

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Estudo do Perfil Químico de Apreensões de Maconha por
RMN de ^1H e Outras Técnicas Analíticas**

Júlia de Almeida Leite

Dissertação de Mestrado em Química

**Vitória
2017**

Júlia de Almeida Leite

Estudo do Perfil Químico de Apreensões de Maconha por RMN de ^1H e Outras Técnicas Analíticas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Química.

Área de Concentração: Química

Linha de Pesquisa: Química Forense

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Cunha Neto

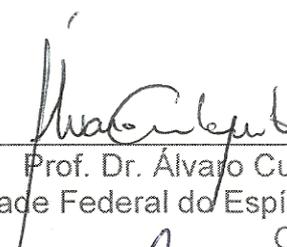
**VITÓRIA
2017**

“Estudo do Perfil Químico de Apreensões de Maconha por
RMN de ^1H e Outras Técnicas Analíticas”

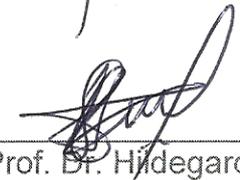
Júlia de Almeida Leite

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Química.

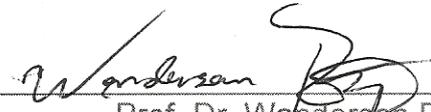
Aprovado em 30/03/2017 por:



Prof. Dr. Álvaro Cunha Neto
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador



Prof. Dr. Hildegardo Seibert França
Instituto Federal do Espírito Santo
Examinador Externo



Prof. Dr. Wanderson Romão
Universidade Federal do Espírito Santo
Examinador Interno

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

L533e Leite, Júlia de Almeida, 1991-
Estudo do perfil químico de apreensões de maconha por
RMN de ¹H e outras técnicas analíticas / Júlia de Almeida Leite. –
2017.
222 f. : il.

Orientador: Álvaro Cunha Neto.
Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal
do Espírito Santo, Centro de Ciências Exatas.

1. Maconha. 2. Ressonância magnética nuclear. 3.
Cromatografia a gás. 4. Espectrometria de massa. 5.
Cromatografia líquida de alta eficiência. 6. Análise de
componentes principais. I. Cunha Neto, Álvaro. II. Universidade
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Exatas. III. Título.

CDU: 54

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Energia Criativa, Deus, por ter concluído este trabalho.

À minha família, ao meu namorado e aos verdadeiros amigos, por todo apoio e ajuda.

Ao meu orientador, pela oportunidade de realizar o mestrado.

À banca examinadora, por aceitar o convite para participar da apresentação da dissertação e por suas contribuições.

À Polícia Civil do Estado do Espírito Santo (PC-ES), pelas amostras de maconha cedidas através do Acordo de Cooperação Técnica nº 23068.011398/2012-72 que esta entidade possui com a UFES.

À CAPES, pelo incentivo financeiro.

Ao LabPetro/NCQP/DQUI/UFES, pelo espaço cedido para que o trabalho fosse realizado.

Ao Laboratório de Petroleômica e Química Forense, pelos padrões de canabinoides cedidos.

Ao Laboratório de Produtos Naturais, pela utilização do cromatógrafo líquido.

Aos colegas de trabalho e de prédio, pela boa convivência.

E a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

“O impossível reside nas mãos inertes daqueles que não tentam.”

Epicuro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação das folhas da Cannabis sativa L. ⁹	22
Figura 2. Anagrama entre as palavras maconha e cânhamo. ¹⁶	23
Figura 3. Estruturas químicas base dos dez grupos principais em que os canabinoides são divididos e estruturas de alguns compostos presentes na classe de “tipos variados”. ¹²	26
Figura 4. Estruturas químicas dos principais canabinoides e suas propriedades farmacológicas. ^{13,22,33,34}	28
Figura 5. Biossíntese dos ácidos THCA, CBDA e CBCA a partir do CBGA e descarboxilação dos mesmos a seus homólogos neutros. ¹³	29
Figura 6. Oxidação do Δ^9 -THC a CBN. ¹³	30
Figura 7. Alinhamento dos momentos magnéticos de um núcleo de spin $\frac{1}{2}$ (a) na ausência e (b) na presença de um campo magnético aplicado. ^{41,42}	32
Figura 8. Estados de spin de um núcleo de spin $\frac{1}{2}$ na ausência e na presença de um campo magnético aplicado. ^{40,41}	33
Figura 9. Movimento de precessão do núcleo. ⁴⁰	33
Figura 10. Processo de absorção de RMN para um núcleo de spin $\frac{1}{2}$. ⁴¹	34
Figura 11. Os spins no estado alfa (pequeno excesso), no equilíbrio, se encontram paralelos a B_0 e são representados por um vetor de magnetização resultante M_0 . ⁴⁰	35
Figura 12. Quando um pulso de radiofrequência é aplicado, este faz com que M_0 se desloque de um ângulo θ do eixo z em direção ao plano x-y. ⁴⁰	36
Figura 13. Sinal de decaimento de indução livre (DIL, ou mais comumente FID) de ^1H de uma amostra, obtido no domínio do tempo, que após aplicação da transformada de Fourier aparece como um espectro usual de RMN obtido no domínio da frequência. ^{40,41}	37
Figura 14. Relaxação longitudinal. Representação da recuperação da magnetização de um vetor, diminuindo a componente transversal (x-y) e reestabelecendo a componente longitudinal (z). ⁴⁰	37
Figura 15. Relaxação transversal. Diferenças de campo local dentro da amostra fazem os spins precessarem com frequências ligeiramente diferentes, resultando em magnetização transversal nula. ⁴⁰	38
Figura 16. Blindagem diamagnética de um núcleo causada pela circulação dos	

elétrons. ⁴¹	38
Figura 17. Esquema de um cromatógrafo a gás. ^{44,46}	40
Figura 18. Esquema de um equipamento CG-EM. ⁴⁴	41
Figura 19. Esquema de um equipamento de CLAE típico. ⁴⁴	43
Figura 20. Funcionamento do detector por arranjo de diodos (DAD). ⁴⁴	45
Figura 21. Esquema geral de um espectrômetro de massas com seus cinco compartimentos. ⁴¹	47
Figura 22. Desenho esquemático do método de ionização paper spray. ⁴⁸	47
Figura 23. Movimento ciclotrônico do íon. Íons positivos e negativos se movimentam em sentidos opostos. ⁵³	48
Figura 24. Representação da matriz X (n x m), de variáveis independentes. Linhas = amostras e colunas = variáveis. ⁵⁶	50
Figura 25. Representação gráfica da decomposição da matriz X realizada pela ACP em duas matrizes T de escores e P de pesos (loadings) e outra matriz E de erros. ^{58,62}	52
Figura 26. Representação de uma componente principal (CP) para duas variáveis. (a) os escores são as projeções das amostras na direção da CP, e (b) os loadings são os cossenos do vetor direção. ^{58,60}	52
Figura 27. Mapa da divisão regional do Espírito Santo. ⁶³	55
Figura 28. Fluxograma geral da purificação do extrato bruto de maconha.....	61
Figura 29. Espectros de RMN de ¹ H dos testes de extração realizados com diferentes solventes.	70
Figura 30. Espectro de RMN de ¹ H do Método 5 - Maceração por ≈72h em CH ₃ OH e análise em CDCl ₃	71
Figura 31. Espectros de RMN de ¹ H de 5 amostras de maconha escolhidas aleatoriamente para mostrar a semelhança existente.....	76
Figura 32. Espectro de RMN de ¹ H da amostra C3_07_15.....	77
Figura 33. Estruturas químicas dos principais canabinoides com os hidrogênios de interesse numerados. ²²	78
Figura 34. Pré-purificação do extrato bruto de maconha por Sephadex LH-20.....	80
Figura 35. Purificação da fração denominada “Frações 19-24” por CLAE e frações obtidas.....	81
Figura 36. Cromatograma Líquido (CLAE) obtido da purificação da “Frações 19-24”.	82

Figura 37. Espectro de RMN de ^1H da Fração 1.	83
Figura 38. Cromatograma gasoso da Fração 1, estruturas e perfis de fragmentação dos canabinoides presentes na mesma.	84
Figura 39. Espectro de RMN de ^1H da Fração 2.	85
Figura 40. Cromatograma gasoso da Fração 2, estrutura e perfil de fragmentação da canabivarina.	86
Figura 41. Espectro de RMN de ^1H da Fração 3.	87
Figura 42. Cromatograma gasoso da Fração 3.	88
Figura 43. Espectro de RMN de ^1H da Fração 4.	89
Figura 44. Cromatograma gasoso da Fração 4.	90
Figura 45. Espectro de RMN de ^1H da Fração 5.	91
Figura 46. Cromatograma gasoso da Fração 5, estrutura e perfil de fragmentação do CBN.	93
Figura 47. Espectro de RMN de ^1H da Fração 6.	94
Figura 48. Cromatograma gasoso da Fração 6, estruturas e perfis de fragmentação de seus canabinoides.	95
Figura 49. Espectro de RMN de ^1H da Fração 7.	96
Figura 50. Cromatograma gasoso da Fração 7, estruturas e perfis de fragmentação de seus canabinoides.	97
Figura 51. Espectro de RMN de ^1H da Fração 8.	98
Figura 52. Cromatograma gasoso da Fração 8.	99
Figura 53. Espectro de RMN de ^1H da Fração 9.	99
Figura 54. Cromatograma gasoso da Fração 9.	100
Figura 55. Cromatograma líquido (CLAE-DAD) obtido da purificação da Fração 2.	102
Figura 56. Espectro de RMN de ^1H da Subfração 2.1 após purificação por CLAE-DAD da Fração 2.	102
Figura 57. Cromatograma gasoso da Subfração 2.1, estrutura e perfil de fragmentação da canabivarina.	103
Figura 58. Cromatograma líquido (CLAE-DAD) obtido da purificação da Fração 6.	104
Figura 59. Estruturas químicas dos canabinoides identificados por CG-EM nas frações obtidas após separação do extrato bruto por Sephadex LH-20.	107
Figura 60. Cromatograma gasoso do padrão de CBN, estrutura e perfil de	

fragmentação.	108
Figura 61. Cromatograma gasoso do padrão de Δ^9 -THC, estrutura e perfil de fragmentação.	109
Figura 62. Cromatograma gasoso do padrão de CBD, estrutura e perfil de fragmentação.	110
Figura 63. Cromatograma gasoso do padrão de CBC, estrutura e perfil de fragmentação.	111
Figura 64. Cromatograma gasoso do padrão de CBG, estrutura e perfil de fragmentação.	112
Figura 65. Espectros de massas de 5 amostras de maconha para se observar possíveis semelhanças e diferenças existentes entre as mesmas.	117
Figura 66. Espectro de massas da amostra C3_07_15.....	118
Figura 67. Espectros de RMN de ^1H sobrepostos de todas as 156 amostras de maconha, com desalinhamentos dos sinais e flutuação da linha de base.	120
Figura 68. Pré-processamento dos espectros de RMN de ^1H . Para exemplificação, o sinal de deslocamento químico entre 8,10 e 8,22 ppm para o (a) sinal original; (b) sinal após o pré-processamento <i>icoshift</i> ; (c) sinal após o pré-processamento <i>airPLS</i>	121
Figura 69. Gráfico de escores das 156 amostras de maconha estudadas utilizando-se a faixa completa dos espectros de RMN de ^1H , de 0 a 14 ppm.	122
Figura 70. Gráficos de loadings das componentes principais 1, 2 e 3. Observa-se uma contribuição significativa da região entre 0 e 3 ppm em todas as CPs.	123
Figura 71. Novo gráfico de escores obtido após seleção de variáveis para as 156 amostras de maconha apreendidas em diferentes cidades do estado do Espírito Santo de julho/14 a julho/15. Destaque para uma separação entre dois agrupamentos de meses.....	124
Figura 72. Gráfico de escores a partir de duas componentes principais para as três frações (obtidas da purificação da “Frações 19-24” por CLAE) e para as 156 amostras de maconha apreendidas em diferentes cidades do Espírito Santo no período de julho/14 a julho/15.	125
Figura 73. Gráfico de escores das 156 amostras de maconha estudadas utilizando-se a faixa completa dos espectros massas de m/z 154 a 1300.	126
Figura 74. Gráficos de loadings das componentes principais 1, 2 e 3. Destaque para uma contribuição significativa do m/z 309 na explicação da CP1.....	127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições dos testes de extração realizados.	60
Tabela 2. Condições e rendimentos dos testes de extração realizados.....	67
Tabela 3. Amostras analisadas por RMN, suas massas pesadas e rendimentos das extrações.....	72
Tabela 4. Deslocamentos químicos (δ), multiplicidades e constantes de acoplamento (J) dos principais canabinoides segundo a literatura. ²²	78
Tabela 5. Frações obtidas a partir da separação do extrato bruto de maconha por Sephadex LH-20, suas massas e respectivos rendimentos.....	80
Tabela 6. Frações obtidas a partir da purificação por CLAE da “Frações 19-24”, seus tempos de retenção, massas obtidas e rendimentos.	82
Tabela 7. Canabinoides identificados por CG-EM nas frações obtidas da purificação por CLAE da “Frações 19-24”.	101
Tabela 8. Canabinoides identificados por CG-EM nas demais frações obtidas após separação do extrato bruto de maconha por Sephadex LH-20.....	106
Tabela 9. Amostras analisadas por EM, suas massas pesadas e rendimentos das extrações.....	113
Tabela 10. Valores de m/z identificados no espectro de massas e seus respectivos possíveis canabinoides.	118

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Possíveis radicais das estruturas base das 10 classes de canabinoides...25	
Quadro 2. Amostras coletadas e suas especificações.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CBCA – Ácido canabicromênico

CBDA – Ácido canabidiólico

CBGA – Ácido canabigerólico

CBNA – Ácido canabinólico

THCA – Ácido tetraidrocanabinólico

-NH₂ – Amino

ACP – Análise de Componentes Principais

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CBL – Canabiciclol

CBC – Canabicromeno

CBCON – Canabicumaronona

CBD – Canabidiol

CBE – Canabielsoin

CBF – Canabifurano

CBG – Canabigerol

CBND – Canabinodiol

CBN – Canabinol

CBT – Canabitriol

CBV – Canabivarina

-COOH – Carboxila

CDCl₃ – Clorofórmio deuterado

CP – Componente Principal

COSY – *Correlation Spectroscopy*

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CG – Cromatografia Gasosa

CG-EM – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

CG-DIC – Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização em Chama

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE-EM – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas

CLAE-DAD – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector por Arranjo de

Diodos

DIL – Decaimento de Indução Livre

DQUI – Departamento de Química

DCE – Detector de Captura de Elétrons

DCT – Detector de Condutividade Térmica

DIC – Detector de Ionização em Chama

DAD – Detector por Arranjo de Diodos

-CH₂(OH)₂ – Diol

DEPT – *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*

UNODC – Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (do inglês, *United Nations Office on Drugs and Crime*)

EM – Espectrometria de Massas

FT-ICR MS – Espectrometria de Massas por Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier (do inglês, *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*)

EMI – Espectrometria de Mobilidade Iônica

RMN – Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

IV – Espectroscopia no Infravermelho

UV-VIS – Espectroscopia no Ultravioleta-Visível

ES – Espírito Santo

FE – Fase estacionária

FM – Fase móvel

-C₆H₅ – Fenil

FID – *Free Induction Decay*

HMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

HSQC – *Heteronuclear Single-Quantum Correlation*

-OH – Hidroxila

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

NIST – Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (do inglês, *National Institute of Standards and Technology*)

IE – Ionização por Impacto de Elétrons

IQ – Ionização Química

LENAD – Levantamento Nacional de Álcool e Drogas

MS – *Mass Spectrometry*

CH₃OH – Metanol

CD₃OD – Metanol deuterado

-CH₃ – Metil

-CN – Nitrilo

NCQP – Núcleo de Competências em Química do Petróleo

-C₁₈H₃₇ – Octadecil

-C₈H₁₇ – Octil

OMS – Organização Mundial de Saúde

PS – *Paper Spray*

PC-ES – Polícia Civil do Estado do Espírito Santo

PCA – *Principal Component Analysis*

r.f. – Radiofrequência

RIE – Radioimunoensaio

RP – Reconhecimento de Padrões

RMN de ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

RMN de ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

SNC – Sistema Nervoso Central

TMS – Tetrametilsilano

UFES – Universidade Federal do Espírito Santo

Δ⁹-THC – Δ⁹-tetraidrocanabinol

Δ⁸-THC – Δ⁸-tetraidrocanabinol

OTHC – 10-oxo-Δ^{6a(10a)}-tetraidrocanabinol

LISTA DE SÍMBOLOS

θ – Ângulo do desvio sofrido pela magnetização após a aplicação do pulso de r.f.

B – Campo magnético

B_0 – Campo magnético externo

B_{induzido} – Campo magnético induzido

B_1 – Campo magnético oscilatório dependente do tempo

q – Carga

cm – Centímetro

M_x – Componente da magnetização transversal no eixo x

M_y – Componente da magnetização transversal no eixo y

K_B – Constante de Boltzmann

h – Constante de Planck

δ – Deslocamento químico

ΔE – Diferença de energia entre estados final e inicial

d – Dupleto

dI – Dupleto largo

β – Estado de maior energia

α – Estado de menor energia

ν – Frequência

ω_c – Frequência ciclotrônica

ω_0 – Frequência de Larmor

g – Grama

$^{\circ}\text{C}$ – Graus Celsius

Hz – Hertz

h – Hora

kV – Kilovolt

M_0 – Magnetização resultante na direção do campo magnético externo

m – Massa

MHz – Megahertz

μL – Microlitro

μm – Micrômetro

mg – Miligrama

mg/mL – Miligrama por mililitro
mL – Mililitro
mm – Milímetro
min – Minuto
P – Momento angular
 μ – Momento magnético
m – Multipleteo
nm – Nanômetro
 n° – Número
 N_β – Número de núcleos no estado de maior energia β
 N_α – Número de núcleos no estado de menor energia α
 $N_{\alpha,\beta}$ – Número de núcleos nos estados energéticos
I – Número quântico de spin nuclear
ppm – Partes por milhão
q – Quinteto
 $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$ – Radiano por segundo
 γ – Razão giromagnética
 m/z – Razão massa carga
 T_1 – Relaxação longitudinal
 T_2 – Relaxação transversal
s – Segundo
s – Singleto
sl – Singleto largo
T – Temperatura
t – Tempo
t – Tripleto

RESUMO

A maconha é a droga ilícita mais consumida no mundo. Ela é derivada da planta *Cannabis sativa* L. Neste trabalho, um total de 156 amostras de maconha apreendidas no estado do Espírito Santo (ES) – Brasil foram estudadas e analisadas por RMN de ^1H a fim de se identificar seus principais canabinoides. Primeiramente, para se otimizar a identificação por RMN, testes de extração foram realizados com diferentes solventes e o método com a combinação metanol + maceração + clorofórmio deuterado para análises de RMN foi escolhido. Por essa técnica observou-se grande similaridade entre as amostras a partir dos espectros obtidos. Após as análises de RMN de ^1H , um extrato bruto de todas as amostras foi submetido à CLAE com o objetivo de purificar esses compostos para servirem como substâncias de referência. Nove frações foram obtidas e então analisadas por RMN e CG-EM, sendo que cinco apresentaram canabinoides confirmados pela última técnica. Δ^9 -THC (Δ^9 -tetraidrocanabinol), Δ^9 -THCA (ácido tetraidrocanabinólico), Δ^8 -THC (Δ^8 -tetraidrocanabinol), 11-hidroxicanabinol, CBV (canabivarina) e CBN (canabinol) foram encontrados e suas estruturas químicas confirmadas por CG-EM. O último composto foi obtido com alta pureza ($\approx 100\%$), podendo ser utilizado como material de referência, enquanto os outros foram obtidos como misturas menos complexas. Outros canabinoides como canabicromeno, canabicitolol e canabicumaronona foram também encontrados no extrato bruto de maconha. As 156 amostras foram também analisadas por EM e notou-se entre elas a mesma similaridade observada por RMN. A técnica quimiométrica Análise de Componentes Principais (ACP) foi aplicada aos dados obtidos por RMN e EM e o mesmo resultado foi verificado para ambas as técnicas: amostras naturalmente agrupadas indicando que as mesmas são similares. Esse fato pode sugerir a possibilidade de que toda a maconha apreendida no ES possa ser proveniente de uma mesma fonte, entrando no estado por um mesmo local e sendo então distribuída aos municípios. Para uma nova ACP aplicada aos dados de RMN, com seleção de variáveis para os espectros, foi observado um agrupamento entre as amostras ao longo dos meses, diferenciando-se em dois grupos (julho/2014 a janeiro/2015 e fevereiro/2015 a julho/2015), o que pode indicar a existência de amostras novas e antigas. Além disso, utilizando-se três frações obtidas após a purificação do extrato bruto de maconha por CLAE, para aplicação de uma ACP supervisionada, foi possível confirmar novamente o quão similares as amostras apreendidas são, e também observar que o perfil químico delas apresentou uma maior similaridade com o espectro de RMN de ^1H da fração isolada contendo a mistura de Δ^8 -THC + Δ^9 -THC + CBN.

Palavras-chave: Maconha. RMN de ^1H . CG-EM. CLAE. EM. ACP.

ABSTRACT

Marijuana is the most consumed illicit drug in the world. It's derived from *Cannabis sativa* L. plant. In this work, a total of 156 marijuana samples seized in the state of Espírito Santo (ES) – Brazil were studied and analyzed by ^1H NMR in order to identify their major cannabinoids. Firstly, for the optimization of the identification by NMR, extraction tests were realized with different solvents and the method with the combination methanol + maceration + deuterated chloroform for NMR analyses was chose. By this technique it was observed a big similarity between the samples from the obtained spectra. After ^1H NMR analyses, a crude extract of all samples was submitted to HPLC with the purpose to purify these compounds to serve as reference substances. Nine fractions were obtained and then analyzed by NMR and GC-MS, and five presented cannabinoids confirmed by the latter technique. Δ^9 -THC (Δ^9 -tetrahydrocannabinol), Δ^9 -THCA (Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid), Δ^8 -THC (Δ^8 -tetrahydrocannabinol), 11-hydroxycannabinol, CBV (cannabivarin) and CBN (cannabinol) were found and their chemical structures were confirmed by GC-MS. The latter compound was obtained with high purity ($\approx 100\%$), being able to serve as reference material, while the others were obtained as less complex mixtures. Other cannabinoids as canabichromene, canabicyclol and cannabicumaronone were also found in the crude marijuana extract. The 156 samples were also analyzed by MS and it was noticed between them the same similarity observed by NMR. The chemometric technique Principal Component Analysis (PCA) was applied to the NMR and MS obtained data and the same result was verified for both techniques: naturally grouped samples indicating that they are similar. This fact may suggest the possibility that all the marijuana seized in ES can come from a same source, entering the state through a same location and then being distributed to the cities. For a new PCA applied to NMR data, with variables selection for the spectra, it was observed that the samples were grouped through the months, differentiating into two groups (July/2014 to January/2015 and February/2015 to July/2015), what may indicate the existence of new and old samples. In addition, using three fractions obtained after HPLC purification of the crude marijuana extract, for the application of a supervised PCA, it was possible to confirm again how similar the seized samples are, and also to observe that their chemical profile presented a greater similarity with the ^1H NMR spectrum of the isolated fraction containing the mixture of Δ^8 -THC + Δ^9 -THC + CBN.

Keywords: Marijuana. ^1H NMR. GC-MS. HPLC. MS. PCA.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Cannabis sativa L., Maconha e Canabinoides	22
1.2. Técnicas Analíticas	31
1.2.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	31
1.2.2. Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)	40
1.2.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE)	42
1.2.3.1. Cromatografia por Exclusão (ou Cromatografia em Gel)	45
1.2.4. Espectrometria de Massas por Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier utilizando-se Paper Spray como Fonte de Ionização Ambiente (PS-FT-ICR MS)	46
1.3. Quimiometria e a Análise de Componentes Principais (ACP)	49
2. OBJETIVOS	54
2.1. Objetivo Geral	54
2.2. Objetivos específicos	54
3. METODOLOGIA	55
3.1. Coleta das amostras	55
3.2. Definição do método de extração	59
3.3. Purificação por CLAE	60
3.3.1. Purificação da fração denominada “Frações 19-24”	61
3.3.2. Purificação da Fração 2	62
3.3.3. Purificação da Fração 6	62
3.4. Análises de RMN e seus parâmetros	63
3.5. Identificação por CG-EM	64
3.6. Novas extrações das 156 amostras para serem analisadas por Espectrometria de Massas e parâmetros utilizados nas análises	65
3.7. Quimiometria	66

3.7.1. RMN	66
3.7.1.1. ACP supervisionada	66
3.7.2. EM.....	66
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
4.1. Definição do método de extração	67
4.2. Aplicação do método de extração selecionado	72
4.3. Purificação por CLAE e Identificação por RMN e/ou CG-EM	80
4.3.1. Purificação da fração denominada “Frações 19-24”	81
4.3.2. Purificação da Fração 2	101
4.3.3. Purificação da Fração 6	104
4.3.4. Identificação por CG-EM das demais frações provenientes da pré-purificação do extrato bruto de maconha	105
4.3.5. Padrões de canabinoides por CG-EM.....	108
4.4. Novas extrações das 156 amostras para serem analisadas por Espectrometria de Massas	113
4.5. Quimiometria	119
4.5.1. RMN	119
4.5.1.1. ACP supervisionada	125
4.5.2. EM.....	126
5. CONCLUSÃO.....	129
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131
ANEXOS	138
ANEXO 1	139
ANEXO 2	178
ANEXO 3	181
ANEXO 4	184

1. INTRODUÇÃO

As Ciências Forenses reúnem diversos conhecimentos técnicos e científicos para auxiliar na elucidação de crimes. Uma de suas áreas, a Química Forense, é a responsável pela realização de inúmeras análises em vários tipos de amostras (biológicas ou não), com o intuito de se investigar e caracterizar as substâncias presentes nas mesmas, e com isso, produzir provas materiais para a justiça. Algumas espécies de amostras analisadas, incluem, por exemplo, explosivos, venenos, resíduos de disparos de armas de fogo, tintas, drogas lícitas e ilícitas, etc.^{1,2}

Na esfera das drogas ilícitas, área de estudo de grande interesse dos cientistas, a identificação das substâncias químicas que as caracterizam como tal é de extrema importância. Porém, a separação e a purificação dessas substâncias são também etapas consideradas fundamentais para auxiliar nos estudos, incluindo a caracterização molecular e a elucidação das propriedades químicas destes compostos.^{1,2}

Com esse objetivo, muitas técnicas analíticas são largamente empregadas no âmbito forense, a citar, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Cromatografia Gasosa (CG) e Espectrometria de Massas (EM), utilizadas separadamente e também em conjunto. A primeira é uma técnica analítica de separação que permite a determinação de grande quantidade de substâncias em diferentes matrizes. A segunda é utilizada na separação e identificação de compostos orgânicos voláteis. E a terceira, é de enorme utilidade por possuir alta capacidade de identificar e quantificar uma vasta série de compostos, inclusive em misturas complexas, sem a necessidade de preparo da amostra.²

Outra técnica analítica que tem sido empregada, mais recentemente, na análise de substâncias ilícitas é a Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), de imensa aplicação na elucidação estrutural (identificação) de substâncias orgânicas.³⁻⁶

Por fim, uma área que merece destaque é a que utiliza estatística no processamento de dados químicos obtidos por meio de experimentos, e também no planejamento prévio destes, chamada Quimiometria. A mesma tem sido de enorme valia em Química Forense, pelo fato de muitas vezes não se ter grande quantidade de amostra para ser analisada nesta vertente, sendo o planejamento prévio importantíssimo para se evitar perdas, como também sua aplicação no

processamento de dados pode permitir, por exemplo, em estudos de drogas ilícitas, correlacionar amostras de diferentes apreensões, levando-se à identificação de rotas de tráfico e até mesmo a origens geográficas de produção das mesmas.^{1,2}

Neste aspecto, o presente trabalho traz um estudo realizado com a droga ilícita de maior consumo no mundo, a maconha, droga derivada de uma planta chamada *Cannabis sativa* L., visando-se identificar e isolar as substâncias pertencentes a uma classe específica de compostos, característicos dessa planta e denominados canabinoides, através da utilização de técnicas analíticas comumente usadas em Química Forense, e também, visando-se utilizar a Quimiometria com o objetivo de se observar o comportamento das amostras de maconha aqui estudadas.

1.1. *Cannabis sativa* L., Maconha e Canabinoides

A *Cannabis sativa* L. (Linnaeus) é uma erva pertencente à família *Cannabaceae*,^{7,8} que foi classificada botanicamente em 1753 por Carl Von Linné.¹⁰ É uma planta nativa da Ásia Central e da Ásia Ocidental que tem sido cultivada por mais de 4500 anos com diferentes propósitos, sendo um deles o seu uso medicinal. Foi utilizada como medicamento antes da era Cristã na Ásia, particularmente na Índia, e aplicada no tratamento de várias doenças desde 1500 a.C. Nesta vertente, sabe-se que dentre todas as funções a ela atribuídas, pode atuar, por exemplo, como analgésico, estimulador da atividade gástrica, sedativo, antiespasmódico, etc.^{7,11}

Outro propósito para o cultivo da *Cannabis sativa* L. é o fato desta planta ser utilizada como droga recreativa. A partir dela, obtém-se preparações como a maconha, mundialmente conhecida como marijuana, o haxixe e o óleo de haxixe, que contêm compostos químicos denominados canabinoides, aos quais são atribuídas as propriedades psicotrópicas que classificam esses derivados como entorpecentes.^{12,13}



Figura 1. Representação das folhas da *Cannabis sativa* L.⁹

Entretanto, como um terceiro propósito de cultivo, valem ressaltar as variedades não droga da *Cannabis sativa* L., denominadas “cânhamo”, que têm sido por milhares de anos uma importante fonte de alimentos e fibras para a humanidade. Estas fibras são utilizadas na fabricação de papel, roupas, calçados, velas, cordas, etc. Outras áreas onde o cânhamo apresenta aplicações são bioconstrução, cosméticos, biocombustíveis, etc.^{7,8}

Droga, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), “é toda a substância que introduzida no organismo vivo modifica uma ou mais das suas funções”.¹⁴ De acordo com a principal ação produzida no Sistema Nervoso Central (SNC), as drogas são classificadas em três grupos: depressoras, estimulantes e perturbadoras (ou modificadoras) do SNC.¹⁰

A maconha é classificada como perturbadora do SNC,¹⁰ e pode-se dizer que é a droga bruta derivada da planta *Cannabis sativa* L.¹² por tratar-se das flores e folhas secas desta planta. Ela é encontrada no mercado ilegal inalterada, bruta, prensada em tabletes e é comumente fumada.^{13,15} No Brasil, também se refere à planta *Cannabis sativa* L. como maconha, palavra que em português acredita-se ser um anagrama da palavra cânhamo (Figura 2).¹⁶

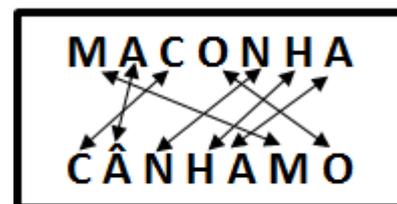


Figura 2. Anagrama entre as palavras maconha e cânhamo.¹⁶

A maconha é uma droga considerada ilícita em praticamente todo o mundo¹³ e a história relacionada à sua proibição é longa. Acredita-se que os Estados Unidos tenham exercido grande influência neste cenário mundial, pois apesar da *Cannabis* ter sido utilizada durante muitos anos como medicamento e posteriormente como droga, mesmo sendo mal vista por muitos, ela era liberada nas primeiras décadas do século XX.¹⁷ Houve uma grande campanha por parte dos EUA para enfatizar que o uso da droga levava as pessoas a uma “raiva delirante” e os induzia a cometer crimes violentos, o que convenceu não só a opinião pública e fez com que nesse país, por volta de 1937, o cultivo, a venda e o uso da *Cannabis* fossem proibidos, mas também governos de outros países a fazerem o mesmo. Além disso, muitos acreditam que interesses econômicos estavam por trás da campanha antimaconha nos Estados Unidos, pois nos anos 20 vários produtos estavam sendo desenvolvidos a partir do petróleo, os quais disputavam o mercado com o cânhamo, logo, por não só se ter proibido a droga, mas também a planta como um todo, extinguiu-se a grandiosa indústria de produção das fibras do cânhamo, abrindo o mercado para o náilon, um derivado do petróleo, e assim, beneficiando influentes empresários americanos.¹⁷

No Brasil, desde a década de 20 já se adotavam leis federais contra a maconha (Lei nº4.296 de 06 de julho de 1921), porém, a repressão ao uso ganhou força em 1930, ano a partir do qual a perseguição policial aos usuários se fez rigorosa e permanente. A proibição total do plantio, cultura, colheita e exploração da maconha

no país se deu com o Decreto-Lei nº 891 do Governo Federal, em 25/11/1938, e sua criminalização, prevendo pena de prisão por porte de qualquer quantidade, ocorreu em 1976, com a Lei nº 6.368.¹⁶ Atualmente, a lei sobre drogas vigente no país, que substitui as anteriores, é a Lei nº 11.343 de 23 de agosto de 2006, que:

Institui o Sistema Nacional de Políticas Públicas sobre Drogas - Sisnad; prescreve medidas para prevenção do uso indevido, atenção e reinserção social de usuários e dependentes de drogas; estabelece normas para repressão à produção não autorizada e ao tráfico ilícito de drogas; define crimes e dá outras providências.¹⁸

Apesar da proibição, a maconha é a droga mais cultivada, mais traficada e mais consumida em todo o mundo. Segundo o Relatório Mundial de Drogas 2016 (*World Drug Report*), do Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (UNODC, *United Nations Office on Drugs and Crime*), aproximadamente 183 milhões de pessoas utilizaram a droga em 2014.¹⁹

No Brasil, de acordo com a pesquisa do II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas 2012 (II LENAD), a proporção de indivíduos que disse já ter utilizado maconha alguma vez na vida foi de 4,3% (597 mil pessoas) para adolescentes e 5,8% (7,8 milhões) para adultos. Também foi realizada uma análise para o consumo dessa droga nos doze meses do ano de 2012 e o resultado mostrou que 3,4% (478 mil) dos adolescentes e 2,5% (3,3 milhões) dos brasileiros adultos declararam ter utilizado maconha no período avaliado.²⁰

No estado do Espírito Santo, mais especificamente na capital Vitória, um estudo no VI Levantamento Nacional sobre o Consumo de Drogas Psicotrópicas entre Estudantes do Ensino Fundamental e Médio das Redes Pública e Privada de Ensino nas 27 Capitais Brasileiras - 2010, mostrou que dos 829 estudantes participantes da pesquisa, 23,6% declarou ter feito uso na vida de alguma droga (exceto álcool e tabaco), 9,9% uso no último ano e 5,6% uso no mês, sendo a maioria adolescentes de idade superior a 16 anos. Já 8,6% dos alunos da rede pública e 13,0% da rede particular relataram uso no ano (da pesquisa) de qualquer droga (exceto álcool e tabaco), sendo as mais citadas a maconha, os inalantes, os ansiolíticos, a cocaína e os anfetamínicos.²¹

Embora apresente propriedades psicotrópicas, como já dito anteriormente, a *Cannabis sativa* L. (ou maconha) também apresenta efeitos medicinais. Há anos tem-se discutido bastante sobre o seu promissor potencial terapêutico,^{12,22} o que fez com que alguns países, como por exemplo Holanda, Canadá, Estados Unidos (alguns

estados) e Uruguai, criassem leis que permitissem o uso medicinal da mesma.²³⁻²⁵ Aqui, salienta-se que em 2013 o Uruguai se tornou o primeiro país no mundo a legalizar e regulamentar o comércio da maconha, o que conseqüentemente torna o seu uso recreativo uma atividade legal,²⁶ como já acontecia na Holanda e agora tem acontecido em alguns estados dos EUA e irá acontecer no Canadá em 2017.^{27,28}

A planta *Cannabis sativa* L. possui uma química muito complexa. Os autores ElSohly e Slade (2005)¹² relatam ser 489 o número de compostos naturais identificados na planta, pertencentes a diversas classes, tais como mono e sesquiterpenos, açúcares, esteroides, flavonoides, hidrocarbonetos, compostos nitrogenados, etc. Destes, aproximadamente 90 são da classe dos constituintes terpeno-fenólicos chamados canabinoides,¹⁵ que são divididos em dez grupos principais e outro grupo denominado “tipos variados”, a saber: tipos Canabigerol (CBG), Canabicromeno (CBC), Canabidiol (CBD), Δ^9 -*trans*-tetraidrocanabinol (Δ^9 -THC), Δ^8 -*trans*-tetraidrocanabinol (Δ^8 -THC), Canabiciolol (CBL), Canabielsoin (CBE), Canabinol (CBN), Canabinodiol (CBND), Canabitriol (CBT) e dentro dos “tipos variados”, encontram-se, por exemplo, os compostos canabifurano (CBF), canabicumaronona (CBCON), 10-oxo- $\Delta^{6a(10a)}$ -tetraidrocanabinol (OTHC), etc.¹²

A Figura 3 a seguir mostra as estruturas químicas base das 10 classes principais existentes e também dos três compostos citados acima pertencentes à classe chamada “tipos variados”, e o Quadro 1 logo abaixo detalha os possíveis radicais presentes nessas estruturas.

Quadro 1. Possíveis radicais das estruturas base das 10 classes de canabinoides.¹²

		Posições				
		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Tipos	CBN	H ou CH ₃	H ou COOH	CH ₃ , C ₂ H ₅ , C ₃ H ₇ , C ₄ H ₉ ou C ₅ H ₁₁		
	CBE	H ou COOH	H ou COOH	C ₃ H ₇ ou C ₅ H ₁₁		
	CBT	H ou OH	H	H, OH ou OEt	C ₃ H ₇ ou C ₅ H ₁₁	
	CBND	C ₃ H ₇ ou C ₅ H ₁₁				
	CBG	H ou COOH	C ₃ H ₇ ou C ₅ H ₁₁	H ou CH ₃	(CH ₂) ₂ CH=C(CH ₃) ₂ ou CH ₃	(CH ₂) ₂ CH=C(CH ₃) ₂ ou CH ₃
	CBC	H ou COOH	C ₃ H ₇ ou C ₅ H ₁₁			
	CBD	H ou COOH	CH ₃ , C ₃ H ₇ , C ₄ H ₉ ou C ₅ H ₁₁	H ou CH ₃		
	CBL	H ou COOH	C ₃ H ₇ ou C ₅ H ₁₁			
	Δ^8 - <i>trans</i> - THC	H ou COOH				
	Δ^9 - <i>trans</i> - THC	H ou COOH	CH ₃ , C ₃ H ₇ , C ₄ H ₉ ou C ₅ H ₁₁	H ou COOH		

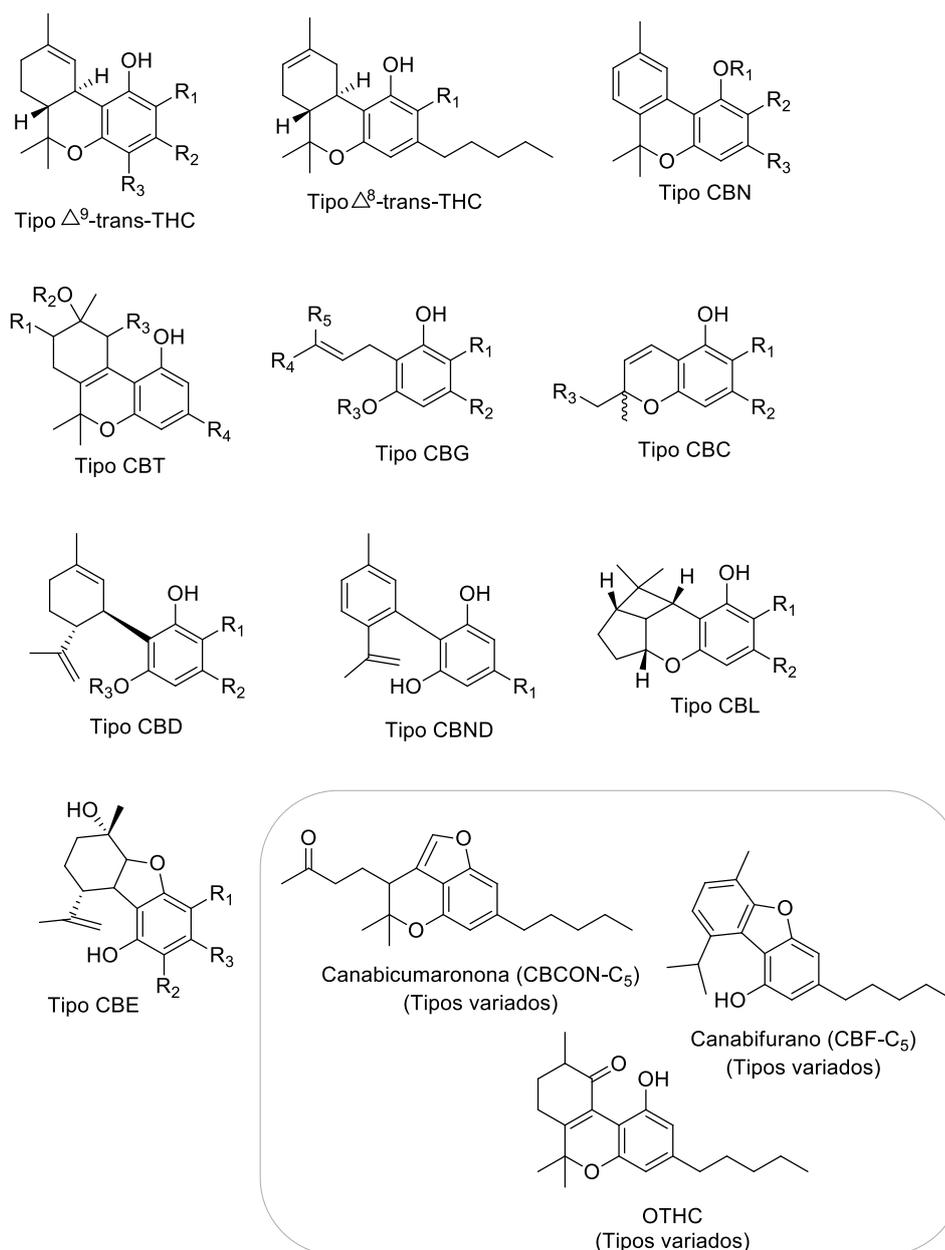


Figura 3. Estruturas químicas base dos dez grupos principais em que os canabinoides são divididos e estruturas de alguns compostos presentes na classe de “tipos variados”.¹²

Observa-se que, no geral, as estruturas da Figura 3 não variam muito umas das outras. As principais diferenças ocorrem: 1) nas cadeias laterais, as quais podem ser de 1 até 5 carbonos; 2) na substituição de um ácido carboxílico; 3) na substituição de um grupo hidroxila ou metoxila; 4) na presença de um grupo carbonila; e 5) na quantidade de ciclos presentes, que podem variar de 1 a 4 ciclos.^{12,22}

Dentre todos os canabinoides destaca-se o Δ^9 -tetraidrocanabinol (Δ^9 -THC-C₅ ou somente THC, com R₁ e R₃ = H e R₂ = C₅H₁₁), considerado o constituinte de maior atividade psicotrópica,¹² logo, o principal responsável pelos efeitos mentais desejados pelos usuários de maconha,²⁹ e, portanto, de grande importância forense,¹³ que

também já provou possuir atividade farmacológica³⁰ e desta forma também apresentar importância de uso clínico. Além dele, outros canabinoides, como por exemplo o ácido tetraidrocanabinólico (THCA), canabinol (CBN), canabidiol (CBD) e canabigerol (CBG) também já mostraram possuir importantes efeitos terapêuticos.³⁰

Os constituintes ativos são considerados os principais canabinoides ou por apresentam importância forense e/ou de uso clínico. Choi et al. (2004a)²², em seu trabalho, extraíram e isolaram das flores da planta *Cannabis sativa* L. e analisaram por Ressonância Magnética Nuclear os que consideram como principais canabinoides: Δ^9 -THC, THCA, CBG, CBN, CBD, Δ^8 -tetraidrocanabinol (Δ^8 -THC) e ácido canabidiólico (CBDA).²² É importante citar que são nas flores que se concentram as maiores quantidades de Δ^9 -THC (10 a 12%).¹³

Nesse estudo, a purificação para a obtenção dos compostos citados foi feita através de uma partição inicial do extrato gerado com dois solventes de polaridades opostas e de cromatografia em coluna utilizando-se primeiramente resina HP-20 (adsorvente polimérico utilizado em cromatografia em fase reversa) como fase estacionária, e durante o processo de purificação, utilizando-se também sílica gel e Sephadex LH-20, todos com eluentes constituídos por diferentes solventes em diversas proporções. Para o isolamento de um desses compostos, também foi empregada cromatografia de partição centrífuga.²²

A Figura 4 a seguir apresenta as estruturas químicas dos principais canabinoides anteriormente mencionados em conjunto com outros também considerados como tal, e algumas de suas ações farmacológicas.^{13,22} Aqui, destacam-se algumas aplicações mais específicas dos canabinoides para propósitos medicinais: são utilizados no tratamento de cólicas menstruais, convulsões, amígdalas inflamadas, enxaquecas e dores de cabeça, glaucoma, asma, esclerose múltipla, no alívio da dor crônica (analgésicos) e também como antieméticos e estimulantes de apetite para pacientes com câncer ou AIDS (Figura 4).^{12,15,22,31,32}

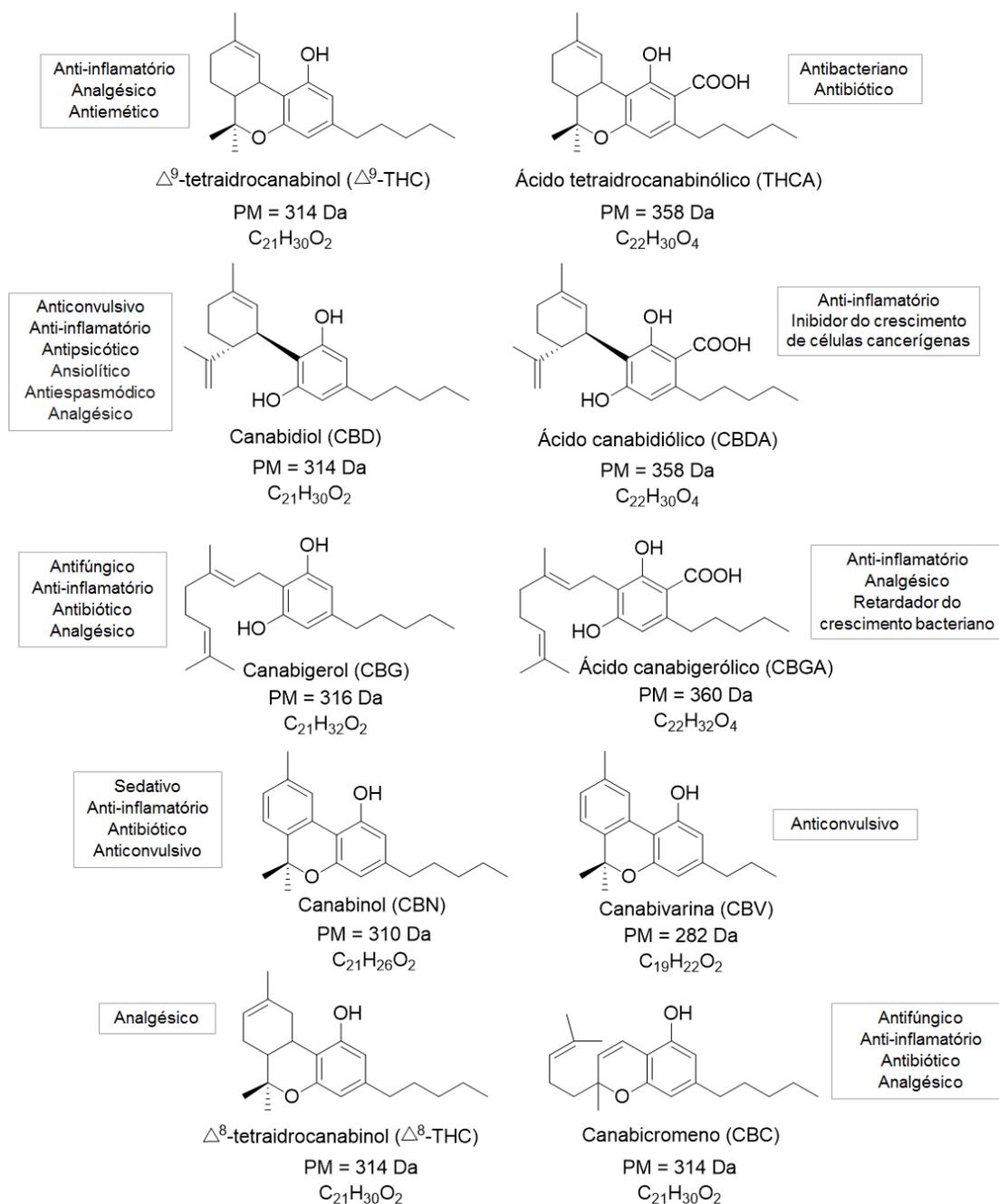


Figura 4. Estruturas químicas dos principais canabinoides e suas propriedades farmacológicas.^{13,22,33,34}

Observa-se na Figura 4 a existência de isômeros. Por exemplo, Δ^9 -THC, CBD, Δ^8 -THC e CBC são isômeros, assim como THCA e CBDA. Este fato mostra que a purificação destes compostos não se trata de uma tarefa fácil, principalmente por estarem contidos em uma matriz bastante complexa que é a *Cannabis sativa* L.

Dos compostos citados acima, o canabidiol - CBD (Figura 4) representa um dos componentes bioativos da *Cannabis sativa* L. com o maior potencial para uso terapêutico. Ele é considerado não psicotrópico e apresenta um perfil de muito baixa toxicidade, sendo bem tolerado em humanos.³⁵

No Brasil, o CBD fazia parte da lista de substâncias proscritas até janeiro de 2015, quando a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) decidiu por passá-lo à lista de substâncias controladas. Segundo a agência:

A discussão sobre sua reclassificação iniciou-se em 2014 a partir identificação de pacientes com síndromes que levam a espasmos e epilepsia e que encontram no CBD a melhor resposta terapêutica para seus tratamentos, sendo a decisão fundamentada nas indicações técnicas de que o canabidiol, isoladamente, não está associado a evidências de dependência, ao mesmo tempo em que diversos estudos científicos recentes têm apontado para possibilidade de uso terapêutico do CBD, logo, não havendo motivos para que permanecesse proibido.³⁶

É possível observar, também na Figura 4, a presença dos respectivos ácidos de alguns dos canabinoides. O ácido canabigerólico (CBGA) é o precursor biossintético do ácido tetraidrocanabinólico (THCA), sendo este último formado através da reação de oxidociclização do primeiro pela enzima THCA-sintase, e também dos ácidos canabidiólico (CBDA) e canabicromênico (CBCA).^{13,37} Estes são psicotropicamente inativos e instáveis. Sob a influência de luz e temperatura se descarboxilam rapidamente gerando seus homólogos neutros (Figura 5).^{15,38}

Como exemplo, o THCA gera o THC por descarboxilação não enzimática durante armazenamento e consumo, como quando se fuma a planta (maconha). Este último, na verdade, é encontrado em nível baixo na planta fresca.¹³

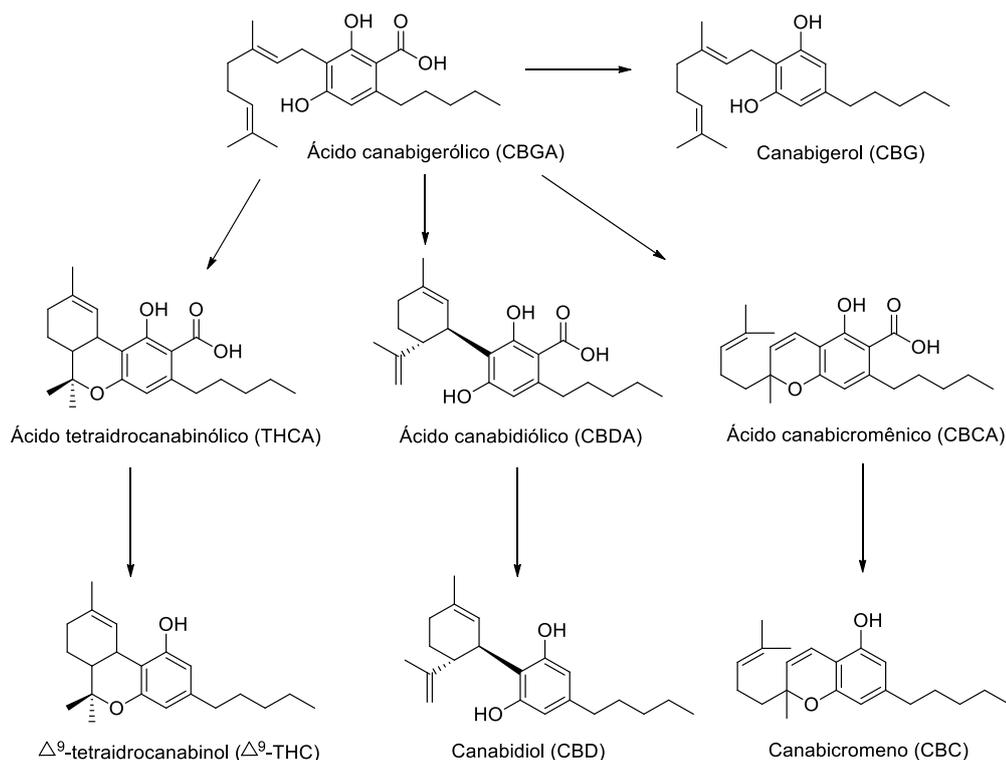


Figura 5. Biossíntese dos ácidos THCA, CBDA e CBCA a partir do CBGA e descarboxilação dos mesmos a seus homólogos neutros.¹³

Como destacado anteriormente, as estruturas químicas dos canabinoides são parecidas, todavia, as quantidades relativas desses compostos presentes em variedades da *Cannabis sativa* L. variam, dependendo das condições ambientais utilizadas no cultivo da planta, como por exemplo, segundo Passagli (2013)¹⁰, fertilidade e pH do solo, clima, temperatura, época da colheita, suprimento de nutrientes, água, luminosidade, etc.^{10,38}

Os teores de canabinoides também podem se alterar com o tempo. No armazenamento de amostras de produtos de *Cannabis*, o Δ^9 -THC se oxida a canabinol (CBN) e com isso, diminui gradualmente seu teor na planta (Figura 6). Outros fatores para a degradação são a exposição ao ar, à luz e à umidade. O CBN é um produto de degradação do Δ^9 -THC, não ocorrendo naturalmente na *Cannabis* fresca ou na maconha cuidadosamente seca. O canabinoide canabivarina (CBV) (Figura 4) é outro exemplo, igualmente não encontrado na planta fresca.^{13,38}

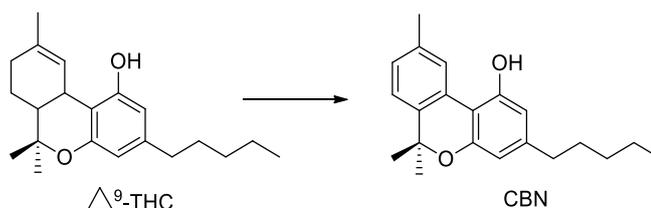


Figura 6. Oxidação do Δ^9 -THC a CBN.¹³

De acordo com o teor de Δ^9 -THC que apresenta, a *Cannabis sativa* L. pode ser classificada de duas maneiras: tipo droga ou tipo fibra. Além do teor total de THC, outra forma de determinar o tipo é pela seguinte equação, que correlaciona a razão dos canabinoides THC, CBN e CBD:

$$X = \frac{[THC] + [CBN]}{[CBD]} \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde: [THC] refere-se à área do THC no cromatograma gasoso (CG-DIC). Se X for maior que 1, considera-se a planta como sendo tipo droga e se X for menor que 1, como tipo fibra.^{10,13}

Muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas ao longo dos anos com a planta *Cannabis sativa* L. (maconha), e, diversas técnicas analíticas são utilizadas no isolamento, na detecção, na identificação e na quantificação dos produtos presentes na mesma, como por exemplo: testes baseados em reações de cor, como teste com *Fast Blue B salt* e teste de Duquenois-Levine; Radioimunoensaio (RIE) para detecção em amostras biológicas (sangue e urina); Espectrometria de Mobilidade Iônica (EMI);

Cromatografia em Camada Delgada (CCD); Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE); Cromatografia Gasosa (CG); Espectrometria de Massas (EM); Espectroscopia no Infravermelho (IV); e Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).^{13,38,39} Técnicas hífenadas são também utilizadas, como por exemplo, a associação das cromatografias Gasosa e Líquida de Alta Eficiência com a Espectrometria de Massas (CG-EM e CLAE-EM, respectivamente), dentre outras.

O isolamento de substâncias químicas presentes em drogas ilícitas, como é o caso dos canabinoides na maconha, é uma área importante no âmbito forense. Focando-se nos compostos mencionados, seu isolamento se constitui em uma difícil tarefa devido à complexidade já relatada da matriz em questão, e também devido à presença de isômeros entre os constituintes dessa classe. Além disso, é importante ressaltar que a busca por padrões de referência de canabinoides é crucial, especialmente em países como o Brasil, onde plantio, cultivo e colheita da planta *Cannabis sativa* L. são proibidos. Muitos trabalhos científicos utilizam a planta em suas pesquisas,^{15,22,30-32} e não é comum se ver o uso de amostras de maconha apreendida para o isolamento de canabinoides, inclusive pelo fato de, geralmente, essas amostras apresentarem um estado de degradação avançado dos seus constituintes. Neste trabalho, algumas das técnicas analíticas citadas foram utilizadas na identificação e no isolamento de canabinoides. A seguir, é encontrada uma breve explanação sobre as mesmas.

1.2. Técnicas Analíticas

1.2.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Por ser uma espectroscopia, a RMN estuda a interação da matéria com a radiação eletromagnética, onde há absorção ou emissão de energia segundo a condição de frequência de Bohr: $|\Delta E|=h\nu$, sendo ΔE a diferença de energia entre os estados final e inicial da matéria em estudo, h a constante de Planck e ν a frequência da radiação.³

Na técnica em questão, amostras quando expostas a um campo magnético externo absorvem seletivamente ondas de rádio, são excitadas e, ao retornarem ao estado inicial, emitem energia no intervalo das radiofrequências (r.f.). A determinação precisa dos valores destas r.f. específicas emitidas e do modo com que a amostra regressa ao estado inicial (relaxação) fornece informações sobre a estrutura molecular da amostra e sobre a dinâmica interna e global das moléculas que a compõem.³

Para serem consideradas “ativas” em RMN, as moléculas devem possuir núcleos magnéticos, que são determinados por uma propriedade física inerente a eles denominada spin nuclear, como se os mesmos possuíssem um movimento de rotação em torno de um dos seus eixos. Este último está associado ao número quântico de spin nuclear (I) do núcleo, que pode assumir valor maior ou igual a zero, inteiro ou múltiplo de $\frac{1}{2}$. O mesmo é dado pela diferença entre prótons e nêutrons no núcleo, e somente exibem propriedades magnéticas (spin nuclear) os núcleos que apresentam I diferente de zero, que são os de massa atômica ou número atômico ímpares, ou ambos, como por exemplo, hidrogênio-1 (1_1H), carbono-13 (${}^{13}_6C$), flúor-19 (${}^{19}_9F$), fósforo-31 (${}^{31}_{15}P$).^{3,40,41}

A propriedade do spin nuclear é fundamental para o fenômeno de ressonância magnética nuclear. Os núcleos que o possuem, também possuem momento angular P , e carga, e o movimento desta carga dá origem a um momento magnético associado, μ , de acordo com a equação:⁴⁰

$$\mu = \gamma P \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde γ é a razão giromagnética, que é constante para cada nuclídeo e indica o quão fortemente magnético é o mesmo.

Os momentos angular e magnético apresentam magnitude e direção. Na ausência de campo magnético, os momentos magnéticos de um núcleo se espalham aleatoriamente, sem orientação preferida, entretanto, quando se aplica um campo magnético externo e estático, convencionado B_0 , seus momentos magnéticos alinham-se em relação ao mesmo, paralela ou antiparalelamente, como pode ser visto na Figura 7 para um núcleo de spin $\frac{1}{2}$.

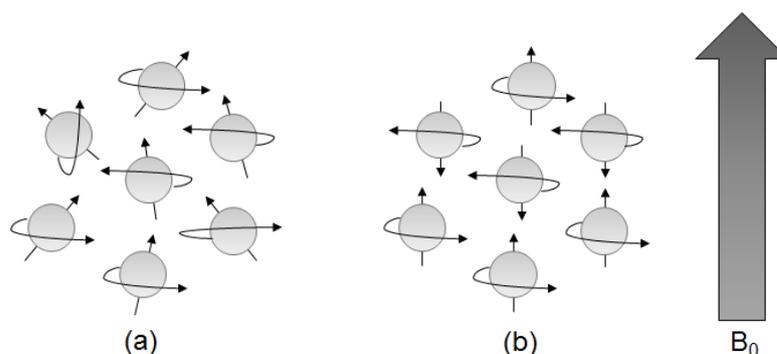


Figura 7. Alinhamento dos momentos magnéticos de um núcleo de spin $\frac{1}{2}$ (a) na ausência e (b) na presença de um campo magnético aplicado.^{41,42}

O número de estados de spin nucleares possíveis para um núcleo após a aplicação de B_0 é de $2I+1$, portanto, para um núcleo de spin $\frac{1}{2}$, como é o caso do hidrogênio (^1H), existem 2 estados possíveis, denotados $+\frac{1}{2}$ e $-\frac{1}{2}$ e denominados, respectivamente, de α e β . No estado α , de menor energia, o momento magnético do núcleo orienta-se paralelamente ao campo e no estado β , de maior energia, antiparalelamente. Vale lembrar, que na ausência de campo, estes estados são degenerados e que B_0 é convencionalmente aplicado ao longo do eixo z do plano cartesiano (Figura 8).⁴⁰

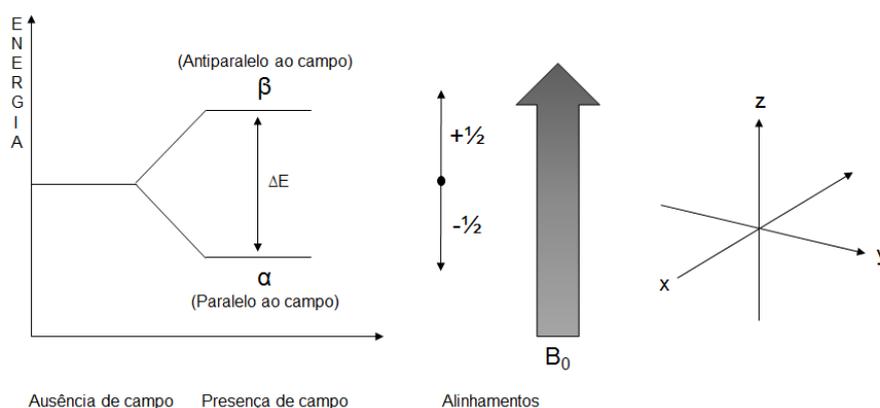


Figura 8. Estados de spin de um núcleo de spin $\frac{1}{2}$ na ausência e na presença de um campo magnético aplicado.^{40,41}

O efeito do campo no momento magnético pode ser descrito em termos de mecânica clássica, onde o campo B_0 impõe um torque sobre o momento, que por consequência adquire um movimento circular em torno do primeiro, se movendo em um cone e mantendo um ângulo constante com B_0 . Esse movimento é chamado de precessão, ou mais especificamente, de precessão de Larmor, como observado na Figura 9 ao lado.^{40,42}

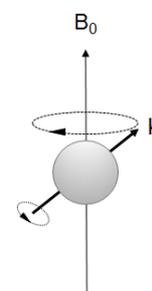


Figura 9. Movimento de precessão do núcleo.⁴⁰

A frequência deste movimento de precessão, ω_0 , é dada pela seguinte equação:

$$\omega_0 = -\gamma B_0 \text{ (rad.s}^{-1}\text{)} \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde γ é a razão giromagnética e B_0 o campo magnético.

Para spins nucleares, ω_0 recebe o nome de frequência de Larmor, e como pode ser visto acima, ela é proporcional ao campo magnético.⁴² Se ao invés de expressada na unidade de rad.s^{-1} (frequência angular) for expressada em Hz (ciclos por segundo), forma mais familiar, a Equação 3 deve ser dividida por 2π e se torna:

$$\nu = \frac{-\gamma B_0}{2\pi} \text{ (Hz)} \quad (\text{Eq. 4})$$

Em um campo magnético aplicado, todos os núcleos apresentam momentos magnéticos alinhados com o campo ou opostos a ele, e, o fenômeno de ressonância magnética nuclear ocorre quando o núcleo alinhado com B_0 muda o seu estado de spin ao absorver um quantum de energia, sendo esta última aplicada na forma de radiação eletromagnética, como mostrado na Figura 10 para um núcleo de spin $\frac{1}{2}$. Para a condição de ressonância ser satisfeita, a frequência desta radiação, que é emitida pelo espectrômetro, deve ser igual à frequência de Larmor do núcleo, e a energia envolvida neste processo, que é quantizada (ou seja, a energia absorvida deve ser igual à diferença de energia entre os dois estados envolvidos) e segue a condição de frequência de Bohr,³ é dada por:^{40,41}

$$\Delta E = h\nu = \frac{h\gamma B_0}{2\pi} \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde h é a constante de Planck.

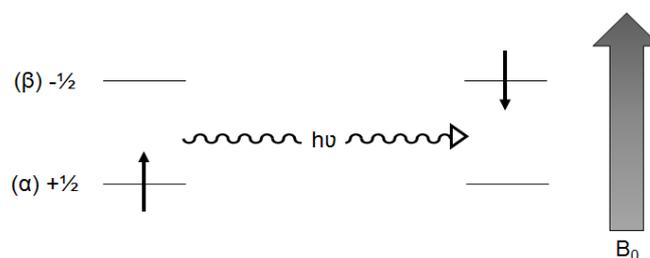


Figura 10. Processo de absorção de RMN para um núcleo de spin $\frac{1}{2}$.⁴¹

Desta forma, a frequência ressonante de um spin é simplesmente sua frequência de Larmor. Normalmente, a frequência de operação do espectrômetro é referida em termos de frequências ressonantes de hidrogênio (^1H), por exemplo, quando se diz utilizar um espectrômetro 400 MHz, que na verdade opera igualmente para o núcleo de carbono-13 (^{13}C), só que a 100 MHz para este último, visto que a razão giromagnética do H é em torno de quatro vezes maior que a do C ($\gamma_{\text{H}}/\gamma_{\text{C}} \approx 4$).⁴⁰

Considerando um conjunto de núcleos similares de spin $\frac{1}{2}$ em um campo magnético estático aplicado, e sabendo-se que os mesmos encontram-se em seus dois estados de spin permitidos α e β , no equilíbrio, haverá um pequeno excesso de núcleos no primeiro (spins orientados a favor do campo, paralelos a B_0), de energia ligeiramente menor que o segundo, como definido pela distribuição de Boltzmann:

$$\frac{N_{\alpha}}{N_{\beta}} = e^{\Delta E/K_B \cdot T} \quad (\text{Eq. 6})$$

Onde $N_{\alpha,\beta}$ representa o número de núcleos em cada uma dos estados de spin, K_B a constante de Boltzmann e T a temperatura.

Embora muito pequeno, este ligeiro excesso de núcleos no estado α permite a detecção de absorção de energia quando a condição de Bohr é realizada.³ O mesmo é pequeno devido ao fato da diferença de energia entre os estados de spin ser pequena, o que torna a RMN uma técnica não muito sensível quando comparada a outras técnicas analíticas como as Espectroscopias no Infravermelho (IV) e Ultravioleta-Visível (UV-VIS), aonde as diferenças de energia dos estados fundamental e excitado são maiores.^{3,40}

Como os spins nucleares (o pequeno excesso de população no estado alfa) não apresentam orientação preferida, estando apenas aleatoriamente distribuídos sobre o cone de precessão, e estão paralelos a B_0 e conseqüentemente ao eixo z, eles geram uma magnetização resultante M_0 nesta mesma direção, conforme a Figura 11 a seguir.⁴⁰

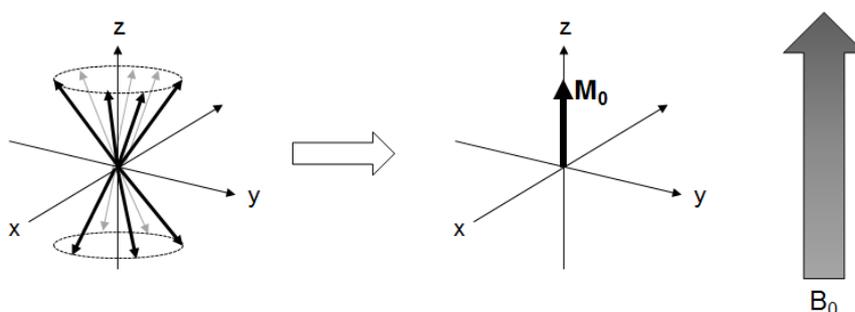


Figura 11. Os spins no estado alfa (pequeno excesso), no equilíbrio, se encontram paralelos a B_0 e são representados por um vetor de magnetização resultante M_0 .⁴⁰

Para explicar o comportamento desta magnetização resultante, é necessário relembrar o seguinte: para que ocorram transições de spin entre níveis de energia, ou seja, para que o fenômeno de ressonância magnética nuclear aconteça, é necessária a aplicação de energia na forma de radiação eletromagnética, ou melhor, de pulsos de radiofrequência (r.f.)³, e a frequência desta onda eletromagnética incidente deve ser igual à frequência de Larmor do núcleo, para que este entre em ressonância com a primeira.⁴¹

Então, na verdade o que ocorre é a aplicação de um campo magnético oscilatório dependente do tempo chamado B_1 , disposto no plano transversal, ou seja, perpendicular ao campo estático B_0 , com frequência ν oscilando na frequência de Larmor do spin. Este campo é provido pela componente magnética da radiofrequência aplicada, a qual é transmitida através de uma bobina localizada ao redor da amostra.⁴⁰

O pulso de radiofrequência, nada mais é, do que ligar esta radiação r.f. de amplitude definida por um período de tempo t , e após este, desligá-la.⁴⁰

Portanto, voltando a M_0 (Figura 11): sabe-se que esta magnetização resultante se alinha a B_0 pois a distribuição dos momentos magnéticos no cone de precessão em torno deste último é aleatória, todavia, quando se aplica um campo B_1 oscilatório, ocorre uma alteração nesta distribuição, o que faz com que M_0 sofra um deslocamento de um pequeno ângulo θ do eixo z, o que causa o aparecimento de uma magnetização no plano xy, com componentes M_x e M_y (Figura 12), que induz uma corrente elétrica numa bobina receptora gerando um sinal elétrico quando a condição de ressonância é atingida (quando ocorre absorção de radiação eletromagnética), o qual é captado em uma bobina.³

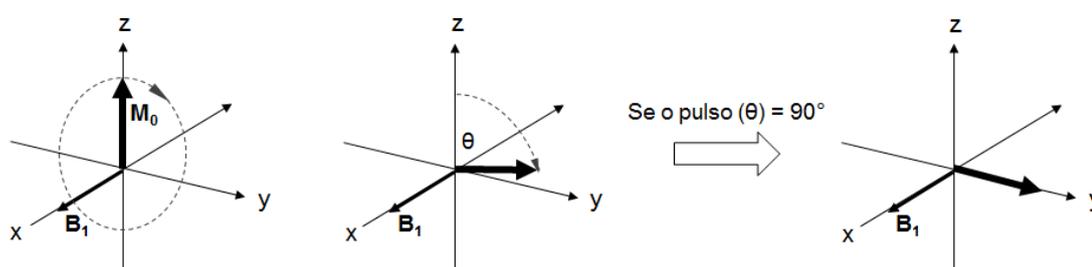


Figura 12. Quando um pulso de radiofrequência é aplicado, este faz com que M_0 se desloque de um ângulo θ do eixo z em direção ao plano x-y.⁴⁰

Como essa radiação eletromagnética se trata de aplicação de pulso de radiofrequência, após interrompê-lo, os momentos magnéticos excitados tendem a retornar à sua posição de equilíbrio, ou seja, o eixo z, num fenômeno denominado relaxação, emitindo a energia previamente absorvida. Como numa mesma molécula existem muitos núcleos distintos, muitas frequências de radiação eletromagnética diferentes são emitidas simultaneamente. Essa emissão é chamada de sinal de decaimento da indução livre (DIL), mais comumente conhecida como FID (*Free Induction Decay*), e sua intensidade decai com o tempo (Figura 13), à medida que os núcleos perdem sua excitação. Ao FID gerado na relaxação, obtido no domínio do tempo, aplica-se uma transformada de Fourier que, por conseguinte, o transforma no espectro de RMN, obtido no domínio da frequência, como apresentado na Figura 13 a seguir.⁴¹

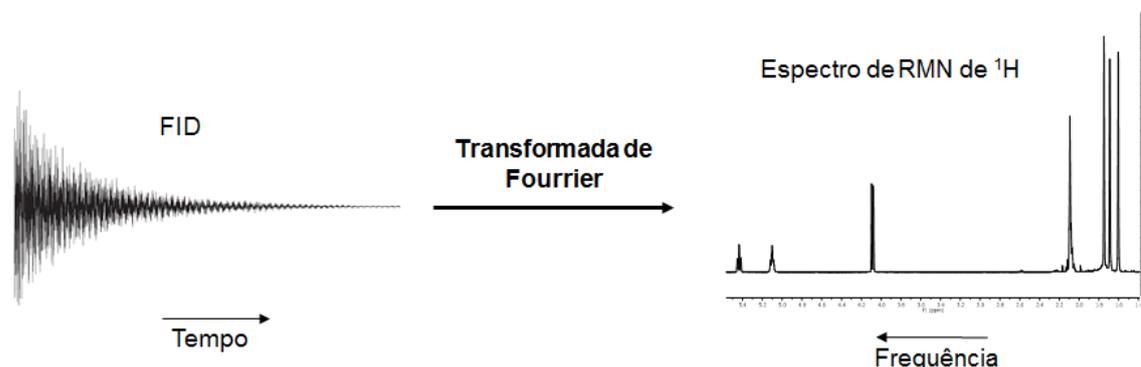


Figura 13. Sinal de decaimento de indução livre (DIL, ou mais comumente FID) de ^1H de uma amostra, obtido no domínio do tempo, que após aplicação da transformada de Fourier aparece como um espectro usual de RMN obtido no domínio da frequência.^{40,41}

Existem dois tipos de relaxação: a longitudinal, T_1 , e a transversal, T_2 . A relaxação longitudinal T_1 é a recuperação total da magnetização dos spins nucleares excitados (pelo campo oscilatório B_1) ao longo do eixo z , conforme Figura 14. Corresponde ao reestabelecimento do equilíbrio das populações, em consequência da transferência de energia dos spins para a vizinhança (meio ou rede) na forma de calor. Consequentemente, T_1 é também chamada de relaxação spin-rede. Entretanto, as energias envolvidas são tão pequenas que não se detecta mudanças de temperatura na amostra.^{3,40}

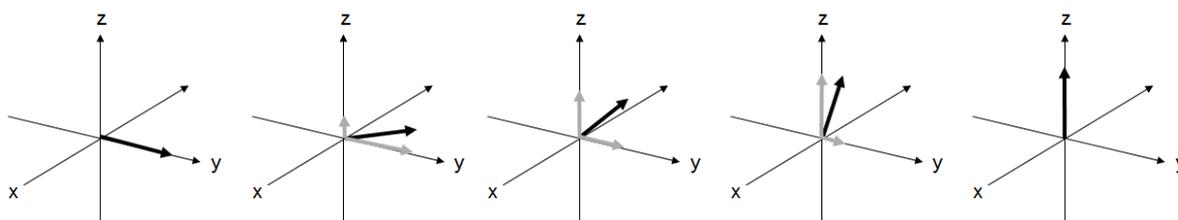


Figura 14. Relaxação longitudinal. Representação da recuperação da magnetização de um vetor, diminuindo a componente transversal (x - y) e reestabelecendo a componente longitudinal (z).⁴⁰

A relaxação transversal T_2 é a perda da magnetização no plano xy , que não necessariamente exige transferência de energia (como acontece em T_1). Corresponde a uma perda de coerência de fase entre os momentos magnéticos individuais no cone de precessão.³ A melhor forma de explicá-la é considerando a situação imediatamente após a aplicação de um pulso, por exemplo de 90° no eixo x , onde a magnetização transversal está em ressonância.⁴⁰

Como a magnetização resultante M_0 resulta da soma de muitos momentos magnéticos individuais dos núcleos que estão em coerência de fase após a aplicação do pulso, em uma amostra com spins semelhantes, seria de se esperar que estes

permanecessem estáticos após a aplicação de B_1 , ou seja, perfeitamente alinhados ao longo do eixo y , ver Figura 15.

Entretanto, isso só aconteceria se o campo magnético experimentado por cada spin na amostra fosse exatamente o mesmo. Como não o é, e na verdade alguns spins experienciam um campo local ligeiramente maior que outros, isso faz com que os primeiros tenham uma frequência maior e se espalhem à frente, enquanto outros irão experienciar um campo ligeiramente menor e começar a ficar para trás (Figura 15), o que resulta em uma defasagem dos momentos magnéticos individuais, ou seja, perda de coerência de fase, que leva à diminuição da magnetização resultante no plano transversal. T_2 também é chamada de relaxação spin-spin.⁴⁰

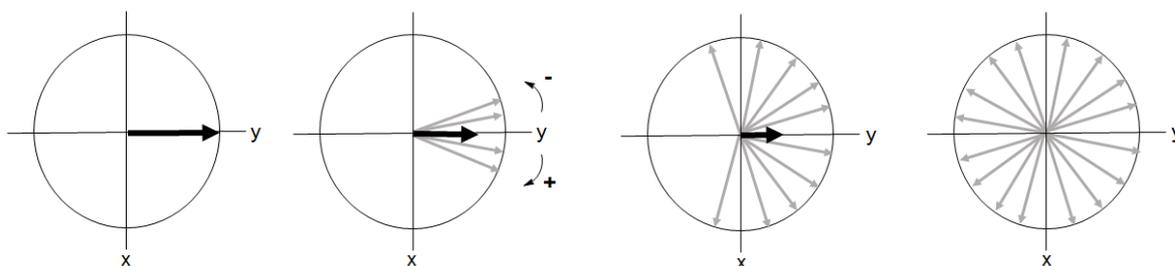


Figura 15. Relaxação transversal. Diferenças de campo local dentro da amostra fazem os spins precisarem com frequências ligeiramente diferentes, resultando em magnetização transversal nula.⁴⁰

O campo magnético experimentado por diferentes núcleos numa amostra, e até mesmo núcleos semelhantes, mas em situações diferentes na molécula, não é exatamente o mesmo devido à contribuição dos elétrons para o campo magnético total “sentido” pelo núcleo magnético.³ Mais especificamente, em um campo aplicado (B_0), os elétrons circulam, gerando um campo magnético secundário, induzido (B_{induzido}), de direção oposta ao campo magnético aplicado, num efeito denominado blindagem diamagnética ou anisotropia (Figura 16).⁴¹

Quanto maior for a densidade eletrônica ao redor do núcleo, maior o B_{induzido} que se opõe a B_0 , e desta forma, o primeiro, que blinda o núcleo, diminuiu o B_0 que este experimenta, fazendo com que o núcleo precesse em uma frequência mais baixa e conseqüentemente absorva radiação r.f. nesta frequência.⁴¹ Ou seja, dependendo do ambiente químico em que se encontram, ou melhor, do ambiente eletrônico em torno dos núcleos, estes absorvem e emitem energias r.f. distintas.^{3,41}

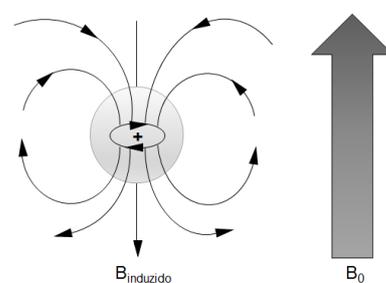


Figura 16. Blindagem diamagnética de um núcleo causada pela circulação dos elétrons.⁴¹

Um bom exemplo a ser dado é o dos grupos de núcleos semelhantes, CH₃, CH₂ e CH em uma molécula. Por terem em torno deles um ambiente eletrônico diferente, cada um destes grupos experienciam um campo magnético total ligeiramente diferente e absorvem radiações r.f. de frequências ligeiramente diferentes.³

Como os ambientes químicos em que os núcleos se encontram são ligeiramente diferentes, também o são as suas frequências de ressonância. Logo, por serem bem próximas, e por ser difícil medir frequências com tanta precisão, o que se faz é adicionar um composto de referência na amostra e medir as frequências de cada próton em relação aos prótons desta substância. O tetrametilsilano (TMS), de fórmula molecular (CH₃)₄Si, é o mais comumente utilizado e foi escolhido como referência pelos seguintes motivos: apresenta grupos metila com alta blindagem, sendo estes mais blindados do que a maioria dos prótons orgânicos; é inerte, volátil e solúvel na maioria dos solventes orgânicos; além de ser simétrico, e por esta razão, apresentar um único sinal de absorção, intenso e fino no espectro de RMN.^{41,43}

Como o que se mede é a diferença de frequência, a ressonância dos prótons do composto que está sendo medido é informada em termos de deslocamento (em Hz) em relação aos prótons do TMS. Visto que este deslocamento depende da intensidade do campo magnético aplicado e para evitar confusão quando se realizam medidas em diferentes campos, define-se um novo parâmetro independente da intensidade destes, o deslocamento químico (δ), dado pela seguinte equação:⁴¹

$$\delta = \frac{\text{deslocamento em Hz}}{\text{frequência do espectrômetro em MHz}} \quad (\text{Eq. 7})$$

Observa-se que o deslocamento químico é expressado em ppm (partes por milhão), na frequência de operação do espectrômetro. Com a relação da Equação 7, os valores de δ de um próton serão sempre os mesmos, independentemente do campo em que se realizou a medição. Nesta escala utilizada, convencionou-se 0,00 ppm à ressonância dos prótons do TMS, e a informação que δ traz é o quanto a ressonância de um próton é deslocada em relação a este composto de referência.⁴¹

O fenômeno do deslocamento químico faz da Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear uma poderosa técnica na identificação e elucidação estrutural de substâncias,³ sendo amplamente aplicada com este propósito. Um exemplo desta aplicação no tema do presente estudo encontra-se no trabalho previamente citado, de Choi et al. (2004a)²², onde os pesquisadores isolaram das flores da planta *Cannabis sativa* L. e analisaram por RMN de ¹H e de ¹³C alguns canabinoides.

