



ISSN 1982-8195

CADERNOS ANP

POLÍCIA FEDERAL



IDENTIFICAÇÃO DE THC EM SEMENTES DE MACONHA

Rogério Campos Galiazzi Pastro

M.J.-DEPARTAMENTO DE POLÍCIA FEDERAL
ACADEMIA NACIONAL DE POLÍCIA

Brasília - DF
2012

CADERNOS ANP

**IDENTIFICAÇÃO DE THC EM SEMENTES DE
MACONHA**



ISSN 1982-8195

Copyright © 2008 - ANP

CADERNOS ANP

Brasília, n. 8, 2012.

ISSN 1982-8195

Corpo Editorial

Guilherme Henrique Braga de Miranda (Editor Responsável)

Gilson Matilde Diana

Comissão Julgadora do I Concurso Nacional de Monografias em Segurança Pública da Academia Nacional de Polícia

Ademir Dias Cardoso Junior, Dinamar Cristina Pereira Rocha, Regina Celia Silva Pitão,
Sara Laís Rahal Lenharo e Tito Caetano Correa

Ministério da Justiça

José Eduardo Cardozo

MINISTRO

Departamento de Polícia Federal

Leandro Daiello Coimbra

DIRETOR-GERAL

Diretoria de Gestão de Pessoal

Valquíria Souza Teixeira de Andrade

DIRETORA SUBSTITUTA

Academia Nacional de Polícia

Renan Marçal Rodrigues

DIRETOR SUBSTITUTO

Célio Jacinto dos Santos

COORDENADOR DA CESP

**MJ - Departamento de Polícia Federal
Diretoria de Gestão de Pessoal
Academia Nacional de Polícia**

ROGÉRIO CAMPOS GALIAZZI PASTRO

IDENTIFICAÇÃO DE THC EM SEMENTES DE MACONHA

Segundo Lugar no I Concurso Nacional de Monografias em Segurança Pública
da Academia Nacional de Polícia - Curso de Gestão de Políticas de Segurança
Pública, em 2008.

Brasília - DF

2012

Copyright © 2008 - ANP

CADERNOS ANP

Brasília, n. 8, 2012.

ISSN 1982-8195

Todos os direitos reservados

Este trabalho é propriedade da Academia Nacional de Polícia, não podendo ser copiado, totalmente ou em parte, sem a prévia autorização da ANP, de acordo com a Lei 9.610 de 19 de fevereiro de 1998 (Lei dos Direitos Autorais).

Projeto Gráfico, Capa e Editoração: Roberto Carlos de Sousa, Guilherme Henrique Braga de Miranda e Gilson Matilde Diana

1ª Edição Fevereiro/2012

Tiragem: *online e 350 exemplares*

Pastro, Rogério Campos Galiuzzi.

IDENTIFICAÇÃO DE THC EM SEMENTES DE MACONHA – Brasília: Academia Nacional de Polícia, 2012, 48 páginas. Orientador: Dr. Alexanders Tadeu das Neves Belarmino

Monografia para a obtenção do título de Especialista em Gestão de Política de Segurança Pública.

ISSN 1982-8195

1. Atividades policiais do DPF. 2. Outro tema. I. PASTRO, Rogério Campos Galiuzzi. II. Academia Nacional de Polícia, Pós-Graduação em Gestão de Política de Segurança Pública. III. Identificação de THC em Sementes de Maconha.

Cadernos ANP é uma publicação da Academia Nacional de Polícia (ANP) dirigida pela equipe da Coordenação Escola Superior de Polícia (CESP). Os trabalhos e pesquisas aqui publicados não refletem necessariamente a opinião do Cadernos ANP ou do DPF, sendo de responsabilidade exclusiva de seus autores. É permitida a reprodução parcial dos trabalhos e pesquisas do Cadernos ANP, desde que citada a fonte, e nos termos da Lei que resguarda os direitos autorais.

Correspondência Editorial

ACADEMIA NACIONAL DE POLÍCIA

ESCOLA SUPERIOR DE POLÍCIA

DF 001 - Estrada Parque do Contorno, Km 2

Setor Habitacional Taquari, Lago Norte - DF - CEP 71559-900

Sumário

RESUMO	7
ABSTRACT	9
INTRODUÇÃO.....	11
1 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA DE DROGAS	15
1.1 Lei nº 11.343, de 23 de agosto de 2006	15
1.2 Portaria do Ministério da Saúde nº 344, de 12 de maio de 1998	15
2 MACONHA E SEUS CANABINÓIDES.....	17
2.1 Semente x frutos	17
2.2 Canabinóides.....	18
2.2.1 Tetra-hidrocanabinol.....	19
2.2.2 Canabinol.....	19
2.2.3 Canabidiol.....	20
3 CROMATOGRAFIA GASOSA	21
3.1 Fase estacionária	22
3.2 Fase móvel.....	24
4 ESPECTROMETRIA DE MASSAS	27
5 SPME	29
5.1 <i>Headspace</i>	30
5.2 Considerações cinéticas e otimização	31
5.2.1 Otimização do volume do frasco	32
5.2.2 Otimização do tempo de extração.....	32
5.2.3 Volume do <i>liner</i>	32
5.2.4 Temperatura de extração e de dessorção.....	33
5.2.5 Seleção da fibra	34
6 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
6.1 Amostras de sementes.....	35
6.2 Instrumentos	35
6.3 Procedimentos	35
7 RESULTADOS E DISCUSSÕES	37
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45
REFERÊNCIAS	47

RESUMO

O presente trabalho trata, de maneira inédita, a identificação do Δ^9 -tetra-hidrocannabinol presente em sementes da *Cannabis sativa* Linneu (maconha). Para a legislação brasileira o Δ^9 -tetra-hidrocannabinol é o único canabinóide proibido, enquanto a planta é apenas controlada. Devido às sementes possuírem quantidades diminutas da substância, cerca de 2 $\mu\text{g/g}$, as técnicas comumente empregadas para identificação de drogas, cromatografia em camada delgada ou cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, tornam-se ineficazes. O plantio torna-se necessário para identificação do princípio ativo, que se apresenta em altas concentrações nas inflorescências da planta. Entretanto, até o seu aparecimento, demanda-se um período de tempo longo, em torno de pelo menos um mês. Utilizando uma técnica criada recentemente, *Solid Phase Micro-extraction* (Micro-extração em Fase Sólida), mostra-se extremamente rápida, sem necessidade de extração e uso de solventes, tornando viável a análise qualitativa do Δ^9 -tetra-hidrocannabinol, a partir de uma matriz sólida composta por, pelo menos, quatro sementes.

PALAVRAS-CHAVE: THC. *Cannabis sativa*. SPME. Maconha. Semente.

ABSTRACT

The present work treats, in an unexplored way, the identification of Δ^9 -tetra-hydrocannabinol present in seeds of *Cannabis sativa* Linneus (marijuana). For the Brazilian legislation, Δ^9 -tetra-hydrocannabinol is the only cannabinoid forbidden, while the plant is only controlled. Because the seeds had trace amounts of the substance, about 2 $\mu\text{g/g}$, the drug's identification techniques usually employed, thin layer chromatography or gas chromatography coupled mass spectrometry, become inefficient. The plantation becomes necessary for identification of the active principle, that presents with high concentration on inflorescences of the plant. However, until its appearance, demand period of long time, around at least one month. Using one new technique, Solid Phase Micro-extraction, reveals extremely fast, without necessity of solvent extraction and use of, becoming viable the qualitative analysis of Δ^9 -tetra-hydrocannabinol, beginning of solid matrix composed by, at least, four seeds.

KEYWORDS: THC. *Cannabis sativa*. SPME. Marijuana. Seed.

INTRODUÇÃO

A legislação brasileira criou um sério obstáculo às instituições policiais, no que concerne à produção da prova técnica em apreensões de sementes de maconha, ao adstringir a ilegalidade ao princípio ativo da *Cannabis sativa* Linneu (maconha), o Δ^9 -tetra-hidrocanabinol (THC). A comprovação da ilegalidade é realizada pela identificação do THC, literalmente proscrito na legislação. Entretanto, quando se trata de sementes de maconha, as técnicas usualmente utilizadas não são sensíveis o suficiente para caracterizar a presença do princípio ativo. A forma utilizada pela perícia, especificamente pelo Instituto Nacional de Criminalística, para contornar o problema da identificação do THC com quantidades tão ínfimas é o plantio da semente. Após a sua germinação, são realizadas as técnicas usuais, cromatografia em camada delgada (CCD) ou cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). Em contrapartida há a argumentação dos indiciados, principalmente, nos casos em que não se comprova o plantio por parte do réu. É bastante comum a alegação de ser “passarinheiro”, onde as sementes de maconha são misturadas à ração para melhorar o canto do mesmo, principalmente em campeonatos. Talvez o caso mais notório seja a importação de 5 kg de sementes da Hungria pelo Deputado Federal Fernando Gabeira, em 1996. Foi a partir deste fato que se criou uma doutrina de plantio como metodologia para a realização da perícia, no âmbito da Polícia Federal.

A semente é capaz de germinar entre 3 e 7 dias, as primeiras folhas aparecem em torno de até 3 semanas e as florescências entre 4 e 16 semanas. Estas estimativas dependem de luminosidade, solo, temperatura e uma série de outras variáveis. No caso das instituições policiais é comum o plantio em estufas, promovendo o estresse lumínico, a adubação química, a temperatura e a umidade adequadas. Levando-se em consideração que são as inflorescências as partes da planta com maior teor de THC, é um tempo significativo para emissão de laudo, ainda mais para um laudo preliminar de constatação.

A situação pode se tornar ainda mais crítica se a apreensão contiver poucas unidades de semente. As técnicas comuns de extração utilizadas não são capazes de fornecer parecer positivo em se tratando de pequenas quantidades de semente, bem como o plantio de poucas unidades de sementes pode ocasionar em insucesso na germinação. O teor de THC nas inflorescências fica em torno de 5.000 a 50.000 $\mu\text{g/g}$, já nas sementes, em sua parte interna, mais precisamente na testa, menos que 2 $\mu\text{g/g}$. É de vital importância analisar apenas a parte interna da semente, pois o perianto está em contato com o cálice (Figura 1). O perianto é a casca da semente. O cálice, rico em THC, é parte da planta. Portanto, analisar a semente com o perianto, na verdade estar-se-á analisando o THC oriundo da planta. Guardadas as devidas proporções, fazendo uma analogia com identificações de drogas a partir de fios de cabelo, é recomendado que esta matriz seja previamente lavada para evitar contaminação, isto é, pode argumentar o fornecedor do cabelo para análise que ele entrou em contato com a fumaça de um cigarro de maconha sem ter feito uso.

