INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE SÃO PAULO

***CAMPUS* AVARÉ**

CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NÍCOLAS REGASSINI SILVA

ANÁLISE DOS INTERFERENTES VEGETAIS POR TESTES COLORIMÉTRICOS NA IDENTIFICAÇÃO DE CANABINÓIDES

AVARÉ

2018

NÍCOLAS REGASSINI SILVA

ANÁLISE DOS INTERFERENTES VEGETAIS POR TESTES COLORIMÉTRICOS NA IDENTIFICAÇÃO DE CANABINÓIDES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo - *Campus* Avaré, como requisito parcial à obtenção do título de licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador(a): Prof. Dr. Matheus Manoel Teles de Menezes

Co-Orientador(a): Prof. Dr. Rafael Aparecido Ferreira

AVARÉ

2018

Catalogação na fonte
Instituto Federal de São Paulo – Campus Avaré
Biblioteca Campus Avaré
Bibliotecária: Anna Karolina Gomes Dias - CRB-8/9563

SILVA, Nícolas Regassini
Análise dos interferentes vegetais por testes colorimétricos na identificação canabinoides. / Nícolas Regassini Silva – Avaré, 2018.
56 p.

Orientador: Matheus Manoel Teles de Menezes
Coorientador: Rafael Aparecido Ferreira

Monografia (Graduação – Licenciatura em Ciências Biológicas) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo – Campus Avaré, Avaré, 2018.

1. Maconha. 2. Canabinoides. 3. Falso-positivo. 4. Metodos colorimetricos. I. Matheus Manoel Teles de Menezes. II. Rafael Aparecido Ferreira. III. Análise dos interferentes vegetais por testes colorimétricos na identificação de canabinóides.

NÍCOLAS REGASSINI SILVA

ANÁLISE DOS INTERFERENTES VEGETAIS POR TESTES COLORIMÉTRICOS NA IDENTIFICAÇÃO DE CANABINÓIDES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo - *Campus* Avaré, como requisito parcial à obtenção do título de licenciado em Ciências Biológicas.

COMISSÃO EXAMINADORA

_____

Prof. Dr. Matheus Manoel Teles de Menezes

Instituto Federal de São Paulo – Campus Catanduva

_____

Prof. Dr. Rafael Aparecido Ferreira

Instituto Federal de São Paulo – Campus Avaré

_____

Profa. Dra. Tarsila Ferraz Frezza

Instituto Federal de São Paulo – Campus Avaré

Avaré, 14 de dezembro de 2018.

ANEXO IV

INSTITUTO FEDERAL São Paulo Campus Avaré	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo *Campus* Avaré

FOLHA DE AVALIAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

IDENTIFICAÇÃO DO(A) ALUNO(A)
Nome: Nicolas Regassini Silva
Título: Análise de interesse vegetais por Testes Colorimétricos na identificação de Carabinadas
Curso: Licenciatura em Ciências Biológicas

BANCA EXAMINADORA

Nome: Tarsila Ferraz Fuzza	
Instituição/Departamento: IFSP - Avaré / Lic. Ciências Biológicas	
Nota: 9,6	**Julgamento:** (X) Aprovado ( ) Reprovado
Assinatura: [signature]	

Nome: Matheus Manoel Teles de Menezes	
Instituição/Departamento: IFSP - Catanduva / Lic. Química	
Nota: 9,9	**Julgamento:** (X) Aprovado ( ) Reprovado
Assinatura: [signature]	

Nome: Rafael Aparecido Ferreira	
Instituição/Departamento: IFSP-Avaré / Bacharelado em Engenharia de Biossistemas	
Nota: 9,9	**Julgamento:** (X) Aprovado ( ) Reprovado
Assinatura: [signature]	

RESULTADO FINAL

Como parte das exigências para conclusão do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, o candidato(a)/aluno(a), em sessão pública, foi considerado aprovado pela Comissão Examinadora, com média final 9,8.

Avaré, 14 **de** dezembro **de 20**18.

1ª via IFSP, 2ª via do(a) Aluno(a)

"Este documento não contém rasuras"

Agradeço, primeiramente, a Deus e à minha família, por sempre me guiarem nessa jornada. Também agradeço meus professores, em especial, ao Prof. Dr. Matheus Manoel Teles de Menezes, pela dedicação, paciência e amizade.

