Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics

Journal homepage: www.ipebj.com.br/forensicjournal

Identificação e Vinculação Geográfica da *Cannabis sativa*: Ferramentas para Inteligência Policial

Identification and Geographical Bond of *Cannabis sativa*: Tools for Police Intelligence

Rodrigo Grazinoli Garrido¹, Alessandra Stefania Dias Ribeiro²,
Rodrigo Soares de Moura Neto²

¹ Instituto de Pesquisa e Perícias em Genética Forense-IPPGF/DGPTC/PCERJ. Rua Marques de Pombal, 150. Cidade Nova, Rio de Janeiro. Tel: 21 2332-8070. E-mail: rgrazinoli@pcvil.rj.gov.br.

² Laboratório de Biologia Molecular Forense, Instituto de Biologia/UFRJ e Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia-INMETRO.

Received 26 January 2013

Resumo. *Cannabis sativa* é uma das espécies mais antigas de plantas domesticadas e permanece como uma das culturas mais difundidas. É também a droga ilícita mais consumida no mundo. Buscou-se apresentar os métodos químicos e botânicos atualmente utilizados para identificação inter e intraespecífica no gênero *Cannabis*, mas que têm pouca ou nenhuma capacidade de individualizar ou correlacionar amostras. Por outro lado, foram caracterizadas as atuais ferramentas moleculares, as quais mostram resultados bastante úteis na individualização de amostras vegetais e, assim, podem contribuir com a inteligência policial na determinação geográfica de plantios e rotas de tráfico.

Palavras-chave: Maconha; Tráfico; Drogas.

Abstract. *Cannabis sativa* is one of the oldest species of domesticated plants and remains one of the most widespread crops. It is also the most used illicit drug in the world. We tried to present the botanical and chemical methods currently used to identify inter and intraspecific diversity in the genus *Cannabis*, but that has little or no ability to individualize or correlate samples. Moreover, we characterized the current molecular tools, which show useful results

in the individualization of plant samples and thus may contribute to the police intelligence in determining geographical plantations and trafficking routes.

Keywords: Marijuana; Trafficking; Drugs.

1. Introdução

Exemplares da espécie *Cannabis sativa* foram primeiramente classificadas por Carolus Linnaeus em 1753. No entanto, estas plantas são conhecidas da humanidade há mais de 6.000 anos, sendo uma das mais antigas culturas do mundo¹. Além da *C. sativa*, o gênero *Cannabis* apresenta outras duas espécies, *C. indica* e *C. ruderalis* que vêm sendo utilizada como fibra têxtil, por conta de sua riqueza em fibras, em preparações medicamentosas, rituais religiosos e como droga recreativa em virtude da bioatividade de seus componentes. Suas sementes apresentam também características nutricionais importantes^{2,3}.

Apesar de encontrado ao redor do mundo, estudos indicam que o gênero *Cannabis* seria disperso a partir da Ásia Central⁴. Atualmente, reconhece-se este gênero como altamente variável, hibridizado, introgrado e panmítico³. Esta origem asiática guarda interessante relação com seu uso religioso. Os primeiros relatos de uso religioso da maconha, como é conhecida popularmente esta erva, dizem respeito à Shiva, divindade hindu⁵. No entanto, outras tradições religiosas fazem este mesmo caminho à Ásia. Algumas religiões ayahuasqueiras brasileiras, como a União do Vegetal (UDV), reconhecem a *C. sativa* como um de seus sacramentos, com o nome Santa Maria⁶. De acordo com o recriador da UDV, Mestre Gabriel, esta tradição teria sido iniciada pelo Rei Salomão⁷. Visão semelhante tem os seguidores do Rastafári, outra religião que faz uso da erva. Para estes a *C. sativa* seria uma das três plantas nascidas do túmulo deste mesmo rei que também viveu na região asiática⁸.

De acordo com Carlini⁹, no Brasil, a *C. sativa* parece ter chegada juntamente com os descobridores, pois fibras desta planta eram utilizadas na constituição dos cordames e velas das caravelas portuguesas que aqui aportaram em 1500. A partir de então a maconha passou a ser plantada em nosso território, através de sementes trazidas por negros escravos, e logo conquistou também os índios. O cultivo até o séc. XVIII era incentivado pela Coroa portuguesa, mas seu consumo mantinha-se restrito às classes menos favorecidas. Esta visão mudou depois da segunda metade do séc. XIX quando passaram a ser divulgados os achados médicos que imputavam

à maconha uma série de empregos farmacológicos, como na asma, na insônia e na úlcera gástrica, mas que já chamavam atenção sobre os malefícios de seu uso contínuo.

Ainda de acordo com este autor, após a participação brasileira no II Conferência Internacional do Ópio, em Genebra em 1924, o uso da erva foi condenado. Somente a partir da década de 1930, a maconha passou a ser criminalizada. Em 1933 foram registradas as primeiras prisões no Rio de Janeiro em virtude do comércio ilegal da erva. A proibição do plantio, cultura, colheita e exploração da maconha em nosso território ocorreu por meio do Decreto-Lei 891 de 1938. Em 1961, passou a ser definitivamente tratada como narcótico através da Convenção Única de Entorpecentes, da Organização das Nações Unidas (ONU), da qual o Brasil é signatário⁹. A Lei 6.368 de 1976 passou a prever, dentre outras coisas, pena de prisão para todos os que tivessem em seu poder qualquer quantidade de *C. sativa*, o que foi alterado pela Lei 11.343 de 2006 que impõe para quem adquirir, guardar, tiver em depósito, transportar ou trazer consigo, para consumo pessoal, penas de advertência, prestação de serviços à comunidade e medidas educativa¹⁰.