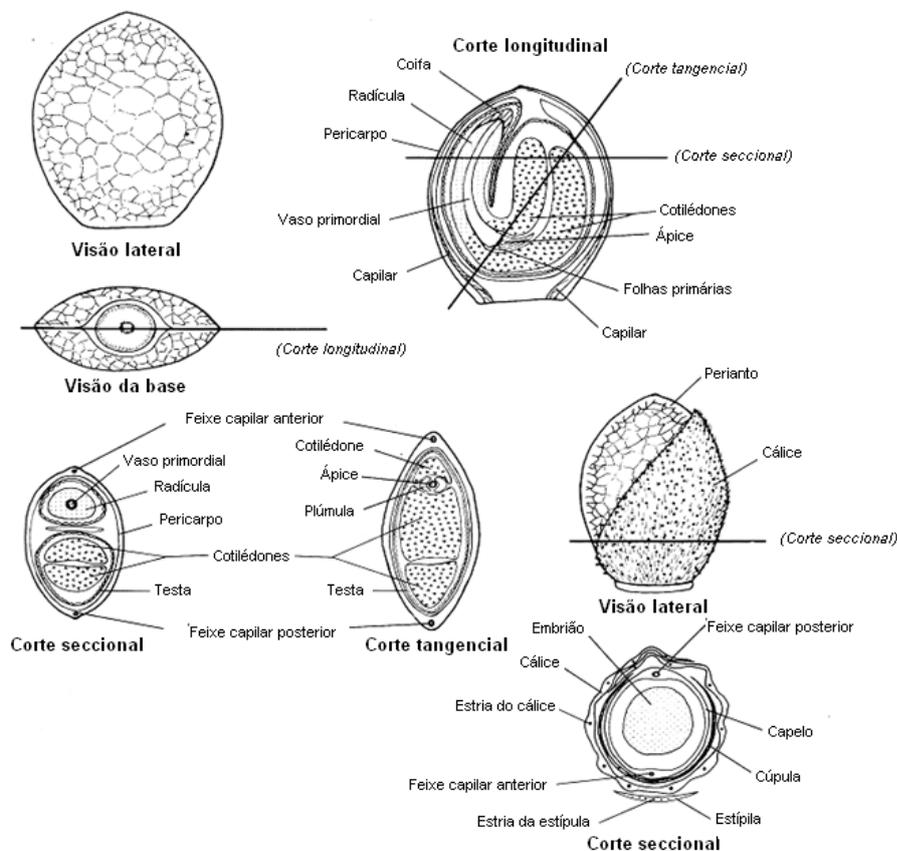


Figura 1: Anatomia da semente de maconha¹.

A proposta deste trabalho é apresentar uma forma mais rápida, sensível e eficaz de identificar as sementes de *Cannabis sativa* Linneu, pela caracterização de seu princípio ativo, evitando, assim, o demorado plantio.

Um levantamento de como é feita a análise de semente de maconha pelas diversas polícias no mundo² demonstrou que a abordagem idealizada neste trabalho é inédita e uma consequência direta da legislação local. Nos Estados Unidos, planta-se ou extrai-se do perianto para se comprovar que a semente esteve em contato com a planta. Na Inglaterra e na Alemanha as sementes não são controladas e somente são investigadas no caso de plantio ilegal, que é feito visualmente ou por cromatografia em camada delgada³. Na Austrália são feitos exames botânicos. No caso do Brasil, é essencial a identifica-

1 Baseada na obra de Clarke (1981, p. 9).

2 Por e-mail dos representantes dos países citados, membros do *Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs* (SWGDRUG), em 5 jun 2008.

3 O uso de CCD para identificação, provavelmente, é realizado em apreensões com grandes quantidades de sementes.

ção do Δ^9 -tetra-hidrocanabinol. A técnica escolhida para identificar o THC em quantidade traço é a micro-extração em fase sólida (*solid phase micro-extraction*) ou SPME. Devido à alta volatilidade do THC, decidiu-se realizar a adsorção da substância à fibra por *headspace*, ao invés da imersão direta. Isto acarreta uma preservação da instrumentação e uma desnecessidade de manipular solvente. Para a identificação propriamente dita empregou-se a técnica já consagrada de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). A união dessas duas técnicas gerou uma nova, com nome próprio, HS-SPME-GC-MS, *headspace – solid phase micro-extraction – gas chromatography – mass spectrometry*. A grande vantagem vislumbrada nesta proposta de trabalho, além das outras já apresentadas, é que toda a aparelhagem necessária para realizá-la foi disponibilizada para todas as unidades descentralizadas da Polícia Federal, através do programa PROMOTEC. Quanto aos institutos de perícias estaduais, uma parcela considerável já possui o equipamento GC-MS ou encontra-se em via de obtê-lo. O equipamento necessário para realizar a técnica SPME é relativamente barato e o custo benefício, incalculável, levando-se em conta que sua utilização pode ser empregada em diversas outras áreas da química forense.

1 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA DE DROGAS

Foram selecionadas duas normas da legislação brasileira que influenciam diretamente a produção da prova técnica no que concerne a identificação do Δ^9 -tetra-hidrocanabinol.

1.1 Lei nº 11.343, de 23 de agosto de 2006

Instituiu o Sistema Nacional de Políticas Públicas sobre Drogas (SISNAD) e não foi apenas uma nova reformulação das leis anteriores. Esta lei realmente inovou ao elaborar dispositivos com o intuito de reinserir o usuário na sociedade e abrandou as penas pelo consumo. Criou uma polêmica muito grande nos setores conservadores da sociedade e, principalmente, no meio policial. Alega-se que incentiva o tráfico de drogas, uma vez que o usuário é ineficazmente punido com penas alternativas. O Artigo 33, § 1º, II, prevê que o plantio é crime, mantendo a mesma doutrina em relação às leis anteriores, revogadas por esta norma.

Art. 33 Importar, exportar, remeter, preparar, produzir, fabricar, adquirir, vender, expor à venda, oferecer, ter em depósito, transportar, trazer consigo, guardar, prescrever, ministrar, entregar a consumo ou fornecer drogas, ainda que gratuitamente, sem autorização ou em desacordo com determinação legal ou regulamentar:

Pena - reclusão de 5 (cinco) a 15 (quinze) anos e pagamento de 500 (quinhentos) a 1.500 (mil e quinhentos) dias-multa.

§ 1º Nas mesmas penas incorre quem:

I - importa, exporta, remete, produz, fabrica, adquire, vende, expõe à venda, oferece, fornece, tem em depósito, transporta, traz consigo ou guarda, ainda que gratuitamente, sem autorização ou em desacordo com determinação legal ou regulamentar, matéria-prima, insumo ou produto químico destinado à preparação de drogas;

II - semeia, cultiva ou faz a colheita, sem autorização ou em desacordo com determinação legal ou regulamentar, de plantas que se constituam em matéria-prima para a preparação de drogas;

1.2 Portaria do Ministério da Saúde nº 344, de 12 de maio de 1998

Norma que aprova o Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial. Exige autorização especial para plantio conforme o dispositivo, entre as exceções os órgão de repressão a entorpecentes, como a Polícia Federal.

Art. 5º A Autorização Especial é também obrigatória para as atividades de plantio, cultivo, e colheita de plantas das quais possam ser extraídas substâncias entorpecentes ou psicotrópicas.

§ 1º A Autorização Especial, de que trata o caput deste artigo, somente será concedida à pessoa jurídica de direito público e privado que tenha por objetivo o estudo, a pesquisa, a extração ou a utilização de princípios ativos obtidos daquelas plantas.

Art. 8º Ficam isentos de Autorização Especial as empresas, instituições e órgãos na execução das seguintes atividades e categorias a eles vinculadas:

II - Órgãos de Repressão a Entorpecentes;

Além disto, define o Δ^9 -tetra-hidrocanabinol como substância proscrita, bem como seus isômeros e sais derivados. Os outros canabinóides não são proibidos, nem a planta propriamente dita, porém estão apenas sob controle.

2 MACONHA E SEUS CANABINÓIDES

A maconha é uma planta herbácea, dicotiledônea, diécia, isto é, possui seus órgãos reprodutivos em indivíduos distintos. Trata-se de um arbusto alto, ereto, anual, podendo atingir a altura de até cerca de 6 metros. Talvez seja uma das plantas mais disseminadas pelo mundo. Não é possível determinar sua origem, entretanto são relatados casos de seu uso há mais de 5.000 mil anos na Ásia Central e no Nordeste da Ásia. Seus usos eram e são dos mais diversos. O óleo extraído de suas sementes, similar ao óleo de linhaça, pode ser utilizado em tintas e vernizes, como combustível ou lubrificante e, até mesmo, como ração animal. Na China antiga era um dos principais alimentos sob a forma de grão. De seu caule produz-se uma fibra resistente, empregada em cordas, roupas e papel de grande durabilidade. A raiz é utilizada em remédios fitoterápicos. Atualmente suas substâncias características têm sido usadas como fármacos ou precursores. E, é claro, seu uso mais comum, como droga de abuso.

A planta é correntemente aceita como da família *Cannabiaceae* que possui um único gênero, *Cannabis*. Entretanto, existem duas correntes discordantes quanto à sua taxonomia. A mais comum e aceita é de que se trata de uma espécie única, a *Cannabis sativa*, classificada por Carl Linneu em 1753. A segunda corrente considera a existência de três espécies distintas. Além da já citada *Cannabis sativa* L., a *Cannabis indica*, classificada por Jean Baptiste Lamarck em 1783 e a *Cannabis ruderalis*, classificada por Dmitri Erastovich Janischewsky em 1924. Como as três “espécies” podem ser cruzadas, produzindo híbridos, a maior parte dos pesquisadores discorda desta distinção.

Os componentes ativos da maconha estão presentes, em maior teor, na resina por ela secretada. Esta resina possui altos teores de canabinóides e terpenos. Desta resina é feito o haxixe. É produzida em glândulas chamadas tricomas e tem como finalidade proteger a planta, principalmente de ataques de insetos e fungos.

2.1 Semente x frutos

Existe uma corrente na criminalística da Polícia Federal que aponta para a denominação das sementes de maconha seja equivocada, que se tratam, na realidade, de frutos. Esta corrente esclarece que as ditas sementes são frutos sem seu cálice persistente. Entretanto, não se verificou outro trabalho publicado em periódicos científicos com esta designação. A Divisão de Drogas e Narcóticos da Organização das Nações Unidas considera como fruto, a semente envolta por seu cálice, sendo, portanto seguida por este trabalho, conforme mostrado na Figura 2.