AGRADECIMENTOS

Com o decorrer das análises, preparação dos reagentes e descrição dos resultados observados a cada intervalo de secagem, pude me aproximar mais do meu propósito como acadêmico. O trabalho produzido contribuiu muito no desenvolvimento de técnicas de laboratório, manipulação de equipamentos, descrição de resultados, elaboração de relatórios e na realização quanto à minha formação profissional. A apresentação contribuiu muito para minha formação, agregando-me experiência na divulgação do trabalho desenvolvido junto ao meu orientador.

Meus agradecimentos a meu orientador Prof. Dr. Matheus Manoel Teles de Menezes pela inspiração na realização dos trabalhos de pesquisa, pela motivação em cada passo rumo à minha formação pessoal e profissional e por todas as sugestões que impulsionaram o trabalho, contribuindo muito na obtenção dos resultados atingidos. Gostaria de agradecer imensamente ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia – Câmpus Catanduva pela oportunidade de desenvolver este trabalho de pesquisa e Câmpus Avaré por disponibilizar o espaço para realização das análises, guiando minha futura carreira profissional e contribuindo enormemente na concretização de meus objetivos.

Agradeço também a meu co-orientador Prof. Dr. Rafael Aparecido Ferreira pela colaboração na organização deste trabalho; à minha família, e aos demais professores que tiveram papel essencial em minha formação pessoal e profissional.

RESUMO

O presente trabalho objetivou a investigação de folhas de espécies vegetais presentes em abundância no estado de São Paulo e que pudessem gerar respostas positivas para os testes colorimétricos de Fast Blue B (FB) e Duquenóis Levine (DL), tanto em solução contendo os extratos vegetais quanto o extrato em papel de filtro. Para a realização do procedimento experimental, foram submetidas as folhas *in natura* de oito espécies vegetais aos testes colorimétricos e, posteriormente, as mesmas análises colorimétricas dos vegetais devidamente secos em estufa à temperatura de 100º C e, realizando medições da massa vegetal em intervalos de 6 em 6 horas até que fosse atingida massa constante das amostras.

Palavras-chave: *Maconha, Canabinóides, Falso-positivo, Cromatografia, Métodos colorimétricos.*

ABSTRACT

The present work aimed at the investigation of leaves of plant species present in abundance in the state of São Paulo and that could generate positive responses for the colorimetric tests of Fast Blue B (FB) and Duquenóis Levine (DL), both in solution containing the vegetal extracts as the extract on filter paper. For the accomplishment of the experimental procedure, the *in natura* leaves of eight vegetal species were submitted to the colorimetric tests and, later, the same colorimetric analyzes of the plants properly dried in greenhouse at a temperature of 100º C, and measuring plant mass in intervals of 6 in 6 hours until constant mass of samples was reached.

Keywords: Marijuana, Cannabinoids, False-positive, Chromatography, Colorimetric methods.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1.a - Estrutura química do Δ9-THC [(–)–Δ^9–trans – tetraidrocanabinol] ($C_{21}H_{30}O_2$).....**Página 4**

Figura 1.1.b - Estrutura química espacial do Δ9-THC; região cinza representa carbono, vermelha oxigênio e a branca, o hidrogênio.....**Página 4**

Figura 1.2.a - Possível produto de reação formado na reação do Fast Blue B com o Δ9-THC. (Imagem gerada pelo ACDLABS 11.0 ChemSketch (freeware version) 1994-2008).....**Página 6**

Figura 1.2.b - Reação entre fenol e reagente colorimétrico Fast Blue B.....**Página 7**

Figura 1.2.c - Reação de Duquenóis-Levine, entre os constituintes da Cannabis sativa L. e vanilina em meio ácido.....**Página 7**

Figura 1.3 – Solução branco para o teste de Fast Blue B em álcool 95% (v/v).....**Página 11**

Figura 1.4 – Preparação dos extratos dos espécimes 1 (*Pinus taiwanensis*), 2 (*Eugenia uniflora)*,3 (*Zanthoxylum rhoifolium*), 4 (*Michelia chumpaca*), 5 (*Ricinus communis*) e 6 (*Tabebuia alba*) *in natura*.....**Página 11**

