

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**MÉTODOS APLICADOS À RASTREABILIDADE DE *Cannabis sativa*
L. (MACONHA) EM TERRITÓRIO BRASILEIRO**

**Mauro Sander Fett
(Tese)**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**MÉTODOS APLICADOS À RASTREABILIDADE DE *Cannabis sativa* L.
(MACONHA) EM TERRITÓRIO BRASILEIRO**

MAURO SANDER FETT

Engenheiro Agrônomo (UFRGS)
Mestre em Economia Rural (UFRGS)

Tese apresentada como um dos
requisitos à obtenção do Grau de
Doutor em Ciência do Solo

Orientador: Prof. Dr. Flávio Anastácio de Oliveira Camargo

Porto Alegre (RS)

Outubro de 2017

CIP - Catalogação na Publicação

Fett, Mauro Sander

MÉTODOS APLICADOS À RASTREABILIDADE DE Cannabis sativa L. (MACONHA) EM TERRITÓRIO BRASILEIRO / Mauro Sander Fett. -- 2017.

97 f.

Orientador: Flávio Anastácio de Oliveira Camargo.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Rastreabilidade. 2. Cannabis sativa L.. 3. Ciência forense. 4. Composição química. 5. Marcadores genéticos. I. Camargo, Flávio Anastácio de Oliveira, orient. II. Título.

Dedico à minha família,
especialmente meu pai e minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Flávio Camargo pela orientação e amizade no período do doutorado.

Aos colegas de trabalho Rafael Ortiz e Eduardo Ávila pelo incentivo e contribuições no trabalho.

Aos pesquisadores, amigos e colaboradores deste projeto de estudo, Gleidson Gimenes, Roberta Mariot e Leonardo Capeleto pelo apoio nos trabalhos.

Aos professores Tales Tiecher e Valdir Stefenon pelo auxílio no processamento dos dados.

À UFRGS e à PUC/RS pelo apoio institucional e estrutura física para realização dos estudos.

À Polícia Federal e aos demais colegas de trabalho que apoiaram e colaboraram para que o trabalho pudesse ser realizado.

Aos amigos, próximos ou distantes, que colaboraram em manter o andamento de vida “normal” durante este período de estudos.

Aos meus pais, Pedro e Janice, à minha esposa, Andrea, e aos meus filhos, Laura e Mateus, pelo apoio e compreensão neste período de estudos e privações.

METODOS APLICADOS À RASTREABILIDADE DE *Cannabis sativa* L. (MACONHA) EM TERRITÓRIO BRASILEIRO¹

Autor: Mauro Sander Fett

Orientador: Prof. Flávio Anastácio de Oliveira Camargo

RESUMO

A repressão ao tráfico de drogas tem sido um dos principais focos de ação da segurança pública nacional e internacional, devido aos graves problemas de saúde pública associados ao consumo, bem como a grande quantidade de crimes associados ou resultantes deste consumo. Os resultados do Relatório Mundial de Drogas de 2013 das Nações Unidas mostram que a demanda estimada por drogas não está reduzindo consideravelmente. Conforme este relatório, a maconha continua sendo a substância ilícita mais utilizada no mundo, embora tenha havido uma redução no crescimento de seus usuários. Uma das formas de combater o tráfico de drogas, direcionando as investigações e apontando as possíveis rotas, é a identificação de sua origem pela rastreabilidade. Isso pode ser realizado através da observação da composição química ou orgânica do material, baseando-se no conceito de marcadores. No caso da maconha, em que o uso direto de partes da planta, os marcadores podem ser identificados na composição da própria planta, influenciados pelas características genotípicas das plantas e pelas condições ambientais a que estas estão submetidas durante o desenvolvimento. Assim, foram realizadas análises da concentração química elementar, das relações isotópicas de $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ e $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e de marcadores genéticos específicos em amostras de *Cannabis* coletadas em diferentes pontos ou locais de cultivo no Nordeste brasileiro, cultivadas em ambiente controlado e apreendidas em ações policiais, a fim de identificar corretamente o local de cultivo (rastrear sua origem). Os resultados obtidos foram processados no método estatístico multivariado de análise discriminante múltipla. As análises de concentração química elementar e o sistema de marcadores genéticos utilizados para rastrear a origem da *Cannabis* mostraram capacidade de classificar corretamente as amostras avaliadas, de acordo com o seu local de cultivo ou coleta. Por outro lado, a relação isotópica não foi adequada para separar as amostras de tecido vegetal de *Cannabis*, de acordo com seu local de cultivo ou coleta no Nordeste brasileiro. Dessa forma, verificou-se que as análises da concentração química elementar e de genotipagem por sistema de marcadores (*multiplex 13-loci STR*) podem ser utilizadas como marcadores ou indicadores para rastrear a origem de amostras de *Cannabis*, inclusive com a exatidão necessária para uso policial e forense.

¹Tese de Doutorado em Ciência do Solo. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.(82p.) Outubro, 2017.

APPLIED METHODS FOR THE TRACEABILITY OF *Cannabis sativa* L. (MARIJUANA) IN BRAZILIAN TERRITORY¹

Author: Mauro Sander Fett

Adviser: Prof. Flávio Anastácio de Oliveira Camargo

ABSTRACT

The repression of drug trafficking has been one of the main action focus of national and international public security, due to the serious public health problems associated to the drug consumption, as well as the large amount of crimes associated or resulting from drug consumption. The results of World Report on Drugs of 2013 by the United Nations show that the estimated demand for drugs is not reducing considerably. According to this report, marijuana continues to be the most used illicit substance in the world, although there had been a reduction in the increase of its users. One of the ways to combat drug trafficking, leading investigations and pointing out possible routes, is the identification of its origin through traceability. That can be accomplished through the observation of the chemical or organic material composition, based on markers concept. In the case of marijuana, in which direct use of parts of the plant, the markers can be identified in the composition of the plant itself, influenced by the plant genotypic characteristics and the environmental conditions to which they are sub-measured during development. Thus, analysis of elemental chemical concentration, stable isotopes analysis ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) and specific genetic markers were performed on *Cannabis* samples collected in different cultivation sites in Brazilian Northeast, samples from plants grown in a controlled environment and police seized samples, in order to identify correctly the cultivation place (trace its origin). The achieved results were processed in the multiple discriminant analysis (MDA). The analysis of elemental chemical concentration and the genetic markers system used to trace the origin of *Cannabis* showed the ability to classify correctly the evaluated samples, according to their cultivation or collection site. On the other hand, the stable isotopes analysis was not suitable for sorting out the samples of *Cannabis* plant tissue, in accordance with their cultivation place in Brazilian Northeast. Therefore, it has verified that analysis of elemental chemical concentration and genotyping by markers system (*multiplex 13 – loci STR*) may be used as markers or indicators to trace out the origin of *Cannabis* samples, even with the required accuracy for police and forensic use.

¹Doctoral thesis in Soil Science – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre (82p) October, 2017.

SUMÁRIO

	Pagina
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1 Ciências forenses e criminalística	6
2.2 <i>Cannabis sativa L.</i> (Maconha)	9
2.3 Rastreabilidade.....	16
2.4 Metodologias utilizadas para a rastreabilidade	19
3 IDENTIFICAÇÃO DA ORIGEM DE <i>Cannabis sativa L.</i> (MACONHA) PELA CONCENTRAÇÃO QUÍMICA ELEMENTAR.....	24
3.1. Introdução	24
3.2. Material e métodos.....	25
3.3. Resultados e discussão	30
3.2.1. Amostras do Nordeste brasileiro.....	30
3.3.2. Amostras do Nordeste versus Amostras cultivadas em vaso	43
3.4. Conclusões	46
4 CAPITULO 3. USO DAS RELAÇÕES ISOTÓPICAS DE $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ E $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ PARA RASTREAR O LOCAL DE CULTIVO DE PLANTAS DE MACONHA NO NORDESTE BRASILEIRO.....	47
4.1. Introdução	47
4.2. Material e métodos.....	49
4.3. Resultados e discussão	51
4.4. Conclusões	54
5 CAPITULO 4. A <i>Cannabis sativa</i> 13-LOCI STR MULTIPLEX SYSTEM TO GENOTYPE BRAZILIAN SEIZURES.....	55
5.1. Introduction	55
5.2. Material and methods.....	57
5.3. Results and discussion	62
5.4. Conclusion.....	72
6 CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS	73
7 REFERENCIAS.....	75

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1. Identificação e localização das amostras coletadas no Nordeste, indicando os pontos de coleta que representam os grupos propostos para a análise estatística.	27
Tabela 2. Teores médios e desvios padrões, entre parêntesis, dos elementos químicos no solo associado às amostras de Cannabis em cada grupo de ponto de coleta e resultados do teste de comparação de média não paramétrico de Kruskal-Wallis para cada um dos elementos comparando o teor no solo. Resultados em negrito, indicam diferenças significativas no teor de elementos no solo a $p < 0,05$. O percentual de amostras de solo corretamente classificado nos grupos de origem foi obtido pela análise discriminante.	32
Tabela 3. Resultado da análise discriminante múltipla para as amostras de solo, mostrando o percentual de classificação correta das amostras para os grupos propostos, a probabilidade média das amostras pertencerem ao grupo definido e o percentual de incerteza na classificação das amostras nos seus devidos grupos.....	33
Tabela 4. Teores médios e desvios padrões, entre parêntesis, dos elementos químicos no solo rizosférico associado às amostras de Cannabis em cada grupo de ponto de coleta e resultados do teste de comparação de média não paramétrico de Kruskal-Wallis para cada um dos elementos comparando o teor no solo rizosférico.....	35
Tabela 5. Resultado da análise discriminante múltipla para as amostras de solo rizosférico, mostrando o percentual de classificação correta das amostras para os grupos propostos, a probabilidade média das amostras pertencerem ao grupo definido e o percentual de incerteza na classificação das amostras nos seus devidos grupos.....	35
Tabela 6. Teores médios e desvios padrões, entre parêntesis, dos elementos químicos no tecido da raiz das plantas de Cannabis em cada grupo de ponto de coleta e resultados do teste de comparação de média não paramétrico de Kruskal-Wallis para cada um dos elementos comparando o teor no solo rizosférico.....	37

Tabela 7. Resultado da análise discriminante múltipla para as amostras de raiz, mostrando o percentual de classificação correta das amostras para os grupos propostos, a probabilidade média das amostras pertencerem ao grupo definido e o percentual de incerteza na classificação das amostras nos seus devidos grupos.....	38
Tabela 8. Teores médios e desvios padrões, entre parêntesis, dos elementos químicos no tecido da parte aérea de plantas de Cannabis em cada grupo de ponto de coleta e resultados do teste de comparação de média não paramétrico de Kruskal-Wallis para cada um dos elementos comparando o teor no tecido das plantas.	40
Tabela 9. Resultado da análise discriminante múltipla para as amostras da parte aérea da planta, mostrando o percentual de classificação correta das amostras para os grupos propostos, a probabilidade média das amostras pertencerem ao grupo definido e o percentual de incerteza na classificação das amostras nos seus devidos grupos.....	42
Tabela 10. Resultado dos passos da análise discriminante com a introdução de um elemento químico, a redução do Wilks' Lambda e aumento no percentual de amostras corretamente classificadas.....	42
Tabela 11. Teores médios e desvios padrões, entre parêntesis, dos elementos químicos no tecido da parte aérea de plantas de Cannabis e resultados do teste de comparação de média não paramétrico de Kruskal-Wallis para cada um dos elementos comparando o teor no tecido das plantas pela análise discriminante.	44
Tabela 12. Resultado da análise discriminante múltipla para as amostras da parte aérea da planta	44
Tabela 13. Resultado dos passos da análise discriminante com a introdução de um elemento químico, a redução do Wilks' Lambda e aumento no percentual de amostras corretamente classificadas.....	45

Tabela 14. Identificação e localização das amostras coletadas no Nordeste, indicando os grupos propostos para a análise estatística.....	50
Tabela 15. Médias e desvios padrões, entre parêntesis, das relações isotópicas no tecido vegetal de plantas de Cannabis e resultados do teste de comparação de média não paramétrico de Kruskal-Wallis para cada uma das relações discriminante.	52
Tabela 16. Resultado da análise discriminante múltipla para as amostras da planta.....	52
Tabela 17. Resultado dos passos da análise discriminante com a introdução de uma relação isotópica, a redução do Wilks' Lambda e aumento no percentual de amostras corretamente classificadas.....	53
Table 18. Characteristics of 13 Cannabis STR markers used in this study based on Houston et al, 2015.....	59
Table 19 Pairwise Nei's genetic distance for the seizure sets based on genotypes of 13 analyzed Cannabis STR loci	66
Table 20. Analysis of Molecular Variance (AMOVA) of 13 analyzed Cannabis STR loci	67
Table 21. List of private alleles for each seizure set of 13 analyzed Cannabis STR loci	68
Table 22. Genetic parameters estimated for all samples (n = 72) based on 13 analyzed Cannabis STR loci.....	69
Table 23 Discriminant Function Analysis (DFA) used to identify the ability of each tracer to distinguish the drug source.	70
Table 24. The Multiple Discriminant Analysis results with the number of samples classify per group, the percentage of samples correctly classified, and the percentage of uncertainty 13 analyzed Cannabis STR loci.....	70
Table 25. Results of the stepwise discriminant function analysis as indicated by the Wilks' Lambda values for the different tracer selected.	71

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama ilustrativo da inter-relação entre as ciências naturais ou puras, as ciências forenses e a criminalística.	8
Figura 2. Aspectos morfológicos da <i>Cannabis sativa</i> L.	11
Figura 3. Estrutura básica dos principais canabinóides	12
Figura 4. Região do polígono da maconha no nordeste brasileiro	13
Figura 5. Vista de uma plantação de <i>Cannabis</i> no nordeste brasileiro.	13
Figura 6. Número de laudos de “semente de maconha” emitidos anualmente pelos setores de criminalística da Polícia Federal. * No ano de 2017 o período é de 01/01/2017 a 30/08/2017.	14
Figura 7. Exemplo de sementes interceptadas pelos correios e encaminhadas para perícia da PF.	15
Figura 8. Imagem de satélite ilustrativa do Google Earth, mostrando a distribuição geográfica dos pontos de coleta das amostras no Nordeste	28
Figura 9. Gráfico de dispersão bidimensional do conjunto de primeiros e segundos coeficientes canônicos (raiz 1 e raiz 2) obtidos a partir da análise de função discriminante para o teor de elementos do solo, de acordo com o ponto coleta ou local de cultivo de <i>Cannabis</i>	33
Figura 10. Gráfico de dispersão bidimensional do conjunto de primeiros e segundos coeficientes canônicos (raiz 1 e raiz 2) obtidos a partir da análise de função discriminante para o teor de elementos do solo rizosférico, de acordo com o ponto coleta ou local de cultivo de <i>Cannabis</i>	36
Figura 11. Gráfico de dispersão bidimensional do conjunto de primeiros e segundos coeficientes canônicos (raiz 1 e raiz 2) obtidos a partir da análise de função discriminante para o teor de elementos da raiz, de acordo com o ponto coleta ou local de cultivo de <i>Cannabis</i>	38
Figura 12. Gráfico de dispersão bidimensional do conjunto dos primeiros e segundos coeficientes canônicos (raiz 1 e raiz 2) obtidos a partir da análise de função discriminante para o teor de elementos da parte aérea de plantas, de acordo com o ponto coleta ou local de cultivo de <i>Cannabis</i>	42

Figura 13. Gráfico de dispersão bidimensional do conjunto dos coeficientes canônicos (raiz 1) obtidos a partir da análise de função discriminante para o teor de elementos da parte aérea de plantas de Cannabis, de acordo com a origem, Nordeste e cultivo em vaso, em função do número da amostra.	45
Figura 14. Gráfico de dispersão bidimensional do conjunto dos primeiros e segundos coeficientes canônicos (raiz 1 e raiz 2) obtidos a partir da análise de função discriminante para a relação isotópica do tecido vegetal de plantas de Cannabis, de acordo com o local de cultivo.....	54
Figure 15. Principal coordinate analysis of the 72 samples based on genotypes of 13 analyzed Cannabis STR loci.....	66
Figure 16. Probability of genotypic identity of two individuals randomly sampled within each set, based on the combination of STR loci (loci 1; loci1+loci2; loci1+loci2+loci3 and so on).....	69
Figure 17. Two-dimensional scatter plot of the first and second discriminant functions from stepwise discriminant function analysis (DFA) according to samples geographical origin.	71

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APR	Amostras de apreensões de maconha prensada realizadas pela Polícia Federal do Rio Grande do Sul
BFP	Brazilian Federal Police
CBD	Canabidiol
CBN	Canabinol
CGPRE	Coordenação Geral de Polícia de Repressão a Entorpecentes
cpSSR	Chloroplast Simple Sequence Repeats
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)
DOU	Diário Oficial da União
DPF	Departamento de Polícia Federal
GC-FID	Gas Chromatography and Flame Ionization Detector
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry
HPLC	High performance liquid chromatography
ICP-MS	Inductively coupled plasma mass spectrometry
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry
IPNI	International Plant Nutrition Institut
ISFG	International Society of Forensic Genetics
ISO	International Organization for Satandardization
MDA	Multiple Discriminat Analysis
MEk	Chernossolo Ebânico - unidade de mapeamento Uruguaiana
mtSSR	Mitochondrial Simple Sequence Repeats
N	Conjunto de amostras coletadas no Nordeste em 2015 e 2017
N15	Amostras coletadas no Nordeste em 2015
N17	Amostras coletadas no Nordeste em 2017

NE	Amostras coletadas no Nordeste
PCoA	Principal Coordinate Analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI	Probability Identity
PF	Polícia Federal
PF	Amostras cultivadas na PF a partir das sementes
PVd	Argissolo Vermelho - unidade de mapeamento São Jerônimo
RUF	Relative Fluorescence Unit
SEM	Amostras das plantas cultivadas em vasos, a partir das sementes
SENAD	Secretaria Nacional Antidrogas
STR	Short Tandem Repeats
SWGDM	Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs
THC	Tetra-hidrocanabinol
THCA	Ácido Tetrahydrocanabinólico – precursor do THC
UNODOC	United Nations Office on Drugs and Crime
USDA	United States Department of Agriculture (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos)
WDR	World Drug Report

1. INTRODUÇÃO GERAL

A repressão ao tráfico de drogas tem sido um dos principais focos de ação da segurança pública nacional e internacional. Além dos problemas de saúde pública causados pelo consumo, soma-se a grande quantidade de crimes associados ou resultantes deste consumo. Os países membros da Organização das Nações Unidas firmaram convenções para o controle de drogas, dentre as quais destacam-se a “Single Convention on Narcotic Drugs”, de 1961, que proíbe a *Cannabis* e a “Convention on Psychotropic Substances, de 1971, que proíbe a substância THC (tetraidrocanabinol). Desde então, estes Estados membros vêm mantendo a determinação no combate à produção e tráfico de drogas. Em 2009, estes, houve novo comprometimento dos países em erradicar ou reduzir significativamente o mercado de drogas ilícitas até 2019, enfatizando que a pesquisa, coleta de dados e análises seriam indispensáveis para se atingir os objetivos desejados (UNODC/WDR, 2013). Os resultados do Relatório Mundial de Drogas de 2013 mostram que a demanda estimada por drogas não reduziu consideravelmente. No entanto, observaram-se alterações nos tipos de drogas oferecidos, com a presença de novas substâncias psicoativas e de drogas diferentes das tradicionalmente controladas e proscritas, nas diversas regiões do planeta.

De acordo com o relatório de 2015, a maconha continua sendo a substância ilícita mais utilizada no mundo, embora tenha havido uma redução no crescimento de usuários de *Cannabis* quando comparado com as previsões de 2009. Além disso, as áreas de plantios de maconha erradicados têm aumentado nos Estados Unidos e nas Américas de maneira geral, o que indica um possível aumento das áreas de cultivo. Na região da América Latina e Caribe, a qual possui a segunda maior quantidade de apreensões de maconha (substância

vegetal) do mundo, atrás da América do Norte, observou-se um aumento destas ações na maioria dos países. Alguns deles, como Bolívia, Colômbia e Paraguai, relataram variação positiva no número de apreensões superior a 100%, quando comparados os períodos de 2002-2006 com 2007-2012.

A estimativa nos níveis globais de produção e cultivo de maconha é de difícil diagnóstico, uma vez que praticamente todos os países do mundo produzem ou podem produzir a planta e, muitas vezes, o mercado consumidor está no próprio local de produção. Além disso, contribuem para esta situação a produção “indoor” em ambientes fechados e controlados (das mais rudimentares às mais tecnificadas) e os recentes processos de liberalização da maconha para uso medicinal ou recreativo, originando a existência de cultivos “legais”. Os esforços dos agentes de segurança pública brasileiros, entre eles a Polícia Federal (Item II do Par. 1º do Art. 144 da Constituição Federal), estão direcionados para o combate do tráfico por meio de investigações baseadas em informação e inteligência. Assim, este órgão realiza regularmente operações para conter traficantes e apreender drogas, e, especificamente com relação à maconha, executa operações policiais de erradicação de cultivos de *Cannabis* em áreas críticas identificadas. Como resultado, a Polícia Federal (PF) apreendeu em 2013 mais de 220 toneladas de maconha, superando as quantidades de 2011 de 174 toneladas e 2012 de 111 toneladas. Ainda em 2013, a Divisão de Repressão à Drogas da PF participou de operações de erradicação de cultivos de *Cannabis* em território paraguaio, onde erradicaram cerca de 1.300 ha de lavoura, o que equivaleria a mais de 4.000 toneladas da droga. Em outra operação para erradicação de cultivos no sertão da Bahia e Pernambuco, a PF erradicou cerca de 800 mil plantas, o que representaria aproximadamente 250 toneladas da droga pronta para consumo (Boletins CGPRE – Coordenação Geral de Polícia de Repressão a Entorpecentes – Junho/2013; Informativo DPF –Outubro/2013).

O tráfico internacional de drogas, especificamente da maconha, tem utilizado outras ramificações, como o despacho via empresas de transporte e logística (correios) de sementes da planta em quantidades reduzidas e endereçadas para centros urbanos. Assim, a atuação dos órgãos de segurança pública no combate ao tráfico de drogas ilícitas como a maconha, envolvendo a retirada da droga pronta, durante seu transporte ou deslocamento aos pontos de

consumo, a identificação e erradicação das plantas nos locais de cultivo, e, mais recentemente, a apreensão de sementes da planta que devem se transformar em droga a ser consumida, mostra a necessidade de planejamento nas ações. Para isso, quanto maior o número de dados e informações relativas à dinâmica das drogas, principalmente aqueles cientificamente comprovados, mais eficientes serão os mecanismos de prevenção e intervenção adotados pela polícia.

A criminalística, entre as suas atribuições, apresenta a função clara de fornecer a prova material existente em determinada situação, objeto ou substância relacionada a um suposto crime, a partir de exames baseados em conhecimento e evidências científicas. Estas informações têm se tornado cada vez mais indispensáveis para a condenação de criminosos no contexto em que a prova material, corretamente fundamentada, seja inquestionável. Deste modo, a ciência associada à criminalística sustenta as decisões judiciais, podendo elucidar casos aparentemente sem solução, principalmente devido às atuais evoluções técnico-científicas. Além do processamento de situações ocorridas, a ciência forense busca informações que podem ser utilizadas na prevenção e investigação de novos crimes. Neste contexto, pode-se citar o *modus operandi* para realização de um roubo, a forma de falsificação de um documento ou a rota de tráfico de drogas utilizada por uma quadrilha. A criminalística deve evoluir nesta direção, contribuindo com a prevenção e a inteligência da segurança pública.

Uma das formas de combater o tráfico de drogas, direcionando as investigações e apontando as possíveis rotas, é a identificação de sua origem pela rastreabilidade. Isso pode ser realizado através da observação da composição química ou orgânica do material, baseando-se no conceito de marcadores. Os setores de perícia da Polícia Federal já têm desenvolvido trabalhos com a finalidade de estabelecer indicadores característicos de determinada droga relacionados ao seu local de produção, processamento ou origem. O principal projeto realizado nesta área é o de determinação do perfil químico da cocaína, envolvendo apreensões desta droga em diferentes locais do país e, aparentemente, provenientes de diferentes origens. No caso da maconha, em que partes da planta são utilizadas como droga, os marcadores podem ser identificados na composição da própria planta. Com isso, estes

marcadores seriam influenciados basicamente pelas características genotípicas das plantas (FISCHEDICK et al., 2010) e pelas condições ambientais a que estas estão submetidas durante o desenvolvimento.

A possibilidade de identificar a origem de drogas apreendidas e, conseqüentemente, de traçar rotas de deslocamento e distribuição dos entorpecentes é uma informação valiosa na investigação e combate ao tráfico. Isso poderia direcionar a busca pelas lavouras de produção no caso da *Cannabis* em um país de grandes dimensões como o Brasil, as quais são muitas vezes camufladas em pequenos talhões. Além disso, o desenvolvimento de metodologia científica, capaz de configurar como prova pericial, a origem de determinado entorpecente apreendido, relacionando o produto a sua área física de produção, poderia trazer desdobramentos legais, tais como o confisco de terras utilizadas com o tráfico (Parágrafo Único do Art. 243 da Constituição Federal), que restituiria parte das perdas sofridas pela sociedade legalmente estabelecida. A crescente demanda pela identificação de sementes de maconha, endereçadas a centros urbanos brasileiros, provavelmente para cultivos caseiros, mostram uma nova tendência de distribuição e cultivo desta droga que também deverá chegar ao consumidor em algum tempo. A utilização de marcadores/indicadores também teria condições de identificar este tipo de produção, direcionando e auxiliando a investigação no combate a esta forma de cultivo que pode contribuir com volumes consideráveis do produto, como já ocorre em outras regiões mundo.

De acordo com contexto apresentado, este estudo tem como diretrizes gerais as seguintes hipóteses: (a) existe relação entre as características do local e do ambiente de cultivo da *Cannabis* com suas respectivas estruturas vegetais, que possam ser identificadas por diferentes análises químicas e moleculares; e (b) a realização de análises, por métodos químicos e moleculares, em amostras de solo e planta de *Cannabis*, provenientes de locais distintos conhecidos, é capaz de gerar resultados que possibilitem identificar corretamente o local de cultivo (rastrear sua origem). Para isso, foram desenvolvidos os seguintes objetivos: (a) coletar amostras de solo e planta de *Cannabis* de locais conhecidos; (b) realizar análises químicas e moleculares do material amostrado; (c) processar estatisticamente os resultados obtidos, visando agrupar as amostras de acordo com o local de coleta/cultivo;

(d) identificar a origem de amostras de *Cannabis* a partir das análises realizadas (rastreabilidade).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ciências forenses e criminalística

As ciências forenses surgiram a partir das contribuições da medicina à justiça, tendo desenvolvido técnicas específicas às demandas legais, decorrentes dos crimes contra a vida. Este conhecimento é o que atualmente se denomina “medicina legal”, com atuação restrita aos profissionais identificados como médicos legistas. Em um segundo momento, estes mesmos especialistas desenvolveram técnicas relacionadas à interpretação do local de crime, à balística para compreender a ação do projétil disparado por arma de fogo com o corpo humano, às formas de identificação humana, além de outras análises químicas, físicas e biológicas (VELHO et al., 2012).

