



UnB

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

Rafaela Dornelas Vieira

**IDENTIFICAÇÃO DE *CANNABIS SATIVA L.* POR ESPECTROS DE
ATR-FTIR OBTIDOS DE EXTRATOS DE AMOSTRAS DE DROGAS
APREENDIDAS**

Trabalho de conclusão de curso

Brasília –DF

2022



UnB

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

Rafaela Dornelas Vieira

**IDENTIFICAÇÃO DE *CANNABIS SATIVA L.* POR ESPECTROS DE
ATR-FTIR OBTIDOS DE EXTRATOS DE AMOSTRAS DE DROGAS
APREENDIDAS**

Trabalho de Conclusão de Curso de Bacharelado em Química apresentado ao Instituto de Química da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dr. Jez Willian Batista Braga
Coorientador: PC. M.Sc. Luciano Chaves Arantes

Brasília –DF

2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus avós, Getúlio e Linda, por todo amor, carinho, ensinamento e por estarem em todos os momentos da minha vida, sem eles nada disso seria possível.

À minha família, por cada momento singular que passamos juntos e como isso me ajudou a crescer.

Aos meus amigos, pelas brincadeiras, conversas, mas principalmente por sempre estarem do meu lado, me dando apoio e me dizendo o que eu precisava ouvir.

Ao meu orientador, professor Dr. Jez Willian Braga, por ver em mim algo que nem eu mesma via e me aceitar como sua aluna por todos esses anos mesmo depois de tanto trabalho.

Ao meu coorientador perito M.Sc. Luciano Arantes pela disponibilidade, oferta de trabalho e pela paciência e ensinamentos ao longo de todo o projeto.

Às pesquisadoras Fabiana Casarin e Laiz Magalhães pelos ensinamentos e paciência.

À Agilent Technologies, pela colaboração e parceria que viabilizaram o empréstimo do espectrofotômetro de infravermelho médio e do acessório de ATR aquecido, os quais foram indispensáveis para a realização desse trabalho

À FAPDF e a CAPES (Edital PROFORENSE, processo 3509/2014), pelo auxílio financeiro.

À PCDF, pela infraestrutura e oportunidade de realizar o trabalho.

“Às estrelas que ouvem e aos sonhos que são atendidos.” Sarah J.Maas

RESUMO

A identificação de maconha em amostras de drogas apreendidas representa uma grande demanda para todos os laboratórios de perícia. Em algumas situações essa identificação apresenta dificuldades devido à similaridade com outros vegetais apreendidos secos e moídos, pois se assemelham muito com o aspecto de outros vegetais de uso comum. Os testes colorimétricos de triagem realizados para uma identificação rápida da *Cannabis sativa L.* podem apresentar alguns resultados falsos positivos devido à presença de alguns compostos presentes em outros vegetais secos, o que diminui a confiabilidade desse método. Na tentativa de minimizar esses problemas, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o uso da espectroscopia no infravermelho médio (MIR) e da quimiometria para diferenciar amostras de drogas contendo *Cannabis sativa L.* de outros vegetais conhecidos por apresentarem interferência no método colorimétrico. A análise colorimétrica foi realizada pela complexação dos fitocanabinoides extraídos com solventes orgânicos (clorofórmio e éter de petróleo) com o sal *Fast Blue B*. Além disso, também foi realizada análise por MIR do extrato etanólico sem a presença do agente complexante. Os espectros foram adquiridos de 360 amostras apreendidas pela Polícia Civil do Distrito Federal (PCDF) e de 135 vegetais, de uso legalizado, sendo analisados por Análise de Componentes Principais (PCA) e Mínimos Quadrados Parciais para análise discriminante (PLS-DA) com o objetivo realizar a análise exploratória e a discriminação entre as amostras de maconha e os demais vegetais analisados, respectivamente. Os modelos de PCA apresentaram nítida separação entre as classes, sendo a região entre 1550 e 1650 cm^{-1} a que apresentou melhores resultados com éter de petróleo. Os modelos PLS-DA, para o éter de petróleo, foram desenvolvidos com a região 1550 e 1650 cm^{-1} e também por análise univariada em 1618 cm^{-1} , os quais apresentaram baixos valores de falso negativo e positivo e altos valores de eficiência, o que mostra viabilidade do método proposto para auxiliar o método atualmente utilizado pela PCDF. Para os extratos obtidos com etanol e clorofórmio foram construídos modelos PLS-DA com toda a região espectral e regiões específicas, os quais apresentaram taxas de eficiência maiores que 90%. Numericamente, considerando as taxas de eficiência, todos os solventes apresentaram métodos equivalentes com ótimos resultados (eficiência >90%).

Palavras-chave: Maconha. Cannabis. Espectroscopia do infravermelho. MIR. THC. PCA. PLS-DA.

ABSTRACT

Marijuana identification in seized drug samples is a great demand by all forensic laboratories. In some situations, this identification may be challenging due to the similarity with other seized vegetables when they are found dry and ground. Colorimetric screening tests performed for the rapid identification of *Cannabis sativa L.* can present false-positive results in the presence of compounds found in other dry vegetables, which decreases the reliability of this method. In the attempt to minimize these problems, the present work evaluated the use of middle infrared spectroscopy (MIR) and chemometry to differentiate the drug-containing *Cannabis sativa L.* from other plants known to interfere in the colorimetric method. The colorimetric analysis was performed by the complexation of phytocannabinoids extracted with organic solvents (chloroform and petroleum ether) with the Fast Blue B salt. Furthermore, the MIR analysis using ethanolic extracts was made without the complex agent. The spectra were acquired from 360 marijuana samples seized by the Civil Police of the Federal District (PCDF) and from 135 other vegetables, of legal use. The spectra were analyzed by Principal Component Analysis (PCA) and Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA) to perform exploratory and discriminant analysis between marijuana and other vegetables, respectively. The PCA models show well-defined groups for *Cannabis* and the other vegetables, being that the region between 1550 and 1650 cm^{-1} showed better results for the discrimination with petroleum ether. Both models created with PLS-DA models for petroleum ether with the region from 1550 to 1650 cm^{-1} and by univariate analysis using the signal at 1618 cm^{-1} presented low false positive and negative results along with high efficiency, which indicates that the method may assist the routine method of the PCDF. Regarding ethanolic and chloroform extracts, the PLS-DA models were built using the entire spectral region as well as specific regions and presented efficiency rates higher than 90%. Numerically, considering the efficiency rates, all solvents were equivalent and presented very good results (>90% of efficiency).

Keywords: Marijuana. Cannabis. Infrared spectroscopy. MIR. THC. PCA. PLS-DA.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS	11
2.1 Objetivos Gerais.	11
2.2 Objetivos Específicos.	11
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.	12
3.1 <i>Cannabis Sativa L.</i>	12
3.1.1 Planta <i>Cannabis Sativa L.</i>	12
3.1.2 Canabinoides	14
3.1.3 Aplicações	16
3.1.3.1 Comércio legalizado	16
3.1.3.2 Comércio ilegal	18
3.1.4 Métodos de identificação	19
3.1.4.1 Técnicas de triagem	20
3.1.4.2 Métodos seletivos	21
3.2 Espectrômetro de infravermelho	21
3.3 Quimiometria	25
3.3.1 Organização de dados	25
3.3.2 Pré-processamento de dados	26
3.3.3 Análise de componentes principais (PCA)	27
3.3.4 Análise hierárquica de agrupamentos (HCA)	29
3.3.5 Análise discriminante por meio de mínimos quadrados parciais (PLS-DA)	29
3.3.5.1 Figuras de mérito	30
3.3.5.2 Amostras anômalas (outliers)	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 Obtenção das amostras	32
4.2 Amostras	32
4.3 Preparo de amostras e aquisição dos espectros	34
4.3.1 Complexação com <i>Fast Blue B</i>	34
4.3.2 Extrato etanólico	35
4.3.3 Aquisição dos espectros de FTIR	35
4.4 Construção dos modelos quimiométricos.	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	36

5.1	Análise de agrupamentos por métodos hierárquicos (HCA)	41
5.1.1	Análise multivariada de toda a região espectral	41
5.1.2	Análise multivariada com região selecionada (1550–1650 cm ⁻¹)	42
5.2	Análise exploratória por PCA	45
5.2.1	Análise multivariada com região selecionada (1550–1650 cm ⁻¹)	45
5.3	Análise discriminante das amostras de maconha apreendidas	47
5.3.1	Análise univariada com um ponto selecionado (~1618 cm ⁻¹)	47
5.3.2	Análise multivariada por PLS-DA com a região (1550–1650 cm ⁻¹)	50
5.4	Análise com outros solventes	54
6.	CONCLUSÕES	56
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1. INTRODUÇÃO

Drogas de abuso são definidas pela presença de substâncias químicas administradas sem qualquer orientação médica ou terapêutica, com o intuito de obter um efeito psicoativo recreativo, podendo levar a dependência física e/ou psíquica ou redução de vida. (RANG et al.,2006)

A análise de drogas de abuso desperta grande interesse da sociedade científica na área da química e toxicologia forenses e isso se deve a sua aplicação em diversos setores da sociedade, dentre eles o combate ao narcotráfico e o controle do crescimento de dependentes químicos. A química forense é a principal área de pesquisa responsável pela identificação dos componentes que constituem uma amostra de droga, também atuando na construção de perfis químicos correlacionando amostras de diferentes apreensões, identificando rotas e origens geográficas de produção. Junto à crescente importância para a análise desse tipo de amostra apareceram grandes desafios nessa especialização, sendo necessária a adaptação de técnicas para suprir as dificuldades de identificação e de processamentos da grande quantidade de dados, devido a demanda dos laboratórios. (ROMÃO et al., 2011)

Popularmente conhecida como maconha, a *Cannabis sativa L.* é uma das plantas mais antigas da qual o ser humano tem conhecimento, cerca de 12.000 anos de relatos na Ásia Central, com aplicações medicinal e terapêutica principalmente na Índia, chegou à América por meio das expedições europeias e hoje está difundida em todos os continentes do mundo. (ZUARDI, 2016; SMALL, MARCUS, 2002; BORILLE, 2016;). A maconha ou produtos à base de maconha tem atuação comprovada e eficaz em diversas áreas, como no tratamento de câncer, glaucoma, pacientes HIV positivos, e também na produção de fibras para roupas e calçados, etc. Porém, em muitos países do mundo o uso dessa planta é proscrito por lei. (SARMA et al, 2020; do NASCIMENTO, 2014; BORILLE, 2016) Para esses países, de acordo com a *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNODC, 2019), a maconha continua sendo a droga ilícita mais consumida no mundo.

No Brasil, a lei nº 11.343 de 23 de agosto de 2006 proíbe o uso, o tráfico e cultivo de maconha. Atualmente, existem várias formas de preparo da droga para comércio, entre as mais comuns tem-se: baseado ou beck, que consiste em partes picadas da planta que são fumadas em cigarros artesanais, o haxixe, uma pasta extraída manualmente ou por meio de infusão a quente das inflorescências da planta, o skunk, cruzamentos feitos em condições controladas entre duas

variedades de maconha que possui um alto teor psicoativo e a sinsemilla, que consiste na planta feminina da *Cannabis sativa L.* após a remoção da planta masculina a fim de evitar formação de frutos. (do NASCIMENTO, 2014)

Além da diversidade no preparo da maconha destinada a comercialização ilegal, o material vegetal apreendido pelas unidades de polícias brasileiras contém uma grande variedade de plantas visualmente semelhantes a maconha, o que dificulta o trabalho dos peritos na identificação da *Cannabis sativa L.* Além disso, o processo de perícia criminal sempre requer uma comprovação da identidade do material por meio de um teste mais objetivo e seletivo, sendo a análise química a mais utilizada. Devido à dificuldade de se comprovar a natureza do material apreendido, o *Scientific Working Group for the analysis of seized drugs* (SWGDRUG, 2019) propôs recomendações mínimas para averiguar, com um alto nível de seletividade, a correta identificação forense da droga.

A detecção de substâncias psicoativas apreendidas é realizada, inicialmente, através de técnicas de triagem que têm o propósito de serem práticas e rápidas, como os testes colorimétricos. Porém, para uma confirmação adequada é necessário um método analítico mais seletivo, como as técnicas de espectrometria de massas e de infravermelho. (SWGDRUG, 2019)

Os testes colorimétricos consistem em uma reação química que resulta na mudança de coloração da solução quando essa apresenta a substância psicoativa de interesse, para a maconha essa substância é o tetrahydrocannabinol (THC) (Δ^9 -Tetrahydrocannabinol ou (-)-(6aR,10aR)-6,6,9-trimethyl-3-pentyl-6a,7,8,10a-tetrahydro-6H-benzo[c]chromen-1-ol). Esses métodos são comumente usados até hoje devido a simplicidade de realização e interpretação dos resultados. A interpretação pode ser realizada a olho nu, não sendo necessário extenso conhecimento químico para realizá-la, utiliza-se pouco solvente e apresentam baixo custo. (PINTO et al., 2015) Apesar das vantagens, os testes colorimétricos, sozinhos, apresentam problemas de seletividade para a identificação da maconha, devido a interferência de outras substâncias que apresentam resultado positivo para a reação química empregada, em destaque a noz moscada, carobinha e o guaraná. (PINTO et al., 2015; dos SANTOS, 2016; BORDIN et al., 2012)

A espectroscopia do infravermelho fornece informações a nível molecular que permitem a identificação do composto em amostras puras, sendo usada para a confirmação da identificação de substâncias em diversas aplicações, como na indústria de alimentos, na discriminação de madeira, no controle de qualidade de combustível e, também na área criminal para a identificação de

substâncias controladas. (CUSTÓDIO et al., 2021; SOARES et al., 2017; SKROBOT, SANTOS, BRAGA, 2019; RODRIGUEZ-OTERO, HERMIDA, CENTENO, 1997)

Devido à complexidade dos extratos da *Cannabis sativa L.*, o uso da quimiometria é essencial para a interpretação dos conjuntos de dados adquiridos. O uso de métodos estatísticos para a obtenção de dados químicos tem se tornado cada vez mais comum e amplo na área da química analítica, atuando, por exemplo, na área ambiental, de alimentos, na simulação de dinâmica molecular, no estudo de alteração de diesel e na identificação de outras drogas. (CUSTÓDIO et al., 2021; KOYAMA et al., 2008; OBEIDAT, AL-KTASH, AL-MOMANI, 2014).

Neste contexto, esse estudo tem como propósito realizar uma análise exploratória dos espectros de infravermelho médio por transformada de Fourier por reflectância total atenuada (ATR-FTIR) obtidos após a extração por solventes de outros vegetais e amostras de maconha apreendidas pela PCDF e avaliar a possibilidade da discriminação entre as amostras de maconha e outros materiais com características organolépticas semelhantes às das apreensões da maconha.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Com base no contexto apresentado na seção anterior, esse trabalho de conclusão de curso tem como principais objetivos realizar uma análise exploratória dos espectros de infravermelho médio por transformada de Fourier por reflectância total atenuada (ATR-FTIR) obtidos após a extração por solventes de interferentes e amostras de maconha apreendidas pela PCDF e avaliar a possibilidade da discriminação das amostras de *Cannabis sativa L.*

2.2 Objetivos específicos

- I) Obter extratos de diversos vegetais conhecidos e de amostras de maconha apreendidas pela PCDF com o solvente éter de petróleo.
- II) Avaliar de forma qualitativa a qualidade e a viabilidade da obtenção de espectros ATR-FTIR dos extratos para fins de identificação da *Cannabis sativa L.*
- III) Analisar os espectros de ATR-FTIR com a ferramenta de classificação de análise de componentes principais (PCA) ou modelos de classificação supervisionada para fins de identificação de *Cannabis sativa L* em unidades de perícia.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. *Cannabis Sativa L.*

3.1.1 Planta *Cannabis Sativa L.*

Desde a primeira classificação da *Cannabis* pelo botânico sueco Carl Von Linné em 1753, o “Manual para uso dos laboratórios nacionais de análises de drogas” do Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (UNODC) considera que a planta apresenta apenas uma espécie reconhecida, sendo ela a *Cannabis sativa Linnaeus*. Outras espécies relatadas são reconhecidas como subespécies da *C. sativa L.*, portanto, a terminologia *Cannabis sativa L.* é considerada adequada para todas as plantas pertencentes a este gênero. (Small, 2015; Sawler et. al., 2015; UNODC, 2009)

A seguir a classificação botânica da *Cannabis* segundo o Departamento de agricultura dos Estados Unidos (2020)

Quadro 1. Classificação botânica da *Cannabis sativa L.*

NOME DA ESPÉCIE: <i>Cannabis sativa L.</i>	
TAXONOMIA	
Reino:	Plantae (planta)
Sub-reino:	Tracheobionta (planta vascular)
Subdivisão:	Spermatophyta (planta com sementes)
Divisão:	Magnoliophyta (planta com flores)
Classe:	Magnoliopsida (Dicotiledônea)
Subclasse:	Hamamelididae
Ordem:	Urticales
Família:	Cannabaceae
Gênero:	<i>Cannabis L.</i>
Espécie:	<i>Cannabis sativa L.</i>
Subespécies:	<i>sativa, indica, ruderalis, spontanea</i>

Figura 1. Ilustração dos aspectos morfológicos da *Cannabis sativa L.*



Fonte: Small, 2015. **A:** florescimento da planta do sexo masculino. **B:** frutificação da planta do sexo feminino. **C:** ramo de flores da planta do sexo masculino. **D:** semente (aquênio: semente única com bráctea). **E:** semente sem bráctea. **F:** semente, vista lateral. **G:** flor da planta do sexo feminino (pistilo sem bráctea). **H:** flor da planta do sexo feminino (pistilo com bráctea).