Figura 1.5 – Solução branco para o teste de Duquenóis Levine em álcool 95% (v/v).....**Página 13**

Figura 2.1.a - Extrato em papel filtro (úmido e seco) da espécie *Pinus taiwanensis in natura*.....**Página 15**

Figura 2.1.b - Extratos em papel filtro (úmido e seco) da espécie *Pinus taiwanensis* após 6 horas (1); 12 horas (2); 18 horas (3); 24 horas (4); 30 horas (5) e 36 horas (6).....**Página 15**

Figura 2.2.a - Extrato em papel filtro (úmido e seco) da espécie *Eugenia uniflora in natura*.....**Página 16**

Figura 2.2.b - Extratos em papel filtro (úmido e seco) da espécie *2* após 6 horas (1); 12 horas (2); 18 horas (3); 24 horas (4); 30 horas (5) e 36 horas (6).....**Página 16**

Figura 2.3.a - Extrato em papel filtro (úmido e seco) da espécie *Zanthoxylum rhoifolium in natura*.....**Página 17**

Figura 2.3.b - Extratos em papel filtro (úmido e seco) da espécie 3 após 6 horas (1); 12 horas (2); 18 horas (3); 24 horas (4); 30 horas (5) e 36 horas (6).....**Página 17**

Figura 2.4.a - Extrato em papel filtro (úmido e seco) da espécie *Michelia chumpaca in natura*.....**Página 18**

Figura 2.4.b - Extratos em papel filtro (úmido e seco) da espécie 4 após 6 horas (1); 12 horas (2); 18 horas (3); 24 horas (4); 30 horas (5) e 36 horas (6).....**Página 18**

Figura 2.5.a - Extrato em papel filtro (úmido e seco) da espécie *Ricinus communis in natura*.....**Página 19**

Figura 2.5.b - Extratos em papel filtro (úmido e seco) da espécie *Ricinus communis* após 6 horas (1); 12 horas (2); 18 horas (3); 24 horas (4); 30 horas (5) e 36 horas (6).....**Página 19**

Figura 2.6.a - Extrato em papel filtro (úmido e seco) da espécie *Tabebuia alba in natura*.....**Página 20**

Figura 2.6.b - Extratos em papel filtro (úmido e seco) da espécie *Tabebuia alba* após 6 horas (1); 12 horas (2); 18 horas (3); 24 horas (4); 30 horas (5) e 36 horas (6).....**Página 20**

Figura 2.7.a - Extrato em papel filtro (úmido e seco) da espécie Manihot esculenta in natura.....**Página 21**

Figura 2.7.b - Extratos em papel filtro (úmido e seco) da espécie *Manihot esculenta* após 6 horas (1); 12 horas (2); 18 horas (3); 24 horas (4); 30 horas (5) e 36 horas (6).....**Página 21**

Figura 2.8.a - Extrato em papel filtro (úmido e seco) da espécie *Phaseolus vulgaris* in natura.....**Página 22**

Figura 2.8.b - Extratos em papel filtro (úmido e seco) da espécie *Phaseolus vulgaris* após 6 horas (1); 12 horas (2); 18 horas (3); 24 horas (4); 30 horas (5) e 36 horas (6).....**Página 22**

Figura 3.1 - Teste de Fast Blue B realizado em triplicata nas espécies *in natura*.....**Página 23**

Figura 3.2 - Teste de Fast Blue B realizado em triplicata nas espécies após 6 horas.....**Página 24**

Figura 3.3 - Teste de Fast Blue B realizado em triplicata nas espécies após 12 horas.....**Página 25**

Figura 3.4 - Teste de Fast Blue B realizado em triplicata nas espécies após 18 horas.....**Página 26**

Figura 3.5 - Teste de Fast Blue B realizado em triplicata nas espécies após 24 horas.....**Página 27**

Figura 3.6 - Teste de Fast Blue B realizado em triplicata nas espécies após 30 horas.....**Página 28**

Figura 3.7 - Teste de Fast Blue B realizado em triplicata nas espécies após 36 horas.....**Página 29**

Figura 4.1 - Teste de Duquenóis-Levine realizado nas espécies *in natura*.....**Página 30**

Figura 4.2 - Teste de Duquenóis-Levine realizado nas espécies após 6 horas.....**Página 31**

