

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR



**METODOLOGIA MOLECULAR PARA
CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE *Cannabis sativa*
L. APREENDIDAS PARA USO EM GENÉTICA FORENSE**

FLÁVIA OLIVEIRA RIBEIRO

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Julho de 2013

FLÁVIA OLIVEIRA RIBEIRO

**METODOLOGIA MOLECULAR PARA CARACTERIZAÇÃO DE
AMOSTRAS DE *Cannabis sativa* L. PARA USO EM GENÉTICA
FORENSE**

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para obtenção
do título de Mestre em Genética e
Biologia Molecular.

Área de concentração: Genética e
Biologia Molecular.

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Julho de 2013

FLÁVIA OLIVEIRA RIBEIRO

METODOLOGIA MOLECULAR PARA CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE
Cannabis Sativa L. PARA USO EM GENÉTICA FORENSE

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para obtenção
do título de Mestre em Genética e
Biologia Molecular.

Área de concentração: Genética e
Biologia Molecular.

APROVADA:

Prof. Dr. Antônio Carlos de Oliveira
UESB

Prof. Dr. Marco Antônio Costa
UESC

Prof. Dra. Amanda Mendes
(UESC)

Prof. Dr. Fabrício Rios-Santos
(UESC- Orientador)

DEDICATÓRIA

A minha filha JÚLIA, fonte inesgotável de estímulo para minhas batalhas. Para que ela sempre se orgulhe da mãe que tem.

A meus pais, MOACIR e VERA, e a minha avó VERONILDES, pelo exemplo de AMOR, INCENTIVO E CONFIANÇA.

A meus irmãos Ricardo e Vinícius, por acreditarem sempre em mim.

A meu marido Thiago, pelo amor e compreensão na realização dos meus sonhos.

A família Ribeiro, pelos momentos de descontração e amor mútuo em nossas maravilhosas reuniões.

A meu avô Manoel Ribeiro (*in memorium*) pelo exemplo de honestidade, amor e simplicidade passado de geração a geração.

EPÍGRAFE

*"A maior parte das coisas importantes no mundo foram realizadas por pessoas que continuaram tentando quando parecia não haver esperança de modo algum."
Dale Carnegie*

AGRADECIMENTOS

Ao meu amado Deus, em primeiro lugar pela vida e saúde.

A Universidade Estadual de Santa Cruz e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade da realização do curso.

Ao Departamento de Polícia Técnica da Bahia / Secretaria de Segurança Pública pela oportunidade de crescimento profissional.

À 1ª Vara Crime de Tóxicos e Entorpecentes de Itabuna, nas pessoas de Murilo Staut Barreto e Antônia Marina Faleiros, juízes de direito que acreditaram no meu projeto me autorizando a realizá-lo.

Ao prof. Dr. Fabrício Rios-Santos pela orientação, incentivo, compreensão e paciência em todos os momentos dessa jornada.

Aos professores Dr. Ronan Xavier Correa e Dra. Fernanda Amato Gaiotto, pela orientação, compreensão e ajuda, agradeço sempre.

À professora Dra. Marcia Valéria F. L. Diederich pela ajuda com questões burocráticas junto ao DPT.

À professora Dra. Simone Gualberto pela amizade e ajuda nas horas difíceis dos testes de protocolo e no incentivo ao longo da caminhada.

Ao ex-bolsista de iniciação científica, hoje mestrando do Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Luciano Gama pela dedicação e apoio sempre.

Aos colegas de laboratório Ivan, Jeiza, Mariana, Elaini, Dani, Samuel, Alan, Fernanda.

Aos orientandos do Prof. Ronan Xavier, Douglas e Lucas Ferraz, meu eterno obrigada, sem a ajuda de vocês não teria conseguido.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular pelos ensinamentos.

Ao grupo LAFEM, pelo acolhimento.

À Coordenação e aos funcionários do Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, principalmente Fabrícia, pelo imprescindível apoio.

ÍNDICE

EXTRATO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 A <i>Cannabis sativa</i> LINNEU.....	5
2.2 Identificação de <i>C. sativa</i> L. na rotina de Laboratórios Forenses.....	7
2.3 Perspectivas Futuras para a Identificação/Individualização de <i>C. sativa</i> L.....	8
2.3.1 Métodos baseados em Polimorfismos de DNA.....	8
2.3.2 Métodos de extração de DNA genômico.....	10
3. MÉTODOS.....	12
3.1 Obtenção de amostras de tecido vegetal verde e seco.....	12
3.2 Comparação entre dois métodos de extração e quantificação de DNA genômico.....	12
3.3 Amplificações com marcadores RAPD.....	13
3.4 Amplificações com marcadores Microsatélites.....	14
3.5 Otimização do PCR e genotipagem dos microsatélites.....	14
3.6 Análises genético-estatísticas dos dados moleculares.....	16
3.6.1 Teste dos protocolos de extração.....	16
3.6.2 Genética Descritiva e Análises de Agrupamento.....	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
4.1 Obtenções das amostras.....	17
4.2 Comparação entre dois métodos de extração e quantificação de DNA genômico.....	17
4.3 Amplificações com marcadores RAPD.....	20
4.4 Estatística e Análise dos dados.....	22
4.4.1 Genética Descritiva.....	22
4.4.2 Métodos de Agrupamento.....	23
5. CONCLUSÕES.....	25
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
7. ANEXO.....	31

EXTRATO

RIBEIRO, Flávia Oliveira, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, agosto de 2011. **Metodologia molecular para caracterização de amostras de *Cannabis Sativa* L. para uso em genética forense.** Orientador: Fabrício Rios Santos. Co-orientador: Ronan Xavier Corrêa. Colaboradora: Fernanda Amato Gaiotto.

Planta oriunda da Ásia, a *Cannabis sativa* L. é popularmente conhecida por maconha. Constitui importante droga ilícita. Dentre seus princípios ativos, destaca-se Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC), o mais ativo e responsável por sua ação psicotrópica. Com a permissão de alguns países para o cultivo de *C. sativa* de baixos teores de THC como fonte de fibras e óleos essenciais, a jurisprudência atual brasileira fortalece a correta caracterização das amostras através de identificação botânica e exames químicos para a detecção do Δ -9-THC uma vez que não é permitido por lei no Brasil. Por outro lado, os métodos químicos apresentam limitações quando as amostras apreendidas apresentam-se em quantidade diminutas ou foram submetidas ao armazenamento prolongado. Além disso, tais exames não são capazes de individualizar e/ou correlacionar as amostras. Sendo assim, técnicas de análise molecular capazes dessa individualização como RAPD, AFLP, RFLP e microssatélites estão sendo investigados para o uso forense, e podem auxiliar na investigação policial uma vez que pode estabelecer elo entre os centros produtores e consumidores da droga. De particular interesse forense, a análise de microssatélites em amostras de *C. sativa* oferece vantagens na obtenção da assinatura molecular devido a sua capacidade em identificar quantidades significativas de variações no DNA. Esse estudo utilizou amostras de *C. sativa* recebidas no Departamento de Polícia Técnica de Itabuna, sendo resultado de apreensões e encaminhadas para análise pericial. Inicialmente foram comparados dois métodos de extração de DNA genômico, método CTAB e método para DArT. Após quantificação e amplificação com iniciadores RAPD, constatou-se que ambos os métodos apresentaram padrão similar entre os produtos extraídos. Uma vez que não houve diferença significativa entre os métodos optou-se por usar o protocolo CTAB. Para onze locos de iniciadores microssatélites de *C. sativa* foram detectados 153 locos microssatélites com a média de 13,9 alelos por loco, havendo loco mais polimórfico, com 18 alelos por loco e H_o 0,98, e loco menos polimórfico, com 09 alelos por loco e H_o 0,18. Os métodos de agrupamento aplicados as amostras e relacionando com as suas cidades de origem, mostraram uma alta similaridade entre as amostras de Itabuna com

as das cidades circunvizinhas. Este trabalho marca o passo inicial para a adequação de técnicas moleculares para *C. sativa* na rotina forense da Bahia.

Palavras chave: *C. sativa*, extração, microssatélites, Bahia

ABSTRACT

RIBEIRO, Flávia Oliveira, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Julho de 2013. **Molecular methodology for sample characterization of *Cannabis Sativa* L. for forensic genetics application.** Advisor: Fabrício Rios Santos. Advisory Committee Members: Ronan Xavier Corrêa. Colaboradora: Fernanda Amato Gaiotto.

Originated in Asia the *Cannabis sativa* L. is popularly known as marijuana. It is an important illicit drug. Among the active substances in *C. sativa*, there is Δ -9-tetrahydrocannabinol (THC), the most active and responsible for its psychotropic action. With the resurgence of interest in the cultivation of *C. sativa* with low levels THC as a source of fiber and essential oils, the jurisdiction requires the correct characterization of the samples through botanical identification and chemical tests for the detection of Δ -9-THC. On the other hand, chemical methods have limitations when the samples are presented in tiny amounts or have been subjected to prolonged storage. In addition, such tests are not able to individualize and / or correlate the samples. Thus, molecular analysis techniques efficient in individualization as RAPD, AFLP, RFLP and microsatellites are being investigated for forensic use, and may assist in police's investigation as it may establish a link between the crop and the consumers of the drug. The particular interest in forensic analysis of microsatellites in samples of *C. sativa*. offers advantages in obtaining a molecular signature because of its ability to identify significant amounts of variations in DNA. This study used samples of *C. sativa*. received in the Departamento de Polícia Técnica of Itabuna, resulting from seizures and sent for forensic analysis. Initially we compared two methods to extraction of genomic DNA, CTAB and DART. After quantification and amplification with RAPD primers, it was found that both methods were similar in the products extracted. Since there was no significant difference between the methods, the CTAB protocol was chosen. Using eleven primers for microsatellite loci from *C. sativa* we detected 153 microsatellite loci, showing the most polymorphic locus with eighteen alleles per locus and H_o 0.98 and the less polymorphic locus with nine alleles per locus and H_o 0.18. The clustering methods applied to the samples aiming at correlating their cities of origin, showed a high similarity between samples by Itabuna with the surrounding towns. This work signalize an initial step towards the suitability of molecular techniques to *C. sativa* in routine forensic of Bahia.