Até 2010, de acordo com relatório da ONU, a maconha ainda é a droga quantitativamente mais traficada e de maior dispersão geográfico no mundo, com comércio predominantemente intrarregional. A maior produção mundial, especialmente na forma de resina, ocorre no Afeganistão e Marrocos. Na América do Sul, Colômbia, Brasil e Paraguai são os principais produtores. As maiores apreensões ocorrem na América do Norte e na África, sendo EUA e México, os principais responsáveis¹¹.

A identificação acurada das evidências de *C. sativa* é essencial para a atividade policial e, assim, para que se faça justiça¹². Para produtos de *Cannabis* que mantêm as características botânicas próprias da espécie, uma combinação de teste químico presuntivos, cromatografia em camada delgada e análise física macroscópica e microscópica é considerada a abordagem analítica minimamente aceitável para a identificação positiva¹¹. No entanto, a individualização de diferentes cultivares de *Cannabis* pode, por exemplo, permitir a determinação geográfica de plantios e rotas de tráfico².

Assim, foi desenvolvida pesquisa exploratória e qualitativa, a partir de documentação indireta de fontes secundárias, na qual se buscou apresentar os

métodos químicos e botânicos atualmente utilizados para identificação inter e intraespecífica no gênero *Cannabis*, mas ênfase foi dada às ferramentas moleculares, as quais mostram resultados bastante úteis à inteligência policial.

2. Técnicas Químicas

Quimicamente, já foram isolados de folhas frescas de *C. sativa* mais de 70 canabinoides diferentes. Estas substâncias são predominantemente resultantes do metabolismo secundários, por vias em que se produzem alquilresorcinol e monoterpeno¹³. São de interesse forense os seguintes canabinoides: (-)- Δ^9 -trans-Tetrahydrocannabinol (THC); Ácido (-)- Δ^9 -trans-Tetrahydrocannabinolic (THCA); Cannabinol (CBN); Cannabidiol (CBD); Cannabigerol (CBG)¹¹. Um único dímero de Δ^9 -THC foi isolado recentemente, o Cannabisol, que apresenta ponte metileno entre as moléculas¹⁴.

Entre as espécies de *Cannabis*, bem como entre os sexos e partes da planta (Tabela 1), a produção de CBD e THC é quantitativamente diferente e tem suas rotas de síntese controladas por dois alelos (Bt e Bd) em um único locus^{11,15}.

Tabela 1: Concentração de THC em diferentes órgãos da *C. sativa*¹¹.

Órgão	Percentual de THC
Flores femininas	10-12%
Folhas	1-2%
Talos	0,1-0,3 %
Raízes	< 0,03 %

Estas substâncias, bem como as plantas utilizadas na sua produção, são enquadradas na Lista F2 da Portaria SVS/MS nº 344/1998, como psicotrópica de uso proscrito e, assim, considerada droga pela Lei 11.343/20064. O limite de 0,3% e 0,2% de THC tem sido utilizado respectivamente na Europa e no Canadá para determinar a diferença entre a variedade de *C. sativa* para a produção de fibra e aquela utilizada como entorpecente¹¹. Algumas substâncias canabiméticas já foram desenvolvidas e são comercializadas como medicamentos por laboratórios norte americanos para tratamento de anorexia e antiemético⁴.

A identificação presuntiva de canabinoides é realizada por meio de ensaios coloridos em via úmida como as técnicas do Fast Blue Salt B, Fast Corinth V Salt e de Duquenois-Levine. Contudo, é possível observar-se falsos-positivos para henna, noz-moscada, mace e agrimônia¹¹. Assim, um teste cromatográfico deve ser combinado.

O método de escolha é a Cromatografia em Camada Fina (TLC), sendo possível o uso de diferentes fases estacionárias e solventes. Esta técnica possibilita a análise qualitativa e semiquantitativa de *Cannabis*. Outros métodos descritos para identificação de THC são Espectrometria de Mobilidade de Íons (IMS); Cromatografia Gasosa com Detecção por Ionização em Chama (GC-FID) com ou sem derivação; Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS) ou em ultravioleta-visível (UV-VIS) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)^{1,11,16}.

Um método voltamétrico para a determinação de Δ^9 -THC foi proposto por Balbino et al (2012)¹⁷. O método mostrou-se confiável e seu limite de detecção permitiu o uso para traços de amostra. No entanto, a maioria das análises químicas mostra-se inadequada para amostras exíguas e com baixos níveis de THC ou para amostras que foram estocadas por longo período^{12,16}. Além disso, estas técnicas não permitem individualizar ou correlacionar amostras de *Cannabis*.

Uma técnica química que traz alguma informação sobre o local de cultivo é a baseada na característica isotópica, principalmente de C e N, e nos constituintes inorgânicos da planta que podem ser correlacionados a amostras de solo de cultivo¹⁸. Contudo, este perfil químico não permite vincular produtores, a partir das características intrínsecas da planta¹⁹.

