 – Figuras de mérito para as amostras de treinamento e validação.	40

LISTA DE SÍMBOLOS, NOMENCLATURAS E ABREVIACÕES

$\Delta 9$ -THC – $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol

PCA – Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis*)

GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (Gas chromatography–mass spectrometry)

LQFF/PCDF – Laboratório de Química e Física Forense da Polícia Civil do Distrito Federal

CBN – Canabinol

CBD – Canabidiol

CBG – Canabigerol

CBC – Canabicromene

CBT – Canabitriol

CBND – Canabinodiol

$\Delta 8$ -THC – $\Delta 8$ -tetrahydrocannabinol

CBL – Canabiciolol

CBE – Canabielsoin

FBBS – Sal de fast Blue B (*Fast Blue B salt*)

FBBBS – Sal de fast Blue BB (*Fast Blue BB salt*)

PC – Componente Principal (*Principal Component*)

SVD – Decomposição por valores singulares (*Singular Value Decomposition*)

TFP – Taxa de falso positivo

FP – Falso positivo

VN – Verdadeiro negativo

TFN – Taxa de falso negativo

FN – Falso negativo

VP – Verdadeiro positivo

TEF – Taxa de eficiência

RESUMO

O crescente uso de drogas de abuso vem se tornando um problema para a sociedade brasileira, sendo a maconha uma das mais utilizadas. A maconha, cujo nome científico é *Cannabis sativa* L., é uma planta que contém dezenas de fitocanabinoides, dentre os quais se destaca o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), um fitocanabinoide que possui efeitos psicoativos, é controlado, juntamente com a maconha, pela Portaria 344/98-SVS/MS.. Ao longo dos anos, alguns métodos presuntivos foram propostos para identificação da maconha, entre eles, o teste colorimétrico utilizando o sal Fast Blue B (FBBS) é um dos mais amplamente utilizados pelos laboratórios forenses no Brasil e no mundo. Consiste em um teste rápido no qual os fitocanabinoides presentes na maconha são extraídos por um solvente orgânico e reagem com o sal FBB em meio básico gerando um complexo de cor vermelha-púrpura com afinidade pela fase orgânica. O presente trabalho teve como proposta aperfeiçoar este método de triagem, utilizando a espectroscopia UV-vis e ferramenta quimiométrica visando a discriminação de amostras de maconha de outros vegetais. A análise de componentes principais (PCA) foi utilizada para análise exploratória de dados e em seguida para discriminar as amostras de acordo com suas características espectrais.

A necessidade principal do aperfeiçoamento do método é a redução de resultados falso positivos observados para alguns vegetais e materiais contendo compostos que desenvolvem um complexo de cor semelhante à do FBBS-fitocanabinoides quando submetidos ao teste colorimétrico. Diferentes apresentações de maconha e seus produtos (haxixe, prensado e planta verde) e diversos outros vegetais e materiais foram submetidos ao método proposto totalizando 497 amostras testadas. Foi feita a aquisição do espectro UV-Vis de cada amostra e dois tratamentos dos dados utilizando a PCA. A primeira abordagem foi exploratória, onde pode-se perceber um relevante agrupamento dos outros vegetais e materiais e também leves aglomerados entre as diferentes apresentações de maconha. Na segunda abordagem foi criado um modelo utilizando os parâmetros da PCA para uma análise discriminatória. Nesta abordagem, a análise de dois dos parâmetros gerou um excelente resultado: taxa de falso negativo de apenas 3,3% e nenhuma amostra classificada erroneamente como maconha.

Palavras-chave: Maconha, Δ^9 -THC, PCA, quimiometria, espectroscopia UV-vis.

ABSTRACT

The growing use of drugs of abuse has become a problem for Brazilian society, with marijuana being one of the most used. Marijuana, whose scientific name is *Cannabis sativa* L., is a plant that contains dozens of phytocannabinoids, among which Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), a phytocannabinoid that has psychoactive effects, is controlled, along with marijuana, by Portaria 344/98-SVS/MS. Over the years, some presumptive methods have been proposed to identify marijuana, among them, the colorimetric test using Fast Blue B salt (FBBS) is one of the most widely used by laboratories forensics in Brazil and in the world. It consists of a rapid test in which the phytocannabinoids present in marijuana are extracted by an organic solvent and react with the FBB salt in a basic medium, generating a red-purple complex with an affinity for the organic phase. The present work aimed to improve this screening method, using UV-vis spectroscopy and a chemometric tool in order to discriminate marijuana samples from other plants. Principal component analysis (PCA) was used for exploratory data analysis and then to discriminate the samples according to their spectral characteristics.

The main need to improve the method is the reduction of false positive results observed for some plants and materials containing compounds that develop a color complex similar to that of FBBS-phytocannabinoids when submitted to the colorimetric test. Different presentations of marijuana and its products (hashish, pressed and green plant) and several other vegetables and materials were submitted to the proposed method, totaling 497 samples tested. The acquisition of the UV-Vis spectrum of each sample and two data treatments were performed using PCA. The first approach was exploratory, where one can see a relevant grouping of other vegetables and materials and also light clusters between the different presentations of marijuana. In the second approach, a model was created using PCA parameters for a discriminatory analysis. In this approach, the analysis of two of the parameters yielded an excellent result: a false negative rate of only 3.3% and no samples misclassified as marijuana.

Keywords: Marijuana, Δ^9 -THC, PCA, chemometrics, UV-vis spectroscopy.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVO	12
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 CANABINÓIDES	13
3.2 FORMAS DE APRESENTAÇÃO	14
3.3 REAÇÃO COLORIMÉTRICA COM FAST BLUE B.....	16
3.4 ESPECTROSCOPIA UV-VIS	18
3.5 QUIMIOMETRIA	19
4 MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 MATERIAIS	24
4.2 PREPARAÇÃO DO MATERIAL	25
4.3 AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS UV-VIS	25
4.4 PROCESSAMENTO DO ESPECTROS	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	28
5.1 COLORIMETRIA.....	28
5.2 MODELO PCA DE CARÁTER CLASSIFICATÓRIO.....	28
5.3 MODELO PCA DE CARÁTER DISCRIMINATÓRIO.....	35
6 CONCLUSÃO	42
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1 INTRODUÇÃO

A *Cannabis sativa* L., popularmente conhecida como maconha, é uma planta da família Cannabaceae que possui propriedades terapêuticas e medicinais, mas que também é utilizada como droga de abuso (BORILLE, 2016; DE LIMA et al, 2021). De acordo com o Relatório Mundial sobre Drogas de 2021, a maconha é a droga mais consumida do mundo (UNODC, 2021). Possui em sua composição mais de 750 moléculas, entre elas canabinoides, monoterpenos, sesquiterpenos, flavonoides, esteroides, compostos nitrogenados, entre outras substâncias. (BORILLE, 2016)

A utilização da maconha é antiga, chineses iniciaram o uso da maconha como droga a mais de 2000 anos atrás (GONTIÈS; ARAÚJO, 2010). Diferentes formas de uso da planta foram implementadas ao longo do tempo. O próprio nome maconha se atribui ao uso mais comum onde o vegetal é seco e suas folhas e flores trituradas, sendo também chamadas de bhang, marijuana ou kif (GONTIÈS; ARAÚJO, 2010). O haxixe, outra apresentação comum, é a resina extraída dos tricomas, que são estruturas da epiderme vegetal semelhante a pelos (GLOSS, 2015). O óleo de maconha (hash oil) também pode ser extraído utilizando diferentes solventes (GLOSS, 2015). Fatores como concentração de canabinoides, método de extração, forma de apresentação e consumo dão origem, além dos já citados, aos mais variados nomes: pot, weed, joint, bong, blant, brew, edibles, wax, etc. (BORILLE, 2016)

O uso da maconha se tornou ilegal devido, principalmente, à molécula de Δ^9 -THC presente em sua composição, que atua no sistema nervoso central do usuário e provoca sensação de euforia e delírio. (PESSOA et al, 2021)

Houve um aumento de cerca de 18% na última década no número de pessoas que utilizam maconha no mundo, sendo que em 2019 o número estimado de usuário ficou próximo de 200 milhões. O cultivo e a quantidade de apreensão também vêm aumentando a cada década (UNODC, 2021). No Brasil, a quantidade da droga apreendida pela polícia rodoviária federal no ano de 2020 dobrou em relação ao ano anterior (MAZZA et al, 2020). De junho de 2020 a junho de 2021, foram apreendidas 633 toneladas de maconha no Brasil. (GOVERNO DO BRASIL, 2021)

Tais fatores tem se tornado um desafio para a polícia brasileira, que ano após ano busca combater o tráfico de maconha. Uma das etapas desse combate é a identificação da droga. Ao chegar aos laboratórios de perícia, a apreensão deve

passar por uma série de análises com o objetivo de determinar as substâncias presentes.

De acordo com as características físicas da apreensão (comprimido, pó, cigarro), hipóteses sobre a possível presença de certos compostos químicos são formuladas e testadas. Testes baseados em reações colorimétricas normalmente são os primeiros a serem empregados devido ao características como baixo custo, facilidade de realização e rapidez na obtenção dos resultados. Esses testes, entretanto, carecem de especificidade, portanto os resultados obtidos precisam ser corroborados com técnicas analíticas mais específicas para serem considerados definitivos. Uma técnica confirmatória comumente utilizada em laboratórios forenses é a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS), a qual produz ótimos resultados para maioria dos compostos. Quando os resultados obtidos por CG-MS corroboram os obtidos pelo método colorimétrico, é possível confirmar a presença das substâncias detectadas por GC-MS. Outras composições de técnicas analíticas são utilizadas a depender do tipo de material e de substâncias a serem analisadas (SWGDRUG, 2019).

Em relação à análise colorimétrica para maconha, o teste de Duquenois-Levine (D-L) é um dos mais conhecidos, tendo sido proposto na década de 1930 e aperfeiçoado ao longo do tempo, onde uma solução contendo etanol, acetaldeído e vanilina reagem com THC em meio ácido gerando uma coloração roxa (JACOBS; STEINER, 2014). Entretanto um grande número de substâncias são relatadas como capazes de produzir resultados falso positivos com esse teste (DE FAUBERT MAUNDER, 1969).

O método colorimétrico de complexação com FBBS também é amplamente utilizado e considerado superior ao D-L pela facilidade de discriminação entre resultados positivos e negativo e menor número de compostos produzindo resultados falso positivo (DE FAUBERT MAUNDER, 1969; BORDIN et al, 2012). Mais recentemente o sal Fast Blue BB também se mostrou adequado para ser utilizado como uma variação do método colorimétrico original com FBBS , Ambos sais possuem uma estrutura semelhante em sua molécula reage com THC e outros fitocanabinoides em meio básico produzindo na fase orgânica uma coloração vermelho púrpura. (LAU-CAM; PIZZITOLA, 1979; DOS SANTOS et al, 2016)

Apesar de ser mais específico que o D-L, há diversos relatos de vegetais que possuem moléculas que reagem com o sal FBB ou FBBB gerando cor. Entre estes vegetais, a noz moscada é a mais frequentemente citada como produtora de resultados falso positivos, por também deixar a solução com a cor vermelho púrpura. (LAU-CAM; PIZZITOLA, 1979)

Como o resultado dos testes é uma solução colorida, a espectroscopia na região UV-vis é uma técnica simples que pode conferir maior especificidade aos resultados obtidos pela reação colorimétrica e cujos espectros podem ser avaliados objetivamente por métodos quimiométricos. A utilização de um planejamento fatorial é capaz de encontrar as condições de reação que geram resultados mais específicos de cor para maconha, enquanto a análise por componentes principais (PCA) possibilita agrupar os espectros da reação com maconha, diferenciando-os de outros vegetais e materiais.

2 OBJETIVOS

O trabalho teve como objetivo discriminar maconha de outros vegetais interesse materiais por meio do uso da espectrometria na região UV-Vis para avaliação da reação colorimétrica e aplicação de métodos quimiométricos de discriminação. Com isso, espera-se conferir à triagem de vegetais realizada no Laboratório de Química e Física Forense da Polícia Civil do Distrito Federal (LQFF/PCDF) maior especificidade.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CANABINOIDES

Os canabinoides são moléculas que ativam ou bloqueiam os receptores CB1 e CB2 do corpo humano, esses receptores são codificados pelos genes CNR1 e CNR2 (HRYHOROWICZ et al, 2018). Há algumas nomenclaturas para os canabinoides: Endocanabinoides, aqueles gerados dentro de um organismo animal (MECHOULAM et al, 2014); Canabinoides sintéticos, desenvolvidos em laboratório; Fitocanabinoides, os mais comuns e que são encontrados na planta *Cannabis*. (BORILLE, 2016)

Até a década de 1980 só se tinha conhecimento dos fitocanabinoides (até então chamados apenas de canabinoides). Eles eram definidos como “o grupo de compostos típicos de diterpeno C21 presentes na *Cannabis sativa* L., seus compostos carboxílicos ácidos, análogos e produtos de transformação”. (LAMBERT; FOWLER, 2005)

Na maconha já foram encontrados mais de 100 tipos de canabinoides, dos quais os principais são Δ 9-tetrahydrocannabinol (Δ 9-THC), cannabinol (CBN) e canabidiol (CBD), além de outros como Canabigerol (CBG), Canabícromene (CBC), Canabitriol (CBT), Canabinodiol (CBND), Δ 8-tetrahydrocannabinol (Δ 8-THC), Canabíciclol (CBL) e Canabielsoin (CBE) (BORILLE, 2016). A figura 1 apresenta as estruturas moleculares do Δ 9-THC, CBN e CBD, onde a principal diferença observada entre eles é que o CBN possui um anel aromático a mais, e o CBD não possui a cadeia fechada com o éter, mas sim uma cadeia aberta com um álcool e um vinil em cada ponta.