1.2.2. Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

A cromatografia é um método físico-químico de separação de compostos presentes em misturas. Envolve a distribuição dos mesmos entre duas fases, uma móvel (FM) e outra estacionária (FE). As duas fases podem ser de diferentes naturezas, e é possível combiná-las de diversas maneiras, o que gera diferentes tipos de métodos cromatográficos, como por exemplo, as cromatografias líquido-sólido, líquido-líquido, gás-sólido e gás-líquido, as duas últimas englobando a Cromatografia Gasosa (CG).^{44,45}

A cromatografia gás-líquido, mais comumente empregada, utiliza como fase estacionária um líquido pouco volátil, que é espalhado ou imobilizado a um suporte sólido ou às paredes de colunas capilares. Já a fase móvel, denominada gás de arraste, consiste em um gás quimicamente inerte, sendo utilizados, em geral, hélio (He), argônio (Ar), nitrogênio (N₂) ou hidrogênio (H₂). Nesta técnica, o princípio da separação envolve a partição das substâncias entre a fase líquida (FE) e a fase gasosa (FM).⁴⁴⁻⁴⁶

O instrumento que realiza a separação cromatográfica gás-líquido é chamado cromatógrafo a gás e é tipicamente constituído pelos seguintes componentes básicos: sistema de gás de arraste; sistema de injeção da amostra; coluna cromatográfica; sistema de detecção; e sistema de registro e tratamento de dados (Figura 17).^{44,46}

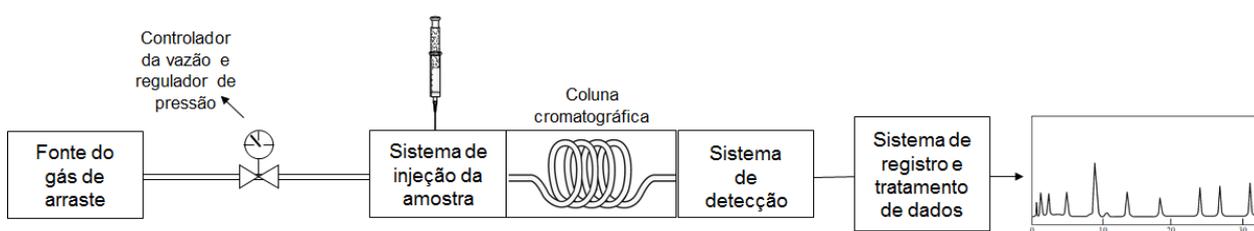


Figura 17. Esquema de um cromatógrafo a gás.^{44,46}

A amostra é injetada no cromatógrafo e imediatamente vaporizada numa câmara de injeção aquecida. Ela é então introduzida em um fluxo de gás (gás de arraste), sendo eluída e levada por ele para uma coluna contida em um forno termostaticado. Os componentes da amostra, à medida que esta passa através da coluna, são particionados e separados. Ao deixarem a coluna, os mesmos chegam ao detector, que gera um sinal para um sistema de registro e tratamento dos dados.⁴⁴⁻⁴⁶

Existem dois tipos de colunas utilizadas em CG: capilares (ou tubulares abertas) e recheadas. As primeiras são preparadas com capilares de sílica fundida com fase estacionária espalhada ou imobilizada na parede interna do capilar e as

últimas são construídas de aço inoxidável, vidro, sílica fundida, Teflon ou cobre (raramente) e recheadas com fase estacionária sólida (neste caso se tornando cromatografia gás-sólido) ou líquida (dispersa em um suporte sólido). Atualmente, as colunas capilares são largamente empregadas nas análises cromatográficas por serem mais eficientes e mais rápidas. Vale ressaltar que durante a análise a coluna pode ter sua temperatura mantida constante ou esta pode ser variada (aumentada) linearmente ou em etapas (programação de temperatura).^{44,46}

Na presente técnica, portanto, são analisadas substâncias voláteis e termodinamicamente estáveis. Primeiro para que passem através da coluna na forma de vapor e segundo, para que não se decomponham nas condições da separação, uma vez que a coluna é mantida sob temperaturas elevadas, podendo-se chegar até o limite máximo prático de 400°C.⁴⁴

Quanto aos sistemas de detecção, diversos detectores têm sido empregados em CG. Os quatro mais utilizados são os detectores de ionização em chama (DIC), de condutividade térmica (DCT), de captura de elétrons (DCE) e o espectrômetro de massas, sendo este último utilizado no presente trabalho e considerado um dos detectores mais poderosos para a CG.⁴⁶

A combinação da cromatografia gasosa com a espectrometria de massas é conhecida como CG-EM e permite a identificação de quase todos os compostos presentes em uma amostra. Consiste em um cromatógrafo (com coluna capilar), uma interface que liga os dois sistemas, uma câmara (fonte) de ionização, um analisador de massas mantido sob vácuo e um sistema de detecção acoplado a um sistema de registro de dados, como pode ser visto na Figura 18.^{44,46}

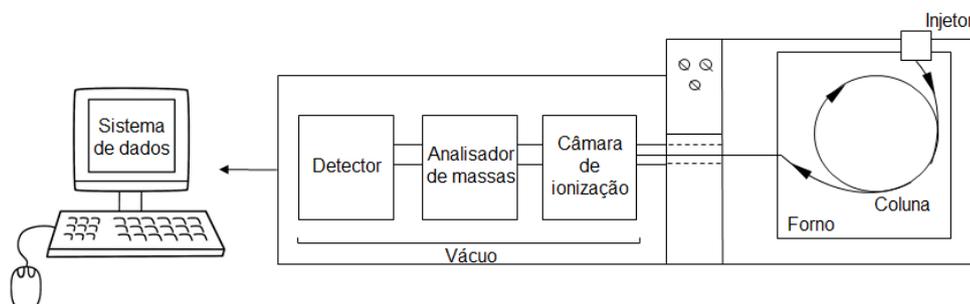


Figura 18. Esquema de um equipamento CG-EM.⁴⁴

Ao saírem da coluna, os compostos são direcionados através de uma interface para a câmara de ionização, onde são formados os íons que então deixam este compartimento e entram no analisador de massas, onde são separados de acordo com sua razão massa/carga (m/z) através da imposição de um campo elétrico ou

magnético externo. Após separados, os íons são detectados e um espectro de massas é produzido pelo sistema de dados. Este último é representado pela intensidade do sinal gerado por cada íon versus sua razão m/z e, para a identificação dos compostos presentes na amostra analisada, pode ser comparado a espectros de massas de padrões ou encontrados em bibliotecas (banco de dados) armazenadas no computador.⁴⁴⁻⁴⁶

É importante citar que o sistema de dados, a partir dos dados obtidos, também fornece cromatogramas convencionais que podem ser utilizados para quantificação.⁴⁴

Em CG-EM, as fontes de ionização empregadas são a ionização por impacto de elétrons (IE) e a ionização química (IQ), os analisadores mais comuns são os tipo quadrupolo e os de armadilha de íons (conhecidos como *ion trap*) e um detector comumente utilizado é o multiplicador de elétrons.^{44,46}

1.2.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE)

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE, ou do inglês, HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*) é um tipo de cromatografia líquida que, como fase estacionária (FE), utiliza colunas empacotadas (recheadas) com materiais especialmente preparados, e como fase móvel (FM), utiliza solventes líquidos eluídos sob altas pressões. Esta técnica se destaca pois consegue separar misturas com grande número de compostos, variados ou até mesmo similares, em diversas amostras, com alta resolução, eficiência e detectabilidade.⁴⁴⁻⁴⁶

Existem diferentes tipos de CLAE, sendo estes definidos pelo mecanismo de separação ou pelo tipo de fase estacionária utilizada. Existem a cromatografia líquido-líquido, na qual a separação é baseada no mecanismo de partição (tipo de CLAE mais utilizado), a cromatografia líquido-sólido (adsorção), a cromatografia de íons (troca iônica) e também as cromatografias por exclusão, por afinidade e quiral.⁴⁶

Na cromatografia por partição, empregada no presente trabalho, o material utilizado como fase estacionária que recheia a coluna é também um líquido, imiscível com o líquido da fase móvel. Na verdade, a coluna é empacotada com um suporte (normalmente partículas de sílica ou alumina), e a fase estacionária líquida é então ligada quimicamente ou fisicamente à superfície dele. Na última tem-se a chamada cromatografia líquido-líquido e na primeira, cromatografia líquida com fase ligada, que atualmente predomina por sua maior estabilidade.^{45,46}

Quando a fase ligada (fase estacionária) é constituída de grupos polares como por exemplo amino ($-\text{NH}_2$), nitrilo ($-\text{CN}$) ou diol ($-\text{CH}_2(\text{OH})_2$), tem-se a chamada cromatografia em fase normal. Quando os grupos são de natureza apolar, como octil ($-\text{C}_8\text{H}_{17}$), octadecil ($-\text{C}_{18}\text{H}_{37}$), fenil ($-\text{C}_6\text{H}_5$), metil ($-\text{CH}_3$), etc., tem-se a cromatografia em fase reversa, que é mais comumente empregada em CLAE, e inclusive foi usada no trabalho.^{44,46} Nesta técnica, atualmente, as fases ligadas contendo grupos octil e octadecil são as mais largamente utilizadas. É comum referir-se às colunas como sendo tipos C8 e C18, respectivamente.^{45,46}

Na cromatografia em fase reversa utiliza-se fases móveis relativamente polares. Normalmente, uma mistura de água e solventes orgânicos como metanol, acetonitrila ou tetraidrofurano, sendo esses os três de maior uso devido à dificuldade de se terem solventes orgânicos miscíveis em água. É importante ressaltar que os solventes devem ser de altíssima pureza (grau cromatográfico) e antes de serem usados devem ser desgaseificados. Ainda nesta vertente, em CLAE existem dois modos de eluição: isocrático e por gradiente. O primeiro consiste em manter constante a composição da fase móvel durante toda a separação cromatográfica, ou seja, um único solvente ou mistura de solventes numa mesma porcentagem é utilizado. Já no segundo, a composição da fase móvel varia durante a separação, logo, as porcentagens dos solventes utilizados são modificadas no decorrer da análise.^{2,44-46}

A Figura 19 a seguir exhibe a instrumentação básica de um equipamento típico de CLAE. O mesmo é constituído pelos seguintes componentes: reservatório de fase móvel, bomba de alta pressão, sistema de injeção, coluna cromatográfica, detector e sistema de aquisição de dados.⁴⁴

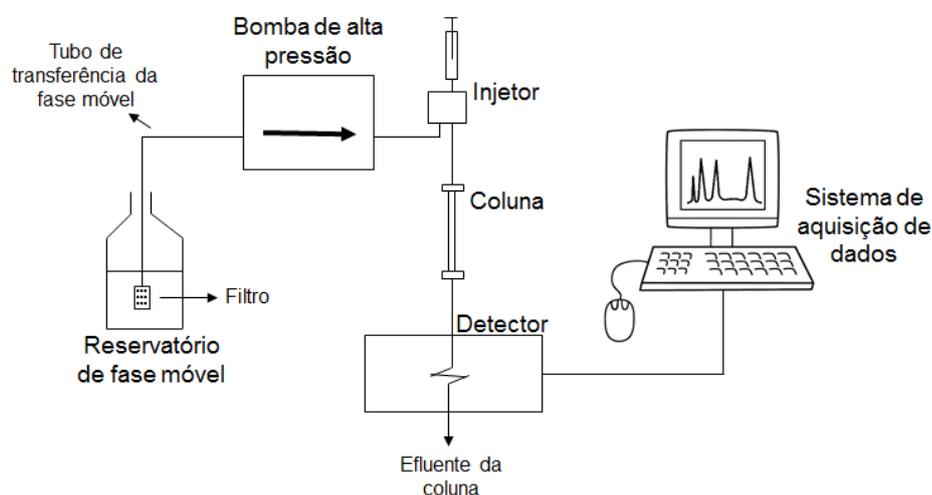


Figura 19. Esquema de um equipamento de CLAE típico.⁴⁴

Primeiramente, antes da amostra ser injetada, a fase móvel, numa vazão controlada, é bombeada sob alta pressão através da coluna. Ao se obter uma linha de base estável, injeta-se então a amostra (previamente diluída na fase móvel ou em um solvente mais fraco que ela e filtrada), que é arrastada pela FM ao longo da coluna, ocorrendo a separação dos compostos, que ao saírem dela são detectados. Sinais são gerados e enviados para um sistema de registro e tratamento de dados, produzindo um cromatograma, que é representado pela resposta do detector em função do tempo de retenção. Neste, aparecerem bandas, uma para cada composto presente na amostra analisada e, a concentração de cada um deles é proporcional à altura ou à área da banda.⁴⁴

Os reservatórios de fase móvel são geralmente de vidro, as bombas de alta pressão têm a função de enviar a fase móvel para a coluna num fluxo constante e reprodutível e as injeções podem ser realizadas com válvulas manuais ou por sistema de injeção automática.^{2,44}

As colunas são geralmente tubos de aço inoxidável fechados e podem ser classificadas como analíticas, semi-preparativas e preparativas, de acordo com seu diâmetro interno. No geral, as analíticas têm diâmetro interno de 2 a 5 mm, comprimento de 5 a 30 cm, e tamanho de partícula de fase estacionária de 3 a 5 μm . As semi-preparativas possuem diâmetro interno de 8 mm e comprimento de 10 cm. E as preparativas podem ter diâmetro interno de 20 mm e 30 cm de comprimento.^{2,44,45} Vale lembrar que os equipamentos mais modernos possuem forno para o controle isotérmico da temperatura da coluna.²

Por fim, existem diversos tipos de detectores, que devem ser escolhidos de acordo com a natureza da amostra que se deseja analisar: por índice de refração, por condutividade elétrica, por fluorescência, por espalhamento de luz, eletroquímico, espectrômetro de massas e por absorvância no ultravioleta e no visível.^{44,46}

Dentro desta última classe, de grande uso em CLAE, existem três tipos de detectores: fotométrico de comprimento de onda fixo, espectrofotométrico de comprimento de onda variável e espectrofotométrico por arranjo de diodos (DAD), que foi o utilizado no trabalho. É possível detectar vários comprimentos de onda simultaneamente com este detector. A Figura 20 mostra o esquema do seu funcionamento.⁴⁴

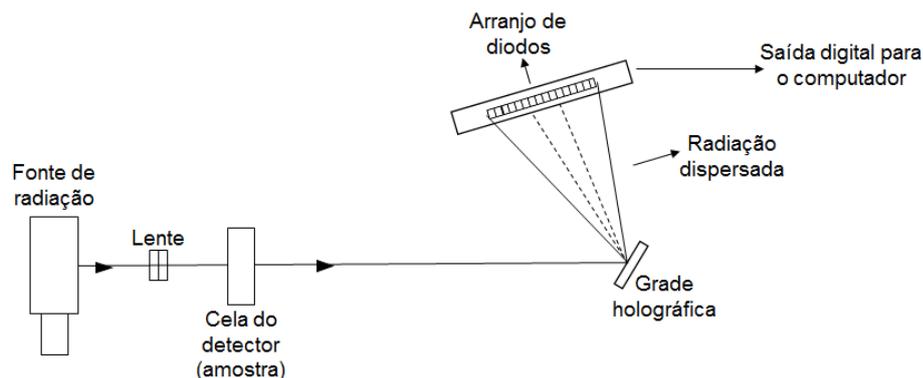


Figura 20. Funcionamento do detector por arranjo de diodos (DAD).⁴⁴

Tem-se uma fonte contínua de radiação (geralmente lâmpada de deutério) e toda a luz passa pela cela do detector (cubeta de fluxo contínuo por onde passa a fase móvel que sai da coluna). Ao chegar na grade de difração holográfica, a radiação é então dispersada nos comprimentos de onda resultantes que compõem a grade e focalizada sobre um arranjo (uma fila) de fotodiodos (de 256 a 1024), fazendo com que todo o espectro possa ser armazenado utilizando-se um computador (sistema de dados).^{2,44}

1.2.3.1. Cromatografia por Exclusão (ou Cromatografia em Gel)

Também foi utilizada neste trabalho uma outra forma de cromatografia, a Cromatografia por Exclusão, que tem como princípio a separação de moléculas presentes numa amostra baseada em seus tamanhos.^{44,45}

Nesta técnica, utiliza-se como fase estacionária um material polimérico reticulado e poroso, denominado gel, constituído de macromoléculas que apresentam ligações cruzadas e também afinidade pelo solvente a ser utilizado como fase móvel, porém, que são insolúveis neste. Na verdade, essas partículas são inchadas com a FM, e a fase estacionária torna-se então o líquido contido nos poros do gel. Logo, as moléculas penetram ou não no gel no decorrer de sua passagem pela coluna (o que está baseado em efeitos estéricos) e sua distribuição nas duas fases e consequentemente seus movimentos e velocidades na coluna dependem do caráter desse gel. Moléculas pequenas penetram mais facilmente no gel, ficando mais tempo retidas, enquanto moléculas grandes passam mais rápido pela coluna, desta forma, ocorrendo a separação.^{44,45}

Um material muito comum utilizado como fase estacionária neste tipo de cromatografia é chamado Sephadex. Consiste em um gel de dextrana (polissacarídeo

com unidades de glicose obtido por fermentação de sacarose) muito estável quimicamente. De fato, ele é um carboidrato polimérico reticulado, e o grau de reticulação é que determina o tamanho dos “orifícios” (poros) na matriz polimérica. Como em sua estrutura são encontrados grupos hidroxila, estes podem adsorver água, o que faz este material inchar, e, à medida que ele expande, são criados os orifícios na matriz.^{44,45}

Uma atenção especial deve ser dada ao Sephadex LH-20, que possui alguns dos grupos hidroxila alquilados, e desta forma apresenta um caráter “orgânico”, podendo então ser utilizado em separações que utilizam solventes não aquosos, ou melhor, podendo ser utilizado com diversos solventes orgânicos, como álcool, acetona, diclorometano, etc.^{44,45}

1.2.4. Espectrometria de Massas por Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier utilizando-se *Paper Spray* como Fonte de Ionização Ambiente (PS-FT-ICR MS)

A Espectrometria de Massas (EM, ou do inglês *Mass Spectrometry*, MS) é uma técnica analítica baseada em dois métodos: ionização dos compostos a serem estudados e separação dos íons formados. Nesta técnica, os compostos de interesse são ionizados e os íons formados são separados com base nas suas razões massa/carga (m/z).⁴³ Destaca-se aqui, que na EM, apenas espécies iônicas são analisadas, e, para formá-las, necessita-se de instrumentação adequada.⁴⁷

Os espectrômetros de massas são divididos em cinco compartimentos, como pode ser visto na Figura 21 a seguir. O primeiro compreende a unidade de entrada da amostra, que a leva do ambiente laboratorial para o equipamento; este último leva a amostra até a fonte de ionização (ou fonte de íons), onde suas moléculas são transformadas em íons em fase gasosa, que são, então, acelerados por um campo eletromagnético; o terceiro compartimento, o analisador de massas, é responsável por separar os íons da amostra de acordo com suas razões massa/carga (m/z); este é então seguido pelo detector, que conta os íons; e por fim, o sinal gerado é registrado e processado pelo sistema de dados, normalmente um computador, fornecendo um espectro de massas, que representa a abundância relativa dos sinais dos íons em função de sua razão m/z .⁴¹ É importante ressaltar que os espectrômetros operam em pressões mais baixas, para que os íons formados não colidam com outras moléculas neutras não ionizadas.^{41,44}

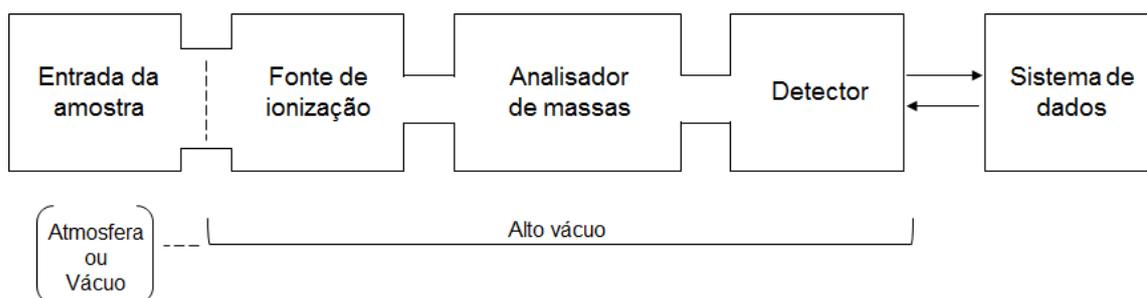


Figura 21. Esquema geral de um espectrômetro de massas com seus cinco compartimentos.⁴¹

Destas etapas pelas quais a amostra passa ao ser analisada, destacam-se as diversas fontes de ionização e os diversos analisadores de massas (considerados o coração dos espectrômetros de massas) existentes, os quais determinam a aplicabilidade da técnica de EM.^{43,47}

No presente trabalho, utilizou-se *paper spray* (PS) como fonte de ionização ambiente e analisador de massas por Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier (FT-ICR).

Primeiramente, a fonte de ionização ambiente é uma forma de ionização que envolve amostragem e ionização diretas das amostras em seus estados naturais, sem a necessidade de pré-tratamento das mesmas antes de serem analisadas por espectrometria de massas. Os experimentos são realizados em condição atmosférica e são caracterizados por apresentar alta velocidade de análise, simplicidade, alta eficiência, alta especificidade química e baixo custo. Além disso, as ionizações ambientes são aplicadas a amostras sólidas, líquidas e gasosas.^{48,49}

Inserido neste tipo de ionização encontra-se o método de ionização *paper spray*, que consiste na aplicação de alta tensão a um substrato de papel com solvente adequado aplicado, de formato triangular contendo a amostra bruta (Figura 22).⁵⁰

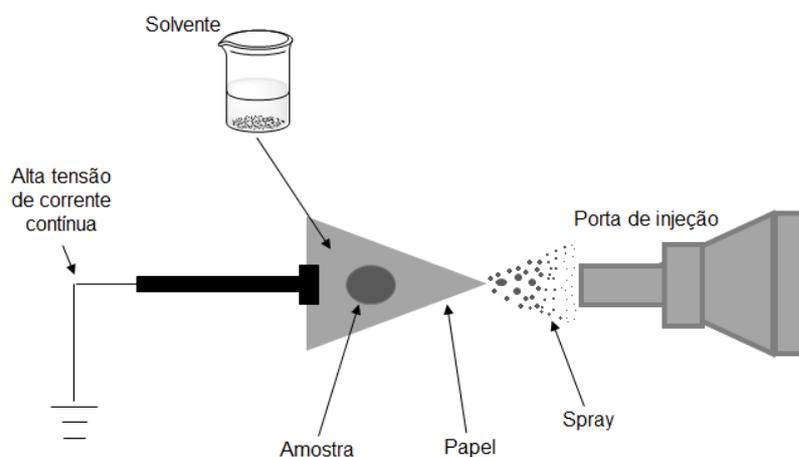


Figura 22. Desenho esquemático do método de ionização *paper spray*.⁴⁸

Mais especificamente, aplica-se a amostra ao meio da superfície de um substrato de papel triangular que é segurado por um grampo de metal conectado a uma fonte de alimentação de alta tensão. O papel é posicionado em frente à entrada do espectrômetro de massas, e a ele adiciona-se solvente (que deve dissolver os compostos de amostra). Aplica-se, então, a alta tensão (de corrente contínua, cuja magnitude pode ser alterada de acordo com o solvente utilizado) ao papel, fazendo com que os compostos da amostra presentes no solvente sejam transferidos para a ponta deste. Quando este solvente chega à ponta do papel, devido ao forte campo elétrico aplicado a este, ocorre a formação de gotículas carregadas (*spray*), que são emitidas do papel, e os íons formados são então rapidamente detectados pela EM.^{48,51}

Algumas condições e parâmetros normalmente utilizados no método de ionização *paper spray* são os seguintes: para amostras líquidas, usa-se de 0,4 a 20 μL de amostra e para amostras sólidas, de 1 a 10 mg; do solvente que é adicionado para formar o *spray* são necessários de 10 a 30 μL ; e a alta tensão que é aplicada ao papel apresenta magnitude de 3 a 5 kV.⁵¹

No analisador de massas por Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier (FT-ICR), considerado como de extraordinário valor analítico pelo fato de apresentar ultra alto poder de resolução e exatidão de massas,⁵² os íons são mantidos em uma célula com um potencial elétrico de aprisionamento, a qual encontra-se dentro de um forte campo magnético (no centro de um magneto supercondutor).⁴³

Dentro da célula (ou cela de ICR), cada íon de massa m e carga q executa um movimento circular em um plano perpendicular à direção do campo magnético espacialmente uniforme B (Figura 23), denominado movimento ciclotrônico, com uma frequência ciclotrônica, ω_c , que é proporcional à sua razão massa/carga e dada pela seguinte equação.^{43,53}

$$\omega_c = \frac{qB}{m} \quad (\text{Eq. 8})$$

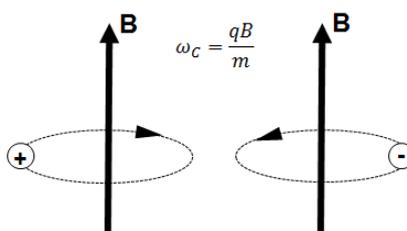


Figura 23. Movimento ciclotrônico do íon. Íons positivos e negativos se movimentam em sentidos opostos.⁵³

Pelo fato dos movimentos ciclotrônicos dos íons aprisionados na cela de ICR terem que ser espacialmente coerentes (sincronizados) para serem detectáveis,⁵³ um pulso de radiofrequência com valor igual ao da frequência ciclotrônica é então aplicado à célula, fazendo com que todas as frequências ciclotrônicas entrem em ressonância simultaneamente e, por consequência, permitindo que os movimentos dos íons sejam detectados, gerando um interferograma (conceitualmente similar ao FID em RMN), espectro obtido no domínio do tempo, que ao ser submetido à transformada de Fourier passa a ter como domínio a frequência, e após uma simples manipulação matemática, resulta então, num espectro de massas (m/z) convencional.^{43,47}

Resumindo, o analisador de massas FT-ICR tem seus experimentos baseados em uma sequência de eventos: 1) criação de íons, ou a injeção destes, em um campo magnético B, e aprisionamento deles por um potencial eletrostático; 2) excitação por radiofrequência (r.f.) de seus movimentos ciclotrônicos (coerentes); 3) detecção e registro de seus sinais de carga de imagem; e 4) aplicação da transformada de Fourier nos sinais transitórios observados, seguido da redução dos dados gerados para se obter o espectro de massas convencional.⁵²

Nos espectrômetros com analisadores FT-ICR todos os íons de um único evento de ionização podem ser aprisionados e analisados, em razão disso, o método torna-se muito sensível. Além do mais, o fato destes equipamentos apresentarem adaptabilidade a uma ampla gama de fontes de ionização, incluindo as fontes externas, faz com que sejam bastante atrativos e largamente utilizados.^{43,52}

1.3. Quimiometria e a Análise de Componentes Principais (ACP)

Quimiometria pode ser definida como a área da Química que utiliza métodos matemáticos, estatísticos e computacionais para: planejar ou selecionar condições otimizadas de medidas e experimentos e prover o máximo de informação química a partir da análise de dados obtidos.⁵⁴⁻⁵⁷

A análise de dados é uma parte essencial em todo experimento, sendo univariada, quando somente uma variável é medida sistematicamente para várias amostras, ou multivariada, quando se pode medir muitas variáveis simultaneamente ao se estudar uma amostra qualquer.^{57,58} Esta última, por considerar a correlação entre muitas variáveis, permite a extração de uma quantidade de informação muito maior do que a primeira, e por isto, é amplamente empregada na Quimiometria, que

é uma ferramenta de tratamento destes dados.⁵⁸

Como a Quimiometria trabalha com conjuntos de dados, de maneira geral, pode-se dizer que, de um certo número de objetos descritos por um determinado número de variáveis é formado um conjunto de dados. São considerados objetos químicos, por exemplo, espectros ou cromatogramas, compostos, amostras analíticas, etc.; e variáveis, as características ou propriedades desses objetos, as quais normalmente estão relacionadas à sua composição, como concentrações dos elementos mais importantes, alturas de picos em perfis cromatográficos, etc.⁵⁹

Na análise multivariada, o conjunto de dados é organizado em uma matriz \mathbf{X} ($n \times m$), de variáveis independentes, onde as linhas representam as amostras e as colunas as variáveis (Figura 24).^{54,56,60}

$$\mathbf{X} = \begin{pmatrix} X_{11} & X_{12} & \dots & X_{1m} \\ X_{21} & X_{22} & \dots & X_{2m} \\ \cdot & \cdot & & \cdot \\ \cdot & \cdot & & \cdot \\ \cdot & \cdot & & \cdot \\ X_{n1} & X_{n2} & \dots & X_{nm} \end{pmatrix}$$

Figura 24. Representação da matriz \mathbf{X} ($n \times m$), de variáveis independentes. Linhas = amostras e colunas = variáveis.⁵⁶

Entretanto, vale lembrar que é fundamental que os dados experimentais sejam pré-processados, pois se estes não apresentarem uma distribuição adequada para a análise multivariada, podem dificultar a extração de informações úteis e também a sua própria interpretação. As técnicas de pré-processamento têm por objetivo eliminar as informações irrelevantes do ponto de vista químico, com isso, tornando a matriz de dados mais adequada para a análise. Alguns exemplos são a normalização dos dados (por exemplo, espectros), a centralização dos dados na média, a derivação (onde deslocamento e inclinação de linha de base são corrigidos) e a suavização utilizando o algoritmo de Savitzky-Golay, dentre outras.^{54,56}

A Quimiometria apresenta diversas subáreas, dentre estas, destacam-se três: planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões (métodos de análise exploratória de dados e classificação de amostras) e calibração multivariada.^{54,59} Nas duas primeiras áreas os métodos quimiométricos são aplicados com propósitos qualitativos, enquanto na última com propósitos quantitativos.⁶⁰

De maneira resumida, na área de planejamento de experimentos, o que se faz em um determinado processo é, além de encontrar as variáveis que mais o afetam,

também verificar a interação entre estas variáveis. No reconhecimento de padrões, busca-se obter agrupamentos de amostras que são semelhantes entre si, conseqüentemente, identificando-se tendências nos dados estudados, os quais são provenientes de uma enorme quantidade de informações (por exemplo, medidas químicas ou espectrais) sobre estes objetos. Por fim, na calibração multivariada, tenta-se criar um modelo que relacione algumas medidas (químicas ou espectrais) realizadas em amostras com uma propriedade definida (concentração, por exemplo).⁵⁴

Voltando ao Reconhecimento de Padrões (RP), como já mencionado, nesta área a análise exploratória é utilizada com o objetivo de visualizar a estrutura do conjunto de dados estudado, e, assim, tentar detectar padrões de agregação no mesmo (similaridades entre amostras), desta forma, permitindo o estabelecimento de relações entre objetos e variáveis, a descoberta de objetos anômalos (*outliers*) ou o agrupamento de objetos. Os métodos de análise exploratória, que, por meio de gráficos a duas ou três dimensões, permitem a interpretação multivariada de conjuntos de dados complexos, são classificados em supervisionados (quando necessitam de informação prévia sobre as amostras para a formação das classes) ou não supervisionados (quando não necessitam de informação inicial sobre as amostras, buscando apenas identificar agrupamentos naturais entre elas). Um método não supervisionado largamente empregado na área de RP é o chamado Análise de Componentes Principais, ACP (do inglês, *Principal Component Analysis*, PCA).^{54,59}

Na verdade, a ACP é a base para diversos métodos dentro desta última área, e também na classificação e na calibração multivariada. O mesmo começou a ser utilizado como método de classificação em Química nos anos 70, e hoje, é considerado um dos métodos mais importantes em Quimiometria.^{54,59,61}

Seu principal objetivo é reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados, porém, mantendo o máximo da informação.^{54,59} Isto é conseguido através da criação de um novo sistema de eixos, denominados componentes principais (CP), onde o conjunto de dados é então representado. Desta forma, consegue-se, em poucas dimensões, visualizar a natureza multivariada deles.⁵⁴

Antes de se aplicar a ACP, tem-se um espaço n-dimensional (n sendo o número de variáveis) no qual as amostras são consideradas pontos. Após a aplicação deste método, chega-se a espaços de dimensões reduzidas definidos pelas CPs (bi ou tridimensionais) e agora as amostras passam a ser pontos localizados nestes.⁵⁴

Matematicamente, na ACP, a matriz X é decomposta de acordo com a seguinte equação:

$$X = TP^T + E \quad (\text{Eq. 9})$$

Onde as duas matrizes T e P são denominadas, respectivamente, escores (T) e pesos ou *loadings* (P), e E é uma matriz de erros.⁵⁴ Esta mesma relação pode ser ilustrada na Figura 25 a seguir, onde plotando-se a matriz T tem-se uma figura dos “padrões de objetos” dominantes da matriz X , e, analogamente, plotando-se a matriz P^T , tem-se os “padrões de variáveis” complementares.⁶²

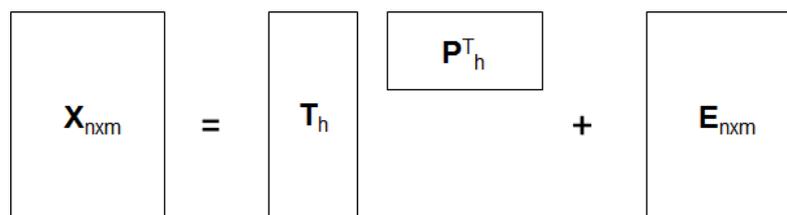


Figura 25. Representação gráfica da decomposição da matriz X realizada pela ACP em duas matrizes T de escores e P de pesos (*loadings*) e outra matriz E de erros.^{58,62}

Como ao se aplicar a ACP tem-se um novo sistema de eixos formados pelas componentes principais, os escores representam as coordenadas das amostras neste sistema (são as projeções das amostras na direção da CP), Figura 26(a), e, visto que as CPs são originadas pela combinação linear das variáveis originais, chamam-se de pesos (*loadings*) os coeficientes dessa combinação.^{54,58}

Os *loadings*, por serem os cossenos dos ângulos entre as variáveis originais e as componentes principais (Figura 26(b)), representam o quanto cada variável original contribui para uma determinada CP. A primeira componente principal, CP1, é a combinação linear de máxima variância (informação). Ela é traçada no sentido da maior variação no conjunto de dados. As demais componentes, sucessivas à primeira, CP2, CP3, etc., ortogonais entre si, têm por objetivo descrever a maior porcentagem da variação não explicada pela CP anterior. Já os escores representam as relações de similaridade entre as amostras.^{54,59}

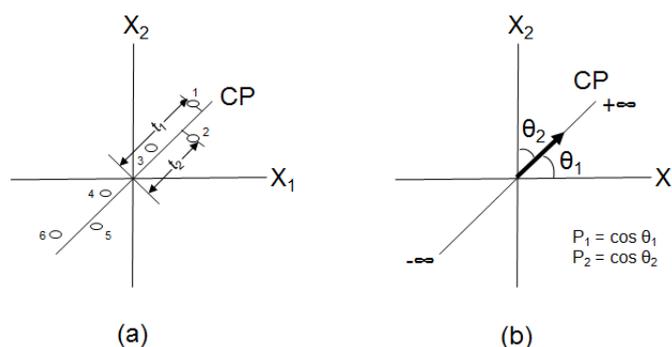


Figura 26. Representação de uma componente principal (CP) para duas variáveis. (a) os escores são as projeções das amostras na direção da CP, e (b) os *loadings* são os cossenos do vetor direção.^{58,60}

Ao observar o gráfico dos escores, nota-se que algumas variáveis contribuem mais para os agrupamentos do que outras. Esta constatação é realizada através da avaliação dos *loadings*. E, analisando-os juntamente com o gráfico de escores, é possível identificar quais variáveis são responsáveis pelas diferenças observadas entre as amostras.⁵⁴

O que determina o número de componentes principais que serão utilizadas na ACP é a porcentagem de variância explicada. Então, seleciona-se um número de componentes que irão capturar a maior porcentagem da variação presente no conjunto de dados originais.⁵⁴

Normalmente, estas informações relevantes se concentram nas duas ou três primeiras CPs, pelo fato destas serem calculadas em ordem decrescente de importância. Assim, essas componentes são selecionadas e analisadas a fim de se encontrar padrões. Quando se fala em padrões, fala-se em similaridade, e o que define esta última entre, por exemplo, dois objetos (ou duas variáveis) representados por dois pontos no novo espaço dimensional reduzido, é a distância entre eles. Logo, quanto menor essa distância, maior a similaridade entre os mesmos.⁵⁹

Na literatura existem muitos trabalhos sobre *Cannabis sativa* L. envolvendo a associação de técnicas espectroscópicas com a ACP. Um deles é o estudo de Choi et al. (2004b), onde os autores utilizaram a RMN de ¹H em conjunto com a ACP para a análise metabolômica de 12 cultivares desta planta. Segundo os pesquisadores, o método criado permitiu uma eficiente diferenciação, sem quaisquer etapas de purificação, mostrando ser RMN de ¹H e ACP juntas uma ferramenta promissora para a autenticação e o controle de qualidade de cultivares de *Cannabis sativa* L.³²

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi identificar os canabinoides presentes em amostras de maconha apreendidas no estado do Espírito Santo através de técnicas analíticas como Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H) e Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) e isolá-los através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

2.2. Objetivos específicos

- Otimizar a identificação por RMN avaliando diferentes métodos de extração com diferentes solventes.
- Interpretar e identificar os canabinoides a partir de RMN de ^1H e CG-EM.
- Gerar materiais de referência a partir da separação por CLAE.
- Utilizar a Espectrometria de Massas (EM) na corroboração dos resultados obtidos pelas técnicas anteriores.
- Utilizar RMN e EM aliadas a técnicas quimiométricas com o intuito de verificar a possibilidade de as amostras de maconha seguirem algum padrão de acordo com as regiões de apreensão, sazonalidade, degradação, etc.

3. METODOLOGIA

3.1. Coleta das amostras

As amostras de maconha utilizadas no estudo foram cedidas pela Polícia Civil do Estado do Espírito Santo (PC-ES) através do Acordo de Cooperação Técnica nº 23068.011398/2012-72 que a mesma possui com a Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e são provenientes de apreensões.

O Estado do Espírito Santo é dividido em quatro macrorregiões de planejamento: Norte, Central, Metropolitana e Sul (Figura 27).⁶³

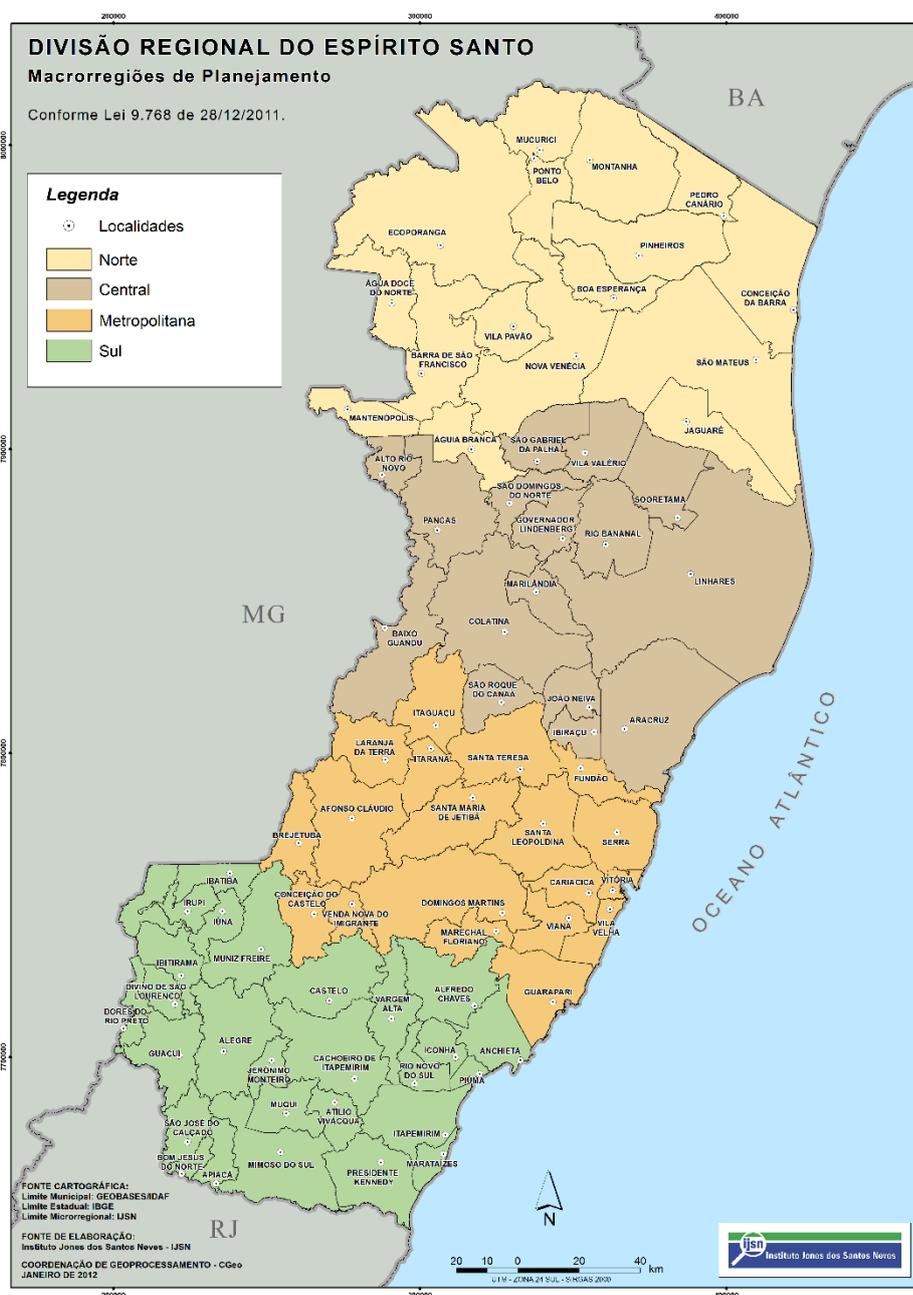


Figura 27. Mapa da divisão regional do Espírito Santo.⁶³

Foram coletadas 3 amostras para cada uma das quatro macrorregiões por mês, entre o período de julho/15 a julho/14, totalizando 156 amostras. Estas foram nomeadas de acordo com sua macrorregião, mês e ano de apreensão, assim, N2_01_15 significa amostra 2 da macrorregião Norte apreendida em janeiro de 2015.

A coleta foi realizada de forma a aproveitar a diversidade das cidades do estado com apreensões de maconha. O Quadro 2 abaixo traz as informações a respeito das amostras.

Quadro 2. Amostras coletadas e suas especificações.

Mês/Ano	Amostra	Macrorregião	Município
Julho/2015	N1_07_15	Norte	Boa Esperança
	N2_07_15		São Mateus
	N3_07_15		Nova Venécia
	C1_07_15	Central	Aracruz
	C2_07_15		Linhares
	C3_07_15		Aracruz
	M1_07_15	Metropolitana	Vila Velha
	M2_07_15		Cariacica
	M3_07_15		Serra
	S1_07_15	Sul	São José do Calçado
	S2_07_15		Anchieta
	S3_07_15		Cachoeiro de Itapemirim
Junho/2015	N1_06_15	Norte	Barra de São Francisco
	N2_06_15		Montanha
	N3_06_15		São Mateus
	C1_06_15	Central	São Gabriel da Palha
	C2_06_15		Aracruz
	C3_06_15		Colatina
	M1_06_15	Metropolitana	Vitória
	M2_06_15		Serra
	M3_06_15		Cariacica
	S1_06_15	Sul	Cachoeiro de Itapemirim
	S2_06_15		Guaçuí
	S3_06_15		Itapemirim
Maio/2015	N1_05_15	Norte	São Mateus
	N2_05_15		Ecoporanga
	N3_05_15		São Mateus
	C1_05_15	Central	Colatina
	C2_05_15		Aracruz
	C3_05_15		Linhares
	M1_05_15	Metropolitana	Viana
	M2_05_15		Serra
	M3_05_15		Guarapari
	S1_05_15	Sul	Alegre
	S2_05_15		Muqui
	S3_05_15		Rio Novo do Sul
Abril/2015	N1_04_15	Norte	Barra de São Francisco
	N2_04_15		Barra de São Francisco
	N3_04_15		Nova Venécia

Mês/Ano	Amostra	Macrorregião	Município
Abril/2015	C1_04_15	Central	Aracruz
	C2_04_15		Colatina
	C3_04_15		Linhares
	M1_04_15	Metropolitana	Vitória
	M2_04_15		Afonso Cláudio
	M3_04_15		Vila Velha
	S1_04_15	Sul	Guaçuí
	S2_04_15		Mimoso do Sul
	S3_04_15		Cachoeiro de Itapemirim
Março/2015	N1_03_15	Norte	Barra de São Francisco
	N2_03_15		Pinheiros
	N3_03_15		Água Doce do Norte
	C1_03_15	Central	Marilândia
	C2_03_15		Linhares
	C3_03_15		Aracruz
	M1_03_15	Metropolitana	Guarapari
	M2_03_15		Santa Teresa
	M3_03_15		Vitória
	S1_03_15	Sul	Ibatiba
	S2_03_15		Piúma
	S3_03_15		Castelo
Fevereiro/2015	N1_02_15	Norte	São Mateus
	N2_02_15		Nova Venécia
	N3_02_15		São Mateus
	C1_02_15	Central	São Gabriel da Palha
	C2_02_15		Linhares
	C3_02_15		Colatina
	M1_02_15	Metropolitana	Vitória
	M2_02_15		Vila Velha
	M3_02_15		Cariacica
	S1_02_15	Sul	Guaçuí
	S2_02_15		Piúma
	S3_02_15		Bom Jesus do Norte
Janeiro/2015	N1_01_15	Norte	Montanha
	N2_01_15		São Mateus
	N3_01_15		Conceição da Barra
	C1_01_15	Central	Colatina
	C2_01_15		Baixo Guandu
	C3_01_15		Colatina
	M1_01_15	Metropolitana	Vitória
	M2_01_15		Serra
	M3_01_15		Cariacica
	S1_01_15	Sul	Bom Jesus do Norte
	S2_01_15		Jerônimo Monteiro
	S3_01_15		Itapemirim
Dezembro/2014	N1_12_14	Norte	Barra de São Francisco
	N2_12_14		Barra de São Francisco
	N3_12_14		Montanha
	C1_12_14	Central	Linhares
	C2_12_14		Ibiraçu
	C3_12_14		Baixo Guandu
	M1_12_14	Metropolitana	Venda Nova do Imigrante
	M2_12_14		Vitória

Mês/Ano	Amostra	Macrorregião	Município
Dezembro/2014	M3 12 14	Metropolitana	Domingos Martins
	S1 12 14	Sul	Jerônimo Monteiro
	S2 12 14		Guaçuí
	S3 12 14		Itapemirim
Novembro/2014	N1 11 14	Norte	Nova Venécia
	N2 11 14		Mantenópolis
	N3 11 14		Mantenópolis
	C1 11 14	Central	Baixo Guandu
	C2 11 14		Colatina
	C3 11 14		Linhares
	M1 11 14	Metropolitana	Serra
	M2 11 14		Vila Velha
	M3 11 14		Cariacica
	S1 11 14	Sul	Itapemirim
	S2 11 14		Cachoeiro de Itapemirim
	S3 11 14		Anchieta
Outubro/2014	N1 10 14	Norte	Nova Venécia
	N2 10 14		Barra de São Francisco
	N3 10 14		São Mateus
	C1 10 14	Central	Sooretama
	C2 10 14		Aracruz
	C3 10 14		Linhares
	M1 10 14	Metropolitana	Marechal Floriano
	M2 10 14		Guarapari
	M3 10 14		Vila Velha
	S1 10 14	Sul	Marataízes
	S2 10 14		Anchieta
	S3 10 14		Muniz Freire
Setembro/2014	N1 09 14	Norte	Barra de São Francisco
	N2 09 14		Nova Venécia
	N3 09 14		São Mateus
	C1 09 14	Central	Aracruz
	C2 09 14		Linhares
	C3 09 14		Colatina
	M1 09 14	Metropolitana	Guarapari
	M2 09 14		Vila Velha
	M3 09 14		Cariacica
	S1 09 14	Sul	Alegre
	S2 09 14		Marataízes
	S3 09 14		Anchieta
Agosto/2014	N1 08 14	Norte	São Mateus
	N2 08 14		São Mateus
	N3 08 14		Pinheiros
	C1 08 14	Central	Vila Valério
	C2 08 14		Aracruz
	C3 08 14		Colatina
	M1 08 14	Metropolitana	Serra
	M2 08 14		Vila Velha
	M3 08 14		Cariacica
	S1 08 14	Sul	Cachoeiro de Itapemirim
	S2 08 14		Marataízes
	S3 08 14		lúna

Mês/Ano	Amostra	Macrorregião	Município
Julho/2014	N1_07_14	Norte	São Mateus
	N2_07_14		Ecoporanga
	N3_07_14		Pinheiros
	C1_07_14	Central	Colatina
	C2_07_14		Aracruz
	C3_07_14		João Neiva
	M1_07_14	Metropolitana	Vila Velha
	M2_07_14		Venda Nova do Imigrante
	M3_07_14		Cariacica
	S1_07_14	Sul	Cachoeiro de Itapemirim
	S2_07_14		Piúma
	S3_07_14		Mimoso do Sul

3.2. Definição do método de extração

A fim de se extrair a maior quantidade de canabinoides possível, realizou-se testes com diferentes solventes,^{13,22} utilizando-se uma das amostras coletadas, M1_10_14, que foi escolhida por apresentar maior massa. Para cada um dos 20 testes realizados, utilizou-se aproximadamente 150 mg de amostra e 1 mL dos respectivos solventes. Maceração (em ambiente refrigerado) e ultrassom foram utilizados como métodos comparativos, sendo os tempos de extração, respectivamente, de aproximadamente 72 horas e de 180 segundos. Após estes tempos, os solventes foram evaporados (exceto os deuterados) e os extratos analisados por RMN de ¹H em clorofórmio deuterado. A Tabela 1 a seguir apresenta as condições de tais testes. Para a definição do método a ser utilizado, as extrações foram avaliadas através dos espectros de RMN de ¹H, onde procurou-se verificar a melhor relação sinal-ruído, relacionada com maior quantidade de material extraído, bem como analisando-se também os sinais de interesse presentes nesses espectros.

Tabela 1. Condições dos testes de extração realizados.

Método	Massa amostra (mg)	Solvente	V _{solvente}	Extração	Tempo	RMN
1	150,1	Metanol deuterado	1 mL	Maceração	≈ 72h	CD ₃ OD
2	152,2			Ultrassom	180s	
3	150,1	Clorofórmio deuterado		Maceração	≈ 72h	CDCl ₃
4	152,5			Ultrassom	180s	
5	150,2	Metanol		Maceração	≈ 72h	
6	149,8			Ultrassom	180s	
7	150,4	Etanol		Maceração	≈ 72h	
8	150,1			Ultrassom	180s	
9	150,6	Clorofórmio		Maceração	≈ 72h	
10	151,9			Ultrassom	180s	
11	151,2	Hexano		Maceração	≈ 72h	
12	150,6			Ultrassom	180s	
13	149,7	Acetona		Maceração	≈ 72h	
14	150,6			Ultrassom	180s	
15	151,6	Éter de petróleo		Maceração	≈ 72h	
16	149,9			Ultrassom	180s	
17	150,7	Acetonitrila		Maceração	≈ 72h	
18	151,0			Ultrassom	180s	
19	151,0	Metanol:Clorofórmio 1:1		Maceração	≈ 72h	
20	150,6			Ultrassom	180s	

3.3. Purificação por CLAE

Os extratos das 156 amostras de maconha, após realizadas as análises de RMN de ¹H, foram misturados em um balão e o solvente evaporado em evaporador rotativo, gerando-se um novo extrato bruto.

O extrato bruto (1,1702 g) foi fracionado por Cromatografia por Exclusão em uma coluna de vidro contendo Sephadex LH-20 e utilizando-se metanol como solvente, dando origem a 40 frações, as quais após análise de placas de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) utilizando-se como eluente a mistura hexano:acetato de etila 8:2 e UV ($\lambda = 254$ nm) como revelador, foram agrupadas em seis frações finais, denominadas segundo a Figura 28 abaixo.

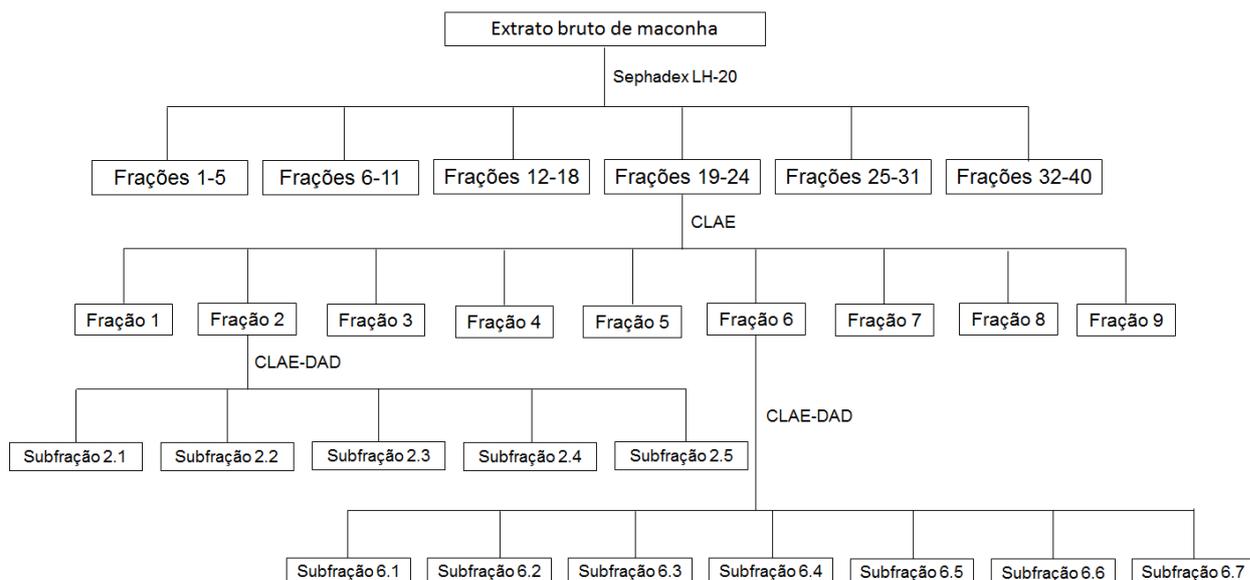


Figura 28. Fluxograma geral da purificação do extrato bruto de maconha.

Destas seis frações, a “Frações 19-24” foi escolhida, através de testes preliminares e análise por CCD, para ser submetida à separação por CLAE e gerou nove novas frações. Por sua vez, duas destas frações foram novamente submetidas à CLAE para serem repurificadas. A Fração 2 gerou cinco subfrações e a Fração 6 gerou sete subfrações, conforme pode ser visto na Figura 28 acima.

Nos subitens a seguir serão encontradas as condições detalhadas das análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

3.3.1. Purificação da fração denominada “Frações 19-24”

A separação da fração denominada “Frações 19-24” (154,1 mg) foi realizada a partir da adaptação da metodologia desenvolvida por Peschel e Politi (2015)⁶⁴ e para tal, utilizou-se um cromatógrafo preparativo Agilent Technologies 1260 Infinity, de bomba binária modelo G1361A-1260 prep pump, detector UV 1260 MWD VL, G1365D e coletor automático de frações 1260 FC-PS, modelo G1364B. Para o preparo da amostra, aos 154,1 mg dela adicionou-se 4,40 mL de acetonitrila e filtrou-se para outro frasco com filtro de seringa. Como condições de análise: coluna preparativa Agilent ZORBAX SB-C18 Prep HT, tamanho de partícula de 7 µm, diâmetro interno de 21,2 mm x 250 mm de comprimento; solventes A - água:acetonitrila (65:35, TFA 0,1%) e B - acetonitrila; modo gradiente (solvente A: 0 min. 70%, 30 min. 35%, 43 min. 5%, 48 min. 53,85%); fluxo de 14 mL/min até 43 min. e após 48 min. de 9,1 mL/min; tempo de corrida 55 minutos; comprimento de onda registrado 254 nm; volume de injeção

200 µL; número de injeções 15. Ao final, foram obtidas nove frações (coletadas manualmente), denominadas 1 a 9, conforme mostrado no fluxograma da Figura 28. Todas elas foram analisadas por RMN de ^1H . A Fração 5 também foi analisada por outros experimentos de RMN: ^{13}C , DEPT, COSY, HSQC e HMBC (Anexo 2).

3.3.2. Purificação da Fração 2

Após testes para otimizar a separação da Fração 2 num cromatógrafo analítico Agilent Technologies 1260 Infinity utilizando-se como base o método presente no manual do UNODC¹³, chegou-se ao que foi utilizado, com as seguintes condições de análise: coluna analítica Phenomenex Luna 5u C8(2) 100A, 5 µm, 4,6 x 250 mm; solventes A - água e C - acetonitrila; fluxo 1 mL/min; tempo da corrida 120 minutos; modo isocrático (solvente A: de 0 a 100 min. 40%, e de 101 a 120 min. 0%); comprimento de onda registrado 220 nm; volume de injeção 10 µL; e número de injeções 3. No preparo da amostra, adicionou-se 30 µL de acetonitrila à 1,2 mg da Fração 2. Ao final das separações, cinco subfrações foram coletadas (Figura 28), porém, apenas a Subfração 2.1 foi analisada por RMN de ^1H .

3.3.3. Purificação da Fração 6

Após testes tentando-se otimizar a separação da Fração 6, com diferentes condições e colunas C18 num cromatógrafo analítico Agilent Technologies 1260 Infinity, chegou-se a um método aparentemente satisfatório, baseado em um método encontrado na literatura,⁶⁵ onde foram separadas sete subfrações (Figura 28). As condições da análise foram as seguintes: coluna analítica Thermo Scientific Accucore C18, 2,6 µm, 4,6 x 150 mm; solventes A - solução de ácido acético 0,1% e C - acetonitrila; fluxo 0,4 mL/min; tempo da corrida 120 minutos; modo isocrático (solvente A: de 0 a 100 min. 40%, e de 101 a 110 min. 0%); comprimento de onda registrado 220 nm; volume de injeção 15 µL; e número de injeções 3. As sete subfrações separadas foram analisadas por RMN de ^1H .

3.4. Análises de RMN e seus parâmetros

As análises de RMN foram realizadas em um espectrômetro Varian 400 MHz (modelo VNMRs 400), operando com um campo magnético de 9,4 Tesla e sonda de detecção direta de 5 mm BroadBand $^1\text{H}/^{19}\text{F}/\text{X}$. Todos os espectros foram tratados no software MestReNova[®] e os obtidos em CDCl_3 foram calibrados pelo sinal do solvente em 7,24 ppm.⁶⁶

Para todos os métodos de extração realizados (ver item 3.2), os parâmetros das análises de RMN de ^1H foram os seguintes: 32 *scans*, tempo de relaxação maior que 5.T1 e pulso de 90° . Após a seleção do método, este foi aplicado a todas as 156 amostras apreendidas de maconha e os extratos obtidos de cada uma delas também foram analisados com os mesmos parâmetros anteriores. Os espectros obtidos podem ser vistos no Anexo 1.

No subitem 3.3.1, da purificação da fração denominada “Frações 19-24”, as nove frações obtidas foram analisadas com os parâmetros: 1024 *scans*, tempo de relaxação de 1,166 segundos e pulso de 45° . Dentre elas, a Fração 5 foi submetida a outros experimentos de RMN e com os seguintes parâmetros: ^{13}C (5000 *scans*, 1 s, 45°), DEPT (2048 *scans*; 2 s; Multiplicidade XH: XH/XH3 para cima & XH2 para baixo; carbonos quaternários suprimidos), COSY (64 *scans* por t1 incrementos e 128 t1 incrementos), HSQC (64 *scans*/128 incrementos) e HMBC (64 *scans*/128 incrementos). Os espectros obtidos encontram-se no Anexo 2.

A Subfração 2.1 obtida da purificação da Fração 2 (subitem 3.3.2) foi analisada com os seguintes parâmetros: 32 *scans*, tempo de relaxação de 1,166 segundos e pulso de 45° . E por fim, os parâmetros utilizados nas análises de RMN de ^1H das sete subfrações separadas da Fração 6 no subitem 3.3.3 foram: 2048 *scans*, tempo de relaxação de 1,166 segundos e pulso de 45° .

3.5. Identificação por CG-EM

As frações obtidas após separação do extrato bruto por Sephadex LH-20, bem como as frações obtidas após a purificação da “Frações 19-24” por CLAE e também alguns padrões de referência de canabinoides (CBN, CBD, Δ^9 -THC, CBG e CBC - Cerilliant® Analytical Reference Standards, Texas, USA) foram analisados por CG-EM.

O método utilizado foi o mesmo para todas as amostras e suas condições são as que seguem: coluna DB5-MS com 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno e revestida com uma camada de 0,25 μm de espessura composta por 5% difenil – 95% dimetilpolisiloxano; Hélio como gás de arraste num fluxo constante de 1 mL/min; injetor com divisor/sem divisor (*Split/splitless*) a 280 °C; razão de divisão de fluxo (*Split ratio*) de 10:1; volume de injeção de 1 μL ; temperatura inicial do forno de 80°C, permanecendo na mesma por 2 minutos, e após, com uma rampa de aquecimento de 10°C/min, chegando-se à temperatura final de 290°C e mantendo-se nela por 5 minutos; tempo total de análise de 28 minutos; temperatura do detector de massas (MS) de 290°C; e aquisição de íons no modo *full scan* com faixa de massa de 50 a 400 *m/z*.

As amostras foram preparadas na concentração de 2 mg/mL em diclorometano P.A. e as análises realizadas em um cromatógrafo Agilent Technologies com sistema de CG modelo 7890B e detector de massas modelo 5977A.

Os padrões são preparados na concentração de 1 mg do composto / 1 mL de metanol. Para preparar suas soluções a serem injetadas no CG, partiu-se de 7 μL de cada solução de padrão, deixou-se evaporar o metanol e adicionou-se 80 μL de diclorometano grau HPLC nos respectivos frascos.

3.6. Novas extrações das 156 amostras para serem analisadas por Espectrometria de Massas e parâmetros utilizados nas análises

Procedeu-se da mesma forma que anteriormente havia-se procedido por RMN. Pesou-se aproximadamente 20 mg de cada uma das 156 amostras de maconha, adicionou-se 1 mL de metanol comercial (CH₃OH) e deixou-se em maceração em ambiente refrigerado por aproximadamente 72 horas, fechando e cobrindo os frascos com papel alumínio para evitar o contato com a luz. Após este período, filtrou-se os extratos para outros frascos, evaporou-se o solvente e deixou-os no dessecador até a realização das análises por Espectrometria de Massas. Antes de serem analisadas, as amostras foram preparadas de modo que a cada amostra foi adicionado certo volume de acetonitrila para se obter concentração final de 10 mg/mL.

As análises foram então realizadas num equipamento Bruker modelo 9.4 T Solarix com fonte *paper spray* no modo negativo de íons (PS(-)). Os papéis aos quais as amostras foram adicionadas foram previamente cortados em formato triangular com 1,2 x 7 mm de tamanho e após, fixados por um grampo metálico (“jacaré”) a 5-7 mm da entrada do espectrômetro de massas. Aproximadamente 10 µL de acetonitrila e uma alta tensão de 3,8 Kv fornecida pelo espectrômetro de massas foram aplicadas ao papel para gerar os espectros de massas. Na transmissão de íons, o tempo de acumulação de íons no hexapolo (*ion accumulation time*) e o TOF (*time of light*) foram de 0,065 s e 0,8 ms, respectivamente. Os espectros de massas (PS(-)FT-ICR) foram adquiridos a partir da acumulação de 32 *scans* com um domínio do tempo de 512 k. A faixa dinâmica de aquisição de íons na cela de ICR foi de *m/z* 154-1300. Outros parâmetros da fonte PS foram: *skimmer* = 30 V e *collision voltage* = 1,0 V. A calibração do equipamento foi realizada com uma solução padrão de NaTFA.

3.7. Quimiometria

Todos os cálculos foram executados no software Matlab® 7.8.0.

3.7.1. RMN

Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos a partir dos arquivos originais utilizando-se o software MestReNova® para exportar arquivos ASCII. Antes que se realizasse a análise exploratória, estes foram submetidos a 4 procedimentos comumente reportados na literatura para pré-processamento de espectros de RMN: (1) Alinhamento dos sinais usando-se o software *icoshift* configurado com faixas de deslocamento químico personalizados.^{67,68} (2) Ajuste da linha de base empregando-se o software *airPLS*⁶⁹ e (3) Aplicação da primeira derivada e (4) Centralização dos dados na média.

Em seguida, aplicou-se a ACP primeiramente à faixa completa de deslocamento químico (δ), de 0 a 14 ppm utilizando-se todas as 156 amostras apreendidas de maconha. Essas foram estabelecidas em 13 classes, que correspondem aos meses de apreensão, da seguinte maneira: julho/14 = 7*, agosto/14 = 8, e assim sucessivamente, chegando-se a junho/15 = 6 e julho/15 = 7. Após, aplicou-se novamente a ACP com seleção de variáveis de δ 6,0 a 8,5 ppm.

3.7.1.1. ACP supervisionada

Os espectros de RMN de ^1H das frações 5, 6 e 7, obtidas após purificação da “Frações 19-24” por CLAE, foram inseridos no modelo em que as 156 amostras de maconha estavam contidas a fim de se realizar uma ACP supervisionada e verificar a similaridade das amostras estudadas com aquelas separadas.

3.7.2. EM

Os espectros de massas foram obtidos a partir dos arquivos originais utilizando-se o software DataAnalysis® para exportar arquivos ASCII. Como em EM não há deslocamento (como observado para RMN), também não há necessidade de pré-processamento dos espectros como, por exemplo, o uso de *icoshift* e *airPLS*. Aqui somente foi realizada a centralização dos dados na média. E em seguida, para a aplicação da ACP, utilizou-se o espectro de massas completo, considerando-se os sinais com intensidade relativa acima de 1%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Definição do método de extração

Com o intuito de se chegar a um método de extração satisfatório, que extraísse a maior quantidade possível de canabinoides presentes em cada uma das 156 amostras de maconha apreendidas, e também que incluísse uma boa relação de custo benefício entre simplicidade nas técnicas laboratoriais utilizadas e materiais de baixo custo, realizou-se testes de extração com diferentes solventes (ver item 3.2).

Uma vez que os canabinoides são facilmente solúveis na maioria dos solventes orgânicos, como por exemplo, metanol, éter de petróleo, hexano, clorofórmio, acetonitrila, etc.,¹³ buscou-se avaliar a eficácia dos solventes utilizados através dos rendimentos das extrações e também dos sinais de interesse desses compostos nos espectros de RMN de ¹H obtidos.

As condições e os rendimentos das extrações encontram-se na Tabela 2 a seguir e os espectros de RMN de ¹H obtidos para cada um deles estão na Figura 29.

Tabela 2. Condições e rendimentos dos testes de extração realizados.

Método	Massa amostra (mg)	Solvente	V _{solvente}	Extração	Tempo	Massa extrato (mg)	Rend. (%)
1	150,1	Metanol deuterado	1 mL	Maceração	≈ 72h	-	-
2	152,2			Ultrassom	180s	-	-
3	150,1	Clorofórmio deuterado		Maceração	≈ 72h	-	-
4	152,5			Ultrassom	180s	-	-
5	150,2	Metanol		Maceração	≈ 72h	19,2	12,8
6	149,8			Ultrassom	180s	10,6	7,1
7	150,4	Etanol		Maceração	≈ 72h	16,1	10,7
8	150,1			Ultrassom	180s	11,3	7,5
9	150,6	Clorofórmio		Maceração	≈ 72h	21,4	14,2
10	151,9			Ultrassom	180s	16,9	11,1
11	151,2	Hexano		Maceração	≈ 72h	9,6	6,3
12	150,6			Ultrassom	180s	4,7	3,1
13	149,7	Acetona		Maceração	≈ 72h	19,2	12,8
14	150,6			Ultrassom	180s	14,3	9,5
15	151,6	Éter de petróleo		Maceração	≈ 72h	5,2	3,4
16	149,9			Ultrassom	180s	3,7	2,5
17	150,7	Acetonitrila		Maceração	≈ 72h	14,9	9,9
18	151,0			Ultrassom	180s	10,1	6,7
19	151,0	Metanol:Clorofórmio 1:1		Maceração	≈ 72h	20,1	13,3
20	150,6			Ultrassom	180s	15,3	10,2

Examinando a Tabela 2, observa-se que os métodos de extração por maceração são mais eficazes do que os por ultrassom, visto que os primeiros são realizados em um tempo extremamente maior do que os últimos. Além disso, pode-se destacar os solventes metanol, clorofórmio, acetona e a mistura de solventes

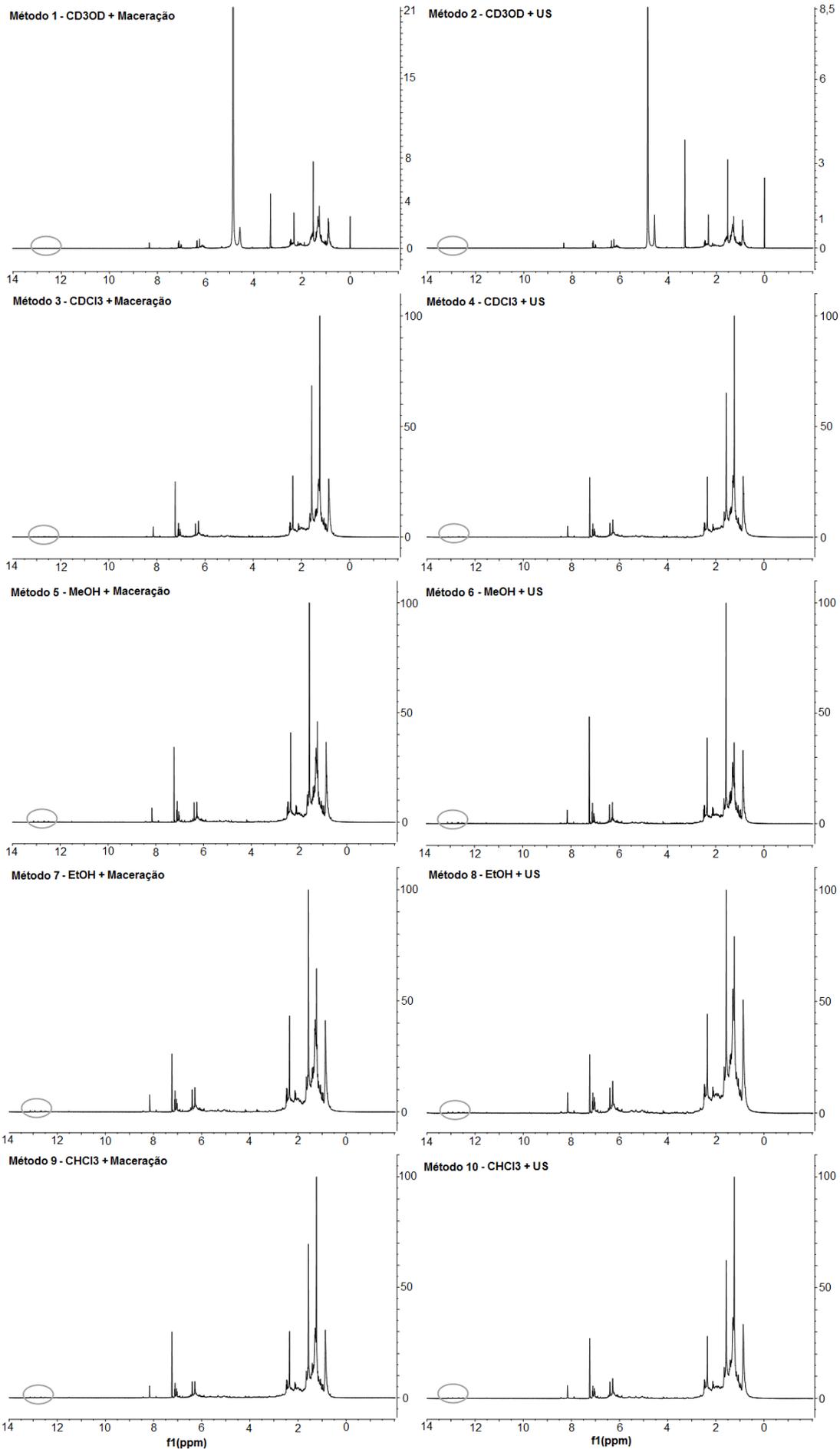
metanol:clorofórmio 1:1 como os de melhor eficácia, por apresentarem os maiores rendimentos, de respectivamente, 12,8%, 14,2%, 12,8% e 13,3%. Logo, estes solventes foram os que extraíram uma maior quantidade de material.

Avaliando-se a relação sinal-ruído nos espectros de RMN de ^1H (Figura 29), exceto para os solventes deuterados (CD_3OD e CDCl_3), que apresentaram relação sinal-ruído baixa e, portanto, seu uso foi descartado, todas as extrações testadas mostraram espectros similares. No entanto, apesar de similares, é possível notar que os solventes metanol, etanol e acetona apresentaram relações sinal-ruído ligeiramente maiores do que os outros.

Como a maconha é uma mistura muito complexa com muitos compostos distintos, e o foco do trabalho são os canabinoides, procurou-se avaliar nos testes de extração os métodos que os extrairiam mais. Isso foi conseguido observando-se a região do espectro de RMN de ^1H que os caracterizam, que é a região de seus hidrogênios aromáticos e olefínicos, os quais apresentam deslocamentos químicos entre 6,00 e 8,20 ppm, e, quando se trata dos canabinoides ácidos, entre 11,00 e 13,00 ppm. Focando-se, então, nos sinais de interesse dos principais canabinoides, na primeira região os métodos de extração apresentaram sinais semelhantes, não sendo possível realizar distinções entre os mesmos, porém, na região dos ácidos é possível ver alguns sinais discretos, com uma relação sinal-ruído ligeiramente maior nos seguintes solventes: metanol, etanol e acetonitrila.

Portanto, levando-se em consideração as razões anteriormente expostas e combinando-as às limitações do laboratório, o teste de extração que utilizou metanol como solvente extrator e maceração (Método 5 do item 3.2), pode ser considerado eficaz e foi então escolhido para o estudo.

A literatura¹³ diz que solventes não polares como hexano e éter de petróleo geram um extrato relativamente limpo e extraem somente canabinoides neutros (livres) quantitativamente, enquanto os outros solventes e suas combinações geram extrações quantitativas dos ácidos canabinoides também.¹³ No entanto, como pode ser observado nos espectros da Figura 29 abaixo, todos os solventes (exceto os deuterados) renderam espectros semelhantes com sinais bem discretos de baixa relação sinal-ruído na região de sinais característicos dos ácidos, entre 11,00 ppm e 13,00 ppm, inclusive os obtidos em éter de petróleo e hexano, mesmo que com relação sinal-ruído ainda inferior aos espectros de metanol, etanol e acetonitrila, como mostrado nas regiões destacadas na Figura 29 a seguir.



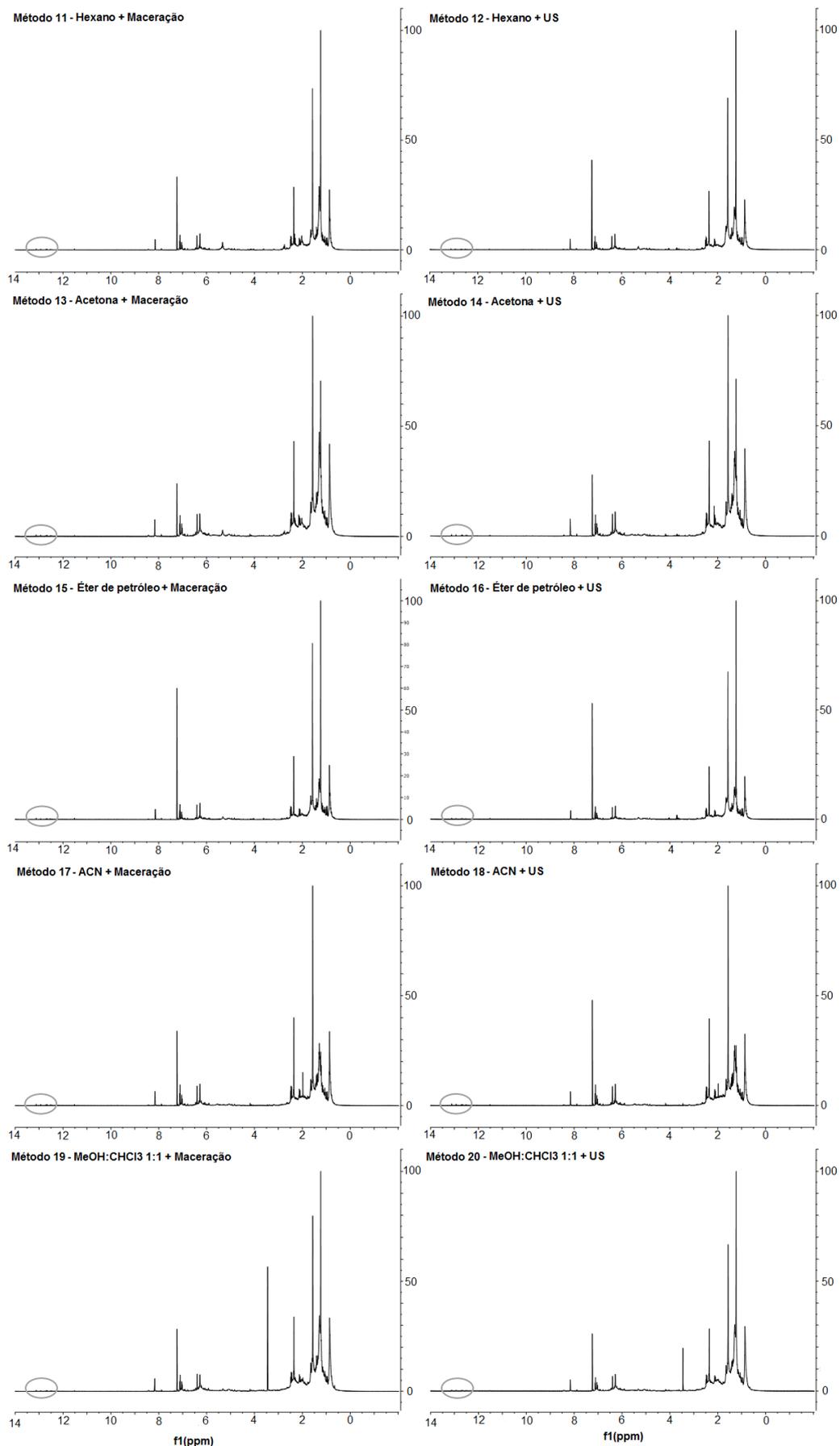


Figura 29. Espectros de RMN de ¹H dos testes de extração realizados com diferentes solventes.

O Método 5 (extração em CH₃OH e RMN em CDCl₃) havia sido realizado anteriormente com uma amostra de maconha aleatória e gerado o seguinte espectro de RMN de ¹H, presente na Figura 30 abaixo.

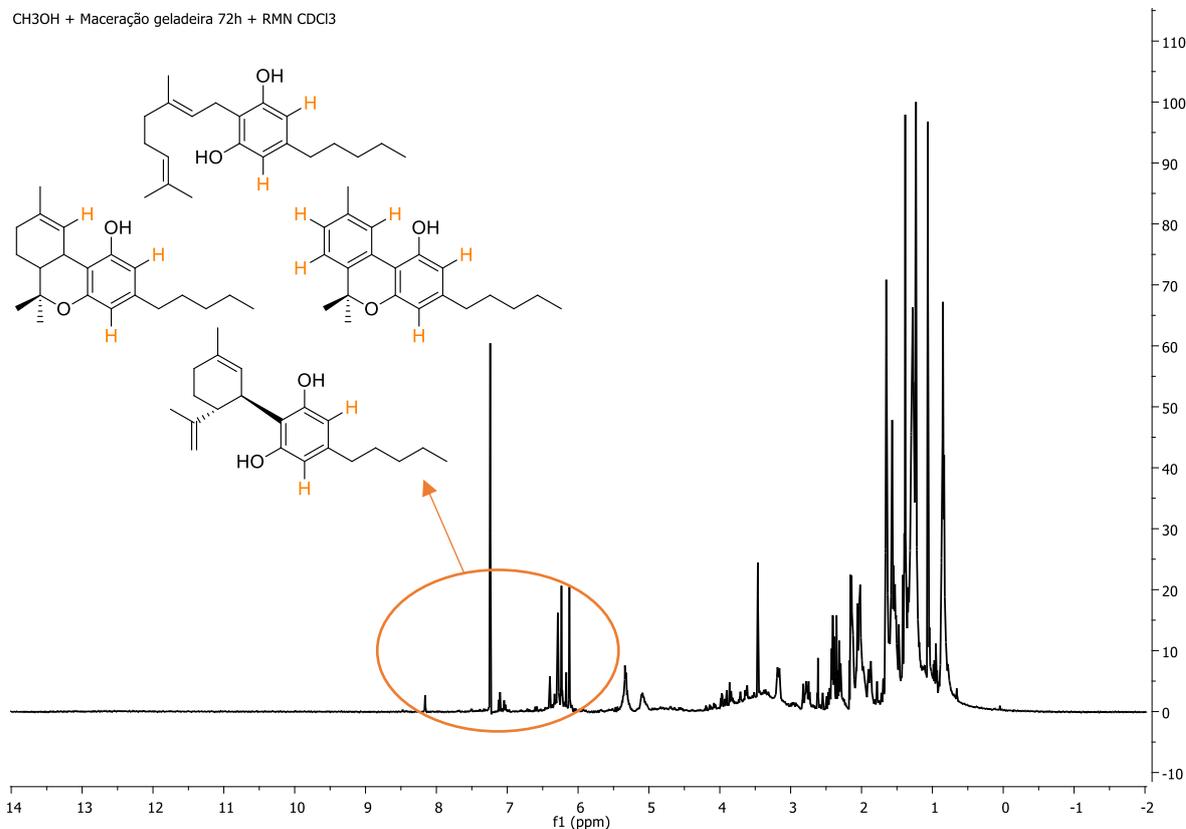


Figura 30. Espectro de RMN de ¹H do Método 5 - Maceração por ≈72h em CH₃OH e análise em CDCl₃.

Nele é possível observar que o metanol é realmente um solvente extrator eficaz, visto que o espectro apresentou uma boa relação sinal-ruído, com os sinais de interesse dos canabinoides bem evidentes, como destacado acima. Em relação ao solvente utilizado na análise de RMN de ¹H, o clorofórmio deuterado, este foi escolhido por dissolver praticamente todas as moléculas orgânicas e também por estarem em CDCl₃ a maioria dos espectros de canabinoides encontrados na literatura (para posteriores comparações).

4.2. Aplicação do método de extração selecionado

Definiu-se que o método de extração a ser utilizado seria o Método 5 (ver item 4.1) e então aplicou-o às amostras de maconha apreendidas no período de julho/2015 a julho/2014 (ver Quadro 2) para se chegar aos extratos brutos das mesmas.

As massas de extrato bruto e os respectivos rendimentos de extração obtidos para cada amostra encontram-se na Tabela 3 a seguir. Os extratos foram analisados por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e os espectros obtidos em clorofórmio deuterado (CDCl_3). Estes encontram-se no Anexo 1.

Tabela 3. Amostras analisadas por RMN, suas massas pesadas e rendimentos das extrações.

Mês/Ano	Amostra	Massa pesada (mg)	Massa obtida de extrato (mg)	Rendimento da extração (%)
Julho/2015	N1_07_15	162,0	23,5	14,5
	N2_07_15	155,3	21,0	13,5
	N3_07_15	154,9	16,3	10,5
	C1_07_15	157,3	18,2	11,6
	C2_07_15	163,0	19,4	11,9
	C3_07_15	158,5	18,3	11,5
	M1_07_15	165,3	22,8	13,8
	M2_07_15	164,7	11,0	6,7
	M3_07_15	160,5	23,5	14,6
	S1_07_15	160,9	14,2	8,8
	S2_07_15	163,5	14,6	8,9
	S3_07_15	158,5	17,6	11,1
Junho/2015	N1_06_15	169,3	17,3	10,2
	N2_06_15	168,1	11,7	7,0
	N3_06_15	158,7	8,6	5,4
	C1_06_15	177,0	10,7	6,0
	C2_06_15	155,9	19,7	12,6
	C3_06_15	173,0	16,3	9,4
	M1_06_15	158,1	21,8	13,8
	M2_06_15	154,3	14,1	9,1
	M3_06_15	152,7	17,5	11,5
	S1_06_15	161,1	14,5	9,0
	S2_06_15	167,0	11,7	7,0
	S3_06_15	160,9	12,0	7,5
Maio/2015	N1_05_15	154,6	9,0	5,8
	N2_05_15	161,9	17,4	10,7
	N3_05_15	153,4	15,8	10,3
	C1_05_15	166,4	15,1	9,1
	C2_05_15	162,0	10,7	6,6
	C3_05_15	161,6	13,4	8,3
	M1_05_15	150,6	11,2	7,4
	M2_05_15	169,4	20,2	11,9
	M3_05_15	160,4	24,4	15,2
	S1_05_15	165,5	16,0	9,7
	S2_05_15	161,3	11,4	7,1
	S3_05_15	159,4	15,1	9,5

Mês/Ano	Amostra	Massa pesada (mg)	Massa obtida de extrato (mg)	Rendimento da extração (%)
Abril/2015	N1 04 15	154,8	14,8	9,6
	N2 04 15	160,3	15,2	9,5
	N3 04 15	168,8	8,7	5,2
	C1 04 15	167,2	13,9	8,3
	C2 04 15	168,1	16,7	9,9
	C3 04 15	156,5	18,4	11,8
	M1 04 15	152,0	18,0	11,8
	M2 04 15	167,2	23,3	13,9
	M3 04 15	157,8	13,9	8,8
	S1 04 15	152,5	8,7	5,7
	S2 04 15	167,4	18,2	10,9
	S3 04 15	161,7	12,6	7,8
Março/2015	N1 03 15	160,2	9,5	5,9
	N2 03 15	167,2	19,5	11,7
	N3 03 15	160,4	15,7	9,8
	C1 03 15	154,8	13,9	9,0
	C2 03 15	160,6	14,6	9,1
	C3 03 15	169,9	5,7	3,4
	M1 03 15	152,9	27,1	17,7
	M2 03 15	163,9	11,2	6,8
	M3 03 15	154,7	16,9	10,9
	S1 03 15	152,6	22,2	14,5
	S2 03 15	153,9	14,0	9,1
	S3 03 15	160,2	14,2	8,9
Fevereiro/2015	N1 02 15	155,9	15,7	10,1
	N2 02 15	154,6	13,7	8,9
	N3 02 15	159,9	12,1	7,6
	C1 02 15	161,8	12,4	7,7
	C2 02 15	167,8	10,9	6,5
	C3 02 15	158,2	22,0	13,9
	M1 02 15	157,1	16,3	10,4
	M2 02 15	155,8	19,8	12,7
	M3 02 15	158,8	12,0	7,6
	S1 02 15	162,8	19,3	11,9
	S2 02 15	168,9	11,9	7,0
	S3 02 15	154,8	23,3	15,1
Janeiro/2015	N1 01 15	157,9	22,1	14,0
	N2 01 15	163,8	13,4	8,2
	N3 01 15	156,6	15,7	10,0
	C1 01 15	165,1	14,9	9,0
	C2 01 15	150,8	16,7	11,1
	C3 01 15	161,1	17,4	10,8
	M1 01 15	157,9	19,9	12,6
	M2 01 15	150,5	14,9	9,9
	M3 01 15	162,8	23,0	14,1
	S1 01 15	156,7	19,3	12,3
	S2 01 15	158,4	13,3	8,4
	S3 01 15	155,5	19,1	12,3
Dezembro/2014	N1 12 14	161,8	15,0	9,3
	N2 12 14	162,6	13,6	8,4
	N3 12 14	166,3	9,7	5,8
	C1 12 14	154,9	11,7	7,6

Mês/Ano	Amostra	Massa pesada (mg)	Massa obtida de extrato (mg)	Rendimento da extração (%)
Dezembro/2014	C2_12_14	157,1	16,4	10,4
	C3_12_14	161,6	20,0	12,4
	M1_12_14	158,9	23,7	14,9
	M2_12_14	161,6	19,2	11,9
	M3_12_14	163,5	17,7	10,8
	S1_12_14	165,6	22,9	13,8
	S2_12_14	169,6	20,4	12,0
	S3_12_14	159,2	22,9	14,4
Novembro/2014	N1_11_14	157,9	24,3	15,4
	N2_11_14	158,4	10,7	6,8
	N3_11_14	156,4	13,2	8,4
	C1_11_14	150,0	18,3	12,2
	C2_11_14	166,7	14,4	8,6
	C3_11_14	166,1	22,6	13,6
	M1_11_14	157,2	15,2	9,7
	M2_11_14	167,2	22,0	13,2
	M3_11_14	166,0	23,4	14,1
	S1_11_14	159,8	24,9	15,6
	S2_11_14	153,4	17,2	11,2
	S3_11_14	164,8	21,9	13,3
Outubro/2014	N1_10_14	151,9	17,8	11,7
	N2_10_14	152,4	14,0	9,2
	N3_10_14	150,7	17,0	11,3
	C1_10_14	161,1	15,3	9,5
	C2_10_14	160,8	18,2	11,3
	C3_10_14	160,2	15,5	9,7
	M1_10_14	157,3	23,2	14,7
	M2_10_14	162,7	15,5	9,5
	M3_10_14	165,4	21,2	12,8
	S1_10_14	156,8	13,3	8,5
	S2_10_14	160,5	15,6	9,7
	S3_10_14	164,7	15,7	9,5
Setembro/2014	N1_09_14	154,9	13,7	8,8
	N2_09_14	160,3	17,3	10,8
	N3_09_14	167,3	22,7	13,6
	C1_09_14	166,0	12,1	7,3
	C2_09_14	159,7	21,4	13,4
	C3_09_14	155,6	19,8	12,7
	M1_09_14	159,4	26,4	16,6
	M2_09_14	157,5	21,5	13,7
	M3_09_14	165,5	20,6	12,4
	S1_09_14	152,2	17,6	11,6
	S2_09_14	152,5	14,0	9,2
	S3_09_14	162,1	19,3	11,9
Agosto/2014	N1_08_14	152,9	9,0	5,9
	N2_08_14	161,0	15,3	9,5
	N3_08_14	156,2	18,6	11,9
	C1_08_14	164,4	22,9	13,9
	C2_08_14	160,2	15,0	9,4
	C3_08_14	155,5	21,2	13,6
	M1_08_14	156,4	14,7	9,4
	M2_08_14	154,3	17,4	11,3

Mês/Ano	Amostra	Massa pesada (mg)	Massa obtida de extrato (mg)	Rendimento da extração (%)
Agosto/2014	M3_08_14	155,0	13,0	8,4
	S1_08_14	160,3	10,4	6,5
	S2_08_14	159,5	17,6	11,0
	S3_08_14	155,7	12,8	8,2
Julho/2014	N1_07_14	161,1	17,3	10,7
	N2_07_14	159,9	11,7	7,3
	N3_07_14	161,7	10,5	6,5
	C1_07_14	153,0	17,2	11,2
	C2_07_14	157,0	17,4	11,1
	C3_07_14	166,3	7,9	4,8
	M1_07_14	150,4	11,7	7,8
	M2_07_14	154,4	14,1	9,1
	M3_07_14	164,5	26,5	16,1
	S1_07_14	161,5	11,8	7,3
	S2_07_14	157,4	16,6	10,5
	S3_07_14	161,2	7,5	4,7

Observa-se na tabela acima que os rendimentos das extrações foram muito variáveis, ainda que tenha sido adotado o mesmo procedimento para todas as amostras e também tenha-se partido de quantidades próximas de massa. As amostras com menor e maior porcentagem de extração foram, respectivamente, a S3_07_14 com 4,7% e a M1_03_15 com 17,7% de rendimento. Desta forma, não foi detectada nenhuma relação ou tendência entre as amostras neste contexto.

Analisando-se os espectros de RMN de ^1H obtidos (ver Anexo 1), observa-se o quão visualmente semelhantes os mesmos são. A seguir, foram escolhidos aleatoriamente 5 deles para mostrar essa semelhança (Figura 31).

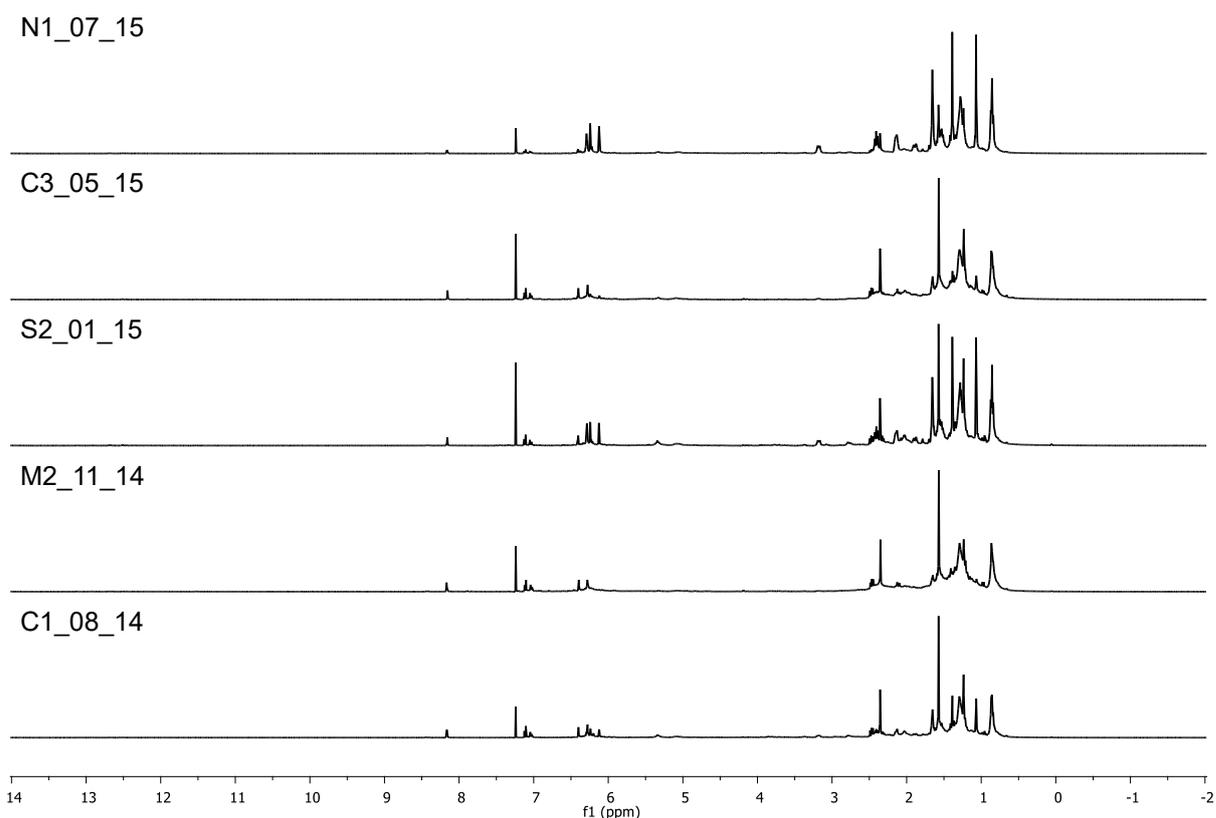


Figura 31. Espectros de RMN de ¹H de 5 amostras de maconha escolhidas aleatoriamente para mostrar a semelhança existente.