Figura 4.3 - Teste de Duquenóis-Levine realizado nas espécies após 12 horas.....**Página 32**

Figura 4.4 - Teste de Duquenóis-Levine realizado nas espécies após 18 horas.....**Página 33**

Figura 4.5 - Teste de Duquenóis-Levine realizado nas espécies após 24 horas.....**Página 34**

Figura 4.6 - Teste de Duquenóis-Levine realizado nas espécies após 30 horas.....**Página 35**

Figura 4.7 - Teste de Duquenóis-Levine realizado nas espécies após 36 horas.....**Página 36**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Família, nome popular e científico dos espécimes vegetais submetidos aos testes colorimétricos.....Pagina 9

Tabela 1.2 – Massas das amostras analisadas nos intervalos de 6 horas, retirando 1 grama a cada análise para execução dos testes com Fast Blue B e 0.25 grama para execução dos testes com Duquenóis-Levine.....Pagina 14

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

-∆9-THC: ((–)–∆9–trans – tetraidrocanabinol)

-SNC: Sistema Nervoso Central

-UNODC: United Nations Office on Drugs and Crime (Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crimes)

-CBD: Canabidiol

-CBN: Canabinol

-CBC: Canabicromeno

-CBL: Canabiciclol

-FB: Fast Blue B

-DL: Duquenóis-Levine

-mL: Mililitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO....1
1.1 PROBLEMATIZAÇÃO....2
1.2 A MACONHA....3
1.3 ESTRUTURA QUÍMICA....3
1.4 IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA....5
1.5 TESTES COLORIMÉTRICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DA MACONHA....6
2 OBJETIVOS....8
2.1 OBJETIVO GERAL....8
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS....8
3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS....9
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO....14
5 CONCLUSÃO....37
REFERÊNCIAS....40

1 INTRODUÇÃO

O uso de substâncias psicoativas remonta há milhares de anos, sendo algo presente na humanidade desde o início de sua história (GONTIÈS; ARAÚJO, 2003). Atualmente, o consumo desenfreado de psicotrópicos, denominados drogas de abuso, vem desencadeando uma série de problemas sociais, tais como o aumento da criminalidade, violência urbana e doméstica (REIS; UCHIMURA; OLIVEIRA, 2013); fazendo com que os órgãos públicos tratem essa questão com devida seriedade e preocupação quanto aos efeitos decorrentes do uso; implementando um conjunto de leis e, muitas vezes, tratando o porte, consumo ou tráfico destas drogas de abuso como crime na legislação (REIS; UCHIMURA; OLIVEIRA, 2013).

Tendo em vista a extrema relevância desta problemática no cenário atual; a polícia científica e institutos de pesquisa forense buscam métodos alternativos na detecção de drogas, fazendo do conhecimento científico uma ferramenta de extrema importância na elucidação de crimes. No Brasil, a problemática do uso de drogas é muito complexa e as substâncias ilícitas mais populares comercializadas em território nacional são: maconha, cocaína, crack, merla e pasta de cocaína; possivelmente tal popularidade esteja relacionada à facilidade de aquisição e aos baixos custos.

A maconha é cultivada de forma ilícita principalmente em áreas isoladas da região nordeste, principalmente na Bahia, Pernambuco e Maranhão e na região norte nos estados do Pará e Amazonas; além de entrar em território nacional pela fronteira com o Paraguai através de rotas alternativas ou clandestinamente pela Ponte da Amizade. (PASSAGLI, 2008).

Tanto a maconha quanto as demais drogas de abuso (cocaína, crack, etc.) têm seu uso proibido em território nacional, conforme a lei 11.343/06, intitulada de nova lei sobre drogas, ou também nova lei antidrogas (LUCHIARI; SILVA, 2007).

A maconha é uma planta que apresenta uma matriz química complexa, contendo aproximadamente 480 substâncias diferentes. Dentre essas substâncias, destacam-se óleos essenciais, flavonoides, açúcares, aminoácidos e ácidos graxos, compostos nitrogenados e terpenofenóis e a sua atividade farmacológica está associada a esta última classe de compostos, onde estão presentes mais de 60 canabinoides, os quais não foram relatados em outras espécies vegetais (LANARO, 2008).