A *Cannabis sativa L.* tem sido utilizada com diversos propósitos. Inicialmente era usada para a produção de fibras, para a confecção de roupas e sapatos, produção de drogas através de partes das plantas e a produção de óleo natural como combustível. Essa pluralidade de aplicações se dá devido a variação da concentração dos componentes da planta, chamados de canabinoides. (SMALL, 2015)

Através do estudo realizado por Yang et. al. (2020) é possível concluir que as concentrações de tetrahydrocannabinol (THC) e canabidiol (CBD) nas flores da *Cannabis Sativa L*

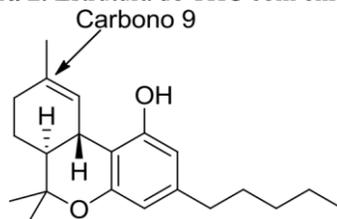
variam de acordo com o envelhecimento da planta. O estudo consiste em fazer observações com diferentes condições climáticas, tempo e solo que influenciam no crescimento da planta. Os resultados indicam que a concentração de THC e CBD aumentam significativamente com o amadurecimento da planta, atingindo o pico de concentração máxima dentro de 6 a 7 semanas. A partir do período de envelhecimento, as concentrações do canabinoide THC diminui e a do canabinoide CBD aumenta. Os canabinoides se distribuem desuniformemente nas plantas, seguindo um gradiente de concentração crescente da raiz para o caule, folhas e inflorescências. (YANG et. al., 2020)

3.1.2 Canabinoides

Existem mais de 500 componentes presentes na *Cannabis sativa L.*, sendo mais de 60 canabinoides. Canabinoides são constituídos por um grupo de substâncias endógenas e exógenas, que podem exercer diversas ações farmacológicas através da interação com o sistema endocanabinoide. Existem três tipos de canabinoides, são eles: fitocanabinoides, endocanabinoides e canabinoides sintéticos. (CARVALHO et al., 2017) Os fitocanabinoides são compostos terpenofenólicos e o termo é atribuído à variedade de moléculas compostas por 21 átomos de carbono as quais não são encontradas em outras espécies vegetais. (BORDIN et al., 2012) (dos SANTOS et al., 2016)

Alguns fitocanabinoides são responsáveis pelos efeitos psicoativos causados pela *C. sativa L.*, sendo o tetraidrocanabinol (THC) o de maior atividade psicotrópica. (BORDIN et al., 2012; SHBAIR et al., 2010; KUMER, SARKAR, SUNANDA, 2019) Por ser uma substância orgânica apolar, como mostra a Figura 2, o THC possui maior afinidade por solventes igualmente apolares, sendo sua extração comumente realizada por etanol, CO₂ e hidrocarbonetos. (BORILLE, 2016)

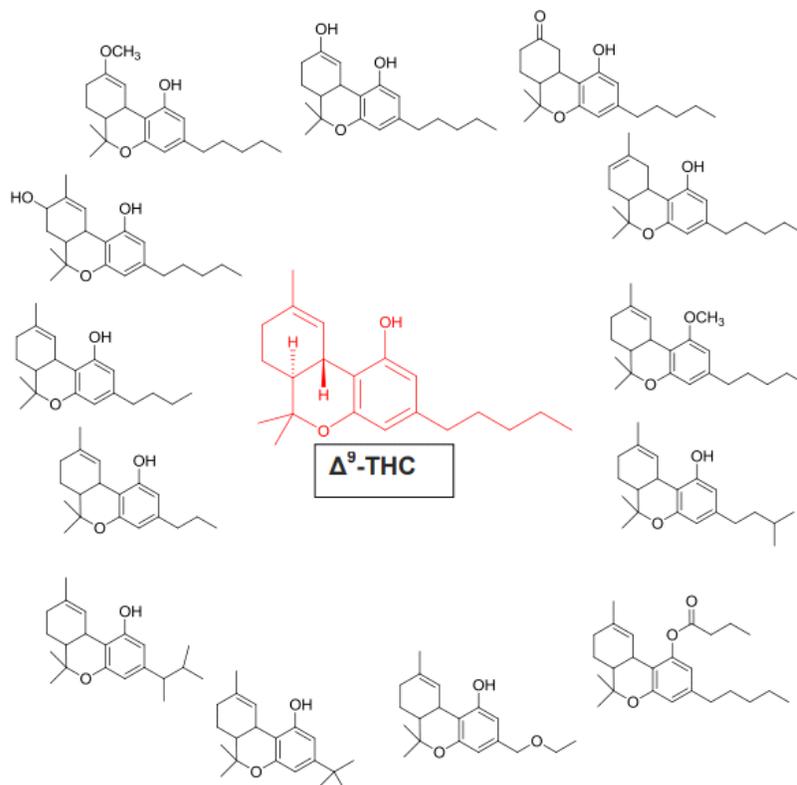
Figura 2. Estrutura do THC com ênfase no carbono 9.



Fonte: do NASCIMENTO, 2014.

Alguns estudos revelam que alterações na cadeia do carbono 9 do THC levam à formação de isômeros, mostrados na Figura 3, porém, essas modificações não são suficientes para alterar a psicoatividade da planta. Uma cadeia alquil de 3 carbonos apresenta suficiência para manter as propriedades psicoativas da espécie. (do NASCIMENTO, 2014)

Figura 3. Isômeros e homólogos do Δ^9 -THC que mantêm a atividade psicotrópica.



Fonte: do NASCIMENTO, 2014

Outra substância fitocanabinoide presente na *Cannabis sativa L.* que merece destaque é o canabinol (CBN). Estudos mostram que esse composto é obtido através da degradação natural do THC após exposição ao calor e a luz por um certo período de tempo. (LEVINE, 1944) Mesmo sendo uma substância originária do THC, o CBN não possui características psicoativas, podendo ser usado como sedativo, antibiótico, anticonvulsivante, entre outros. (do NASCIMENTO, 2014) O canabidiol (CBD) também se encontra em grande abundância na *Cannabis sativa L.*, devido a isso foram realizados alguns estudos voltados para a sua atuação com ênfase na concentração encontrada na droga. Concentrações de CBD combinadas com THC influenciam nas propriedades psicotrópicas da *Cannabis sativa L.*, concentrações semelhantes das duas substâncias resultam em

uma intensa psicoatividade, baixa concentração de THC e alta de CBD causam um efeito tranquilizante, enquanto o contrário confere um efeito energético ao usuário. (do NASCIMENTO, 2014) (TURNER, ELSOHL, BOEREN, 1980)

3.1.3 Aplicações

3.1.3.1 Mercado legal

Cannabis sativa L. continua sendo a droga mais usada mundialmente e a UNODC (2021) estima que cerca de 4% da população entre 15 e 64 anos usou a planta pelo menos uma vez durante a vida, isso equivale a 200 milhões de pessoas. Houve um aumento de cerca de 18% nos últimos 10 anos no uso de maconha. (UNODC, 2021)

A indústria da *Cannabis sativa L.* cresceu rapidamente nos últimos anos. Em 2021, 19 estados dos EUA legalizaram o uso da maconha para fins medicinais e recreativos. Em 2018, no Canadá, a maconha se tornou federalmente legalizada e já era legalizada apenas para fins medicinais desde 2001. O uso da planta de forma recreativa e medicinal é considerado legal em outros países como África do Sul, México e Uruguai. (MONTICELLI et. al., 2022; UNODC, 2021)

Em 1990, o sistema endocanabinoide (ECS) foi descoberto. Esse sistema está relacionado com a homeostase do corpo, o que afeta uma gama de ações psicológicas. Esse sistema é composto por receptores canabinoides, ligantes endógenos e enzimas e são considerados transmissores retrógrados, por viajarem contra o fluxo do transmissor sináptico. Diversos fitocannabinoides interagem com o ECS através dos receptores canabinoides, alguns dos efeitos podem ser terapêuticos e outros indesejados, como alucinações. (KLUMPERS, THACKER, 2019)

A liberação da maconha proporcionou estudos mais aprofundados para verificar as capacidades medicinais da planta. Na atuação contra insônia, foram desenvolvidos estudos que mostram que medicamentos à base de *Cannabis sativa L.* tem maior eficiência contra a insônia atuando em efeitos indiretos, como por exemplo enxaquecas. (WHITING et al., 2015) Apesar de existir pouca evidência da eficácia do tratamento à base de maconha contra ansiedade, estudos realizados por Bergamaschi et al. (2011), mostram que pacientes com o transtorno tiveram menores taxas de ansiedade após o uso de um medicamento à base de canabidiol (CBD). E o

mesmo acontece no tratamento contra a síndrome de Tourette, com baixa evidência, estudos mostram que o THC auxilia na diminuição de comportamentos repetitivos ansiosos. (KLUMPERS, THACKER, 2019) Alguns estudos foram iniciados em relação a eficácia do tetrahidrocanabinol (THC) contra perda de apetite. Apesar de não haver evidência suficiente que comprove a eficácia da planta, alguns resultados mostram que o consumo de THC aumenta o consumo calórico e o apetite dos pacientes (HANEY et al., 2007) Para doenças como o transtorno de estresse pós-traumático e a epilepsia possuem diversos estudos que comprovam a eficácia do uso de THC e CBD, respectivamente, no tratamento. (KLUMPERS, THACKER, 2019)

Um estudo realizado por Eubanks et al., (2006) mostrou um mecanismo no qual a molécula de THC interfere diretamente na patologia da doença de Alzheimer. O uso do THC facilitou o entendimento de como as drogas deveriam atuar na doença e devido a sua afinidade com os receptores canabinoides, essa molécula é considerada um forte inibidor da enzima acetilcolinesterase (AChE) que pode causar o Alzheimer.

Devido a vasta utilização medicinal, é crescente a preocupação com o controle de qualidade na produção de produtos à base de *Cannabis sativa L.* Alguns estudos mostram técnicas que podem ser utilizadas por empresas produtoras para melhorar a qualidade da plantação da maconha e por consequência melhorar a qualidade dos medicamentos produzidos a partir dela. Alguns estudos estão voltados para o tempo de crescimento ideal dependendo da concentração do fitocanabinoide de interesse, outros se preocupam com a qualidade do solo e dos medicamentos produzidos pela planta. (YANG et al., 2020; SARMA et al., 2020; MONTICELLI et al., 2022) Uma reportagem mostrou que parte da população do estado do Colorado nos Estados Unidos está preocupada com a mudança de categoria da maconha para que essa deixe de ser considerada uma droga perigosa equivalente, por exemplo, ao ácido dietilamida lisérgico (LSD). A reportagem mostra o uso de pesticidas inadequados (até mesmo proibidos por lei) nas plantações de maconha (destinada a uso medicinal) e alegam que a criminalização da planta impede que estudos avancem nas áreas de qualidade. (ERICKSON, 2016)

A maconha tem sido usada de forma medicinal por muito tempo e em diversas áreas de atuação, porém ainda é necessário muito estudo para comprovar a eficácia da planta, principalmente para os fitocanabinoides THC e CBD, que tiveram mais destaques nas pesquisas. Mas algumas pesquisas são inviabilizadas ou atrasadas em muitos países devido a criminalização da planta.

De acordo com o relatório do Banco de Montreal de 2019, a indústria de maconha vai movimentar cerca de 194 bilhões de dólares até 2026. E de acordo com o relatório publicado pela consultoria Whitney Economics, as atividades relacionadas à *Cannabis sativa L.* empregam cerca de 300 mil pessoas em território americano, esse número chega a ser maior do que empresas de cerveja, que empregam 60 mil trabalhadores.

No Brasil, o projeto de lei para a legalização do uso da maconha para fins medicinais está na Comissão de Direitos Humanos e Legislação Participativa (CDH) do Senado. De acordo com o texto, a droga será usada em pacientes com câncer, para alívio da dor, e em pacientes com epilepsia, no Brasil esse número chega a 600 mil pessoas que sofrem com a doença e resistem ao tratamento convencional.

3.1.3.2 Comércio ilegal

O uso, o tráfico e o cultivo da maconha são proibidos no Brasil pela lei nº 11.343 de 23 de agosto de 2006. A lei categoriza como droga substâncias capazes de causar dependência química e física listadas pela própria lei ou atualizadas pelo Poder Executivo.

A maconha é vendida de diversas formas, entre as mais comuns são: a inflorescência, maconha prensada, haxixe e planta verde, como mostra a Figura 4. A produção e o nome variam de acordo com a quantidade e as partes da planta usadas e por consequência a concentração de THC presente. Partes que possuem mais folhas e inflorescências possuem concentrações maiores de THC.

Para ser uma prática mais lucrativa, é comum que traficantes adicionem à *Cannabis sativa L.* vegetais que se pareçam química e fisicamente com a planta. Essa adulteração dificulta o trabalho dos peritos de identificar a droga quando apreendida. Esses vegetais são conhecidos na literatura como interferentes e são responsáveis por resultados falso positivos, o que prejudica, judicialmente, a confiabilidade do método usado pela polícia atualmente. (BORDIN et. al., 2012)

O mercado ilegal da maconha movimenta 30 bilhões de dólares por ano. (UNIFESP) A criminalização da planta se prova mais lucrativa do que sua legalização. Sem contar que a “luta contra as drogas” gera como consequência violência em regiões mais pobres do país, onde a maior parte da população é negra. (OLIVEIRA, 2018; RYBKA et. al., 2018). Os dados coletados pela UNODC (2021) mostram que esse combate contra as drogas não muda o consumo da

maconha, os números continuam crescendo.

Figura 4. Exemplos de maconha vendida ilegalmente.



Fonte: Adaptada de Google imagens. **A:** Inflorescência; **B:** haxixe; **C:** maconha prensada.

3.1.4 Métodos de identificação

O Grupo de Trabalho Científico para Análise de Drogas Aprendidas (SWGDRUG, 2019) recomendou critérios mínimos para a identificação positiva da *Cannabis sativa L.* A escolha de métodos adicionais para a análise de maconha deve manter as recomendações mínimas para se obter um nível adequado de seletividade nas análises forenses. Para tanto, SWGDRUG dividiu as técnicas analíticas em 3 categorias: A, B e C, sendo a categoria A composta pelas técnicas mais seletivas que fornecem informação estrutural, como espectroscopia de infravermelho, espectrometria de massas, espectroscopia Raman, ressonância nuclear magnética. Já a categoria B consiste nas técnicas que apresentam de intermediária a alta seletividade através de características químicas e físicas, sem, no entanto, fornecerem informação estrutural. Alguns exemplos são: cromatografia de camada delgada, eletroforese capilar, UV-Vis e cromatografias líquida e gasosa. Por fim, a categoria C abrange as técnicas menos seletivas, mas que proporcionam alguma informação geral ou de classe, como teste colorimétrico, ponto de fusão, identificação farmacêutica e imunoenaios. A rotina analítica mínima sugerida pelo SWGDRUG para a detecção e identificação inequívoca de substâncias de interesse forense deve conter uma combinação entre as categorias. Quando uma técnica da categoria A é empregada, ao menos outra técnica deve ser incorporada, seja ela categoria A, B ou C. E quando a Categoria A não é usada, no mínimo três

técnicas distintas devem ser empregadas, das quais duas delas devem ser da categoria B e a terceira pode ser tanto da categoria B, quanto da C. (SWGDRUG, 2019)

3.1.4.1 Técnicas de triagem

Dentro das técnicas de triagem, os testes colorimétricos são os mais comumente usados em postos de fiscalização. Eles consistem na adição da substância de interesse em um recipiente e ao entrar em contato com algum solvente ou sal a solução muda a coloração em função da reação química do composto de interesse e um ligante ou agente complexante. Estes testes são interessantes para a determinação de THC por serem técnicas baratas, rápidas e não precisam de formação aprofundada em química para utilizá-las em campo. A escolha dos métodos de triagem é fundamental para definir os analitos que serão detectados. (BORDIN et. al., 2012)

O método de Duquenois-Levine tem sido usado por mais 80 anos pela comunidade científica para confirmar a presença de THC. O reagente é composto por etanol, acetaldeído, vanilina e devido ao meio ácido este irá reagir com a posição *-para* livre do grupo fenólico presente no THC, apresentando uma coloração roxa. Como vários compostos possuem uma estrutura fenólica com uma posição *-para* livre, a técnica é muito sugestiva para falso positivo. (JACOBS, STEINER, 2014)

Estudos recentes mostram que o teste colorimétrico que emprega o sal *Fast Blue B* é considerado mais seletivo por gerar produtos reacionais mais estáveis e por serem menos suscetíveis a resultados falso positivos. O método se baseia na reação da molécula de *Fast Blue B* com o grupo fenólico do THC presente na *Cannabis sativa L.*, em meio orgânico básico, apresentando uma coloração vermelha como resposta positiva. (dos SANTOS et. al., 2016)

Visando o lucro, é comum que traficantes adulterem a composição da maconha com substâncias que possuem características físicas e químicas semelhantes a planta, essas substâncias dificultam o resultado das análises colorimétricas. (BORDIN et. al., 2012) Mesmo que o *Fast Blue B* tenha uma suscetibilidade menor quando comparado ao Duquenois-Levine, o método ainda está sujeito a determinação incorreta devido a presença de interferentes presentes em adulterantes e diluentes adicionados à maconha. Esses materiais são denominados de interferentes na literatura, os mais comuns são folhas de eucalipto, orégano, chá de camomila, carobinha, guaraná e noz moscada. (do NASCIMENTO, 2014; BORDIN et. al., 2012) Por esse motivo, um resultado obtido

a partir do teste colorimétrico deve ser confirmado por meio de uma técnica mais seletiva.