A necessidade de outros conhecimentos aplicados para responder às demandas legais foi ocasionando a inserção das mais variadas formações técnicas no contexto forense. Assim, surgiu o conceito de Criminalística, utilizado pela primeira vez pelo juiz de instrução alemão Hans Gross, no livro *System der Kriminalistik* de 1893, a fim de abrigar todas as técnicas científicas a serviço da lei (VELHO et al., 2012). No Brasil, somente durante o I Congresso Nacional de Polícia Técnica em São Paulo, no ano de 1947, foi adotada a denominação Criminalística, tendo sido acatada a denominação proposta por Del Picchia, descrita como: “*Criminalística é a disciplina que tem por objetivo o reconhecimento e interpretação dos indícios materiais extrínsecos, relativos ao crime ou à identidade do criminoso*” (VELHO et al., 2012).

Seguindo esta mesma conceituação, Del Picchia considerou que os *vestígios intrínsecos*, ou seja, na pessoa, seriam de responsabilidade da medicina-legal. Isso trouxe uma divisão evidente entre as técnicas utilizadas pela criminalística e a atuação da medicina-legal, como se esta forma de tratamento

dos vestígios fosse possível em todos os cenários. Esta cisão pode ser uma das responsáveis pela dificuldade no desenvolvimento e crescimento das ciências forenses no país (VELHO et al., 2012)

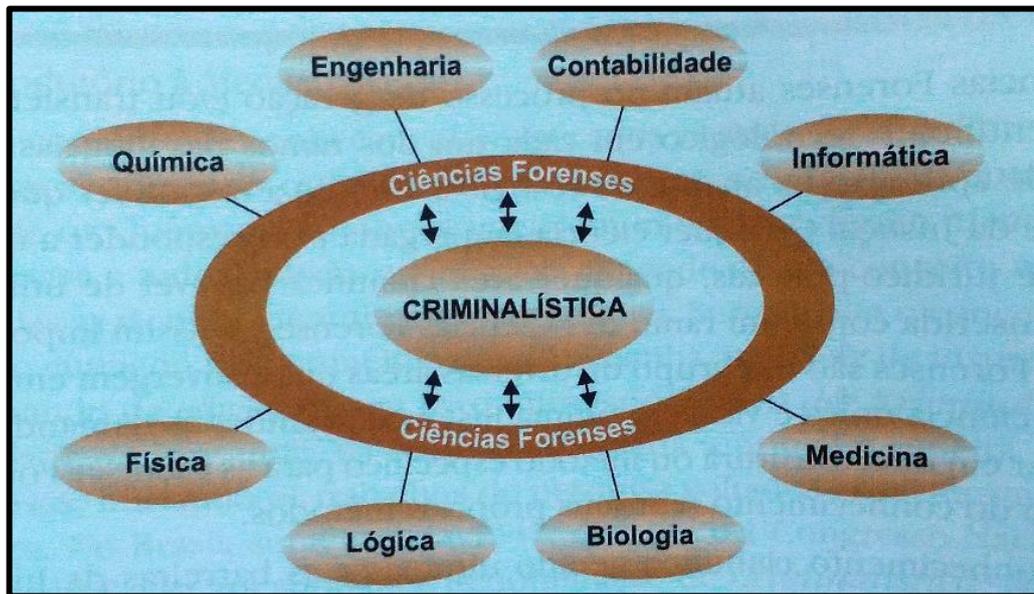
Na formação da Criminalística, inicialmente se destacaram os conhecimentos químicos, que foram sucedidos por área associadas à biologia, à física, às engenharias, à contabilidade, à informática, entre outras. Nota-se que a criminalística seria a reunião de diversos ramos do conhecimento, a serem utilizados de forma aplicada, sistematizada e com regras precisas, para servir os interesses da justiça. Dessa forma, há uma inter-relação entre o desenvolvimento das ciências naturais com alguma forma de aplicação no sistema judiciário e a racionalização deste conhecimento, com métodos e técnicas, a fim de responder questões específicas formuladas pela justiça.

Considerando a conceituação dos termos ciência e forense de forma isolada, de acordo com o descrito por Velho et. al. (2012), as ciências forenses, de uma maneira simplificada, podem ser entendidas como as ciências naturais aplicadas à análise de vestígios, no intuito de responder às demandas judiciais. A criminalística, por sua vez, seguindo o conceito de Hans Gross em 1893 e de Gilberto Porto no Manual de Criminalística de 1953, seria a forma sistematizada e com regras precisas do uso de técnicas e metodologias de diferentes ciências para servir e responder à Justiça.

Nota-se, com isso, a inter-relação existente entre o desenvolvimento da ciência forense e sua aplicação pela criminalística no atendimento de demandas específicas da justiça. Embora os peritos tenham autonomia para utilizarem as técnicas científicas que considerarem mais adequadas para atendimento de suas demandas, é usual, e até mesmo recomendado, que sejam utilizados os procedimentos de técnicas testadas e consagradas para cada caso, sempre que existentes. O avanço destas técnicas, a criação e a implementação de novos procedimentos, inclusive para aquelas situações ainda não atendidas, seriam a linha de atuação das ciências forenses. Como consequência, as novas metodologias desenvolvidas com sucesso seriam aplicadas em campo para as análises de vestígios e exames realizados pelos peritos.

A figura 2.1 mostra um diagrama ilustrativo da inter-relação entre as ciências naturais ou puras, as ciências forenses e a criminalística. As diversas áreas das ciências contribuem com conhecimentos específicos para as ciências

forenses que, por sua vez, abastecem o sistema de criminalística com métodos, parâmetros ou técnicas para responder as demandas específicas da justiça.



VELHO et al., 2012

Figura 1. Diagrama ilustrativo da inter-relação entre as ciências naturais ou puras, as ciências forenses e a criminalística.

Com o desenvolvimento das tecnologias em todas as áreas de conhecimento e a especialização jurídica na capacidade de questionamento das provas, a justiça necessita, cada vez mais, embasar suas decisões em provas técnicas. Com isso, a perícia, apoiada em técnicas forenses testadas e comprovadas cientificamente, tem papel fundamental no desfecho dos processos judiciais. Como consequência, as metodologias utilizadas na realização dos exames periciais passam a ser um novo foco de contestação nos processos, inclusive com a atuação de diferentes peritos ou assistentes técnicos indicados pelas partes.

Este processo, é importante para mostrar possíveis falhas em exames periciais e estimular o desenvolvimento de técnicas com a menor possibilidade de erro associado. Quando determinado exame pericial não é suficiente para apresentar um resultado conclusivo, levando ao descarte de provas, é necessária sua adequação, evolução ou criação de novas formas de análises. Para isso, a pesquisa científica precisa estar associada, como uma maneira de aplicar o conhecimento de forma sistematizada e contínua às demandas apresentadas no contexto forense.

Dessa forma, nota-se que as técnicas periciais não são estáticas, mas

estão em constante desenvolvimento e baseadas em pesquisa científica. Com a implementação do exame de DNA, por exemplo, obteve-se uma prova irrefutável quanto à presença de um suspeito em local de crime ou à paternidade de um indivíduo. É este nível de confiabilidade que os exames periciais ou as análises de amostras forenses precisam ter como meta, de maneira que os vestígios possam ser considerados provas inquestionáveis. E, conseqüentemente, os juízes tenham condições de formar suas convicções e apresentar as sentenças com a menor quantidade de elementos subjetivos possível. No caso das drogas de abuso, inclusive a maconha, existe grande preocupação no enquadramento dos portadores das substâncias como usuários ou traficantes, o que pode ser apresentado pelo trabalho policial, contando com metodologias que auxiliem e direcionem para o combate ao tráfico.

2.2 *Cannabis sativa* L. (Maconha)

A *Cannabis sativa* L. (maconha) é uma planta herbácea da família das Canabiáceas (Cannabaceae), amplamente cultivada em muitas partes do mundo. Os primeiros registros de seu uso como fonte de fibras e grãos datam de cerca de 12.000 anos atrás, na Ásia Central (SMALL, 2002; PAIN, 2015). Os chineses foram os responsáveis pelo desenvolvimento de diferentes formas de uso da planta, desde o uso da fibra para fabricação de artefatos, até seu emprego na alimentação e uso recreacional (ZUARDI, 2006; BALBINO, 2014).

A espécie foi introduzida na Ásia, Egito e Europa Ocidental por volta de 500 d.C., tendo o seu cultivo se desenvolvido exclusivamente para produção de fibras. Os colonizadores espanhóis, na América do Sul, e os colonos ingleses, na América do Norte, introduziram a planta também para produção de fibras, entre os séculos XVI e XVII (ZUARDI, 2006; SMALL, 2002; PAIN, 2015). No Brasil, acredita-se que a *Cannabis* tenha chegado simultaneamente com sua descoberta, trazida pelos portugueses e escravos africanos durante a colonização. O uso recreativo da planta se disseminou inicialmente entre os escravos negros, sendo posteriormente adotado pelos índios, os quais passaram a cultivar a espécie em terras brasileiras (CARLINI, 2006; BALBINO, 2014).

Taxonomicamente, existem discussões quanto à classificação botânica da maconha (SMALL, 1976; VAN BAKEL et al., 2011; GLOSS, 2015; SMALL, 2015; SAWLER et al., 2015), desde a sua apresentação inicial pelo

botânico sueco Carolus Linnaeus (Carl Von Linné). Entretanto, o Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (UNODC) considera que a planta possui apenas uma espécie reconhecida, a *Cannabis sativa* L. (Linnaeus). Outras espécies associadas ao gênero, tais como *C. sativa* subsp. *sativa*, *C. sativa* subsp. *indica*, *C. sativa* subsp. *ruderalis*, *C. sativa* subsp. *spontanea*, *C. sativa* subsp. *Kafiristanca*, bem como híbridos originados de cruzamentos, são considerados subespécies. A classificação botânica, segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) é a seguinte (2017): Nome da espécie: *Cannabis sativa* L.; Reino: Plantae (planta); Subreino: Tracheobionta (planta vascular); Subdivisão: Spermatophyta (planta com sementes); Divisão: Magnoliophyta (planta com flores); Classe: Magnoliopsida (Dicotiledônea); Subclasse: Hamamelididae; Ordem: Urticales; Família: Cannabaceae; Gênero: *Cannabis* L.; Espécie: *Cannabis sativa* L.; Subespécies: *sativa*, *indica*, *ruderalis*, *spontanea*

A *Cannabis* é uma planta angiosperma, dicotiledônea, anual e geralmente dioica, com flores macho e fêmea em indivíduos separados. Existem também exemplares de plantas monoicas, com flores de ambos os sexos no mesmo indivíduo. Seus frutos, comumente identificados como sementes, são pequenas nozes secas, denominados de aquênio (figura 2.2). A princípio, estas plantas podem crescer em qualquer tipo de solo, até mesmo nos menos férteis, e apresentam, no mínimo, quatro estágios de desenvolvimento bem definidos desde a semente, que são: germinação e estabelecimento; desenvolvimento vegetativo; floração e frutificação; e senescência. Cada um dos estágios requer condições ambientais, principalmente de espaço, iluminação (fotoperíodo), disponibilidade de água e nutrição, adequadas para o desenvolvimento da planta (MCCARTHY, 2011).

Em áreas a céu aberto e com iluminação solar abundante, solos bem drenados e bem irrigados, a *Cannabis* pode atingir até seis metros de altura durante quatro a seis meses de crescimento. Nos ambientes fechados, e com alterações no fotoperíodo, o florescimento pode ser estimulado antes do completo ciclo vegetativo. A planta é extremamente adaptada e influenciada pelas condições ambientais a que está submetida, podendo alterar sua composição química e a proporção entre seus componentes, inclusive o THC (UNODC/WDR, 2013).

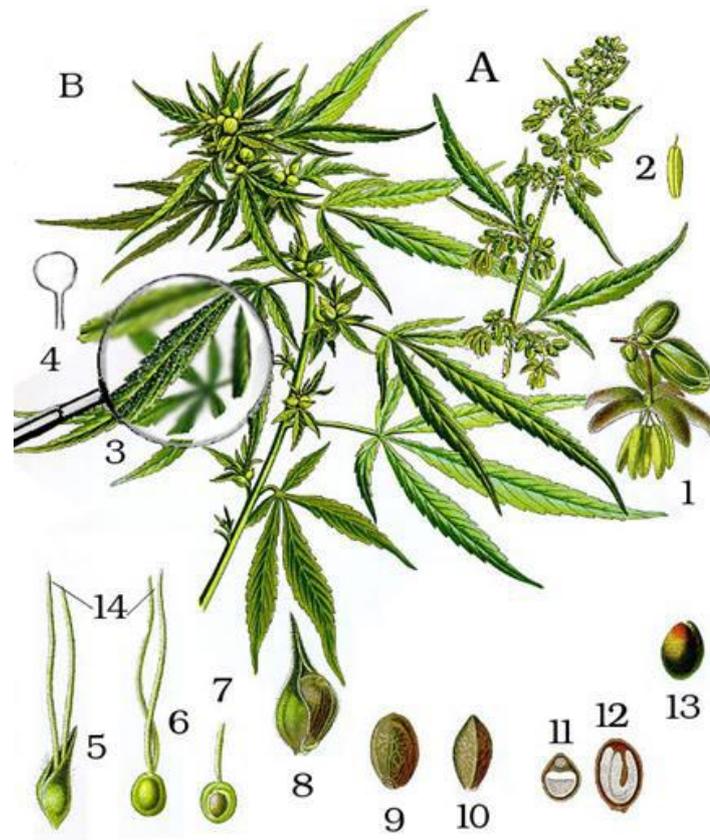


Figura 2. Aspectos morfológicos da *Cannabis sativa* L. A - florescimento da planta do sexo masculino; B - florescimento da planta do sexo feminino; 1 - conjunto de flor da planta do sexo masculino (detalhe ampliado); 2 - flor da planta do sexo masculino: estame (antera e filamento curto); 3 - folha da planta do sexo feminino coberta por tricomas (detalhe ampliado); 4 – desenho ilustrativo de um tricoma; 5 - flor da planta do sexo feminino: pistilo com bráctea; 6 - flor da planta do sexo feminino: pistilo sem bráctea; 7 - flor da planta do sexo feminino: pistilo mostrando ovário (secção longitudinal); 8 - semente (aquênio: semente única com bráctea); 9 - semente sem bráctea; 10 - semente, vista lateral; 11 - semente, secção transversal; 12 - semente, seção longitudinal; 13 - semente sem pericarpo (descascada); 14 - estilos (adaptado de UNODOC, 2009).

As folhas são finamente recortadas em segmentos lineares; as flores, unissexuais e inconspícuas, possuem pelos com glândulas nas femininas, denominados tricomas, que segregam uma resina rica em canabinoides e terpenos; o caule possui fibras industrialmente importantes, conhecidas como cânhamo; e a resina tem propriedades psicoativas. Por estas características, é considerada uma planta “medicinal”, cuja composição fitoquímica tem sido estudada, principalmente em relação aos seus compostos canabinoides, especificamente sintetizados pela planta, que se destacam pelas suas características e propriedades.

Neste grupo de compostos, os mais representativos são os tetraidrocanabinóis (THCs), os canabidióis (CBDs) e os canabinóis (CBNs), cujas estruturas básicas estão apresentadas na figura 2.3. Tais compostos atuam como analgésico, anódino, antiemético, antiespasmódico, calmante do sistema nervoso, embriagador, estomático, narcótico, sedativo, tônico, etc (THAKUR et al., 2005). Entre os efeitos relacionados à intoxicação de THC pelo consumo de *Cannabis*, o mais comum é a taquicardia que pode durar por várias horas e pode ser particularmente prejudicial a pessoas que sofrem de problemas cardíacos. O uso da maconha também tem sido associado ao desencadeamento ou intensificação de alterações psiquiátricas específicas como transtorno bipolar e depressão (SANCHES & MARQUES, 2010) e às deficiências no desempenho de atividades produtivas com o uso crônico da droga tais como limitações na capacidade de abstração, formação de conceitos e flexibilidade mental (ALMEIDA et al., 2008).

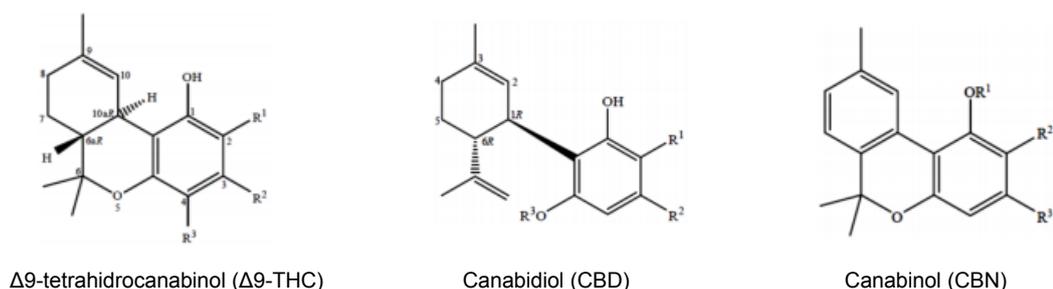


Figura 3. Estrutura básica dos principais canabinóides

A maconha produzida em maiores quantidades no Brasil está localizada em áreas das regiões Norte e Nordeste, especialmente nas margens e em ilhas do Rio São Francisco, na região conhecida como “polígono da maconha” (figura 2.4). Nestas áreas, o cultivo se dá essencialmente de forma artesanal, em pequenas extensões de terras, com adubação e irrigação manual, sem a adoção de práticas agrônômicas. Raramente são observadas lavouras com áreas superiores a 1 ha (figura 2.5), ou com algum sistema de irrigação envolvendo encanamento e mangueiras de gotejamento. As sementes, utilizadas para a formação de mudas nas sementeiras, são obtidas diretamente das plantas cultivadas anteriormente na região. Quando atingem cerca de 15 a 20 cm de altura na sementeira, as mudas são transplantadas para as covas definitivas na lavoura, sendo estabelecida de duas a quatro plantas por cova.

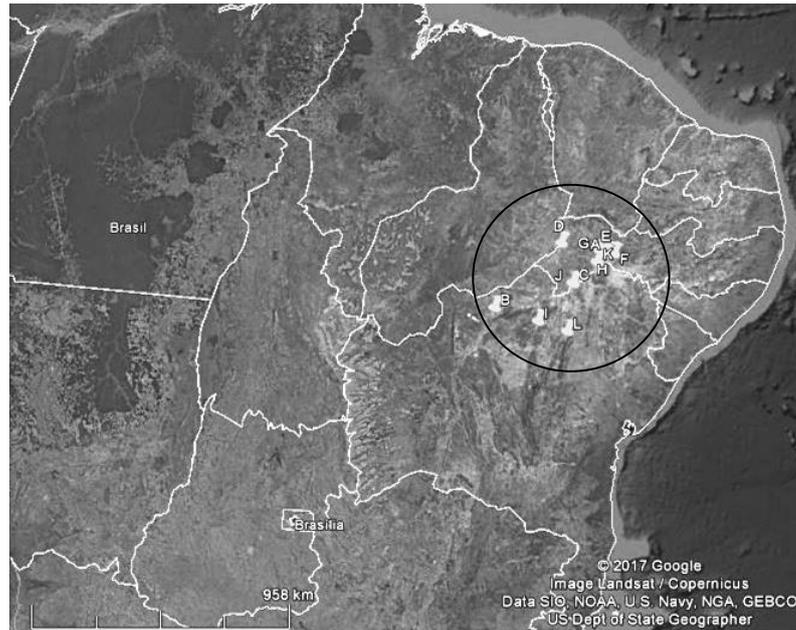


Figura 4. Região do polígono da maconha no NE do Brasil/

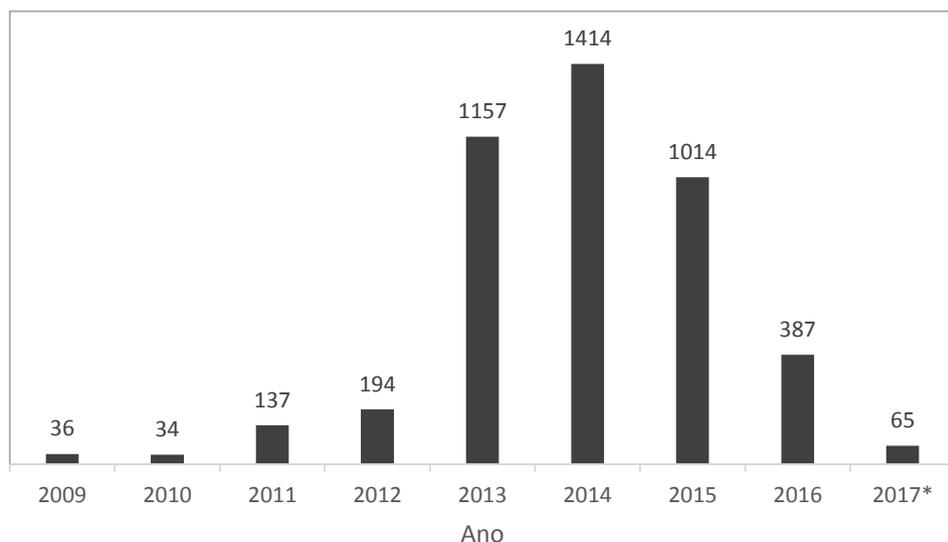


Figura 5. Vista de uma plantação de *Cannabis* no nordeste brasileiro.

Outra provável e crescente forma de cultivo da *Cannabis* no Brasil é em ambientes fechados ou residências, em vasos com solo ou substratos inertes, a partir sementes adquiridas no exterior pela internet, que chegam aos destinatários como encomendas simples entregues pelos correios. Isto é verificado pela constante interceptação deste tipo de produto proveniente do exterior pelas centrais dos correios, que são encaminhadas para perícia da PF.

O número de Laudos de “sementes de maconha” emitidos pelos setores de criminalística da PF no Brasil corrobora com este contexto (figura 2.6), em que parte da maconha consumida no país pode ser produzida de forma caseira, a partir de sementes selecionadas oriundas de empresas estrangeiras especializadas, tais como “Royal Queen Seeds” e “Paradise Seeds” (Figura 2.7). Neste caso, as formas de manejo do cultivo nos ambientes fechados, embora também sejam artesanais e manuais, não devem seguir um padrão específico.

A redução de laudos referentes a sementes de maconha emitidos nos últimos anos, não está diretamente relacionada com a diminuição desta forma de obtenção da droga. Isso ocorre, devido a novas interpretações da lei sobre drogas (Lei nº 11.343/2006, especialmente no art. 42), quanto ao enquadramento desta ação como tráfico internacional de drogas, o que exigira a instauração de Inquérito Policial Federal e laudo oficial da Perícia Federal. Quantidades consideradas menores de sementes apreendidas, com base em estudos inclusive de peritos criminais federais (ORTIZ et al., 2015), estão sendo desqualificados como tráfico pela Procuradoria-Geral da República, passando a ser identificados como contrabando (até 14 sementes foram desqualificadas), quando ainda são desconsiderados pelo princípio da insignificância (Parecer nº 795/2017 – LCFF da Procuradoria-Geral da República – Ministério Público Federal).



*01/01/2017 a 30/08/2017.

Figura 6. Número de laudos de “semente de maconha” emitidos anualmente pelos setores de criminalística da Polícia Federal. Fonte (PF, 2017)



Figura 7. Exemplo de sementes interceptadas pelos correios e encaminhadas para perícia da PF.

Quanto ao enquadramento da maconha como droga, segundo a descrição do artigo 1º, Parágrafo Único, da Lei 11.343/06, o tetraidrocannabinol (THC) é citado na lista F2 de substâncias de uso proscrito no Brasil, sendo uma substância psicotrópica que pode determinar dependência física ou psíquica. Além disso, a *Cannabis sativa* L. se encontra relacionada na lista E de plantas que podem originar substâncias entorpecentes e/ou psicotrópicas, de acordo com a Portaria nº 344, de 12/05/98, da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, republicada no D.O.U. em 01/02/99, estando inserida em sua atualização vigente. A Portaria nº 344 de 1998, apresentou o Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamento sujeitos a controle especial no Brasil, detalhando, em capítulos, itens relativos à autorização, comércio, transporte, prescrição e listas de todas as substâncias psicotrópicas e entorpecentes proscritas no país.

Em maio de 2015 (Brasil, 2015b), foi publicada a Portaria foi atualizada pela Resolução RDC nº 17 que “Define os critérios e os procedimentos para a importação, em caráter de excepcionalidade, de produto à base de Canabidiol em associação com outros canabinoides, por pessoa física, para uso próprio, mediante prescrição de profissional legalmente habilitado, para tratamento de saúde”, viabilizando a utilização de medicamentos à base de canabidiol. A RDC nº 66/2016 (Brasil, 2016) trouxe evoluções neste tema, fazendo um adendo em cumprimento a uma decisão judicial do Ministério Público Federal que permite a prescrição médica e a importação, por pessoa física, de produtos farmacêuticos que contenham as substâncias CBD e THC em sua formulação, exclusivamente para uso pessoal e tratamento de saúde. A última atualização da Portaria 344 da ANVISA foi a Resolução RDC nº 175 de setembro

de 2017 que atualiza o anexo I (lista de substâncias entorpecentes, psicotrópicas, precursoras e outras, sob controle especial).

A maconha continua sendo tratada como droga ilícita que deve ter sua comercialização e consumo combatidos pela polícia, como se presume por suas atribuições. As Nações Unidas consideram que a *Cannabis* é uma droga que tem se tornado cada vez mais problemática, em oposição à crença de que ela seja uma droga pouco perigosa. Neste caso, os efeitos mais prováveis relacionados ao uso da *Cannabis* seriam a dependência, o aumento na ocorrência de acidentes de veículos automotores, o comprometimento da função respiratória, os problemas cardiovasculares e os efeitos adversos no desenvolvimento psicossocial e saúde mental no uso regular por adolescentes (UNODC, 2010).

2.3 Rastreabilidade

A rastreabilidade pode ser definida, de maneira ampla, conforme apresentado pela International Organization for Standardization, na ISO 9000, de 2000, como sendo a "habilidade de rastrear a história, uso ou destino de algo". A Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, aplicando à produção de alimentos, define a rastreabilidade como o conjunto de procedimentos que permite detectar a origem e acompanhar a movimentação de um produto ao longo das etapas da cadeia produtiva, mediante dados e registros de informações.

A norma ISO 22005, em 2007, também tratou da rastreabilidade especificamente na cadeia de alimentos. Neste documento, surgiram os conceitos de "tracking", que seria a capacidade de seguir uma unidade específica de produto na cadeia de alimentos (rastrear a jusante), e de "tracing", que seria a possibilidade de identificar a origem de um produto no conjunto de fornecedores, seguindo os registros efetuados (rastrear a montante).

A implementação de processos na produção agropecuária e de alimentos que permitam rastrear os produtos, na forma com que os conceitos são apresentados, não se trata de uma tarefa simples. As diversas culturas e criações possuem procedimentos e características de produção específicas, bem como diferentes formas de produção e níveis tecnológicos para um mesmo produto. Soma-se a isso, as diferenças tecnológicas existentes no processamento e na organização e controle da distribuição e comercialização.

Assim, são identificados pontos chave para se manter registros e controle em todas as etapas da cadeia produtiva, a fim de atender a necessidade de se saber a origem dos alimentos oferecidos ao consumidor final ou para qual estabelecimento comercial seguiram os produtos (COCHON & LOPES, 2012).

A evolução dos procedimentos de controle e registros nas etapas de produção e processamento de determinados produtos levou à padronização e identificação de atributos peculiares nas atividades realizadas e na mercadoria resultante. Estas particularidades, associadas a aspectos reconhecidos como positivos pelo consumidor, tais como produção orgânica, produto de pequenos produtores, produção artesanal ou locais de cultivo que conferem características de melhor sabor ou compostos diferenciados benéficos à saúde, apareceram como uma oportunidade de agregação de valor ao produto. Dessa forma, o conjunto de produtores relacionado a cada tipo de produto considerado diferenciado tratou de identificar estas características com selos e certificações que somente podem ser estabelecidas e confirmadas com os registros exigidos pela rastreabilidade.