Os testes químicos mais empregados pela polícia científica para a triagem da Cannabis sativa L. são Fast Blue B e Duquenóis-Levine, propostos no presente trabalho. A reação do Fast Blue B é atribuída à natureza fenólica das moléculas de canabinoides, sendo que o mecanismo reacional ocorre quando o extrato etéreo dos produtos de maconha forma um produto de coloração vermelho-púrpura, que é solúvel na fase orgânica (WEXLER, 2005). Já a reação do teste Duquenóis-Levine atribuída ao canabidiol, ao ∆9-THC e aos ácidos destes compostos, possui o resultado positivo caracterizado pelo aparecimento de um anel azul violáceo (KOVAR; LAUNDSZUN, 1989).

Para os testes supracitados, existe a descrição de uma incidência de resultados falso-positivos para folhas de alguns vegetais que apresentaram coloração idêntica à maconha (BALBINO, 2012).

1.1 PROBLEMATIZAÇÃO

Neste contexto, vale ressaltar que alguns estudos (KELLY, 2008; BALBINO et al., 2012) relatam a existência de resultados falso-positivos para os testes colorimétricos de identificação da maconha. Tal fato evidencia a pouca seletividade desses testes e a necessidade de serem realizados em associação com outros métodos analíticos, a fim de produzir resultados precisos e mais confiáveis (MENEZES, 2010).

A abundância de compostos fenólicos na matriz química de inúmeras plantas poderiam gerar resultados falso-positivos para os testes de Fast Blue B e Duquenóis-Levine quando desenvolvidos para as folhas de algumas espécies vegetais.

Desta forma o presente trabalho busca investigar espécimes vegetais presentes na área urbana do município de Avaré-SP que possam gerar respostas falso-positivas aos testes colorimétricos Fast Blue B e Duquenóis-Levine verificando especificidades, a saber: alterações nos resultados após a secagem do material foliar até que atinja massa constante, comparações entre os resultados realizados em tubos de ensaio e em papel filtro e comparações da seletividade entre os testes colorimétricos utilizados.

1.2 – A MACONHA

A maconha (*Cannabis sativa linnaeus*) foi classificada botanicamente pela primeira vez em 1753, pelo biólogo Carl Von Linnè. Apesar de seus registros milenares, atualmente o uso desta planta encontra-se sob controle legal internacional (PASSAGLI, 2008).

Possivelmente foi introduzida clandestinamente no Brasil pelos escravos trazidos da África, pois era muito utilizada em sua forma fumada em ritos e crenças, como por exemplo, o candomblé (FARIAS, 2007).

Conforme supracitado, tanto a maconha quanto as demais drogas de abuso (cocaína, crack, etc.) têm seu uso proibido em território nacional, conforme a lei 11.343/06, intitulada de nova lei sobre drogas, ou também nova lei antidrogas (LUCHIARI; SILVA, 2007).

De acordo com o relatório anual da UNODC (United Nations Office on Drugs and Crime - 2008), cerca de 165,6 milhões de pessoas consumiram maconha entre 2006-2007 e estima-se que 10% dos que experimentaram se tornaram usuários diários e 20 a 30% consomem semanalmente.

Também de acordo com o relatório anual da UNODC (United Nations Office on Drugs and Crime - 2018), a maconha foi a droga mais amplamente consumida em 2016, com 192 milhões de pessoas tendo-a utilizado pelo menos uma vez ao longo do último ano. O número global de usuários de cannabis continua a aumentar e aparenta ter expandido em aproximadamente 16% na ultima década até 2016.

Segundo dados estatísticos da Polícia Federal, a maconha figura como a droga que perfaz o maior número de apreensões em todo o Brasil, sendo que a principal região é a centro-oeste, seguida pela sul, sudeste, norte e nordeste.