3.1.4.2 Métodos seletivos

As técnicas mais seletivas usadas para a identificação de drogas, reconhecidas na literatura, são: cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV-VIS ou de espectrometria de massas, cromatografia em camada delgada, eletroforese capilar, cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas e cromatografia de íons (UNODC, 2009; de OLIVEIRA et. al., 2009; ESPY et. al., 2014) Em comparação com as técnicas de triagem, esses métodos apresentam vantagens, como a possibilidade de quantificação dos analitos de interesse, diminuição dos resultados falso positivos, podendo até obter um perfil químico das drogas apreendidas, através da identificação da droga e de outros vegetais. (de OLIVEIRA et. al., 2009)

Apesar da boa seletividade dessas técnicas, elas são mais caras que os métodos de triagem e precisam de profissionais altamente treinados para executá-las. A necessidade de infraestrutura laboratorial e conhecimento especializado em química analítica conferem a esses métodos uma desvantagem considerável para serem executadas em postos de fiscalização.

Atualmente, as técnicas de determinação de maconha usados pela PCDF são: o teste colorimétrico com o sal *Fast Blue B* e a cromatografia em camada delgada (CCD) para os resultados positivos no teste de triagem. Com o objetivo de facilitar e diminuir o custo das análises, esse estudo se preocupou em testar outra técnica classificada pelo SWGDRUG (2019) como categoria A, a espectroscopia do infravermelho, para a determinação de THC nas amostras de maconha. A espectroscopia do infravermelho é uma técnica consagrada e utilizada na determinação de outras drogas (MOROS et. al., 2008; MEYER, 2000; Evans-Nguyen, 2021) O grande diferencial dessa técnica é o fato de ser a mais barata entre as técnicas de Categoria A, a utilização de uma quantidade mínima de solvente e uma drástica redução no uso de consumíveis, como por exemplo placas de cromatografia em camada delgada, além de permitirem a obtenção de resultados rápidos.

3.2. Espectrômetro de infravermelho

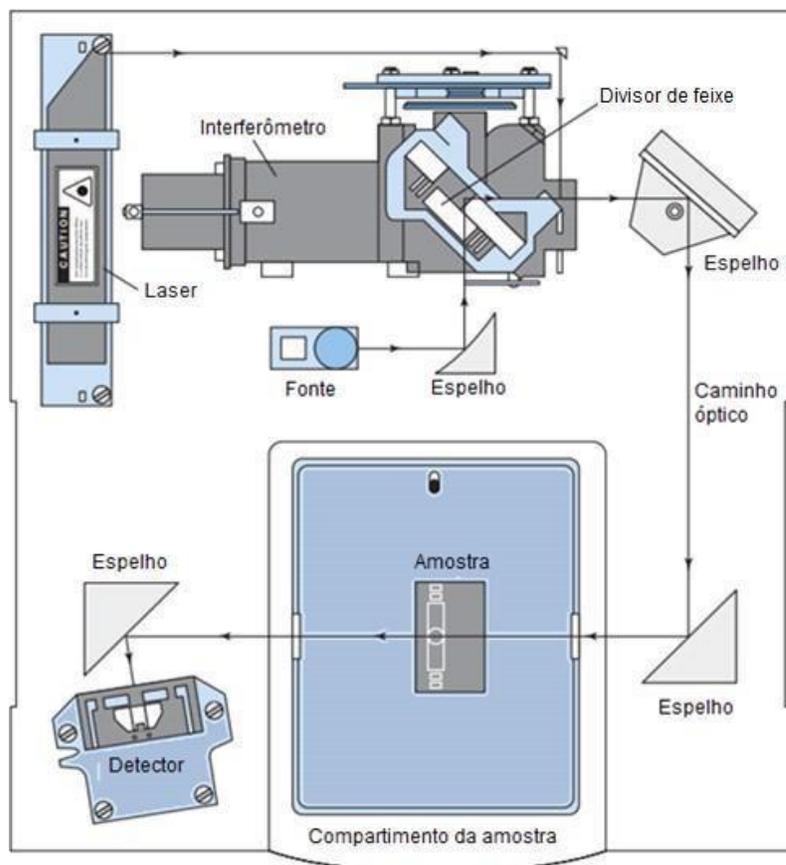
A região espectral do infravermelho é dividida em três regiões, o próximo (12500-4000 cm^{-1}), médio (4000-200 cm^{-1}) e distante (200-10 cm^{-1}). Porém, a parte mais característica do

espectro do infravermelho é de 4000 a 667 cm^{-1} , por ser uma região característica para a determinação dos grupos funcionais de substâncias orgânicas. (VOGEL et al., 2002)

O espectro do infravermelho é consequência de diferentes modos de vibração e rotação da molécula. Para que a vibração apareça no espectro é necessário que ocorra uma mudança no momento de dipolo. As frequências dos modos vibracionais são dependentes da massa e da força de ligação entre os átomos. (VOGEL et al., 2002)

O espectro do infravermelho médio é considerado como a “impressão digital” de compostos químicos, ou seja, é inerente e característico de cada um, conferindo a técnica a capacidade de identificar substâncias puras ou detectar impurezas. Para realizar a identificação de compostos puros é adquirido o espectro de uma amostra desconhecida e esse é comparado com um número limitado de espectros de substâncias conhecidas e de propriedades similares. É uma técnica muito comum para distinguir isômeros.

Figura 5. Disposição do espectrômetro de infravermelho por transformada de Fourier.



Fonte: Adaptada de HARRIS, 2007

Normalmente, em espectrômetros modernos de infravermelho, a aquisição de espectros de uma substância de interesse se dá a partir da obtenção de um interferograma de referência da fonte. Em seguida a amostra é disposta no compartimento da amostra e é obtido um segundo interferograma. Após a aplicação da transformada de Fourier a razão entre esses sinais resulta no espectro de transmitância de infravermelho da amostra de interesse. A esquematização do aparelho é mostrada na Figura 5. (HARRIS, 2007)

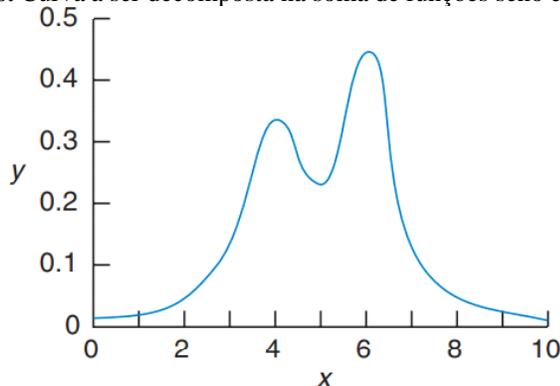
A espectroscopia do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é fundamentada pela série de Fourier, a qual é caracterizada por determinar que qualquer forma ondulatória pode ser descrita como uma série de funções senoidais que podem ser decompostas em uma série de senoides de frequência conhecida. (SKOOG et al., 2005) Um exemplo de função a ser decomposta está representada na Figura 6. A análise de Fourier é a decomposição da soma de funções seno e cosseno, recebendo o nome de série de Fourier, que em um intervalo de $x_1=0$ e $x_2=10$ pode ser representada por:

$$y = [a_0 \sin(0\omega x) + b_0 \cos(0\omega x)] + [a_1 \sin(1\omega x) + b_1 \cos(1\omega x)] + \dots$$

$$y = \sum_{n=0}^{\infty} [a_n \sin(n\omega x) + b_n \cos(n\omega x)] \quad (1)$$

$$\text{Onde } \omega = \frac{2\pi}{x_2 - x_1} = \frac{2\pi}{10 - 0} = \frac{\pi}{5}$$

Figura 6. Curva a ser decomposta na soma de funções seno e cosseno.

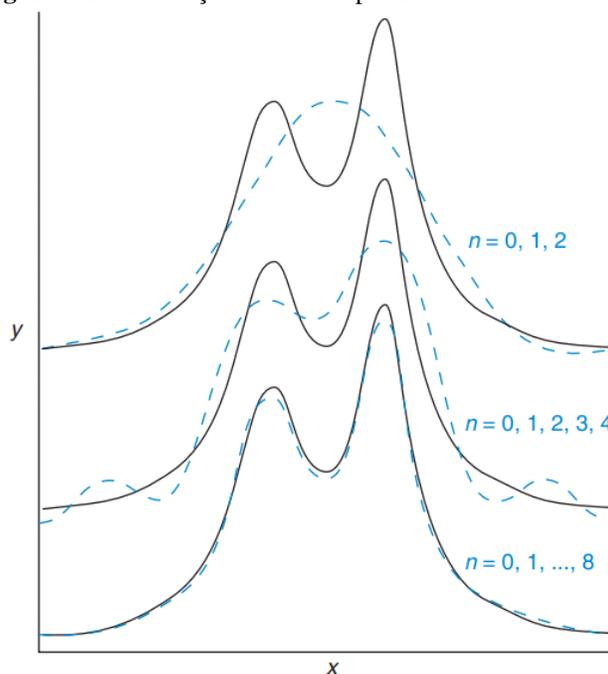


Fonte: HARRIS, 2007

A equação 1 mostra que quaisquer valores de y e x podem ser representados em forma de

uma soma infinita de funções seno e cosseno e por consequência, termos sucessivos correspondem ondas de maiores frequências, ou seja, quanto maior a quantidade de termos presente na série de Fourier melhor é a aproximação da curva, como mostra a Figura 7.

Figura 7. Reconstrução da curva a partir da série de Fourier.



Fonte: HARRIS, 2007. As linhas sólidas representam a curva original e as linhas tracejadas são feitas a partir da série de Fourier para $n=2, 4$ e 8 .

A instrumentação do FTIR não apresenta nenhum elemento dispersivo e todos os comprimentos de onda são detectados simultaneamente. Ao contrário de outras técnicas espectroscópicas não é usado um monocromador, mas sim um interferômetro, capaz de produzir padrões de interferência que contém informação espectral da amostra de interesse. As fontes usadas no FTIR são as mesmas usadas no infravermelho dispersivo. Os transdutores mais comuns são o sulfato de triglicina e o telureto de cádmio. (SKOOG et al., 2005)

O interferômetro é o principal componente do espectrômetro do infravermelho por transformada de Fourier. A faixa de comprimento de onda dos espectros é determinada pela forma a qual esse dispositivo é disposto. (HARRIS, 2007)

A técnica do FTIR apresenta inúmeras vantagens quando comparada com a espectroscopia dispersiva. Os espectros são coletados simultaneamente devido à rápida rotação do espelho, se tem um melhor aproveitamento da potência luminosa, cerca de 10 a 200 vezes mais radiação passando

conferindo maior precisão, as medições são feitas de forma mais rápida por estarem acopladas a computadores, há uma redução no ruído observado nos espectros e apesar da complexidade da análise de Fourier, essa pode ser realizada em computadores pessoais modernos, o que confere a técnica alta velocidade e baixo custo. (HARRIS, 2007)

3.3 Quimiometria

O desenvolvimento tecnológico proporcionou um grande avanço na área da química, principalmente devido ao surgimento de equipamentos que têm a capacidade de coletar uma grande quantidade de dados simultaneamente, como espectrômetros e cromatógrafos. Devido aos novos aparelhos de medição de amostras surge a necessidade de se acoplar a esses equipamentos computadores, uma vez que conseguem utilizar de forma mais rápida ferramentas matemáticas e estatísticas para trabalhar e analisar uma grande quantidade de dados. (NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2006)

Para atender a demanda de análise e processamentos da abundância de informações químicas coletadas, a quimiometria foi criada e se desenvolveu rapidamente. O termo quimiometria foi usado pela primeira vez na primeira metade da década de 1970 por Svante Wold. Após a criação de uma sociedade de quimiometria, o termo foi expandido para outros pesquisadores que trouxeram destaque ao tratamento de dados químicos a partir de métodos multivariados. (WOLD, 1976; KOWALSKI, 1975)

Antes de realizar uma análise química é importante que seja definido *a priori* quais problemas se quer solucionar, quais informações químicas são úteis para essa finalidade e, portanto, qual é o método de coleta e preparo de amostra que devem ser utilizados a fim de economizar tempo e recurso.

3.3.1 Organização dos dados

Os sinais coletados por espectrômetros e cromatógrafos fornecem informações brutas sendo necessária a tradução/interpretação química desses dados, tais como a identificação e quantificação de substâncias de uma dada amostra.

Após a coleta, para a análise quimiométrica os dados são organizados em forma de uma matriz \mathbf{X} , na qual cada linha i corresponde a uma amostra podendo ser maconha ou outro vegetal

de uso legalizado e cada coluna j está associada a uma variável, no caso desse estudo, o número de onda, como mostra a Figura 8.

Figura 8. Disposição dos dados em forma de uma matriz $\mathbf{X}(I \times J)$.

$$\mathbf{X} = \begin{bmatrix} \mathbf{x}_1^T \\ \mathbf{x}_2^T \\ \vdots \\ \vdots \\ \mathbf{x}_I^T \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} x_{11} & x_{12} & \cdots & \cdots & x_{1J} \\ x_{21} & x_{22} & \cdots & \cdots & x_{2J} \\ \vdots & \vdots & \ddots & & \vdots \\ \vdots & \vdots & & \ddots & \vdots \\ x_{I1} & x_{I2} & \cdots & \cdots & x_{IJ} \end{bmatrix} = [\mathbf{x}_1 \quad \mathbf{x}_2 \quad \cdots \quad \cdots \quad \mathbf{x}_J]$$

Fonte: FERREIRA, 2015

As variáveis podem ser quantitativas ou qualitativas. As quantitativas assumem valores numéricos, podendo ser representadas pelos sinais obtidos por espectrômetros e cromatógrafos, como por exemplo, absorvância, transmitância ou reflectância. As variáveis qualitativas são representadas, de forma geral, por características das amostras, como por exemplo textura, odor, sabor, cor, entre outras. Para essas variáveis é atribuído um peso (numérico) a fim de separá-las por interpretação matemática e estatística.

Em resumo, a matriz de dados é representada por $\mathbf{X}(I \times J)$, com o total de I linhas (amostras) e J colunas (variáveis – número de onda). Essa matriz pode ser interpretada de duas formas diferentes, ou cada linha é considerada um vetor ou o mesmo é feito para cada coluna. No primeiro caso tem-se um conjunto de I vetores de um espaço real de dimensão J , onde cada variável corresponde a um eixo do sistema de coordenadas, no segundo caso, cada coluna é considerada um vetor no espaço de dimensão I , onde cada amostra corresponde a um eixo no sistema de coordenadas. (FERREIRA, 2015) Após a plotagem dos dados é importante que seja verificada a presença de amostras anômalas (*outliers*) que podem comprometer a análise.

3.3.2 Pré-processamento dos dados

Após a organização das amostras em forma de uma matriz \mathbf{X} , deve-se verificar a necessidade de aplicar algum pré-processamento afim de corrigir efeitos indesejáveis nos espectros (ex.: variações de linha de base, ruído excessivo, etc.). Há duas formas de corrigir os ruídos dos

espectros, um deles é a transformação, a qual é aplicada na linha da matriz \mathbf{X} e o outro é o pré-processamento aplicado nas colunas da matriz \mathbf{X} . (FERREIRA, 2015)

Na transformação de dados, cada amostra (linha da matriz \mathbf{X}) é tratada de forma individual e padronizada. Exemplos de pré-processamentos para essa aplicação são o alisamento, usado para reduzir a componente aleatória do sinal obtido e a correção da linha de base, que é responsável por reduzir variações sistemáticas. Muitos dos instrumentos analíticos modernos têm associados a eles a capacidade de realizar tais processamentos de forma automática. (FERREIRA, 2015) As técnicas de alisamento consistem na varredura de todo o espectro através de um seguimento pré-determinado, quanto maior essa janela maior será a redução do ruído, porém um tamanho muito grande dessa região pode influenciar o formato e resolução dos espectros prejudicando a interpretação dos dados.

A correção da linha de base é outra técnica de transformação e consiste na aplicação das funções derivadas para corrigir variações sistemáticas da linha de base. Importante ressaltar que essas funções matemáticas não alteram a relação entre absorvância e concentração de um espectro, sendo mantida assim toda a informação química para proceder com a análise. Outras transformações comumente usadas e também de grande importância para o pré-tratamento dos dados são o logaritmo, que tem o objetivo de linearizar os dados, a normalização, a qual consiste na divisão de cada uma das variáveis da matriz \mathbf{X} por um fator de normalização, o que coloca as amostras em uma mesma escala pré-determinada. Tem-se a correção multiplicativa de espalhamento e a padronização normal de sinal, que têm como objetivo remover interferências de espalhamento e de tamanho de partícula sólida. Existem muitas outras técnicas de transformação, por isso, conhecer bem os dados que estão sendo analisados tem muita importância para a escolha do tratamento que será realizado. (FERREIRA, 2015; DA-COL, DANTAS, POPPI, 2022)

Entre as técnicas mais comuns de pré-processamento tem-se a centragem dos dados na média, onde os eixos assumem seus valores médios e têm sua estrutura mantida, o escalamento pela variância, onde os dados são divididos pelo desvio padrão e o autoescalamento que é uma combinação da centragem na média e do escalamento pela variância, que tem o objetivo de atribuir a todas as amostras a mesma importância.

3.3.3 Análise de componentes principais (PCA)

Após a organização e pré-processamento dos dados é necessária uma ferramenta

matemática e estatística capaz de extrair informações químicas que serão de suma importância para o estudo. A demanda por essas informações tem aumentado junto com o avanço dos equipamentos e a quantidade de dados que esses têm coletado em um pequeno espaço de tempo.

Ao extrair esse conhecimento químico da matriz é necessário observar a relação que esses dados possuem entre si, como suas semelhanças e diferenças. Há duas estratégias quimiométricas capazes de realizar essa tarefa, os métodos supervisionados, que consistem na análise de amostras de uma classe preestabelecida e utilizam essa informação para construir modelos de classificação, e os métodos não supervisionados que não utilizam esse conhecimento prévio e as amostras são agrupadas com base nos dados experimentais obtidos. (FERREIRA, 2015) Segundo Sidou e Borges (2020), o PCA é um dos métodos não supervisionados mais importantes e com inúmeras aplicações atualmente.