No judiciário, especialmente no processo penal e, de maneira extensiva, nos exames forenses, a rastreabilidade é representada pela Cadeia de Custódia das provas materiais. O conceito de Cadeia de Custódia das provas pode ser expresso como o registro documentado de toda a cronologia da posse, movimentação, localização e armazenamento do material probatório (GALON, 2017). Assim, todos os procedimentos que contribuem para a rastreabilidade das provas como o reconhecimento, fixação, coleta, acondicionamento, transporte, recebimento, processamento, armazenamento e descarte, bem como as pessoas envolvidas nos registros de cada etapa ou alteração, integram a Cadeia de Custódia (LOPES et al., 2006; EDINGER, 2016). Neste contexto, nota-se que, embora a prova material e o resultado dos exames obtidos por exames apropriados pela perícia tenha relevância cada vez mais importante no conjunto probatório apreciado pelos juízes, este trabalho pode ser totalmente descartado, caso haja quebra ou desconfiança quanto à Cadeia de Custódia.

O conceito de rastreabilidade também pode ser utilizado para produtos em que não se tem registros ou controle nas suas etapas de produção, bem como quando se suspeita das informações existentes. Trata-se de buscar rastrear a origem de um produto, a partir de características, marcas e padrões

similares ou divergentes presentes na própria mercadoria. Esta técnica vem sendo utilizada para identificar fraudes em produtos com origem certificada através de análises comparativas entre produtos de origem comprovada com aqueles suspeitos, que vem adotando o selo de certificação para se beneficiar economicamente (KMENT et al., 2005; GIACOMO et al., 2007).

Nas ciências forenses, esta técnica vem sendo adotada, especialmente por intermédio de análises realizadas em drogas e medicamentos falsificados, a fim de agrupar apreensões de acordo com suas características. Esse processo, pode levar à conclusão de que determinados produtos (drogas ou medicamentos) apreendidos foram disponibilizados por um mesmo fornecedor, indicando rotas de tráfico ou contrabando e até mesmo a origem (HURTADO & LASMAR, 2014). No caso da *Cannabis*, por ser uma droga consumida praticamente “in natura”, ou seja, as próprias partes da planta são comercializadas para uso como substância psicotrópica, espera-se que seja possível rastrear a sua origem até o local de cultivo, de acordo com análises que indiquem diferenças em propriedades das plantas influenciadas pelo ambiente de plantio (solo, luminosidade, temperatura, etc.).

Os setores de perícia da Polícia Federal já têm desenvolvido trabalhos com a finalidade de estabelecer indicadores característicos de determinada droga relacionados ao seu local de produção, processamento ou origem. O principal projeto realizado nesta área é o de determinação do perfil químico da cocaína, envolvendo apreensões desta droga em diferentes locais do país e, aparentemente, provenientes de diferentes origens (SILVA JUNIOR et al., 2012; ZACCA; et al., 2014; BOTELHO et al., 2014; MARCELO et al., 2015; MALDANER et al., 2015; MALDANER et al., 2016).

As análises realizadas para estabelecer a rastreabilidade da maconha demanda que os marcadores/indicadores identificados sejam avaliados em conjunto para aumentar a exatidão dos resultados. O critério para a escolha de um marcador/indicador para a rastreabilidade vegetal da maconha deve levar em consideração: a) sua utilidade em definir e identificar procedência; b) sua habilidade em integrar propriedades químicas, físicas e biológicas; c) sua sensibilidade para detectar variações no ambiente, manejo e no clima (UNODC, 2013). Na definição de um indicador, devem-se considerar também alguns aspectos como: a) simplicidade e facilidade de medição; b) aplicabilidade em

todas as escalas; c) capacidade de predição e extrapolação; d) versatilidade; e) simplicidade de análise e de interpretação; f) relevância para a criminalística; g) adequação a processos e condições de avaliação (BARBOZA, 2011).

Depois de elegidos os possíveis marcadores/indicadores a serem utilizados para inferir rastreabilidade, é necessário estabelecer relações quantitativas daqueles com os processos de identificação e de procedência do material vegetal e do ambiente de coleta. Com essas relações bem definidas, é possível calibrar os indicadores com eventos ou situações específicas e estabelecer níveis críticos de reconhecimento e identificação do material. Isso deverá nortear a tomada de decisão em função da exatidão requerida na identificação e utilização dos resultados obtidos (COCHON & LOPES, 2012).

Os dados e informações obtidos, com relação aos níveis críticos de marcadores/indicadores da rastreabilidade da maconha, deverão ser combinados na forma de índices (conjunto de indicadores) ou de grupos de índices. Estes índices possibilitam avaliar, de forma mais consistente e abrangente, a eficiência do método de rastreabilidade proposto. As principais possibilidades de desenvolvimento de índices de rastreabilidade vegetal estão baseadas na utilização de métodos estatísticos paramétricos e não paramétricos (HAIR JR et al, 2009).

2.4 Metodologias utilizadas para a rastreabilidade

A possibilidade de relacionar produtos ou subprodutos vegetais com seus locais, regiões ou ambientes de origem, através de diferentes análises químicas, físicas ou biológicas, é apresentada por diferentes métodos em estudos científicos. Estes trabalhos têm visado, especialmente, confirmar os atributos de qualidade e vantagens comerciais de produtos com certificados de origem. Almeida e Vasconcelos (2003), bem como Kment et al. (2005), buscaram identificar marcadores para vinhos, baseados inclusive na composição dos solos, para determinar e confirmar certificação de origem. Trabalho semelhante para determinar origem geográfica de cultivares de batata através de elementos minerais traço foi desenvolvido por Giacomo et al. (2007). Estes estudos se baseiam em análises por espectrometria de massas com fonte de plasma induzido acoplada (ICP-MS – Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry), associado à análise estatística multivariada.

A identificação de marcadores capazes de classificar amostras de *Cannabis sativa* L. (maconha), bem como o seu local de produção, está sendo desenvolvida por diversos pesquisadores. Both et al. (2010) usaram marcadores isotópicos para buscar a origem e a forma (indoor e outdoor) de produção da maconha apreendida no Alasca com resultados promissores. A tentativa de buscar marcadores metabólicos, a partir das quantidades de canabinóides e terpenóides presentes nas plantas de *Cannabis* (maconha), foi desenvolvida por Fishedick et al. (2010). Estes estudos têm a finalidade de agrupar amostras de drogas apreendidas de acordo com a presença e quantidades de determinados componentes.

De acordo com o documento da United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC, 2009) das Nações Unidas, os métodos recomendados para a identificação e análise da *Cannabis* e seus produtos são classificados em: métodos físicos, métodos químicos e outros métodos. O exame físico seria em relação às características morfológicas, no caso de espécies herbáceas. A avaliação envolveria a análise das características macroscópicas morfológicas como tipo de flores, folhas e frutos, bem como a cor a elas associada que pode ser indicadora do ambiente e condições de cultivo. Características microscópicas, como as estruturas tricômicas glandulares e não glandulares (cistolíticos e não cistolíticos) presentes na superfície do tecido vegetal, especialmente das flores e relacionadas à produção de canabinoides e terpenos, também seriam avaliadas. Entretanto, o exame desse tipo de características, notadamente as macroscópicas, necessitaria de plantas com suas estruturas inteiras e íntegras. Como a quase totalidade das apreensões da *Cannabis* como droga, se apresenta de forma prensada, exames físicos não foram contemplados neste estudo.

Para os outros métodos citados, existem diversos relatos de uso científico reconhecido da rastreabilidade, entre eles: os perfis gênicos, o uso de radioisótopos, a análise mineralógica, entre outros. Na análise química, o principal indicador avaliado é o teor de THC (total THC: THC e THCA após descarboxilação), o qual pode ser determinado por meio de testes presuntivos (imunologia, espectrometria iônica de mobilidade e por cromatografia de camada fina) ou por equipamentos analíticos como a cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (GC-FID), por cromatografia gasosa acoplada ao

espectrômetro de massa (GC-MS) e por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Para a classificação quimiométrica e para o estabelecimento de padrões de referência, a técnica de GC-FID pode ser utilizada na tentativa de associar plantas com mesma idade, fenótipo e condições de cultivo.

Em relação aos métodos moleculares (DNA), a identificação da origem geográfica de plantas tem sido realizada utilizando-se diferentes tipos de marcadores genéticos, variando em seu grau de confiabilidade, custos e necessidades laboratoriais. Estudos forenses geralmente contam com pequena quantidade de material e de baixa qualidade para análises genéticas e o desenvolvimento de técnicas confiáveis é essencial. Estudos genéticos de *Cannabis* têm sido desenvolvidos com marcadores RAPD (JAGADISH et al. 1996), microssatélites (ALGHANIM & ALMIRALL, 2003) e DNA organelar (GILMORE et al., 2007, RIBEIRO et al., 2013), visando a identificação geográfica de plantas.

Marcadores RAPD apresentam a vantagem de serem facilmente obtidos em laboratório, porém são altamente sensíveis a variáveis como reagentes e equipamentos utilizados, apresentando problemas quanto à reprodutibilidade dos padrões de bandas, sendo assim pouco indicados para estudos forenses. Microssatélites apresentam alta reprodutibilidade e polimorfismo, sendo indicados para análises de diversidade genética populacional, mas não sendo muito informativos com relação à origem geográfica de indivíduos. Marcadores baseados na sequência de regiões plastidiais têm sido adotados para análises que objetivem a identificação da origem geográfica de plantas, permitindo o desenvolvimento de códigos de barra genéticos (DNA barcode). Com relação a plantas de *Cannabis* apreendidas no Brasil, sequências do gene *rbcl* foram empregadas por Ribeiro et al. (2013), visando a identificação da espécie, e encontrar haplótipos em *Cannabis sativa*, apreendidas no Estado do Rio de Janeiro. Esse estudo possibilitou identificar três haplótipos distintos, diferenciando amostras do Rio de Janeiro, da China e Estados Unidos/Reino Unido. Contudo, plantas de origem asiática têm sido identificadas como *Cannabis indica* por alguns autores (GILMORE et al. 2007) e, nesse caso, a identificação não estaria relacionada à origem geográfica, mas sim a subespécies distintas, mesmo que geneticamente relacionadas. Gilmore

et al. (2013) empregaram regiões inter-gênicas e microssatélites de cloroplastos (cpSSR) e mitocôndrias (mtSSR) para a identificação de uma ampla gama de variedades de *C. sativa* de diferentes regiões do mundo e demonstraram o potencial destas sequências de DNA em uma perspectiva forense de identificação biogeográfica das amostras.

Outro método molecular que vem sendo utilizado com resultados promissores, é a genotipagem de sequências específicas do DNA das plantas (STR – Short Tandem Repeats), a fim de buscar diferenças nas repetições dos alelos que podem estar relacionadas com a sua origem. Na Austrália, um sistema multiplex STR foi desenvolvido com sucesso para identificar apreensões de *Cannabis*, sendo verificadas semelhanças no genótipo das amostras de mesma procedência (HOWARD et al., 2009). Nos Estados Unidos, Mendoza, et al. (2009) desenvolveu um sistema com dados STR para *Cannabis* para identificar marcadores. A aplicação de sistemas multiplex STR com 15 e 13 locus (marcadores), por Köhnemann et al. (2012) e Houston, et al. (2015), em amostras de *Cannabis*, apresentaram resultados positivos para individualizar e agrupar amostras de acordo com a origem.

Em relação aos métodos isotópicos, observa-se que a variação isotópica de carbono e nitrogênio é o mais utilizado para avaliar a procedência geográfica de material vegetal. Ao contrário das demais drogas, a *Cannabis* não é processada quimicamente para o consumo ilícito e conseqüentemente mantém sua relação isotópica e elementar original. As condições de cultivo e o manejo do solo e do ambiente podem afetar a relação isotópica e a discriminação pode ser limitada. Entretanto, o uso de valores de referência poderá reduzir estas interferências.

O uso de relações isotópicas para avaliar a rastreabilidade da maconha foi testado em amostras apreendidas em São Paulo (SHIBUYA et al., 2007). Entretanto, estes autores conseguiram identificar primariamente apenas as regiões em relação a algumas poucas variáveis ambientais e com aplicação limitada para uma proposta de rastreabilidade. Resultados mais recentes (WEST et al., 2009) demonstram que é possível refinar a técnica isotópica para obter melhores resultados de procedência. Estes autores utilizaram a relação Sr87/Sr86 de amostras de maconha cultivada em 79 municípios americanos. Os resultados indicaram que o isótopo estrôncio pode identificar as origens

geográficas de maconha. No Alasca, onde a dificuldade de controlar o tráfico e a produção é maior, Booth et al. (2010) analisaram vários isótopos estáveis (C, N, O e H) de maconha apreendida e identificaram 56 amostras cultivadas neste estado. As análises de relações isotópicas permitiram inclusive avaliar algumas condições especiais de cultivo. Nota-se que as relações isotópicas têm apresentado um bom desempenho para o uso na rastreabilidade, mas necessitam um maior refinamento na técnica visando aumentar a exatidão da localização.

Em relação a análise multielementar, a ciência forense tem utilizado esta ferramenta para os mais distintos propósitos para a identificação de crimes e o estabelecimento de provas aceitáveis. Os perfis multielementares usados em conjunto para o solo e a planta têm potencial para o uso na rastreabilidade da maconha. A distribuição elementar disponibilizada pela análise do solo e de plantas, utilizando o Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) é capaz de detectar vários metais e não metais em concentrações tão baixas como uma parte em 10^{12} (parte por trilhão) por meio da ionização da amostra e quantificação dos íons pelo uso de um espectrômetro de massa. Comparativamente às técnicas de absorção atômica, o ICP-MS tem maior velocidade, precisão e sensibilidade (REIDY et al., 2013). Estes autores verificaram que a associação do ICP-MS, com análise estatística multivariada, pode ser utilizada como uma “impressão digital” elementar suficiente para distinguir solos sob diferentes usos e localizações geográficas.

Dessa forma, no presente estudo, foram selecionados, de acordo com a capacidade e disponibilidade de equipamentos das instituições de pesquisa envolvidas, os seguintes métodos e análises: químico mineralógico, com a análise da composição do solo e tecido vegetal das plantas em ICP-OES; químico isotópico, com a análise das relações isotópicas $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ e $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$; e, molecular pela genotipagem de *Cannabis* utilizando um sistema de marcadores multiplex 13-loci STR proposto por Houston, et al. (2015).

3. IDENTIFICAÇÃO DA ORIGEM DE *Cannabis sativa* L. (MACONHA) PELA CONCENTRAÇÃO QUÍMICA ELEMENTAR

3.1. Introdução

O número de usuários de drogas consideradas ilícitas, com idade entre 15 e 64 anos, continua crescendo nos últimos anos, conforme o relatório das Nações Unidas que trata de drogas e crimes de 2015 (UNODC/WDR, 2015). No entanto, este número mantém uma proporção estável em relação ao total da população usuária de drogas estimada nesta faixa etária. Por outro lado, nota-se um aumento significativo no número de usuários que se tornam um problema para a saúde pública, chegando a 10% do total de usuários com necessidade de atendimento especializado em função dos efeitos das drogas (UNODC/WDR, 2015). Aos problemas de saúde pública causados pelo consumo de drogas, soma-se a grande quantidade de crimes associados ou resultantes neste processo. Dessa forma, a segurança pública nacional e internacional, representada pela ação policial, continua mantendo o foco na repressão ao tráfico de drogas. Dentre as drogas de abuso com uso proscrito ou controlado na maioria dos países integrantes das Nações Unidas, a maconha (*Cannabis sativa*) continua sendo apontada como a substância ilícita mais utilizada no mundo (UNODC/WDR, 2015).

No caso da *Cannabis*, em que a comercialização e o uso se fazem diretamente de partes da planta, existe a possibilidade de identificar marcadores que relacionem a planta a sua origem de cultivo. Um destes parâmetros pode ser o teor de elementos químicos (essenciais ou não às plantas) presentes no tecido vegetal. A concentração desses elementos pode ser influenciada pelas características genotípicas das plantas (FISCHEDICK et al., 2010) e pelas condições ambientais a que estas estão submetidas durante o desenvolvimento,

como o tipo de solo cultivado. A possibilidade de identificar a origem de drogas apreendidas e, conseqüentemente, de traçar rotas de deslocamento e distribuição dos entorpecentes é uma informação valiosa na investigação e combate ao tráfico. Isso poderia direcionar a busca pelas lavouras de produção no caso da *Cannabis* em um país de grandes dimensões como o Brasil, as quais são muitas vezes camufladas em pequenos talhões ou em cultivos caseiros. Neste sentido, encontrar padrões multielementares que caracterizem um determinado local de plantio, bem como plantios em ambientes fechados ou *indoor*, pode também ser muito importante. Na prática judicial isto pode resultar na distinção entre um usuário e um traficante e conseqüentemente em distintas penas.

Trabalhos envolvendo a possibilidade de relacionar produtos ou subprodutos vegetais com seus locais e ambientes de origem, através da análise da composição elementar de suas estruturas vegetais, foram realizados para confirmação de certificados de origem (ALMEIDA & VASCONCELOS, 2003); KMENT et al., 2005; GIACOMO et al., 2007). Amostras de apreensões de *Cannabis* pela Polícia Civil do Estado de São Paulo no combate ao tráfico também tiveram sua composição elementar analisada com resultados promissores na tentativa de identificação de semelhanças e padrões (SHIBUYA et al., 2007). A matriz de resultados, formada pelo teor de diversos elementos químicos em cada amostra analisada, invariavelmente é processada estatisticamente com análises multivariadas, indicando diferentes formas de interpretação. Com isso, este capítulo tem o objetivo estudar a utilização da composição multielementar de amostras de tecido vegetal de plantas de *Cannabis*, subdividas em raiz e parte aérea, bem como amostras do solo e do solo rizosférico em que as plantas estavam se desenvolvendo, como indicadores da origem do local de cultivo, buscando desenvolver ferramentas que possam ser empregadas na classificação de amostras de origens diferentes.

3.2. Material e métodos

O conjunto de amostras analisadas se subdividiram em duas formas de obtenção bastante distintas. Da Região Nordeste do Brasil, especialmente nas áreas que abrangem o denominado “Polígono da Maconha” nas proximidades do Rio São Francisco, tendo como referência os municípios de

Salgueiro/PE e Juazeiro/BA, foram obtidas 30 (trinta) amostras de *Cannabis*, compostas de solo, solo rizosférico, raiz e parte aérea para cada uma delas. O solo foi coletado juntamente com a amostra da planta, exatamente no mesmo ponto, com uma profundidade de 20 cm. Essas amostras foram coletadas durante operações de erradicação de maconha realizadas pela Polícia Federal em 2014 e 2015. Foram coletadas, pelo menos, 3 amostras de cada ponto de coleta. Outras 49 (quarenta e nove) amostras foram obtidas em cultivo controlado, efetuado em vasos no interior do laboratório de química forense do Setor Técnico-Científico da Superintendência de Polícia Federal no Rio Grande do Sul.

Salienta-se que as amostras do Nordeste brasileiro foram coletadas durante procedimento policial de erradicação de cultivo da droga e pericial de identificação e caracterização do local, estimativa da área cultivada e do número de plantas, bem como da retirada de amostra específica para exame definitivo de droga.

A tabela 3.1 apresenta a identificação das amostras com relação ao ponto geográfico de coleta, característica geral do local e município em que o ponto se encontra, bem como o grupo proposto a que pertencem para a análise estatística. A figura 3.1 mostra os pontos em uma imagem de satélite do Google Earth.

Para o cultivo em ambiente fechado, realizado de fevereiro a outubro de 2014, em espaço adaptado com iluminação e ventilação artificial, foram utilizados vasos plásticos de dois litros. Foi utilizado um substrato composto de solo orgânico adquirido no comércio de jardinagem (sem marca específica), húmus de minhoca e areia na proporção de 1:1:2, respectivamente, e dois tipos de solo encontrados no sul do Brasil, sendo um Argissolo Vermelho da unidade de mapeamento São Jerônimo (PVd) e um Chernossolo Ebânico da unidade de mapeamento Uruguaiana (MEk). Ambos os solos foram previamente peneirados em malha de 2 mm e secos (TFSA). Posteriormente acidez dos solos foi corrigida para atingir pH 6,5.

Tabela 1. Identificação e localização das amostras coletadas no Nordeste, indicando os pontos de coleta que representam os grupos propostos para a análise estatística.

ID	PONTO/ GRUPO	COORDENADA GEOGRÁFICA		LOCAL	MUNICÍPIO
		LONG	LAT		
1	A	39°42'26,6"O	8°46'59,5"S	Ilha do Rio	Santa Maria da Boa Vista/PE
2	A	39°42'26,6"O	8°46'59,5"S	Ilha do Rio	Santa Maria da Boa Vista/PE
3	A	39°42'26,6"O	8°46'59,5"S	Ilha do Rio	Santa Maria da Boa Vista/PE
4	A	39°42'26,6"O	8°46'59,5"S	Ilha do Rio	Santa Maria da Boa Vista/PE
5	B	42°22'1,0"O	10°5'2,0"S	Margem Lago Sobradinho	Pilão Arcado/PE
6	B	42°22'1,0"O	10°5'2,0"S	Margem Lago Sobradinho	Pilão Arcado/PE
7	B	42°22'1,0"O	10°5'2,0"S	Margem Lago Sobradinho	Pilão Arcado/PE
8	B	42°22'1,0"O	10°5'2,0"S	Margem Lago Sobradinho	Pilão Arcado/PE
9	C	40°19'27,1"O	9°21'11,1"S	Continente	Petrolina/PE
10	C	40°19'27,1"O	9°21'11,1"S	Continente	Petrolina/PE
11	C	40°19'27,1"O	9°21'11,1"S	Continente	Petrolina/PE
12	D	40°39'59,9"O	8°20'30,0"S	Continente	Santa Filomena/PE
13	D	40°39'59,9"O	8°20'30,0"S	Continente	Santa Filomena/PE
14	D	40°39'59,9"O	8°20'30,0"S	Continente	Santa Filomena/PE
15	D	40°39'59,9"O	8°20'30,0"S	Continente	Santa Filomena/PE
16	E	39°29'30,6"O	8°35'20,8"S	Ilha do Rio	Orocó/PE
17	E	39°29'30,6"O	8°35'20,8"S	Ilha do Rio	Orocó/PE
18	E	39°29'30,6"O	8°35'20,8"S	Ilha do Rio	Orocó/PE
19	E	39°29'30,6"O	8°35'20,8"S	Ilha do Rio	Orocó/PE
20	E	39°29'30,6"O	8°35'20,8"S	Ilha do Rio	Orocó/PE
21	E	39°29'30,6"O	8°35'20,8"S	Ilha do Rio	Orocó/PE
22	F	39°16'45,2"O	8°33'34,0"S	Ilha do Rio	Cabrobó/PE
23	F	39°16'45,2"O	8°33'34,0"S	Ilha do Rio	Cabrobó/PE
24	F	39°16'45,2"O	8°33'34,0"S	Ilha do Rio	Cabrobó/PE
25	G	39°39'12,8"O	8°30'21,0"S	Continente	Orocó/PE
26	G	39°39'12,8"O	8°30'21,0"S	Continente	Orocó/PE
27	G	39°39'12,8"O	8°30'21,0"S	Continente	Orocó/PE
28	H	39°32'5,1"O	8°36'7,9"S	Ilha do Rio	Orocó/PE
29	H	39°32'5,1"O	8°36'7,9"S	Ilha do Rio	Orocó/PE
30	H	39°32'5,1"O	8°36'7,9"S	Ilha do Rio	Orocó/PE



Figura 8. Imagem de satélite mostrando a distribuição geográfica dos pontos de coleta das amostras no Nordeste (Fonte Google Earth)

Foi realizado o plantio das sementes, previamente germinadas em processo que contempla uma primeira fase de manter as sementes por um dia em água destilada no interior de estufa com temperatura entre 20 e 30°C e outra de colocá-las sobre papel toalha umedecido em água destilada sobre placa de Petry em ambiente arejado e escuro durante 3 dias. Em seguida, cada vaso recebeu nove sementes pré-germinadas de *Cannabis*, e três semanas após a emergência das plantas, foi efetuado o desbaste, mantendo-se três plantas por vaso. As condições de iluminação, ventilação e adubação foram mantidas as mesmas para todos os vasos. Inicialmente, foi empregado um regime de iluminação de 18 horas de luz diárias, para favorecer o crescimento vegetativo e, após 30 dias de cultivo, foi empregado um regime de 12 horas de luz diária para favorecer a floração. Transcorridos 70 dias após o plantio, procedeu-se a coleta das partes aéreas das plantas e sua secagem em temperatura ambiente por uma semana.

Cada planta, ou material relacionado a ela (solo, solo rizosférico e raiz) deu origem a uma amostra. As amostras de solo e solo rizosférico foram secos em temperatura ambiente e peneirados; as amostras de tecido vegetal, raiz e parte aérea, foram triturados após a secagem. Em seguida, tanto as amostras de solo, quanto as de tecido vegetal, foram submetidas ao processo de digestão nitro-perclórica (TEDESCO et al., 1995) e levadas para análise do teor de elementos químicos (Al, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, S, Se, V e Zn) em espectrômetro de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES). O ICP-OES utilizado é da marca Perkin Elmer e funciona na rotina do laboratório de análises de solos da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Em cada bateria de análises, foi processada uma amostra em branco para fins de controle.

Primeiramente, o teor de cada um dos elementos químicos foi submetido ao teste de comparação de médias de Kruskal-Wallis H . Posteriormente, os dados foram submetidos à análise discriminante no modo "backward", em que são eliminadas as variáveis que não contribuem com o modelo, utilizando os pontos de coleta ou local de cultivo (no caso dos vasos) como variável dependente e não-métrica (grupos previamente definidos) e a concentração dos elementos no tecido como variáveis independentes. A função discriminante múltipla é baseada no valor de Wilks' Lambda (Λ^*) originado na

análise de variância multivariada, no qual o critério utilizado no modelo estatístico é a minimização do Λ^* . O Λ^* se aproxima de “1”, quando todos os grupos definidos parecem semelhantes, enquanto que valores baixos de Λ^* , indicam que a variabilidade dentro dos grupos é menor que a variabilidade total do conjunto das amostras.

O Wilks' Lambda (Λ^*) é calculado pela equação (TIECHER et al., 2017),

$$\Lambda^* = \frac{|W|}{|B+W|}$$

onde,

$|W|$ = determinante da matriz da soma dos quadrados em função do erro;

$|B + W|$ = determinante da matriz do total da soma dos quadrados.

Cada passo da análise visa a minimização do resultado geral do Wilks' Lambda. A máxima significância do teste F para incluir a variável na análise foi de 0,05, assim como a mínima significância do F para retirar a variável da análise foi de 0,05. Os dados foram processados no Software Statistica, version 12, Statsoft Inc.

3.3. Resultados e discussão

Somente as amostras obtidas nas operações de erradicação de maconha no Nordeste brasileiro foram coletadas e subdivididas em solo, solo rizosférico, raiz e parte aérea. Dessa forma, tratou-se de analisar e discutir os resultados em dois momentos: o primeiro, pela verificação da possibilidade de separação das amostras oriundas do Nordeste, de acordo com respectivo ponto de coleta; e, o segundo, pela capacidade de distinguir os grupos das amostras coletadas em plantações no Nordeste, daquelas obtidas pelo cultivo em vasos em ambiente fechado.