1.3 – ESTRUTURA QUÍMICA

O ∆9-THC ((–)–∆9–trans–tetraidrocanabinol), cuja estrutura química está representada nas Figuras 1.1.a e 1.1.b, foi sintetizado e isolado pela primeira em 1964 por Raphael Mechoulam, Yechiel Gaoni e Habib Edery em Israel e atualmente

é considerado o principal responsável pelas propriedades psicoativas da planta e sua concentração na maconha está diretamente ligada à potência de seus efeitos sobre o sistema nervoso central (SNC). A concentração desta substância presente na maconha pode variar dependendo das condições ambientais utilizadas no cultivo da planta (fertilidade do solo, clima, temperatura, época da colheita, luminosidade, nutrientes, água, etc.), podendo a maconha ter um teor de ∆9-THC variando de 0,5% a mais de 40%. Outros fatores também podem alterar a composição de ∆9-THC no vegetal, bem como o estado de armazenamento, parte do vegetal utilizada, estágio de desenvolvimento da planta, formas e preparação na secagem da planta (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

Figura 1.1.a - Estrutura química do ∆9-THC [(–)–∆9–trans – tetraidrocanabinol] ($C_{21}H_{30}O_2$). (Imagem gerada pelo ACDLABS 11.0 ChemSketch (freeware version) 1994-2008).

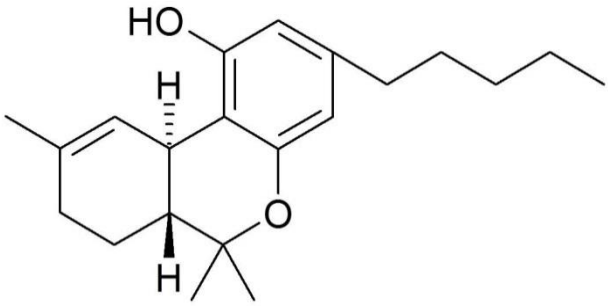
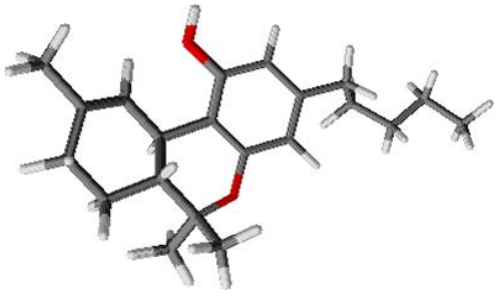


Figura 1.1.b - Estrutura química espacial do ∆9-THC; região cinza representa carbono, vermelha oxigênio e a branca, o hidrogênio. (Imagem gerada pelo ACDLABS 11.0 ChemSketch (freeware version) 1994-2008).



Além do ∆9-THC, outros canabinoides estão presentes nas folhas, flores, caule e ramos da maconha. Dentre estes, os canabinoides de maior importância farmacológica são: ∆8-THC, que apresenta menor efeito psicoativo que o ∆9-THC; o

Canabidiol (CBD), que não apresenta efeito psicoativo, no entanto atua como anticonvulsivo e sedativo; o Canabinol (CBN), que possui efeito psicoativo apenas via intravenosa e apresenta atividade anti-inflamatória; o Ácido ∆8-THC e Ácido ∆9-THC, que apresentam atividade psicoativa, sendo que o ácido ∆9-THC só é ativado quando aquecido e convertido em ∆9-THC; o Canabigerol, não psicoativo, mas pode apresentar efeito bacteriológico; o Canabicromeno (CBC), Canabiciclol (CBL) e seus ácidos (STAMBOULI et al., 2005; LANARO, 2008).

1.4 – IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

A Cannabis sativa L, também conhecida como cânhamo indiano, é uma planta da família Cannabaceae, originária da Ásia e cultivada principalmente em climas tropicais e temperados. Por ser uma planta que apresenta polimorfismo de suas características externas, não há ainda um consenso sobre a sua sistematização, podendo ser classificada segundo as suas variedades ou espécies (C. sativa, C. ruderalis, C. indica) e composição química ou quimiotipos (tipo fibra ou tipo droga) (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

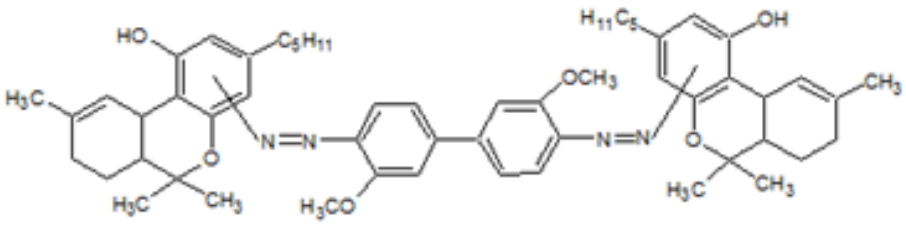
É uma planta herbácea, dioica, anual, com aspecto arbustivo, podendo atingir até seis metros de altura. Possui caules fibrosos, eretos, ocos, finos, com estrias longitudinais e tricomas, além de raiz axial. As folhas são simples, palmatissectas, longo-pecioladas, levemente ásperas, com segmentos linear-lanceolares e serradas nas bordas, contendo números ímpares (de 3 a 11) (PASSAGLI, 2008).

