



INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA (PPGQ)

DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**IDENTIFICAÇÃO DE FITOCANABINOIDES EM PRODUTOS DE *CANNABIS*
SATIVA POR CROMATOGRÁFIA EM CAMADA DELGADA E ANÁLISE DE
IMAGENS**

Aluna: Rayssa Rocha Zeidan dos Santos

Orientador: Prof.º Dr. Jez Willian Batista Braga

Brasília, DF

2024

1

Rayssa Rocha Zeidan dos Santos

DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**IDENTIFICAÇÃO DE FITOCANABINOIDES EM PRODUTOS DE *CANNABIS*
SATIVA POR CROMATOGRÁFIA EM CAMADA DELGADA E ANÁLISE DE
IMAGENS**

LINHA DE PESQUISA:
MÉTODOS DE ANÁLISE

Orientador: Jez Willian Batista Braga

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química do Instituto de Química da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

Brasília, DF

2024

2

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo zelo e a perseverança em minha trajetória. Aos meus pais e amigos pelo carinho e suporte nos momentos mais difíceis, sem os quais o desenvolvimento desta dissertação não seria possível.

Sou grata aos meus professores, sobretudo, ao meu orientador prof. Dr. Jez Willian Batista Braga e ao coorientador Msc. Luciano Chaves Arantes pelos conselhos, paciência e determinação fundamentais à concepção e condução deste trabalho.

Gostaria de deixar registrado igualmente o meu reconhecimento ao Laboratório de Química e Física Forense (LQFF) da Polícia Civil do Distrito Federal, junto à toda a equipe de perícia responsável direta e indiretamente pela infraestrutura e cessão de amostras, imprescindíveis para a execução dos ensaios.

Aos professores Dr. Guilherme Dotto Brand e Dr. Ângelo Henrique de Lira Machado, além de todos os demais responsáveis pelo Laboratório de Isolamento e Transformação de Moléculas Orgânicas (LITMO) da Universidade de Brasília pela infraestrutura e o Espectrômetro de Massas.

Ao Conselho de Aprimoramento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), à Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal e à Universidade de Brasília (FUB) pelo auxílio financeiro e bolsa de estudos, respectivamente.

Brasília, DF

2024

3

DEDICATÓRIA

Dedico o presente trabalho ao meu avô que, por sua vasta sabedoria e inquebrantável perseverança, mesmo frente aos momentos mais difíceis de sua vida, representa um verdadeiro exemplo de superação, inspirando-me a ser uma pessoa melhor a cada dia.

Brasília, DF

2024

4

Tente mover o mundo – o primeiro passo será
mover a si mesmo.

(Platão)

RESUMO

A Cromatografia em Camada Delgada (CCD) é uma técnica amplamente empregada nas instituições de perícia criminal em razão da simplicidade, baixo custo e alta frequência analítica. Apesar disso, apresenta desvantagens quanto a resolução, a detectabilidade, a reprodutibilidade e a subjetividade na interpretação dos resultados. Para proporcionar medidas mais objetivas dos sinais, diversas ferramentas quimiométricas e a análise de imagens digitais podem ser empregadas. Nesse sentido, o presente estudo visou avaliar a eficiência das separações para a identificação de alguns fitocanabinoides presentes em amostras de *Cannabis sativa* L. apreendidos pela Polícia Civil do Distrito Federal (PCDF). As amostras foram acondicionadas em microtubos plásticos e submetidas a extração com clorofórmio e à reação colorimétrica com o sais azo Fast Blue B (FBBS) e Fast Blue BB (FBBBS). Em seguida, foram feitas aplicações da fase orgânica em placas de CCD para eluição nas condições cromatográficas estabelecidas para os sistemas TI e TJ. Imagens das placas de CCD foram obtidas primeiramente através de um scanner comum e posteriormente importadas para o Matlab®, onde foram feitos ajustes na resolução e pre-processamentos para a obtenção dos cromatogramas de cada corrida nos diferentes componentes de cor. Após a redução dos ruídos e a correção de linha de base, os resultados de distância de migração, área e altura de pico foram obtidos, os quais apresentaram boa precisão e reprodutibilidade. Por fim, a estequiometria da reação de acoplamento dos fitocanabinoides com os sais azo foi estudada por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas de Tempo de Voo (LC TripleTOF). Os ensaios de caracterização demonstraram que apesar do sal azo FBBS apresentar dois grupos diazônios, a reação de acoplamento diazoico ocorre majoritariamente na razão de 1:1 para o THC, CBD e CBN, entretanto ela ocorre na razão de 2:1 para o CBC. THC, CBD, CBN e CBC foram distinguíveis tanto nas análises por LC TripleTOF quanto nas análises por CCD. Os resultados obtidos por CCD com amostras apreendidas foram comparados com os obtidos com padrões analíticos de THC, CBN e CBD, os quais evidenciaram picos bem definidos, com boa intensidade e reprodutíveis, além de terem sido obtidas regressões significativas, com $R^2 > 0,92$ para a camada azul e saturação. O método se mostrou superior em termos qualitativos ao atualmente empregado na PCDF, mas a reação de acoplamento entre FBBBS e os analitos ainda precisa ser melhor elucidada para possibilitar a quantificação dos analitos.

Palavras-chave: Cannabis, CCD, Fitocanabinoides, Química Forense, Quimiometria

ABSTRACT

Thin Layer Chromatography (TLC) is a technique widely employed in forensic institutions due to its simplicity, low cost, and high analytical frequency. However, it presents disadvantages regarding resolution, detectability, reproducibility, and subjectivity in result interpretation. To provide more objective measures of the signals, various chemometric tools and image analysis can be employed. In this regard, the present study aimed to evaluate the efficiency of separations for the identification and quantification of some phytocannabinoids present in *Cannabis sativa* L. samples seized by the Civil Police of the Federal District (PCDF). The samples were stored in plastic microtubes and subjected to extraction with chloroform and colorimetric reaction with Fast Blue B (FBBS) and Fast Blue BB (FBBBS) azo salts. Subsequently, applications of the organic phase were made on TLC plates for elution under the chromatographic conditions established for systems TI and TJ. Images of the TLC plates were first obtained through a common scanner and then imported into Matlab®, where adjustments in resolution and preprocessing were made to obtain chromatograms of each run in all RGB and HSV color components. After noise reduction and baseline correction, migration distance, area, and peak height results were obtained, showing good precision and reproducibility. Finally, the stoichiometry of the coupling reaction of phytocannabinoids with azo salts was studied by Liquid Chromatography coupled with Time-of-Flight Mass Spectrometry (LC TripleTOF). Characterization assays demonstrated that despite the FBBS azo salt presenting two diazonium groups, the diazoic coupling reaction occurs mainly in a 1:1 ratio for THC, CBD, and CBN, however, it occurs in a 2:1 ratio for CBC. THC, CBD, CBN, and CBC were distinguishable both in LC TripleTOF and TLC analyses. The results obtained by TLC with seized samples were compared with those obtained with analytical standards of THC, CBN, and CBD, which showed well-defined peaks with good intensity and reproducibility, and significant regressions were obtained with $R^2 > 0.92$ for the blue layer and saturation. The method proved to be superior qualitatively to the one currently employed in PCDF, but the coupling reaction between FBBBS and the analytes still needs to be further elucidated to enable the quantification of the analytes.

Keywords: Cannabis, TLC, Phytocannabinoids, Forensic Chemistry, Chemometrics

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estruturas moleculares do (A) tetrahydrocannabinol (THC), (B) canabidiol (CBD), (C) canabinol (CBN) e (D) canabicromeno (CBC).	20
Figura 2. Apreensões de produtos de Cannabis sativa entre os anos de 2017 e 2021. Fonte: UNODC World Drug Report, 2023	21
Figura 3. Esquema ilustrando a formação de um possível produto da reação de acoplamento entre o THC e o FBBBS.	22
Figura 4. Figura ilustrativa de uma cuba para análise em cromatografia em Camada Delgada. (DM) Distância de Migração dos compostos separados, (PA) Pontos de aplicação, (FM) Fase móvel, (DS) Distância percorrida pelo solvente.....	25
Figura 5. Estrutura molecular do Sal Fast Blue BB (FBBBS).....	32
Figura 6. Esquema para realização do teste colorimétrico de triagem empregando o sal Fast Blue B, onde ao final do processo se observa a formação de uma coloração avermelhada no fundo do microtubo indicando a presença do THC na amostra estudada.	33
Figura 7. Sistema TJ para as corridas de CCD com a tampa da cuba fechada (À esquerda) e Sistema TI para as corridas de CCD com a tampa da cuba entreaberta (À direita).....	34
Figura 8. Esquema ilustrando o processamento das imagens para a obtenção dos cromatogramas.	36
Figura 9. Esquema ilustrando a formação de um possível produto da reação de acoplamento entre o THC e o FBBBS.	38
Figura 10. Esquema de aplicação das triplicatas de A1 a A6 na placa de CCD.	40
Figura 11. Esquema de aplicação das amostras A1 e A2 e suas diluições na placa da CCD. MIX: padrão contendo os compostos THC, CBN e CBD.	41
Figura 12. Esquema de aplicação das amostras de A1 a A4 e suas adições na placa de CCD. MIX: padrão contendo os compostos THC, CBN e CBD.	42
Figura 13. Vegetal macerado “S.2893” (A); Vegetal macerado “S.12776” (B); “Pixe – IP2” (C); Óleo de CBD (D); Branco de Reação “Br_Rx” (E).	43
Figura 14. Acoplamento com o sal fast blue B após a corrida cromatográfica no sistema TI (A) e antes da corrida cromatográfica no sistema TI (B).....	44
Figura 15. Placas onde foram aplicados 1µL dos padrões de (THC) tetrahydrocannabinol, (CBD) canabidiol, (CBN)	

canabinol e (CBC) canabicromeno, na concentração de 5 mg/mL, utilizando o clorofórmio (onde não foi indicado) e o etanol (EtOH) como solventes extratores e seguindo a mesma ordem de aplicação para eluição nos sistemas: (superior) Sistema TI e (inferior) Sistema TJ.	46
Figura 16. Zoom na região dos pontos de aplicação (PA) de uma placa de CCD, onde foi selecionada a altura que englobava as aplicações de todas as amostras (pixel 60).	47
Figura 17. Gráfico das intensidades ao longo do pixel selecionado na figura 14 que permite determinar a intensidade mínima para identificar todas as corridas de interesse (0.1).	48
Figura 18. (À esquerda) Exemplo do cromatograma bruto obtido para o processamento da imagem da placa. (À direita) Cromatograma após correção da linha de base e alisamento pelo método de Savitzky-Golay.	48
Figura 19. Cromatogramas obtidos dos canais de cor: RGB e GS.	50
Figura 20. Cromatogramas obtidos dos canais de cor: HSV.	51
Figura 21. Destaque das corridas 3(padrão de CBN), 5 (MIX de fitocanabinoides) e 10 (padrão de CBD) e seus respectivos cromatogramas nas componentes B e G. PA: ponto de aplicação. Separação obtida com o sistema TI. .	52
Figura 22. Destaque das corridas 20 (MIX de fitocanabinoides), 21 (padrão CBN) e 25 (padrão CBD) e seus respectivos cromatogramas nas componentes B e G. PA: ponto de aplicação. Separação obtida com o sistema TJ. .	53
Figura 23. Placa de CCD, onde foi diluída e aplicada em triplicata uma amostra de maconha apreendida.	54
Figura 24. À esquerda, cromatograma de todas as corridas da placa da figura 17 no sistema TI no canal azul. À direita, cromatogramas das corridas 16, 17 e 18 (diluição 1/20 da amostra).	55
Figura 25. Curvas analíticas para os canais azul e saturação utilizando a área dos picos como base de cálculo.	55
Figura 26. Efeito de arraste visualizado nas sete primeiras corridas.	56
Figura 27. Passo a passo das correções feitas nas bandas dos analitos antes da integração das áreas dos picos de interesse visualizados nos cromatogramas, onde é demonstrado que uma representação gráfica em 3D da banda pode ser obtida através da medição das áreas dos <i>spots</i>	58
Figura 28. Raspagens dos fitocanabinoides feitas com estilete em duas placas de CCD sem adição de composto fluorescente (F254) no sistema TI. À esquerda, “padrões positivos” de fitocanabinoides raspados de placa, cuja derivatização aconteceu após a corrida cromatográfica. À direita, formas ácidas raspadas de placa, cuja derivatização aconteceu previamente à corrida cromatográfica.	59
Figura 29. Cromatogramas obtidos no LC/MS dos padrões dos fitocanabinoides tetrahydrocannabinol (THC) e canabidiol (CBD).	61
Figura 30. Cromatogramas obtidos no LC/MS dos padrões dos fitocanabinoides canabicromene (CBC) e canabinol	

(CBN).....	62
Figura 31. Placas de HPTLC isentas de F ₂₅₄ corridas no sistema TI, onde foram aplicadas as amostras: óleo de CBD (A), S.12776 (B), “pixe” (C) e S.2893 (D). A mesma amostra foi adicionada em todos os pontos de aplicação.	63
Figura 32. Placas de HPTLC isentas de F ₂₅₄ corridas na diagonal (TLC-2D) no sistema TI, onde foram aplicadas: óleo de CBD com secagem e ressuspensão em etanol (A), amostra S.12776 com secagem e ressuspensão em etanol (B), Branco de reação com clorofórmio (C) e “pixe” IP2 com clorofórmio (D).	64
Figura 33. (A) Placa 3 de exatidão, (B) Placa 4 de precisão e (C) Placa 5 de LOD, com A1 a A6 sendo as amostras selecionadas, AD1, AD2 e AD3 sendo as respectivas adições de padrão, A1’ a A6’ e A1’’ a A6’’ sendo as respectivas replicatas e A1D1 a A1D7 e A2D1 a A2D7 sendo as respectivas diluições.	65
Figura 34. Placas de CCD obtidas pelo método de rotina em uso na PCDF pelo sistema TI (A) e TJ (B).	67
Figura 35. Placas de CCD obtidas pela metodologia proposta pelo presente estudo pelo sistema TI (placa 1) (A) e TJ (placa 2) (B).	67
Figura 36. Cromatogramas dos padrões de THC e CBN das curvas analíticas das placas 3, 4 e 5 nos canais azul e saturação, onde (P.A.) é o ponto de aplicação.	68
Figura 37. Estudo comparativo entre os canais azul e saturação, utilizando os resultados das áreas e das alturas dos picos encontrados quanto à sua significância e sensibilidade na construção da curva analítica do THC.	70
Figura 38. Gráficos de regressão comparativos entre os canais azul e saturação, utilizando os resultados das áreas e das alturas dos picos encontrados quanto à sua significância e sensibilidade na construção da curva analítica do CBN.	71
Figura 39. Cromatogramas das amostras de A1 a A6 e suas replicatas (placa 4) nos canais azul e saturação, onde (P.A.) é o ponto de aplicação.	73
Figura 40. Cromatogramas das amostras A1 e A2 e suas 7 diluições (placa 5) nos canais azul e saturação, onde (P.A.) é o ponto de aplicação.	74
Figura 41. Novo ensaio feito na placa 6 utilizando o sistema TJ, onde se constata a ausência de sobreposições de bandas e uma minimização significativa do “efeito sorriso”.	77
Figura 42. Cromatogramas das amostras de A1 e A4 e suas respectivas adições de padrão analítico (placa 3) nos canais azul e saturação, onde (P.A.) é o ponto de aplicação.	78
Figura 43. Placa 7 feita no TI com extração de 30 minutos, sendo A1 a A14 as amostras e 1AD suas respectivas adições de padrão.	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Categorização das técnicas analíticas.....	23
Tabela 2. Concentrações dos padrões de THC e CBN aplicadas nas placas de CCD.....	40
Tabela 3. Preparo das diluições das amostras A1 e A2 na placa de CCD.....	41
Tabela 4. Preparo das adições das amostras de A1 a A4 na placa de CCD.	42
Tabela 5. Resultados médios, desvios padrões e coeficiente de variação (entre parênteses) das distâncias de migração (DM), área e altura obtidos na análise da placa CCD dos padrões no sistema TI.	54
Tabela 6. Análise de variância para o canal azul, onde são apresentadas as Fontes da variação (Fonte), a variação dos dados do modelo (Somatória Quadrática), a razão entre a somatória e os graus de liberdade (Média Quadrática), além de medidas objetivas quanto à adequação do moledo (Falta de ajuste) e os erros obtidos (Erro Puro).	57
Tabela 7. Análise de variância para o canal saturação, onde são apresentadas as Fontes da variação (Fonte), a variação dos dados do modelo (Somatória Quadrática), a razão entre a somatória e os graus de liberdade (Média Quadrática), além de medidas objetivas quanto à adequação do moledo (Falta de ajuste) e os erros obtidos (Erro Puro).	57
Tabela 8. Resultados dos RFs** (%) dos padrões analíticos (P) e das amostras (A) estudadas nas placas 3, 4 e 5 de CCD apresentadas na figura 33 com eluições pelo sistema TI a partir dos cálculos de desvio-padrão simples, média amostral e coeficiente de variação.	69
Tabela 9. Avaliação das curvas analíticas do THC e do CBN utilizando as áreas (A) dos picos como base.....	71
Tabela 10. Avaliação das curvas analíticas do THC e do CBN utilizando as alturas (H) dos picos como base.	72
Tabela 11. Desvios padrões das triplicatas do THC e CBN de cada uma das amostras de A1 a A6, tendo como base de cálculo as áreas dos picos.	73
Tabela 12. Desvios padrões das triplicatas do THC e do CBN de cada uma das amostras de A1 a A6, tendo como base de cálculo as alturas dos picos.	74
Tabela 13. Concentrações esperadas pela diluição realizada e efetivamente encontradas pelas curvas analíticas nas amostras A1 e A2 e em cada uma de suas 7 diluições.	76
Tabela 14. Concentrações encontradas ([µg/mL]) das amostras de A1 a A4 e suas adições obtidas a partir das diferenças entre os três níveis distintos de adição e a amostra original, divididas pelo respectivo nível de adição (0,1; 0,2 ou 0,3) e posteriormente multiplicou-se o resultado por 100.....	80

Tabela 15. Resultados dos ensaios de recuperação das 14 amostras e suas respectivas adições.81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CBC Canabicromeno

CBD Canabidiol

CBN Canabinol

CCD Cromatografia em Camada Delgada

CG Cromatografia Gasosa

CLAE Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

ESI-MS Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray

FBBS Fast Blue B Salt

FBBBS Fast Blue BB Salt

LC TripleTOF Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas de Tempo de Voo

LQFF Laboratório de Química e Física Forense

PCDF Polícia Civil do Distrito Federal

POP Procedimento Operacional Padrão

SVS/MS Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde

THC Tetrahydrocannabinol

UNODC United Nation Office on Drugs and Crime

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. HIPÓTESES	18
3. OBJETIVOS.....	19
3.1.OBJETIVO GERAL.....	19
3.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4. REVISÃO DA LITERATURA	20
4.1. Análise de maconha para a determinação de fitocanabinoides	20
4.1.1. Testes colorimétricos de triagem.....	21
4.1.2. Cromatografia em Camada Delgada	24
4.1.3. LC TripleTOF	26
4.2. Quimiometria e Imagens Digitais	27
4.2.1. Análise de imagens digitais	28
4.2.2. Filtro por Savitzky-Golay.....	29
4.2.3. Análise de Componentes Principais (PCA) e cálculo de área de pico	29
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
5.1. Descrição dos reagentes e soluções	31
5.2.Descrição das amostras.....	31
5.3. Preparo das amostras e teste colorimétrico	31
5.4. Separação por CCD.....	33
5.5. Aquisição e análise de dados das imagens digitais	36
5.6. Testes preliminares por diluição para avaliar a linearidade das áreas obtidas no programa desenvolvido.....	37
5.7. Elucidação estrutural por LC TripleTOF	37
5.8. Validação do método.....	38
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
6.1. Reação colorimétrica e extração pré e pós acoplamento.....	43

6.2.	Avaliação da seletividade da separação pós acoplamento em padrões	44
6.3.	Testes de precisão e linearidade obtidas no programa desenvolvido	54
6.4.	Estudo da razão de acoplamento dos fitocanabinoides e do FBBS por LCTripleTOF	59
6.5.	Avaliação da influência da fase estacionária na degradação dos analitos	63
6.6.	Ensaio de validação dos métodos qualitativo e quantitativo	64
6.6.1.	Identificação qualitativa dos fitocanabinoides	66
6.6.2.	Avaliação das curvas analíticas	69
6.6.3.	Precisão e ganhos de resolução	72
6.6.4.	LOD e LOQ	74
6.6.5.	Exatidão	77
6.6.5.1.	Ensaio de recuperação com extrato 24 h	78
6.6.5.2.	Ensaio de recuperação com extrato de 30 min	80
7.	CONCLUSÕES	82
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

1. INTRODUÇÃO

A *Cannabis sativa* L., vulgarmente conhecida como “maconha”, é uma planta da família *Cannabaceae*, cujo emprego recreativo e alimentício remonta à China antiga, onde foi documentado o uso mais antigo medicinal da planta e seus derivados pelo imperador Shen Neng em 12.000 AC (JOYCE & CURRY, 1970).

Os principais metabólitos secundários são os fitocanabinoides que constituem uma classe de compostos extraídos principalmente das inflorescências e folhas da espécie *Cannabis Sativa* L. Desde sua redescoberta pelos povos ocidentais, esses compostos têm despertado grande atenção e interesse na comunidade científica devido às suas propriedades medicinais e farmacológicas (TURNER et al., 1980; ROSS e ELSOHLY, 1995; ELSOHLY e SLADE, 2005). O arcabouço de aplicabilidade terapêutica desses compostos envolve, entre outros, o tratamento de esclerose múltipla, dor crônica, glaucoma, asma, condições cardiovasculares e como antiemético (WILLIAMSON & EVANS, 2000).

Apesar do notável potencial farmacológico que os fitocanabinoides possuem, o consumo ilícito na forma da droga comumente conhecida como maconha ainda é o principal uso dos fitocanabinoides, sendo a análise de material vegetal para sua identificação uma das principais demandas de laboratórios forenses. Segundo o relatório do Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime – World Drug Report of the *United Nation Office on Drugs and Crime* (UNODC) de 2023, estima-se que 219 milhões de pessoas tenham consumido maconha no ano de 2021, o equivalente a 4,3% da população adulta mundial (entre 15 e 64 anos), sendo 41% dos transtornos por uso de drogas associados ao abuso de maconha.

Ainda, de acordo com os dados estatísticos apontados pela Polícia Federal, no Brasil, a maioria das apreensões concentra-se na maconha e seus derivados, distribuindo-se por todas as regiões do país, principalmente no Centro-Oeste, sendo a segunda droga de abuso com o maior número de apreensões, em contraste com os dados apresentados pela Polícia Civil, cujo quadro de apreensões é equilibrado entre maconha, cocaína e derivados (BRASIL, 2020).

Contudo, devido à complexidade das amostras, variedade de material vegetal apreendido, da possível presença de adulterantes e das diferentes formas de apresentação da droga, a confirmação da presença dos fitocanabinoides é uma tarefa que quase sempre requer a aplicação de uma técnica de separação cromatográfica.

Algumas substâncias vegetais são descritas como causadoras de resultado falso positivo em testes colorimétricos normalmente empregados como métodos de triagem rápida nos laboratórios forenses. Entre essas substâncias vegetais pode-se citar: (a) as folhagens e galhos de *Jacaranda decurrens* Cham., vulgarmente conhecida como “Carobinha” (BERTONI, B. W. et al., 2010); (b) folhagens e galhos de *Paullinia cupana* Kunth., conhecida como “Guaraná” (BORDIN, D. C. et al. & BERTONI, B. W. et al., 2010); (c) além de produtos derivados de *Myristica fragans* Houtt., como a “noz moscada” (MAUNDER, 1969).

Entre as técnicas cromatográficas disponíveis, a cromatografia em camada delgada (CCD) (Figura 3) consiste na separação dos componentes de uma mistura por meio de sua migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana (fase estacionária) favorecida por solventes ou mistura de solventes apropriados (fase móvel), configurando uma técnica analítica de maior praticidade e menos onerosa para separação e identificação de compostos contidos em uma amostra. Ademais, a CCD possui a capacidade de analisar múltiplas amostras concomitantemente, tendo, por conseguinte, uma alta frequência analítica, superior à de outras técnicas analíticas instrumentais como a cromatografia gasosa, sendo amplamente aceita e empregada nas instituições policiais (DEGANI, A. L. G. et al., 2018).

Todavia, a técnica possui como limitações a capacidade reduzida de separação, sensibilidade e baixa reprodutibilidade para propósitos de quantificação além da característica subjetiva de interpretação dos resultados. Consequentemente, ainda são necessários estudos para o aprimoramento desses métodos com objetivo de uma simples identificação ou mesmo a quantificação dos principais fitocanabinoides (ATTIMARAD, M. et al., 2011).

Atualmente já são disponíveis comercialmente kits de CCD para a identificação de diversas amostras forenses, tais como explosivos (FIELD FORENSICS, 2021) e maconha (SIRCHIE, 2021). Contudo, alguns problemas de seletividade são observados, de modo que ainda há necessidade de avanços em pesquisas para aprimorar a separação e análise dos dados (SIBUG et al., 2019). Nesse sentido, o estudo de reações de acoplamento envolvendo fitocanabinoides e a aplicação de ferramentas quimiométricas de planejamento de experimentos de análise multivariada podem proporcionar avanços significativos para esse tipo de análise.

2. HIPÓTESES

- A realização da separação por CCD do extrato da maconha depois da reação colorimétrica pode fornecer uma melhor separação dos fitocanabinoides.
- A coloração das bandas observadas na CCD depende dos tipos e quantidades de fitocanabinoides presentes nas amostras.
- A análise de imagens pode fornecer um cromatograma que permite maior objetividade na caracterização dos fitocanabinoides.
- O “efeito sorriso” visualizado no sistema TJ é minimizado ao não se aguardar o tempo de estabilização da fase móvel na cuba de vidro.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo geral avaliar a eficiência da separação cromatográfica pela técnica de cromatografia em camada delgada, após acoplamento prévio dos extratos de maconha e de seus derivados aos sais Fast Blue B (FBBS) e Fast Blue BB (FBBBS) para a identificação, quantificação e caracterização química dos fitocanabinoides presentes em amostras apreendidas pela Polícia Civil do Distrito Federal (PCDF).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Confirmar a eficiência das separações dos fitocanabinoides acoplados aos FBBS e FBBBS com base no comportamento de padrões dos quatro principais fitocanabinoides de interesse forense (THC, CBD, CBN e CBC).
- Comparar os resultados obtidos das imagens digitalizadas das placas de CCD pré e pós acoplamento ao FBBS e ao FBBBS e avaliar os possíveis ganhos de resolução e sensibilidade.
- Investigar os produtos do acoplamento dos principais fitocanabinoides encontrados nas amostras de maconha ao FBBS, por meio da espectrometria de massas.
- Elaborar um software que seja capaz de traduzir os sinais das bandas formadas nas imagens das placas de CCD em cromatogramas e identificar os picos de interesse de forma semiautomatizada.
- Construir curvas de calibração linear relacionando a concentração dos fitocanabinoides (mg/mL) com a intensidade do sinal.
- Validar qualitativamente o método proposto, avaliando a sua eficiência na extração e identificação dos fitocanabinoides de interesse em comparação com a metodologia amplamente empregada na PCDF tendo sido utilizadas, para tal finalidade, amostras de apreendidas pela PCDF.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1. Análise de maconha para a determinação de fitocanabinoides

O tráfico e consumo de substâncias ilícitas constitui um sério problema que abrange desde as áreas de saúde e segurança pública, como também outros aspectos sociais, econômicos e legais da sociedade. De acordo com a Portaria 344/98 da Secretária de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (SVS/MS), uma substância entorpecente ou psicotrópica ilícita consiste em toda substância de uso proibido no Brasil (proscrita) e que pode determinar dependência física ou psíquica relacionada, como tal, nas listas aprovadas pelas Convenções sobre Substâncias Entorpecentes e Psicotrópicas (BRASIL, 1998). O Relatório Mundial sobre Drogas, organizado pelo Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime destaca que entre as diversas drogas ilícitas a maconha ainda é a droga de abuso mais cultivada, traficada e consumida no mundo, sendo a maioria das apreensões de maconha relatadas no continente Americano (UNODC, 2023, Figura 2).

A maconha é uma droga ilícita obtida da espécie vegetal *Cannabis sativa* L. que é geralmente traficada desidratada e prensada e consumida pelas vias oral ou inalatória/pulmonar. Sua ação no organismo pode variar dependendo da dose, do indivíduo e da forma de administração, podendo causar efeitos psicomiméticos e depressores, além de taquicardia, congestão conjuntival, insônia, agitação, náusea e irritabilidade. Esses efeitos estão relacionados à presença de diversos fitocanabinoides, dentre os quais o tetrahydrocannabinol (THC), o canabidiol (CBD) e o canabinol (CBN) são os majoritários (THAKUR et al., 2005) (Figuras 1A, B e C). Ademais, o canabicromeno (CBC) que, juntamente ao CBD e ao CBN (Figura 1D), apesar de não serem canabinóides psicoativos, possuem atividades anti-inflamatórias e antimicrobianas (HARTSEL, J. A. et al., 2016) e, de acordo com os dados obtidos em estudos prévios realizados na PCDF, os fatores de retardamento do THC e do CBC visualizados nos sistemas de eluição TI e TJ por CCD (CLARK, 2016), alternam seus valores entre si.