Words key: *C. sativa*, extraction, microsatellites, Bahia.

1 INTRODUÇÃO

Planta de origem asiática, a *Cannabis sativa* LINNEU é popularmente conhecida como maconha, marijuana, erva, erva maldita, entre outras denominações. As flores e as inflorescências da planta produzem em maior escala um grupo de substâncias chamadas canabinóides, sendo o Δ -9-tetrahydrocannabinol (Δ -9-THC ou simplesmente THC) o principal componente psicoativo. A portaria nº 344/98 da Vigilância Sanitária – Ministério da Saúde (SVS/MS), relaciona a *C. sativa* na Lista E (Lista de plantas que podem originar substâncias entorpecentes e/ou psicotrópicas) e o THC na Lista F2 (Lista de Substâncias Psicotrópicas). A utilização da *C. sativa* através da queima das folhas e inflorescências e inalação dos vapores contendo Δ -9-THC leva o usuário a experimentar sensações de bem estar, as quais vêm acompanhadas de estados alucinatorios e exaltação imaginativa. Há na literatura relatos de entorpecimento gradativo, perturbação psicomotora, aumento de apetite, aumento do peso e perda de noção de espaço e tempo. O usuário crônico pode adquirir problemas pulmonares, cardíacos, neurológicos, reprodutivos, hepáticos, imunológicos e gastrintestinais (IVERSEN, 2000).

A reação ao consumo da *C. sativa* e outras substâncias psicotrópicas ganhou força a partir do final do século XVIII e início do século XIX. Em se tratando de *C. sativa*, contribuiu para isso os relatos de quadros depressivos e o desenvolvimento de características psicóticas entre os usuários. A partir de 1910, diversas substâncias se tornaram ilícitas nos Estados Unidos da América, sendo esta conduta seguida por países da Europa e demais países das Américas. No final da década de 30, a *C. sativa* já estava proibida por lei em vários países do mundo (BONNIE, 1970).

Algumas variedades da *C. sativa* descritas na literatura possuem baixa concentração de canabinóides, sendo utilizadas como fonte de fibras e óleos. Alguns países permitem o cultivo dessas variedades para a finalidade industrial. No entanto, a despeito das várias possibilidades de aplicações para a *C. sativa*, o uso, o cultivo e a posse da planta, independente do teor de canabinóides, são proibidas pela lei em muitos países, inclusive no Brasil (BRASIL, 2006).

A função de repressão contra as drogas tem como eixo estratégico a produção de provas materiais contra o delito. A prova pericial é um importante meio de materialidade do crime, sendo essencial para elucidação dos fatos e tipificação do crime.

As atividades de investigação, apreensão, identificação e caracterização dos materiais entorpecentes apreendidos, cabem a Secretaria de Segurança Pública de cada estado da federação. Especificamente na Bahia, o órgão subordinado a secretaria de segurança destinado a produção das provas materiais é o Departamento de Polícia Técnica, que está seccionado em Institutos de acordo com as áreas de atuação (perícias médicas e necroscópicas, odonto-legais, laboratoriais, de identificação e criminalísticas). A Institucional Diretoria do Interior (DI) tem por finalidade coordenar, supervisionar e controlar as ações da Polícia Técnica no interior do estado. Distribuídas em seis Grandes Regionais (Recôncavo, Nordeste, Oeste, Chapada, Mata Sul, e Planalto) a DI atua nas áreas da medicina legal, odontologia legal e criminalística. A Coordenação de Itabuna, pertencente a DI Grande Regional Mata Sul, atende as cidades de Almadina, Arataca, Barro Preto, Buerarema, Camacan, Coaraci, Floresta Azul, Ibicaraí, Itabuna, Itajú do Colônia, Itajuípe, Itapé, Itapitanga, Jussari, Mascote, Pau Brasil, Santa Cruz da Vitória e São José da Vitória. As amostras de drogas apreendidas nestas cidades supracitadas, por ações da Polícia Militar e Polícia Civil, são encaminhadas para o Departamento de Polícia Técnica (DPT) de Itabuna para realização de Perícia Toxicológica de Constatação (PTC) de substâncias entorpecentes.

O número de drogas de abuso, dentre elas maconha e *crack*/cocaína, que são encaminhadas para PTC é grande, se comparado com outros tipos de perícias realizadas no DPT, o que deixa explícito o maior consumo entre a população e, conseqüentemente uma maior repreensão por parte das autoridades competentes. No DPT de Itabuna, no ano de 2009, 41,84% das entradas para perícia de constatação foram de maconha e 58,16% foram de *crack*/cocaína para um total de 588 entradas neste Departamento, o que representou uma média de 49 perícias por mês. Em 2010, das 546 entradas, 38,83% foram para análise de maconha e 61,17% para *crack*/cocaína, representando uma média de 45,5 perícias de drogas por mês (Dados da 6ª Coordenadoria Regional de Polícia Técnica – Itabuna/BA).

As principais características dos materiais apreendidos são apresentarem-se secos, triturados ou prensados, podendo ser em tamanho grande embalado em fita adesiva (barra ou tablete) ou em pequenas quantidades embaladas individualmente em plástico ou papel alumínio (buchas) (Figura 2). As duas formas oficiais de caracterização são os métodos de identificação botânica e química. A avaliação botânica caracteriza-se pela constatação dos tricomas glandulares e tectores, que são apêndices

epidérmicos secretores dos compostos canabinóides e que são encontrados em toda a estrutura da planta e em maior quantidade nas flores, inflorescência e folhas (revista DPF). Estando o material seco e triturado, a identificação botânica fica comprometida, pois as estruturas se encontram muitas vezes degradadas, dificultando assim a distinção ao microscópico.

A análise química ocorre a partir da extração hexânica de parte da amostra apreendida. Dentre os métodos de identificação é utilizada com maior frequência a Cromatografia em Camada Delgada (CCD). A observação de uma mancha de cor púrpura em forma de boca indica a presença de THC. Para outros compostos canabinóides como canabinol e canabidiol, também presentes nas amostras, são observadas padrões de manchas na CCD. Em caso de necessidade de um segundo teste confirmatório, as amostras são analisadas por Cromatografia Gasosa aplicada ao Espectrofotômetro de Massa (CG/MS).

Apesar dos avanços técnicos na identificação de *C. sativa*, os métodos químicos ainda apresentam limitações quando as amostras se encontram em quantidades diminutas ou foram submetidas a longo período de armazenamento. A maconha pronta para o consumo consiste de folhas, pequenos talos e inflorescências secos, prensados e armazenados por um longo período, que consiste no intervalo entre a prensagem e a distribuição, apresentando dessa forma alto grau de depreciação vegetal. Neste caso os testes químicos ainda não são capazes de individualizar e/ou correlacionar amostras de *C. sativa*. Tal limitação pode afetar consideravelmente as investigações policiais, em caso de necessidade de confirmar provas materiais. Nesse sentido, novos métodos são necessários para individualizar e/ou correlacionar amostras de *C. sativa* nas rotinas de laboratórios forenses. Dentre os métodos em desenvolvimento destacam-se os padrões de assinaturas químicas associadas aos perfis orgânicos, inorgânicos e/ou isotópicos das amostras de *C. sativa* (SHIBUYA, 2005) e o uso da biologia molecular (JAGADISH, 1996; SHIROTA, 1998; COYLE, 2003; DATWYLER, 2006; HSIEH, 2003; GILMORE & PEAKALL, 2003).

Dentre os métodos supracitados, a assinatura química ainda apresenta a limitação de não auxiliar na determinação de origem geográfica das amostras, sendo os métodos baseados na identificação do DNA muito mais informativos e eficientes.

Marcadores microssatélites tem sido desenvolvidos para plantas (GUPTA et al, 1996) com diversos propósitos dentre eles análises de variabilidade genética,

conservação, testes de paternidade e mais recentemente em *C. sativa* com propósito forense (GILMORE e PEAKALL, 2003). Baseados em seqüências repetitivas em *tandem* (STR), também denominados “seqüências simples repetitivas” (SSR), são ideais para análises forenses, uma vez que são multialélicos, altamente polimórficos e estão presentes de forma randômica nos genomas vegetais, animais e em populações humanas (GOLDSTEIN, SCHLÖTTERER, 1998).

Nesse contexto, este trabalho objetivou a o estabelecimento de uma metodologia molecular para caracterização de amostras de *C. sativa*, resultantes de apreensões e que foram encaminhadas para o DPT de Itabuna para realização de PTC, para uso em Genética Forense. Este estudo constitui um primeiro passo, no estado da Bahia, para adequação dos métodos moleculares as práticas forenses objetivando auxiliar a investigação policial no combate ao tráfico de drogas.

Dessa forma, os objetivos do presente trabalho foram:

1. Comparar dois métodos de extração de DNA genômico nas amostras de *C. sativa* prensadas.
2. Caracterizar e quantificar a variabilidade e similaridade genética nas amostras de *C. sativa* recebidas no DPT de Itabuna utilizando onze locos microssatélites.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A *Cannabis sativa* L.