3. Técnicas Botânicas

Morfologicamente, estas plantas são dioicas e apresentam aspecto herbáceo-arbustivo, com até seis metros de altura. As plantas masculinas são, em geral, menos robustas do que as femininas¹¹. Seus caules são fibrosos, eretos, ocos, finos, com estrias longitudinais e tricomas. A raiz é axial. As folhas são simples, palmatissectas, longopecioladas, levemente ásperas, com segmentos lineares, lanceolares e serrilhadas nas bordas, com número ímpar de folíolos. Predominam inflorescências que produzem uma resina rica em THC estocado nos tricomas

glandulares. Os frutos ou aquênios, com uma semente, são marrom-esverdeados e ovoides, com ou sem cálice persistente⁴.

Como as apreensões, em geral, são da erva seca, picada e prensada, a análise morfológica torna-se dificultada, especialmente para classificar espécies do gênero *Cannabis*. Para tanto, seria possível utilizar microscopia óptica ou eletrônica na tentativa de caracterizar algumas estruturas típicas nos fragmentos de folhas²⁰.

Os tricomas são estruturas microscópicas facilmente identificadas. Dois tipos de tricomas são observados por microscopia óptica em aumento não superior a 40 vezes: tricomas não glandulares e glandulares. Os não glandulares são unicelulares, rígidos e curvados com delgado ápice pontiagudo e se dividem em outros dois grupos que são observados simultaneamente: cistolíticos encontrados na superfície superior das folhas podem conter carbonato de cálcio e apresentar um formato de garra; não cistolíticos que ocorrem na superfície inferior da folha, brácteas e bractéolas e falta a base alargada. Tricomas glandulares, onde a resina é produzida e estocada, podem ser observados das seguintes formas: sésseis, sem pedúnculo, geralmente encontrados na epiderme inferior; pequenos tricomas glandulares bulbosos com hastes unicelulares; longos multicelulares nas bractéolas que cercam as flores femininas²¹.

Plantações de *C. sativa* podem ser monitoradas por meio de imagens espectrais obtidas através de sensoriamento remoto. De acordo com Azaria et al²², plantas de *Canabis* apresentam uma assinatura espectral diferente quando comparada com outras espécies da vegetação. A melhor identificação de *C. sativa* ocorre na região: 530-550 nm, 670-680 nm and 705-720 nm. Estes autores demonstraram também que a capacidade de distinção espectral da *C. sativa* pode ser utilizada tanto para níveis laboratoriais, quanto na plantação e até mesmo do alto.

Diferenças de reflectância espectrais entre *C. sativa* e espécies arbóreas e entre *C. sativa* e monocotiledôneas são maiores do que quando se compara a espécies herbáceas, especialmente no comprimento de onda do verde e do infravermelho próximo. Além disso, quando apresenta dossel mais denso, a *C. sativa* torna-se melhor discriminada de outra vegetação²³.

Na verdade, muitos estudos têm demonstrado a utilidade do uso de índices ópticos, obtidos através de ferramentas de sensoriamento remoto, na avaliação das características morfofisiológicas e nutricionais da vegetação. Estes índices são muito

utilizados na agricultura de precisão e podem distinguir a idade da planta, a densidade e a fertilização nitrogenada²³. Para a cobertura vegetal, por exemplo, existem diversos índices que objetivam ressaltar o comportamento espectral da vegetação em relação ao solo e a outros alvos²⁴.

Outra metodologia de identificação possível seria realizada por meio da relação parasita-hospedeiro. Esta está baseada na coevolução de grupos de parasitas obrigatórios com seus hospedeiros tornando-os restrito a determinado táxon, neste caso ao gênero *Cannabis*¹⁵.

4. Técnicas Moleculares

De modo geral, as análises atuais não podem restringir-se a identificar inequivocamente a espécie de *Cannabis*, mas devem possibilitar determinar a origem geográfica e correlacionar amostras apreendidas, permitindo revelar rotas de tráfico, relacionar grupos criminosos e distinguir amostras legais daquelas comercializadas como droga, onde o cultivo é permitido. Para tanto, os métodos moleculares, baseados nos perfis de DNA apresentam-se como ferramentas importantíssimas para a inteligência policial¹⁹.

O uso de ferramentas genéticas moleculares para identificação de plantas, especialmente daquelas do gênero *Cannabis*, ganhou força a partir da década de 1990. Tendo como alvo o DNA nuclear ou de organelas e utilizando-se de técnicas de RAPD (polimorfismo de DNA amplificado randomicamente); AFLP (polimorfismos de tamanho do fragmento de restrição amplificado) e RFLP (polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição), estas ferramentas demonstram potencialidade para individualizar amostra de *C. sativa*²⁵. A diferenciação entre tipos produtores de fibra e de droga da *C. sativa* pode ser feita também através do polimorfismo do gene da Δ -9-tetrahydrocannabinolic acid sintase²⁶.

4.1 RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado Randomicamente)

Esta técnica consiste em uma única reação de PCR onde existem iniciadores que geram produtos polimórficos de DNA amplificados aleatoriamente. Sempre que um iniciador tiver homologia com a sequência molde do DNA, na qual se ligará, um produto de PCR será então formado. Os produtos de PCR são de tamanho variável e costumam ser separados num gel de 1% de agarose e corados com brometo de etídio para a detecção do padrão de bandas. Não é necessário ter um conhecimento

prévio da sequência de DNA de um organismo para executar tal técnica, no entanto, as condições de PCR devem ser mantidas constantes para gerar consistentes padrões de bandas²⁷. O método já foi aceito e utilizado em tribunais para casos criminais e cíveis^{28,29}.