Por se tratarem de muitos espectros (156) e os mesmos apresentarem perfis similares, o que indica similaridade entre as amostras estudadas, selecionou-se um para exemplificar a atribuição dos deslocamentos químicos de alguns principais canabinoides. Escolheu-se o espectro da amostra C3_07_15, pois nele é possível observar uma boa quantidade de sinais de deslocamentos químicos característicos destes compostos (Figura 32).

Escolheu-se aqui uma região um pouco maior para ser estudada, entre 4,00 ppm e 8,20 ppm, que além dos hidrogênios aromáticos dos canabinoides, enquadram seus hidrogênios olefínicos e de grupos hidroxila (-OH), além de ser neste intervalo que os espectros de RMN de ¹H das amostras de maconha estudadas são mais distinguíveis. O mesmo foi feito por Hazekamp, Choi e Verpoorte (2004)⁶, que selecionaram para seu estudo os sinais de hidrogênios na região entre 4,00 ppm e 7,00 ppm por este mesmo motivo.

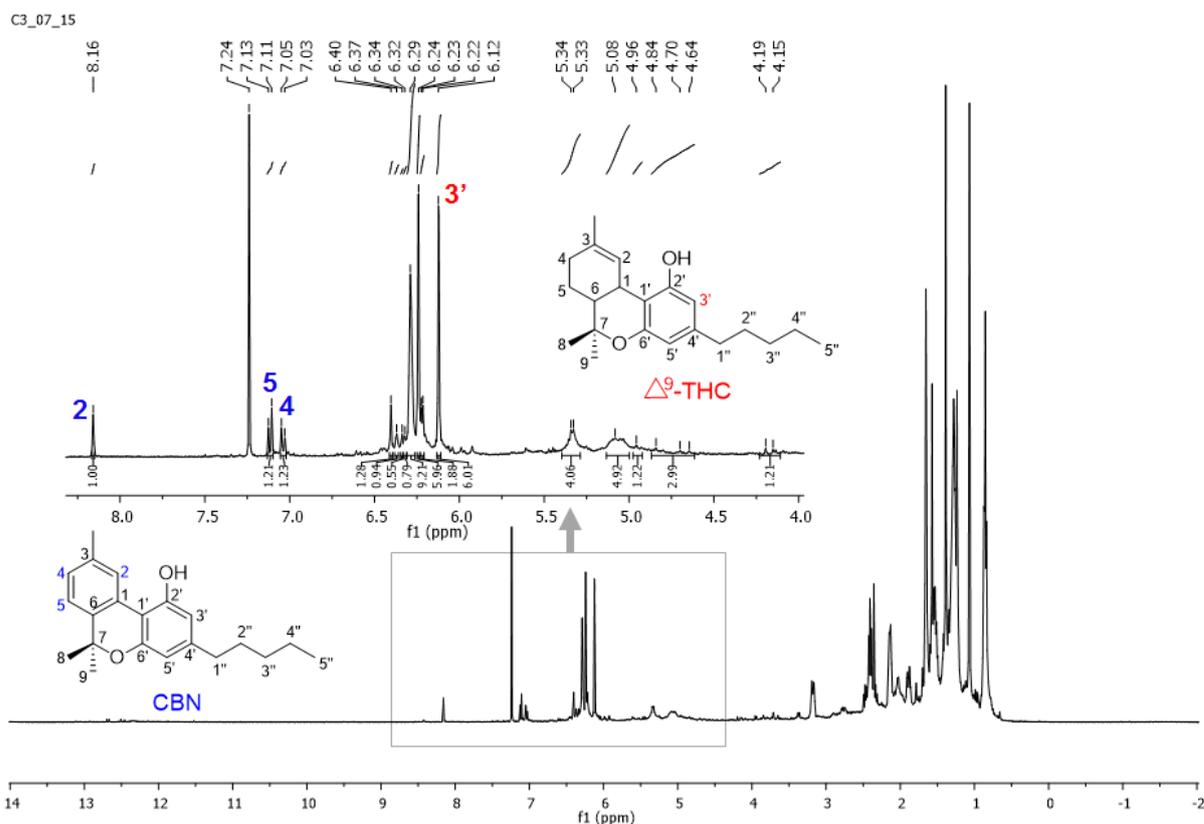


Figura 32. Espectro de RMN de ^1H da amostra C3_07_15.

Para se realizar as atribuições dos deslocamentos químicos dos canabinoides presentes nos extratos estudados, utilizou-se dados da literatura como base. Destaca-se o trabalho de Choi et al. (2004a)²², utilizado como referência para o presente estudo, que mostra com detalhes as atribuições dos que eles consideram os principais canabinoides isolados de flores da *Cannabis sativa* L. A Figura 33 a seguir mostra as estruturas químicas destes compostos com os hidrogênios de interesse numerados e a Tabela 4 apresenta seus deslocamentos químicos segundo a literatura.

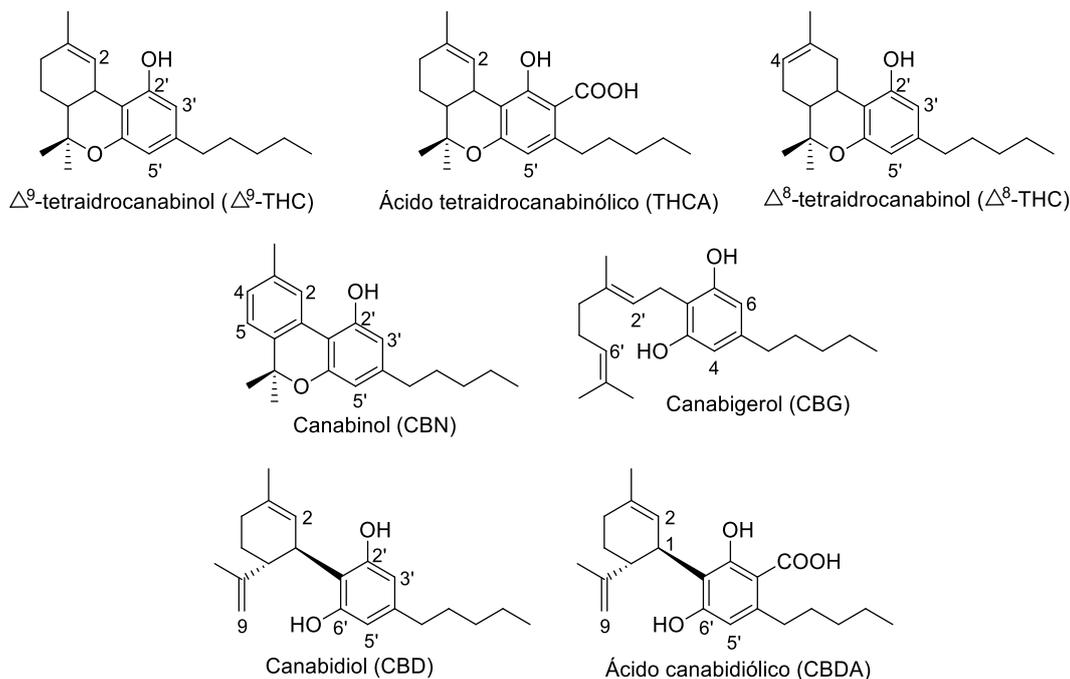


Figura 33. Estruturas químicas dos principais canabinoides com os hidrogênios de interesse numerados.²²

Tabela 4. Deslocamentos químicos (δ), multiplicidades e constantes de acoplamento (J) dos principais canabinoides segundo a literatura.²²

Posição	Δ^9 -THC	THCA	Δ^8 -THC	CBN	CBG	CBD	CBDA
1							4,09 (1H, m)
2	6,31 (1H, q, 1,6 Hz)	6,39 (1H, sl)		8,16 (1H, s)		5,57 (1H, s)	5,56 (1H, s)
4			5,43 (1H, dl, 4,8 Hz)	7,07 (1H, d, 7,9 Hz)	6,26 (2H, s)		
5				7,14 (1H, d, 7,9 Hz)			
6					6, (2H, s)		
9						4,64 (<i>trans</i> , 1H, m)	4,55 (<i>trans</i> , 1H, m)
						4,54 (<i>cis</i> , 1H, m)	4,40 (<i>cis</i> , 1H, m)
2'					5,29 (1H, m)		
3'	6,14 (1H, d, 1,6 Hz)		6,11 (1H, d, 1,6 Hz)	6,29 (1H, d, 1,1 Hz)		6,26 (1H, sl)	
5'	6,27 (1H, d, 1,6 Hz)	6,26 (1H, s)	6,27 (1H, d, 1,5 Hz)	6,44 (1H, d, 1,1 Hz)		6,16 (1H, sl)	6,26 (1H, s)
6'					5,07 (1H, m)		
2'-OH	4,87 (1H, s)	12,19 (1H, s)	4,82 (1H, s)	5,13 (1H, s)		5,99 (1H, s)	11,93 (1H, s)
OH					5,36 (2H, s)		
6'-OH						5,02 (1H, s)	6,63 (1H, s)

d - dupleteo; dl - dupleteo largo; m - multipleteo; q - quinteto; s - singleteo; sl - singleteo largo.

Comparando-se os deslocamentos químicos do espectro da Figura 32 com os da Tabela 4, pode-se confirmar a presença de CBN na amostra C3_07_15. O CBN, que é um produto de degradação do Δ^9 -THC, apresenta três sinais unicamente característicos dele dentre os demais canabinoides estudados (ver Tabela 4), que no espectro aparecem em 8,16 ppm (singleto), 7,12 ppm (dubleto – J = 7,9 Hz) e 7,04 ppm (dubleto – J = 8,0 Hz). Os mesmos correspondem, respectivamente, aos hidrogênios H2, H5 e H4 numerados na estrutura química do CBN na Figura 33.

Em relação aos demais sinais, não se pode afirmar que são de um ou de outro canabinoide específico, pois nota-se pela tabela acima que os hidrogênios aromáticos destes compostos apresentam valores de deslocamentos químicos muito próximos, variando de 6,00 a 6,44 ppm, e como trata-se de um extrato de maconha que é uma matriz muito complexa, os deslocamentos químicos (δ) destes constituintes provavelmente saem sobrepostos no espectro.

No entanto, avaliando-se os sinais dessa região, pode-se inferir que nesta amostra também há a presença de outros canabinoides, como por exemplo, o Δ^9 -THC e o Δ^8 -THC, que têm, segundo a literatura, seus H3' com valor de δ de 6,14 ppm e 6,11 ppm, respectivamente, e que podem estar representados juntos no singleto largo que aparece em 6,12 ppm no espectro.

Outro sinal que pode estar relacionado a dois canabinoides distintos é o singleto largo (sl) que aparece em 6,40 ppm no espectro. Podem estar juntos ali o hidrogênio aromático H5' do CBN (literatura 6,44 ppm) e o hidrogênio olefínico H2 do THCA (literatura 6,39 ppm). Como também, o sl em 6,40 ppm pode ser do CBN, e na verdade, o sl em 6,37 ppm ser do THCA, já que estes últimos dois sinais integram para 1 hidrogênio cada no espectro.

Um outro exemplo é o singleto largo em 6,29 ppm no espectro. Como está integrando para 9 hidrogênios, certamente neste único sinal estão representados hidrogênios de alguns compostos, como pode ser o caso do H5' do Δ^9 -THC (literatura 6,27 ppm), H5' do Δ^8 -THC (literatura 6,27 ppm), H5' do THCA (literatura 6,26 ppm), H3' do CBN (literatura 6,29 ppm), H4 do CBG (literatura 6,26 ppm), H3' do CBD (literatura 6,26 ppm) e H5' do CBDA (literatura 6,26 ppm). É importante lembrar que é sempre possível haver pequenos deslocamentos nos valores de δ .

Portanto, em relação aos sinais acima mencionados, não se pode afirmar nada, e sim, apenas utilizá-los para inferências sobre a presença ou não de certos canabinoides na amostra em questão estudada.

4.3. Purificação por CLAE e Identificação por RMN e/ou CG-EM

Com o objetivo de se poder afirmar quais canabinoides estariam presentes nas amostras de maconha estudadas e, principalmente, tê-los de forma pura para serem utilizados como materiais de referência, partiu-se para a purificação.

Após realizadas as análises de RMN de ^1H das 156 amostras, misturou-se seus extratos para obter maior massa, gerando-se um novo extrato bruto, que foi submetido à Cromatografia por Exclusão utilizando-se uma coluna de vidro contendo Sephadex LH-20 como fase estacionária, e do qual foram obtidas seis frações finais, organizadas de acordo com os resultados obtidos nas placas de CCD e denominadas “Frações 1-5”, “6-11”, “12-18”, “19-24”, “25-31” e “32-40” (Figura 34). Partiu-se de 1,1702 g de extrato bruto de maconha e as massas das frações obtidas e os respectivos rendimentos encontram-se na Tabela 5.

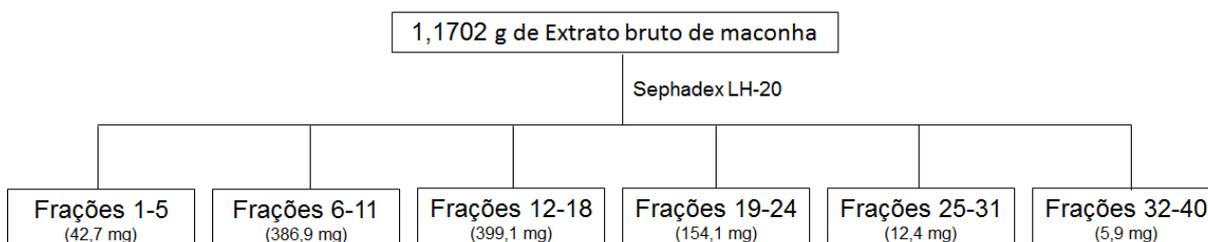


Figura 34. Pré-purificação do extrato bruto de maconha por Sephadex LH-20.

Tabela 5. Frações obtidas a partir da separação do extrato bruto de maconha por Sephadex LH-20, suas massas e respectivos rendimentos.

Frações	Massa obtida (mg)	Rendimento (%)
1-5	42,7	3,6
6-11	386,9	33,1
12-18	399,1	34,1
19-24	154,1	13,2
25-31	12,4	1,1
32-40	5,9	0,5

O objetivo ao se aplicar a Cromatografia por Exclusão foi simplificar um pouco a matriz complexa que é a maconha, separando as moléculas por tamanho. Como os principais canabinoides apresentam estruturas e conseqüentemente tamanhos semelhantes, decidiu-se fazer essa pré-purificação para tentar agrupá-los numa mesma fração ou em um menor número delas, eliminando-se assim, demasiadas impurezas.

4.3.1. Purificação da fração denominada “Frações 19-24”

Das seis frações finais obtidas, a chamada “Frações 19-24” foi escolhida para ser submetida à CLAE com base na análise de placas de CCD, comparando-se as suas manchas com a mancha do canabinol (CBN). Uma separação anterior do extrato bruto de maconha por CLAE, realizada apenas como teste, rendeu o isolamento de pequena massa do CBN, que foi identificado por RMN de ^1H , e desta forma, serviu como referência para a realização da CCD. A “Frações 19-24” apresentou, pelas placas reveladas com UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$), a mancha do CBN mais intensa e, então, foi escolhida por este motivo. Inferiu-se que essa fração, por possuir maior quantidade de CBN, poderia também conter outros principais canabinoides, uma vez que esses compostos apresentam pesos moleculares próximos.

Portanto, a purificação da fração denominada “Frações 19-24” por CLAE foi realizada com o objetivo de se chegar aos canabinoides puros para serem possivelmente empregados como substâncias de referência. A partir dela, nove bandas cromatográficas foram obtidas e chamadas de frações 1 a 9, conforme a Figura 35 abaixo.

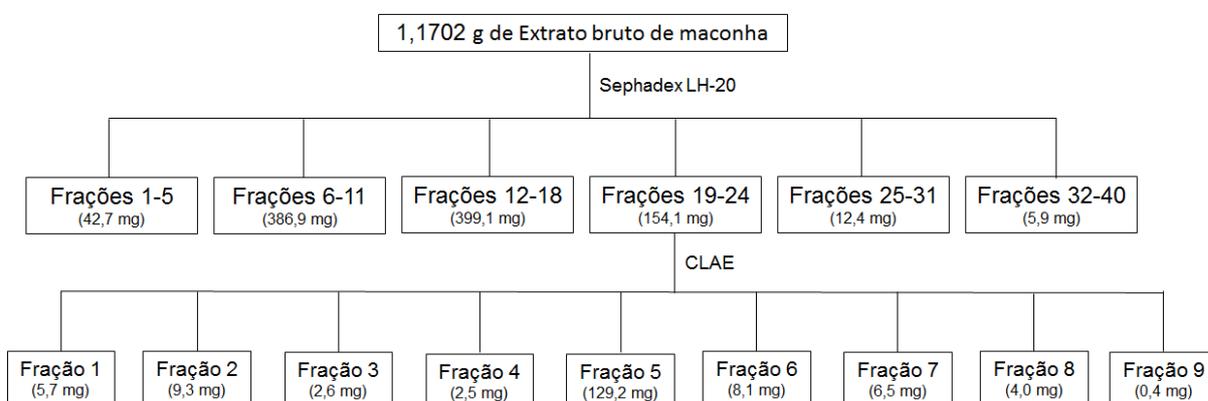


Figura 35. Purificação da fração denominada “Frações 19-24” por CLAE e frações obtidas.

Foram realizadas 15 injeções e o cromatograma de uma delas, que é semelhante ao das demais, encontra-se na Figura 36.

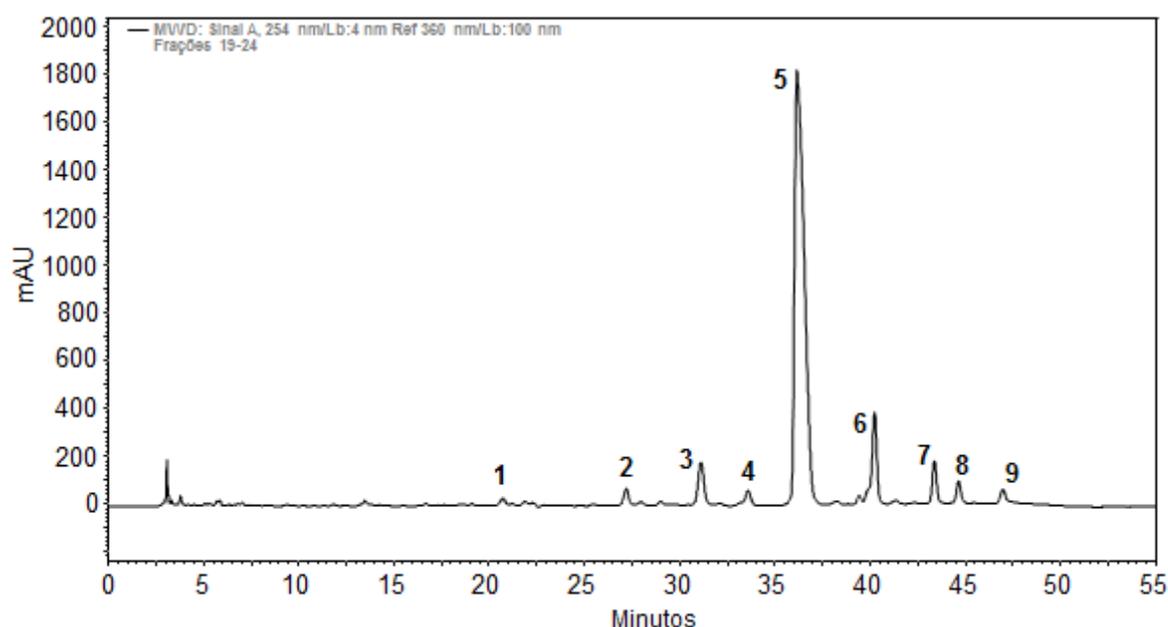


Figura 36. Cromatograma líquido (CLAE) obtido da purificação da “Frações 19-24”.

A Tabela 6 abaixo apresenta os tempos de retenção das nove frações obtidas, suas massas e seus respectivos rendimentos.

Tabela 6. Frações obtidas a partir da purificação por CLAE da “Frações 19-24”, seus tempos de retenção, massas obtidas e rendimentos.

Fração	Tempo de retenção (min.)	Massa obtida (mg)	Rendimento (%)
1	20,713	5,7	3,7
2	27,173	9,3	6,0
3	31,100	2,6	1,7
4	33,573	2,5	1,6
5	36,133	129,2	83,8
6	40,193	8,1	5,3
7	43,340	6,5	4,2
8	44,607	4,0	2,6
9	46,933	0,4	0,3

Estas frações foram analisadas por RMN de ^1H e CG-EM, e seus respectivos espectros e cromatogramas são mostrados a seguir.

- **Fração 1**

O espectro de RMN de ^1H da Fração 1 é exibido na Figura 37 abaixo.

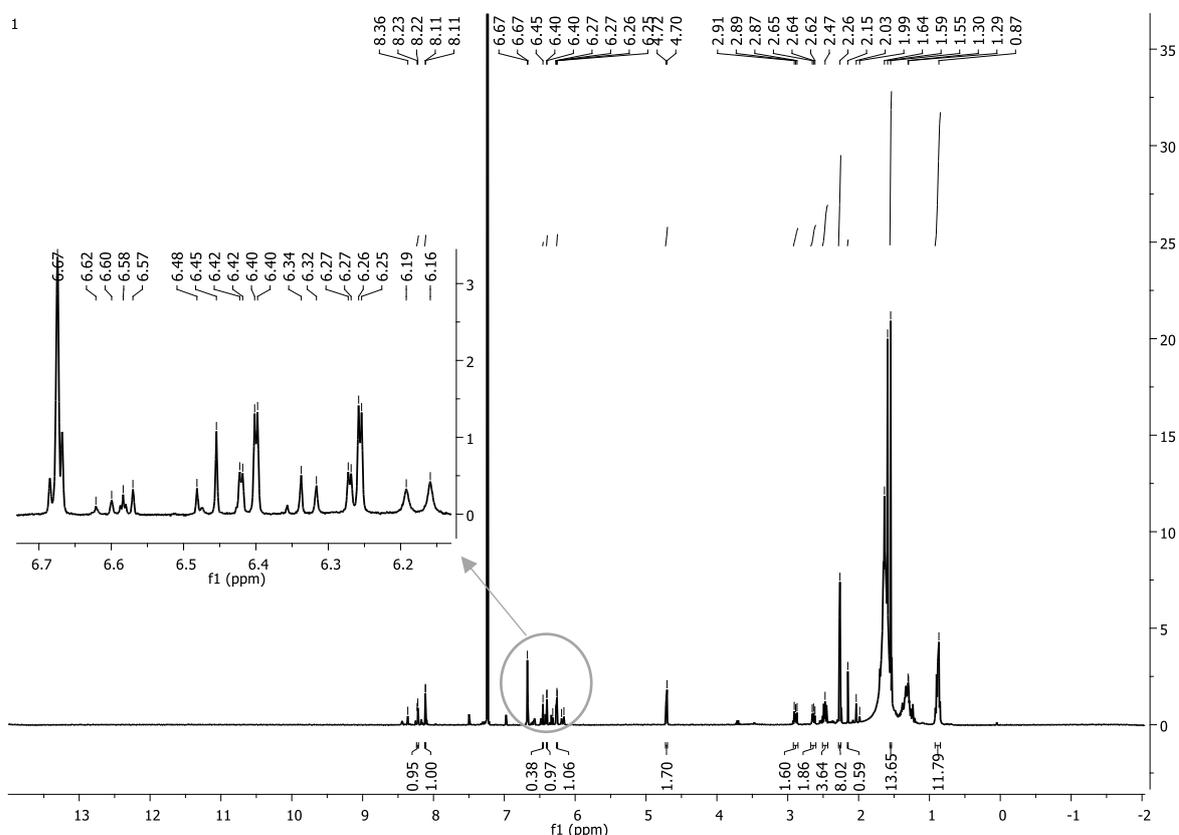


Figura 37. Espectro de RMN de ^1H da Fração 1.

É observado no espectro, tanto pelos sinais quanto pelas integrações, que se possui mais de um composto na Fração 1, ou seja, sua purificação não foi de total eficácia. Mas, são observados sinais característicos de canabinoides na região destacada acima. No entanto, como já dito anteriormente, estes compostos apresentam seus hidrogênios aromáticos e olefínicos com deslocamentos químicos semelhantes, sendo muito difícil afirmar com precisão, por RMN, que um determinado sinal se refere a um canabinoide específico. Na região expandida da Figura 37, aparecem dois dubletos, em 6,26 ppm ($J = 1,6$ Hz) e 6,40 ppm ($J = 1,6$ Hz), que se comparados com a literatura (ver Tabela 4), podem ser referentes aos hidrogênios H3' e H5' do CBN, respectivamente.

A CG-EM, por permitir a rápida identificação de compostos presentes em misturas, foi então utilizada para complementar as informações obtidas por RMN. O cromatograma da Fração 1 aparece na Figura 38 abaixo.

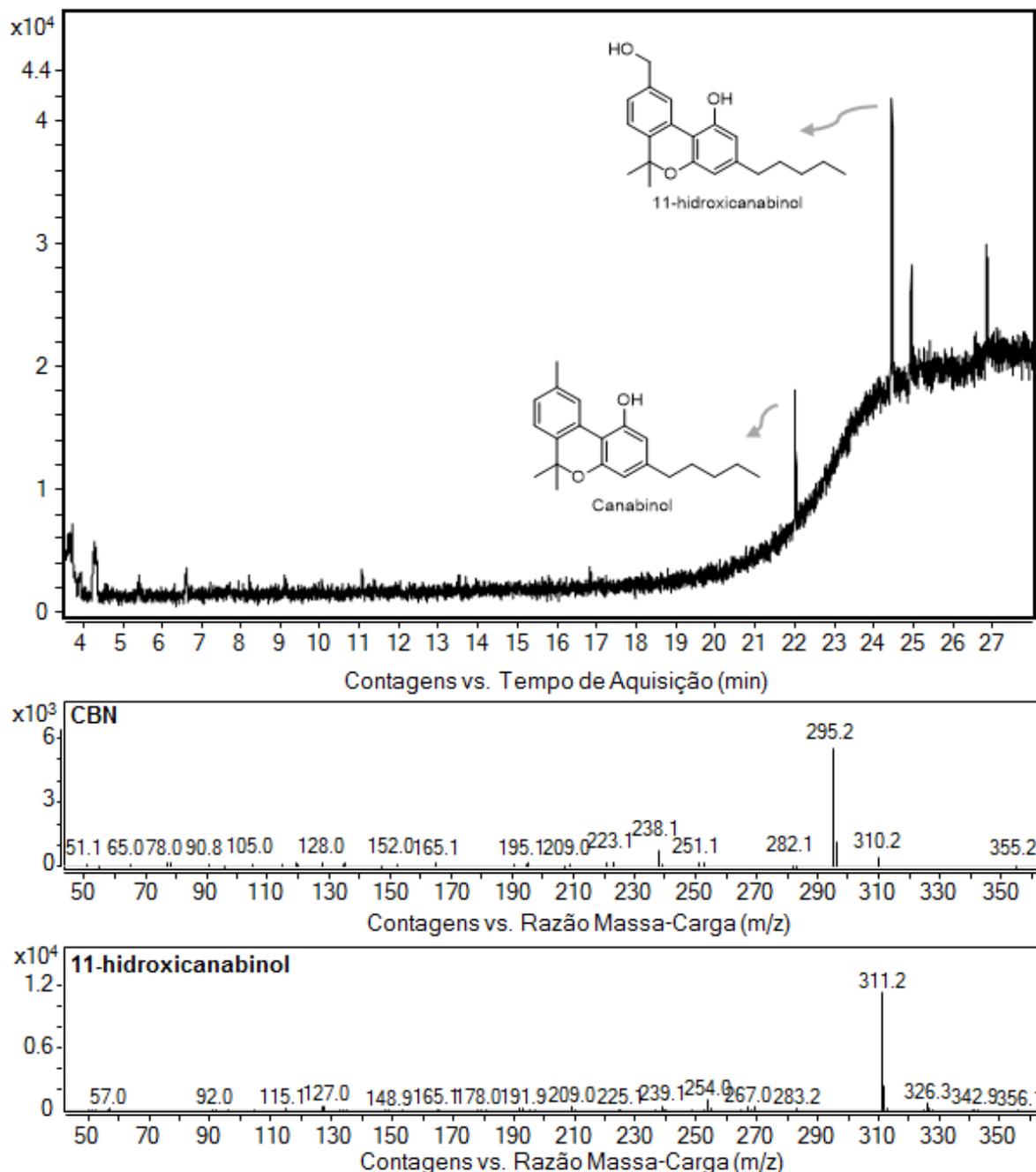


Figura 38. Cromatograma gasoso da Fração 1, estruturas e perfis de fragmentação dos canabinoides presentes na mesma.

Por CG-EM, constata-se a presença de 4 compostos na Fração 1, sendo dois deles pertencentes à classe dos canabinoides. Como no presente trabalho o interesse é nestes constituintes, somente os picos relativos a eles serão demonstrados. O primeiro, com tempo de retenção de 22,008 minutos e 26,58% de área de integração relativa, refere-se ao CBN, com 82,9% probabilidade de ser este composto pela biblioteca NIST. Já o segundo, em 24,453 minutos e 100% de área de integração relativa, é referente ao 11-hidroxicanabinol, com 71,6% probabilidade. A estrutura

química deste último encontra-se na Figura 38.

Os demais picos não foram identificados como canabinoides pela biblioteca NIST. Como é possível que ela não apresente todos os canabinoides existentes em seus registros, pelos seus íons moleculares pode-se tentar ter uma noção da possibilidade de se tratar de um canabinoide não identificado ou se confirmar se realmente trata-se de um composto que não pertence a esta classe através de buscas na literatura.^{70,71}

Os dois picos restantes, com tempos de retenção de 24,947 minutos e 26,840 minutos, apresentam respectivamente íons moleculares $m/z = 360$ e $m/z = 394$. Nenhum dos dois valores são referentes a canabinoides, logo, descarta-se a existência de mais constituintes desta classe na Fração 1, além dos dois já identificados.

- **Fração 2**

A Fração 2 apresenta o seguinte espectro de RMN de ^1H (Figura 39).

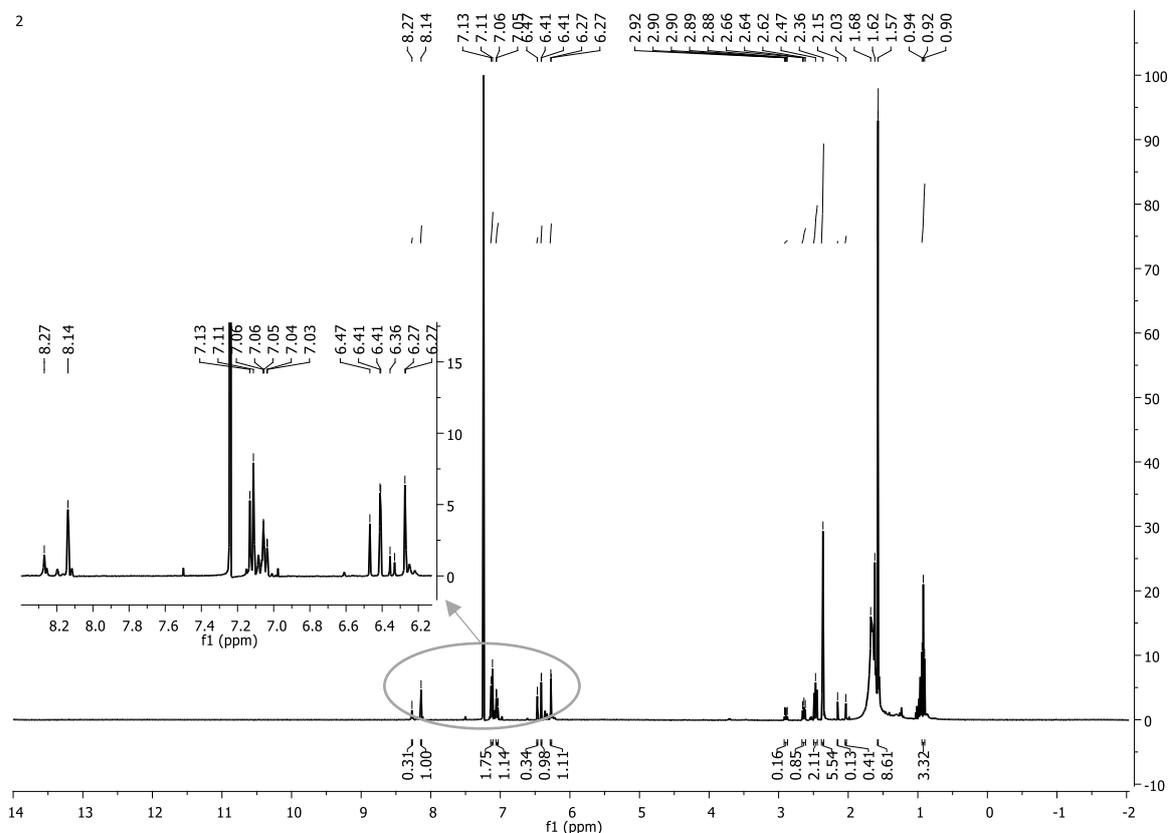


Figura 39. Espectro de RMN de ^1H da Fração 2.

Este espectro apresenta menor quantidade de sinais, o que pode indicar a presença de relativamente menos compostos e/ou impurezas na Fração 2. Ele

apresenta sinais característicos do CBN (ver Figura 32 e Tabela 4), como por exemplo o singlete em 8,14 ppm do hidrogênio H2, o sinal alargado em 7,04 ppm (literatura: $\delta = 7,07$ ppm, dubleto, $J = 7,9$ Hz) e o sinal alargado em 7,12 ppm (literatura: $\delta = 7,14$ ppm, dubleto, $J = 7,9$ Hz) dos hidrogênios H4 e H5, respectivamente, porém, apresenta alguns sinais a mais que não são característicos deste. Portanto, por RMN, pode se tratar do CBN misturado com mais compostos, ou também pode se tratar de um composto de estrutura semelhante a dele.

Por CG-EM, o cromatograma da Fração 2 apresentou 4 picos (Figura 40). Apenas o primeiro, com tempo de retenção de 20,372 minutos e 100% área de integração relativa é concernente a um canabinoide. No caso, trata-se da canabivarina (CBV), com 72,4% probabilidade pela biblioteca NIST.

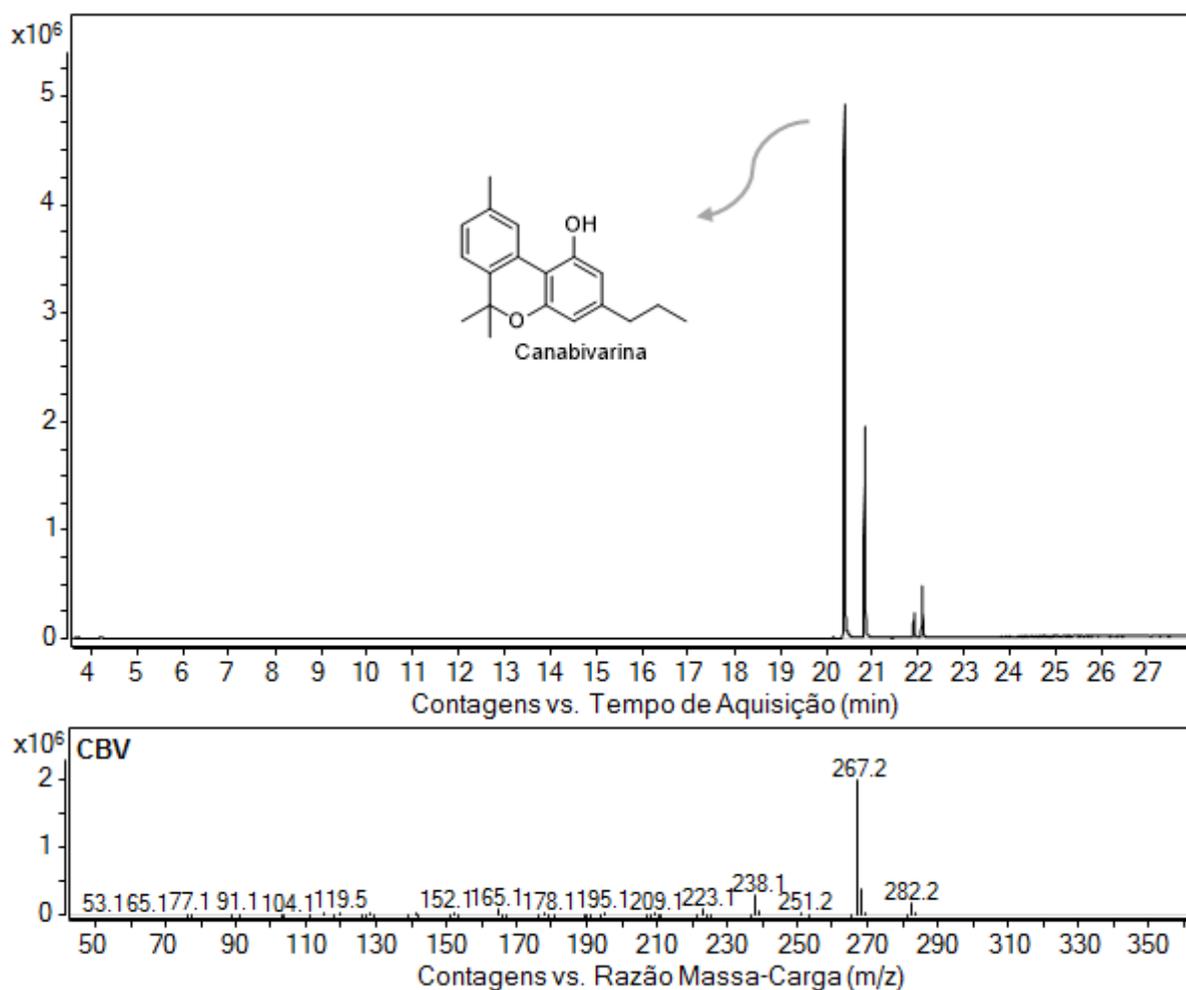


Figura 40. Cromatograma gasoso da Fração 2, estrutura e perfil de fragmentação da canabivarina.

Observa-se pela estrutura presente na figura acima que a canabivarina apresenta estrutura química muito semelhante ao canabinol. Este fato explica os sinais característicos que apareceram no espectro de RMN de ^1H da Figura 39.

Os demais picos não identificados como canabinoides pela biblioteca NIST na Figura 40 foram pesquisados na literatura^{70,71} pelos seus valores de m/z . Os picos 2 e 3 apresentam $m/z = 316$, e com este valor existe um possível canabinoide, o canabigerol (CBG), mas, por estar entre os principais desta classe, é registrado na biblioteca, desta forma, podendo-se descartar a possibilidade destes dois picos serem de canabinoides. O pico 4, com $m/z = 350$, também não corresponde a nenhum canabinoide.

- **Fração 3**

O espectro de RMN de ^1H da Fração 3 encontra-se na Figura 41 seguir.

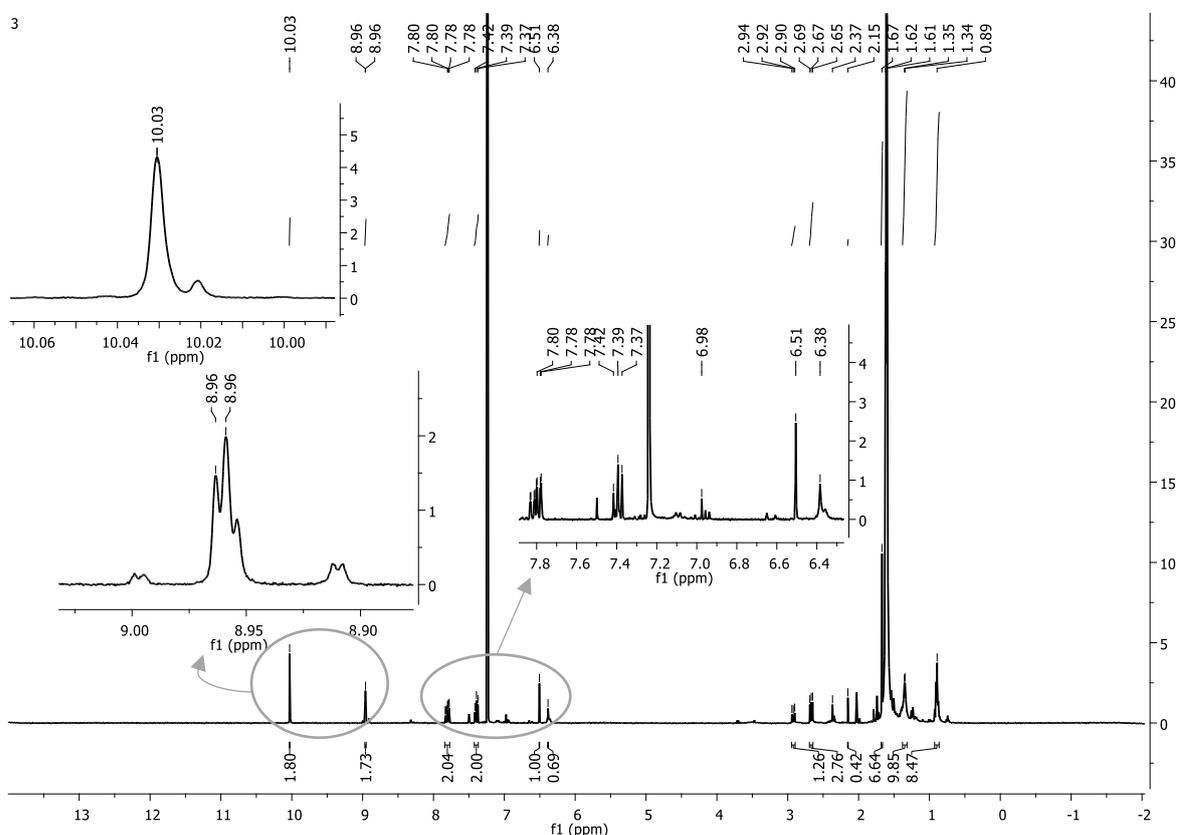


Figura 41. Espectro de RMN de ^1H da Fração 3.

Pela Figura 41, observa-se que provavelmente se tem mais de um composto na Fração 3, tanto pelas integrações quanto pela quantidade de sinais. Estes últimos, mais especificamente na região entre 6,00 ppm e 8,20 ppm, podem ser referentes a canabinoides, porém, dos dados da literatura que se dispõe neste trabalho, este espectro geral não é pertinente a nenhum dos canabinoides que se tem informações.

Para o singlete evidente em 10,03 ppm, uma possibilidade é que o mesmo seja de um hidrogênio de aldeído, pois deslocamentos químicos na região de 9,00 ppm a

10,00 ppm são característicos deste tipo de H,⁴¹ todavia, esta é apenas uma ideia. Neste caso, não se pode confirmar por RMN.

Para verificar a presença de canabinoides, submeteu-se a Fração 3 à CG e a Figura 42 abaixo exhibe o cromatograma gasoso obtido.

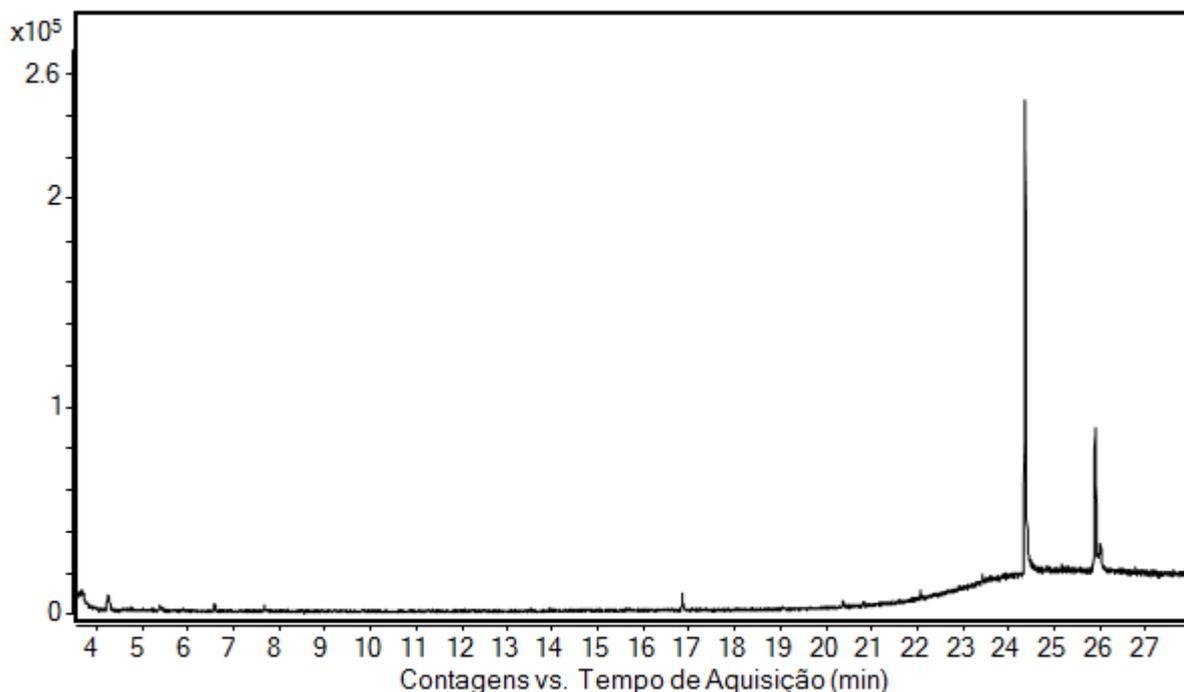


Figura 42. Cromatograma gasoso da Fração 3.

Nota-se a presença de 3 picos, sendo que o terceiro parece estar coeluído com o segundo. Foi constatado pela biblioteca NIST que não se tratam de canabinoides. Porém, buscando-se alternativas para possíveis inferências de compostos desta classe não registrados na presente biblioteca, buscou-se pelo valor da razão massa/carga (m/z) a possível existência dos mesmos, comparando-se os perfis de fragmentação obtidos dos picos do cromatograma com os da literatura.⁷⁰ Novamente não se achou qualquer tipo de correlação.

O primeiro pico, de tempo de retenção de 24,358 minutos e 100% de área de integração relativa, tem seu íon molecular com $m/z = 358$. Com este mesmo valor, existem seis compostos pertencentes à classe dos canabinoides. No entanto, são referentes a compostos na forma ácida,⁷¹ que não aparecem no CG por se descarboxilarem a temperaturas elevadas, mas aparecendo no cromatograma como seus homólogos neutros. Como não foi o caso, constata-se que a Fração 3 é realmente ausente de canabinoides.

- **Fração 4**

A próxima banda cromatográfica isolada na separação da “Frações 19-24” por CLAE trata-se da Fração 4. Seu espectro de RMN de ^1H e seu cromatograma gasoso encontram-se, respectivamente, nas Figuras 43 e 44 a seguir.

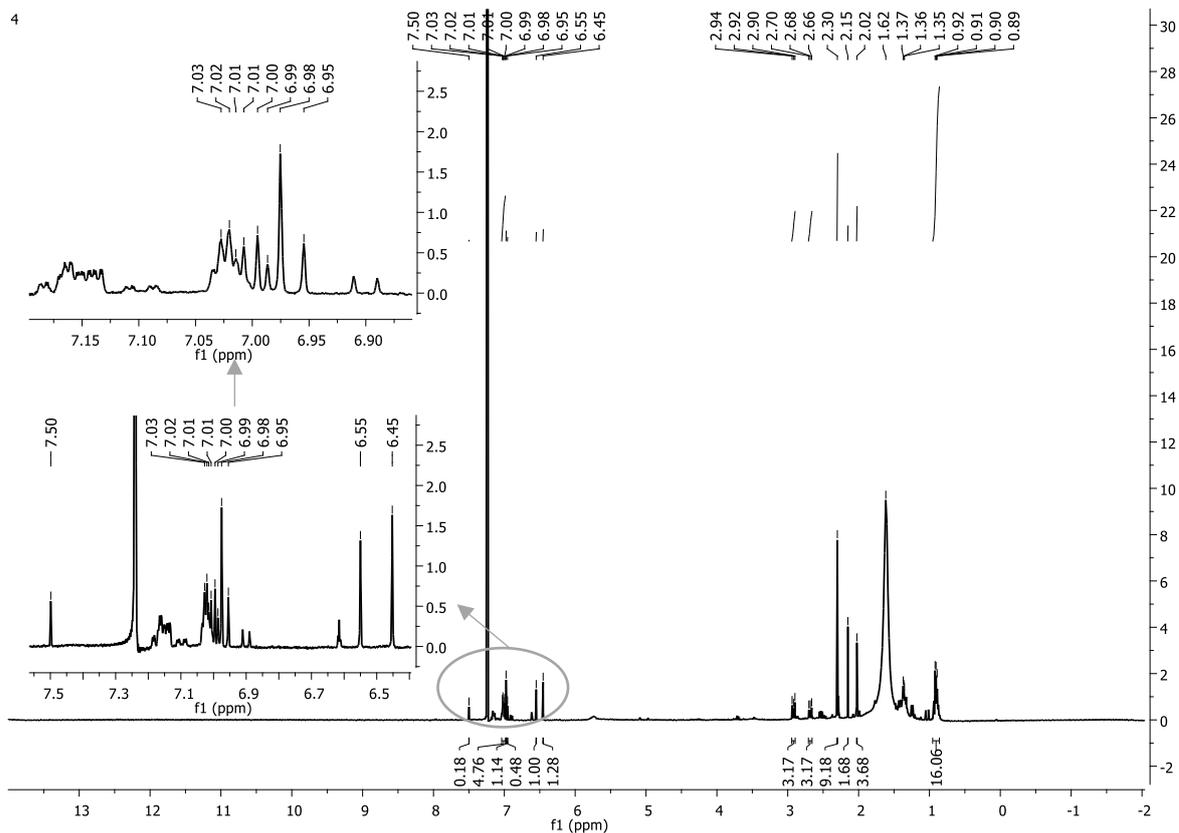


Figura 43. Espectro de RMN de ^1H da Fração 4.

Novamente, pela análise da Figura 43 acima, trata-se de uma fração impura, não separada com eficiência. Partindo-se então para o resultado obtido por CG-EM, observa-se a presença de 4 compostos no cromatograma da Fração 4 (Figura 44).

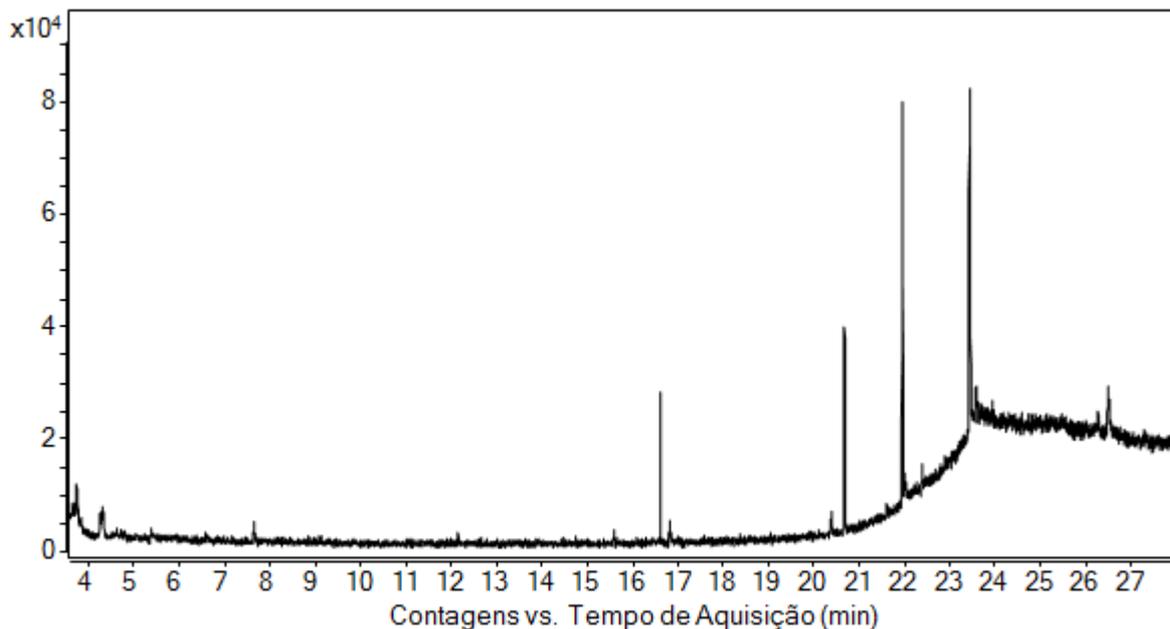


Figura 44. Cromatograma gasoso da Fração 4.

Aqui também não foi observada a presença de canabinoides registrados na biblioteca NIST. Após análise dos valores de m/z de cada pico e comparações com possíveis compostos pelos perfis de fragmentação da literatura,⁷⁰ também não foi verificada a presença de constituintes da classe de interesse deste estudo. Todavia, algumas constatações a serem feitas baseando-se apenas nos valores de m/z são as seguintes: 1) com valor de $m/z = 286$, idêntico ao do pico 2, existem 5 possíveis canabinoides (ver Tabela 3 da referência 71); 2) com $m/z = 320$, pico 3, existem 2 canabinoides; e 3) com $m/z = 354$, pico 4, existe 1 canabinoide.⁷¹ Porém, mesmo havendo a possibilidade desses picos estarem relacionados a canabinoides, uma melhor purificação e mais estudos devem ser feitos para complementar essas duas técnicas analíticas para então se poder afirmar a identidade dos compostos presentes.

- **Fração 5**

A Fração 5 apresenta o seguinte espectro de RMN de ^1H (Figura 45).

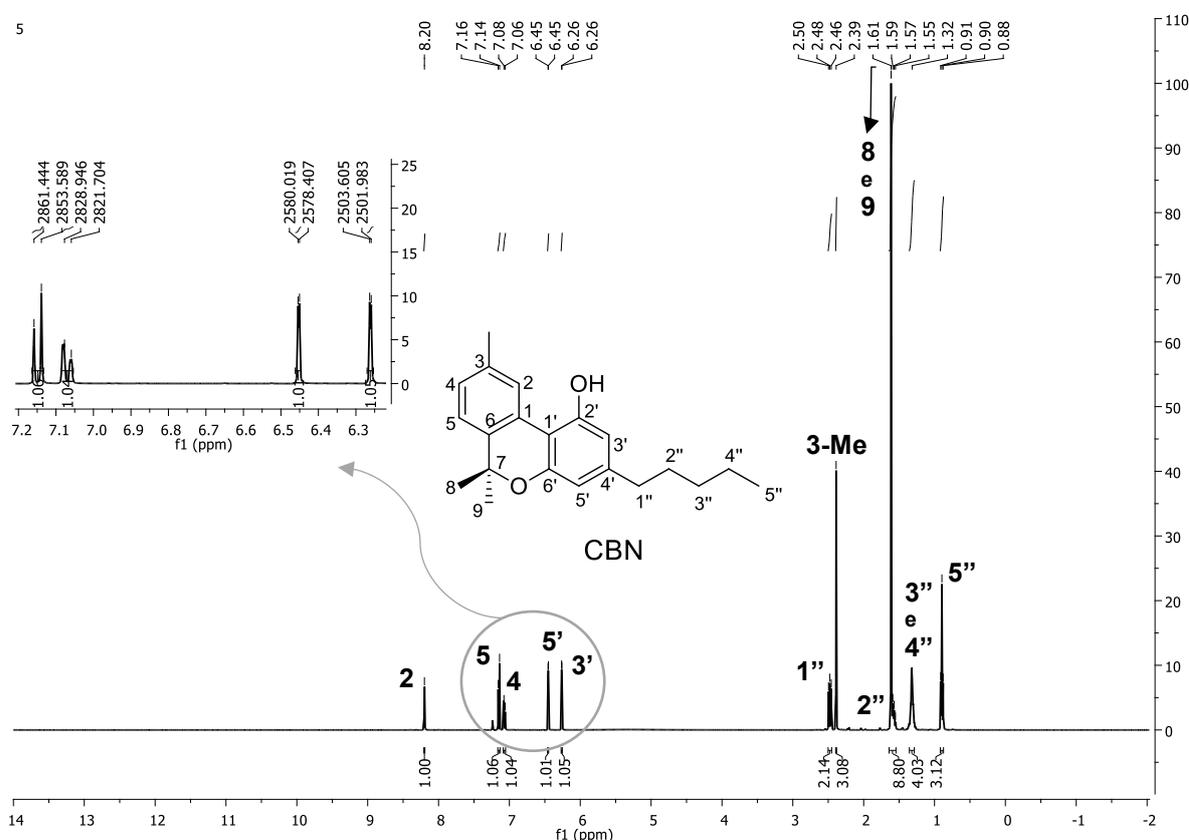


Figura 45. Espectro de RMN de ^1H da Fração 5.

Pelo espectro acima observa-se que a separação desta banda cromatográfica foi bem-sucedida. Ele encontra-se limpo, com os sinais bem definidos e ótima relação sinal-ruído. Analisando-se os deslocamentos químicos e as integrações e comparando-se com a literatura²² e com os dados da Tabela 4, trata-se do canabinol (CBN) puro.

Para uma maior confirmação, realizou-se as atribuições de todos os sinais de hidrogênio presentes no espectro acima a partir de comparação com os dados presentes no trabalho de Choi et al. (2004a)²². A Tabela 7 a seguir mostra os deslocamentos químicos do CBN no espectro de RMN de ^1H (Figura 45) obtido e seus respectivos valores encontrados na literatura.²²

Tabela 7. Deslocamentos químicos (δ) em ppm para o Canabinol (CBN) – Espectro de RMN de ^1H do CBN separado por CLAE e dados da literatura.²²

Posição	RMN de ^1H - Literatura	RMN de ^1H - Composto obtido
1		
2	8,16 (1H, s)	8,20 (1H, s)
3		
3-Me	2,38 (3H, s)	2,39 (3H, s)
4	7,07 (1H, d, 7,9 Hz)	7,07 (1H, d, 7,8 Hz)
5	7,14 (1H, d, 7,9 Hz)	7,15 (1H, d, 7,8 Hz)
6		
7		
8	1,60 (6H, s)	1,61 (6H, s)
9	1,60 (6H, s)	1,61 (6H, s)
1'		
2'		
3'	6,29 (1H, d, 1,1 Hz)	6,26 (1H, d, 1,6 Hz)
4'		
5'	6,44 (1H, d, 1,1 Hz)	6,45 (1H, d, 1,6 Hz)
6'		
1''	2,50 (2H, t, 7,5 Hz)	2,48 (2H, t, 7,5 Hz)
2''	1,63 (m)	1,57 (2H, m)*
3''	1,32 (m)	1,32 (4H, m)
4''	1,32 (m)	1,32 (4H, m)
5''	0,89 (3H, t, 6,8 Hz)	0,90 (3H, t, 6,9 Hz)
2'-OH	5,13 (1H, s)	-

s - singleto; d - dubleto; t - tripleto; m - multipleto.

*Este sinal encontra-se parcialmente suprimido pelas duas metilas em 1,61 ppm.

- Sinal não apareceu no espectro.

O cromatograma gasoso da Fração 5 encontra-se a seguir (Figura 46), e por ele confirma-se a presença de apenas CBN na mesma. Seu tempo de retenção no presente método foi de 22,008 minutos, com 100% de área de integração relativa, e pela biblioteca NIST, a probabilidade de ser este composto é de 97,6%.

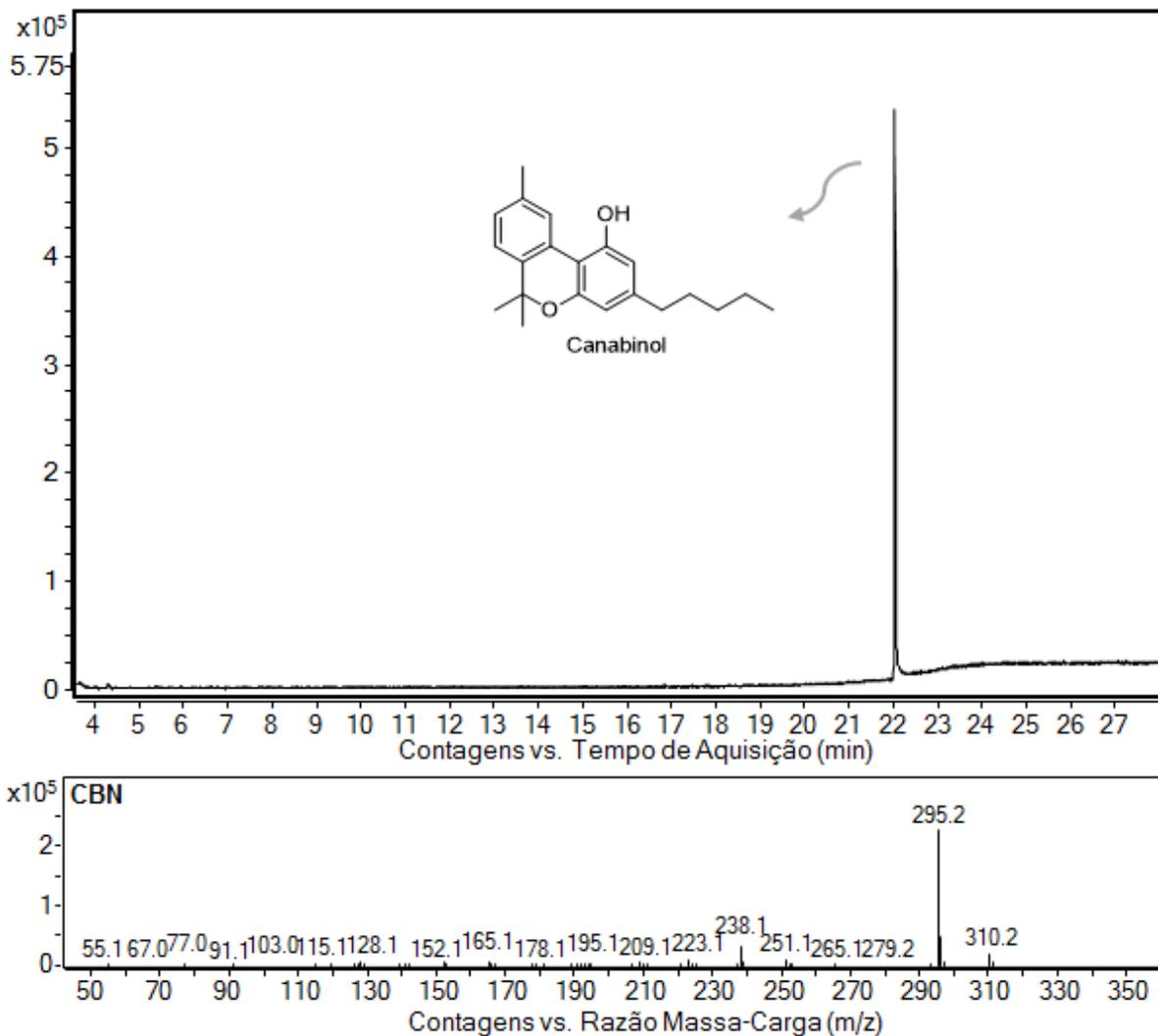


Figura 46. Cromatograma gasoso da Fração 5, estrutura e perfil de fragmentação do CBN.

Portanto, conclui-se que se conseguiu obter o canabinol com alta pureza ($\approx 100\%$), cumprindo este composto, então, o papel de poder ser utilizado como material de referência.

Da Fração 5 também foram realizados outros experimentos de RMN. Como o CBN estava puro, as demais análises foram feitas unicamente para novamente comprovar que se tratava deste composto. Os espectros obtidos são encontrados no Anexo 2.

- **Fração 6**

A Figura 47 abaixo exibe o espectro de RMN de ^1H da Fração 6.

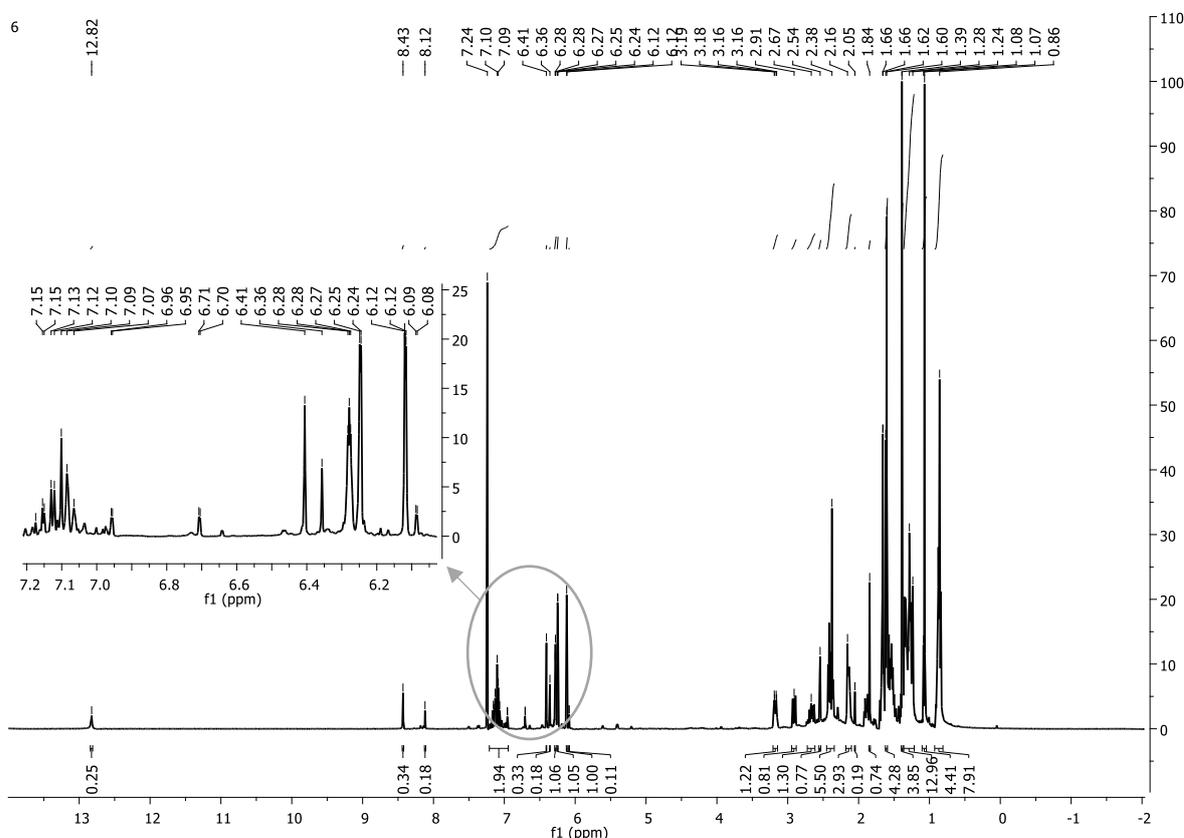


Figura 47. Espectro de RMN de ^1H da Fração 6.

Nota-se que o espectro apresenta muitos sinais, logo, a Fração 6 está impura e nela estão presentes no mínimo dois compostos. Entretanto, dentre estes, é muito provável a existência de canabinoides, pelos sinais característicos destes componentes por todo o espectro, como por exemplo, os sinais em 6,12 ppm, 6,25 ppm, 6,27 ppm, etc., que podem ser alusivos ao Δ^9 -THC e também os sinais em 8,12 ppm e 7,12 ppm, que podem ser relativos ao CBN (ver Tabela 4). Por RMN, quando se trabalha com misturas desse tipo, o que se tem são possibilidades e não certeza. Uma constatação a ser feita é a presença do singleto em 12,82 ppm que indica a provável presença de um ácido na Fração 6, que até então não havia aparecido nas demais frações já analisadas.

O cromatograma gasoso (Figura 48) mostra a presença de seis compostos (seis picos) na presente fração, sendo 3 deles canabinoides. O pico 1, de tempo de retenção de 21,304 minutos e área de integração relativa de 6,47% é Δ^8 -THC, com 86,5% de probabilidade pela biblioteca NIST. O pico 2, em 21,502 minutos e 100% de área de integração relativa, trata-se do Δ^9 -THC com 89,2% probabilidade. E o pico 4,

com tempo de retenção de 22,013 minutos e área de integração relativa de 33,7% é o CBN com 98,3% de probabilidade.

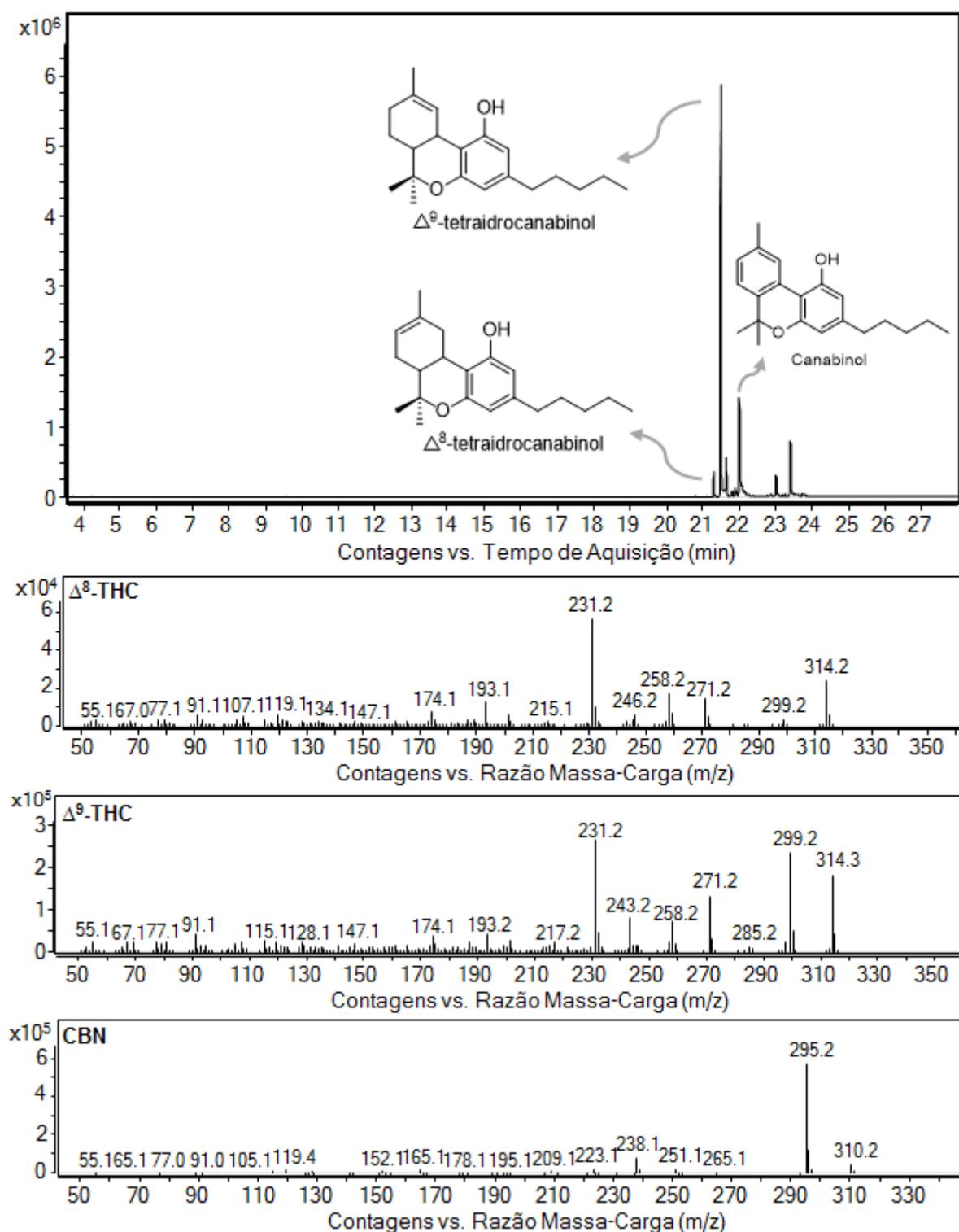


Figura 48. Cromatograma gasoso da Fração 6, estruturas e perfis de fragmentação de seus canabinoides.

Os demais picos, 3, 5 e 6, não identificados como canabinoides pela presente biblioteca, apresentam, respectivamente, valores de *m/z* de 308, 348 e 344.

Com $m/z = 308$ existe um possível canabinoide de acordo com a referência 71, com $m/z 348$ existem 3 e com $m/z 344$ existem 3, porém, esses últimos são ácidos, e não apareceriam no CG.

- **Fração 7**

A Fração 7 é representada pelo espectro de RMN de ^1H presente na seguinte Figura 49.

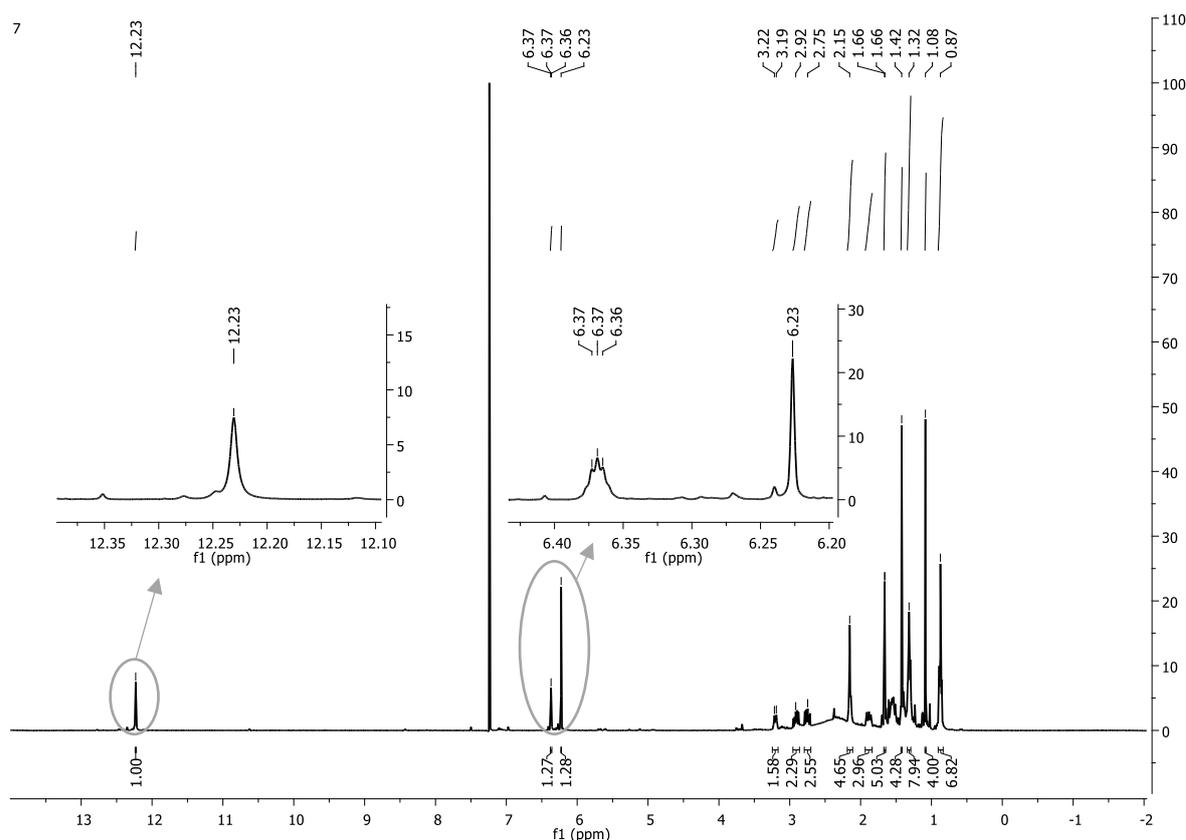


Figura 49. Espectro de RMN de ^1H da Fração 7.

Observa-se que se trata de um espectro mais limpo (principalmente na região de hidrogênios aromáticos dos canabinoides) em que provavelmente se tem um desses compostos e mais algumas impurezas (quando analisa-se as integrações). Destaca-se aqui a possibilidade de se ter um ácido, visto o singlete que aparece em 12,23 ppm ser característico de hidrogênios deste grupo funcional.

Mais especificamente, parece tratar-se do ácido tetraidrocanabinólico (THCA). Comparando-se os valores dos deslocamentos químicos dos sinais destacados no espectro com os dados da literatura²² presentes na Tabela 4, estes três sinais são característicos deste canabinoide.

Para a confirmação, segue o cromatograma gasoso da Fração 7 na Figura 50.

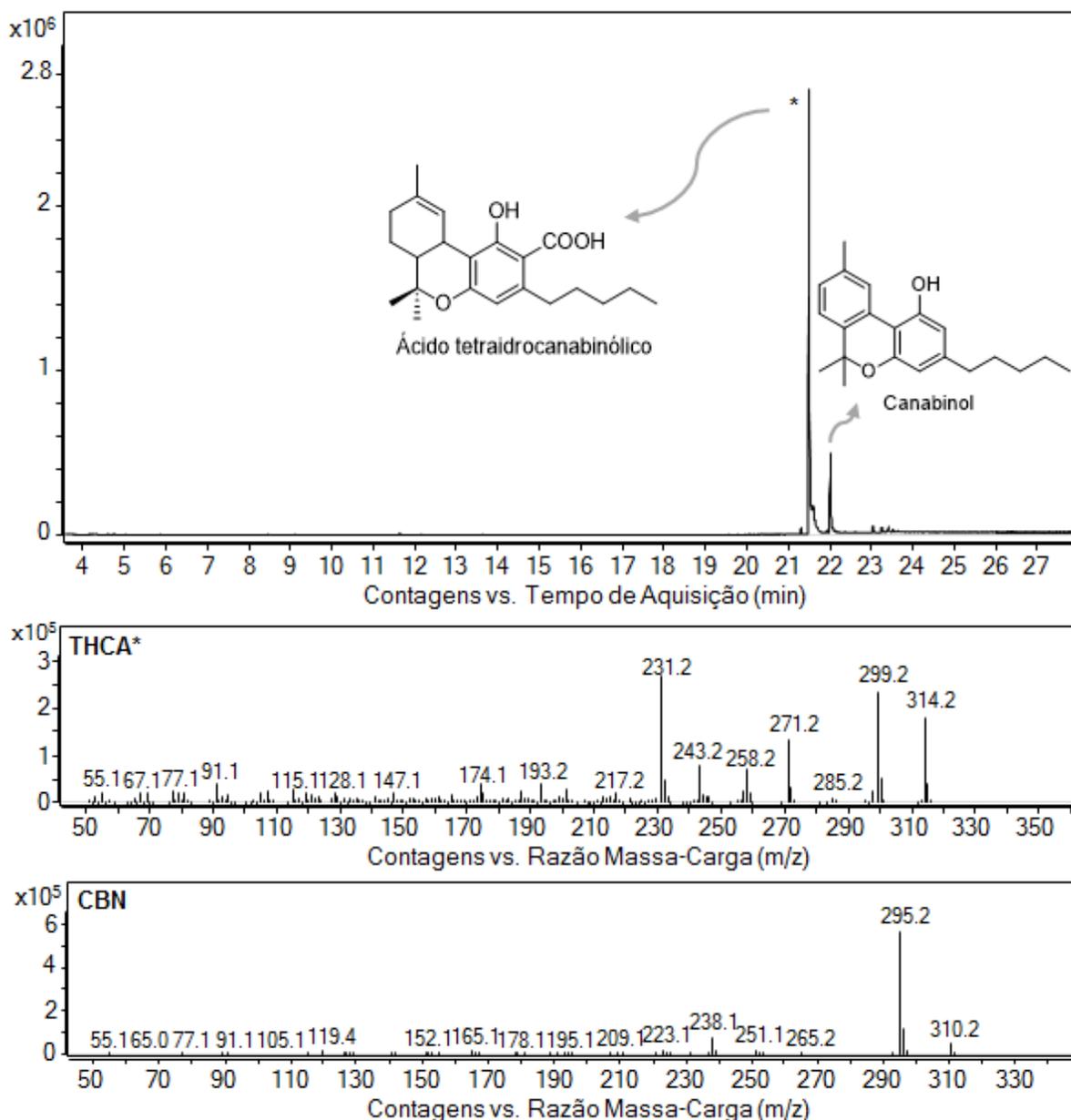


Figura 50. Cromatograma gasoso da Fração 7, estruturas e perfis de fragmentação de seus canabinoides.

Observa-se que há corroboração das constatações feitas por RMN. A Fração 7 apresentou dois compostos, ambos canabinoides, sendo o majoritário, de tempo de retenção de 21,493 minutos e 100% de integração relativa de área, o THCA. No cromatograma de CG-EM, o mesmo aparece como sendo o Δ^9 -THC, com 89,3% de probabilidade pela biblioteca NIST, porém, como confirmado por RMN, trata-se do seu homólogo ácido. Isso ocorre pelo fato do THCA se descarboxilar a THC a temperaturas mais elevadas, em torno de 125 a 150°C.¹³ Já o segundo pico, com tempo de retenção de 22,008 minutos e área de integração relativa de 21,13% é o CBN com 98,2% de probabilidade. Como não se observa sinais evidentes

característicos de CBN no espectro de RMN de ^1H da Figura 49, uma possível explicação para o seu aparecimento no cromatograma gasoso pode ser a elevada temperatura que faz o THCA se descarboxilar a THC e este conseqüentemente se oxidar a CBN.

- **Fração 8**

Nas Figuras 51 e 52 são apresentados o espectro de RMN de ^1H e o cromatograma obtido por CG-EM da Fração 8.

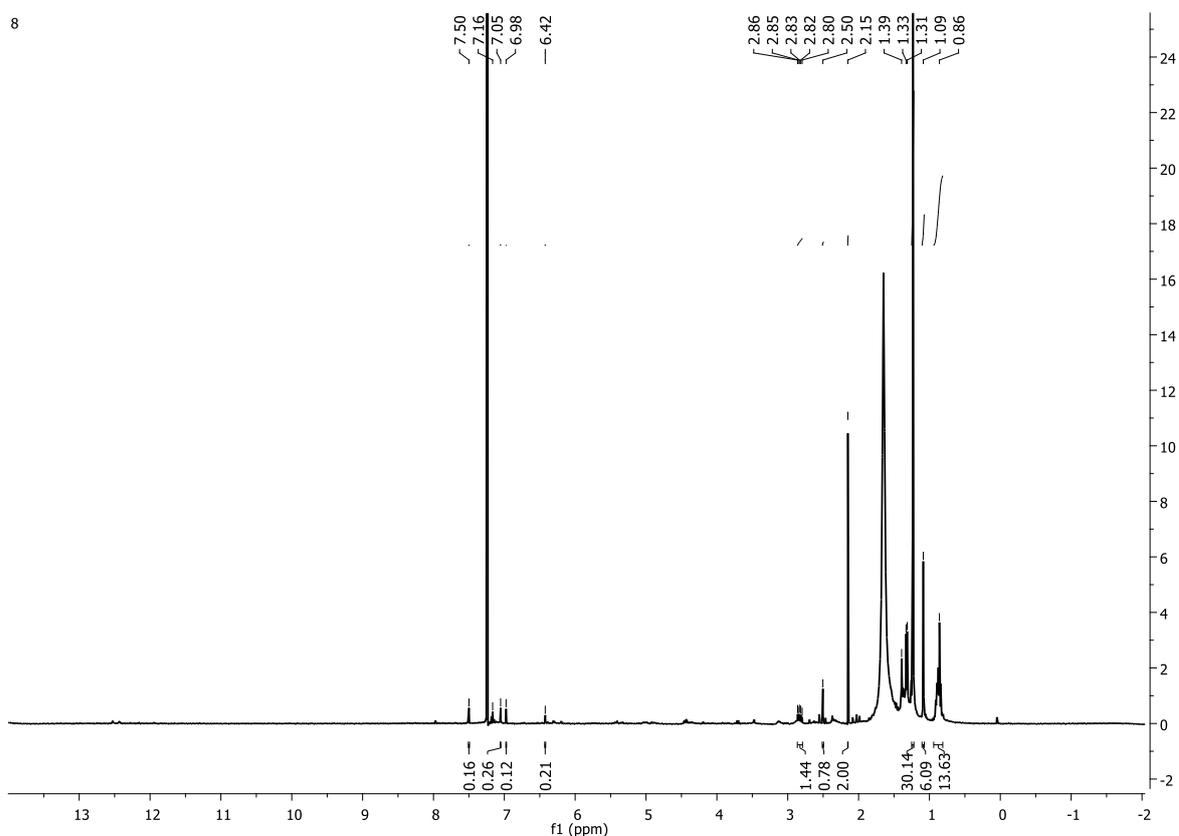


Figura 51. Espectro de RMN de ^1H da Fração 8.

No espectro acima é possível observar apenas que não se trata de uma fração pura, visto que as integrações mostram a presença de muitos hidrogênios. Também não se tem muitos sinais característicos de canabinoides, o que pode levar a crer que é possível que esta fração não apresente compostos pertencentes a essa classe.

Ao analisar o cromatograma abaixo (Figura 52), nota-se a presença de vários picos. Após verificá-los, constatou-se que não são relativos a canabinoides.

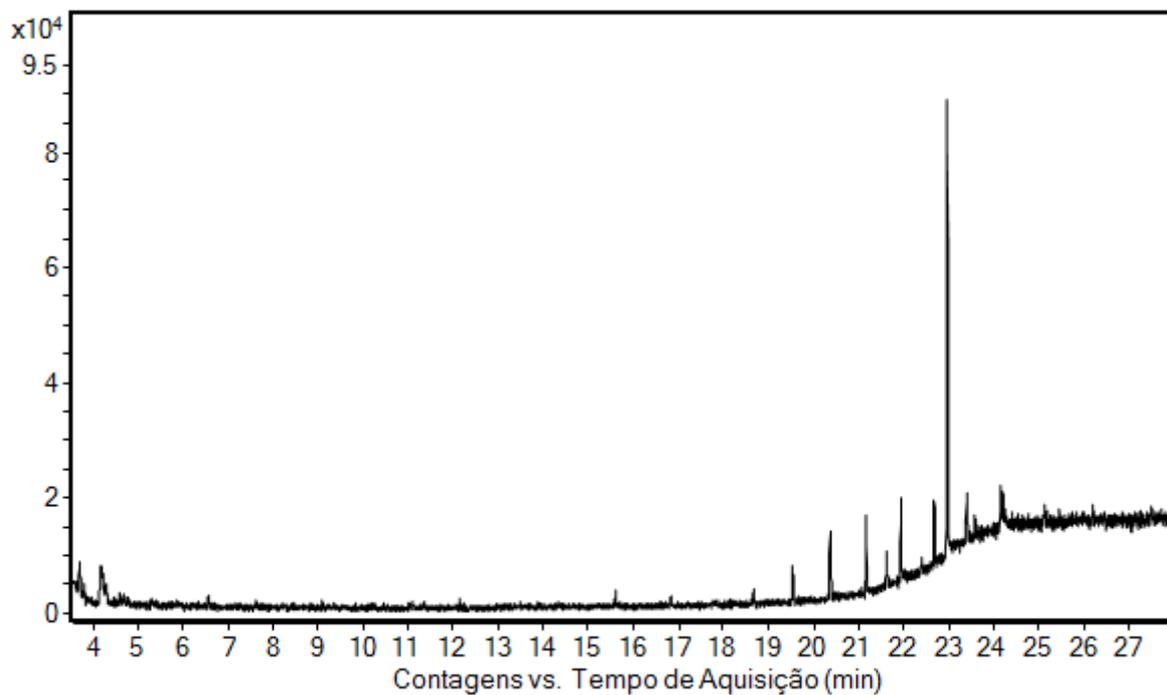


Figura 52. Cromatograma gasoso da Fração 8.

- **Fração 9**

Por fim, a última banda cromatográfica separada por CLAE foi a Fração 9. Seu espectro de RMN de ^1H é mostrado na Figura 53 abaixo.