Planta de origem asiática, popularmente conhecida no Brasil como maconha, tem sua distribuição mundial seguindo as migrações humanas. A partir da Ásia Oriental, a *C. sativa* difundiu-se gradualmente para a Índia e Oriente Médio, mais tardiamente, para Europa, norte da África e Américas (CASTRO, 2006). A descrição mais antiga refere-se ao uso de *C. sativa* com propósitos medicinais e em rituais religiosos. A descoberta na região de Turpan, Xinjiang na China de fósseis contendo material vegetal caracterizado como *C. sativa*, através de exames botânicos, análises fitoquímicas e genéticas, atestam para o uso do vegetal há cerca de três mil anos (RUSSO *et al*, 2008).

Por volta de 1300 anos atrás os povos que viviam no sul da Rússia conheciam a *C. sativa*. Há 2100 anos foi muito cultivada para extração de fibras e se espalhou para a Itália e Sicília, espalhando-se durante a Idade Média por toda a Europa. A *C. sativa* chegou ao continente americano com a chegada dos europeus. No Brasil a história da maconha está diretamente relacionada com a história do país, já que as caravelas portuguesas chegadas em 1500 possuíam o cordame feito de cânhamo, produto originário da maconha. *C. Sativa* chegou ao Brasil por volta de 1549 através de sementes escondidas em bonecas de pano, amarradas nas pontas das tangas dos escravos (CARLINI, 2005).



Figura 1: Imagens de *C. sativa*. Fonte Google, 2011.

A planta é um arbusto lenhoso, da família Cannabaceae, com altura variando de 1,5 a 3,0m. Possui talo carnoso e folhas de formato palmo-partida que cresce em várias partes do mundo, incluindo regiões tropicais e temperadas. Em geral são dióicas, embora existam formas monóicas ou hermafroditas. Em média as plantas masculinas são mais baixas e delgadas que as femininas. O período de amadurecimento das plantas femininas é de 2-4 semanas após o amadurecimento das plantas masculinas. Seu

cariótipo é representado por $2n=20$ com nove cromossomos autossômicos mais um par de cromossomos sexuais homogamético para as fêmeas XX e heterogamético para machos XY. O tamanho do genoma das plantas masculinas é de 1683 Mbp enquanto que o de uma planta feminina aproxima-se a 1636Mbp. A diferença de 47 Mbp sugere que o cromossomo Y possa ser maior do que o X (TRUTÃ et al, 2007).

Cerca de 400 substâncias químicas foram identificadas em amostras de *C. sativa*, entre as quais se destacam pelo menos 60 alcalóides denominados canabinóides, classe de compostos contendo 21 átomos de carbono, que são lipofílicos e não solúveis em água. As folhas e inflorescências contêm maior quantidade de substâncias psicoativas como os canabinóides Δ -9-Tetrahydrocannabinol (THC), o canabidiol (CBD), e o canabinol (CBN), sendo o THC o mais ativo e responsável por sua ação psicotrópica, bem como sua forma enantiomérica Δ -8-tetrahydrocannabinol (Δ -8-THC). O canabidiol não possui propriedades entorpecentes, no entanto pode ocasionar sedação, ação anticonvulsivante e outras ações farmacológicas como interação com o THC.

C. sativa é popularmente denominada *marijuana*, *hashish*, *charas*, *bhang*, *ganja* e *sinsemila*. *Hashish* (haxixe) e *charas* são os nomes dados à resina seca extraída das flores de plantas fêmeas, que apresenta a maior porcentagem de compostos psicoativos (de 10 a 20%). Os termos *ganja* e *sinsemila* são utilizados para definir o material seco encontrado no topo das plantas fêmeas, contendo cerca de 5 a 8% de compostos psicoativos. *Bhang* e *marijuana* são preparações com menor conteúdo (2 a 5%) de substâncias psicoativas extraídas do restante da planta (HONÓRIO *et al.*, 1996). O termo maconha é utilizado no Brasil e refere-se à planta como um todo, tanto a parte aérea como também, as sementes e a resina extraída de qualquer parte da planta.

Os aspectos morfológicos, geográficos e químicos da *C. sativa* são altamente variáveis. Devido à longa associação de *C. sativa* com humanos, nenhum precursor silvestre é conhecido e, em qualquer caso, foi generalizada a introgressão e a hibridização entre linhagens silvestres e cultivadas (SMALL; CRONQUIST, 1976).

Atualmente, em função de benefícios econômicos e ambientais, tem ressurgido o interesse no cultivo de *C. sativa* com baixos teores de canabinóides, levando alguns países a permitirem o cultivo desta variedade. As variedades de *C. sativa* têm sido cultivados como fonte de fibras para a indústria têxtil, de alimentos, de óleo extraído de suas sementes, para uso medicinal e uso como droga psicoativa, bem como matéria prima de rações e combustíveis. Seu óleo pode ser usado como combustível e matéria-

prima para plásticos, bem como alimento para gado ou como fertilizante (KAYIS *et al*, 2009).

O mecanismo de ação do Δ -9-THC baseia-se na ligação com receptores endocanabinóides (CB1 e CB2) existentes no organismo humano. Os genes que sintetizam os receptores CB1 e CB2 estão localizados no braço curto do cromossomo 6 humano, entre as regiões 14 e 15, e produzem uma proteína que varia de 472 a 473 resíduos de aminoácidos (aa) sendo a homologia entre os receptores de 44%. Os receptores CB1 distribuem-se no Sistema Nervoso Central e Periférico e, quando ativados pela ligação com THC são responsáveis por alterações nas funções cognitivas, memória curta (receptores dispersos pelo córtex cerebral e hipocampo), alterações das funções motoras e de movimento (receptores no gânglio basal e cerebelo). Os receptores CB2 se distribuem nos tecidos periféricos, e em células do sistema imune, presumivelmente como mediação de imunossuppressores induzidos por canabinóides e possivelmente com efeito anti-inflamatórios (SVÍŽENSKÁ *et al*, 2008). Os efeitos corporais provocados pela *C. sativa* visivelmente detectados em linhas gerais são vermelhidão e diminuição da pressão intra-ocular, secura na boca, sensação de calor e frio simultânea, aumento da frequência cardíaca e relaxamento dos músculos.

2.2 Identificação de *C. sativa* na rotina de Laboratórios Forenses.

Cabem às Secretarias de Segurança Pública as atividades de investigação, apreensão, identificação e caracterização dos materiais entorpecentes. Após a apreensão os materiais são encaminhados para os institutos de perícia a fim de que se proceda a identificação, caracterização e quantificação. Inicialmente procede-se à identificação botânica desse material, no entanto não torna suficiente essa análise uma vez que a jurisprudência atual exige a realização de testes químicos para detecção dos compostos canabinóides presentes. Essa análise definitiva, então, envolve uma gama de testes químicos de coloração com base na detecção de Δ -9-THC e outros canabinóides, dentre esses ensaios a reação com “*Fast Blue Salt B*”, o Teste de *Gamarawy* (p-dimetil-amino-benzaldeído), o teste de *Duquenois-Levine* e a Cromatografia em Camada Delgada (CCD) são os principais utilizados (UNITED NATIONS, 1987). No entanto há casos raros em que a identificação completa da amostra não é possível com os testes químicos

e o uso de técnicas instrumentais como a Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectro de Massa (CG/MS) ou a Espectroscopia na região do Ultravioleta-visível (UV/VIS) se torna essencial devido à alta sensibilidade.

Na rotina forense baiana as amostras de vegetais são analisadas qualitativamente através da avaliação botânica, aplicação do teste de *Gamarawy* e aplicação do teste em CCD. Como teste confirmatório, um extrato obtido das amostras é analisado por cromatografia gasosa com detector de massa (CG/MS).

2.3 Perspectivas futuras para a Identificação/Individualização de *C. sativa*.

Embora os testes analíticos estejam bem estabelecidos na prática forense, eles apresentam limitações quando as amostras se encontram em quantidade diminuta ou em estado de depreciação vegetal. Além disso, os métodos químicos tradicionais não são capazes de individualizar e/ou correlacionar amostras de *C. sativa*. A capacidade de individualizar as amostras e correlacioná-las constitui importante ferramenta para o futuro da inteligência policial, uma vez que permitirá estabelecer relações com diferentes apreensões, apontar possíveis rotas de tráfico bem como a origem do material. Apesar de não constarem nas rotinas forenses, os métodos de individualização de *C. sativa* estão sendo desenvolvidos e avaliados. Tais métodos se baseiam em padrões de assinaturas químicas associadas aos perfis orgânicos e/ou isotópicos das amostras de *C. sativa* (SHIBUYA, 2005) e em polimorfismos de DNA.

2.3.1 Métodos baseados em Polimorfismos Genéticos.

Trabalhos em que iniciadores específicos na região entre os genes *trnL* e *trnF* no DNA cloroplástico de *C. sativa* foram desenvolvidos a fim de distinguir a *C. sativa* de outras espécies vegetais (LINACRE, 1998). As análises dos polimorfismos na região ITS1 e ITS2 do DNA nuclear ribossomal (GIGLIANO, 1997-1999) e do polimorfismo de comprimento na região intergênica em DNA cloroplastidial utilizando PCR-SSCP (do inglês, *single strand conformation polymorphism*) (KOHJYUUMA, 2000) permitiram a distinção da *C. sativa* de outras espécies como o *Humulus lupulus* L., representante do gênero *Humulus*, que é o único da família *Cannabaceae* além do gênero *Cannabis*. Esses trabalhos sugerem o uso de metodologias moleculares para aplicação em propósitos forenses.

Além da identificação, trabalhos buscando distinção entre amostras de *C. sativa* tem surgido na literatura através do uso de padrões de bandas RAPD (do inglês, *random amplification of polymorphic DNA*) (JAGADISH, 1996) e RFLP (do inglês, *restriction fragment length polymorphism*) (SHIROTA, 1998). Tem se utilizado também a técnica AFLP (do inglês, *amplified fragment length polymorphism*) para análises de variação genética em *C. sativa*, distinção e confirmação de reprodução clonal entre indivíduos (COYLE, 2003) e no estabelecimento de padrões genéticos (PALMABACH, 2005).