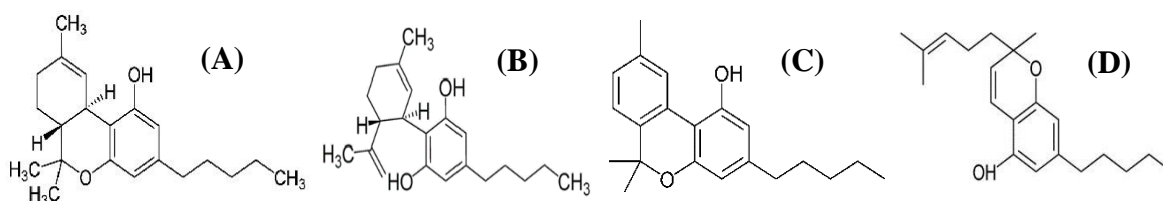


Figura 1. Estruturas moleculares do (A) tetrahydrocannabinol (THC), (B) canabidiol (CBD), (C) canabinol (CBN) e (D) canabicromeno (CBC).

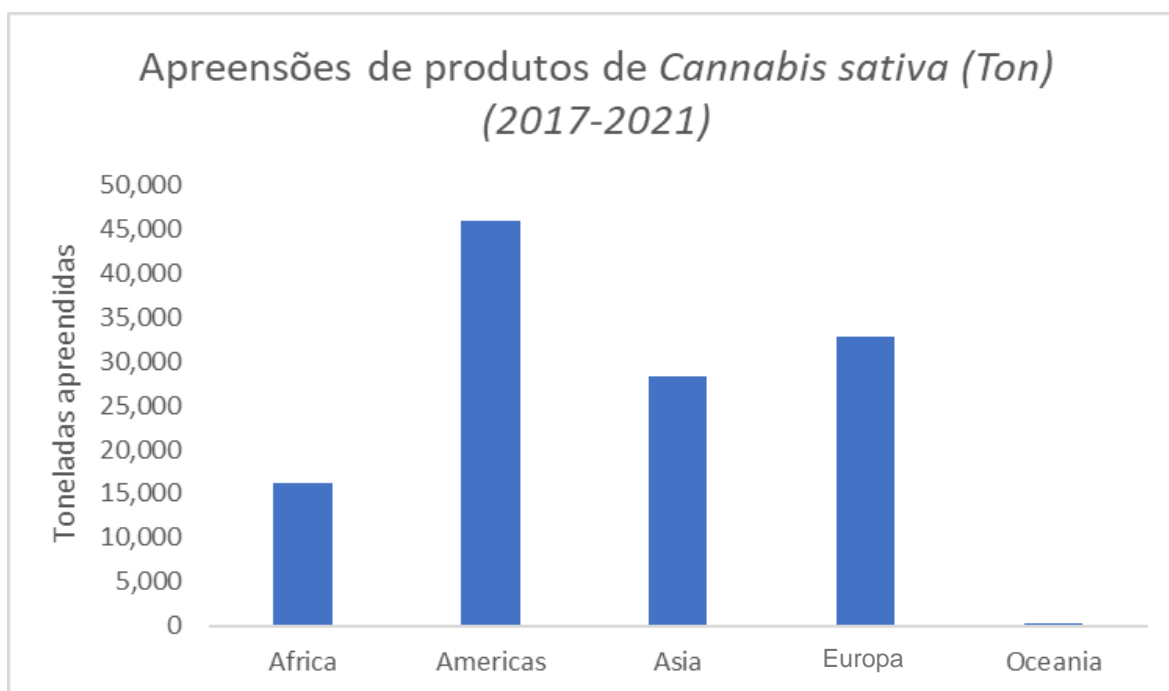


Figura 2. Apreensões de produtos de *Cannabis sativa* entre os anos de 2017 e 2021. Fonte: UNODC World Drug Report, 2023

Cabe destacar que, apesar do extenso uso como droga ilícita, a aplicação da maconha ou de seus fitocanabinoides para fins medicinais é crescente e representa um mercado de extrema importância do ponto de vista farmacológico (ZUARDI, 2006; DE PETROCELLIS, 2011). Portanto, o desenvolvimento de um método que permita a detecção dos principais fitocanabinoides no intuito de atender tanto às demandas forenses para a identificação de produtos da *C. sativa*, quanto às necessidades da saúde pública, no que diz respeito ao controle de qualidade de produtos medicinais à base de fitocanabinoides, faz-se necessário.

Considerando o cenário atual, faz-se igualmente necessário um melhor conhecimento acerca da abrangência e das limitações de cada método analítico e, nesse sentido, o desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis, de boa resolução, de maior praticidade e custo reduzido procuram atender às demandas das instituições fiscalizadoras e periciais.

4.1.1. Testes colorimétricos de triagem

Com a finalidade de verificar a presença ou ausência dos analitos de interesse, os testes colorimétricos de triagem (*screenings*) são imprescindíveis como etapas preliminares de identificação dos compostos de uma amostra (CHASIN et al, 2008). Nesses métodos são utilizadas reações químicas que produzem uma coloração característica e facilmente observável (MUSAH, 2018).

Entre os diversos testes colorimétricos empregados na rotina laboratorial, a reação de acoplamento ao sal azo FBBS (sal duplo de zinco o-dianisidina bis(diazotizado), $C_{14}H_{12}N_4O_2Cl_2 \cdot ZnCl_2$) (Figura 3) é uma das que fornece maior seletividade para os fitocanabinoides e forma produtos estáveis, perdurando por até 7 dias, sendo preconizada nas instituições policiais (DOS SANTOS, N. A. et al., 2016). Percebe-se o desenvolvimento de uma coloração avermelhada, confirmando a presença de fitocanabinoides na amostra.

Cabe destacar a influência do controle do pH do meio reacional da extração, haja vista que as alterações no pH reacional podem provocar mudanças nas estruturas dos analitos, interferindo no processo de extração e no caso da reação de acoplamento do sal azo ao grupo fenólico da molécula, ocorre uma substituição eletrofílica com os cátions arenodiazônicos mais facilmente em soluções ligeiramente alcalinas, com pH situado entre 5 e 7. Se o pH da solução for um pouco menor que 5, a velocidade com a qual a reação ocorrerá será mais baixa. Para tanto, a manutenção do meio reacional em pH básico a partir da adição de NaOH, que evita esse efeito (CLARK, 2016).

Contudo, apesar das conveniências, a reação de acoplamento aos sais azo apresenta uma limitação quanto à sua especificidade em razão do possível acoplamento aos anéis fenólicos de outros compostos além dos fitocanabinoides presentes na maconha gerando falsos positivos, como por exemplo a *Jacaranda decurrens* Cham ou “Carobinha” e *Paullinia cupana* Kunth, popularmente conhecida como “Guaraná” (COSTA, 2002).

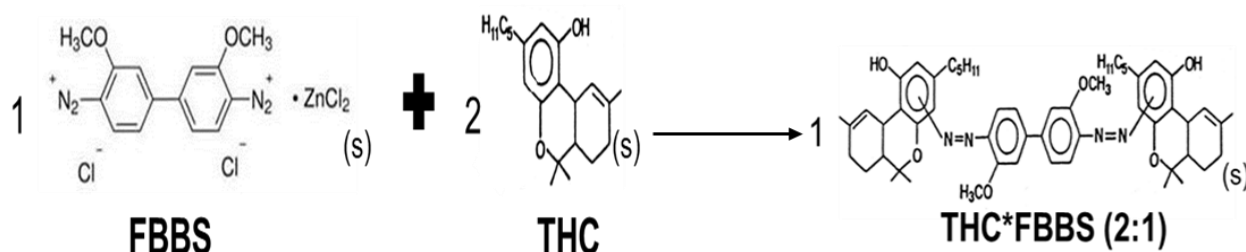


Figura 3. Esquema ilustrando a formação de um possível produto da reação de acoplamento entre o THC e o FBBS.

Ademais, o sucesso de uma extração depende de uma condição ótima de solubilidade dos compostos ativos, mediante dissolução em solventes adequados. Para garantir uma maior efetividade de extração e gerar sinais suficientemente intensos e visualizáveis nas bandas formadas após separação nas placas de CCD, uma maior exposição da superfície de contato dos analitos para com o solvente é uma etapa necessária. Isso é obtido mediante um pré-tratamento de moagem das amostras apreendidas (SOVOVÁ, 1994).

Em razão do caráter inconclusivo dos testes colorimétricos, as recomendações do Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs (SWGDRUG) de 2016 os enquadram como ensaios de categoria C, conforme ilustra a Tabela 1. Logo, para a emissão de um resultado conclusivo para a análise qualitativa, exige-se confirmação ou por duas outras técnicas de categoria B, como os ensaios cromatográficos, que apresentam maior sensibilidade e especificidade quando comparados aos de categoria C, ou por uma técnica de categoria A.

Tabela 1. Categorização das técnicas analíticas.

Categoria A	Categoria B	Categoria C
Espectroscopia Infravermelho	Eletroforese capilar	Testes colorimétricos
Espectrometria de Massas	Cromatografia gasosa	Espectroscopia de Fluorescência
Ressonância Magnética Nuclear	Espectrometria de mobilidade de íon	Imunoensaios
Espectroscopia Raman	Cromatografia Líquida	Ponto de Fusão
Difratometria por raio-X	Testes Microcristalinos	Espectroscopia Ultravioleta
	Identificadores Farmacêuticos	
	Cromatografia em Camada Delgada	
	Exclusivos para Cannabis:	
	Exames Macroscópicos	
	Exames Microscópicos	

Fonte: SWGDRUG, 2016.

Adicionalmente, a hifenção com técnicas instrumentais como a Espectroscopia UV-VIS pode fornecer maior rapidez e eficiência nas análises forenses de diversos analitos, a partir do provimento de uma nova dimensão destinada à confirmação da presença de substâncias de interesse, como o THC, por exemplo, além dos espectros obtidos pela absorção trazerem mais informações acerca da formação do produto da reação de acoplamento ao FBBS.

4.1.2. Cromatografia em Camada Delgada

Entre os métodos de referência mais empregados, destacam-se a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e a Cromatografia Gasosa (CG). A Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) é atualmente a técnica mais utilizada entre os laboratórios forenses devido à associação entre a cromatografia gasosa, que oferece grande versatilidade analítica e alta resolução com o emprego das atuais colunas analíticas capilares, e a espectrometria de massas, que contribui com um aumento de seletividade pela geração de espectros contendo inúmeros fragmentos que em conjunto são exclusivos ou são compartilhados por um pequeno número de analitos (LIU, Y. et al., 2020). Apesar dessas técnicas apresentarem alta capacidade de resolução, acurácia e precisão, seu alto custo de manutenção, tempo de análise prolongado, maior complexidade de execução, além da dificultarem a análise em campo, configuram-se como um empecilho para diversos laboratórios. (SHERMA & FRIED, 2003).

Neste contexto, a cromatografia em camada delgada (CCD) (Figura 4) costuma ser amplamente empregada nos órgãos de fiscalização e instituições de perícia criminal como um dos métodos de categoria B para separação e identificação de substâncias contidas em material apreendido em razão de sua maior simplicidade, facilidade de implementação, baixo custo e alta frequência analítica, além de capacidade de automação, que através da aplicação automatizada de volumes de 5µm de amostras em placas de sílica-gel nas dimensões de 10 x 10 cm, permite a formação de bandas com diâmetros menores e, por conseguinte, mais reproduzíveis melhorando, inclusive a detectabilidade em quantidades pequenas de amostras. Sendo assim, a CCD pode ser considerada uma técnica verde por gastar reduzida quantidade de solventes se comparada a técnicas como CLAE, por exemplo (COLLINS, 2010).

Ainda, segundo DEGANI, A. L. G. et al., as amostras são aplicadas sobre uma placa de sílica gel (fase estacionária) a uma distância de aproximadamente 1 cm da borda inferior. Em seguida, a placa é inserida no interior de uma cuba de vidro contendo a fase móvel e, por capilaridade, as substâncias vão eluindo com o solvente. Ao final da corrida, a placa é retirada da cuba e posta para secar, possibilitando determinar a linha de chegada do solvente e devido às diferenças de polaridade existentes entre as substâncias e ambas as fases do sistema que favorecem diversas interações compostos-solvente com a placa, as bandas formadas adquirem fatores de retardamento/retenção característicos que podem ser calculados facilmente pela razão entre a distância percorrida pela substância (dm) e a distância percorrida pelo solvente (ds).

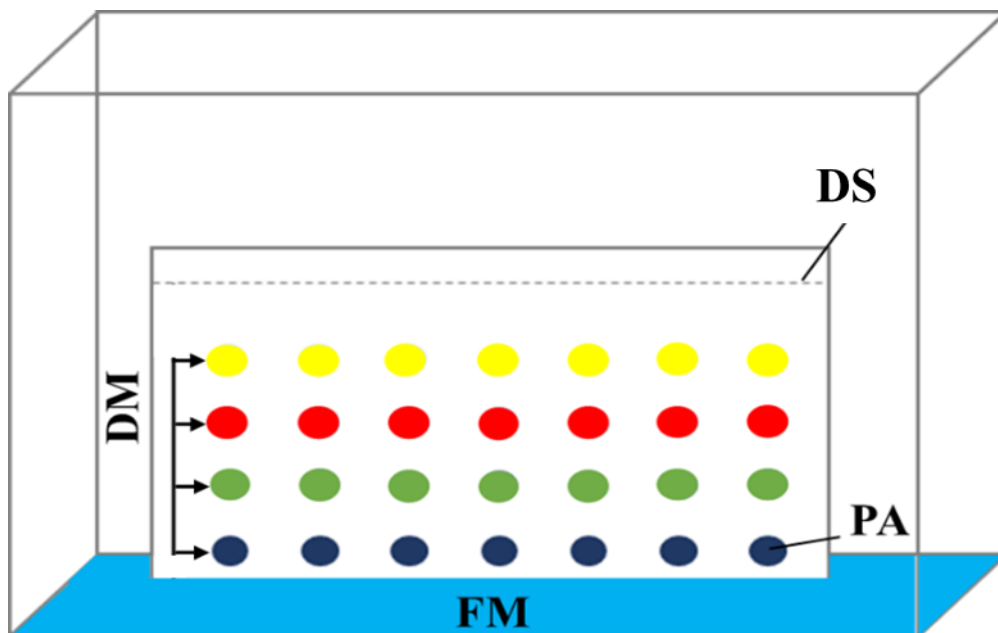


Figura 4. Figura ilustrativa de uma cuba para análise em cromatografia em Camada Delgada. (DM) Distância de Migração dos compostos separados, (PA) Pontos de aplicação, (FM) Fase móvel, (DS) Distância percorrida pelo solvente.

Apesar disso, tem-se percebido uma carência na literatura atual de estudos que comparem a performance de diferentes fases móveis, incluindo aquelas que estão sendo atualmente utilizadas em laboratórios de análises forenses (LIU, Y. et al., 2020).

Ainda, segundo dados apontados por Sherma & Fried (2013), o ato de borrifar um reagente de detecção/revelação sobre as placas de CCD após terminadas as corridas cromatográficas é a forma comumente empregada para a produção de cor característica ou visualização por fluorescência. Uma segunda forma de visualizar analitos de interesse é o emprego de fase estacionária contendo marcador fluorescente que quando excitado por luz ultravioleta de onda curta (254 nm) revela bandas escuras sobre um ruído de fundo fluorescente verde, onde os analitos concentrados em bandas ocultam a visualização da fluorescência.

De maneira complementar, a Association of Official Agricultural Chemists (AOAC International) tem desenvolvido um programa com requisitos para avaliar o desempenho de métodos padronizados para análise da cannabis e seus derivados e para pesticidas encontrados em amostras de cannabis. Espera-se que o programa sirva como material de apoio à comunidade analítica da cannabis, além das possibilidades de proficiência em testagens e treinamento (SHERMA, J. & RABEL, F., 2019).

Dessa forma, novos métodos envolvendo análise por CCD vem sendo desenvolvidos com o intuito de preencher os requisitos necessários para a aplicação em indústrias de cannabis no mundo inteiro e em razão das suas vantagens, a expectativa é de que a CCD continue a ser utilizada pelos laboratórios para identificar novos fitocanabinoides fornecendo um complemento aos resultados obtidos pelos métodos espectrométricos e de colunas cromatográficas comumente empregados. (SIMPSON, D. et al., 1997).

Apesar disso, as limitadas capacidade de separação e de sensibilidade, aliadas à difícil reprodutibilidade para propósitos de quantificação e à característica subjetiva de interpretação dos resultados podem representar desvantagens e empecilhos da técnica de CCD (SHERMA, J.; FRIED, B., 2003). Consequentemente, estudos visando melhorar os parâmetros mencionados são desejados e poderão impactar significativamente tanto as rotinas de laboratórios forenses quanto de indústrias de produção de produtos de cannabis.

4.1.3. LC TripleTOF

Os resultados obtidos com a CCD não são suficientes para a identificação inequívoca dos compostos de uma mistura complexa, uma vez que algumas substâncias apresentam Fatores de Retenção (R_f 's) muito semelhantes, tornando-se difícil distingui-las.

Nesse contexto, a Espectrometria de Massas, que consiste em uma técnica capaz de elucidar as estruturas químicas e diferenciar compostos com tempos de retenção semelhantes através da ionização e fragmentação de substâncias contidas em uma amostra na forma gasosa, permite separá-las de acordo com suas razões massa/carga (m/z), bem como estimar suas proporções em que aparecem de acordo com a fragmentação, a abundância e os tempos de retenção (MUKHERJEE, P. K., 2019).

A técnica de ionização por electrospray (ESI) permite que uma solução contendo os analitos seja convertida em gotículas carregadas através da pulverização eletrostática da amostra. O processo pode ser favorecido mediante a secagem da amostra por gás Nitrogênio (N_2). A vaporização dos solventes com a protonação/desprotonação dos íons resulta em íons livres para serem analisados no detector de massas e, em razão dessa característica aliada à possibilidade de análise de amostras líquidas, ESI é amplamente empregado na resolução de problemas biológicos. Contudo, dentre todos os seus atributos destaca-se a capacidade de acoplar MS com técnicas de separação de líquidos, como HPLC, por exemplo (GLISH & VACHET, 2003).

Levando em consideração o grau de precisão e sensibilidade da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), comumente tem-se a hibridização do HPLC ao Espectrômetro de Massas (MS), dessa forma, permitindo ampliar a capacidade de separação, confiabilidade na identificação e quantificação dos compostos.

Apesar disso, a exigência de um fluxo constante da amostra implica possibilidade de desperdício de material e a suscetibilidade aos efeitos de supressão de íons, especialmente em se tratando de misturas complexas, em que os analitos de maior concentração possuem a tendência de suprimir a formação de íons por analitos de baixa concentração, configuram as principais desvantagens da técnica de ionização por ESI (KEBARLE, 2000).

Para a análise de componentes herbais como os fitocanabinoides, detectores de massas que mensurem o tempo de voo (TOF) dos analitos são altamente recomendados para elucidação e confirmação das estruturas, especialmente quando há interesse em identificar compostos não-alvo e metabólitos secundários desconhecidos. Dessa forma, um registro completo dos espectros em todos os momentos com medições de massas precisas é possível devido à sensibilidade espectral de varredura completa e do fornecimento de informações sobre os íons-precusores e íons-produto por meio de medição de massa exata (WILLIAMSON & BARTLETT, 2007; BRISTOW, 2006).

4.2. Quimiometria e Imagens Digitais

A quimiometria é a área da química que trata do desenvolvimento e aplicação de métodos matemáticos e estatísticos em sistemas químicos com o objetivo de promover a otimização de experimentos, processos e sistemas de análise e realizar análise dos dados para obter o máximo de informação sobre o meio (OTTO, 1999). Estende-se por diversas áreas de atuação, tais como: planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões, processamento de sinais, resolução de sinais, métodos supervisionados de classificação, discriminação e calibração multivariada (FERREIRA et al., 1999; TEÓFILO et al., 2006).

Desde seu surgimento na década de 80 a aplicação da quimiometria vem sendo crescente no meio científico e apresentando contribuições significativas dentro da química e áreas correlatas, como alimentos, farmacêutica, agrária, etc (SANTOS et al., 2019).

4.2.1. Análise de imagens digitais

Podendo ser aplicadas em diversos setores como nas indústrias, comunicações e pesquisas, o emprego de imagens digitais é amplamente difundido na atualidade. Caracteriza-se como uma técnica prática de se extrair sinais analíticos através de componentes de cor podendo, dessa forma, ser empregada na análise de amostras sólidas, líquidas e gasosas. (PRATT, W. K., 1991; HAYAKAWA, T. & HIRAI, M., 2003). Em particular, constitui uma estratégia interessante para o processamento dos resultados de CCD, podendo fornecer um gráfico bidimensional relacionando a distância de migração ou fator de retenção dos compostos com a intensidade do canal de cor utilizado, o que é conhecido como cromatograma.

As informações químicas contidas nas bandas obtidas nas placas de CCD podem ser traduzidas no computador mediante ajustes de imagens digitais em *softwares* como o Matlab®, o que possibilita o desenvolvimento de um algoritmo de análise de imagens digitais capaz de mensurar a intensidade de sinal de cada banda, bem como determinar suas respectivas distâncias de migração, podendo ser utilizadas para fins quantitativos (TIE-XIN, T. & HONG, W., 2008).

Computadores normalmente utilizam o sistema RGB para a definição de cores, em que cada pixel que compõe uma imagem pode conter 256^3 (= 16.777.216) tonalidades diferentes definidas por combinações de índices inteiros que variam de 0 a 255 entre três canais de cor: R (vermelho), G (verde) e azul (B) (GODINHO et al., 2008).

Dessa forma, os cromatogramas formados são gráficos que representam visualmente a posição e a intensidade de cada banda na placa de CCD e para que a imagem da placa seja retratada fielmente e a quantificação do que compõe cada banda seja possível, faz-se necessário que primeiramente os ruídos sejam minimizados, possibilitando, então, a determinação das distâncias de migração (DM) e os cálculos para a devida integração das áreas dos picos obtidos. Para tanto, são utilizados o filtro de Savitzky-Golay, a análise de componentes principais (PCA) e as equações diferenciais ordinárias (EDO). Tais ferramentas serão abordadas, respectivamente nessa ordem, nos tópicos a seguir.

4.2.2. Filtro por Savitzky-Golay

Em quimiometria, um dos filtros mais utilizados para o alisamento ou redução de ruído é o processamento de sinais pelo algoritmo Savitzky-Golay. Devido às propriedades de suavização e capacidade de baixa frequência de sinal usando deslocamentos e encostas através da diferenciação, o filtro é capaz de reduzir ruídos de alta frequência em sinais (SAVITZKY, A.; GOLAY, M. J. E., 1964).

Esse filtro ajusta os pontos de um gráfico através de um ajuste polinomial de ordem escolhido pelo pesquisador em uma janela pré-definida, conforme o filtro se move através dos sinais. O filtro estima o centro de cada janela através do ajuste polinomial do ponto central. Conforme a largura do filtro aumenta, maior serão os ajustes e a suavização nos gráficos, de forma que os picos mais estreitos parecerão mais suprimidos (EIGENVECTOR RESEARCH INC., 2004).

4.2.3. Análise de Componentes Principais (PCA)

A PCA facilita o processo de análise das imagens fazendo uso de combinações lineares das variáveis originais. Consiste em uma ferramenta capaz de fazer mudança de base dos dados multivariados representados em uma matriz \mathbf{X} , conseguindo compactar a informação sistemática dos dados em um número menor de variáveis. Além disso, PCA também pode ser aplicada como uma estratégia de redução de ruído ou para separar as informações mais relevantes presentes na matriz através do uso de apenas um pequeno número de componentes principais (PCs) definido pelo pesquisador. Em situações simples, esse número de PCs pode ser escolhido a partir do percentual de variância explicada.

A decomposição da matriz \mathbf{X} transforma um espaço multidimensional em um novo subsistema menor capaz de organizar os dados em componentes principais (PC's), que contem informações relevantes de forma mais compacta (menor número de variáveis). Cada PC é composta pela combinação linear entre os escores (*scores*), que são as coordenadas das amostras nos novos eixos, com os coeficientes/pesos das variáveis originais (*loadings*).

4.2.4. Processo de integração dos picos por equações diferenciais ordinárias (EDO)

O processo de integração dos picos faz uso de equações diferenciais ordinárias (EDO), que fazem uso de métodos numéricos em suas resoluções, dentre os quais pode-se citar o método de integração trapezoidal. Esse método numérico possui o objetivo de calcular a área sobre uma curva formada por uma sequência de pontos, sendo mais preciso e com um acúmulo de erro menor causado pelas oscilações numéricas (OLIVEIRA, A.R.C.; COGO, J.R., 1983).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Descrição dos reagentes e soluções

Os solventes utilizados para os testes colorimétricos, as etapas quali e quantitativas das corridas de CCD e para os ensaios no LC-Triple TOF foram: acetonitrila (ACN), clorofórmio (CHCl_3), etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$), Tolueno ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$), Xileno (C_8H_{10}), Hexano (C_6H_{14}) e Dietilamina ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{N}$). Como reagentes foram utilizados os sais azo FBBS ($\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_2\text{Cl}_2$) e FBBBS ($\text{C}_{34}\text{H}_{36}\text{Cl}_4\text{N}_6\text{O}_6\text{Zn}$).

5.2. Descrição das amostras

As amostras incluídas nesse projeto consistiram em apreensões de maconha realizadas pela Polícia Civil do Distrito Federal (PCDF), as quais incluíram maconha prensada (contendo caule, folha, inflorescências e sementes), uma amostra de concentrado “pixe” e uma amostra de óleo rico em canabidiol.

5.3. Preparo das amostras e teste colorimétrico

Foi realizada a moagem manual das amostras de folha prensada com gral e pistilo, tendo sido obtidos grãos na ordem de $1000\ \mu\text{m} - 60\ \mu\text{m}$. Em seguida, 27,5 mg das amostras foram transferidas para microtubos plásticos (ependorfs), seguidas de extração simples com solvente orgânico. Dentre os solventes elegíveis ao processo de extração dos compostos fitocanabinoides, o clorofórmio foi selecionado como solvente extrator, de acordo com estudos prévios realizados na PCDF, em razão da maior afinidade dos fitocanabinoides presentes nas amostras apreendidas para com o CHCl_3 , proporcionando uma maior interação com os analitos de interesse.

Todas as amostras selecionadas foram submetidas ao teste colorimétrico para identificação de maconha utilizando o reagente Fast Blue B (FBBS), conforme descrito por Maunder com adaptações (MAUNDER, 1974). É importante destacar que ao longo do trabalho foram utilizados os sais Fast Blue B (FBBS) (zinc;4-(4-diazonio-3-methoxyphenyl)-2-methoxybenzenediazonium;tetrachloride) e Fast Blue BB (FBBBS) (4-benzamido-2,5-diethoxybenzenediazonium;dichlorozinc;dichloride).

Apesar de ser o reagente originalmente empregado no método descrito por Maunder, o FBBS apresenta propriedades cancerígenas, tendo sido descontinuado. Já o FBBBS é um reagente com propriedades semelhantes de acoplamento com os fitocanabinoides, não é cancerígeno, estando disponível comercialmente (Figura 5). Além disso, enquanto FBBS pode se acoplar com duas moléculas de fitocanabinóide o FBBBS se acopla com uma única molécula. Em ambos os reagentes, é visualizada a formação de uma coloração avermelhada na fase orgânica do microtubo, sinalizando positivamente à presença de THC na amostra. Independente do sal azo empregado o procedimento foi conduzido de acordo com as seguintes etapas, conforme ilustra o esquema da Figura 6.

Foram pesados 27,5 mg de amostra vegetal e 18 mg sal FBBS em microtubos plásticos. Em seguida, 1,0 mL de clorofórmio foi adicionado e agitaram-se os tubos por 1 min. Na sequência, foi adicionado 1,0mL de solução 0,1 mol/L de NaOH e novamente agitou-se os microtubos por 1 min. Ao final, os microtubos foram centrifugados a 10000 rpm por 3 min.

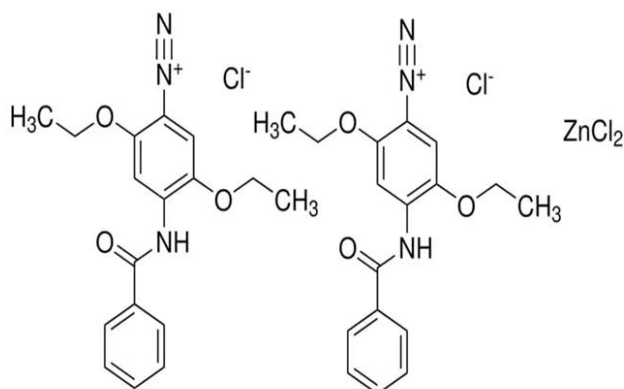


Figura 5. Estrutura molecular do Sal Fast Blue BB (FBBBS).