3.2.1. Amostras do Nordeste brasileiro

A coleta das amostras do Nordeste brasileiro foi realizada durante operações de erradicação da maconha pela PF e, conforme já mencionado, ficaram sujeitas às limitações do trabalho policial e pericial realizado concomitantemente. Em alguns casos, os procedimentos para coleta das amostras compostas de solo, solo rizosférico, raiz e parte aérea não foram

realizados da forma mais adequada. Isso resultou na obtenção de material que não se prestou plenamente ao preparo e análises, havendo ausência de informação para algumas frações das amostras, o que foi mais aparente no caso das raízes.

Os resultados e discussões para cada uma das subdivisões de amostras (solo, solo rizosférico, raiz e parte aérea) serão apresentados a seguir.

A partir das 30 amostras compostas coletadas, 29 amostras de solo foram analisadas, estando os teores médios e o respectivo desvio padrão para cada elemento químico analisado dentro dos grupos formados pelo local de coleta ou cultivo apresentados na tabela 3.2. Esta tabela também mostra o teste estatístico de Kruskal-Wallis para cada elemento químico em separado, indicando a sua significância para separar as amostras nos grupos propostos e o percentual das amostras corretamente classificadas.

O resultado da análise estatística apresentada na tabela 3.2 mostrou a existência de diferença significativa no teor de diversos elementos químicos, que foram Al, As, Ba, Ca, Cd, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, V e Zn. Entretanto, esta variabilidade não contribuiu substancialmente, de forma individualizada, para classificação correta das amostras nos grupos propostos. Assim, nota-se que a utilização do teor de um único elemento como marcador para identificar o solo/substrato em que a planta foi cultivada é limitado, sendo necessário utilizar um conjunto de traçadores químicos para diminuir o erro associado com a predição do local de cultivo ou origem das amostras. Por isso, foi realizada uma análise discriminante linear para selecionar o grupo mínimo de variáveis para separar os grupos de amostras.

A análise discriminante múltipla aplicada aos dados dos teores de elementos químicos presentes no solo em que estavam as plantas de *Cannabis*, considerando cada local de coleta ou cultivo como um grupo, mostrou que somente um grupo teve amostras classificadas equivocadamente (grupo E). A probabilidade média de que estas amostras tenham sido classificadas de forma correta foi 0,95, no entanto, o percentual de incerteza associado à classificação no grupos B e E foi superior a 10%, conforme apresentado na Tabela 3.3.

Tabela 2. Teores médios e desvios padrões, entre parêntesis, dos elementos químicos no solo associado às amostras de *Cannabis* em cada grupo de ponto de coleta e resultados do teste de comparação de média não paramétrico de Kruskal-Wallis para cada um dos elementos comparando o teor no solo. Resultados em negrito, indicam diferenças significativas no teor de elementos no solo a $p < 0,05$. O percentual de amostras de solo corretamente classificado nos grupos de origem foi obtido pela análise discriminante.

Metal marcador	Teor dos elementos no solo dos grupos – média e desvio padrão (DP) em cada ponto de coleta								Kruskal-Wallis test		% Corret. Classif.
	A	B	C	D	E	F	G	H	p-value	H-value	
Al (mg kg ⁻¹)	25477 (8432)	62530 (26516)	59913 (3383)	33943 (10722)	29603 (13853)	6714 (102)	21050 (1342)	21557 (3020)	0,0090	18,7	34,5
As (mg kg ⁻¹)	6,80 (8,05)	14,15 (6,41)	3,86 (2,04)	2,18 (2,19)	10,03 (4,96)	2,60 (0,12)	1,08 (0,53)	5,31 (1,49)	0,0089	0,9	37,9
Ba (mg kg ⁻¹)	1358 (389)	1787 (1944)	127,13 (5,39)	96,52 (16,01)	71,63 (28,53)	21,60 (2,55)	70,64 (16,35)	58,53 (1,37)	0,0036	21,1	55,2
Ca (g kg ⁻¹)	0,36 (0,28)	0,27 (0,11)	0,44 (0,05)	0,47 (0,24)	0,16 (0,07)	0,08 (0,02)	0,17 (0,08)	0,14 (0,05)	0,0228	16,3	27,6
Cd (mg kg ⁻¹)	0,14 (0,12)	0,44 (0,22)	0,40 (0,08)	0,18 (0,10)	0,41 (0,09)	0,19 (0,01)	0,39 (0,02)	0,38 (0,03)	0,0122	9,7	24,1
Co (mg kg ⁻¹)	8,23 (2,17)	12,56 (4,63)	17,80 (0,56)	11,22 (1,40)	9,23 (4,26)	2,99 (0,02)	11,02 (1,30)	6,44 (0,91)	0,0103	18,4	34,5
Cr (mg kg ⁻¹)	23,96 (10,86)	25,92 (8,08)	36,17 (4,99)	20,30 (9,41)	23,60 (12,53)	15,67 (1,75)	34,19 (6,53)	21,75 (5,25)	0,1218	11,4	24,1
Cu (mg kg ⁻¹)	9,99 (5,01)	25,94 (10,44)	31,42 (0,83)	13,73 (7,46)	15,88 (8,73)	5,16 (0,09)	12,14 (0,51)	10,42 (1,50)	0,0164	17,1	37,9
Fe (mg kg ⁻¹)	14790 (5007)	25635 (9772)	27283 (296)	16825 (4982)	16788 (6585)	5880 (172)	17030 (859)	13463 (1507)	0,0404	14,7	34,5
K (g kg ⁻¹)	0,20 (0,09)	0,44 (0,18)	0,32 (0,05)	0,27 (0,09)	0,24 (0,07)	0,06 (0,01)	0,19 (0,02)	0,23 (0,06)	0,0406	14,6	34,5
Mg (g kg ⁻¹)	0,18 (0,06)	0,36 (0,15)	0,45 (0,04)	0,26 (0,05)	0,21 (0,10)	0,06 (0,01)	0,24 (0,03)	0,15 (0,03)	0,0079	19,1	37,9
Mn (mg kg ⁻¹)	204,50 (97,70)	326,98 (121,87)	356,97 (13,51)	331,63 (114,00)	228,30 (117,63)	69,45 (3,41)	233,87 (62,08)	176,87 (22,52)	0,0297	15,5	31,0
Na (mg kg ⁻¹)	188,77 (49,54)	553,85 (233,82)	481,93 (71,62)	319,83 (113,07)	208,80 (43,87)	141,10 (14,50)	266,30 (32,22)	192,97 (69,59)	0,0059	19,9	27,6
Ni (mg kg ⁻¹)	11,89 (4,90)	25,95 (10,36)	32,31 (0,66)	15,60 (6,56)	16,17 (7,67)	4,61 (0,31)	18,78 (1,81)	11,28 (1,09)	0,0107	18,3	34,5
P (g kg ⁻¹)	0,04 (0,02)	0,05 (0,02)	0,06 (0,01)	0,05 (0,02)	0,05 (0,02)	0,03 (0,00)	0,05 (0,01)	0,05 (0,01)	0,4788	6,5	20,7
Pb (mg kg ⁻¹)	8,27 (3,14)	15,08 (5,68)	14,99 (1,08)	9,78 (4,47)	9,35 (2,29)	4,66 (1,99)	9,17 (1,22)	7,84 (0,86)	0,0445	14,4	27,6
S (g kg ⁻¹)	0,06 (0,06)	0,07 (0,04)	0,03 (0,01)	0,04 (0,03)	0,03 (0,01)	0,01 (0,01)	0,02 (0,01)	0,02 (0,01)	0,2594	8,9	20,1
Se (mg kg ⁻¹)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,0000	1,0	0,00
V (mg kg ⁻¹)	31,74 (9,39)	67,74 (23,30)	55,59 (1,03)	39,46 (11,46)	34,45 (16,08)	11,59 (0,96)	40,16 (3,61)	27,44 (5,73)	0,0105	18,3	41,8
Zn (mg kg ⁻¹)	29,83 (8,79)	60,54 (22,16)	62,06 (7,09)	34,72 (8,40)	38,71 (9,77)	15,26 (0,68)	32,13 (1,63)	36,32 (2,56)	0,0423	14,5	31,0

A análise discriminante múltipla, da forma que foi proposta, realiza as combinações, excluindo as variáveis independentes que não contribuem na separação das amostras, de acordo com os grupos propostos. Dessa forma, identifica-se que as variáveis ou elementos químicos presentes nas amostras de solo que foram utilizados para classificar as amostras nos diferentes grupos foram, conforme a prioridade de seleção pelo cálculo estatístico, Mn, As, Ca, Al, V, Ni, Ba e Fe. Os demais elementos, Cd, Co, Cr, Cu, K, Mg, Na, P, Pb, S, Se e Zn, não foram selecionados para fazer parte da análise, ou seja, a sua presença não traria contribuição ao resultado obtido.

Tabela 3. Resultado da análise discriminante múltipla para as amostras de solo, mostrando o percentual de classificação correta das amostras para os grupos propostos, a probabilidade média das amostras pertencerem ao grupo definido e o percentual de incerteza na classificação das amostras nos seus devidos grupos.

GRUPO/Local de coleta	Número de amostras classificadas em cada grupo								Classificação correta (%) / Média
	A	B	C	D	E	F	G	H	
A	3	0	0	0	0	0	0	0	100
B	0	4	0	0	0	0	0	0	100
C	0	0	3	0	0	0	0	0	100
D	0	0	0	4	0	0	0	0	100
E	0	0	0	0	5	0	0	1	83
F	0	0	0	0	0	3	0	0	100
G	0	0	0	0	0	0	3	0	100
H	0	0	0	0	0	0	0	3	100
Total	3	4	3	4	5	3	3	4	100
Classificação correta (%)	100	100	100	100	83	100	100	100	98
Incerteza associada com a classificação das amostras (%)	3,3	11,4	0,0	0,5	14,8	0,0	0,0	4,1	4,3

Os coeficientes canônicos referentes a cada uma das variáveis utilizadas na análise discriminante, trata de desenvolver uma combinação linear do conjunto de variáveis para maximizar a relação entre este conjunto de variáveis dependentes e independentes (HAIR JR et al, 2009). Os coeficientes referentes às duas primeiras variáveis da função linear obtida para cada amostra podem ser utilizadas para representar graficamente a distância entre as amostras, bem como a capacidade de estarem presentes nos grupos definidos (Figura 3.2).

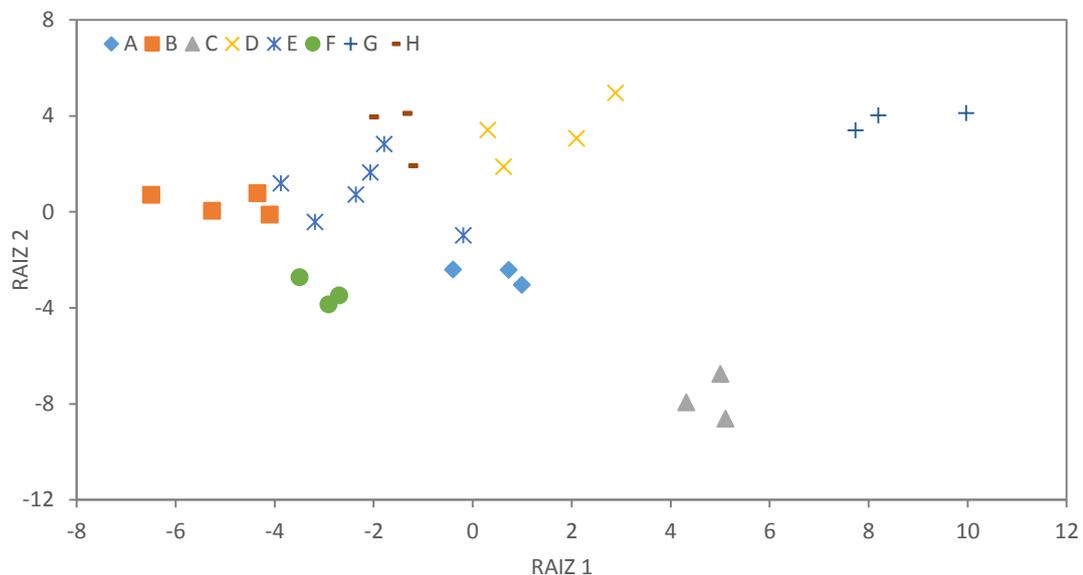


Figura 9. Dispersão bidimensional do conjunto de primeiros e segundos coeficientes canônicos (raiz 1 e raiz 2) obtidos a partir da análise de função discriminante para o teor de elementos do solo, de acordo com o ponto coleta ou local de cultivo de *Cannabis*.

O solo rizosférico definido como a região do solo sob influência das raízes, apresenta características diferentes do solo localizado distante das raízes. Essas diferenças estão associadas à liberação pelas raízes de células, mucilagens, exsudados e lisados que contêm aminoácidos, enzimas, proteínas, açúcares, carboidratos complexos, álcoois, vitaminas e hormônios (KLUEPFEL, 1993). A presença destes compostos, que são prontamente utilizados pelos microrganismos, aumenta e modifica a atividade microbiana nesta região de contato solo-raiz (DAANE et al., 2001).

Embora a separação entre o solo e o solo rizosférico não seja visualmente possível, considerou-se solo rizosférico o material que somente se desprende das raízes após sua vigorosa agitação. Tiveram condições de ser preparadas para posterior análise, 28 amostras de solo rizosférico. Os teores médios e o respectivo desvio padrão (entre parêntesis) para cada elemento químico analisado dentro dos grupos formados pelo local de coleta ou cultivo são apresentados na tabela 3.4, a qual também mostra o teste estatístico para cada elemento químico em separado, a significância para separar as amostras nos grupos propostos e o percentual corretamente classificado.

A análise estatística realizada para o solo rizosférico, mostrou a existência de diferença significativa no teor dos mesmos elementos químicos observados para o solo (Al, As, Ba, Ca, Cd, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, V e Zn). Na análise individualizada, somente a variabilidade no teor de Ba teria condições de classificar corretamente nos grupos propostos cerca de 60% das amostras. A análise do conjunto dos possíveis traçadores químicos foi realizada para buscar a melhor separação nos grupos de amostras, conforme apresentado na tabela 3.5. Nesta análise, amostras coletadas nos pontos E e H foram classificadas incorretamente em outros grupos, sendo a probabilidade média de que todas as amostras tenham sido classificadas corretamente de 0,84. Além disso, o percentual de incerteza associado à classificação nos grupos E e H foi superior a 40%. As variáveis ou elementos químicos avaliados nas amostras de solo que foram utilizados para classificar as amostras nos diferentes grupos foram P, Ba, As, Al, Co e Ni, sendo os demais elementos desconsiderados na análise.

Tabela 4. Teores médios e desvios padrões, entre parêntesis, dos elementos químicos no solo rizosférico associado às amostras de *Cannabis* em cada grupo de ponto de coleta e resultados do teste de comparação de média não paramétrico de Kruskal-Wallis para cada um dos elementos comparando o teor no solo rizosférico. Resultados em negrito, indicam diferenças significativas no teor de elementos no solo rizosférico a $p < 0,05$. O percentual de amostras de solo rizosférico corretamente classificado nos grupos de origem foi obtido pela análise discriminante.

Metal marcador	Teor dos elementos no solo rizosférico dos grupos – média e desvio padrão (DP) em cada ponto de coleta								Kruskal-Wallis test		% Corret. Classif.
	A	B	C	D	E	F	G	H	p-value	H-value	
Al (mg kg ⁻¹)	22017 (3840)	67333 (9347)	56403 (1503)	34150 (8520)	29227 (15499)	8124 (1670)	17385 (742)	14957 (3363)	0,0016	23,2	57,1
As (mg kg ⁻¹)	5,31 (5,21)	15,16 (1,55)	3,02 (0,61)	2,53 (3,32)	10,03 (4,52)	4,08 (1,18)	2,12 (2,17)	5,64 (1,22)	0,0102	18,4	42,8
Ba (mg kg ⁻¹)	1396 (258)	3311 (389)	2542 (187)	2197 (215)	1728 (928)	550 (111)	1186 (142)	893 (204)	0,0022	22,3	60,7
Ca (g kg ⁻¹)	0,22 (0,18)	0,31 (0,05)	0,40 (0,06)	0,50 (0,26)	0,19 (0,09)	0,10 (0,01)	0,17 (0,03)	0,10 (0,01)	0,0111	18,2	39,3
Cd (mg kg ⁻¹)	0,16 (0,14)	0,47 (0,08)	0,28 (0,01)	0,12 (0,13)	0,29 (0,16)	0,16 (0,04)	0,09 (0,02)	0,21 (0,11)	0,0259	15,9	32,1
Co (mg kg ⁻¹)	8,32 (2,45)	13,47 (1,68)	16,68 (0,94)	11,48 (1,17)	9,50 (4,77)	4,04 (0,77)	8,95 (0,61)	5,21 (1,06)	0,0045	20,5	42,8
Cr (mg kg ⁻¹)	12,31 (4,98)	32,18 (16,66)	36,47 (9,26)	23,90 (17,12)	24,11 (6,37)	17,30 (2,93)	33,17 (4,51)	15,49 (9,16)	0,0726	12,9	32,1
Cu (mg kg ⁻¹)	10,81 (3,83)	29,39 (3,65)	29,76 (2,01)	13,56 (8,36)	16,27 (9,16)	5,62 (0,75)	10,50 (0,78)	8,08 (1,50)	0,0092	18,7	35,7
Fe (mg kg ⁻¹)	13477 (3105)	26660 (2428)	24940 (2165)	17790 (4652)	17607 (6548)	7363 (1205)	13875 (969)	10864 (1669)	0,0049	20,3	42,8
K (g kg ⁻¹)	0,17 (0,03)	0,49 (0,08)	0,30 (0,04)	0,28 (0,07)	0,31 (0,13)	0,11 (0,03)	0,16 (0,01)	0,18 (0,07)	0,0074	19,2	35,7
Mg (g kg ⁻¹)	0,16 (0,03)	0,39 (0,04)	0,42 (0,03)	0,26 (0,03)	0,22 (0,12)	0,07 (0,02)	0,21 (0,01)	0,11 (0,03)	0,0029	21,7	57,1
Mn (mg kg ⁻¹)	192,50 (90,39)	370,70 (44,11)	331,10 (33,64)	343,53 (116,72)	255,35 (128,07)	85,79 (18,96)	205,25 (38,96)	147,43 (38,91)	0,0108	18,3	28,5
Na (mg kg ⁻¹)	146,07 (21,55)	556,30 (105,38)	446,90 (106,09)	286,28 (81,35)	248,00 (106,59)	146,65 (48,39)	187,70 (46,67)	168,47 (43,49)	0,0065	19,6	35,7
Ni (mg kg ⁻¹)	11,73 (3,66)	27,86 (1,96)	29,92 (1,09)	15,94 (7,04)	16,74 (8,10)	5,74 (1,01)	15,71 (0,49)	8,88 (1,80)	0,0047	20,5	46,4
P (g kg ⁻¹)	0,03 (0,00)	0,06 (0,01)	0,06 (0,01)	0,06 (0,02)	0,06 (0,01)	0,04 (0,00)	0,05 (0,00)	0,05 (0,01)	0,0659	13,3	42,8
Pb (mg kg ⁻¹)	8,32 (2,40)	17,21 (0,96)	13,37 (1,26)	11,78 (5,69)	10,31 (2,97)	4,19 (1,43)	7,32 (0,55)	6,75 (0,94)	0,0077	19,2	46,4
S (g kg ⁻¹)	0,02 (0,00)	0,09 (0,05)	0,03 (0,02)	0,05 (0,03)	0,04 (0,02)	0,02 (0,01)	0,02 (0,00)	0,02 (0,01)	0,0805	12,7	28,6
Se (mg kg ⁻¹)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,000	0,0	0,0
V (mg kg ⁻¹)	27,26 (5,37)	71,83 (6,99)	55,54 (3,98)	41,94 (10,21)	35,99 (14,43)	15,00 (3,21)	32,82 (1,90)	19,85 (4,11)	0,0023	22,2	50,0
Zn (mg kg ⁻¹)	31,15 (8,64)	65,09 (3,69)	55,98 (4,09)	42,12 (20,49)	44,91 (16,86)	20,53 (2,87)	30,13 (2,86)	31,16 (6,75)	0,0175	17,0	46,4

Tabela 5. Resultado da análise discriminante múltipla para as amostras de solo rizosférico, mostrando o percentual de classificação correta das amostras para os grupos propostos, a probabilidade média das amostras pertencerem ao grupo definido e o percentual de incerteza na classificação das amostras nos seus devidos grupos.

GRUPO/Local de coleta	Número de amostras classificadas em cada grupo								Classificação correta (%) / Média
	A	B	C	D	E	F	G	H	
A	3	0	0	0	0	0	0	0	100
B	0	4	0	0	0	0	0	0	100
C	0	0	3	0	0	0	0	0	100
D	0	0	0	4	0	0	0	0	100
E	0	0	0	0	4	1	0	1	67
F	0	0	0	0	0	3	0	0	100
G	0	0	0	0	0	0	2	0	100
H	0	0	0	0	0	1	0	2	100
Total	3	4	3	4	4	5	2	3	67
Classificação correta (%)	100	100	100	100	67	100	100	67	89
Incerteza associada com a classificação das amostras (%)	7,8	0,0	0,0	0,0	46,0	30,7	1,3	41,6	15,9

O gráfico relacionando as raízes das duas primeiras variáveis da função linear dos coeficientes canônicos, obtidos na análise das amostras de solo rizosférico e utilizados para representar a distância entre as amostras e os grupos definidos, é apresentado na figura 3.3.

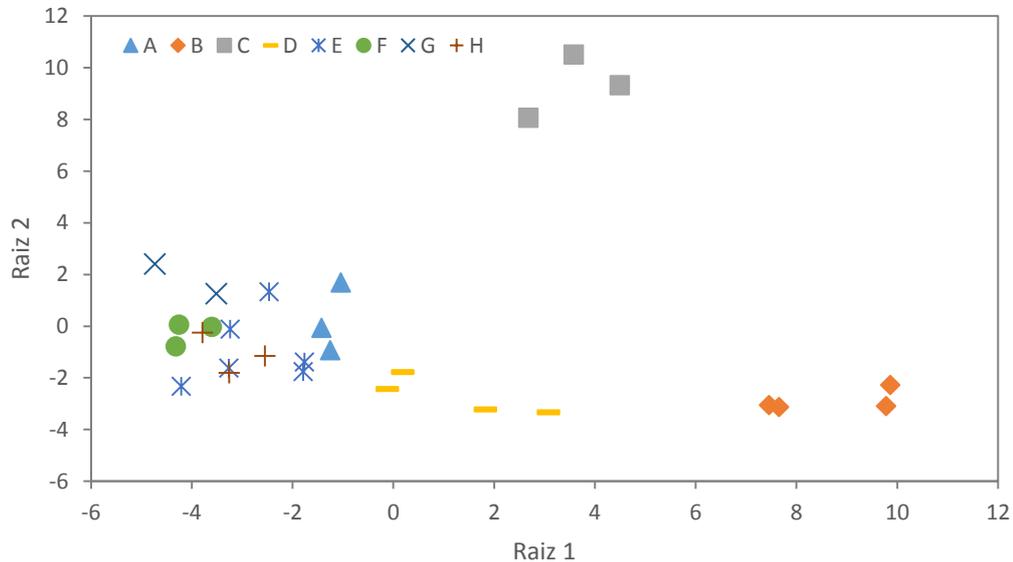


Figura 10. Dispersão bidimensional do conjunto de primeiros e segundos coeficientes canônicos (raiz 1 e raiz 2) obtidos a partir da análise de função discriminante para o teor de elementos do solo rizosférico, de acordo com o ponto coleta ou local de cultivo de *Cannabis*.

As plantas coletadas foram subdivididas em raiz e parte aérea. Toda a porção da raiz coletada de cada planta ou amostra foi reunida e combinada, sem separação de partes específicas da raiz. No caso das raízes, somente 16 amostras tiveram material suficiente para preparação e análise. Os locais identificados com as letras A, B, C e G tiveram somente uma única amostra com resultados do teor de elementos químicos. Com isso, o processamento estatístico para identificação das amostras nos grupos ou locais propostos ficou prejudicado para estes pontos de coleta.

A tabela 3.6 mostra os resultados dos teores médios e desvio padrão (entre parêntesis) dos elementos químicos analisados para a raiz, bem como as análises individualizadas por metal traçador. Os resultados obtidos não mostraram diferenças significativas no teor de nenhum dos elementos químicos analisados nas raízes. Na análise individualizada por metal considerado, a variabilidade no teor de Pb destacou-se pela capacidade de classificar corretamente mais de 50% das amostras nos grupos propostos.

Tabela 6. Teores médios e desvios padrões, entre parêntesis, dos elementos químicos no tecido da raiz das plantas de *Cannabis* em cada grupo de ponto de coleta e resultados do teste de comparação de média não paramétrico de Kruskal-Wallis para cada um dos elementos comparando o teor na raiz. Resultados em negrito, indicam diferenças significativas no teor de elementos no tecido vegetal da raiz a $p < 0,05$. O percentual de amostras de tecido de raiz corretamente classificado nos grupos de origem foi obtido pela análise discriminante.