As metodologias RAPD, AFLP, RFLP se mostraram capazes de individualizar *C. sativa*, no entanto os marcadores SSR são considerados ideais uma vez que estes marcadores se mostram em abundância, encontram-se distribuídos uniformemente em todos os genomas, além de serem altamente polimórficos e multialélicos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Os SSRs fazem parte de uma classe de DNA repetitivo, presente em todos os organismos vivos eucarióticos e procarióticos (MELO, 2005). São constituídos por sequências de DNA, formadas por uma a seis nucleotídeos que se repetem lado a lado (*in tandem*) no genoma, onde estão distribuídos ao acaso (GUPTA *et al.*, 1996). O polimorfismo nestes locos é resultado de variações do número de repetições das sequências de nucleotídeos. A repetição pode ser perfeita ou interrompida por muitos nucleotídeos não repetidos sendo chamada de repetições compostas (MELO, 2005).

Estas regiões repetitivas ocorrem freqüente e randomicamente nos genomas de plantas, animais, nos seres humanos e tipicamente apresentam uma grande variação. De maneira geral são os marcadores mais informativos para estudos de genética ao nível de espécies e têm sido aplicados em muitos estudos com plantas, animais e em populações humanas incluindo a determinação de origem parental por teste de paternidade. São marcadores codominantes e altamente multialélicos, apresentando maior conteúdo informativo por loco gênico entre todas as classes de marcadores moleculares (GOLDSTEIN; SCHLÖTTERER, 1998).

Os primeiros trabalhos relatando o desenvolvimento de microssatélites em *C. sativa* relataram um total de 27 (vinte e sete) locos polimórficos publicados. Hiesh (2003) utilizando-se de 108 amostras, sendo 89 sementes e 19 folhas, descreveu um loco microssatélite com motivo hexanucleotídico, significativamente diferente de qualquer outra sequência de DNA relatada, apresentando heterosigose observada de 0,87%, e, após teste em vinte outras espécies de plantas demonstrou a especificidade do

marcador para *C. sativa*. Gilmore e Peakall (2003) num trabalho inicial desenvolveram identificaram cinco locos microssatélites em *C. sativa*, e após análise deles em 48 amostras obteve faixa alélica média de dez alelos por loco com heterozigose média de 0,68, o que demonstrou serem os marcadores hipervariáveis e informativos. Num trabalho seguinte Gilmore (2003) selecionou cinco locos microssatélites do estudo anterior para genotipar 93 amostras, o que acarretou na detecção de setenta e nove alelos com o número de alelos por loco variando de seis a vinte e nove alelos, e uma heterozigosidade média de 0,83%. Este trabalho permitiu ao autor inferir sobre a capacidade dos marcadores SSR de *C. sativa* de discriminar entre acessos e indivíduos, bem como sugere a criação de um robusto banco de dados para uso forense.

Paralelamente, ocorreu o desenvolvimento de onze marcadores também desta classe, sendo analisadas 41 amostras, obtendo-se uma faixa de três a nove alelos por loco e uma heterozigose observada média de 0,52 (ALGHANIM; ALMIRALL, 2003). Em 2006, um perito federal em conjunto com a Universidade Católica de Brasília, testou treze locos microssatélites de *C. sativa*. amplificados em multiplex e os utilizou onze deles para investigar a diversidade genética em 477 amostras coletadas no Paraguai e no Brasil, baseando-se nas publicações referentes a uso de marcadores microssatélites anteriormente descritos (GILMORE, 2003; ALGHANIM; ALMIRALL, 2003; HSIEH, 2003). Esses marcadores foram selecionados pelo autor com base na heterozigose, número de alelos observados e locos com motivos de repetição acima de dois nucleotídeos. Os iniciadores para esses locos foram redesenhados pelo autor (CASTRO, 2006).

2.3.2 Métodos de extração de DNA genômico para *C.sativa*.

O passo chave na análise genética de plantas, através de fragmentos de DNA, é o isolamento e a purificação de quantidades suficientes de DNA de boa qualidade. Logo o DNA obtido deve estar íntegro, livre de impurezas e ser passível de amplificação (MAZZA; BITTENCOURT, 2000). Vários autores descreveram problemas no isolamento e purificação de DNA vegetal (MERCADO *et al.*, 1999; ROMANO; BRASILEIRO, 1999), os quais são resultantes, principalmente, do co-isolamento de polissacarídeos, proteínas, substâncias fenólicas e compostos secundários. Contaminantes, como os compostos polifenólicos, liberados durante a lise celular,

principalmente de tecidos de folhas maduras, aderem irreversivelmente ao DNA, inibindo a amplificação da polimerase em cadeia (MAZZA; BITTENCOURT, 2000). O rompimento da célula também libera polissacarídeos, os quais são de difícil separação do DNA e inibem a enzima *Taq* DNA polimerase, interferindo nas diversas análises moleculares. O método de extração CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) é mais comumente utilizada em tecidos frescos. O método desenvolvido para DART (*Diversity Arrays Technology* – 2008) vem sendo utilizada com sucesso em amostras provenientes de estados precários de conservação, como excicatas de herbários, etc. Em adição, as amostras secas, prensadas e longo período de armazenamento dificultam ainda mais a obtenção de DNA em pesquisas genéticas, como é característica das amostras de *C. sativa* oriundas de apreensões na rotina forense. Protocolos a base de Sarcosil e Sorbitol tem sido utilizados na obtenção de DNA genômico a partir de amostras sob condições de estocagem prolongada, característica comum para *C. sativa* resultante de apreensões policiais.

Contudo, todos os trabalhos realizados partiram de espécies vegetais íntegras, sementes ou a planta seca. A realidade pericial por outro lado, mostra que a maioria das amostras apreendidas é caracterizada como material seco e prensado (Figura 2). Com isso, neste trabalho buscou-se a padronização da extração de DNA em amostras de alto grau de depreciação vegetal recebidas no DPT de Itabuna.

Figura 2: Ilustrações de maconha apreendida



Legenda: Formas comuns de apreensão, tablete ou barra, buchas embaladas em papel alumínio ou plástico e buchas sem embalagem.

3 METODOS

3.1 Obtenção de amostras de tecido vegetal verde e seco

Foram coletadas 53 amostras de *C. sativa* oriundas de apreensões na região da 6ª COORPIN (Coordenadoria de Polícia do Interior) (Anexo I). A liberação e o uso desse material foram devidamente autorizados pelo poder judicial (Anexo II). As amostras se apresentavam secas e prensadas, com a grande parte de sua massa composta de tecido foliar, contudo, havia a presença de talos e sementes. A amostra de tecido foliar fresco, utilizada como controle positivo, foi resultado da apreensão de uma planta que estava sendo cultivada no interior de uma residência na cidade de Itabuna. Alíquotas de cada amostra foram prontamente catalogadas e pesadas separadamente. Foram selecionados os maiores ramos de cada amostra para extração de DNA genômico. As amostras ficaram armazenadas em sílica gel, anteriormente a execução da extração, uma vez que a umidade presente nas amostras interferiu significativamente na qualidade do DNA extraído.

3.2 Comparação entre dois métodos de extração e Quantificação de DNA genômico

Foram testados dois protocolos de extração (CTAB e DArT), conduzidos com repetição para cada um dos protocolos, utilizando-se de cerca de 50 mg das primeiras 35 amostras coletadas com base no cronograma de coleta. O protocolo de extração de DNA de CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) testado foi o desenvolvido por Doyle e Doyle (1990) modificado por Ferreira e Grattapaglia (1998). Para a obtenção de DNA de *C. sativa* foram feitas algumas modificações físicas no processo de extração. Estas modificações foram introduzidas no ato da maceração, que foi realizado diretamente no tampão, no uso de esferas de inox (4,0 mm em diâmetro) e no ato da centrifugação (BARROSO *et al*, 2006). Posteriormente o restante das amostras foi submetido à extração com uso do protocolo CTAB, dando um total de 48 amostras para amplificação com microssatélites.

O método DArT foi desenvolvido para amostras estocadas por um período de tempo considerável. Para a execução do protocolo três tipos de tampões são preparados. O primeiro tampão é o de Extração, composto por 0,1M Tris-HCl pH 8,0, 5mM EDTA pH 8,0 e 0,35M sorbitol. O sorbitol serve como desnaturante de enzimas, agindo na

ligação dissulfito. O segundo tampão, de lise, é formado por 0,2M Tris-HCl, 0,05M EDTA, 2M NaCl e 2% CTAB. O terceiro tampão, de estoque de sarcosil a de 5% (g L^{-1}), uma vez que o sarcosil é um surfactante iônico. Juntos os três tampões se tornam o “tampão de trabalho”, acrescentando-se metabissulfito de sódio 0,5% e PVP 2%. Este tampão deve ser feito imediatamente antes da extração e aquecido a 65°C.

Esferas de inox foram acrescentadas aos tubos junto com o tecido vegetal e 1,0 ml de tampão de trabalho para a maceração. As etapas seguintes foram banho-maria 65°C por uma hora, adição de 1,0mL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), inversões por 30 minutos, centrifugação a 10000 rpm por 20 minutos, transferência de fase aquosa para novo tubo e descarte do tecido residual, adição de igual volume de isopropanol gelado, centrifugação a 4°C 10000rpm por 30minutos, descarte do sobrenadante e lavagem do pellet em álcool 70% e 95% e por fim ressuspensão em volume de 100-250 μL de TE.

O DNA extraído por ambos os métodos foi quantificado tanto em gel de agarose a 1,5% por comparação visual com concentração conhecida DNA *Lambda fago* de 50 e 100 ng e corado com brometo de etídio $0,5\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$, como por espectrofotometria pela razão entre os valores para cada amostra obtidos pelas leituras em absorbância de A260 e A280. No espectrofotômetro a concentração de DNA é calculada pelo próprio equipamento em $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$.