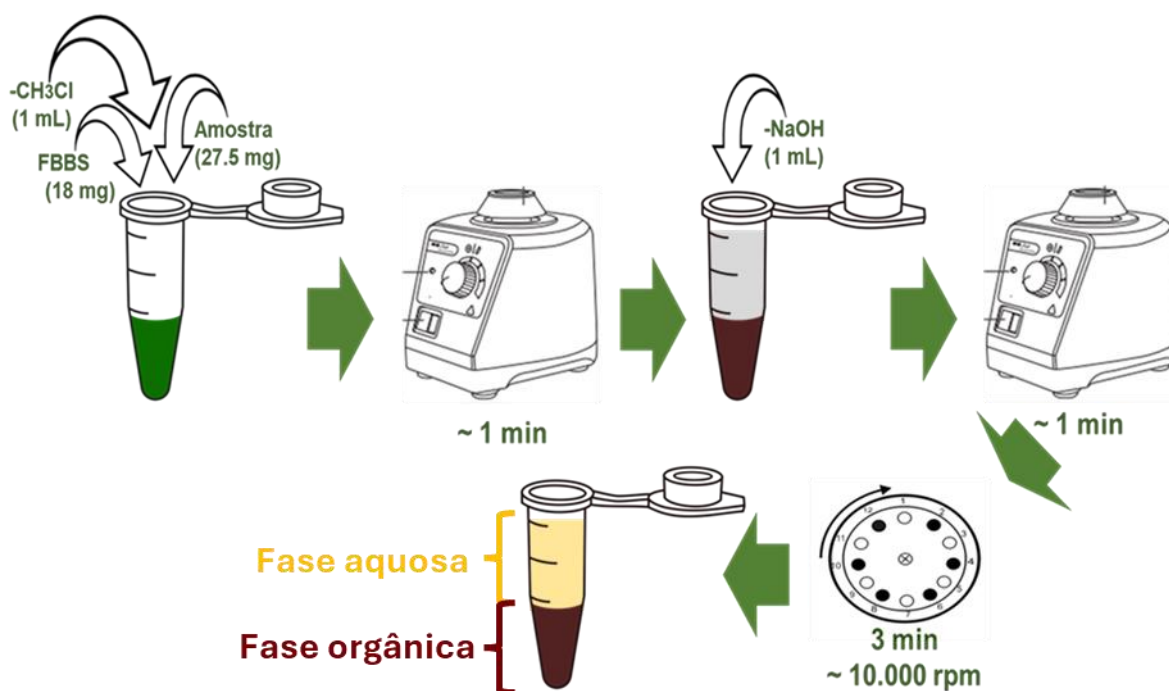


Figura 6. Esquema para realização do teste colorimétrico de triagem empregando o sal Fast Blue B, onde ao final do processo se observa a formação de uma coloração avermelhada no fundo do microtubo indicando a presença do THC na amostra estudada.

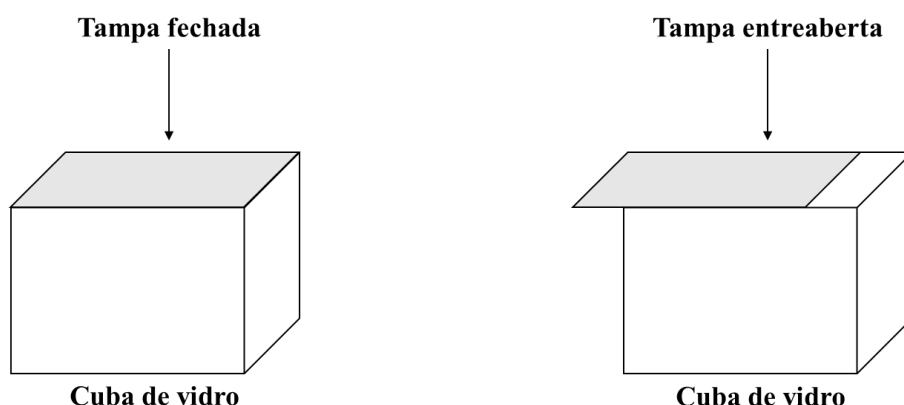
5.4. Separação por CCD

Foram utilizadas placas comerciais de cromatografia em camada delgada marca ALUGRAM®, com as seguintes especificações: 20 x 20 cm (altura x largura), fase estacionária do tipo sílica Gel 60 contendo agente fluorescente excitável a 254nm e espessura de 250 μm , aplicada sobre suporte flexível de alumínio. Antes da aplicação das amostras, as placas foram cortadas ao meio, ficando com 10 cm de altura, e os pontos de aplicação das amostras foram demarcados respeitando a distância de 1 cm das bordas inferior e laterais. Com auxílio de um carimbo e pó de grafite, 30 pontos de aplicação foram marcados em cada placa, guardando uma distância de 6 mm entre os pontos.

Para a separação pelo método proposto nesse trabalho foi empregada a fase orgânica obtida ao final do método de triagem ilustrado na Figura 5, sendo que ao longo do trabalho foram ajustadas as proporções das massas de amostras igualmente tanto para FBBS quanto para FBBBS no intuito de assegurar que todos os fitocanabinoides estivessem acoplados ao sal azo. A fase orgânica foi coletada com o auxílio de uma micropipeta monocal com capacidade de 1000 μL (p1000) e acondicionada em novos microtubos para posterior aplicação nas placas de cromatografia em camada delgada contendo sílica Gel 60 como fase estacionária. 1,0 μL do extrato obtido de cada amostra foi transferido para o respectivo ponto de aplicação utilizando uma micropipeta monocal com capacidade de 2 μL (p2).

Em paralelo, foram preparadas as fases móveis e transferidas para duas cubas cromatográficas de vidro com dimensões 20 x 21 x 10 cm (altura x largura x profundidade). As fases móveis foram selecionadas de acordo com as distâncias de migração do THC, CBN e CBD indicadas por MOFFAT et al (2011). Duas fases móveis foram empregadas: a fase TI, constituída por um único solvente, o tolueno; e a fase TJ, constituída por uma combinação de três solventes, xileno, hexano e dietilamina na proporção de 25:10:1, volume-volume (CLARK, 2016).

As placas foram inseridas no interior de cada uma das cubas e as fases móveis eluíram por aproximadamente 15 min até atingirem uma distância de migração de aproximadamente 8 cm. Ao conjunto da fase móvel utilizada e modo de utilização da cuba (aberta ou saturada) dá-se o nome de sistema de eluição. Conforme ilustra o esquema da Figura 7, o sistema TI utiliza a fase móvel TI e a cuba com a tampa entreaberta, enquanto o sistema TJ utiliza a fase móvel TJ e a cuba com a tampa fechada (saturada) em razão da volatilidade provocada pela maior pressão de vapor exercida pela dietilamina no sistema TJ comparada aos demais



solventes que compõem as fases móveis.

Figura 7. Sistema TJ para as corridas de CCD com a tampa da cuba fechada (À esquerda) e Sistema TI para as corridas de CCD com a tampa da cuba entreaberta (À direita).

Para comparar a eficiência da separação e os ganhos de resolução do método proposto com o realizado em rotina pela PCDF foram preparadas placas contendo amostras distintas e realizadas a eluição pelos métodos TI e TJ (CLARK, 2016).

Nas placas destinadas à aplicação do método de rotina da PCDF, de cunho qualitativo, foram pesados em 30 microtubos, aproximadamente, 500 mg das amostras apreendidas e em seguida, adicionou-se 1,4 mL de etanol (EtOH) em cada microtubo. Posteriormente, os microtubos foram submetidos a uma sonicação por 7 minutos. Por fim, foram aplicados cerca de 2µL dos extratos etanólicos obtidos em cada um dos 30 poços nas placas de CCD para a eluição por TI e TJ em CCD e posteriormente serem borrifadas com uma solução de água destilada contendo o sal azo a 3,33 mg/mL.

Já nas placas para execução pelo método proposto, durante a etapa de validação, foram pesados aproximadamente 13,75 mg de amostras em 30 microtubos, dentro dos quais foi adicionada uma massa de 9,0 mg de FBBS ou de FBBBS e em seguida, foi acrescentado um volume de 1,0 mL de CHCl₃. Posteriormente, os microtubos foram agitados no vórtex a 3.000 RPM por 1 min. Após, foi acrescentado 1,0 mL de NaOH em cada um dos microtubos, os quais foram centrifugados a 10.00 RPM por 3 min. Por fim, descartou-se a fase aquosa e aplicou-se na placa de CCD cerca de 2µL da fase orgânica em cada um dos 30 poços.

Vale destacar que os ensaios da etapa de validação foram conduzidos utilizando ambos os sais azo no intuito de avaliar a eficiência das reações de acoplamento para com os fitocanabinoides em diferentes proporções de massas de sal e amostra acrescentadas aos microtubos.

5.5. Aquisição e análise de dados das imagens digitais

Em paralelo às análises em CCD e eleição dos parâmetros cromatográficos, foi desenvolvido um programa para o processamento de imagens de placas de CCD obtidas na análise de fitocanabinoides de amostras de maconha. As placas foram fotografadas inicialmente no equipamento VSC8000® na faixa de luz visível (400-700 nm) e posteriormente, imagens das placas foram obtidas em um escaner Epson® comum, modelo L3150, com a finalidade de se comparar a qualidade das imagens obtidas nos dois equipamentos.

As imagens foram importadas para o *software* Matlab®, onde foram feitas correções de iluminação, nitidez e fundo da imagem, além da aplicação de pré-processamento para redução dos ruídos através do filtro de Savitzky-Golay, análise das componentes principais (PCA) e correção da linha de base por mínimos quadrados assimétricos nos cromatogramas.

Para cada placa, foram obtidos 30 cromatogramas simultaneamente, dos quais os picos de interesse puderam ser identificados automaticamente pelo software, possibilitando o cálculo das distâncias de migração (DM) e fatores de retenção (RF) das substâncias. Os cromatogramas foram avaliados nas diferentes componentes de cores do sistema RGB (*red, green, blue*), do sistema HSV (*hue, saturation, value*), além da escala de cinza (GS), conforme ilustrado no esquema apresentado na Figura 8.

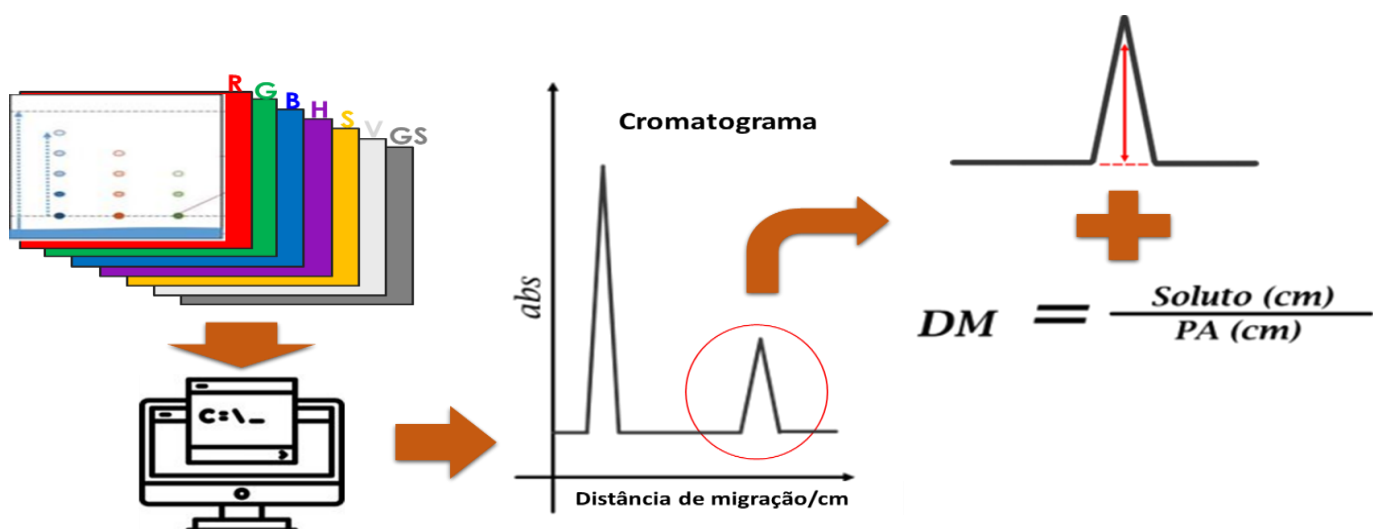


Figura 8. Esquema ilustrando o processamento das imagens para a obtenção dos cromatogramas.

5.6. Testes preliminares por diluição para avaliar a linearidade das áreas obtidas no programa desenvolvido

Para avaliar se as áreas obtidas eram proporcionais às concentrações dos compostos separados nas corridas cromatográficas, diluições nas proporções de 1/1, 1/1.13, 1/2, 1/4, 1/10, 1/20, 1/40, 1/100, 1/125 e 1/150 de uma mesma amostra foram feitas e aplicadas em triplicata em uma placa de CCD, utilizando os extratos complexados com o FBBS e o sistema TI, descrito no item 5.3.

Novas imagens foram capturadas pelo VSC8000® e pelo escaner. Em seguida, foram feitos alisamentos, ajustes e correções na imagem no Matlab® e foram transferidos ao Excel® para a construção de uma curva de calibração analítica.

5.7. Elucidação estrutural por LC TripleTOF

De acordo com o método descrito por Carvalho, T. C. et al. (2016), após o término das corridas na placa de CCD, a sílica presente na placa, bem como as bandas suspeitas de representarem os fitocanabinoides THC, CBD, CBN e CBC, foram raspadas com auxílio de um estilete e acondicionadas em microtubos para posterior extração em uma solução contendo 2 mg de amostra para 1 mL de acetonitrila em relação a massa de material raspado.

Em seguida, conforme determinado por Wang, X. et al. (2016), a solução foi injetada diretamente em um cromatógrafo líquido de alta eficiência, onde no interior de uma coluna de sílica ACE C18-AR (100 mm x 2.1 mm, com partículas de 3 µm), os compostos contidos na amostra foram separados para posterior análise por eletronspay utilizando o modo de ionização positivo (ESI(+)-MS). A solução para análise por ESI foi preparada em 0,1 % de ácido fórmico.

Os ensaios foram executados de acordo com os seguintes parâmetros: i) fluxo de injeção de 5 µL min⁻¹, (ii) voltagem capilar na faixa de 3500-4100 V, (iii) offset de 500 V, (iv) temperatura de gás de evaporação e vazão de 250°C e 2 L min⁻¹, respectivamente, (v) pressão de gás nebulizador de 1 Bar, (vi) skimmer = 15 V e voltagem de colisão em (±) 1 V.

5.8. Validação do método

A validação do método proposto levou em consideração a seletividade quanto a capacidade de separação dos analitos entre si para fins qualitativos e quantitativos e dos demais compostos presentes na maconha, bem como determinados os seus tempos de retenção. Para essa fase foram produzidas um total de 7 placas. As placas 1 e 2 foram utilizadas para validar o método qualitativo, enquanto que as placas 3, 4 e 5 foram destinadas para validar os métodos de exatidão, precisão e limite de detecção (LOD), respectivamente. Por fim, as placas 6 e 7 correspondem a ensaios complementares de exatidão.

Conforme informado anteriormente, haja visto o potencial risco à saúde que o FBBS fornece em razão de sua carcinogenicidade, além de sua estrutura permitir o acoplamento com outras substâncias interferentes, a seletividade, bem como a interpretação dos resultados fica comprometida. Dessa forma, optou-se pelo FBBBS para a condução dos ensaios de validação por ser menos prejudicial à saúde e fornecer uma seletividade ainda maior nas reações de acoplamento com os fitocanabinoides, decorrente de sua estrutura molecular que favorece o acoplamento na proporção de 1:1 (figura 9).

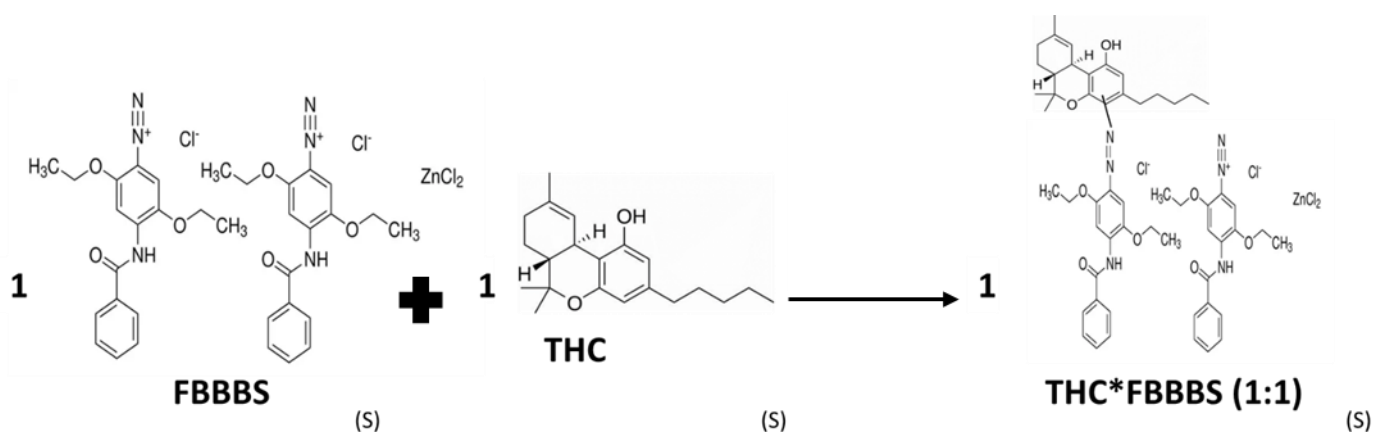


Figura 9. Esquema ilustrando a formação de um possível produto da reação de acoplamento entre o THC e o FBBBS.

Nos ensaios de quantificação, para garantir que todos os fitocanabinoides reagissem com o FBBBS, foram feitos diversos testes com distintas proporções de massas de amostra e sal no intuito de se obter a melhor resolução e com o mínimo de efeito de arraste. Ao final dos ensaios constatou-se que a pesagem do dobro da massa de amostra e da metade da massa do sal fornecia a melhor resolução para a realização dos ensaios nesta etapa.

Com isso, 110 mg de amostras apreendidas foram pesados em 6 microtubos, dentro dos quais foram acrescidos volumes de 2 mL de CHCl_3 . Após a realização da reação colorimétrica, os microtubos foram acondicionados, por aproximadamente 24 h, em um armário dentro do Laboratório de Química e Física Forense (LQFF), na PCDF, minimizando-se dessa forma, a eventual degradação dos compostos pela luz. Por fim, foram feitas aplicações das amostras em 3 novas placas de CCD destinadas a avaliar os parâmetros da curva analítica (coeficiente de determinação, sensibilidade), além dos parâmetros de precisão, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) e exatidão. Em paralelo, foram pesados 9,0 mg de FBBBS em 62 microtubos.

Infelizmente, durante a realização do trabalho foi constatado que o padrão analítico de CBD foi degradado em meio aos ensaios realizados e considerando o alto custo da reposição do padrão e o escasso tempo a validação do método foi realizada apenas ao THC e ao CBN, sendo que em cada uma das 3 placas de CCD, um número de poços foi reservado para a construção de uma curva analítica, de forma que uma replicata da curva foi feita em cada uma das 3 placas e os pontos de aplicação de amostra restantes foram dedicados a: ensaios de exatidão (placa 3), ensaios de precisão (placa 4) e ensaios de limite de detecção e quantificação (placa 5), conforme descrito em detalhes nas próximas seções. Além disso, outras 2 placas foram feitas ao final dessas análises para ensaios complementares de exatidão.

5.7.1. Curva analítica

De acordo com as RDCs nº69/14 e 166/17 da ANVISA, foram utilizadas soluções químicas de trabalho como padrões analíticos de referência secundários para a construção da curva analítica construída em solvente. A partir de soluções estoque de 5 mg/mL de THC e CBN em metanol acondicionadas no *freezer*, a uma faixa de aproximadamente $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, foram preparadas 2 soluções padrões de aproximadamente 0,5 mg/mL em balões de 10 mL. Completou-se o volume com clorofórmio até a altura do menisco. Em seguida, foi feita uma triplicata real de 3 curvas analíticas nas 3 placas de CCD, nas quais os padrões analíticos foram aplicados em 11 poços, estrategicamente selecionados no meio da placa (região de menor influência do efeito *smile* em CCD).

As curvas de THC e CBN foram feitas de forma conjunta, com as concentrações inversas uma em relação à outra, isto é, o poço que continha a maior concentração de THC era o mesmo que continha a menor concentração de CBN e assim por diante. As concentrações preparadas para a curva analítica são apresentadas na tabela 2.

Tabela 2. Concentrações dos padrões de THC e CBN aplicadas nas placas de CCD.

N° Spot da placa	Concentração (mg/mL)											
	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
THC	0,5	0,45	0,4	0,35	0,3	0,25	0,2	0,15	0,1	0,05	0	
CBN	0	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	

5.7.2. Precisão

De acordo com o preconizado pela RDC 166/17 da ANVISA, foram selecionadas 6 amostras, das quais 2 detinham concentrações altas de THC e baixas de CBN, outras 2 que possuíam concentrações médias de ambos e, por fim, 2 que teriam um teor maior de CBN e, por conseguinte, menor de THC em suas constituições. Foram feitas triplicatas de cada uma dessas amostras (A1, A2, A3, A4, A5 e A6) em 18 poços de uma placa de CCD conforme o esquema apresentado na Figura 10. Com o auxílio de uma pipeta P200, 100 μ L dos 18 microtubos contendo as amostras selecionadas e suas triplicatas foram extraídos e acrescentados em microtubos contendo 9,0 mg de FBBBS. Posteriormente, os microtubos foram agitados no vórtex por aproximadamente 1 minuto e em seguida foram acrescentados 100 μ L de NaOH 0,5 mol/L. Por fim, os microtubos foram centrifugados por aproximadamente 3 minutos a 10.000 rpm.

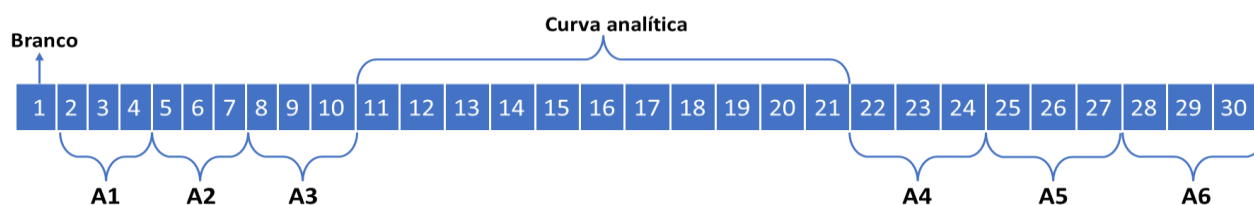


Figura 10. Esquema de aplicação das triplicatas de A1 a A6 na placa de CCD.

5.7.3. LOD e LOQ

O LOD e o LOQ foram calculados tendo como base a RDC 166/17 da ANVISA, em que multiplica-se o erro padrão da intersecção da curva analítica por 3,3 para LOD e por 10 para LOQ e divide-se o resultado pela inclinação da reta estimada. Uma confirmação dos valores de LOD e LOQ foi realizada com base em diluições consecutivas das amostras A1 e A2, que foram escolhidas devido ao maior teor estimado de THC e CBN, respectivamente. Foram feitas 7 diluições das amostras trabalhadas.

CHCl₃ foi acrescentado aos microtubos, seguido de agitação no vórtex por aproximadamente 1 minuto a 3000 rpm. Por fim, NaOH 0,5 mol/L foi acrescentado aos microtubos para posteriormente serem centrifugados a 10.000 rpm por aproximadamente 3 minutos, conforme o ilustrado pela Tabela 3. A sequência de aplicação na placa de CCD seguiu o esquema da figura 11.

Tabela 3. Preparo das diluições das amostras A1 e A2 na placa de CCD.

diluição	amostras(μL)	CHCl ₃ (μL)	NaOH(μL)
0	80	20	100
1	60	40	100
2	40	60	100
3	30	70	100
4	20	80	100
5	10	90	100
6	5	95	100
7	2,5	97,5	100

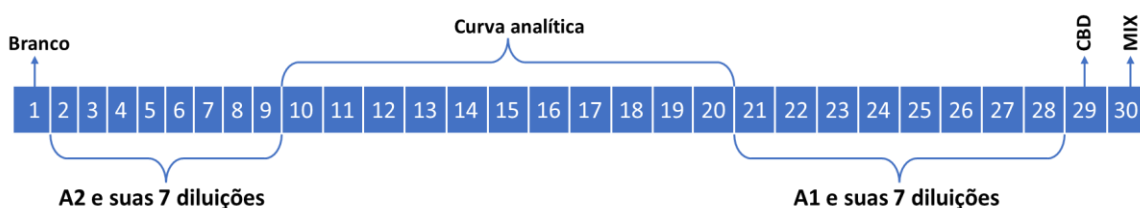


Figura 11. Esquema de aplicação das amostras A1 e A2 e suas diluições na placa da CCD. MIX: padrão contendo os compostos THC, CBN e CBD.

5.7.4. Exatidão

Para essa placa foram feitos ensaios de recuperação utilizando as amostras A1, A2, A3 e A4, seguindo o esquema de aplicação ilustrado pela Figura 12. Para cada uma dessas amostras foram analisadas as amostras sem nenhuma adição de padrão analítico e mais 3 níveis de adições em microtubos distintos. Sendo assim, foram preparados 4 microtubos para cada amostra, cada qual contendo 9,0 mg de FBBBS. No primeiro nível de adição era acrescentado 40 μL de amostra, 0 μL de padrão e 60 μL de CHCl₃, totalizando 100 μL. Após, agitou-se no vórtex a 3000 rpm por aproximadamente 1 minuto. Ao final, acrescentou-se 100 μL de NaOH 0,5 mol/L e centrifugou-se a 10.000 rpm por aproximadamente 3 minutos.

Para os microtubos com adição, adicionava-se 40 μL de amostra e depois quantidades proporcionalmente crescentes de padrão analítico (0 μL , 20 μL , 40 μL e 60 μL) e diminuída a quantidade de CHCl_3 , conforme demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4. Preparo das adições das amostras de A1 a A4 na placa de CCD.

Adição	V. amostra(μL)	V. padrão(μL)	V. CHCl_3 (μL)	V. NaOH (μL)
0	40	0	60	100
1	40	20	40	100
2	40	40	20	100
3	40	60	0	100

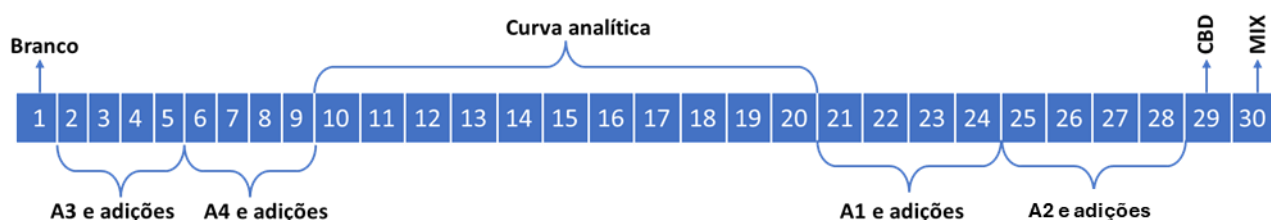


Figura 12. Esquema de aplicação das amostras de A1 a A4 e suas adições na placa de CCD. MIX: padrão contendo os compostos THC, CBN e CBD.

Para as duas outras placas de exatidão preparadas, foi seguido o mesmo procedimento, excetuando-se a massa de amostra pesada e o volume de CHCl_3 acrescentado que foram reduzidos pela metade, além de a aplicação haver sido feita logo após a revelação colorimétrica, não ficando em repouso por 24 horas. Nessas placas foram utilizadas 14 amostras, cada qual com apenas 1 adição de padrão, totalizando 28 poços de aplicação. Em relação aos testes anteriores esses ensaios apresentam o dobro de FBBBS e foram aplicados na placa logo após o preparo. Portanto, esses ensaios foram realizados em uma condição que garantia de forma mais segura que os fitocanabinoides presentes estariam acoplados ao FBBBS e minimizar as perdas por evaporação do CHCl_3 de um dia para outro.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Reação colorimétrica e extração pré e pós acoplamento

Os resultados dos testes colorimétricos seguiram as condições otimizadas em trabalhos anteriores desse grupo de pesquisa e demonstraram uma melhora na seletividade a depender da quantidade e das espécies de canabinoides presentes em uma amostra.

As Figuras 13A, B e C ilustram o aspecto da fase orgânica para duas amostras maceradas (A e B) e para uma amostra contendo uma mistura de compostos canabinoides de aspecto “resinoso” (“Pixe – IP2”) (C), as quais adquiriram coloração intensa e característica da presença de THC. Por outro lado, na figura 13D a amostra constituída por óleo de CBD adquiriu uma coloração mais rosada. O branco de reação, consistindo do sal FBBS não acoplado (13E) permaneceu transparente, com uma parte sobrenadante e outra sedimentada. Pode-se observar ainda que os produtos vegetais e resíduos do sal azo ficaram na interface das duas fases. A intensidade da coloração está relacionada tanto com a concentração dos fitocanabinoides quanto com a proporção da mistura de fitocanabinoides presentes na amostra, onde quanto maior for a proporção e concentração do THC maior será a intensidade de uma coloração avermelhada-vermelho escuro. Por outro lado, a presença de CBD em maior proporção e concentração leva ao desenvolvimento de uma coloração alaranjada.

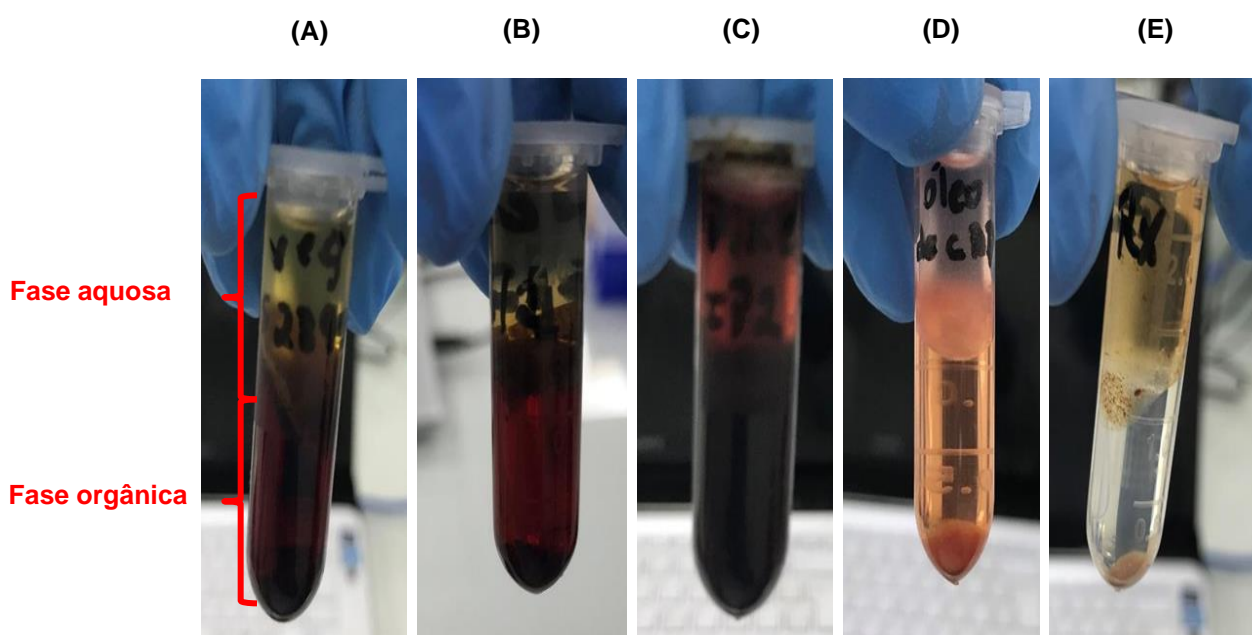


Figura 13. Vegetal macerado “S.2893” (A); Vegetal macerado “S.12776” (B); “Pixe – IP2” (C); Óleo de CBD (D); Branco de Reação “Br_Rx” (E).