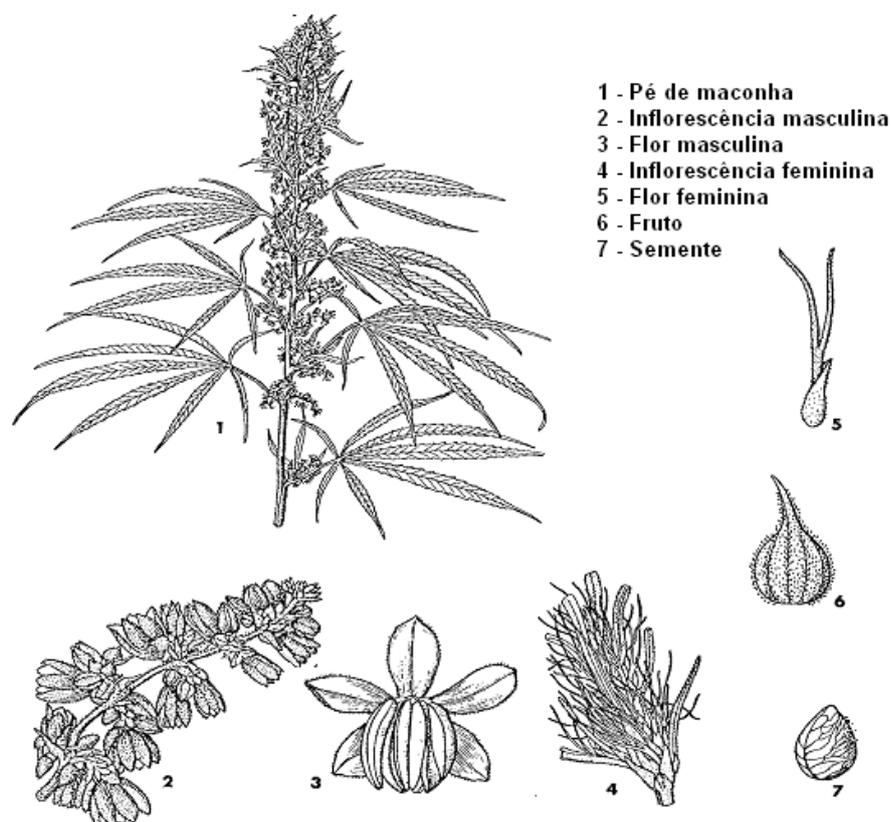


Figura 2: Anatomia da *Cannabis sativa* Linneu⁴

2.2 Canabinóides

A *Cannabis sativa* possui uma complexa variedade de substâncias químicas, atingindo um número próximo a 500 compostos conhecidos. Estes constituintes representam diversas classes como mono e sesquiterpenos, açúcares, hidrocarbonetos, esteróides, compostos nitrogenados, aminoácidos e muitos outros. A maconha é a única fonte de compostos conhecidos coletivamente como canabinóides ou fitocanabinóides. Até hoje foram catalogados 70 canabinóides. O mais conhecido é o (-)- Δ^9 -trans-(6aR,10aR)-tetra-hidrocanabinol (THC). Outros canabinóides de significância forense são o canabidiol (CBD) e o canabinol (CBN), devido a seus teores e a estudos relacionados à biossíntese do THC. Com a crescente utilização da maconha como matéria-prima para fins industriais, principalmente na Europa, a importância dos canabinóides CBN e CBD aumenta. Baseado no teor destes componentes a planta pode ser dividida em dois tipos: fibra ou droga. Por intermédio da razão entre a soma dos teores de

⁴ Baseada no manual da UN (*United Nations*, 1987, p. 21).

THC e CBN pelo teor de CBD, propõe-se esta distinção destes fenótipos.

2.2.1 Tetra-hidrocanabinol

O composto psicoativo mais importante da maconha é o (-)-trans- Δ^9 -tetra-hidrocanabinol. Trata-se de um óleo viscoso, praticamente insolúvel em água. Encontra-se em teores de até 5 % na planta, podendo chegar a 10 % no haxixe. É esta característica que lhe confere a volatilidade que facilita sua análise em cromatografia gasosa. Adere com grande facilidade a superfícies de vidro e plásticas, gerando procedimentos laboratoriais mais trabalhosos. Além de suas propriedades psicotrópicas, possui propriedades antiinflamatória, antioxidante, analgésica e antiemética.

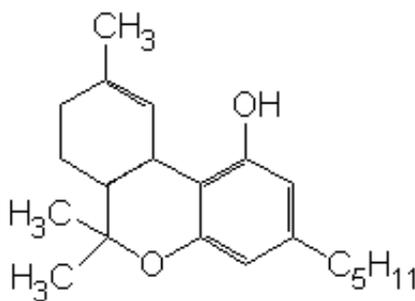


Figura 3: Estrutura molecular do THC

Outro THC não tão notório é o Δ^8 -tetra-hidrocanabinol, que possui propriedades farmacêuticas similares, porém psicotrópicas bem menos potentes que a do Δ^9 -tetra-hidrocanabinol.

2.2.2 Canabinol

Foi o primeiro composto a ser identificado na maconha em 1896, por Wood⁵. É produto da degradação do THC. Em uma maconha que seja estocada por muito tempo, verifica-se o aumento do teor do CBN e um decréscimo do teor do THC. Trata-se de sólido cristalino com ponto de fusão em torno de 76 °C. Composto pouco polar, insolúvel em água. Possui propriedades sedativas, antibióticas, anticonvulsantes e antiinflamatórias.

5 Wood, T., Spivey, W., and Easterfield, T. (1896) XL. Charas. *The resin of Indian hemp*, J. Chem. Soc. 69, 539.

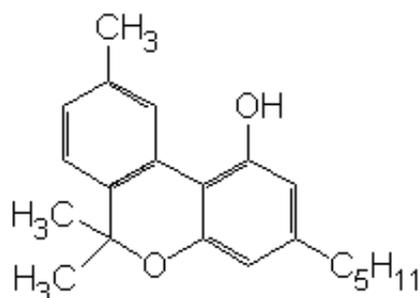


Figura 4: Estrutura molecular do CBN.

2.2.3 Canabidiol

Sólido resinoso de cor amarelo pálido com ponto de fusão em torno de 66 °C. Praticamente insolúvel em água. Possui propriedades ansiolíticas, antipsicóticas, analgésicas, antiinflamatórias, antioxidantes e antiespasmódicas. É o canabinóide mais abundante nas plantas classificadas como tipo-fibra, aplicadas para fins industriais.

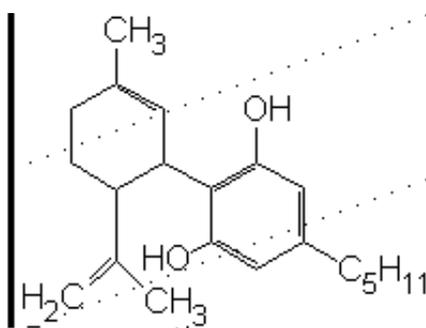


Figura 5: Estrutura molecular do CBD

3 CROMATOGRAFIA GASOSA

Uma das técnicas mais empregadas em análises quantitativas e qualitativas forenses, tanto para drogas propriamente ditas como para metabólitos fisiológicos.

A cromatografia inclui uma série de técnicas que tem em comum a separação de componentes de uma mistura através de equilíbrios resultantes na partição de espécies químicas em duas fases distintas, uma estacionária, de grande superfície, e a outra, móvel. A mistura a ser separada, bem como os analitos, podem ser classificados em sólido, líquido ou gasoso.

Este trabalho se baseia na cromatografia gasosa capilar. Um tubo de vidro oco, com espessura de um fio de cabelo, é internamente recoberto por um filme líquido com uma largura de ordem micrométrica. O conjunto é chamado de coluna cromatográfica. Este filme líquido é um polímero com características polares ou apolares, escolhido de acordo com as características da mistura que se deseja analisar. Este polímero é a fase estacionária. A mistura é dissolvida e então levada à fase gasosa por aquecimento quando introduzida no injetor do aparelho de cromatografia gasosa. Esta mistura é então carregada por um gás puro, chamado de gás carreador ou fase móvel, pelo interior da coluna cromatográfica. A mistura, como dito antes, é composta por vários componentes, os quais possuem características diferentes de polaridade e volatilidade. À medida que a mistura vai percorrendo o interior da coluna, seus componentes vão interagindo com a fase móvel. Uns, pouco interagem, outros, interagem mais, de acordo com a afinidade que possuem em relação ao polímero, fazendo com que os componentes separem-se (Figura 6). Esta partição deve-se ao fato destas espécies químicas possuírem afinidades diferentes entre estas fases, adsorvendo-se mais em uma do que em outra. O resultado desta interação é uma distribuição dos componentes da amostra nestas duas fases, resultando na separação destes componentes em bandas ou picos cromatográficos, que são definidos individualmente pelo seu tempo de retenção. Quaisquer que sejam, são requisitos necessários que os componentes das amostras sejam estáveis, que possuam uma pressão de vapor em torno de 0,1 Torr na temperatura aplicada e que interajam com o material da coluna cromatográfica (fase estacionária) e com o gás carreador (fase móvel).

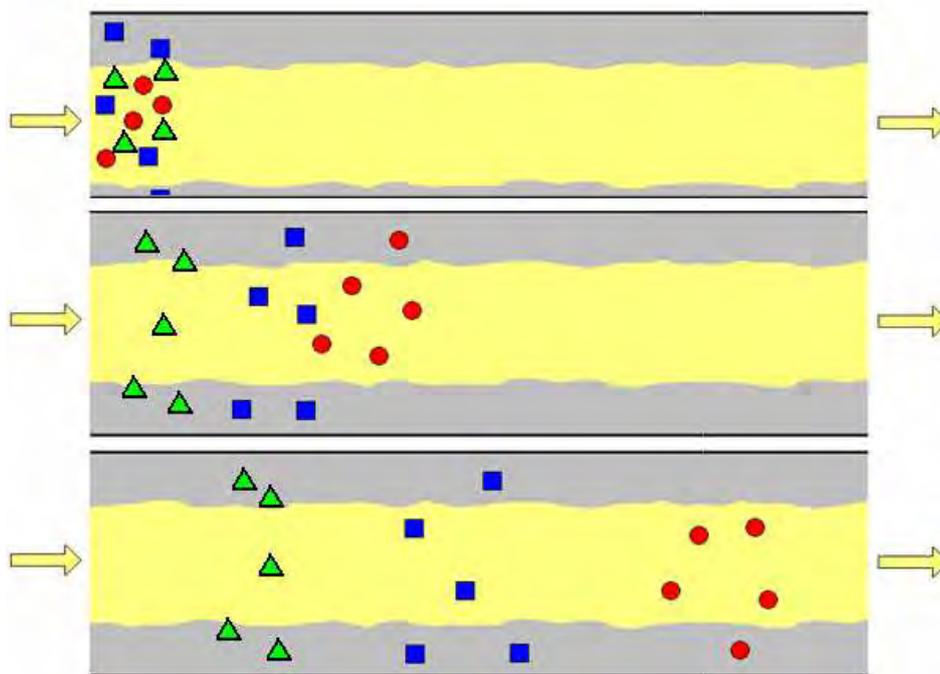


Figura 6: Separação de componentes em uma coluna cromatográfica.

Existem formas de se controlar e melhorar a separação dos componentes de uma mistura. Elas podem ser realizadas modificando-se as características físicas da instrumentação. As variáveis a serem modificadas são em relação à fase estacionária e à fase móvel. Em relação à fase estacionária pode-se alterar o tamanho da coluna, o diâmetro interno da coluna, a espessura do filme polimérico e a composição do filme sem modificar em demasia sua polaridade. Em relação à fase móvel pode-se alterar a composição do gás carreador, sua velocidade linear ou pressão e sua temperatura.

3.1 Fase estacionária

Não há como se falar em fase estacionária sem mencionar pratos teóricos. O número de prato teóricos N é o que define a eficiência de uma coluna, sendo uma função da razão entre o tempo de retenção (t_R) de certo componente de uma mistura pela largura do seu pico cromatográfico (ω), que é dada pela Equação 1. Quanto maior o número de pratos teóricos, maior será a eficiência da coluna.

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{\omega} \right)^2 \quad (\text{Equação 1})$$

Altura equivalente do prato teórico (H ou HETP) é outra medida de eficiência dada pela razão entre o comprimento da coluna (L) e o número de pratos teóricos (Equação 2). Quanto menor a altura maior será a eficiência da coluna. O comprimento da coluna está diretamente ligado ao tempo de retenção. Isto é bem claro, pois a uma dada velocidade do gás de arraste, maior será o tempo para percorrer quanto maior for a distância.

$$H = HETP = \frac{L}{N} \quad (\text{Equação 2})$$

Outra equação importante é a de Van Deemter (Equação 3), uma relação empírica entre diversas variáveis relacionadas a ambas as fases cromatográficas com a altura equivalente do prato teórico.