O Δ 9-THC pode induzir efeitos psicotomiméticos, paranóia, alucinações, ansiedade, alterações perceptivas e deficiências de memória (D'SOUZA et al, 2008). Diferente do Δ 9-THC, o CBN e o CBD não produzem efeitos psicoativos, mas sim efeitos anticonvulsivos e anti-inflamatórios, sendo atualmente amplamente estudados e já utilizados pela medicina (RUSSO; MARCU, 2017; CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA, 2014; MECHOULAM et al, 2002).

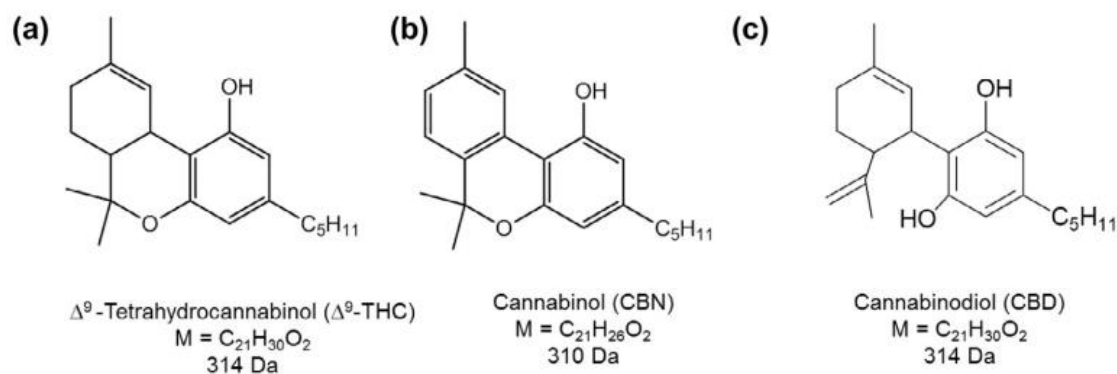


Figura 1. Principais canabinoides presentes na maconha. Fonte: Adaptado de DOS SANTOS (2016).

3.2 FORMAS DE APRESENTAÇÃO

Entre as diversas formas de apresentação da maconha, as que são mais comumente apreendidas, são mostradas na figura 2: 2A, planta prensada; 2B, planta ainda em cultivo; e 2C, haxixe. Para fazer o prensado, as partes aéreas da planta são desidratadas e colocadas em uma caixa, que é fechada com placas de madeira e inserida numa prensa hidráulica. Após a prensagem, há ainda uma etapa de corte (MAXX, 2017).

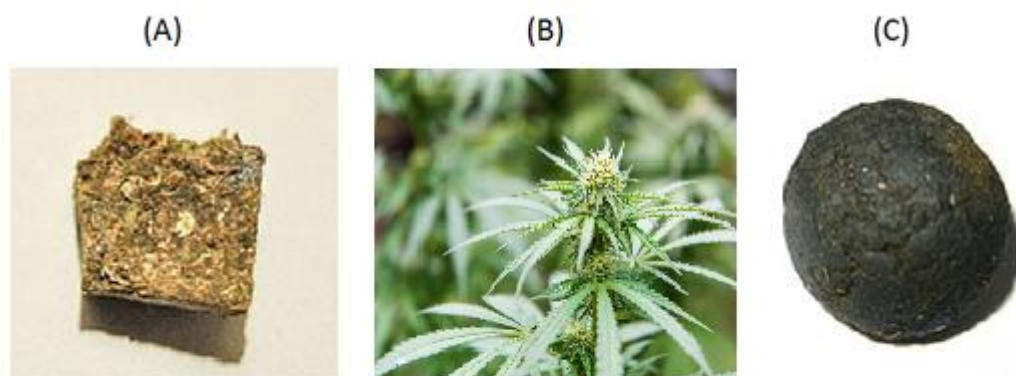


Figura 2. (A) Maconha no formato de prensado. (B) Planta de maconha. (C) Haxixe. Fonte: PRENSADO, 2022; ARAÚJO, 2017; HAXIXE, 2020.

O haxixe é produzido pela extração da resina existente nas inflorescências da planta feminina. A figura 3 apresenta diferenças entre a parte masculina e feminina da planta, bem como alguns aspectos morfológicos da maconha. Pode-se extrair o haxixe

de forma manual, utilizando peneiras, ou com a utilização de solventes como butano. O resultado é uma pasta pegajosa marrom escura (NASCIMENTO, 2014).



Figura 3. Aspectos morfológicos da Cannabis Sativa L.. A- Inflorescência do sexo masculino (estaminada). B- Planta feminina (pistilos/carpelos). 1- Flor estaminada. 2- Estame (anteras e curto filamento). 3- Estames. 4- Pólen. 5- flor com pistilo com bract. 6- flor com pistilo sem bract. 7- flor com pistilo mostrando ovário. 8- Aquênios com bract. 9- Semente sem bract. 10- Semente. 11- Semente. 12- Sementes. 13- Semente sem pericarpo (descascada). Fonte: UNODC, 2009.

3.3 REAÇÃO COLORIMÉTRICA COM O SAL FAST BLUE B

Para que ocorra a reação colorimétrica, os fitocanabinoides devem ser extraídos da maconha utilizando um solvente orgânico. Adiciona-se então o sal Fast Blue B (FBBS), um sal de diazônio aromático, que reage com a parte fenólica de duas moléculas de Δ^9 -THC (Fig. 4), CBN, CBD ou outros fitocanabinoides, formando um azocomposto de cor vermelha (THC e CBN) ou alaranjada (CBD). A reação ocorre melhor em meio alcalino, portanto utiliza-se hidróxido de sódio diluído em água. O meio reacional fica com duas fases distintas, a fase orgânica e a fase aquosa. O produto da reação é solúvel na fase orgânica, sendo a fase aquosa utilizada para extração de corantes inespecíficos que podem interferir na interpretação dos resultados da análise (BALBINO et al, 2016; JORK et al, 1990).

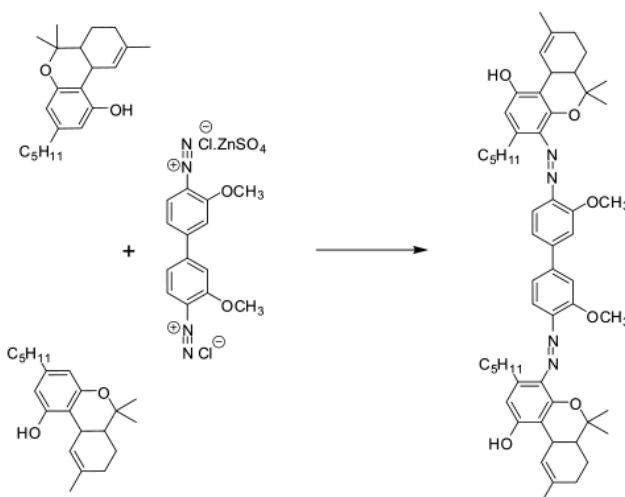


Figura 4. Reação do Fast Blue B com duas moléculas de Δ^9 -THC. Fonte: Balbino et al (2016).

Ainda não se têm grande conhecimento a respeito do mecanismo de reação do Δ^9 -THC e de outros fitocanabinoides com o Fast Blue B, porém DOS SANTOS et al reproduziu o mecanismo sugerido por Korte (1964), apresentado na figura 5, para a reação com o Fast Blue BB (FBBBS), um sal de estrutura bastante similar.

A reação com Fast Blue B não é específica para os fitocanabinoides da maconha. O sal é reagente para moléculas contendo fenóis, ácidos fenólicos, taninos e algumas aminas (JORK et al, 1990). Há diversos vegetais que possuem algumas dessas moléculas e que quando submetidos ao teste colorimétrico originam cor na fase orgânica. O resultado do teste com café, por exemplo, é uma coloração violeta.

Os materiais e vegetais mais problemáticos para a determinação de maconha são aqueles que também geram a cor vermelha: Noz moscada, cáscara sagrada, ruibarbo, carobinha, guaraná (LAU-CAM; PIZZITOLA, 1979; BORDIN; MESSIAS, 2012).

Como a interpretação do teste depende da visão e percepção do investigador, o resultado é subjetivo, logo, em uma análise laboratorial utilizando apenas o teste colorimétrico, alguns desses vegetais pode acabar gerando um resultado de falso positivo, o que faz com que testes colorimétricos sejam considerados testes presuntivos, necessitando de uma confirmação por um método mais específico.

Um trabalho feito pelo nosso grupo de pesquisa conseguiu uma significativa melhora da especificidade do teste colorimétrico baseado na complexação dos fitocanabinoides com FBBS a partir de uma abordagem envolvendo planejamento fatorial, com avaliação dos resultados por superfície de resposta (Casarin et al, em preparação).

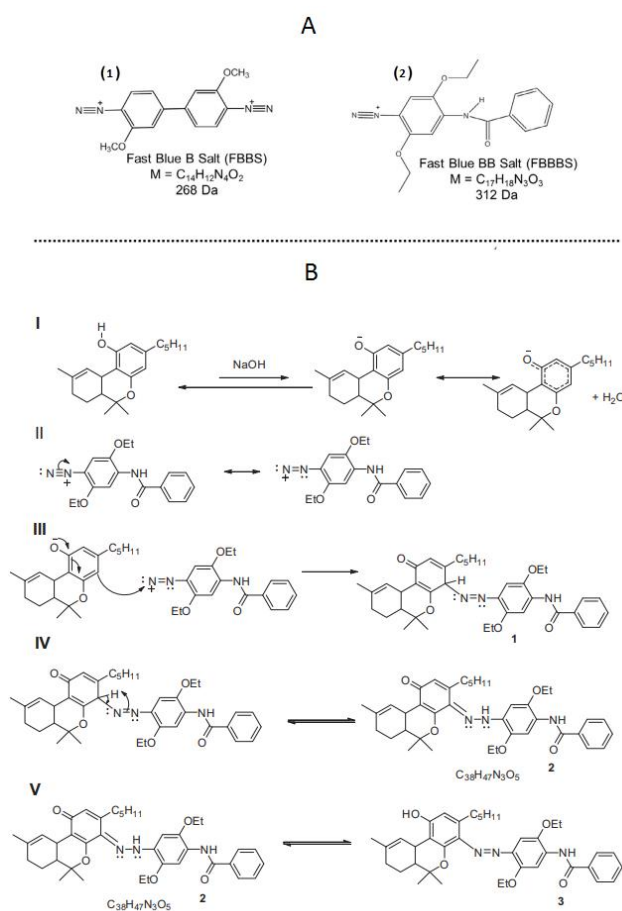


Figura 5. A – Estrutura dos sais Fast Blue B (1) e Fast Blue BB (2). B – Mecanismo proposto para o produto do teste colorimétrico de maconha usando o FBBBS. Fonte: Adaptado de DOS SANTOS et al, 2016.

3.4 ESPECTROSCOPIA UV-VIS

A radiação eletromagnética é uma forma de energia descrita como uma onda. Para cada quantidade de energia, a onda eletromagnética terá uma frequência e comprimento de onda diferente. O espectro eletromagnético divide as ondas em regiões de acordo com a energia. A região do espectro de UV (Ultravioleta) compreende a faixa de comprimento de onda de 180-380 nm, enquanto a região do visível compreende de 380-780 nm (SKOOG et al, 2005).

Cada molécula consegue absorver a radiação em frequências características. A absorção de radiação faz com que a molécula receba energia, provocando uma atenuação do feixe incidido. A transmitância e a absorbância de uma molécula em determinada frequência são medidas calculadas dessa atenuação. O espectrofotômetro UV-vis é um equipamento que incide radiação eletromagnética da região ultravioleta e visível sobre uma molécula e mede a absorbância em cada comprimento de onda, gerando um espectro de absorção característico. Portanto, a princípio seria possível reconhecer um composto, e distingui-lo de outros, por meio de seu espectro de absorção. Contudo, como a maiorias dos espectros em meios líquidos são constituídos por bandas largas e pouco características, principalmente em solventes polares como água, essa identificação estrutural é até certo ponto limitada nessa região do espectro (SKOOG et al, 2005).

Quando uma molécula é excitada por radiação pode ocorrer três tipos de transição quantizadas: eletrônica, vibracional, rotacional. O tipo de transição depende da faixa de comprimento de onda da radiação. Moléculas excitadas pela radiação UV-vis sofrem a transição eletrônica, que é quando um elétron se move de um orbital molecular ocupado para um orbital desocupado de maior energia. Esse tipo de transição se associa com informações estruturais de uma molécula e também determina propriedades moleculares como a cor (SKOOG et al, 2005).

A figura 6 mostra as transições eletrônicas mais observadas na região UV-vis e os níveis de energia dos orbitais: ligantes σ , correspondentes às ligações σ ; ligantes π , correspondentes às ligações π ; orbital não ligante "n", ocupados por elétrons isolados; e os orbitais antiligantes (ou desocupados) π^* e σ^* . Os cromóforos são grupos funcionais com absorções óticas características, na qual ocorre uma ou mais dessas transições. Alcanos, por exemplo, só possuem transições eletrônicas do tipo

$\sigma \rightarrow \sigma^*$, que absorvem energia ultravioleta. Transições $\sigma \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$ ocorrem em compostos carbonílicos, as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ ocorrem em alcenos, compostos carbonílicos, alcinos, azo compostos e outros, as transições $n \rightarrow \sigma^*$ ocorrem em compostos de oxigênio, nitrogênio, enxofre e halogênio (PAVIA et al, 2016; ATKINS, 2017).