6.2. Avaliação da seletividade da separação pós acoplamento em padrões

A Figura 14 mostra o resultado de duas placas cromatográficas de CCD contendo várias corridas/análises, uma obtida pela separação de um extrato não acoplado com FBBS (placa superior) e uma obtida pela separação dos compostos presentes na fase orgânica do resultado do teste colorimétrico, o qual contém os fitocanabinóides acoplados (placa inferior).

Apesar das duas placas não conterem as mesmas amostras, é nítido que a reação de acoplamento ao FBBS, quando realizada antes das aplicações das amostras nas placas de CCD, produz um ganho de resolução e sensibilidade em relação à acoplamento ao se borrifar o revelador sobre a placa após a eluição, possibilitando a quantificação dos constituintes de cada banda formada. Com base nesses resultados, o trabalho foi focado na melhoria da separação e processamento das placas obtidas pela aplicação da amostra já acoplada com FBBS.

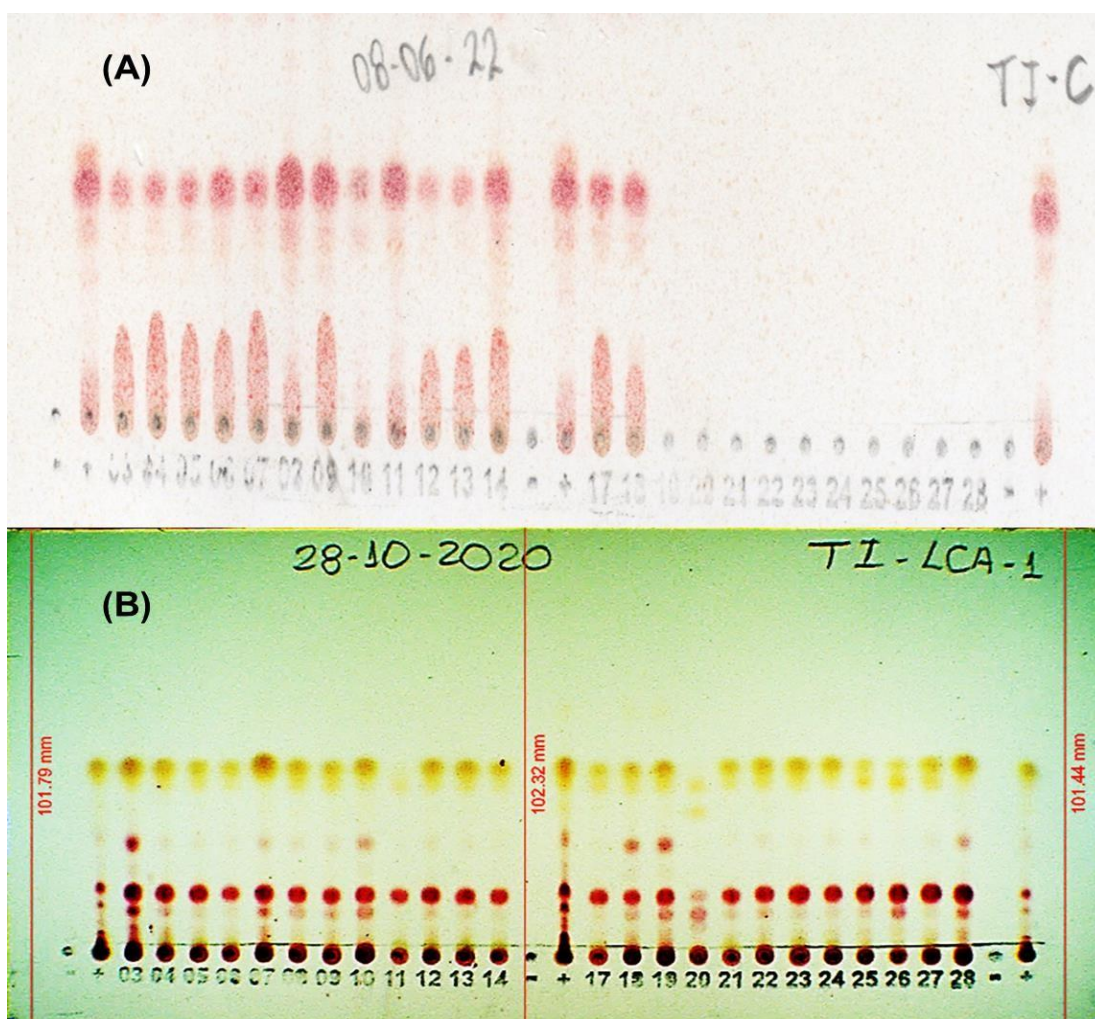


Figura 14. Acoplamento com o sal fast blue B após a corrida cromatográfica no sistema TI (A) e antes da corrida cromatográfica no sistema TI (B).

A Figura 15 mostra o resultado de corridas obtidas em duas placas onde foram aplicados os padrões dos fitocanabinoides THC, CBD, CBN e CBC de acordo com os parâmetros estipulados pelos sistemas TI e TJ, respectivamente. Pode-se observar que na placa do TI, os padrões formaram bandas que, além de intensas, bem separadas e definidas, apresentaram colorações distintas e comportamento reprodutível entre as replicatas. Ainda que os padrões fossem misturados (corridas identificadas com MIX) ou que o etanol fosse usado como solvente extrator (corridas identificadas com EtOH) em vez de clorofórmio, THC, CBD, CBN e CBC sempre apresentaram similaridade em suas distâncias de migração (DM) na placa.

De maneira complementar, apesar de CBN e CBD terem apresentado distâncias de migração semelhantes, com os picos de intensidade sobrepostos no sistema TI, o sistema TJ é capaz de diferenciá-los quanto aos respectivos DMs. Destaca-se, contudo, que devido à pressão de vapor da dietilamina e ao comprimento mais alongado das placas de CCD, um efeito sorriso “*smile*” acentuado pode ser observado na eluição por TJ, dificultando a reprodutibilidade das distâncias de migração (ou fatores de retenção) das bandas formadas. Dessa forma, o uso de placas de CCD mais estreitas é recomendado para reduzir o efeito sorriso em TJ, mas também tem como resultado diminuir o número de corridas simultâneas executadas em uma mesma placa. Por esta razão, o sistema TJ não foi o foco na etapa quantitativa.

Outro fato relevante é que, além das bandas dos fitocanabinoides aplicados em cada corrida, percebeu-se a formação de bandas brandas acima das bandas principais de cada fitocanabinoide, podendo indicar possíveis produtos de degradação ou diferentes razões de acoplamento com o FBBS.

Ademais, as corridas com EtOH apresentaram intensidades muito menores de suas bandas formadas se comparadas com as corridas que utilizaram o clorofórmio, demonstrando a ineficiência do EtOH como solvente extrator.

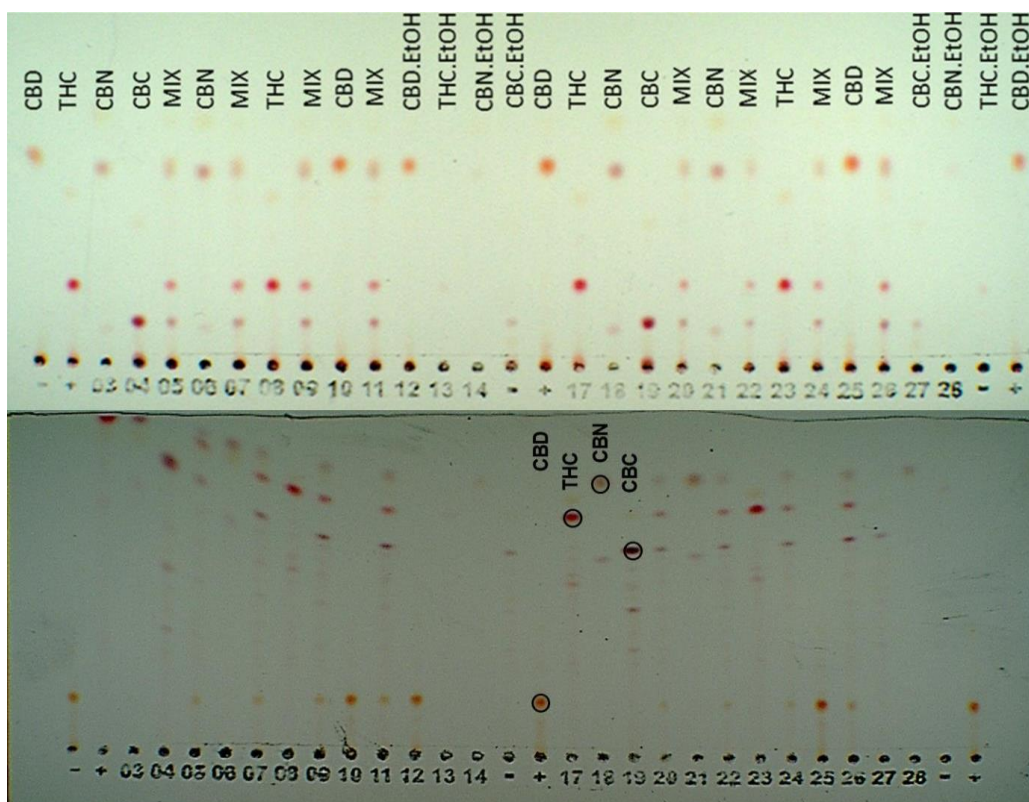


Figura 15. Placas onde foram aplicados 1 μ L dos padrões de (THC) tetrahydrocannabinol, (CBD) canabidiol, (CBN) canabinol e (CBC) canabicromeno, na concentração de 5 mg/mL, utilizando o clorofórmio (onde não foi indicado) e o etanol (EtOH) como solventes extratores e seguindo a mesma ordem de aplicação para eluição nos sistemas: (superior) Sistema TI e (inferior) Sistema TJ.

6.3. Diferença nas imagens das placas de CCD obtidas no VSC8000® e no escaner comum

Primeiramente a região de interesse da placa foi selecionada nas imagens importadas. Essa seleção foi necessária para retirar regiões da imagem que representavam apenas o ruído de fundo do equipamento VSC8000®. Além disso, foram evitadas identificações escritas à lápis, uma vez que estas prejudicam os sinais de intensidade obtidos, gerando interferências e aumentando o nível de ruído dos cromatogramas.

Em seguida, o programa desenvolvido plota a imagem da placa e solicita que o usuário informe o número de um pixel no eixo vertical da imagem da placa em que os pontos de aplicação de todas as corridas estejam incluídos. Na sequência, um segundo gráfico é plotado para que o usuário indique um valor de intensidade mínima que permita identificar todas as corridas de interesse. Para as figuras 16 e 17 apresentadas como exemplo poderiam ser escolhidos como *inputs* o pixel vertical de número 60 para garantir que todos os pontos de aplicação sejam contabilizados e o valor de intensidade 0,1, que identifica todas as corridas desconsiderando os ruídos obtidos, respectivamente.

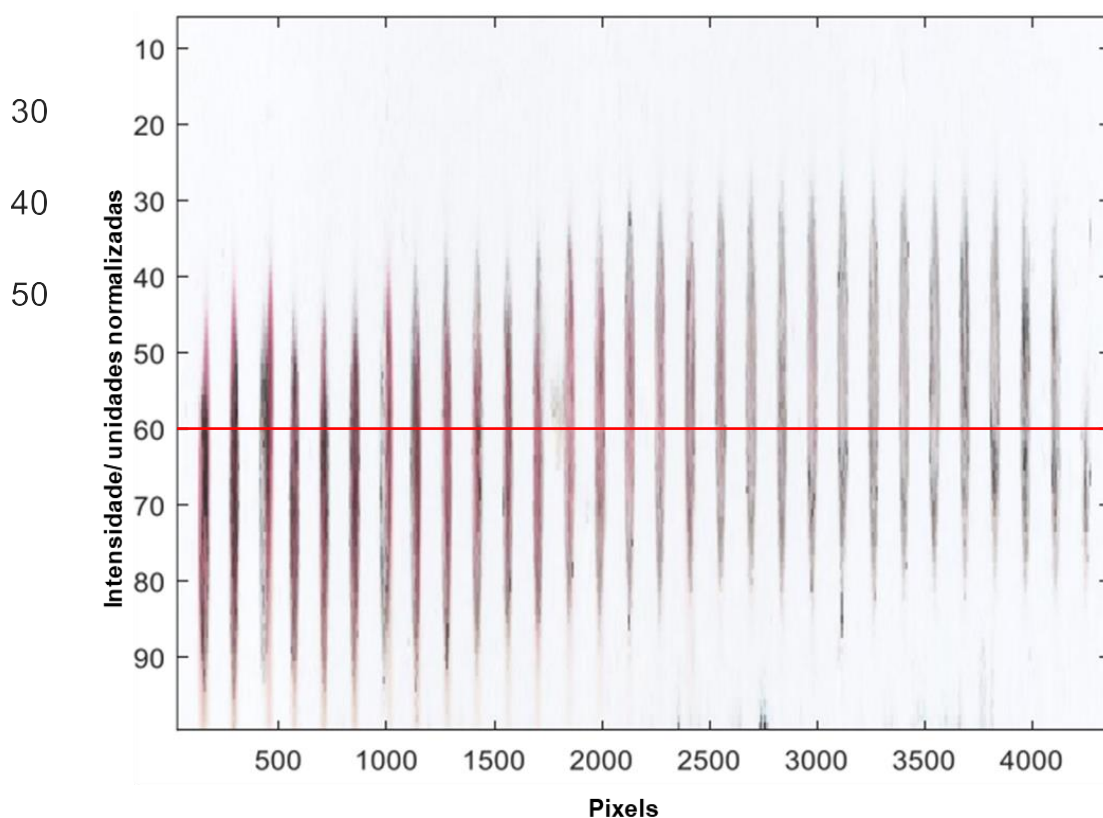


Figura 16. Zoom na região dos pontos de aplicação (PA) de uma placa de CCD, onde foi selecionada a altura que englobava as aplicações de todas as amostras (pixel 60).

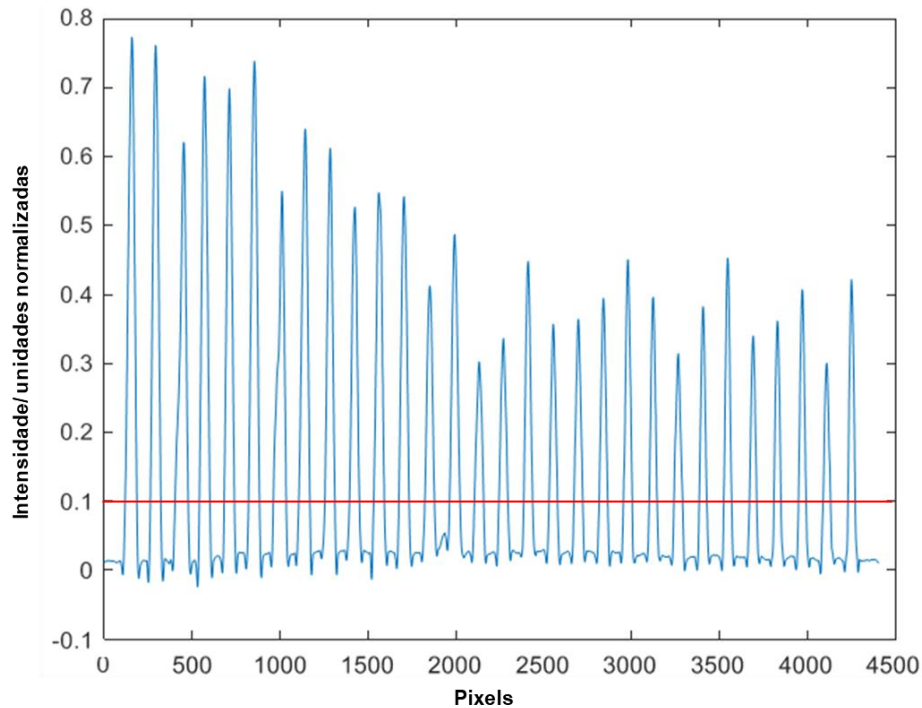


Figura 17. Gráfico das intensidades ao longo do pixel selecionado na figura 14 que permite determinar a intensidade mínima para identificar todas as corridas de interesse (0.1).

Após essas entradas (“inputs”) o programa realiza todo o restante do processo automaticamente. Conforme ilustra a Figura 18, os cromatogramas brutos obtidos inicialmente pelo programa apresentavam aspecto ruidoso e com deslocamento de linha base entre si, em decorrência da variância na constituição das amostras vegetais e variação no ruído de fundo da placa.

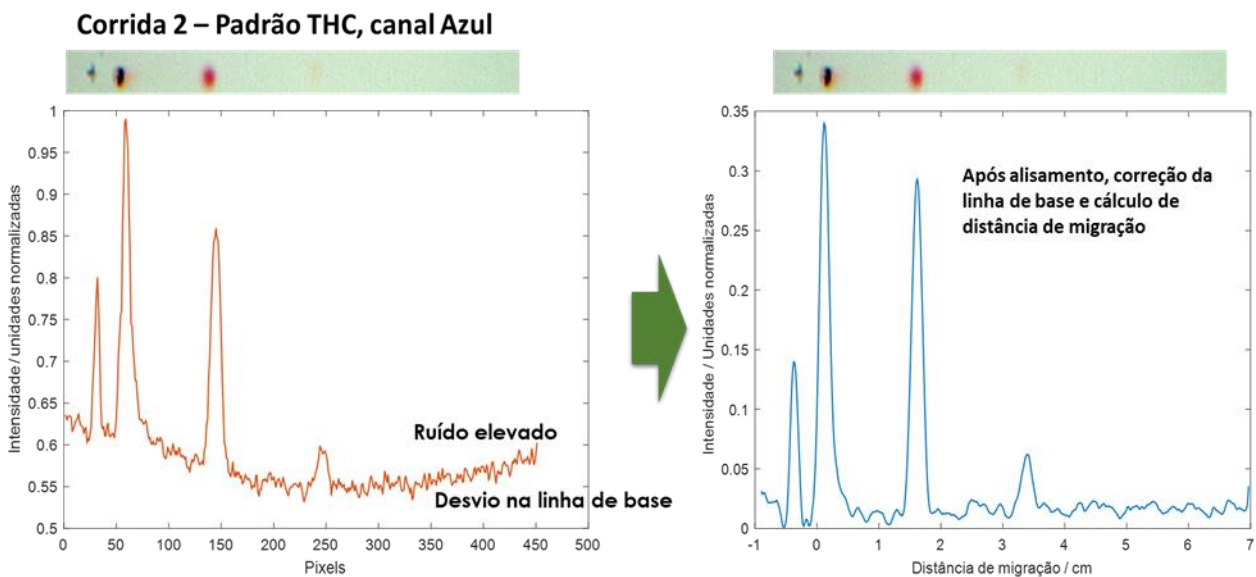


Figura 18. (À esquerda) Exemplo do cromatograma bruto obtido para o processamento da imagem da placa. (À direita) Cromatograma após correção da linha de base e alisamento pelo método de Savitzky-Golay.

Em paralelo, foram feitos estudos com 3 diferentes iluminações do VSC8000® (Flood, 254 nm e 365 nm) para analisar a eficiência de conversão dos pixels obtidos das imagens das placas em informações de área dos picos no *software* desenvolvido. Concluiu-se que a iluminação Flood fornecia a melhor qualidade das bandas formadas em suas imagens.

Ao todo, para cada placa em que foram feitas 30 aplicações, foram gerados um total de 210 cromatogramas (30 corridas x 1 iluminação x 7 canais de cor), nos quais foram feitas correções nos parâmetros de saturação, matiz e luminosidade da placa proporcionando maior nitidez e visualização das bandas mais transparentes e, por conseguinte, sendo obtidos sinais intensos, além de bem definidos e separados. Conforme ilustram as figuras 19 e 20, todos os canais de cor, com exceção do vermelho, da luminosidade e da matiz, geraram cromatogramas com picos bem definidos, suficientemente intensos e separados.

Levando em consideração o menor custo, a maior praticidade e facilidade de uso de aparatos escaneadores, o mesmo procedimento de obtenção de imagens digitalizadas foi realizado em um escaner EPSON® comercial comum no intuito de se fazer um estudo comparativo da qualidade das imagens formadas. Ao final, as imagens obtidas tiveram uma qualidade superior às do VSC8000®, possibilitando a realização das etapas posteriores apenas com o uso do escaner.

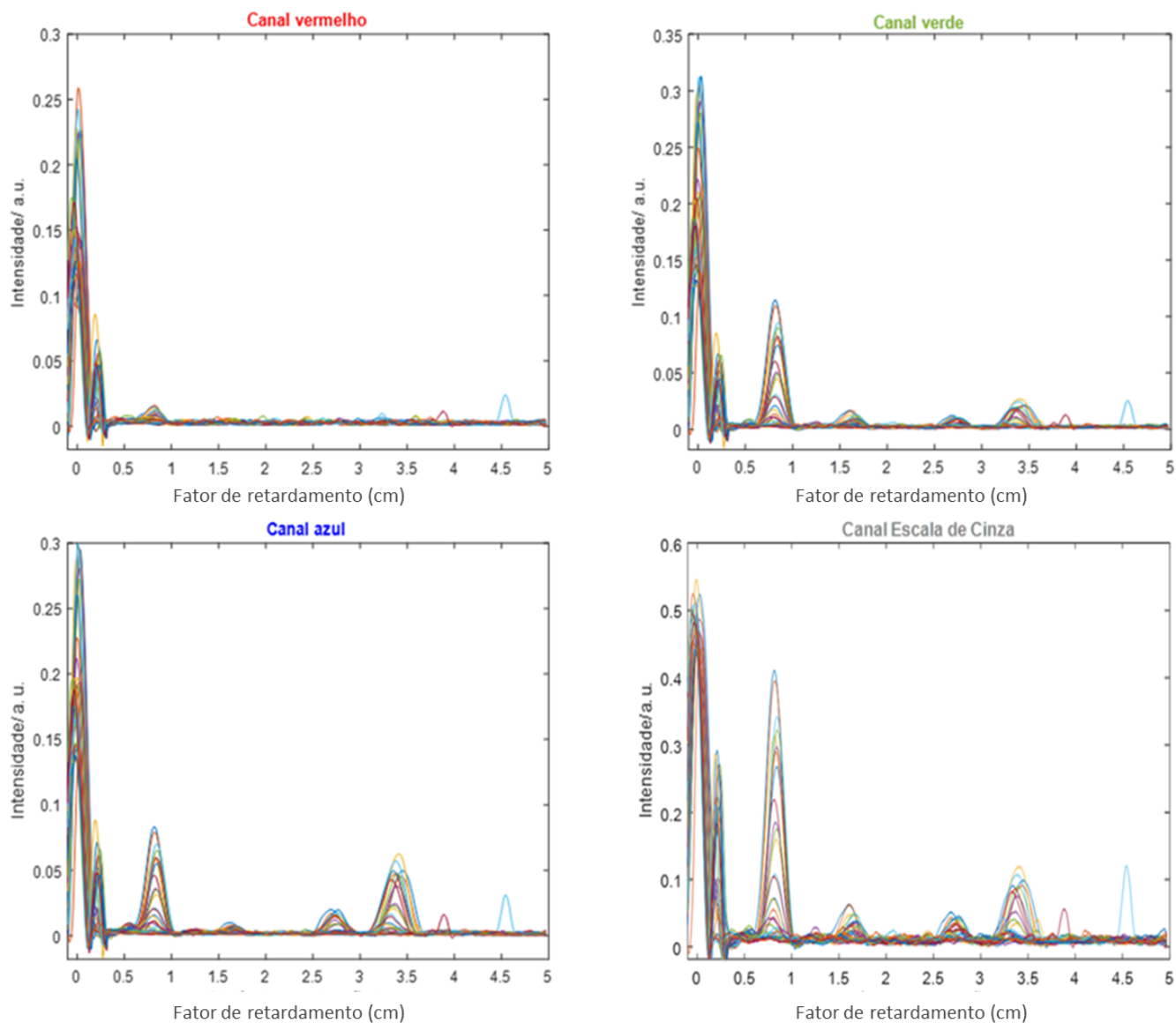


Figura 19. Cromatogramas obtidos dos canais de cor: RGB e GS.

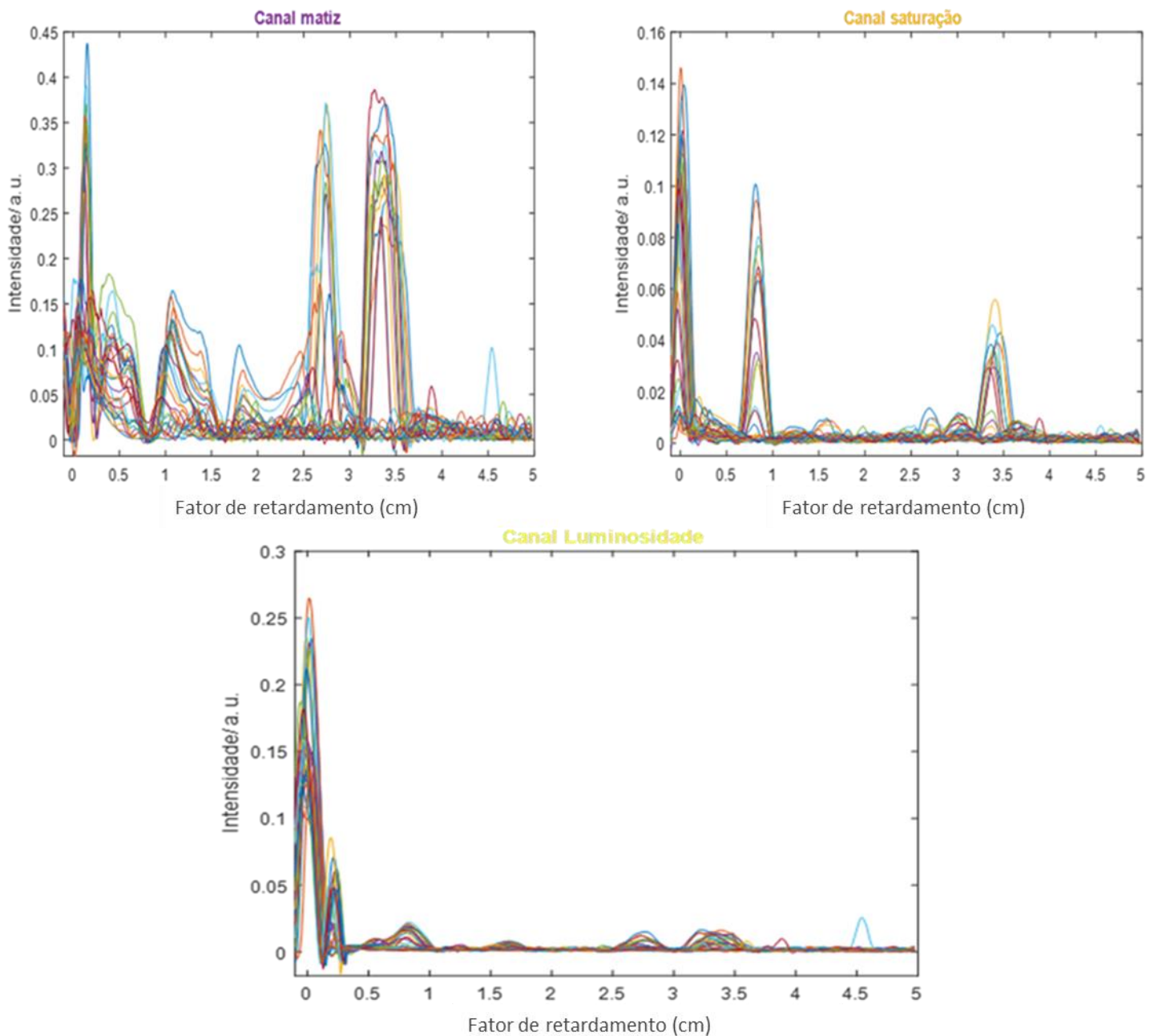


Figura 20. Cromatogramas obtidos dos canais de cor: HSV.

A absorção dos fitocanabinoides complexados com FBBS ocorre na faixa de 400 a 600 nm, correspondendo à região que engloba do violeta ao amarelo. Como consequência, a maior parte das bandas mais intensas desses compostos (radiação refletida) ocorre na faixa do vermelho da luz visível (625 nm – 770 nm). Portanto, os canais G, B, S e escala de cinza foram os que apresentaram mais riqueza de informações.