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \xrightarrow{A=0} H = \frac{B}{u} + Cu \quad (\text{Equação 3})$$

onde u é a velocidade linear do gás carreador

A primeira parcela (A) refere-se ao empacotamento da coluna, portanto no caso de colunas capilares não deve ser considerada. A segunda parcela (B) é pertinente à difusão da amostra na fase gasosa e seus efeitos tornam-se pronunciados apenas em baixas velocidades do gás carreador (u). A terceira parcela (C) refere-se à resistência da transferência de massa entre as fases móvel e estacionária, sendo a de maior contribuição em colunas capilares (Equação 3).



Figura 7: Representação gráfica da Equação de Van Deemter⁶

A última parcela é dividida em outras duas, referentes à fase estacionária e à fase móvel

⁶ Baseada na obra de Grob e Barry (2004, p. 55).

$$C = C_e + C_m \quad (\text{Equação 4})$$

$$C_e = \frac{2kd_f^2u}{3(1+k)^2D_e} \quad (\text{Equação 5})$$

$$C_m = \frac{r^2(1+6k+11k^2)}{D_m24(1+k)^2} \quad (\text{Equação 6})$$

onde

D_e é o coeficiente de difusão do analito na fase estacionária;

k é o fator de retenção do analito;

d_f é a espessura da fase estacionária;

D_m é o coeficiente de difusão do analito na fase móvel.

Como visto anteriormente, a eficiência da coluna é maior quanto menor for a altura do prato teórico. Portanto, de acordo com a Equação de Van Deemter, quanto menor for a espessura da fase estacionária maior será a eficiência da coluna. Analisando a Figura 7, verifica-se que existe uma medida que fornece uma melhor resposta que está relacionada com uma velocidade ótima do gás de arraste. Deve-se ter em mente que o tempo de retenção de amostra na fase estacionária é diretamente proporcional à espessura da fase estacionária (Equações 4, 5 e 6). A espessura ótima da fase estacionária está ligada ao tipo de amostra que se deseja analisar. Como existe uma grande variedade de composição de fases estacionária e dentro de cada uma delas uma série de variações de espessuras e diâmetros de colunas, a seleção de qual coluna deve ser utilizada, é baseada em resultados empíricos elaborados no decorrer dos anos de sua utilização, formando um conjunto de obras extenso realizado por diversos pesquisadores.

3.2 Fase móvel

Os fatores que mais influenciam num processo de separação por cromatografia gasosa, referente à fase móvel, são a composição, a temperatura e velocidade do gás de arraste. A Figura 8 demonstra, pelo uso da Equação de Deemter, a eficiência de uma coluna cromatográfica em relação à composição do gás de arraste e sua velocidade linear. Verifica-se uma velocidade linear ótima, dada pelo ponto mínimo da curva e conseqüentemente uma altura mínima do prato teórico. A composição do gás carreador está adstrita ao tipo de detector utilizado. No caso deste trabalho, o detector utilizado é um espectrômetro de massas, que geralmente utiliza o hélio como gás de arraste.

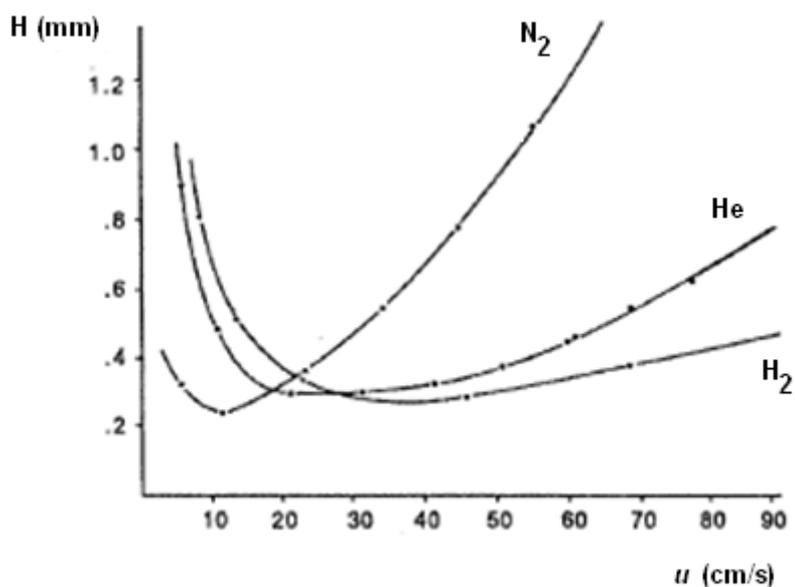


Figura 8: Perfil de gases carreadores.

A temperatura influencia diretamente na resolução da separação da mistura, isto é, na capacidade da coluna de fornecer picos cromatográficos bem separados e definidos. A programação da temperatura no decorrer da corrida cromatográfica é um poderoso instrumento para melhorar a resolução. Isto é realizado levando em conta o diferente tempo de retenção na fase estacionária das substâncias analisadas. Trata-se de um problema experimental e específico da mistura analisada e deve ser resolvido empiricamente, dependendo muito da experiência e da habilidade do analista. Por exemplo, uma mistura com dois componentes que a uma dada temperatura, ambos sejam detectados ao mesmo tempo. Verificando-se que possuem pontos de ebulição diferentes, é possível evitar a coeluição programando-se a temperatura para aquele que possui menor ponto de ebulição seja primeiro detectado. (Figura 9).

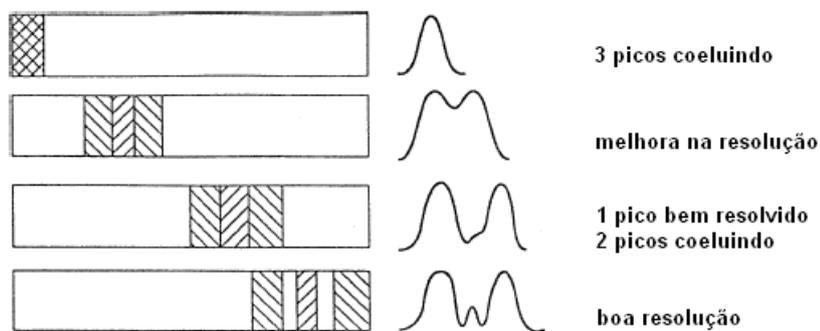


Figura 9: Resolução de picos cromatográficos⁷

⁷ Baseada na obra de Grob e Barry (2004, p. 103).

4 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massas quando acoplada à cromatografia gasosa é um dos métodos mais utilizados da química analítica (GC-MS). Além de ser usada como detector, é uma poderosa ferramenta de identificação e quantificação. Sendo utilizada há décadas fornece uma extensa bibliografia de espectros que têm por principal característica ser a “impressão digital” das substâncias químicas. Entre as diferentes técnicas utilizadas para espectrometria, a mais difundida é a de impacto de elétrons com uso de filtro quadrupolo, também utilizada neste trabalho (Figura 10). Por ser a mais popular é a que mais possui resultados publicados, isto é, com a maior biblioteca de espectros.

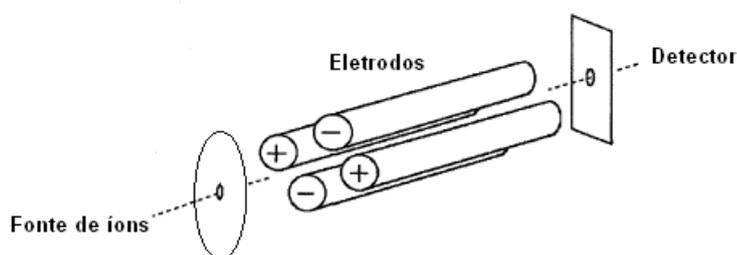


Figura 10: Esquema simplificado do Filtro Quadrupolo⁸

À medida que os componentes da mistura são separados na coluna cromatográfica, são introduzidos no espectrômetro de massas na forma de vapor, em uma câmara de vácuo. Os espectrômetros de massa devem operar em baixas pressões para minimizar as colisões entre as moléculas iônicas de forma a evitar reações químicas que mudariam sua composição. Passam então pela fonte de íons, cuja técnica é chamada de ionização eletrônica (EI), que produz um feixe de elétrons com potencial de 70 eV. Esta energia foi padronizada empiricamente, tendo em vista uma quantidade ótima de fragmentos formados. As moléculas são bombardeadas no feixe de elétrons sendo então ionizadas, podendo formar moléculas iônicas ou fragmentos iônicos (Equações 7 e 8). São esses íons que darão a forma do espectro de massas que são a impressão digital da substância química.



A Figura 11 demonstra o processo. Os íons formados possuem uma razão de massa e carga (m/z). Segue-se então para o filtro quadrupolo, formado por quatro eletrodos em barras cilíndricas paralelas, opostos em pares. Dois criam um potencial elétrico de corrente contínua e os outros dois

⁸ Baseada na obra de Grob e Barry (2004, p. 350).

de corrente alternada ou de rádio-freqüência. A combinação destes dois potenciais separa os íons em função de sua massa e carga. São criados ciclos destas combinações na quais apenas os íons com uma relação de massa e carga específica atravessam ilesos pelo filtro quadrupolo, enquanto os íons restantes colidem com as barras dos eletrodos e são destruídos.

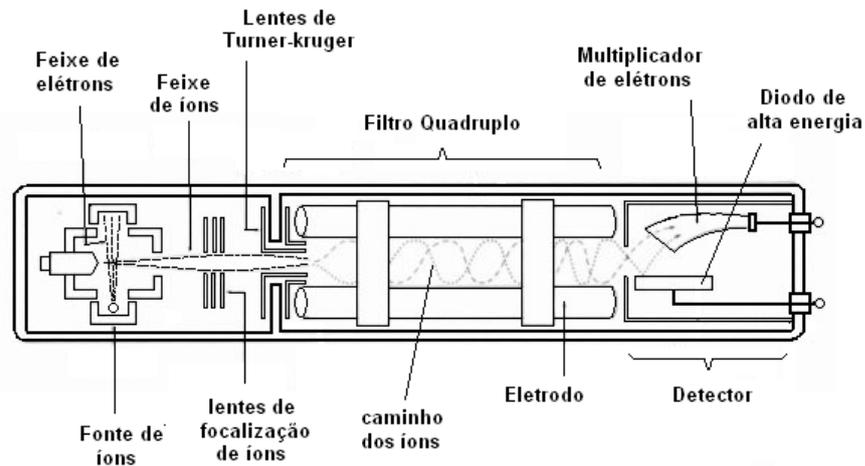


Figura 11: Esquema de um Espectrômetro de Massas⁹

Após atravessarem o filtro quadrupolo, os íons seguem para o detector. O mais comum é o multiplicador de elétron. Para cada relação de massa e carga que atravessa o filtro quadrupolo e é detectada, atribui-se uma contagem. Ao final do processo, um gráfico é criado, contendo o número de íons contados e sua reação de massa e carga, chamado de espectro de massas. Este espectro de massas é característico de uma substância, sendo capaz de identificá-la, como, por exemplo, o espectro de THC apresentado na Figura 12, abaixo.