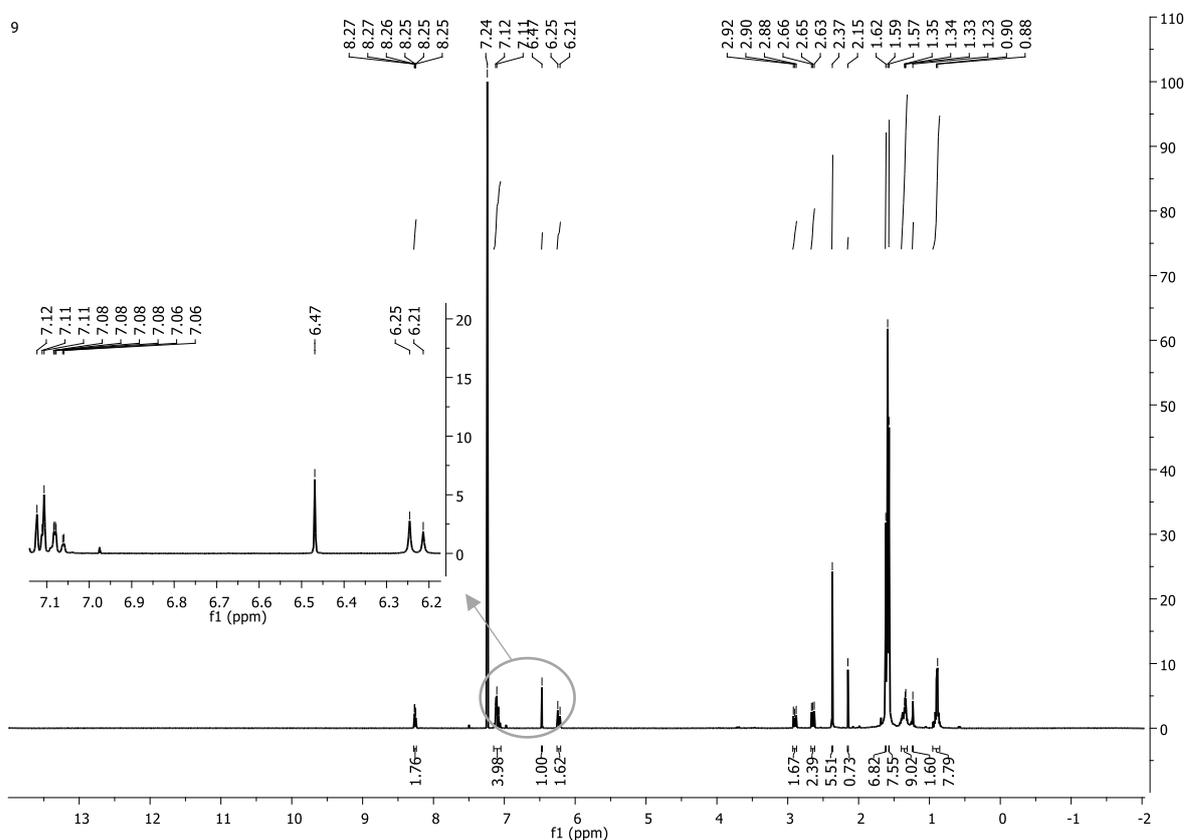


Figura 53. Espectro de RMN de ^1H da Fração 9.

A Fração 9 também apresentou um espectro mais limpo (Figura 53), mas que não aparenta conter apenas um composto. Visualmente, no geral, este se assemelha a espectros de canabinoides, apresentando sinais que aparecem nas mesmas regiões. É possível observar alguns deslocamentos químicos semelhantes àqueles encontrados para o CBN, como por exemplo o dubleto em 7,07 ppm ($J = 7,9$ Hz) e o singlete largo em 7,12 ppm (literatura: $\delta = 7,14$ ppm, dubleto, $J = 7,9$ Hz), no entanto, comparando-se este com o espectro da Figura 45, não parece se tratar de CBN, podendo, talvez, ser algum composto com estrutura semelhante a dele.

O cromatograma gasoso da Fração 9, presente na Figura 54, mostra a presença de apenas dois compostos. Pela biblioteca NIST os picos não são concernentes a canabinoides.

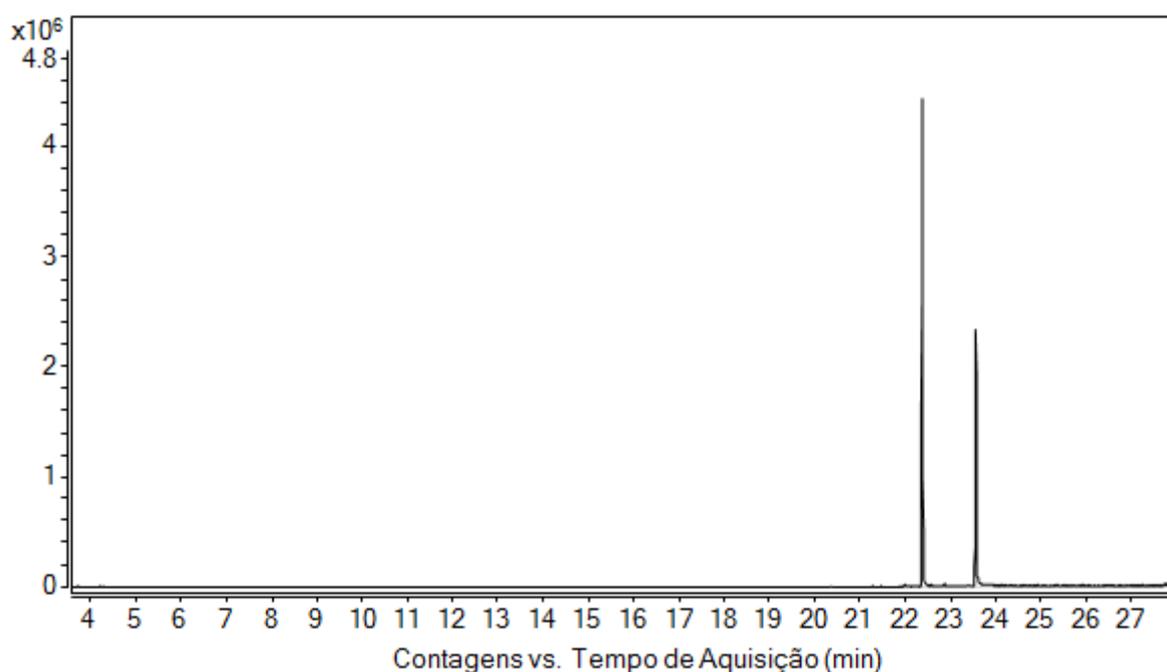


Figura 54. Cromatograma gasoso da Fração 9.

Entretanto, analisando-se a possibilidade de serem constituintes desta classe não identificados no banco de dados NIST, buscou-se possíveis correlações na literatura.^{70,71} O pico 1, de tempo de retenção de 22,392 minutos e 100% de área de integração relativa, apresenta $m/z = 344$, que de acordo com a referência 71 pode ser de 3 possíveis canabinoides, que por serem ácidos, deveriam aparecer como seus homólogos neutros no CG, mas este não foi o caso. Já o pico 2, com $m/z = 378$, não é referente a nenhum canabinoide até o momento reportado na literatura pesquisada.

Portanto, resumindo tudo o que foi exposto acima, das 9 frações obtidas da purificação da fração denominada “Frações 19-24” por CLAE, apenas uma estava completamente pura (Fração 5), e de todas elas, apenas cinco apresentaram canabinoides identificados por CG-EM, conforme pode ser visto na Tabela 7 a seguir.

Tabela 7. Canabinoides identificados por CG-EM nas frações obtidas da purificação por CLAE da “Frações 19-24”.

Fração	Massa (mg)	Canabinoides por CG-EM (Integração relativa %)	Tempo de retenção (minutos)	Probabilidade (%)
1	5,7	CBN (26,58%)	22,008	82,9%
		11-hidroxicanabinol (100%)	24,453	71,6%
2	9,3	CBV (100%)	20,372	72,4%
3	2,6	-	-	-
4	2,5	-	-	-
5	129,2	CBN (100%)	22,008	97,6%
6	8,1	Δ^8 -THC (6,47%)	21,304	86,5%
		Δ^9 -THC (100%)	21,502	89,2%
		CBN (33,7%)	22,013	98,3%
7	6,5	Δ^9 -THCA*(100%)	21,493	89,3%
		CBN (21,13%)	22,008	98,2%
8	4,0	-	-	-
9	0,4	-	-	-

-: frações não apresentaram canabinoides.

*: no CG-EM apareceu Δ^9 -THC, porém, trata-se do seu ácido precursor THCA (confirmado por RMN), que se decompõe ao homólogo neutro em temperaturas elevadas.

Como essas frações não foram completamente separadas e algumas apresentaram misturas de canabinoides, para se obter os compostos identificados em sua forma pura, tentou-se nova purificação. Duas frações foram resubmetidas à CLAE. A seguir encontram-se os resultados obtidos para as mesmas.

4.3.2. Purificação da Fração 2

A Fração 2, por CG-EM, apresentou 4 compostos (Figura 40). Dentre eles, a canabivarina (CBV) era a de maior porcentagem na amostra.

Ao repurificar esta fração por CLAE-DAD com o intuito de se obter o canabinoide CBV puro obteve-se o seguinte cromatograma (Figura 55) com 5 bandas cromatográficas, nomeadas de subfrações 2.1 a 2.5.

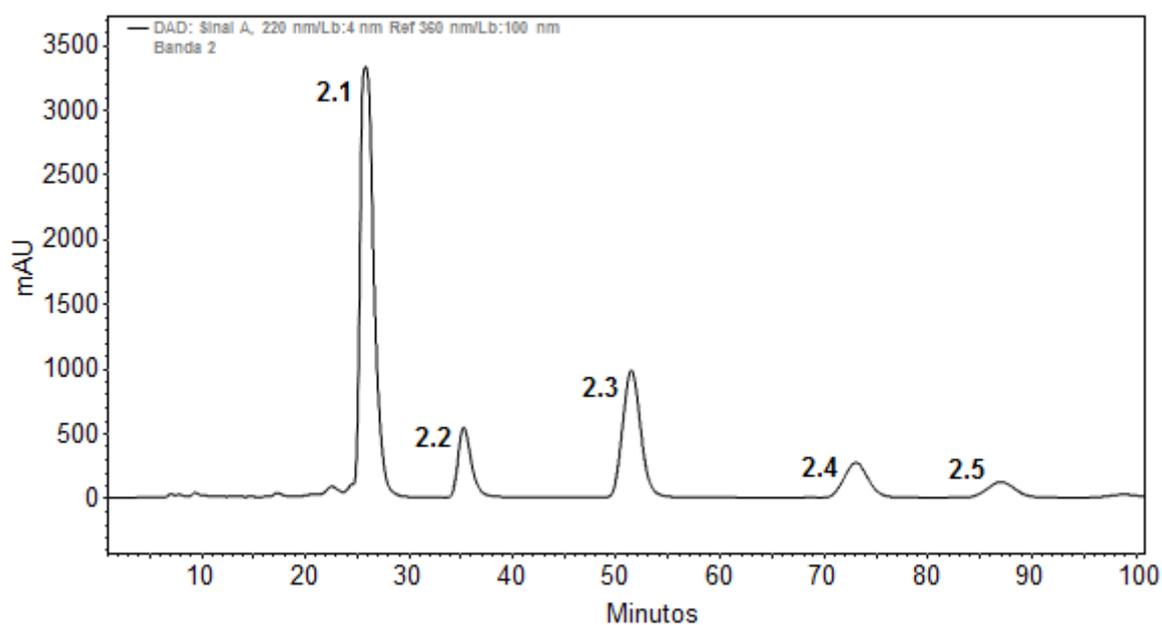


Figura 55. Cromatograma líquido (CLAE-DAD) obtido da purificação da Fração 2.

A Subfração 2.1, de tempo de retenção de 24,839 minutos e de maior absorvância, foi inferida como sendo referente ao composto majoritário na amostra, no caso, o CBV. Como a mesma foi separada e considerada pura, a analisou-se por RMN de ^1H . O espectro encontra-se na Figura 56 a seguir.

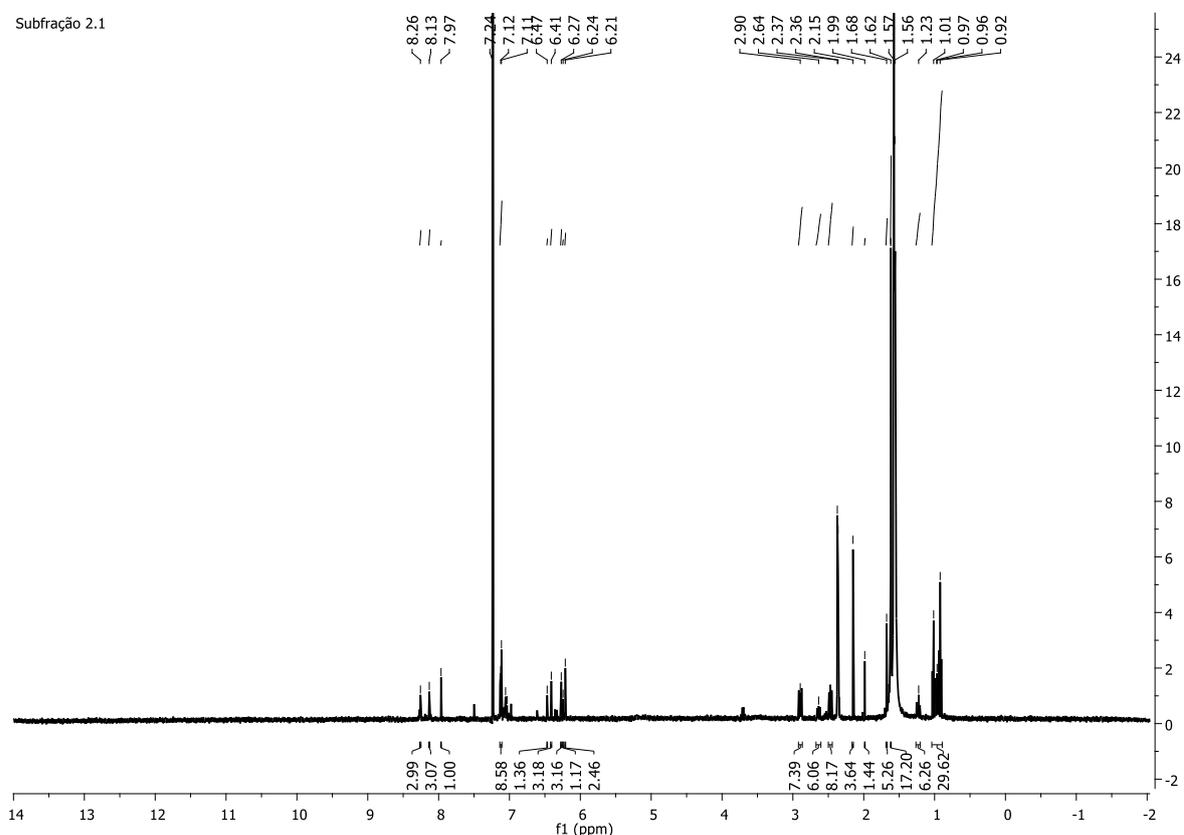


Figura 56. Espectro de RMN de ^1H da Subfração 2.1 após purificação por CLAE-DAD da Fração 2.

Observa-se que de alguma forma a purificação não foi eficiente, pois há mais de um composto no espectro de RMN de ^1H acima. Este espectro é proveniente de uma única banda cromatográfica separada por CLAE-DAD, a Subfração 2.1, porém, se comparado ao espectro de RMN de ^1H de sua fração de origem, a Fração 2 (Figura 39), constata-se que o primeiro apresenta mais sinais do que este último.

Nota-se no espectro da Figura 56 sinais com deslocamentos químicos semelhantes aos do CBN, o que era de se esperar, visto que CBN e CBV apresentam estruturas químicas quase que idênticas. Logo, por RMN pode-se inferir que se tem CBV na Subfração 2.1 separada, porém, tem-se mais compostos juntos que não foram vistos no cromatograma de CLAE, por provavelmente estarem sobrepostos pela banda cromatográfica deste constituinte.

Resolveu-se, então, realizar CG-EM da Subfração 2.1 para verificar o que havia acontecido e o cromatograma obtido é mostrado a seguir (Figura 57).

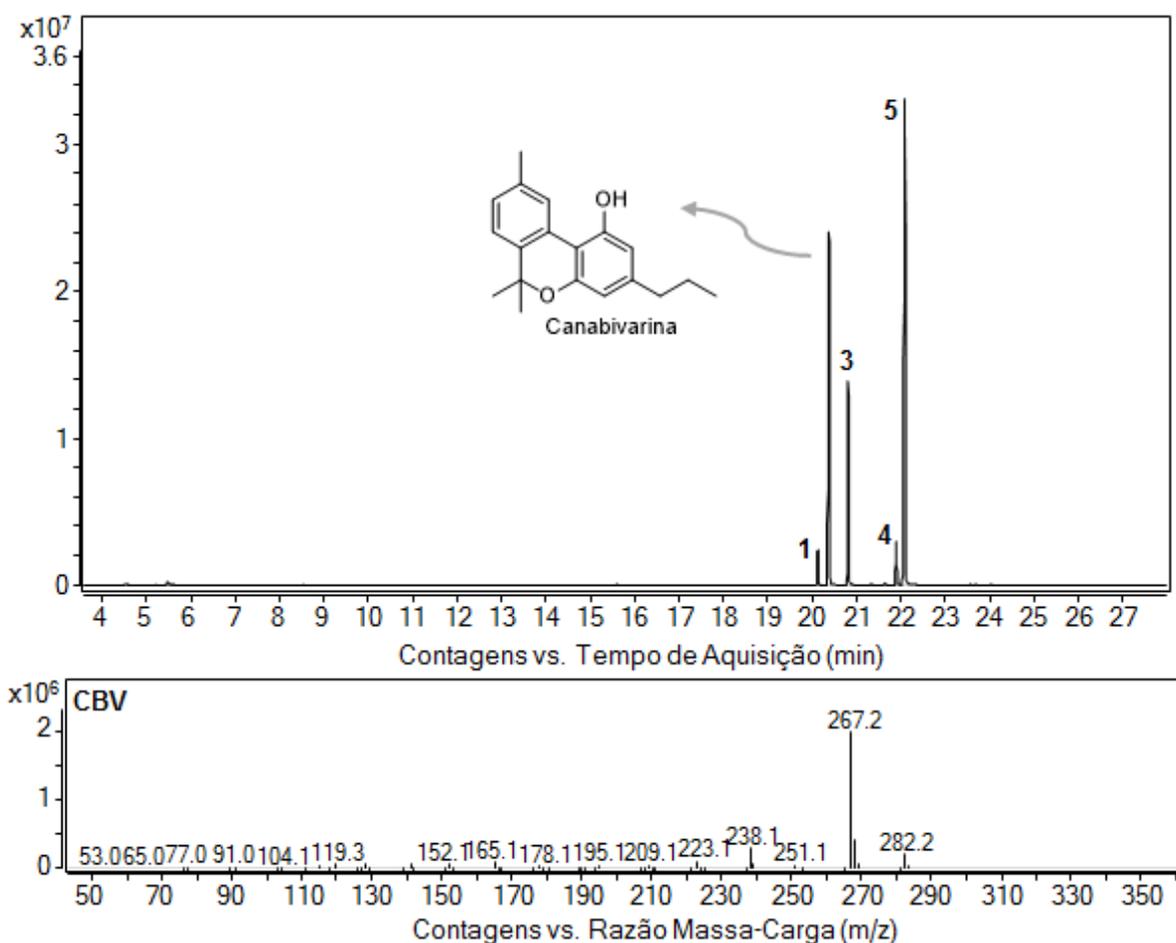


Figura 57. Cromatograma gasoso da Subfração 2.1, estrutura e perfil de fragmentação da cannabivarina.

O cromatograma acima, da Subfração 2.1, que por CLAE-DAD tratava-se de apenas uma banda cromatográfica (Figura 55) e conseqüentemente se esperaria que

de um único composto, apresentou 5 picos. De acordo com CLAE, esta subfração estava pura e isolada, o que não foi observado por RMN e CG-EM. Comparando-se este cromatograma (Figura 57) com aquele da Fração 2 originária (Figura 40), observa-se que após separada, a Subfração 2.1 apresentou 5 picos, enquanto a sua fração de origem (antes da purificação) apresentou apenas 4 picos. Além disso, a canabivarina (CBV), que na Fração 2 (Figura 40) apresentava 100% de integração relativa de área, agora, no cromatograma da Subfração 2.1, teoricamente purificada e onde se esperava ter um único pico referente ao CBV, não é mais o pico majoritário (Figura 57).

Portanto, conclui-se que a purificação que havia se achado ser eficaz, não o foi. E, possíveis explicações para isto são o fato da possibilidade de terem sido formados compostos de degradação devido à exposição a elevadas temperaturas no CG ou até mesmo da possibilidade de contaminação com impurezas.

4.3.3. Purificação da Fração 6

A purificação da Fração 6 era de grande valia, pelo fato de apresentar o Δ^9 -THC, composto de extrema importância forense. Após diversas tentativas de otimização de métodos, chegou-se a um que separava melhor as bandas cromatográficas de interesse. Por CG, a Fração 6 apresentou 6 picos (Figura 48), já pelo cromatograma obtido por CLAE-DAD (Figura 58), apareceram 7 bandas, denominadas de subfrações 6.1 a 6.7.

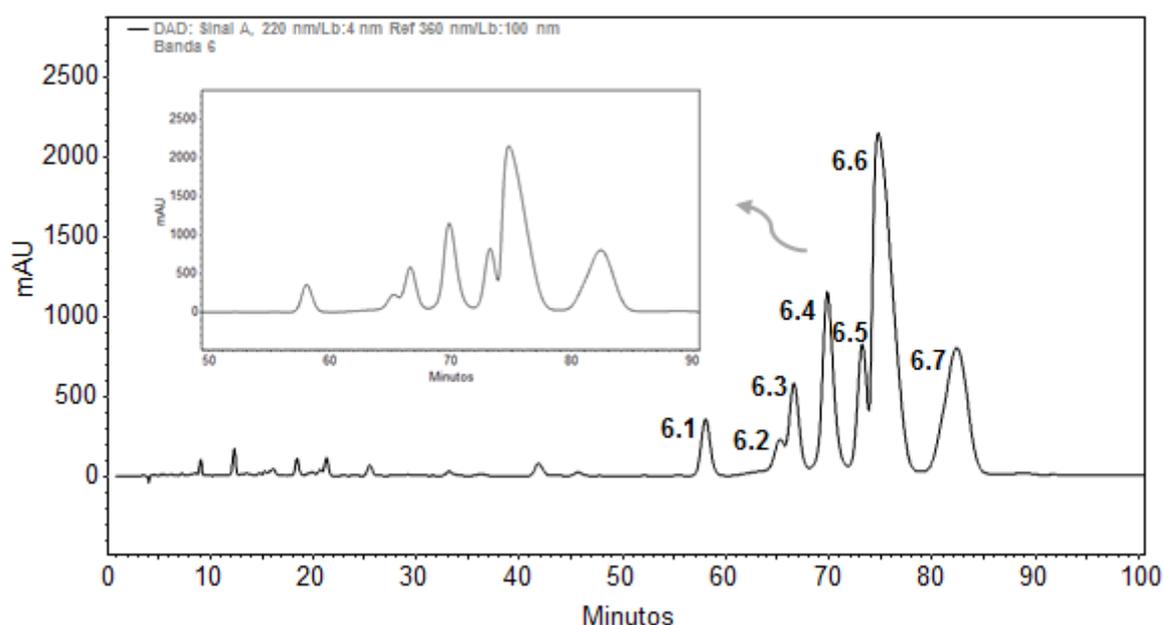


Figura 58. Cromatograma líquido (CLAE-DAD) obtido da purificação da Fração 6.

Estas bandas foram analisadas por RMN de ^1H com a finalidade de se obter os espectros de cada composto puro, porém, ao analisar os espectros obtidos observou-se que as massas das subfrações não foram suficientes para as análises. Logo, não foi possível obter nenhuma informação sobre as mesmas por esta técnica.

4.3.4. Identificação por CG-EM das demais frações provenientes da pré-purificação do extrato bruto de maconha

As frações provenientes da separação do extrato bruto por Sephadex LH-20, exceto a fração chamada “Frações 19-24”, também foram submetidas a CG-EM e a Tabela 8 mostra quais canabinoides foram identificados pela biblioteca NIST. Não foi possível, pela ausência de tempo hábil, trabalhar na purificação de cada uma delas. Mas, pode-se ter uma noção geral de quais compostos da classe de interesse estão presentes no extrato bruto de maconha. Canabinoides como canabicromeno, canabiciolol e canabicumaronona foram encontrados. A Figura 59 apresenta as estruturas químicas dos canabinoides identificados que ainda não tiveram suas estruturas demonstradas no decorrer do trabalho. E os cromatogramas das frações da Tabela 8 encontram-se no Anexo 3.

Tabela 8. Canabinoides identificados por CG-EM nas demais frações obtidas após separação do extrato bruto de maconha por Sephadex LH-20.

		Canabinoides						
		Frações 1-5	Frações 6-11	Frações 12-18	Frações 19-24	Frações 25-31	Frações 32-40	
Tempos de retenção no CG-EM (min.)	19,556			Canabicitol (?%) / P=45,6%	Antes de ser analisada no CG-EM, toda sua massa foi utilizada na purificação por CLAE preparativo.			
	20,355					Canabivarina (1,66%) / P=79,6%		
	20,718			Canabicromeno (2,21%) / P=67,7%				
	20,941			Canabicumaronona (2,78%) / P=91,4%				
	21,027		Canabicumaronona (1,96%) / P=88,1%	Canabicumaronona (1,76%) / P=87,4%				
	21,485	Δ^9 -THC (2,15%) / P=69,7%	Δ^9 -THC (3,53%) / P=90,0%	Δ^9 -THC (17,6%) / P=85,0%			Δ^9 -THC (2,17%) / P=88,4%	
	21,708		Canabicumaronona (?%) / P=66,5%	Canabicumaronona (?%) / P=12,5%				
	22,013	CBN (100%) / P=97,7%	CBN (100%) / P=98,1%	CBN (100%) / P=98,0%			CBN (100%) / P=98,0%	CBN (11,6%) / P=98,0%
	22,796		Metóxi-THC (3,91%) / P=27,5%	Metóxi-THC (2,97%) / P=8,94%				
	23,253			8 α -Hidróxi- δ -9-tetraidrocanabinol (2,03%) / P=38,4%				
	23,538		8 α -Hidróxi- δ -9-tetraidrocanabinol (1,95%) / P=28,7%	8 α -Hidróxi- δ -9-tetraidrocanabinol (8,54%) / P=53,2%				
	23,752		8 α -Hidróxi- δ -9-tetraidrocanabinol (3,13%) / P=29,2%	8 α -Hidróxi- δ -9-tetraidrocanabinol (23,02%) / P=29,6%				
24,461					11-Hidroxicanabinol (71,86%) / P=63,4%			

Representação: Canabinoide (Integração - %) / Probabilidade (%)

?: O respectivo pico não foi integrado pelo software.

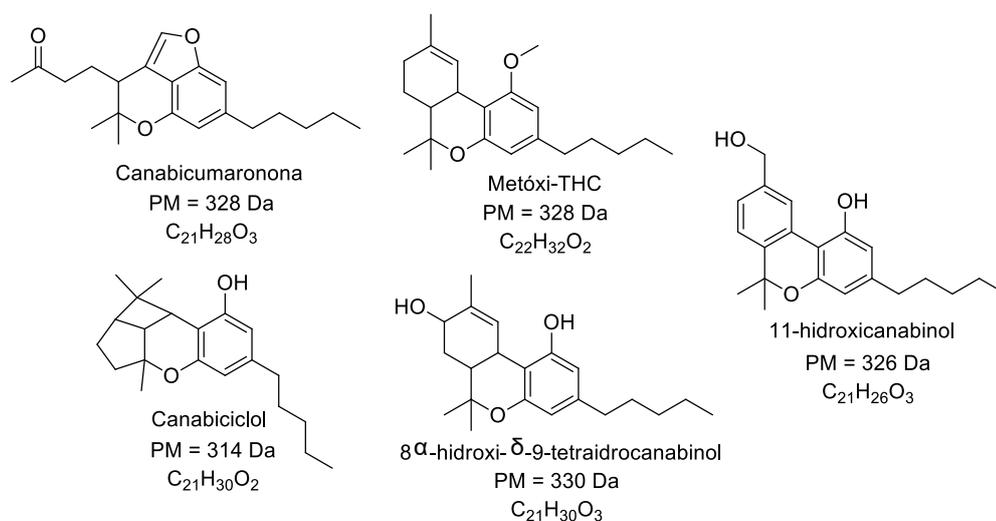


Figura 59. Estruturas químicas dos canabinoides identificados por CG-EM nas frações obtidas após separação do extrato bruto por Sephadex LH-20.

É importante ressaltar que não foi constatada a presença do canabidiol (CBD) em nenhuma das frações acima estudadas. Este canabinoide é de extrema importância de uso clínico devido aos seus efeitos medicinais, e seria de grande valor sua obtenção na forma pura.

4.3.5. Padrões de canabinoides por CG-EM

Cinco padrões de canabinoides cedidos pelo Laboratório de Petroleômica e Química Forense foram analisados por CG-EM e seus cromatogramas encontram-se a seguir.

- **Padrão de CBN**

O canabinol apresentou tempo de retenção de 22,017 minutos no presente método, como pode ser visto na Figura 60, e 98,0% de probabilidade pela biblioteca NIST.

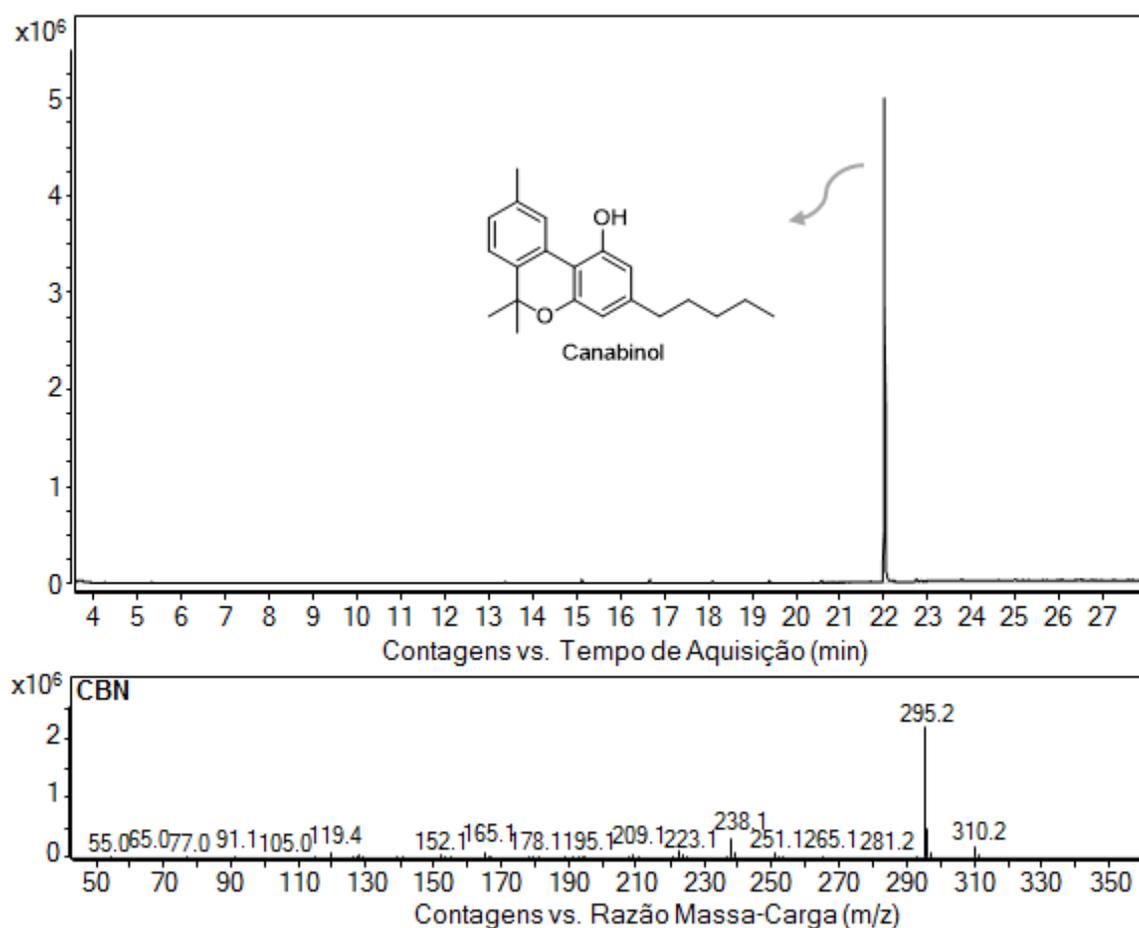


Figura 60. Cromatograma gasoso do padrão de CBN, estrutura e perfil de fragmentação.

Nota-se que o tempo de retenção do padrão bate com os tempos de retenção obtidos para o CBN presente nas frações acima estudadas. Portanto, mais uma vez, é confirmada a presença deste composto nas amostras analisadas no trabalho e reitera-se aqui a possibilidade de se usar o CBN obtido a partir da purificação do extrato de maconha como uma substância de referência.

- **Padrão de Δ^9 -THC**

O Δ^9 -tetraidrocanabinol apresentou tempo de retenção de 21,489 minutos, com 91,7% de probabilidade de ser ele pela biblioteca NIST. A Figura 61 mostra o seu cromatograma juntamente com o perfil de fragmentação.

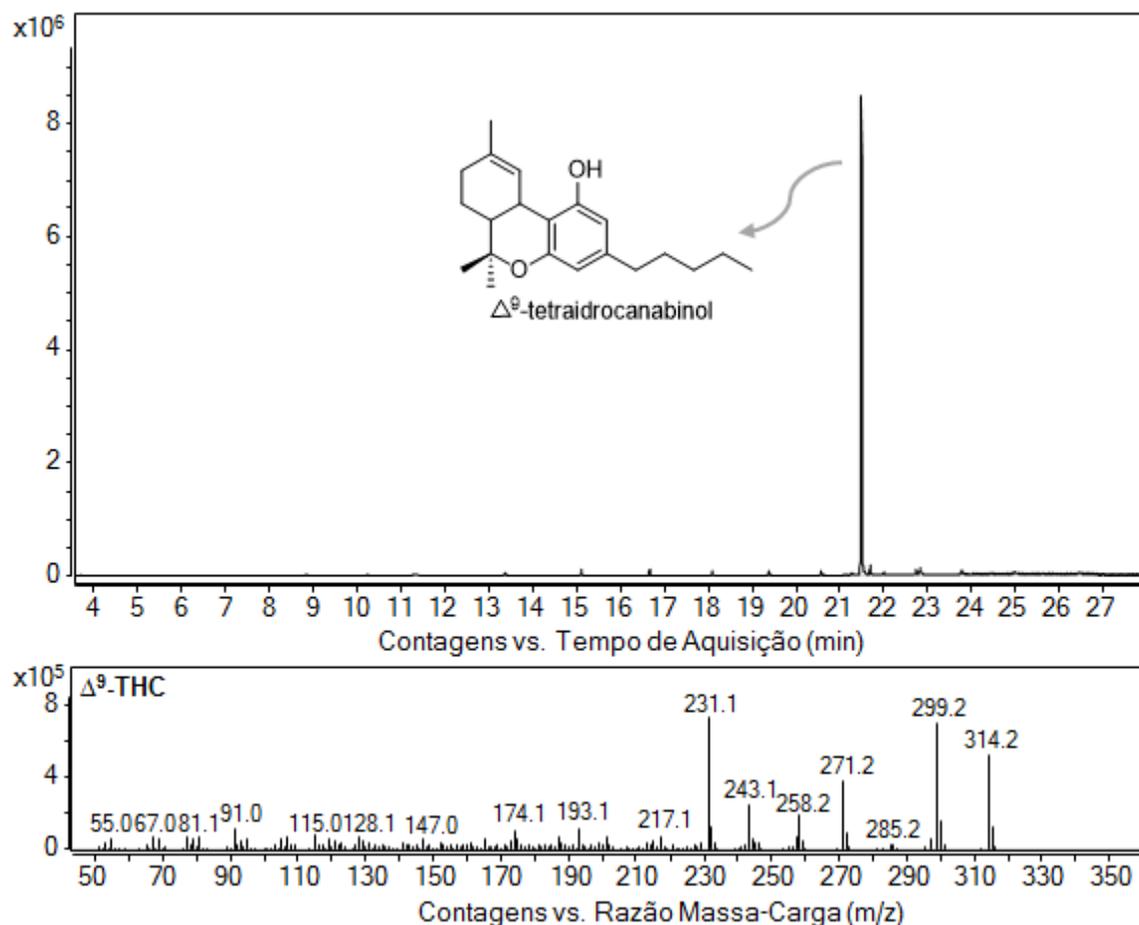


Figura 61. Cromatograma gasoso do padrão de Δ^9 -THC, estrutura e perfil de fragmentação.

Para o Δ^9 -THC observou-se a mesma coisa que para o CBN. Os tempos de retenção do padrão e das amostras analisadas que o continham foram idênticos.

- **Padrão de CBD**

O canabidiol apresentou tempo de retenção de 20,714 minutos e 45% de probabilidade pela biblioteca NIST. A Figura 62 exibe o cromatograma obtido.

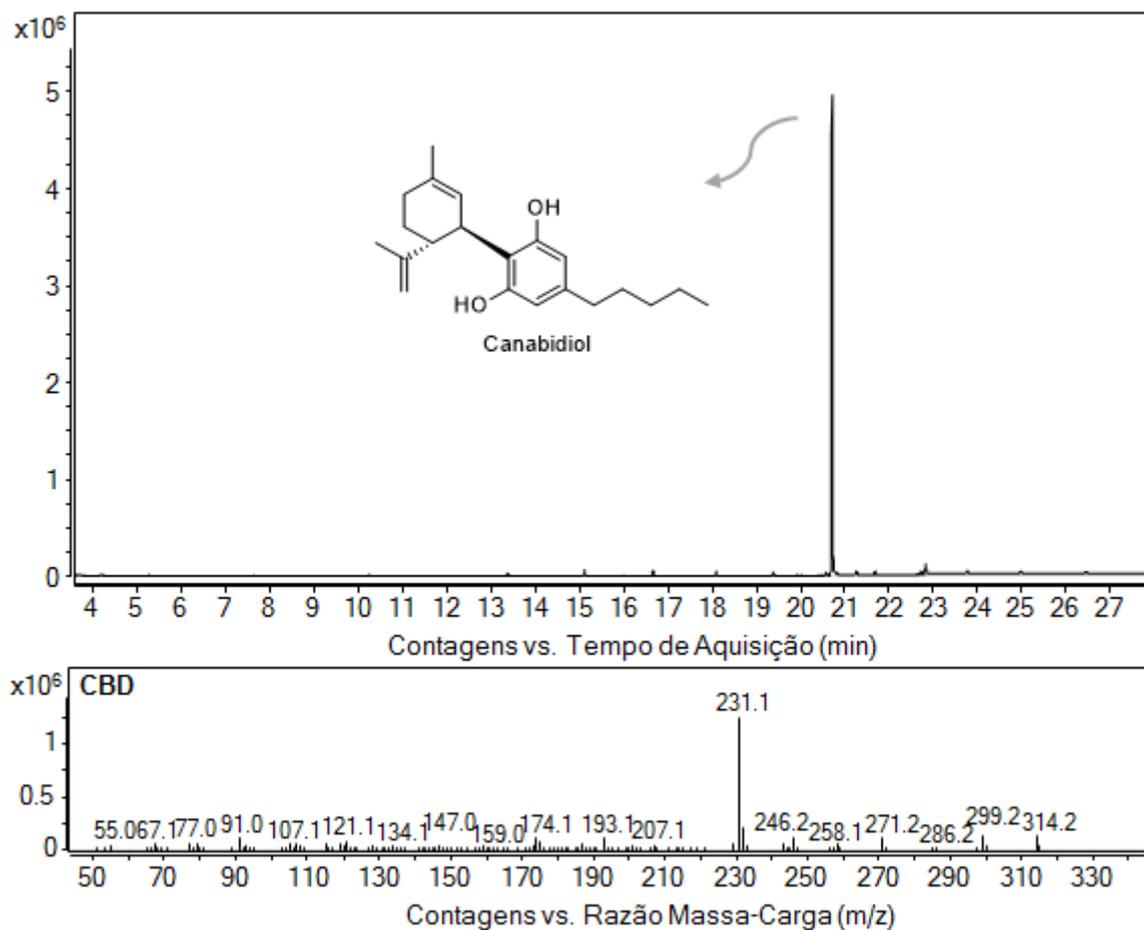


Figura 62. Cromatograma gasoso do padrão de CBD, estrutura e perfil de fragmentação.

Como o CBD não foi identificado nas amostras analisadas, o mesmo não foi utilizado para qualquer tipo de confirmação.

- **Padrão de CBC**

O canabicromeno apresentou tempo de retenção de 20,731 minutos no presente método, com 62,1% de probabilidade pela biblioteca NIST. O cromatograma obtido é representado na Figura 63 abaixo.

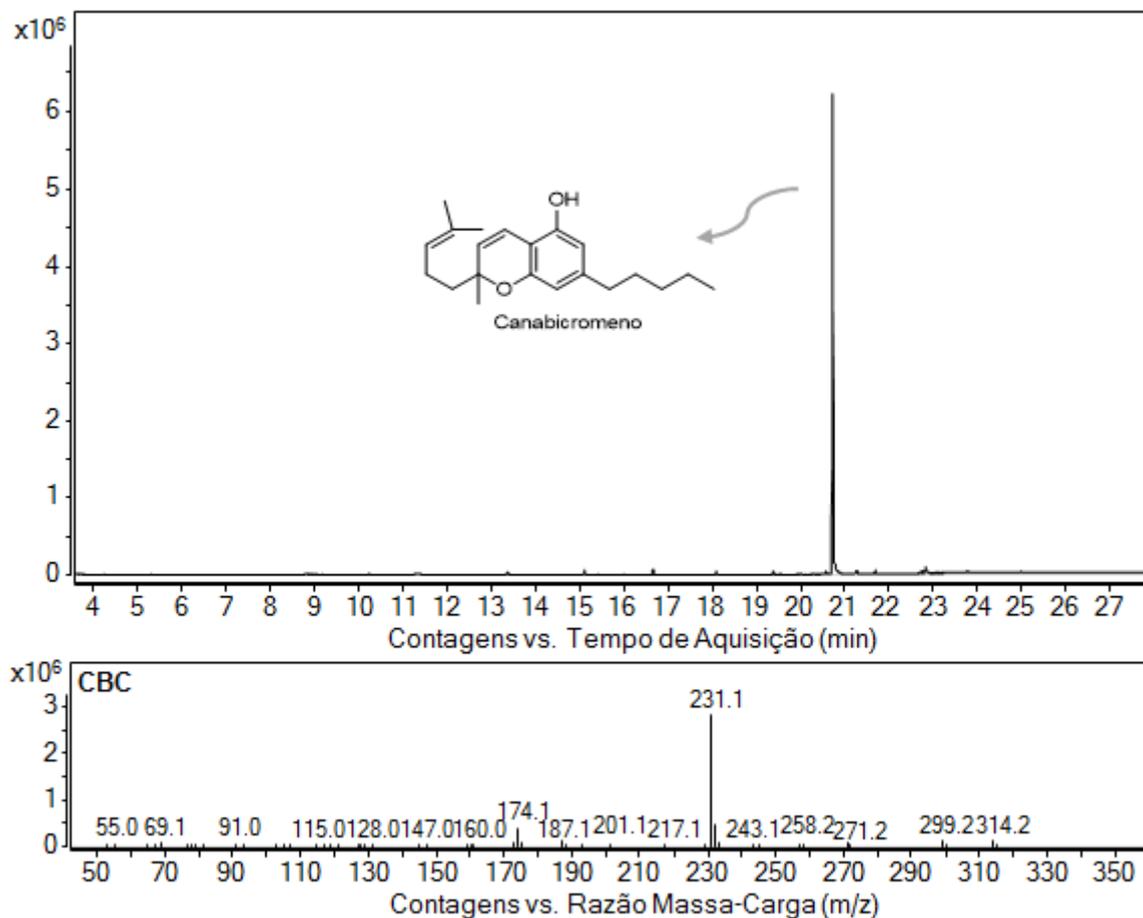


Figura 63. Cromatograma gasoso do padrão de CBC, estrutura e perfil de fragmentação.

Observa-se que no presente método, CBC e CBD (isômeros) apresentaram tempos de retenção muito semelhantes. Como dito anteriormente, o CBD não foi identificado no estudo, entretanto, na fração denominada “Frações 12-18” foi observada a presença do CBC (ver Tabela 8).

- **Padrão de CBG**

O canabigerol apresentou tempo de retenção de 21,885 minutos no presente método, com 97,6% de probabilidade pela biblioteca NIST. A Figura 64 a seguir expõe o cromatograma e o perfil de fragmentação do CBG.

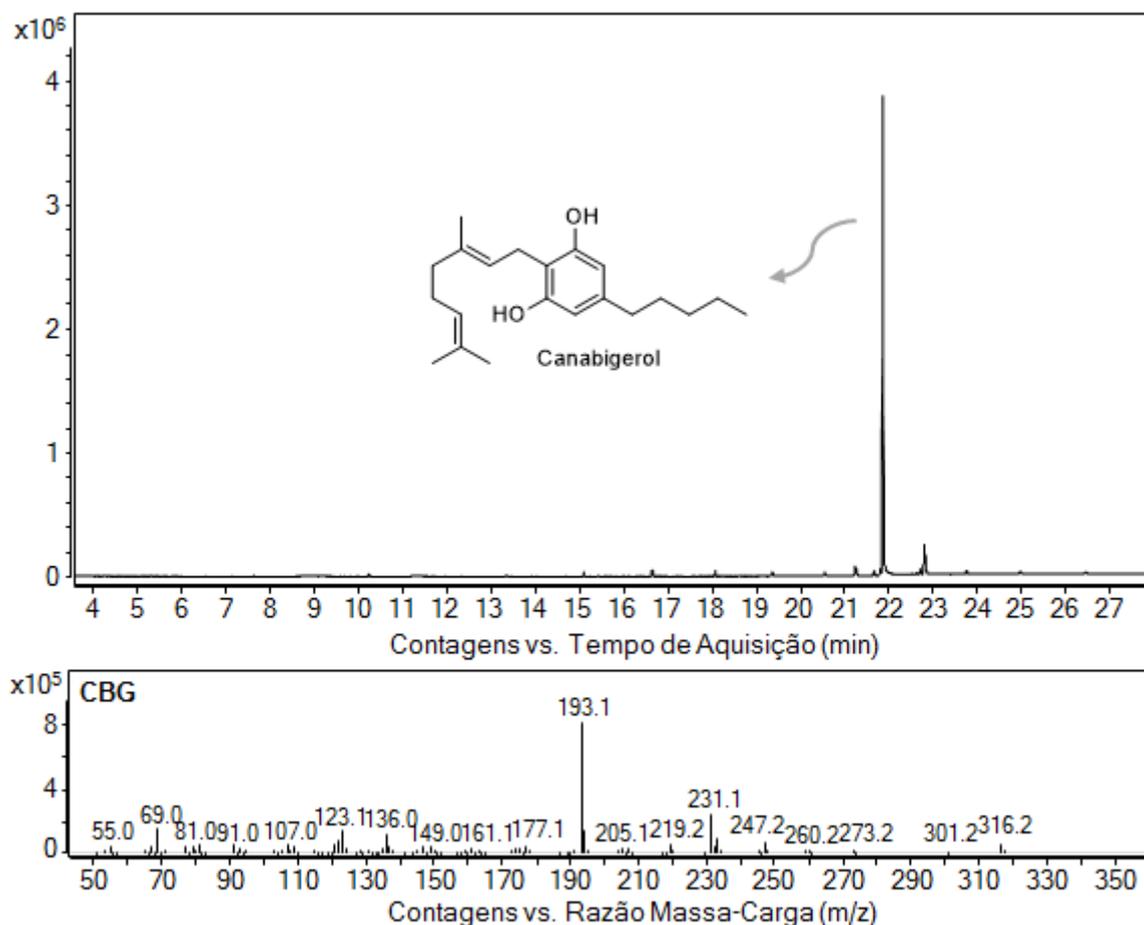


Figura 64. Cromatograma gasoso do padrão de CBG, estrutura e perfil de fragmentação.

Este canabinoide também não foi encontrado nas frações estudadas no presente trabalho, e, portanto, não foi utilizado para qualquer tipo de comparação.

4.4. Novas extrações das 156 amostras para serem analisadas por Espectrometria de Massas

As mesmas 156 amostras de maconha anteriormente analisadas por RMN de ^1H foram novamente pesadas, extraídas com metanol, e, após o tempo de maceração, tiveram o solvente filtrado para outros frascos e evaporado gerando-se extratos brutos. Em seguida, a esses extratos foi adicionado acetonitrila e as soluções formadas foram analisadas por *paper spray* no modo negativo.

O solvente em questão foi selecionado por dissolver bem os canabinoides, e como estes possuem grupos hidroxila (-OH) em suas estruturas químicas, o modo negativo foi escolhido visto que a desprotonação do grupo hidroxila na ionização ocorre facilmente.

A utilização de *paper spray*, fonte de ionização ambiente, proporcionou a identificação de valores m/z de canabinoides presentes nos extratos de maconha - misturas complexas - de forma simples e rápida.

Num primeiro momento, o objetivo ao analisar as 156 amostras de maconha por EM era utilizar os dados obtidos em Quimiometria, comparando-se os resultados da aplicação da ACP entre esta técnica e a RMN. Por isso a extração em EM foi idêntica à feita anteriormente para RMN. Entretanto, com o grande volume de dados obtido, resolveu-se utilizar a EM na identificação dos canabinoides e conseqüentemente usar os resultados desta a fim de corroborar com aqueles obtidos a partir das técnicas analíticas anteriormente utilizadas. A Tabela 9 a seguir apresenta as massas de extrato bruto e os respectivos rendimentos de extração obtidos para cada amostra analisada por EM. E, seus respectivos espectros de massas podem ser vistos no Anexo 4.

Tabela 9. Amostras analisadas por EM, suas massas pesadas e rendimentos das extrações.

Mês/Ano	Amostra	Massa pesada (mg)	Massa obtida de extrato (mg)	Rendimento da extração (%)
Julho/2015	N1_07_15	19,4	2,6	13,4
	N2_07_15	22,9	3,7	16,2
	N3_07_15	21,7	1,5	6,9
	C1_07_15	19,3	2,0	10,4
	C2_07_15	19,2	2,1	10,9
	C3_07_15	22,8	5,4	23,7
	M1_07_15	22,8	2,6	11,4
	M2_07_15	20,6	1,2	5,8
	M3_07_15	18,6	4,6	24,7
	S1_07_15	20,5	2,4	11,7
	S2_07_15	21,0	2,6	12,4
	S3_07_15	20,8	3,6	17,3

Mês/Ano	Amostra	Massa pesada (mg)	Massa obtida de extrato (mg)	Rendimento da extração (%)
Junho/2015	N1 06 15	21,0	3,8	18,1
	N2 06 15	18,6	1,8	9,7
	N3 06 15	21,4	3,2	15,0
	C1 06 15	21,1	3,3	15,6
	C2 06 15	22,6	3,8	16,8
	C3 06 15	22,7	3,9	17,2
	M1 06 15	19,4	4,7	24,2
	M2 06 15	22,4	3,7	16,5
	M3 06 15	20,7	2,8	13,5
	S1 06 15	21,5	2,4	11,2
	S2 06 15	22,1	2,3	10,4
	S3 06 15	21,9	2,8	12,8
Maiο/2015	N1 05 15	18,9	1,4	7,4
	N2 05 15	19,9	2,8	14,1
	N3 05 15	19,6	3,7	18,9
	C1 05 15	18,9	2,6	13,8
	C2 05 15	18,7	2,3	12,3
	C3 05 15	18,5	2,8	15,1
	M1 05 15	19,5	2,3	11,8
	M2 05 15	20,8	4,0	19,2
	M3 05 15	21,3	3,3	15,5
	S1 05 15	20,2	2,4	11,9
	S2 05 15	20,0	1,8	9,0
	S3 05 15	18,8	2,1	11,2
Abril/2015	N1 04 15	20,1	6,0	29,9
	N2 04 15	21,7	5,5	25,3
	N3 04 15	21,3	1,0	4,7
	C1 04 15	19,1	5,1	26,7
	C2 04 15	20,1	4,0	19,9
	C3 04 15	22,6	2,9	12,8
	M1 04 15	21,2	3,8	17,9
	M2 04 15	21,1	4,2	19,9
	M3 04 15	21,2	1,8	8,5
	S1 04 15	22,7	6,0	26,4
	S2 04 15	21,3	3,0	14,1
	S3 04 15	20,9	1,7	8,1
Março/2015	N1 03 15	19,2	3,0	15,6
	N2 03 15	19,0	4,8	25,3
	N3 03 15	19,5	3,4	17,4
	C1 03 15	21,1	1,0	4,7
	C2 03 15	22,2	1,0	4,5
	C3 03 15	19,4	3,1	16,0
	M1 03 15	19,3	3,8	19,7
	M2 03 15	21,9	1,1	5,0
	M3 03 15	23,1	2,5	10,8
	S1 03 15	21,4	3,7	17,3
	S2 03 15	19,5	2,6	13,3
	S3 03 15	22,5	5,0	22,2
Fevereiro/2015	N1 02 15	19,5	0,7	3,6
	N2 02 15	22,4	3,2	14,3
	N3 02 15	19,0	1,5	7,9
	C1 02 15	18,9	1,3	6,9

Mês/Ano	Amostra	Massa pesada (mg)	Massa obtida de extrato (mg)	Rendimento da extração (%)
Fevereiro/2015	C2_02_15	22,4	4,9	21,9
	C3_02_15	18,4	1,2	6,5
	M1_02_15	21,9	2,9	13,2
	M2_02_15	21,4	2,0	9,3
	M3_02_15	22,7	1,0	4,4
	S1_02_15	20,1	3,7	18,4
	S2_02_15	20,3	1,7	8,4
	S3_02_15	20,8	5,6	26,9
Janeiro/2015	N1_01_15	20,3	3,7	18,2
	N2_01_15	19,3	3,6	18,7
	N3_01_15	18,5	3,2	17,3
	C1_01_15	20,3	1,4	6,9
	C2_01_15	21,9	1,1	5,0
	C3_01_15	18,5	2,3	12,4
	M1_01_15	19,8	3,5	17,7
	M2_01_15	19,7	1,5	7,6
	M3_01_15	19,3	1,8	9,3
	S1_01_15	19,6	1,9	9,7
	S2_01_15	20,7	0,8	3,9
	S3_01_15	21,6	2,6	12,0
Dezembro/2014	N1_12_14	22,1	4,5	20,4
	N2_12_14	21,9	4,1	18,7
	N3_12_14	20,1	2,9	14,4
	C1_12_14	21,1	2,1	10,0
	C2_12_14	19,9	6,1	30,7
	C3_12_14	19,6	3,2	16,3
	M1_12_14	20,5	3,3	16,1
	M2_12_14	20,0	3,0	15,0
	M3_12_14	20,2	2,2	10,9
	S1_12_14	19,8	3,8	19,2
	S2_12_14	21,6	3,9	18,1
	S3_12_14	18,0	4,0	22,2
Novembro/2014	N1_11_14	19,7	3,7	18,8
	N2_11_14	18,3	2,1	11,5
	N3_11_14	22,5	3,5	15,6
	C1_11_14	19,0	3,3	17,4
	C2_11_14	21,8	2,5	11,5
	C3_11_14	19,6	3,6	18,4
	M1_11_14	20,4	3,1	15,2
	M2_11_14	21,0	2,9	13,8
	M3_11_14	19,5	3,2	16,4
	S1_11_14	18,9	4,3	22,8
	S2_11_14	20,3	3,8	18,7
	S3_11_14	18,9	3,4	18,0
Outubro/2014	N1_10_14	22,8	4,3	18,9
	N2_10_14	21,2	3,3	15,6
	N3_10_14	20,1	4,2	20,9
	C1_10_14	22,5	3,6	16,0
	C2_10_14	18,7	4,0	21,4
	C3_10_14	20,2	3,3	16,3
	M1_10_14	22,8	4,2	18,4
	M2_10_14	19,3	3,6	18,7

Mês/Ano	Amostra	Massa pesada (mg)	Massa obtida de extrato (mg)	Rendimento da extração (%)
Outubro/2014	M3_10_14	22,6	4,9	21,7
	S1_10_14	22,6	2,4	10,6
	S2_10_14	20,1	2,7	13,4
	S3_10_14	18,1	5,0	27,6
Setembro/2014	N1_09_14	20,4	1,2	5,9
	N2_09_14	21,0	3,9	18,6
	N3_09_14	22,0	3,3	15,0
	C1_09_14	21,9	3,6	16,4
	C2_09_14	21,5	4,8	22,3
	C3_09_14	20,1	3,8	18,9
	M1_09_14	20,7	4,2	20,3
	M2_09_14	21,6	5,6	25,9
	M3_09_14	20,9	4,7	22,5
	S1_09_14	19,8	4,8	24,2
	S2_09_14	18,3	3,7	20,2
	S3_09_14	22,6	3,4	15,0
Agosto/2014	N1_08_14	22,1	4,9	22,2
	N2_08_14	21,2	2,1	9,9
	N3_08_14	22,3	5,2	23,3
	C1_08_14	18,9	4,5	23,8
	C2_08_14	20,7	4,4	21,3
	C3_08_14	22,7	4,9	21,6
	M1_08_14	20,4	3,5	17,2
	M2_08_14	21,5	4,1	19,1
	M3_08_14	21,6	3,8	17,6
	S1_08_14	19,1	1,6	8,4
	S2_08_14	19,6	3,0	15,3
	S3_08_14	21,2	2,6	12,3
Julho/2014	N1_07_14	19,2	4,0	20,8
	N2_07_14	20,0	3,9	19,5
	N3_07_14	21,4	3,8	17,8
	C1_07_14	19,1	4,0	20,9
	C2_07_14	18,3	3,6	19,7
	C3_07_14	20,2	1,6	7,9
	M1_07_14	22,1	4,3	19,5
	M2_07_14	19,8	2,6	13,1
	M3_07_14	19,2	5,7	29,7
	S1_07_14	20,8	2,5	12,0
	S2_07_14	22,8	2,4	10,5
	S3_07_14	20,0	2,7	13,5

Observa-se na tabela acima o mesmo observado nas amostras extraídas para RMN (Tabela 3): rendimentos das extrações muito variados, mesmo com o procedimento adotado para todas tendo sido idêntico e novamente, partindo-se de quantidades de massa de amostra semelhantes. Aqui, os rendimentos variaram de 3,6% a 29,9%, sendo o menor valor referente à amostra N1_02_15 e o maior à amostra N1_04_15. Nenhuma relação é obtida a partir da Tabela 9.

Analisando-se os espectros de massas obtidos para as amostras (ver Anexo 4), nota-se que há variações nas intensidades dos sinais obtidos, mas no geral, todos os espectros apresentam valores de m/z semelhantes - alguns relativos aos principais canabinoides -, o que mostra que há similaridade entre as amostras estudadas. Na Figura 65 a seguir encontram-se os espectros de massas das mesmas cinco amostras utilizadas para RMN (Figura 31), a fim de se observar possíveis semelhanças e diferenças existentes entre elas por EM.

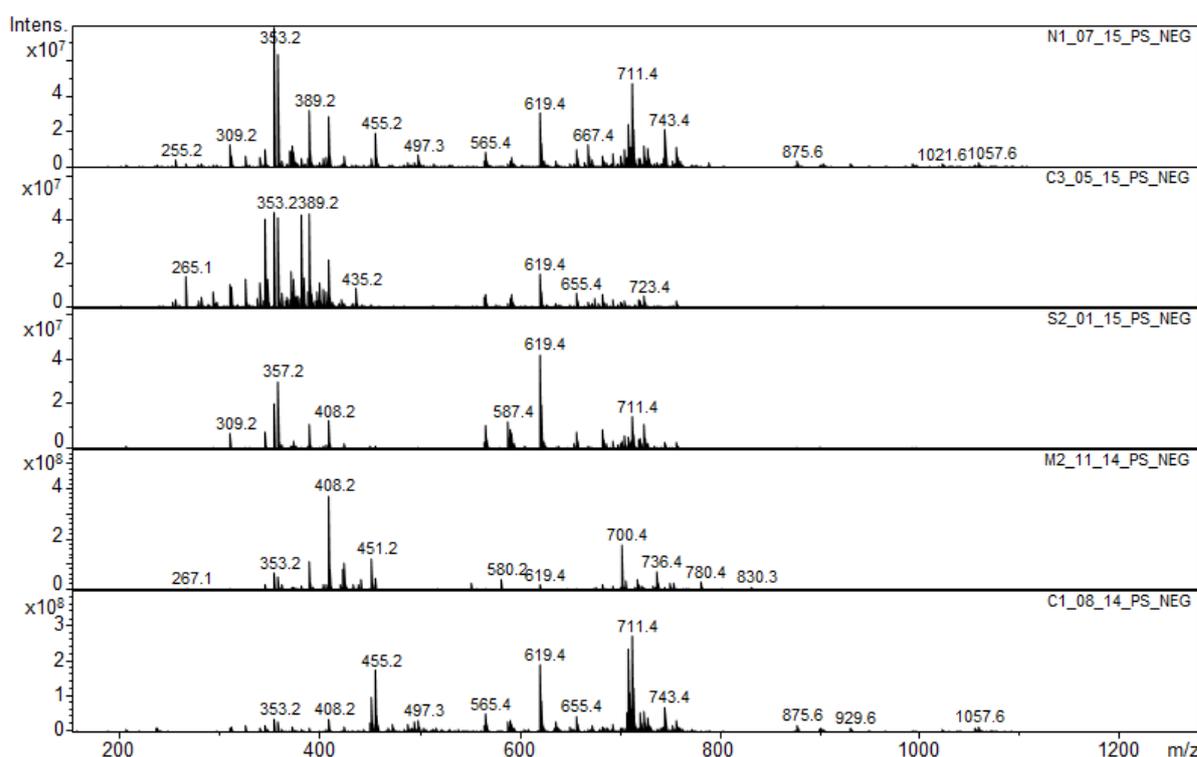


Figura 65. Espectros de massas de 5 amostras de maconha para se observar possíveis semelhanças e diferenças existentes entre as mesmas.

Percebe-se que visualmente há diferenças entre os espectros, principalmente em relação à intensidade e quantidade de sinais. Alguns apresentam menos sinais que outros. No entanto, observa-se que mesmos valores de m/z se repetem em todos os espectros, inclusive na faixa de 300 a 400 m/z , que caracteriza os canabinoides.

Selecionando-se um espectro geral para exemplificar todos os obtidos, e assim, realizar as identificações dos m/z de canabinoides, escolheu-se a amostra C3_07_15, escolhida anteriormente para RMN (Figura 32), para que os resultados das duas técnicas se complementem. A Figura 66 a seguir exhibe o espectro de massas da amostra C3_07_15.

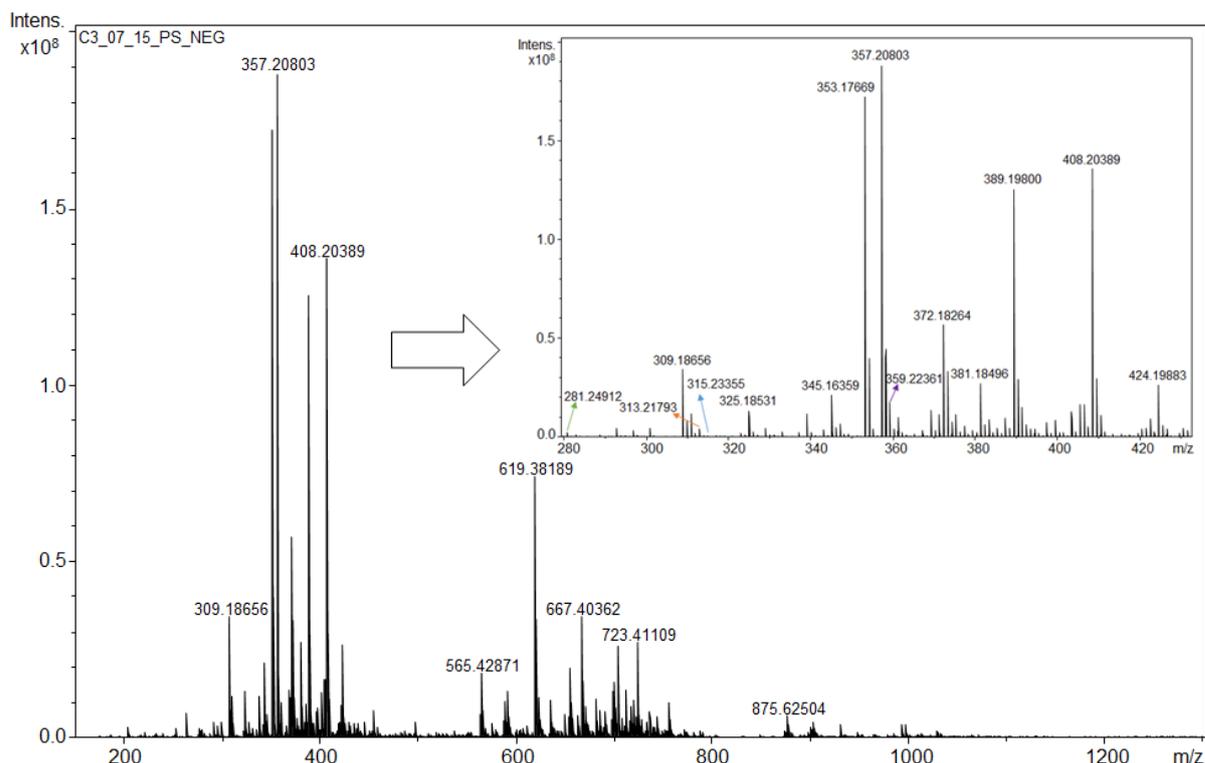


Figura 66. Espectro de massas da amostra C3_07_15.

Observa-se no espectro acima valores de m/z de canabinoides. Como a amostra foi analisada no modo negativo, os valores são diminuídos em uma unidade.

A Tabela 10 a seguir mostra os valores de m/z identificados no espectro e a quais possíveis canabinoides estão relacionados. Buscou-se os valores de m/z dos compostos presentes na Figura 4 e também daqueles identificados no decorrer do trabalho (Figura 59). Além disso, utilizou-se a Referência 71 como auxílio na busca de outros possíveis canabinoides com valores de m/z que apareceram no espectro de massas da Figura 66.

Tabela 10. Valores de m/z identificados no espectro de massas e seus respectivos possíveis canabinoides.

m/z medido	Fórmula molecular real	Erro (ppm)	Intensidade relativa (%)	Canabinoide
281,24912	$C_{18}H_{34}O_2$	1,83	1,18	CBV
309,18656	$C_{21}H_{26}O_2$	1,80	18,19	CBN
313,21793	$C_{21}H_{30}O_2$	2,01	2,12	Δ^9 -THC, CBD, CBC, Δ^8 -THC, Canabiciolol
315,23355	$C_{21}H_{32}O_2$	1,90	0,28	CBG
325,18531	$C_{21}H_{26}O_3$	31,7	7,05	11-hidroxicanabinol
327,19719	$C_{21}H_{28}O_3$	1,91	0,67	Canabicumaronona
353,17669	$C_{22}H_{26}O_4$	2,42	91,73	CBNA ⁷¹
357,20803	$C_{22}H_{30}O_4$	2,50	100	THCA, CBDA
359,22361	$C_{22}H_{32}O_4$	2,30	9,31	CBGA
389,19800	$C_{22}H_{30}O_6$	2,68	66,71	8 β -11-bis-hidroxi- Δ^9 -THCA-A ⁷¹

O sinal com m/z 408,20389 que aparece com 72,26% de intensidade relativa no espectro de massas da Figura 66, não corresponde, pelas Referências 12 e 71, a nenhum canabinoide natural identificado na planta *Cannabis sativa* L. Em compensação, uma busca realizada na Referência 70 levou ao canabinoide sintético recente EG2201, de fórmula molecular $C_{28}H_{24}FNO$. Pelo software DataAnalysis®, o valor de m/z em questão pode se referir a essa fórmula com erro (ppm) igual a 66,07. Todavia, não se pode afirmar que realmente se trata deste composto apenas por esta breve análise. Uma pesquisa mais aprofundada deve ser realizada para que quaisquer declarações sejam feitas. Já o m/z em 424,19883 não é concernente a nenhum canabinoide de acordo com as referências acima citadas.

Comparando-se os resultados obtidos por EM e por RMN de 1H , constata-se o seguinte: por RMN foi possível notar a presença de sinais característicos de CBN e Δ^9 -THC na amostra C3_07_15, além de outros sinais que podem ser referentes a diferentes canabinoides, mas que nada se pode afirmar sobre os mesmos pela técnica em questão. Já por EM confirmou-se a presença de CBN (309,18656 m/z) e a possibilidade da presença de Δ^9 -THC, uma vez que o único valor de m/z em 313,21793 pode também se referir a todos os isômeros desse composto. Por EM, outros possíveis canabinoides também foram identificados na amostra estudada, como pôde ser visto na Tabela 10 acima.

4.5. Quimiometria

4.5.1. RMN

AACP (ou PCA, *Principal Component Analysis*) decompõe o conjunto de dados em escores e *loadings*, além de um resíduo não explicado pelo modelo matemático. Esse artifício proporciona diversas vantagens, entre elas, a redução da matriz original de dados preservando, em suas componentes principais, a variância do conjunto de dados original.^{54,62} Nesse sentido, para os dados da técnica de RMN deste trabalho, a matriz de escores traz informações sobre a relação das amostras de maconha e os *loadings* a relação entre os valores de deslocamento químico.

No entanto, os dados de RMN de 1H devem passar por pré-processamentos para garantir a confiabilidade dos dados da ACP. Os espectros podem conter sinais cujo valor máximo apresentam variações entre as amostras (Figura 67). Vários fatores químicos e/ou físicos podem afetar a posição desses sinais. Quando os espectros são interpretados de maneira qualitativa, essas variações podem ser negligenciadas.

Entretanto, para processamentos quantitativos, os desalinhamentos devem ser corrigidos garantindo a harmonia entre os espectros de RMN.⁶⁷ Nesse contexto, o software *icoshift*, de código fonte aberto, tem se mostrado uma ferramenta versátil para pré-tratamento de dados quimiométricos.^{67,68}

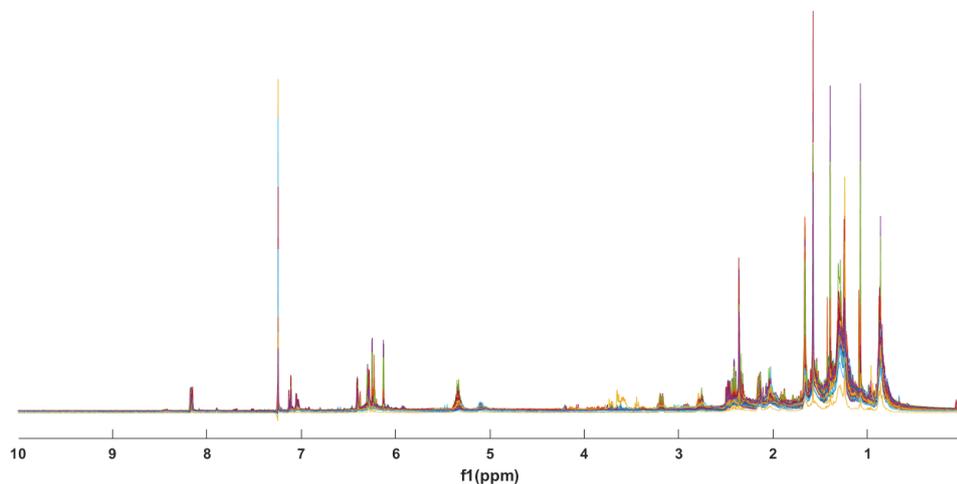


Figura 67. Espectros de RMN de ^1H sobrepostos de todas as 156 amostras de maconha, com desalinhamentos dos sinais e flutuação da linha de base.

Além disso, a flutuação da linha de base observada na Figura 67 pode, também, ocasionar resultados errôneos em quimiometria por não considerar a altura efetiva do sinal. Neste caso, o algoritmo *airPLS* tem sido usado para pré-processamento de dados de várias técnicas, principalmente RMN,⁶⁹ gerando espectros ajustados em sua linha de base.

Para exemplificar a aplicação dos pré-processamentos aos espectros de RMN de ^1H , a Figura 68 apresenta as sobreposições de sinais na região de deslocamento químico de 8,10 a 8,22 ppm. Primeiramente, na letra (a) observa-se os espectros originais, com diferenças nas alturas máximas dos sinais e também nas linhas de base. Já na letra (b), após a aplicação do *icoshift* nota-se o alinhamento de todos os sinais. Por fim, na letra (c), após a aplicação do *airPLS* observa-se o ajuste da linha de base.

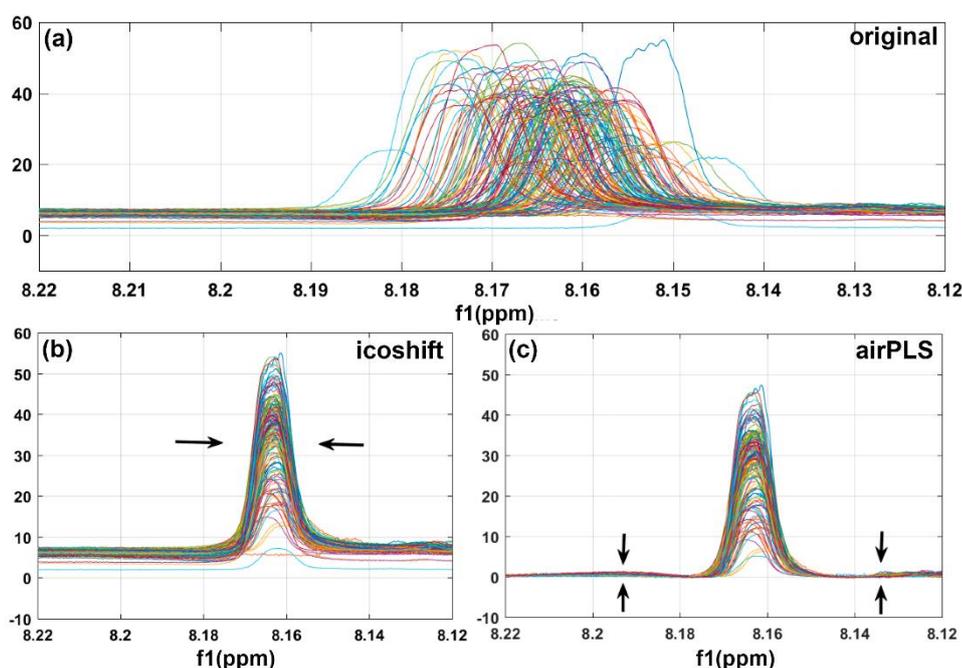


Figura 68. Pré-processamento dos espectros de RMN de ^1H . Para exemplificação, o sinal de deslocamento químico entre 8,10 e 8,22 ppm para o (a) sinal original; (b) sinal após o pré-processamento *icoshift*; (c) sinal após o pré-processamento *airPLS*.

Após os devidos pré-processamentos, os espectros foram derivados para que as taxas de variação dos sinais fossem usadas na ACP e também centralizados na média. Num primeiro momento, foi aplicada uma ACP com valores de variáveis compreendidos entre 0 e 14 ppm, faixa que contempla o espectro de RMN completo, utilizando-se todas as 156 amostras de maconha apreendidas no período de julho/14 a julho/15. Como critério inicial de agrupamento para a ACP admitiu-se o mês datado no laudo emitido pela Polícia Civil. As notações dos meses foram realizadas da seguinte maneira: julho/14 = 7*, agosto/14 = 8, setembro/14 = 9, outubro/14 = 10, novembro/14 = 11, dezembro/14 = 12, janeiro/15 = 1, fevereiro/15 = 2, março/15 = 3, abril/15 = 4, maio/15 = 5, junho/15 = 6 e julho/15 = 7. O objetivo de aplicar esta ACP foi avaliar a relação entre o perfil químico das amostras com o período de tempo das apreensões e suas macrorregiões.

A Figura 69 mostra o gráfico de escores obtido.

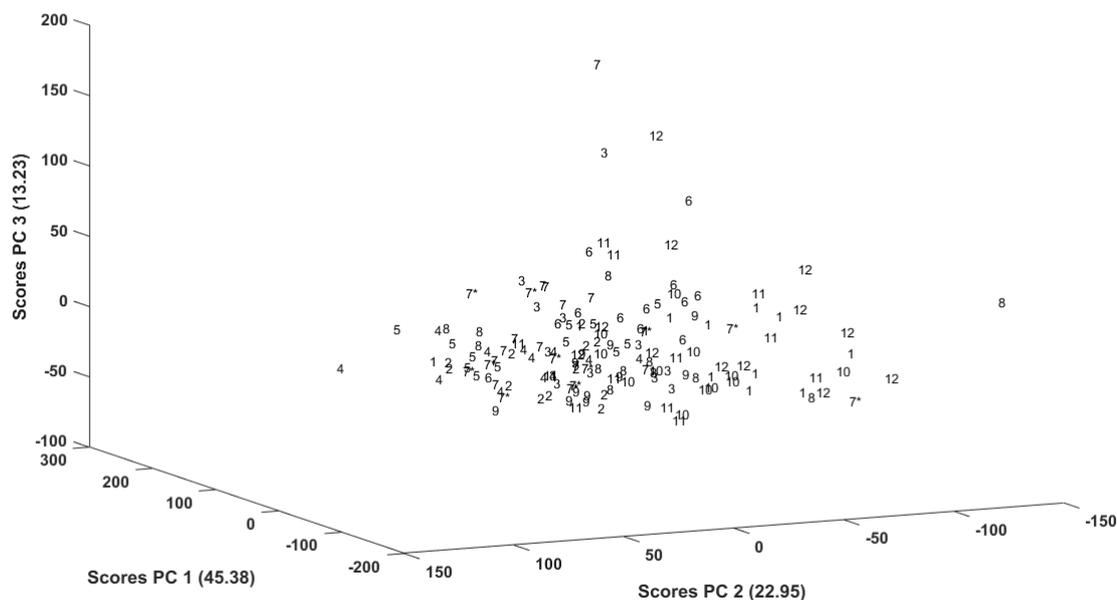


Figura 69. Gráfico de escores das 156 amostras de maconha estudadas utilizando-se a faixa completa dos espectros de RMN de ^1H , de 0 a 14 ppm.

Com a seleção de todo o espectro de RMN para o cálculo, percebe-se na figura acima que não houve separação das amostras, todas elas ficaram agrupadas sem uma distinção clara, formando um único aglomerado, o que mostra que essas amostras possuem características próximas, ou seja, que existe similaridade entre elas. Portanto, em se tratando da avaliação de agrupamentos em relação às macrorregiões do estado do Espírito Santo, observa-se que as amostras se agrupam naturalmente através dos meses. Desta forma, uma possível inferência é o fato de que essas amostras possam ser provenientes de uma mesma fonte, visto que o ES é um estado pequeno e cortado de norte a sul por uma rodovia nacional. É provável que toda a droga entre por um único local no estado e seja distribuída aos municípios, por isso a similaridade. Outra possível explicação para essa semelhança pode ser a degradação que a maconha sofre com o tempo devido ao armazenamento, o que faz com que todas as amostras apresentem os mesmos produtos de degradação e, por conseguinte, perfis semelhantes. Essa consideração é válida para o presente trabalho, a partir das variáveis utilizadas aqui.

Pelos gráficos de *loadings* (Figura 70) observa-se que a região entre 0 e 3 ppm aparece com boa contribuição para as três componentes principais, ou seja, é uma região importante, rica em informação, que abre margem até para outros estudos devido à dificuldade em se extrair essa informação. É uma região na qual poderia ser

empregada outra metodologia de trabalho para se conseguir obter mais detalhes de toda a informação que a mesma concentra.

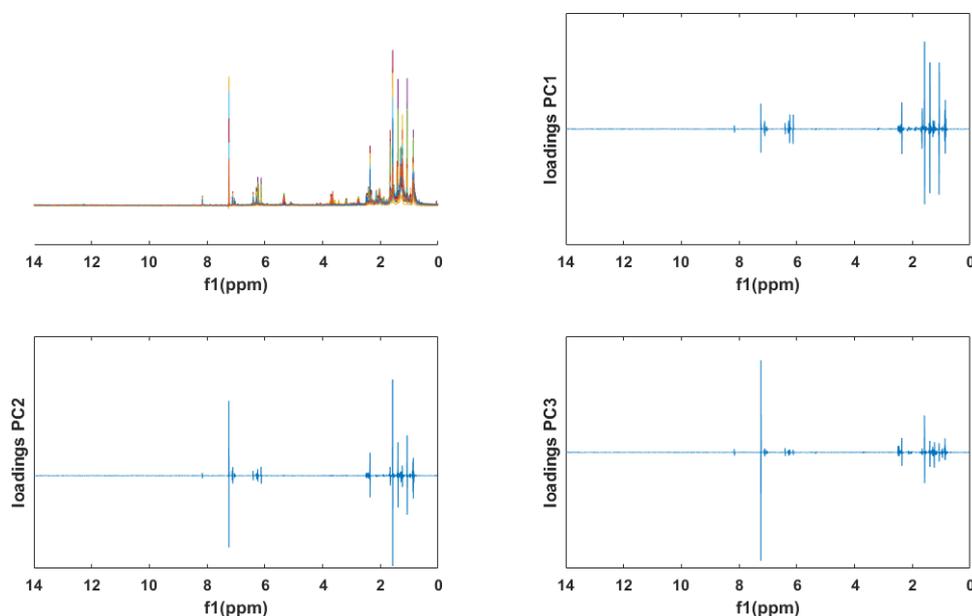


Figura 70. Gráficos de *loadings* das componentes principais 1, 2 e 3. Observa-se uma contribuição significativa da região entre 0 e 3 ppm em todas as CPs.

Ainda analisando os gráficos de *loadings* acima, nota-se que a região entre 6,0 ppm e 8,5 ppm – considerada de interesse por conter os sinais de hidrogênios (aromáticos e olefínicos) mais distinguíveis dos canabinoides e também sinais característicos do CBN (produto de degradação do THC) – pode ter influência no padrão comportamental das amostras. Decidiu-se então, que esta região seria suficiente para especular uma relação entre as características químicas abstraídas por RMN de ^1H e os meses dos laudos policiais, visando elucidar um possível comportamento sazonal e até mesmo de idade (degradação) das amostras aprendidas.

Após a seleção das variáveis (região entre 6,0 ppm e 8,5 ppm), uma nova ACP foi aplicada observando-se os grupos naturalmente existentes e o novo gráfico de escores encontra-se na Figura 71 a seguir.

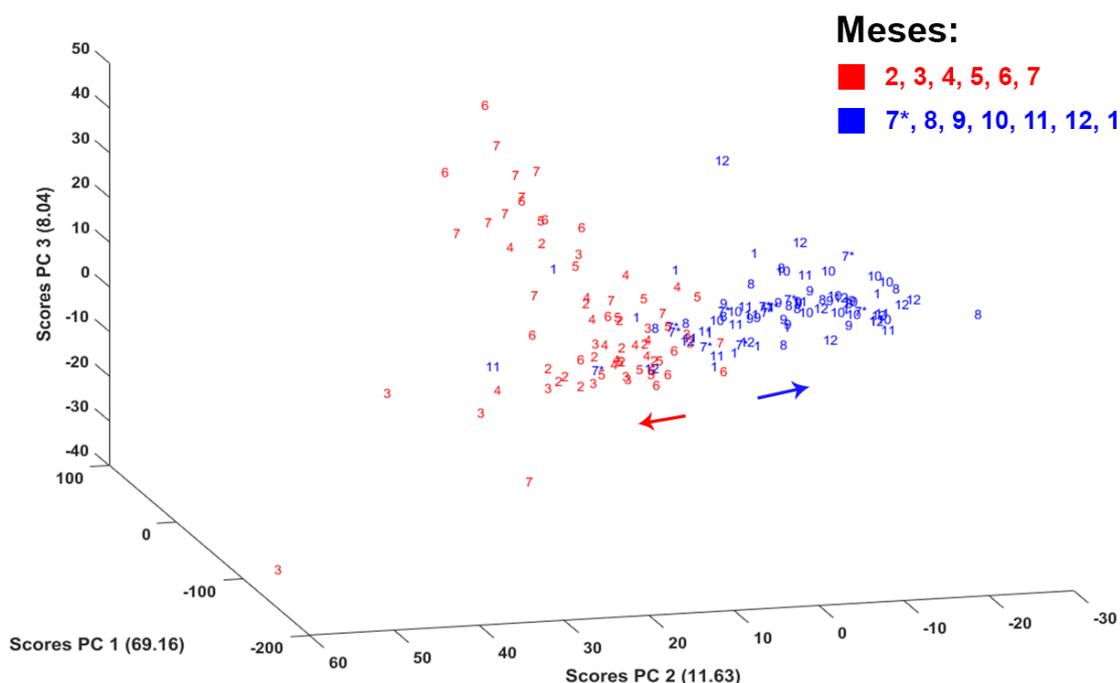


Figura 71. Novo gráfico de escores obtido após seleção de variáveis para as 156 amostras de maconha apreendidas em diferentes cidades do estado do Espírito Santo de julho/14 a julho/15. Destaque para uma separação entre dois agrupamentos de meses.

Observa-se que com a seleção de variáveis, levando em consideração os escores das componentes principais 1 e 2, houve separação das amostras em dois grupos: um grupo A que compreendeu as amostras dos meses de julho/14 (7*) a janeiro/15 e um outro grupo B que compreendeu as amostras dos meses de fevereiro/15 a julho/15 (7). Portanto, o uso da ACP discriminou as 156 amostras em dois grupos, onde nota-se que os meses de julho distantes um ano um do outro ficaram em grupos diferentes.

A nova região de deslocamentos químicos (δ) agora avaliada está relacionada com a presença de sinais de δ característicos do CBN, em 8,16 ppm (H2), 7,12 ppm (H5) e 7,04 ppm (H4). Este é produto de degradação do THC, não existe na droga cuidadosamente e recém preparada, então, pode-se inferir que é possível que maconhas mais envelhecidas apresentem maiores quantidades de CBN. Desta forma, explica-se a separação dos dois grupos na figura acima, confirmada principalmente pelos dois meses 7 e 7*, que diferem em tempo por um ano e se encontram em lados opostos na figura, evidenciando que existem diferenças nessas amostras.

4.5.1.1. ACP supervisionada

Para a aplicação da ACP supervisionada, inseriu-se três frações obtidas após a purificação da fração denominada “Frações 19-24” por CLAE, chamadas Fração 5 (CBN puro), Fração 6 (Δ^8 -THC + Δ^9 -THC + CBN) e Fração 7 (Δ^9 -THCA + CBN) ao modelo contendo as 156 amostras de maconha. O objetivo ao se colocar esses “padrões” era tentar direcionar as amostras para verificar seu comportamento, se elas se assemelhavam menos ou mais com eles. O gráfico de escores obtido é exibido na Figura 72 abaixo.

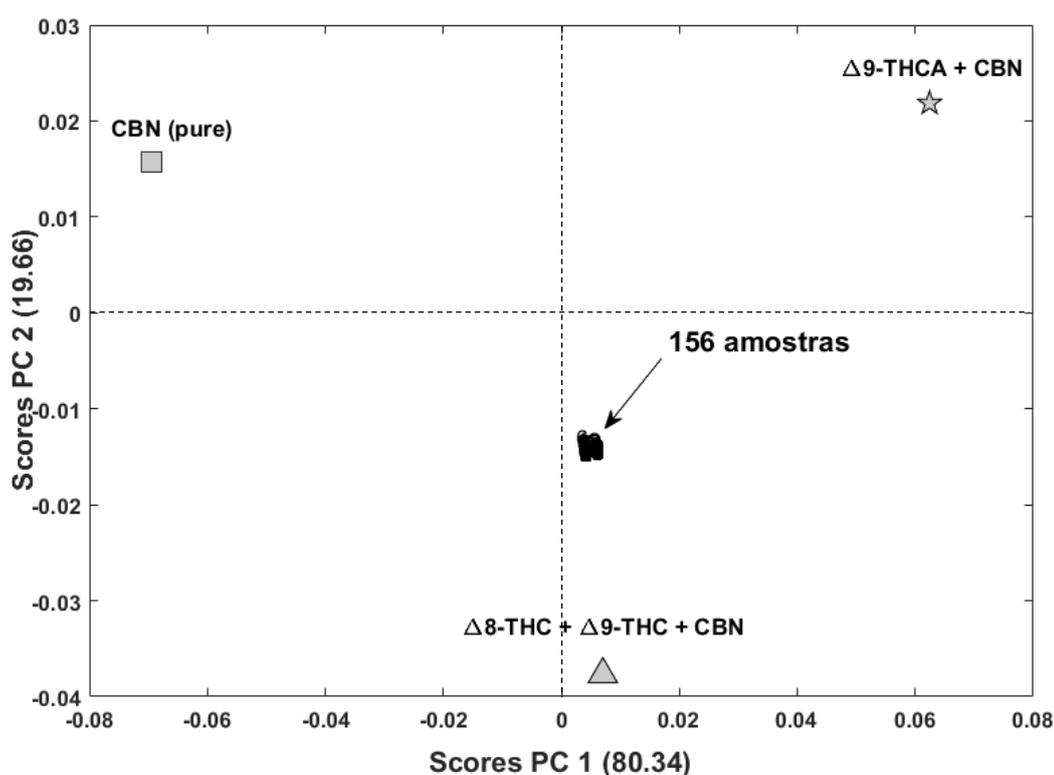


Figura 72. Gráfico de escores a partir de duas componentes principais para as três frações (obtidas da purificação da “Frações 19-24” por CLAE) e para as 156 amostras de maconha apreendidas em diferentes cidades do Espírito Santo no período de julho/14 a julho/15.

Observa-se que as 156 amostras de maconha se agruparam em um único quadrante de CPs, localizadas nas regiões de CP1>0 e CP2<0, estando, portanto, mais próximas à Fração 6. Isso indica que, no geral, as amostras se assemelham mais com esse “padrão”. Contudo, o agrupamento das amostras apreendidas na localização central de CPs confirma que elas também apresentam similaridade com as outras duas frações obtidas, ou seja, que as 156 amostras apresentam quantidades muito próximas dos três “padrões”, porém, obedecendo a seguinte ordem de similaridade: Fração 6 (Δ^8 -THC + Δ^9 -THC + CBN) > Fração 7 (Δ^9 -THCA + CBN) >

Fração 5 (CBN puro).