Metal marcador	Teor dos elementos na raiz das plantas nos grupos – média e desvio padrão (DP) em cada ponto de coleta								Kruskal-Wallis test		% Corret. Classif.
	A*	B*	C*	D	E	F	G*	H	p-value	H-value	
Al (mg kg ⁻¹)	5580 (0,00)	946 (0,00)	2805 (0,00)	4471 (3265)	8577 (10230)	2851 (1077)	1991 (0,00)	4474 (1487)	0,2563	8,9	42,8
As (mg kg ⁻¹)	3,44 (0,00)	2,87 (0,00)	2,84 (0,00)	3,18 (1,14)	5,59 (2,43)	4,10 (1,93)	1,95 (0,00)	4,05 (1,22)	0,2306	9,3	33,3
Ba (mg kg ⁻¹)	34,19 (0,00)	14,58 (0,00)	8,52 (0,00)	22,05 (15,23)	30,29 (23,26)	16,97 (5,13)	14,10 (0,00)	19,32 (3,63)	0,3265	8,0	33,3
Ca (g kg ⁻¹)	0,55 (0,00)	0,39 (0,00)	0,33 (0,00)	0,44 (0,16)	0,69 (0,23)	0,67 (0,10)	0,36 (0,00)	0,76 (0,19)	0,2024	9,8	33,3
Cd (mg kg⁻¹)	0,04 (0,00)	0,00 (0,00)	0,07 (0,00)	0,21 (0,05)	0,06 (0,07)	0,32 (0,07)	0,23 (0,00)	0,16 (0,08)	0,0231	16,2	28,6
Co (mg kg ⁻¹)	4,98 (0,00)	1,05 (0,00)	1,10 (0,00)	3,33 (1,45)	3,45 (3,10)	2,18 (1,26)	2,94 (0,00)	2,08 (0,75)	0,2676	8,8	19,0
Cr (mg kg ⁻¹)	49,12 (0,00)	18,86 (0,00)	5,06 (0,00)	5,64 (1,40)	9,06 (5,94)	8,03 (0,99)	4,89 (0,00)	17,22 (17,23)	0,1186	11,5	38,1
Cu (mg kg ⁻¹)	12,58 (0,00)	3,90 (0,00)	5,18 (0,00)	5,82 (2,72)	10,92 (5,53)	10,70 (2,14)	4,65 (0,00)	11,51 (1,37)	0,9460	12,2	42,8
Fe (mg kg ⁻¹)	2727 (0)	835 (0)	1563 (0)	2132 (1213)	4049 (4296)	2206 (777)	1358 (0)	2911 (1112)	0,4437	6,8	28,6
K (g kg ⁻¹)	0,57 (0,00)	0,73 (0,00)	0,42 (0,00)	0,46 (0,14)	0,34 (0,10)	0,31 (0,12)	0,58 (0,00)	0,49 (0,22)	0,1605	10,5	28,6
Mg (g kg ⁻¹)	0,26 (0,00)	0,16 (0,00)	0,18 (0,00)	0,21 (0,10)	0,18 (0,06)	0,15 (0,05)	0,16 (0,00)	0,19 (0,02)	0,5814	5,6	28,6
Mn (mg kg ⁻¹)	356,85 (0,00)	44,31 (0,00)	57,04 (0,00)	207,31 (153,01)	163,34 (86,86)	127,53 (22,74)	114,20 (0,00)	129,40 (17,31)	0,3334	8,0	23,8
Na (mg kg ⁻¹)	172,90 (0,00)	404,00 (0,00)	1353 (0,00)	642,38 (468,56)	448,22 (368,25)	237,63 (100,89)	638,50 (0,00)	208,63 (38,86)	0,2115	9,6	33,3
Ni (mg kg ⁻¹)	35,23 (0,00)	11,09 (0,00)	5,10 (0,00)	6,54 (2,28)	9,69 (6,01)	5,87 (0,58)	5,39 (0,00)	13,66 (10,36)	0,2621	8,8	33,3
P (g kg ⁻¹)	0,34 (0,00)	0,23 (0,00)	0,12 (0,00)	0,29 (0,04)	0,19 (0,06)	0,22 (0,07)	0,22 (0,00)	0,27 (0,05)	0,3145	8,2	42,8
Pb (mg kg ⁻¹)	2,88 (0,00)	1,72 (0,00)	1,29 (0,00)	2,28 (0,14)	4,02 (1,43)	3,39 (0,02)	2,34 (0,00)	2,96 (0,37)	0,0594	13,6	52,4
S (g kg ⁻¹)	0,63 (0,00)	0,58 (0,00)	0,45 (0,00)	0,54 (0,06)	0,48 (0,12)	0,18 (0,01)	0,22 (0,00)	0,17 (0,03)	0,376	14,9	47,6
Se (mg kg ⁻¹)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,0	0,0	0,0
V (mg kg ⁻¹)	6,82 (0,00)	1,84 (0,00)	4,17 (0,00)	5,49 (3,68)	10,21 (9,71)	5,11 (1,51)	3,50 (0,00)	6,03 (2,20)	0,3446	7,9	23,8
Zn (mg kg ⁻¹)	59,96 (0,00)	27,42 (0,00)	26,85 (0,00)	50,73 (11,54)	43,66 (9,50)	49,87 (8,67)	38,78 (0,00)	47,44 (3,96)	0,3479	7,8	38,1

* Pontos com somente uma amostra processada, resultando em desvios padrões iguais a 0,00.

A análise do conjunto dos teores de elementos químicos para separação das amostras nos grupos propostos ficou prejudicada, já que não foi possível de ser aplicada para os pontos de coleta A, B, C e G, conforme apresentado na tabela 3.7. Entretanto, para os demais grupos, os resultados se mostraram bastante satisfatórios, com 100% das amostras classificadas corretamente. Soma-se a isso, a probabilidade média de todas as amostras tenham sido corretamente classificadas de 1,00 e o percentual de incerteza associado à classificação nos demais grupos de 0,0. Os teores de elementos químicos considerados na análise com as amostras de raiz foram Cd, K, Ca, Mg,

S, Cu, Al, Ba, Mn, Na e Pb, sendo os outros metais eliminados da análise. A representação gráfica, a partir das duas primeiras variáveis da função linear dos coeficientes canônicos, é apresentada na figura 3.4.

Tabela 7. Resultado da análise discriminante múltipla para as amostras de raiz, mostrando o percentual de classificação correta das amostras para os grupos propostos, a probabilidade média das amostras pertencerem ao grupo definido e o percentual de incerteza na classificação das amostras nos seus devidos grupos.

GRUPO/Local de coleta	Número de amostras classificadas em cada grupo								Classificação correta (%) / Média
	A	B	C	D	E	F	G	H	
A									
B									
C									
D				4	0	0		0	100
E				0	6	0		0	100
F				0	0	3		0	100
G									
H				0	0	0		3	100
Total				4	6	3		3	100
Classificação correta (%)				100	100	100		100	100
Incerteza associada com a classificação das amostras (%)				0,0	0,0	0,0		0,0	0,0

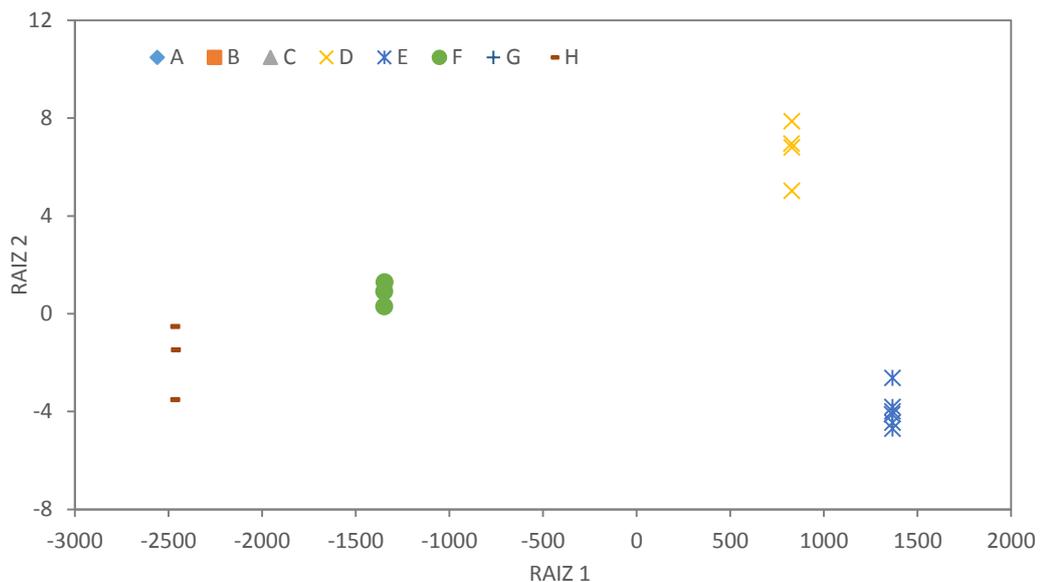


Figura 11. Dispersão bidimensional do conjunto de primeiros e segundos coeficientes canônicos (raiz 1 e raiz 2) obtidos a partir da análise de função discriminante para o teor de elementos da raiz, de acordo com o ponto coleta ou local de cultivo de *Cannabis*.

As amostras da parte aérea foi composta especialmente pelas folhas e partes das inflorescências, quando presentes nas plantas. Foram obtidas e preparadas 25 amostras das estruturas da parte aérea das plantas dos diferentes pontos de coleta. Somente o ponto D ficou com duas amostras, todos os demais tiveram, no mínimo, três amostras levadas à análise.

Da mesma forma que para as outras subdivisões das amostras, são apresentadas a tabela 3.8, com os teores médios, desvio padrão e análises individualizadas por metal traçador para o tecido vegetal da parte aérea; a tabela 3.9, mostrando os resultados da análise discriminante múltipla do conjunto de variáveis observadas para separação nos grupos propostos; e, a figura 3.5 que representa graficamente, a partir dos coeficientes canônicos, a distância entre os grupos.

A variabilidade nos teores dos metais analisados mostrou diferenças significativas para Ba e Na, conforme os resultados na tabela 3.8. Na análise individualizada por metal para classificação correta nos grupos propostos, verificou-se que a variabilidade nos teores de P classificaram corretamente mais de 50% das amostras nos grupos propostos. Para os demais metais, o percentual de classificação correta não superou os 36%.

A análise do conjunto dos teores de elementos químicos para separação das amostras nos grupos propostos apresentou resultados bastante satisfatórios, classificando corretamente todas as amostras. Soma-se a isso, a probabilidade média de que as amostras tenham sido classificadas corretamente de 0,96 e o percentual de incerteza médio associado ao resultado da classificação nos grupos de 4,4%. Por outro lado, alguns grupos específicos, como A, E, F e H, tiveram o percentual de incerteza superiores a 5%, o que pode limitar as conclusões para o encaminhamento de decisões judiciais de maneira decisiva. Ainda assim, podem compor um conjunto de informações, com confirmações ou exclusões, que auxiliem na construção da convicção das decisões.

Nas amostras da parte aérea, os metais considerados na análise foram P, Ba, Al, Mg, S, Cu, Cr, Fe e Mn, e os demais desconsiderados por não contribuírem com o resultado. Assim, em complemento ao resultado da análise discriminante múltipla, pode-se mostrar a contribuição pela adição de cada um dos elementos selecionados em cada passo da análise. Esta análise segmentada é apresentada na Tabela 3.10, na qual observa-se a minimização do Wilks' Lambda e o incremento no percentual das amostras classificadas corretamente nos grupos propostos a cada passo da análise. O valor final alcançado de Wilks' Lambda de 0,0001, indica que este conjunto de variáveis selecionado explica praticamente 100% das diferenças entre os grupos

propostos.

As diferenças observadas entre os elementos considerados na análise para classifica as amostras de raiz (Cd, K, Ca, Mg, S, Cu, Al, Ba, Mn, Na e Pb) e as da parte aérea (P, Ba, Al, Mg, S, Cu, Cr, Fe e Mn) podem ter relação com a sua disponibilidade no solo e sua translocação no tecido vegetal (KAUTZ et al., 2013). Elementos altamente móveis na planta, como o Na e K, foram apontados somente nas raízes (PRIMAVESI & MALAVOLTA, 1980; IPNI, 2017), possivelmente pela diferença de absorção em função de sua disponibilidade nos solos. Na parte aérea, a elevada translocação, não resultou em variabilidade entre as amostras, conforme o ponto de cultivo.

Tabela 8. Teores médios e desvios padrões, entre parêntesis, dos elementos químicos no tecido da parte aérea de plantas de *Cannabis* em cada grupo de ponto de coleta e resultados do teste de comparação de média não paramétrico de Kruskal-Wallis para cada um dos elementos comparando o teor no tecido das plantas. Resultados em negrito, indicam diferenças significativas no teor de elementos no tecido vegetal da parte aérea a $p < 0,05$. O percentual de amostras de tecido de plantas corretamente classificado nos grupos de origem foi obtido pela análise discriminante.

Metal marcador	Teor dos elementos na parte aérea das plantas por grupos – média e desvio padrão (DP) em cada ponto de coleta								Kruskal-Wallis test		% Corret. Classif.
	A	B	C	D	E	F	G	H	p-value	H-value	
Al (mg kg ⁻¹)	1208 (1740)	243,83 (118,22)	96,90 (23,90)	334,25 (71,35)	295,15 (250,17)	125,78 (47,93)	264,23 (85,58)	57,44 (8,11)	0,0540	13,8	32,0
As (mg kg ⁻¹)	2,38 (1,05)	3,00 (0,52)	2,86 (0,97)	1,86 (1,74)	2,84 (0,88)	3,32 (0,64)	2,58 (0,70)	3,01 (0,54)	0,8406	3,4	12,0
Ba (mg kg⁻¹)	34,45 (14,64)	11,21 (3,00)	14,17 (9,13)	13,31 (3,54)	30,32 (15,49)	12,20 (2,50)	46,70 (18,62)	23,08 (11,11)	0,0296	15,5	20,0
Ca (g kg ⁻¹)	2,26 (0,90)	3,67 (0,17)	2,97 (0,23)	2,83 (0,83)	3,89 (1,46)	3,02 (0,67)	4,12 (1,00)	2,91 (0,59)	0,2100	9,5	24,0
Cd (mg kg ⁻¹)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,000	0,0	0,0
Co (mg kg ⁻¹)	0,20 (0,34)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,07 (0,10)	0,08 (0,18)	0,00 (0,00)	0,17 (0,29)	0,01 (0,01)	0,7672	4,1	20,0
Cr (mg kg ⁻¹)	1,59 (2,52)	0,03 (0,05)	0,36 (0,03)	0,65 (0,14)	0,15 (0,20)	0,22 (0,19)	0,39 (0,57)	0,00 (0,00)	0,1258	11,3	36,0
Cu (mg kg ⁻¹)	9,29 (4,06)	17,21 (5,46)	10,60 (3,48)	11,29 (1,85)	11,57 (3,24)	7,87 (1,29)	8,22 (1,72)	12,04 (1,95)	0,1391	11,0	28,0
Fe (mg kg ⁻¹)	904,03 (1203)	206,03 (64,13)	170,17 (17,96)	285,35 (7,00)	247,76 (152,93)	151,67 (24,45)	263,67 (78,00)	114,13 (4,84)	0,1001	12,0	28,0
K (g kg ⁻¹)	1,09 (0,54)	1,34 (0,16)	1,39 (0,04)	1,20 (0,21)	0,96 (0,33)	1,09 (0,08)	0,86 (0,15)	1,02 (0,22)	0,1316	11,2	16,0
Mg (g kg ⁻¹)	0,42 (0,17)	0,60 (0,04)	0,60 (0,08)	0,46 (0,10)	0,56 (0,16)	0,52 (0,06)	0,65 (0,11)	0,55 (0,05)	0,3517	7,8	28,0
Mn (mg kg ⁻¹)	176,23 (73,07)	371,00 (137,37)	284,00 (176,62)	214,80 (108,33)	351,22 (179,66)	234,00 (54,06)	460,30 (272,47)	242,43 (30,55)	0,4669	6,6	16,0
Na (mg kg⁻¹)	88,14 (53,33)	35,21 (4,74)	46,19 (12,40)	73,33 (12,90)	64,72 (26,42)	41,96 (8,46)	31,52 (7,94)	22,47 (4,58)	0,0213	16,4	24,0
Ni (mg kg ⁻¹)	3,26 (1,32)	3,90 (0,82)	2,87 (0,98)	1,89 (0,98)	5,22 (3,35)	1,33 (0,47)	3,10 (1,18)	4,01 (2,02)	0,0989	12,0	24,0
P (g kg ⁻¹)	0,33 (0,08)	0,40 (0,02)	0,45 (0,08)	0,60 (0,10)	0,32 (0,13)	0,35 (0,00)	0,51 (0,07)	0,45 (0,13)	0,0796	12,7	52,0
Pb (mg kg ⁻¹)	3,07 (0,49)	2,86 (0,56)	2,67 (0,57)	3,03 (0,42)	2,92 (0,53)	3,15 (0,25)	3,09 (0,69)	3,47 (0,58)	0,6681	4,9	20,0
S (g kg ⁻¹)	0,36 (0,14)	0,32 (0,02)	0,39 (0,09)	0,33 (0,01)	0,33 (0,06)	0,32 (0,06)	0,29 (0,04)	0,29 (0,03)	0,6475	5,1	16,0
Se (mg kg ⁻¹)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,000	0,0	0,0
V (mg kg ⁻¹)	2,42 (3,58)	0,17 (0,20)	0,00 (0,01)	0,42 (0,28)	0,42 (0,36)	0,18 (0,14)	0,40 (0,23)	0,06 (0,06)	0,0520	13,9	36,0
Zn (mg kg ⁻¹)	36,38 (11,92)	45,72 (0,47)	59,90 (11,38)	48,09 (24,42)	42,86 (8,91)	40,11 (2,24)	35,74 (7,12)	38,50 (5,09)	0,2063	9,7	28,0

Os elementos considerados praticamente imóveis no tecido vegetal, como o Ca (PRIMAVESI & MALAVOLTA, 1980; NUTRI-FATOS, 2017), também apareceram somente na análise das amostras de raízes, provavelmente devido a sua disponibilidade no solo. Estes teores não foram reprisados na parte aérea, em função da bastante reduzida ou ausente translocação.

Os elementos considerados móveis ou parcialmente móveis, como o P, S, Mn, Mg, Fe e Al (PRIMAVESI & MALAVOLTA, 1980; NUTRI-FATOS, 2017), na maioria dos casos, quando foram representativos para classificar as amostras de raiz, também foram para as da parte aérea, a exceção do Cu. Isso indica que a variabilidade decorrente da disponibilidade destes elementos no solo, absorvida pelas raízes e translocada para a parte aérea tende a se repetir, podendo ser indicadores mais apropriados do local de cultivo das plantas.

Em todas as subdivisões de amostras propostas (solo, solo rizosférico, raiz e parte aérea), os resultados mostraram que a variabilidade nos teores de metais analisados isoladamente teria condições de agrupar corretamente mais de 60% das amostras, de acordo com os locais de coleta. Dessa forma, como não se verificou a presença de um único metal traçador com capacidade para identificar o grupo ou ponto de coleta/cultivo da planta correto, somente a análise do conjunto de variáveis tem condições de indicar essa informação com mais exatidão. Em cada uma das subdivisões de amostras analisadas, foi selecionado o conjunto de metais que melhor classificou as amostras nos grupos propostos, o que pode ser modificado, à medida que novas amostras ou novos grupos/locais de coleta forem adicionados na análise.

Além disso, a análise do conjunto de variáveis disponíveis mostrou a capacidade em classificar corretamente as amostras, chegando a 100% no caso da raiz e da parte aérea. Assim, nota-se que a variabilidade presente nas estruturas da planta, que associa as características do solo com as condições ambientais, tem melhores condições de indicar o local de cultivo ou rastreabilidade das plantas, conforme a análise por agrupamento proposta.

Tabela 9. Resultado da análise discriminante múltipla para as amostras da parte aérea da planta, mostrando o percentual de classificação correta das amostras para os grupos propostos, a probabilidade média das amostras pertencerem ao grupo definido e o percentual de incerteza na classificação das amostras nos seus devidos grupos.

GRUPO/Local de coleta	Número de amostras classificadas em cada grupo								Classificação correta (%) / Média
	A	B	C	D	E	F	G	H	
A	3	0	0	0	0	0	0	0	100
B	0	3	0	0	0	0	0	0	100
C	0	0	3	0	0	0	0	0	100
D	0	0	0	2	0	0	0	0	100
E	0	0	0	0	5	0	0	0	100
F	0	0	0	0	0	3	0	0	100
G	0	0	0	0	0	0	3	0	100
H	0	0	0	0	0	0	0	3	100
Total	3	3	3	2	5	3	3	3	100
Classificação correta (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Incerteza associada com a classificação das amostras (%)	5,91	4,11	0,15	1,53	7,47	5,18	1,86	9,35	4,4

Tabela 3.10. Resultado dos passos da análise discriminante com a introdução de um elemento químico, a redução do Wilks' Lambda e aumento no percentual de amostras corretamente classificadas.

Passos	Metal marcador	Wilks' Lambda	P to remove	% de amostras corretamente classificadas acumulado
1	P	0,4529	0,0307	52,0
2	Ba	0,1904	0,0047	68,0
3	Al	0,1127	0,0067	72,0
4	Mg	0,0800	0,0197	72,0
5	S	0,0372	0,0094	76,0
6	Cu	0,0142	0,0025	88,0
7	Cr	0,0042	0,0003	96,0
8	Fe	0,0016	0,0001	100,0
9	Mn	0,0001	1,68E-07	100,0

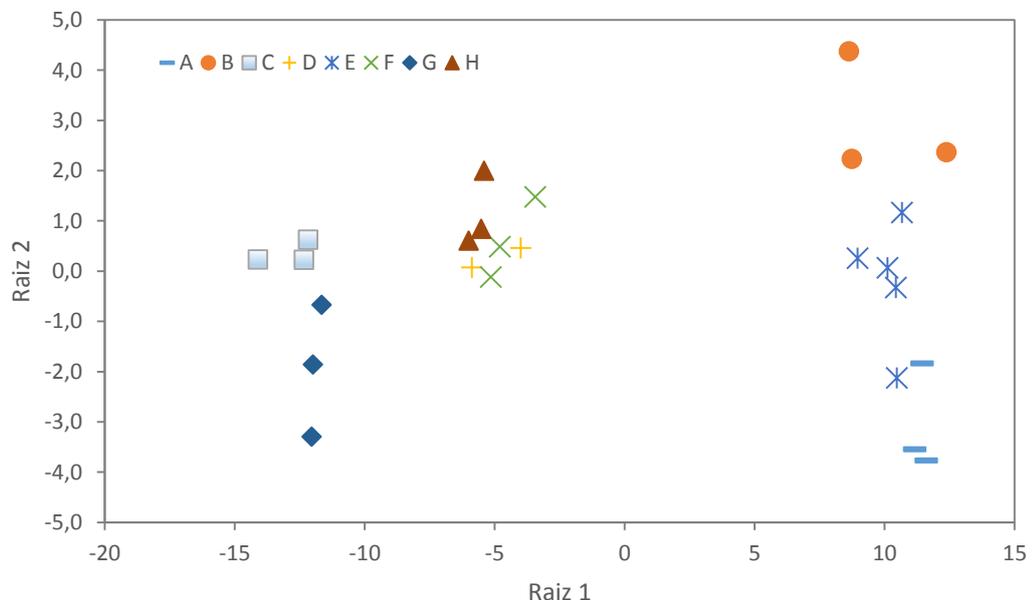


Figura 12. Dispersão bidimensional do conjunto dos primeiros e segundos coeficientes canônicos (raiz 1 e raiz 2) obtidos a partir da análise de função discriminante para o teor de elementos da parte aérea de plantas, de acordo com o ponto coleta ou local de cultivo de *Cannabis*.

3.3.2. Amostras do Nordeste versus Amostras cultivadas em vaso

Nesta etapa da análise, as amostras coletadas no Nordeste (NE) foram confrontadas com as amostras das plantas cultivadas em vasos (SEM), a partir de sementes encaminhadas para exames periciais. Estas plantas se desenvolveram em ambiente adaptado e controlado, no interior do prédio da Polícia Federal no Rio Grande do Sul.

No caso das plantas cultivadas indoor, foram obtidas e preparadas 49 amostras somente do tecido vegetal da parte aérea para às análises dos teores de metais. Dessa forma, as 25 amostras da parte aérea das plantas do Nordeste formaram um grupo único, e foram analisadas frente as 49 amostras, também de parte aérea, das plantas cultivadas indoor.

A análise das médias dos teores de cada elemento químico individualmente, apresentada na tabela 3.11, mostra variabilidade significativa para a maioria dos metais que foram Al, As, Ba, Ca, Cr, K, Mg, Mn, Mo, Ni, P, Pb, S, Se, V e Zn. A análise indicou ainda que somente com o uso da variabilidade nos teores de K e Mg seria possível classificar corretamente 100% das amostras nos dois grandes grupos propostos.

Com a finalidade de reduzir o erro associado na predição do local de cultivo ou origem das amostras, foi realizada a análise discriminante linear do conjunto de variáveis disponíveis, apresentada na tabela 3.12. Esta análise da função discriminante classificou corretamente 100% das amostras e selecionou o grupo mínimo de variáveis capaz de maximizar a separação das amostras nos grupos propostos que foi composto pelo P, Ca, Mg, Se e As.

O resultado pela adição de cada um dos elementos selecionados em cada passo da análise está apresentado na tabela 3.13. A cada elemento adicionado na análise, observa-se principalmente a minimização do Wilks' Lambda, que está associado à redução na incerteza da análise, uma vez que o percentual das amostras classificadas corretamente nos grupos propostos atinge 100%, já no segundo passo. O valor final alcançado de Wilks' Lambda de 0,0241, indica que este conjunto de variáveis selecionado explica cerca de 97,6 % das diferenças entre os grupos propostos.

Tabela 11. Teores médios e desvios padrões, entre parêntesis, dos elementos químicos no tecido da parte aérea de plantas de *Cannabis* em cada grupo de origem e resultados do teste de comparação de média não paramétrico de Kruskal-Wallis para cada um dos elementos comparando o teor no tecido das plantas. Resultados em negrito, indicam diferenças significativas no teor de elementos no tecido vegetal da parte aérea a $p < 0,05$. O percentual de amostras de tecido de plantas corretamente classificado nos grupos de origem foi obtido pela análise discriminante.

Metal marcador	Teor dos elementos no solo dos grupos – média (DP) em cada grupo		Kruskal-Wallis test		% Corret. Classif.
	NE	SEM	p-value	H-value	
Al (mg kg ⁻¹)	325,29 (619,91)	83,66 (95,66)	<0,0001	22,1	74,3
As (mg kg ⁻¹)	2,77 (0,83)	12,92 (10,42)	<0,0001	49,0	74,3
Ba (mg kg ⁻¹)	24,15 (15,87)	2,12 (2,06)	<0,0001	47,6	90,5
Ca (g kg ⁻¹)	3,28 (0,99)	47,06 (11,44)	<0,0001	49,0	98,6
Cd (mg kg ⁻¹)	0,00 (0,00)	0,02 (0,07)	0,1448	2,1	39,2
Co (mg kg ⁻¹)	0,07 (0,17)	0,12 (0,48)	0,3411	0,90	35,1
Cr (mg kg ⁻¹)	0,39 (0,90)	1,41 (2,66)	0,0076	7,1	54,0
Cu (mg kg ⁻¹)	11,05 (3,88)	11,01 (4,51)	0,6111	0,2	44,6
Fe (mg kg ⁻¹)	289,54 (426,51)	185,06 (114,16)	0,1830	1,8	64,9
K (g kg ⁻¹)	1,10 (0,29)	31,12 (7,77)	<0,0001	49,0	100,0
Mg (g kg ⁻¹)	0,55 (0,12)	8,30 (1,52)	<0,0001	49,0	100,0
Mn (mg kg ⁻¹)	299,58 (157,77)	159,56 (164,64)	<0,0001	16,3	68,9
Mo (mg kg ⁻¹)	0,00 (0,00)	0,96 (0,94)	<0,0001	26,7	74,3
Na (mg kg ⁻¹)	50,67 (28,89)	54,11 (97,74)	0,0718	3,2	36,5
Ni (mg kg ⁻¹)	3,41 (2,05)	2,24 (1,76)	0,0054	7,7	60,8
P (g kg ⁻¹)	0,41 (0,12)	5,56 (1,73)	<0,0001	49,0	98,6
Pb (mg kg ⁻¹)	3,02 (0,50)	0,53 (2,81)	<0,0001	53,2	95,9
S (g kg ⁻¹)	0,33 (0,06)	2,30 (1,11)	<0,0001	28,0	89,2
Se (mg kg ⁻¹)	0,00 (0,00)	7,46 (18,13)	<0,0001	30,6	70,3
V (mg kg ⁻¹)	0,51 (1,28)	0,06 (0,37)	<0,0001	48,3	77,0
Zn (mg kg ⁻¹)	43,18 (11,04)	71,29 (28,75)	<0,0001	20,9	68,9

Tabela 12. Análise discriminante múltipla para as amostras da parte aérea da planta, mostrando o percentual de classificação correta das amostras para os grupos propostos, a probabilidade média das amostras pertencerem ao grupo definido e o percentual de incerteza na classificação das amostras nos seus devidos grupos.

GRUPO/Local de coleta	Número de amostras classificadas em cada grupo		Classificação correta (%) / Média
	NE	SEM	
NE	25	0	100
SEM	0	49	100
Total	25	49	100
Classificação correta (%)	100	100	100
Incerteza associada com a classificação das amostras (%)	0,00	0,00	0,0

Tabela 13. Resultado dos passos da análise discriminante com a introdução de um elemento químico, a redução do Wilks' Lambda e aumento no percentual de amostras corretamente classificadas.