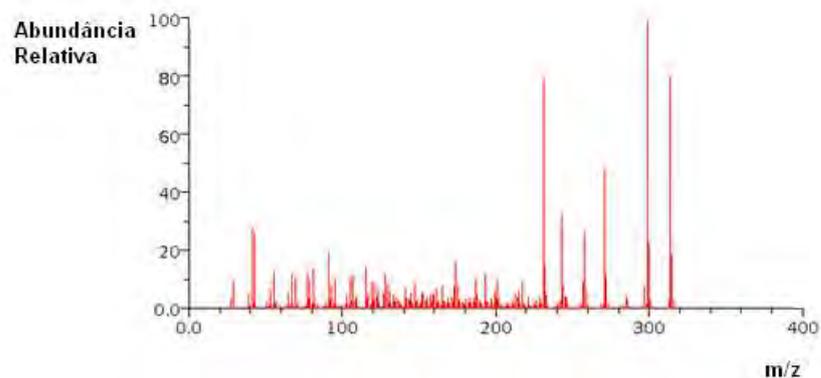


Figura 12: Exemplo de um espectro de massas do THC

9 Baseada na obra de McLafferty e Ture ek (1993, p. 9).

O método abordado é chamado de SCAN, no qual se define os limites mínimo e máximo das relações de massa e carga para montar o espectro. Possui uma quantidade mínima detectável da ordem de 10^{-12} g ou picograma (μg) no modo de impacto de elétrons (EI). Outro método existente é o chamado SIM – *selective ion monitoring* –, ou monitoramento seletivo de íon, no qual se selecionam algumas relações de massa e carga, referentes a fragmentos iônicos ou ao próprio íon molecular. Deve ser realizado quando se tem certeza do tempo de retenção da substância numa corrida cromatográfica determinada. É geralmente utilizado para componentes da mistura em quantidade traço ou para quantificação da substância, visto que é um método bem mais acurado e eficaz que o SCAN. Seu limite de detecção é da ordem de 10^{-13} g ou décimo de picograma (pg).

5 SPME

A microextração em fase sólida (SPME) é uma técnica bastante recente, que obteve um grande impacto na comunidade científica por ser rápida, de pouco custo, livre de solvente e reprodutível. Baseia-se na partição dos analitos entre a matriz da amostra e a fase de extração. Foi primeiramente desenvolvida para operar conjuntamente com a técnica de cromatografia gasosa nas análises de componentes que se apresentam com teores de traço. Nada mais é do que uma fibra ótica revestida por um filme polimérico acoplada em uma seringa cromatográfica, na qual foi implantada para ser inserida no cromatógrafo. O filme polimérico pode ter diversas composições, de acordo com o que se pretende analisar. Este filme é o responsável pela partição do analito, selecionando e concentrando por adsorção (Figura 13). Deve-se ter em mente que a análise por SPME é composta em duas fases: a primeira, de adsorção, na qual analitos são seletivamente adsorvidos e concentrados no filme polimérico, e a segunda, de extração, na qual os analitos são dessorvidos termicamente do filme polimérico. Isto é realizado com a introdução da seringa de SPME no injetor do cromatógrafo gasoso.

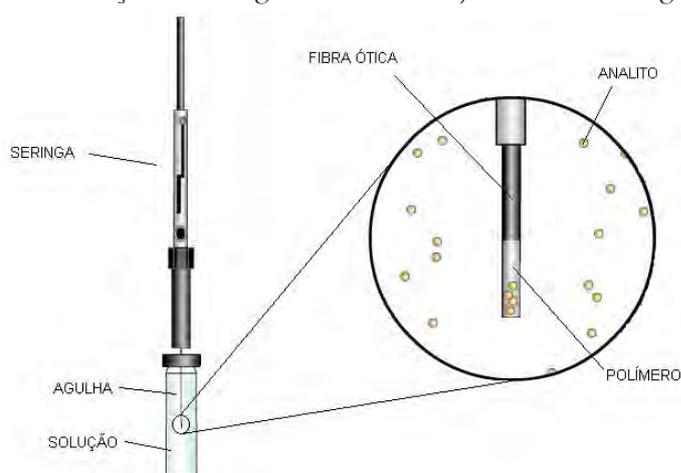


Figura 13: Representação ilustrativa de extração por SPME.

5.1 Headspace

A SPME foi inicialmente desenvolvida para realizar extrações com imersão direta, ou seja, com a introdução da fibra com filme polimérico numa solução aquosa. Posteriormente, desenvolveu-se a extração em *headspace*. É uma técnica que foi desenvolvida nos anos sessenta para a cromatografia gasosa aplicada para analitos voláteis (Figura 14). A análise é realizada apenas nos componentes gasosos de uma amostra líquida armazenada em um frasco hermeticamente fechado. Aquecimento com *salting out*, que são duas formas de favorecer a volatilização dos analitos, isto é, a sua passagem para o estado gasoso. *Salting out* nada mais é do que adicionar à solução um sal bastante solúvel que fará com que o analito de interesse torne-se menos solúvel. No caso, sendo um composto volátil, com o aquecimento passará para a fase gasosa com mais facilidade

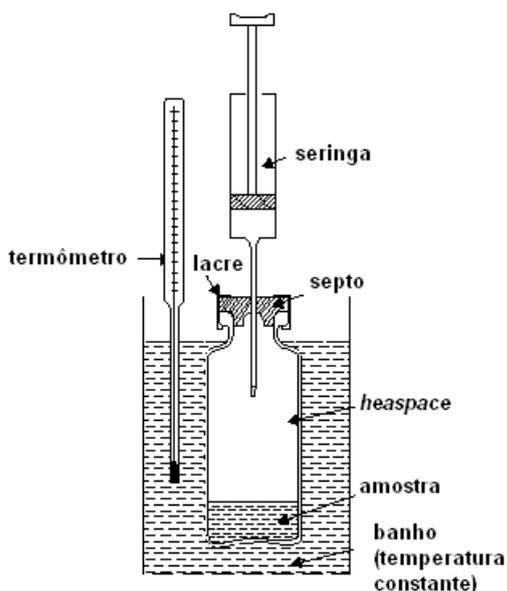


Figura 14: Representação ilustrativa de *headspace* estática¹⁰.

O fator crítico em *headspace* é a contaminação do ar na amostra analisada, seja procedente da seringa ou do frasco contenedor da amostra. Quando aliada à microextração em fase sólida, esse fator crítico desaparece.

O ineditismo deste trabalho, em grande parte, é devido à técnica de *headspace* introduzida de maneira diversa da qual foi originalmente planejada para operar com a microextração em fase sólida. A técnica *headspace* – microextração em fase sólida (HS-SPME) introduzida neste trabalho não utilizou uma matriz líquida, mas sim uma matriz sólida, as próprias sementes da maconha. Os motivos são

¹⁰ Baseada na obra de Grob e Barry (2004, p. 564).

bem simples. O THC é volátil o suficiente para passar para o estado gasoso quando aquecido, prova disso é que a forma mais comum de seu consumo é pelo fumo. A quantidade do analito de interesse nas sementes de maconha é bastante reduzida, de forma que extraí-lo numa solução para em seguida realizar um salting out haveria perda mássica, podendo comprometer o resultado. O THC é insolúvel em água, o que acarretaria extraí-lo da semente com solvente apolar, o que operacionalmente inviabilizaria o processo, visto que o filme polimérico poderia ser destruído pelo solvente.

5.2 Considerações cinéticas e otimização

A SPME é um processo baseado em equilíbrios simultâneos em sistemas multifásicos. No caso deste trabalho, um sistema trifásico ideal simples é o da fibra, da fase gasosa (*headspace*) e da matriz sólida. Entretanto, um sistema real é bem mais complexo, pois nenhum dos componentes são sistemas ideais, além de outros fatores como a possibilidade dos analitos reagirem entre si, de aderirem à parede do frasco de vidro, que é o caso, ou eventualmente ao bastão de fibra ótico, o que também é bem provável por se tratarem de materiais similares.

Num sistema trifásico ideal, antes da extração, n_0 moles do analito estariam presentes na matriz com volume V_m em uma concentração C_0 . Após o equilíbrio, terminada a extração, os n_0 mols estariam distribuídos entre as fases, isto é, n_m na matriz, n_h no *headspace* e n_f na fibra. Desta forma, a conservação de massa é dada pela Equação 9:

$$n_0 = n_m + n_h + n_f \quad (\text{Equação 9})$$

As constantes de distribuição cinéticas seriam: fibra-matriz ($K_{fm} = C_f/C_m$), fibra-*headspace* ($K_{fh} = C_f/C_h$) e *headspace*-matriz ($K_{hm} = C_h/C_m$). Fazendo um rearranjo algébrico, obtém-se a Equação 10:

$$K_{fm} = K_{fh} \cdot K_{hm} \quad (\text{Equação 10})$$

Como o número de mols n é resultado do produto entre a concentração C e o volume V , substituindo-se as constantes de equilíbrio na equação de conservação de massa, obtém a quantidade de analito extraído do sistema em equilíbrio, dado pela Equação 11.

$$n_f = \frac{K_{fm} V_f C_0 V_m}{K_{fm} V_f + K_{hm} V_h + V_m} \quad (\text{Equação 11})$$

Será esta equação que irá fornecer alguns parâmetros para a otimização do processo operacional para a análise. Deve-se levar em conta que a otimização diz respeito, fundamentalmente, a maior quantidade de analito adsorvido à fibra de SPME e a menor quantidade de tempo para alcançar o equilíbrio.

5.2.1 Otimização do volume do frasco

O volume do *headspace* está intrinsecamente ligado ao volume do frasco. A forma mais rápida de transferir o analito do *headspace* é diminuir o volume do frasco.

5.2.2 Otimização do tempo de extração

Idealmente, um sistema nunca entra em equilíbrio, desta forma o tempo de extração ótimo é infinito. Entretanto, Pawliszyn (1997, p. 212) fornece o tempo necessário para extração de 95 % da massa extraída do *headspace* (t_{95}) e função da espessura do filme (L_f) e do coeficiente do analito nesta camada (D_f), cuja relação é dada pela Equação 12. Esse tempo é definido de forma empírica.

$$t_{95} = \frac{L_f^2}{2D_f} \quad (\text{Equação 12})$$

Pode-se notar que quanto menos espesso for o filme, mais rápido será o tempo de extração. Isso porque a fibra ficará saturada mais rápida. Deve-se considerar se isso não pode ser prejudicial ao processo, por exemplo, quando quantidades muito pequenas do analito que se deseja estudar estiverem presentes. Como, muito provavelmente, ele terá que competir com outras substâncias pela partição na fibra, esta irá saturar com quantidades pequenas do analito alvo. Trata-se de uma questão experimental que deverá ser solucionada com um estudo extenso dos tipos de fibra.

5.2.3 Volume do liner

Liner é uma parte do injetor, que é a interface do cromatógrafo gasoso com o mundo exterior. É nele que é feita a injeção da amostra para ser introduzida na coluna cromatográfica, onde a mistura será separada e posteriormente seus componentes identificados no espectrômetro de massas. Criou-se para evitar problemas operacionais tais como, calibre da seringa ser grande demais para introduzi-la na coluna, gerar uma mistura homogênea com o gás carreador e evitar alargamentos de picos ou picos duplos, evitar que compostos termicamente degradados e outros tipos de sujeira contaminem a coluna. No caso, o injetor utilizado pelos aparelhos existentes no Departamento de Polícia Federal é do tipo *split/splitless*. No modo *split* determina-se a quantidade a ser purgada da amostra injetada, ou seja, a amostra é misturada ao gás carreador no injetor já aquecido e uma parte é desviada e não é lançada dentro da coluna. Com

isso poupa-se o tempo de vida da fonte de íons. Já no modo *splitless* não há a purga, sendo empregado principalmente para técnica *headspace* ou para componentes em quantidade traço.