A análise de componentes principais, do inglês *Principal Component Analysis* (PCA) é um método não supervisionado, ou seja, não precisa de informação *a priori* sobre a existência de classes entre as amostras e, no contexto da análise exploratória, tem como objetivo principal reduzir a dimensão dos dados obtidos para facilitar a interpretação química. Essa técnica consiste na busca por correlações entre as variáveis de tal forma que os dados possam ser traduzidos em menos variáveis, mas suficientemente representativas de toda a informação química contida na matriz original, essas variáveis recebem o nome de componentes principais (PCs). (PEREIRA et al., 2014)

As PCs são ortogonais e não correlacionadas, ou seja, a informação presente em uma dessas componentes não está em outra. Outra propriedade importante é a quantidade de informação que cada uma dessas PCs consegue descrever. A PC1 representa ou explica a direção de máxima variância dos dados originais, a PC2 representa ou explica a segunda maior direção de variância, considerando a variância restante ou residual, após ser descontada a contribuição da PC1 e assim por diante. (PÉREZ-ARRIBAS, LÉON-GONZÁLEZ, ROSALES-CONRADO, 2017)

Fazendo a análise de uma perspectiva matemática, a matriz $\mathbf{X}(I \times J)$ é decomposta em outras três matrizes, uma de escores \mathbf{T} , outra ortonormal de pesos \mathbf{P} e uma \mathbf{E} de resíduos, como descreve a Figura 9. Os escores expressam as relações entre as amostras e os pesos as relações entre as variáveis. Essa decomposição resulta na mudança de base das variáveis originárias para as componentes principais, a qual cada uma das colunas da matriz \mathbf{P} define a direção de um eixo de uma PC em um novo conjunto de base. (FERREIRA, 2015)

Figura 9. Esquematização da decomposição da matriz original de dados.

$$\begin{array}{c}
 \begin{array}{|c|} \hline m \\ \hline \mathbf{X} \\ \hline n \end{array}
 =
 \begin{array}{|c|} \hline d \\ \hline \mathbf{T} \\ \hline n \end{array}
 \begin{array}{|c|} \hline m \\ \hline \mathbf{P}^T \\ \hline d \end{array}
 +
 \begin{array}{|c|} \hline m \\ \hline \mathbf{E} \\ \hline n \end{array}
 \end{array}$$

Fonte: LOPES et al., 2010

Para a interpretação dos dados geralmente plota-se o gráfico dos escores e dos pesos das componentes principais, em formato bi ou tridimensional, o que facilita a observação das semelhanças entre os dados. Através do cálculo da distância entre os escores, o modelo matemático tem a capacidade de agrupar as amostras quanto a sua similaridade (pontos de menor distância), o que torna o PCA um modelo estatístico eficaz para a identificação de amostras anômalas (pontos que ocupam maiores distâncias). (LOPES, 2010)

3.3.4 Análise hierárquica de agrupamentos (HCA)

Outro método não supervisionado de reconhecimento de padrões é o HCA. Esse método é capaz de descobrir padrões de comportamento entre amostras com base na análise multivariada, ou seja, mais de uma variável. É um método matemático capaz de reduzir a dimensionalidade dos dados, permitindo o agrupamento de amostras de comportamento semelhante e por consequência, a detecção de amostras de comportamento anômalo. (FERREIRA, 2015)

Esse método consiste em agrupar amostras de acordo com o grau de similaridade apresentado. Menores distâncias estão associadas a um elevado grau de similaridade, maiores distâncias significam o contrário. Há dois tipos de análise hierárquica, a chamada aglomerativa, a qual cada amostra é um grupo unitário que é aglomerado aos demais por similaridade até restar apenas um grupo, e a divisiva, a qual a amostra é considerada inicialmente um grupo que é dividido em dois ou mais grupos, começando pelos objetos mais distantes. (FERREIRA, 2015) O resultado do HCA é apresentado em forma de uma árvore hierárquica, também conhecido como dendrograma. (FERREIRA, 2015)

3.3.5 Análise discriminante por meio de mínimos quadrados parciais (PLS-DA)

PLS-DA é um método de discriminação supervisionado, ou seja, é necessária identificação

prévia das amostras e suas classes para definir as regras para a discriminação e construção do modelo. (de SANTANA, et. al., 2020) De acordo com a química Dr^a Márcia Ferreira (2015), o método PLS-DA domina as aplicações de espectroscopia na região do infravermelho médio e é o método de discriminação mais popular em quimiometria. O PLS-DA produz bons resultados, desde que haja uma variação semelhante entre os interferentes presentes nas amostras de treinamento e nas de validação. (FERREIRA, 2015)

O método PLS-DA utiliza a técnica de regressão multivariada por mínimos quadrados parciais (PLS). O PLS é um método de calibração inversa, o qual se busca uma relação entre a resposta instrumental (matriz \mathbf{X}) e a propriedade de interesse (matriz \mathbf{Y} ou o vetor \mathbf{y}). Variáveis latentes determinam o conjunto de novas coordenadas, que contém as informações mais relevantes das variáveis originais. (CUSTÓDIO et al., 2021) As equações 1 e 2 mostram a decomposição dessas matrizes nesse novo sistema de coordenadas.

$$\mathbf{X} = \sum_{a=1}^A \mathbf{t}_a \mathbf{p}_a^T + \mathbf{E} \quad (1)$$

$$\mathbf{y} = \sum_{a=1}^A \mathbf{t}_a \mathbf{q}_a^T + \mathbf{f} \quad (2)$$

onde, \mathbf{t}_a são os escores, \mathbf{p}_a e \mathbf{q}_a são os pesos e \mathbf{E} e \mathbf{F} são os resíduos das matrizes \mathbf{X} e \mathbf{y} , respectivamente, e A é o número total de variáveis latentes.

3.3.5.1 Figuras de mérito

Figuras de mérito têm suma importância na área de química analítica por estabelecerem limites que trazem confiabilidade ao método aplicado. Esses parâmetros são utilizados para demonstrar o bom desempenho das técnicas e descrevem a linearidade, exatidão, robustez, precisão, sensibilidade do método, entre outros. (RIBEIRO et al., 2008)

Entre as figuras de mérito de maior importância para este trabalho estão as taxas de falso negativo, falso positivo e a eficiência. (CUSTÓDIO et al., 2021) Esses parâmetros apresentam o quanto o modelo criado consegue discriminar as classes de interesse. Os falsos positivos são amostras não pertencentes à classe alvo, mas que após o cálculo do modelo foram caracterizadas como pertencentes à classe alvo. Por outro lado, os falsos negativos são amostras pertencentes à classe alvo, mas após a modelagem não foram caracterizadas como pertencentes a essa classe. A

eficiência descreve o quanto o método consegue analisar corretamente. As figuras de mérito são calculadas pelas equações 3, 4 e 5 (SOARES et al., 2017)

$$TFP = \frac{FP}{FP+VN} \times 100 \quad (3)$$

$$TFN = \frac{FN}{FN+VP} \times 100 \quad (4)$$

$$TEF = 100 - (TFN + TFP) \quad (5)$$

onde FP e FN são os números das amostras preditas como falso positivo e falso negativo, respectivamente, VP e VN são os números das amostras preditas corretamente como pertencentes à classe alvo (verdadeiros positivos) e não pertencentes a essa classe (verdadeiros negativos), respectivamente e TFP, TFN e TEF são, respectivamente, a taxa total de falsos positivos, falsos negativos e a eficiência do modelo.

3.3.5.2 Amostras anômalas (outliers)

Os modelos de PLS-DA são construídos visando discriminar as classes sem que haja sobre ajuste dos modelos. Portanto, para a escolha do número de variáveis latentes dos modelos é utilizado o parâmetro raiz quadrada do erro médio quadrático de validação cruzada. (RMSECV). Os modelos com os menores valores de RMSECV são selecionados para o seguimento da otimização do modelo pela exclusão de amostras anômalas. (CUSTÓDIO et. al., 2021)

A construção dos modelos PLS-DA geram dois parâmetros, o *Hotelling* T^2 e os resíduos Q. O primeiro define o quanto uma amostra está distante do centro da distribuição das amostras do conjunto de treinamento, amostras com alto *Hotelling* T^2 possuem alta influência. O resíduo Q representa o erro de modelagem para uma determinada amostra, ou seja, amostras que o modelo não consegue explicar. As amostras que possuem altos valores de T^2 e resíduo Q são identificadas como anômalas, mais conhecidas como outliers. (SOARES et al., 2017)

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção das amostras

Todas as amostras de maconha utilizadas nesse projeto foram apreendidas pela Polícia Civil do Distrito Federal (PCDF) e foram analisadas no Laboratório de Química e Física Forense (LQFF) do Instituto de Criminalística da PCDF. Foram coletadas 360 amostras de maconha, sendo 324 maconhas prensadas, 16 haxixes e 20 amostras de planta verde. Foram analisados 135 vegetais diversos, de uso legalizado, entre eles guaraná, chá de camomila, noz moscada, entre outros.

4.2. Amostras

As amostras de maconha neste trabalho foram apreendidas em três formas: haxixe, planta verde e amostras prensadas sendo necessário preparos de amostras diferentes para cada forma. As amostras prensadas foram maceradas manualmente a fim de reduzir o tamanho de partícula e homogeneizar a amostra para a análise, as plantas verdes foram secas na estufa à 80 °C por 2 horas, após a secagem as folhas foram arrancadas e maceradas manualmente. O haxixe não apresentou necessidade de ser tratado antes do preparo da solução. Os demais vegetais de uso legalizado não foram tratados antes do preparo da solução.

A relação de todas as amostras utilizadas no experimento é apresentada na Tabela 1. É importante ressaltar que as amostras classificadas como maconha para esse estudo constam no sistema da Polícia Civil do DF como maconha após testarem positivo para os testes colorimétrico e definitivo, que consiste na análise por cromatografia em camada delgada.

Tabela 1. Relação de amostras utilizadas na construção dos modelos exploratórios para a determinação de THC.

Amostras	N*	Amostras	N*	Amostras	N*	Amostras	N*
Haxixe	16	Chá de silvestre	1	Cominho	2	Lobélia	1
Maconha - planta verde	20	Chá mate	2	Confrei	1	Louro em pó	2
Maconha prensada	324	Chá mate e groselha negra	1	Embaúba	3	Louro turco	1
Alecrim (desidratado)	2	Chá misto de maçã com canela	1	Erva cidreira	3	Macis	1
Arnica nacional	2	Chá misto de morango	1	Erva de Santa Maria	1	Mamona	1
Beladona	1	Chá misto detox	1	Erva doce	3	Manjeriçã	1
Boldo do Chile	1	Chá preto	2	Erva mate	1	Maracujá	1
Caju (folhas)	1	Chá preto mais frutas vermelhas	1	Espirradeira	1	Menta	2
Calêndula	1	Chá pure Ceylon	1	Eucalipto	1	NaN	1
Camomila	3	Chá pure peppermint	1	Folha de mandioca	1	Noz de cola em pó	1
Capim-limão	3	Chá verde	3	Fucus vesiculosus	1	Noz-moscada em grão	4
Carobinha	1	Chá verde hortelã e limão	1	Fumo desfiado	1	Noz-moscada em pó	2
Catuaba	1	Chá verde multi ervas reais	1	Fumo narguile	1	Orégano	3
Cavalinha	3	Chacrona	2	Ginseng Brasileiro	2	Passiflora	1
Centelha asiática	1	Chapéu de couro	1	Guaco	1	Pata-de-Vaca	2
Chá Darjeeling (chá preto)	1	Cigarro - Black Djarum	1	Guaraná	1	Picão preto	1
Chá de boldo	1	Cigarro - Dunhill	3	Guaraná em pó	1	Pimenta calabresa	1
Chá de camomila	1	Cigarro - Hollywood	1	Hamamélis	1	Poejo	1
Chá de capim cidreira	1	Cigarro - L.A.Djarum	1	Henna	1	Salsa desidratada	2
Chá de carqueja	2	Cigarro - Marlboro	1	Hibisco	1	Sálvia	1
Chá de flores e frutas	1	Cigarro - Winston	1	Hipérico	1	Sene	2
Chá de frutas silvestres	1	Coentro grão	2	Hortelã	1	Tomilho	2
Chá de romã e cranberry	1	Coentro moído	1	Jaborandi	3	Trombeteira	1

Fonte: Elaborada pela autora. N*: quantidade de amostras.

4.3. Preparo de amostras e aquisição dos espectros

O estudo tem como um dos objetivos testar a viabilidade do produto de extração gerado pelo método colorimétrico como ponto de partida para novas análises. Dessa forma, os solventes éter de petróleo e clorofórmio foram selecionados para a realização do trabalho por serem tradicionalmente utilizados no método colorimétrico. Espera-se melhorar a especificidade do método e reduzir tempo de análise, gastos com consumíveis e a possibilidade de troca de amostras ao utilizar como ponto de partida o produto final de uma análise primária.

O etanol foi selecionado para fins de comparação com os demais solventes. Foi feita uma série de experimentos nos quais foram variadas a massa das amostras e quantidade de etanol utilizado para obter uma extração adequada com a menor quantidade de amostra e solvente.

4.3.1 Complexação com *Fast Blue B*

Todas as amostras de maconha e interferentes foram analisadas por extração com 3 solventes, éter de petróleo, clorofórmio e etanol. Para o éter de petróleo, foram pesados aproximadamente, 20,0 mg de vegetal (maconha ou outros vegetais de uso legalizado) e 30,0 mg do sal *Fast Blue B* em um mesmo eppendorf de 2,0 mL, seguido da adição de 1,0 mL de éter de petróleo. Na sequência, 1,0 mL de NaOH foi adicionado, as amostras ficaram sob agitação no vórtex por 30 segundos e depois foram levadas à centrifuga por aproximadamente 3 minutos a 10.000 xg. Para o clorofórmio o procedimento foi o mesmo, porém, foram pesados aproximadamente 27,5 mg de vegetal e 18 mg do sal *Fast Blue B* seguido da adição de 1,0 mL de clorofórmio e na sequência 1,0 mL de NaOH, as amostras ficaram sobre agitação pelo mesmo período de tempo.

Após o preparo das amostras com éter de petróleo e com o clorofórmio, duas fases líquidas foram formadas, a orgânica contendo os analitos e a outra aquosa, contendo os restos vegetais da amostra e substâncias hidrofílicas. Toda a solução de interesse foi transferida para outro eppendorf, os frascos foram abertos e os solventes evaporados naturalmente por até 1 dia útil, resultando em uma substância pastosa, que é o produto da complexação entre o vegetal e o *Fast Blue B*. Uma quantidade mínima foi retirada do produto final, suficiente para cobrir o cristal para a leitura no equipamento.

4.3.2 Extrato etanólico

Para a extração etanólica foi utilizado Etanol 99,8%. Foram pesados aproximadamente 27,5 mg de vegetal e foram adicionados 200 μL de etanol, as soluções ficaram sob agitação no vórtex por aproximadamente 3 minutos. Após o preparo da solução, foram retiradas alíquotas de 20,0 μL para serem analisadas no equipamento.

4.3.3 Aquisição dos espectros de FTIR

Todas as análises foram realizadas no equipamento ATR-FTIR Agilent® Cary 630 equipado com cristal de diamante aquecido com controle de temperatura indo até 130 °C em incrementos de 0.1 °C. O equipamento foi operado à 80 °C com resolução espectral de 4 cm^{-1} , sendo os espectros coletados na faixa entre 4000 e 650 cm^{-1} , após a leitura e subtração do branco (leitura do cristal sem amostra) e com acumulação de 32 espectros.

4.4. Construção dos modelos quimiométricos

A partir dos espectros das soluções preparadas foram realizadas análises exploratórias empregando HCA e PCA, enquanto que um modelo de discriminação foi desenvolvido por PLS-DA. Os cálculos foram realizados com o programa MATLAB R2017a e o pacote PLS-Toolbox (versão 8.81). O pré-processamento usado em todos os modelos apresentados nesse estudo foi centrar na média (*mean center*). Foi feita uma seleção da região espectral em todos os espectros trabalhados afim de diminuir o ruído, foram retiradas da análise as regiões entre 650 e 750 cm^{-1} e 3550 e 4000 cm^{-1} .

Para a construção dos modelos de PLS-DA, os espectros foram divididos entre amostras de calibração e validação de acordo com a Tabela 2 abaixo:

Tabela 2. Quantidade e composição das amostras que foram utilizadas para a construção dos modelos PLS-DA.

Amostras	Quantidade		Composição
	Conjunto de calibração	Conjunto de validação	
Maconha	180	180	Prensada, haxixe e planta verde
Interferentes	69	68	82 tipos de vegetais diferentes

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Esse trabalho consistiu na complexação e extração de 360 amostras de maconha e 135 amostras de outros vegetais, de uso legalizado. Os espectros das soluções foram adquiridos por dois espectrômetros de infravermelho, Bruker® e Agilent®. As Figuras 10, 11 e 12 mostram o conjunto de espectros de todas as amostras com os solventes clorofórmio, etanol e éter de petróleo, respectivamente, adquiridos pelo equipamento Agilent® 360 Cary e As Figuras 14, 15 e 16 mostram o conjunto de espectros adquiridos pelo equipamento Bruker®. Devido a parceria com o laboratório de criminalística da Polícia Civil do DF com a empresa Agilent®, esse estudo irá analisar de forma mais detalhada apenas os espectros das amostras com éter de petróleo adquiridos pelo equipamento da Agilent®. Contudo, o segundo equipamento apresentou resultados análogos e sem diferença significativa.