Passos	Metal marcador	Wilks' lambda	P to remeove	% de amostras corretamente classificadas acumulado
1	P	0,2472	<0,0001	98,5
2	Ca	0,0505	<0,0001	100,0
3	Mg	0,0304	<0,0001	100,0
4	Se	0,0303	<0,0001	100,0
5	As	0,0241	<0,0001	100,0

A representação gráfica, realizada pela utilização dos coeficientes canônicos referentes às variáveis da função linear obtidos para cada amostra, mostra claramente a separação das amostras nos grupos definidos, bem como a distância entre eles.

A análise do teor de metais nas amostras do tecido vegetal da parte aérea das plantas nos dois grandes grupos propostos – cultivos a campo no Nordeste e cultivos em vaso indoor – em um conjunto de 74 amostras, apresentou resultados que possibilitam a sua separação com elevada confiabilidade. A correta classificação, associada a baixos níveis de incerteza, das amostras de maconha avaliadas nos devidos grupos propostos, de acordo com suas respectivas composições de elementos químicos no tecido vegetal, mostra que este é um parâmetro a ser observado na tentativa de relacionar as características das plantas ao seu local de cultivo ou sua origem. Além disso, verifica-se que a análise estatística utilizada foi adequada para classificação das amostras nos grupos previamente estabelecidos.

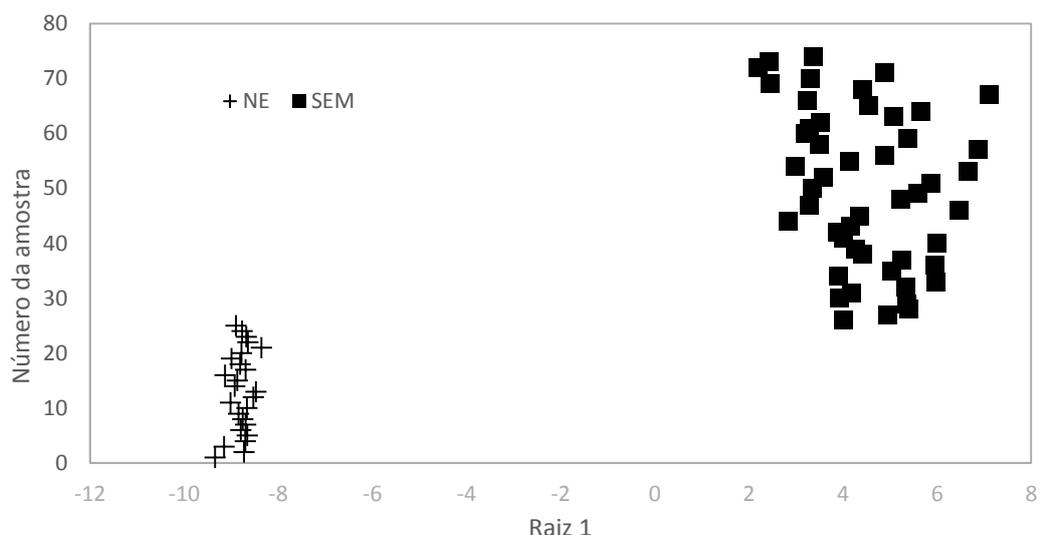


Figura 13. Dispersão bidimensional do conjunto dos coeficientes canônicos (raiz 1) obtidos a partir da análise de função discriminante para o teor de elementos da parte aérea de plantas de *Cannabis*, de acordo com a origem, Nordeste e cultivo em vaso, em função do número da amostra.

A possibilidade de submeter uma amostra apreendida desconhecida e, a partir de sua composição química elementar, identificar a sua procedência, ainda que em grandes grupos de plantios a campo e cultivos indoor, é de grande valia para a justiça e investigação. Estes resultados, podem direcionar com mais precisão as rotas de tráfico, bem como inserir ou excluir suspeitos de crimes pela justiça.

3.4. Conclusões

A análise foi realizada em duas etapas, sendo a primeira somente com as amostras obtidas no Nordeste, as quais foram subdivididas em solo, solo rizosférico, raiz e parte aérea, e a segunda com as amostras do Nordeste e as amostras oriundas de plantas cultivadas, a partir de sementes encaminhadas a exame pericial, em ambiente controlado (*indoor*) na Polícia Federal do Rio Grande do Sul. Para as amostras do Nordeste, o processamento estatístico com vistas à rastreabilidade, buscou classificar corretamente as amostras, conforme o local de cultivo ou ponto de coleta. A análise reunindo as amostras do Nordeste e as cultivadas indoor, também no intuito de identificação da origem, tratou de classificar as amostras nestes dois grandes grupos.

Em todas as análises das amostras do Nordeste, não se verificou a presença de um único metal traçador com capacidade para identificar o grupo ou ponto de coleta/cultivo da planta correto, somente a análise do conjunto de variáveis teve condições de classificar corretamente as amostras de raízes e da parte aérea.

Os resultados obtidos demonstram que a composição de elementos químicos no tecido vegetal das plantas de *Cannabis*, tanto da raiz quanto da parte aérea, pode ser usada como indicador do local de cultivo ou origem. Nota-se que o ambiente de cultivo é capaz de marcar as plantas com um perfil de elementos químicos característico que pode identificar sua origem.

4. USO DAS RELAÇÕES ISOTÓPICAS DE $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ E $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ PARA RASTREAR O LOCAL DE CULTIVO DE PLANTAS DE MACONHA NO NORDESTE BRASILEIRO

4.1. Introdução

A maconha continua sendo a substância ilícita mais utilizada no mundo, segundo o relatório da UNODC (2015), embora tenha havido uma redução no crescimento de usuários de *Cannabis* quando comparado com as previsões de 2009. Os esforços dos agentes de segurança pública brasileiros, entre eles a Polícia Federal (Item II do Par. 1º do Art. 144 da Constituição Federal), estão direcionados para o combate do tráfico por meio de investigações baseadas em informação e inteligência. Este órgão, através de operações para conter traficantes e apreender drogas, inclusive com ações de erradicação de plantas nas áreas de cultivo, apreendeu mais de 220 toneladas de maconha e erradicou cerca de 800 mil plantas no sertão da Bahia e Pernambuco (Boletins CGPRE – Coordenação Geral de Polícia de Repressão a Entorpecentes – Junho/2013; Informativo DPF –Outubro/2013).

A estimativa nos níveis globais de produção e cultivo de maconha é de difícil diagnóstico, já que em praticamente todos os locais pode haver a produção da planta e, muitas vezes, o mercado consumidor está bem próximo de sua origem. Contribuem para esta situação a produção “indoor”, em ambientes fechados e controlados (simples ou bastante tecnificados), e os recentes processos de liberalização da maconha para uso medicinal ou recreativo, originando a existência de cultivos “legais”.

A possibilidade de identificar a origem de drogas apreendidas e, conseqüentemente, de traçar rotas de deslocamento e distribuição dos

entorpecentes é uma informação valiosa na investigação e combate ao tráfico. No caso de materiais vegetais como a *Cannabis*, diferentemente de drogas processadas ou semissintéticas, a identificação de marcadores pode estar associada ao ambiente e condições de cultivo, o que remete à sua origem. Além disso, o desenvolvimento de metodologia científica, capaz de configurar como prova pericial, a origem de determinado entorpecente apreendido, relacionando o produto a sua área física de produção, poderia trazer desdobramentos legais, tais como o confisco de terras utilizadas com o tráfico (Parágrafo Único do Art. 243 da Constituição Federal).

Um dos parâmetros mais largamente utilizados como indicativos da origem de drogas são a composição isotópica de carbono e nitrogênio, uma vez que, juntamente com o H, O e S, estão presentes em diversos processos bioquímicos, sendo importantes traçadores biológicos. Isótopos são átomos que contêm o mesmo número de prótons e diferentes números de nêutrons, apresentando diferenças nas características físicas, químicas e bioquímicas por possuírem massas diferentes (SHIBUYA, 2005).

Nas plantas, o principal mecanismo de fixação e de fracionamento do C é a fotossíntese, pela qual ocorre a apropriação do carbono atmosférico (CO₂) para formas orgânicas reduzidas. Este processo envolve mecanismos fotoquímicos influenciados pela luminosidade, processos enzimáticos e processos de difusão, que são as trocas de CO₂ e O₂ entre o cloroplasto e a atmosfera. Todas estas etapas e transformações são influenciadas por fatores internos e externos, como temperatura, fotoperíodo e umidade, o que reflete na relação dos isótopos estáveis de C¹³/C¹² (SHIBUYA, 2007).

O nitrogênio apresenta dois isótopos estáveis, o N¹⁴ e o N¹⁵, sendo suas abundâncias na atmosfera praticamente constantes. No solo, o N está relacionado à fonte de nitrogênio que pode ser originada da atmosfera pela fixação microbiológica, pela decomposição da matéria orgânica e pela adição de fertilizantes industriais. As diferentes fontes de N no solo representada pelos valores obtidos na relação N¹⁵/N¹⁴, associada à sua mobilidade neste sistema, embora muitas vezes não caracterize o local de origem de forma inequívoca, podem trazer indícios sobre as condições de cultivo das plantas (SHIBUYA, 2007).

O uso de relações isotópicas para avaliar a rastreabilidade da maconha foi testado em amostras apreendidas em São Paulo (SHIBUYA et al., 2007). Entretanto, estes autores conseguiram identificar primariamente apenas as regiões em relação a algumas poucas variáveis ambientais e com aplicação limitada para uma proposta de rastreabilidade. Resultados mais recentes (WEST et al., 2009) demonstram que é possível refinar a técnica isotópica para obter melhores resultados de procedência. Estes autores utilizaram a relação Sr87/Sr86 de amostras de maconha cultivada em 79 municípios americanos. Os resultados indicaram que o isótopo estrôncio pode identificar as origens geográficas de maconha. No Alasca, onde a dificuldade de controlar o tráfico e a produção é maior, Booth et al. (2010) analisaram vários isótopos estáveis (C, N, O e H) de maconha apreendida e identificaram 56 amostras cultivadas neste estado. As análises de relações isotópicas permitiram inclusive avaliar algumas condições especiais de cultivo.

Dessa forma, o presente capítulo tem o objetivo verificar a relação isotópica de C e N de amostras de tecido vegetal de plantas de *Cannabis* como indicador da origem do local de cultivo, no intuito de testar ferramentas que sejam úteis na classificação de amostras de acordo com suas origens.

4.2. Material e métodos

As amostras de *Cannabis* analisadas foram obtidas na Região Nordeste do Brasil, mais especificamente em áreas do sertão da Bahia e Pernambuco, próximas ao Rio São Francisco. As amostras foram coletadas durante operações de erradicação de maconha realizadas pela Polícia Federal em 2014 e 2015, seguindo as restrições de deslocamento, segurança e tempo adequadas ao trabalho policial. Nestas ocasiões, foi possível coletar, foram coletadas, pelo menos, 3 amostras compostas de folhas e partes de inflorescências, quanto presentes nas plantas, em oito locais distintos de cultivo. As amostras obtidas foram secas a temperatura ambiente e finamente trituradas. No processo de preparo das amostras, verificou-se a falta de material suficiente em alguns pontos, bem como o descarte de material sem condições de análise. Assim, foram levadas à análise 24 (vinte e quatro) amostras de 8 pontos ou locais de cultivo distintos. A identificação dos pontos de coleta, as respectivas coordenadas geográficas e o município em que estão localizados, bem como a

imagem representando suas distâncias espaciais, são apresentadas na tabela 4.1.

Tabela 14. Identificação e localização das amostras coletadas no Nordeste, indicando os grupos propostos para a análise estatística.

ID	GRUPO	COORDENADA GEOGRAFICA		MUNICÍPIO
		LONG	LAT	
1	A	39°42'26,6"O	8°46'59,5"S	Santa Maria da Boa Vista/PE
2	A	39°42'26,6"O	8°46'59,5"S	Santa Maria da Boa Vista/PE
3	A	39°42'26,6"O	8°46'59,5"S	Santa Maria da Boa Vista/PE
4	B	42°22'1,0"O	10°5'2,0"S	Pilão Arcado/PE
5	B	42°22'1,0"O	10°5'2,0"S	Pilão Arcado/PE
6	B	42°22'1,0"O	10°5'2,0"S	Pilão Arcado/PE
7	C	40°19'27,1"O	9°21'11,1"S	Petrolina/PE
8	C	40°19'27,1"O	9°21'11,1"S	Petrolina/PE
9	D	40°39'59,9"O	8°20'30,0"S	Santa Filomena/PE
10	D	40°39'59,9"O	8°20'30,0"S	Santa Filomena/PE
11	E	39°29'30,6"O	8°35'20,8"S	Orocó/PE
12	E	39°29'30,6"O	8°35'20,8"S	Orocó/PE
13	E	39°29'30,6"O	8°35'20,8"S	Orocó/PE
14	E	39°29'30,6"O	8°35'20,8"S	Orocó/PE
15	E	39°29'30,6"O	8°35'20,8"S	Orocó/PE
16	E	39°29'30,6"O	8°35'20,8"S	Orocó/PE
17	F	39°16'45,2"O	8°33'34,0"S	Cabrobó/PE
18	F	39°16'45,2"O	8°33'34,0"S	Cabrobó/PE
19	F	39°16'45,2"O	8°33'34,0"S	Cabrobó/PE
20	G	39°39'12,8"O	8°30'21,0"S	Orocó/PE
21	G	39°39'12,8"O	8°30'21,0"S	Orocó/PE
22	H	39°32'5,1"O	8°36'7,9"S	Orocó/PE
23	H	39°32'5,1"O	8°36'7,9"S	Orocó/PE
24	H	39°32'5,1"O	8°36'7,9"S	Orocó/PE

As amostras foram analisadas por espectrômetro de massas de razão isotópica (IRMS) Delta V Advantage, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany, acoplado a um analisador elementar FlashEA 2000, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany, instalado no Laboratório de Solos da Universidade Federal de Santa Maria. As relações isotópicas de $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ e $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ são mensuradas após a separação das moléculas, de acordo com as massas dos isótopos, em seguida comparadas com as razões de calibração utilizadas por referências internacionais. Resultados são expressos em relação aos desvios das razões isotópicas quando comparadas com os padrões (SHIBUYA et al, 2007).

$$\delta X_{\text{sample}}(\text{‰}) = [R_{\text{amostra}}/R_{\text{padrão}} - 1]1000,$$

onde: R representa $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ou $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$.

O tratamento estatístico dos dados foi realizado, primeiramente pela aplicação do teste de comparação de médias de Kruskal-Wallis H nas relações isotópicas obtidas para cada amostra. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise discriminante no modo “backward”, em que são eliminadas as variáveis que não contribuem com o modelo, utilizando os pontos de coleta ou local de cultivo como variável dependente e não-métrica (grupos previamente definidos) e a relação isotópica obtida em cada amostra do tecido vegetal como variáveis independentes. A função discriminante múltipla é baseada no valor de Wilks' Lambda (Λ^*) originado na análise de variância multivariada, no qual o critério utilizado no modelo estatístico é a minimização do Λ^* . O Λ^* se aproxima de “1”, quando todos os grupos definidos parecem semelhantes, enquanto que valores baixos de Λ^* , indicam que a variabilidade dentro dos grupos é menor que a variabilidade total do conjunto das amostras.

O Wilks' Lambda (Λ^*) é calculado pela equação (TIECHER et al., 2017),

$$\Lambda^* = \frac{|W|}{|B+W|}$$

onde,

$|W|$ = determinante da matriz da soma dos quadrados em função do erro;

$|B + W|$ = determinante da matriz do total da soma dos quadrados.

Cada passo da análise visa a minimização do resultado geral do Wilks' Lambda. A máxima significância do teste F para incluir a variável na análise foi de 0,05, assim como a mínima significância do F para retirar a variável da análise foi de 0,05. Os dados foram processados no Software Statistica, version 12, Statsoft Inc.

4.3. Resultados e discussão

As diferenças nas relações isotópicas $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ e $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, agrupadas pelo local de cultivo e coleta das amostras, está apresentada na tabela 4.2. O teste estatístico de Kruskal-Wallis realizado para cada uma destas razões isotópicas mostrou-se significativo, ao nível de significância de $p < 0,05$, para ambas variáveis. Entretanto, o percentual das amostras corretamente

classificados foi relativamente baixo, sendo observado 25% para a relação isotópica do N e pouco mais de 33% para a do C.

Tabela 15. Médias e desvios padrões, entre parêntesis, das relações isotópicas no tecido vegetal de plantas de *Cannabis* em cada grupo de ponto de coleta e resultados do teste de comparação de média não paramétrico de Kruskal-Wallis para cada uma das relações. Resultados em negrito, indicam diferenças significativas na relação isotópica a $p < 0,05$. O percentual de amostras de plantas corretamente classificado nos grupos de origem foi obtido pela análise discriminante.

Relação isotópica	Relação isotópica no tecido vegetal das plantas por grupos – média e desvio padrão (DP)								Kruskal-Wallis test		% Corret. Classif.
	A	B	C	D	E	F	G	H	p-value	H-value	
15N/14N	1,37 (4,00)	-4,79 (2,55)	-3,67 (0,83)	-3,12 (2,51)	3,33 (2,08)	3,24 (0,27)	4,35 (1,17)	3,55 (0,85)	0,0409	14,6	25,0
13C/12C	-30,16 (1,43)	-28,29 (0,37)	-25,83 (0,57)	-27,45 (1,07)	-27,54 (0,81)	-27,32 (0,67)	-28,19 (0,58)	-28,10 (0,40)	0,0267	15,8	33,3

A análise discriminante múltipla, envolvendo as duas razões isotópicas consideradas, foi realizada com a finalidade de verificar a potencialidade do conjunto das variáveis agrupar corretamente as amostras. Os resultados obtidos, apresentados na tabela 4.3, mostraram que somente um grupo (grupo C) teve as amostras classificadas corretamente. Todos os demais tiveram amostras associadas a grupos equivocados, sendo que dois grupos (D e G) não tiveram nenhuma amostra classificada corretamente.

Tabela 16. Resultado da análise discriminante múltipla para as amostras da planta, mostrando o percentual de classificação correta das amostras para os grupos propostos, a probabilidade média das amostras pertencerem ao grupo definido e o percentual de incerteza na classificação das amostras nos seus devidos grupos.

GRUPO/Local de coleta	Número de amostras classificadas em cada grupo								Classificação correta (%) / Média
	A	B	C	D	E	F	G	H	
A	2	1	0	0	0	0	0	0	66,7
B	0	2	0	1	0	0	0	0	66,7
C	0	0	2	0	0	0	0	0	100,0
D	0	1	1	0	0	0	0	0	0,0
E	0	0	0	0	1	3	1	1	16,7
F	0	0	0	0	2	1	0	0	33,3
G	0	0	0	0	1	0	0	1	0,0
H	0	0	0	0	0	0	1	2	66,7
Total	2	4	3	1	4	4	2	4	41,7
Classificação correta (%)	67	67	100	0	17	33	0	67	44
Incerteza associada com a classificação das amostras (%)	31,0	26,1	13,5	80,3	73,2	68,0	70,3	69,7	54,0

O tratamento estatístico utilizado realiza combinações que podem levar a exclusão de variáveis independentes que não contribuem com a separação das amostras de acordo com os grupos proposto. Neste caso, as

duas variáveis foram consideradas na análise, já que a sua combinação trouxe um aumento no número de amostras classificadas corretamente, que chegou próximo a 42%, como pode ser observado na análise segmentada apresentada na tabela 4.4. Esta tabela mostra ainda a redução no Wilks' Lambda com o acréscimo da segunda variável que é um dos objetivos da análise discriminante múltipla.

Tabela 17. Resultado dos passos da análise discriminante com a introdução de uma relação isotópica, a redução do Wilks' Lambda e aumento no percentual de amostras corretamente classificadas.

Passos	Relação isotópica	Wilks' lambda	P to remove	% de amostras corretamente classificadas acumulado
1	15N/14N	0,222199	0,000236	25,0
2	12C/13C	0,049904	0,000001	41,7

Os resultados obtidos mostraram que as variações nas relações isotópicas de N e C não foram apropriadas para separar adequadamente as amostras, nas condições em que foram obtidas, de acordo com o seu local de cultivo. Nota-se que, além do percentual de classificação correta não atingir 50% das amostras, o percentual de incerteza associado à análise foi de 54% (tabela 4.3). A representação gráfica, apresentada na figura 4.2, obtida pelas duas primeiras variáveis da função linear dos coeficientes canônicos, também mostra uma sobreposição de amostras de diferentes pontos de cultivo, sem a formação dos agrupamentos propostos.

Estes resultados divergem dos apresentados por Shibuya (2007), possivelmente pela proximidade dos pontos de cultivo ou coleta das amostras, obtendo-se um conjunto de amostras com origem bastante semelhante. Como as relações isotópicas representam as condições ambientais, essencialmente de temperatura, fotoperíodo, umidade e solo, e, em menor proporção, as formas de manejo, as diferenças porventura existentes não foram suficientes para apontar corretamente pontos relativamente próximos (figura 4.1). Além disso, o número de amostras analisado foi extremamente pequeno e foram coletadas de plantas em diferentes estádios de desenvolvimento, o que pode influenciar a relação isotópica de forma mais significativa do que os próprios locais de cultivo.

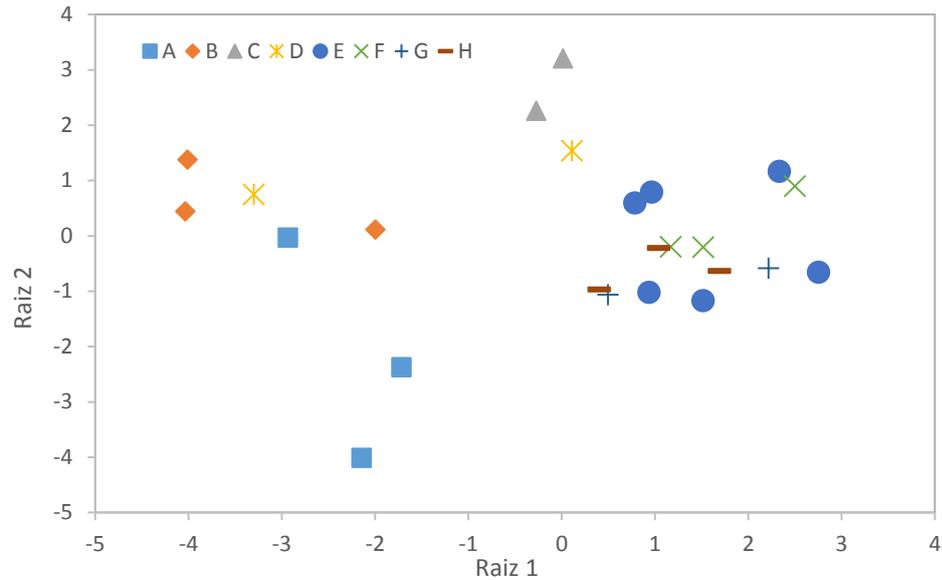


Figura 14. Gráfico de dispersão bidimensional do conjunto dos primeiros e segundos coeficientes canônicos (raiz 1 e raiz 2) obtidos a partir da análise de função discriminante para a relação isotópica do tecido vegetal de plantas de *Cannabis*, de acordo com o local de cultivo.

Dessa forma, as variações nas relações isotópicas de N e C não apresentaram resultados satisfatórios que indiquem a sua utilização como indicadores de origem para amostras de maconha cultivadas na Região Nordeste do Brasil. Caso estas amostras sejam confrontadas com amostras de regiões distantes ou distintas, tais como cultivos paraguaios ou de plantas de composição genética europeia, estas variáveis possam trazer bons resultados, inclusive para aplicação forense e policial.

4.4. Conclusões

Nenhuma das relações isotópicas (N15/N14 e C13/C12) foi capaz de classificar corretamente as amostras de plantas de *Cannabis* analisadas. Assim, pode-se concluir que, nas condições do presente estudo, as relações isotópicas de N e C das amostras do tecido vegetal de *Cannabis* não foram apropriadas para uso como indicador do local de cultivo das plantas oriundas da Região Nordeste do Brasil.

5. A *Cannabis sativa* 13-LOCI STR MULTIPLEX SYSTEM TO GENOTYPE BRAZILIAN SEIZURES

5.1. Introduction

Cannabis continues to be the most widely cultivated, produced, trafficked and consumed drug worldwide. Reports by Member States over the period 2009-2014 indicate that South America countries, Colombia and Paraguay, are important source of the *Cannabis* herb sold in international markets. The Brazilian Federal Police (BFP) is acting to eradicate drugs, however no detailed studies about *Cannabis* production, distribution and consumption in Brazil are available. It is known that *Cannabis* in Brazil could be originated from Paraguay or cultivated in Brazil. The South, Southeast and West Central of Brazil are supplied by *Cannabis* cultivated in Paraguay. According to the National Anti-Drug Secretariat's (*Secretaria Nacional Antidrogas* - SENAD), Brazil receives 85% of the whole production of *Cannabis* in Paraguay (MOREIRA, 2005). While Center South of Brazil are supplied by Paraguay, Northeast and North are supplied by a national production of marijuana. A region on Northeast of Brazil is an important *Cannabis* producer, known as the Marihuana Polygon (*Poligono da Maconha*) due to the numerous *Cannabis* plantations. Marihuana Polygon is located between Bahia and Pernambuco states, comprising Petrolina, Juazeiro, Cabrobró, Salgueiro, Floresta and other cities, the São Francisco river basin and north of Bahia State (MOREIRA, 2005). Approximately 40 thousand workers are estimated to be directly and indirectly involved in *Cannabis* plantation, while the marihuana economy reportedly moves around \$52 thousand annually in this region (FRAGA, 2014).

Although, in recent years the form of *Cannabis* drug trafficking has been changing and the BFP has exponentially increased the number of seizures

of *Cannabis* seeds sent by the mail. This change in the *Cannabis* trafficking scenario may be occurring due to BFP efforts to eradicate the large-scale cultivation of the plant on farms and the change of the outdoor setting for indoor cultivation, a tendency also observed in Europe (UNODC, 2015; DE BACKER et al., 2012). Additionally, licitly and illicitly produced *Cannabis* in jurisdictions that have legalized recreational *Cannabis* use can be used to supply the illicit *Cannabis* markets of neighboring jurisdictions, although the extent to which smuggling has increased as a result of *Cannabis* legalization is difficult to evaluate. Likewise, officials in Argentina and Brazil voiced concern following the legalization of *Cannabis* use in Uruguay (UNODC, 2016). Despite its importance cultivation as a source of food, fibre and medicine, and its global status as the most used illicit drug, the genus *Cannabis* has an inconclusive taxonomic organization and evolutionary history (SAWLER et al. 2015). As academic and commercial interest grows, governments and the research community will encounter a rising demand for taxonomic information to help resolve disputes, establish registered cultivars, and create reliable centralized databases of *Cannabis* information (LAURSEN et al., 2015).

Clonal and sexual propagation are the two usual ways to cultivated *Cannabis*. Clonal propagation results in plants genetically identical (MILLER COYLE et al., 2003), which facilitates DNA analysis to link the seizure drug and the region where the plant was cultivated. Unfortunately, the clonal propagation is not the method adopted by illegal cultivation in South America. The BFP operations verified the presence of seeds probably to generate new plantations in the same region or other regions. However, those plantations are located in remote and very small places making difficult to police tracking, so the plants resulting by seeds could still be tracked back by DNA analysis.

Since the sequenced analysis of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (rbcL) gene did not differentiate twelve (12) *Cannabis* seizures samples on southeast of Brazil (RIBEIRO et al., 2013). Moreover, many studies had been using Short Tandem Repeats (STR) to genotype *Cannabis* for forensic purpose and had found promising results (GILMORE, PEAKALL e ROBERTSON, 2003; HOWARD et al., 2008; HOWARD et al., 2009; KÖHNEMANN et al., 2012). Though, Houston et al. (2015) following the International Society of Forensic Genetics (ISFG) and Scientific Working Group

for the Analysis of Seized Drugs (SWGDM) guidelines demonstrated the applicability of a 13 loci STR system for *Cannabis sativa*.