Esta técnica costuma ser menos onerosa e de simples realização, entretanto o método sofre com problemas de reprodutibilidade entre laboratórios. Esses problemas podem ser atribuídos a diferentes velocidades de rampagem nos termocicladores o que afeta a ligação dos iniciadores nas sequências alvo de DNA. Além disso, bandas fracas nos géis de agarose podem ser marcadas de modo diferente devido a diferenças na avaliação visual entre os especialistas durante a etapa de detecção^{27,30}.

4.2 AFLP (Polimorfismos de Tamanho do Fragmento de Restrição Amplificado)

Este método tem sido utilizado para distinguir indivíduos de muitas espécies, incluindo plantas³¹, insetos³², aves³³, peixes³⁴ e bactérias³⁵. A técnica de AFLP baseia-se na amplificação seletiva por PCR de fragmentos de restrição a partir de uma digestão total do DNA genômico. A técnica envolve três passos: (i) a restrição do DNA e ligação de adaptadores de oligonucleotídeos, (ii) amplificação seletiva de conjuntos de fragmentos de restrição, e (iii) a análise dos fragmentos amplificados²⁷.

A amplificação por PCR dos fragmentos de restrição é obtida através da ligação de adaptadores que possuem como alvo sequências do local de restrição para a hibridação com o iniciador. A amplificação seletiva é atingida através do uso de iniciadores que se estendem através dos fragmentos de restrição. A amplificação ocorre apenas naqueles em que as extensões dos iniciadores alinharem com os nucleotídeos que flanqueiam os sítios de restrição. Usando este método, os conjuntos de fragmentos de restrição podem ser visualizados sem o conhecimento prévio da sequência de nucleótidos. O método permite a coamplificação específica de um elevado número de fragmentos de restrição que podem ser analisados ao mesmo tempo. No entanto, é dependente da resolução do sistema de detecção que pode ser através de um sistema de eletroforese capilar³⁶.

A validação deste método para amostras de maconha é completa^{27,37} onde foram realizadas análises de maconha clonada mostrando que perfis clonais de polimorfismos de comprimento de fragmentos amplificados são altamente reprodutíveis.

4.3 RFLP (Polimorfismo de Tamanho de Fragmento de Restrição)

Técnica que também utiliza enzimas de restrição para a digestão do DNA genômico. Quando o DNA é digerido, muitos fragmentos de tamanhos diferentes são produzidos e estes então podem ser separados por um gel de agarose³⁸.

Após a separação em gel, O padrão de DNA é então transferido para um suporte sólido, tal como um filtro de nitrocelulose³⁹, e os fragmentos específicos são detectados através da utilização de uma sonda radioativa adequada constituída por uma sequência de DNA homóloga que hibridiza na região. O filtro é lavado, seco e colocado contra um filme fotográfico para a exposição autoradiográfica³⁸.

Todas as técnicas moleculares descritas apresentam problemas como a necessidade de grandes quantidades de DNA altamente purificado e, como já citado, há um baixo grau de reprodutividade entre analistas e laboratórios⁴⁰.

4.4 STR (Região de repetição em Tandem)

O genoma dos eucariotos é repleto de sequências repetitivas no DNA. Essas sequências ocorrem em vários tamanhos e são designadas tipicamente pelo comprimento da unidade de repetição e o número das repetições contínuas dessas unidades⁴¹.

As unidades de repetição quando ocorrem em um tamanho considerado médio são referidas como minissatélites ou número variável de repetições em tandem (VNTR). Os VNTRs são formadas por unidades de repetições que contêm desde 8 pares de base (pb) até 100pb de comprimento. Foram muito utilizados como marcadores genéticos na década de 1990⁴¹.

As regiões do DNA com as unidades menores de repetição, variando entre 2pb até 7pb de comprimento são denominadas microssatélites ou sequências simples de repetição (SSRs) ou ainda repetições curtas em tandem (STRs). Os STRs se tornaram mais populares devido a sua maior facilidade de amplificação por PCR. Isto ocorre devido a ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto serem similares na repetição e diferentes apenas no tamanho. O número de repetições em STR pode ser altamente variável entre indivíduos, tornando esses marcadores efetivos para o propósito de identificação e individualização de humanos⁴¹ e, por esse motivo, também estão sendo desenvolvidos para identificação de *C. sativa*⁴².

Assim, na última década, várias pesquisas de identificação genética da *C.sativa* passaram a utilizar-se da tecnologia de STR^{20,25}. De acordo com Carita⁴⁰,

os marcadores STR apresentam como vantagens a possibilidade de uso em reações multiplex rápidas e automatizadas; a produção de perfis mesmo com concentrações exíguas e com material degradado; a determinação da fonte, mesmo a partir de misturas de DNA; além de apresentarem resultados comparáveis e com grande discriminação estatística. Por outro lado, as principais desvantagens dos STR são a necessidade de determinação a priori da sequência de anelamento de *primers* e os gastos de tempo e capital com a otimização dos sistemas multiplex e no estabelecimento de bancos de dados para cada espécie.