No caso específico da SPME, o volume do *liner* estará adstrito à otimização do processo de dessorção do analito na fibra. Sendo a mesma equação aplicada para otimização do volume do frasco (Equação 11), uma vez que é o caminho inverso. Além de fornecer picos mais finos, diminui o tempo de dessorção, como demonstrado na Figura 15, a seguir.

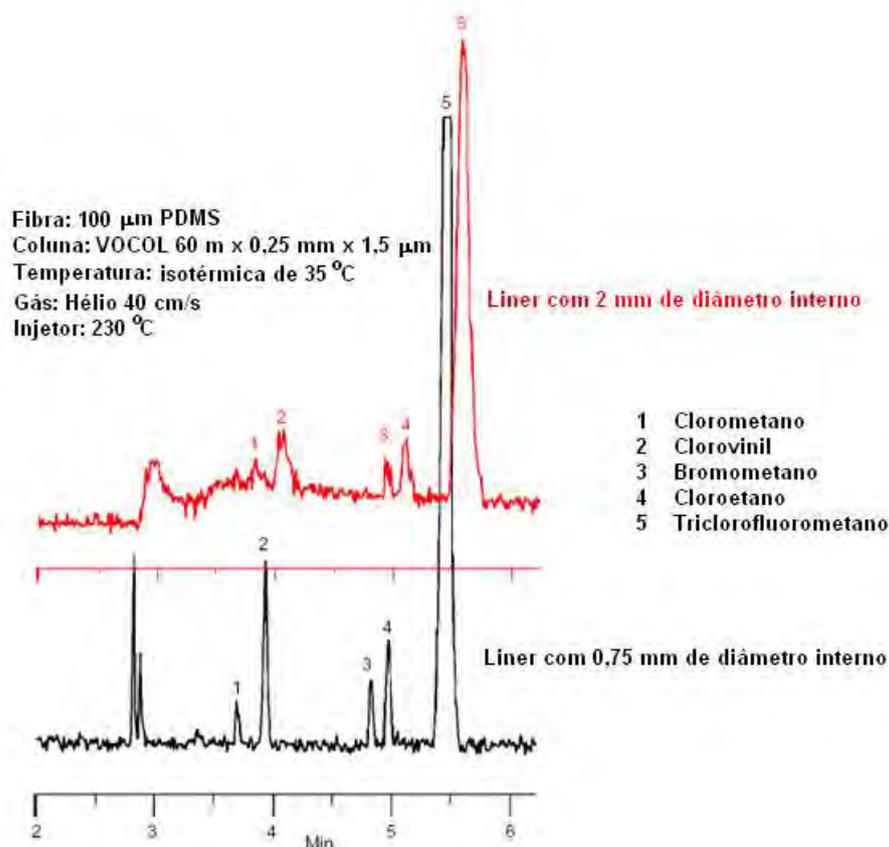


Figura 15: Efeito do diâmetro do liner na resolução de um cromatograma¹¹.

5.2.4 Temperatura de extração e de dessorção

Estes dois parâmetros são puramente experimentais, sendo a temperatura de extração mais complexa e trabalhosa. As constantes de equilíbrio referentes às partições do analitos nas diversas fases são dependentes da temperatura. Deve-se então encontrar uma temperatura ótima para que a maior quantidade mássica fique adsorvida na fibra. Em uma temperatura muito alta, o analito irá prevalecer na fase do *headspace* e em uma temperatura muito baixa, o analito predominará na matriz.

11 Baseada na figura do Boletim 923 (Supelco, 1998, p.3)

Para determinar eficientemente a temperatura de extração deve-se lançar mão de uma técnica de quantificação na qual são necessários usos de padrões primários.

Para a determinação da temperatura de dessorção, o fator crítico é a economia da fibra. Uma vez a dessorção é realizada no *liner*, que já se encontra aquecido, a tarefa não é das mais complicadas. Temperaturas altas favorecem a dessorção, devendo ficar atento ao limite de temperatura que a fibra usa pode ficar expostas sem ser danificada. Outro fator a que se deve ficar atento é o tempo de dessorção para evitar o chamado *carry-over*, ou efeito memória, que é o resíduo do analito que não é dessorvido. Deve-se trabalhar o tempo, também de maneira empírica para minimizar ou excluir o *carry-over*.

5.2.5 Seleção da fibra

Apesar de existir uma recomendação do fabricante quanto à escolha da melhor fibra para determinados tipos de analitos, entende-se ser necessário um trabalho experimental para determinar a seleção. É claro que a recomendação do fabricante deve ser usada como ponto de partida (Figura 16), uma vez que a gama de possibilidades é extensa. Pode haver impedimentos operacionais para utilizar uma determinada fibra, mesmo que ela apresente um melhor rendimento, tais como degradação térmica ou pelo uso de solventes orgânicos.

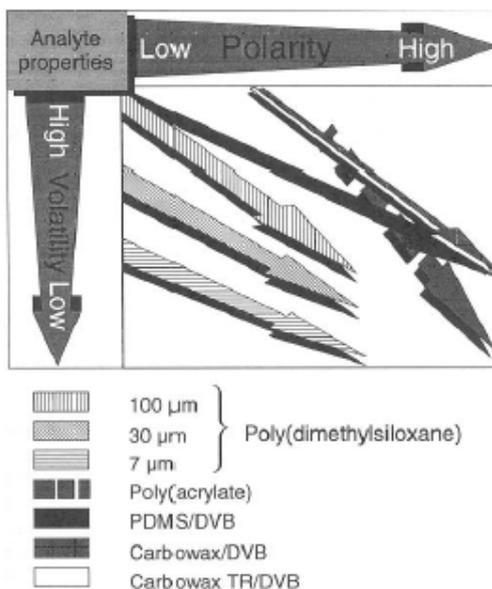


Figura 16: Diagrama para escolha da fibra de SPME¹².

12 Extraída, com permissão, da obra de Pawliszyn (1998, p. 99).

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Amostras de sementes

As sementes utilizadas neste trabalho são resultado de uma apreensão realizada na cidade de Itajaí, no ano de 2006. No local da apreensão havia plantas em diversos estágios de crescimento, realizado em estufas. Apresentava características de que havia sido feito um melhoramento genético por seleção de espécimes com produção controlada de frutos e sementes. Foram encontrados indícios de que uma das linhagens era proveniente de sementes da variedade *Bubblelicious*, do *breeder* holandês Nirvana.

6.2 Instrumentos

As análises de GC-MS foram realizadas em um cromatógrafo gasoso da marca *Agilent Technologies*, modelo 6890N, equipado com injetor do tipo *split/splitless* e coluna capilar apolar DB1-MS (100 % de polidimetilsiloxano), com 25 m de comprimento e diâmetro nominal de 0,2 mm e espessura do filme de 0,33 μm . Acoplado ao cromatógrafo, um detector seletivo de massas da marca *Agilent Technologies*, modelo 5973 *inert*. O cromatógrafo foi operado com o *software ChemStation* versão 2.00d, da *Agilent Technologies* e a identificação dos compostos foi realizada comparando os espectros de massas obtidos experimentalmente com a biblioteca eletrônica NIST-MS versão 2.0, do *National Institute of Standards and Technology*.

A extração por HS-SPME foi realizada utilizando uma seringa manual de SPME da Supelco, modelo 57330-U, equipada com fibras recobertas por filme de PDMS com 100 μm , fabricadas pela Supelco.

6.3 Procedimentos

Quatro sementes foram separadas de seu perianto e acondicionadas em frasco de vidro de 2,0 mL, sendo em seguida, trituradas. O frasco foi lacrado com tampa de alumínio e septo de teflon.

No procedimento de extração, o frasco foi pré-aquecido. Após a introdução da seringa no frasco e a liberação da fibra, a mesma foi mantida por quinze minutos a uma temperatura de 65 °C.

Imediatamente após ser retirada do frasco, a seringa foi inserida no cromatógrafo para a dessorção no *headspace*. Utilizou-se um *liner* de 2 mm de diâmetro interno, com o injetor a uma temperatura de 270 °C, no modo *pulsed splitless*, no qual foi mantida uma pressão de 35 psi por 5

minutos em modo *splitless* seguido do modo *split* com pressão de 20 psi no restante da corrida cromatográfica. A fibra ficou exposta no *liner* durante os 5 minutos de modo *splitless* evitando maiores perdas durante a dessorção.

A separação dos componentes no cromatógrafo gasoso utilizou temperatura programada para uma rampa térmica que iniciou em 50 °C por cinco minutos, com um gradiente de 15 °C por minuto até a temperatura de 260 °C. O hélio foi usado como gás carreador com um fluxo constante de 1,2 mililitros por minuto.

Na metodologia de identificação dos componentes, isto é, no espectrômetro de massas utilizou-se a temperatura de interface com o cromatógrafo a 300 °C, a temperatura da fonte de íons em 230 °C e o quadrupolo a 150 °C. O filtro quadrupolo foi utilizado nos modos SCAN e SIM, simultaneamente.

7 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O resultado das análises foi feito em triplicata e demonstrou ser uma técnica eficiente e, principalmente, reproduzível na identificação de canabinóides presentes em sementes de *Cannabis sativa*, mostrando-se capaz de identificá-las com tal. Foram identificados o canabidiol (CBD), Δ^9 -tetra-hidrocanabinol (THC) e o canabinol (CBN). Os cromatogramas (Figuras 17 e 18) apresentaram-se bem resolvidos, ao menos na área onde se encontravam os canabinóides, com picos relativamente finos e abundantes.

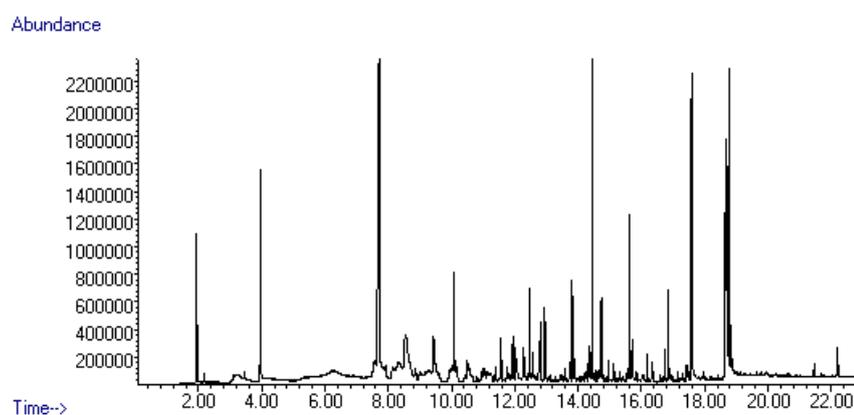


Figura 17: Cromatograma de íons totais obtido por HS-SPME-GC-MS com quatro sementes de maconha.