Vale ressaltar que o agrupamento de todas as amostras na Figura 72, quando estas foram observadas em função dos “padrões”, mostra que não houve uma discrepância entre elas. Esse fato confirma mais uma vez a similaridade entre as amostras, e que na verdade, nas Figuras 69 e 71 foi dado um *zoom* em algo muito pequeno, e é por este motivo que se enxergam lá as amostras espalhadas. Se estivessem de fato espalhadas, ao serem inseridas no modelo dos padrões, as amostras não se encontrariam agrupadas como pôde ser visto na Figura 72.

4.5.2. EM

Em Espectrometria de Massas não há necessidade de pré-processamento dos espectros como foi visto para RMN. Nessa técnica não há deslocamento, logo, o uso de ferramentas como *icoshift* e *airPLS* não é necessário. Antes de se aplicar a ACP aos espectros de massas das 156 amostras de maconha, somente se realizou a centralização dos dados na média. Na matriz de consolidação foram utilizadas duas casas decimais para a precisão das massas.

Em seguida, para a aplicação da ACP, utilizou-se o espectro de massas completo (faixa de m/z de 154 a 1300), considerando-se os sinais com intensidade relativa acima de 1%. A Figura 73 abaixo mostra o gráfico de escores obtido após o processamento dos dados.

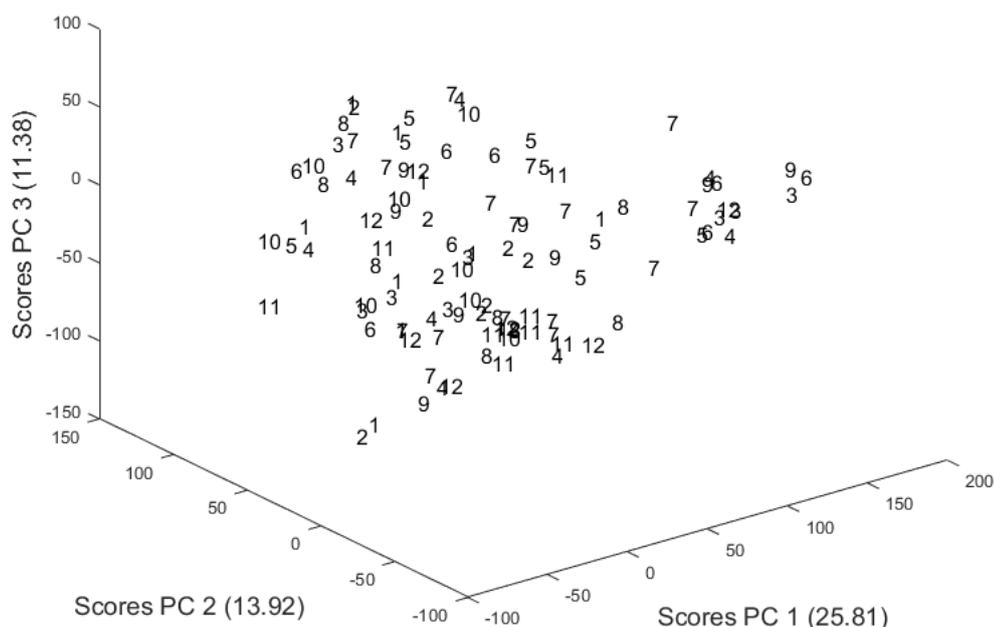


Figura 73. Gráfico de escores das 156 amostras de maconha estudadas utilizando-se a faixa completa dos espectros massas de m/z 154 a 1300.

É possível observar a partir do gráfico de escores acima o mesmo observado por RMN, ou seja, que não houve separação das amostras em diferentes grupos. As mesmas formaram um único grupo, confirmando que apresentam similaridade. Portanto, as duas técnicas se corroboram, e mais uma vez pode-se sugerir que é possível que as amostras sejam provenientes de uma mesma fonte, e que a maconha entre por um único local no estado e seja então distribuída. Como por RMN, outra possível explicação para a semelhança pode ser a degradação por armazenamento e o surgimento de compostos característicos, como é o caso do CBN. Novamente, reforça-se aqui que a consideração feita acima é válida para o presente trabalho.

A seguir, na Figura 74, encontram-se os gráficos de *loadings* das componentes principais CP1, CP2 e CP3.

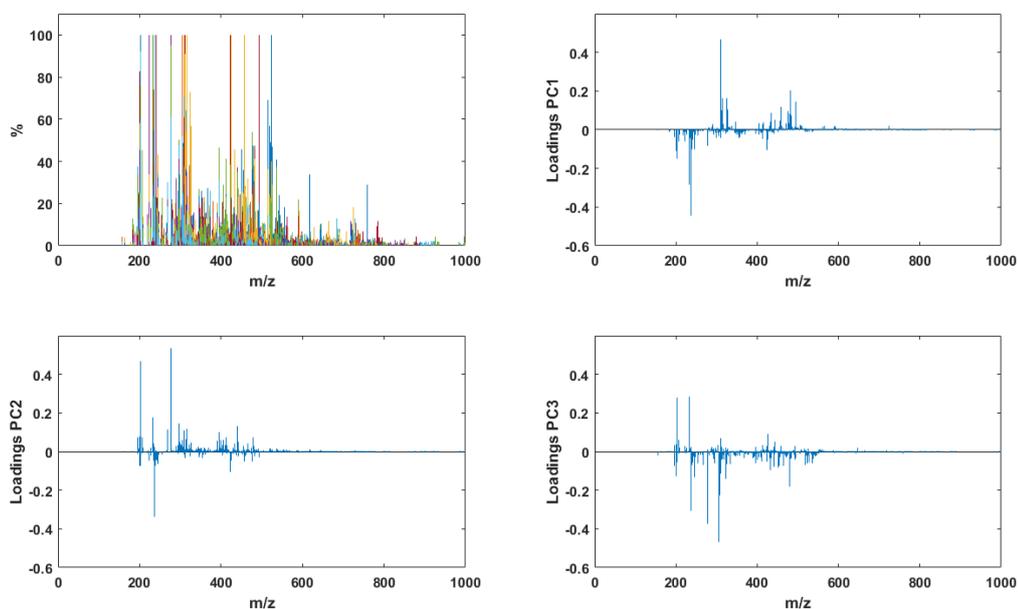


Figura 74. Gráficos de *loadings* das componentes principais 1, 2 e 3. Destaque para uma contribuição significativa do m/z 309 na explicação da CP1.

Avaliando-se os gráficos de *loadings* acima, mais especificamente o da CP1, nota-se a presença de dois valores de m/z com maior contribuição para a variância explicada por esta componente, que aparecem em torno de m/z 250 e m/z 300. Este último, muito provavelmente se refere ao valor de m/z 309 concernente ao CBN (PM = 310 Da, ver Figura 4), com perda de um hidrogênio pelo fato das análises terem sido realizadas no modo negativo. Já o primeiro, aparentemente não tem nenhuma relação com canabinoides.

Ainda a partir da Figura 74 acima pode-se dizer que no gráfico da CP1 a intensidade do CBN se destaca, o que mostra que esse valor de m/z (309) é uma variável de grande importância na distinção das amostras, uma vez que este é o objetivo da ACP. Além disso, é possível observar nos 156 espectros de massas obtidos das amostras de maconha analisadas (Anexo 4) que algumas apresentam esse mesmo sinal elevado e outras, baixo, porém, o fato é que o sinal em m/z 309 é um sinal de grande variância, ou seja, com grande quantidade de informação, que, todavia, apesar de ter muita importância, pode não servir para discriminar as amostras estudadas.

5. CONCLUSÃO

Primeiramente, para se otimizar a identificação das amostras de maconha por RMN de ^1H , testes de extração foram realizados com uma amostra e diferentes solventes. O método escolhido, que utilizou metanol como solvente extrator, maceração como método de extração e clorofórmio deuterado para as análises de RMN dos extratos obtidos, se mostrou eficaz e com boa relação custo benefício.

As 156 amostras de maconha utilizadas no estudo, apreendidas pela PC-ES no período de julho/14 a julho/15 foram analisadas por RMN de ^1H e renderam espectros com um perfil geral muito semelhante, mostrando a existência de similaridade entre elas. Porém, como a maconha é uma matriz de grande complexidade, esta técnica analítica sozinha não é totalmente conclusiva na identificação dos canabinoides presentes nas amostras.

O extrato bruto gerado da junção dos extratos de todas as 156 amostras foi submetido à purificação por CLAE, dando origem a 9 frações (bandas cromatográficas). Após análise por CG-EM, constatou-se que foi possível obter CBN como material de referência e, além disso, outras quatro frações contendo canabinoides: duas com elevadas quantidades de Δ^9 -THCA e CBV, respectivamente, uma terceira com uma mistura dos isômeros Δ^8 -THC e Δ^9 -THC e uma quarta com 11-hidroxicanabinol. No primeiro e no terceiro casos, houve a presença de CBN como subproduto, o qual pode ser obtido a partir da oxidação do Δ^9 -THC, que por sua vez é naturalmente originado do seu ácido precursor Δ^9 -THCA.

Outros canabinoides como canabicromeno, canabiciclol e canabicumaronona foram também identificados no extrato bruto de maconha, sendo suas estruturas confirmadas por CG-EM. Não foi constatada a presença de CBD, que é um constituinte de extrema importância para uso clínico devido aos seus efeitos medicinais.

As 156 amostras de maconha também foram analisadas por EM e observou-se o mesmo que para RMN: pela análise dos espectros, no geral todas apresentaram perfis semelhantes, o que indica similaridade entre elas, agora confirmada por uma outra técnica analítica. Por EM, novamente assim como por RMN, também se fazem inferências a respeito dos possíveis canabinoides presentes nas amostras estudadas, não sendo esta técnica utilizada isoladamente conclusiva na identificação precisa dos mesmos.

A partir da aplicação da técnica quimiométrica ACP aos dados obtidos por RMN e EM separadamente, novamente foi possível notar corroboração entre essas duas técnicas analíticas. Para cada uma delas, utilizando-se o espectro (de RMN de ^1H e de massas) completo, observou-se que as amostras de maconha não se separaram em diferentes grupos, e sim, formam um único aglomerado, fato que mais uma vez mostra a existência de similaridade entre elas.

Para RMN, foi aplicada uma nova ACP, com seleção de variáveis, e observou-se a separação das 156 amostras por meses em dois grupos. Desse resultado pôde-se notar que amostras mais envelhecidas, provavelmente com maior quantidade de CBN, se separaram das amostras mais novas, uma vez que a região de deslocamento químico selecionada para essa análise compreende sinais unicamente característicos deste composto de degradação, que não existe na planta fresca ou na maconha “nova” cuidadosamente seca.

Por fim, uma ACP supervisionada foi aplicada aos dados de RMN das 156 amostras de maconha e de 3 frações obtidas a partir da purificação do extrato bruto por CLAE, mostrando novamente o quanto as amostras são semelhantes entre si, e também a similaridade das mesmas com as frações obtidas obedecendo a seguinte ordem: Fração 6 ($\Delta^8\text{-THC} + \Delta^9\text{-THC} + \text{CBN}$) > Fração 7 ($\Delta^9\text{-THCA} + \text{CBN}$) > Fração 5 (CBN puro).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ ROMÃO, W.; SCHWAB, N. V.; BUENO, M. I. M. S.; SPARRAPAN, R.; EBERLIN, M. N.; MARTINY, A.; SABINO, B. D.; MALDANER, A. O. Química Forense: Perspectivas sobre Novos Métodos Analíticos Aplicados à Documentoscopia, Balística e Drogas de Abuso. *Quim. Nova*, **34(10)**, 1717-1728, 2011.
- ² DE MARTINIS, B. S.; OLIVEIRA, M. F. **Química Forense Experimental**. São Paulo: Cengage Learning, 2015. 480 p.
- ³ GIL, V. M. S.; GERALDES, C. F. G. C. **Ressonância Magnética Nuclear: Fundamentos, Métodos e Aplicações**. 2ª Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002. 1012 p.
- ⁴ PAGANO, B.; LAURI, I.; DE TITO, S.; PERSICO, G.; CHINI, M. G.; MALMENDAL, A.; NOVELLINO, E.; RANDAZZO, A. Use of NMR in profiling of cocaine seizures. *Forensic Sci. Int.*, **231**, 120-124, 2013.
- ⁵ GAMA, L. A.; MERLO, B. B.; JÚNIOR, V. L.; ROMÃO, W.; NETO, A. C. No-deuterium proton NMR (No-D NMR): A simple, fast and powerful method for analyses of illegal drugs. *Microchem. J.*, **118**, 12-18, 2015.
- ⁶ BALAYSSAC, S.; RETAILLEAU, E.; BERTRAND, G.; ESCOT, M.; MARTINO, R.; MALET-MARTINO, M.; GILARD, V. Characterization of heroin samples by ¹H NMR and 2D DOSY ¹H NMR. *Forensic Sci. Int.*, **234**, 29-38, 2014.
- ⁷ LA PAZ, S. M.; MARÍN-AGUILAR, F.; GARCÍA-GIMÉNEZ, M. D.; FERNÁNDEZ-ARCHE, M. A. Hemp (*Cannabis sativa* L.) Seed Oil: Analytical and Phytochemical Characterization of the Unsaponifiable Fraction. *J. Agric. Food Chem.*, **62**, 1105-1110, 2014.
- ⁸ WARF, B. HIGH POINTS: AN HISTORICAL GEOGRAPHY OF CANNABIS. *Geogr. Rev.*, **104(4)**, 414-438, 2014.
- ⁹ Espécies de *Cannabis*. Disponível em: <https://oleodericksimpson.wordpress.com/cannabis/>. Acessado em 24 de dezembro de 2016.
- ¹⁰ PASSAGLI, M. F. **Toxicologia Forense: Teoria e Prática**. 4ª Ed. Campinas: Millennium, 2013. 515 p.
- ¹¹ KUDDUS, M.; GINAWI, I. A. M.; AL-HAZIMI, A. *Cannabis sativa*: An ancient wild edible plant of India. *Emir. J. Food Agric.*, **25(10)**, 736-745, 2013.
- ¹² ELSOHLY, M. A.; SLADE, D. Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sci.*, **78**, 539-548, 2005.

- ¹³ United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). **Recommended Methods for the Identification and Analysis of Cannabis and Cannabis Products**, New York, 2009.
- ¹⁴ Associação Humanidades. **Manual de Prevenção do Uso de Drogas para mediadores**, Lisboa.
- ¹⁵ FISCHEDICK, J. T.; HAZEKAMP, A.; ERKELENS, T.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. Metabolic fingerprinting of *Cannabis sativa* L., cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes. *Phytochemistry*, **71**, 2058-2073, 2010.
- ¹⁶ CARLINI, E. A. A história da maconha no Brasil. *J. Bras. Psiquiatr.*, **55(4)**, 314-317, 2006.
- ¹⁷ A verdade sobre a maconha. Disponível em: <http://super.abril.com.br/ciencia/a-verdade-sobre-a-maconha/>. Acessado em 24 de dezembro de 2016.
- ¹⁸ Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas (SENAD). **Legislação e Políticas Públicas sobre Drogas**, Brasília, 2008.
- ¹⁹ United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). **World Drug Report 2016**, New York, 2016.
- ²⁰ II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD) – 2012. Ronaldo Laranjeira (Supervisão) [et al.], São Paulo: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas de Álcool e Outras Drogas (INPAD), UNIFESP. 2014.
- ²¹ VI Levantamento Nacional sobre o Consumo de Drogas Psicotrópicas entre Estudantes do Ensino Fundamental e Médio das Redes Pública e Privada de Ensino nas 27 Capitais Brasileiras – 2010/ E. A. Carlini (supervisão) [et. al.], -- São Paulo: CEBRID - Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas: UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo 2010. SENAD - Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas, Brasília – SENAD, 2010. 503 p.
- ²² CHOI, Y. H.; HAZEKAMP, A.; PELTENBURG-LOOMAN, A. M. G.; FRÉDÉRICH, M.; ERKELENS, C.; LEFEBER, A. W. M.; VERPOORTE, R. NMR Assignments of the Major Cannabinoids and Cannabiflavonoids Isolated from Flowers of *Cannabis sativa*. *Phytochem. Anal.*, **15**, 345-354, 2004a.
- ²³ Canada Plans Groundbreaking Medical Marijuana Initiative. Disponível em: <http://www.drugpolicy.org/news/2004/03/canada-plans-groundbreaking-medical-marijuana-initiative>. Acessado em 25 de dezembro de 2016.
- ²⁴ 28 Legal Medical Marijuana States and DC - Laws, Fees, and Possession Limits.

Disponível em:

<http://medicalmarijuana.procon.org/view.resource.php?resourceID=000881>.

Acessado em 25 de dezembro de 2016.

²⁵ Uruguai regulamenta lei para maconha de uso medicinal. Disponível em:

<http://g1.globo.com/ciencia-e-saude/noticia/2015/02/uruguai-regulamenta-lei-para-maconha-de-uso-medicinal.html>. Acessado em 25 de dezembro de 2016.

²⁶ Uruguay becomes first nation to legalise marijuana trade. Disponível em:

<http://www.bbc.com/news/world-latin-america-25328656>. Acessado em 25 de dezembro de 2016.

²⁷ Marijuana Legalization and Regulation. Disponível em:

<http://www.drugpolicy.org/marijuana-legalization-and-regulation>. Acessado em 25 de dezembro de 2016.

²⁸ Canadá irá legalizar maconha em 2017. Disponível em:

<http://oglobo.globo.com/sociedade/canada-ira-legalizar-maconha-em-2017-19135414>. Acessado em 25 de dezembro de 2016.

²⁹ MACONHA. Disponível em:

<http://www.uniad.org.br/images/stories/publicacoes/texto/MACONHA.pdf>. Acessado em 25 de dezembro de 2016.

³⁰ POLITI, M.; PESCHEL, W.; WILSON, N.; ZLOH, M.; PRIETO, J. M.; HEINRICH, M.

Direct NMR analysis of cannabis water extracts and tinctures and semi-quantitative data on Δ^9 -THC and Δ^9 -THC-acid. *Phytochemistry*, **69**, 562-570, 2008.

³¹ HAZEKAMP, A.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. Quantitative Analysis of

Cannabinoids from *Cannabis sativa* Using ¹H-NMR. *Chem. Pharm. Bull.*, **52(6)**, 718-721, 2004.

³² CHOI, Y. H.; KIM, H. K.; HAZEKAMP, A.; ERKELENS, C.; LEFEBER, A. W. M.;

VERPOORTE, R. Metabolomic Differentiation of *Cannabis sativa* Cultivars Using ¹H NMR Spectroscopy and Principal Component Analysis. *J. Nat. Prod.*, **67**, 953-957, 2004b.

³³ Cannabis 101. Disponível em: <http://harbory.us.com/information/cannabis-101/>.

Acessado em 25 de dezembro de 2016.

³⁴ MALCHER-LOPES, R. Canabinoides ajudam a desvendar aspectos etiológicos em

comum e trazem esperança para o tratamento de autismo e epilepsia. *Revista da Biologia*, **13(1)**, 43-59, 2014.

³⁵ SCUDERI, C.; DE FILIPPIS, D.; IUVONE, T.; BLASIO, A.; STEARDO, A.;

ESPOSITO, G. Cannabidiol in Medicine: A Review of its Therapeutic Potential in CNS Disorders. *Phytother. Res.*, **23**, 597-602, 2009.

³⁶ Canabidiol é reclassificado como substância controlada. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=223315&_101_type=content&_101_groupId=219201&_101_urlTitle=canabidiol-e-reclassificado-como-substancia-controlada&redirect=http%3A%2F%2Fportal.anvisa.gov.br%2Fresultado-de-busca%3Fp_p_id%3D3%26p_p_lifecycle%3D0%26p_p_state%3Dnormal%26p_p_mode%3Dview%26p_p_col_id%3Dcolumn-1%26p_p_col_count%3D1%26_3_groupId%3D0%26_3_keywords%3Dcanabidiol%2Be%2Breclassificado%2Bcomo%2Bsubstancia%2Bcontrolada%26_3_cur%3D1%26_3_struts_action%3D%252Fsearch%252Fsearch%26_3_format%3D%26_3_formDate%3D1441824476958&inheritRedirect=true. Acessado em 25 de dezembro de 2016.

³⁷ FELLERMEIER, M.; EISENREICH, W.; BACHER, A.; ZENK, M. H. Biosynthesis of cannabinoids: Incorporation experiments with ¹³C-labeled glucoses. *Eur. J. Biochem.*, **268**, 1596-1604, 2001.

³⁸ VOLLNER, L.; BIENIEK, D.; KORTE, F. Review of Analytical Methods for Identification and Quantification of Cannabis Products. *Regul. Toxicol. Pharm.*, **6**, 348-358, 1986.

³⁹ HAZEKAMP, A.; PELTENBURG, A.; VERPOORTE, R.; GIROUD, C. Chromatographic and Spectroscopic Data of Cannabinoids from *Cannabis sativa* L. *J. Liq. Chromatogr. R. T.*, **28**, 2361-2382, 2005.

⁴⁰ CLARIDGE, T. D. W. **High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry**. 2^a Ed. Oxford: Elsevier, 2009. 383 p.

⁴¹ PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia**. Tradução da 4^a edição norte-americana. São Paulo: Cengage Learning, 2010. 700 p.

⁴² LEVITT, M. H. **Spin Dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance**. 2^a Ed. Southampton: John Wiley & Sons, 2008. 713 p.

⁴³ SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7^a Ed. New York: John Wiley & Sons, 2005.

550 p.

⁴⁴ COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora Unicamp, 2006. 456 p.

⁴⁵ ENGEL, R. G.; KRIZ, G. S.; LAMPMAN, G. M.; PAVIA, D. L. **Química Orgânica Experimental**: Técnicas de escala pequena. Tradução da 3ª edição norte-americana. São Paulo: Cengage Learning, 2012. 1015 p.

⁴⁶ SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. Tradução da 8ª edição norte-americana. São Paulo: Cengage Learning, 2008. 1026 p.

⁴⁷ ROMÃO, W. **Novas Aplicações da Espectrometria de Massas em Química Forense**. Tese de doutorado. Departamento de Química Analítica da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010. 200 p.

⁴⁸ ZHANG, Z.; LIU, X.; ZHENG, Y. Ambient Ionization-Paper Spray Ionization and Its Application. *Chin. J. Anal. Chem.*, **42(1)**, 145-152, 2014.

⁴⁹ COOKS, R. G.; OUYANG, Z.; TAKATS, Z.; WISEMAN, J. M. Ambient Mass Spectrometry. *Science*, **311**, 1566-1570, 2006.

⁵⁰ SHEN, L.; ZHANG, J.; YANG, Q.; MANICKE, N. E.; OUYANG, Z. High throughput paper spray mass spectrometry. *Clin. Chim. Acta*, **420**, 28-33, 2013.

⁵¹ KLAMPFL, C. W.; HIMMELSBACH, M. Direct ionization methods in mass spectrometry: An overview. *Anal. Chim. Acta*, **890**, 44-59, 2015.

⁵² Marshall, A.G.; Schweikhard, L. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: technique developments. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.*, **118/119**, 37-70, 1992.

⁵³ MARSHALL, A. G.; HENDRICKSON, C. L. Fourier transform ion cyclotron resonance detection: principles and experimental configurations. *Int. J. Mass Spectrom.*, **215**, 59-75, 2002.

⁵⁴ SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. EXPERIMENTO DIDÁTICO DE QUIMIOMETRIA PARA ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE ÓLEOS VEGETAIS COMESTÍVEIS POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO MÉDIO E ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS: UM TUTORIAL, PARTE I. *Quim. Nova*, **35(1)**, 223-229, 2012.

⁵⁵ VANDEGINSTE, B. G. M. TEACHING CHEMOMETRICS. *Anal. Chim. Acta*, **150**, 199-206, 1983.

⁵⁶ FERREIRA, M. M. C; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O.

Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial. *Quim. Nova*, **22(5)**, 724-731, 1999.

⁵⁷ BRUNS, R. E.; FAIGLE, J. F. G. Quimiometria. *Quim. Nova*, **8**, 84-99, 1985.

⁵⁸ SENA, M. M.; POPPI, R. J.; FRIGHETTO, R. T. S.; VALARINI, P. J. Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos. *Quim. Nova*, **23(4)**, 547-556, 2000.

⁵⁹ NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 ANOS DE QUIMIOMETRIA NO BRASIL. *Quim. Nova*, **29(6)**, 1401-1406, 2006.

⁶⁰ PARREIRA, T. F. **UTILIZAÇÃO DE MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS EM DADOS DE NATUREZA MULTIVARIADA**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Físico-Química da Universidade Federal de Campinas, Campinas, 2003. 106 p.

⁶¹ BRERETON, R. G. **Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant**. Bristol: John Wiley & Sons, 2003. 497 p.

⁶² WOLD, S. Principal Component Analysis. *Chemometr. Intell. Lab.*, **2**, 37-52, 1987.

⁶³ Limites e Regionalizações - Divisão Regional do Espírito Santo – Macrorregiões de Planejamento. Disponível em: <http://www.ijsn.es.gov.br/mapas/>. Acessado em 10 de fevereiro de 2016.

⁶⁴ PESCHEL, W.; POLITI, M. 1H NMR and HPLC/DAD for *Cannabis sativa* L. chemotype distinction, extract profiling and specification. *Talanta*, **140**, 150-165, 2015.

⁶⁵ ONO, T.; TSENG, K.; HIROSE, TSUNEHISA. Detecting THC Metabolites and other Cannabinoids. Nacalai USA, Inc., San Diego, United States and Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan.

⁶⁶ O'NEIL, M. J.; HECKELMAN, P.E.; KOCH, C. B.; ROMAN, K. J. **The Merck Index, an Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals**. 14^a Ed. New Jersey: Merck Co., Inc. Whitehouse Station, 2006.

⁶⁷ SAVORANI, F.; TOMASI, G.; ENGELSEN, S. B. icoshift: A versatile tool for the rapid alignment of 1D NMR spectra. *J. Magn. Reson.*, **202**, 190-202, 2010.

⁶⁸ NETO, A. C.; OLIVEIRA, E. C. S.; JÚNIOR, V. L.; CASTRO, E. V. R.; ROMÃO, W.; SILVA, R. C.; PEREIRA, R. G.; STEN, T.; FILGUEIRAS, P. R.; POPPI, R. J. Quality control of ethanol fuel: Assessment of adulteration with methanol using ¹H NMR. *Fuel*, **135**, 387-392, 2014.

⁶⁹ ZHANG, Z.; CHEN, S.; LIANG, Y. Baseline correction using adaptive iteratively reweighted penalized least squares. *Analyst*, **135**, 1138-1146, 2010.

⁷⁰ Southern Association of Forensic Scientists. Disponível em: <http://forendex.southernforensic.org/>. Acessado em 26 de fevereiro de 2017.

⁷¹ NASCIMENTO, I. R. **Identificação Química em Nível Molecular de Amostras de Maconha por ESI-FT-ICR MS**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Química da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2014. 147 p.

ANEXOS

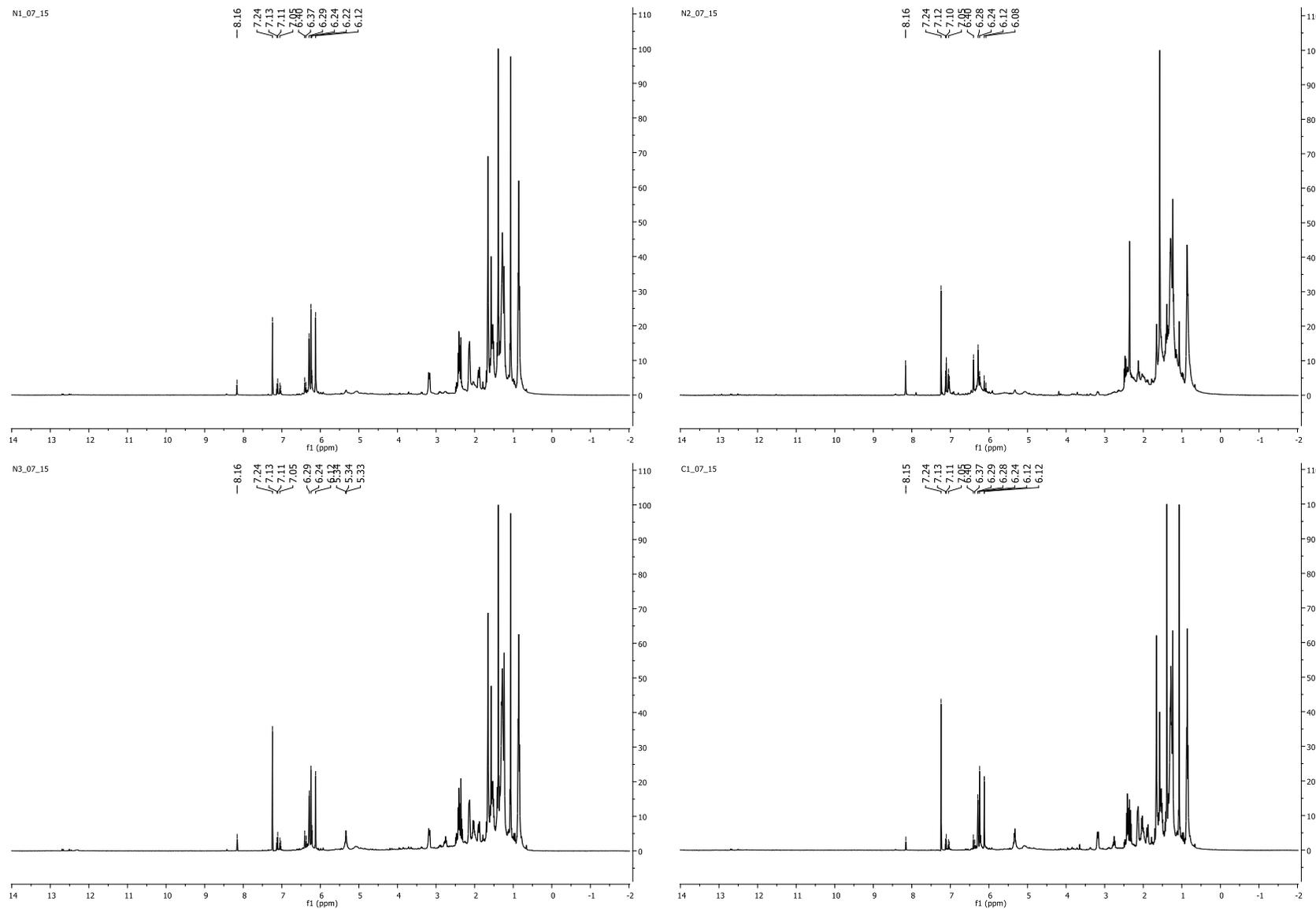


Figura A1.1. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos das amostras N1_07_15, N2_07_15, N3_07_15 e C1_07_15 em CDCl_3 .

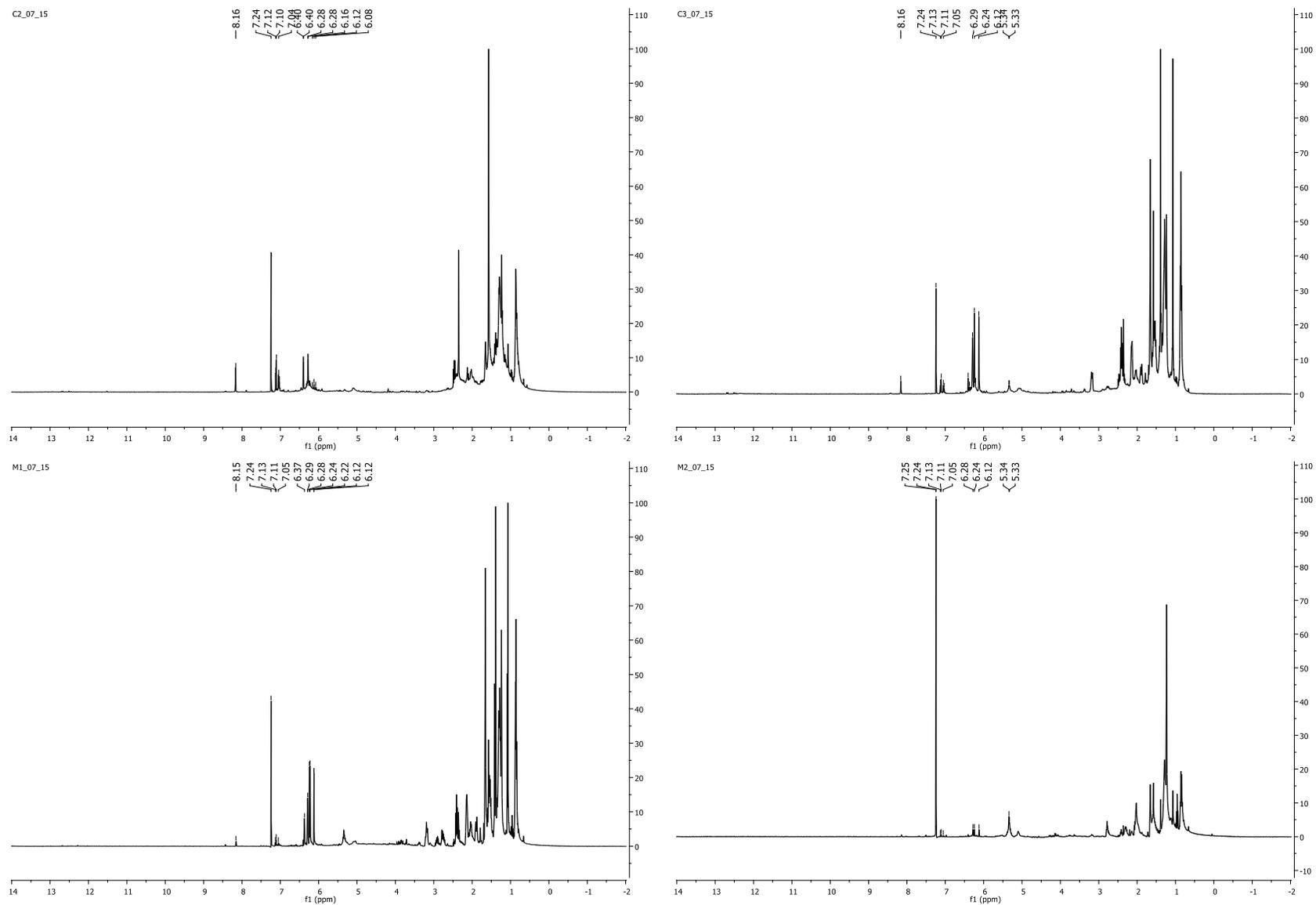


Figura A1.2. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos das amostras C2_07_15, C3_07_15, M1_07_15 e M2_07_15 em CDCl_3 .

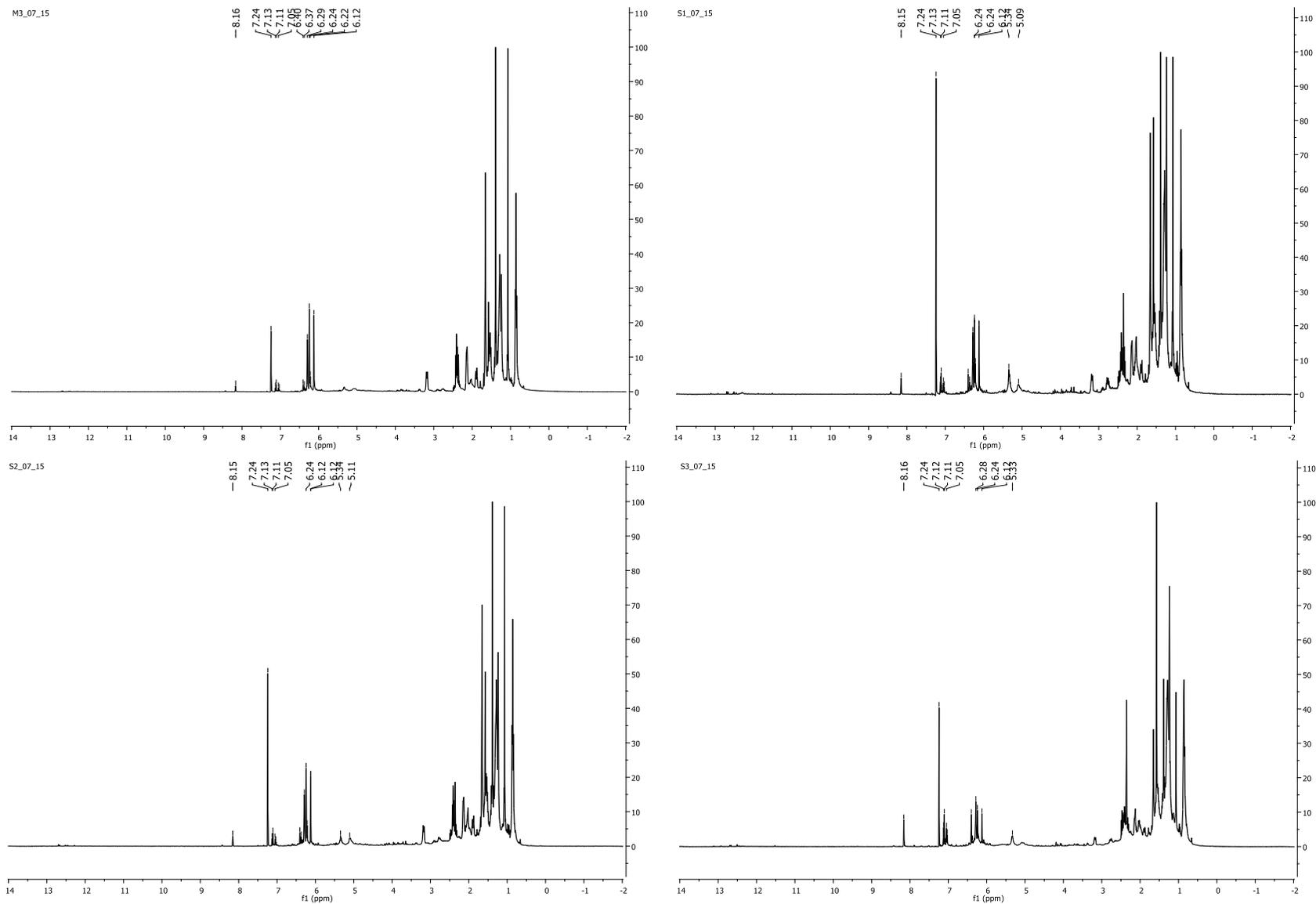


Figura A1.3. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos das amostras M3_07_15, S1_07_15, S2_07_15 e S3_07_15 em CDCl_3 .

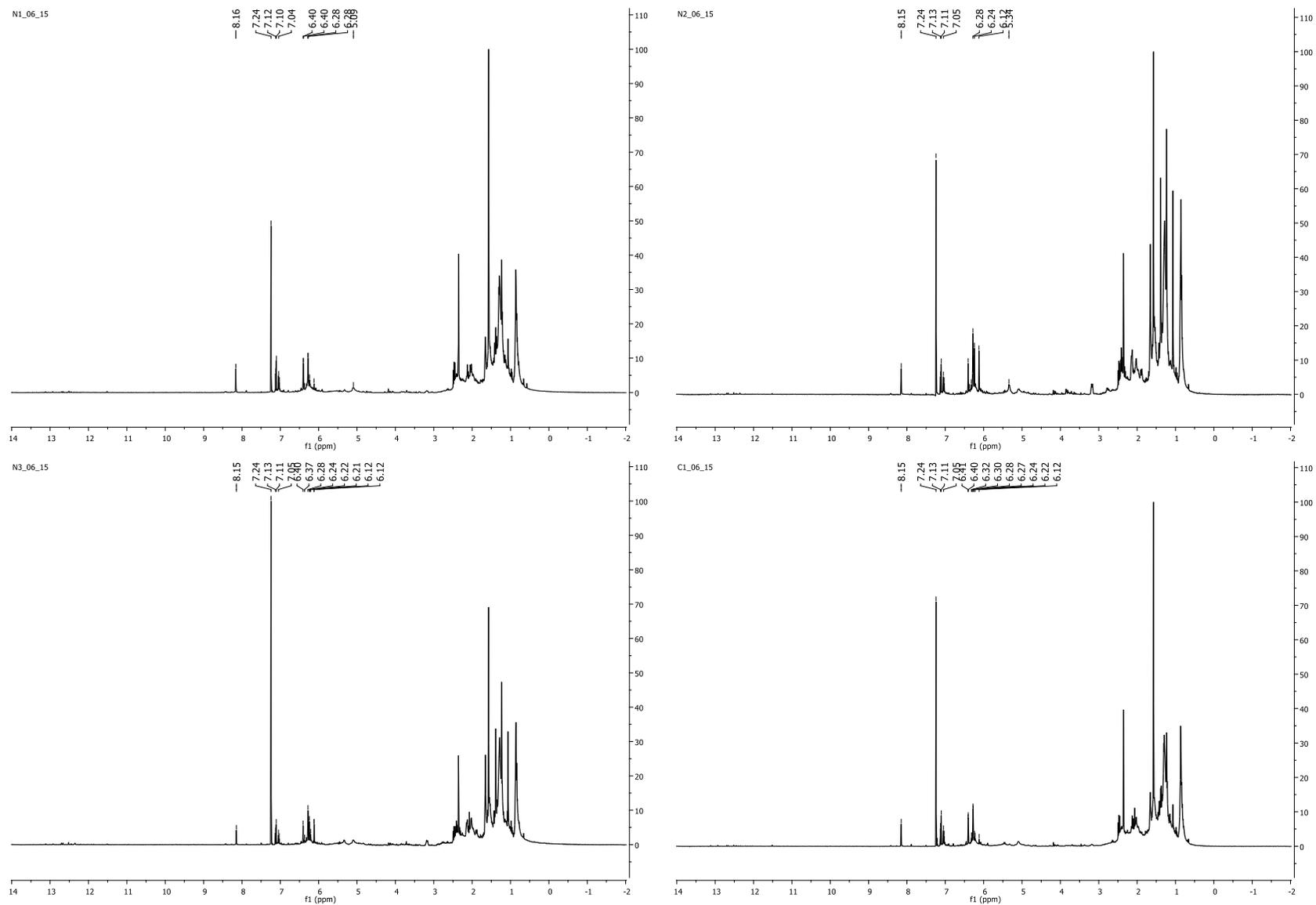


Figura A1.4. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos das amostras N1_06_15, N2_06_15, N3_06_15 e C1_06_15 em CDCl_3 .

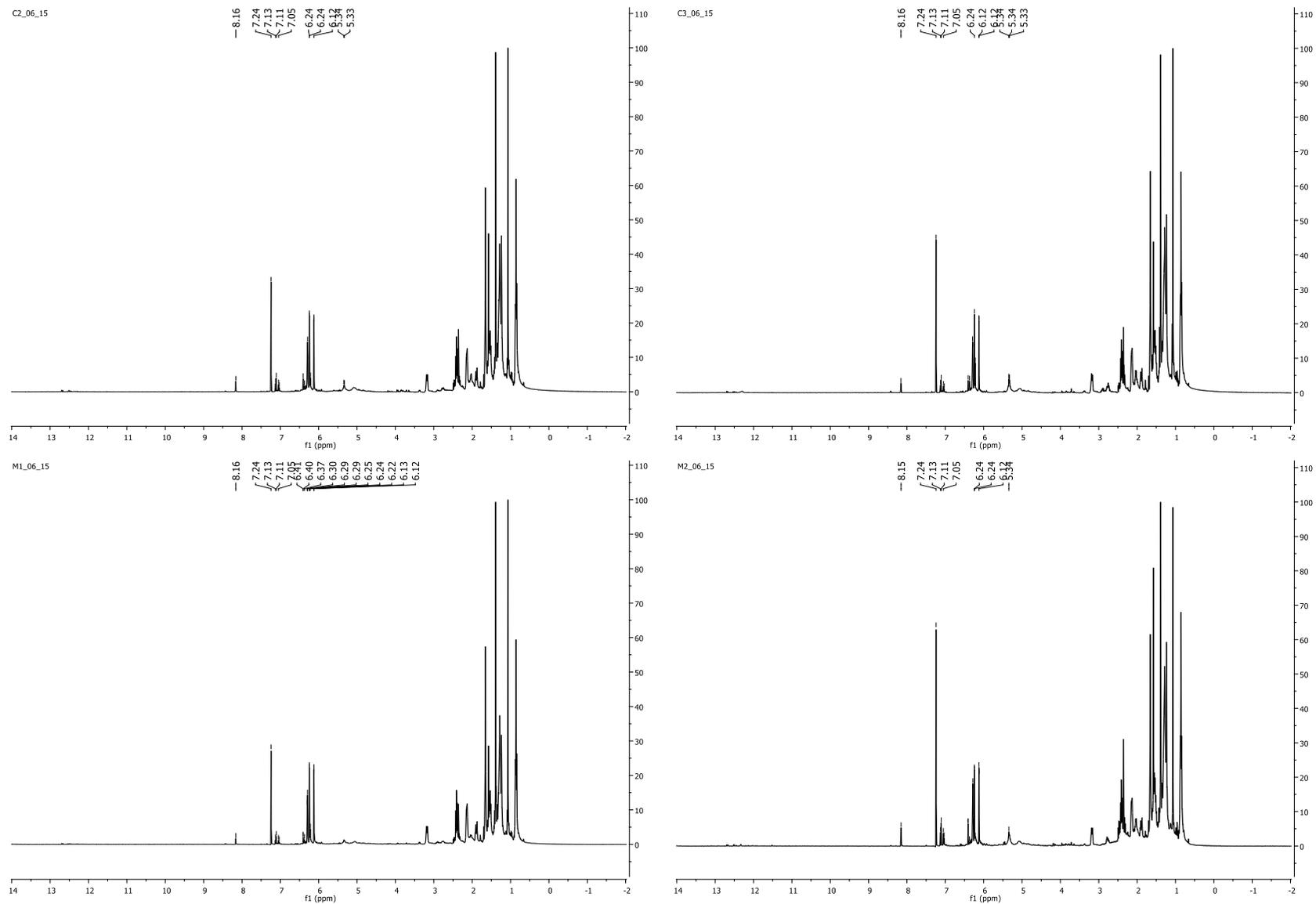


Figura A1.5. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos das amostras C2_06_15, C3_06_15, M1_06_15 e M2_06_15 em CDCl_3 .

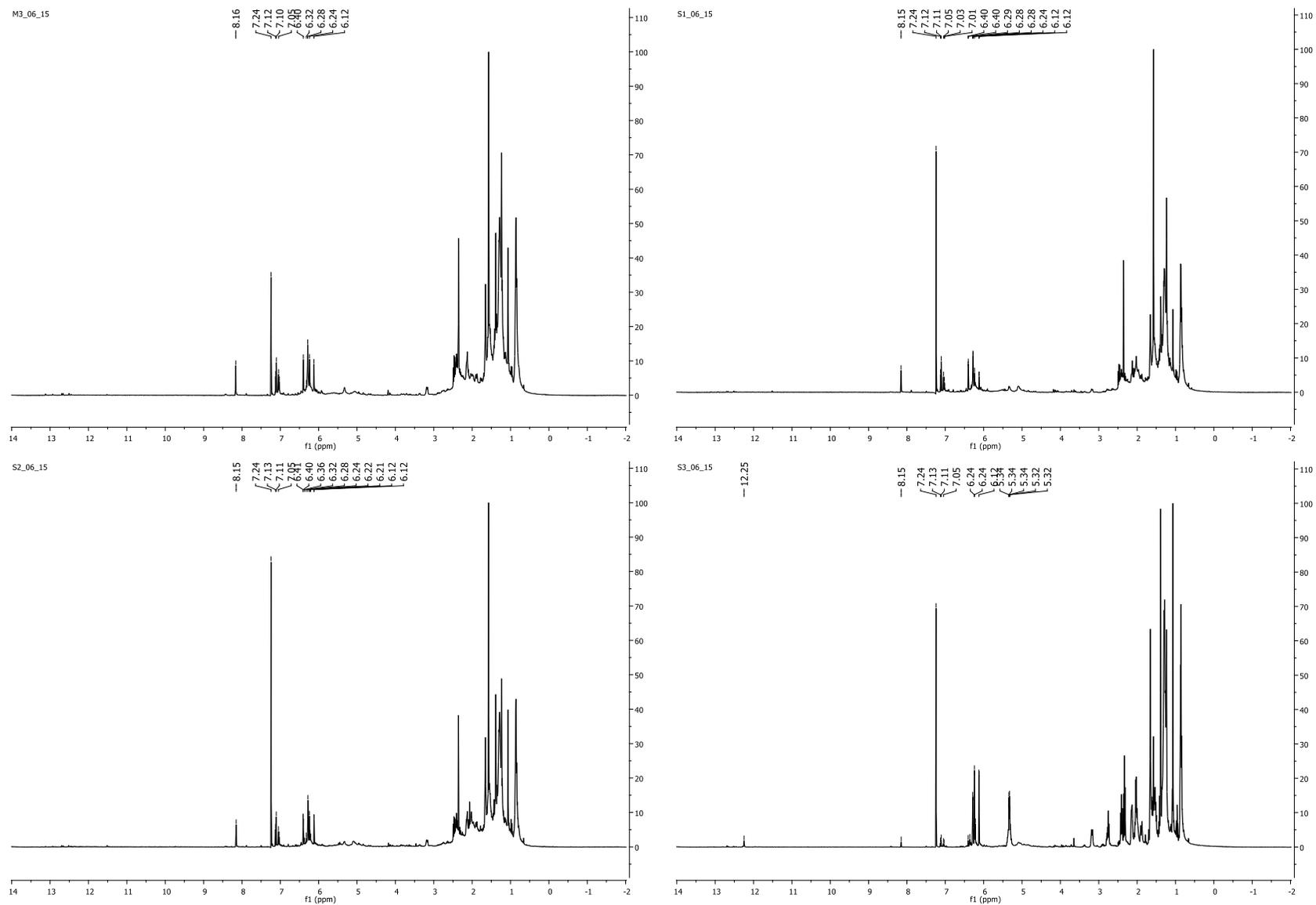


Figura A1.6. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos das amostras M3_06_15, S1_06_15, S2_06_15 e S3_06_15 em CDCl_3 .

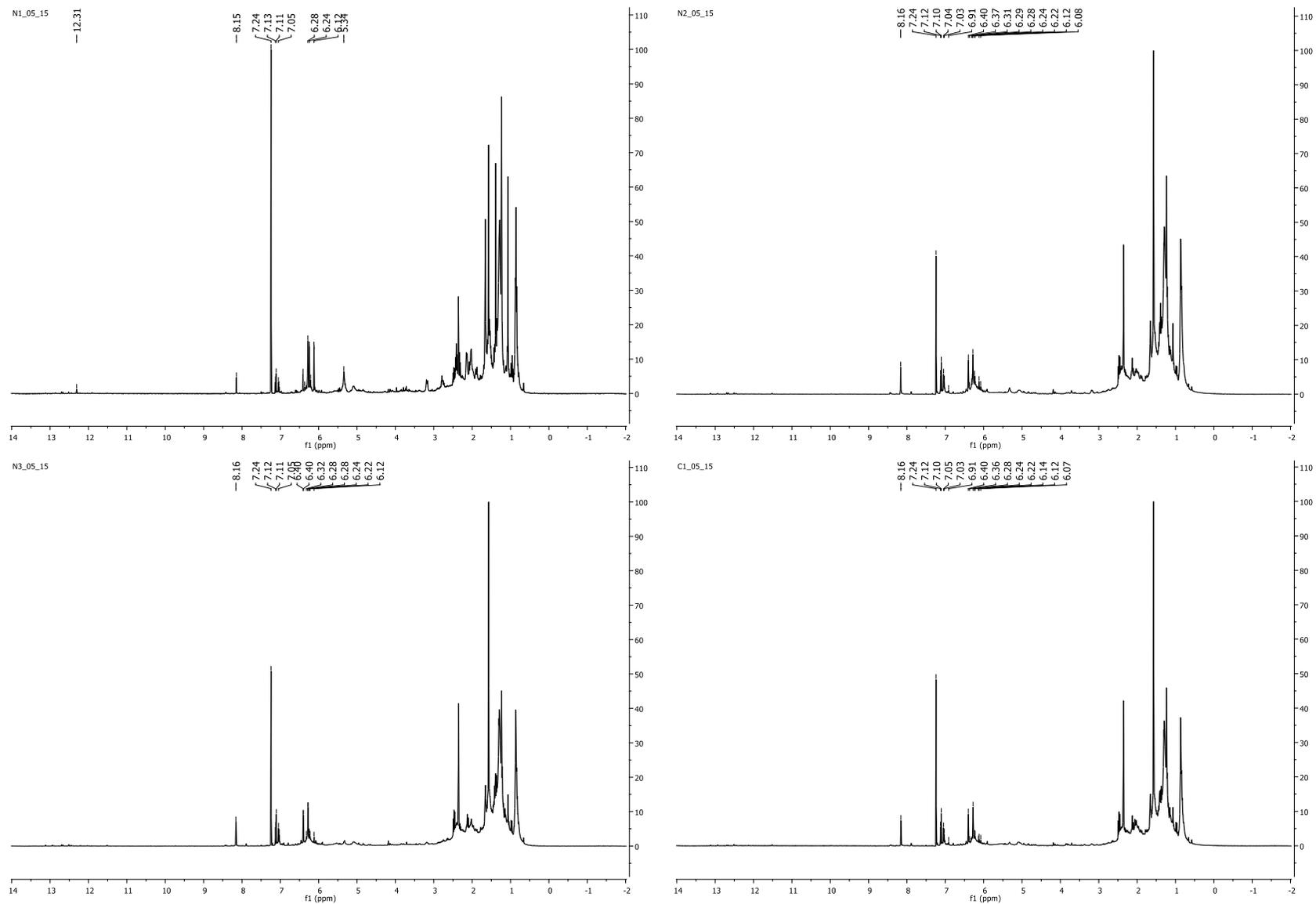


Figura A1.7. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos das amostras N1_05_15, N2_05_15, N3_05_15 e C1_05_15 em CDCl_3 .

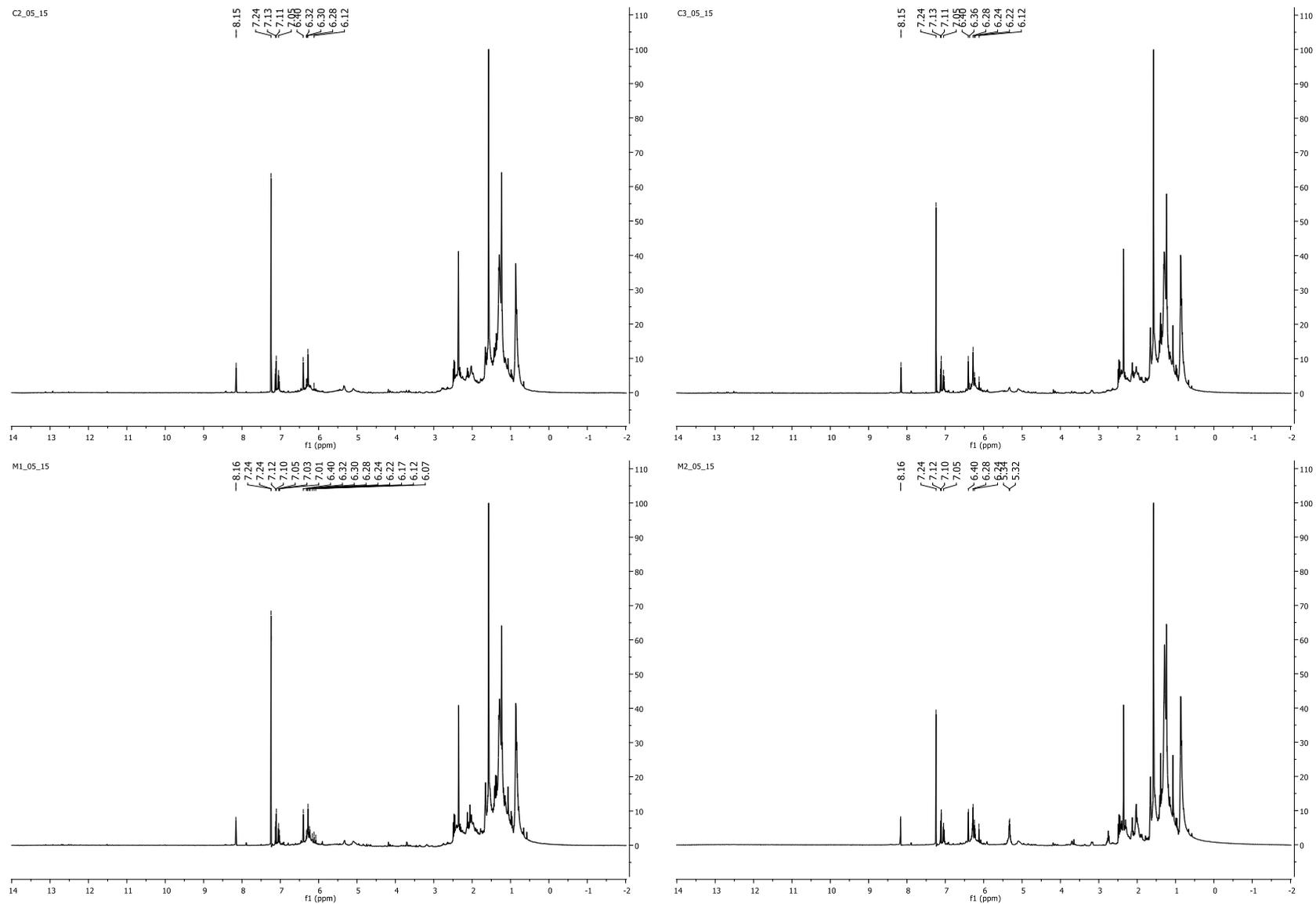


Figura A1.8. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos das amostras C2_05_15, C3_05_15, M1_05_15 e M2_05_15 em CDCl_3 .

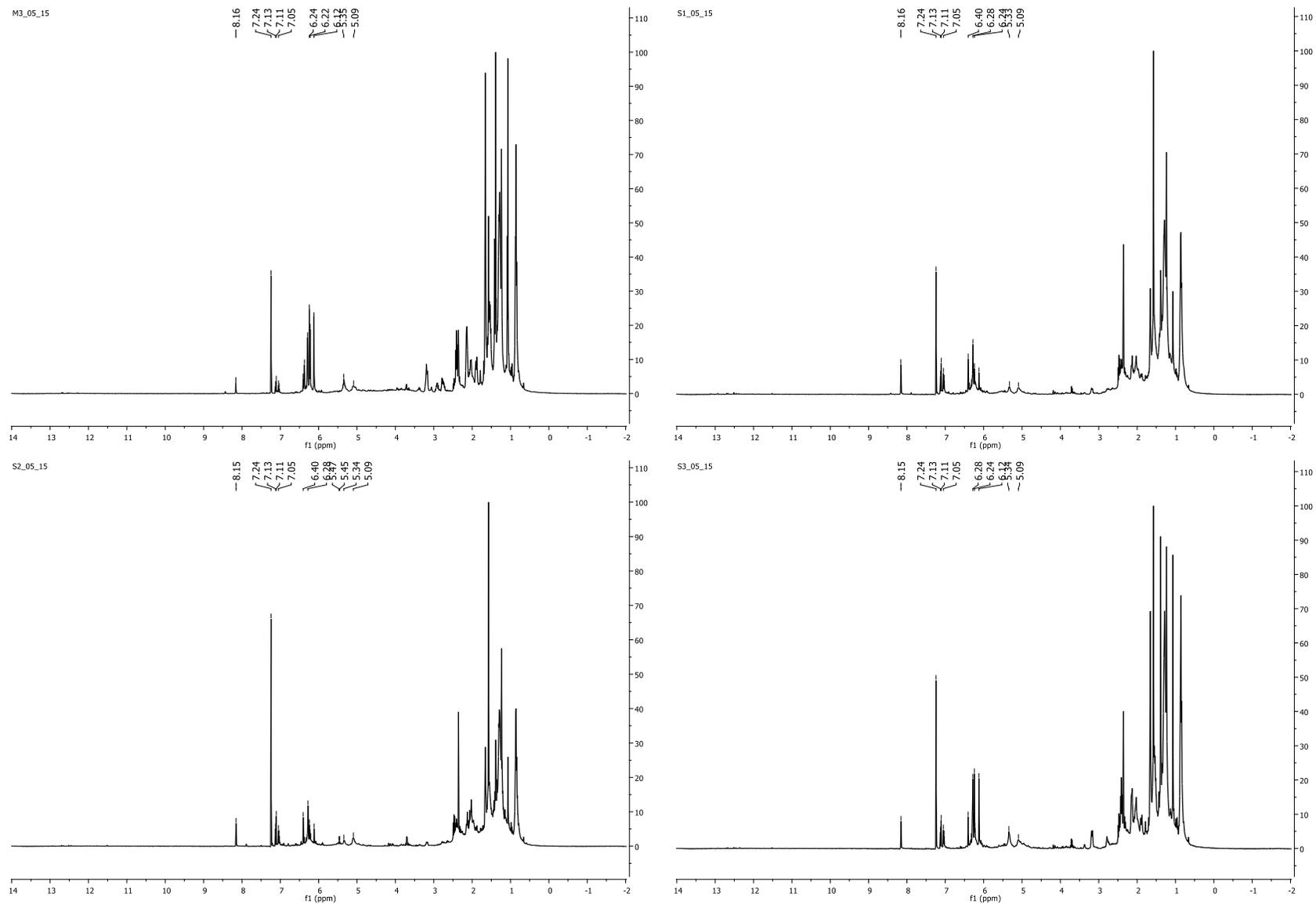


Figura A1.9. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos das amostras M3_05_15, S1_05_15, S2_05_15 e S3_05_15 em CDCl_3 .

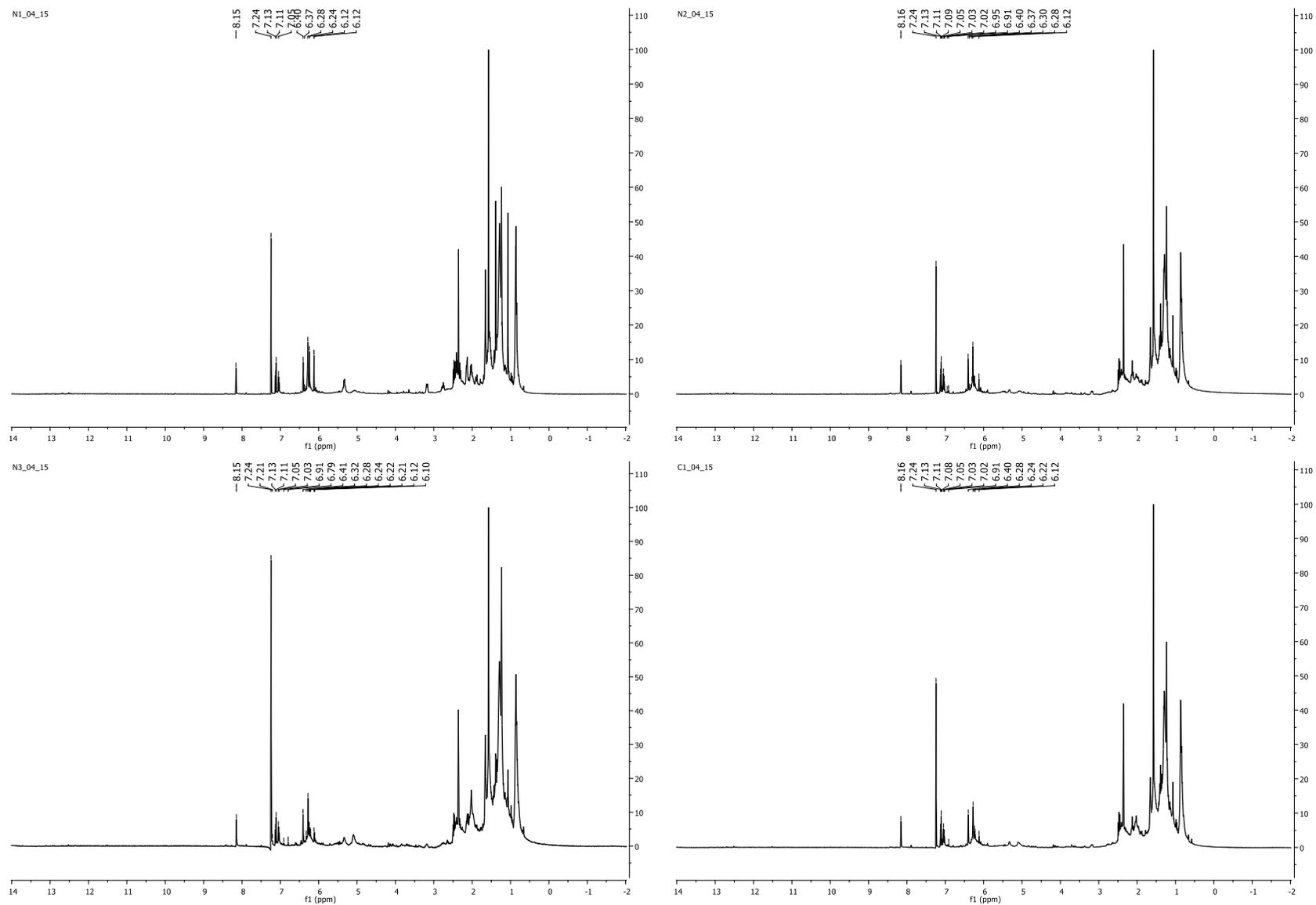


Figura A1.10. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos das amostras N1_04_15, N2_04_15, N3_04_15 e C1_04_15 em CDCl_3 .

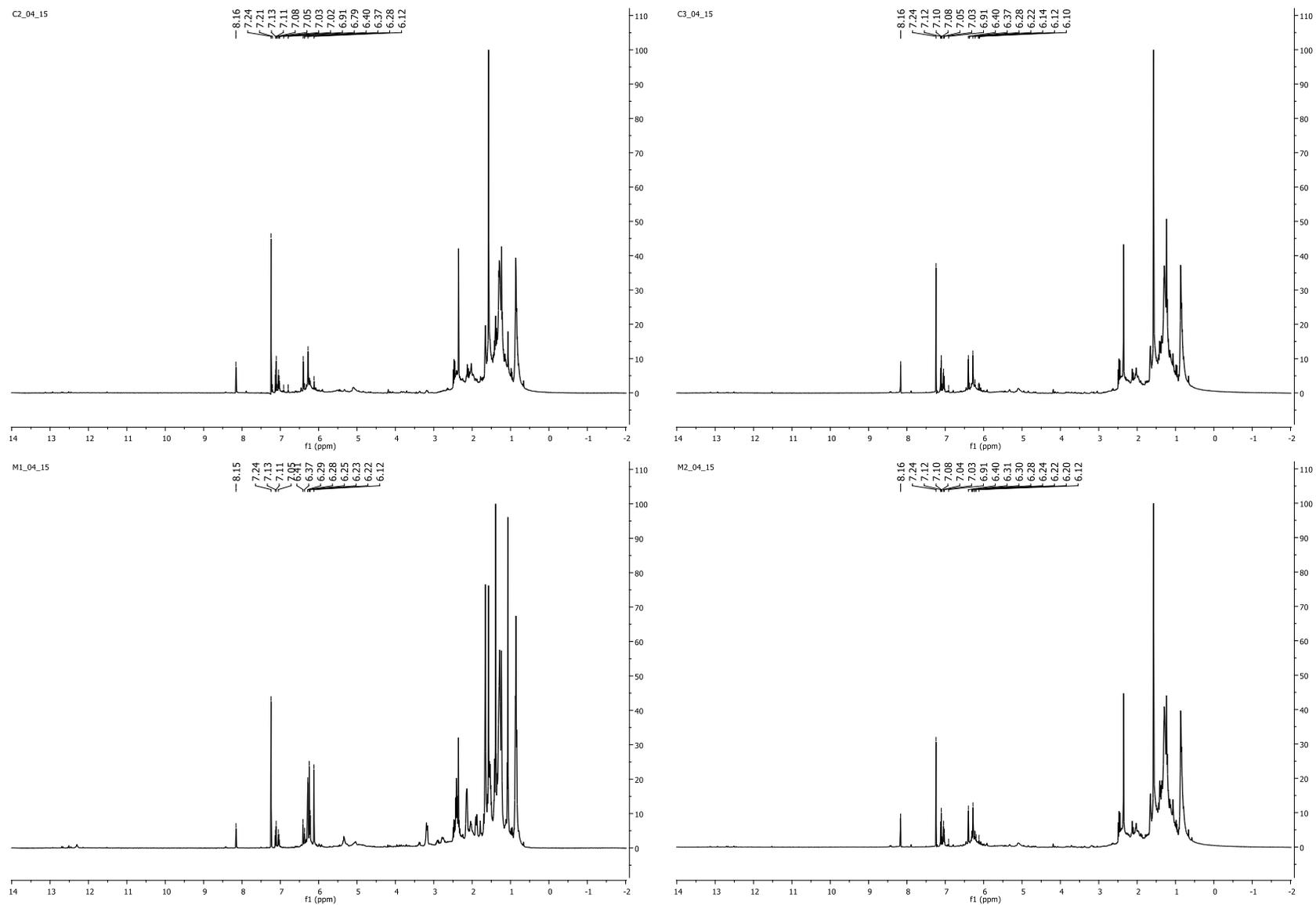


Figura A1.11. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos das amostras C2_04_15, C3_04_15, M1_04_15 e M2_04_15 em CDCl_3 .

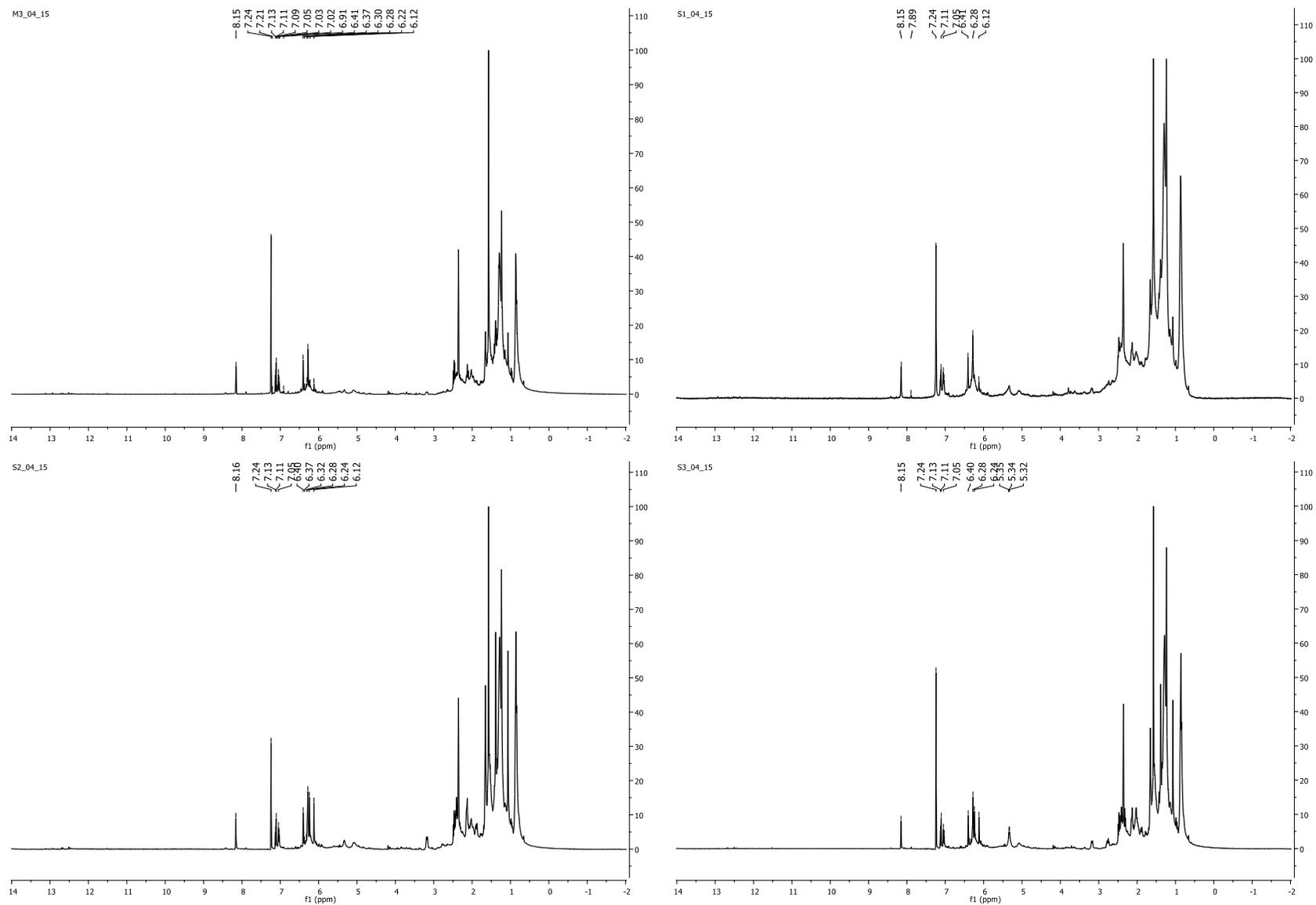


Figura A1.12. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos das amostras M3_04_15, S1_04_15, S2_04_15 e S3_04_15 em CDCl_3 .

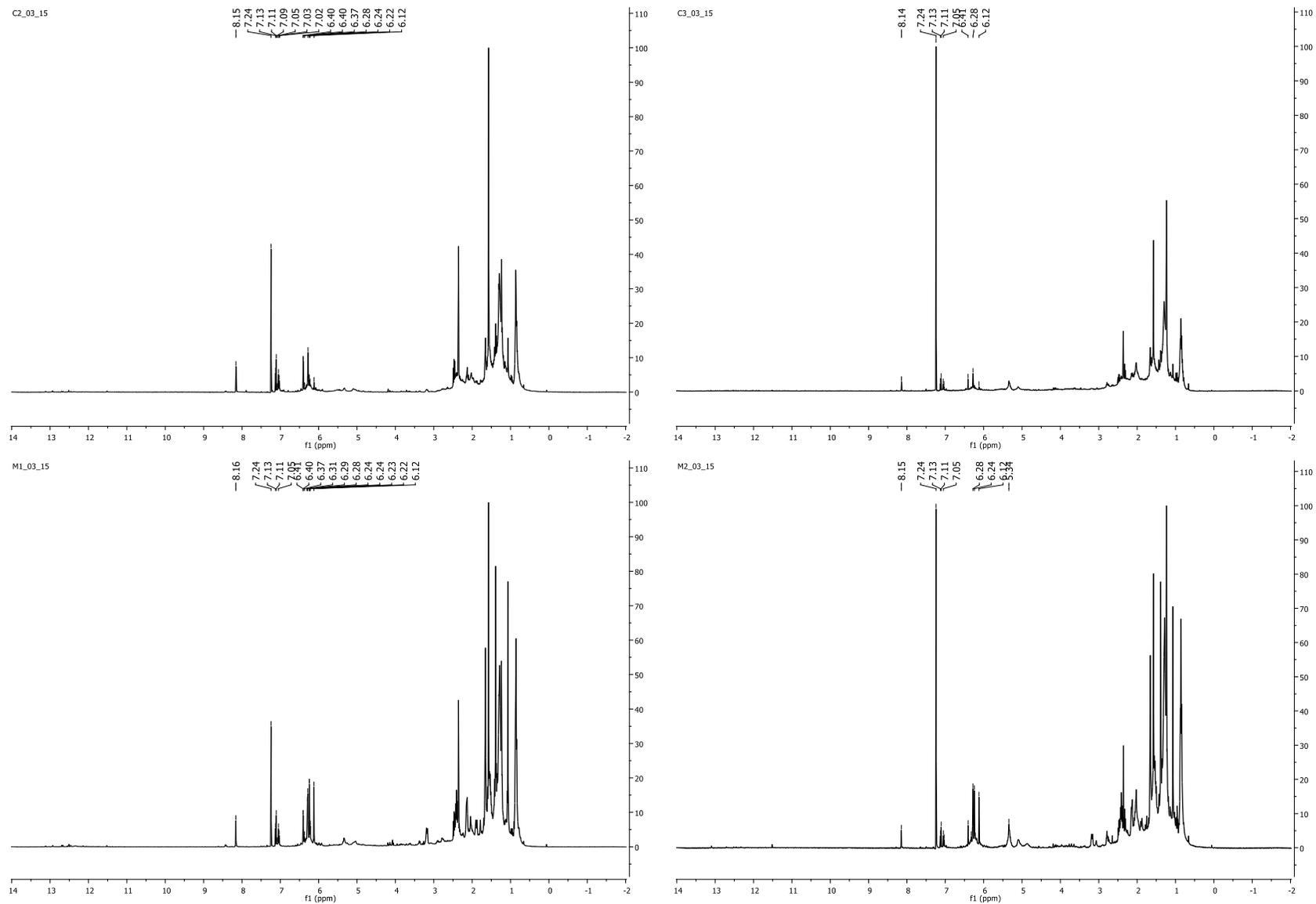


Figura A1.14. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos das amostras C2_03_15, C3_03_15, M1_03_15 e M2_03_15 em CDCl_3 .

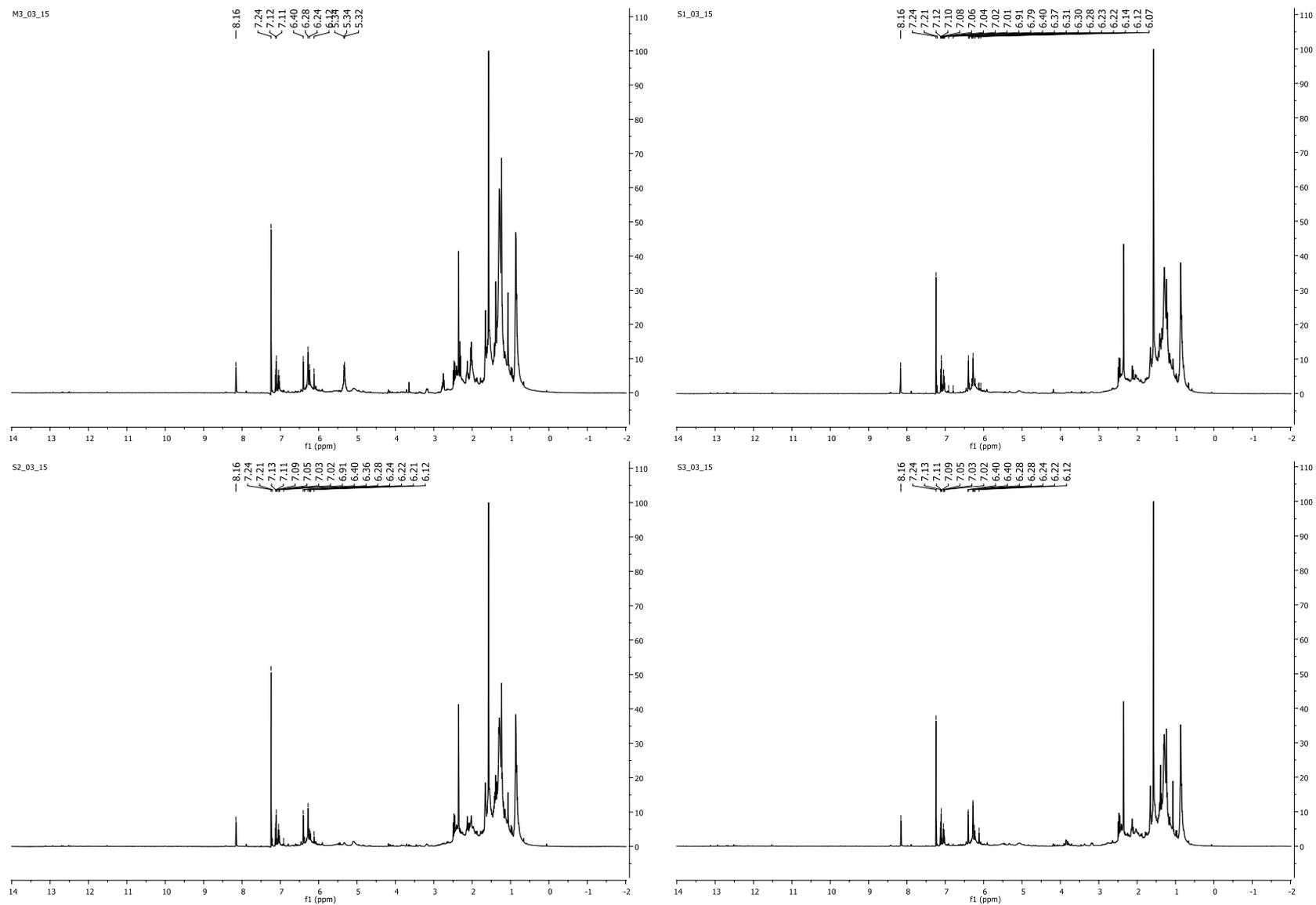


Figura A1.15. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos das amostras M3_03_15, S1_03_15, S2_03_15 e S3_03_15 em CDCl_3 .

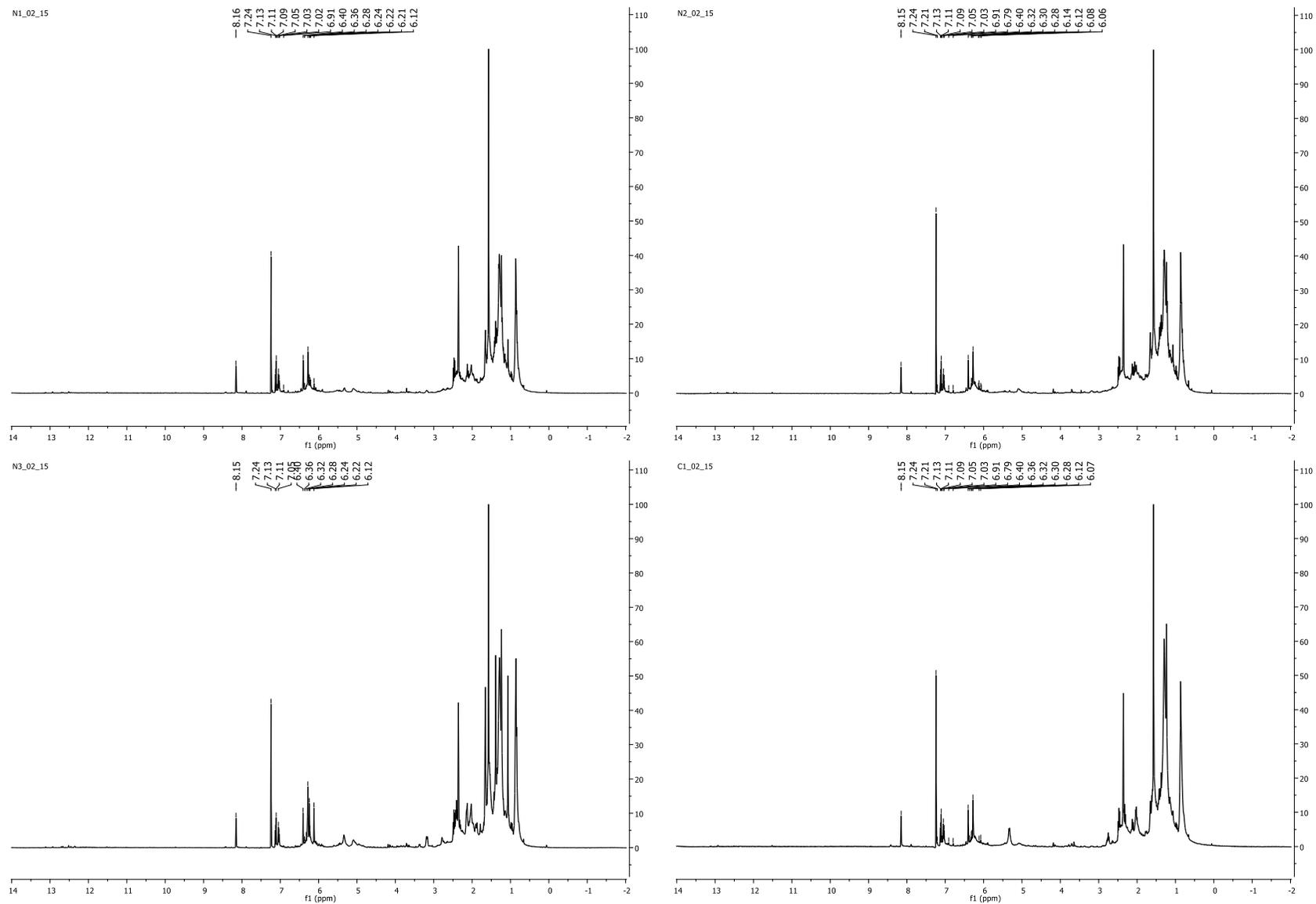


Figura A1.16. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos das amostras N1_02_15, N2_02_15, N3_02_15 e C1_02_15 em CDCl_3 .

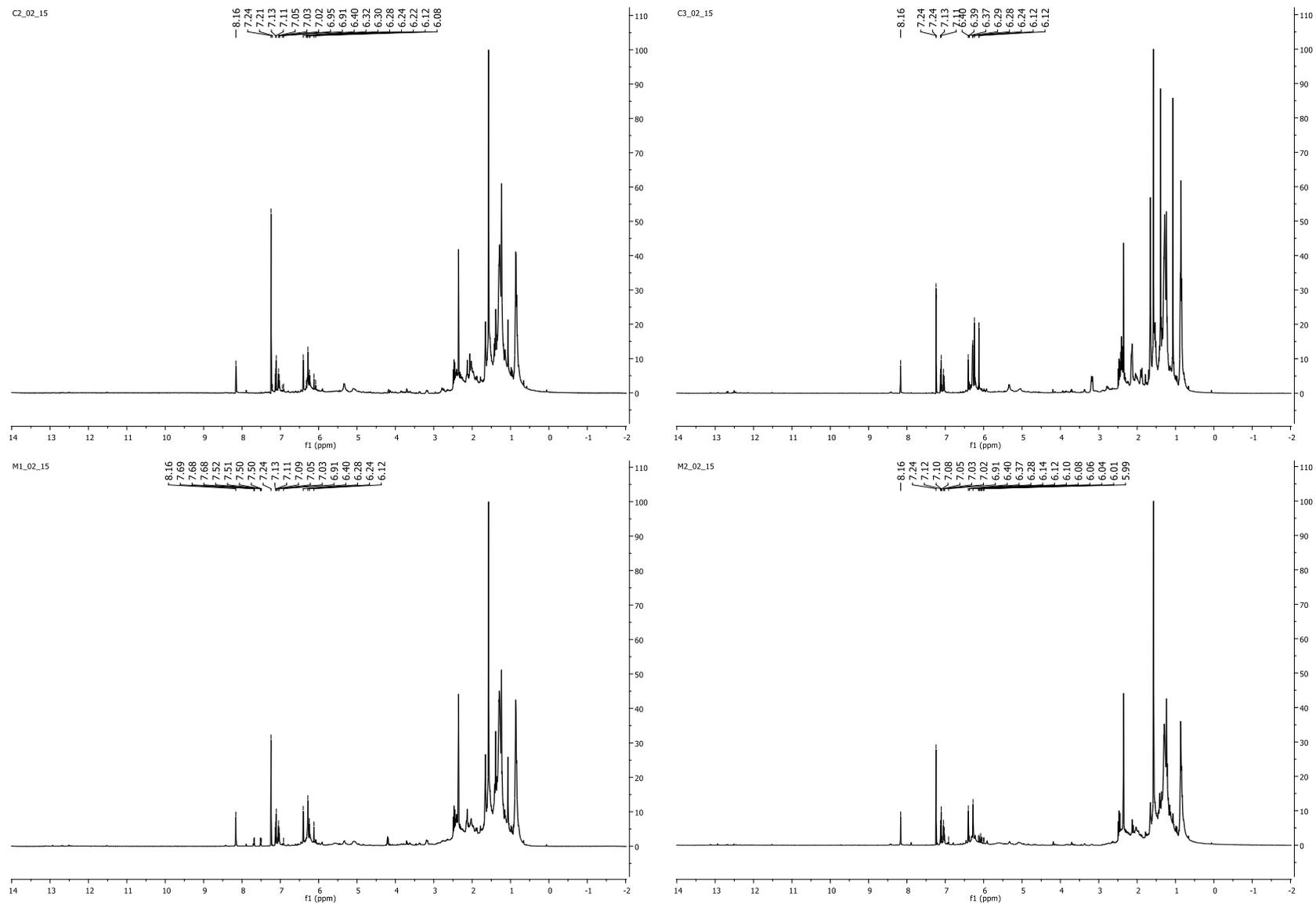


Figura A1.17. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos das amostras C2_02_15, C3_02_15, M1_02_15 e M2_02_15 em CDCl_3 .