De maneira complementar, as figuras 21 e 22 mostram, em destaque, as corridas de número 3, 5 e 10 para o sistema TI e 20, 21 e 25 para o sistema TJ das placa onde foram aplicados os padrões dos fitocanabinoides e seus respectivos cromatogramas gerados pelo software com os canais B e G. Os picos, exceto pelos situados no ponto de aplicação, são bem definidos, com boa eficiência e variam em intensidade de acordo com a concentração de cada composto, além de apresentarem distâncias de migração (deslocamentos/cm) distintos, com exceção para CBN e CBD por apresentarem RFs semelhantes no TI. Contudo, esta similaridade de RFs pode ser resolvida ao se utilizar o sistema TJ para eluir as placas. Em razão da diferença das diferentes afinidades que CBN e CBD possuem com a mistura de solventes da fase móvel do sistema TJ, esses dois compostos canabinoides findam por apresentarem RFs distintos e, por conseguinte, ficando bem separados na placa, conforme visualizado pelos resultados do cromatograma da Figura 22.

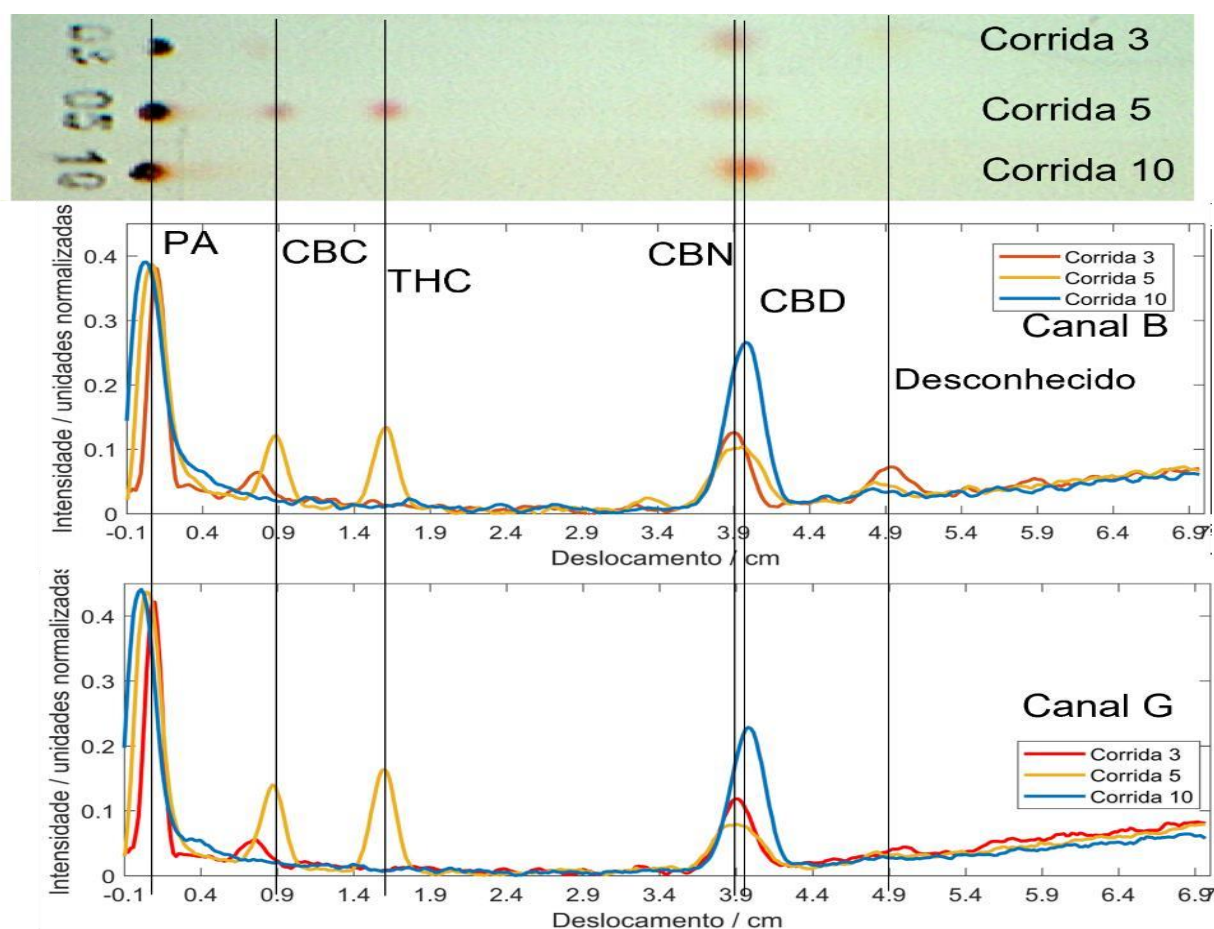


Figura 21. Destaque das corridas 3(padrão de CBN), 5 (MIX de fitocanabinoides) e 10 (padrão de CBD) e seus respectivos cromatogramas nas componentes B e G. PA: ponto de aplicação. Separação obtida com o sistema TI.

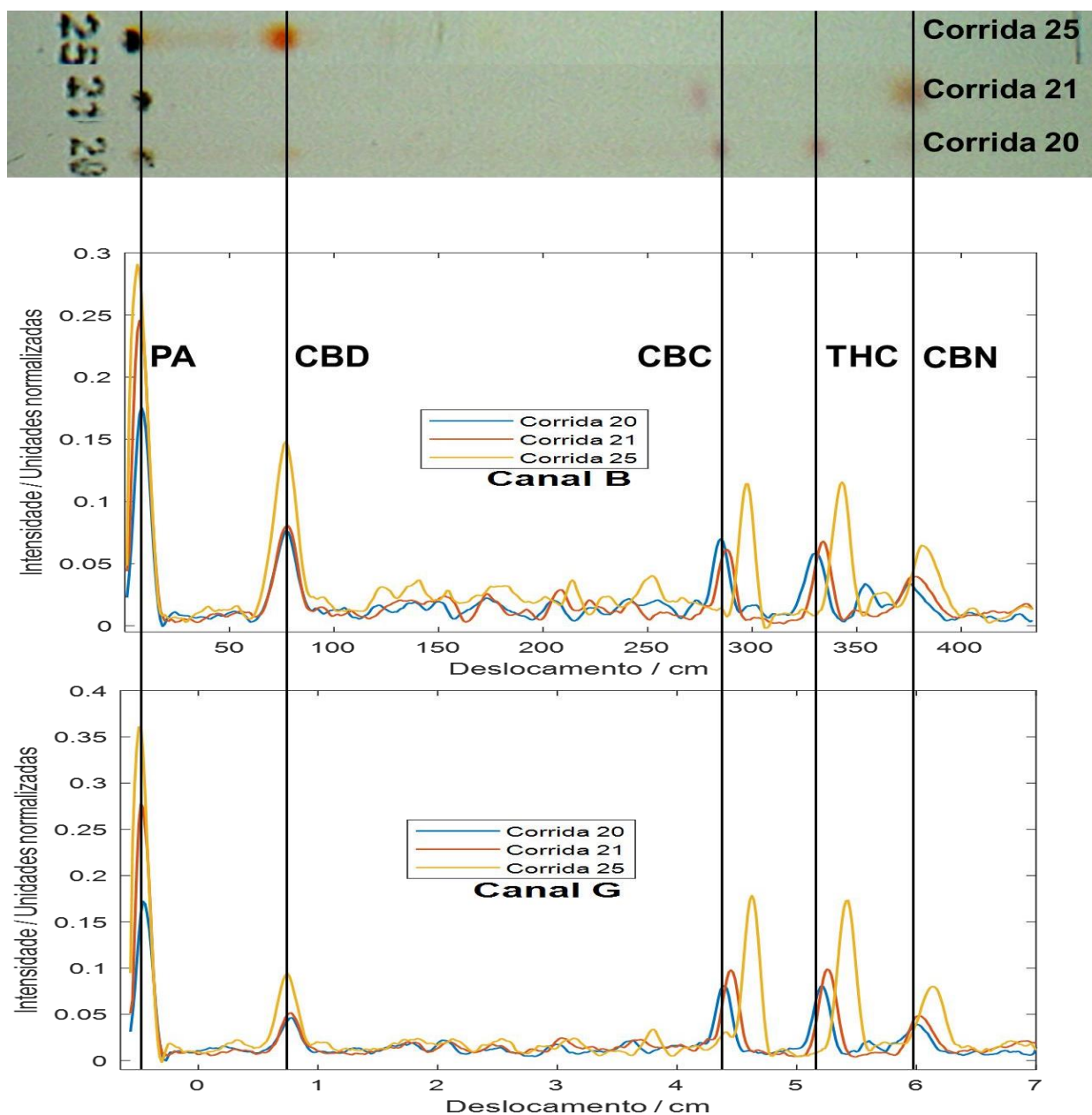


Figura 22. Destaque das corridas 20 (MIX de fitocanabinoides), 21 (padrão CBN) e 25 (padrão CBD) e seus respectivos cromatogramas nas componentes B e G. PA: ponto de aplicação. Separação obtida com o sistema TJ.

A conversão de unidades de pixel em cm, obtida pela divisão uma unidade de pixel (256) pela quantidade total em cm da placa, bem como a determinação do ponto de aplicação (PA) possibilitaram a determinação das distâncias de migração (DM) necessárias para verificar a separação de cada uma das bandas, além de fornecer uma comparação objetiva para avaliar a separação.

6.3. Testes de precisão e linearidade obtidas no programa desenvolvido

De acordo com os resultados da Tabela 5 para o sistema TI, apesar da variabilidade na aplicação manual da aplicação dos padrões nas placas, os resultados obtidos dos valores de distâncias de migração, altura e área dos picos foram considerados muito promissores. Infelizmente, para essas placas não foi possível o cálculo dos RFs, mas a sua utilização não afetaria os resultados da Tabela 5 de forma significativa. Considerando que um desvio usualmente tomado como aceitável para análises quantitativas em instituições de perícia é de 10%, também adotado segundo os critérios da Comunidade Europeia (96/23/EC), a metodologia proposta pelo presente trabalho apresentou potencial para realizar a identificação dos fitocanabinoides por seus fatores de retenção, pois os resultados das medidas das áreas e alturas apresentaram desvios na faixa de 5% a 16%, valores considerados aceitáveis para uma placa que foi produzida ainda sem propósitos quantitativos.

Tabela 5. Resultados médios, desvios padrões e coeficiente de variação (entre parênteses) das distâncias de migração (DM), área e altura obtidos na análise da placa CCD dos padrões no sistema TI.

	N=8	N=6	
	DM	ÁREA	ALTURA
CBC	0,85 ± 0,01 (1,7%)	1,35 ± 0,09 (6,9%)	0,13 ± 0,01 (5,4%)
THC	1,59 ± 0,01 (0,8%)	1,72 ± 0,20 (12%)	0,15 ± 0,02 (11%)
CBN/CBD	3,88 ± 0,03 (0,8%)	1,48 ± 0,24 (16%)	0,08 ± 0,01 (15%)

O potencial quantitativo do método proposto foi avaliado com base em novas corridas cromatográficas realizadas com base em diluições consecutivas de uma mesma amostra. As aplicações da amostra foram feitas em uma nova placa de CCD em triplicata, seguindo o padrão de diluição ilustrado na Figura 23.

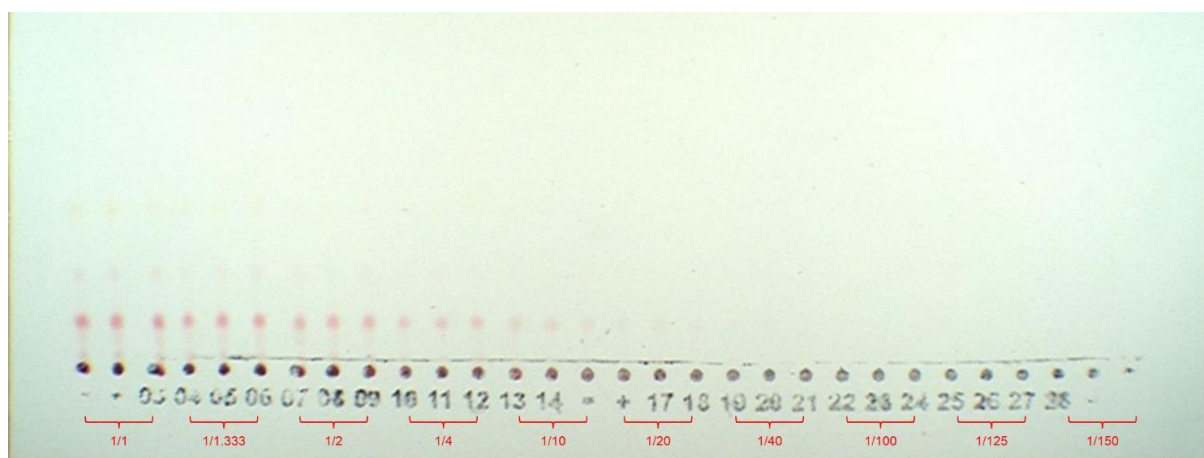


Figura 23. Placa de CCD, onde foi diluída e aplicada em triplicata uma amostra de maconha apreendida.

Em razão da maior sensibilidade no processamento dos dados da imagem da placa da Figura 22 pelos canais azul e saturação, os picos de interesse visualizados apresentaram maior intensidade e nitidez, bem como uma maior razão sinal/ruído calculada, tendo sido obtido um ruído com uma intensidade menor que 0,02, enquanto a menor intensidade de pico obtida foi de 0,05 e conforme ilustram os cromatogramas da Figura 24, foram obtidos resultados com uma boa intensidade de sinal mesmo na diluição de 1/20.

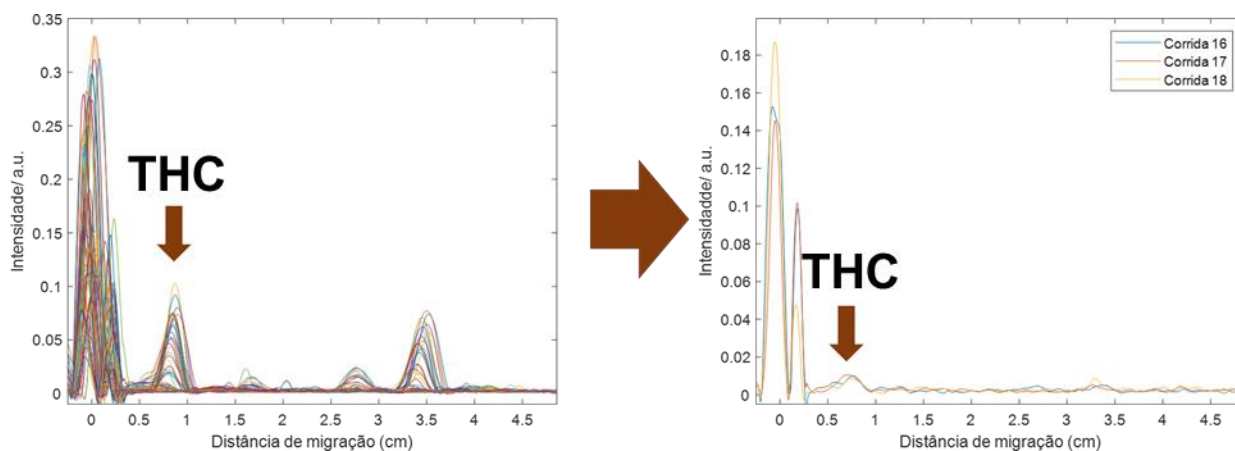


Figura 24. À esquerda, cromatograma de todas as corridas da placa da figura 17 no sistema TI no canal azul. À direita, cromatogramas das corridas 16, 17 e 18 (diluição 1/20 da amostra).

Dessa forma, duas curvas analíticas correlacionando os níveis de diluição da amostra analisada pela intensidade de sinal da área obtida para a banda correspondente ao THC serão apresentados apenas para esses dois canais (Figura 25). Ambas as regressões apresentam valores de coeficiente de determinação (R^2) muito bons, sendo de 0,966 para o canal azul e de 0,98 para o canal saturação. Apesar disso, ocorre uma maior variabilidade nas sete primeiras corridas provocada pelo “efeito de arraste” dos compostos nos pontos mais concentrados (Figura 26), levando a uma leve sobreposição de sinais no cromatograma.

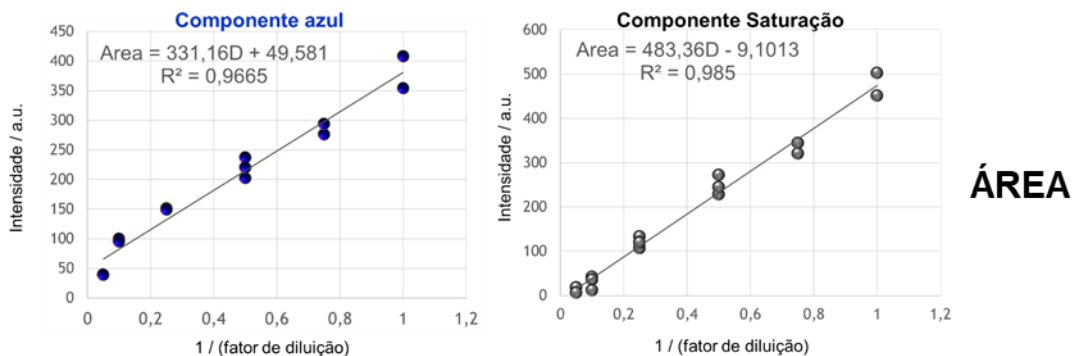


Figura 25. Curvas analíticas para os canais azul e saturação utilizando a área dos picos como base de cálculo.

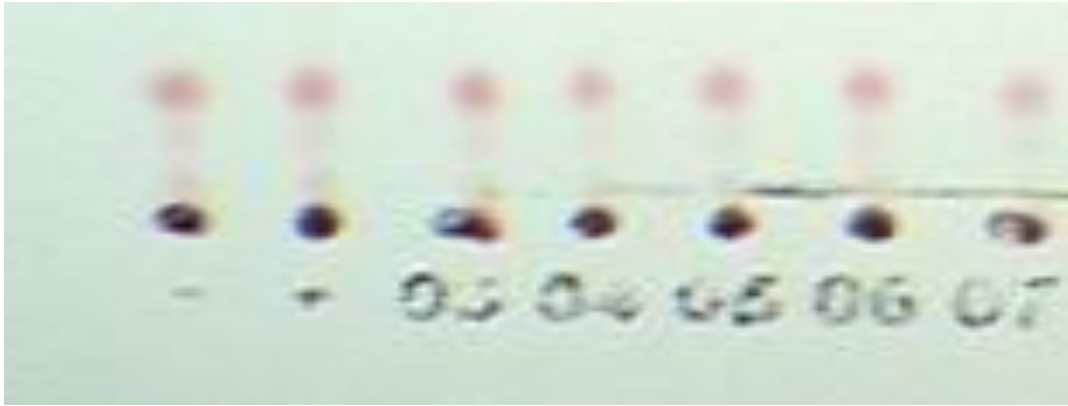


Figura 26. Efeito de arraste visualizado nas sete primeiras corridas.

Ademais, as regressões foram igualmente significativas e, apesar da diminuição gradativa na intensidade de sinal no decorrer da placa em razão do aumento do fator de diluição, apresentaram reduzida quantidade de resíduos de maneira geral, além de uma boa adequação ao ajuste linear, conforme ilustram as Tabelas 6 e 7 das análises de variância dos respectivos canais.

Os valores de significância (valores de F calculado para o teste-F de significância de regressão) obtidos para as regressões construídas para os canais azul e saturação foram 246,6 e 498,8, respectivamente mais de 10 vezes maiores que os respectivos valores tabelados, de modo que ambas regressões fornecem predições boas o suficiente para fins práticos.

Por fim, percebe-se a existência de uma correlação positiva entre amostras contendo concentrações crescentes de THC e as intensidades de sinal. Além disso, devido ao fato de CBN ser um produto de degradação do THC e a apreensão utilizada ter sido relativamente nova, suas bandas aparecem com menor intensidade comparativamente às do THC.

Tabela 6. Análise de variância para o canal azul, onde são apresentadas as Fontes da variação (**Fonte**), a variação dos dados do modelo (**Somatória Quadrática**), a razão entre a somatória e os graus de liberdade (**Média Quadrática**), além de medidas objetivas quanto à adequação do moledo (**Falta de ajuste**) e os erros obtidos (**Erro Puro**).

Fonte	Somatória Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática
Regressão	7,4946	1	7,4946
Resíduos	0,46	15	0,030398
Falta de ajuste	0,13	4	0,031772
Erro Puro	0,33	11	0,029898
TOTAL	7,95	16	

Tabela 7. Análise de variância para o canal saturação, onde são apresentadas as Fontes da variação (**Fonte**), a variação dos dados do modelo (**Somatória Quadrática**), a razão entre a somatória e os graus de liberdade (**Média Quadrática**), além de medidas objetivas quanto à adequação do moledo (**Falta de ajuste**) e os erros obtidos (**Erro Puro**).

Fonte	Somatória Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática
Regressão	4,526	1	4,526414
Resíduos	0,136	15	0,009075
Falta de ajuste	0,032	4	0,00805
Erro Puro	0,104	11	0,009447
TOTAL	4,663	16	

Ademais, o processo de alisamento por Savitzky-Golay, a decomposição de dados em componentes principais por PCA e a correção de linha de base influenciam no cálculo de altura e integração das áreas dos picos, promovendo condições favoráveis à realização de um processamento de sinal que realiza a modelagem 3D das bandas obtidas para sua posterior integração. Esse processamento de sinal ocorre a partir da delimitação das áreas das bandas após uma varredura feita pelo programa através da placa, cujos *outputs* informam características intrínsecas do *spot* identificado, tais como a profundidade, a intensidade e o volume do composto ali presente, conforme ilustra o esquema na Figura 27.

Primeiramente, são obtidos os cromatogramas brutos de todas as 30 corridas das placas de CCD. Em seguida, é realizado o alisamento por Savitzky-Golay e os picos de interesse são detectados. O background e o ruído são corrigidos mediante o alisamento por PCA e as correções na linha de base, deixando os picos bem definidos, sem, no entanto, prejudicar a intensidade dos sinais. Ao final, são feitos ajustes nas dimensões do contorno das bandas e obtém-se um sinal pré-processado para que as áreas a serem calculadas coincidam com os picos encontrados.

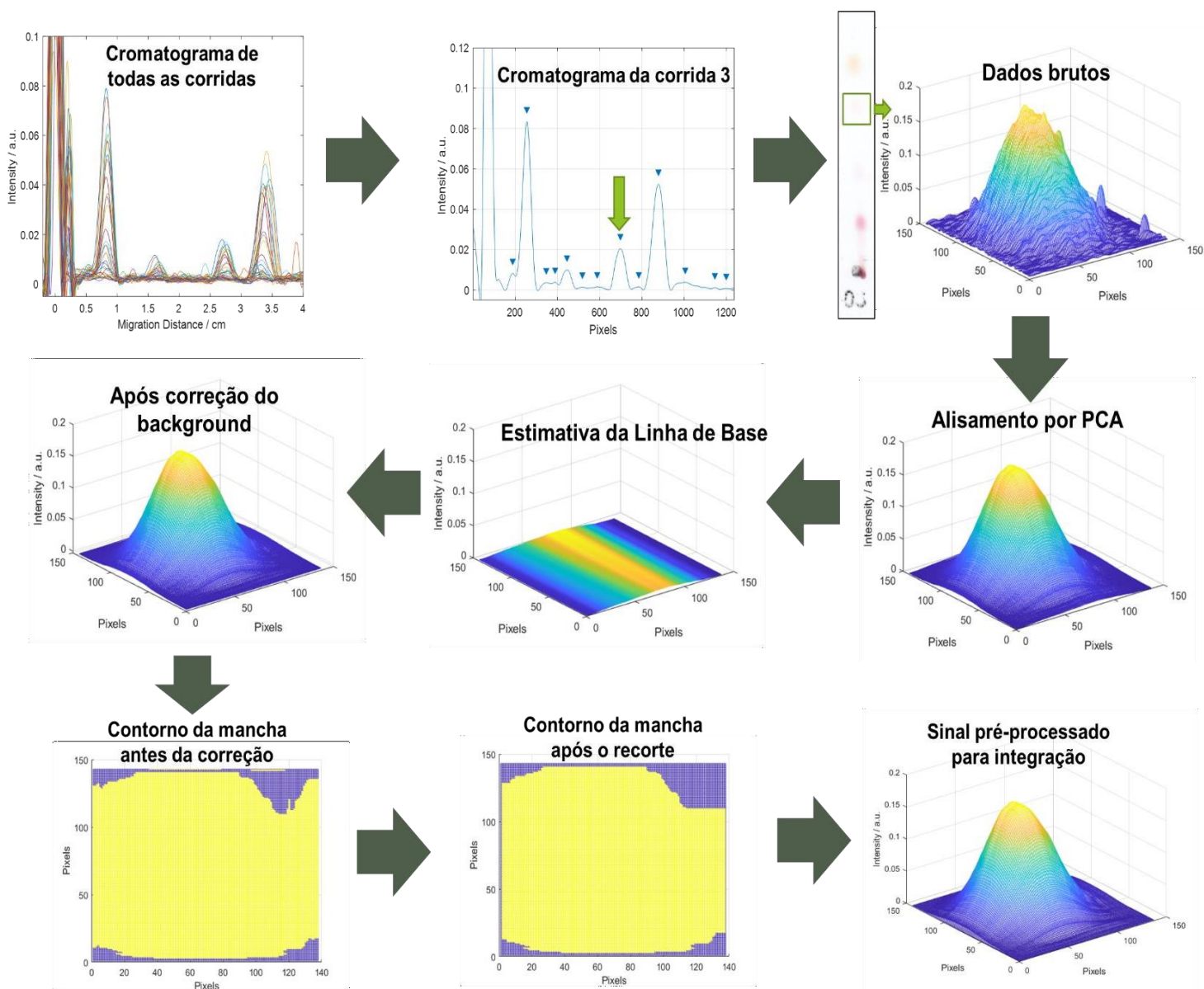


Figura 27. Passo a passo das correções feitas nas bandas dos analitos antes da integração dos volumes dos picos de interesse visualizados como manchas nos cromatogramas.

Denota-se que através de uma linha de base comportada e filtros de alisamento, a identificação dos compostos canabinoides é facilitada, gerando menos erros no processamento dos dados.

6.4. Estudo da razão de acoplamento dos fitocanabinoides e do FBBS por LC TripleTOF

Conforme observado na placa dos padrões da Figura 15, foram observadas mais de uma banda para cada um dos fitocanabinoides na placa, levando às hipóteses de possíveis produtos de degradação ou diferentes razões de acoplamento ao FBBS. Para elucidar esse comportamento, foram feitas raspagens das bandas de algumas corridas nas placas de CCD (Figura 28) para posterior análise por TripleTOF LC/MS.

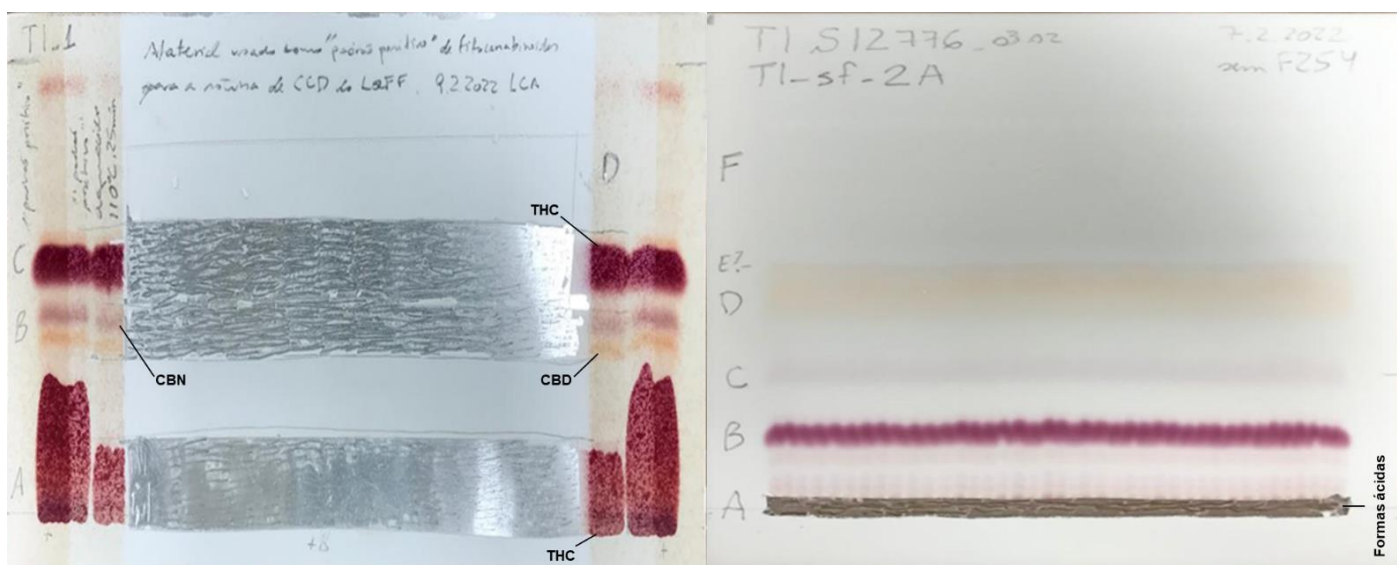


Figura 28. Raspagens dos fitocanabinoides feitas com estilete em duas placas de CCD sem adição de composto fluorescente (F₂₅₄) no sistema TI. À esquerda, “padrões positivos” de fitocanabinoides raspados de placa, cuja derivatização aconteceu após a corrida cromatográfica. À direita, formas ácidas raspadas de placa, cuja derivatização aconteceu previamente à corrida cromatográfica.