Atualmente, já são descritos em torno de 30 marcadores de STR para *C. sativa*¹⁶. Existem dois kits que foram desenvolvidos com reações multiplex contendo marcadores microssatélites (STR): o primeiro validado pela Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDAM) com 10 loci de STR: ANUCS301, ANUCS302, ANUCS303, ANUCS304, ANUCS305, ANUCS501, B01-CANN1, B05-CANN1, B02-CANN2, C11-CANN119. Um segundo foi desenvolvido pelo grupo de Köhnemann et al, 2012⁴³ contendo 15 regiões de STR's: E07 CANN1, ANUCS 302, H09 CANN2, D02 CANN1, C11 CANN1, B01 CANN1, B05 CANN1, H06 CANN2, B02 CANN2, H11 CANN1, ANUCS305, ANUCS 308, ANUCS 301, CS1 e ANUCS 501. Estes locais apresentam alto polimorfismo alélico e heterozigose e núcleos de repetições com três ou mais nucleotídeos. O sistema descrito apresentou ótimos resultados para amplificação de material genético extraído de folhas secas de maconha pelo grupo de Howard e cols, 2008¹⁹.

4.5 DNA Barcode

Entre as técnicas genéticas que estão cada vez mais sendo adotadas para a identificação de espécies botânicas, encontra-se o sistema chamado de DNA Barcode (o código de barras do DNA). Esta ferramenta é utilizada para o estudo taxonômico da biodiversidade através da utilização de uma região curta e padronizada do DNA, proporcionando uma rápida e precisa identificação de organismos. Isto ajuda a caracterizar e distinguir espécies e indivíduos não identificados para atribuir à espécie^{44,45}.

Entretanto, para ser prático e satisfatório a região do gene selecionado deve satisfazer três critérios: (i) conter suficiente variabilidade entre as espécies, (ii) ser curto o suficiente para ser sequenciado em uma única reação, e (iii) conter regiões conservadas para o desenvolvimento de *primers* universais⁴⁶.

Devido ao grande interesse no estudo do DNA Barcode, em 2004 foi criado o *Consortium for the Barcode of Life* (CBOL), que consiste na criação de um banco de dados contendo atualmente em torno de 2.069.661 Barcodes de DNA de várias espécies⁴⁷. Fazem parte do CBOL cerca de 200 organizações de 50 países, que fomentam grupos de trabalho, workshops, conferências, divulgação e treinamento⁴⁷. Neste banco de dados encontramos oito sequências de DNA Barcode de *C. sativa* que foram depositadas: seis são sequências do gene *rbcl* e dois do gene *matK*.

Uma variedade de loci tem sido sugerida como uma possibilidade para o desenvolvimento de DNA barcode em plantas e é de consenso geral que a abordagem baseada em organelas é a estratégia mais eficaz para identificação botânica^{48,49,50}. O polimorfismo do DNA mitocondrial (mtDNA) e cloroplástico (cpDNA), de origem geralmente uniparental (materna) em angiospermas e com baixas taxas de mutação, são capazes de individualizar haplotipos de *C. sativa*, provendo dados evolutivos e biogeográficos. Gilmore, Peakall e Robertson³ demonstraram que a análise de 12 loci de mtDNA e cpDNA revelou 7 loci polimórficos, sendo 5 regiões variáveis de tamanho e 2 polimorfismos de nucleotídeo único (SNP). Assim, seria possível determinar três grupos de haplótipos de *Cannabis* originados nos tipos selvagem e nos produtores de droga e fibra.

Dessa forma, um dos genes candidatos é o ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (*rbcl*) presente no DNA dos cloroplastos das plantas e utilizado como um sistema de DNA Barcode. Este gene codifica uma proteína essencial para o processo fotossintético. Assim, sofre pressão seletiva positiva, mantendo uma região bem conservada, que possibilita comparar espécies distantes evolutivamente e facilita o desenho de iniciadores universais utilizados na técnica⁵¹.

Recentemente, Ribeiro e cols. 2013⁵² realizaram um trabalho de identificação molecular de *C. Sativa* em amostras que foram apreendidas pela Polícia Civil do Estado do Rio de Janeiro através do sistema de DNA Barcode, utilizando o gene *rbcl*. Através deste método, foi possível caracterizar três haplótipos distintos encontrados em quatro regiões: um haplótipo observado nos Estados Unidos e Reino Unido, o segundo pertencente à China e o terceiro típico das amostras que foram apreendidas no Rio de Janeiro. Propuseram assim que esse gene cloroplástico pode ser usado como um marcador biogeográfico e sugeriram se tratar de uma assinatura genética para análise forense.

Os princípios importantes para a padronização de uma região a ser utilizada como DNA Barcode envolvem a escolha de um ou poucos loci padrão que possam ser sequenciados rotineiramente e de forma confiável em grandes e diversos conjuntos de amostras, resultando em dados facilmente comparáveis para permitir a distinção interespecífica. O Barcode padrão para animais, por exemplo, utiliza o gene CO1 que se encaixa nesses critérios: é um haploide de herança uniparental que apresenta altos níveis de poder discriminatório e é uma região não propensa a grandes variações, com microinversões, ou repetições de mononucleotídeos frequentes^{53,54}. Estas características, combinadas com a capacidade de desenvolvimento de conjuntos de *primers* robustos resultam na alta qualidade desta região para utilização como DNA Barcode⁴⁸.

Entretanto, encontrar uma região equivalente para amplificação em plantas tem-se revelado difícil. Em geral a baixa taxa de substituição de nucleotídeos em genomas mitocondriais de plantas, impede o uso de CO1 como Barcode para identificação botânica⁵⁵. Assim, na busca de um Barcode para plantas, acreditam muitos pesquisadores, ser necessária a utilização de múltiplos marcadores para a adequada discriminação entre espécies⁴⁸.