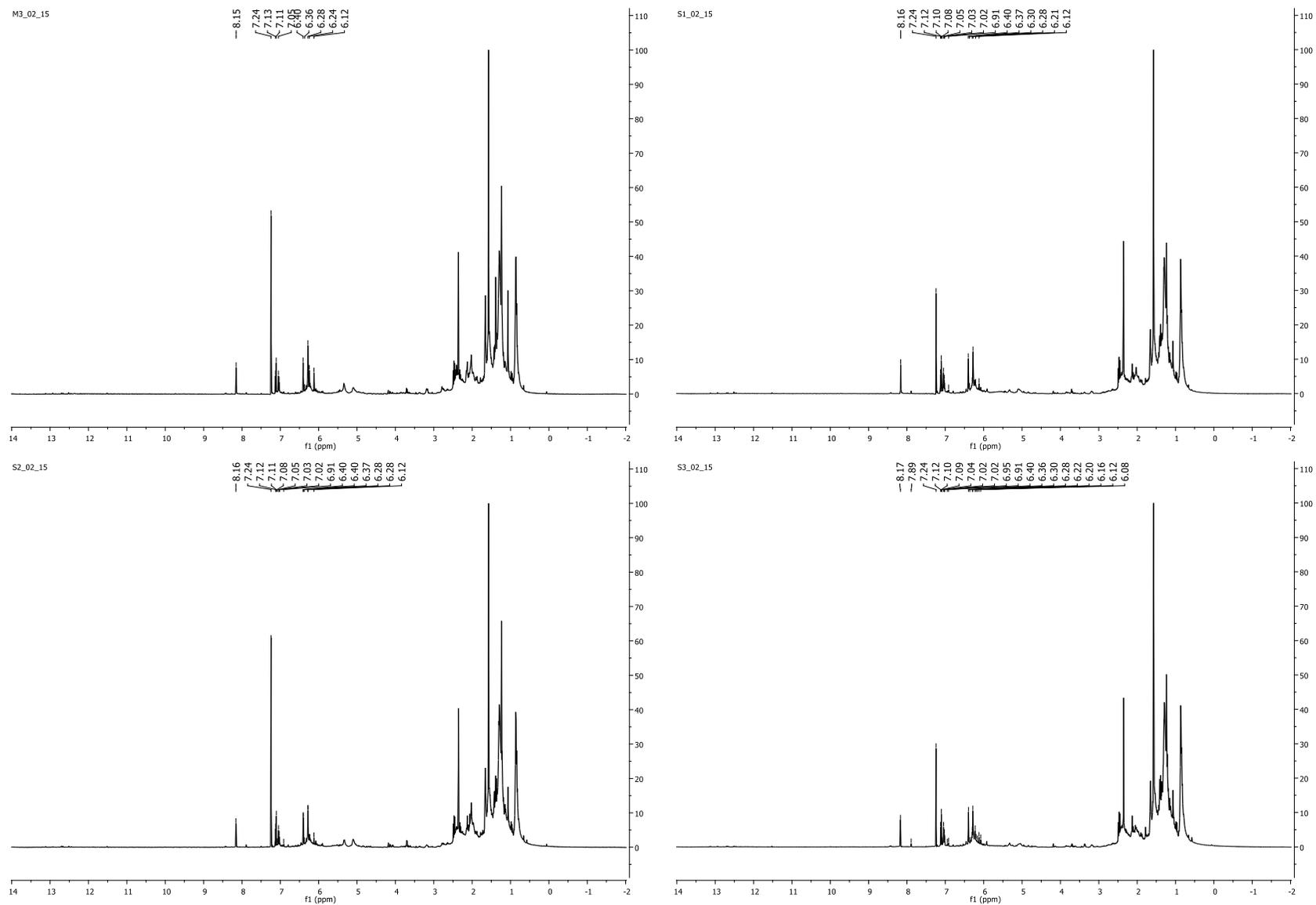


Figura A1.18. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos das amostras M3_02_15, S1_02_15, S2_02_15 e S3_02_15 em CDCl_3 .

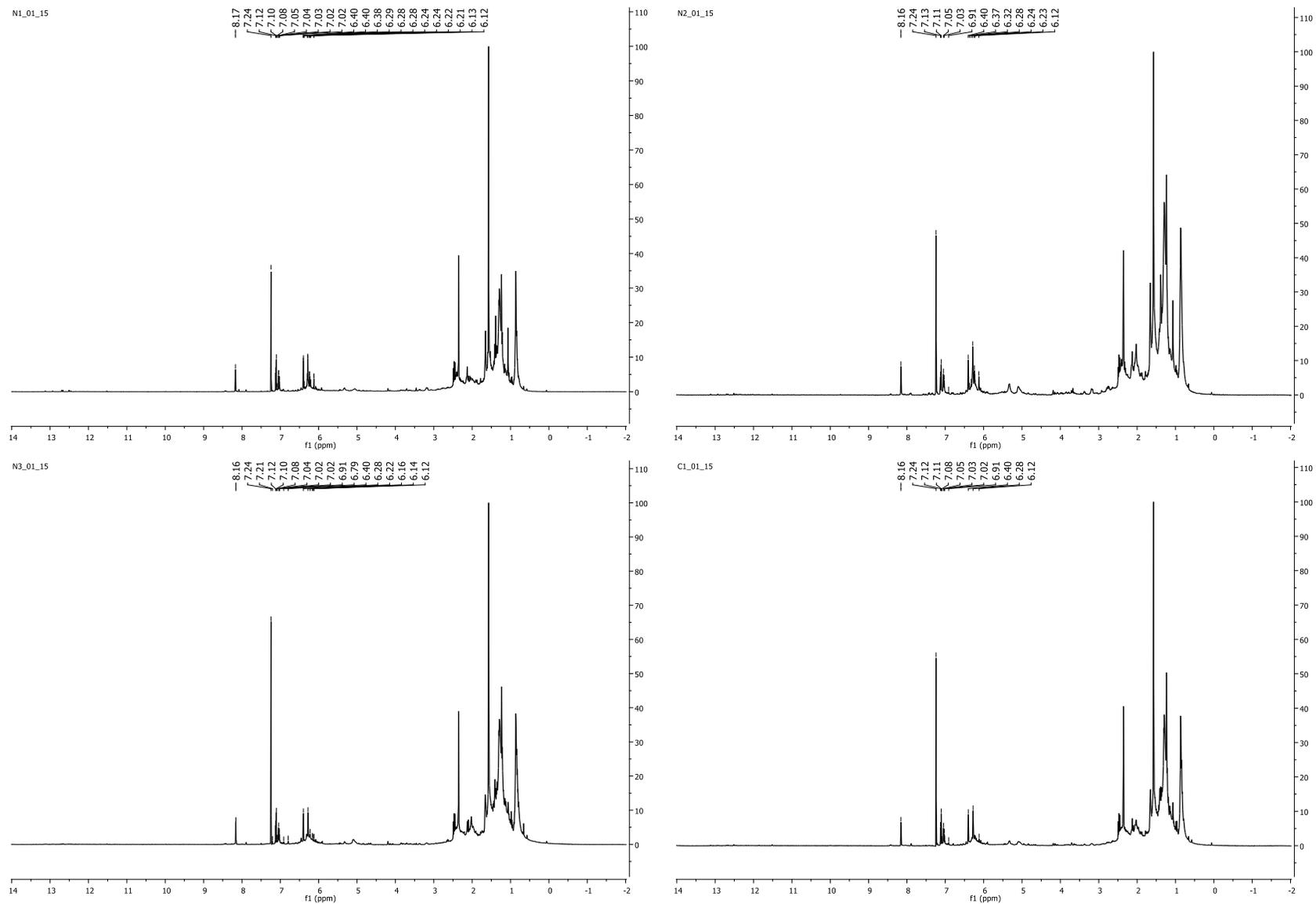


Figura A1.19. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos das amostras N1_01_15, N2_01_15, N3_01_15 e C1_01_15 em CDCl_3 .

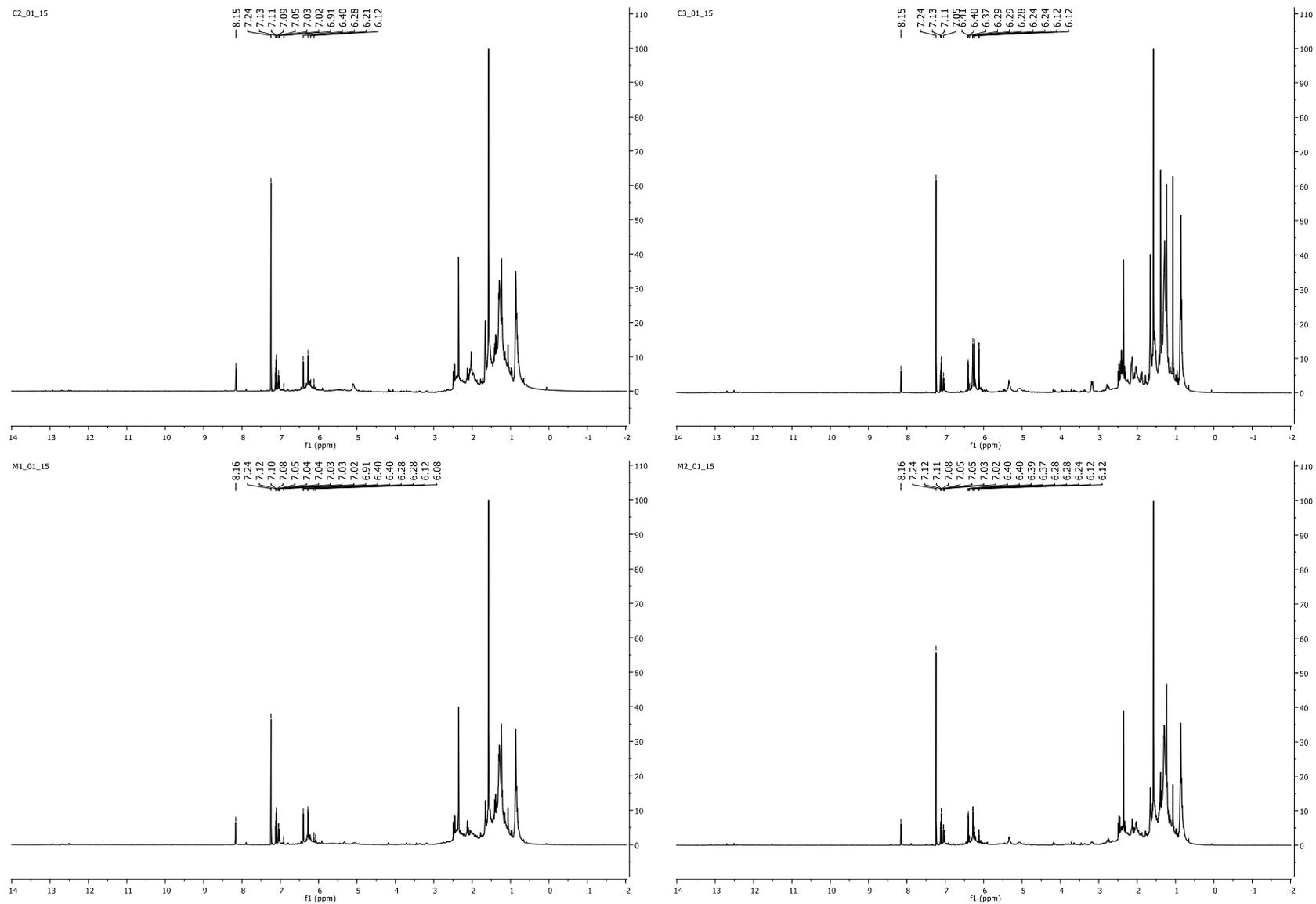


Figura A1.20. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos das amostras C2_01_15, C3_01_15, M1_01_15 e M2_01_15 em CDCl_3 .

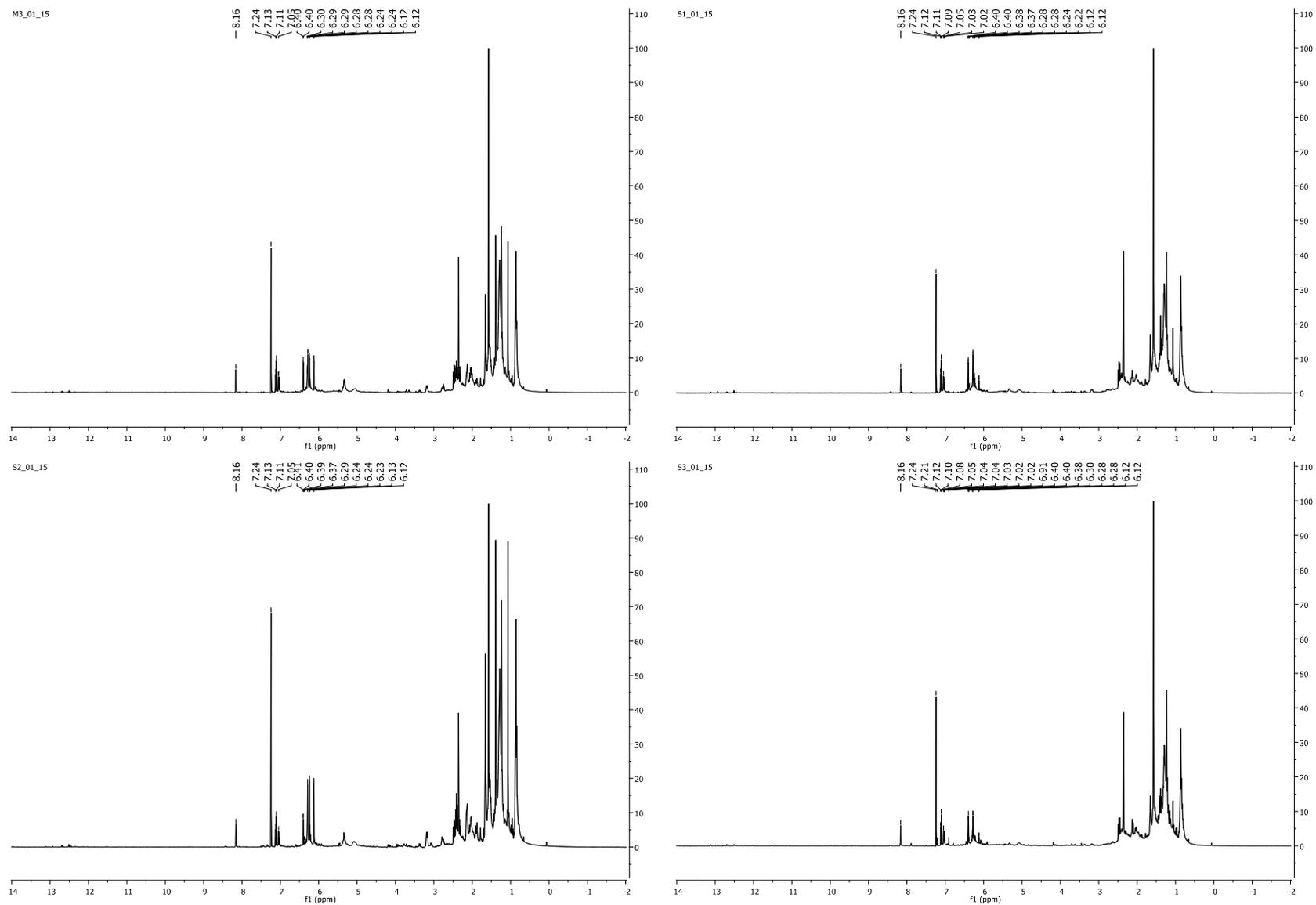


Figura A1.21. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos das amostras M3_01_15, S1_01_15, S2_01_15 e S3_01_15 em CDCl_3 .

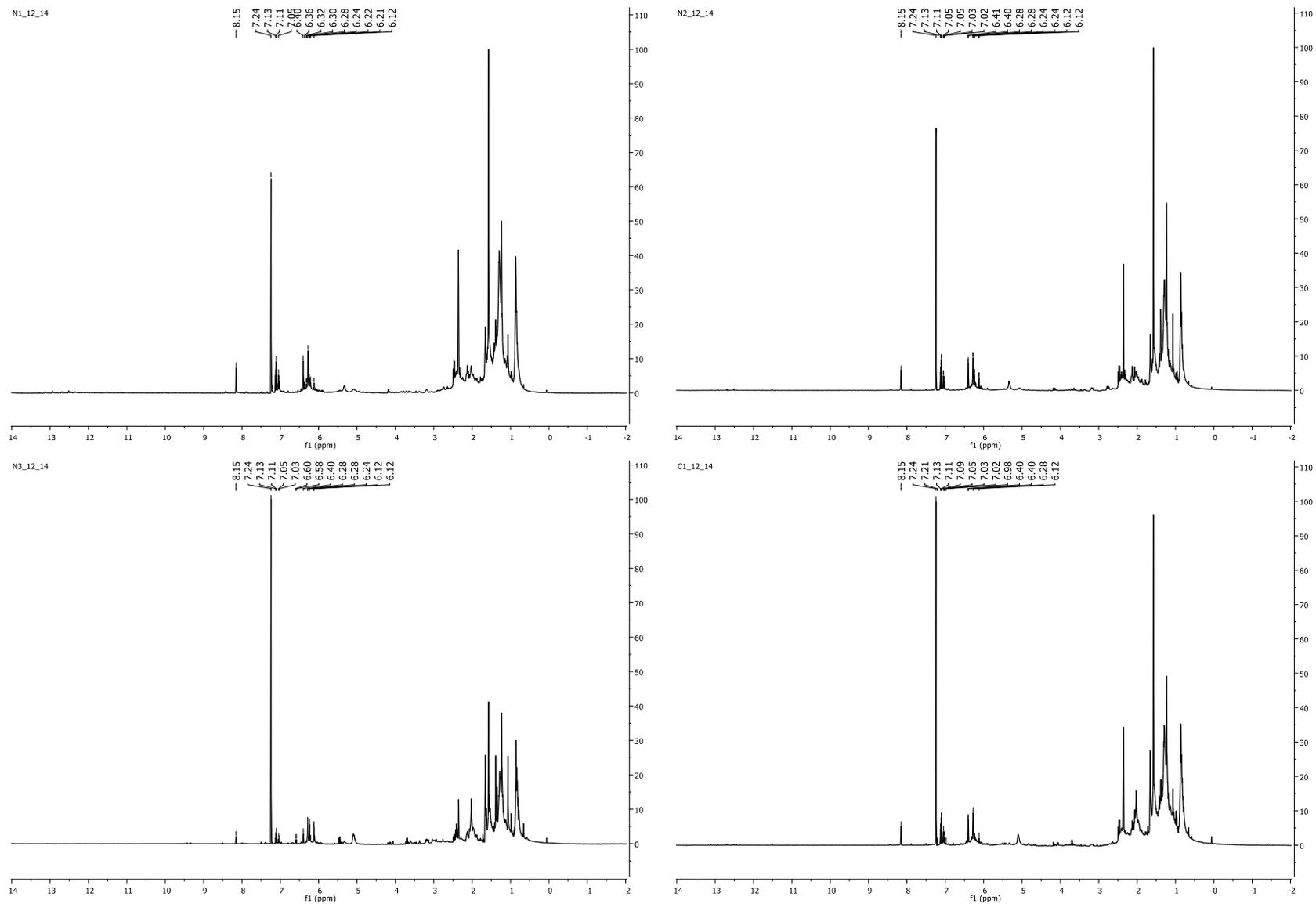


Figura A1.22. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos das amostras N1_12_14, N2_12_14, N3_12_14 e C1_12_14 em CDCl_3 .

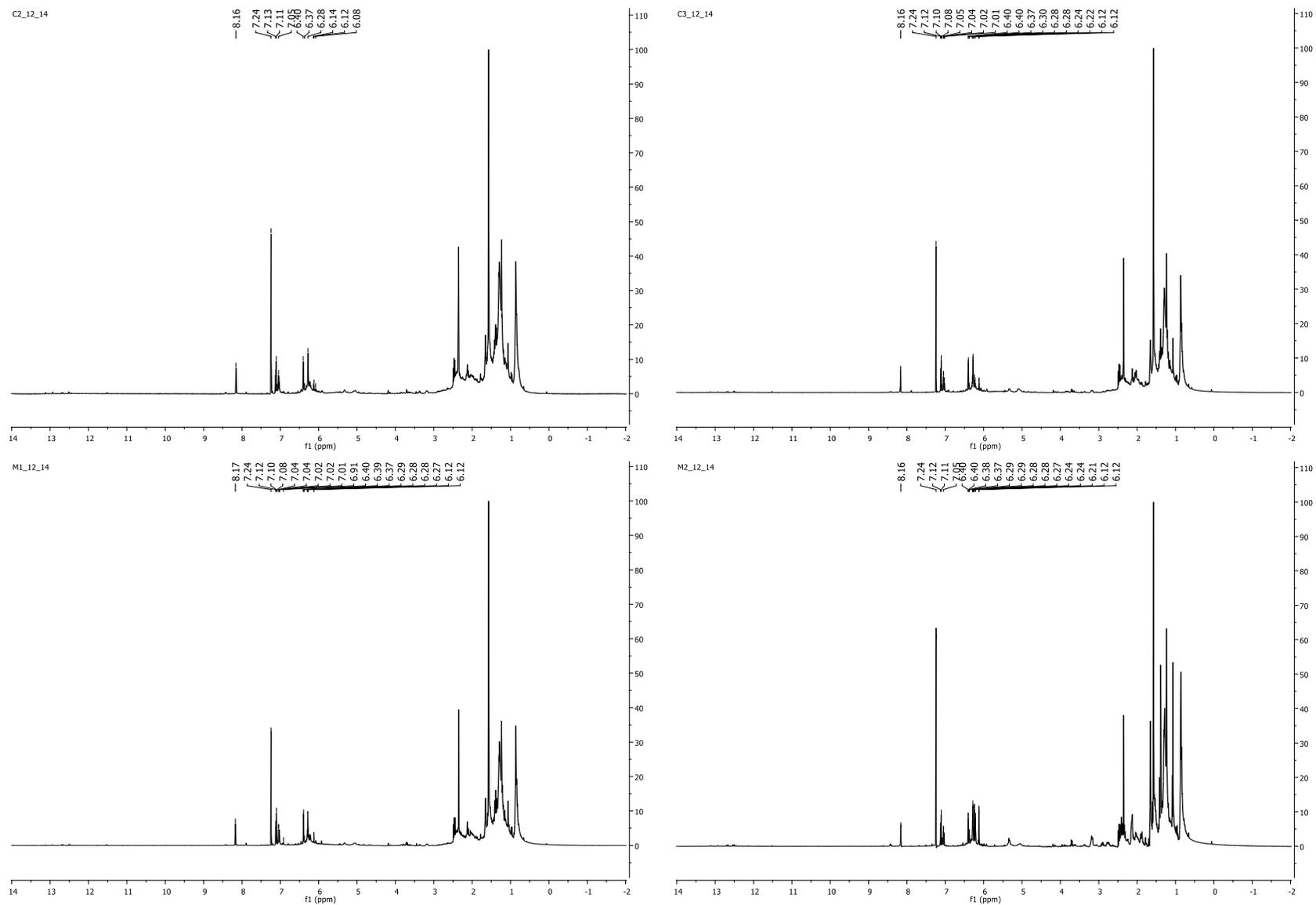


Figura A1.23. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos das amostras C2_12_14, C3_12_14, M1_12_14 e M2_12_14 em CDCl_3 .

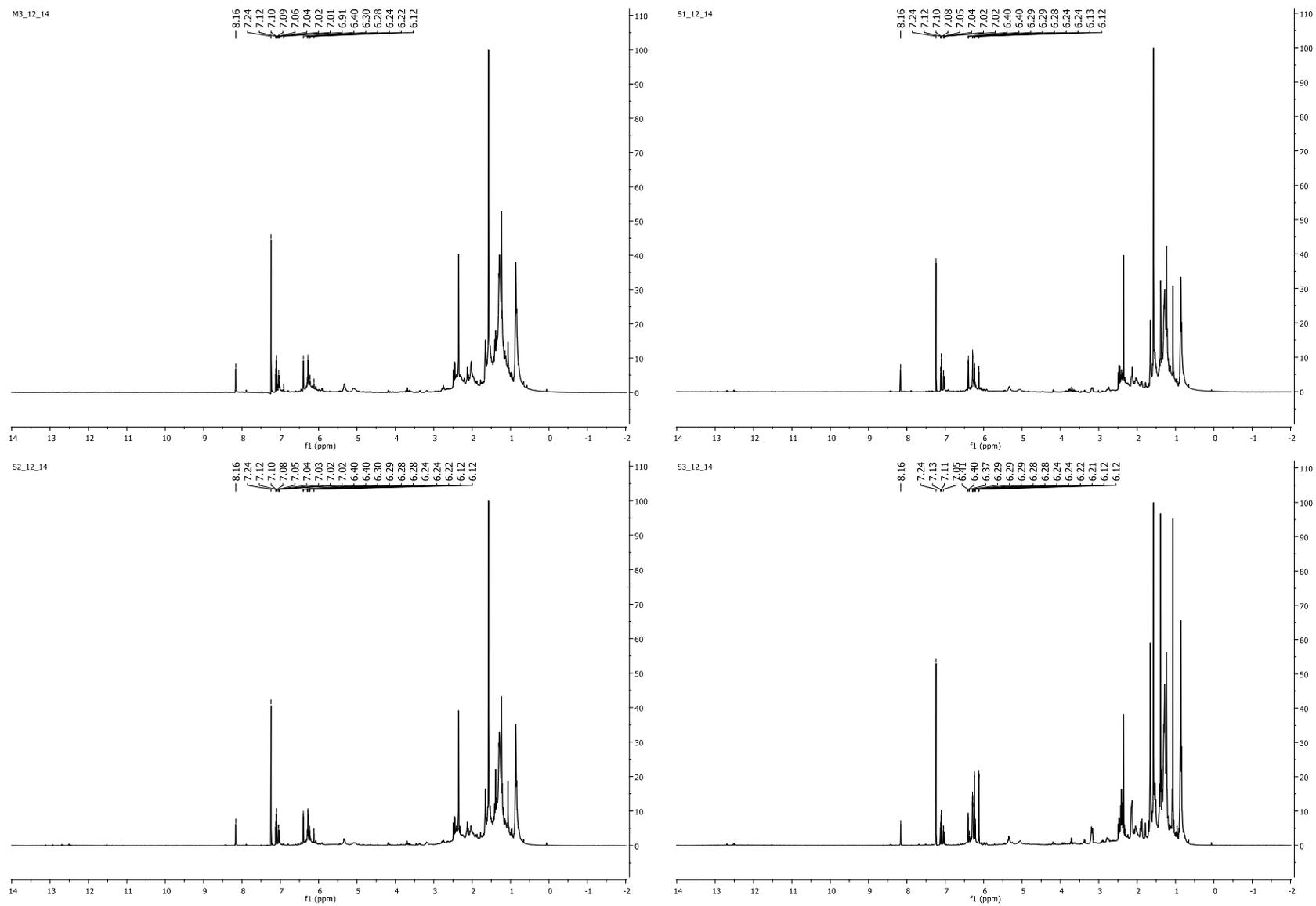


Figura A1.24. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos das amostras M3_12_14, S1_12_14, S2_12_14 e S3_12_14 em CDCl_3 .

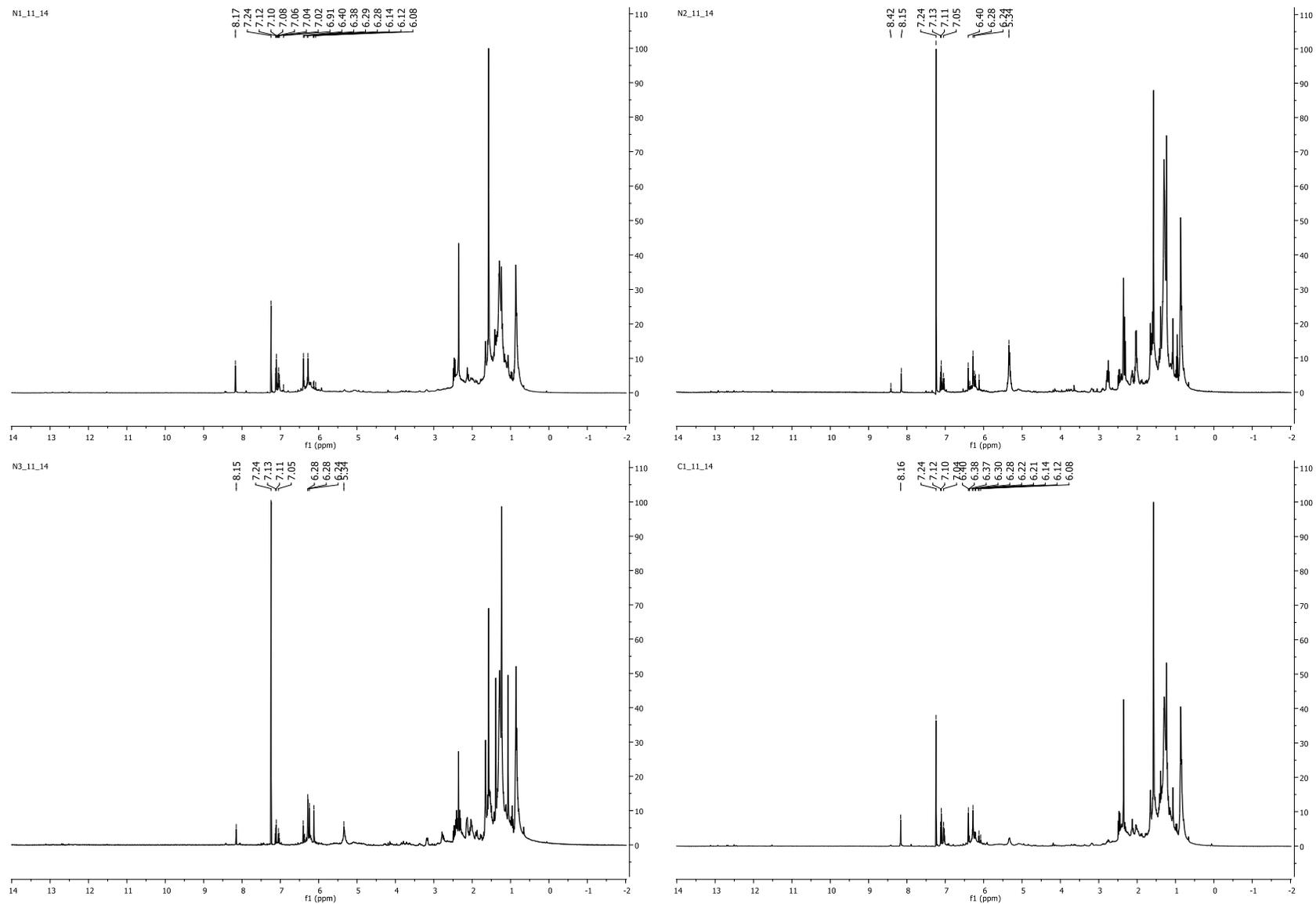


Figura A1.25. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos das amostras N1_11_14, N2_11_14, N3_11_14 e C1_11_14 em CDCl_3 .

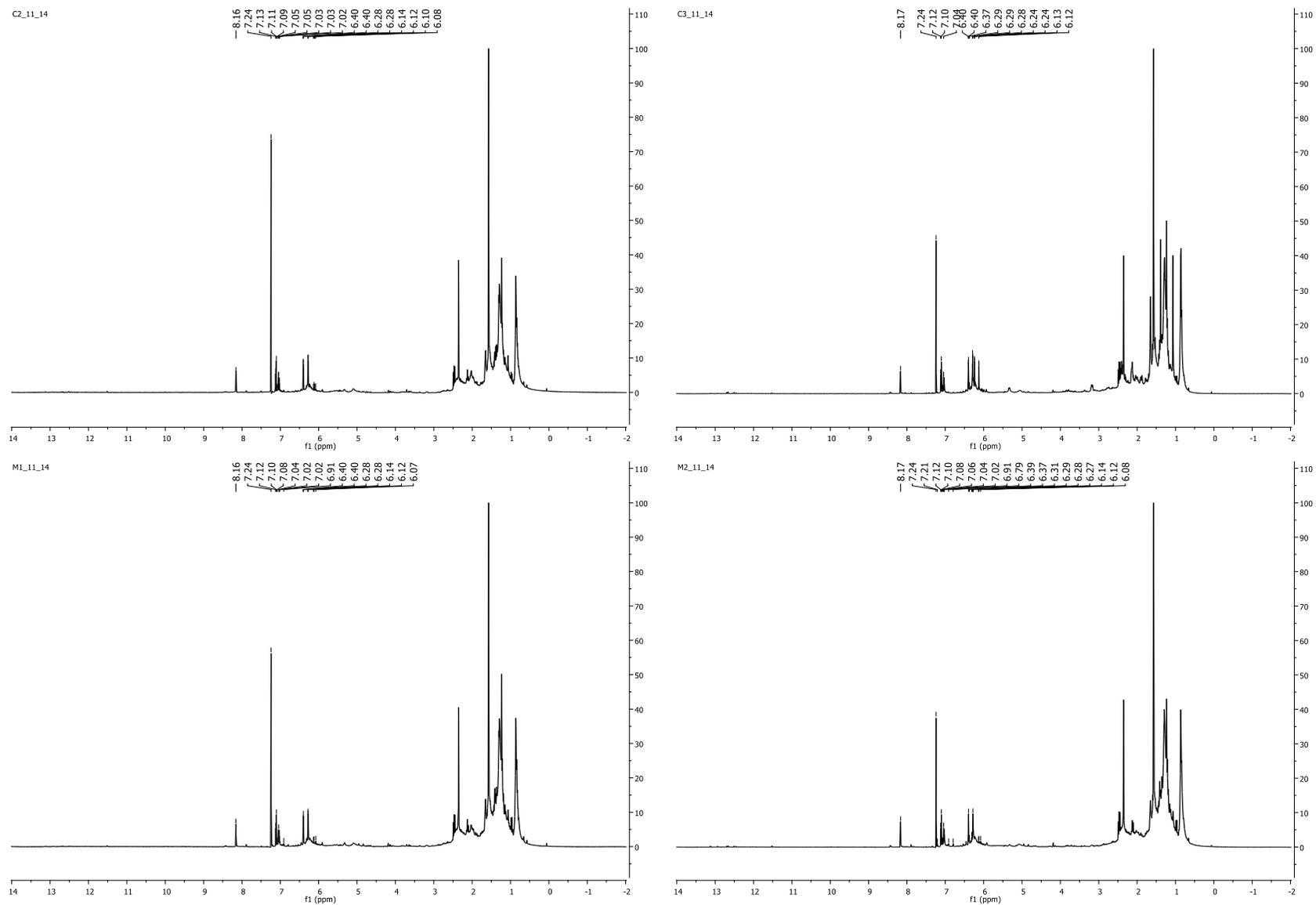


Figura A1.26. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos das amostras C2_11_14, C3_11_14, M1_11_14 e M2_11_14 em CDCl_3 .

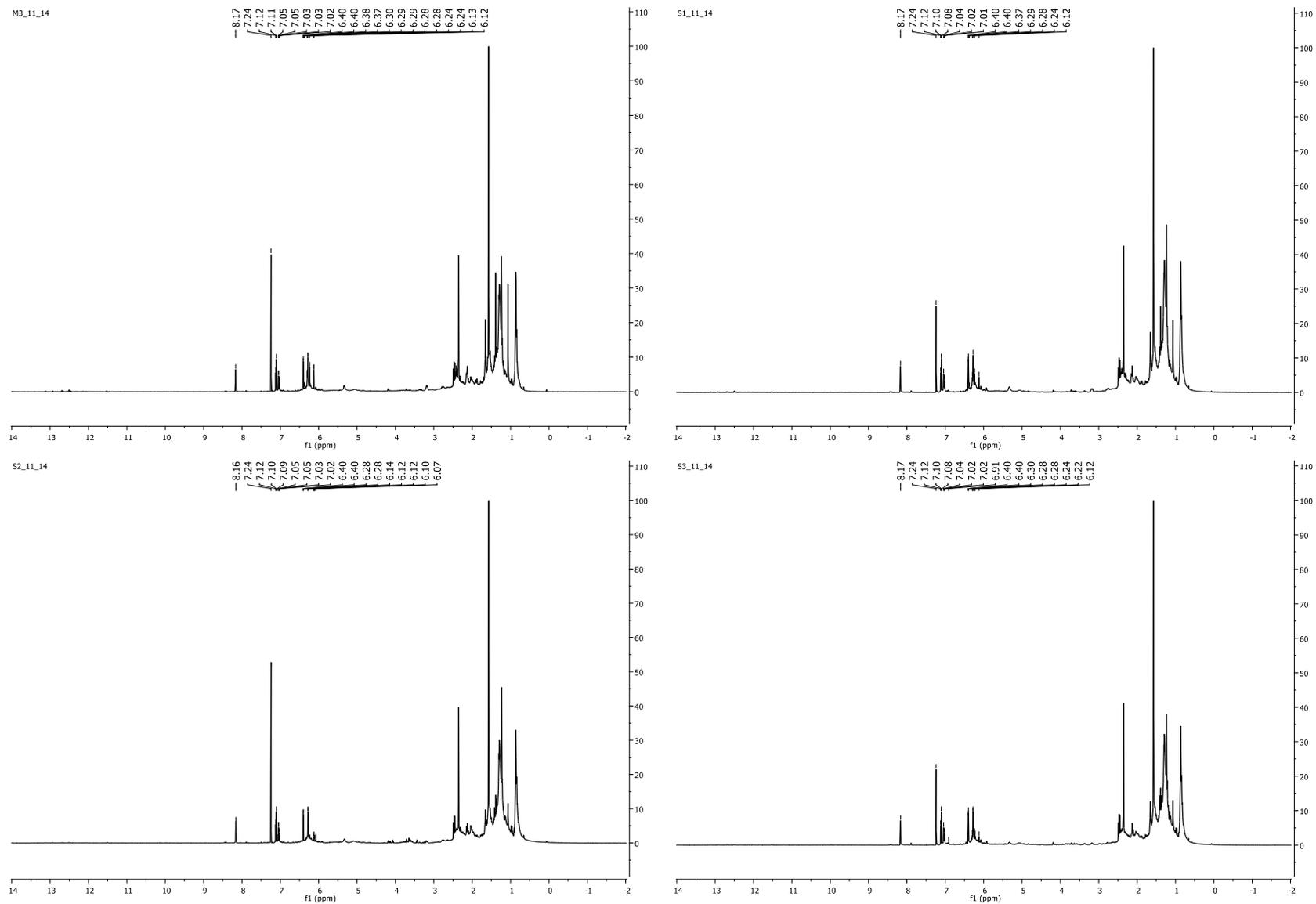


Figura A1.27. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos das amostras M3_11_14, S1_11_14, S2_11_14 e S3_11_14 em CDCl_3 .

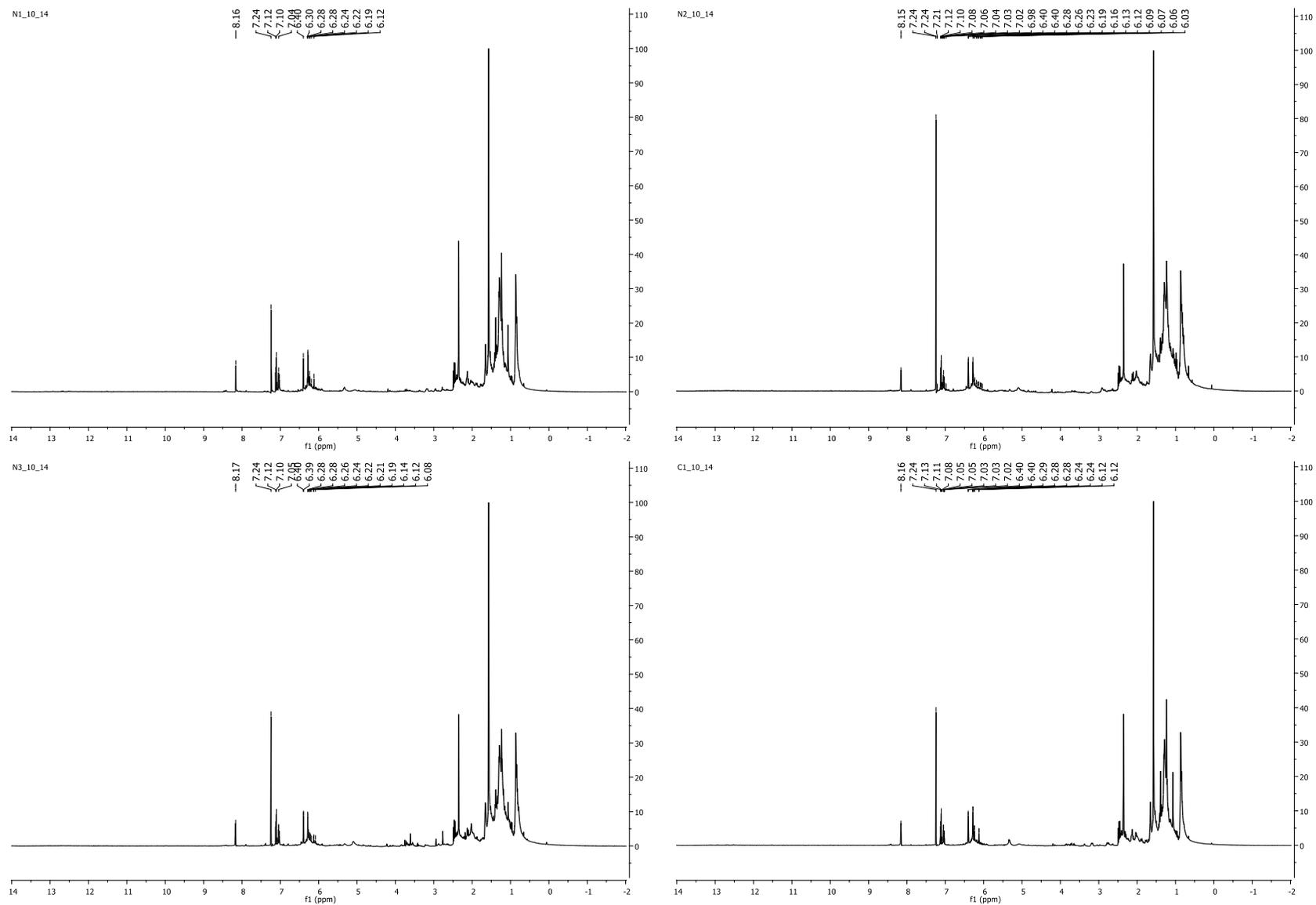


Figura A1.28. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos das amostras N1_10_14, N2_10_14, N3_10_14 e C1_10_14 em CDCl_3 .

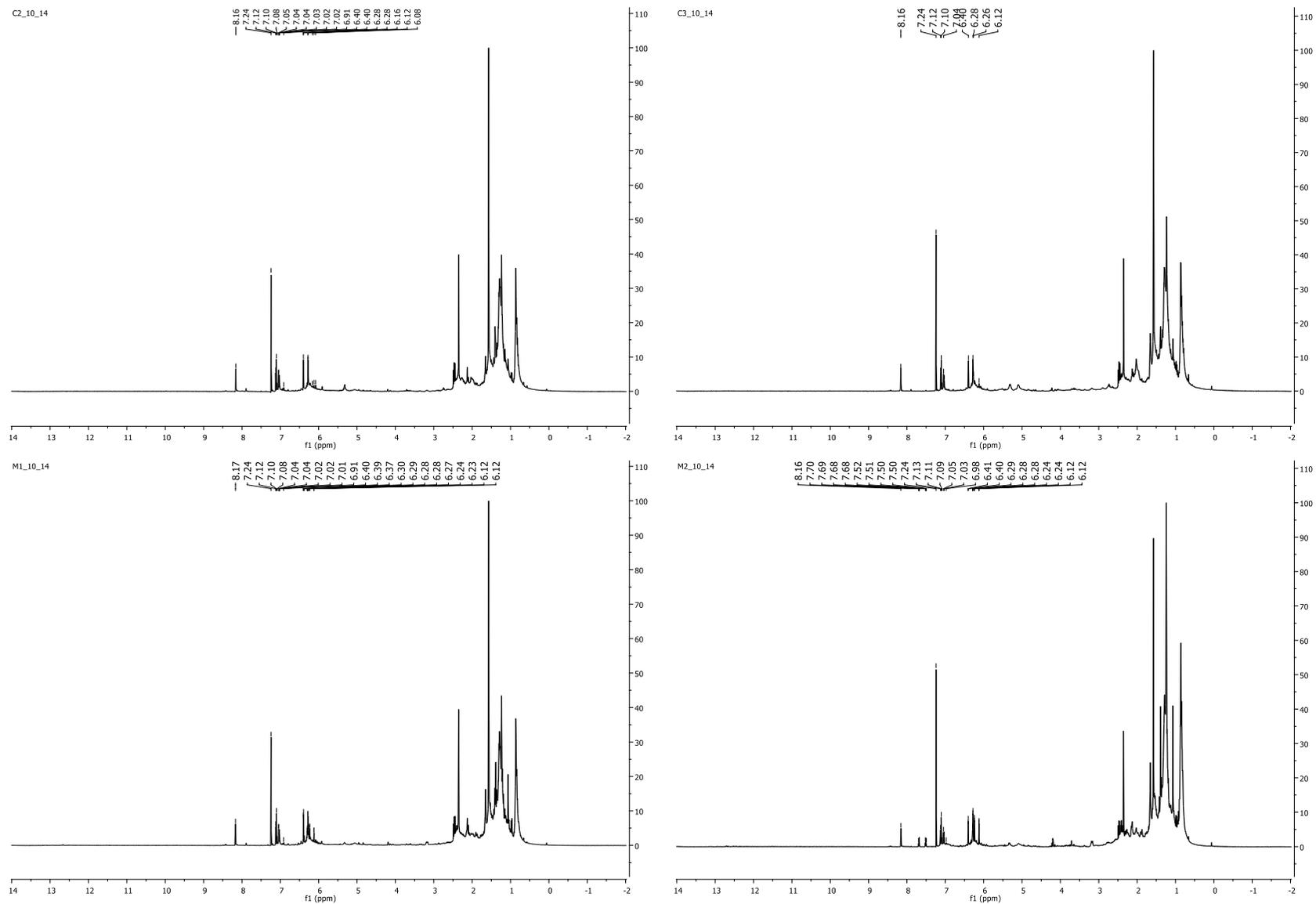


Figura A1.29. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos das amostras C2_10_14, C3_10_14, M1_10_14 e M2_10_14 em CDCl_3 .

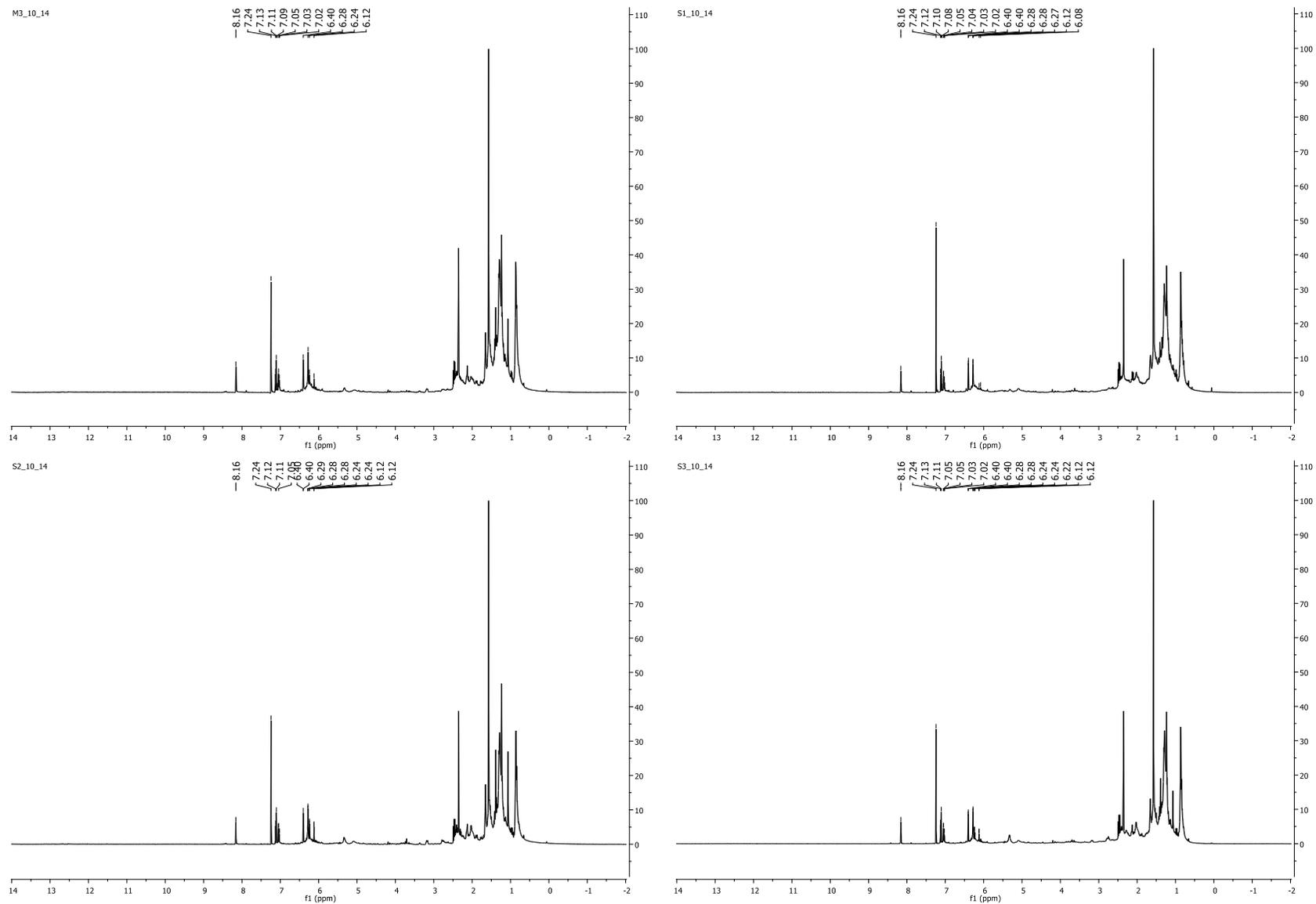


Figura A1.30. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos das amostras M3_10_14, S1_10_14, S2_10_14 e S3_10_14 em CDCl_3 .

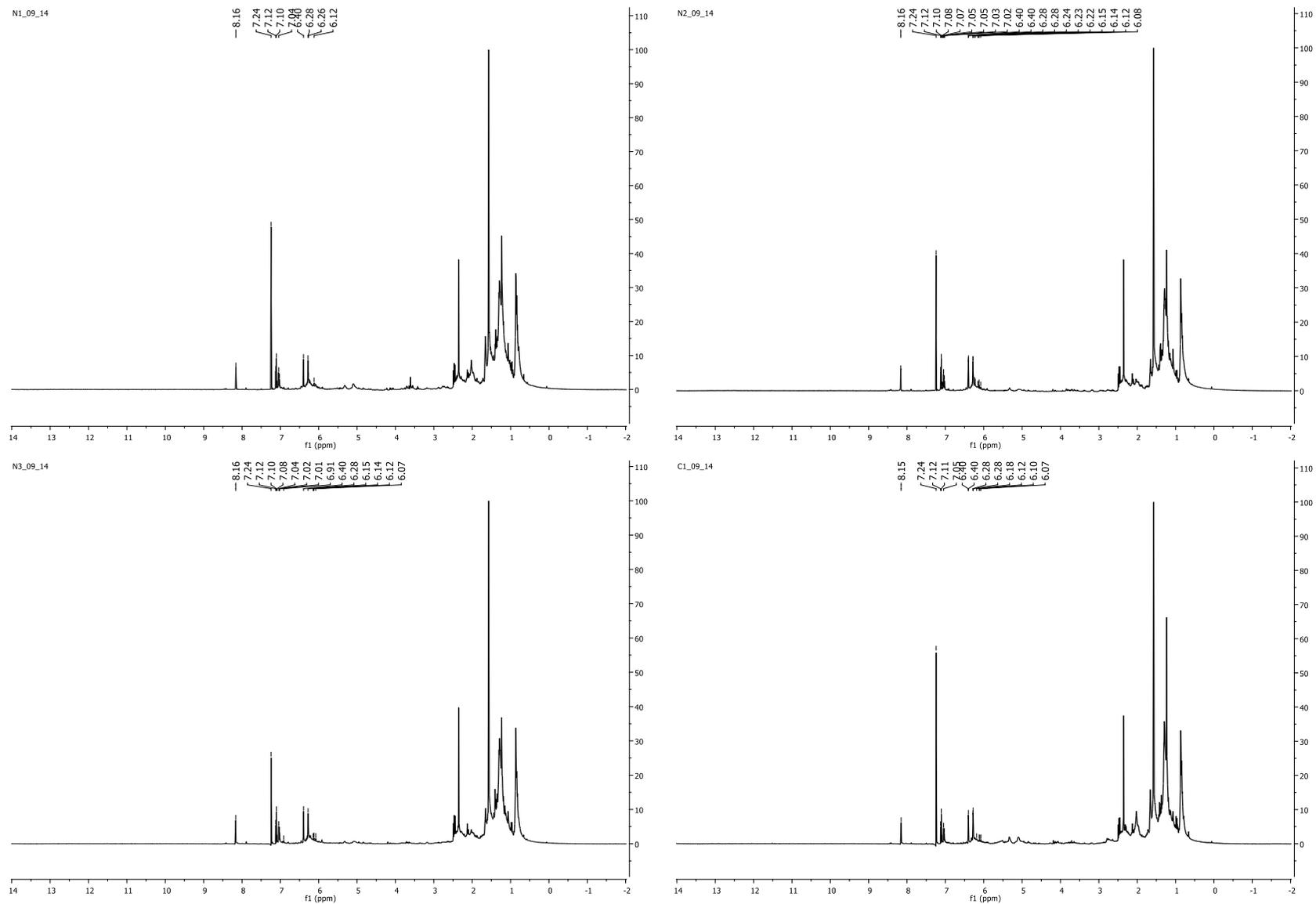


Figura A1.31. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos das amostras N1_09_14, N2_09_14, N3_09_14 e C1_09_14 em CDCl_3 .

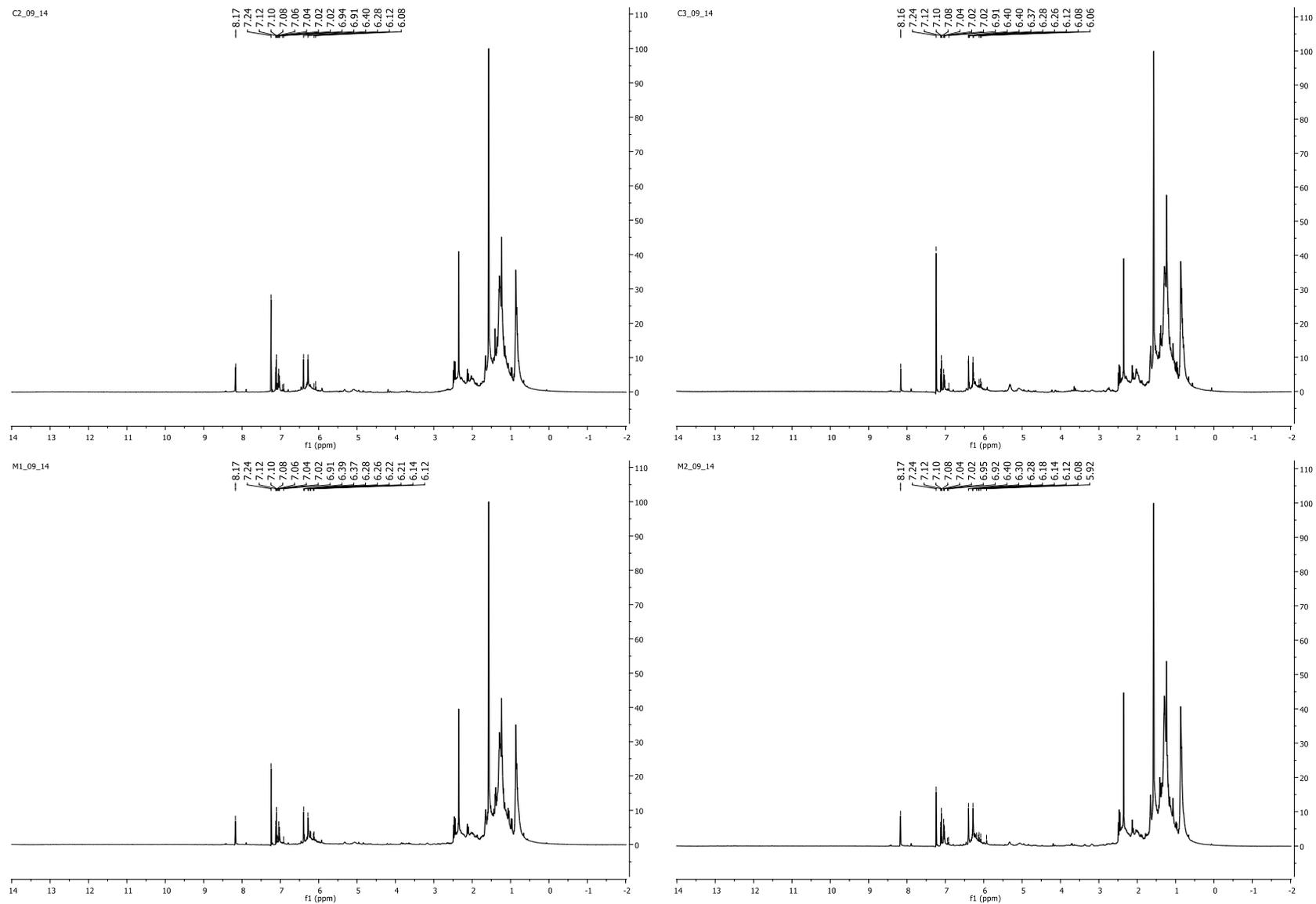


Figura A1.32. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos das amostras C2_09_14, C3_09_14, M1_09_14 e M2_09_14 em CDCl_3 .

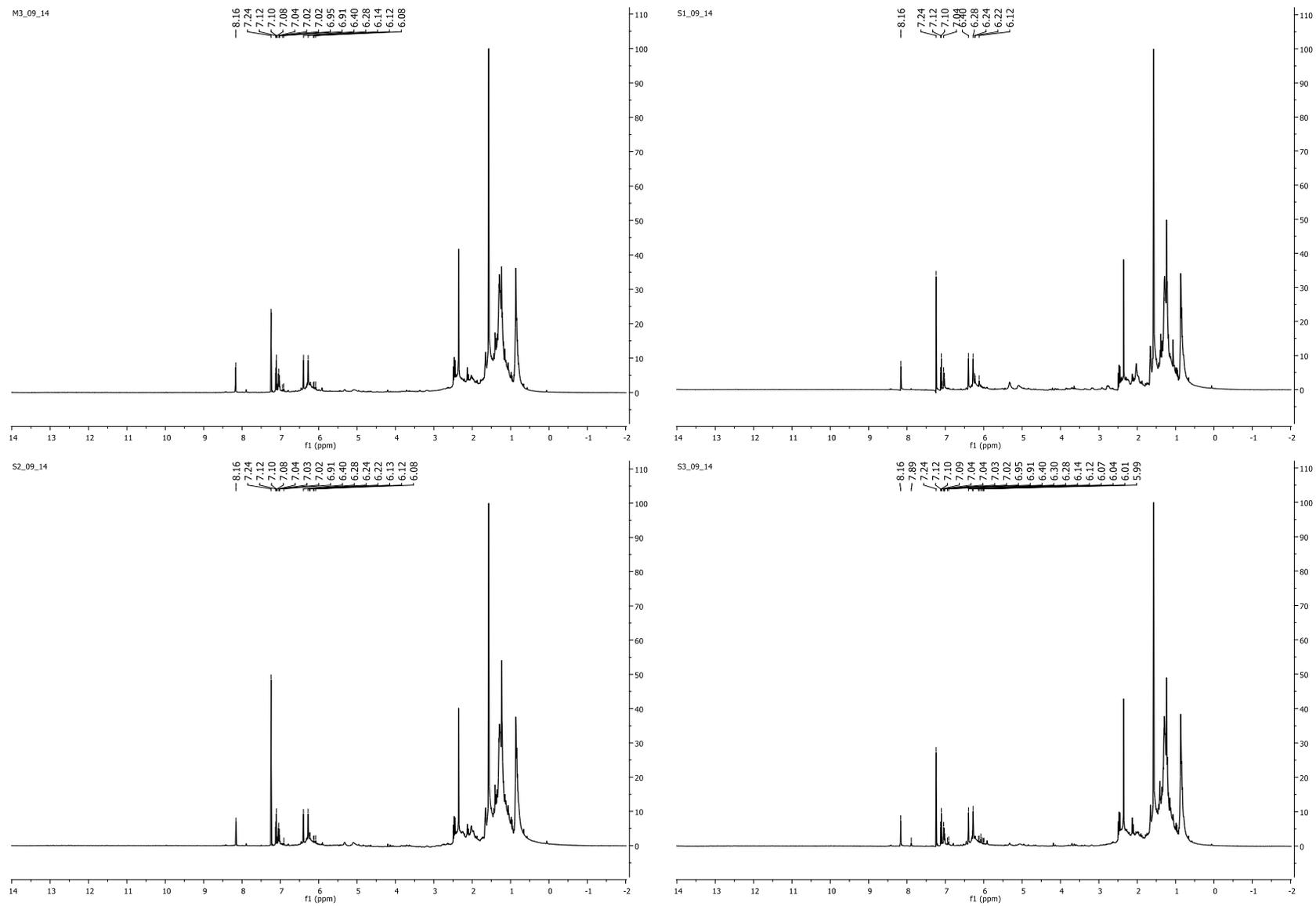


Figura A1.33. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos das amostras M3_09_14, S1_09_14, S2_09_14 e S3_09_14 em CDCl_3 .

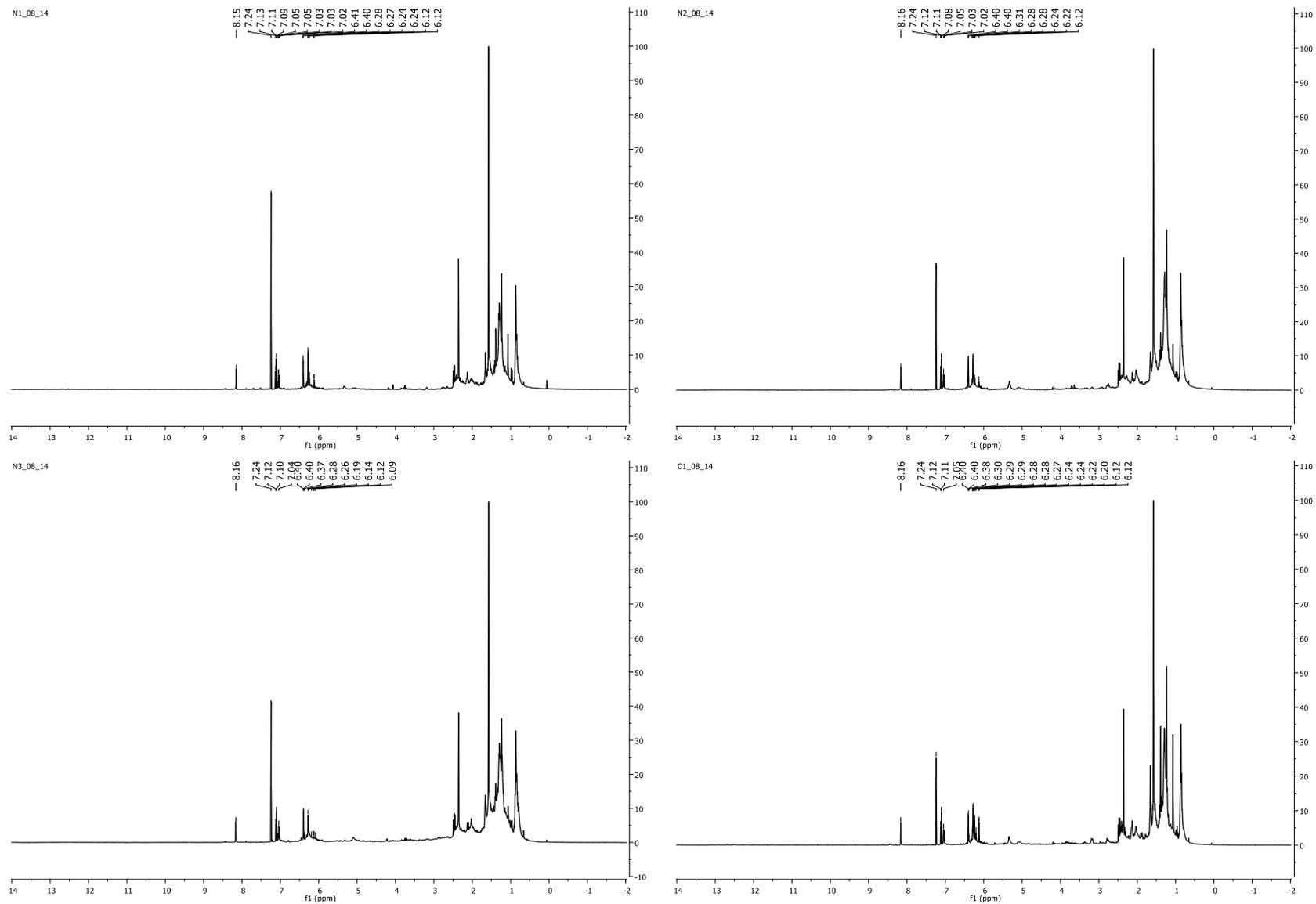


Figura A1.34. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos das amostras N1_08_14, N2_08_14, N3_08_14 e C1_08_14 em CDCl_3 .

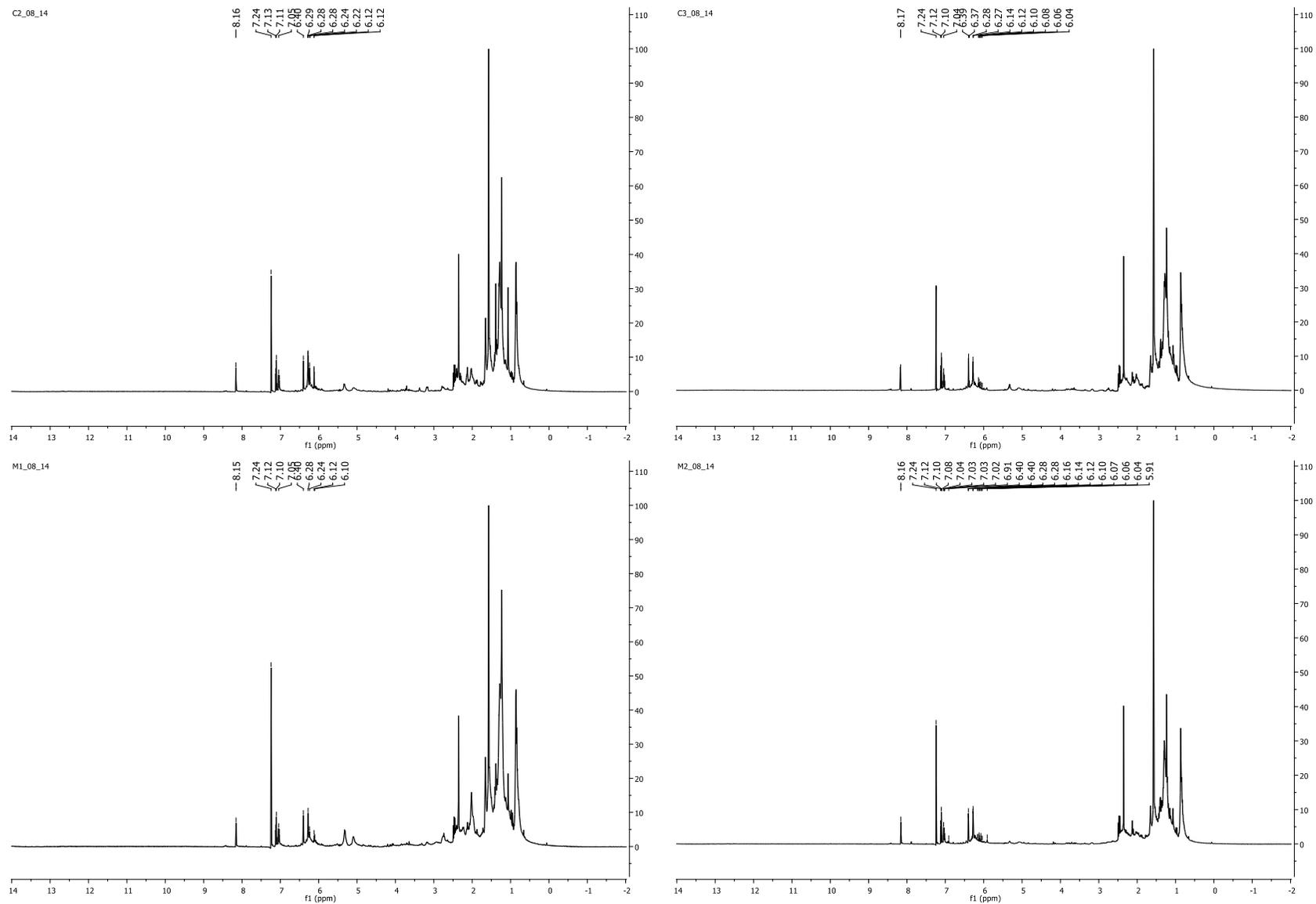


Figura A1.35. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos das amostras C2_08_14, C3_08_14, M1_08_14 e M2_08_14 em CDCl_3 .

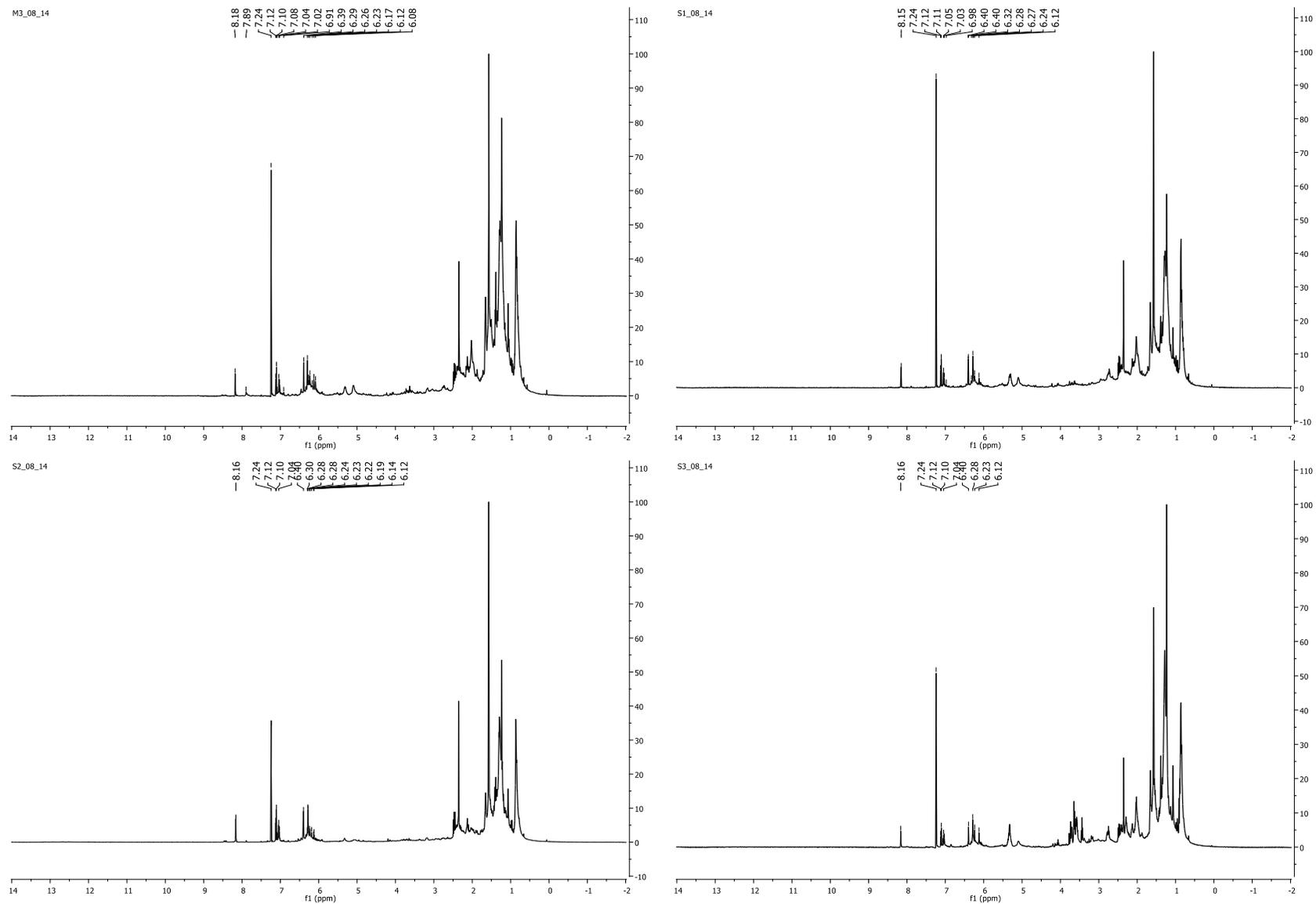


Figura A1.36. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos das amostras M3_08_14, S1_08_14, S2_08_14 e S3_08_14 em CDCl_3 .

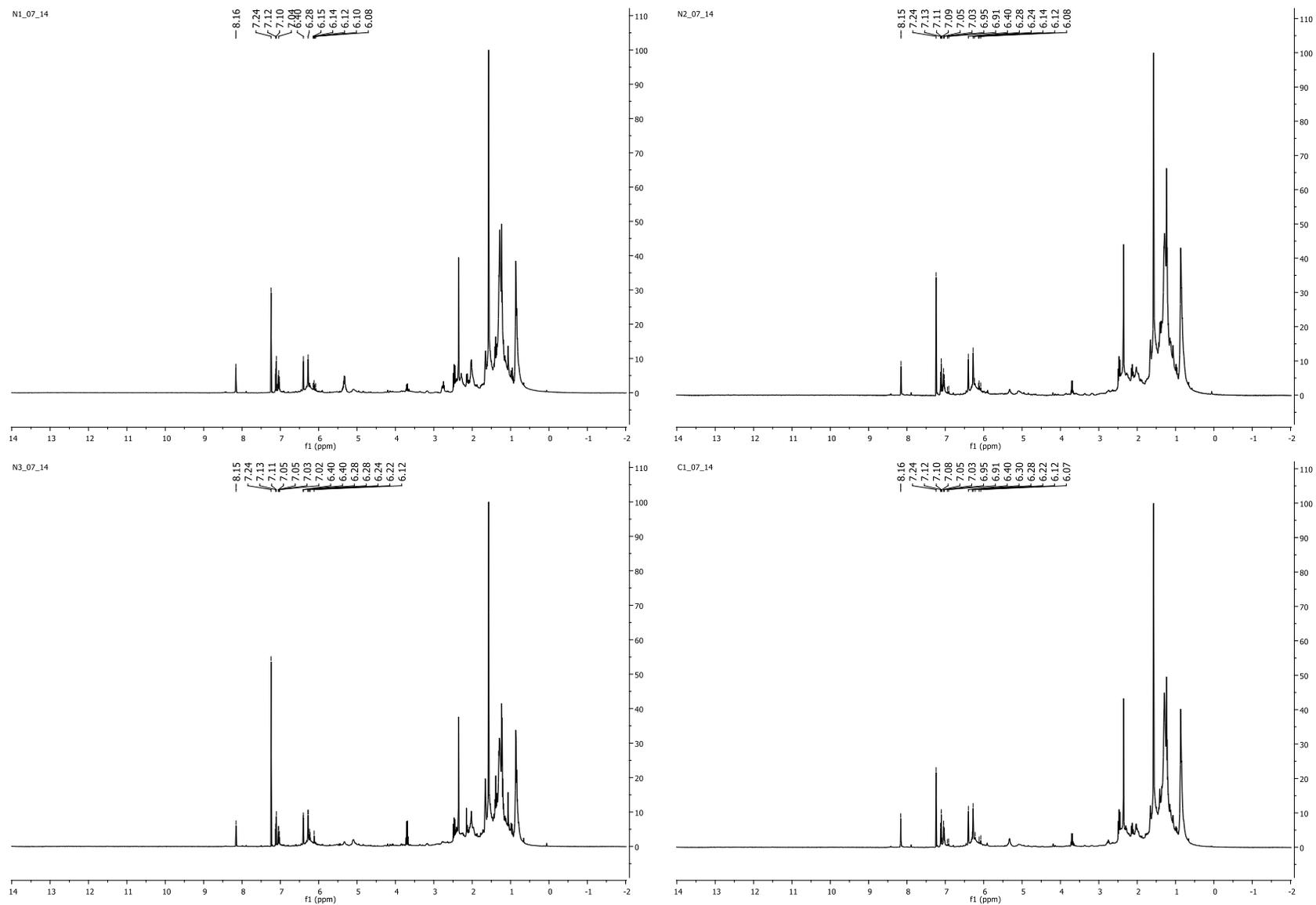


Figura A1.37. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos das amostras N1_07_14, N2_07_14, N3_07_14 e C1_07_14 em CDCl_3 .

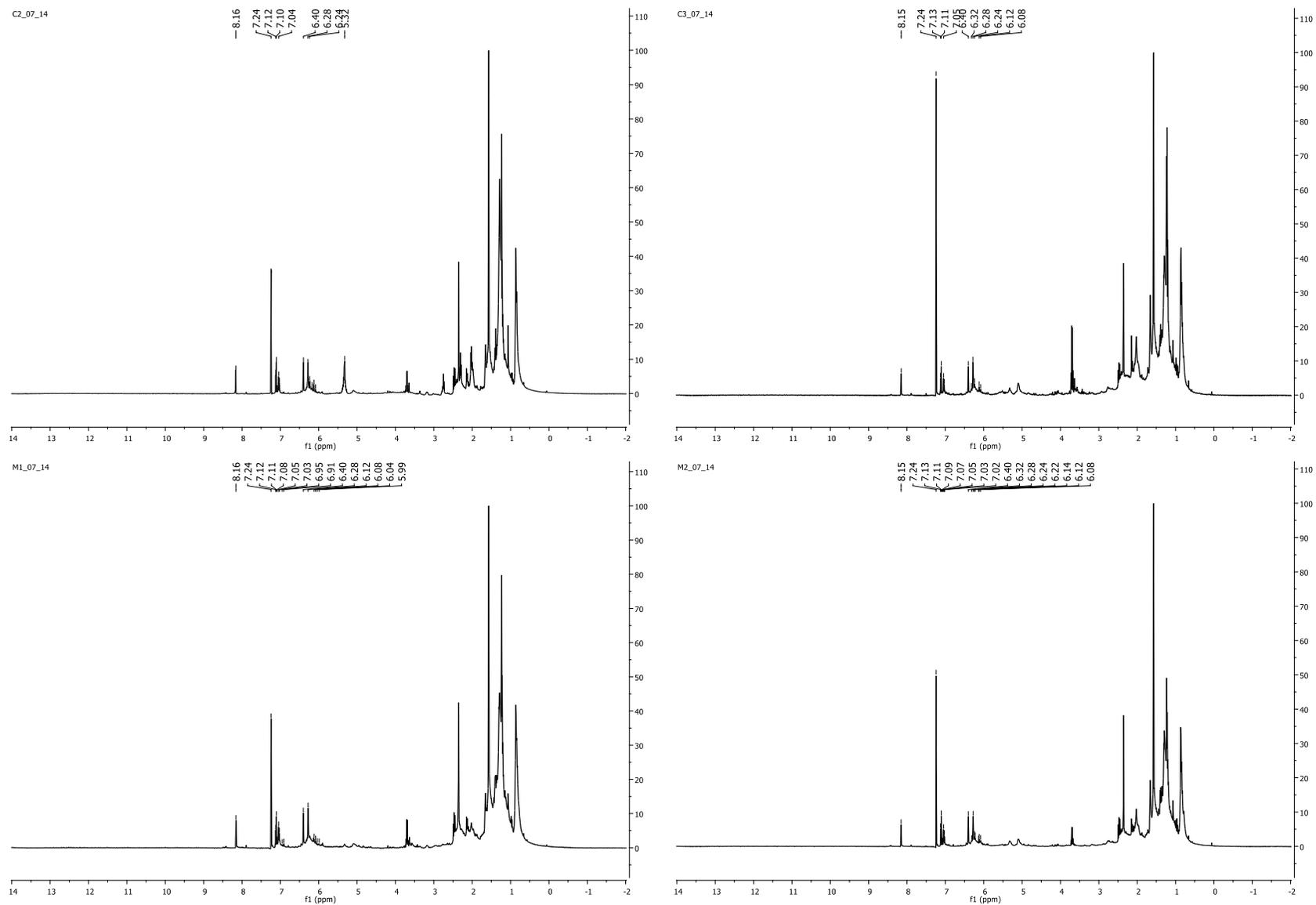


Figura A1.38. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos das amostras C2_07_14, C3_07_14, M1_07_14 e M2_07_14 em CDCl_3 .

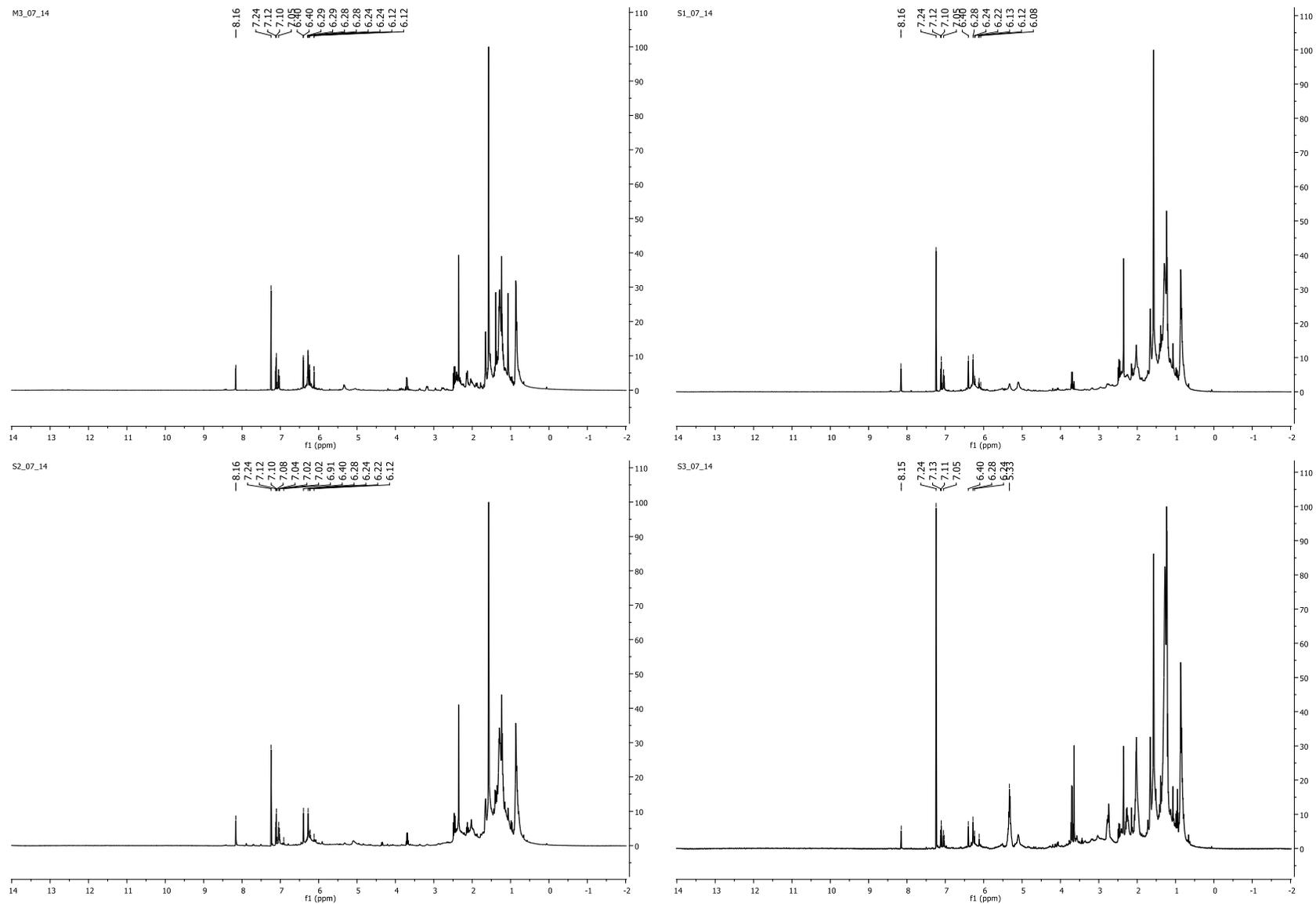
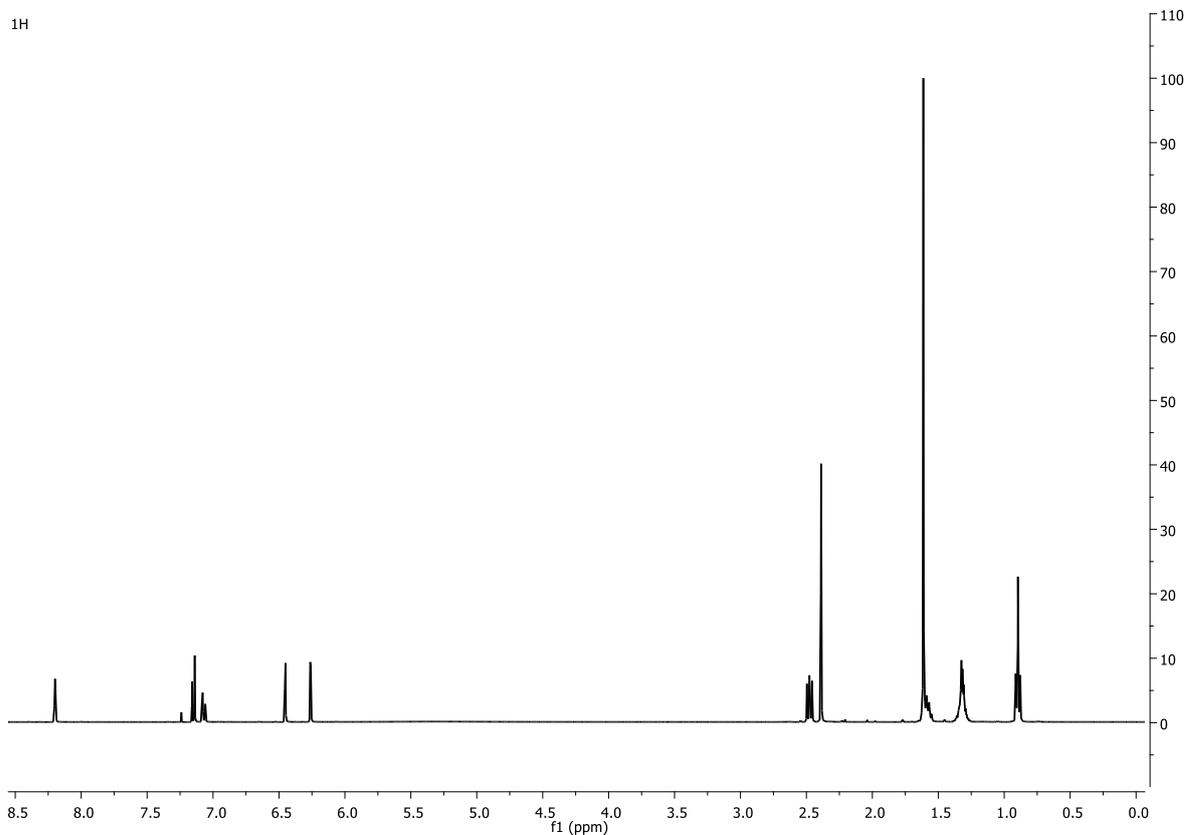
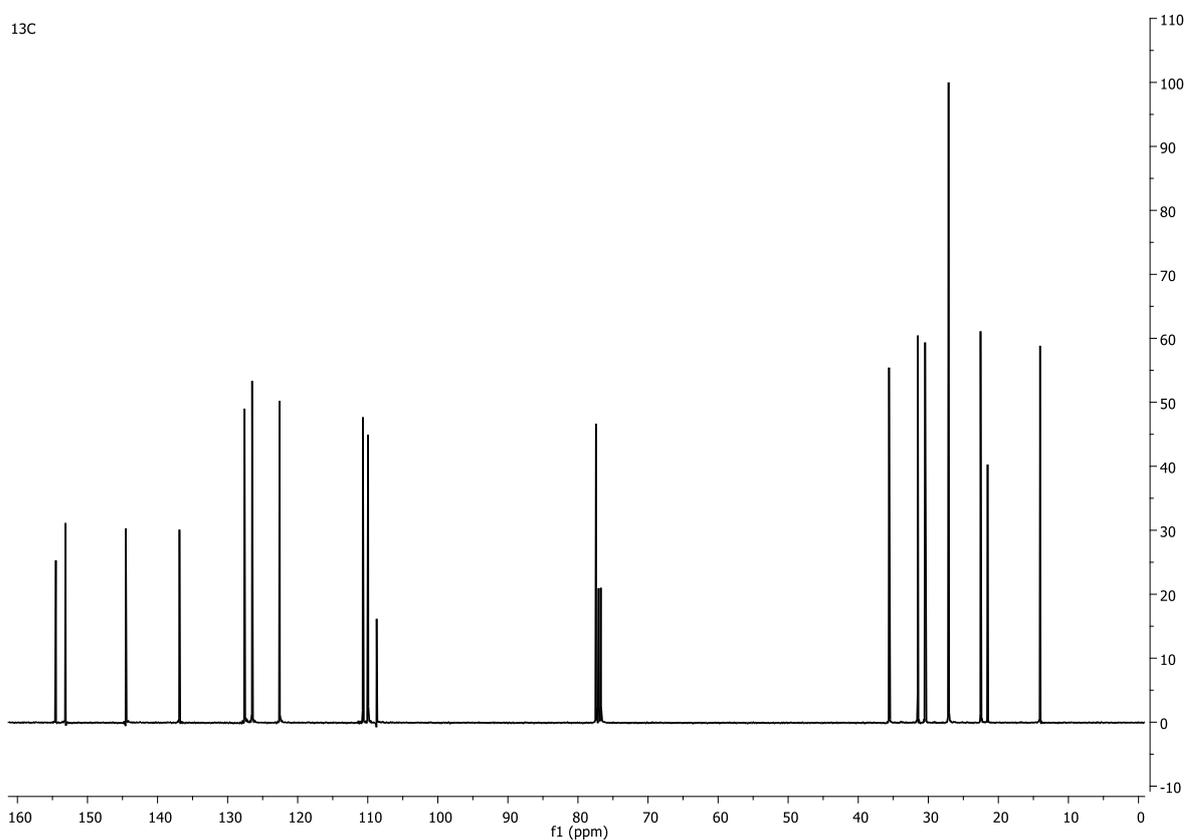


Figura A1.39. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos das amostras M3_07_14, S1_07_14, S2_07_14 e S3_07_14 em CDCl_3 .