The present study aimed to use the 13-loci STR multiplex system proposed by Houston et al (2015) to evaluate the power of such markers in geographically characterize *Cannabis sativa* samples from different origins, seized in Brazil by the BPF.

5.2. Material and methods

Cannabis Samples

From Northeastern of Brazil were obtained thirty-six (36) *Cannabis* samples. Twenty-four (24) plants from eight different locations, at least two plants per location, were seized in 2015, and twelve (12) *Cannabis* plants from four different locations, three plants per location, were seized in 2017. Additionally, thirty-one (31) *Cannabis* samples from plants cultivated by Brazilian Federal Police (BFP) from mail seized seeds were also collected. Individual *Cannabis* stem and/or flowers fragments were cut for those 31 samples. The brands of the seeds were identified by their label: Northern Light, Special Kush, Special Queen #1, Royal Bluematic, Sour Diesel, Blue Mystic, Royal Caramel, Cream Caramel Auto, Souvenir, and Dutch Passion. Some seeds were not labeled. Finally, five (05) pressed *Cannabis* samples seized on South of Brazil were obtained, in this case individual plant could not be collected. All seventy-two (72) samples analyzed on the present study were seized and/or cultivated by the BFP. All samples were dried naturally at room temperature, any preparation were done.

DNA Isolation and Quantification

The DNA extraction was performed using DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) and Dneasy mericon Food Kit (Qiagen, Valencia, CA) following the manufacturer's protocol (1; 2), except for the initial amount of sample on Dneasy mericon Food Kit that were used ≤ 20 mg instead of ≤ 200 mg. The DNA purity and concentration was assessed by absorbance measurements using a NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). For integrity evaluation, 1 μ g of DNA was migrated by electrophoresis (20 min at 80 V) in denaturing agarose gel (0,8% agarose, 1 \times TBE) stained with GelRed (Biotium, Hayward, CA). The *Cannabis* DNA samples concentration were quantified by Qubit dsDNA HS Assay Kit

(Invitrogen Carlsbad, California, USA).

PCR Multiplex Reaction

The *Cannabis* 13-loci STR multiplex conducted was based on a previous study (HOUSTON et al., 2015). Thirteen previously published *Cannabis* microsatellites (E07 CANN1, ANUCS 302, H09 CANN2, D02 CANN1, C11 CANN1, B01 CANN1, B05 CANN1, H06 CANN2, ANUCS 305, ANUCS 308, ANUCS 301, CS1, and ANUCS 501) were used in this study (Table 5.1). Amplification of these markers was performed via polymerase chain reaction (PCR) using the Multiplex PCR Kit (Qiagen, Valencia, CA) on the VERITI 96 well Thermo Cycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). The PCR reactions were prepared at a 12.5- μ L volume using 2 ng of template DNA. An aliquot of DNA (2 μ L) from each sample was added to 10.5 μ L of PCR master mix. The PCR master mix consisted of 6.25 μ L of 2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (Qiagen, Valencia, CA) 2.60 μ L of 10 \times Primer mix, 1.25 μ L of 5 \times Q- (Qiagen, Valencia, CA) and 0.4 μ L of 8 mg/mL bovine serum albumin (BSA) (Sigma- Aldrich St. Louis, MO, USA).

Forward primers were labeled with four different fluorescent dyes (FAM, PET, NED, and VIC, Life Technologies), and final optimal concentrations of forward and reverse primers are showed in Table 5.1. PCR cycling conditions were as follows: activation for 5 min at 95 °C, followed by 7 cycles of 30 s at 95 °C, 90 s at 60 °C, 30 s at 72 °C; 5 cycles of 30 s at 95 °C, 90 s at 59 °C, 30 s at 72 °C; 5 cycles of 30 s at 95 °C, 90 s at 58 °C, 30 s at 72 °C; 5 cycles of 30 s at 95 °C, 90 s at 57 °C, 30 s at 72 °C; 5 cycles of 30 s at 95 °C, 90 s at 56 °C, 30 s at 72 °C; 5 cycles of 30 s at 95 °C, 90 s at 55 °C, 30 s at 72 °C and a final extension of 30 min at 60 °C. Every set of PCR reactions included one negative and at least one positive control. The positive control DNA sample 1-D1 and 4-A2 were kindly provided by Dr. David Gangitano (Department of Forensic Science, College of Criminal Justice, Sam Houston State University).

A single PCR experiments followed by 2 μ L of PCR product migrated by electrophoresis (40 min at 80 V) in denaturing agarose gel (1% agarose, 1 \times TBE) stained with GelRed (Biotium, Hayward, CA) were previous performed at least for 10 DNA samples and for the 13 primer pairs to confirm the expected amplicon length for each primer pair.

Table 18. Characteristics of 13 *Cannabis* STR markers used in this study based on Houston et al, 2015.

Marker	Dye	STR Motif	Type of Repeat	Observed Alleles	Primer Concentration (uM)
D02	FAM	(GTT)	Simple	6, 7, 8	0,08
C11	FAM	(TGA)x(TGG)y	Compound/Indel	13, 14, 15	0,10
H09	FAM	(GA)	Simple	11, 12, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24	0,17
B01	FAM	(GAA)x(A) (GAA)y	Complex	10, 13, 14, 15	0,19
E07	VIC	(ACT)	Simple	7, 8, 9	0,62
305	VIC	(TGG)	Simple	4, 8, 9	0,17
308	VIC	(TA)	Simple	3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13	0,27
B05	VIC	(TTG)	Simple	7, 8, 9, 10	0,06
H06	VIC	(ACG)	Simple	7, 8, 9	0,15
501	NED	(TTGTG)	Simple	4, 5, 6	0,21
CS1	NED	(CACCAT)	Simple	12, 14, 17, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30	0,29
302	PET	(ACA)x(ACA)y (ACA)z	Compound	22, 29, 31, 33, 36	0,17
301	PET	(TTA)	Simple	6, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 24, 25	0,62

Fragment separation and detection of PCR Multiplex products were carried out in a 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

An aliquot of 1 µL of PCR product was added to 9.5 µL Hi-Di Formamide® and 0.5 µL LIZ® 500 Size Standard, Applied Biosystems). Samples were then denatured for 5 min at 95°C and loaded on the 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) and run using the following conditions: oven: 60 °C; prerun 15 kV, 180 s; injection 1.2 kV, 23 s; run 15 kV, 1200 s; capillary length 36 cm; polymer: POP-4™; and dye set G5. A bin set, and an allelic ladder were also kindly provided by Dr. David Gangitano. The allelic ladder was included on each injection to ensure accurate genotyping. Genotyping was performed using GeneMapper v. 4.0 software (Applied Biosystems). The analytical threshold was set at 150 relative fluorescence units (RFUs) as recommended by Houston et al (2015).

Single PCR Reactions

With the view to have a full DNA profile from all 72 *Cannabis* samples, single PCR reactions for B01 CANN1, ANUCS308 and ANUCS301 locus were done. The single PCR reactions were also prepared at a 12.5- μ L volume, but using 1 ng of template DNA. An aliquot of DNA (1 μ L) from each sample was added to 11.5 μ L of PCR master mix. The PCR master mix consisted of 6.25 μ L of Taq PCR Master Mix (Qiagen, Valencia, CA) 0.625 μ L of primer forward and reverse, and 4 μ L of distilled water provided by Taq PCR Master Mix. Single PCR cycling were as follows: activation for 5 min at 95 °C, followed by 30 cycles of 30 s at 95°C, 90 s at 55°C and 30 s at 72 °C, and a final extension for 30 min at 60°C. A volume of 5 μ L of single PCR product from B01 CANN1, ANUCS308 and ANUCS301 locus was added to a new tube and homogenized properly just before the fragment analysis. The fragmentation analysis of the PCR product pool were carried out as previous described.

Sensitivity

To establish the sensitivity of the 13-loci STR multiplex system, DNA from two (02) different *Cannabis* individuals were amplified in the following amounts: 20 ng, 10 ng, 2 ng, 1.5 ng, 1 ng, and 0.5 ng per 12.5 μ L of PCR reaction volume. The two *Cannabis* samples were selected based on their high heterozygosity. Each series was amplified in triplicate and injected using the same parameters described above (SWGDM, 2016).

Mixture Study

Pressed *Cannabis* samples seizure on the south of Brazil displayed a profile with more than one individual. In order to interpret those data and evaluate contamination a mixture study was needed. A two (02) different mixture sets using DNA from four (04) different *Cannabis* samples were normalized for the same concentration using ultrapure water, and tested using the following ratios: 19:1, 9:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:9 and 1:19 (SWGDM, 2016). The mixture series were amplified in triplicate and injected using the same parameters described above (SWGDM, 2016).

Genetic Parameters

The program GenAlEx 6.5 (Peakall and Smouse 2006, 2012) was employed to compute several genetic parameters, in order to determine the usefulness of the STR markers for forensic analyses. In order to evaluate the ability of the 13 STR loci for discriminate individuals based on their genotypic information, a Principal Coordinate Analysis (PCoA) was computed based on Nei's standard genetic distance (NEI, 1972), for discriminate individuals based on their genotypic information. An analysis of molecular variance (AMOVA) was performed to determine the amount of differentiation observed among and within groups, using 10,000 permutations of microsatellite genotypes to test significance. One thousand permutations was employed for determining the significance of the among groups difference estimated.

A Probability Identity (PI) analysis was used to determine the minimal number of loci needed to determine the genotypic identity of two individuals randomly sampled within each set, based on the combination of STR loci (loci 1; loci1+loci2; loci1+loci2+loci3 and so on). This analysis estimates the average probability that two independent samples will have the same identical genotype.

The list of private alleles, the total number of alleles (A), the effective number of alleles ($A_E = 1 / \sum p_i^2$), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity ($H_e = 1 - \sum p_i^2$), Shannon index of diversity ($I = -\sum p_i \log_2 p_i$) and polymorphic information content ($PI C = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$) were estimated for each locus, considering all samples ($n = 72$) as a single population.

Multiple Discriminant Analysis (MDA)

Cannabis samples genotypes were subjected to comparison by Kruskal-Wallis H, followed by a multiple discriminant analysis (MDA) in the backward mode using the origin of *Cannabis* sample (groups previous defined) as dependent variable, non-metric, and each sample genotype as independent variable. The multivariate discriminant function is based on Wilks' Lambda (Λ^*) value from the analysis of variance, where the criterion used by the statistical model is the minimization of Λ^* . Λ^* of 1 occurs if all the group means are the same while a low Λ^* value means that the variability within the groups is small

compared to the total variability.

The Wilks' Lambda (Λ^*) is calculated by equation (TIECHER et al., 2017),

$$\Lambda^* = \frac{|W|}{|B + W|}$$

Eq. 1

Where,

$|W|$ = determinant of the matrix of sums of squares due to the error;

$|B + W|$ = determinant of the matrix of the total sum of squares.

At each step, the property which minimized the overall Wilks' Lambda was entered. The maximum significance of F to enter a property was 0.01. The minimum significance of F to remove a property was 0.01. The data were carried out on Statistica, version 12, Statsoft Inc, Software.

5.3. Results and discussion

DNA was extracted from all *Cannabis sativa* samples, included the pressed samples seizure on the south of Brazil. However, the DNA isolated by Dneasy mericon Food Kit demonstrated a higher quality and concentration when compared with DNA isolated by DNeasy Plant Mini Kit. The average amount plus the standard deviation of DNA isolated was $14,5 \pm 9,03$ ng/ μ L in a total volume of 100 μ L using Dneasy mericon Food Kit and $2,68 \pm 1,37$ ng/ μ L in a total volume of 100 μ L using DNeasy Plant Mini Kit. As well the purity of isolated DNA assessed by 280/260 ratio was $1,454 \pm 0,175$ using DNeasy Plant Mini Kit and $1,795 \pm 0,068$ using Dneasy mericon Food Kit. It should be noted that an adequate amount and quality DNA was isolated with a low amount of plant material and no sample preparation was necessary. For a future lab routine those issues will be very important, because the large amount of *Cannabis* seizures on south of Brazil are pressed, very dry and seems a very low quality samples, but still got an adequate amount and quality of DNA.

The *Cannabis* STR multiplex system previously reported by Köhnemann et al. (2012) and optimized by Houston et al. (2015) was used as reference for the present work with some modifications such as a PCR reaction using Multiplex PCR Master Mix (Qiagen, Valencia, CA), different PCR cycling conditions, primer and DNA concentration. A total of 72 samples of *C. sativa* were

amplified using the 13-loci STR multiplex system tested, although only 33 samples (40.3 %) showed a full DNA profile. The loci affected by locus drop-out were B01 CANN1 (37.5 %), ANUCS308 (27.8%) and ANUCS301 (54.2 %). Houston and collaborators (2015) also observed similar loci drop-out.

Houston et al. (2015) experimentally determined the annealing temperatures of these three problematic markers to check if weak primer binding and eventually primer-primer interaction were the cause of allele drop-out. The annealing temperatures of markers ANUCS301, ANUCS308, and B01 CANN1 were 53, 55, and 55 °C, respectively. For this reason, instead to use a fixed annealing temperature at 60°C on the multiplex PCR cycle, a touchdown of the annealing temperature from 60°C to 55°C was used, as described on Material and Methods. Using these touchdown cycling, unspecific amplification was not observed, however when the touchdown cycling of the annealing temperature were from 60°C to 53°C, to reach the annealing temperature of ANUCS301, many unspecific peaks appears on the eletropherograms.

In order to have full DNA profile and check if homozygote *Cannabis* samples previous genotyped using the 13-loci STR multiplex system could be heterozygotes, single PCR reaction for B01 CANN1, ANUCS308 and ANUCS301 were done for all 72 samples. When the pool with the single PCR reactions were analyzed a peak off the ladder bins, but very close to locus B01 CANN1, appeared in almost *Cannabis* samples from northeast of Brazil. So, single PCR product from samples that exhibit this peak close to locus B01 CANN1 were sequenced to check if it could be a new allele.

As reported by Houston et al. (2015), only H09 STR marker showed some difficulties for automatic allele calling due to high stutter peaks. Probably because this marker has a dinucleotide STR motif. Besides issues, the individualization of *Cannabis* drug were achieved only using the data provided by 13-loci STR multiplex system, since all 72 samples analyzed revealed a distinct genetic profile, as well for those plants collected in the same location. Those distinct genotypes were confirmed when data from single PCR pool with ANUCS301, ANUCS308, and B01 CANN1 were added to the samples profiles.

For sensitivity test 20 ng, 10 ng, 2 ng, 1.5 ng, 1 ng, and 0.5 ng of DNA from two different *Cannabis* individuals were amplified. The sensitivity and optimal input of DNA determined for the 13 loci STR multiplex was 1.0 ng and 2.0

ng, respectively. Allele drop-out and peak imbalance was displayed when the template DNA was at 0.5 ng. Split peaks were observed when the template DNA was at or above 10 ng.

A DNA profile is generally considered to be comprised of more than one individual if three or more alleles are present at one or more loci and/or the peak height ratios between a single pair of allelic peaks for one or more loci are below the empirically determined appropriate threshold for heterozygous peak height ratio(s) (Budowle et al., 2009). As was previously mentioned *Cannabis* seizures are usually pressed. As well, the five samples seizure from South Brazil displayed electropherograms with more than two peaks in some loci, suggesting the presence of DNA from more than one plant. Budowle et al. (2009) recommended that a laboratory must define within its standard operating protocol the specific elements necessary to make reliable allelic and nonallelic peak assignments. Then a mixture study was done with the intent to interpret those data. The ratio mixtures 19:1, 9:1, 1:9, and 1:19 showed a severe alleles drop-out for the minor contributor. Instead, the ratio mixtures 3:1 and 1:3 displayed a peaks imbalance.

The allelic pattern observed in the studied samples matched the profile published by Houston et al. (2016) concerning the size of the alleles, except by allele 10 from locus B01, which was observed in the Brazilian Northeastern samples. All five samples from pressed marijuana seizure in Southern of Brazil presented more than two alleles for some loci, since these samples are composed by an admixture of unknown plants. In order to enable the analysis of these samples together with all the other samples, the two most common alleles in the total sampling were chosen. Similarly, five samples from leaf or seed seizures presented multiple alleles in at least one STR locus: one sample from apprehended seed displayed three alleles in two loci (302 and 501) and four alleles in CS1 locus. For these samples, the most common allele was also used as the true genotype. A preliminary analysis using different combinations of alleles revealed that the results are the same for all cases, independent of the alleles arrangement employed (data not shown).

Köhnemann et al. (2012), Knight et al. (2010), and Hsieh et al. (2003) found similar results for locus 302, and Shirley et al. (2013) for locus CS1 (called by NMI01). The multiallelic pattern is suggestive of polyploidy, where multiple

copies of the genome are present, a situation common in plants with no adverse effects. However, other explanations of multiallele patterns include locus duplication and aneuploidy.

It is important to mention that the genotypes of those five samples were obtained from plants leaf material, with those multiallelic loci exhibiting peaks of approximately equal height. These observations along with the absence of additional peaks at the remaining loci support the conclusion that this profile is not due to cross-contamination or mixture samples, such as pressed samples seizure in South of Brazil.

Overall, the Principal Coordinate Analysis (PCoA) analysis based on the 13 STR markers (Figure 5.1) clearly discriminated the seizure sets based on their geographical origin. The first principal component (PCoA1) expressed 51.82% of the variance, and the second principal component (PCoA2) expressed 16.37% of the variance.

Samples from the Northeastern Brazil (N15 and N17), although apprehended in different years, grouped together, with exception of one sample (sample 2.3 from the 2017 seizure).

The samples from seeds apprehended by the BFP formed a distinct group. Such seeds are usually purchased through the Internet sites, and are probably originated from Europe, because all brands identified by their label could be found on European websites. However, some seeds were not labeled, so we could not be sure about their origin.

The five pressed samples, which were apprehended in Southern Brazil, presented an intermediary position between these two groups. Moreira (2005) and Shibuya et al. (2007) suggest that Paraguay supplies Brazilian Southern market, so these *Cannabis* samples are probably from there. However, due to the fact that Uruguay, Rio Grande do Sul State border, legalized recreational *Cannabis* use, these samples could be also acquired by an illicit market on this country.

At individual level, the PCoA analysis was able to discriminate each single sample, indicating the absence of plants with the same genotype. This supports the hypothesis of sexual instead of clonal propagation of the apprehended plants and seeds. Houston et al (2015), Houston et al. (2017), and Shirley et al (2013) results also support this hypothesis.

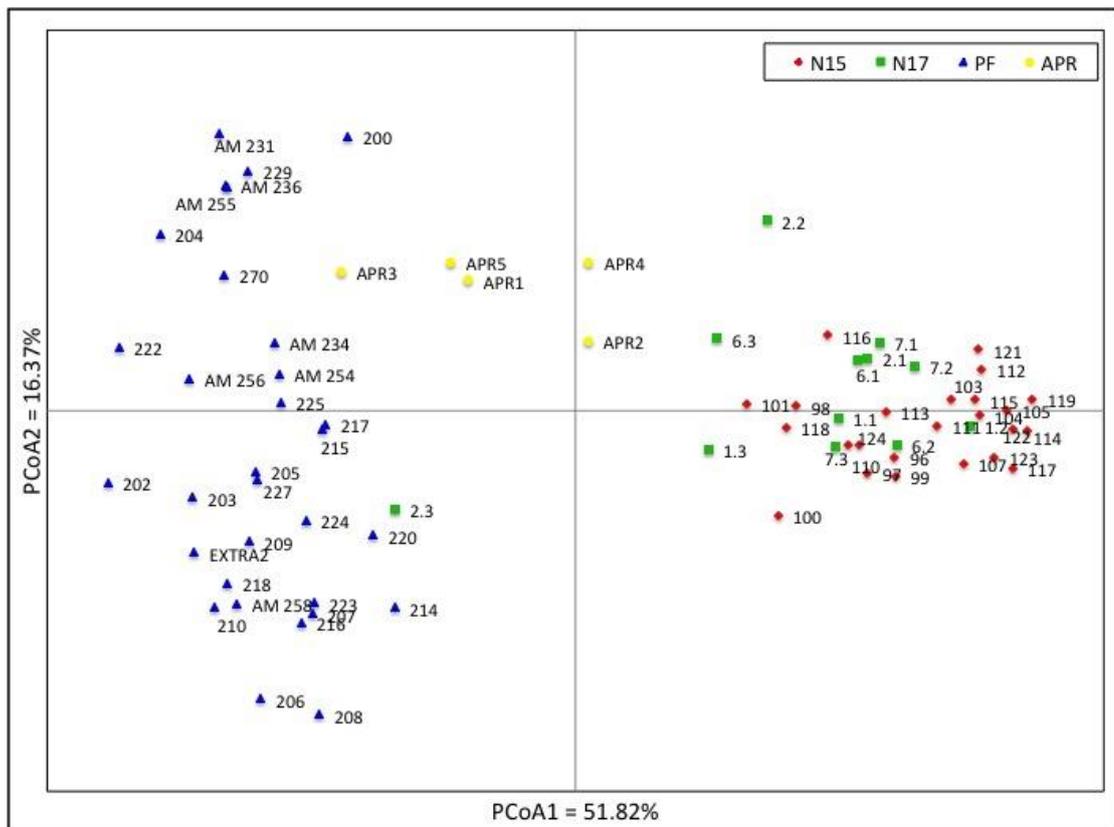


Figure 15. Principal coordinate analysis of the 72 samples based on genotypes of 13 analyzed *Cannabis* STR loci

As expected, the pairwise genetic distance was smaller between the N15 and N17 seizures, which were apprehended in plantations from the same geographic region (Table 5.2). The largest distances were observed between PF and N15 followed by PF and N17 seizures. These largest distances between those groups are not unexpected due to the samples origin that compound each group.

Table 19. Pairwise Nei's genetic distance for the seizure sets based on genotypes of 13 analyzed *Cannabis* STR loci

Sample group	N15	N17	PF	APR
N15	0.000			
N17	0.012	0.000		
PF	0.616	0.446	0.000	
APR	0.343	0.228	0.224	0.000

The analysis of molecular variance (AMOVA) (Table 5.3) revealed that 38% of the total differentiation at allelic frequencies level is due to among population differences and 62% due to differences among samples within groups. Usually, plant populations present higher differentiation within populations than among populations. This capability of revealing high differentiation among groups suggests that this set of 13 STR markers is valuable for evidencing the geographic origin of seized plants of *Cannabis*, being a useful tool for forensic investigations.

Table 20. Analysis of Molecular Variance (AMOVA) of 13 Cannabis STR loci

Source	Df	SS	MS	Est. Var.	%
Among groups	3	231.163	77.054	4.343	38%***
Within groups	68	484.170	7.120	7.120	62%
Total	71	715.333		11.463	100%

*** P (rand \geq data) = 0.001

Private alleles were observed for seven out of the 13 STR loci and for all seizure sets (Table 5.4). The largest number of private alleles (13) was observed for the PF samples, likely due to the European origin of the seeds. Allele 10 from locus B1 was observed in sets N15 and N17, originated from seizures in different years, both in the same geographic area. This allele was not reported for other studies using this STR locus for genotyping samples from other countries, suggesting it is an allele private for samples from Northeast Brazil.

The Probability Identity analysis (Figure 5.2) demonstrated that the combination of the 13 STR loci is quite informative for discriminating two samples randomly collected within each seizure set.

The probability of a match between the genetic profiles of two unrelated samples is of one in 2 millions for N17, one in 23 millions for N15, one in 5 billions for PF and one in 2 millions for APR.

Different genotypes, obtained by 13 STR loci, were analyzed jointly in order to select the minimum number of markers able to discriminate the *Cannabis* samples groups. A multiple discriminant analysis (MDA) for the alleles of each genotype/sample was applied, considering their geographical origin (seized on Northeastern of Brazil in 2015 and 2017, seized on South of Brazil, and plants cultivated by BFP using seized mail seeds). In order to processing the data, each

marker was decompound according to the presence of their alleles. So, if a sample displayed allele 11 on locus H09, the number "11" was added to the data matrix; on the other hand, if the sample do not displayed allele 11 on locus H09, the number "o" was added to the data matrix instead.

Table 21. List of private alleles for each seizure set of 13 *Cannabis* STR loci

Samples	Locus	Allele	Freq
N15	H09	22	0.042
N15	H09	23	0.021
N15	501	7	0.021
N17	302	35	0.083
N17	301	23	0.042
PF	H09	24	0.033
PF	305	9	0.032
PF	308	3	0.048
PF	308	10	0.032
PF	308	11	0.032
PF	308	13	0.177
PF	CS1	14	0.048
PF	CS1	21	0.113
PF	CS1	30	0.016
PF	302	22	0.018
PF	302	29	0.054
PF	301	24	0.065
PF	301	25	0.016
APR	305	7	0.100

The main genetic parameters of forensic interest computed for each locus were calculated based on alleles frequency, and are summarized in Table 5.5. The highest number of alleles, heterozygosity, Shannon index of diversity and polymorphic content index were observed for locus CS1, as reported by Houston et al. (2016), followed by loci 308 and H09.

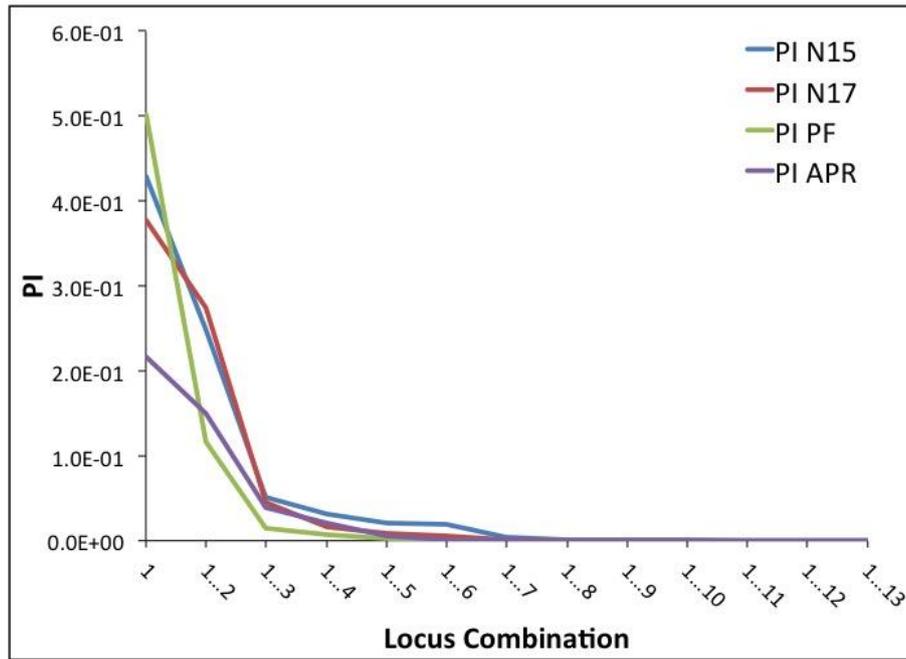


Figure 16. Probability of genotypic identity of two individuals randomly sampled within each set, based on the combination of STR loci (loci 1; loci1+loci2; loci1+loci2+loci3 and so on).