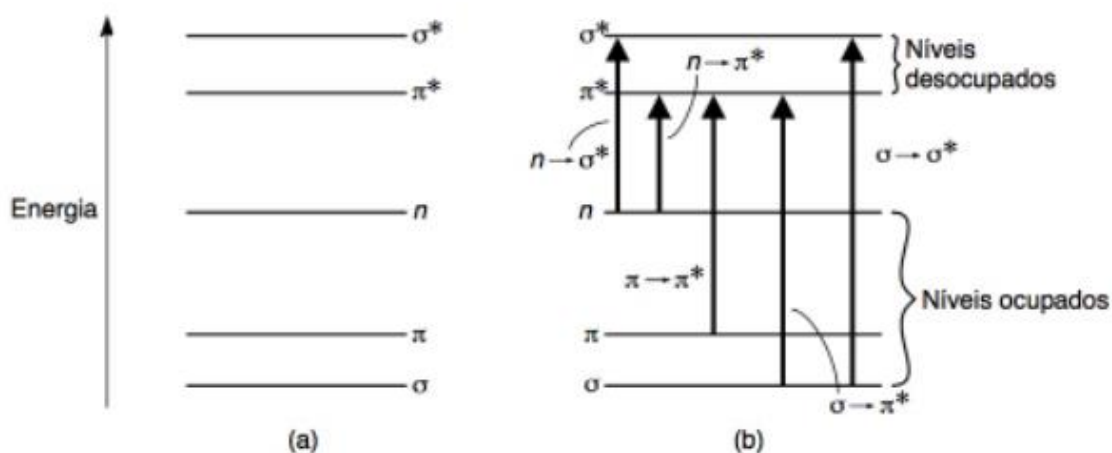


Figura 6. Níveis de energia eletrônica e transições. Fonte: PAVIA et al, 2016.

3.5 QUIMIOMETRIA

A quimiometria é uma área da química que utiliza ferramentas matemáticas e estatísticas para planejamento de experimentos e extração do máximo de informação química pela análise de dados. Um dos papéis da quimiometria é o de “planejar ou selecionar procedimentos ótimos para a realização de medidas experimentais” (SATO et al, 2013). Uma das formas de fazer isso é utilizando planejamentos fatoriais, onde se estuda como fatores, por exemplo, o solvente utilizado em determinada reação e seus diferentes níveis (solvente A e B) afetam determinado experimento. Com esse tipo de abordagem, é possível conduzir experimentos de forma a se obter melhores respostas baseadas em seu interesse. No caso de reações colorimétricas, por exemplo, é possível encontrar a concentração de reagente que potencializa o sinal da análise UV-vis do produto (NETO et al, 2010).

A quimiometria é também uma disciplina voltada a análises químicas de natureza multivariada (FERREIRA et al, 1999). Em muitos casos, as variáveis se correlacionam e quanto mais se aumenta o número de variáveis, mais difícil é a análise por métodos univariados convencionais. Na espectroscopia UV-vis, por exemplo, cada comprimento de onda de um espectro é uma variável, de modo que um espectro medido com resolução de 1 nm entre 180 e 780 nm teria 601 variáveis.

Métodos quimiométricos já foram utilizados, por exemplo, para discriminação de espécies de madeira, de drogas, análise de qualidade de alimentos, entre outros (MAGALHÃES et al, 2019; SOARES et al, 2017; MELO et al, 2021).

Uma das ferramentas quimiométricas que pode ser utilizada para a análise exploratória inicial de dados é a análise de componentes principais (PCA) que consiste na criação de um novo sistema de eixos (variáveis) a partir de uma matriz de dados com muitas variáveis. Esse novo sistema de eixos permite verificar a variação entre os dados em poucas dimensões. Isso faz com que o volume dos dados seja reduzido, removendo redundâncias e mantendo grande parte da informação. Os eixos criados são chamados de componentes principais. De acordo com Varella, na PCA “procura-se redistribuir a variação observada nos eixos originais de forma a se obter um conjunto de eixos ortogonais não correlacionados”, fazendo com que as amostras sejam agrupadas de acordo com sua variância. Na figura 7, há um exemplo da criação de dois novos eixos (PC1 e PC2) a partir de dados que anteriormente se dispersavam em eixos de três variáveis diferentes.

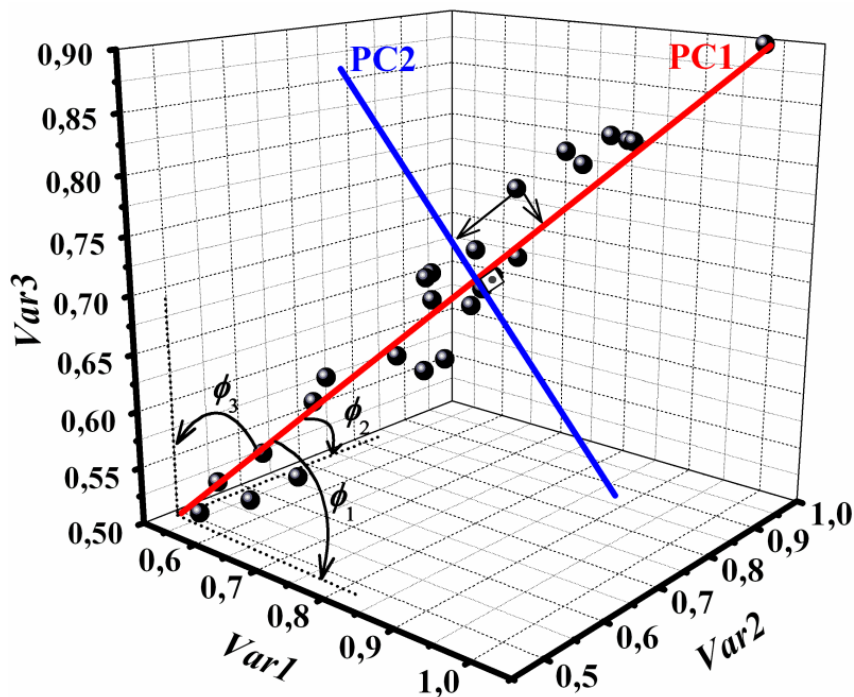


Figura 7. Representação de uma PCA. Cada amostra, representada por esferas, é uma amostra com valores diferentes nas três variáveis. Elas se redistribuem em novos eixos de acordo com suas variabilidades. Fonte: TEÓFILO, 2013.

A criação do novo sistema de eixos é feita por meio da decomposição da matriz de dados no produto de duas novas matrizes, uma de escores T e uma de pesos P mais uma matriz E , contendo os resíduos de decomposição. A matriz de escores mostra as coordenadas de cada amostra no novo sistema de eixos, ou seja, nas componentes principais (PC), enquanto a matriz de pesos mostra como cada variável contribui para a formação desses novos eixos. A figura 8 mostra a equação básica para PCA no formato polinomial, onde cada termo $t_i p_i^T$ se relaciona com a componente principal "i". A mesma figura ainda mostra a equação no formato matricial e também um esquema da representação das matrizes de dados, escores, pesos e de erros. Cada componente principal explica uma quantidade de variância dos dados, sendo a primeira (PC1) a que explica a maior porcentagem de variância. Dessa forma, amostras que possuem correlações em suas variáveis são agrupadas, e isso pode ser visto no gráfico dos escores (TEÓFILO, 2013).

$$X = t_1 p_1^T + t_2 p_2^T + \dots + t_A p_A^T + E$$

$$X = \mathbf{TP}^T + E$$

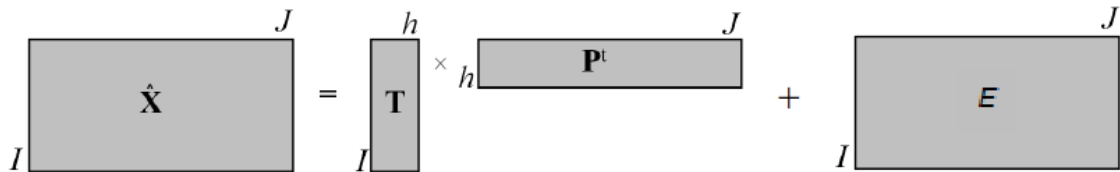


Figura 8. Esquema da decomposição da matriz de dados em componentes principais. Fonte: Adaptado de TEÓFILO, 2013.

Dado um conjunto de amostras que são possivelmente correlacionadas, há algumas abordagens para verificar se elas realmente se agrupam. O T^2 de Hotelling, uma dessas abordagens, é o quadrado da distância de Mahalanobis (uma distância elíptica) de uma amostra até o centro de dispersão dos escores da PCA. Caso uma amostra tenha uma distância que ultrapasse um certo limite de confiança, chamado limite de T^2 , ela não faz parte daquele grupo, considerando o grau de confiança estabelecido *a priori*. O limite de confiança Q funciona de forma semelhante, sendo este relacionado à somatória dos quadrados dos resíduos de decomposição da PCA. Sendo assim, caso o resíduo Q de uma amostra seja muito alto, ela não é bem modelada pela PCA e provavelmente tem alguma característica distinta do grupo de amostras utilizado no cálculo das PCs.

A discriminação de amostras pode ser realizada através de uma carta de controle. Para isso, um modelo é criado utilizando um grupo de amostras conhecidas que têm alguma característica específica em comum, essas amostras são chamadas amostras de treinamento. Para a criação da carta de controle podem ser empregadas diversas características, inclusive os valores dos escores das PCs de uma PCA. Os escores obtidos da primeira componente principal, pode ser utilizado para criar um limite, utilizando a fórmula de intervalo de confiança. Caso uma amostra tenha o escore acima desse valor limite, considera-se que ela não faz parte do grupo. O

modelo criado é validado por meio das amostras de validação, que são também conhecidas. Para a validação são utilizadas tanto as amostras do grupo que se pretende discriminar quanto amostras de outros grupos. Através de figuras de mérito, verifica-se a credibilidade do modelo.

Um dos algoritmos mais utilizados para a decomposição de matrizes em PCA é a decomposição por valores singulares (SVD). Uma matriz **X** de dados, onde as *i* linhas representam as amostras, e as *j* colunas representam as variáveis, pode ser representada pelo produto de outras três matrizes:

$$\mathbf{X} = \mathbf{USV}^T$$

A equação matricial é bastante semelhante com a que se busca na PCA, sendo por isso, bastante utilizada. O produto das matrizes **US** gera a matriz **T** de escores, onde o número de linhas é igual ao número de amostras. Na matriz **V** têm-se os pesos (**P**), e o número de linhas é igual ao número de variáveis. Portanto, os escores tem relação com as amostras e os pesos com as variáveis.

Antes de submeter uma matriz de dados a uma PCA, é comum realizar um pré-processamento nos dados. Em alguns casos, as variáveis podem apresentar uma faixa de variação muito grande ou não possuir uma distribuição adequada. Um tipo de pré-processamento comum utilizado nesses casos é o Mean Centering (Centrar na média). Consiste em calcular a média da coluna e subtraí-la de cada elemento dela, fazendo isso para todas as colunas.

Sendo x_{ij} o (*ij*)-ésimo elemento da matriz **X**, então os dados são centrados da seguinte forma:

$$x_{ij}^c = x_{ij} - \bar{x}_j$$

Onde x_{ij}^c é o (*ij*)-ésimo elemento da nova matriz $\bar{\mathbf{X}}$, \bar{x}_j é a média aritmética dos elementos da *j*-ésima coluna, *i* é o número de elementos na coluna (TEÓFILO, 2013).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Toda a parte experimental da pesquisa foi realizada no Laboratório de Química e Física Forense da Polícia Civil do Distrito Federal (LQFF/PCDF). Todos os materiais foram cedidos pelo LQFF/PCDF, com exceção de alguns vegetais que foram comprados em mercados/feiras. Todos os equipamentos necessários para a obtenção dos dados também foram cedidos pelo LQFF/PCDF.

Para as análises, foram selecionadas 359 amostras de maconha, dentre as quais 322 eram da forma prensada, 20 eram planta verde, e 17 eram haxixe. Foram também selecionadas 138 amostras de vegetais e materiais diversos, cujas espécies foram listadas na Tabela 1.