ANEXO 2

**Figura A2.1.** Espectro de RMN de ¹H da banda 5 (CBN).**Figura A2.2.** Espectro de RMN de ¹³C da banda 5 (CBN).

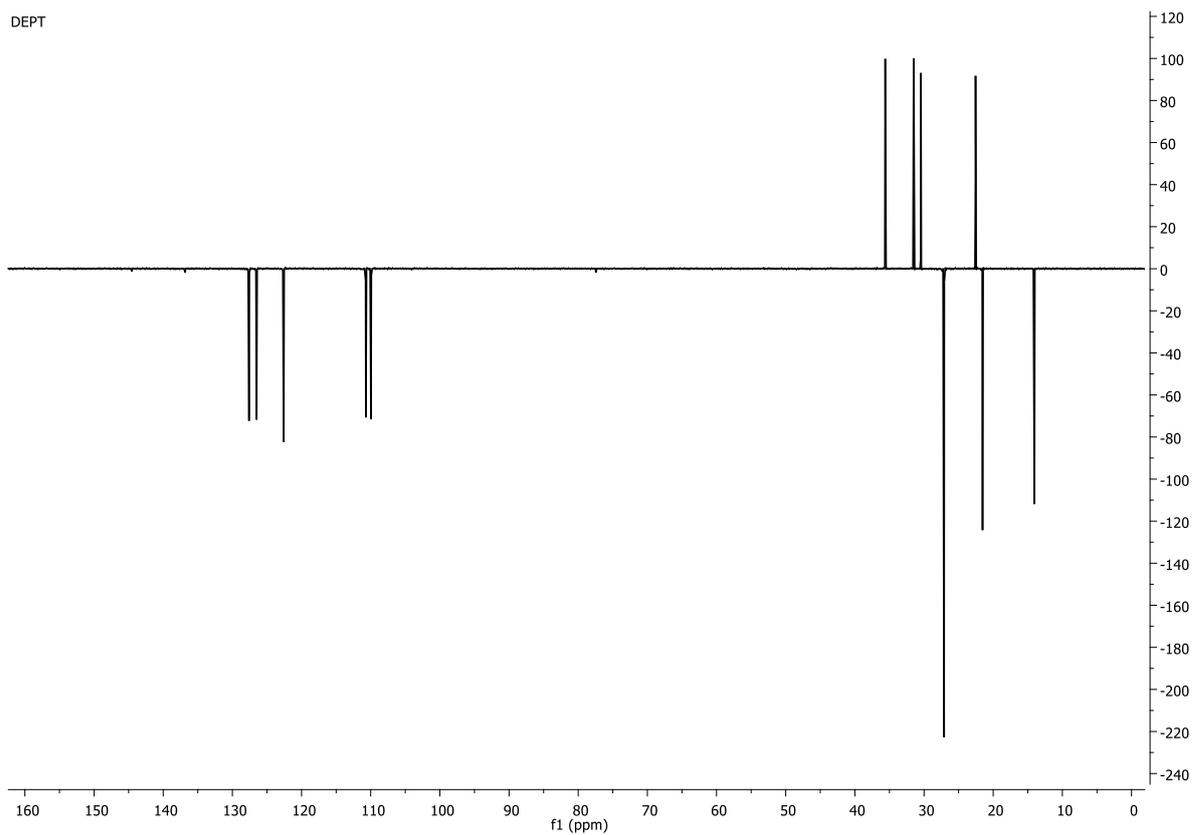


Figura A2.3. DEPT da banda 5 (CBN).

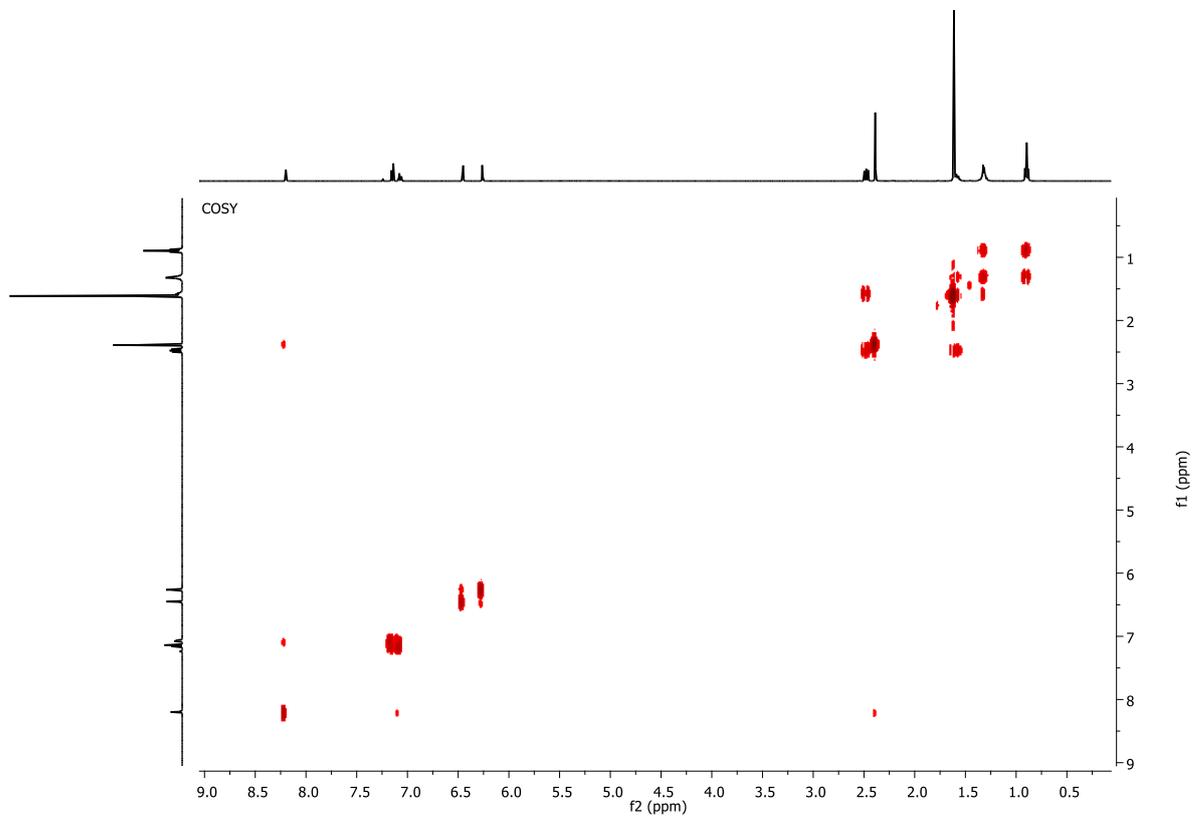


Figura A2.4. COSY da banda 5 (CBN).

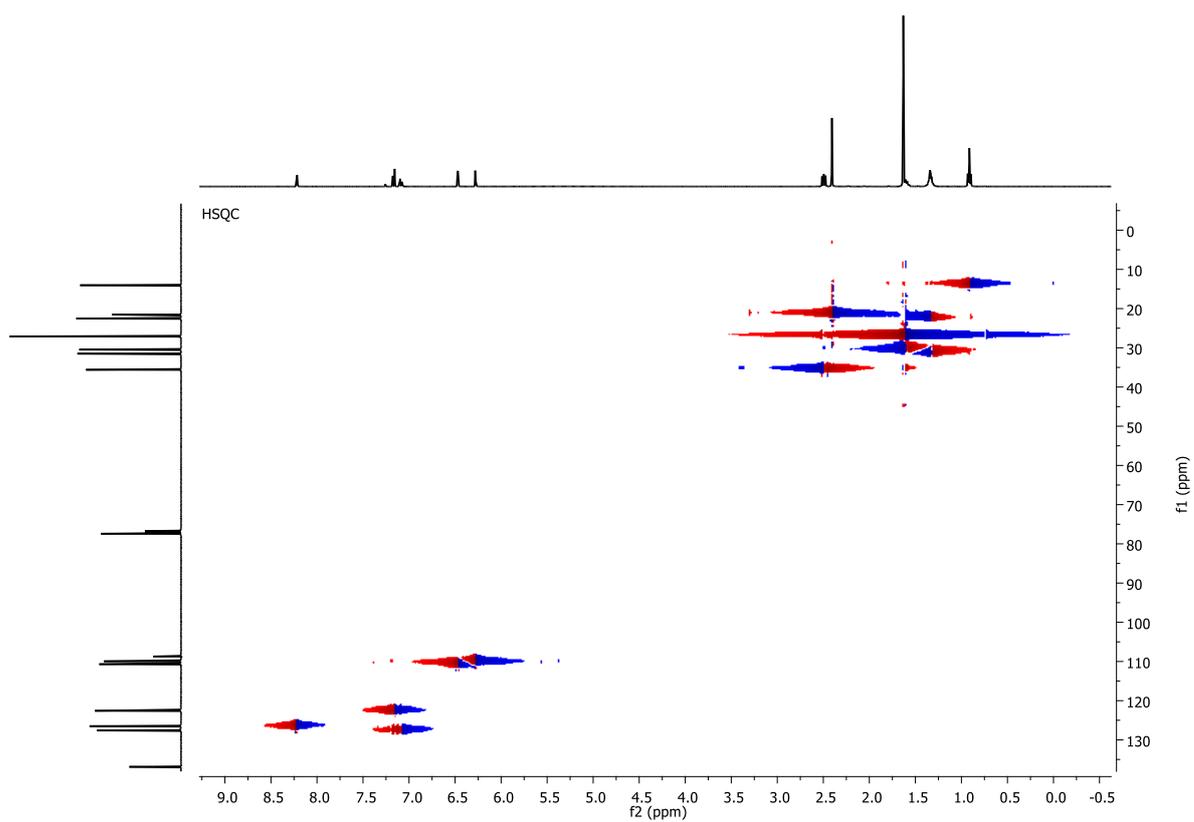


Figura A2.5. HSQC da banda 5 (CBN).

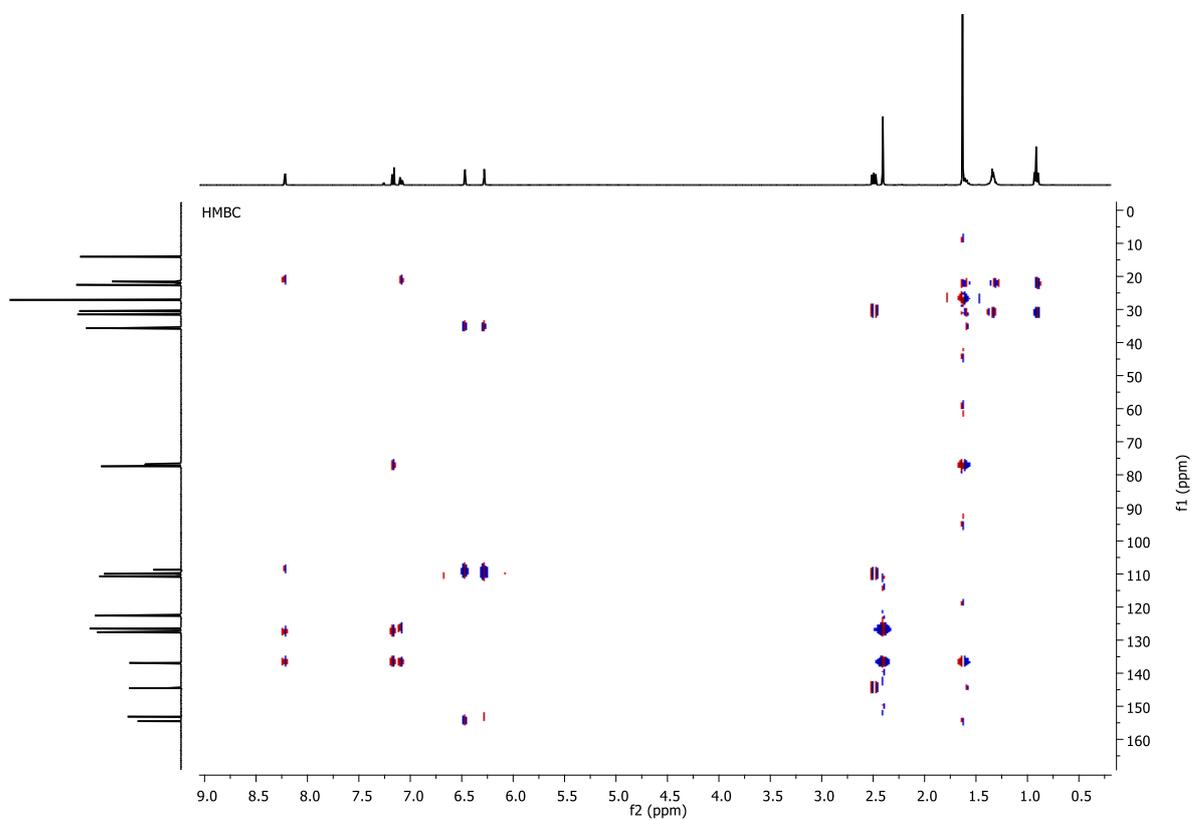


Figura A2.6. HMBC da banda 5 (CBN).

ANEXO 3

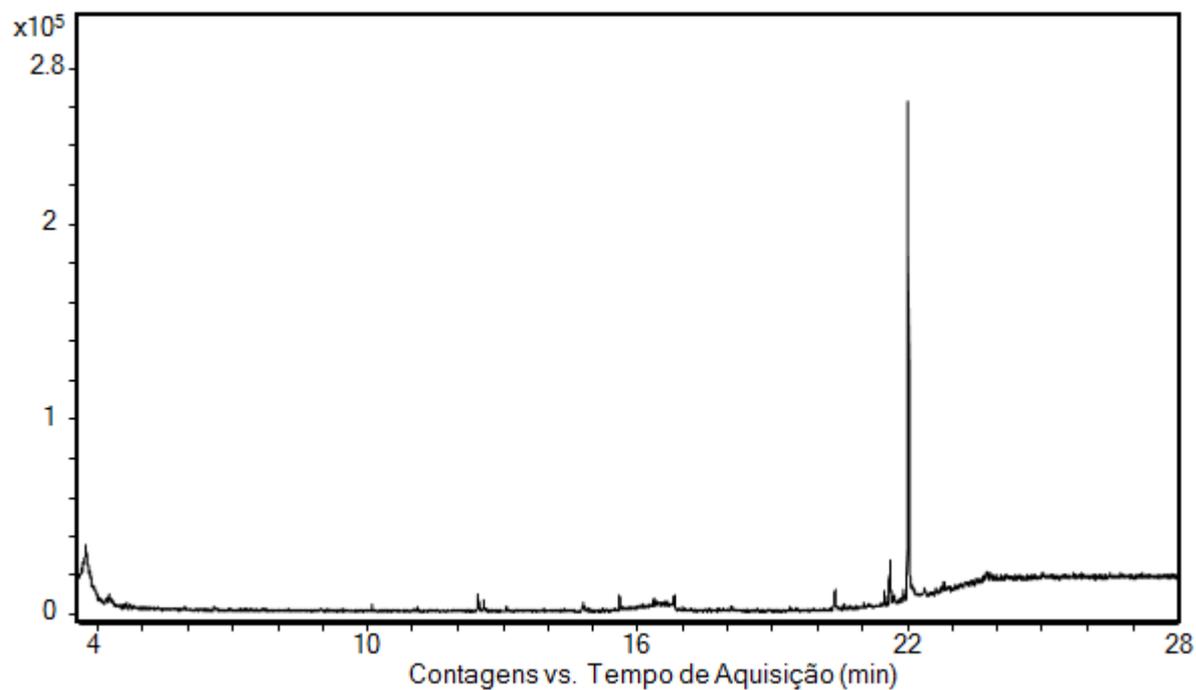


Figura A3.1. Cromatograma gasoso da fração denominada "Frações 1-5".

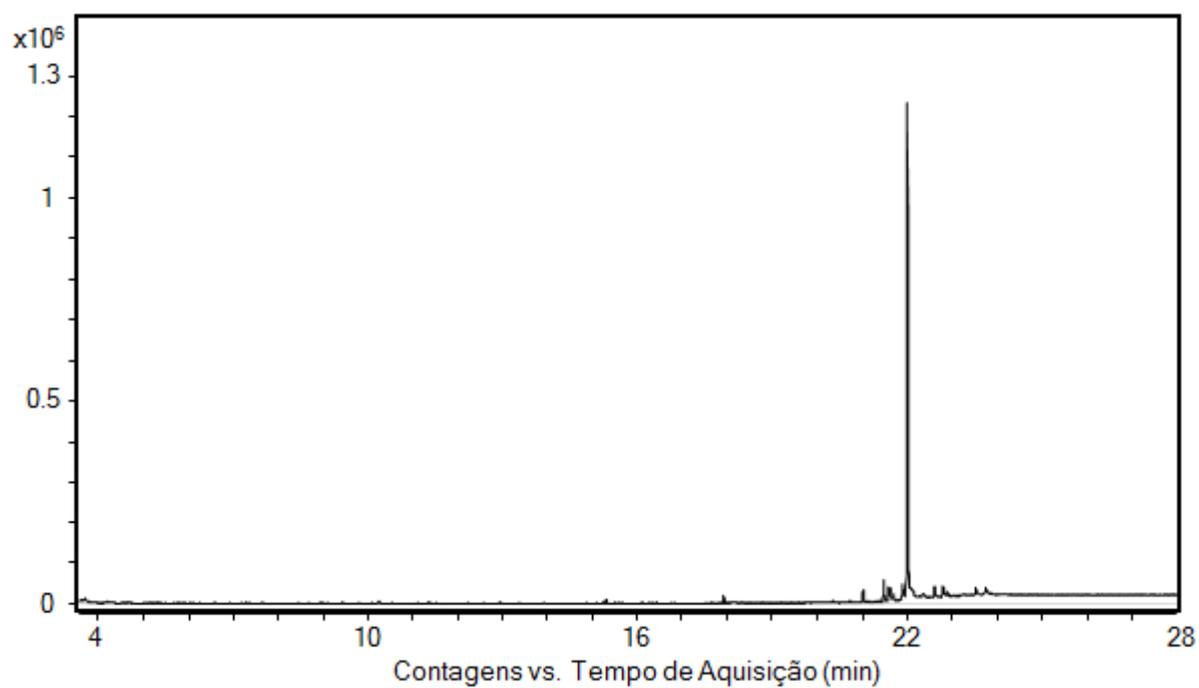


Figura A3.2. Cromatograma gasoso da fração denominada "Frações 6-11".

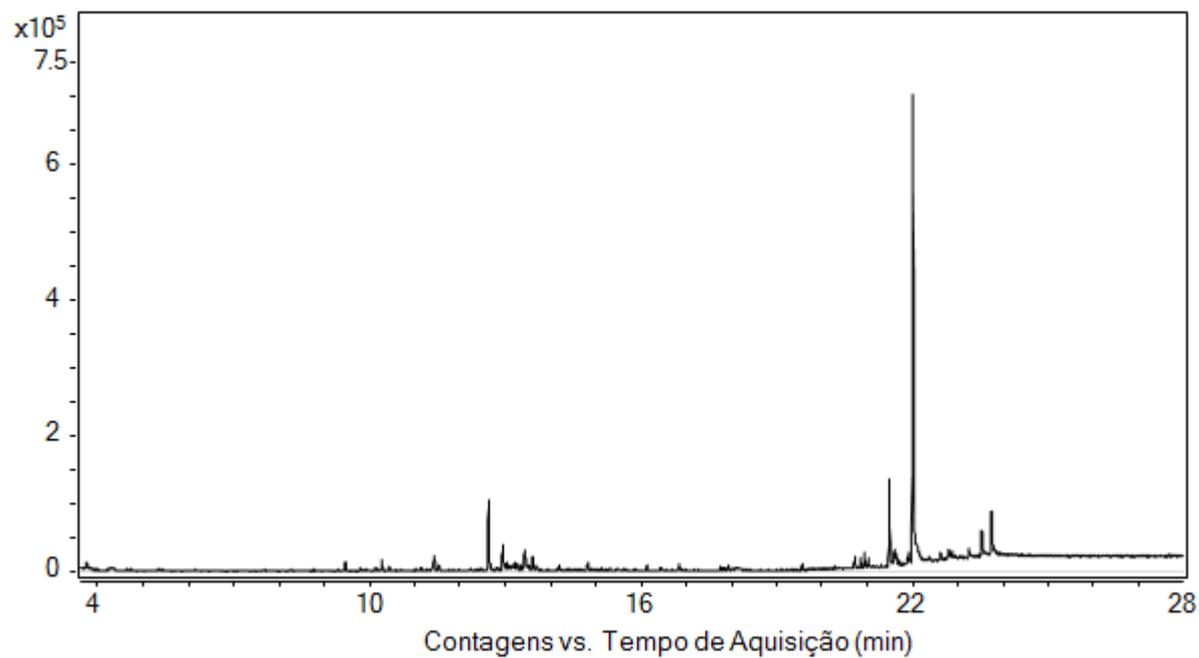


Figura A3.3. Cromatograma gasoso da fração denominada "Frações 12-18".

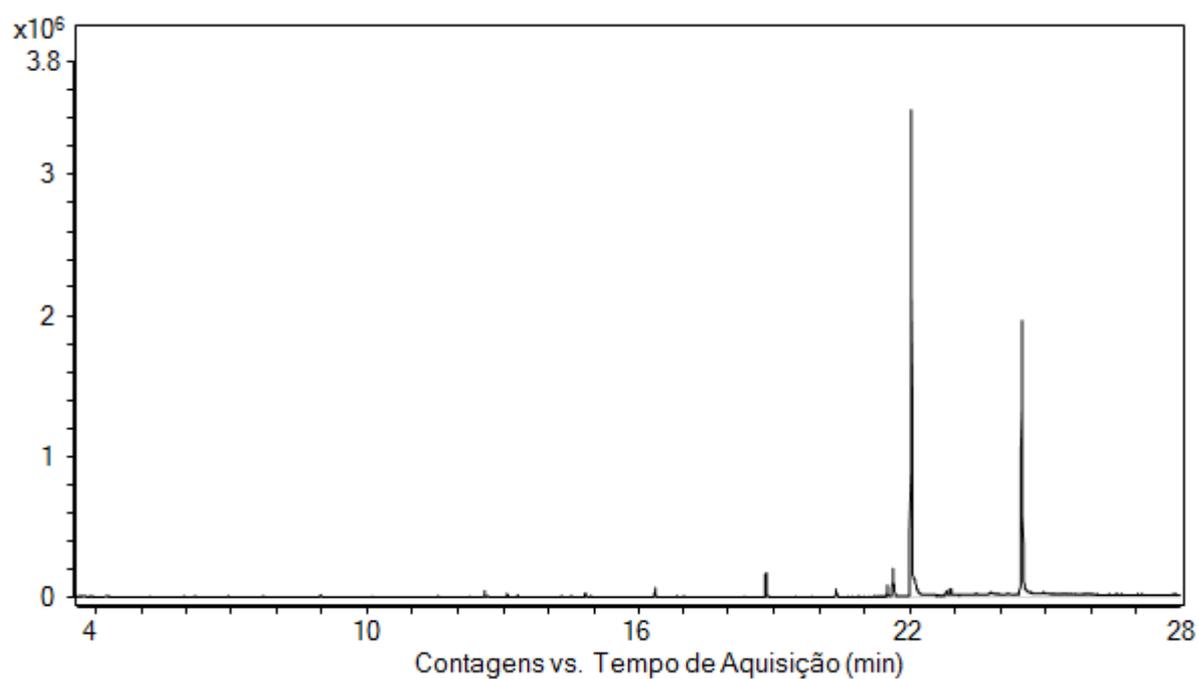


Figura A3.4. Cromatograma gasoso da fração denominada "Frações 25-31".

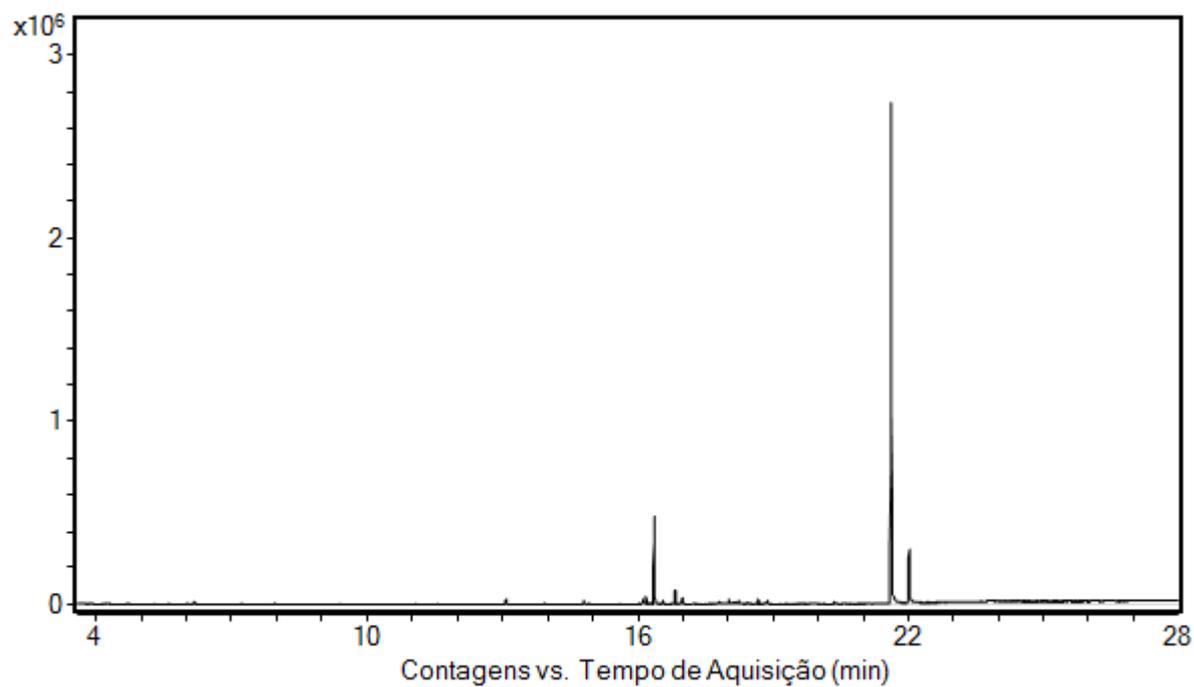


Figura A3.5. Cromatograma gasoso da fração denominada “Frações 32-40”.

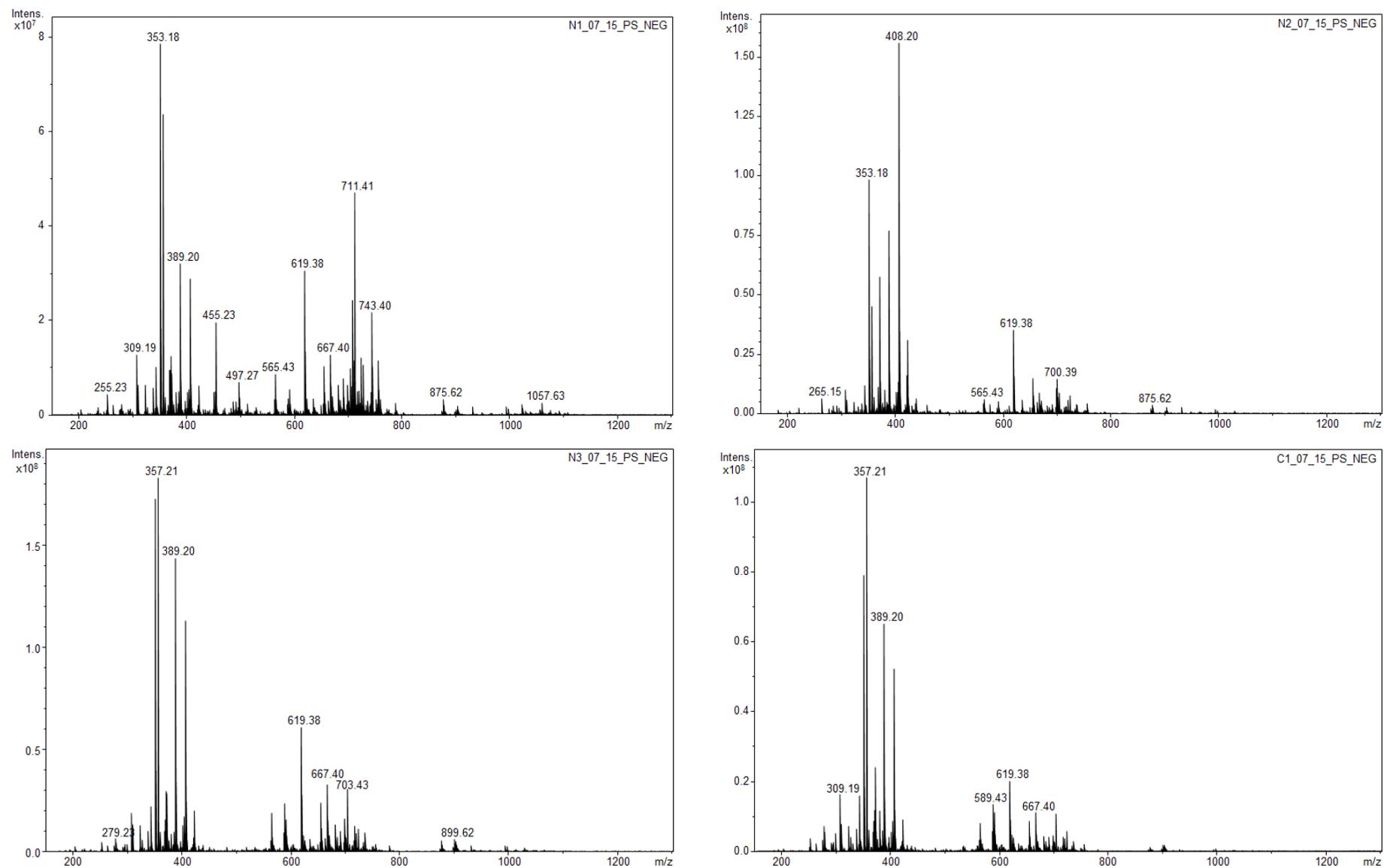


Figura A4.1. Espectros de massas dos extratos brutos das amostras N1_07_15, N2_07_15, N3_07_15 e C1_07_15.

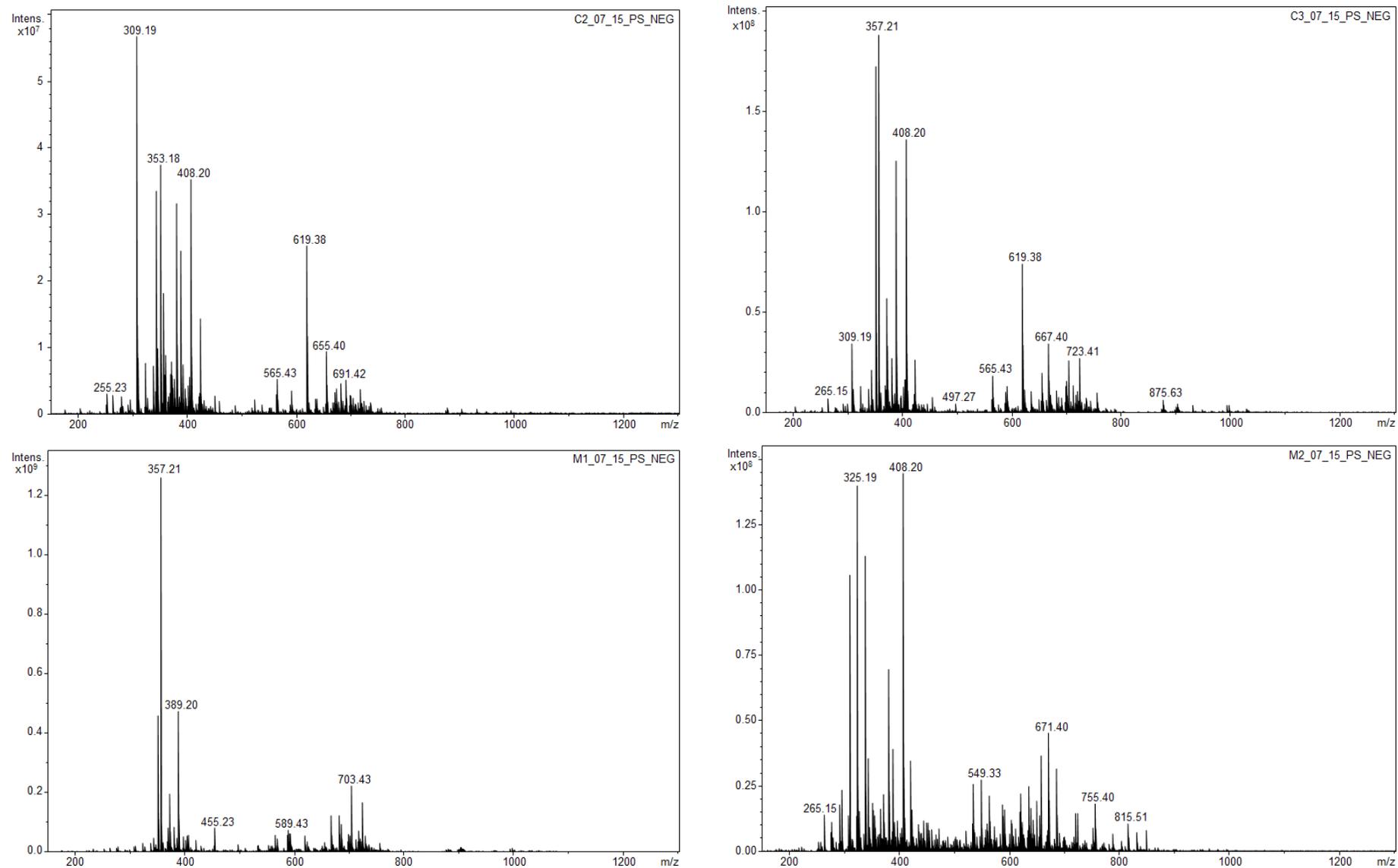


Figura A4.2. Espectros de massas dos extratos brutos das amostras C2_07_15, C3_07_15, M1_07_15 e M2_07_15.

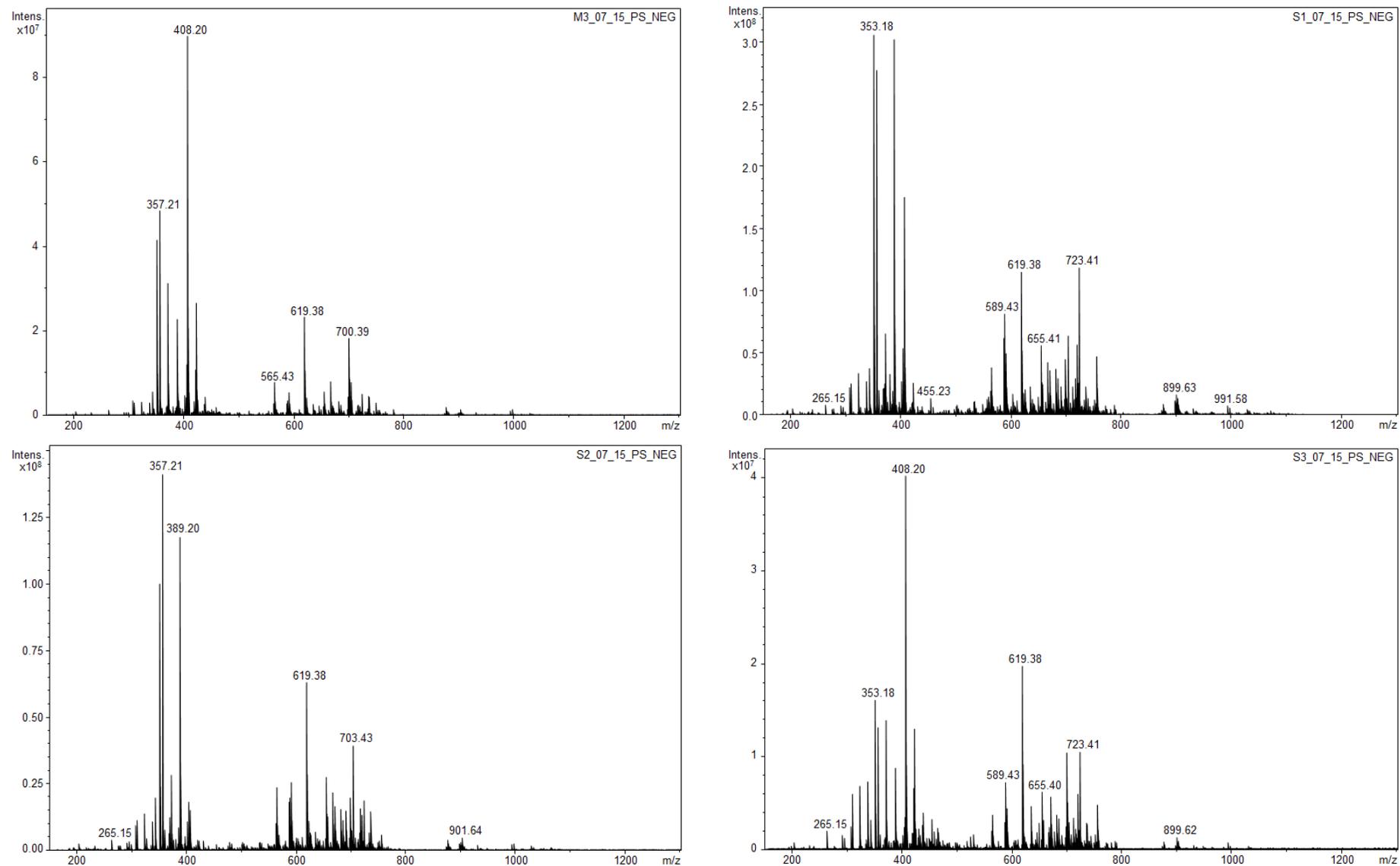


Figura A4.3. Espectros de massas dos extratos brutos das amostras M3_07_15, S1_07_15, S2_07_15 e S3_07_15.

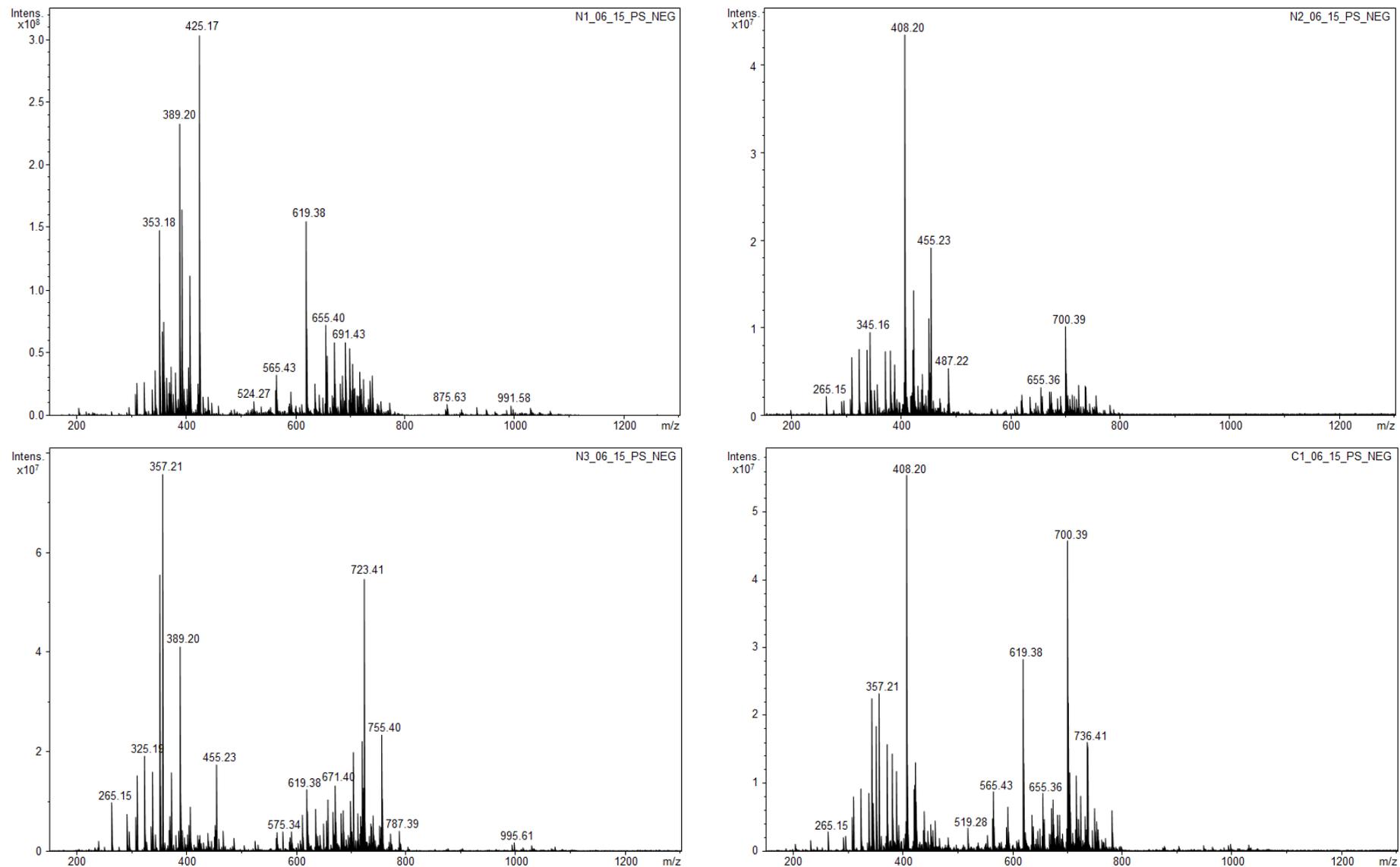


Figura A4.4. Espectros de massas dos extratos brutos das amostras N1_06_15, N2_06_15, N3_06_15 e C1_06_15.

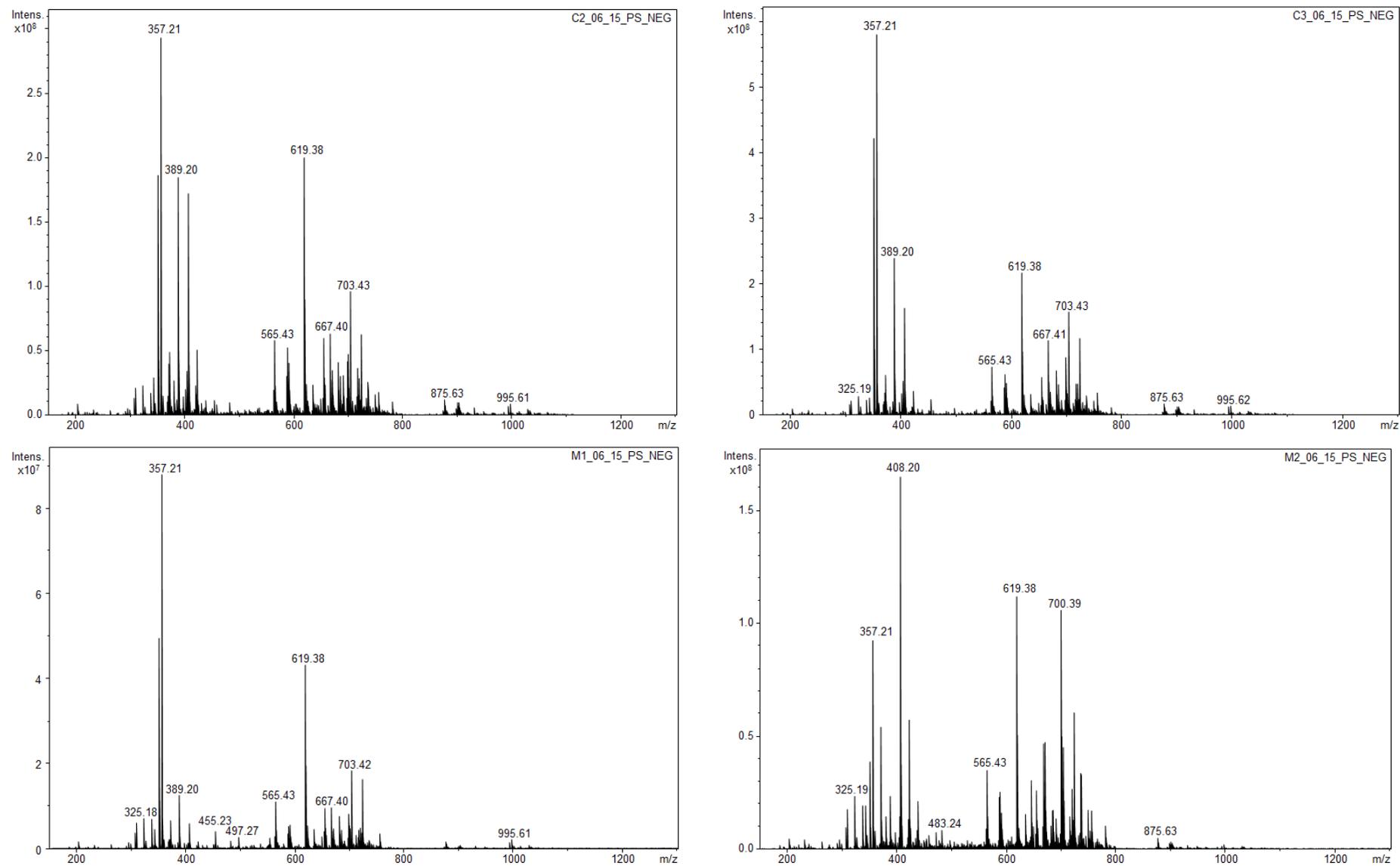


Figura A4.5. Espectros de massas dos extratos brutos das amostras C2_06_15, C3_06_15, M1_06_15 e M2_06_15.

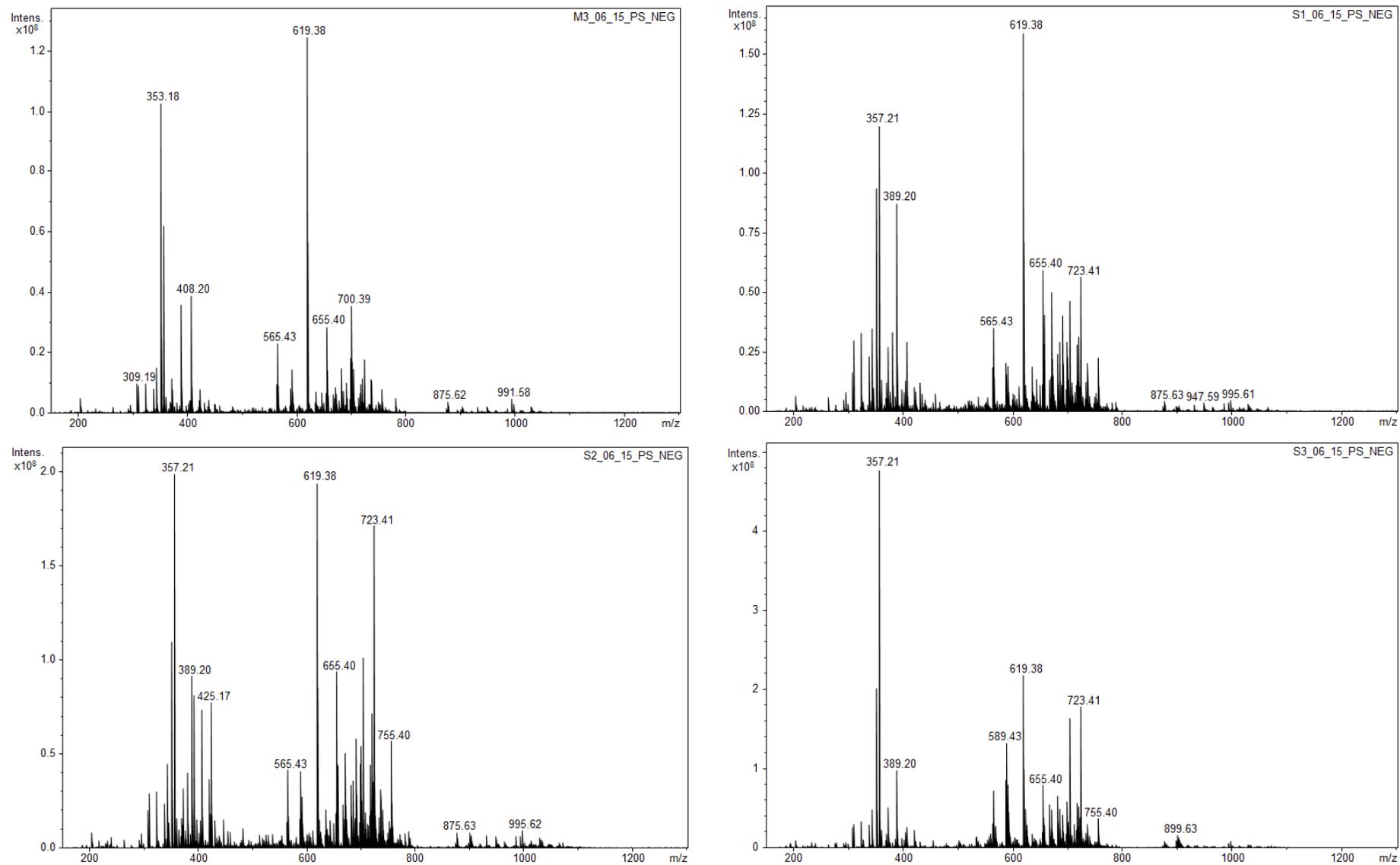


Figura A4.6. Espectros de massas dos extratos brutos das amostras M3_06_15, S1_06_15, S2_06_15 e S3_06_15.

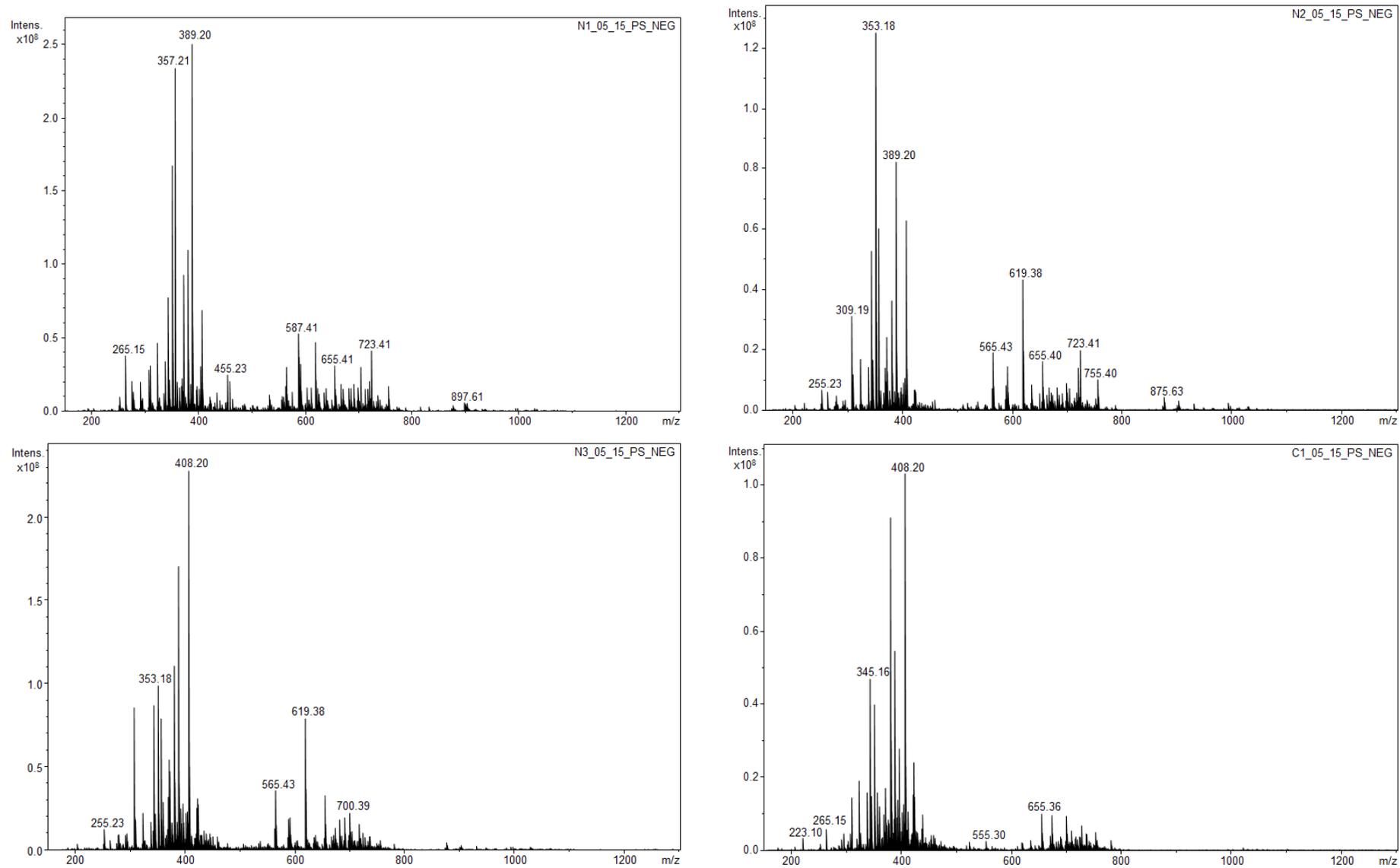


Figura A4.7. Espectros de massas dos extratos brutos das amostras N1_05_15, N2_05_15, N3_05_15 e C1_05_15.

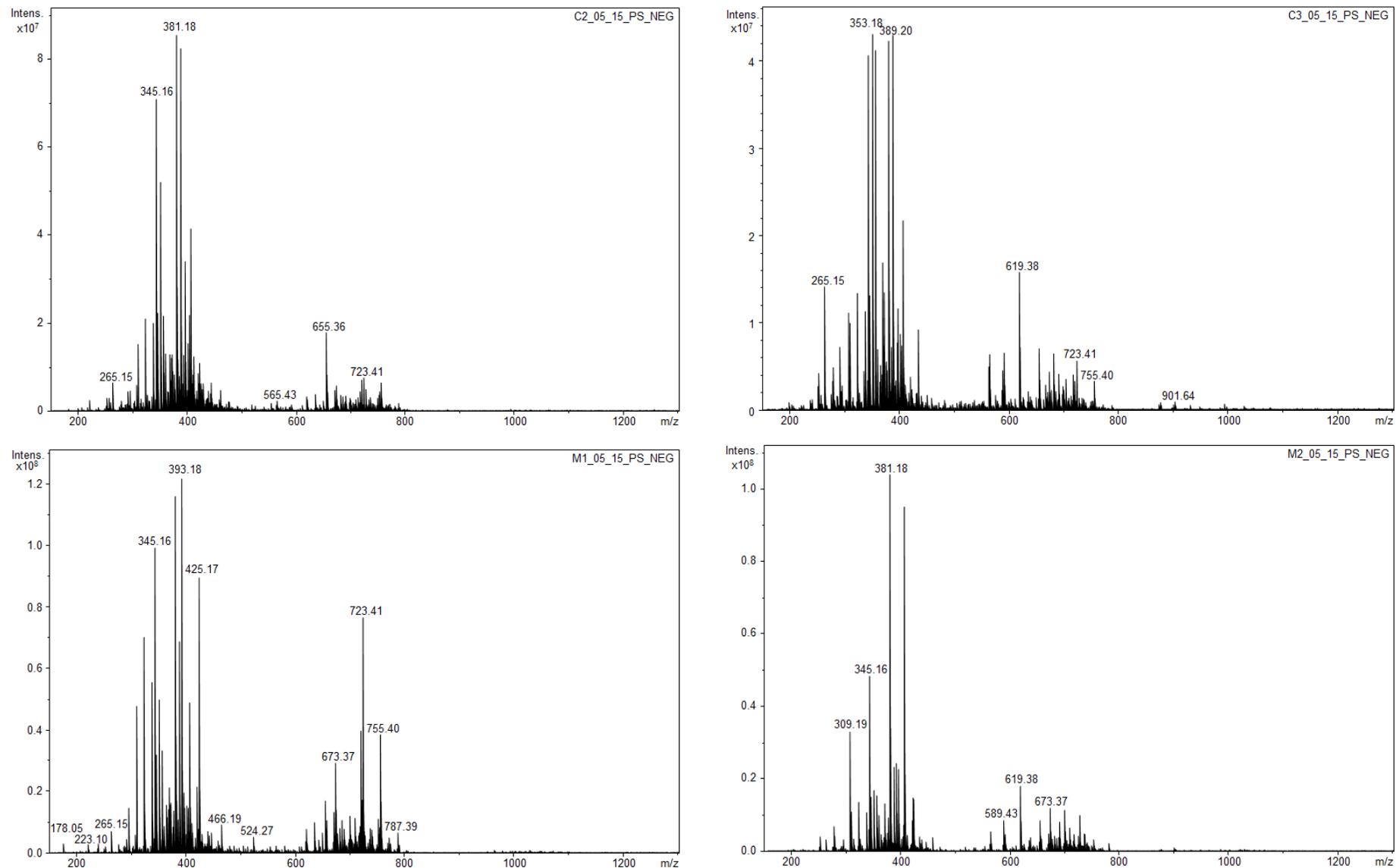


Figura A4.8. Espectros de massas dos extratos brutos das amostras C2_05_15, C3_05_15, M1_05_15 e M2_05_15.

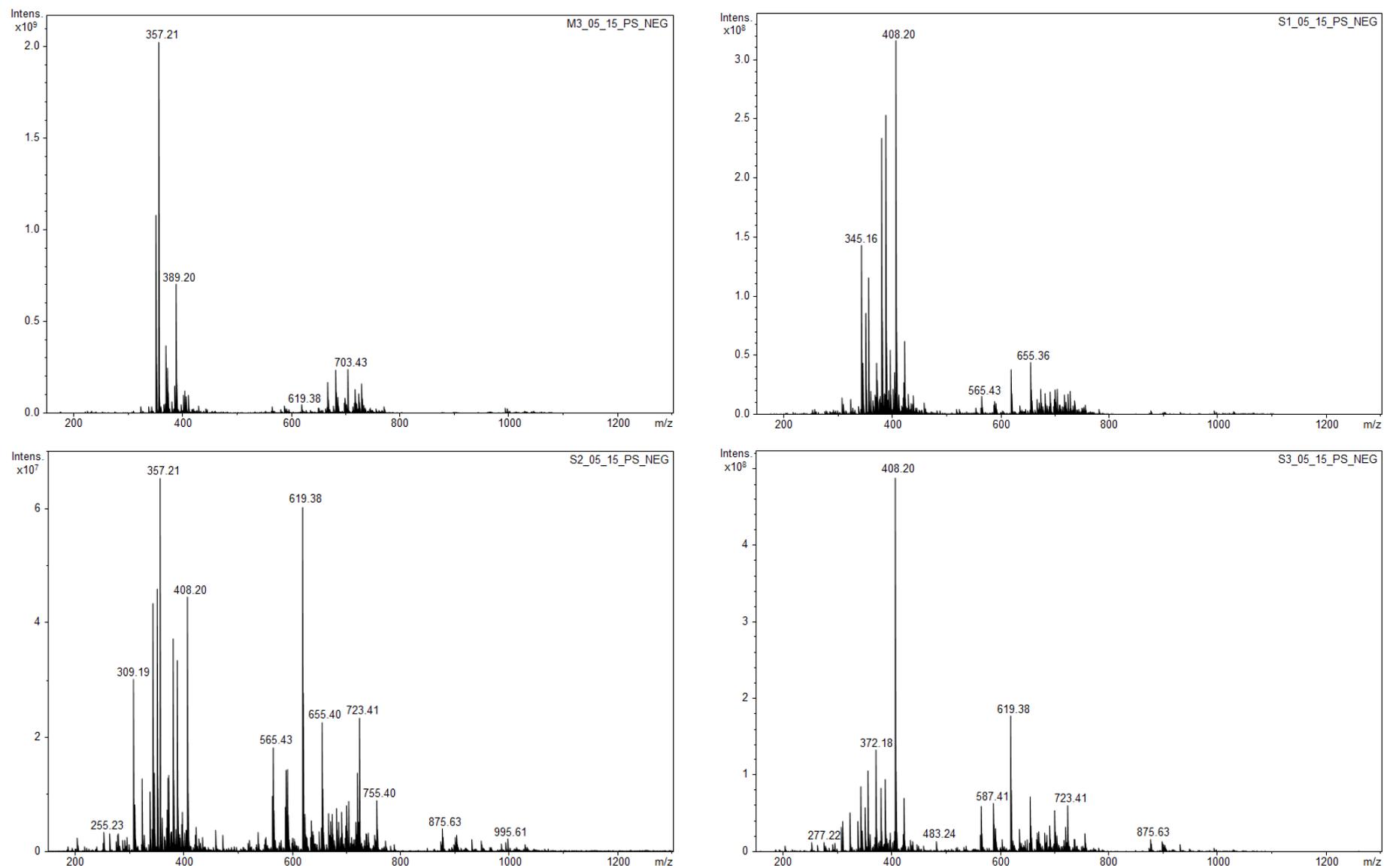


Figura A4.9. Espectros de massas dos extratos brutos das amostras M3_05_15, S1_05_15, S2_05_15 e S3_05_15.

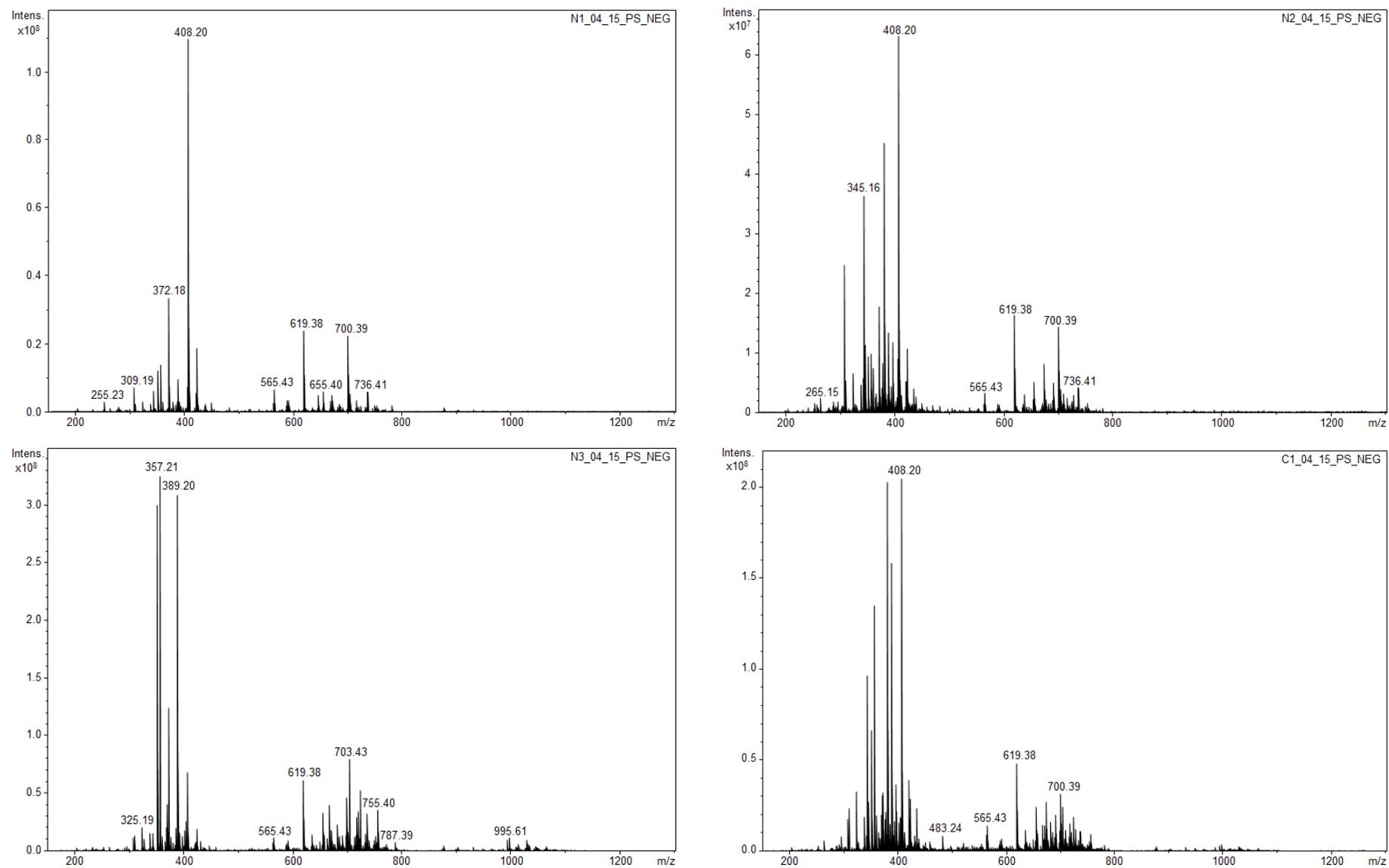


Figura A4.10. Espectros de massas dos extratos brutos das amostras N1_04_15, N2_04_15, N3_04_15 e C1_04_15.

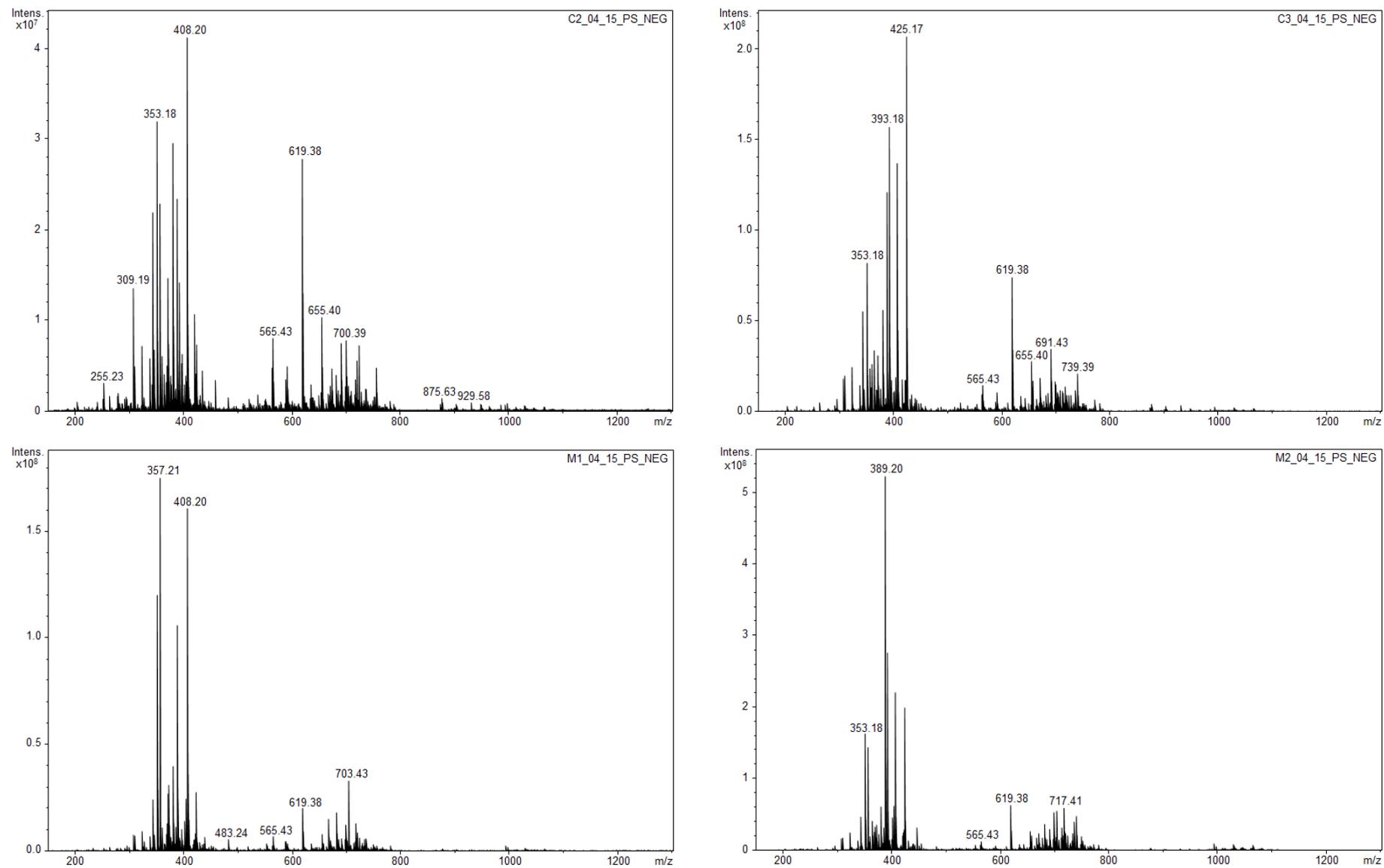


Figura A4.11. Espectros de massas dos extratos brutos das amostras C2_04_15, C3_04_15, M1_04_15 e M2_04_15.

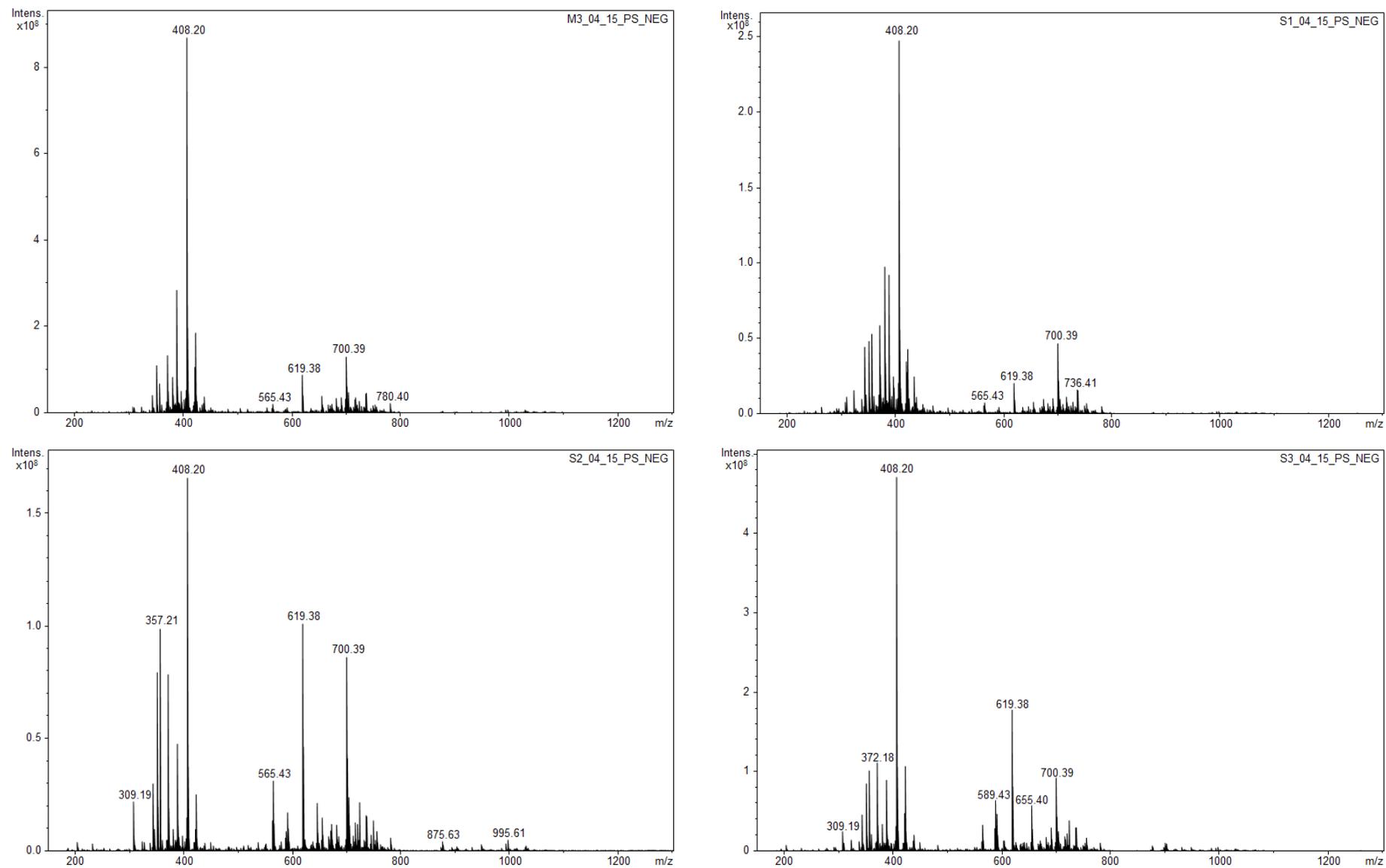


Figura A4.12. Espectros de massas dos extratos brutos das amostras M3_04_15, S1_04_15, S2_04_15 e S3_04_15.

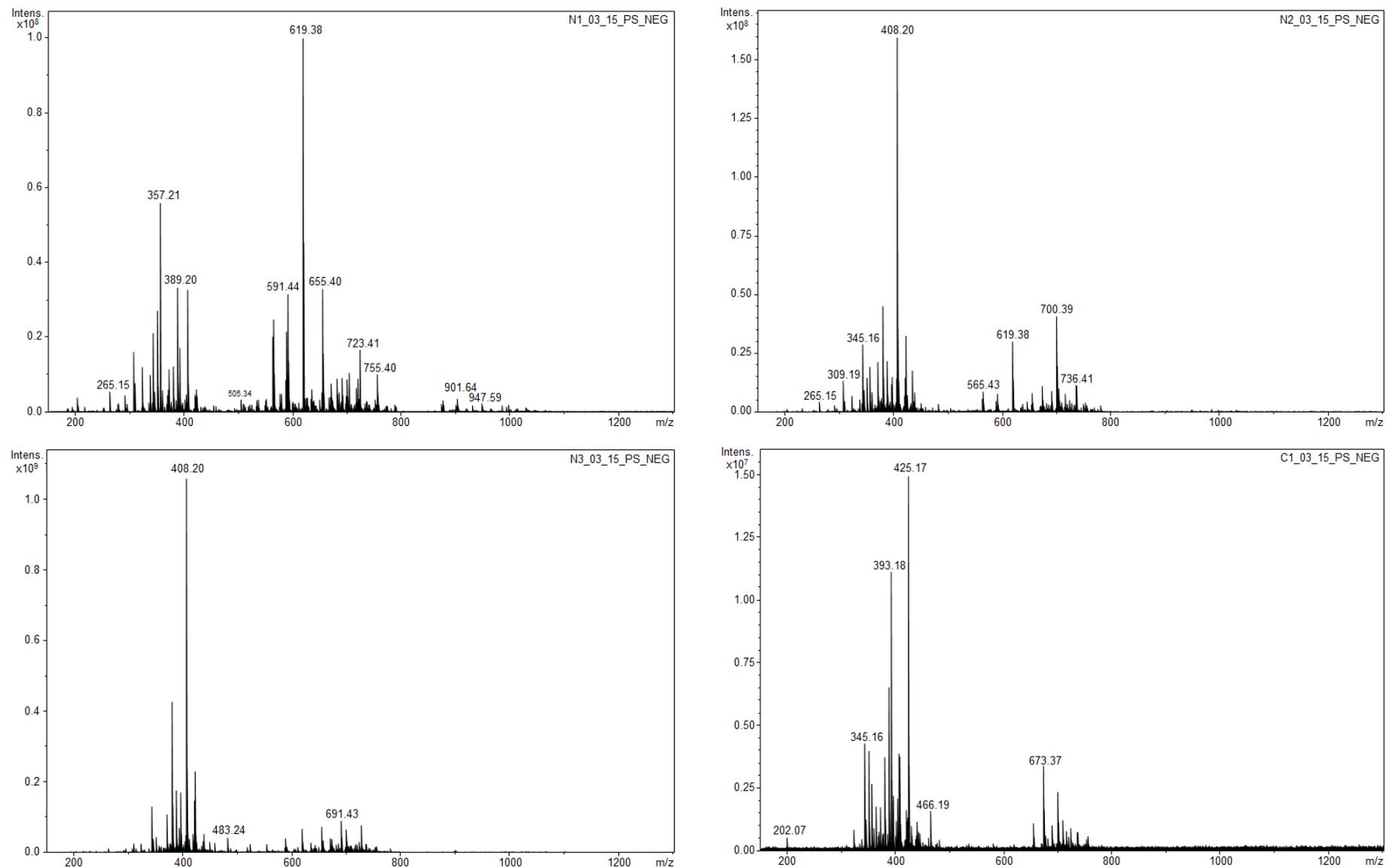


Figura A4.13. Espectros de massas dos extratos brutos das amostras N1_03_15, N2_03_15, N3_03_15 e C1_03_15.

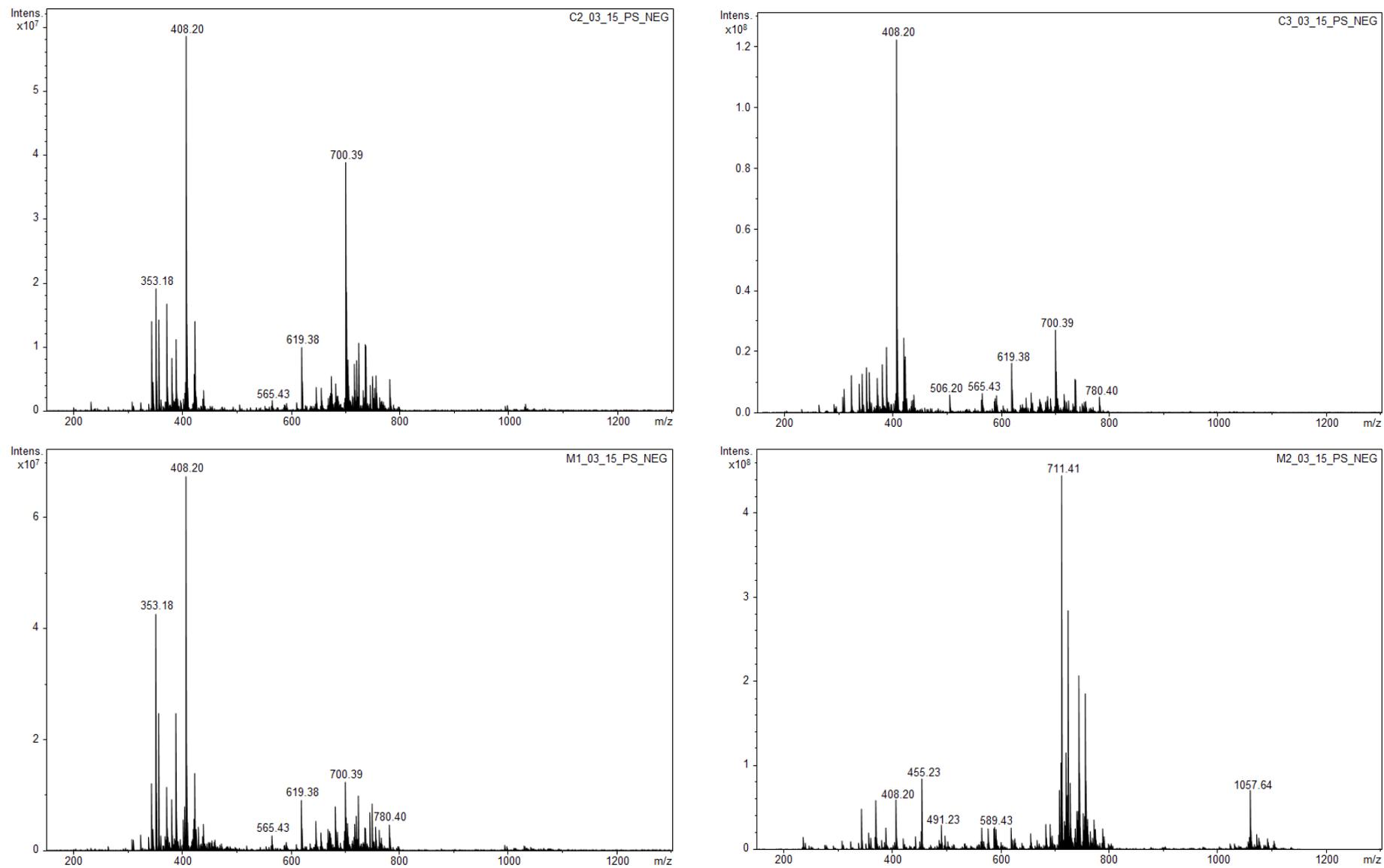


Figura A4.14. Espectros de massas dos extratos brutos das amostras C2_03_15, C3_03_15, M1_03_15 e M2_03_15.

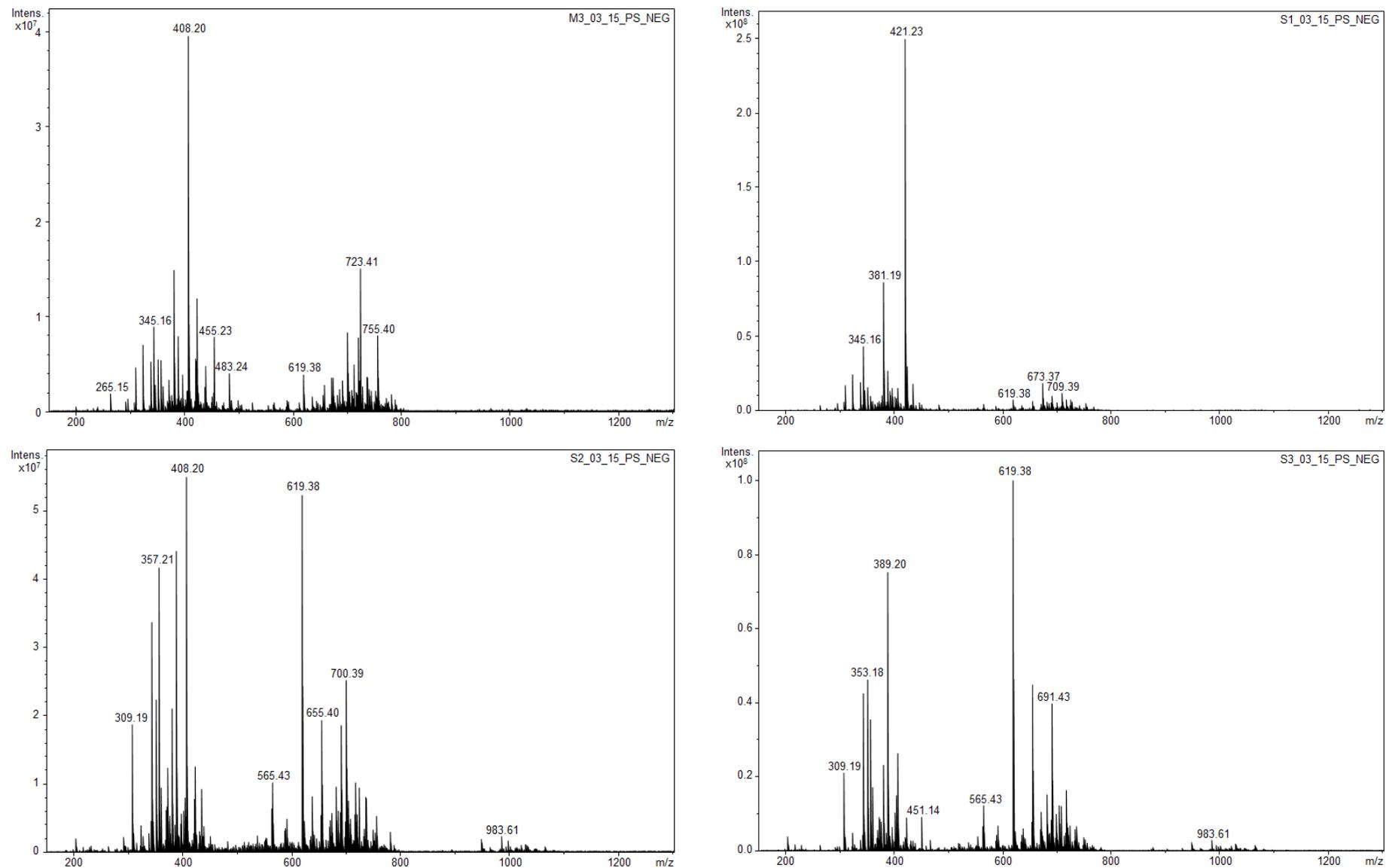


Figura A4.15. Espectros de massas dos extratos brutos das amostras M3_03_15, S1_03_15, S2_03_15 e S3_03_15.

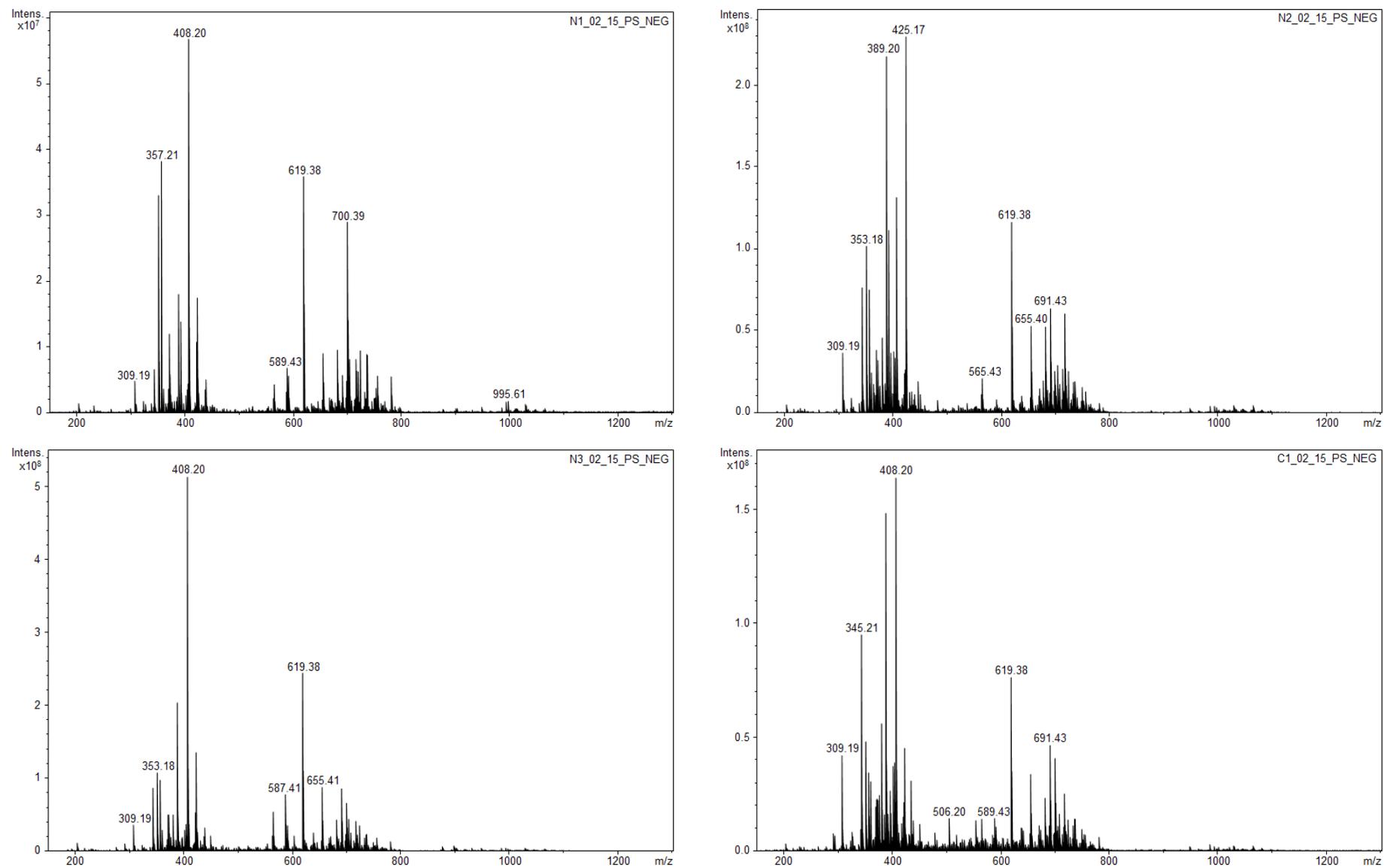


Figura A4.16. Espectros de massas dos extratos brutos das amostras N1_02_15, N2_02_15, N3_02_15 e C1_02_15.