Figura 10. Conjunto de espectros sem processamento das amostras com Clorofórmio, obtida pelo equipamento Agilent®.

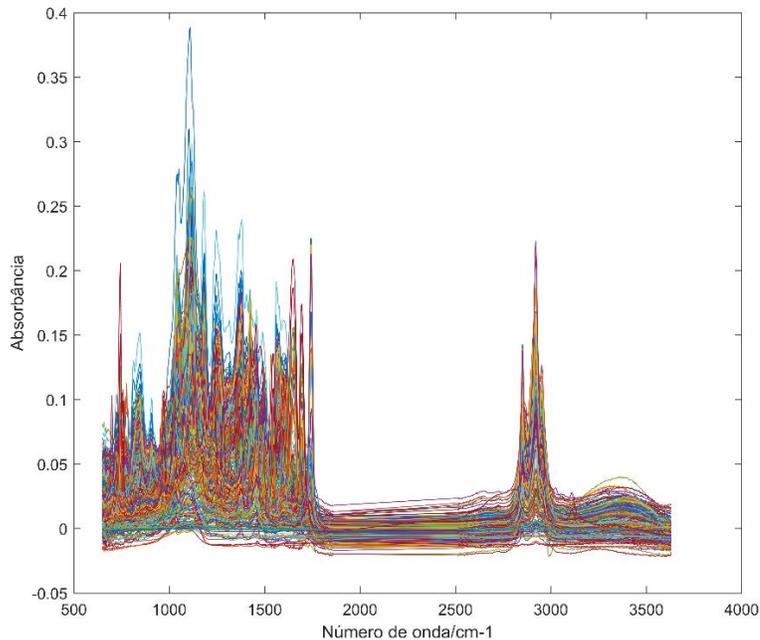


Figura 11. Conjunto de espectros sem processamento da extração etanólica, obtida pelo equipamento Agilent®.

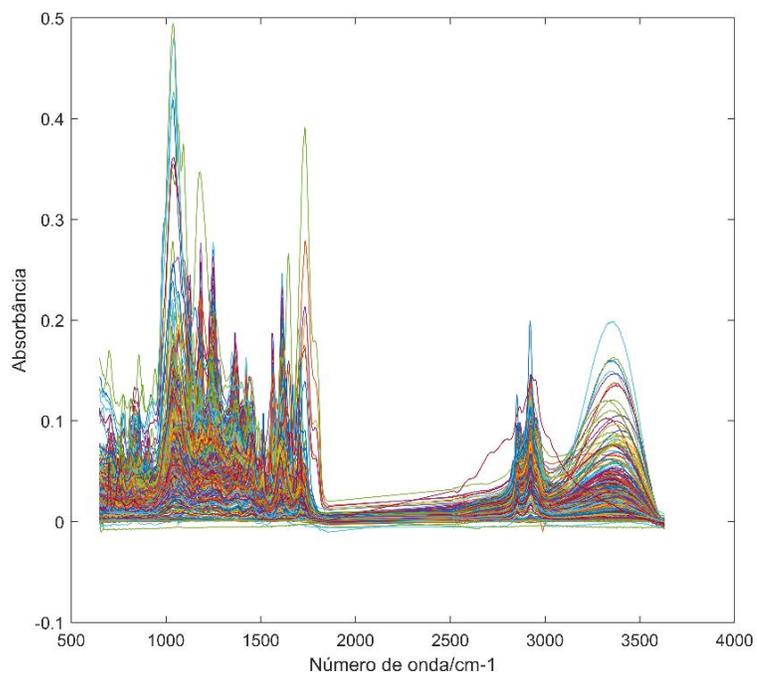


Figura 12. Conjunto de espectros sem processamento das amostras com Éter de petróleo, obtida pelo equipamento Agilent®.

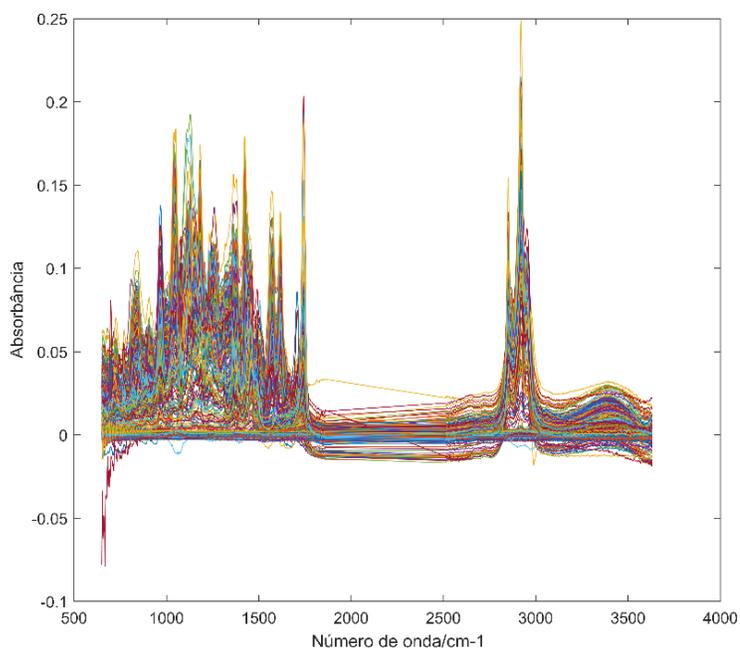


Figura 13. Conjunto de espectros sem processamento das amostras com Clorofórmio, obtida pelo equipamento Bruker®.

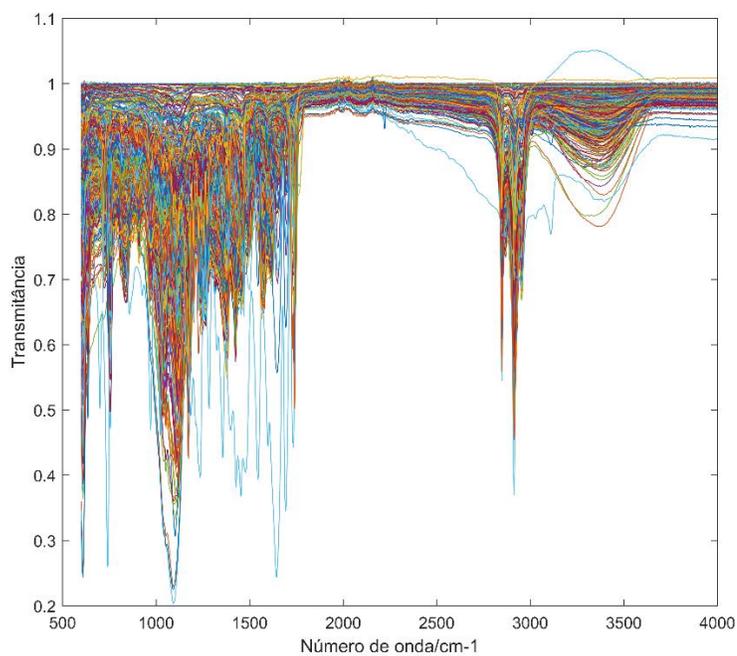


Figura 14. Conjunto de espectros sem processamento da extração etanólica, obtida pelo equipamento Bruker®.

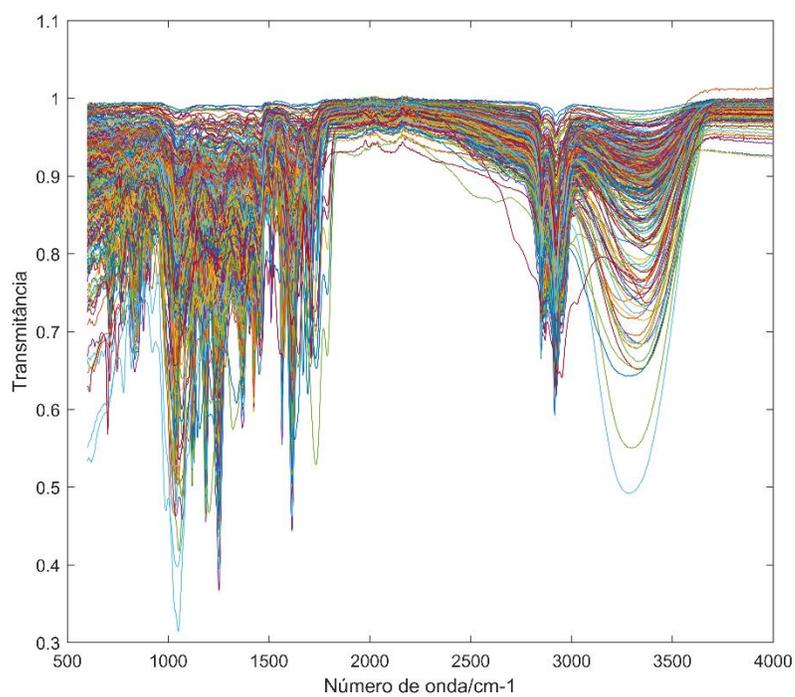
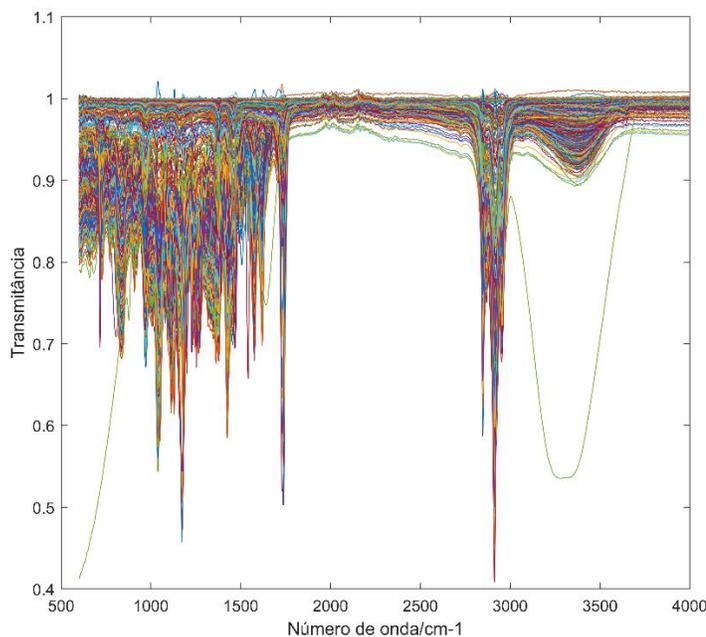


Figura 15. Conjunto de espectros sem processamento das amostras com Éter de petróleo, obtida pelo equipamento Bruker®.



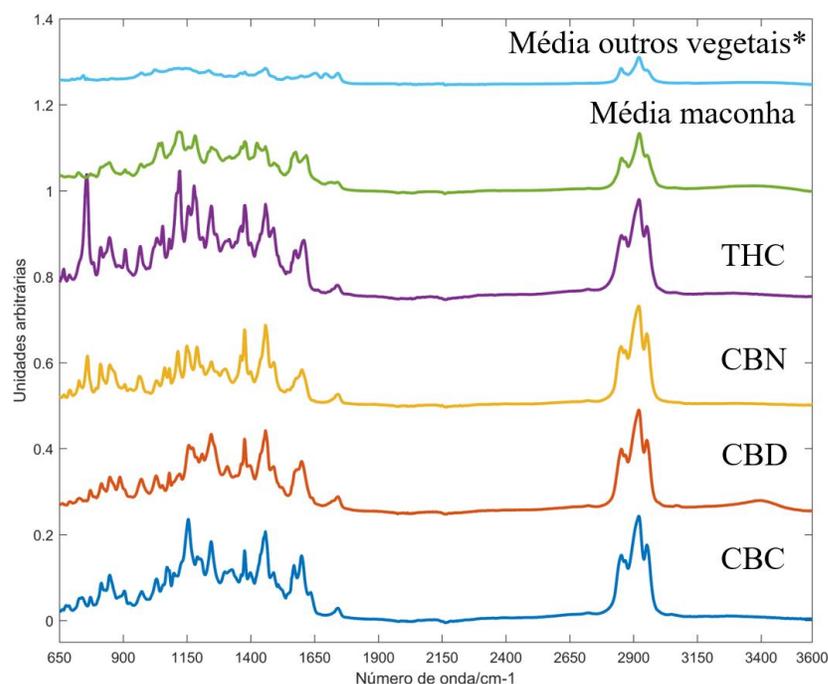
A primeira análise realizada foi a comparação dos dados espectrais dos padrões de fitocanabinoides adquiridos pela PCDF com a média das amostras de interferentes e de maconha, como mostra a Figura 16. Os espectros dos padrões foram obtidos a partir de uma solução em clorofórmio. Como no preparo de amostras com éter de petróleo e do clorofórmio, o solvente é evaporado, a diferença entre eles se torna mínima e, portanto, não é esperado um comportamento espectral significativamente diferente.

Observando os espectros dos padrões, nota-se bandas características para alguns dos fitocanabinoides. Para o THC duas regiões se destacam, a região entre 700 e 750 cm^{-1} e a região 1100 e 1150 cm^{-1} , por terem um sinal mais intenso quando comparado com os demais compostos. Essas bandas são características da deformação da ligação C-H em benzenos dissubstituídos e da ligação C-O do alquil-éter, respectivamente. Essas informações são compatíveis com estrutura apresentada na Figura 2. Para o CBN, a região de destaque está entre aproximadamente 1000 e 1100 cm^{-1} , a qual apresenta um sinal duplo característico para esse composto, que está relacionado com o estiramento da ligação C-O do aril-alquil-éter. (QUÍMICA NOVA, 2004)

Algumas observações importantes foram feitas após a comparação dos espectros. O sinal das amostras de maconha se mostrou mais intenso do que o sinal dos interferentes porque em diversos

casos não houve complexação. As bandas entre 820 e 950 cm^{-1} e 1550 e 1650 cm^{-1} , regiões características do estiramento da ligação dupla de $\text{C}=\text{C}$, se destacaram por estarem presentes nos padrões e nas amostras de maconha, sendo que os sinais nessa região se mostraram pouco intensos ou quase inexistentes no espectro médio de interferentes. (QUÍMICA NOVA, 2004)

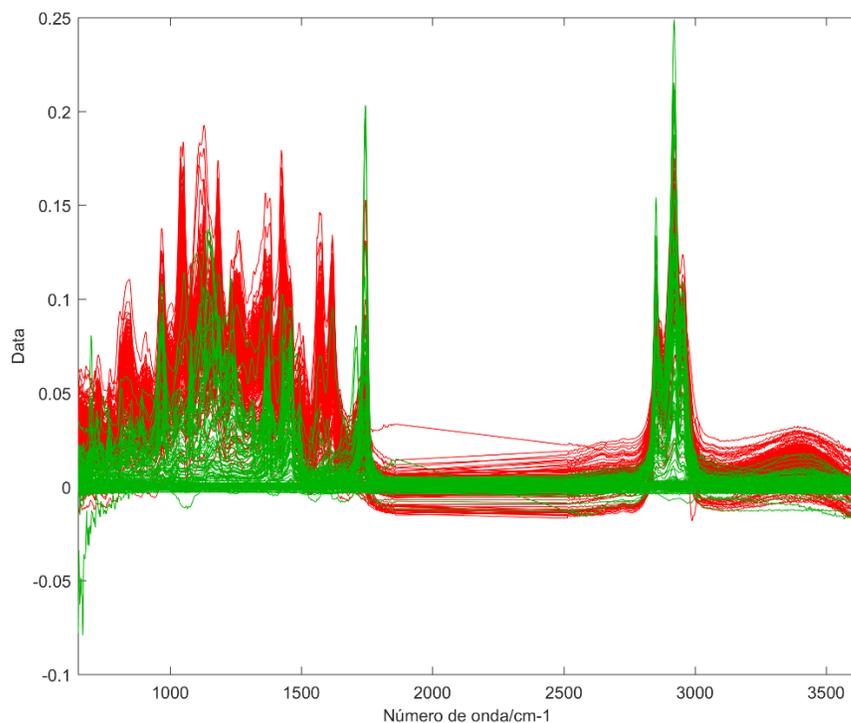
Figura 16. Espectro dos padrões de fitocanabinoides comparados com as médias dos interferentes e das amostras de maconha. Outros vegetais*: vegetais de uso legalizado.



Essas diferenças espectrais trazem a possibilidade de observar uma separação entre maconha e interferentes até mesmo com modelos não supervisionados como PCA.

Ao comparar as amostras de maconha e de interferentes, observa-se que algumas amostras de maconha tiveram sinal baixo, como mostrado na Figura 17. Como as amostras de maconha trabalhadas nesse estudo consistem em amostras apreendidas pela PCDF em diversas condições e algumas foram armazenadas por muito tempo, acredita-se que esses fatores influenciaram as medições. Mesmo com algumas amostras apresentando sinais de baixa intensidade, a diferença entre maconha e interferentes é bem evidente, principalmente nas bandas entre 820 e 950 cm^{-1} e 1550 e 1650 cm^{-1} .

Figura 17. Conjunto de espectros de todas as amostras de maconha e de interferentes para o éter de petróleo no equipamento Agilent® Cary 630. — : Maconha; — : Interferentes.



Durante a obtenção dos espectros notou-se que alguns dos interferentes possuem sinais fracos ou inexistentes, isso acontece porque a extração com éter de petróleo não foi efetiva para essas amostras.