Conforme apresentado pelos cromatogramas das Figuras 29 e 30, foram detectados sinais analíticos de THC, CBD e CBN complexados com o FBBS na razão de 1:1 com intensidade e abundância maiores que os sinais detectados pelos compostos não-complexados. A Figura 29A, que se refere a injeção do extrato obtido pela raspagem da banda de THC apresentou como picos principais as moléculas protonadas de THC (m/z 315,2 Da) e de THC complexado com uma molécula de Fast Blue B (m/z 555,3 Da).

THC, CBD e CBC são isômeros, entretanto o tempo de retenção das moléculas protonadas do CBD complexado com o Fast Blue B nas condições cromatográficas empregadas é bastante distinto do tempo de retenção do THC complexado ($[M+H]^+_{\text{CBD+FBB}} = 9,3$ min e $[M+H]^+_{\text{THC+FBB}} = 10,85$ min, respectivamente) (Fig. 29B) permitindo a discriminação entre esses dois isômeros.

Por outro lado, conforme demonstrado na Figura 30A, o acoplamento do CBC ao FBBS é o único dos quatro fitocanabinoides estudados que ocorre majoritariamente na razão de 2:1. O pico principal e mais intenso ($[M+H]^+_{2 \times \text{CBC+FBB}}$, m/z 895,5 Da) aparece com tempo de retenção de 9,6 min, permitindo sua fácil discriminação em relação aos isômeros THC e CBD. Adicionalmente, ainda que o pico correspondente ao acoplamento 1:1 entre CBC e o FBB tenha mesma massa e tempo de retenção quase idêntico ao do THC acoplado, os espectros de massas do CBC e do THC são facilmente distinguíveis. A Figura 30B demonstra que os resultados para as moléculas protonadas (m/z 311,2 Da) e o complexado (m/z 511,3 Da) do CBN apesar de terem tempos de retenção semelhantes aos do CBD e THC, respectivamente, são de fácil distinção pelas massas de suas moléculas protonadas do CBN e do CBN complexado com o FBB, com 4 Da a menos que as dos isômeros CBD e THC.

Bordin et. al apontava que a reação de acoplamento entre fitocanabinoides e FBBS ocorreria sempre na razão de 2:1 para todos os analitos estudados. Contudo, os resultados obtidos por TripleTOF LC/MS (Figura 29 e 30), contendo massa exata e fragmentação por ESI, sugerem que a razão de acoplamento de 2:1 é observada somente para o canabicromeno. Os demais fitocanabinoides complexam com o Fast Blue B na razão 1:1. O canabicromeno também complexa, ainda que com menor rendimento, na razão 1:1 com o Fast Blue B.

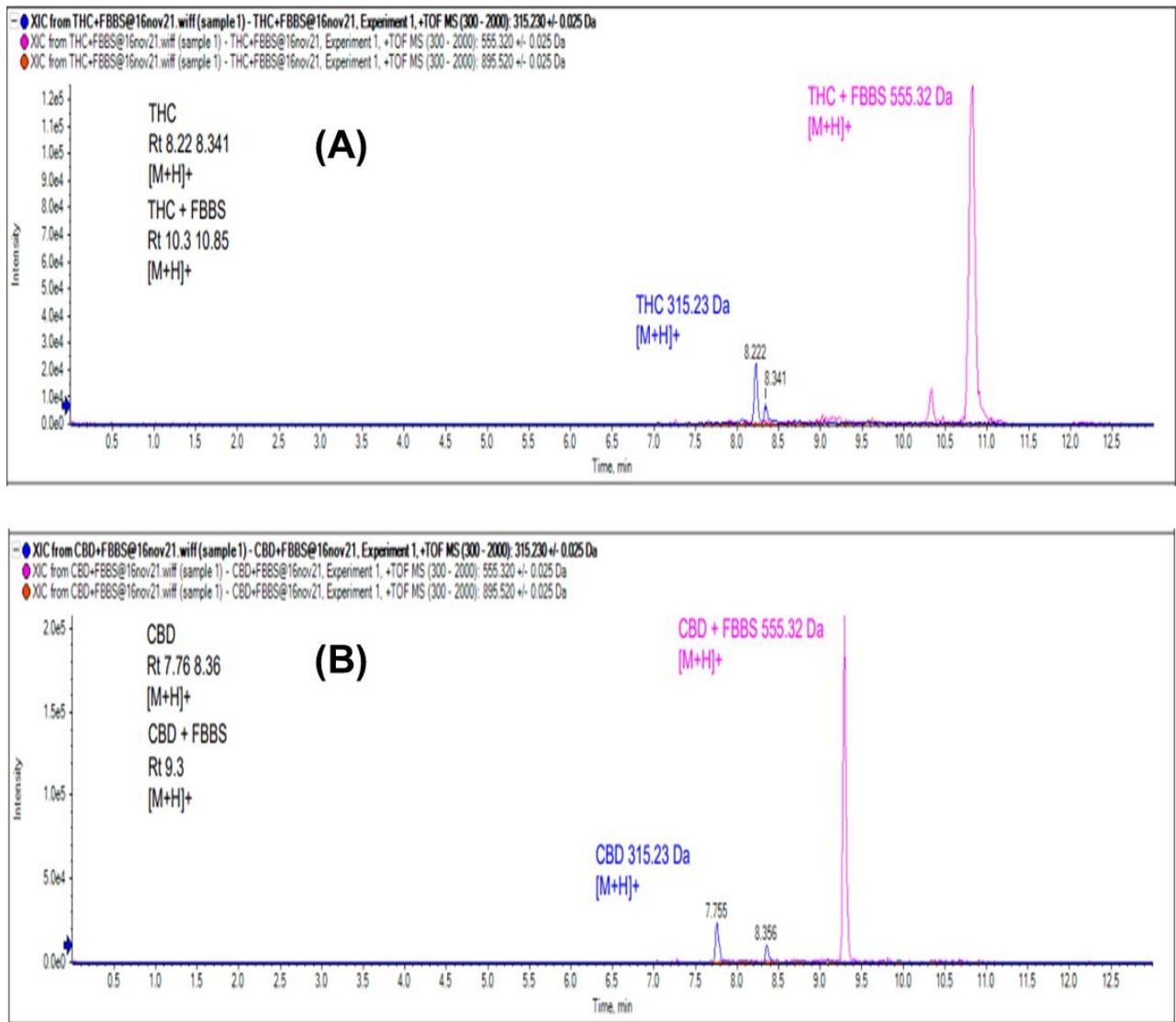


Figura 29. Cromatogramas obtidos no LC/MS dos padrões dos fitocanabinoides tetrahydrocannabinol (THC) e canabidiol (CBD).

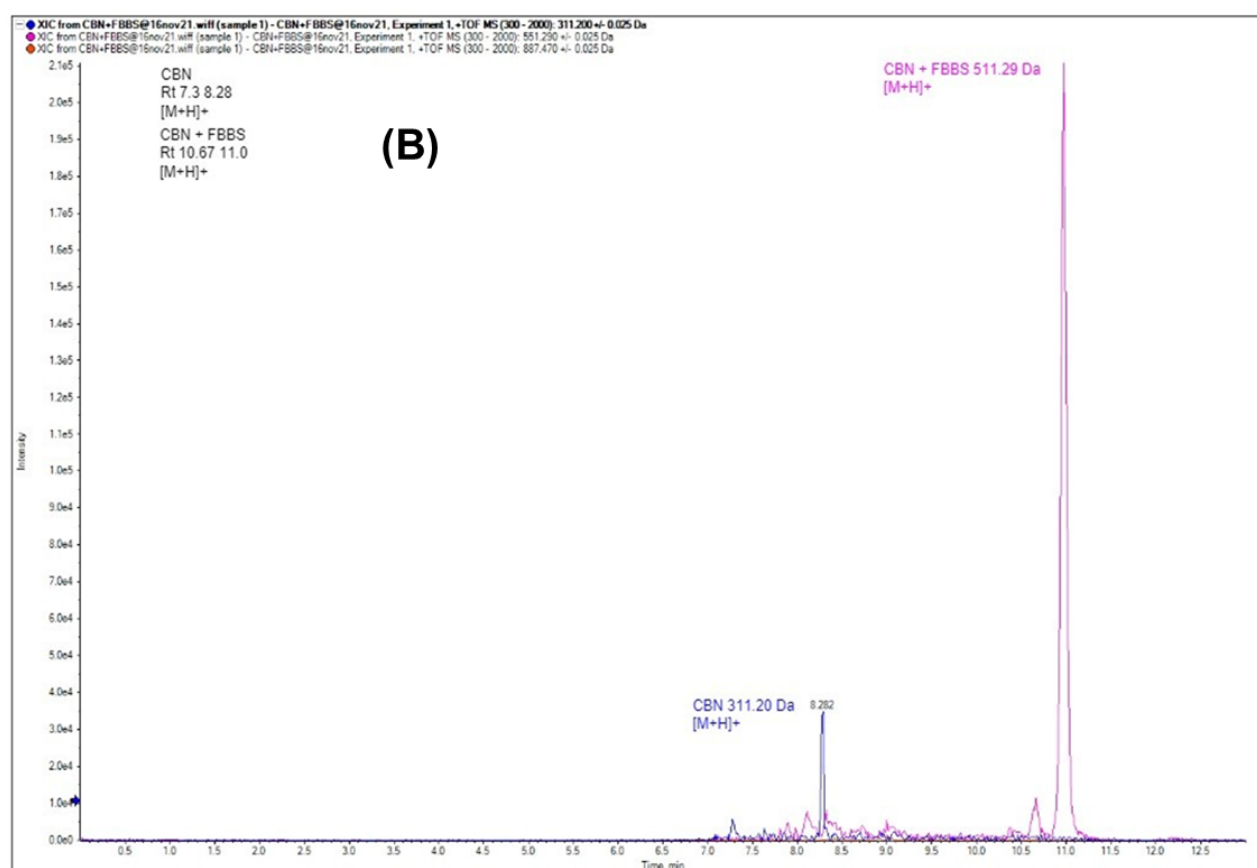
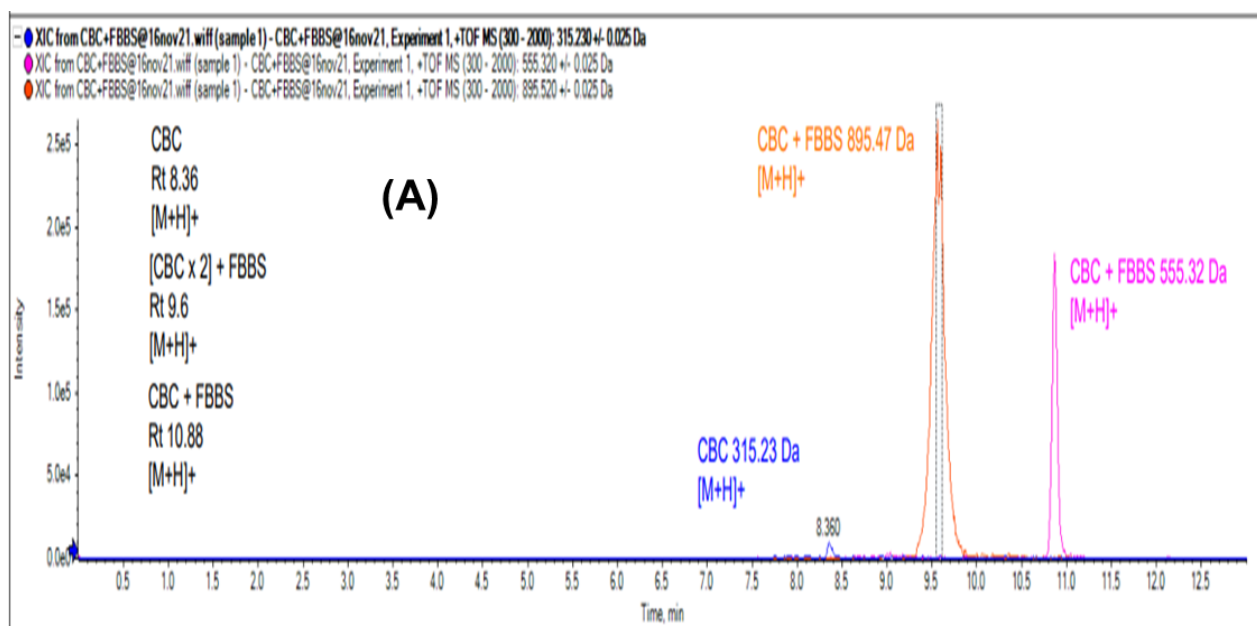


Figura 30. Cromatogramas obtidos no LC/MS dos padrões dos fitocanabinoides canabicromene (CBC) e canabinoil (CBN).

Em conclusão, os tempos de retenção obtidos pela separação cromatográfica associado aos espectros de massas dos complexos fitocanabinoides – FBB possibilitaram uma clara discriminação entre todos os quatro fitocanabinoides, ainda que três deles sejam isômeros.

6.5. Avaliação da influência da fase estacionária na degradação dos analitos

Em paralelo às análises de TripleTOF LC/MS para a avaliação da razão de acoplamento, foram feitas 4 novas corridas de CCD (Figura 31) em placas grau HPTLC (cromatografia em camada delgada de alta performance) sem a presença de compostos fluorescentes, além de outras 4 placas TLC-2D com secagem e ressuspensão em etanol e clorofórmio (figuras 32A, B, C e D), no intuito de averiguar possíveis degradações e oxidações promovidas pela fase estacionária. Esses ensaios foram feitos em razão da detecção de muitos sinais espectrais intensos de massas distintas das esperadas pelos fitocanabinoides, levantou-se a suspeita de que a Sílica-gel ou do agente fluorescente estivesse agindo sobre as amostras aplicadas nas placas anteriores, promovendo degradação e oxidação de seus constituintes, pois seu uso intensivo pode acabar produzindo resíduos sólidos contaminados com diversos outros compostos orgânicos em um determinado ambiente. Além disso, o aumento na temperatura altera a estrutura molecular da sílica, fazendo com que a eficiência das separações fique prejudicada, por conseguinte.

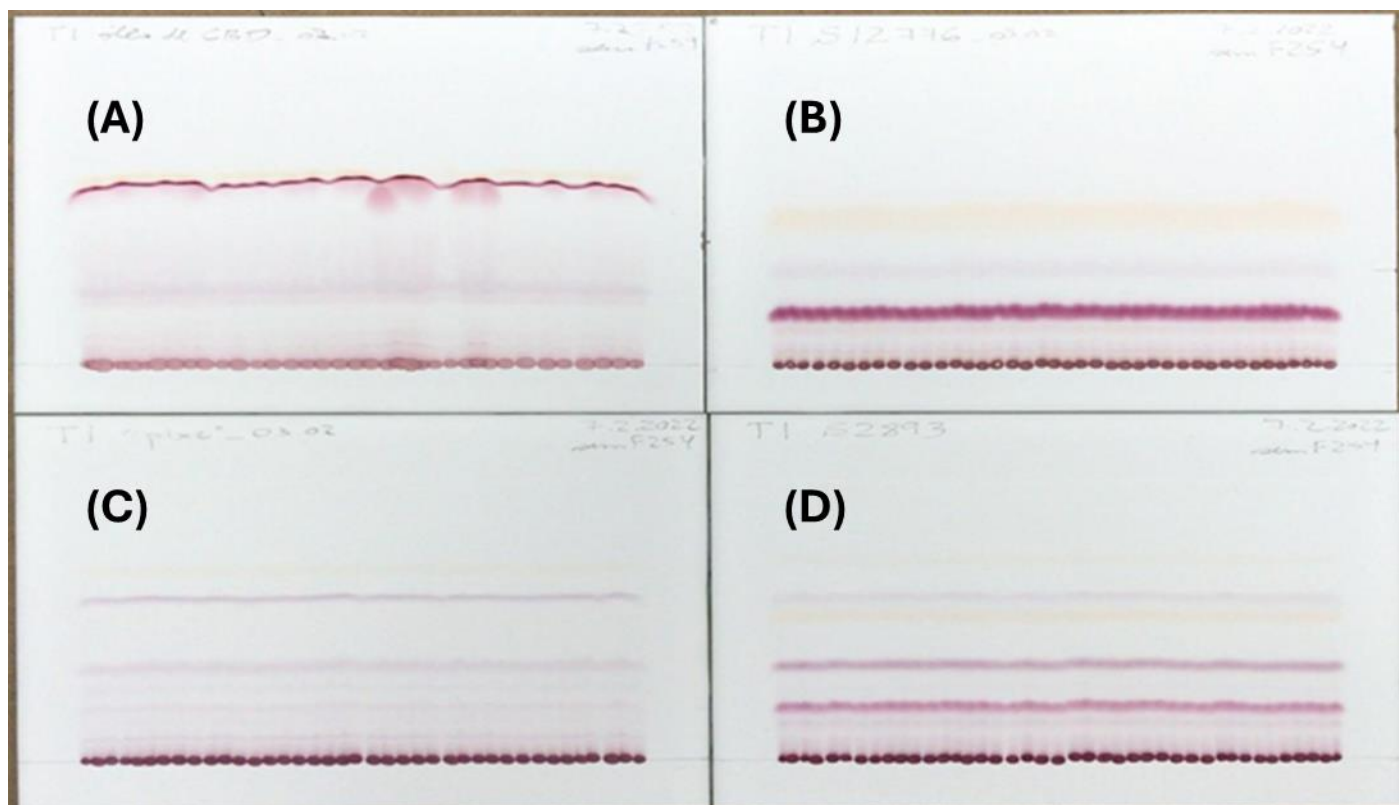


Figura 31. Placas de HPTLC isentas de F₂₅₄ corridas no sistema TI, onde foram aplicadas as amostras: óleo de CBD (A), S.12776 (B), “pixe” (C) e S.2893 (D). A mesma amostra foi adicionada em todos os pontos de aplicação.

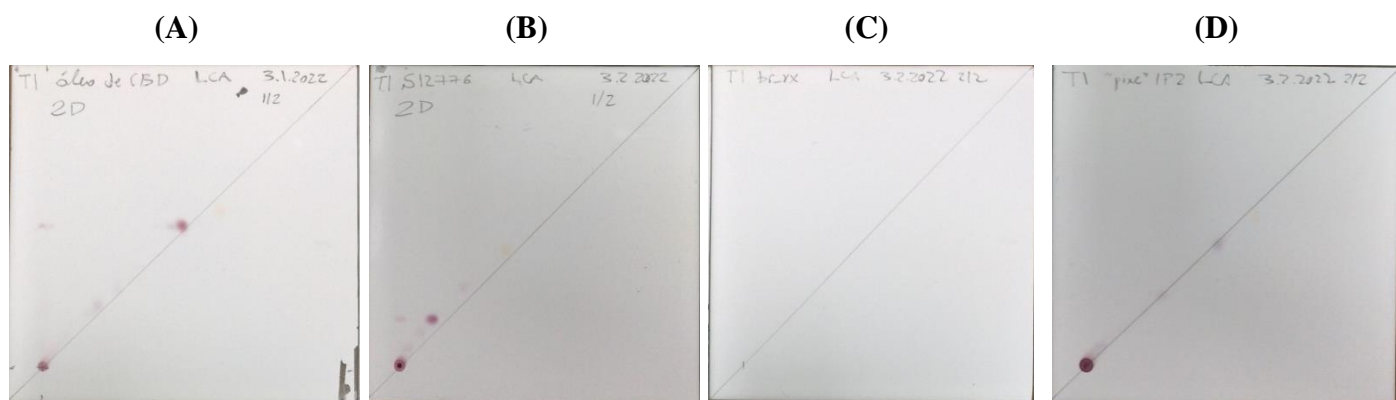


Figura 32. Placas de HPTLC isentas de F_{254} corridas na diagonal (TLC-2D) no sistema TI, onde foram aplicadas: óleo de CBD com secagem e ressuspensão em etanol (A), amostra S.12776 com secagem e ressuspensão em etanol (B), Branco de reação com clorofórmio (C) e “pixe” IP2 com clorofórmio (D).

Apesar do sinal de alteração em uma pequena porção do analito contido no Óleo de CBD (Figura 31A) e na amostra S12776 (figura 31B) que eluiu em linha reta nas placas de TLC-2D, todas as corridas seguiram a direção da diagonal da placa, refutando-se a hipótese da interferência da sílica. Além disso, os RFs calculados para cada um dos fitocanabinoides pré-complexados obtiveram um ganho de resolução se comparados com os achados literários de POOLE, C. F. et al., 2011.

De maneira análoga, todas as amostras eluíram normalmente nas 4 outras placas de HPTLC e apesar dos arrastes e borrões visualizados na placa onde foi corrido o Óleo de CBD (Figura 32A), possivelmente devido à natureza oleosa, as amostras não aparentaram sofrer degradação ou oxidação pela fase estacionária.

6.6. Ensaios de validação dos métodos qualitativo e quantitativo

Haja vista a finalidade do presente estudo de trazer melhorias para o método de CCD e tendo sido obtidos bons resultados qualitativos, uma etapa de validação foi conduzida com o objetivo de confirmar a possibilidade de identificação e quantificação de THC e CBN presentes em diversas amostras apreendidas pela PCDF. Para o método qualitativo tomou-se como parâmetro a separação das manchas dos analitos de interesse e a precisão dos fatores de retenção em diferentes amostras. No método quantitativo tomou-se como base as seguintes figuras de mérito: coeficiente de determinação (R^2) das curvas analíticas, sensibilidade, precisão, LOD e LOQ e exatidão.

Apesar dos resultados anteriores terem sido obtidos com o reagente FBBS, nesta etapa optou-se pela utilização do FBBBS (*Fast Blue BB Salt*). Essa mudança ocorreu devido à menor toxicidade desse reagente em relação ao FBBS, sua maior disponibilidade (uma vez que o FBBS foi descontinuado pela Merck), sua estrutura molecular que permite apenas o acoplamento de um único composto canabinoide por vez, o que fornece uma maior especificidade e seletividade à reação colorimétrica. As placas produzidas com esse novo reagente são apresentadas nas Figura 33. Essas placas foram lidas no Matlab® nos canais azul e saturação, sendo registradas as alturas, áreas e fatores de retenção dos picos dos cromatogramas obtidos.

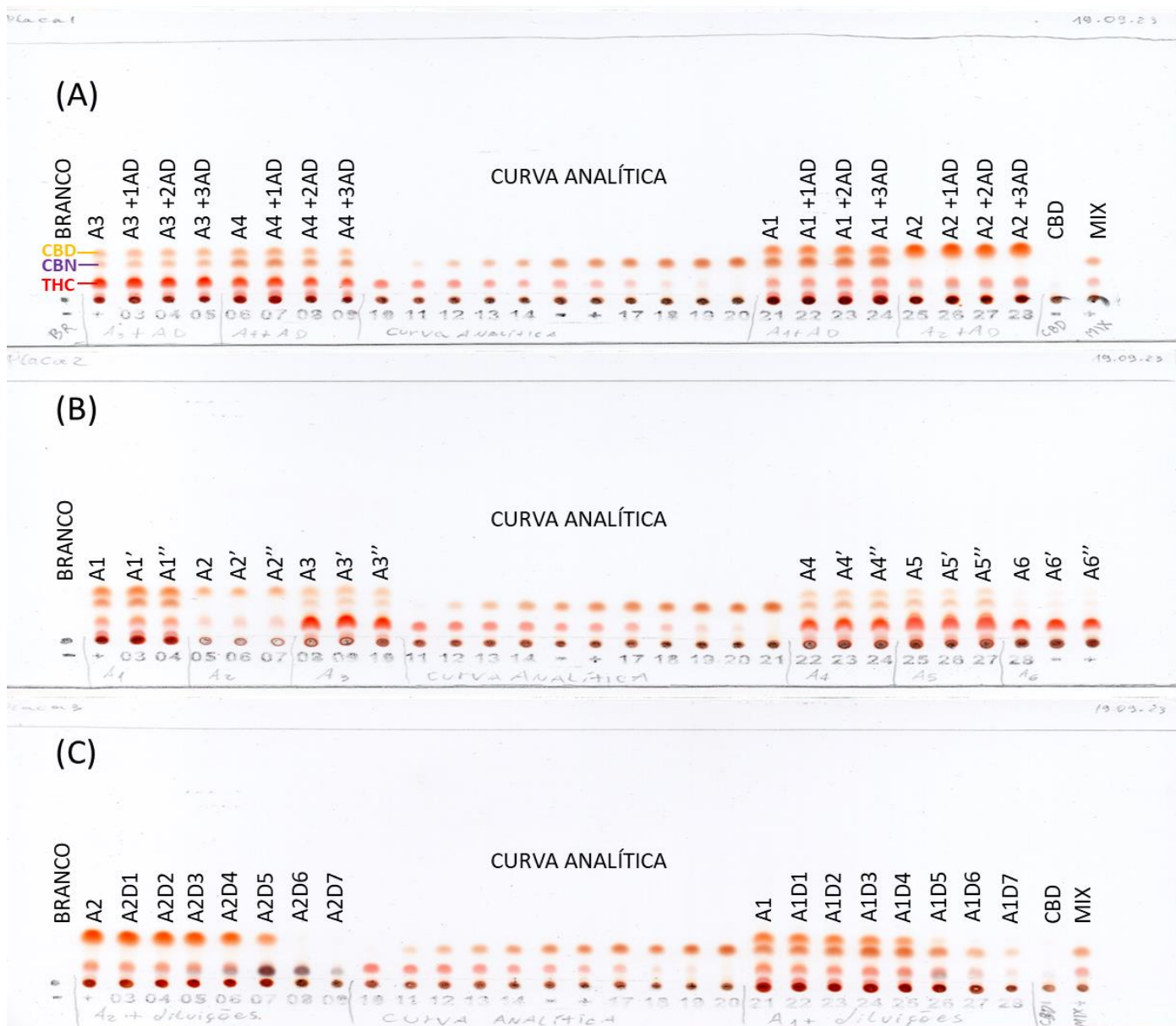


Figura 33. (A) Placa 3 de exatidão, (B) Placa 4 de precisão e (C) Placa 5 de LOD, com A1 a A6 sendo as amostras selecionadas, AD1, AD2 e AD3 sendo as respectivas adições de padrão, A1' a A6' e A1'' a A6'' sendo as respectivas replicatas e A1D1 a A1D7 e A2D1 a A2D7 sendo as respectivas diluições.

6.6.1. Identificação qualitativa dos fitocanabinoides

As figuras 34 e 35 mostram os resultados de quatro placas, duas obtidas pelo método de rotina em uso na PCDF pela separação de um extrato não acoplado com FBBBS (figuras 34A e B) e duas outras obtidas pela metodologia proposta pelo presente estudo, o qual prevê a separação dos compostos presentes na fase orgânica do resultado do teste colorimétrico, o qual contém os fitocanabinóides acoplados (Figuras 35A e B).

As quatro placas contêm as mesmas amostras e na mesma ordem de aplicação, ficando nítido que a reação de acoplamento ao FBBBS, quando realizada antes das aplicações das amostras nas placas de CCD, produz um ganho significativo de nitidez e resolução em relação à realização do acoplamento ao se borrifarem o revelador sobre a placa após a eluição. Esse resultado possibilita uma melhor caracterização e identificação das substâncias presentes nas amostras. Percebe-se também a ocorrência de uma inversão na ordem em que os fitocanabinoides aparecem ao se usar o sistema TJ para eluição das placas em detrimento do sistema TI. Este fenômeno ocorre devido à diferença de afinidade existente entre as fases móveis e os analitos presentes nas amostras, que faz com que THC e o CBD invertam seus respectivos RFs.

Ademais, devido ao método proposto fazer proveito dos resultados da análise de triagem realizado na PCDF, obtém-se um menor gasto com reagentes se comparado com o método de rotina de CCD na PCDF sendo, portanto, mais econômica e, por conseguinte, apresentando maior praticidade de execução, além do ganho de tempo.

O emprego do FBBBS em detrimento do FBBS e as mudanças nas proporções de amostras vegetais e sais azo adicionados aos microtubos para a realização da reação de acoplamento com os fitocanabinoides propiciou também uma minimização do efeito de arraste, presente nos resultados do método atualmente empregado na rotina da PCDF, o que facilitou as leituras e interpretação das bandas pelo Matlab®.

Na Figura 35A, percebe-se uma inclinação nas primeiras 6 corridas da placa de CCD. Contudo, isso se deveu à forma em que foi inserida a placa no interior da cuba de vidro, que possuía calhas verticais. Durante a realização do experimento a superfície da lateral esquerda da placa encostou em uma das calhas no momento em que ocorria a eluição das substâncias com a fase móvel, gerando ao final da corrida um “falso efeito sorriso”. Devido a esse efeito os fatores de retenção obtidos para a placa da figura 35A não foram comparáveis aos obtidos nas placas da figura 33, apresentados na tabela 8.