Dessa maneira, quatro principais sugestões para o desenvolvimento de Barcode em plantas, propostas por três diferentes grupos de pesquisa, envolvem várias combinações de alguns marcadores de plastos: rpoC1+ rpoB+matK ou rpoC1 + matK +trnH-psbA⁵⁶, rbcL + trnH-psbA⁵⁷. Diversas combinações foram discutidas na 2ª Conferencia Internacional Barcode of Life em Taipei, mas não se chegou a consenso. Apesar dos desafios, o desenvolvimento do DNA Barcode de Plantas será extremamente útil para numerosas aplicações, tais como para identificação forense, ecológicas e taxonomia⁴⁸.

4.6 Real Time PCR (qPCR)

A tecnologia de qPCR já tem sido utilizada para identificar amostras desconhecidas de origem animal^{58,59} e já é amplamente aceito em ambientes forenses⁶⁰. Este método não está limitado a amostras com grande quantidade e qualidade de DNA e a análise não requer o processamento pós-PCR, pois a tecnologia permite a amplificação e identificação simultâneas de uma ou mais sequências específicas de DNA em tempo real. Além disso, os protocolos minimizam o risco de exposição à

contaminação, reduzindo tanto o custo quanto o tempo necessário para identificar uma amostra desconhecida⁶¹.

Recentemente Johnson e cols. 2013⁶¹ validaram uma metodologia de qPCR para identificação de amostras de DNA de *C. sativa*. As regiões foram amplificadas usando os *primers* C, D, G, e H, que têm como alvo o espaçador intergênico do exón 3' trnL e o gene trnF no cloroplasto, conforme descrito no Linacre e Thorpe⁶².

As sondas testadas foram extraídas de sementes de *C. sativa* e de material foliar da *H. lupulus* (sonda Green Plant) O resultado mostrou que as amostras da semente *C. sativa* exibiram atividades fluorogênicas de ambas as sondas, enquanto apenas a sonda Green Plant produziu sinais quando o *H. lupulus* foi testado. Assim, concluiu-se que o método pode distinguir com precisão amostras de *C. sativa* e seu parente mais próximo *H. lupulus*⁶¹.

5. Conclusão

Na rotina dos laboratórios forenses, a identificação química da *Cannabis sativa* é realizada pela determinação da presença de canabinoides. Entre os métodos utilizados há os ensaios químicos de cor em via úmida e aqueles em que se utilizam diversas tecnologias cromatográficas que podem ser acopladas a detectores específicos. Apesar de, em conjunto com métodos botânicos micro e macroscópicos, serem suficientes para a determinação inequívoca do material, demandada para o devido processo legal, estes métodos podem ser inadequada para amostras em quantidade e qualidade reduzidas, além de não permitirem individualizar amostras de *Cannabis*.

Assim, com o uso de tecnologias moleculares é possível ir além. Atualmente, pode-se vincular geograficamente o material apreendido e correlacionar amostras, o que permite revelar rotas de tráfico e relacionar grupos criminosos. Estes métodos moleculares são baseados nos perfis de DNA, tornando-se ferramentas importantíssimas. Entre estes métodos, o DNA Barcode proporciona rápida e precisa identificação de *Cannabis*, a partir de uma pequena região padronizada do genoma, a qual caracteriza e distingue espécies e indivíduos, contribuindo para a inteligência policial.

Referências

1. Coyle HM, Palmbach T, Ladd C, Lee HC. Tracking Clonally Propagated Marijuana Using Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) Analysis. In: Coyle, H.M. (ed)

- Forensic Botany. Principles and Applications to Criminal Casework. CRC Press: Boca Raton: 2005; p.185-96.
2. Datwyler SL, Weiblen GD. Genetic variation in hemp and marijuana (*Cannabis sativa* L.) according to amplified fragment length polymorphisms. J Forensic Sci. 2006; 51:371-75.
 3. Gilmore S, Peakall R, Robertson J. Organelle DNA haplotypes reflect crop-use characteristics and geographic origins of *Cannabis sativa*. Forensic Sci Int. 2007; 172:179-90.
 4. Passagli M, Marinho PA, Ricoy CD. Drogas Modificadoras. In: Passagli, M. Toxicologia Forense. Campinas: Millennium, 2009; p. 171-208.
 5. Gabeira FA. Maconha. São Paulo: Publifolha, 2000; p.73.
 6. Balzer C. Santo Daime na Alemanha. Uma fruta proibida do Brasil no “Mercado das Religiões”. In: Labate, B.C. e Araújo, W.S. O uso Ritual da Ayahuasca. Mercado das Letras, 2009; p.507-40.
 7. Garrido RG, Sabino BD. Ayahuasca: entre o legal e o cultural. Saúde, Ética & Justiça. 2009; 14(2):57-66.
 8. Barret L. The Rastafarians. Boston: Bacon Press. 1997.
 9. Carlini EA. A História da Maconha no Brasil. J Bras Psiquiatr. 2006; 55(4): 314-7.
 10. Passagli M. Drogas – Uso abusivo e dependência In: Passagli, M. Toxicologia Forense. Campinas: Millennium, 2009; p.51-70.
 11. UNODC. World Drug Report. New York: UN, 2012; 101p.
 12. Sanger M. Species Identifications of Marijuana by DNA Analysis. In: Coyle, H.M. (ed) Forensic Botany. Principles and Applications to Criminal Casework. CRC Press: Boca Raton: 2005; p.159-61.
 13. Shoyama Y, Tamada T, Kurihara K, Takeuchi A, Taura F, Arai S, Blaber M, Shoyama Y, Morimoto S, Kuroki R. Structure and function of 1-tetrahydrocannabinolic acid (THCA) synthase, the enzyme controlling the psychoactivity of *Cannabis sativa*. J Mol Biol. 2012; 423: 96-105.
 14. Zulfikar F, Ross AS, Slade D, Ahmed AS, Radwan MM, Ali Z, Khan IA, ElSohly MA. Cannabisol, a novel D9-THC dimer possessing a unique methylene bridge, isolated from *Cannabis sativa*. Tetrahedron Letters 2012; 53: 3560-2.
 15. Mc Partland JM, Comentary. J Forensic Sci. 2006; 51(6):1405.
 16. Castro JL. O. Identificação forense de microssatélites para investigação da origem de *Cannabis sativa* no Brasil e Paraguai. Dissertação de mestrado. Universidade Católica de Brasília, 2006.
 17. Balbino MA, de Menezes MM, Eleoterio IC, Saczk AA, Okumura LL, Tristao HM, de Oliveira MF. Voltammetric determination of Delta9-THC in glassy carbon electrode: An