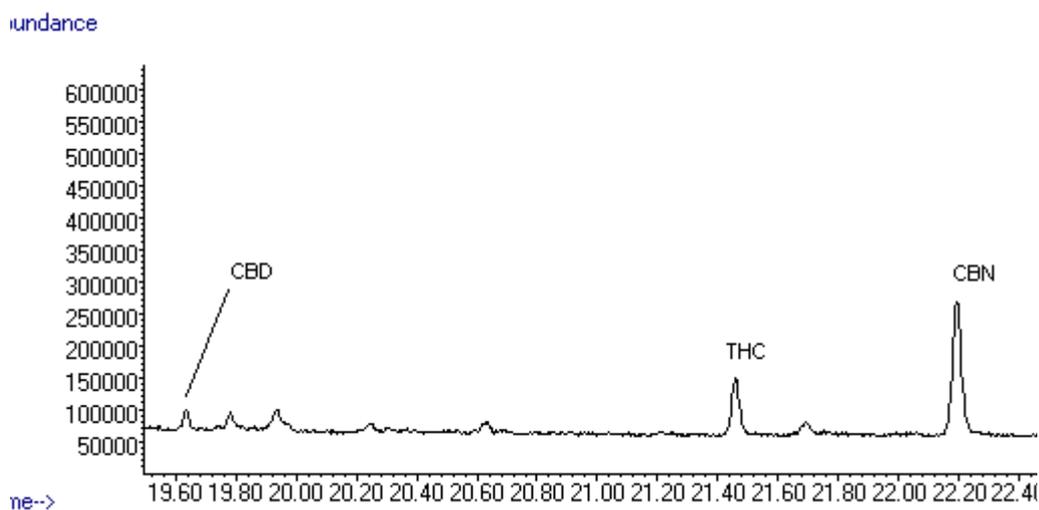


Figura 18: Cromatograma de íons totais obtido, ampliado no tempo de retenção do CBD, THC e CBN.

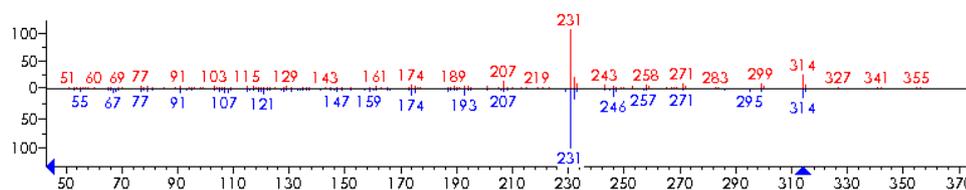


Figura 19: Espectro de massas do CBD obtido experimentalmente.

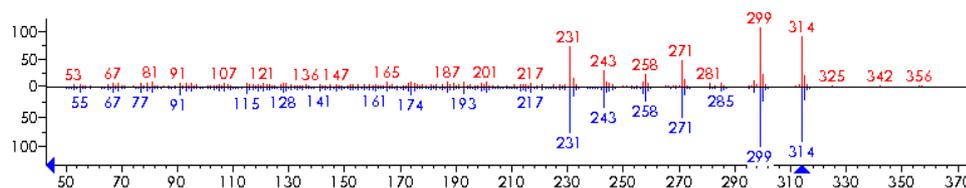


Figura 20: Espectro de massas do THC obtido experimentalmente.

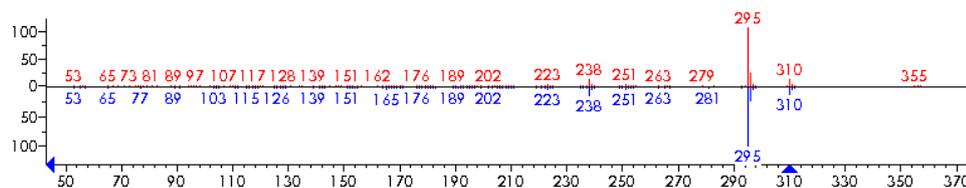


Figura 21: Espectro de massas do CBN obtido experimentalmente.

É importante relatar que os procedimentos e os resultados apresentados são fruto de um trabalho habitual que foi apresentado a este autor. Somente mais tarde, é que se verificou sua potencialidade como um projeto de pesquisa científico. Desde então foram estabelecidos esforços para adquirir materiais para a realização e otimização do processo. Infelizmente, até então, os materiais necessários não foram adquiridos pela administração, visto que se mostrou uma poderosa ferramenta para os processos operacionais da criminalística. Além disso, o GC-MS encontra-se inoperante devido à quebra de seu no-break. Portanto, todas as etapas de otimização que seriam realizadas para compor este projeto não foram realizadas, entretanto serão discutidas e apresentadas da forma que foram idealizadas.

No trabalho de Valente e Augusto (2000, p. 527) é apresentado um roteiro para desenvolvimento de um método de SPME, no qual se devem verificar as condições cromatográficas para o analito alvo, realizar estudo sobre seleção da fibra mais apropriada para o analito alvo, verificar as condições da extração

e da dessorção. O roteiro é dividido em duas partes. A primeira etapa é uma aproximação do problema representado pela matriz, que deve ser realizada com o uso de padrão primário do analito alvo:

1. Dar preferência a fibras com recobrimento menos espesso;
2. Dar preferência a extração por *headspace*;
3. Verificar a necessidade de redimensionar as condições de extração e de cromatografia;
4. Verificar se os perfis de extração podem ser aplicados nas concentrações próximas às reais, apresentadas pela matriz.

A segunda etapa é uma simulação da matriz, na qual além da amostra sintética do analito alvo, são adicionados outros padrões primários relativos aos componentes secundários da matriz para verificar:

1. Se os componentes da matriz podem contaminar ou deteriorar a fibra, impedindo análises posteriores;
2. Se as condições de extração e de cromatografia precisam ser revistas;
3. Ser viável a análise simultaneamente dos componentes da matriz;

Terminada a segunda etapa, deve-se realizar a fase experimental com a matriz, verificando se as condições anteriores precisam ser reavaliadas, e, por fim, validar o método, que consiste em estabelecer a linearidade por métodos quantitativos, a recuperação do analito proveniente da fibra, a reprodutibilidade, a comparação com outros métodos convencionais, a avaliação com amostras padrões e comparações interlaboratoriais com resultados de análises por instituições independentes.

Uma análise do que foi realizado será discutido a seguir em conjunto com o roteiro proposto. As condições cromatográficas demonstraram êxito no tempo de retenção relativo aos analitos de interesse, tanto para o THC quanto para o CBN, que se apresentaram em picos relativamente finos e bem resolvidos. A rampa térmica foi construída levando-se em conta o tempo de dessorção. Planejando um tempo de dessorção relativamente longo, 5 minutos, uma temperatura alta no início da programação provavelmente causaria picos largos e uma coeluição de muitos componentes. Isto ocorreria porque, à medida que os componentes fossem dessorvidos da fibra já seriam carreados pela fase móvel. Ao contrário, com uma temperatura baixa, 50 °C, a maioria dos componentes ficaria particionado na fase estacionária durante a dessorção. Entretanto, os analitos secundários, constituídos de substâncias mais voláteis, ficaram bastante espremidos no início do cromatograma, apresentando baixa resolução. Algo que pode ser melhorado.

A escolha do recobrimento da fibra foi bastante acertada. Levou-se em conta a recomendação do fabricante. A fibra usada, 100 μm PDMS, é recomendada para substâncias voláteis apolares, bem o caso do THC e do CBN, além de ser a que é menos afetada pela umidade, componente presente em materiais de origem vegetal. Obviamente um estudo utilizando várias fibras e um método quantitativo usando padrões primários seria o recomendado, o que não pode ser realizado devido aos problemas expostos anteriormente. Entretanto esta etapa poderia ser superada face ao trabalho de Nadulski e Pragst (2007, p. 81) no qual demonstra que a fibra escolhida foi a de melhor rendimento na extração de canabinóides (Figura 22).

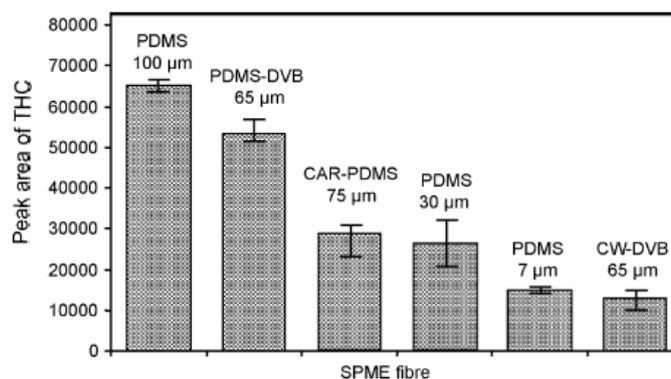


Figura 22: Escolha da melhor fibra para THC em função do rendimento da extração .

Da mesma forma deve ser tratado o estudo das condições da extração, com padrões primários e uma série de experimentos em função do tempo e da temperatura. Quanto ao volume do frasco, foi visto anteriormente que a redução do volume do *headspace* favorece a extração. Como o caso se trata de uma matriz sólida, o menor frasco disponível no mercado foi utilizado. Novamente, Nadulski e Pragst (2007, p. 82) realizaram também o estudo de otimização da extração, poupando esforços (Figura 23).

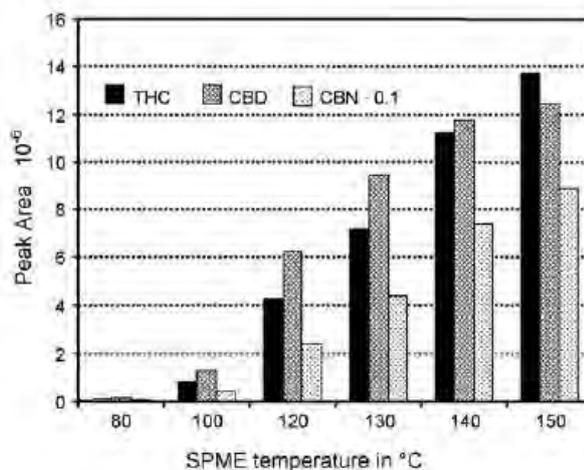


Figura 23: Otimização da temperatura de adsorção para canabinóides em função do rendimento da extração .

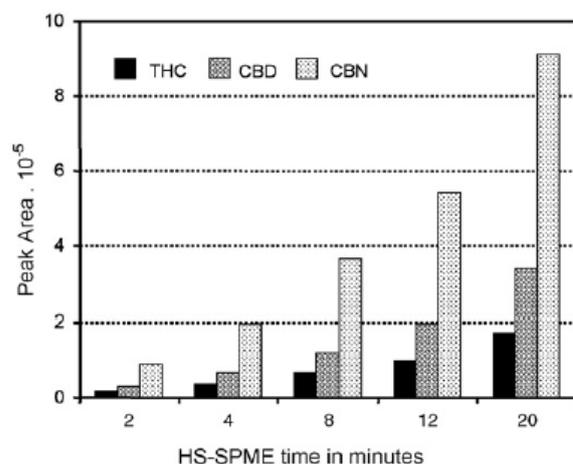


Figura 24: Otimização do tempo de adsorção para canabinóides.

Verifica-se que a temperatura aplicada em nosso trabalho acarreta um rendimento muito baixo na extração. Não obstante, o resultado deste trabalho foi positivo, demonstrando sua potencialidade. Não se deve deixar de esclarecer que no trabalho usado como modelo, a matriz era líquida, proveniente de uma digestão de fios de cabelo de usuários da droga. A baixa temperatura usada para a extração deve-se em parte à falta de material adequado. Para aplicar uma temperatura mais alta e mantê-la homogênea por todo o frasco, garantindo a eficácia torna-se necessário o uso de uma camisa ou banho de óleo. Outro fator determinante para a escolha de uma temperatura mais baixa foi a reatividade do THC. Visto anteriormente, o THC naturalmente degrada em CBN com o decorrer do tempo, o que também se reflete quando a temperaturas altas. Pode-se verificar na Figura 24 que a extração de CBN aumenta exponencialmente enquanto o THC aumenta linearmente. O tempo, no entanto, foi próximo ao deste trabalho.