Suas flores não são vistosas, mas possuem características morfológicas distintas da masculina para a feminina. Predominam inflorescências ou formações florais, que produzem uma resina com alto teor de ∆9-THC, a qual protege a planta da desidratação. Os frutos ou aquênios (contêm uma semente) são marrom-esverdeados e ovoides (4,0 x 3,0 mm), confundidos às vezes com as sementes, podendo estar ou não com os cálices persistentes. As plantas masculinas possuem um porte mais elevado, ramos mais finos e folhas mais longas que as femininas (SOUZA; MICHELIN; HOLLER, 2006).

1.5 – TESTES COLORIMÉTRICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DA MACONHA

Os testes químicos mais utilizados para a triagem da *Cannabis sativa L.* são Fast Blue B e Duquenóis-Levine. A reação do Fast Blue B é atribuída à natureza fenólica da molécula de canabinoides, sendo que o mecanismo reacional ocorre quando o extrato etéreo ou alcoólico dos produtos de maconha através da reação descrita na Figura 1.2.a, forma um produto de coloração vermelho-púrpura, que é solúvel na fase orgânica (WEXLER, 2005).

Figura 1.2.a - Possível produto de reação formado na reação do Fast Blue B com o ∆9-THC. (Imagem gerada pelo ACDLABS 11.0 ChemSketch (freeware version) 1994-2008).

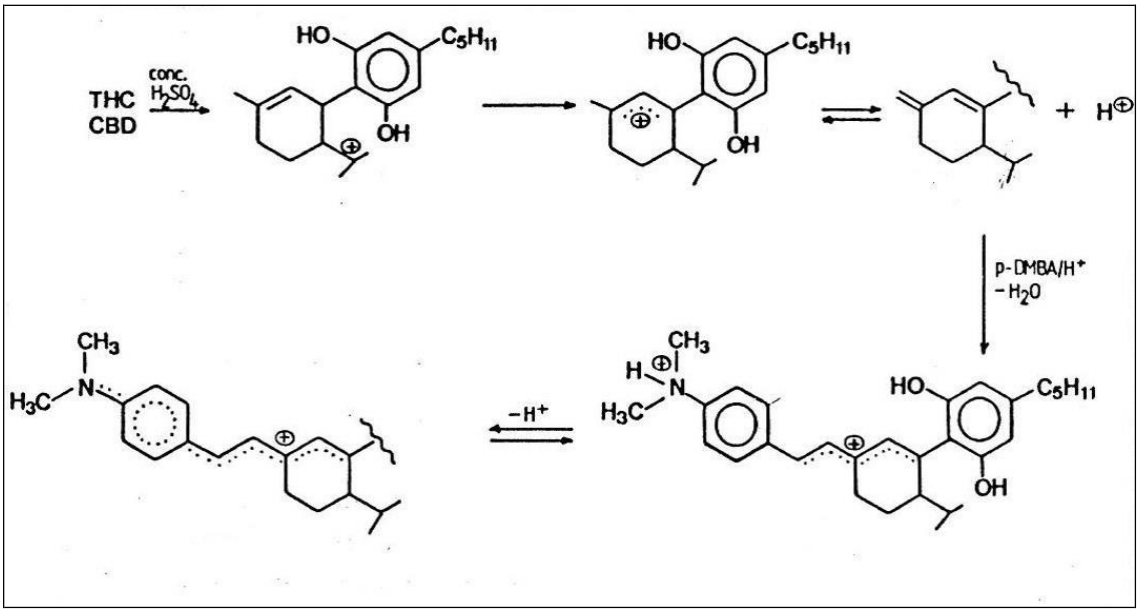


Acredita-se que tal coloração seja resultante da interação química entre compostos fenólicos presentes na planta e o reagente colorimétrico Fast Blue B. Desta forma, foi estudada a reação de uma solução aquosa fenólica com o reagente Fast Blue B (Figura 1.2.b), apresentando uma coloração avermelhada. A coloração obtida nesta reação é característica do resultado positivo para o teste empregado, devido à interação do reagente colorimétrico ao fenol; assim como se pode observar após a reação do Fast Blue B aos compostos de natureza fenólica da molécula de canabinoides.