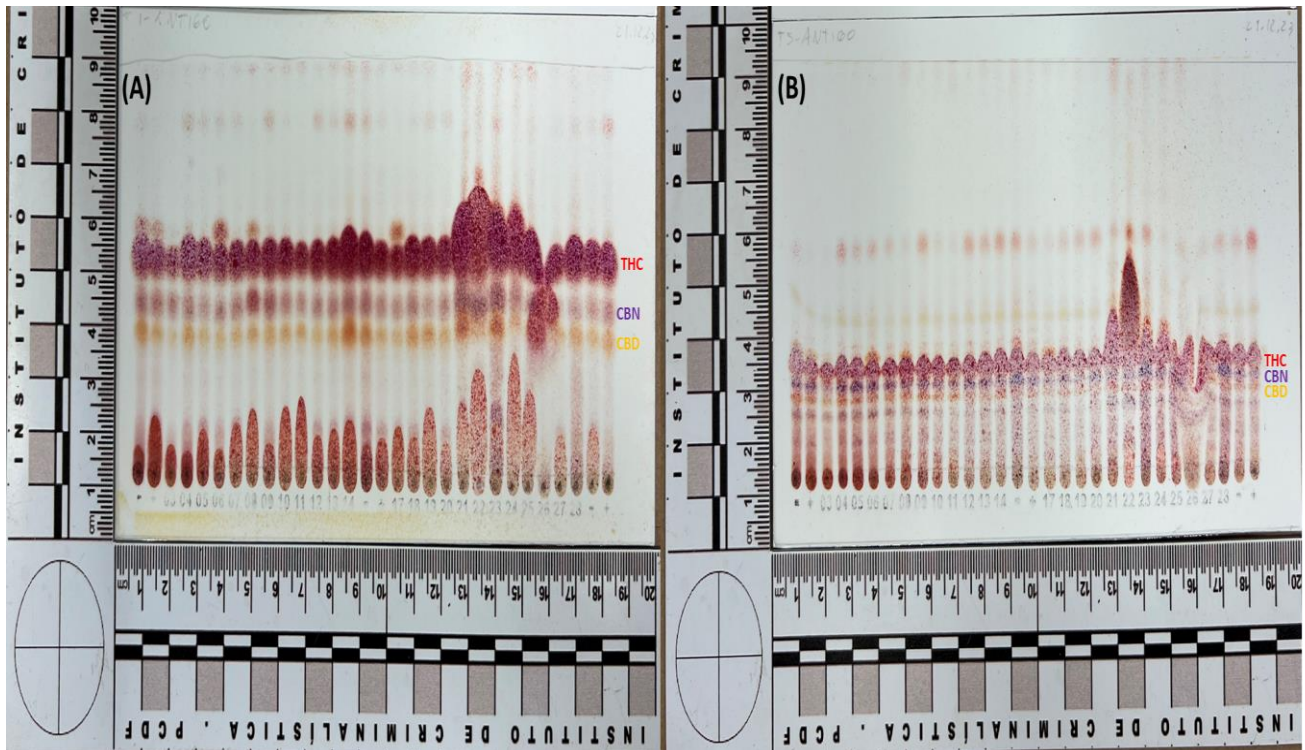


Figura 34. Placas de CCD obtidas pelo método de rotina em uso na PCDF pelo sistema TI (A) e TJ (B).

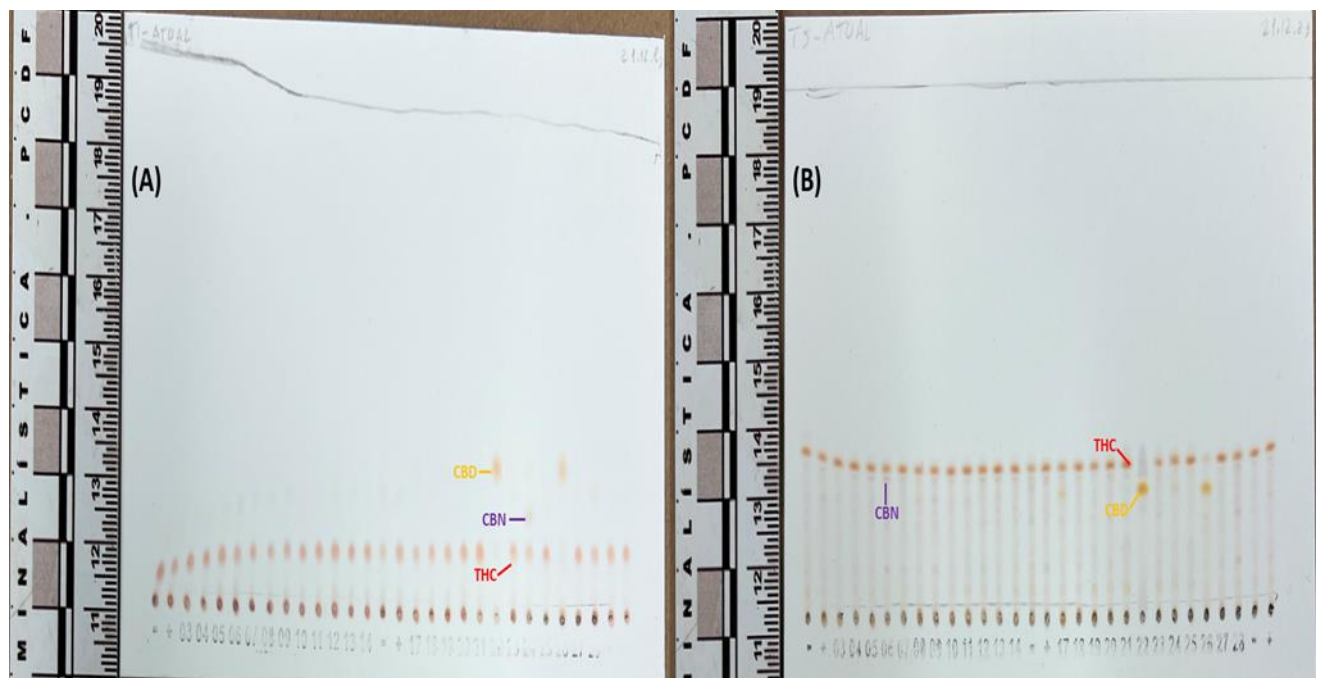


Figura 35. Placas de CCD obtidas pela metodologia proposta pelo presente estudo pelo sistema TI (placa 1) (A) e TJ (placa 2) (B).

Os cromatogramas associados às corridas da placa apresentada na Figura 33A-C são apresentados abaixo na Figura 36. Pode-se observar uma boa separação e intensidade de sinal dos padrões de THC e CBN para os canais azul e saturação, além de uma linha de base comportada e reduzido efeito de deslocamento horizontal dos picos, estando em concordância com os achados na etapa de análise qualitativa do presente estudo.

Conforme demonstram os dados da Tabela 8, há uma concordância entre os RFs dos padrões de THC e CBN para as 3 placas analisadas (Figura 33), com coeficientes de variação menores que 10%, o que aponta para uma boa precisão e reprodutibilidade do método. Foi observado que os RFs praticamente coincidem com os dos padrões analíticos, reforçando que o método proposto possui uma boa repetibilidade, facilitando a identificação dos analitos em amostras. Assim, os resultados da Figura 36 e da Tabela 8 demonstram o melhor potencial do método proposto para a identificação dos analitos em rotina.

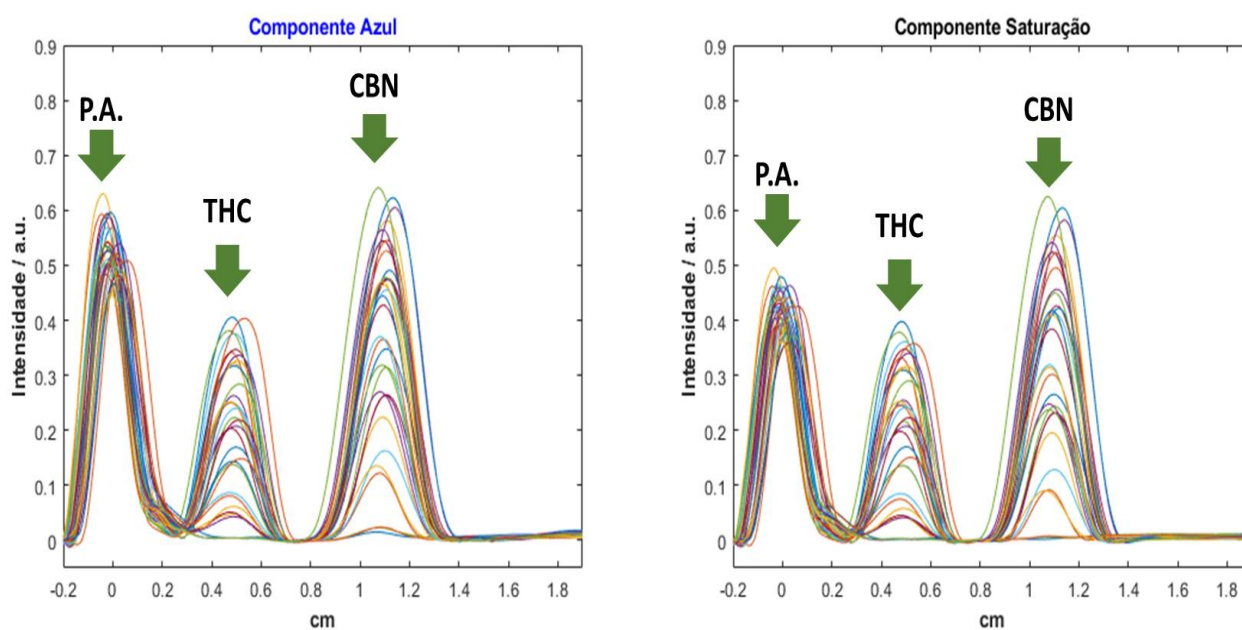


Figura 36. Cromatogramas dos padrões de THC e CBN das curvas analíticas das placas 3, 4 e 5 nos canais azul e saturação, onde (P.A.) é o ponto de aplicação.

Tabela 8. Resultados dos RFs** (%) dos padrões analíticos (**P**) e das amostras (**A**) estudadas nas placas 3, 4 e 5 de CCD apresentadas na figura 33 com eluições pelo sistema TI a partir dos cálculos de desvio-padrão simples, média amostral e coeficiente de variação.

PLACAS	RF (%) THC		RF (%) CBD		RF (%) CBN	
	P	A	P	A	P	A
Placa 3	5,42 ± 0,20 (3,66%)	5,53 ± 0,16 (2,83%)	*	16,23 ± 0,49 (3,02%)	12,31 ± 0,18 (1,49%)	12,52 ± 0,28 (2,25%)
Placa 4	5,32 ± 0,11 (2,05%)	6,43 ± 0,21 (3,20%)	*	16,44 ± 0,23 (1,40%)	12,26 ± 0,01 (0,09%)	12,26 ± 0,09 (0,71%)
Placa 5	5,66 ± 0,12 (2,21%)	5,52 ± 0,41 (7,38%)	*	16,44 ± 0,30 (1,83%)	12,34 ± 0,10 (0,01%)	12,20 ± 0,26 (2,12%)

*Em razão da degradação do padrão de CBD, o *software* não pôde realizar a leitura das bandas. **Rf=(distância percorrida pelo pico)/(distância percorrida pelo solvente)*100

6.6.2. Avaliação das curvas analíticas

Após a exclusão de todos os outliers, as replicatas da curva analítica feitas nas placas 3, 4 e 5 não apresentaram diferenças significativas quanto às suas inclinações de suas curvas analíticas tanto para a altura dos picos do THC nos canais azul (0,93; 0,95 e 0,95) e saturação (1,03; 1,01 e 0,97), quanto para suas áreas no canal azul (2474; 3260; 3561,3) e saturação (2810,3; 3388,3 e 3561,3). O mesmo comportamento se deu para o CBN quanto às suas alturas nos canais azul (1,09; 1,02 e 1,01) e saturação (1,11; 1,01 e 1,11) e quanto às suas áreas nos canais azul (5655,4; 5033 e 4547,6) e saturação (5530,5; 4922,7 e 4784,8). Isto possibilitou que essas regressões fossem utilizadas para a construção de uma única curva analítica conforme apresentado nas figuras 37 e 38.

A regressão demonstrou uma dispersão visivelmente maior das replicatas entre si e coeficientes de determinação um pouco menores para as áreas calculadas dos picos tanto no canal azul como no de saturação, se comparados com os resultados visualizados nas curvas da placa feita em diluição da figura 23. Essa maior dispersão pode ser atribuída ao fato das regressões das figuras 37 e 38 terem sido obtidas por meio de três replicatas autênticas em três placas distintas, o que configura um cenário comum na rotina laboratorial, ao se levar em consideração a alta demanda de apreensões que chegam aos laboratórios, aliada às incertezas obtidas pela aplicação manual das amostras.

Apesar disso, uma nova atualização no *software* possibilitou que as alturas dos picos pudessem ser utilizadas para fins comparativos quanto ao R^2 e a dispersão da regressão. Os R^2 obtidos dos resultados das alturas dos picos para o canal azul da figura 37 para o THC ($R^2=0,966$) mostrou-se tão bom e sensível quanto o da figura 25 ($R^2=0,9665$). Por outro lado, CBN ainda se apresentou um R^2 levemente inferior para ambos os canais. Com isso, foi feita uma comparação dos erros padrões obtidos para ambos os canais (azul e saturação) e quanto à altura e a área dos picos (Tabelas 9 e 10).

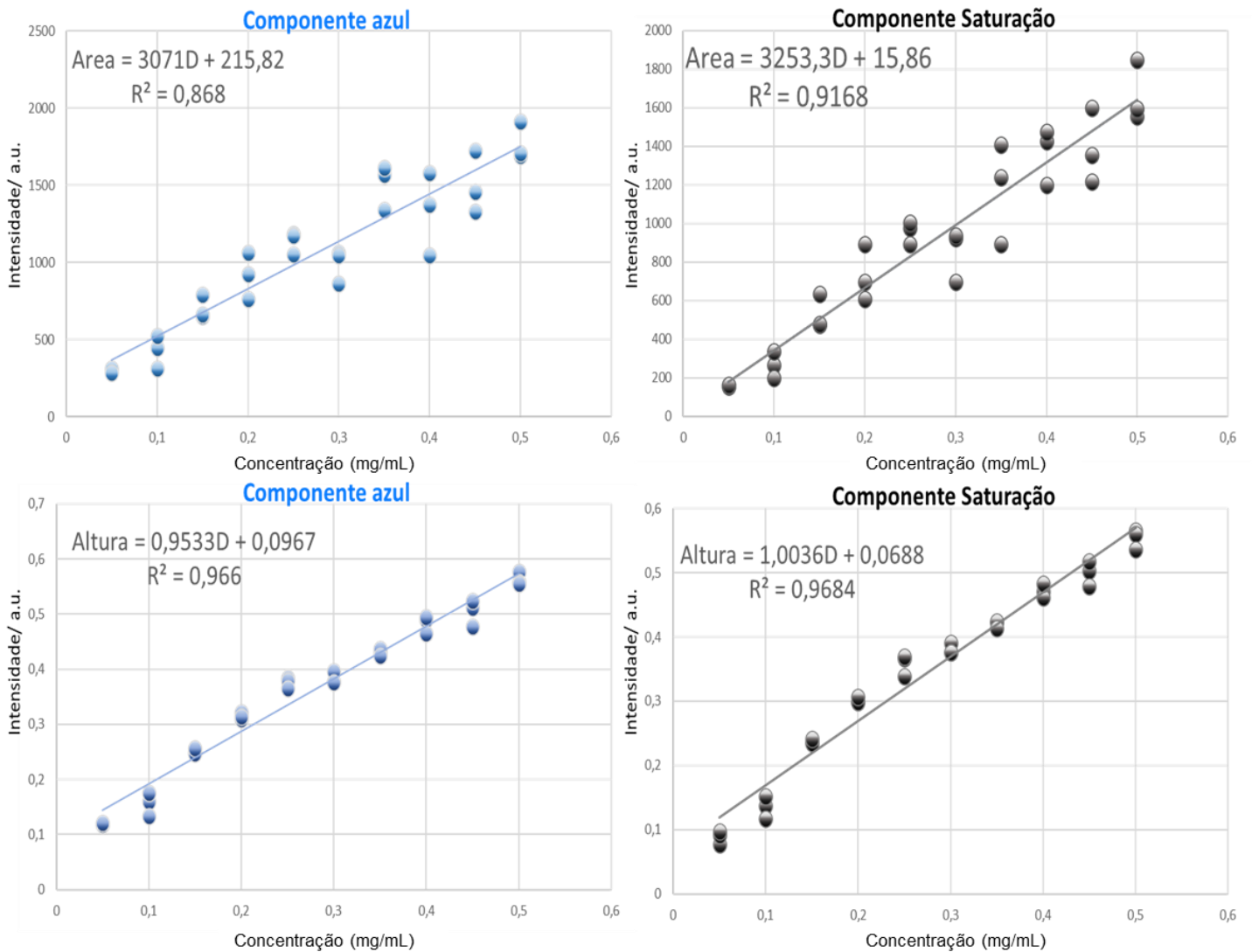


Figura 37. Estudo comparativo entre os canais azul e saturação, utilizando os resultados das áreas e das alturas dos picos encontrados quanto à sua significância e sensibilidade na construção da curva analítica do THC.

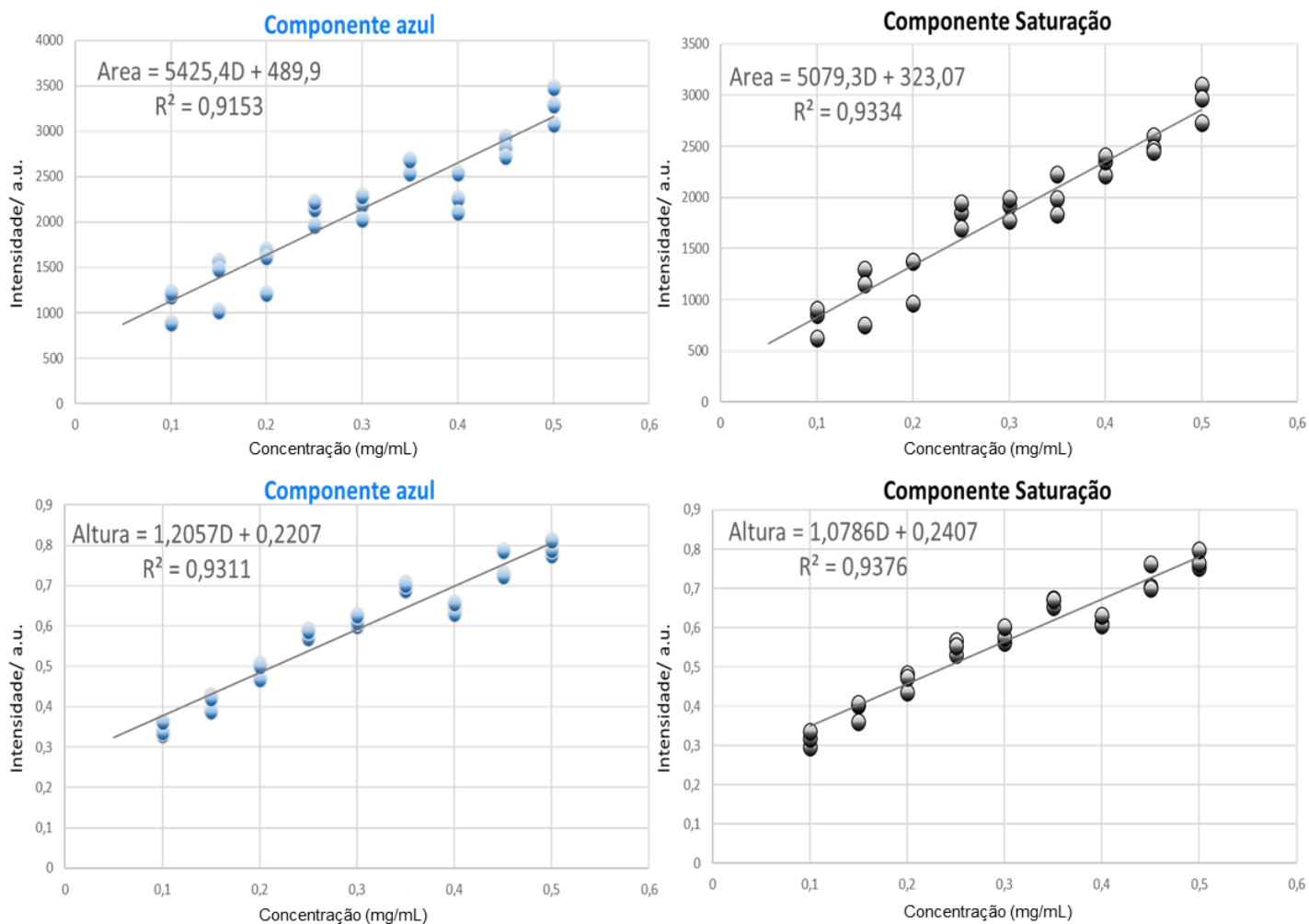


Figura 38. Gráficos de regressão comparativos entre os canais azul e saturação, utilizando os resultados das áreas e das alturas dos picos encontrados quanto à sua significância e sensibilidade na construção da curva analítica do CBN.

Tabela 9. Avaliação das curvas analíticas do THC e do CBN utilizando as áreas (A) dos picos como base.

Analito	Canal	Equação	R ²	Erro padrão (mg/L)*
THC	B	A=3071[THC]+215,82	0,87	0,056
THC	S	A=3253,3[THC]+15,86	0,92	0,045
CBN	B	A=5425,4[CBN]+489,9	0,92	0,045
CBN	S	A=5079,3[CBN]+323,07	0,93	0,036

* Erro padrão da regressão em mg/L.

Tabela 10. Avaliação das curvas analíticas do THC e do CBN utilizando as alturas (H) dos picos como base.

Analito	Canal	Equação	R ²	Erro padrão (mg/mL)*
THC	B	H=0,9533[THC]+0,0967	0,97	0,027
THC	S	H=1,0036[THC]+0,9684	0,97	0,026
CBN	B	H=1,2057[CBN]+0,2207	0,93	0,041
CBN	S	H=1,0786[CBN]+0,2407	0,94	0,045

* Erro padrão da regressão em mg/L.

A altura dos picos em ambos os canais mostrou ser a melhor opção para se calcular os percentuais e as quantidades absolutas de THC e CBN presentes nas amostras, com um erro médio em torno de 0,026 mg/L para as regressões, com coeficientes de determinação (R²) acima de 0,9, o que denota que a regressão é capaz de fornecer uma estimativa de concentração dentro de uma margem de erro aceitável para a PCDF.

6.6.3. Precisão e ganhos de resolução

Os cromatogramas obtidos pela análise da placa 4 (Figura 33B) nas duas componentes de cor (azul e saturação), conforme ilustram os cromatogramas da Figura 39, demonstram uma boa definição, intensidade de sinal e separação do THC em relação aos demais analitos. Contudo, apesar da clara distinção visual das manchas de CBN e CBD nas amostras da placa, o cálculo dos cromatogramas revela que os picos não estão totalmente separados. Pode-se observar claramente a existência de dois máximos, mas o sinal não chega a voltar a linha base, indicando que CBN e CBD têm seus sinais sobrepostos quando a CCD é conduzida no sistema TI (resultado já relatado na literatura no método clássico utilizado em rotina pela PCDF). Esse resultado infelizmente inviabilizou a quantificação de CBN pelo método proposto utilizando tanto as áreas quanto as alturas dos picos em ambos os canais (azul e saturação).

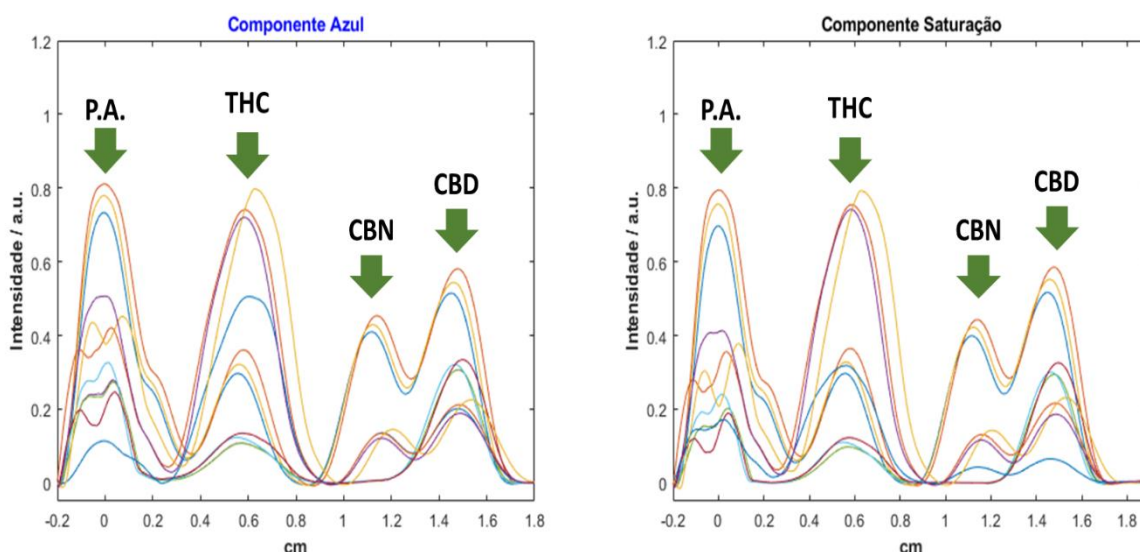


Figura 39. Cromatogramas das amostras de A1 a A6 e suas replicatas (placa 4) nos canais azul e saturação, onde (P.A.) é o ponto de aplicação.

O efeito de arraste visualizado anteriormente na Figura 26 foi minimizado utilizando o FBBBS em vez do FBBS. Em seguida, a precisão foi avaliada pela análise das amostras A1 a A6 sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única corrida analítica, conforme o estabelecido pela RDC 166/2017. Constatou-se que os RSDs obtidos tanto com área como altura dos picos apresentaram boa repetibilidade entre si tanto para o THC quanto para o CBN (Tabelas 11 e 12). Além disso, para o CBN, apesar da sobreposição das bandas, foram obtidos desvios abaixo de 13%, com exceção da amostra A6, apresentou maior desvio relativo para leitura e avaliação no programa.

Tabela 11. Desvios padrões das triplicatas do THC e CBN de cada uma das amostras de A1 a A6, tendo como base de cálculo as áreas dos picos.

Amostra	RSD (THC)	RSD (CBN)
A1	10,91	8,36
A2	10,67	*
A3	2,71	10,29
A4	5,77	4,70
A5	9,63	12,76
A6	7,61	29,53

* Não detectado pelo *software*

Tabela 12. Desvios padrões das triplicatas do THC e do CBN de cada uma das amostras de A1 a A6, tendo como base de cálculo as alturas dos picos.

Amostra	RSD (THC)	RSD (CBN)
A1	10,98	4,23
A2	8,13	*
A3	5,46	12,27
A4	8,66	5,01
A5	5,35	12,65
A6	10,97	34,98

* Não detectado pelo *software*

6.6.4. LOD e LOQ

De maneira análoga aos cromatogramas da Figura 37, as amostras A1 e A2, bem como suas 7 diluições aplicadas na placa 5 (Figura 33C) demonstraram comportamento similar na formação dos picos reforçando a repetibilidade e a reprodutibilidade, conforme ilustram os cromatogramas da Figura 40. A sobreposição dos sinais de CBN e CBD também ocorre como esperado.

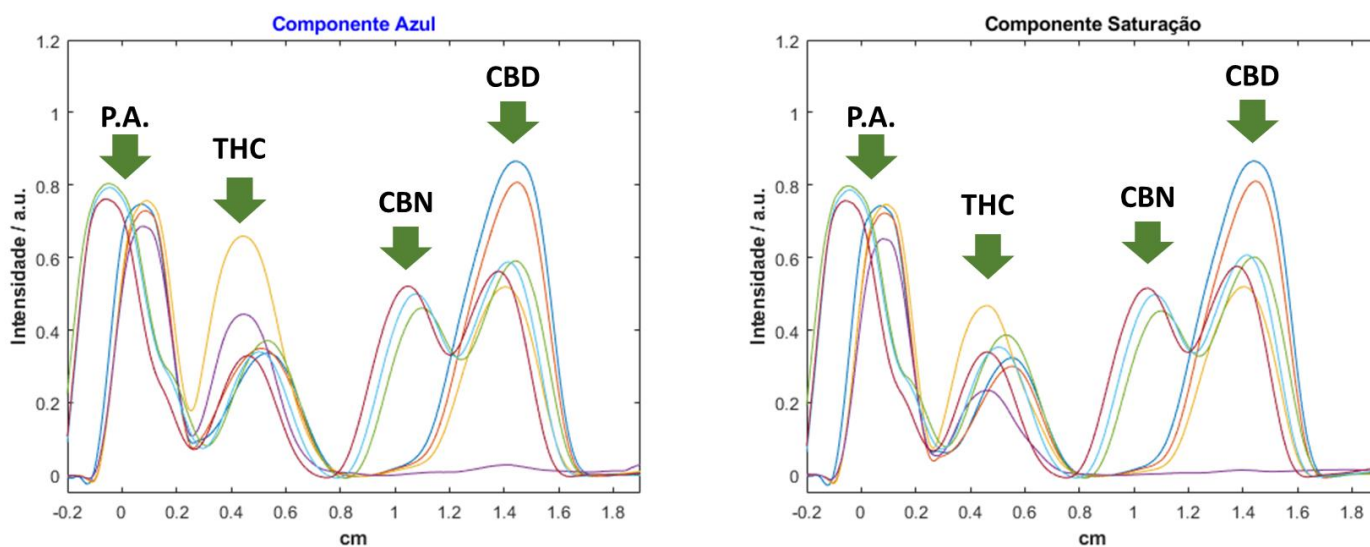


Figura 40. Cromatogramas das amostras A1 e A2 e suas 7 diluições (placa 5) nos canais azul e saturação, onde (P.A.) é o ponto de aplicação.

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram determinados de acordo com os artigos 53 e 58 da RDC nº166/17 da ANVISA, respectivamente. Os parâmetros de intersecção e inclinação das 3 curvas de calibração construídas foram tomados como base e ficou estabelecido que o LOD seria determinado pela multiplicação do desvio-padrão (σ) do intercepto por 3,3, seguido da divisão pela inclinação da curva de calibração, enquanto o LOQ seriam determinado pelo produto da multiplicação do desvio-padrão (σ) do intercepto por 10, seguido da pela inclinação. Os valores etimados para LOD e LOQ foram 0,04 e 0,11 mg/mL, respectivamente.