important contribution to forensic electroanalysis. *Forensic Sci Int.* 2012; 221: 29-32.

18. Shibuya EK. Rastreamento da origem geográfica de amostra de maconha apreendidas nas ruas de São Paulo por meio de assinaturas químicas. Tese de Doutorado em Ciências–Tecnologia Nuclear–Materiais. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2005.
19. Howard C, Gilmore S, Robertson J, Peakall R. Developmental validation of a *Cannabis sativa* STR multiplex system for forensic analysis. *J Forensic Sci.* 2008; 53:1061-7.
20. Mitosinka GT, Thornton JI, Hayes TL. The examination of cystolithic hairs of *Cannabis* and other plants by means of the scanning electron microscope. *J Forensic Sci Soc.* 1972; 12:521-9.
21. United Nation Office of Drugs and Crime (UNODC). Recommended methods for the identification and analysis of cannabis and cannabis products, 2009.
22. Azaria I, Goldshleger N, Ben-Dor E, Bar-Hamburger R. Detection of Cannabis Plants by Hyper-Spectral Remote Sensing Means. Proceedings of 6th EARSeL SIG IS workshop imaging spectroscopy: Innovative tool for scientific and commercial environmental applications, 2009.
23. Daughtry CST, Walthall CL. Spectral Discrimination of *Cannabis sativa* L. Leaves and Canopies. *Remote Sens Environ.* 1998; 64: 192-201.
24. Brandão ZN, Bezerra MVC, Freire EC, da Silva BB. Determinação de Índices de Vegetação Usando Imagens de Satélite para a Agricultura de Precisão. In: Anais do V Congresso Brasileiro de Algodão, 2005.
25. Hsieh HM, Hou RJ, Tsai LC, Wei CS, Liu SW, Huang LH, Kuo YC, Linacre A, Lee JC. A highly polymorphic STR locus in *Cannabis sativa*. *Forensic Sci Int.* 2003; 131:53-8.
26. Kojoma M, Seki H, Yoshida S, Muranaka T. DNA polymorphisms in the tetrahydrocannabinolic acid (THCA) synthase gene in "drug-type" and "fiber-type" *Cannabis sativa* L. *Forensic Sci Int.* 2006; 159:132-40.
27. Coyle HM, Palmbach T, Juliano N, Ladd C, Lee HC. An Overview of DNA Methods for the Identification and Individualization of Marijuana. *Croatian Medical Journal* 2003; 44(3):315-21.
28. Yoon CK. Forensic science. Botanical witness for the prosecution. *Science* 1993; 260:894-5.
29. Congiu L, Chicca M, Cella R, Rossi R, Bernacchia G. The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to identify strawberry varieties: a forensic application. *Mol Ecol.* 2000; 9:229-32.
30. Jones CJ, Edwards KJ, Castaglione S, Winfield MO, Sala F, van de Wiel C, Bredemeijer G, Vosman B, Matthes M, Daly A, Brettschneider R, Bettini P, Buiatti M,

- Maestri E, Malcevschi A, Marmioli N, Aert R, Volckaert G, Rueda J, Linacero R, Vazquez A, Karp A. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Mol Breed*. 1997; 3:381-90.
31. Becker J, Vos P, Kuiper M, Salamini F, Heun M. Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. *Mol Gen Genet*. 1995; 249:65-73.
 32. Parsons YM, Shaw KL. Species boundaries and genetic diversity among Hawaiian crickets of the genus *Laupala* identified using amplified fragment length polymorphism. *Mol Ecol*. 2001; 10:1765-72.
 33. Bensch S, Helbig AJ, Salomon M, Seibold I. Amplified fragment length polymorphism analysis identifies hybrids between two subspecies of warblers. *Mol Ecol*. 2002; 11:473-81.
 34. Liu Z, Nichols A, Li P, Dunham RA. Inheritance and usefulness of AFLP markers in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), blue catfish (*I. furcatus*), and their F1, F2, and backcross hybrids. *Mol Gen Genet*. 1998; 258:260-8.
 35. Avrova AO, Hyman LJ, Toth RL, Toth IK. Application of amplified fragment length polymorphism fingerprinting for taxonomy and identification of the soft rot bacteria *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. *Appl Environ Microbiol*. 2002; 68:1499-508.
 36. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Friters A, Pot J, Paleman J, Kuiper M, Zabeau M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*. 1995; 11, 23(21): 4407–14.
 37. Coyle HM, Germano-Presby J, Ladd C, Palmbach T, Lee HC. Tracking clonal marijuana using amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis: an overview. *Proceedings of the 13th International Symposium on Human Identification*; 2002 Oct 7-13; Phoenix, AZ. Disponível em: URL:<http://www.promega.com>. Acesso em: 26 mai 2013
 38. Beckmann JS, Soller M. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs *Theor Appl Genet*. 1983; 67:35-43.
 39. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*. 1975; 98:503-17.
 40. Carita EJ. Classical and Future DNA Typing Technologies for Plants. In: Coyle, H.M. (ed) *Forensic Botany. Principles and Applications to Criminal Casework*. Boca Raton: CRC Press: 2005; p.253-74.
 41. Butler JM. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. Elsevier: 2012.