Tabela 1. Vegetais, produtos vegetais e outros materiais utilizados para desafiar o teste colorimétrico baseado na complexação do sal Fast Blue B com fitocanabinoides.

n° da amostra	Vegetais e materiais diversos	n° da amostra	Vegetais e materiais diversos	n° da amostra	Vegetais e materiais diversos
1	Chá de boldo	47	Tomilho	93	Lobélia
2	Chá de camomila	48	Cigarro Dunhill	94	Chacrona
3	Calendula	49	Giseng	95	Cominho
4	Chá preto	50	Cavalinha	96	Erva doce
5	Chá verde	51	Chá misto flores e frutas	97	Folhas de mamona
6	Chapéu de couro	52	Cigarro Winston	98	Pata de vaca
7	Embaúba	53	Cigarro Calton Blend Dunhill	99	Orégano
8	Capim Cideira	54	Cigarro Black Djarum	100	Chacrona
9	Capim Cideira	55	Cigarro Hollywood	101	Alecrim desidratado
10	Erva doce	56	Eucalipto	102	Arnica Nacional
11	Coentro moído	57	Erva cidreira	103	Noz moscada em grão
12	Salvia	58	Guaraná	104	Erva de Santa Maria
13	Jaborandi	59	Cigarro Dunhill	105	Jaborandi
14	Alecrim	60	Cigarro Djarum	106	Erva cidreira
15	Chá mate	61	Cavalinha	107	Hamamélis
16	Passeflora	62	Folhas de caju	108	Centelha asiática
17	Sene	63	Hipérico	109	Sene
18	Louro em pó	64	Chá verde	110	Carobinha
19	Pata de vaca	65	Chá verde chinês	111	Maracujá
20	Chá de carqueja	66	Chá verde	112	Beladona
21	Manjeriço	67	Pure Ceylon tea	113	Folha de mandioca
22	Picão	68	Darjeeling tea	114	Capim limão
23	Orégano	69	Noz de cola em pó	115	Camomila
24	Carqueja amarga	70	Noz moscada em pó	116	Espirradeira
25	Erva mate	71	Pucus viscosos	117	Jaborandi
26	Hibisco	72	Chá verde	118	Menta
27	Fumo desfiado (Maratá)	73	Camomila	119	Chá misto detox
28	Catuaba	74	Confrei	120	Orégano
29	Fumo (narguilê)	75	Arnica nacional	121	Tomilho
30	Chá silvestre flores e frutas	76	Capim limão	122	Salsa desidratado
31	Chá maçã com canela	77	Camomila	123	Apreensão contendo folhas de planta
32	Chá misto de morango	78	Trombeteira	124	Pimenta calabresa
33	Chá verde, hortelã e limão	79	Guaco	125	Chá preto
34	Chá mate + groselha negra	80	Menta	126	Henna Indiana
35	Chá romã e cranberry	81	Erva doce	127	Macis
36	Chá sabor frutos silvestres	82	Ginseng Brasileiro	128	Noz moscada
37	Chá preto + frutas vermelhas	83	Boldo do chile	129	Noz moscada
38	Manjeriço	84	Louro turco	130	Noz moscada
39	Chá de carqueja	85	Louro em pó	131	Noz moscada
40	Coentro grão	86	Pure peppermint	132	Noz moscada
41	Hortelã	87	Embaúba	133	Apreensão contendo fumo e maratá
42	Noz moscada em pó	88	Mate leão	134	Apreensão contendo nicotina e trevo
43	Cigarro Marlboro	89	Capim limão	135	Apreensão contendo resina de caféina e interferentes
44	Cavalinha	90	Camomila	136	Henna Indiana replicata
45	Salsa	91	Embaúba	137	Henna Indiana replicata
46	Cominho	92	Moejo	138	Apreensão semelhante a haxixe

4.2 PREPARAÇÃO DO MATERIAL

Um estudo prévio foi feito para verificar as quantidades de vegetal (maconha ou outro material) e de sal Fast Blue B que trariam as respostas mais específicas para o complexo FBB-fitocanabinoides. Este estudo envolveu um planejamento fatorial onde os fatores selecionados foram as massas de sal, de vegetal e o modo de agitação (manual ou centrífuga). O solvente orgânico utilizado foi o clorofórmio, por ser um dos solventes tradicionalmente utilizados no método colorimétrico com FBBS e aquele já em uso na rotina do LQFF/PCDF. Verificou-se que o ponto ótimo para o experimento era com massa de sal igual a 18 mg e a massa de vegetal igual a 27,5 mg. Verificou-se também que o modo de agitação era um fator inerte.

Utilizando uma balança analítica, cada amostra foi preparada pesando-se 27,5 mg de vegetal em um microtubo plástico com capacidade para 2 mL. No mesmo microtubo, era adicionado 18 mg da mistura de sal Fast Blue B da marca Sigma-Aldrich com sulfato de sódio anidro, na proporção 1:100, em que a mistura é homogeneizada por maceração manual ou em moinho de bolas. Em seguida, era adicionado 1 mL do solvente para extração clorofórmio com teor de 99,8 % da marca Êxodo Científica, e 1 mL de solução de hidróxido de sódio 0,5 M, previamente preparada, para basificar o meio. O microtubo era então agitado, utilizando uma centrífuga, ou manualmente. Para as amostras de maconha de planta verde, antes da realização da pesagem o vegetal era aquecido em uma estufa a cerca de 80°C, com o objetivo de desidratá-la, maximizando a extração de compostos apolares, como os fitocanabinoides, por clorofórmio.

Nessa etapa o resultado do teste colorimétrico já é visível na fase orgânica, porém para a análise espectroscópica, foi necessária diluição 1:20 para que os sinais de absorvância não saturassem o detector. Portanto, 100 µL da fase orgânica era transferido para outro microtubo contendo 1,9 mL de clorofórmio.

4.3 AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS UV-VIS

O equipamento utilizado para aquisição dos espectros de UV-vis foi o Cary 60 UV-Vis Spectrophotometer, cedido pela Agilent Technologies do Brasil, controlado pelo software Cary WinUV. O equipamento obtém o espectro na faixa de 200 nm até 1100 nm. Cada amostra era colocada dentro de uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho

óptico, que em seguida, era inserida no equipamento para a obtenção do espectro. Os espectros eram convertidos para extensão compatível com a planilha eletrônica Excel, da Microsoft Corporation para processamento.

4.4 PROCESSAMENTO DOS ESPECTROS

Os espectros obtidos foram submetidos a Análise dos Componentes Principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) com o pré-processamento mean center. Os programas utilizados foram o Matlab R2019b e PLS-Toolbox (versão 8.8.1, Eigenvector Inc.).

Foram realizadas duas abordagens de PCA, uma de caráter classificatório, e outra de caráter discriminatório.

A primeira abordagem foi feita para observar se há relações ou separações entre as amostras de prensado, de haxixe, de planta verde, e as dos outros e vegetais e materiais. Portanto, cada espectro foi inicialmente identificado por uma dessas 4 classes. O objetivo é verificar se após a PCA as amostras de uma mesma classe irão se agrupar no espaço das componentes principais. Todos Os os espectros gerados de todas as amostras foram utilizados nesta etapa.

A segunda abordagem teve como objetivo criar um modelo onde se possa definir pelo espectro de UV-vis se uma amostra é ou não de maconha. Para isso, foi realizado uma PCA em um primeiro grupo de amostras, selecionadas pelo algoritmo Onion (disponível no PLS-Toolbox), apenas de maconha. Esta etapa é chamada de treinamento. Os limites de T2 e de Q, gerados por esse modelo inicial, são utilizados para verificar a existência de amostras anômalas neste grupo. Caso haja amostras anômalas, estas são excluídas e um novo modelo é criado com as amostras restantes. Os novos limites de T2 e de Q são então utilizados para discriminar as amostras restantes, de maconha, de outros vegetais e materiais, pertencentes à etapa de validação. Foi também criado uma carta de controle utilizando o limite dos escores das amostras de treinamento, considerando que estes seguem uma distribuição Normal. Dado o modelo criado, o resultado da amostra é positivo quando ela for discriminada pelo método como maconha e o resultado da amostra é negativo quando ela for discriminada pelo método como outros vegetais e materiais. A análise final, foi feita através de uma tabela com figuras de mérito, com as taxas de falso positivo, falso negativo e eficiência para cada etapa.

A taxa de falso positivo (TFP) é o percentual de amostras de resultado falso positivo (FP) sobre o total de amostras de materiais e outros vegetais. É calculada da seguinte forma:

$$TFP = \frac{FP}{VN + FP} * 100$$

Onde: FP (falso positivo) é o número de amostras de materiais e outros vegetais que foram discriminadas como maconha pelo método; VN (verdadeiro negativo) é o número das amostras de materiais e outros vegetais que foram discriminadas corretamente.

A taxa de falso negativo (TFN) é o percentual de amostras de resultado falso negativo (FN) sobre o total de amostras de maconha. É calculada da seguinte forma:

$$TFN = \frac{FN}{VP + FN} * 100$$

Onde: FN (falso negativo) é o número de amostras de maconha que foram discriminadas como materiais e outros vegetais pelo método; VP (verdadeiro positivo) é o número de amostras de maconha que foram discriminadas corretamente.

A eficiência do modelo pode ser observada pela sua taxa de eficiência (TEF), que é calculada a partir das outras duas taxas da seguinte forma:

$$TEF = 100 - (TFN + TFP)$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COLORIMETRIA

Após realizar os ensaios dos testes colorimétricos com os vegetais, já era possível diferenciar maconha de outros materiais e vegetais a olho nu, como se pode ver na Figura 9. A maioria das amostras de maconha adquiriam uma coloração vermelha-púrpura, algumas mais intensas e outras menos. Do grupo materiais e outros vegetais, a noz moscada é aquela cujo resultado mais se assemelha ao de maconha, com uma coloração vermelha forte. Ainda assim é possível notar visualmente diferença na intensidade da cor. A maior parte dos outros vegetais adquiriram pouca ou nenhuma cor, como mostra o resultado do coentro em grãos na parte (B) da figura.

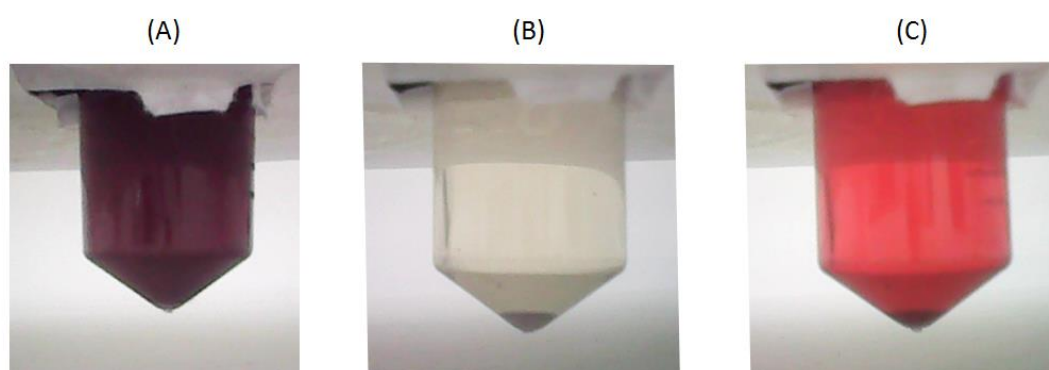


Figura 9. Foto de um microtubo com o resultado da reação para uma amostra (A) de maconha. (B) de coentro em grãos. (C) de noz moscada em pó.

5.2 MODELO PCA DE CARÁTER CLASSIFICATÓRIO

A figura 10 mostra os espectros UV-vis de todas as amostras, codificados por cor de acordo com sua classe (maconha prensada: vermelho, haxixe: azul escuro, planta verde: verde, materiais e outros vegetais: azul claro). A região do espectro que entre 200 e 350 nm, que representa parte da faixa UV, apresenta sinal saturado para muitas das amostras,. Para a diluição utilizada e considerando o objetivo do trabalho, aumentar a especificidade do resultado da reação colorimétrica, essa região foi excluída das análises. Percebe-se também que os níveis de absorbância das amostras permanecem bem próximos da linha de base ao longo da região entre 710

e 1100 nm, detendo pouca informação, levando também à exclusão dessa região das análises. Além disso, a região com maior potencial discriminativo, entre 350 e 710 nm (destacada pelo retângulo na Fig. 10), está em torno da mesma região do visível no espectro eletromagnético, o que faz ainda mais sentido utilizá-la já que o resultado do teste colorimétrico em questão pode ser observado de forma visual. Logo, esta foi a região utilizada para as análises.

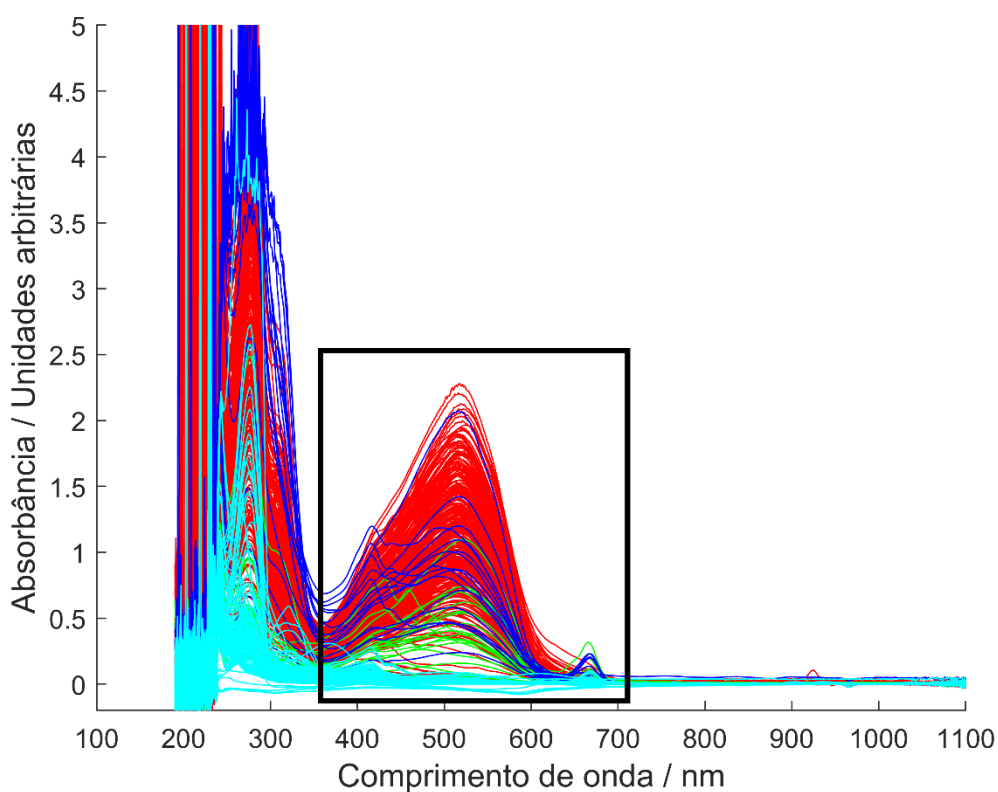


Figura 10. Espectros brutos das amostras das quatro classes. (azul claro) materiais e outros vegetais, (verde) amostras de maconha em forma de planta verde, (azul escuro) haxixe e (vermelho) maconha prensada.