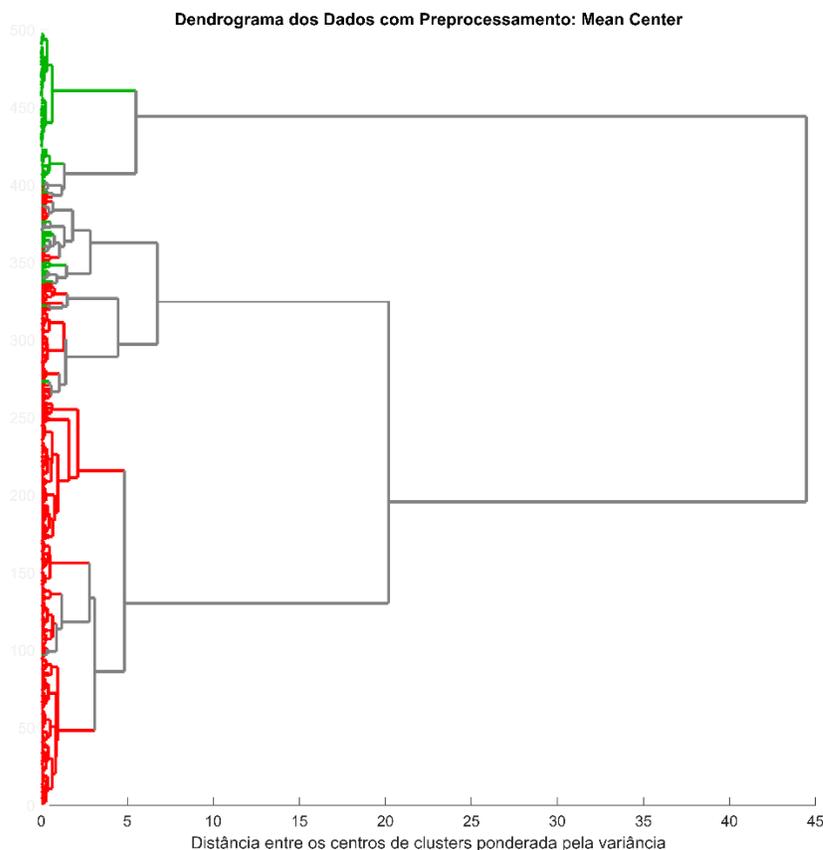
5.1 Análise de agrupamentos por métodos hierárquicos (HCA)

5.1.1 Análise multivariada de toda a região espectral

O dendrograma foi construído com base na distância Euclidiana, amostras que possuem pequenas distâncias entre si são agrupadas como pertencentes ao mesmo grupo, o contrário acontece para amostras mais distantes uma das outras. A Figura 18 mostra que, de acordo com o HCA muitas amostras de maconha apresentaram comportamento semelhante às amostras de interferentes. Esse comportamento foi resultado de um grupo de amostras que obteve sinal fraco ou apresentou algum problema com a extração com éter de petróleo, provavelmente amostras que

não foram armazenadas em condições adequadas ou ficaram muito tempo guardadas. Mas mesmo com algumas amostras de maconha misturadas com interferentes, o dendrograma revelou que as amostras apresentam distinções que tornam viável a discriminação entre os dois grupos.

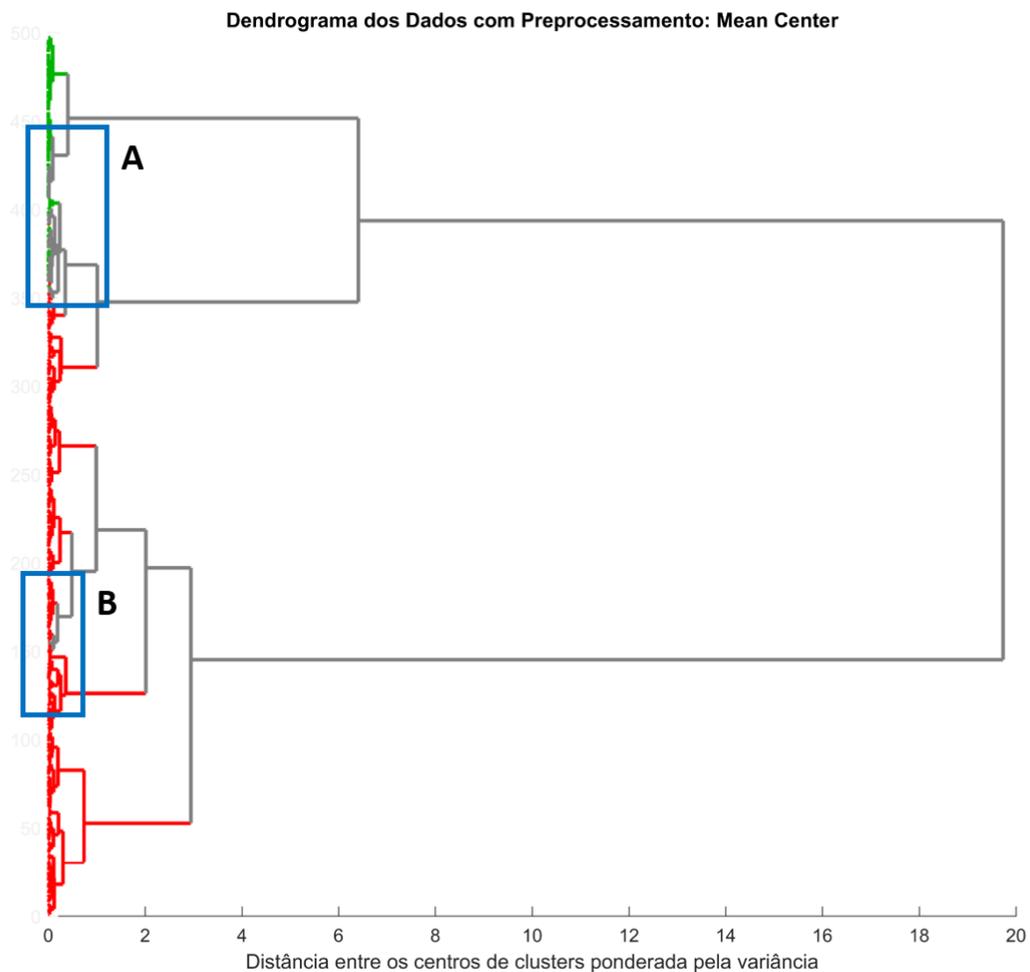
Figura 18. Dendrograma das amostras de maconha e interferentes com toda a região espectral para o éter de petróleo no equipamento Agilent® Cary 630. — : Maconha; — : Interferentes.



5.1.2 Análise multivariada com uma região selecionada (1550–1650 cm^{-1})

A região de maior destaque nos espectros apresentou melhores resultados quando se aplicou HCA quando comparado com o modelo que abrangeu toda a região espectral, como é possível comparar na Figura 19.

Figura 19. Dendrograma das amostras de maconha e interferentes com uma região selecionada (1550–1650 cm^{-1}) para o éter de petróleo no equipamento Agilent® Cary 630. — : Maconha; — : Interferentes.



As duas classes apresentam uma distinção melhor, com um menor número de amostras de maconha e de interferentes com alta similaridade, como pode ser observado nos destaques das Figuras 20 e 21. De forma geral, essa região apresentou melhores resultados e reforçou que existe a possibilidade de se obter dois grupos distintos entre maconhas e interferentes.

Figura 20. Região A do dendrograma com uma região selecionada (1550–1650 cm^{-1}) para o éter de petróleo no equipamento Agilent® Cary 630. — : Maconha; — : Interferentes.

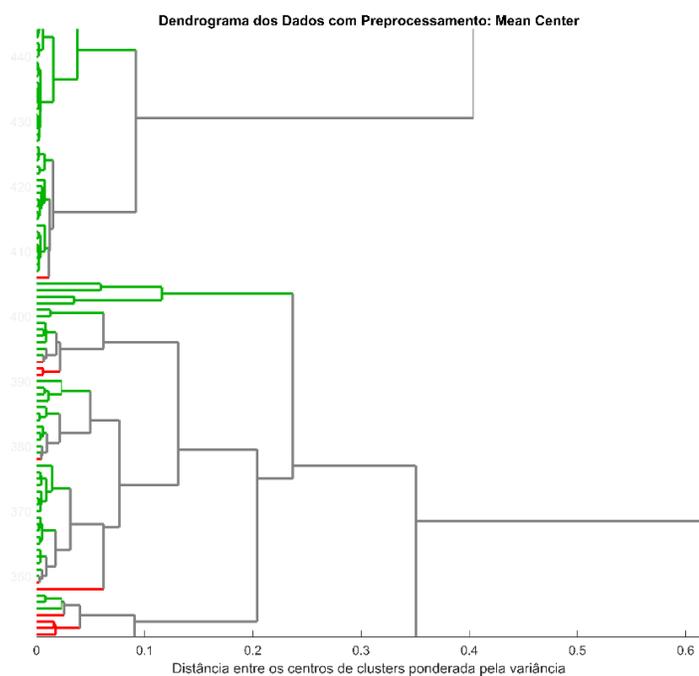
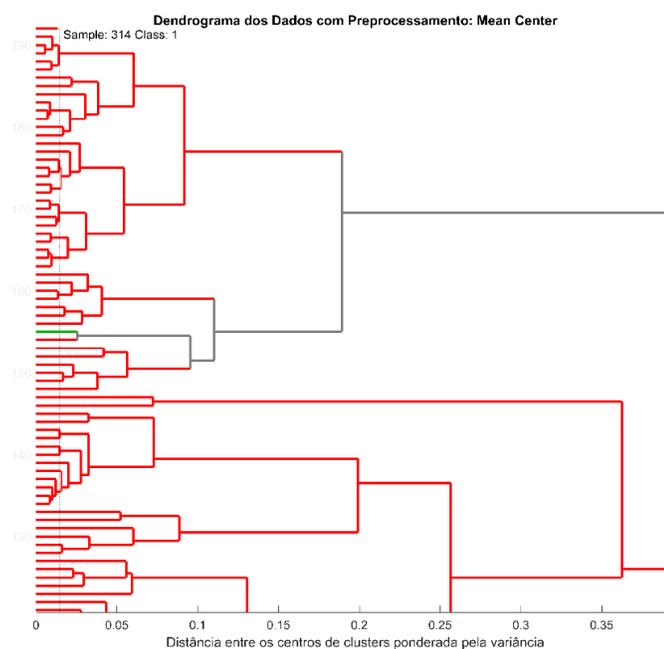


Figura 21. Região B do dendrograma com uma região selecionada (1550–1650 cm^{-1}) para o éter de petróleo no equipamento Agilent® Cary 630. — : Maconha; — : Interferentes.

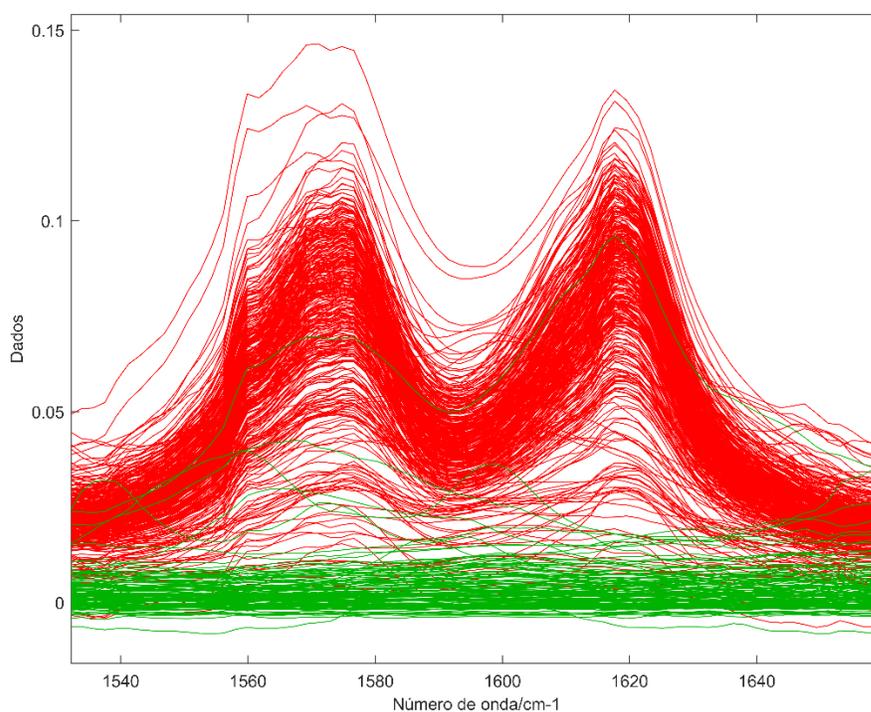


5.2 Análise exploratória por PCA

5.2.1 Análise multivariada com uma região selecionada (1550–1650 cm^{-1})

Foram feitos modelos com diversas regiões, porém a banda 1550 – 1650 cm^{-1} , mostrada na Figura 22, foi selecionada para criar o modelo por ser uma região que apresentou maior distinção entre as classes em comparação com as demais, portanto, espera-se melhores resultados ao selecionar essa banda.

Figura 22. Espectro das amostras de maconha e interferentes da região 1550 – 1650 cm^{-1} para o éter de petróleo no equipamento Agilent® Cary 630. — : Maconha; — : Interferentes.



De acordo com o gráfico dos espectros, o sinal das amostras de maconha, em vermelho, é mais intenso para essa região em comparação com o sinal dos interferentes. Acredita-se que esse é o principal fator de separação entre as duas classes.

Na construção da PCA foi selecionada apenas uma PC, como mostra a Figura 23. Ao analisar o gráfico dos resíduos Q versus T^2 , nota-se que o modelo possui apenas dois outliers e poucas amostras com valor de resíduos Q elevado. Ao observar o gráfico dos escores é possível

notar que há padrões comportamentais em alguns grupos de amostras de maconha, em vermelho, esse padrão pode estar relacionado a forma como as amostras se apresentavam, maconha prensada, haxixe e planta verde.

Através do gráfico dos pesos para esse modelo, mostrado na Figura 24, é possível observar novamente a contribuição da PC1 ao conter a maioria da variação dos dados e como a região escolhida é capaz de separar com melhor definição as duas classes de interesse, maconha e interferentes.

Figura 23. Escores do modelo PCA da região 1550 – 1650 cm^{-1} e gráfico Resíduos Q X *Hotelling T*². ◆: Maconha; ■: Interferentes.

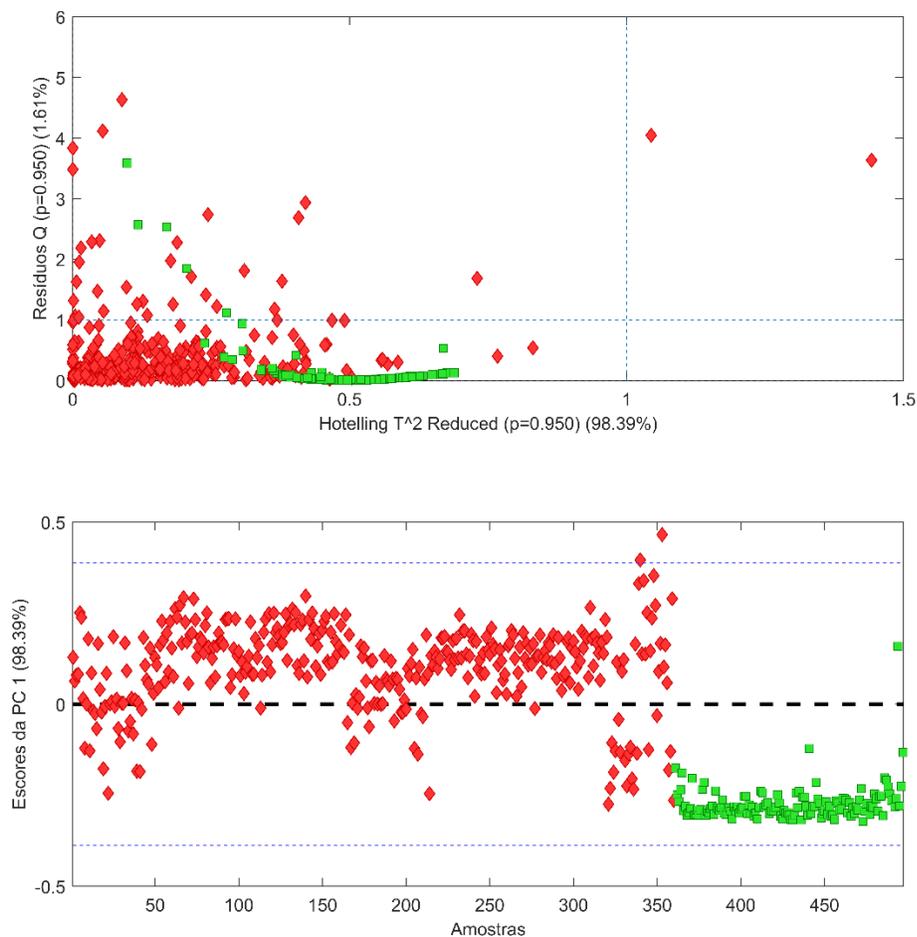
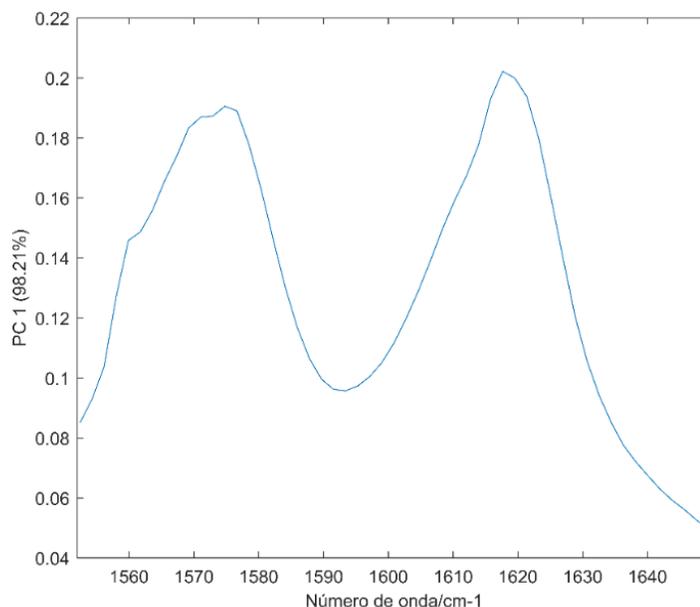


Figura 24. Gráfico dos pesos para o modelo PCA da região 1550 – 1650 cm^{-1} para o éter de petróleo no equipamento Agilent® Cary 630.