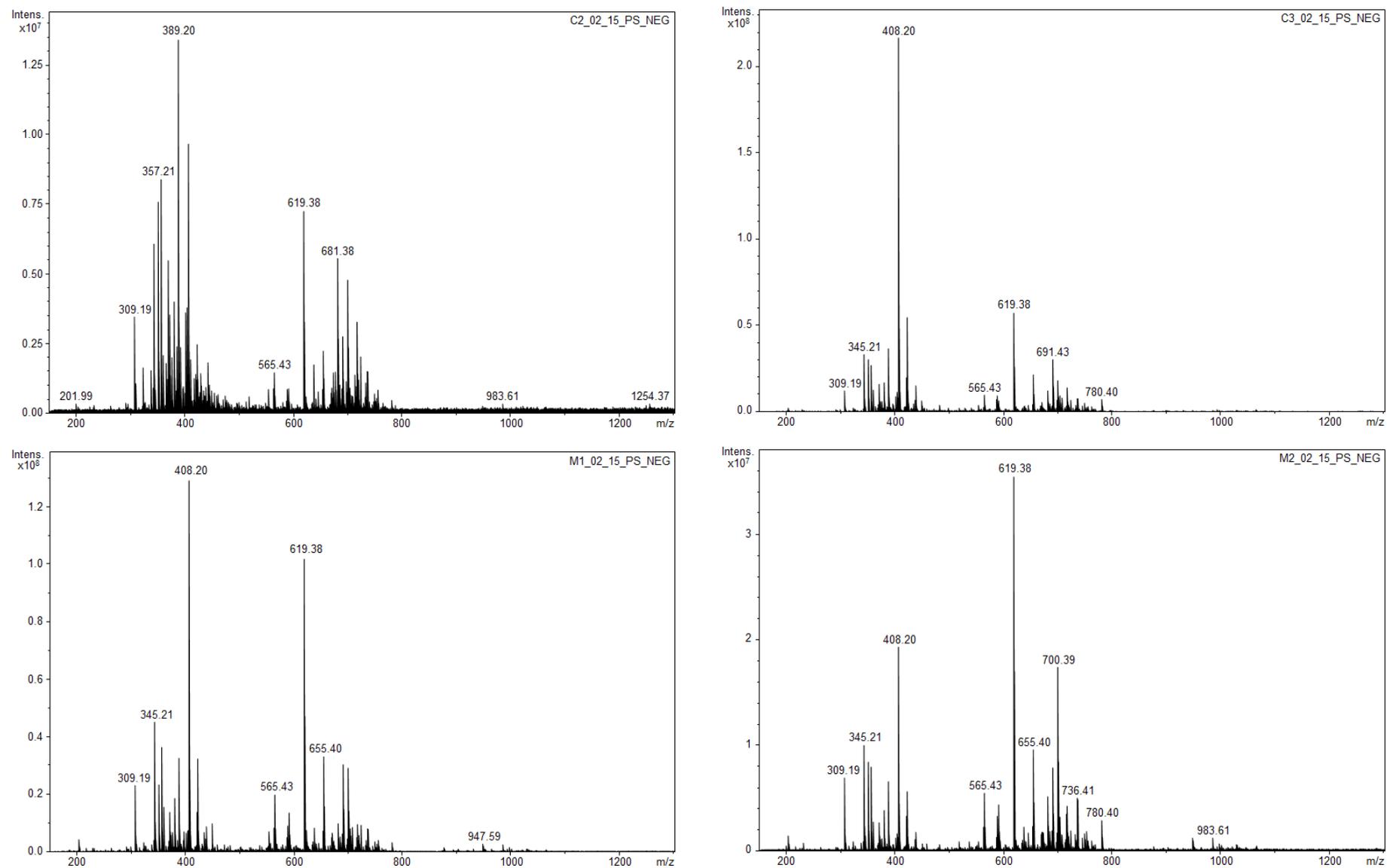


Figura A4.17. Espectros de massas dos extratos brutos das amostras C2_02_15, C3_02_15, M1_02_15 e M2_02_15.

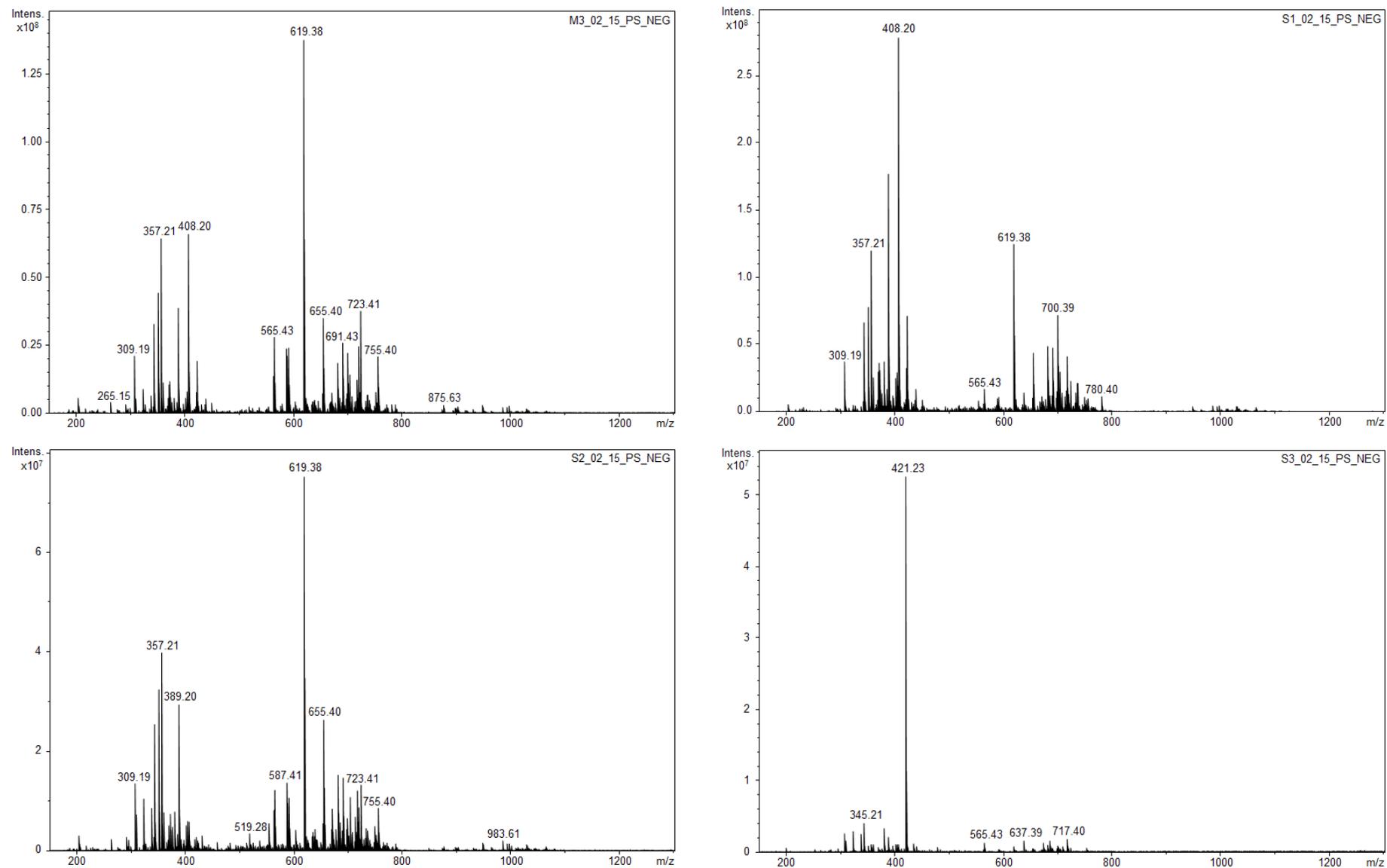


Figura A4.18. Espectros de massas dos extratos brutos das amostras M3_02_15, S1_02_15, S2_02_15 e S3_02_15.

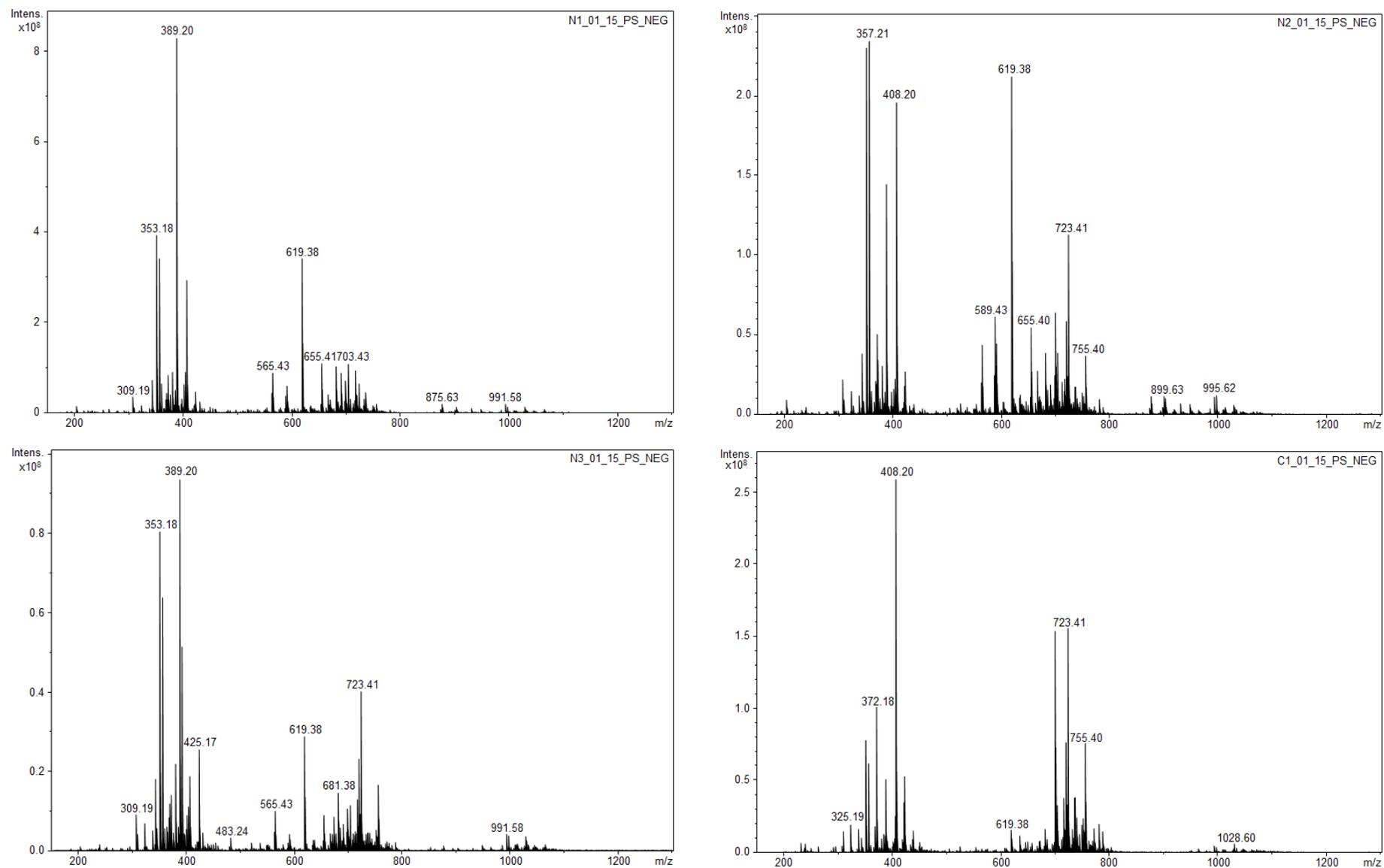


Figura A4.19. Espectros de massas dos extratos brutos das amostras N1_01_15, N2_01_15, N3_01_15 e C1_01_15.

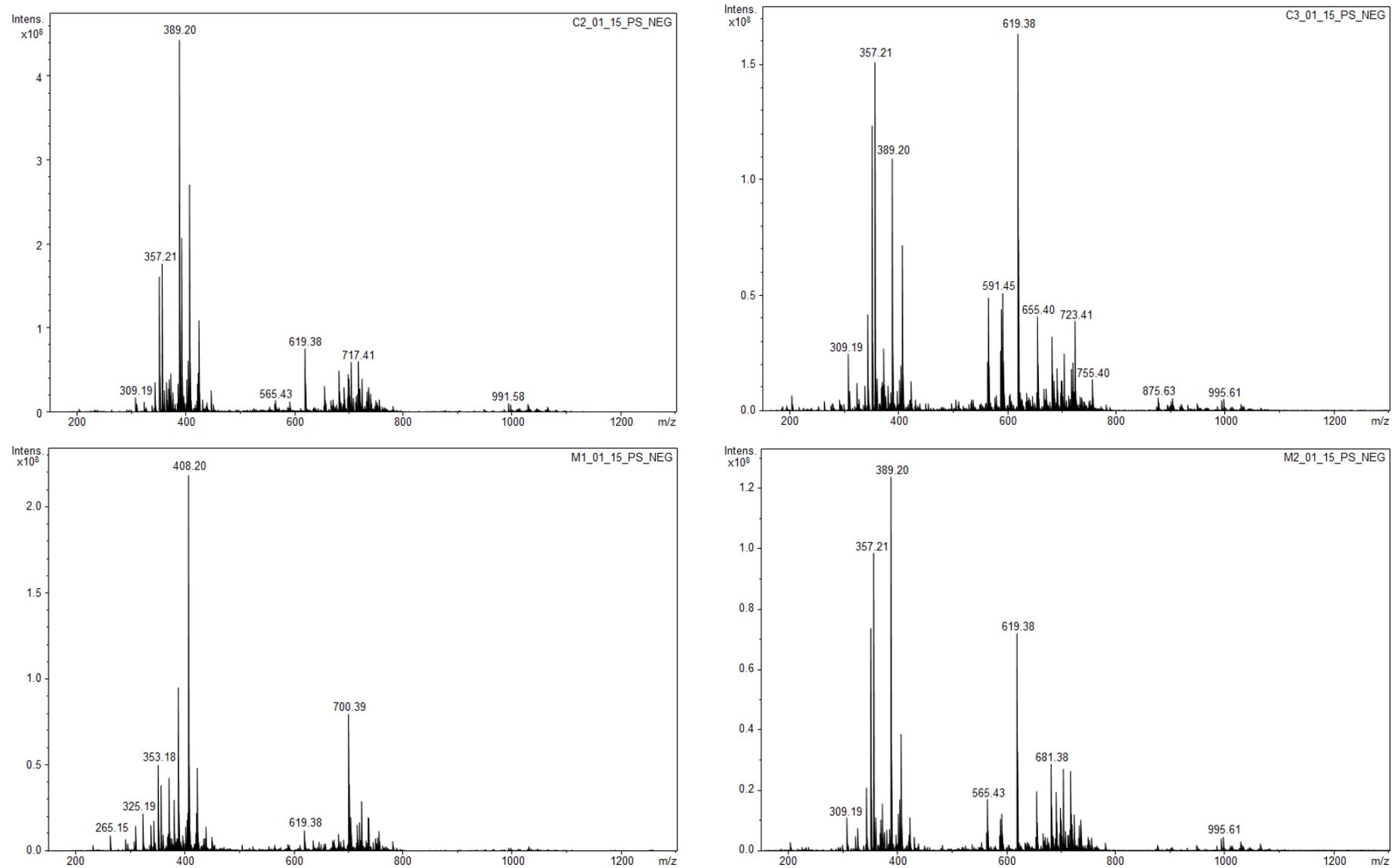


Figura A4.20. Espectros de massas dos extratos brutos das amostras C2_01_15, C3_01_15, M1_01_15 e M2_01_15.

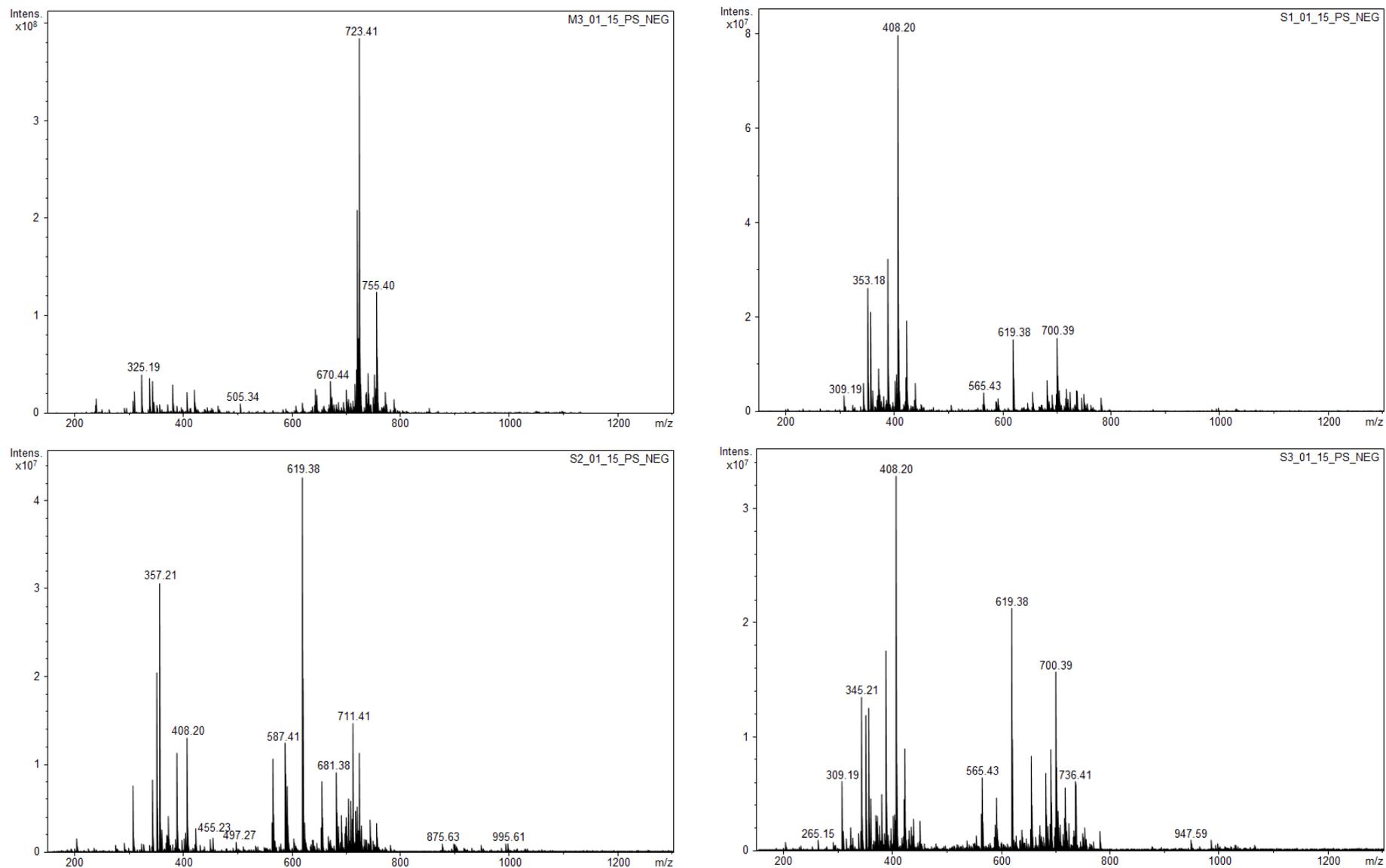


Figura A4.21. Espectros de massas dos extratos brutos das amostras M3_01_15, S1_01_15, S2_01_15 e S3_01_15.

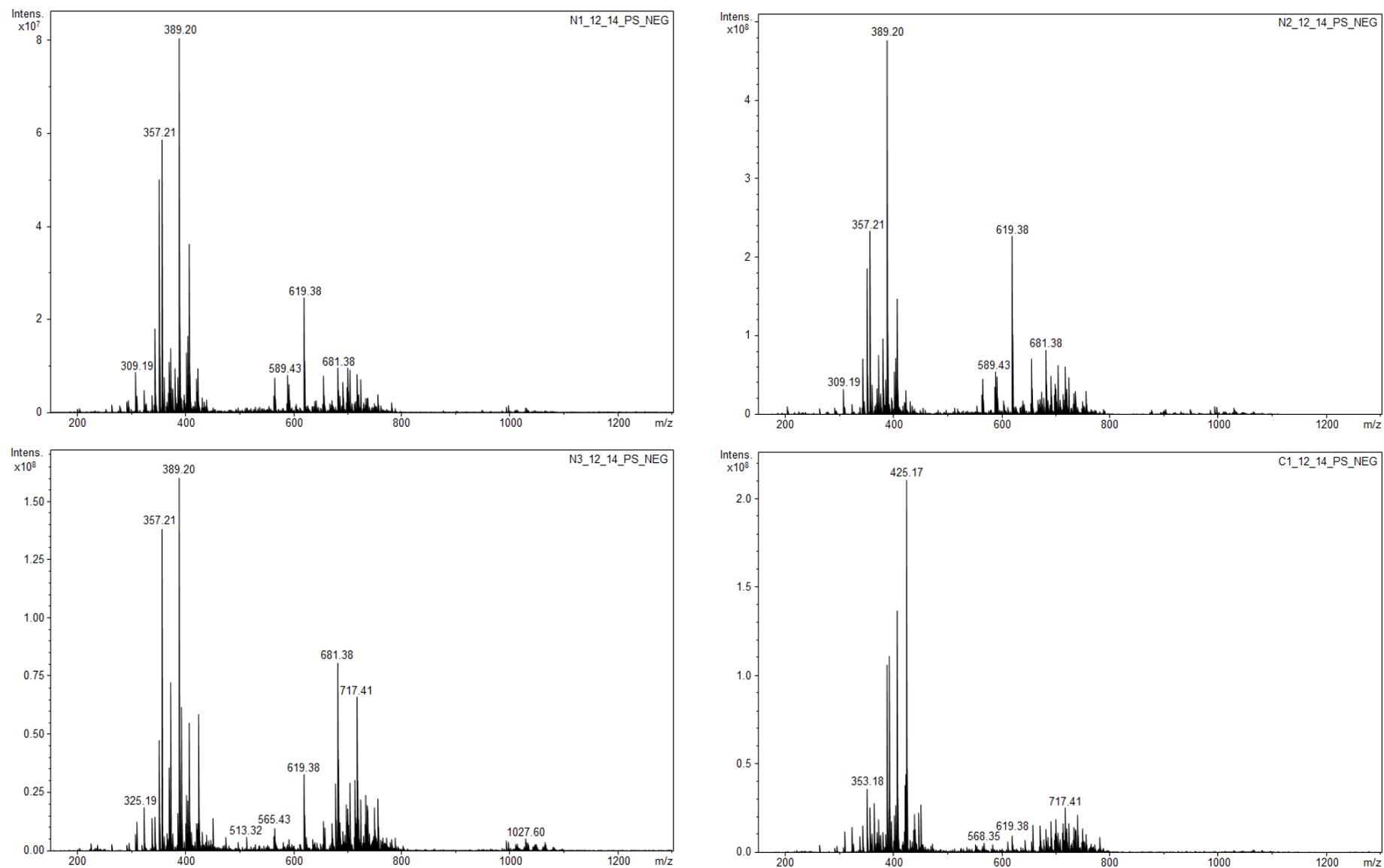


Figura A4.22. Espectros de massas dos extratos brutos das amostras N1_12_14, N2_12_14, N3_12_14 e C1_12_14.

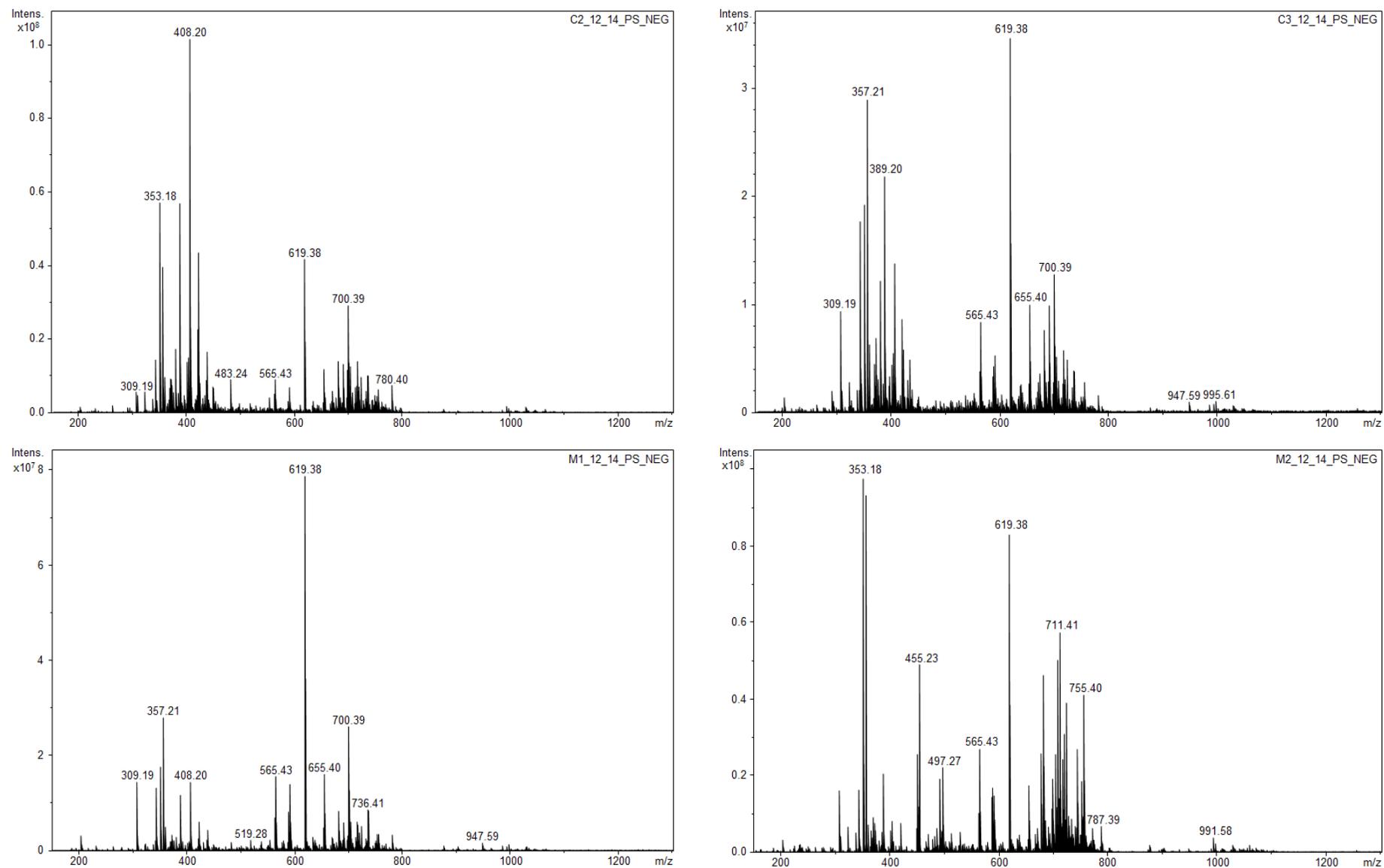


Figura A4.23. Espectros de massas dos extratos brutos das amostras C2_12_14, C3_12_14, M1_12_14 e M2_12_14.

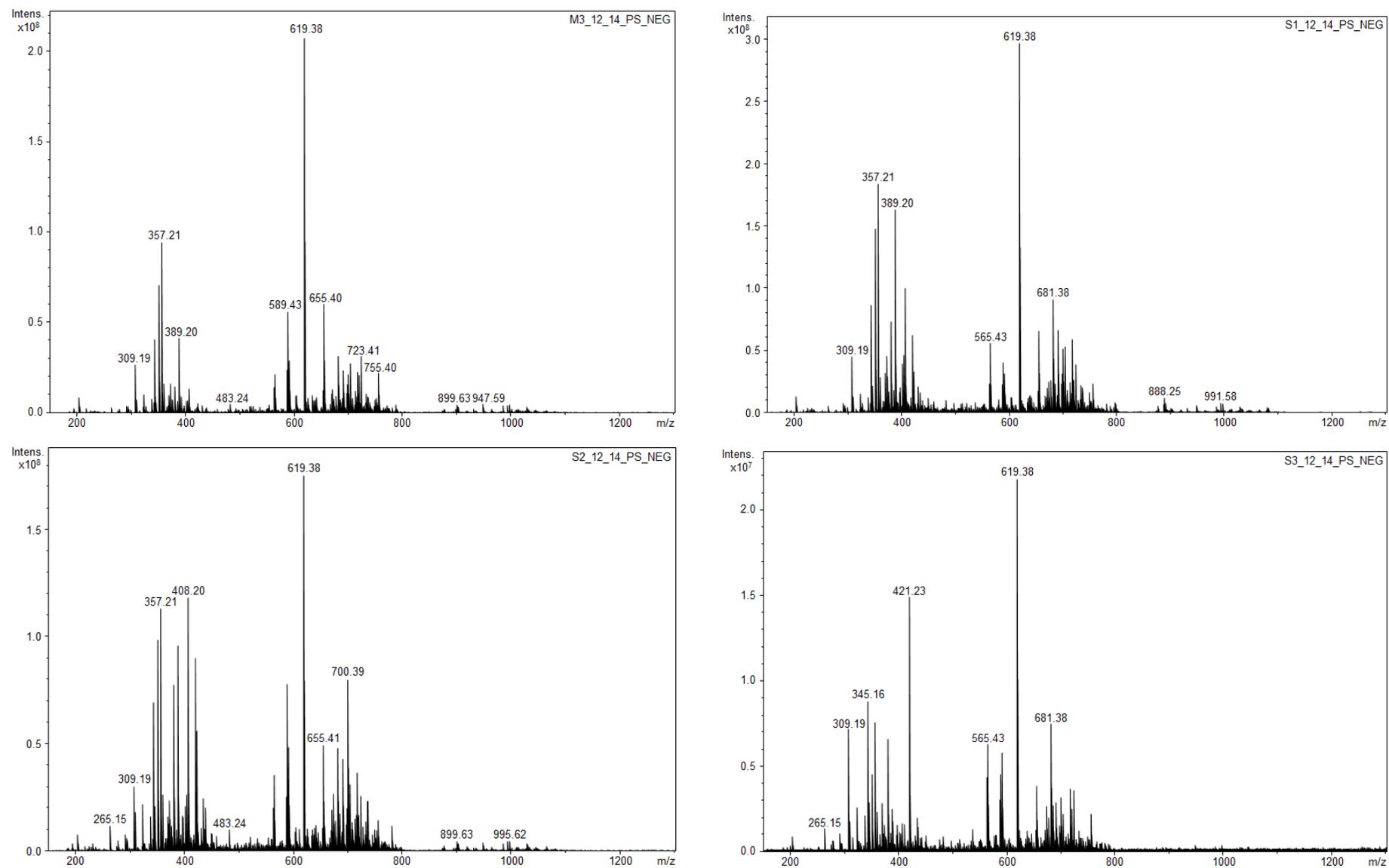


Figura A4.24. Espectros de massas dos extratos brutos das amostras M3_12_14, S1_12_14, S2_12_14 e S3_12_14.

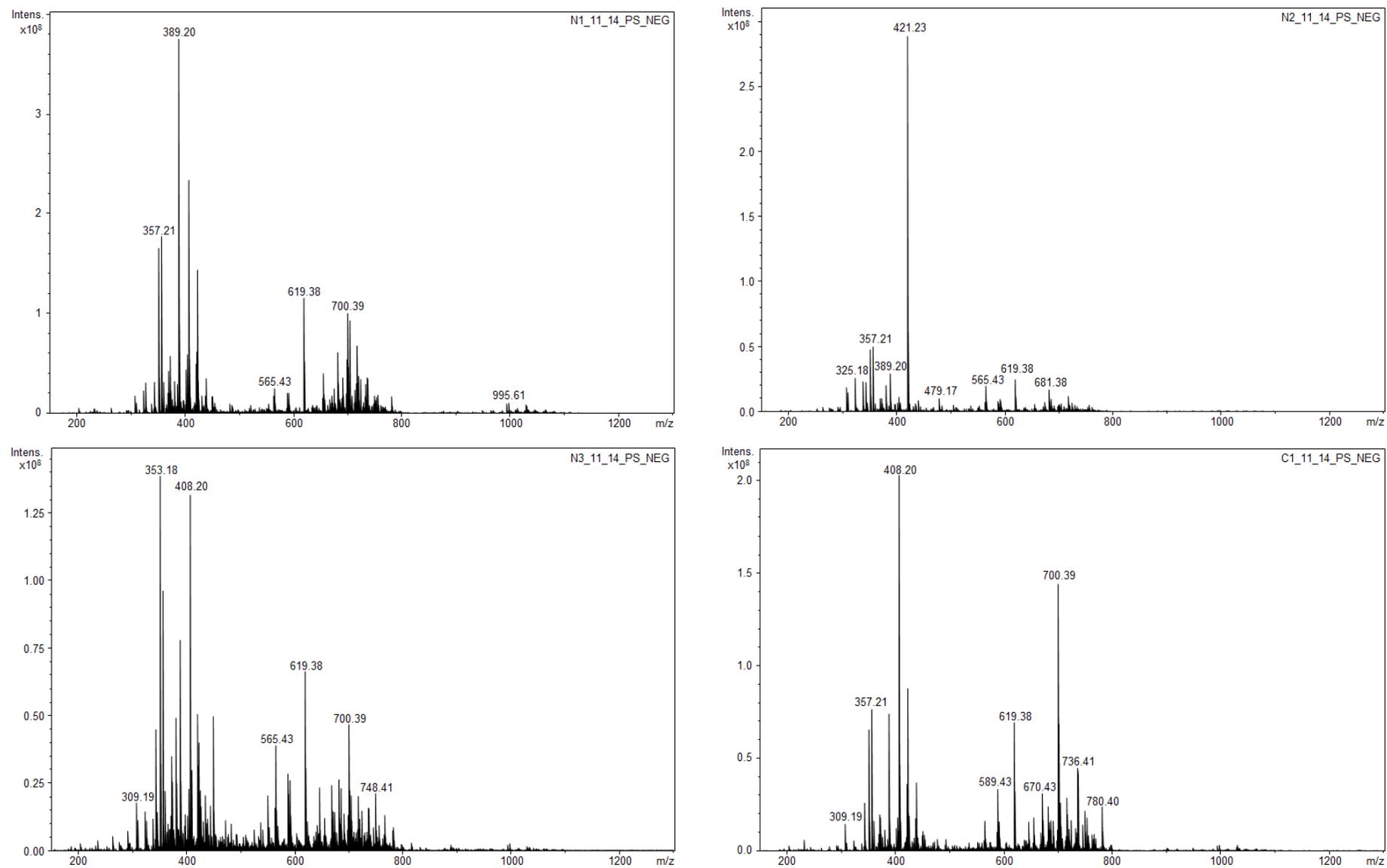


Figura A4.25. Espectros de massas dos extratos brutos das amostras N1_11_14, N2_11_14, N3_11_14 e C1_11_14.

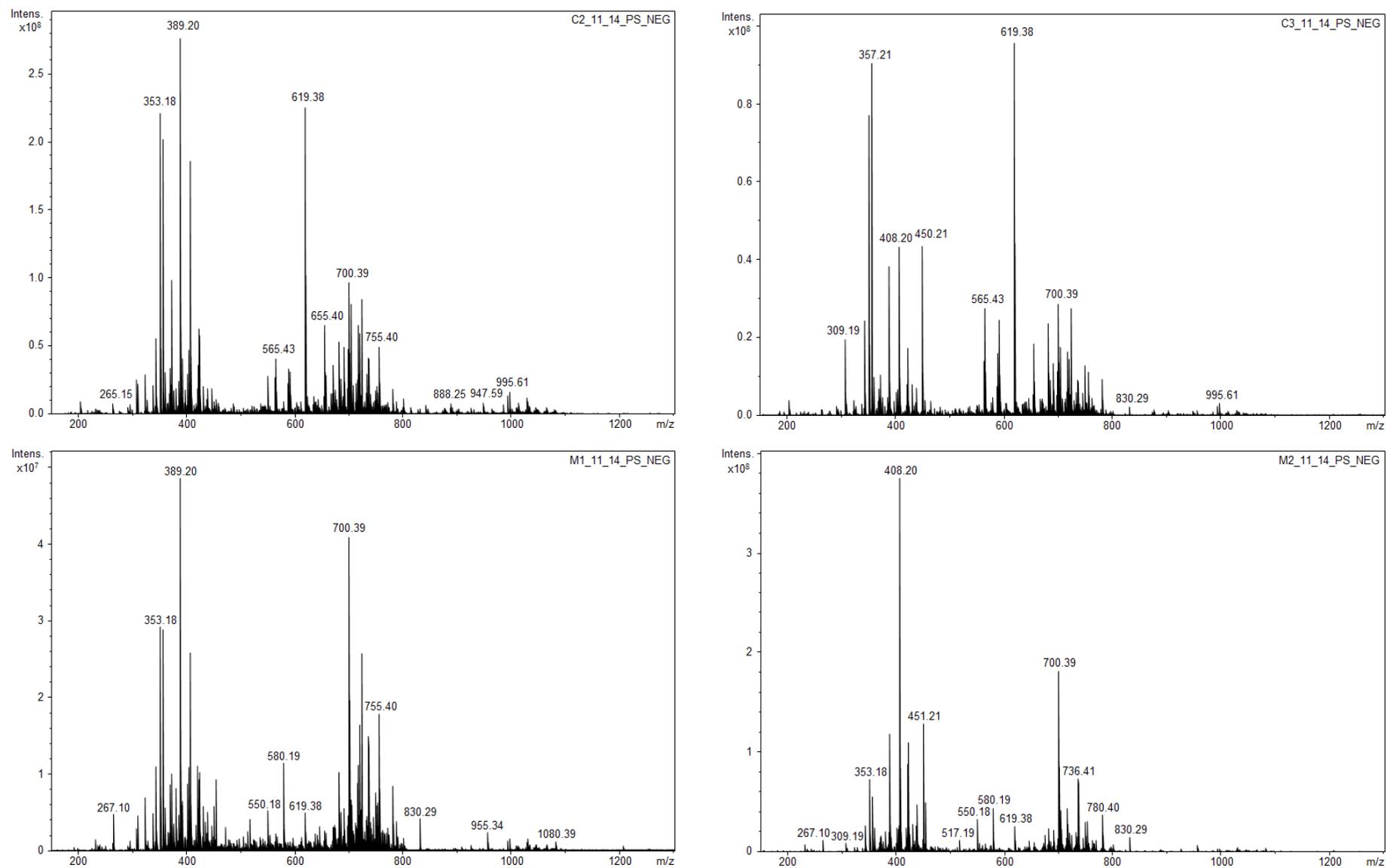


Figura A4.26. Espectros de massas dos extratos brutos das amostras C2_11_14, C3_11_14, M1_11_14 e M2_11_14.

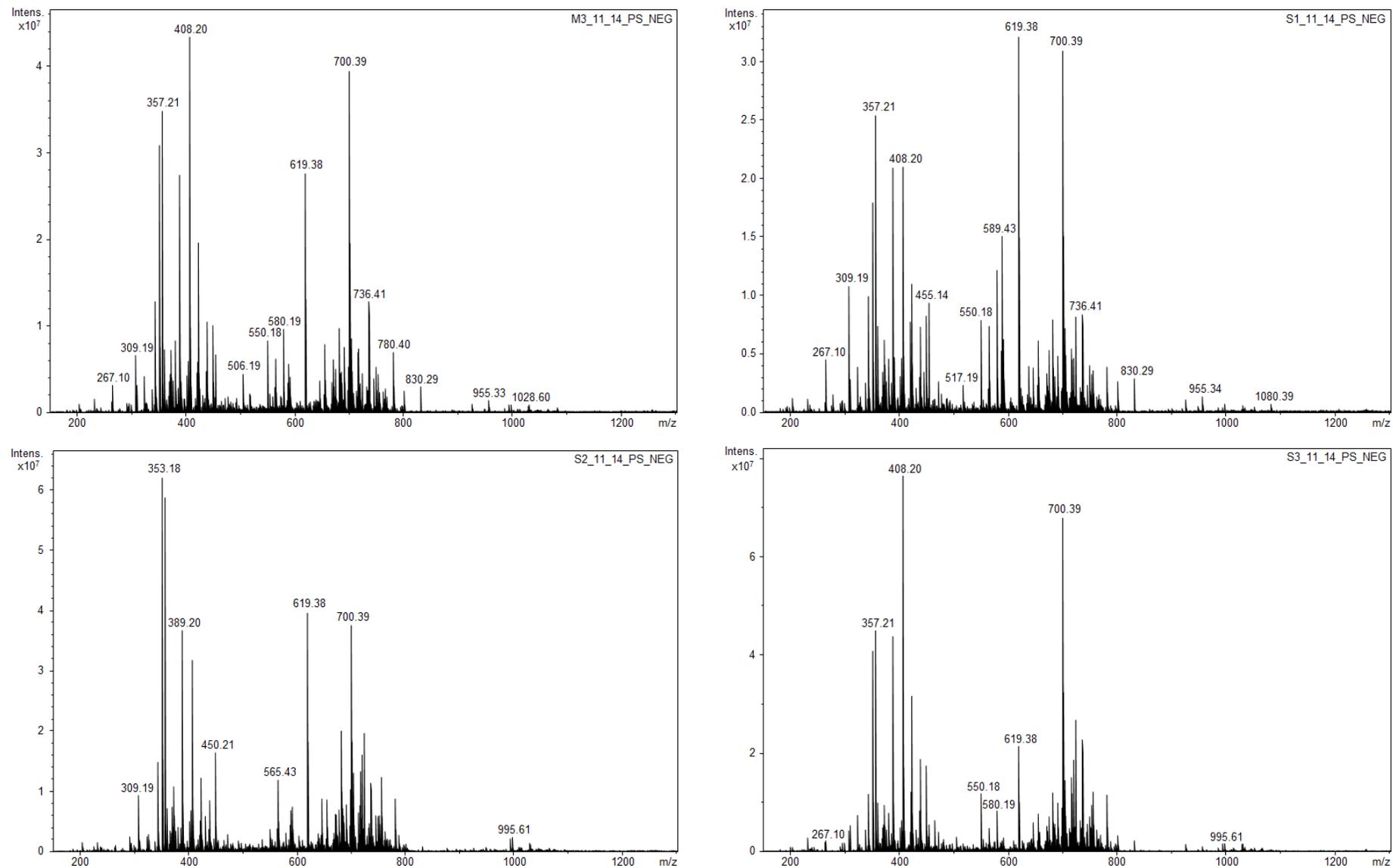


Figura A4.27. Espectros de massas dos extratos brutos das amostras M3_11_14, S1_11_14, S2_11_14 e S3_11_14.

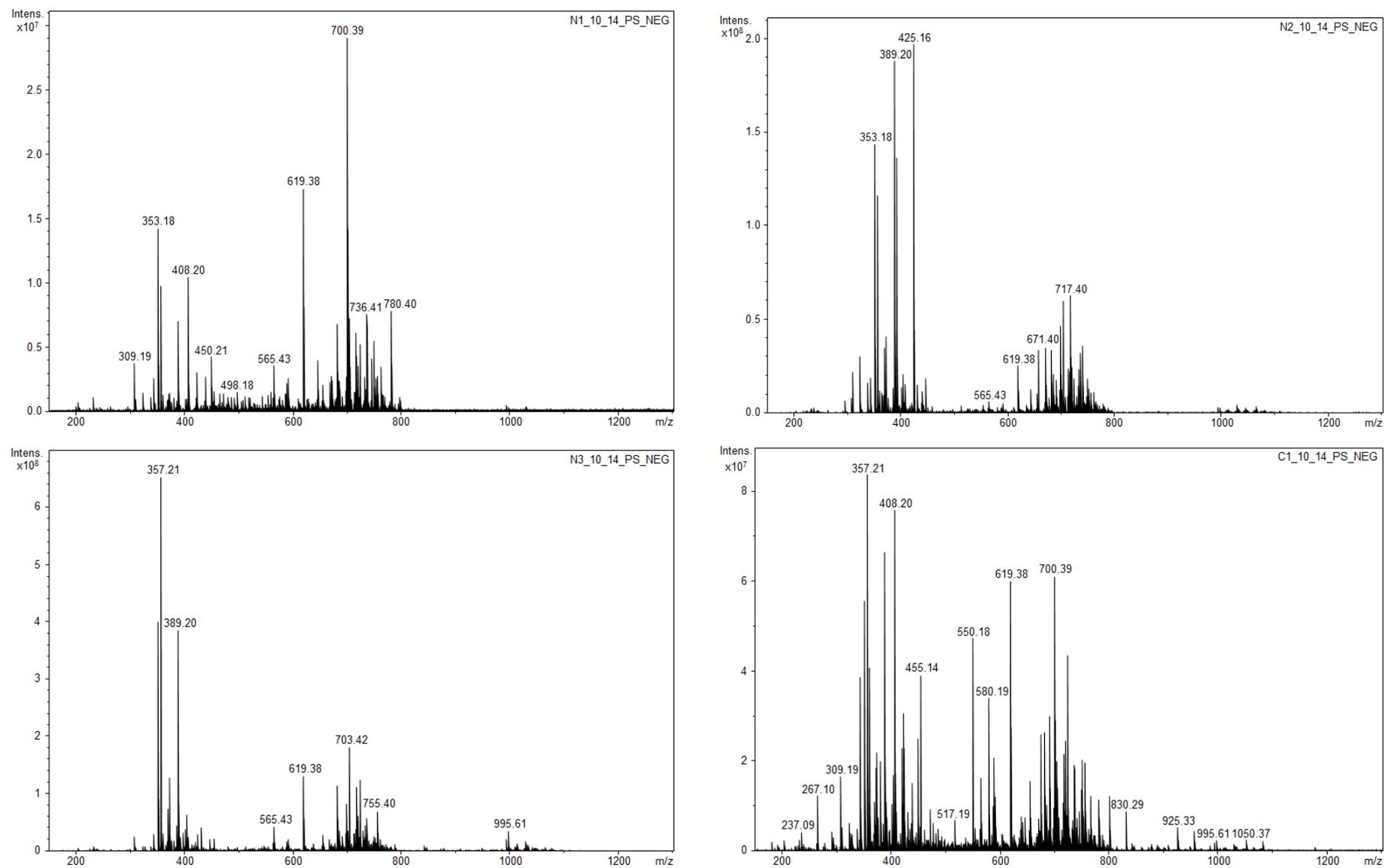


Figura A4.28. Espectros de massas dos extratos brutos das amostras N1_10_14, N2_10_14, N3_10_14 e C1_10_14.

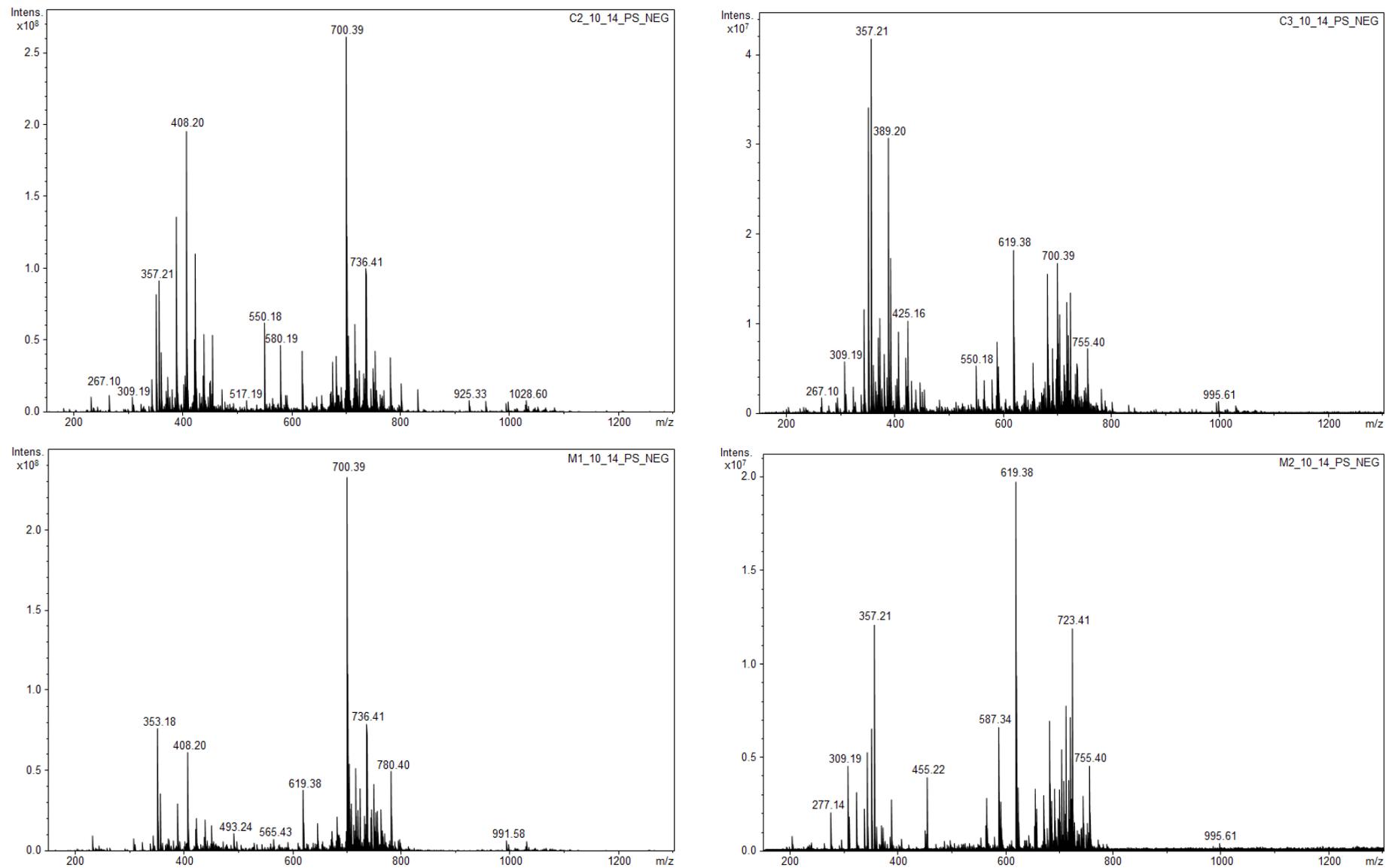


Figura A4.29. Espectros de massas dos extratos brutos das amostras C2_10_14, C3_10_14, M1_10_14 e M2_10_14.

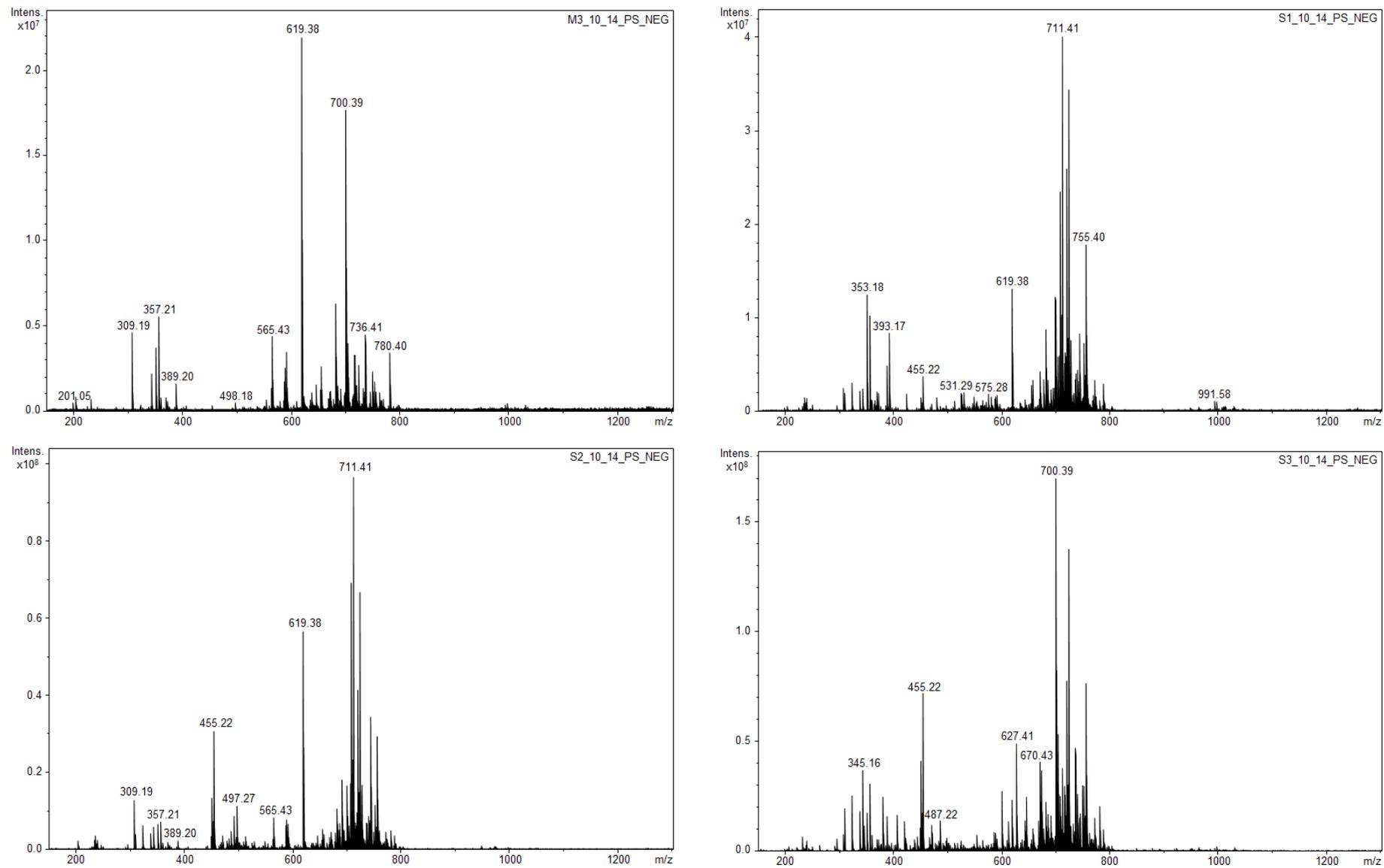


Figura A4.30. Espectros de massas dos extratos brutos das amostras M3_10_14, S1_10_14, S2_10_14 e S3_10_14.

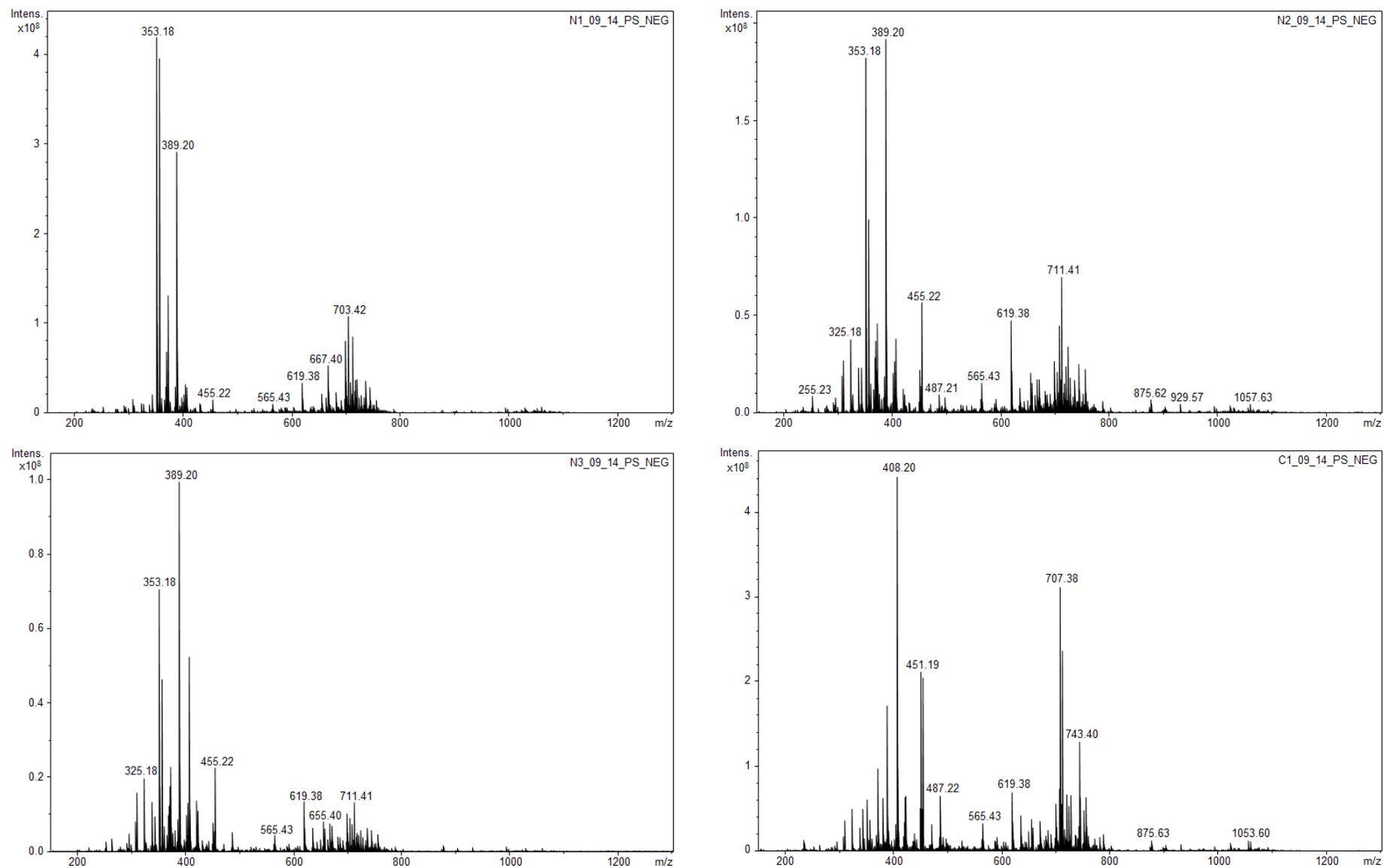


Figura A4.31. Espectros de massas dos extratos brutos das amostras N1_09_14, N2_09_14, N3_09_14 e C1_09_14.

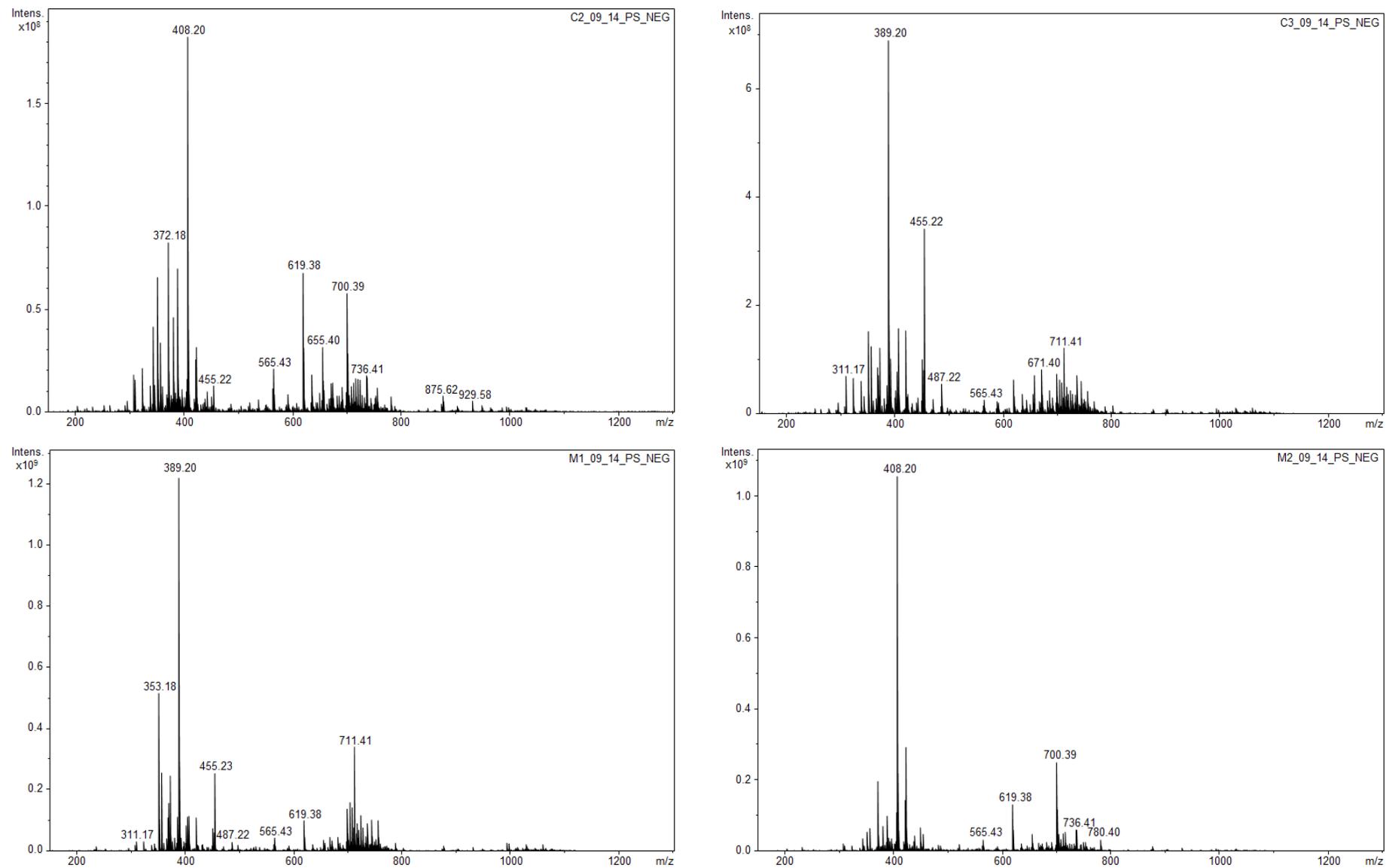


Figura A4.32. Espectros de massas dos extratos brutos das amostras C2_09_14, C3_09_14, M1_09_14 e M2_09_14.

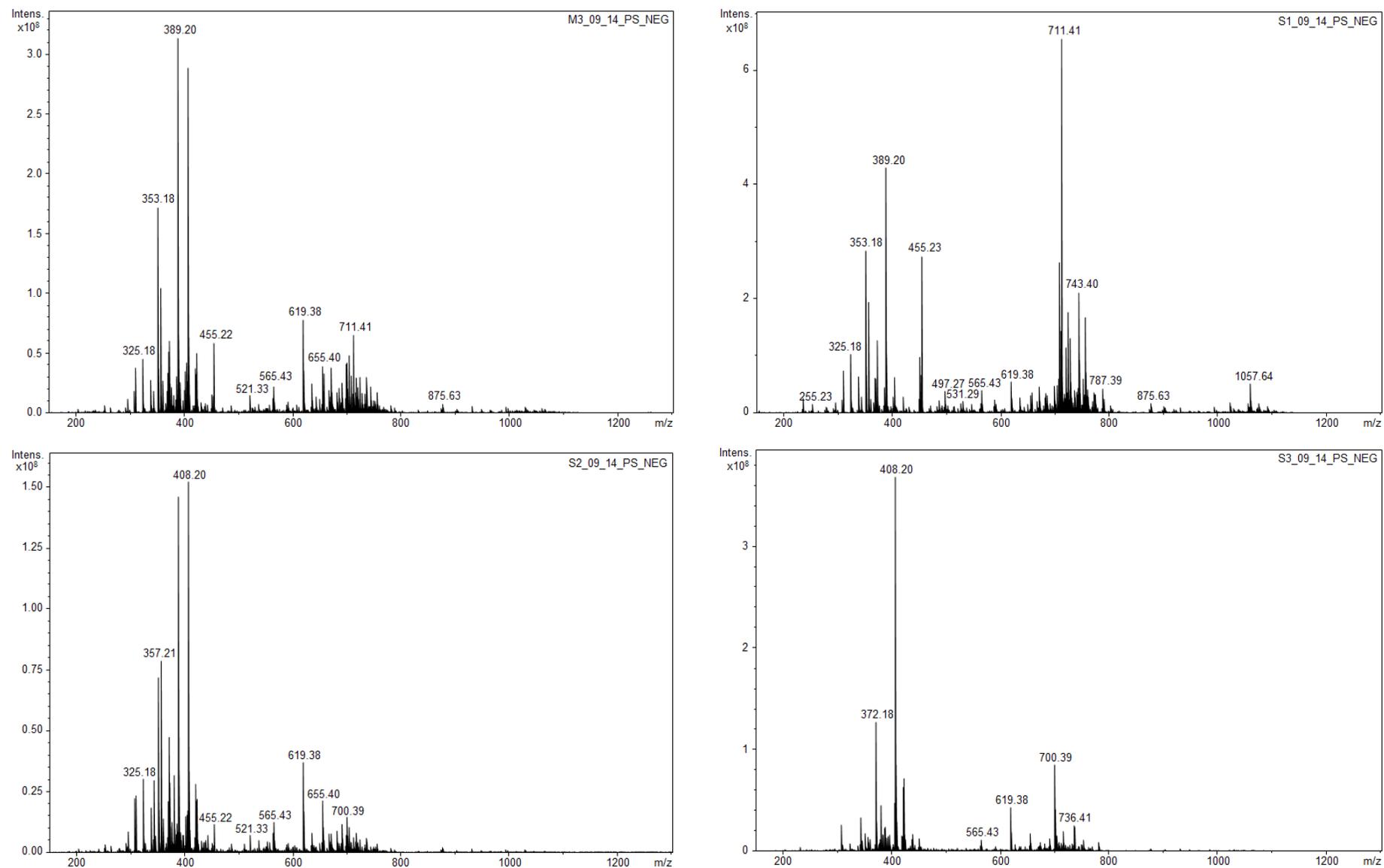


Figura A4.33. Espectros de massas dos extratos brutos das amostras M3_09_14, S1_09_14, S2_09_14 e S3_09_14.

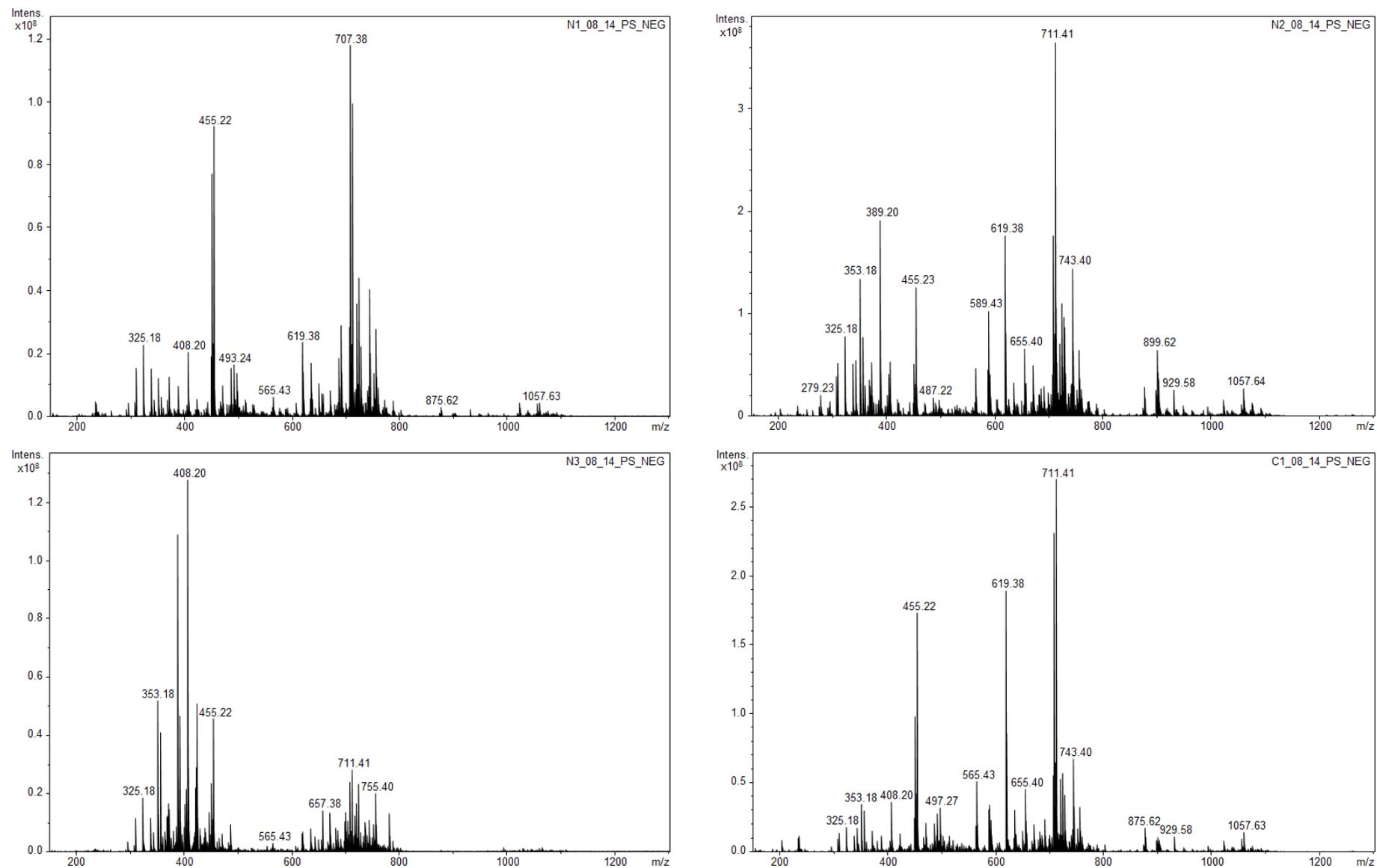


Figura A4.34. Espectros de massas dos extratos brutos das amostras N1_08_14, N2_08_14, N3_08_14 e C1_08_14.

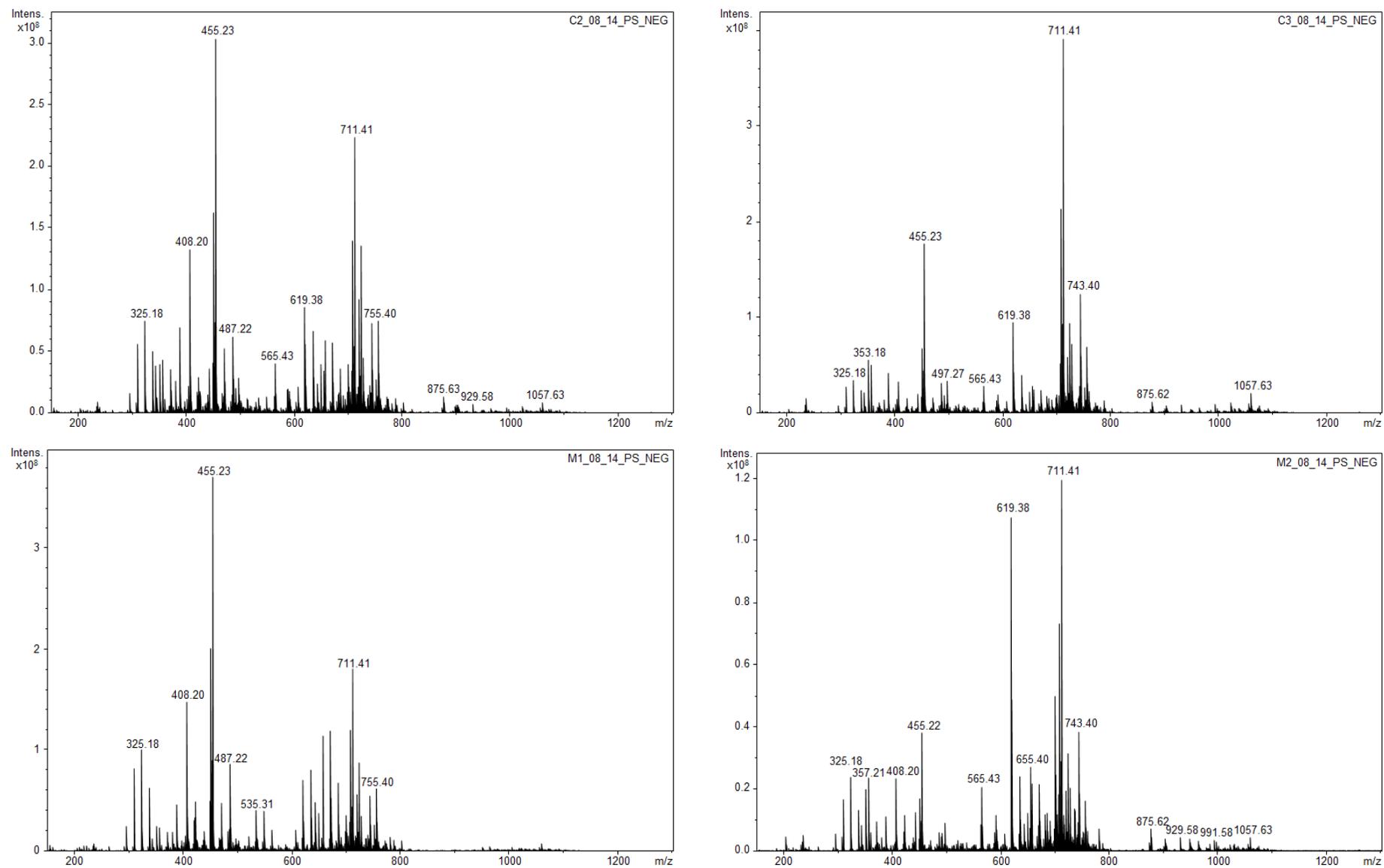


Figura A4.35. Espectros de massas dos extratos brutos das amostras C2_08_14, C3_08_14, M1_08_14 e M2_08_14.

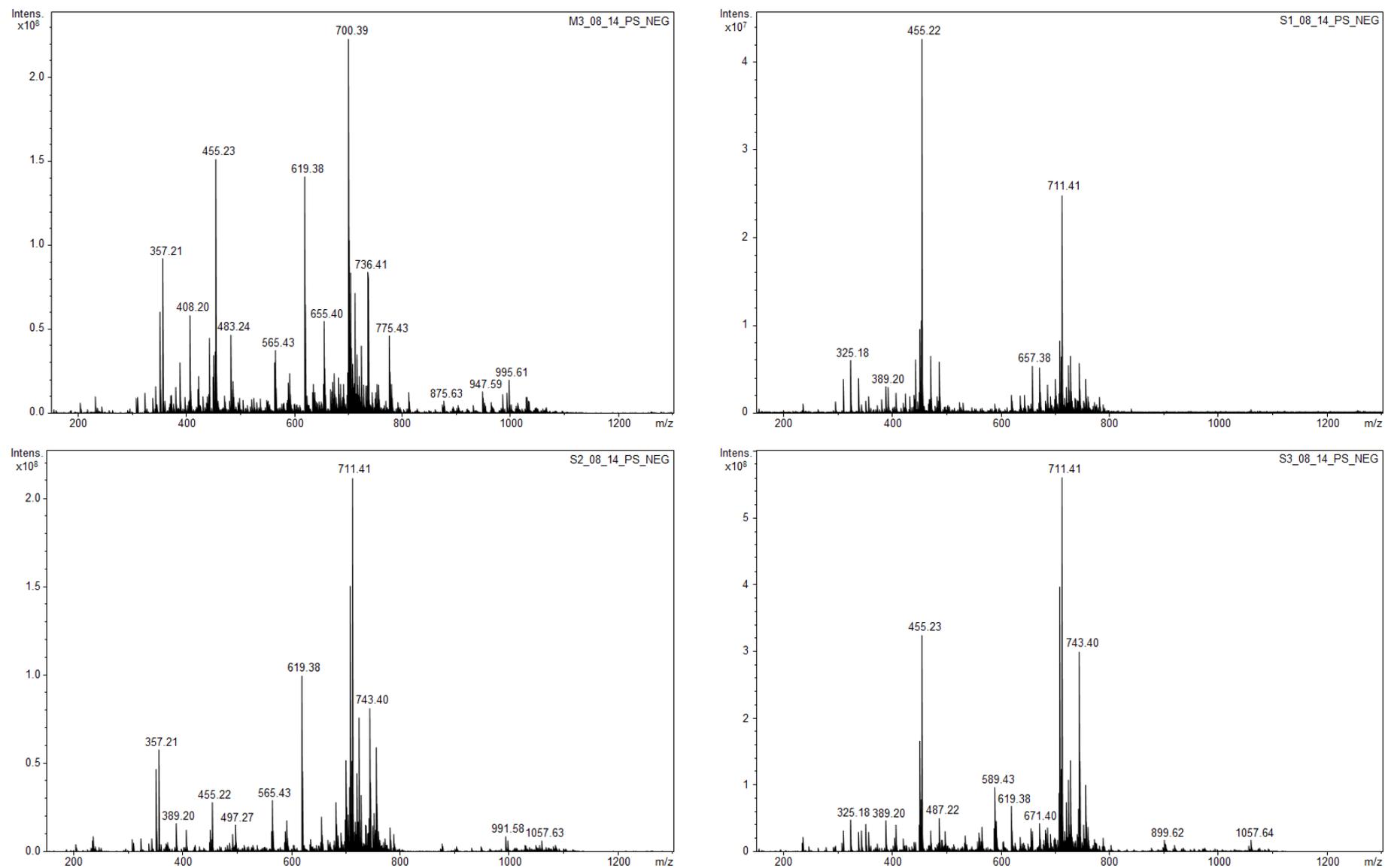


Figura A4.36. Espectros de massas dos extratos brutos das amostras M3_08_14, S1_08_14, S2_08_14 e S3_08_14.

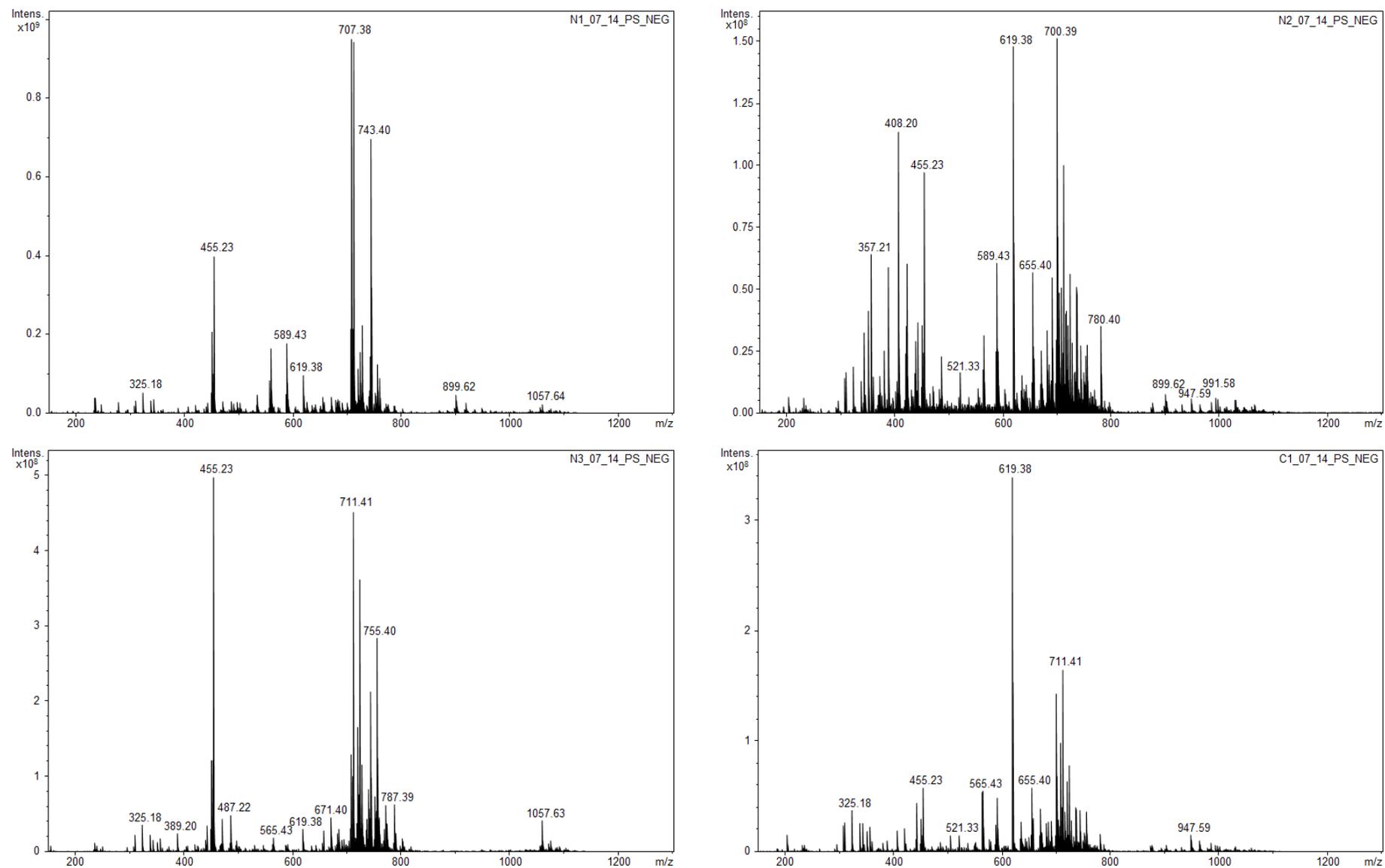


Figura A4.37. Espectros de massas dos extratos brutos das amostras N1_07_14, N2_07_14, N3_07_14 e C1_07_14.

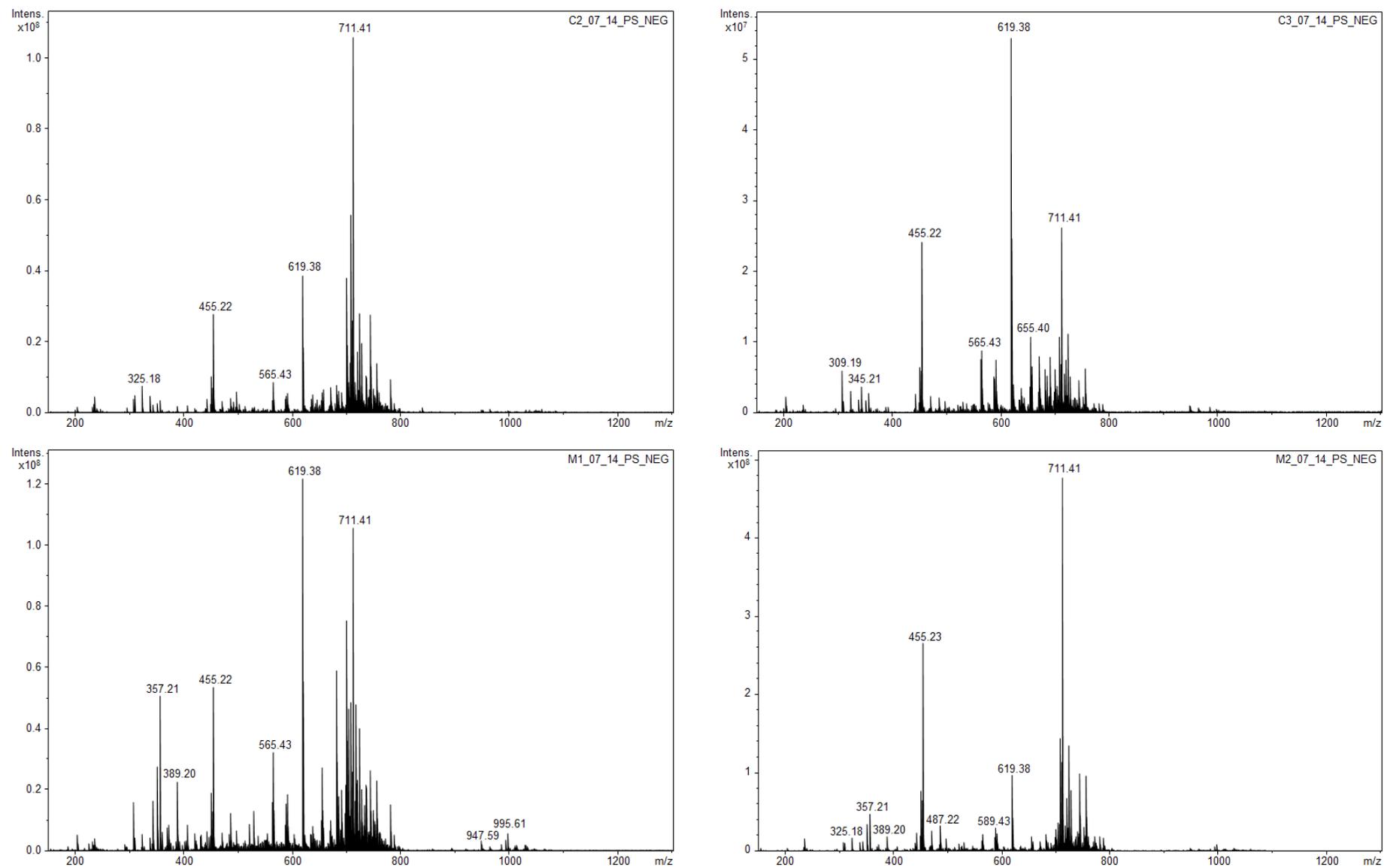


Figura A4.38. Espectros de massas dos extratos brutos das amostras C2_07_14, C3_07_14, M1_07_14 e M2_07_14.

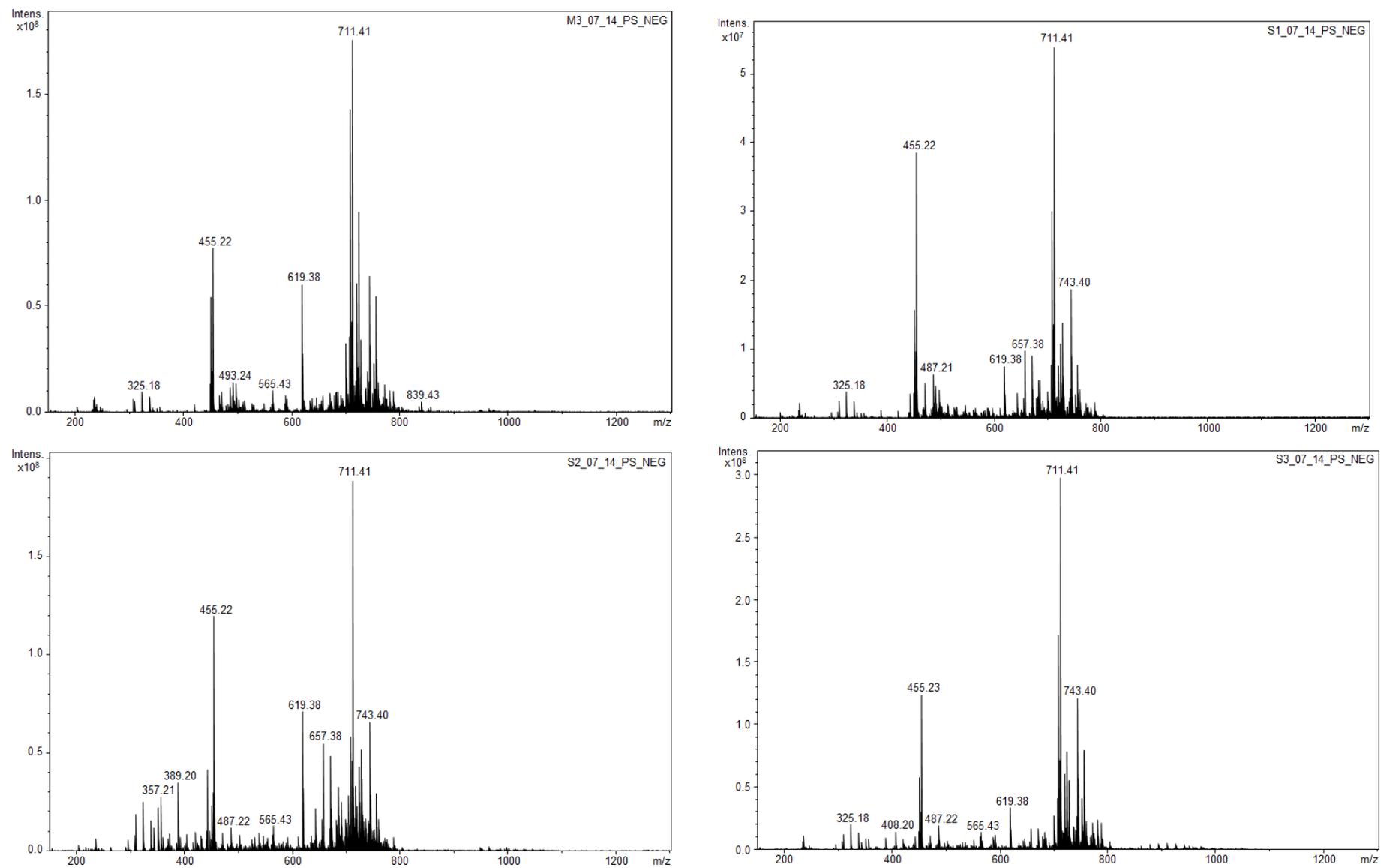


Figura A4.39. Espectros de massas dos extratos brutos das amostras M3_07_14, S1_07_14, S2_07_14 e S3_07_14.