A figura 11 mostra os espectros na região selecionada para as análises. Visualmente, é perceptível que na região de aproximadamente 515 nm existe uma banda de absorção marcante nas amostras de maconha, que não aparece nas amostras de materiais e outros vegetais. Aparentemente essa banda segue um padrão de intensidade, sendo mais forte nas amostras de prensado, e mais fracas nas de planta verde, o que indica existir na faixa de comprimentos de onda próximo de 510 nm potencial para desenvolvimento de método quantitativo. Considerando a

diferença de intensidade do espectro UV-Vis dos diferentes grupos de amostra para essa banda, pode-se inferir que ela deve representar o sinal do produto da reação do THC e demais fitocanabinoides com o sal Fast Blue B. É possível que o sinal da banda seja mais fraco nas amostras de planta verde devido ou à maior quantidade de água presente nessas amostras, presente mesmo após a secagem na estufa, ou à menor concentração de fitocanabinoides. Nota-se também a presença de outras bandas menores próximas aos 415 nm e 670 nm, que estão mais evidentes nas amostras de haxixe. Estas bandas podem ter relação com uma maior concentração de fitocanabinoides, diversos do THC, presentes na maconha.

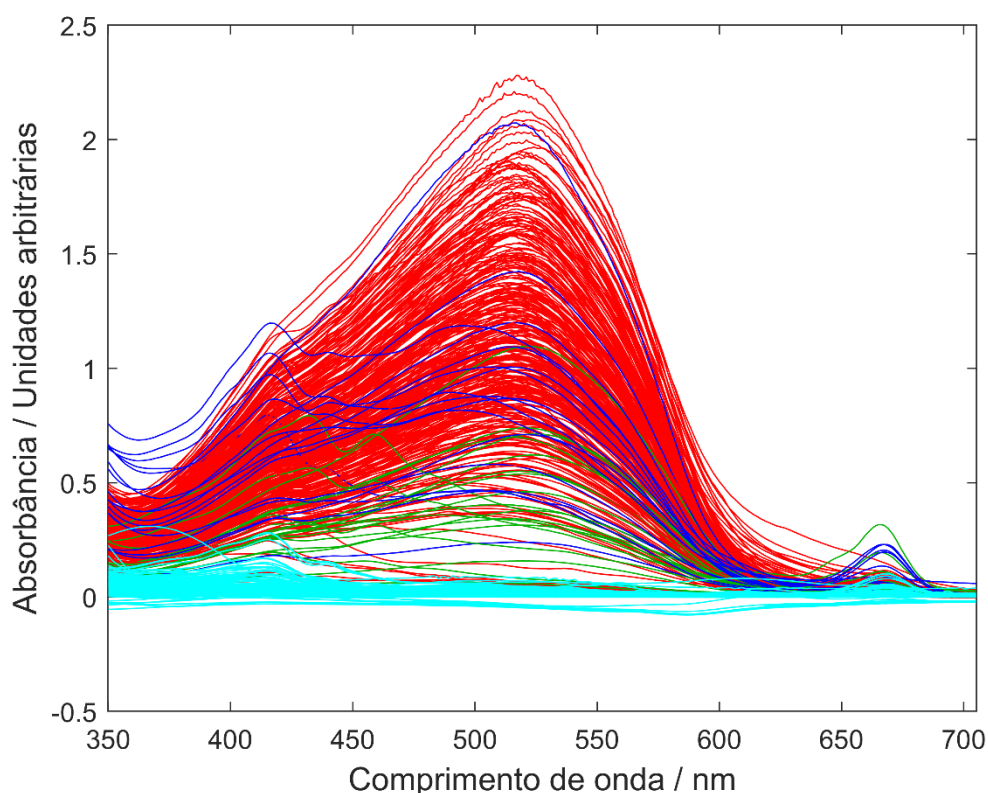


Figura 11. Espectros das amostras das quatro classes na região selecionada de 350 a 700 nm. (azul claro) materiais e outros vegetais, (verde) amostras de maconha em forma de planta verde, (azul escuro) haxixe e (vermelho) maconha prensada.

Com os espectros na região selecionada, foi realizado uma PCA, na qual cada comprimento de onda é uma variável. Os espectros foram pré-processados para centrar os valores de cada variável na na média do conjunto de dados. A tabela 2 mostra as variâncias individuais e acumuladas das três primeiras componentes

principais. Com três PCs, é possível descrever 99,89% da variância dos dados, e por esse motivo decidiu-se limitar o modelo a três PCs. A PC2 e PC3 explicam juntas apenas 1,3% da variância, porém pode haver alguma informação importante com a análise delas. Apenas 0,11% da variância dos dados não é explicada por essa PCA, o que provavelmente corresponde ao ruído presente nos espectros.

Tabela 2. Variância explicada por cada uma das três componentes principais e variância acumulada.

Número da componente principal	Variância da PC (%)	Variância acumulada (%)
1	98,59	98,59
2	1,06	99,65
3	0,24	99,89

Ao analisar o gráfico de escores da PC1 na figura 12 é possível perceber o agrupamento de todas as amostras de materiais e outros vegetais, onde o escore delas apresenta valores por volta de -9, com pouca dispersão. Esse resultado demonstra que tanto o método utilizando espectroscopia de UV-Vis quanto o tratamento dos dados por PCA são eficazes na discriminação dos grupos de amostras no espectro UV-vis. Visualmente, apenas 8 amostras de maconha seriam confundidas como materiais e outros vegetais, sendo que 4 são de prensado e 4, de planta verde. Estas seriam consideradas como falso negativo. O gráfico também mostra que há uma grande dispersão dos escores de maconha, principalmente as de haxixe e prensado, com escores que vão de cerca de -9 até quase 15. As amostras de planta verde parecem seguir um comportamento levemente diferente das demais, se concentrando em uma região de -5 e com apenas uma amostra acima do 0.

O gráfico de pesos da PC1, apresentado na figura 13, pode explicar esses resultados. Nele é mostrado quais comprimentos de onda possuem maior relevância na construção da primeira componente principal. A banda na região de 515 nm está próxima do valor máximo de pesos da PC1, o que permite inferir que essa PC está diretamente relacionada com a banda do complexo dos fitocanabinoides com o FBBS, característica que diferencia maconha dos materiais e outros vegetais. As amostras de maconha possuem essa banda de forma mais intensa, enquanto as de materiais e outros vegetais não a apresentam. É bem provável que a intensidade dessa banda esteja relacionada à quantidade de THC e outros fitocanabinoides presentes no

vegetal. É perceptível também um “ombro” na região de 415 nm e uma pequena banda na região de 670 nm que também influenciam na PC1.

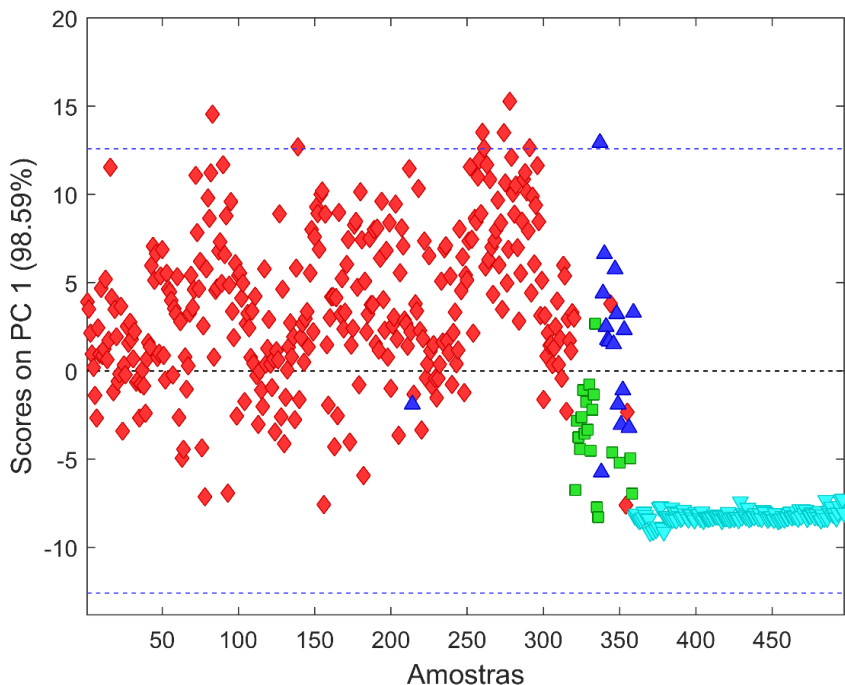


Figura 12. Gráfico de escores da primeira componente principal da PCA de caráter classificatório. (azul claro) materiais e outros vegetais, (verde) amostras de maconha em forma de planta verde, (azul escuro) haxixe e (vermelho) maconha prensada.

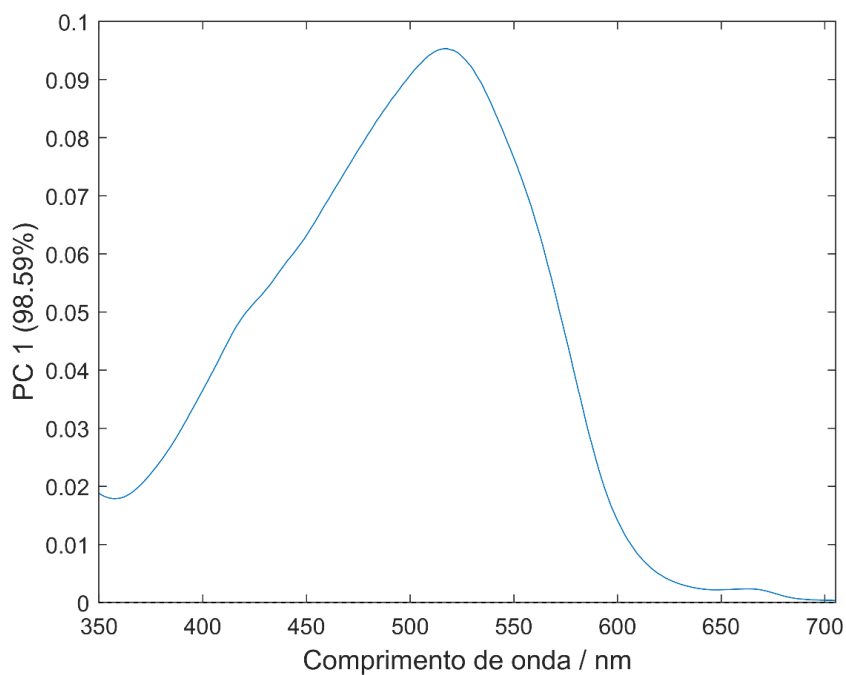


Figura 13. Gráfico de pesos da primeira componente principal da PCA de caráter classificatório.

Quando se juntam as três componentes principais em um gráfico, como mostra a figura 14, a distinção entre alguns grupos pode ser percebida, mesmo que de forma parcial no caso das formas de apresentação de maconha. A imagem mostra que há uma grande diferença entre amostras de maconha e de materiais e outros vegetais, e que há algumas diferenças sutis entre as amostras de maconha de diferentes formas de apresentação. A classe dos materiais e outros vegetais se agrupam na parte esquerda, tendo pouca dispersão. Há também um leve agrupamento entre as amostras de planta verde, que também ficam próximas as de materiais e outros vegetais. As amostras de haxixe não são tão bem agrupadas, porém na parte superior há uma maior presença destas. As amostras de prensado se agrupam bem no centro da imagem, porém com uma grande dispersão.

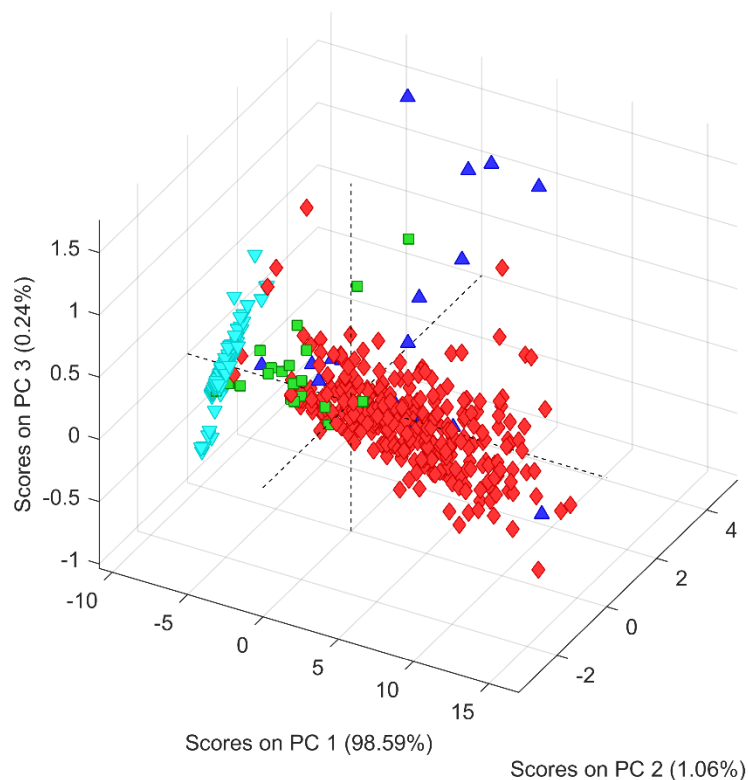


Figura 14. Gráfico de escores das três primeiras componentes principais da PCA de caráter classificatório. (azul claro) materiais e outros vegetais, (verde) amostras de maconha em forma de planta verde, (azul escuro) haxixe e (vermelho) maconha prensada.