3.3 Amplificações com *primers* RAPD

Inicialmente foi feito uma triagem com 24 iniciadores decâmeros da Operon (2005) escolhidos aleatoriamente a fim de que fosse verificado a amplificabilidade desses primers inespecíficos para aplicação no DNA de *C. sativa* obtido pelos dois métodos de extração. Foram selecionados então cinco iniciadores decâmeros identificados como D2, D8, D11, D13 e D15, cujas sequências estão disponíveis em Operon (2005), empregados na amplificação de DNA extraído de ambos os protocolos, de 07 amostras (3, 6, 9, 13, 25, 27 e 35) selecionadas de acordo com a relação A260/A280, além do controle negativo. As condições de amplificação e eletroforese foram realizadas de acordo com Corrêa *et al* (1999). Os produtos das amplificações foram separados por eletroforese em agarose 1,5%, corados com brometo de etídio e fotografados em luz ultravioleta.

3.4 Amplificações com *primers* microssatélites

Foram utilizados os onze pares de primers que acessam polimorfismos em locos microssatélites descritos por CASTRO (2006) (Tabela 1). Para o presente trabalho foram feitas modificações nas sínteses dos iniciadores, para a adição uma cauda (*tail*) única composta por 19pb oriunda do vetor M13, a fim de diminuir significativamente os custos da reação de amplificação sem afetar a confiabilidade do trabalho. Essa cauda foi acrescida à região 5' do *primer*. A sequencia *tail* faz pareamento com a sequencia reversa M13 marcada com fluorocromos numa reação multiplex (MISSIAGGIA & GRATTAPAGLIA, 2006)

3.5 Otimização da PCR e Genotipagem dos microssatélites

Em uma etapa preliminar de padronização das condições de amplificação, cada par de *primers* microssatélites foi testado com quatro amostras de DNA para confirmar a amplificabilidade nas condições descritas na literatura em reações individuais de 13µl. Nessa etapa de padronização, a separação dos fragmentos foi realizada por eletroforese em gel de agarose 3,0%. Com base nos parâmetros definidos nessa etapa foi estabelecido a mistura para as reações da PCR foi composta de 150ng de DNA genômico, 10X tampão com (NH₄)₂SO₄, MgCl₂ 25mM, BSA 2,5 mg/ml, dNTP 2,5 mM, 10µM de cada *primer* (*forward*, *reverse* e marcado com fluorocromo), 0,2U de Taq DNA polimerase (Fermentas) e água ultrapura autoclavada para um volume final de 13µL. As amplificações foram realizadas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* da *PerkinElmer* nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento (tabela 1) por 1 minuto e extensão a 72 °C por 45 segundos e extensão adicional a 72 °C por 7 minutos. Para análise prévia dos testes de amplificação utilizou-se eletroforese em gel de agarose 2% corado com Brometo de Etídeo para uma pequena alíquota. Os produtos das amplificações foram então agrupados em sistema multiplex, de acordo com a faixa alélica (Tabela 1), separados em gel de poliacrilamida 5% no seqüenciador automático de DNA ABI Prism[®] 377 (AppliedBiosystems), utilizando os programas Genescan[®] e Genotyper[®] (AppliedBiosystems) na caracterização de microssatélites

amplificados a partir de *primers* com cauda *tail* e dos primers adjacentes marcados com fluorocromos, e analisados por meio do sistema de detecção de fluorescência no seqüenciador de DNA ABI 377.

Tabela 1: Lista dos locos utilizados, os motivos, sequencias e respectivas temperaturas de anelamento.

Nº de ordem	Locus	Motivo	Primer (5' > 3')	T (°C)
1	ANUCS202	(GA) ₂₀	F [TAIL]- TGCACATACATAGAGAGAGAGAG R-CAGAACTGAAGAGAGGGGAAG	54
2	ANUCS302	(CAA) ₇ -(CAA) ₄	F [TAIL]-AACATAAACACCAACAACCTGC R-TGTTCCGTGATGGTTGAT	57
3	ANUCS303	(GTG) ₇	F [TAIL]-CGCGATTTTAAGAGACAACA R-TCGACGATAATAGGGCAAG	56
4	ANUCS304	(TCT) ₈ TCA(TCT) 7	F [TAIL]-TCTTCACTCACCTCCTCTCT R- TCTTTAAGCGGGACTCGT	56
5	ANUCS305	(TGG) ₇	F [TAIL]- AAAGTTGGTCTGAGAAGCAAT R-CCTAGGAACCTTCGACAACA	56
6	B01-CANN1	(GAA) ₁₃ (A)(GAA) ₃	F [TAIL]-GGAGTCAAATGAAAGGGGAAC R-CATAGCATTATCCCACTCAAG	58
7	B05-CANN1	(TGG) ₉	F [TAIL]-TTGATGGTGGTGAAACGG R-CCAATCTCAATCTCAACCC	56
8	C08-CANN2	(GA) ₂₁	F [TAIL]- GCAAGAAGTAGAGAGACAATCC R-CCCTCAACACTCATTAACCTCAC	56
9	H06-CANN2	(ACG) ₇	F [TAIL]-TGGTTTCAGTGGTCCTCTC R-ACGTGAGTGATGACACGAG	57
10	H09-CANN2	(GA) ₁₅	F [TAIL]-CGTACAGTGATCGTAGTTGAG R-ACACATACAGAGAGAGCCC	57
11	H11-CANN1	(CT) ₁₈	F [TAIL]-ATGTGGTTGTTTCGTACCC R-GCGAACATTCCTCTAGCTC	57

3.6 Análises Genético-Estatísticas dos dados moleculares

3.6.1 Teste dos protocolos de extração

As estimativas estatísticas (Teste t pareado, Teste da Normalidade) foram calculadas usando o programa computacional BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007). Médias da eficiência de extração de DNA, expresso em ng/ul, foram estimadas para cada método de extração. O teste de comparação média foi executado por meio de teste t dependente bilateral, utilizando como teste da normalidade o Teste d'Agostinho, e a verificação da plausibilidade da hipótese nula foi definida pelo p-valor com 5% de probabilidade. Para verificar a distribuição das concentrações de DNA obtidas pelos dois métodos gerou-se um gráfico de *Box-Plot* de mediana e quartis.

3.6.2 Genética Descritiva e Análise de Agrupamento

A análise descritiva da frequência alélica de cada um dos locos estudados foi realizada identificando o número de alelos por loco e a distribuição de frequência, mediante emprego do programa GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2000). Os valores do conteúdo de informação polimórfica (PIC) para cada loco foram estimados com auxílio do programa PowerMarker V3.25 (LIU; MUSE, 2005).

A similaridade entre as amostras foi calculada usando como variável quantitativa a distância de Mahalanobis, que com base nas distâncias entre genótipos, gera uma matriz de variância e co-variâncias residuais. As amostras foram agrupadas pelo método hierárquico das médias das distâncias (UPGMA – *Unweight Pair-Group Method Using a Arithmetic Average*). Utilizou-se o programa Genes (CRUZ, 2008).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção das amostras

Foram coletadas 53 amostras de *C. sativa* no DPT de Itabuna, sendo amostras representativas de cidades da região sul da Bahia (Tabela 2 e Anexo 1). Para a comparação entre os métodos de extração as 35 primeiras amostras coletadas foram submetidas aos dois métodos de extração descritos anteriormente.

Tabela 2: Cidades de origem das 53 amostras coletadas.

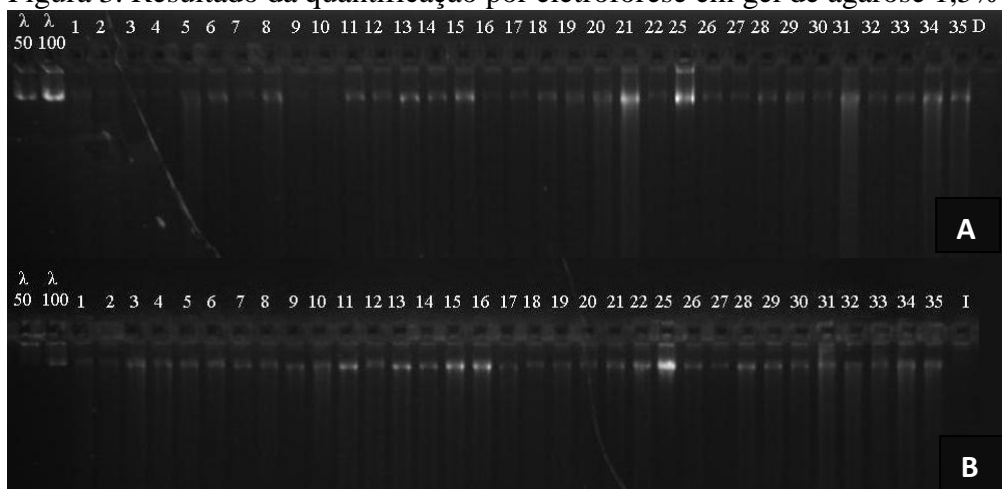
Nº amostra	CIDADE DA APREENSÃO
1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 11, 16,19, 21, 22, 24, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 32,33, 36, 38, 41, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 53, 54, 57, 58	ITABUNA
13, 14, 39, 42	COARACI
15, 18	CAMACAN
20, 23	BUERAREMA
28, 34, 35, 56	BARRO PRETO
37, 40,	IBICARAÍ
55	ITAPITANGA
52	PAU BRASIL

4.2 Comparação entre dois métodos de Extração e Quantificação de DNA Genômico

Para verificar a quantidade de DNA genômico extraído usou-se eletroforese em gel de agarose 3%. A quantificação em agarose é melhor aplicada para análises qualitativas verificando, por exemplo, a integridade e a qualidade do DNA pós-extração. Com base nas análises realizadas, o produto de DNA quantificado em gel de agarose 1,5%, obtido em ambos os métodos de extração, e valendo-se de marcadores com padrão de DNA conhecidos (DNA fago) foi visualizado e observado também quanto à integridade e a quantidade do DNA. Seguindo essa quantificação, com base na análise visual do gel (Figura 3) e do DNA Fago, estimou-se valores para comparação das médias de DNA, sendo 34,55 ng/3µl de DNA para CTAB e 59,7 ng/3µl para o método de DArT, dessa forma percebemos que o método DArT apresentou melhor padrão de bandas em agarose. As bandas de DNA obtidas em ambos os métodos de

extração se mostraram bem visíveis. A banda representativa da amostra de número 25 no gel corresponde ao controle positivo já que se trata da planta fresca. A intensidade e o tamanho da banda controle se diferem das demais em ambos os métodos, uma vez que confirma que a diferença na qualidade do material interfere significativamente na qualidade do DNA extraído. A presença de rastro para algumas amostras pode ser explicada por diversos fatores, principalmente o tempo e condição de armazenamento do material que está sendo analisando. Quanto mais tempo e mais umidade as amostras apresentarem, maior é a degradação enzimática que agirá sob o material.