Table 22. Genetic parameters estimated for all samples (n = 72) based on 13 analyzed *Cannabis* STR loci

	D02	C11	H09	B01	E07	305	308	B05	H06	501	CS1	302	301
Na	3	3	10	4	3	4	10	4	3	4	13	6	11
Ne	2.281	1.946	4.233	2.692	1.813	1.625	5.592	2.004	1.988	1.390	9.274	2.848	3.469
I	0.925	0.836	1.706	1.095	0.763	0.647	1.881	0.943	0.825	0.563	2.355	1.207	1.514
Ho	0.431	0.292	0.507	0.306	0.333	0.333	0.347	0.556	0.333	0.208	0.708	0.565	0.514
He	0.566	0.489	0.769	0.633	0.452	0.387	0.827	0.505	0.500	0.283	0.898	0.654	0.717
PIC	0.562	0.486	0.764	0.629	0.448	0.385	0.821	0.501	0.497	0.281	0.892	0.649	0.712

Na: mean number of alleles; Ne: mean effective number of alleles; I: mean Shannon index of diversity; Ho: mean observed heterozygosity; He: mean expected heterozygosity; PIC: Polymorphic Content Index

Table 5.6 shows that all selected markers are able to correctly classify over 50% of the processed samples. Note that only the CS1 marker has the ability to correctly classify 92% of the samples analyzed in the proposed groups. However, for forensic samples, indexes close to 100% are desirable, and it is necessary to use a set of markers to reduce the error with the prediction of the samples origins. The Table 5.7 show that all 72 *Cannabis* samples were correctly classified by Kruskal-Wallis H followed by a MDA, actually, the classification is in agreement with the predefined groups. Endorsing these results, the percentage of samples correctly classified was 100%, and the percentage of uncertainty was 0%.

Table 23. Discriminant Function Analysis (DFA) used to identify the ability of each tracer to distinguish drug source.

Fingerprint selected	Correctly classified samples (%)	Fingerprint selected	Correctly classified samples (%)
D02	69,7	B05	76,0
C11	73,7	H06	81,6
H09	84,2	501	64,5
B01	68,4	CS1	92,1
E07	64,5	302	88,1
305	58,7	301	88,1
308	88,1		

Table 24. Multiple Discriminant Analysis results with the number of samples classified per group, percentage of samples correctly classified, and percentage of uncertainty of 13 *Cannabis* STR loci.

Groups/origin	Number of samples classify per group			Correct classification (%) / Mean
	N	Indoor (PF)	Seizures (APR)	
N	36	0	0	100
Indoor (PF)	0	30	0	100
Seizures (APR)	0	0	8	100
Total	36	30	8	100
Correct classification (%)	100	100	100	100
Uncertainty associated with samples classification (%)	0	0	0	0

The MDA performed combinations excluding the independent variables that did not contribute to classify the samples in their predefined group. Accordingly, the markers that classified properly the samples were CS1, 301, H06, H09, 302, B01, 501, E07, 305, 308, and B05. Only C11 and D02 markers were not selected for be a part of the analysis, they do not contribute for the samples classification.

The MDA also revealed the contribution of each marker associated to certain alleles for the samples classification. On Table 5.8 is listed all 11 steps of the analysis, the marker and his respective allele for each step. It is possible noticed the Wilks' Lambda decreased while the percentage of samples correctly classified increased along the MDA.

The canonical variables and the discriminant functions can be expressed as a linear combination of the markers included in the particular model (HAIR JR. et al., 2009; SZCZERBOWSKA-BORUCHOWSKA et al., 2011). An examination of the group discrimination was performed based on a scatter plot between two first variables roots. The distribution of the samples in the plane of the two calculated discriminant functions is illustrated in Figure 17.

Table 25. Results of the stepwise discriminant function analysis as indicated by the Wilks' Lambda values for the different tracer selected.

Step	Tracer selected	Wilks' lambda	P to remove	Cumulative % of source type samples classified correctly
1	CS1	0,0254	<1E-17	92,1
2	301	0,0068	<1E-17	97,4
3	H06	0,0036	<1E-17	100,0
4	H09	0,0023	<1E-17	100,0
5	302	0,0009	<1E-17	100,0
6	B01	0,0002	<1E-17	100,0
7	501	0,0002	<1E-17	100,0
8	E07	0,0001	<1E-17	100,0
9	305	0,0001	<1E-17	100,0
10	308	0,0000	<1E-17	100,0
11	B05	0,0000	<1E-17	100,0

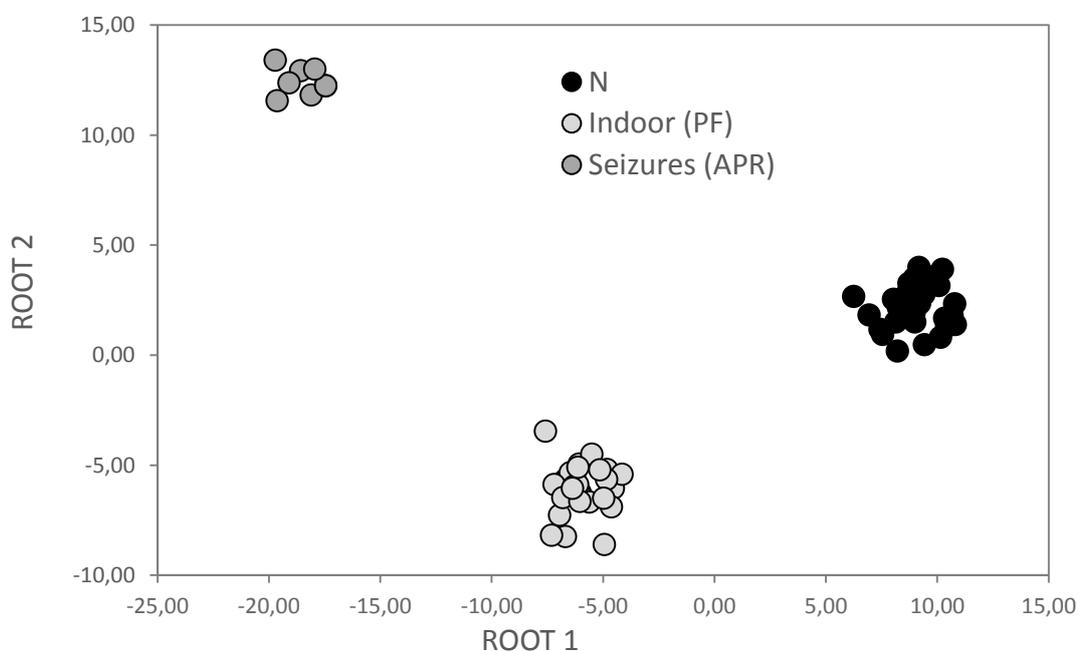


Figure 17. Two-dimensional scatter plot of the first and second discriminant functions from stepwise discriminant function analysis (DFA) according to samples geographical origin.

The MDA confirmed the PCoA results, and showed that the 13 STR markers clearly discriminated the seizure sets analyzed on the present work based on their geographical origin. The samples were 100% correct classified, associated with a null percentage of uncertainty, these results of MDA show the efficiency of 13 STR system for evidencing the geographic origin of seized plants of *Cannabis* and for being a useful tool for forensic investigations.

5.4. Conclusion

13-loci STR multiplex system achieved the aim for individualization and origin differentiation to the *Cannabis* sample tested on the present work. This system could be a good tool to help police intelligence to trace back trade routes of drug syndicates or dealers, and link different *Cannabis* plants to a crime scene. However, a robust database is necessary: increase number of samples, and include different origins, as *Cannabis* grown in Uruguay may affect the drug traffic on south of Brazil.

6. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

As análises da concentração química elementar, especialmente de raiz e parte aérea, de plantas de *Cannabis* classificaram corretamente as amostras avaliadas, de acordo com o seu local de cultivo ou coleta no Nordeste brasileiro. Esta técnica, ainda foi capaz de separar com exatidão as amostras da parte aérea do tecido vegetal das plantas cultivadas no Nordeste, das plantas cultivadas em ambiente controlado indoor, a partir de sementes provenientes do exterior apreendidas pela Polícia Federal.

A relação isotópica de $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ e $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ não foi adequada para separar as amostras de tecido vegetal de *Cannabis*, de acordo com seu local de cultivo ou coleta no Nordeste brasileiro. A proximidade destes pontos, que refletem condições ambientais e de cultivo semelhantes, pode ter sido responsável pelo resultado obtido.

O sistema de marcadores genéticos (multiplex 13-loci STR) utilizado para rastrear a origem de *Cannabis* indicou grande variabilidade entre as amostras do tecido vegetal da planta, provenientes de cultivos no Nordeste brasileiro, cultivos de sementes de origem estrangeira indoor, e material prensado apreendido pela Polícia Federal no sul do Brasil. As amostras do Nordeste brasileiro apresentaram inclusive um alelo específico, ausente nas amostras das demais origens, em um dos marcadores utilizados. O método de marcadores genéticos utilizado foi capaz de classificar todas as amostras corretamente, com incerteza praticamente nula, de acordo com o local de origem previamente definido (Nordeste, exterior, apreensão PF).

Os resultados obtidos indicam que as análises químicas e moleculares realizadas mostraram relação do ambiente de cultivo com as estruturas vegetais das amostras de *Cannabis* de diferentes origens. Dessa

forma, as análises, especialmente da concentração química elementar e de genotipagem por sistema de marcadores (multiplex 13-loci STR) podem ser utilizadas como marcadores ou indicadores para rastrear a origem de amostras de *Cannabis*, sendo ferramentas de grande utilidade para uso policial e forense.

Como perspectivas para o avanço e continuidade do presente estudo, percebe-se a necessidade da ampliação no número de amostras de diferentes origens conhecidas para formação de um banco de dados cada vez mais robusto. Além disso, novas ferramentas de análise podem ser implementadas, envolvendo o ambiente de cultivo e as interações solo e planta, com o objetivo de identificar a origem, tais como fatores mineralógicos do solo, de composição química orgânica das plantas, de análise química dos alcaloides, de variabilidade genética e genômica, entre outras. Por fim, a seleção ou reunião do conjunto de indicadores aplicada em um sistema que possa ser utilizado na rotina dos exames periciais para que se consiga identificar ou direcionar o local de origem da *Cannabis* apreendida traria avanços na investigação policial ou mesmo na detecção de fraudes em um cenário de crescente legalização de produtos compostos de substâncias presentes na *Cannabis*.

7. REFERENCIAS

ALGHANIM, H.J.; ALMIRALL, J.R. Development of microsatellite markers in *Cannabis sativa* for DNA typing and genetic relatedness analyses. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v.376, p.1225-1233, 2003.

ALMEIDA, C.M.R.; VASCONCELOS, M. T. S. D. Multielement composition of wines and their precursors including provenance soil and their potentialities as fingerprints of wine origin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.51, p.4788-4798, 2003.

ALMEIDA, P. P. et al. Revisão: funcionamento executivo e uso de maconha. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, São Paulo, v. 30, n. 1, 2008. p. 69-76.

BALBINO, M. A. **Estudo do comportamento eletroquímico do Δ^9 -tetraidrocannabinol derivatizado com Fast Blue B**. 2014.143 f. Tese (Doutorado em Química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

BARBOZA, L. F. O uso equilibrado de indicadores balanceados. In: CONGRESSO NACIONAL DE EXCELÊNCIA EM GESTÃO, 7., 2011, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: CNEG, 2011. p. 1-22.

BENSON, G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.27, 1999, p. 573-580.

BOLETIM ESTATÍSTICO [da] Coordenação geral de polícia de repressão a drogas. [Brasília]: MJ – Departamento de Polícia Federal, Diretoria de investigação e combate ao crime organizado, 2013. 30 p.

BOOTH, A.L. et al. Tracing geographic and temporal trafficking patterns for marijuana in Alaska using stable isotopes (C, N, O and H). **Forensic Science International**, Amsterdam, 2010, v.202, p. 45-53.

BORILLE, B.T. et al. Near Infrared spectroscopy combined with chemometrics for growth stage classification of cannabis cultivated in a greenhouse from seized seeds. **Spectrochimica Acta Part A Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Cambridge, 2017, v. 173, p. 318-323.

BOTELHO, E. D. et al. Chemical profiling of cocaine seized by Brazilian Federal Police in 2009-2012: major components. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, 2014, v. 25, p. 611-618.

BRASIL. Constituição (1988). Brasília, DF: Senado Federal, 1988. 292 p.

BRASIL. Ministério Público Federal. **Parecer nº 795**. Parecer da relatora Luiza Cristina Fonseca Frischeisen, subprocuradora-geral da república. 19 de jun. 2017. Brasília, 2017. Disponível em: <http://www.mpf.mp.br/pgr/documentos/AREsp1077512_PA_trfco_sementesde_maconha_contrabando_insignificancia_AMA.pdf>. Acesso em: 8 set. 2017.

BUDOWLE, B. et al. Mixture Interpretation: Defining the Relevant Features for Guidelines for the Assessment of Mixed DNA Profiles in Forensic Casework. **Journal of Forensic Sciences**, Chicago, 2009, v. 54, p. 1556-4029.

CARLINI, E. A. The history of marijuana in Brazil. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, Rio de Janeiro, 2006, v. 55, n. 4, p. 314-317.

COCHON, F. L.; LOPES, M. A. **Rastreabilidade e segurança alimentar**. Lavras, MG: UFLA, 2012. p. 1-25. (Boletim técnico, 91).

DAANE, L.L. et al. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria associated with the rhizosphere of salt marsh plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 2683-2691, 2001.

DE BACKER, B. et al. Evolution of the content of THC and other major cannabinoids in drug-type Cannabis cuttings and seedlings during growth of plants. **Journal of Forensic Sciences**, Chicago, v. 57, p. 918–922, 2012.

DNEASY plant handbook. Valencia: Qiagen, 2013. 68 p.

DNEASY mericon food handbook. Valencia: Qiagen, 2010. 33 p.

EDINGER, C. Cadeia de custódia, rastreabilidade probatória. **Revista Brasileira de Ciências Criminais**, São Paulo, v. 120, 09 p., 2016.

FISCHEDICK, J. T. et al. Metabolic fingerprinting of Cannabis sativa L., cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes. **Phytochemistry**, Amsterdam, v.71, p. 2058-2073, 2010.

FRAGA, P.C.P. Illicit Crops in Brazil. The rural workers between income and the exploitation of drug trafficking. **Humanities and Social Sciences**, New York, v. 2, n. 6, p. 211-222, 2014.

GALON, T. C. O. A cadeia de custódia e a validade da prova pericial. **Revista Jus Navigandi**, Teresina, ano 22, n. 5038, 2017. Disponível em: <<https://jus.com.br/artigos/36272>>. Acesso em: 4 set. 2017.

GIACOMO, F. D.; SIGNORE, A. D.; GIACCIO, M. Determining the geographic origin of potatoes using mineral and trace element content. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v. 55, p. 860-866, 2007.

GILMORE, S.; PEAKALL, R.; ROBERTSON, J. Short tandem repeat (STR) DNA markers are hypervariable and informative in *Cannabis sativa*: implications for forensic investigations. **Forensic Science International**, Amsterdam, v. 131, p. 65-74, 2003.

GILMORE, S.; PEAKALL, R.; ROBERTSON, J. Organelle DNA haplotypes reflect crop-use characteristics and geographic origins of *Cannabis sativa*. **Forensic Science International**, Amsterdam, v.172, p.179–190, 2007.

GLOSS, D. An overview of products and bias in research. **Neurotherapeutics**, Heidelberg, v. 12, p. 731-734, 2015.

HAIR JÚNIOR. et al. **Análise multivariada de dados**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. 688 p.

HOUSTON, R. et al. Evaluation of a 13-loci STR multiplex system for *Cannabis sativa* genetic identification. **International Journal of Legal Medicine**, Heidelberg, v. 130, p. 635-682, 2016.

HOUSTON, R. et al. Developmental and internal validation of a novel 13 loci STR multiplex method for *Cannabis sativa* DNA profiling. **Legal Medicine**, Amsterdam, v. 26, p. 33-40, 2017.

HOWARD, C. et al. Developmental validation of a *Cannabis sativa* STR multiplex system for forensic analysis. **Journal of Forensic Sciences**, Chicago, v. 53, p. 1061–1067, 2008.

HOWARD, C. et al. A *Cannabis sativa* STR genotype database for Australian seizures: forensic applications and limitations. **Journal of Forensic Sciences**, Chicago, v. 54, p. 556-563, 2009.

HSIEH, H.-M. et al. A highly polymorphic STR locus in *Cannabis sativa*, **Forensic Science International**, Amsterdam, v. 131, p. 53-58, 2003.

HURTADO, R. L.; LASMAR, M. C. Medicamentos falsificados e contrabandeados no Brasil: panorama geral e perspectivas de combate ao seu consumo. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 4, p. 891-895, abr. 2014.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 9000:2000**: quality management systems: fundamentals and vocabulary. Brussels, 2000.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 22005:2007**: traceability in feed and food chain: general principles and basic requirements for system design and implementation. Brussels, 2007.

JAGADISH, V.; ROBERTSON, J.; GIBBS, A. RAPD analysis distinguishes *Cannabis sativa* samples from different sources. **Forensic Science International**, Amsterdam, v.79, p.113-121, 1996.

KAUTZ, T. et al. Nutrient acquisition from arable subsoils in temperate climates: a review. **Soil Biology & Biochemistry**, Amsterdam, v. 57, p. 1003-1022, 2013.

KLUEPFEL, D.A. The behavior and tracking of bacteria in the rhizosphere. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 31, p. 441-472, 1993.

KMENT, P. et al. Differentiation of Czech wines using multielement composition – A comparison with vineyard soil. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 91, p. 157-165, 2005.

KNIGHT, G. et al. The results of an experimental indoor hydroponic *Cannabis* growing study, using the 'Screen of Green' (ScrOG) method—Yield, tetrahydrocannabinol (THC) and DNA analysis. **Forensic Science International**, Amsterdam, v. 202, p. 36-44, 2010.

KÖHNEMANN, S. et al. The validation of a 15 STR multiplex PCR for *Cannabis* species. **International Journal of Legal Medicine**, Heidelberg, v. 126, p. 601-606, 2012.

LAURSEN, L. The cultivation of weed. **Nature**, Heidelberg, v. 525, p. s4-s5, 2015.

LISITA, A. **Mapeamento semiautomático de cultivos ilícitos de *Cannabis sativa* no semiárido pernambucano mediante integração de imagens spot 5 – HRG, dados geográficos auxiliares e conhecimento de campo.** 2011. 217 f. Tese (Doutorado em Geologia)- Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

LOPES, M.; GABRIEL, M. M.; BARETA, G. M. S. Cadeia de custódia: uma abordagem preliminar. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.7, p. 1-5, 2006.

MARCELO, M. C. A. et al. Profiling cocaine by ATR-FTIR. **Forensic Science International**, Amsterdam, v. 246, p. 65-71, 2015.

MALDANER, A. O. et al. Brazilian Federal District cocaine chemical profiling – mass balance approach and new adulterant routinely quantified (aminopyrine). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 26, p.1227-1231, 2015.

MALDANER, A. O. et al. Chemical profiling of street cocaine from different Brazilian regions. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 27, p. 719-726, 2016.

MARIOTTI, K.C. et al. Seized cannabis seeds cultivated in greenhouse: a chemical study by gas chromatography-mass spectrometry and chemometric analysis. **Science & Justice**, Amsterdam, v. 56, p. 35–41, 2016.

MCCARTHY T. **Growing marijuana.** New York: Castle Books, 2011. 202 p.

MELO, V.F. et al. Chemical, physical and mineralogical characterization of soils from the Curitiba Metropolitan Region for forensic purpose. **Forensic Science International**, Amsterdam, v.179, p.123-134, 2008.

MILLER COYLE, H. et al. An overview of DNA methods for the identification and individualization of marijuana. **Croatian Medical Journal**, Zagreb, v. 44, p. 315-321, 2003.

MOREIRA, E.M. A despenalização do trabalhador rural preso no cultivo da *Cannabis sativa*. **Confluências** - Revista Interdisciplinar de Sociologia e Direito, Niterói, 2005, v. 4, p. 7-21. Disponível em: <<http://www.confluencias.uff.br/index.php/confluencias/article/viewFile/232/78>>. Acesso em: 3 out. 2017.

MURPHY, C. et al. **Chain of custody**: recommendations for acceptance and analysis of evidentiary geochemical samples. Washington: U.S. G.P.O. ; Denver, CO : U.S. Geological Survey, Information Services [distribuidor], 1997. 33 p. (Geological Survey Circular, 1138) Disponível em: <<https://pubs.usgs.gov/circ/c1138/c1138.pdf>>. Acesso em: 20 set. 2017.

NEI, M. Genetic distance between populations. **The American Naturalist**, Chicago, v. 106, p. 283-292, 1972.

NUTRI-FATOS: informação agronômica sobre nutrientes para plantas. Piracicaba: IPNI, [2017]. [34 p.]. Disponível em: <[http://www.ipni.net/publication/nutrifacts-brasil.nsf/0/A4BABE9BE86ECB2883258186004D682C/\\$FILE/NutriFacts-BRASIL-18.pdf](http://www.ipni.net/publication/nutrifacts-brasil.nsf/0/A4BABE9BE86ECB2883258186004D682C/$FILE/NutriFacts-BRASIL-18.pdf)> Acesso em: 20 set. 2017.

ORTIZ, R. S. et al. É possível estimar a quantidade de maconha produzida a partir do crescimento *indoor* de *Cannabis*? **Revista Perícia Federal**. Brasília, 2015, n. 35, p. 12-15.

PAIN, S. A potted history. **Nature**, Heidelberg, v. 525, p. 10-11, 2015.

PESSOA, M. C. P. Y.; SILVA, A. S.; CAMARGO, C. P. **Qualidade e certificação de produtos agropecuários**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002, 191 p. (Texto para discussão, 14).

PRIMAVESI, A.C.P.A.; MALAVOLTA, E. Estudos sobre a nutrição mineral do maracujá amarelo: VIII. extração de nutrientes e exigências nutricionais para o desenvolvimento vegetativo. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, Piracicaba, v. 37, n. 2, p. 603-607, 1980.

REIDY, I. et al. Elemental fingerprinting of soils using ICP-MS and multivariate statistics: A study for and by forensic chemistry majors. **Forensic Science International**, Amsterdam, v.233, p.37-44, 2013.

RESENDE, M. **Mineralogia de solos brasileiros**: interpretação e aplicação. Lavras: Ed. UFLA, 2005. 192 p.

RIBEIRO, A.S.D. et al. O gene *rbcl* como barcode para identificação forense de *Cannabis sativa*. **Saúde, Ética & Justiça**. São Paulo, v. 18(Ed. Especial). p. 67-71, 2013.

SANCHES, R. F.; MARQUES, J. M. A. Cannabis e humor. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, São Paulo, v. 32, p. 173-180, 2010.

SAWLER, J. et al. The Genetic Structure of Marijuana and Hemp. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 10, n.8, p. 01-09, 2015.

SHIBUYA E. K. **Rastreamento da origem geográfica de amostras de maconha apreendidas nas ruas de São Paulo, por meio de assinaturas químicas**. 2005. 221 f. Tese (Doutorado em Ciências)- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

SHIBUYA E. K. et al. Carbon and nitrogen stable isotopes as indicative of geographical origin of marijuana samples seized in the city of São Paulo (Brazil). **Forensic Science International**, Amsterdam, v.167, p.8-15, 2007.

SHIBUYA, E. K., et al. Sourcing Brazilian marijuana by applying IRMS analysis to seized samples. **Forensic Science International**, Amsterdam, v.160, p.35-43, 2006.

SHIBUYA, E. K., et al. Multivariate classification based on chemical and stable isotopic profiles in sourcing the origin of marijuana samples seized in Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 18, p. 205-214, 2007.

SHIRLEY, N. et al. Analysis of the NMI01 Marker for a population database of Cannabis seeds. **Journal of Forensic Sciences**, Chicago, v. 58, p.176-182, 2013.

SILVA JUNIOR, R. C. et al. Demystifying “oxi” cocaine: chemical profiling analysis of a “new Brazilian drug” from Acre State. **Forensic Science International**, Amsterdam, v.221, p.113-119, 2012.

SMALL, E. et al. A Practical and Natural Taxonomy for Cannabis. **Taxon**, New York, v. 25, p. 405-435, 1976.

SMALL, E. et al. Hemp: a new crop with new uses for North America. In: JANICK, Jules; WHIPKEY, Anna (Ed.). **Trends in new crops and new uses**. Alexandria: ASHS Press, 2002

SMALL, E. Evolution and classification of Cannabis sativa (Marijuana, Hemp) in relation to human utilization. **Botanical Review**, Heidelberg, v. 81, p. 189-294, 2015.

SAWLER, J. et al. The genetic structure of Marijuana and hemp. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, p. 1-9, 2015.

SWGDM - SCIENTIFIC WORKING GROUP ON DNA ANALYSIS METHODS. **Validation guidelines for DNA analysis methods**. Woodbridge, 2016. 15 p. Disponível em: <<https://www.swgdam.org/>>. Acesso em: set. 2017.

SZCZERBOWSKA-BORUCHOWSKA, M.; LANKOSZ, M; ADAMEK, D. First step toward the “fingerprinting” of brain tumors based on synchrotron radiation X-ray fluorescence and multiple discriminant analysis. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, Heidelberg, v. 16, p. 1217-1226, 2011.

THAKUR, G. A., DUCLOS JR. R. I., MAKRIYANNIS, A. Natural cannabinoids: templates for drug discovery. **Life Sciences**, Amsterdam, v. 78, p. 454-466, 2005.

TIECHER, T. et al. Quantifying land use contributions to suspended sediment in a large cultivated catchment of Southern Brazil (Guaporé River, Rio Grande do Sul). **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 237, p. 95-108, 2017.

UITDEWILLIGEN, J.G.A.M.L. et al. A next-generation sequencing method for genotyping by sequencing of highly heterozygous autotetraploid potato. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, p. 01-14, 2013.

UNODC-UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. **Recommended methods for the identification and analysis of Cannabis and Cannabis products**: manual for use by national drug analysis laboratories. New York: United Nations, 2009. 60 p.

UNODC-UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. **Word drug report 2010**. New York: United Nations, 2010. 307 p. Disponível em: <https://www.unodc.org/documents/wdr/WDR_2010/World_Drug_Report_2010_I-o-res.pdf> Acesso em: 28 set. 2016.

UNODC- UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. **World drug report 2013**. New York: United Nations, 2013. 151 p. Disponível em: <http://www.unodc.org/unodc/secured/wdr/wdr2013/World_Drug_Report_2013.pdf>. Acesso em: 28 set. 2016.

USDA – UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. NRCS- NATURE RESOURCES CONSERVATION SERVICE. **Plants database**. Washington, DC, [2017]. Disponível em: <<http://plants.usda.gov/classification.html>>. Acesso em: 20 set. 2017.

VALVERDE, L. et al. Letter to the editor: nomenclature proposal and SNPSTR haplotypes for 7 new *Cannabis sativa* L. STR loci. **Forensic Science International: Genetics**, Amsterdam, v. 13, p. 185-186, 2014.

VAN BAKEL, H. et al. The draft genome and transcriptome of *Cannabis sativa*. **Genome Biology**, Heidelberg, v. 12, p. 2-17, 2011.

VELHO, J. A.; GEISER, G.C.; ESPINDULA, A. **Ciências Forenses**: uma introdução às principais áreas da criminalística moderna. Campinas: Millenium, 2012. 528 p.

WEST, J.B. et al. The stable isotope ratios of marijuana. II. Strontium isotopes relate to geographic origin. **Journal of Forensic Science**, Chicago, v. 54, p. 1261-1269, 2009.

ZACCA, J. J. et al. Brazilian federal police drug chemical profiling — The PeQui Project. **Science & Justice**, Amsterdam, v. 54, p. 300-306, 2014.

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