As componentes principais 2 e 3 podem ser explicadas pelos seus gráficos de pesos, mostrados nas figuras 15 e 16. Nota-se que na PC2 há uma grande influência das bandas em 415 nm e 670 nm, e a banda maior vista anteriormente na PC1 não é importante. Na PC3 a banda de 670 nm também é relevante, somada a uma outra na região de 570 nm. Como mencionado anteriormente, os sutis agrupamentos entre as diferentes formas de apresentações de maconha só foram observados através das PC2 e PC3, o que sugere que estas componentes principais expliquem essas diferenças. Portanto, sugere-se que essas bandas explicam as diferentes concentrações de fitocanabinoides, já que o preparo de haxixe e de prensado, a partir da planta verde, é diferente.

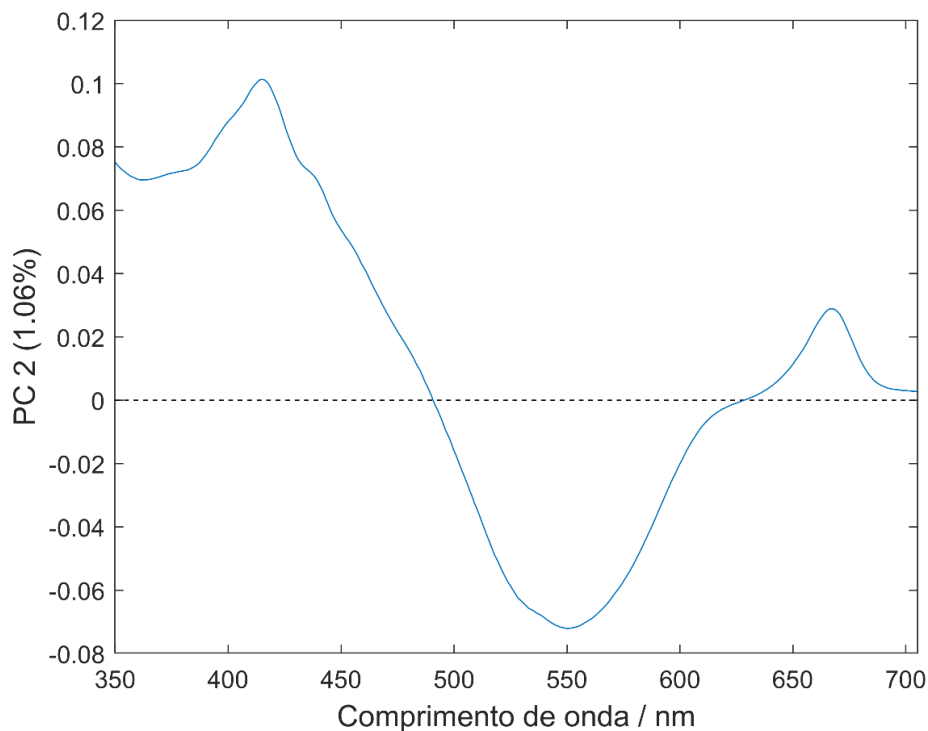


Figura 15. Gráfico de pesos da segunda componente principal da PCA de caráter classificatório.

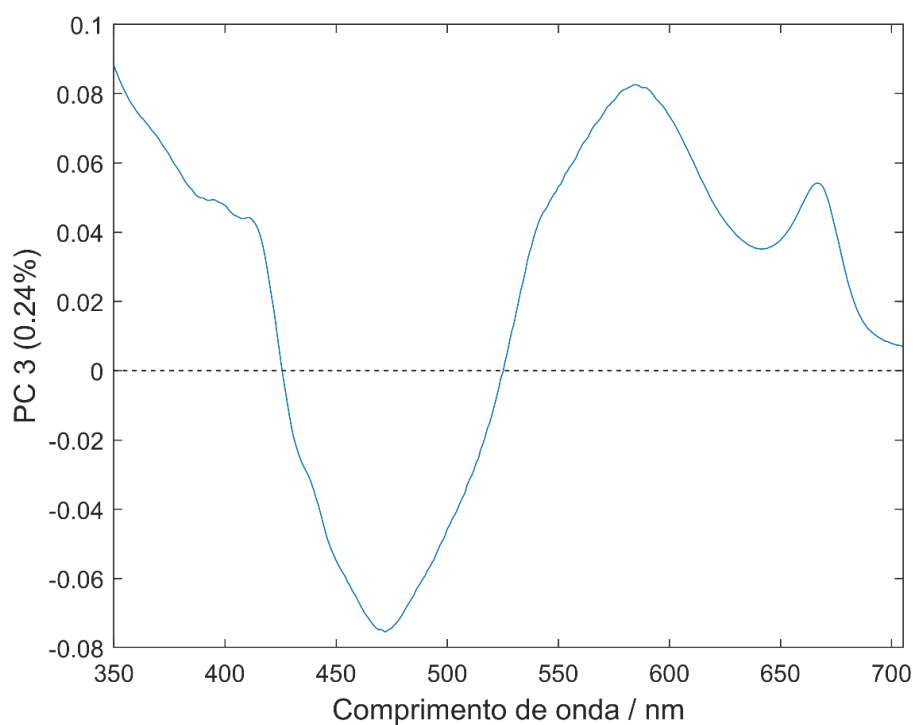


Figura 16. Gráfico de pesos da terceira componente principal da PCA de caráter classificatório.

5.3 MODELO PCA DE CARÁTER DISCRIMINATÓRIO

Para uma análise discriminatória, 237 espectros de amostras de maconha foram selecionados para um modelo de PCA. As amostras incluíram prensado, haxixe e planta verde. O modelo foi inicialmente configurado com duas componentes principais, com o objetivo de verificar possíveis amostras anômalas. A figura 17 mostra o gráfico dos escores nas duas componentes principais, que explicam juntas 99,15% da variância dos dados. Nota-se que há 4 amostras distantes do centro do modelo, que potencialmente podem interferir na análise final. Foi criado então o gráfico de T^2 de Hotelling x resíduos Q, mostrado na figura 18, onde os limites de ambos os parâmetros têm 99% de confiança e estão representados pela linha tracejada. Amostras que ultrapassaram qualquer um desses limites foram consideradas anômalas e foram excluídas do modelo. Foram então excluídas 5 amostras, sendo uma de prensado, três de haxixe e uma de planta verde.

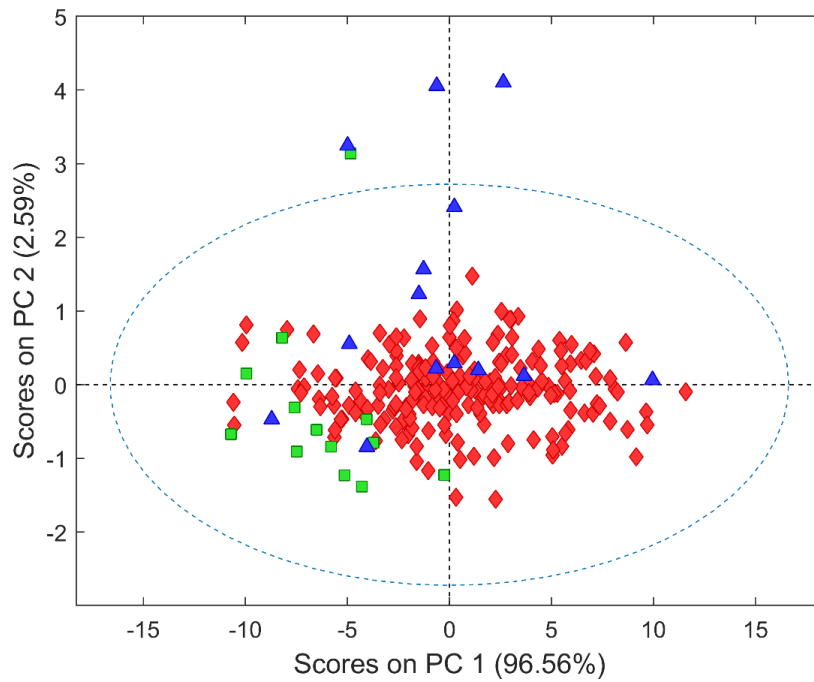


Figura 17. Gráfico de escores das duas primeiras componentes principais da PCA de caráter discriminatório, sem exclusão de amostras. (verde) amostras de maconha em forma de planta verde, (azul escuro) haxixe e (vermelho) maconha prensada.

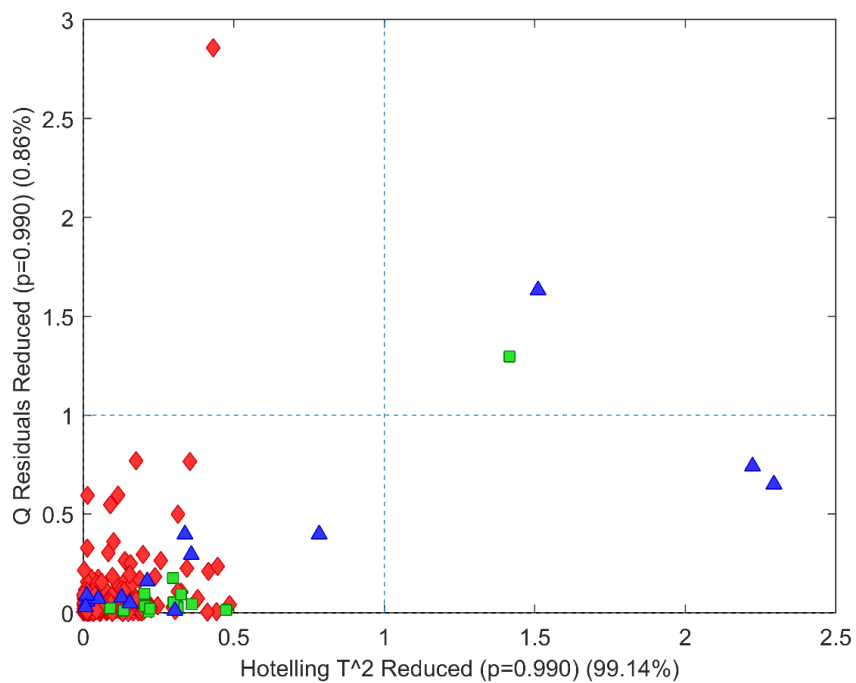


Figura 18. Gráfico de T² de Hotelling x resíduos Q da PCA de caráter discriminatório considerando as duas primeiras componentes principais. (verde) amostras de maconha em forma de planta verde, (azul escuro) haxixe e (vermelho) maconha prensada.

Um novo modelo de PCA foi feito com as 232 amostras restantes. O novo modelo, mostrado na figura 19, possui apenas uma amostra distante do centro, mas como essa amostra excedia o limite de confiança apenas de forma marginal, decidiu-se não excluir essa amostra, então manteve-se esse modelo para o restante das análises. A primeira PC do modelo explica 97,89 % da variância dos dados, enquanto a segunda PC explica 1,55%. Devido à essa diferença nos valores, decidiu-se manter apenas a primeira componente do modelo. A figura 20 mostra o gráfico de pesos dessa primeira PC, ilustrando novamente a importância da banda na região de 515 nm, dessa vez para discriminação entre maconha e materiais e outros vegetais.

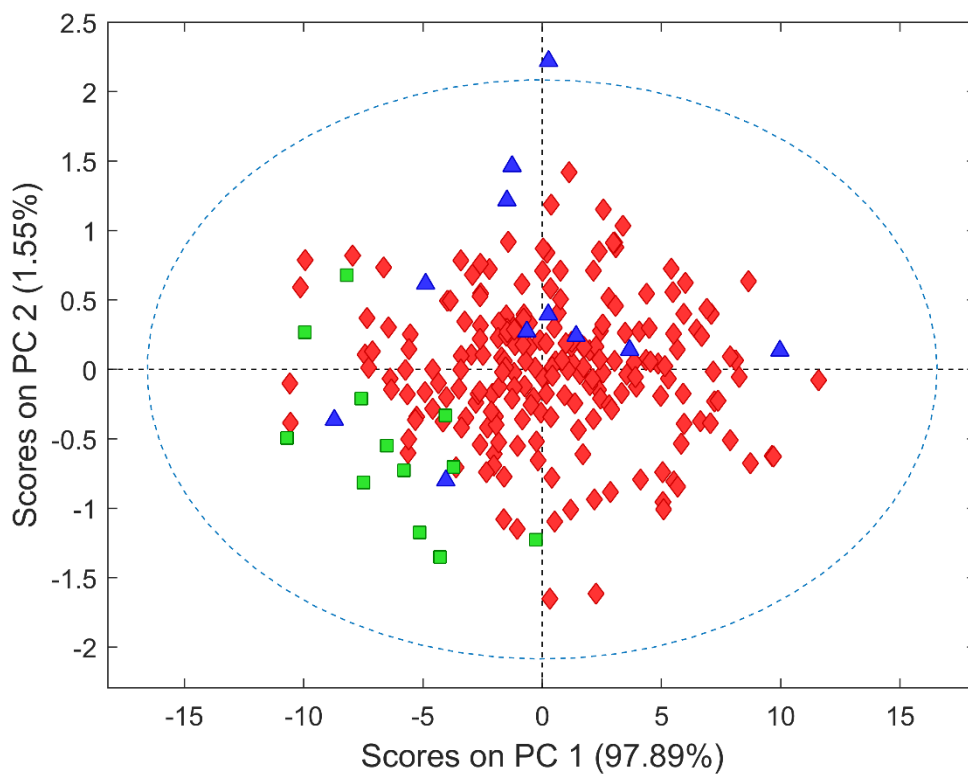


Figura 19. Gráfico de escores das duas primeiras componentes principais da PCA de caráter discriminatório, com a exclusão de amostras anômalas. (verde) amostras de maconha em forma de planta verde, (azul escuro) haxixe e (vermelho) maconha prensada.