Figura 3. Resultado da quantificação por eletroforese em gel de agarose 1,5%.



Legenda: Quantificação de DNA genômico extraído de 35 amostras de *C. sativa* pelos métodos (A) CTAB e (B) DART, visualizadas em gel de agarose 1,5% corado com Brometo de etídio. Uso de marcadores Fago λ 50 e 100 como padrão de bandas.

A concentração de uma substância em determinada solução pode ser determinada por espectrometria, utilizando gráficos de variação de transmitância em função da concentração de soluções-padrão, e também para determinar o grau de pureza/contaminação do material nucléico através da razão entre as absorvâncias A260 e A280. O espectro ideal para DNA puro é definido por valores de razão A260/A280 entre 1,6 e 1,8; razões menores indicam contaminação por proteínas e maiores indicam contaminação por fenóis (ROMANO; BRASILEIRO, 1999). Considerando-se a leitura à A260, obtivemos as concentrações de DNA extraído pelos dois métodos e, a partir daí, os valores das médias calculadas. As médias foram comparadas pelo teste *t* de *Student* dependente. O p-valor bilateral foi de 0,20, sendo o p-valor maior que 0,05, podemos

concluir que não existe diferença significativa entre os métodos (Tabela 3). As concentrações médias de DNA extraído das amostras de *C. sativa* pelos dois métodos (CTAB e DArT) ao serem submetidas ao teste de normalidade Teste D'Agostinho, indicaram que as amostras atendem ao pressuposto de normalidade (Tabela 4). O Gráfico 1 mostra um *Box Plot* da distribuição das concentrações obtidas, demonstrando gráficos semelhantes nessa distribuição de valores, o que sugere uma maior uniformidade nas concentrações obtidas pelos dois métodos testados.

Tabela 3: Dados estatísticos gerados (BioStat 5.0).

	CTAB	DART
Indivíduos	35	35
Média A260/A280 ²	1.2991	1.6073
Média(ug/uL) ¹	305.1714	272.7286
Desvio Padrão	135.3497	179.0504
Erro Padrão	22.8783	30.2650
(t)=	1.2962	
Graus de Liberdade	34	
(p) unilateral =	0.1018	
IC (95%)	-18.4301 a 83.3158	
IC (99%)	-35.8670 a 100.7528	

Legenda: ¹Médias gerais da concentração de DNA extraído quantificado por espectrometria dos dois métodos de extração de DNA. ²Relação A260/A280 obtido também por espectrofotômetro.

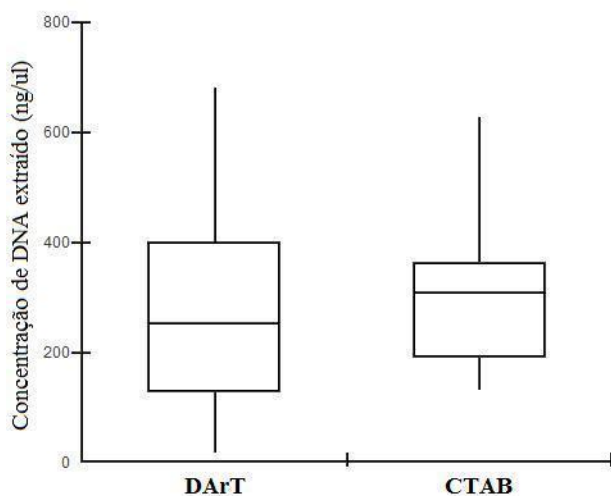
Tabela 4: Teste de normalidade D'Agostinho (BioStat 5.0).

Resultados	Coluna 1(CTAB)	Coluna 2 (DArT)
Tamanho da amostra	35	35
D (Desvio)	0.2745	0.2814
Valores críticos 5%	0.2677 a 0.2867	0.2677 a 0.2867
Valores críticos 1%	0.2613 a 0.2873	0.2613 a 0.2873
P	Ns	Ns

Legenda: H0: a distribuição da variável apresenta normalidade;

H1: a distribuição da variável não atende o pressuposto de normalidade.

Gráfico 1: Distribuição das concentrações de DNA obtidas pelos métodos de extração DArT e CTAB.

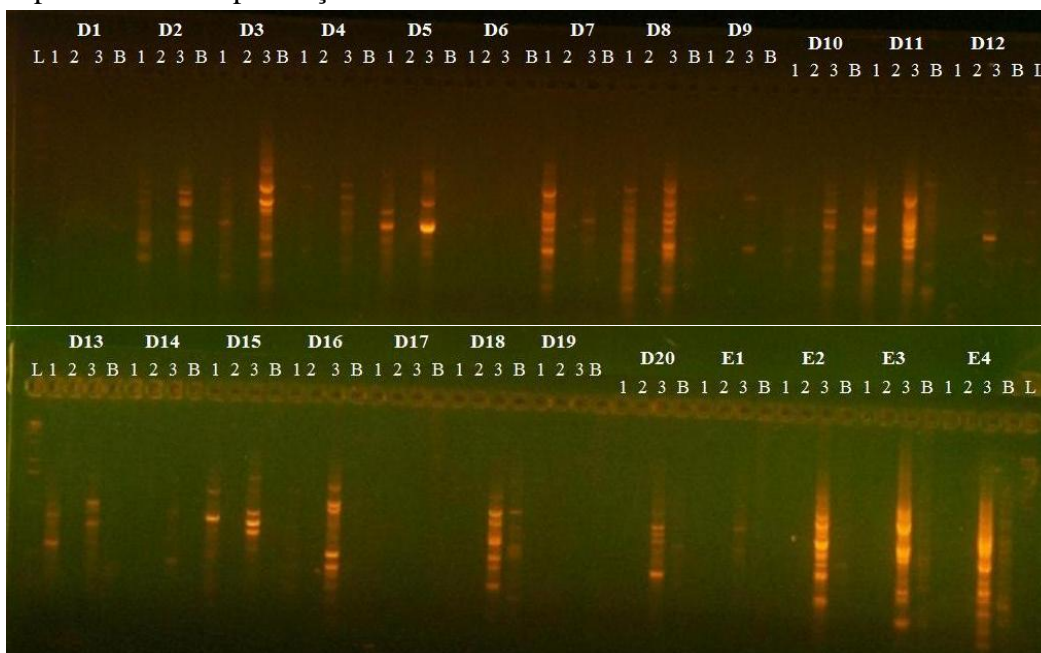


Legenda: Eixo X – métodos de extração; Eixo Y – Concentração de DNA extraído (ng/ul)

4.3 Amplificações com marcadores RAPD

De maneira geral a integridade e qualidade do DNA se mostraram satisfatórias em ambos os métodos quando os extratos foram submetidos a análises de quantificação. Analisou-se a amplificabilidade das amostras por meio de marcadores moleculares do tipo RAPD. Foi realizada uma triagem com iniciadores RAPD da Operon (2005) para vermos quais seriam capazes de amplificar utilizando a técnica de PCR. Dos 24 *primers* RAPD testados, observamos amplificação em 16 deles em três amostras escolhidas com base na integridade das bandas observadas na quantificação em gel de agarose 2%, sendo que a amostra de número 3 refere-se à amostra de material vegetal fresco (Figura 4). Escolhemos, com base nessas amplificações, 05 iniciadores RAPD para fazermos análises de amplificação em seis amostras escolhidas aleatoriamente entre as 35 extraídas até então (Figura 5), além de utilizar o como controle amplificação sem material genético - Branco. Dessa maneira, pudemos observar que o DNA das amostras extraídas pelo método do CTAB teve maior capacidade de amplificação, nas mesmas condições de temperatura e quantidade de ciclos na reação de PCR realizada, do que o método DArT.

Figura 4: Triagem de 24 primers de marcadores moleculares do tipo RAPD para escolha dos primers a serem utilizados para análises posteriores, seguindo o critério da capacidade de amplificação ao DNA extraído.



Legenda: L – Leadder1Kb; 1 – amostra 13; 2 – amostra 16; 3 – amostra 25 (ANEXO I); B – branco; D1 a D20, E1 a E4 – primers RAPD Operon, 2005.

Figura 5. Resultado do PCR – RAPD para análise qualitativa do material extraído utilizando 05 primers RAPD.



Legenda: Primers RAPD D2, D8, D11, D13, D15Operon, 2005; Amostras de DNA números: 3, 6, 9, 13, 25, 27, 35; B - reação sem material genético(Branco); L: Leadder1Kb; Gel de agarose 1,5%.