O PCA se trata de um método não supervisionado, portanto a separação quase total das duas classes mostra que é possível identificar maconha e separá-las das amostras de interferentes. Nota-se que as amostras de maconha formam um grupo distinto e bem definido, isso acontece devido as diferenças espectrais principais encontradas nessa região, a qual se mostrou característica de fitocanabinoides. Para a maioria dos interferentes o sinal dessa região é fraco, podendo ser explorada para futuros modelos de predição.

Os interferentes tiveram a tendência de se agrupar com valores mais negativos de escores, mostrando um comportamento semelhante entre as amostras, com exceção de uma que apresentou valor de escore positivo compatível com uma amostra de maconha.

De forma geral, o modelo separa bem as duas classes, apesar dos falsos negativos e positivos. Esse modelo apresentou resultados melhores quando comparado ao modelo construído com toda a região espectral.

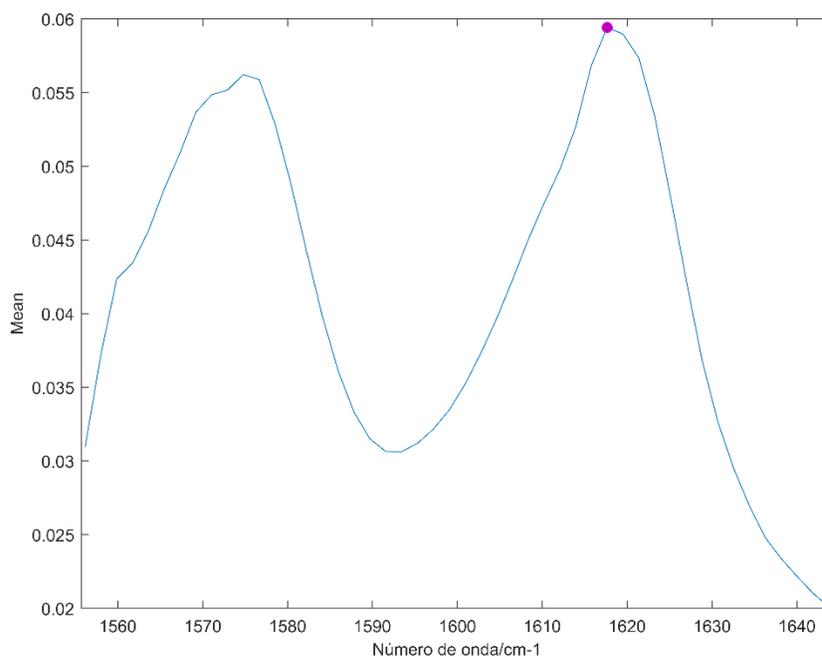
5.3 Análise discriminante das amostras de maconha apreendidas

5.3.1 Análise univariada com um ponto selecionado (~1618 cm^{-1})

Ao reduzir a região espectral analisada houve uma melhora significativa nos resultados, seguindo esse raciocínio foi feita uma análise univariada levando em conta a região selecionada anteriormente. Foram criados dois modelos com os pontos de maior intensidade, aproximadamente 1575 cm^{-1} e 1618 cm^{-1} . O modelo construído a partir do ponto 1618 cm^{-1} , mostrado na Figura 25, apresentou melhores resultados.

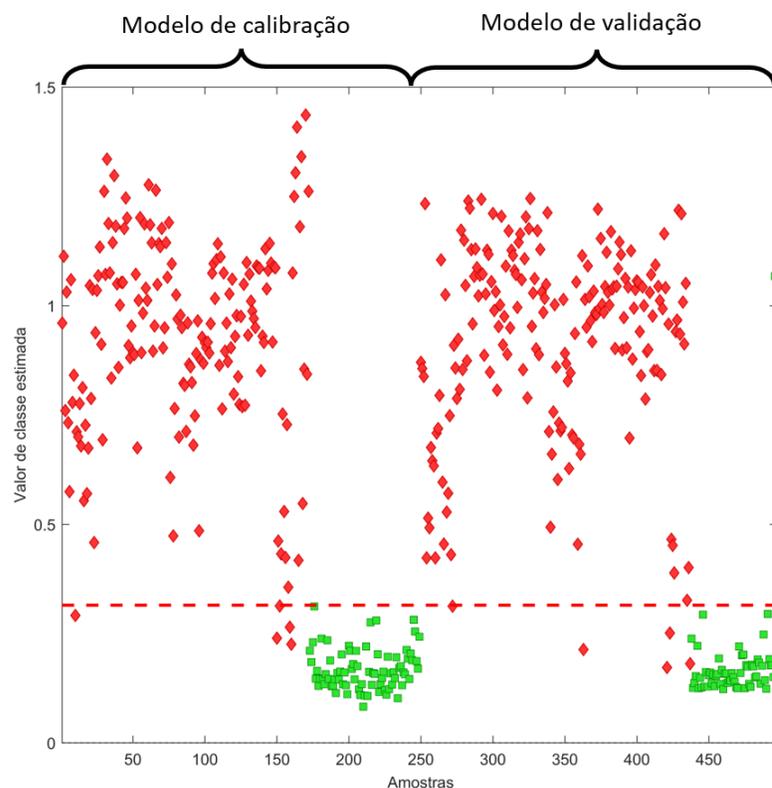
A análise univariada apresenta algumas desvantagens quando comparada com a análise multivariada, na univariada não é possível calcular os resíduos Q e *Hotelling* T^2 , de forma que o método não consegue identificar outliers.

Figura 25. Gráfico do ponto selecionado para a análise univariada.



Apesar dessas desvantagens a seleção de apenas um ponto atribuiu ao método uma separação mais definida, com menores valores de falsos positivos, como é possível observar no gráfico dos resultados na Figura 26.

Figura 26. Gráfico dos resultados do modelo univariados ($\sim 1618\text{ cm}^{-1}$) para o éter de petróleo no equipamento Agilent® Cary 630. \blacklozenge : Maconha; \blacksquare : Interferentes; Linha tracejada vermelha: limite de detecção.



Seguindo o mesmo pensamento da análise multivariada, as amostras acima da linha de discriminação pertencem a classe 1, as amostras de maconha, e as abaixo não pertencem a essa classe, os interferentes.

Esse método comprova que apenas um ponto foi capaz de apresentar praticamente os mesmos resultados da análise multivariada. Na etapa de validação, padrão a direita do gráfico, apresenta um comportamento esperado, com separações distintas entre as classes e poucas amostras classificadas erroneamente. Novamente, é observada a tendência dos interferentes apresentarem baixos valores de intensidade, enquanto as amostras de maconha tem sinais mais elevados.

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

FIGURAS DE MÉRITO	%
Falso negativo (FN)	2,2
Falso positivo (FP)	1,5
Eficiência (EF)	96,3

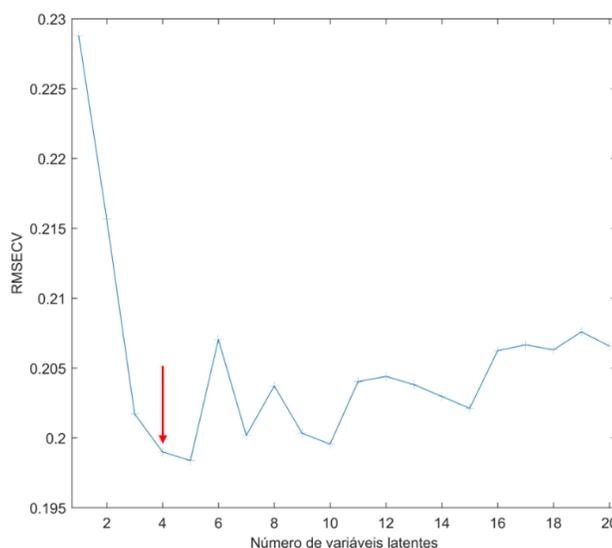
Como mostrado na Tabela 3, esse modelo univariado apresentou baixas taxas de FN e FP e alta eficiência, o que significa que é um método com uma alta confiabilidade e foi capaz de identificar corretamente cerca de 96% de todas as amostras analisadas, o que significa que a análise univariada foi uma escolha suficiente para o desenvolvimento do método para discriminar as amostras de maconha de interferentes com o solvente éter de petróleo.

5.3.2 Análise multivariada por PLS-DA com a região de 1550–1650 cm^{-1}

Buscando explorar o resultado exploratório obtido pelos modelos de PCA, foi construído um modelo PLS-DA empregando o algoritmo Onion para selecionar quais amostras fariam parte do grupo de treinamento e validação, foi determinado que a algoritmo destinaria 50% das amostras para cada um dos grupos.

O número de variáveis latentes (VL) dos modelos foi escolhido ao analisar o gráfico de RMSECV em função do número de variáveis latentes (Figura 27). Escolhe-se o VL que apresenta o menor valor de RMSECV ou o valor a partir do qual se atinge o patamar. Portanto foram escolhidas 4 variáveis, pois a contribuição a partir desse ponto se mostrou muito baixa para justificar a adição de mais variáveis ao modelo.

Figura 27. Gráfico do erro de validação cruzada *versus* o número de variáveis latentes.



Ao observar o gráfico de resíduos Q *versus* T^2 , disposto na Figura 28, nota-se que há poucos

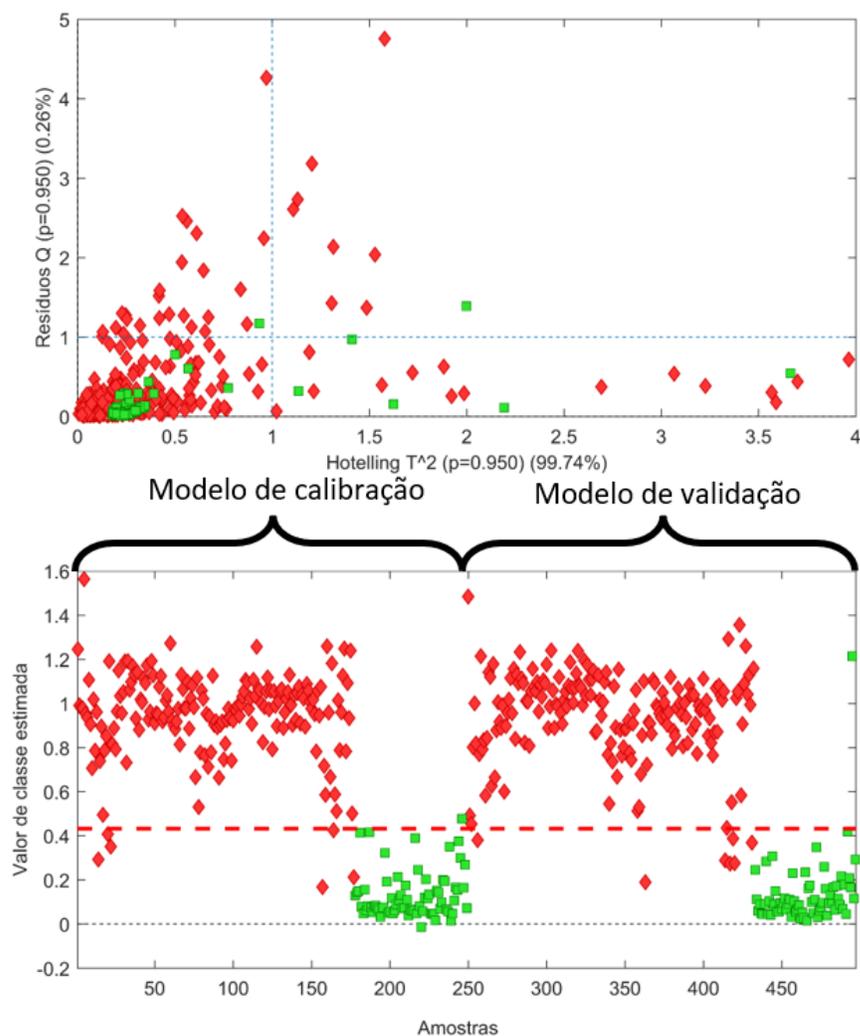
possíveis outliers, ou seja, poucas amostras que o modelo não consegue modelar adequadamente. Algumas amostras de maconha e de interferentes apresentaram um alto valor de T^2 , ou seja, estão mais distantes da distribuição das outras amostras e por consequência elas têm uma alta influência no resultado do modelo.

As amostras de interferentes apresentaram um comportamento muito semelhante e baixa dispersão em sua maioria, o que indica uma distinção comportamental clara entre as amostras de maconha e os interferentes.

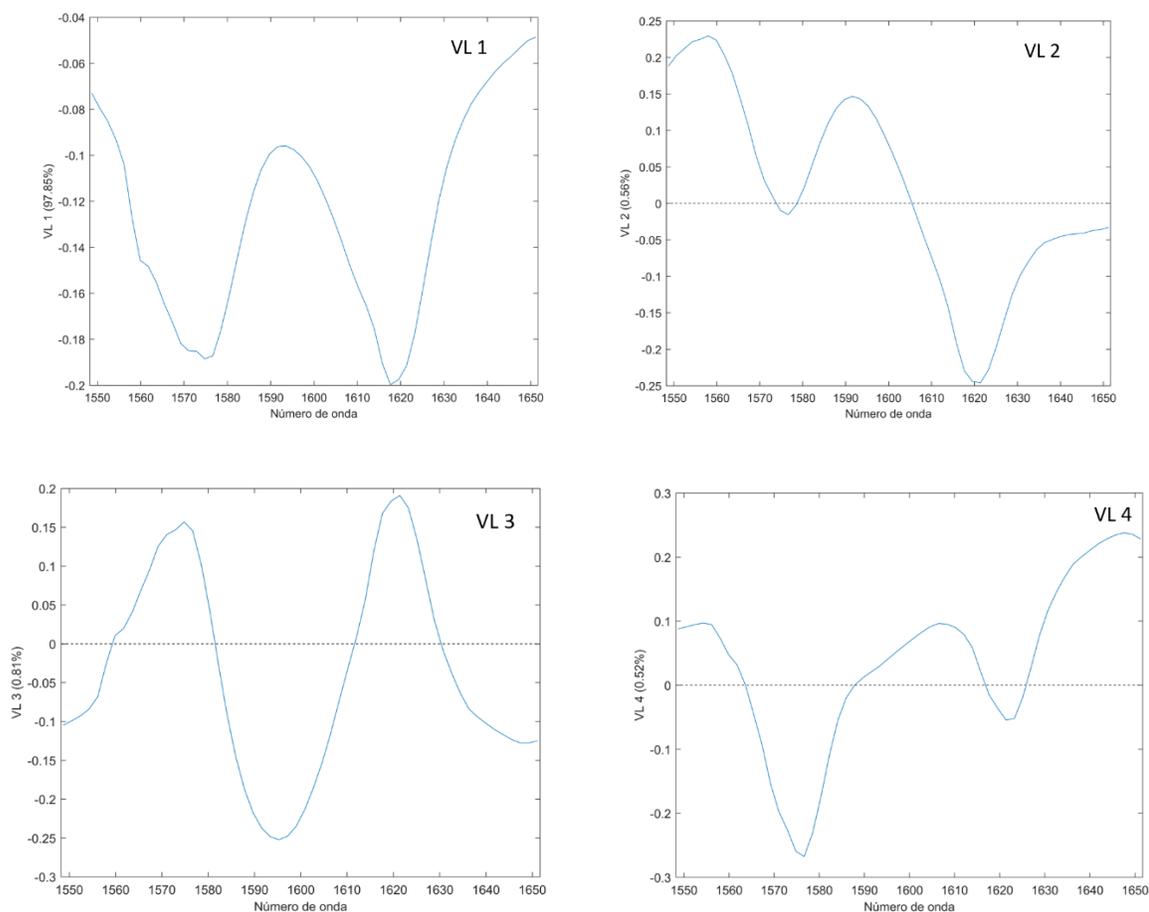
A linha vermelha pontilhada no gráfico dos valores estimados de classe é o limite de discriminação do modelo, amostras acima dessa linha são classificadas como pertencentes a classe 1, em vermelho, maconha, abaixo dessa linha são amostras que não pertencem ao grupo 1, em verde, os interferentes. O padrão a esquerda do gráfico representa a etapa de treinamento, ou seja, ele expressa o comportamento esperado tanto para as amostras de maconha quanto para as amostras de interferentes. Ao verificar a etapa de validação, a partir do segundo grupo de amostras de maconha, observa-se que o modelo tem uma alta eficiência, por conseguir separar a grande maioria das amostras.

A amostra de interferente da fase de validação que está acima do limite de discriminação foi classificada, pelo modelo, como pertencente a classe maconha, dessa forma é considerada falso positivo, o mesmo acontece para as amostras de maconha abaixo do limite de discriminação, foram classificadas como pertencentes aos interferentes e por isso são denominados falsos negativos, com é possível observar na Figura 28.

Figura 28. Gráfico Resíduos Q versus Hotelling T^2 (acima) e de Escores do modelo PLS-DA (abaixo) da região 1550 – 1650 cm^{-1} com 4 VL para o éter de petróleo no equipamento Agilent® Cary 630. \blacklozenge : Maconha; \blacksquare : Interferentes. Linha tracejada azul: limite de 95% de confiança; Linha tracejada vermelha: limite de detecção.