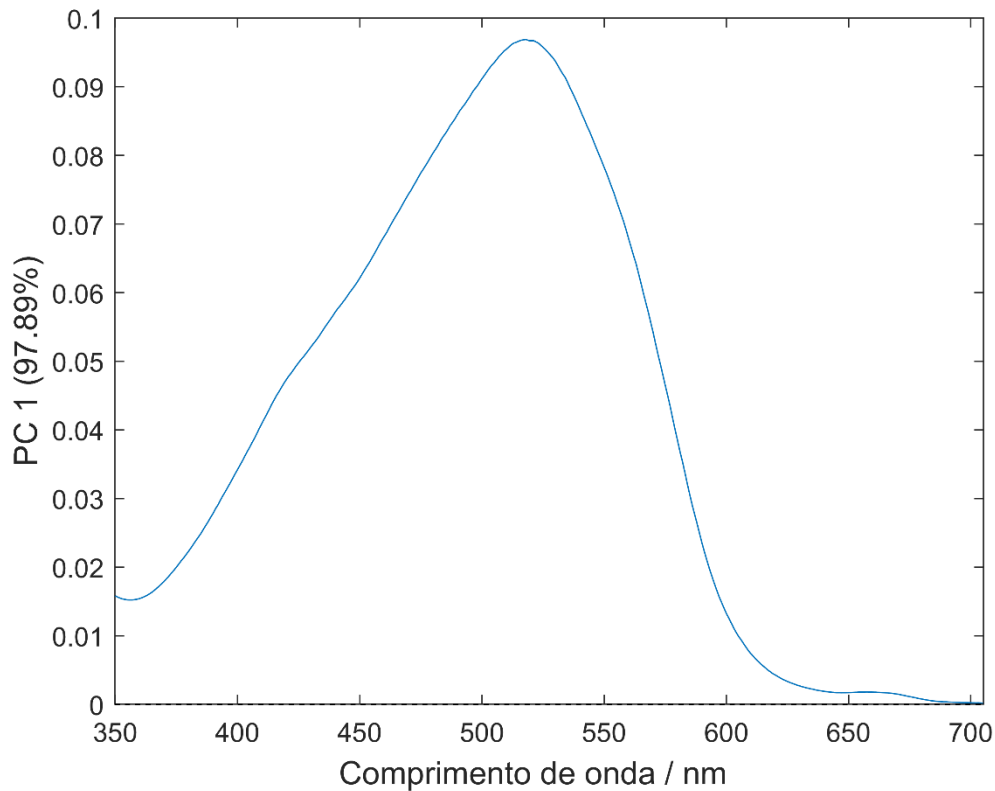


Figura 20. Gráfico de pesos da primeira componente principal da PCA de caráter discriminatório, após a exclusão de amostras anômalas.

Os limites de T^2 de hotelling e de resíduos Q desse modelo de uma componente criado foi utilizado para a discriminação de maconha. Além desses dois limites, um limite de escores também foi criado considerando que estes seguem uma distribuição Normal, numa abordagem de carta de controle, utilizando a equação de intervalo de confiança com 95 % de confiança.

Na etapa de validação, as outras 122 amostras de maconha e as 139 amostras de materiais e outros vegetais foram analisadas utilizando o modelo. Gerou-se então os valores de escores, T^2 de Hotelling e de resíduos Q para essas novas amostras no modelo. Esses valores foram utilizados para analisar se a amostra é ou não maconha, onde se o valor for abaixo dos limites o resultado é positivo para maconha, e acima dos limites é negativo. O gráfico da figura 21 mostra os valores de T^2 de Hotelling e de resíduos Q de todas as amostras, e também os limites, representados pelas linhas tracejadas. Nota-se que o parâmetro resíduos Q não é eficiente para discriminar maconha de materiais e outros vegetais, já que a maioria das amostras de maconha

e de materiais e outros vegetais estão abaixo do limite de resíduos Q. Uma possível explicação para esse resultado é que boa parte das amostras de materiais e outros vegetais apresentam um sinal pouco intenso, o que faz com que os resíduos também sejam baixos. Já o parâmetro T^2 de Hotelling parece ser mais eficiente, pois os valores de todos os materiais e outros vegetais estão acima do limite, enquanto a maioria dos valores de maconha estão abaixo.

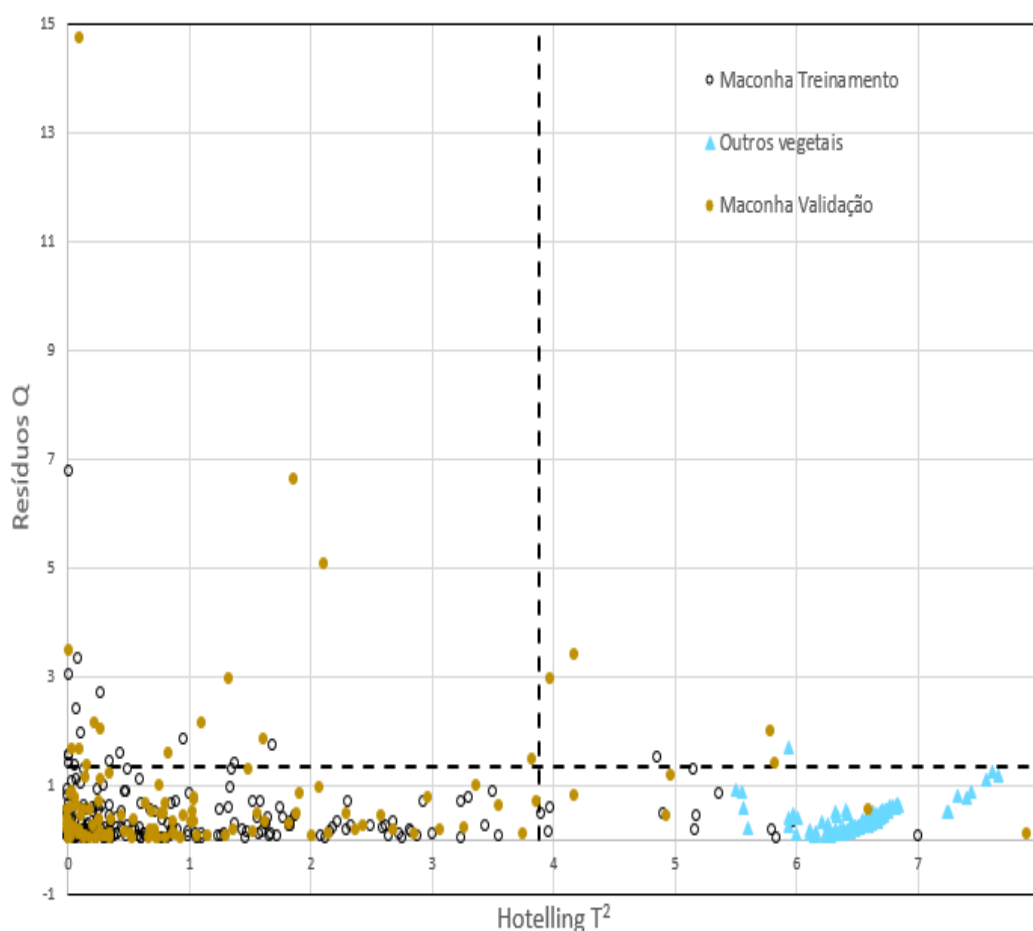


Figura 21. Aplicação dos parâmetros de Hotelling T² e resíduos Q às amostras de maconha e materiais e outros vegetais.

O gráfico da figura 22 mostra os valores de escores para todas as amostras, e também o limite de 95% de confiança, representado pela linha tracejada. Além disso, as amostras sem preenchimento, do lado esquerdo, são as do grupo de treinamento, e as com preenchimento são as de validação. Assim como na análise do parâmetro T^2 de Hotelling, todos os escores de materiais e outros vegetais estão abaixo do limite

de 95% de confiança, além de uma minoria de maconha também abaixo deste limite, indicando uma boa eficiência.

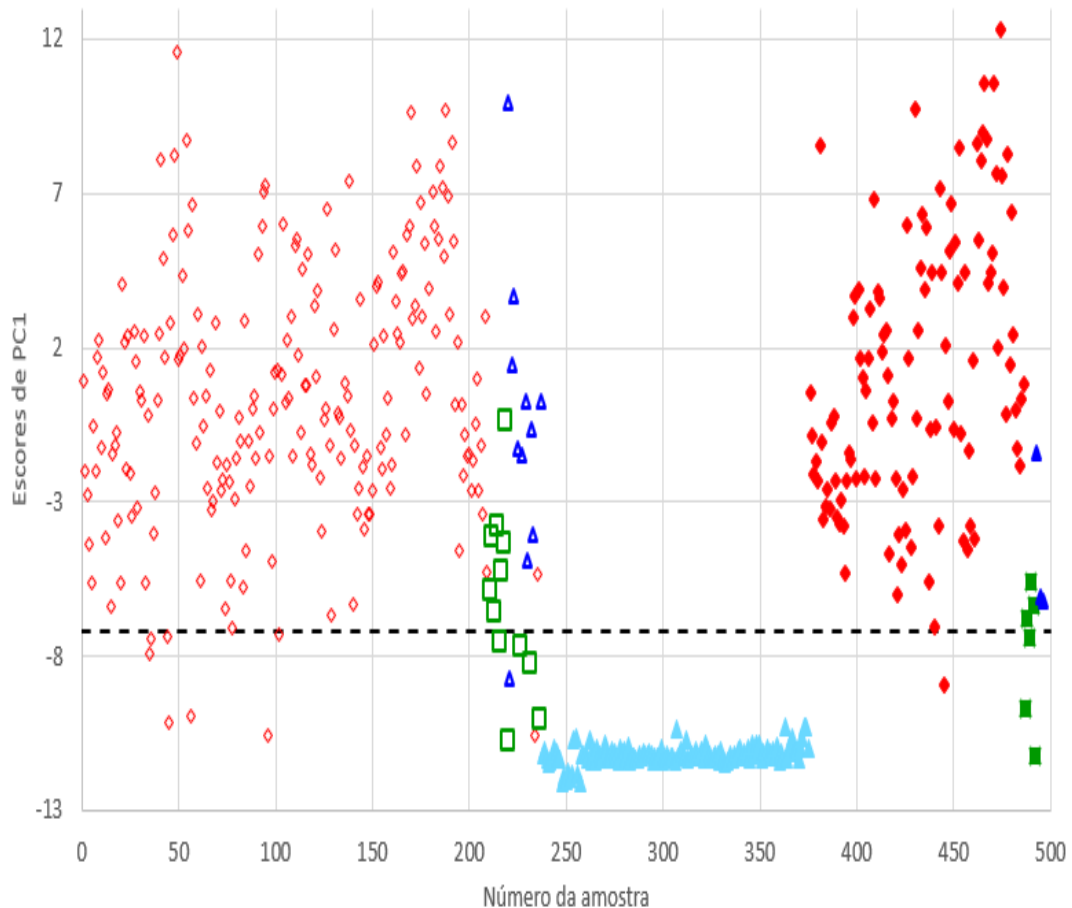


Figura 22. Carta de controle de escores de PC1, utilizando o limite de confiança de 95 %. (Vermelho) maconha prensado, (verde) planta verde, (Azul escuro) haxixe, (Azul claro) materiais e outros vegetais e (linha tracejada) limite de confiança.

Os resultados do método para a discriminação de maconha foram colocados na tabela 3. Calculou-se a taxa de falso negativo (TFN) para as amostras de treinamento e de validação e as taxas de falso positivo (TFP) e de eficiência (TEF) para as amostras de validação, já que no treinamento não havia nenhuma amostra de materiais e outros vegetais. Essas taxas foram calculadas para cada parâmetro, além de um parâmetro global (uso dos três parâmetros), que é quando o resultado era falso para pelo menos um dos outros três parâmetros. Pode-se notar um excelente resultado de TFP para a carta de escores e T^2 de Hotelling, onde ambos não

apresentaram nenhum falso positivo. Isso significa que caso o modelo fosse colocado em prática usando esses parâmetros, nenhuma amostra que não contenha maconha seria classificada como tal. O mesmo não ocorre para o parâmetro resíduos Q, onde apenas uma amostra de materiais e outros vegetais não foi classificada como maconha. Em relação a TFN, os melhores parâmetros também foram a carta de controle de escores e o T^2 de Hotelling. No grupo de validação, apenas 4 amostras de maconha foram classificadas como materiais e outros vegetais, gerando uma TFN de 3,3%. No grupo de treinamento os valores de TFN foram próximos, com o T^2 de Hotelling se sobressaindo levemente. Os valores de escores e de T^2 de Hotelling têm semelhança, devido à ambos tratarem-se de distâncias, e talvez por isso tenham resultados próximos e bons. Quando se analisou o parâmetro global, as taxas de falso negativo e de falso positivo foram mais elevadas, isso porque muitas amostras tinham resultado falso em apenas um dos três parâmetros. Conclui-se, portanto, que o melhor método elaborado para discriminar maconha de materiais e outros vegetais foi a utilização da carta de controle de escores com intervalo de confiança de 95%.

Tabela 3. Figuras de mérito para as amostras de treinamento e validação.