Dessa forma, tomando como base essas estimativas de LOD e LOQ, foram realizadas diluições seriadas de duas amostras quantificadas para validar esses limites. As concentrações estimadas para os analitos nessas amostras são apresentada na Tabela 13. Conforme as diluições realizadas, as concentrações esperadas para as 7 diluições da A1 seriam, da mais concentrada à menos concentrada de: 0,49; 0,36; 0,24; 0,18; 0,12; 0,06; 0,03 e 0,02. Já para as 7 diluições da amostra A2, as concentrações esperadas seriam: 0,44; 0,33; 0,22; 0,17; 0,11; 0,06; 0,03 e 0,01. Contudo, conforme mostra a tabela 13, as concentrações encontradas com base nas alturas dos picos e aplicação das curvas analíticas não corroboraram a expectativa da queda da concentração em função do fator de diluição. Na placa 5, para THC, um dos principais motivos se deveu à formação de uma banda roxa intensa e anômala na mesma posição da banda desse analito resultando em uma sobreposição de sinais. Contudo, para CBN também não se observou um abaixamento das concentrações conforme a diluição preparada. Esse comportamento leva a crer que ainda existe algum efeito no acoplamento dos analitos e do FBBBS que ainda não foi elucidado. Apesar disso, resultados visuais obtidos nessa placa sugerem que as concentrações de THC e CBN nas amostras são superiores aos LOD e LOQ estimados, não sendo essa uma das limitações do método tanto para fins de identificação e quantificação.

Tabela 13. Concentrações esperadas pela diluição realizada e efetivamente encontradas pelas curvas analíticas nas amostras A1 e A2 e em cada uma de suas 7 diluições.

Amostras	[] esperada (mg/mL)	[] encontrada (mg/mL)
A1	0,49	0,49
	0,36	0,42
	0,24	0,41
	0,18	0,43
	0,12	0,44
	0,06	0,36
	0,03	0,18
	0,02	0,01
A2	0,44	0,44
	0,33	0,42
	0,22	0,40
	0,17	0,42
	0,11	0,42
	0,06	0,78
	0,03	0,51
	0,01	0,14

Considerando que o sistema TJ fornece resultados complementares ao TI, além de serem formadas bandas estreitas e melhor separadas, formulou-se a hipótese de que a corrida pelo TJ demonstraria um comportamento distinto do TI com relação à formação das bandas roxas e, com isso, foi feito um novo ensaio em uma outra placa de CCD, onde foram aplicadas 14 amostras contendo THC e CBN. Ao final da análise, constatou-se que as bandas roxas não foram observadas na mesma posição do THC. Portanto, não se observou a mesma sobreposição com a banda do THC, mas outras bandas foram observadas na mesma posição do sinal do CBN (figura 41). Além disso, percebeu-se que o “efeito sorriso” presente não foi suficiente para prejudicar a análise. Contudo, a quantificação e estimativas de LOD e LOQ não puderam ser realizadas pela impossibilidade de repetir as curvas analíticas pelo método TJ.

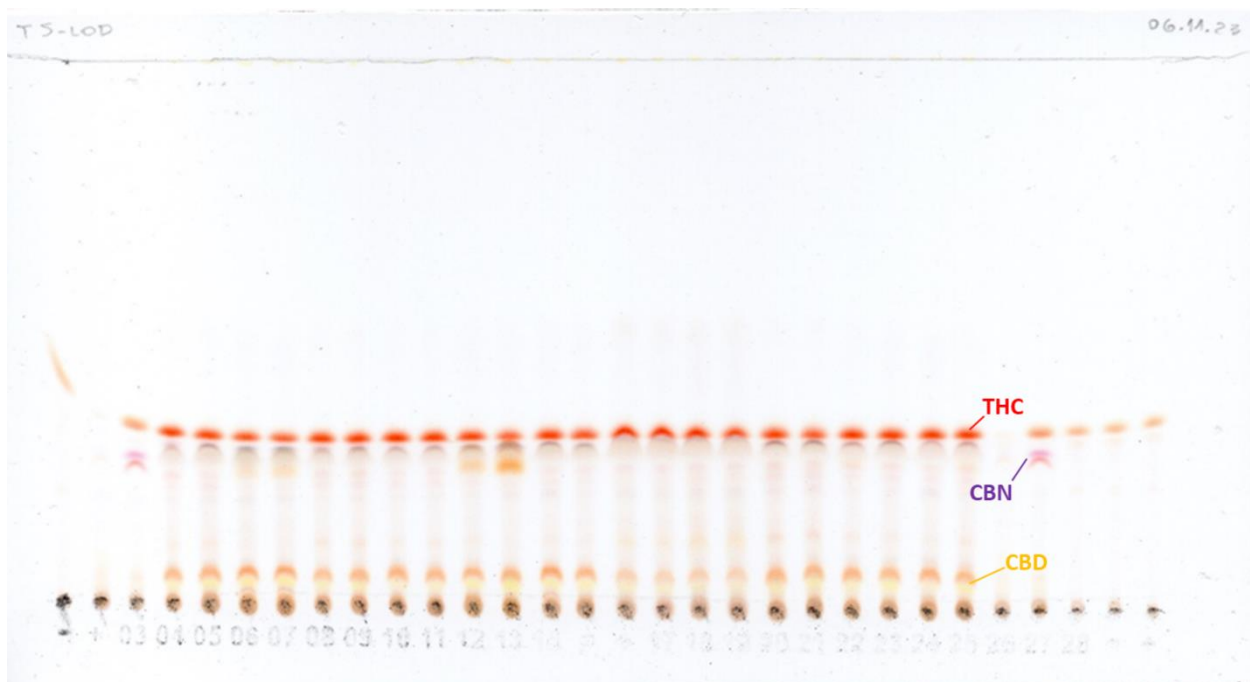


Figura 41. Novo ensaio feito na placa 6 utilizando o sistema TJ, onde se constata a ausência de sobreposições de bandas e uma minimização significativa do “efeito sorriso”.

6.6.5. Exatidão

Na placa 3 (figura 33A), onde foram feitas adições de 20%, 40% e 60%, respectivamente, dos padrões analíticos de THC e CBN nos microtubos contendo as amostras de A1 a A4, pode ser observado novamente uma boa separação, intensidade de sinal e definição dos picos de THC obtidos nas duas componentes de cor (azul e saturação), além da sobreposição dos sinais de CBN e CBD, conforme ilustram os cromatogramas da Figura 42. Além disso, percebe-se que todos os cromatogramas das 3 placas analisadas apresentam boa concordância entre si, com reduzido deslocamento horizontal dos picos obtidos.

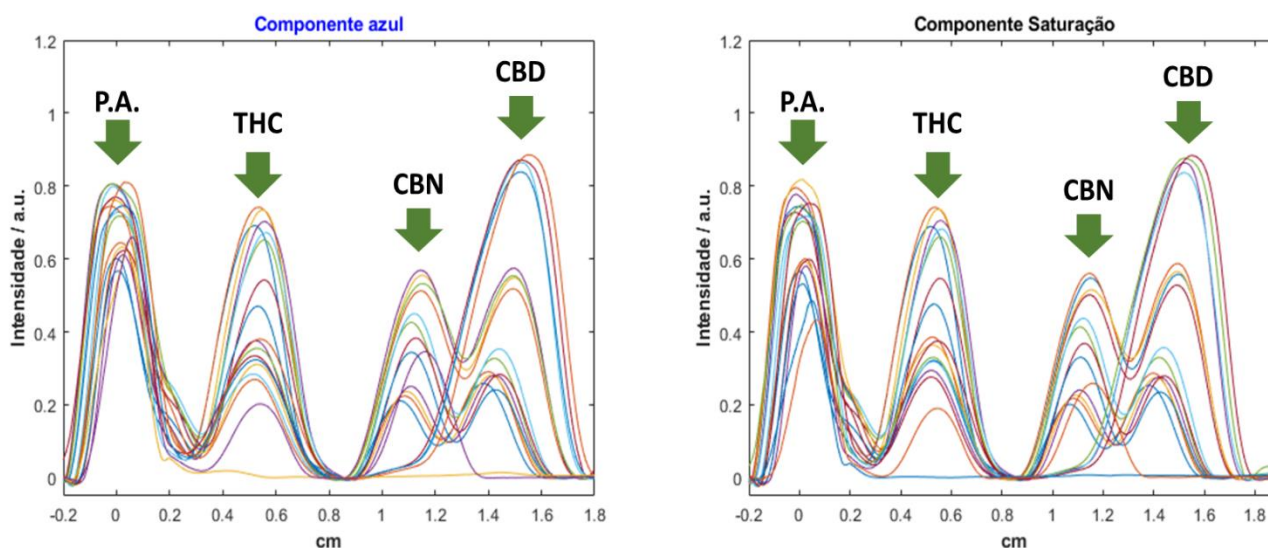


Figura 42. Cromatogramas das amostras de A1 e A4 e suas respectivas adições de padrão analítico (placa 3) nos canais azul e saturação, onde (P.A.) é o ponto de aplicação.

Conforme consta nos artigos 45 e 46 da RDC nº 166/17 da ANVISA, os ensaios de exatidão foram realizados adicionando uma quantidade conhecida de solução padrão aos microtubos contendo as amostras de A1 a A4 e os 9,0 mg de FBBBS. Sendo assim, a exatidão foi determinada pelo percentual de recuperação dos padrões analíticos adicionados às amostras obtido da subtração da concentração estimada pela curva analítica após a adição dos padrões pela concentração da amostra antes da adição, seguido da divisão pela concentração adicionada do analito correspondente.

Para o cálculo dos valores de recuperação foram testados dois tempos distintos de extração: uma em 24 h e outra em 30 minutos, que serão discutidos em detalhes nas próximas seções. Os ensaios demonstraram não haver uma distinção significativa entre os rendimentos dos dois tempos de extrações, não havendo, portanto, diferenças quanto à eficiência no processo de extração.

6.6.5.1. Ensaio de recuperação com extrato 24 h

Apesar da boa eficiência no processo de extração, as amostras e suas respectivas adições não demonstraram uma boa concordância nos ensaios de recuperação, conforme ilustrado pela Tabela 14. Considerando que o CHCl_3 é um solvente bastante volátil e o extrato foi preparado em 24 h, levantou-se a hipótese de que o solvente extrator teria evaporado nos microtubos interferindo, dessa forma, nos resultados dos ensaios de recuperação.

Tabela 14. Concentrações encontradas ([]mg/mL) das amostras de A1 a A4 e suas adições obtidas a partir das diferenças entre os três níveis distintos de adição e a amostra original, divididas pelo respectivo nível de adição (0,1; 0,2 ou 0,3) e posteriormente multiplicou-se o resultado por 100.

Amostras	Adições (mg/mL)	[] mg/mL	Diferenças	RECUPERAÇÃO (%)
A3	0	0,09	0	0
A3+1AD	0,1	0,10	0,01	7,89
A3+2AD	0,2	0,11	0,02	9,10
A3+3AD	0,3	0,13	0,04	12,06
A4	0	0,32	0	0
A4+1AD	0,1	0,35	0,04	38,17
A4+2AD	0,2	0,30	0,02	-10,16
A4+3AD	0,3	0,29	0,03	-10,21
A1	0	0,37	0	0
A1+1AD	0,1	0,43	0,06	62,08
A1+2AD	0,2	0,48	0,11	53,83
A1+3AD	0,3	0,47	0,1	33,93
A2	0	0,35	0	0
A2+1AD	0,1	0,42	0,07	73,23
A2+2AD	0,2	0,39	0,05	23,77
A2+3AD	0,3	0,46	0,11	38,17

6.6.5.2. Ensaio de recuperação com extrato de 30 min

Com isso, visando minimizar os efeitos da possível evaporação do solvente extrator, foi preparada uma nova placa no sistema TI (figura 43), com um tempo de extração de 30 minutos. Neste novo ensaio foram utilizadas 14 amostras distintas cada qual com uma única adição de padrão de THC e feita com a metade das massas de amostras pesadas e do volume de CHCl_3 adicionado, totalizando 28 microtubos (figura 33A). O maior número de amostras foi empregado para evitar que o comportamento anômalo de uma amostra individual prejudicasse a análise do comportamento geral. Ao final da análise esperava-se que os ensaios de recuperação tivessem uma melhor concordância. Contudo, conforme ilustra a tabela 15, os resultados obtidos ainda assim não obtiveram um bom grau de concordância, indicando que algo que provavelmente existe algum efeito desconhecido na reação de acoplamento que estaria interferindo nos resultados.

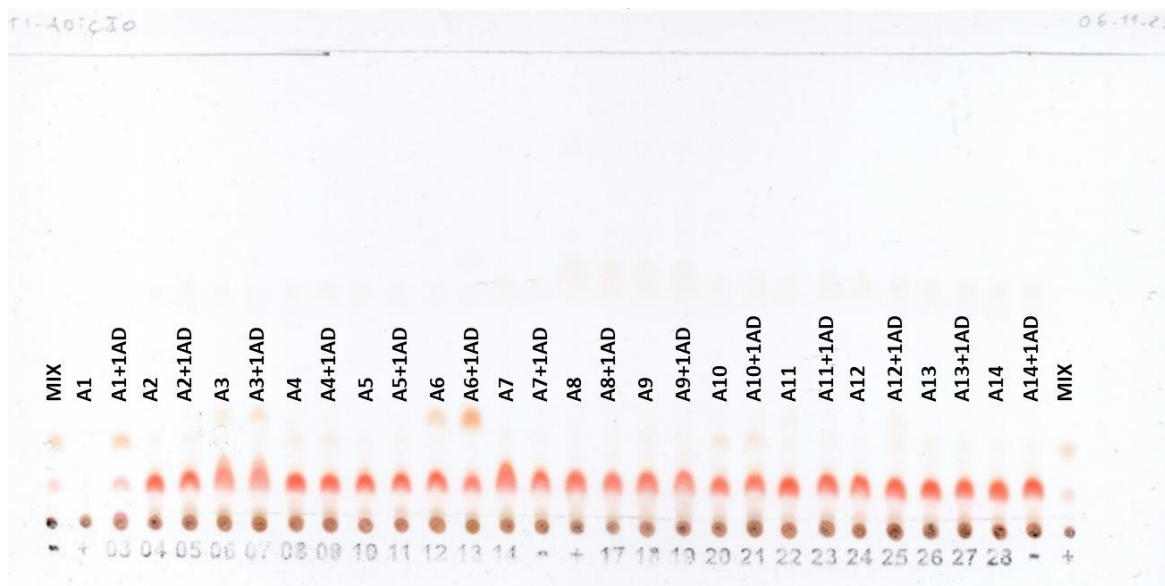


Figura 43. Placa 7 feita no TI com extração de 30 minutos, sendo A1 a A14 as amostras e 1AD suas respectivas adições de padrão.

Tabela 15. Resultados dos ensaios de recuperação das 14 amostras e suas respectivas adições.

Amostras	[THC] mg/mL	RECUPERAÇÃO
A1	0,04	0
A1+1AD	0	0
A2	0,09	60,62
A2+1AD	0,59	0
A3	0,49	-62,69
A3+1AD	0,39	0
A4	0,36	-20,44
A4+1AD	0,60	0
A5	0,58	-16,99
A5+1AD	0,63	0
A6	0,58	-29,740
A6+1AD	0,62	0
A7	0,44	-119,82
A7+1AD	0,52	0
A8	0,44	-54,21
A8+1AD	0,52	0
A9	0,44	-53,04
A9+1AD	0,49	0
A10	0,45	-26,40
A10+1AD	0,49	0
A11	0,53	30,14
A11+1AD	0,62	0
A12	0,60	-7,91
A12+1AD	0,57	0
A13	0,57	0
A13+1AD	0,61	0
A14	0,62	3,48
A14+1AD	0,63	0

7. CONCLUSÕES

A reação de acoplamento dos fitocanabinoides com os sais azo (FBBS e FBBBS), quando feita antes da aplicação das amostras e eluição nas placas de CCD, proporciona ganhos de resolução e sensibilidade capazes de proporcionar uma melhor separação as bandas de THC, CBD e CBN e deixá-las com melhor definição, facilitando a identificação visual das manchas e dos picos de interesse nos cromatogramas e tornando-os passíveis de interpretação semiautomatizada. Contudo, CBD e CBN ainda apresentaram sobreposição de sinais no sistema TI, o que impediu a quantificação desses analitos.

O método se mostrou seletivo, sensível e com boa precisão. Além disso, as maiores variâncias que ocorriam nos pontos mais concentrados devido ao efeito de arraste dos compostos, bem como o efeito sorriso acentuado no sistema TJ foram minimizados com o uso do FBBBS e não se esperando o tempo de estabilização da fase móvel no interior da cuba de vidro, respectivamente.

O programa foi capaz de identificar os picos de interesse e traduzir os sinais das bandas em cromatogramas culminando em uma separação mais eficiente e objetiva dos padrões de fitocanabinoides de interesse. As regressões preliminares obtidas por diluições seriadas em matriz se mostraram bem ajustadas, indicando que a incerteza da aplicação manual das amostras nas placas não é um limitante. Esses resultados foram confirmados posteriormente nas curvas analíticas preparadas com padrões dos analitos THC e CBN, onde os erros padrões das regressões ficaram em torno de 0,03 e 0,04 mg/L respectivamente (para um intervalo de concentração de 0,05 a 0,5 mg/L).

Os resultados obtidos em padrões mostra que as diferenças de intensidade e coloração das bandas dependem da quantidade e do tipo dos fitocanabinoides presentes. Contudo, os resultados das diluições realizadas nos ensaios de limite de detecção e ensaios de recuperação revelaram que algum efeito na reação de acoplamento ainda precisa ser elucidado. Comportamentos opostos visualizados, onde nos ensaios de LOD esperava-se que a intensidade das bandas reduzisse conforme as diluições e nos ensaios de recuperação esperava-se que as intensidades aumentassem conforme os padrões analíticos eram adicionados proporcionalmente aos microtubos. Além disso, foi observada a formação de uma mancha roxa anômala no sistema TI com RF muito próximo ao THC.

Uma hipótese para o aparecimento dessa banda é a possível degradação dos analitos ou presença de suas formas ácidas. O que deverá ser investigado em trabalhos futuros. Infelizmente esses resultados inviabilizaram a quantificação dos fitocanabinóides nas amostras.

Os ensaios com LC/MS revelaram que as razões de acoplamento dos fitocanabinóides com o FBBS majoritariamente ocorre na razão de 1:1 para o THC, o CBD e o CBN e na razão de 2:1 para o CBC. Esse é um resultado que discorda dos achados anteriores, que indicavam um acoplamento preferencial de 2:1.

Amostras forenses reais são desafiadoras de serem fielmente analisadas em CCD devido a muitas variáveis envolvidas, tais como o fator antropogênico, as dispersões das bandas, além dos possíveis efeitos ocorrendo na reação de acoplamento. Dessa forma, ajustes no programa e na execução da nova metodologia no que diz respeito às proporções de sal azo e das amostras ainda são necessários antes que o método proposto possa ser aplicado em rotina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATTIMARAD, M.; AHMED, K. K. M.; ALDHUBAIB, B. E.; HARSHA, S. High-performance thin layer chromatography: A powerful analytical technique in pharmaceutical drug discovery. **Pharmaceutical Methods**. Vol. 2, Issue 2, April-June, 2011

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria 344, de 12 de maio de 1998 – Aprova o Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial**. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs/1998/prt0344_12_05_1998_rep.html. Acesso em 22/07/2021.

BRASIL. Ministério da Justiça e Segurança Pública. Departamento de Polícia Federal. Estatística de drogas apreendidas – 2020 [**Brazil. Ministry of Justice and Public Security. Federal Police Department. Seized drug statistics – 2020**]. Disponível em: <http://www.pf.gov.br/imprensa/estatistica/drogas>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2023.

BERTONI, B. W.; TELLES; M. P. C. ; MALOSSO, M. G.; TORRES, S. C. Z.; PEREIRA, J. O. Genetic diversity in natural populations of Jacaranda decurrens Cham. determined using RAPD and AFLP markers, **Genet. Mol. Biol.** 33, 532–538, 2010.

BORDIN, D. C.; MESSIAS, M.; LANARO, R.; CAZENAVE, S. O. S.; COSTA, J. L. Análise forense: Pesquisa de drogas vegetais interferentes de testes colorimétricos para identificação dos canabinoides da maconha (*Cannabis sativa* L.). **Quím. Nova**, Vol. 35, No. 10, 2040-2043, 2010.

BRISTOW, A. W. T. Accurate mass measurement for the determination of elemental formula—a tutorial. **Mass Spectrom. Rev.** 25, 99–111, 2006.

CARVALHO, T.C.; OLIVEIRA, I.F.; TOSE, L.V.; VANINI, G.; KILL, J.B.; NETO, A.; MACHADO, L.F.; LABOISSIERE, J. C.; JÚNIOR, V.L.; VAZ, B.G.; ROMÃO, W. Qualitative analysis of designer drugs by paper spray ionisation mass spectrometry (PSI-MS), **Anal. Methods**. Vol. 8, pg. 614–620, 2016.

CHASIN, A. A. M.; MOREAU, R. L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B. Em Toxicologia Analítica; eds.; **Guanabara Koogan**: Rio de Janeiro, 2008.

CLARK, J. Reações de sais de diazônio. Disponível em: [https://batch.libretexts.org/print/url=https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Organic_Chemistry\)/Phenylamine_and_Diaz_Diaz_Compounds/Reactions_of_Diazonium_Salts.pdf](https://batch.libretexts.org/print/url=https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Supplemental_Modules_(Organic_Chemistry)/Phenylamine_and_Diaz_Diaz_Compounds/Reactions_of_Diazonium_Salts.pdf). Acesso em: 12/04/2024

COSTA, A. F. **Farmacognosia**, 5a ed.; Fundação Calouste Gulbenkion: Lisboa, 2002.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova na Escola**. No 7, Maio, 1998.

ELSOHLY, M.A.; SLADE, D. Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. **Life Sci**, v.78, p.539–548, 2005.

FERREIRA, M. M. C. ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: Calibração Multivariada, um tutorial. **Quím. Nova**, v.22, n.5, p.724-731,1999.

FIELD FORENSICS website. Disponível em: <https://www.fieldforensics.com/products/by-model/spotonid-explosives-narcotics/>. Acesso em 22/07/2021.

GLISH, G. L., VACHET, R.W. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. **Nat. Rev. Drug Discov.** 2, 140–150, 2003.

GODINHO, M. S. da.; PEREIRA, R. O.; RIBEIRO, K. O. de., SCHIMIDT, F.; OLIVEIRA, A. E. de., OLIVEIRA, S. B. de. Classificação de refrigerantes através de análise de imagens e análise de componentes principais (PCA). **Quím. Nova**, Vol. 31 No. 6, 2008.

HARTSEL, J. A., EADES, J., HICKORY, B., & MAKRIYANNIS, A. Cannabis sativa and Hemp. **Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity**. Elsevier Inc., 2016.

HAYAKAWA, T.; HIRAI, M. An assay of ganglioside using fluorescence image analysis on a thin-layer chromatography plate. **Anal. Chem.** No. 75, 6728, Dec.1st, 2003.

KEBARLE, P. A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. **J. Mass Spectrom.** 35, 804–817, 2000.

KRISHNA, R.; PATIL, K.; DIXIT, A.; JOSEPH, J.; PANDEY, A. A novel paper-based microfluidic device and UV-visible spectroscopy coupled method for the field detection and analysis of seized marijuana samples. **Applied Research.** December, 2022.

LIU, Y.; BRETTELL, T. A.; VICTORI, J.; WOOD, M. R.; STARETZ, M. E. High performance thin-layer chromatography (HPTLC) analysis of cannabinoids in cannabis extracts. **Forensic Chemistry**, Volume 19, June 2020.

MANO-SOUSA, B.J.; MAIA, G.A.S.; LIMA, P.L.; CAMPOS, V.A.; NEGRI, G.; CHEQUER, F.M.D.; DUARTE-ALMEIDA, J.M. Color determination method and evaluation of methods for the detection of cannabinoids by thin-layer chromatography (TLC). **J Forensic Sci**, maio, 2021.

MAUNDER, M. J. F. An improved procedure for the field testing of cannabis. **Bull. Narcotics**, v.4, p.19 – 26,1974.

MESSIAS, D. C. B. e M.; LANARO, R.; CAZENAVE, S. O. S.; COSTA, J. L. Análise Forense: Pesquisa de drogas vegetais interferentes de testes colorimétricos para identificação dos canabinoides da maconha (*Cannabis sativa L.*). **Quím. Nova**, Vol. 35, No. 10, 2040-2043, 2012.

MOFFAT, A. C.; OSSELTON, M D.; WIDDOP, B.; WATTS, J. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. 4th Ed., London, **Pharmaceutical Press**, 2011.

MUKHERJEE, P. K. **Quality Control and Evaluation of Herbal Drugs Evaluating Natural Products and Traditional Medicine**. 1st Ed., ch. 11, May 29, 2019.

OLIVEIRA, A. R. C.; COGO, J. R. Aplicação Do Método de Integração Trapezoidal Em Sistemas Elétricos. ART429-07 - CD 262-07 - PÁG.: 7, **GSI - ENGENHARIA E CONSULTORIA LTDA**. EFEI, 1983

OTTO, M.; **Chemometrics**, 1st Ed. Weinheim, Wiley, 1999.

PLS_Toolbox and Solo. EIGENVECTOR REASERCH, Inc., Manson, WA USA 98831; software available at: www.eigenvector.com, 2004.

PRATT, W. K. **Digital Image Processing**, 2nd ed., John Wiley & Sons: New York, 1991.

RAHARJO, T. J.; VERPOORTE, R. Methods for the analysis of cannabinoids in biological materials: a review. **Phytochem Anal**, v.15, p.79–94, 2004.

ROSS, S.A.; ELSOHLY, M.A.; Consituents of Cannabis Sativa L. XXVIII. A review of the natural constituents: 1980–1994. **Zagazig J Pharm Sci**, v.4, p.1–10, 1995.

SANTOS, M. C.; NASCIMENTO, P. A. M.; GUEDES, W. N.; PEREIRA-FILHO, E. R.; FILLETTI, E. R.; PEREIRA, F. M. V. Chemometrics in analytical chemistry – an overview of applications from 2014 to 2018. **Eclética Quím. J.**, v. 44, n. 2, p.11-25, 2019.

SANTOS, N. A. dos. ; SOUZA , L. M.; DOMINGOS, E.; FRANÇA , H. S.; LACERDA Jr. V.; ADILSON B.; VAZ, B. G.; RODRIGUES, R. R. T.; CARVALHO, V. V.; MERLO, B. B.; KUSTER, R. M.; ROMÃO, W. Evaluating the selectivity of colorimetric test (Fast Blue BB salt) for the cannabinoids identification in marijuana street samples by UV–Vis, TLC, ESI(+)FT-ICR MS and ESI(+)MS/MS. **Forensic Chemistry**. Vol. 1, pg. 13–21, 2016.

SAVITZKY, A.; GOLAY, M. J. E. "Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures," **Anal. Chem.** 1964, 36(8), 1627-1639

SHERMA, J.; FRIED, B. **Handbook of Thin-Layer Chromatography**, 3rd Ed., New York, Marcel Dekker, 2003

SHERMA, J.; RABEL, F. Thin layer chromatography in the analysis of cannabis and its components and synthetic cannabinoids. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, 42:19-20, 613-628, 2019.

SIBUG, TORRES, S. M.; PADOLINA, I. D.; CRUZ, P.; GARCIA, F. C.; GARROVILHAS, M. J.; YABILLOA, M. R.; ENRIQUEZ, E. P. **Anal. Methods**, v.11, p.721-732, 2019.

SIMPSON, D.; BRAITHWAITE, R. A.; JARVIE, D. R.; STEWART, M. J.; WALKER, S.; WATSON, I. W.; WIDDOP, B. Screening of Drugs of Abuse (II): Cannabinoids, Lysergic Acid Diethylamide; Buprenorphine, Methadone, Barbiturates, Benzodiazepines, and Other Drugs. **Ann. Clin. Biochem.** 34, 460–510, 1997.

SIRCHIE Catalog No. MZ020, **Technical Information: Thin Layer Chromatography of Marijuana**, 2011. Disponível em: https://www.sirchie.com/media/resourcecenter/item/m/z/mz020_ti02-45eng-rev3e.pdf. Acesso em 22/07/2021.

SOVOVÁ, H., Rate of the Vegetable Oil Extraction with Supercritical CO₂ - Modeling of Extraction Curves. **Chemical Engineering Science**, 49(3), 409-414, 1994.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Quím. Nova**, v.29, n.2, p.338-350, 2006.

THAKUR, G. A.; DUCLOS, R. I.; MAKRIYANNIS, A. Natural cannabinoids: templates for drug discovery. **Life Sci**, v.78 p.454–466, 2005.

TIE-XIN, T.; HONG, W. An Image Analysis System for Thin-Layer Chromatography Quantification and Its Validation. **Journal of Chromatographic Science**, Vol. 46, July 2008

TURNER, C.E.; ELSOHLY, M. A.; BOEREN, E.G. Constituents of Cannabis sativa L.17. A review of the natural constituents. **J Nat Prod**, v.43, p.169–234, 1980.

UNODC. World Drug Report 2021. Disponível em: <https://www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/wdr2021.html>. Acesso em 22/07/2021.

WILLIAMSON, E. M.; EVANS, F. J. Cannabinoids in clinical practice. **Drugs**, v.60, n.6, p.1303–1314, 2000.

WILLIAMSON, L. N., BARTLETT, M. G. Quantitative liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. **Biomed. Chromatogr.** 21, 567–576, 2007.

WOJTUNIK-KULESZA, K. A.; TARGOWSKA-DUDA, K.; KLIMEK, K.; GINALSKA, G.; JOZWIAK, K.; WAKSMUNDSZKA-HAJNOS, M.; CIESLA, L. Volatile Terpenoids as Potential Drug Leads in Alzheimer's Disease. **Open Chem.** 15, 332–343, 2017.

XIAOYAN WANG DM, SEARFOSS J., TELEPCHAK M. **Determination of cannabinoid content and pesticide residues in Cannabis edible beverages.** LCGC 34(10):20–27, 2016.