A Figura 29 mostra a contribuição espectral das 4 variáveis latentes utilizadas na construção do modelo PLS-DA, as quais evidenciam que todos os números de onda da região selecionada parecem ser importantes, não apresentando pesos com valores próximos a zero.

Figura 29. Gráfico de pesos das variáveis latentes (VL) de 1 a 4 do modelo PLS-DA.

Os valores das figuras de mérito, apresentados na Tabela 4, mostram que o método por PLS-DA teve baixos valores de falso negativo e falso positivo e uma alta eficiência (>95%), como esperado pela análise gráfica dos dados.

Tabela 4. Figuras de mérito para as amostras de validação.

FIGURAS DE MÉRITO	%
Falso negativo (FN)	5
Falso positivo (FP)	1,5
Eficiência (EF)	93,5

Quando comparada com a Tabela 3, a análise univariada apresentou melhores resultados, mas ambos os modelos apresentaram valores altos de eficiência e baixos valores de classificação

errônea.

Os bons resultados obtidos pelos modelos PLS-DA e univariado indiciam que esse método de identificação de maconha é suficientemente eficiente e pode ser uma alternativa ao método já utilizado pela PCDF, análise com cromatografia em camada delgada, classificada pela SWGDRUG como categoria A técnica empregada nesse estudo também é caracterizada como categoria A pelo SWRDRUG, porém o método apresenta tempo de análise inferior, é mais barato e consome menos solvente.

5.4 Análise com outros solventes

A Tabela 5 apresenta as figuras de mérito dos modelos de PLS-DA da extração com outros solventes utilizados nesse estudo, empregando o FTIR da marca Agilent®.

Tabela 5. Figuras de mérito dos modelos PLS-DA para clorofórmio, éter de petróleo e etanol.

Figuras de mérito (%)	Etanol (espectro total)	Etanol (região 1550–1650 cm⁻¹)	Clorofórmio (espectro total)	Clorofórmio (região 800–870 cm⁻¹)	Éter de petróleo (região 1550–1650 cm⁻¹)	Éter de petróleo (~1618 cm⁻¹)
FN	7,5	2,5	3,8	5,6	5	2,2
FP	0	1,5	2,9	1,5	1,5	1,5
EF	92,5	96,0	93,3	92,9	93,5	96,3

FN: falso negativo; FP: falso positivo; EF: eficiência.

O processo de extração com etanol difere dos demais solventes, mas os resultados da construção de ambos os modelos comprovam alta eficiência dessa do uso desse solvente. O modelo com toda a região espectral entre 1550 e 1650 cm⁻¹ apresentou os melhores resultados para o etanol.

Diferente do que aconteceu para éter de petróleo, a região 1550–1650 cm⁻¹ não se mostrou significativa na construção do modelo para as amostras com clorofórmio. Entretanto a região entre 800 e 870 cm⁻¹ apresentou ótimos resultados de separação entre as classes para esse solvente.

Como esperado, o clorofórmio e o éter de petróleo tiveram resultados semelhantes. É importante ressaltar que a forma de extração das amostras foi a mesma para ambos os solventes,

mas a extração com éter de petróleo se provou mais eficiente.

De forma geral, os melhores resultados foram obtidos nas análises onde foram selecionadas regiões específicas e no caso do éter de petróleo, a análise univariada apresentou melhores resultados comparado com todos os outros modelos. O éter de petróleo se mostrou o solvente com melhor resultado de extração e bandas mais definidas, o que permitiu a análise univariada.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos por HCA e PCA mostraram que foi possível a distinção entre amostras de maconha e interferentes através da extração com solvente orgânico e reação com o sal *Fast Blue B*. Os melhores resultados para ambas as análises foram apresentados para os modelos criados com a região espectral 1550–1650 cm^{-1} , caracterizada pelo estiramento da ligação dupla de C=C, podendo aferir que essa região apresenta informação química suficiente para se diferenciar essas classes.

Os modelos de PLS-DA mostraram alta eficiência e baixas taxas de FN e FP. O método baseado em PLS-DA apresentou bons resultados para a região selecionada. Por outro lado, o método baseado na análise univariada apresentou os melhores resultados, apenas um número de onda foi capaz discriminar as classes com maior eficiência e menores valores de FN e FP. A identificação de amostras de maconha através da análise por infravermelho associada ao tratamento quimiométrico mostrou resultados promissores, podendo esse ser um possível substituto ao método de identificação de maconha por CCD tradicionalmente utilizado pela PCDF. A técnica também possui como vantagens ser mais barata, tem menor consumo de solvente e ser mais rápida quando comparada ao procedimento usado pela Polícia Civil.

Os modelos construídos para todos os solventes apresentaram alta eficiência e baixos valores de FN e FP, porém a análise univariada com éter de petróleo se mostrou mais eficiente do que os demais.

Apesar do método de extração ser diferente, o etanol apresentou ótimos resultados, o que mostra que a metodologia aplicada para esse solvente pode ser explorada em estudos futuros.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[Planalto]. Disponível em http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Lei/L11343.htm. Acessado em: 28/03/2022

[UNIFESP]. Disponível em <https://www.unifesp.br/reitoria/dci/publicacoes/entreteses/item/2198-um-mercado-de-300-bilhoes-de-dolares>. Acessado em 28/03/2022

Bergamaschi, M.M., Queiroz, R.H.C., Chagas, M.H.N., de Oliveira, D.C.G., De Martinis, B.S., Kapczinski, F., Quevedo, J., Roesler, R., Schröder, N., Nardi, A.E., Martín-Santos, R., Hallak, J.E., Zuardi, A.W., & Crippa, J.A. **Cannabidiol reduces the anxiety induced by simulated public speaking in treatment-naïve social phobia patients.** (2011) *Neuropsychopharmacology* 36, 1219–1226. doi:10.1038/npp.2011.6

Bordin, D. C.; Messias, M.; Lanaro, R.; Cazenave, S. O.; Costa, J. L. **Análise forense: pesquisa de drogas vegetais interferentes de testes colorimétricos para identificação dos canabinoides da maconha (Cannabis Sativa L.),** Quím. Nova, vol. 35, no.10, São Paulo, 2012.

Borille, B. T. **Caracterização química da planta Cannabis Sativa L. a partir de sementes apreendidas pela polícia federal no estado do Rio Grande do Sul.** Dissertação de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Porto Alegre, 2016.

Carvalho, C. R.; Hoeller, A. A.; Franco, P. L. C.; EIDT, I.; WALZ, R. **Canabinoides e Epilepsia: potencial terapêutico do canabidiol.** VITTALLE-Revista de Ciências da Saúde, v. 29, n. 1, p. 54-63, 2017.

Custódio, M. F.; Magalhães, L. O.; Arantes, L. C.; Braga, J. W. **Identification of Synthetic Drugs on Seized Blotter Papers Using ATR-FTIR and PLS-DA: Routine Application in a Forensic Laboratory,** J. Braz. Chem. Soc., Vol. 32, No. 3, 513-522, 2021.

Da-Col, J. A., Dantas, W. F., Poppi, R. J., **Experimento didático de quimiometria para o mapeamento de *pellets* farmacêuticos utilizando espectroscopia de imagem na região do infravermelho próximo e resolução multivariada de curvas com mínimos quadrados alternantes: Um tutorial, parte IV,** Química Nova, vol. 45, No. 2, 2022, p. 137-261.

de Oliveira, et. at., **Análise do teor de cocaína em amostras apreendidas pela polícia utilizando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV-Vis.** Eclética Química, vol. 34, nº3, 2009.

de Santana, F. B., et. al. **Experimento didático de quimiometria para classificação de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio combinado com análise discriminante por mínimos quadrados parciais: um tutorial, parte V.** Quim. Nova, Vol. 43, No. 3, 371-381, 2020.

do Nascimento, I. R. **Identificação Química em Nível Molecular de Amostras de Maconha por ESI-FT-ICR MS.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Exatas, Vitória-ES, 2014.

dos Santos, N. A. et al., **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 1* (2016), pp. 13-21.

Erickson, B., **Is it time to relax marijuana's legal status? U.S. government ponders whether to ease regulations on drug to advance medical research, endure safety**. *C&EN Washington*, 2016.

Espy, R. D., et. al. **Paper spray and extraction spray mass spectrometry for the direct and simultaneous quantification of eight drugs of abuse in whole blood**. *Anal. Chem.* 2014, 86.

Eubanks, L. M., et al., **A molecular link between the active component of marijuana and alzheimer's disease pathology**, vol. 3, nº 6. *Molecular Pharmaceutics*, 2006.

Evans-Nguyen, K. **Forensic Chemistry**, *Forensic Chemistry*; American Chemical Society, 2021. DOI: 10.1021/acsinfocus.7e5009.

Ferreira, M. M. C. **Quimiometria: Conceitos, métodos e aplicações**. Campinas, SP: Editora Unicamp, 2015.

Haney, M., Gunderson, E.W., Rabkin, J., Hart, C.L., Vosburg, S.K., Comer, S.D., & Foltin, R.W. **Dronabinol and marijuana in HIV-positive marijuana smokers. Caloric intake, mood, and sleep**, (2007) *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 45, 545–554. doi:10.1097/QAI.0b013e31811ed205

Harris, D. C. **Quantitative Chemical analysis**. Ed. 7; New York: W. H. Freeman and Company, 2007.

Jacobs, A., Steiner, R. **Detection of the Duquenois-Levine chromophore in a marijuana sample**. *Forensic Science International* 239 (2014) 1-5

Klumpers, L.; Thacker D.; **A Brief Background on Cannabis: From Plant to Medical Indications**. *Journal of AOAC International* Vol. 102, No. 2, 2019

Koyama, Y. M.; Tetsuya, J. K.; Tomada, S.; Ueda, H. R. **Perturbational formulation of principal component analysis in molecular dynamics simulation**. Vol. 78, Iss. 4 – October 2008.

Kowalski, B. R. **Chemometrics: Views and Propositions**. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, Vol. 15, No. 4, 1975.

Kumer, A.; Sarkar, N.; Sunanda, P. **The Theoretical Prediction of Thermophysical properties, HOMO, LUMO, QSAR and Biological Indices of Cannabinoids (CBD) and Tetrahydrocannabinol (THC) by Computational Chemistry**, *Advanced Journal of Chemistry-Section A*, 2019, 2(3), 190-202.

Levine, J. **Origin of Cannabinol**, J. Am. Chem. Soc. 1944, 66, 11, 1868–1870.

Lopes, R. E.; Santos, I. P.; Soares, F. L.; Pereira, E. F.; Braga, J. W.; **Aplicação da Análise por Componentes Principais (PCA) na identificação de marcas de canetas esferográficas – uma introdução à quimiometria**. XV Encontro Nacional de Ensino de Química (XVENEQ) – Brasília, DF, Brasil – 21 a 24 de julho de 2010.

Meyer, V. **Laboratory Profiles: The Scientific Forensic Service of the Zurich city police have to identify illegal drugs quickly determine their purity**. *Anal. Chem.* 2000, 72, 15, 516 A.

Monticelli, D., et. al. **Cannabis Cultivation Facilities: A Review of Their Air Quality Impacts from the Occupational to Community Scale**, *Environmental Science & Technology* 2022 56 (5), 2880-2896. DOI: 10.1021/acs.est.1c06372

Moros, J., et. al. **Nondestructive Direct Determination of Heroin in Seized Illicit Street drugs by Diffuse Reflectance near-Infrared Spectroscopy**. *Anal. Chem.* 2008, 80, 19, 7257–7265.

Neto, B.; Scarmínio, I.; Bruns, R. **25 Anos de Quimiometria no Brasil**. *Quím. Nova* 2006, 29 (6) 1401-1406.

Obeidat, S. M.; Al-Ktash, M. M.; Al-Momani, I. F. **Study of Fuel Assessment and Adulteration Using EEMF and Multiway PCA**. *Energy Fuels* 2014, 28, 8, 4889–4894 Publication Date: July 14, 2014.

Oliveira, N., Ribeiro, E., **O massacre negro brasileiro na guerra às drogas**. *Revista Institucional de Direitos Humanos*, vol 15 N.28, 2018.

Pereira, P. C.; Freita, C. F.; Chaves, C. S.; Estevão, B. M.; Pellosi, D. S.; Tessaro, A. L.; Batistela, V. R.; Scarmínio, I. S.; Caetano, W.; Hioka, N. **A quimiometria nos cursos de graduação em química: proposta do uso da análise multivariada na determinação de pK_a** . *Quím. Nova*, Vol. 37, No. 8, 1417-1425, 2014.

Pérez-Arribas, L. V.; León-González, M. E.; Rosales-Conrado, N. **Learning Principal Component Analysis by Using Data from Air Quality Networks**, *J. Chem. Educ.* 2017, 94, 458–464.

Pinto, G. A.; Freitas, L. G.; Machado, Y.; Marinho, P. A. **Avaliação da técnica de imunocromatografia para análise de drogas de abuso no contexto da química forense**. P.A. Marinho, *Rev. Bras. Crimin.* V. 4, n. 3, 28-37, 2015.

Química Nova, vol. 27, nº4, 670-673, 2004.

Rang, H. P. et al. **Farmacologia**. Rio de Janeiro, RJ, Brasil: ELSEVIER. 2006.

Ribeiro, F. A.; Ferreira, M. M.; Morano, S. C.; da Silva, L. R.; Schneider, R. P. **Planilha de**

validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados, Quím. Nova vol.31 no.1 São Paulo, 2008.

Rodriguez-Otero, J. L.; Hermida, M.; Centeno, J. **Analysis of Dairy Products by Near-Infrared Spectroscopy: A review**. J. Agric. Food Chem. 1997, 45, 8, 2815–2819.

Romão, W.; Schwab, N. V.; Bueno, M. I.; Sparrapan, R.; Eberlin, M. N.; Martiny, A.; Sabino, B. D.; Maldaner, A. O. **Química Forense: Perspectivas sobre novos métodos analíticos aplicados à documentoscopia, balística e drogas de abuso**. Quim. Nova, Vol. 34, No. 10, 1717-1728, 2011.

Rybka, L. N., do Nascimento, J., Guzzo, R. S. **Os mortos e feridos na “guerra às drogas”: uma crítica ao paradigma proibicionista**. Psicologia social e organizacional. Estud. Psicol. 35, 2018.

Sarma, N. D. et al. **Cannabis Inflorescence for Medical Purposes: USP Considerations for Quality Attributes**. J. Nat. Prod. 2020, 83, 1334–1351.

Sawler J. et. al. **The Genetic Structure of Marijuana and Hemp**. PLOS ONE. 2015.

Shbair, M. K. et al. **Drugs involved in drug facilitated crimes-part II: Drugs of abuse, prescription and over-the-counter medications**. A review. Ann Pharm. Fr. 2010b; 68:319-31.

Sidou, L. F.; Borges, E. M. **Teaching Principal Component Analysis Using a Free and Open-Source Software Program and Exercises Applying PCA to Real-World Examples**, J. Chem. Educ. 2020, 97, 1666–1676

Skrobot, V. L.; Santos, C. S; Braga, J. W. B. **Exploratory Analysis of Automotive Diesel Fuel Stability Test Methods by Infrared Spectroscopy and Parallel Factor Analysis**. Energy Fuels 2019, 33, 7, 6170–6176.

Small, E. **Evolution and Classification of *Cannabis sativa* (Marijuana, Hemp) in Relation to Human Utilization**. The New York Botanical Garden (outside the USA), 2015.

Small, E.; Marcus, D. **Hemp: A New Crop with New Uses for North America**. 2002. J. Janick and A. Whipkey (eds.). ASHS Press, Alexandria, VA.

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 madeiras amazônicas**. Quim. Nova 2017, 40, 418.

Skoog; West; Holler; Crouch. **Fundamentos de Química Analítica**. Ed.8; Editora Thomson, 2005.

SWGDRUG. Recommendations. Version 8.0, 2019-Julho-13.

Turner, C. E., Elsohly, M. A., & Boeren, E. G. **Constituents of *Cannabis sativa* L. XVII.A**

review of natural constituents, Journal of Natural Products, 43, 169, 1980).

UNODC. **Executive Summary: Conclusions and policy implications. World Drug Report.** 2019.

UNODC. **Drug market trends: Cannabis, Opioids.** 2021

USDA. United States Department of Agriculture. Natura Resources Conservation Service. Disponível em: <https://plants.usda.gov/home/plantProfile?symbol=CASA3>. Acessado em: 15/03/2022

Vogel et al. **Textbook of Quantitative Chemical Analysis**, Ed. 6, LTC — LivrosTécnicos e Científicos Editora Ltda. 2002.

Whiting, P.F., Wolff, R.F., Deshpande, S., Di Nisio, M., Duffy, S., Hernandez, A.V., Keurentjes, J.C., Lang, S., Misso, K., Ryder, S., Schmidtkofer, S., Westwood, M., & Kleijnen, J. **Cannabinoids for Medical Use: A Systematic Review and Meta-analysis.** (2015) JAMA 313, 2456–2473. doi:10.1001/jama.2015.6358

Wold, S. **Pattern recognition by means of disjoint principal components models.** Pergamon Press 1976 Vol 8 pp 127-139 Printed In Oreal Britain.

Yang R. et al. **Development of Cannabinoids in Flowers of Industrial Hemp (Cannabis sativa L.): A Pilot Study.** J. Agric. Food Chem. 2020, 68, 6058–6064.

Zuardi, A. W. **History of cannabis as a medicine: a review.** Revista Brasileira de Psiquiatria, v. 28, n. 2, p. 153-157, 2006.