42. Gilmore S, Peakall R, Robertson J. Short tandem repeat (STR) DNA markers are hypervariable and informative in *Cannabis sativa*: implications for forensic investigations. *Forensic Sci Int.* 2003; 131:65-74.
43. Kohnemann S, Nedele J, Schwotzer D, Morzfeld J, Pfeiffer H. The validation of a 15 STR multiplex PCR for *Cannabis* species. *Int J Legal Med.* 2012; 126:601-6.
44. Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Biol Sci.* 2003; 270:313-21.
45. Ratnasingham S, Hebert PD. bold: The Barcode of Life Data System. *Mol Ecol Notes* 2007; 7:355-64.
46. Clement LW, Donoghue MJ. Barcoding success as a function of phylogenetic relatedness in *Viburnum*, a clade of woody angiosperms. *BMC Evolutionary Biology.* 2012; 12:73.
47. CBOL. BOLD Systems, 2012. Disponível em: <http://www.boldsystems.org>. Acesso em: 21 Maio 2013.
48. Hollingsworth PM, Graham SW, Little DP. Choosing and Using a Plant DNA Barcode. *PLoS ONE.* 2011; Maio: 1-13.
49. Bafeel SO, Arif IA, Bakir MA, Khan HA, Farhan AHA, Homaidan AAA, Ahamed A, Thomas J. Comparative evaluation of PCR success with universal primers of maturase K (matK) and ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase oxygenase large subunit (rbcL) for barcoding of some arid plants. *Plant Omics Journal.* 2011; 4: 195-8.
50. Bruni I, De MF, Galimberti A, Galasso G, Banfi E, Casiraghi M, Labra M. Identification of poisonous plants by DNA barcoding approach. *Int.J.Legal Med.* 2010; 124:595-603.
51. Freitas LB, Bered F. *Genética e Evolução Vegetal.* 2003; 1ª ed., (S.I.): UFGRS.
52. Ribeiro, ASD; Dias, VH; Mello, ICT; Silva, R; Sabino, BD; Garrido RG; Seldin, L; Moura-Neto RS. O gene rbcL como barcode para identificação forense de *Cannabis sativa*. *Saúde, Ética & Justiça.* 2013; 18 (Ed.Esp.): 67-71.
53. Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London, series B* 2003; 270: 313–21.
54. Fazekas AJ, Kesanakurti PR, Burgess KS, Percy DM, Graham SW, Barret SC H, Newmaster SG, Ibabaei MH, Husband BC. Are plant species inherently harder to discriminate than animal species using DNA barcoding markers? *Molecular Ecology Resources* 2009; 9: 130–139.
55. Fazekas AJ, Burgess KS, Kesanakurti PR, Graham SW, Newmaster SG, Husband BC, Percy DM, Hajibabaei M, Barrett SC. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PLoS.One.* 2008; 3: e2802.

56. Chase MW, Cowan RS, Hollingsworth PM, van den Berg C, Madriñán S, Petersen GSO, Jorgensen T, Cameron KM., Carine M, Pedersen Ni, Hedderson TAJ, Conrad F, Salazar GA, Richardson JE, Hollingsworth ML, Barraclough TG, Kelly L, Wilkinson M. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *Taxon* 2007; 56: 295–9.
57. Kress WJ, Erickson DL. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcl* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS.One.* 2007; 2: e508.

58. Kanthaswamy S, Premasuthan A, Ng J, Satkoski J, Goyal V. Quantitative real-time PCR (qPCR) assay for human-dog-cat species identification and nuclear DNA quantification. *Forensic Sci Int Genet.* 2012; 6: 290-5.
59. Evans JJ, Wictum EJ, Penedo MC, Kanthaswamy S. Real-time polymerase chain reaction quantification of canine DNA. *J Forensic Sci.* 2007; 52:93-6.
60. American Academy of Forensic Science (AAFS). qPCR workshop, 2008. Disponível em: <http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/training/AAFS2008qPCRworkshop.htm>. Acesso em: 26 maio 2013.
61. Johnson CE, Premasuthan A, Satkoski Trask J, Kanthaswamy S. Species Identification of *Cannabis sativa* using Real-Time Quantitative PCR (qPCR). *J Forensic Sci.* 2013; 58(2): 486-90.
62. Linacre A, Thorpe J. Detection and identification of cannabis by DNA. *Forensic Sci Int.* 1998; 91:71-6.