Figuras de mérito	Treinamento			Validação						
	VP	FN	TFN (%)	VP	FN	VN	FP	TFN (%)	TFP (%)	TEF (%)
Escores	218	14	6,0	118	4	138	0	3,3	0	96,7
T^2 de Hotelling	219	13	5,6	113	9	138	0	7,4	0	92,6
Resíduos Q	216	16	6,9	104	18	1	137	14,75	99,3	0
Global	197	35	15,1	97	25	1	137	20	99,3	0

6 CONCLUSÃO

Os espectros VIS na região entre 350 e 710 nm obtidos das reações colorimétricas com o sal FBB feitas com 359 amostras de maconha e 138 de materiais e outros vegetais demonstrou significativo potencial discriminatório, corroborando a observação visual do teste colorimétrico que sugere que o desenvolvimento de cor na fase orgânica está associado ao produto de reação do sal de Fast Blue B com os fitocanabinoides da maconha. Mesmo no caso da noz moscada, em que a fase orgânica da solução gerou uma solução vermelha, a diferença no tom de cor foi perceptível.

O modelo de PCA de caráter classificatório foi bastante útil para verificar agrupamentos presentes nos dados de espectroscopia UV-vis das soluções. Apenas ao visualizar os espectros é notável a diferença de maconha para os materiais e outros vegetais na região da banda de 520 nm. A PCA realizada nesta etapa permitiu a apresentação objetiva dessas diferenças. Houve um bom agrupamento de amostras de materiais e outros vegetais, visualizado na primeira componente principal, que explicou 98,59% da variância do modelo. Ao verificar o gráfico das três primeiras componentes principais, também notou-se agrupamentos entre as diferentes formas de apresentação de maconha: na sua forma prensada, em forma de planta verde e haxixe. Estes agrupamentos podem estar relacionados às proporções dos diferentes fitocanabinoides presentes em cada um dos grupos de maconha.

Por fim, com o modelo de PCA de caráter eliminatório, foi possível discriminar maconha de materiais e outros vegetais com uma certa eficiência. O parâmetro com resultado mais desfavorável foi o de Q resíduos, que pôde discriminar apenas uma amostra de materiais e outros vegetais. Este último parâmetro influenciou negativamente o resultado do parâmetro global, já que no global para a amostra ser considerada como verdadeiro negativo (ou positivo) ela deveria ser verdadeiro negativo (ou positivo) nos outros três parâmetros.

Como os parâmetros de T2 de Hotelling e de escores têm relação direta com distância no modelo de PCA, os dois obtiveram ótimos resultados. Ambos conseguiram discriminar materiais e outros vegetais de maconha, não havendo nenhum falso positivo. E ao discriminar maconha de materiais e outros vegetais de fato, somando as 354 amostras de maconha, 232 de treinamento e 122 de validação,

no parâmetro de escores houve apenas 18 falsos negativos e no de T2 de Hotelling apenas 22.

O presente trabalho foi capaz de demonstrar que a triagem de vegetais no LQFF/PCDF pode ser aprimorada associando o método colorimétrico pelo sal FBB com a espectroscopia UV-vis e análise de componentes principais, além de abrir possibilidade para discriminação de amostras de maconha com diferentes apresentações e diferentes concentrações de fitocanabinoides.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, T.. “Maconha é reconhecida como planta medicinal pela Anvisa”. Super interessante. Maio de 2017. Disponível em: <<https://super.abril.com.br/coluna/psicoativo/maconha-e-reconhecida-como-planta-medicinal-pela-anvisa/>>. Acesso em: 16 fev. 2022.

ATKINS, Peter. Físico-Química - Fundamentos, 6ª edição. Grupo GEN, 2017. 9788521634577.

BALBINO, M.A.; DE OLIVEIRA, L.S.; ELEOTÉRIO, I.C.; OIYE, E.N.; RIBEIRO, M.F.M.; MCCORD, B.R.; IPOLITO, A.J.; DE OLIVEIRA, M.F.. “The Application of Voltammetric Analysis of Δ^9 -THC for the Reduction of False Positive Results in the Analysis of Suspected Marijuana Plant Matter”. Journal of Forensic Sciences, vol. 61, no 4, julho de 2016, p. 1067–73.

BORDIN, D.C.; MESSIAS, M.; LANARO, R.; CAZENAVE, S.O.S.; COSTA, J.L.. “Análise Forense: Pesquisa de Drogas Vegetais Interferentes de Testes Colorimétricos Para Identificação Dos Canabinoides Da Maconha (Cannabis Sativa L.)”. Química Nova, vol. 35, no 10, 2012, p. 2040–43.

BORILLE, B.T.; Caracterização química da planta cannabis sativa I. a partir de sementes apreendidas pela polícia federal no estado do rio grande do sul. Tese (Doutorado em ciências farmacêuticas) – Universidade federal do Rio Grande do Sul da faculdade de farmácia. Porto alegre, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde/SNVS. Portaria nº344 de 12 de maio de 1998 Aprova o Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 31 de dez. de 1998.

CFM - Conselho Federal de Medicina. “Exposição de motivos da resolução CFM N° 2.113/2014”.

[https://portal.cfm.org.br/canabidiol/motivos.php#:~:text=O%20Canabidiol%20\(CBD\)%20%C3%A9%20um,et%20al.%2C%202012](https://portal.cfm.org.br/canabidiol/motivos.php#:~:text=O%20Canabidiol%20(CBD)%20%C3%A9%20um,et%20al.%2C%202012). Acessado 3 de março de 2022.

DE FAUBERT MAUNDER, M. J., J. Assoc. Public Analysts . 1969, 7, 24.

DE LIMA, A.A.; ALEXANDRE, U.C.; SANTOS, J.S. “O uso da maconha (Cannabis sativa L.) na indústria farmacêutica: uma revisão”. Research, Society and Development, vol. 10, no 12, setembro de 2021, p. e46101219829.

DOS SANTOS, N.A.; SOUZA, L.M.; DOMINGOS, E.; FRANÇA, H.S.; LACERDA JR, V.; BEATRIZ, A.; VAZ, B.G.; RODRIGUES, R.R.T.; CARVALHO, V.V.; MERLO, B.B.; KUSTER, R.M.; ROMÃO, W.. “Evaluating the Selectivity of Colorimetric Test (Fast Blue BB Salt) for the Cannabinoids Identification in Marijuana Street Samples by UV–Vis, TLC, ESI(+)FT-ICR MS and ESI(+)MS/MS”. Forensic Chemistry, vol. 1, agosto de 2016, p. 13–21.

D'SOUZA, D.C.; RANGANATHAN, M.; BRALEY, G.; GUEORGUIEVA, R.; ZIMOLO, Z.; COOPER, T.; PERRY, E.; KRYSTAL, J. "Blunted Psychotomimetic and Amnestic Effects of Δ -9-Tetrahydrocannabinol in Frequent Users of Cannabis".

Neuropsychopharmacology, vol. 33, no 10, setembro de 2008, p. 2505–16.

ELSOHLY, M.A.; SLADE, D. "Chemical Constituents of Marijuana: The Complex Mixture of Natural Cannabinoids". Life Sciences, vol. 78, no 5, dezembro de 2005, p. 539–48.

FERREIRA, M.M.C.; ANTUNES, A.M.; MELGO, M.S.; VOLPE, P.L.O.. "Quimiometria I: Calibração Multivariada, Um Tutorial". Química Nova, vol. 22, no 5, setembro de 1999, p. 724–31.

GLOSS, D. "An Overview of Products and Bias in Research". Neurotherapeutics, vol. 12, no 4, outubro de 2015, p. 731–34.

GOVERNO DO BRASIL. "Cresce o número de apreensões de drogas em um ano". Governo do Brasil. Junho, 2021. <https://www.gov.br/pt-br/noticias/justica-e-seguranca/2021/06/cresce-o-numero-de-apreensoes-de-drogas-em-um-ano>. Acessado 2 de março de 2022.

GONTIÈS, B.; ARAÚJO, L. F. DE. Maconha: uma perspectiva histórica, farmacológica e antropológica. Mneme - Revista de Humanidades, v. 4, n. 07, 30 jun. 2010.

HAXIXE. In: WIKIPÉDIA, a enciclopédia livre. Flórida: Wikimedia Foundation, 2020. Disponível em: <<https://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Haxixe&oldid=57996535>>. Acesso em: 16 fev. 2022.

HRYHOROWICZ, S.; WALCZAK, M.; ZAKERSKA-BANASZAK, O.; STOMSKI, R.; SKRZYPCZAK-ZIELIN'SKA, M. "Pharmacogenetics of Cannabinoids". European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, vol. 43, no 1, fevereiro de 2018, p. 1–12.

JACOBS, A.D.; STEINER R.R. "Detection of the Duquenois–Levine Chromophore in a Marijuana Sample". Forensic Science International, vol. 239, junho de 2014, p. 1–5.

JORK, H.; FUNK, W.; FISCHER, W; WIMMER, H.. Thin Layer chromatography - Reagents and Detection Dethods-. Volume 1a, pp. 288-293, VCH Publisher, Weinheim, Germany (1990).

LAMBERT, D.M.; FOWLER, C.J. "The Endocannabinoid System: Drug Targets, Lead Compounds, and Potential Therapeutic Applications". Journal of Medicinal Chemistry, vol. 48, no 16, agosto de 2005, p. 5059–87.

LAU-CAM, C. A.; PIZZITOLA, V.. "Simple Field Test for Marijuana". Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 68, no 8, agosto de 1979, p. 976–78.

MAGALHÃES, L.O.; ARANTES, L.C.; BRAGA, J.W.B.. “Identification of NBOMe and NBOH in Blotter Papers Using a Handheld NIR Spectrometer and Chemometric Methods”. *Microchemical Journal*, vol. 144, janeiro de 2019, p. 151–58.

MAXX, M. “Como nasce o ‘prensado’”. Agência Pública, 21 de agosto de 2017, <https://apublica.org/2017/08/como-nasce-o-prensado/>. Acessado 3 de março de 2022.

MAZZA, L.; AMOROZO, M.; BUONO, R. “No ano da pandemia, apreensão de maconha mais que dobrou no Brasil”. *Folha de S. Paulo, revista Piauí*. Outubro, 2020. <https://piaui.folha.uol.com.br/no-ano-da-pandemia-apreensao-de-maconha-mais-que-dobrou-no-brasil/>. Acessado 2 de março de 2022.

MECHOULAM, R.; HANUS, L.O.; PERTWEE, R.; HOWLETT, A.C. “Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond”. *Nature Reviews Neuroscience*. AOP, published online 15 October 2014.

MECHOULAM, R.; PARKER, L.A.; GALLILY, R. “Cannabidiol: An Overview of Some Pharmacological Aspects”. *The Journal of Clinical Pharmacology*, vol. 42, no S1, novembro de 2002, p. 11S-19S.

MELO, C.W.B.; COSTA, I.H.L., MACEDO, G.S.; MENESES, R.B.. “Quimiometria na classificação de leite cru refrigerado”. *Segurança Alimentar e Nutricional*, vol. 28, abril de 2021, p. e021020.

NASCIMENTO, I.R. “Identificação Química em Nível Molecular de Amostras de Maconha por ESI-FT-ICR MS”. Dissertação de Mestrado em Química - UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO. Espírito Santo, 2014.

NETO, Benício B.; SCARMINIO, Ieda S.; BRUNS, Roy E. *Como Fazer Experimentos*. Porto Alegre: Bookman, 2010. 9788577807130.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R.. *Introdução à espectroscopia*. Cengage Learning Brasil, 2016. 9788522123391.

PESSOA, D.O.C.; LIRA, I.V.; SIQUEIRA, L.P. “Cannabis Sativa: uma revisão integrativa dos aspectos legais, toxicológicos e farmacoterapêuticos”. *Research, Society and Development*, vol. 10, no 15, novembro de 2021, p. e18101522408–e18101522408.

PRENSADO. In: WIKIPÉDIA, a enciclopédia livre. Flórida: Wikimedia Foundation, 2022. Disponível em: <<https://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Prensado&oldid=63034934>>. Acesso em: 16 fev. 2022.

RUSSO, E.B.; MARCU J. “Cannabis Pharmacology: The Usual Suspects and a Few Promising Leads”. *Advances in Pharmacology*, vol. 80, Elsevier, 2017, p. 67–134.

SATO, J.H. “MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DO CARBONO ORGÂNICO EM SOLOS DO CERRADO”. Dissertação de Mestrado em Agronomia – Universidade de Brasília. Brasília, 2013.

SKOOG, Douglas A.; WEST, Donald M.; HOLLER, F J.; CROUCH, Stanley R. Fundamentos de Química Analítica: Tradução da 9ª edição norte-americana. Cengage Learning Brasil, 2015. 9788522121373.

SOARES, L.F.; da SILVA, D.C.; BERGO, M.C.J.; CORADIN, V.T.R.; BRAGA, J.W.B.; PASTORE, T.C.M.. “Avaliação de espectrômetro NIR portátil e PLS-DA para a discriminação de seis espécies similares de madeira amazônicas”. Química Nova, fevereiro de 2017.

SWGDRUG. Scientific Working Group for the analysis of seized drugs (SWGDRUG) recommendations. Junho de 2019. Disponível em: <https://www.swgdrug.org/Documents/SWGDRUG%20Recommendations%20Version%208_FINAL_ForPosting_092919.pdf>. Acesso em: 22 abr. 2022.

TEÓFILO, R.F.. “Métodos Quimiométricos: Uma Visão Geral - Conceitos básicos de quimiometria”. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Vol. 1, 2013.

UNODC - United Nations Office On Drugs And Crime – Vienna. “Recommended methods for the identification and analysis of cannabis and cannabis products”. Manual for use by national drug analysis laboratories. Nova Iorque, 2009.

UNODC. United Nations Office on Drugs and Crime. World Drug Report 2021. United Nations Publication, Sales No. E.21.XI.8, 2021.

VARELLA, C.A.A.. “Análise de componentes principais”. Análise Multivariada Aplicada as Ciências Agrárias. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, 2008.