4.4 Estatística e Análise dos dados

4.4.1 Genética Descritiva

Entre os pares de *primers* SSR utilizados para amplificar as 53 amostras de DNA, dez dos 11 *primers* testados foram polimórficos, com padrão típico de marcadores codominantes, possuindo pelo menos dois alelos diferentes por loco. Um total de 153 alelos foi detectado, com variação quanto ao número de alelo por loco (6 – 22) e com média geral de 14,7 alelos por loco. O valor do PIC calculado para estimar a informatividade de cada iniciador variou de 0,29 a 0,91, com média de 0,71, o que sugere que os marcadores utilizados no presente estudos são informativos.

Dentro do grupo amostral analisado os locos H09-CANN2, ANUCS305 e H06-CANN2 exibiram número reduzido de alelos comparados com os demais, sendo respectivamente 6, 7 e 9, sendo que o loco H09-CANN2 apresentou-se monomórfico, o que vai de encontro a outros trabalhos anteriormente publicados (CASTRO, 2006 e ALGHANIM; ALMIRALL, 2003). Por outro lado comparando-se os dados referentes ao loco H06-CANN2, caracterizado como o loco menos informativo com 9 alelos por loco e $H_o = 0,18$, $H_e = 0,30$ e $PIC = 0,29$, verifica-se uma congruência dos resultados com os trabalhos anteriores, quando o mesmo loco foi caracterizado como monomórfico (CASTRO, 2006).

Os locos ANUCS302, B05-CANN1 e ANUCS202 exibiram o maior número de alelos, apresentando respectivamente 22, 19 e 18 alelos para cada um, sendo o mais polimórfico o loco ANUCS202 com $H_o = 0,98$, $H_e = 0,92$ e $PIC = 0,91$, seguido pelo loco B05-CANN1 com $H_o = 0,60$, $H_e = 0,80$ e $PIC = 0,89$. O loco mais polimórfico, ANUCS202 é um dinucleotídeo $(GA)_{26}$ com dezoito alelos variando, em múltiplos de duas unidades de pares de base (pb), de 119-171pb. Nota-se que dentro de uma amplitude de 52 pares de bases, todos os alelos potenciais foram detectados no conjunto de amostras (Tabela 5).

Tabela 5: Dados referentes às análises de Genética Descritiva, com base em onze locosmicrossatélites.

Número de ordem	Locos SSR	Motivo	Nº de alelos	Amplitude alélica	Ho	He	PIC
1	ANUCS202	(GA) ₂₀	18	119-171	0,98	0,92	0,91
2	ANUCS302	(CAA) ₇ -(CAA) ₄	22	101-177	0,88	0,90	0,90
3	ANUCS303	(GTG) ₇	14	71-137	1,0	0,80	0,78
4	ANUCS304	(TCT) ₈ TCA(TCT) ₇	15	71-135	1,0	0,77	0,74
5	ANUCS305	(TGG) ₇	7	151-263	0,71	0,64	0,58
6	B01-CANN1	(GAA) ₁₃ (A)(GAA) ₃	12	285-373	0,82	0,71	0,67
7	B05-CANN1	(TGG) ₉	19	207-279	0,60	0,89	0,89
8	C08-CANN2	(GA) ₂₁	15	127-211	0,86	0,69	0,65
9	H06-CANN2	(ACG) ₇	9	265-339	0,18	0,30	0,29
10	H09-CANN2	(GA) ₁₅	6	237-267	0,0	0,67	0,61
11	H11-CANN1	(CT) ₁₈	16	221-335	0,74	0,79	0,76
Total/Médias			153/14,7		0,71	0,74	0,71

Legenda: He – heterozigose esperada; Ho – heterozigose observada; PIC - Conteúdo de Informação Polimórfica.

4.4.2 Métodos de Agrupamento

Na matriz de dissimilaridade foi identificado o par de indivíduos mais similares e então foi formado o grupo inicial. A partir daí, é avaliada a possibilidade de inclusão de novos indivíduos, adotando-se o critério de que a distância média intragrupo deve ser menor que a distância média intergrupo (CRUZ et. al., 2008). As amostras foram agrupadas pelo método hierárquico das médias das distâncias (UPGMA – *Unweight Pair-Group Method Using a Arithmetic Average*), onde o cluster é determinado pela média aritmética das distâncias entre os itens. Em cada ciclo para novos clusters, estes são agrupados de acordo com menor média da distância entre os indivíduos, no caso distâncias obtidas na matriz de dissimilaridade. A média é não ponderada porque um cálculo anterior para um cluster não influencia num seguinte, ou seja, cada elemento contribui igualmente para o cálculo das médias das distâncias. O dendrograma formado mostrou (Figura 6), utilizando como ponte de corte um valor próximo 0,95 do índice de similaridade, a formação de três grupos distintos: o inferior formado por 03 amostras (56, 58 e 57), oriundas respectivamente das cidades de Barro Preto e Itabuna, da

amostra 37 (Ibicaraí) que se diferenciou totalmente dos outros indivíduos e do grupo formado pelas demais amostras. Dentre todo o conjunto amostral as amostras mais similares foram: 5 e 6; 19 e 21; 50 e 51, todas oriundas da cidade de Itabuna. De maneira geral considerando-se como similaridade de 55% todas as amostras mostram-se similares entre si. No valor de corte inferior a 0,59 pode-se constatar a formação de quatro cluster mostrando similaridade de 60% entre as amostras 5 e 6, 19 e 21, 22 e 35, 50 e 51, sendo todas originadas em Itabuna. Um pouco mais a frente, considerando-se o valor de corte variando entre 0,59 e 0,69 observam-se a formação de quatro clusters sendo dois intra-amostras (27 (Itabuna) e 28 (Barro Preto), 42 (Itabuna) e 44 (Coaraci)) além de pequenos grupos formados entre uma amostra e um cluster (49 -50 e 51 – todas de Itabuna) e um grupo um pouco maior formado entre as amostras 26 (Itabuna) e o grupo formado da amostra 34 (Barro Preto) a 38 no eixo Y do dendograma (Figura 6).

Uma vez utilizando o ponto de corte 0,69 observam-se três grupos com amostras de origens distintas intercaladas entre si, mostrando alta similaridade para a área geográfica abrangida pela 6º COORPIN (>70%). A amostra 37 (Ibicaraí) se caracterizou como a mais distante geneticamente entre as demais, com quase 100% de similaridade entre as demais.

Outro fato importante a ser constatado é que amostras resultantes de uma mesma apreensão em Itabuna (4 e 5; 24 e 25; 31 e 32; 43, 44 e 45; 57 e 58) obtiveram padrões diferentes de similaridade. As amostras 4 e 5 enquadraram-se em um mesmo cluster com ponto de corte acima de 0,7 mas com diferença de similaridade em torno de 20%. As amostras 24 e 25 divergiram em dois clusters distintos. Para as amostras 31 e 32 a situação foi inversa, mostraram-se similares em mais de 60% formando um cluster ente si, já os dados referentes às amostras 43, 44 e 45 evidenciam que nem sempre o distribuidor recebe material da mesma fonte. E finalmente as amostras 57 e 58 que se mostraram as mais similares entre as oriundas de mesma apreensão, além da proximidade com a amostra 56, de Barro Preto.

A amostra 25, que se tratava de uma planta apreendida numa residência em um bairro de Itabuna, mostrou similaridade de 63% com a amostra 34 originária de Barro Preto, assim como as amostras 57 e 58, que se tratava de folhas secas, originárias de Itabuna, mostraram similaridade de 95% com a amostra 56 também de Barro Preto, nos levando a relacionar a proximidade geográfica da cidade de Barro Preto com Itabuna como principal motivo de grande similaridade.

O arranjo do agrupamento poderá ser variável, ano a ano, mês a mês, conforme se insere mais amostras no banco de dados. Na prática, o ideal seria utilizar os marcadores SSR para criação de um banco de dados de amostras apreendidas em cada cidade do Estado da Bahia para determinação de origem geográfica com base nas análises moleculares.

Observou-se que as amostras apreendidas em Itabuna se mostraram dispersas ao longo do dendrograma, o que leva a suposição de se tratar de um local obrigatório de passagem entre os distribuidores, uma vez que a localização geográfica a caracteriza como entreposto para as cidades circunvizinhas. No entanto a utilização de informações de cada apreensão, juntamente com o trabalho de Investigação, é fundamental para a criação de uma possível rota de distribuição na região, sendo os dados obtidos com o presente trabalho um passo inicial.

5 Conclusões

1 - Os métodos de extração de DNA genômico (CTAB e DArT) se mostraram eficientes para o uso em amostras de *C. sativa* L secas, prensadas, com longo período de armazenamento. Não foram testados protocolos do tipo “*flash-prep*” uma vez que não dispúnhamos de tempo hábil para providências dos mesmos, porém ressaltam-se que tais métodos possuem vantagens incontestáveis, como menor demanda de tempo e menor risco em potencial para o operador, uma vez que alguns compostos, como fenol e clorofórmio, não são utilizados.

2 – A diversidade alélica média encontrada foi de 0,71 e a diversidade gênica foi de 0,574. Havendo loco mais polimórfico (ANUCS202; 0,98) e loco menos polimórfico (H06-CANN2; 0,18), Detectou-se também um loco monomórfico (H09-CANN2), sugerindo a repetição de análises para este loco para confirmação.

3 - A eficiência dos marcadores microssatélites é incontestável, permitindo determinar no presente estudo que eles são altamente polimórficos e com grande conteúdo informativo.

4 - Existe pouca variabilidade genética entre as amostras estudadas, o que pode ser explicado pela qualidade do material analisado, já que são recebidos buchas ou tabletes prensados, sendo possível sugerir haver mais de um indivíduo para cada amostra apreendida.