A otimização da dessorção deve levar em conta dois fatores: estabilidade térmica da fibra e *carry-over*. Quanto maior a temperatura, mais rápida será a dessorção, implicando que a temperatura de dessorção será a máxima à que a fibra pode ser exposta, de acordo com as informações do fabricante. Isto foi aplicado neste trabalho e também é visto em praticamente todos os trabalhos publicados em periódicos científicos. Quanto ao *carry-over*, a chave para evitá-lo é o tempo. Entretanto, deve-se pesar entre minimizá-lo e comprometer a eficiência e a resolução da corrida cromatográfica. Um tempo de dessorção muito longo, certamente, irá comprometer o cromatograma. Desta vez, Hall *et alli* (1998, p. 1791) que ratifica o tempo de dessorção aplicado (Figura 22).

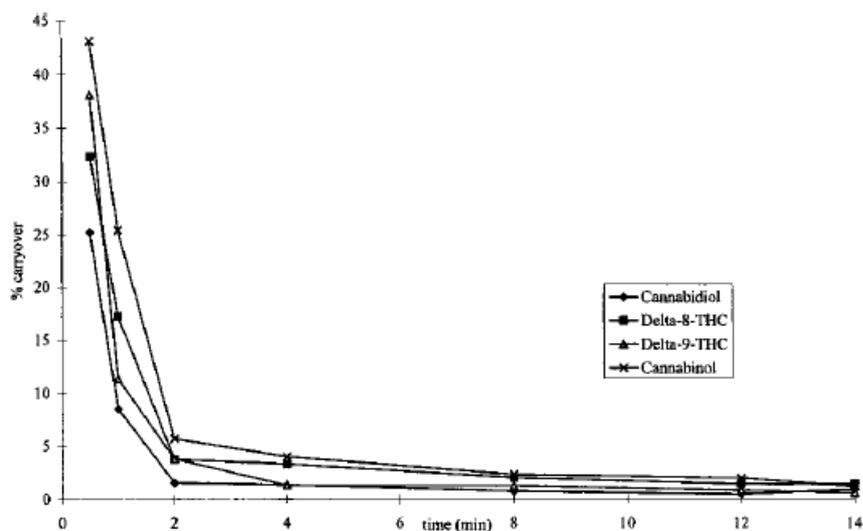


Figura 25: Otimização do carry-over em função do tempo de dessorção.

Apesar dos bons resultados colhidos, muito poderia ter sido melhorado em relação ao aspecto do cromatograma e ao *carry-over*, que sempre foi um fator crítico nas análises. Aponta-se a causa desses problemas como um *liner* de diâmetro e volume altos. Foi utilizado um *liner* de 2 mm de diâmetro ao invés do 0,75 mm recomendado. Para tentar contornar esse obstáculo, aplicou-se o modo *pulsed splitless* no qual a pressão do *liner* é aumentada por certo período de tempo no modo *splitless*, no caso o tempo de dessorção. Aumentando-se a pressão do *liner*, aumenta-se também a velocidade do gás. Foi uma tentativa de simular um *liner* mais fino, que aparentemente rendeu frutos, porém nada melhor que trabalhar com o material recomendado. O modo *splitless* é fundamental no uso de SPME, uma vez que evita perdas de massa para a purga, ainda mais quando se analisa componentes com concentrações muito baixas.

As duas etapas do roteiro recomendado, citado anteriormente, foram parcialmente seguidas, devido, principalmente, à falta de material. O que vale a pena ser citado, que já não tenha sido discutido, é em relação à simulação da matriz. Devido à ausência de padrões primários, tanto do analito alvo como dos analitos secundários, fez-se, realmente, um estudo antes de abordar a técnica com a matriz de interesse. Simularam-se os componentes da semente utilizando-se inflorescências, que em princípio, seriam originárias da mesma linhagem. Os resultados mostraram-se promissores, o que incentivou a realização do projeto. Deve-se considerar que a simulação de uma matriz proveniente de um material vegetal é bastante complexa, visto a existência de uma miríade de compostos, muitos ainda nem identificados.

Outro ponto é a validação do método. Entre os estágios necessários para a validação está a comparação com outros métodos tradicionais. Não obstante haver um consenso, principalmente, na criminalística da Polícia Federal, de que a extração por solvente do THC proveniente de sementes de maconha é infrutífera, realizou-se um estudo, visto que esta técnica nunca havia sido relatada. Também gerou resultados negativos, acredita-se que devido à pequena amostragem utilizada, uma vez que Lachenmeier *et alli* (2004, p. 183-189) relata análises positivas para ambos os casos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A despeito das dificuldades encontradas no decorrer deste projeto, isto é, a ausência de materiais essenciais e a inoperância do GC-MS, os resultados obtidos mostraram-se consistentes para disseminar a técnica no âmbito da criminalística brasileira e, fundamentalmente, na Polícia Federal.

Em primeiro lugar porque os materiais básicos necessários para sua implementação já estão disponíveis na maioria dos Setores Técnicos-Científicos das unidades descentralizadas da Polícia Federal e em alguns institutos de periciais estaduais, ou seja, a seringa e as fibras de SPME, bem como os cromatógrafos e espectrômetros de massa. A aquisição de outros materiais necessários como vials e *liners* específicos para SPME, camisas para aquecimento do vials e guia para a seringa não compõem um investimento alto .

Segundo lugar, trata-se de uma técnica barata, rápida, simples e sem uso de solvente. Como foi demonstrada, a aplicação da técnica emprega poucas horas de trabalho, utilizou apenas quatro sementes de maconha, sem necessidade de extração por solvente. Em contrapartida, o plantio das sementes e a colheita das inflorescências acarretariam em semanas de espera, sem mencionar a extração do THC por solvente para injeção no GC-MS.

Em terceiro lugar, a SPME pode ser aplicada em vários outros campos da criminalística, tais como perícias ambientais, balística forense, medicina legal, etc. Inclusive seu desenvolvimento foi aplicado na área ambiental (Pawliszyn e Arthur, 1990, p. 2145).

Mesmo diante de resultados expressivos, não há como considerar o processo finalizado, até porque foi interrompido por causas exógenas em seu estágio mais importante, que é sua otimização. A SPME provou ser uma técnica eficiente para o problema, entretanto não se foi capaz de torná-la mais eficiente. Pretende-se, portanto, realizar os estudos necessários para este fim, abordando as variáveis relativas ao volume do *headspace*, tempos e temperaturas de extração e dessorção, bem como, reavaliar novos parâmetros em cromatografia.

Paradoxalmente, o Setor Técnico-Científico de Santa Catarina está em vias de obter certificação junto a Organização das Nações Unidas, por intermédio do escritório de combate a crimes e entorpecentes, *United Nations Office on Drugs and Crime* – UNODC. Neste convênio o SETEC/SC irá receber padrões primários de drogas, entre eles de canabinóides, o que propiciará uma alavancagem neste estudo. Além disso, o processo de licitação para a compra de materiais para SPME está em vias de terminar, o que completa os requisitos necessários para tornar o projeto completo.

Outras aplicações têm sido idealizadas para a SPME é na área de perícia. Pretende-se realizar um estudo quanto à potencialidade em se identificar e, talvez, quantificar explosivos por intermédio da análise de seus resíduos em solos e outros suportes. Estudos de insumos químicos utilizados para o refino de cocaína e drogas sintéticas como ecstasy têm sido ventilados. Já se realizou trabalho referente a disparo de arma de fogo no SETEC/SC utilizando SPME, o que também pode se tornar fonte de novos projetos científicos.

Com exceção das apreensões de drogas, que geram grandes volumes de material para análise, as outras áreas de perícias em química forense, geralmente apresentam analitos de interesse em quantidades ínfimas. A microextração em fase sólida tem se apresentado como uma poderosa ferramenta para análise de componentes-traço. Este trabalho, possivelmente pioneiro na área da segurança pública, é uma contribuição para alertar e difundir esta nova técnica, que apresenta um futuro promissor nas investigações policiais.

REFERÊNCIAS

- CLARKE, R. C. *Marijuana Botany. An Advanced Study: The Propagation and Breeding of Distinctive Cannabis*. Oakland: Ronin Publishing, 1981.
- ELSOHLY, M. A. *Marijuana and the cannabinoids*. Totowa: Humana Press Inc., 2007.
- ELSOHLY, M. A., SLADE, D. "Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids." *Life Science*, V. 78, 2005, p. 539-548.
- FUCCI, N., DE GIOVANNI, N., CHIAROTTI, M. "Simultaneous detection of some drugs of abuse in saliva samples by SPME technique." *Forensic Science International*, V. 134, 2003, p. 40-45.
- GROB, R. L., BARRY, E. F. *Modern practice of gas chromatography*. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2004.
- HALL, B. J., SATTERFIELD-DOERR, M., PARIKH, A. R., BRODBELT, J. S. "Determination of Cannabinoids in Water and Human Saliva by Solid-Phase Microextraction and Quadrupole Ion Trap Gas Chromatography/Mass Spectrometry." *Analytical Chemistry*, V. 70, N. 9, 1998, p. 1788-1796.
- LACHENMEIER, D. W., KROENER, L., MUSSHOFF, F., MADEA, B. "Determination of cannabinoids in hemp food products by use of headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry." *Anal Bioanal Chem*, V. 378, 2004, p. 183-189.
- MCLAFFERTY, F. W., TURECEK, F. *Interpretation of Mass Spectra*. Sausalito: University Science Books, 1993.
- NADULSKI, T., PRAGST, F. "Simple and sensitive determination of delta-9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol in hair by combined silylation, headspace solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry." *Journal of Chromatography B*, V. 846, 2007, p. 78-85.
- PAWLISZYN, J. *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*. Waterloo: Wiley-VHC, Inc., 1997.
- PAWLISZYN, J., ARTHUR, C. L. "Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption using fused silica optical fibers." *Analytical Chemistry*, V. 62, 1990, p. 2145-2148.
- SOCIETY OF HAIR TESTING. "Recommendations for hair testing in forensic cases." *Forensic Science*

International, V. 145, 2004, p. 83-84.

SPORKERT, F., PRAGST, F. "Use of headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) in hair analysis for organic compounds." *Forensic Science International*, V. 107, 2000, p. 129-148.

SUPELCO. "Solid Phase Microextraction: Theory and Optimization of Conditions". *Bulletin 923*, 1998. Disponível em <http://www.sigmaaldrich.com>. Acesso em 04 set 2008.

UNITED NATIONS. "Recommended Testing for Cannabis". 1987 Disponível em <http://www.unodc.org>. Acesso em 28 ago 2008.

VALENTE, A. L. P., AUGUSTO, F. "Microextração por fase sólida." *Química Nova*, V. 23, N. 4, 2000, p. 523-529.

YONAMINE, M., TAWIL, N., MOREAU, R. L. M., SILVA, O. A. "Solid-phase micro-extraction-gas chromatography and headspace-gas chromatography of tetrahydrocannabinol, amphetamine, methamphetamine, cocaine and ethanol in saliva samples." *Journal of Chromatography B*, V. 789, 2003, p. 73-78.