5 - Os resultados analisados neste trabalho são dados preliminares, uma vez que o tamanho amostral deve ser aumentado e outros testes para extração serem realizados, de forma que otimize a extração de material genético genômico adequando-se o baixo custo e a eficiência.

6 – Como método de determinar a relação entre os resultados obtidos no presente estudo e a co-existência de mais de um indivíduo para cada amostra, sugere-se para cada amostra apreendida a coleta de sementes e a germinação em estufas para submissão à caracterização molecular com uso dos marcadores SSR.

7 – Espera-se que as metodologias moleculares sejam adequadas às rotinas dos Institutos de Perícia, já que são métodos consagrados há muito na literatura, com grande capacidade de individualizar e correlacionar os centros consumidores com os produtores de *C. sativa*, contribuindo para o trabalho de Inteligência Policial.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALGHANIM, H. J.; ALMIRALL, J. R. **Development of microsatellite markers in *Cannabis sativa* for DNA typing and genetic relatedness analyses.** Anal. Bioanal. Chem, 376: 1225-1233, 2003.

AYRES, M.; AYRES JUNIOR, M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S. BioEstat 5.0.: aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biomédicas. Sociedade Civil Mamirauá: Belém, Pará-Brasil. 2007. 324p. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Ong Mamiraua. Belém, PA.

BARROSO, P.A.V.; HOFFMANN, L.V.; BATISTA, C. E. A; ARAÚJO, R. L.; MORESCO, E. R.; **Uso de Esferas de Inox na Maceração de Tecidos Foliare de Algodoeiro Destinados à Extração de DNA.** Campina Grande: Embrapa Algodão, Comunicado Técnico, 297, 2006.

BONNIE, Richard J; WHITEBREAD II, Charles H. **The forbidden fruit and the tree of knowledge:** An inquiry into the legal history of american marijuana prohibition. Virginia law review, 56:6, 1970.

BRASIL: Decreto lei nº 11.343, de 23 de agosto de 2006. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 de ago 2006, Seção 1, nº 163, p. 1-6.

CARLINI,E.A.; Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID). Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). São Paulo: CEBRID, 2005.

CORRÊA, R.X.; ABDELNOOR, R.V.; FALEIRO, F.G.; CRUZ, C.D.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. de. Genetic distances in soybean based on RAPD markers. **Bragantia**, v.58, p.15-22, 1999.

CASTRO. J. L. O. **Desempenho forense de microssatélites para a investigação da origem de *Cannabis sativa* no Brasil e no Paraguai.** Brasília 2006. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) - Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2006.

COYLE, H. M.; PALMBACH, T.; JULIANO, N.; LADD, C.; LEE, H. C. **An overview of DNA methods for the identification and individualization of marijuana.** Croatian Medical Journal, 44:315-321, 2003.

CRUZ, C. D. . Programa Genes - Diversidade Genética. 1. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, v. 1. 278 p., 2008.

DART. *Diversity Arrays Technology Pty. Ltd.* Disponível em: http://www.diversityarrays.com/pub/DArT_DNA_isolation.pdf. Acesso em: 19 ago. 2008.

DATWYLER, S.L.; WEIBLEN G.D.; **Genetic variation in hemp and marijuana *Cannabis sativa* L. according to amplified fragment length polymorphisms.** J Forensic Sci, 51(2):371-5, 2006.

DIVISION OF NARCOTIC DRUGS. **Recomended Methods for Testing *Cannabis*.** New York: UNITED NATION, 1987.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. **Isolation of plant DNA from fresh tissue.** Focus, Rockville, 12: 13-15, 1990.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3ed. Brasília: Embrapa, 220p., 1998.

GIGLIANO, G. Siniscalco; CAPUTO, P.; COZZOLINO, S. **Ribosomal DNA analysis as a tool to identify specimens of *Cannabis sativa* L. of forensic interest.** Sci. Justice, 37:171-174, 1997.

GIGLIANO, G. Siniscalco. **Identification of *Cannabis sativa* L. (Cannabaceae) using restriction profiles of the Internal Transcribed Spacer II (ITS2).** Sci. Justice, 38:225-230, 1998.

GIGLIANO, G. Siniscalco. **Preliminary data on the usefulness of Internal Transcribed Spacer I (ITS1) sequence in *Cannabis sativa* L. identification.** J. Forensic Sci., 44(3):475-477, 1999.

GILMORE, S.; PEAKALL, R. **Isolation of microsatellite markers in *Cannabis sativa* L. (marijuana).** Molecular Ecology Notes, 3: 105-107, 2003.

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

GOLDSTEIN, D. B.; SCHLÖTTERER, C. **Microsatellites evolution and applications.** Oxford University Press. New York, 1998.

GUPTA, P. K.; BALYAN, H.S.; SHARMA, P.C.; RAMESH, B.; **Microsatellites in plants: a new class of molecular markers.** Current science, 70, 1, p.45-54, 1996.

HONÓRIO, et al. 2006. **Aspectos terapêuticos de compostos da planta *Cannabis sativa***. Quim. Nova, vol. 29, nº2, São Paulo, 2006.

HSIEH, Hsing-Mei et al. **A highly polymorphic STR locus in *Cannabis sativa***. Forensic Sci. Int., 131:53-58, 2003.

IVERSEN, Leslie L. **The science of marijuana**. New York, Oxford University Press, 2000.

JAGADISH, V.; ROBERTSON, J.; GIBBS, A. **RAPD analysis distinguishes *Cannabis sativa* samples from different sources**. Forensic Sci. Int., 79: 113-121, 1996.

KAYIS, S. A.; PINARKARA, E.; HAKKI, E. E.; SAG, A. **RAPD analysis of seized marijuana (*Cannabis sativa* L.) in Turkey**. Eletronic J. of Biotechnology, 12(1), 2009.

KOHJYUUMA, M. **Interspecific variation in *Cannabis sativa* L. based on intergenic spacer region of chloroplast DNA**. Japan, Biol Pharm Bull 23:727-30. 2000

Lewis, P.O., and Zaykin, D. 2002. Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.1. Free program distributed by the authors over the internet from <http://hydrodictyon.eeb.uconn.edu/people/plewis/software.php> (Lewis, 2002).

LINACRE, Adrian; THORPE, James. **Detection and identification of Cannabis by DNA**. Forensic Sci. Int., 91:71-76, 1998.

Liu, and Muse, 2005, PowerMaker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis, Bioinformatics, 21: 2128-2129

MAZZA, M. C. M.; BITTENCOURT, J. V. M. **Extração de DNA de tecido vegetal de *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae)**. Bol. Pesq. Fl., Colombo, 41: 12-17, 2000.

MELO, S. C. O. **Estrutura Genética e Fluxo Gênico em *C. echinata* (PAU BRASIL) por meio de marcadores microsatélites**. Ilhéus, BA: UESC, 71f, 2005.

MENDOZA, M. A.; MILLS, D. K.; LATA, H.; CHANDRA, S.; ELISOHLY, M. A.; ALMIRALL, J. R. **Genetic individualization of *Cannabis sativa* by a short tandem repeat multiplex system**. Anal Bioanal Chem, 393: 719-726, 2009.

MERCADO, J.A.; MANSOURI, I.; JIMÉNEZ-BERMUDEZ, S.; PLIEGO-ALFARO, F.; QUESADA, M.A. **A convenient protocol for extraction and purification of DNA from *Fragaria***. In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant, v.35, n.2, p.152-153, 1999.

MISSIAGGIA, A.; GRATTAPAGLIA, D. **Plant microsatellite genotyping with 4-color fluorescent detection using multiple-tailed primers.** Genet. Mol. Res. 5 (1): 72-78, 2006.

PALMBACH, T H M; LADD, C; LEE, HC. **Tracking clonally propagated marijuana using amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis.** In: Coyle HM, editor. Forensic botany: principles and applications to criminal casework. Boca Raton, FL: CRC Press; 2005.

RAO, R. C. **Advanced statistical methods in biometric research.** New York: John Wiley and Sons, 390p, 1952.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. **Extração de DNA de plantas: soluções para problemas comumente encontrados.** Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, ano 2, nº9, 43: 1999. Disponível em <[http://www.biotecnologia.com.br/ com. br](http://www.biotecnologia.com.br/com.br)>.

RUSSO, E.B.; JIANG, H.E.; LI, X.; SUTTON, A.; CARBONI, A.; BIANCO, F.; MANDOLINO, G.; POTTER, D. J.; ZHAO, Y. X.; BERA, S.; ZHANG, Y. B.; LÜ, E. G.; FERGUSON, D. K.; HUEBER, F.; ZHAO, L. C.; LIU, C. J.; WANG, Y. F.; LI, C. S.; **Phytochemical and genetic analyses of ancient cannabis from Central Asia.** Journal of Experimental Botany, 59, p.4171- 4182, 2008.

SHIBUYA, E. K.; SARKIS, J.E.S.; NETO, O.N.; MOREIRA, M.Z.; VICTORIA, R.L.; **Sourcing Brazilian marijuana by applying IRMS analysis to seized samples.** Forensic Science International, 160, p35-43, 2006

SHIROTA, O. et al. **Random amplified polymorphic DNA and restriction fragment length polymorphism analyses of Cannabis sativa.** Natural Medicines, 52(2):160-166, 1998.

SMALL, E.; CRONQUIST, Arthr. **A practical and natural taxonomy for Cannabis.** JSTOR, Vol.25, n.4, August, 1976, p405-435.

SVÍŽENSKÁ, I.; DUBOVÝ, P.; SULCOVÁ, A. **Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures — A short review.** Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 90, p. 501–511, 2008.

TRUTĂ, E.; OLTEANU, Z.; SURDU, S; ZAMFIRACHE, M-M.; OPRICĂ, L. **Some aspects of sex determinism in hemp.** Sectiunea Genetică si Biologie Moleculară, TOM VIII, 2007.