Figura 1.2.b - Reação entre fenol e reagente colorimétrico Fast Blue B

A reação do teste Duquenóis-Levine atribuída ao canabidiol, ao ∆9-THC e aos ácidos destes compostos (Figura 1.2.c), possui o resultado positivo caracterizado pelo aparecimento de um anel azul violáceo (KOVAR; LAUNDSZUN, 1989).

Figura 1.2.c - Reação de Duquenóis-Levine, entre os constituintes da Cannabis sativa L. e vanilina em meio ácido.



2 - OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

Este projeto visa investigar por meio de testes analíticos do tipo “spot tests” (Teste com Fast-Blue B e Teste com Reagente de Duquenóis-Levine) amostras vegetais que possam gerar resultados falsos para canabinoides, em especial o Δ9-THC presente na maconha e, desta forma, colaborar com a identificação de falso-positivos que possam ocorrer em análises deste tipo ligadas à ciência forense envolvendo a droga.

2.2- Objetivos Específicos

- Realizar testes com Fast Blue B e Reagente de Duquenóis-Levine em amostras vegetais comumente presentes na área urbana do município de Avaré-SP, na fase in natura e secas em estufa, com o extrato vegetal em solução e em papel filtro.

- Efetuar a comparação dos resultados obtidos em solução e em papel-filtro, objetivando a comparação da seletividade de ambos os testes analíticos utilizados no presente trabalho.

3- PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

O presente trabalho foi executado no Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia – Campus Catanduva e Avaré, sendo desenvolvido nos laboratórios de química dos mesmos. Inicialmente foram empregados seis exemplares das espécies descritas e, posteriormente, mais duas espécies foram submetidas aos testes propostos.

3.1- Espécies vegetais submetidas aos testes colorimétricos.

Tabela 1.1 – Família, nome popular e científico dos espécimes vegetais submetidos aos testes colorimétricos.

Amostra	Família	Nome popular	Nome científico
1	Pinaceae	Pinus	*Pinus Taiwanensis*
2	Myrtaceae	Pitanga	*Eugenia uniflora*
3	Rutaceae	Juva	*Zanthoxylum rhoifolium*
4	Magnoliacea	Magnólia-amarela	*Michelia chumpaca*
5	Euphorbiaceae	Mamona	*Ricinus communis*
6	Bignoniaceae	Ipê-amarelo	*Tabebuia alba*
7	Euphorbiaceae	Mandioca	*Manihot esculenta*
8	Fabaceae	Vagem	*Phaseolus vulgaris*

3.2- Testes Colorimétricos

Para a realização dos testes Fast Blue B (FB) e Duquenóis-Levine (DL) foram realizadas as coletas de ramos das espécies no dia anterior às análises e estas foram deixadas em bacias individuais com água, de modo a evitar a desidratação dos vegetais, que em seguida foram levadas ao Laboratório de Química do IFSP – Campus Avaré para a preparação das amostras.

Após a realização dos testes colorimétricos com as folhas in natura, colocou-se 28,0 gramas do material foliar em estufa à temperatura de 100° C e procedeu-se com as análises colorimétricas em intervalos de 6 horas até a amostra atingir massa constante. Foram retirados 1.25 gramas em cada intervalo de análise para a realização dos testes colorimétricos.

3.3.1 – Teste de Fast Blue B

O teste de Fast Blue B trata-se de um spot test preparado a partir da dissolução do sal em água deionizada. A reação do teste colorimétrico com um extrato vegetal pode ter como resultado a coloração vermelho púrpura, se houver a reação deste com possíveis compostos de natureza fenólica presentes na amostra vegetal, caracterizando, neste caso, o resultado positivo.

3.3.1.1 Preparação da Solução de Fast Blue B

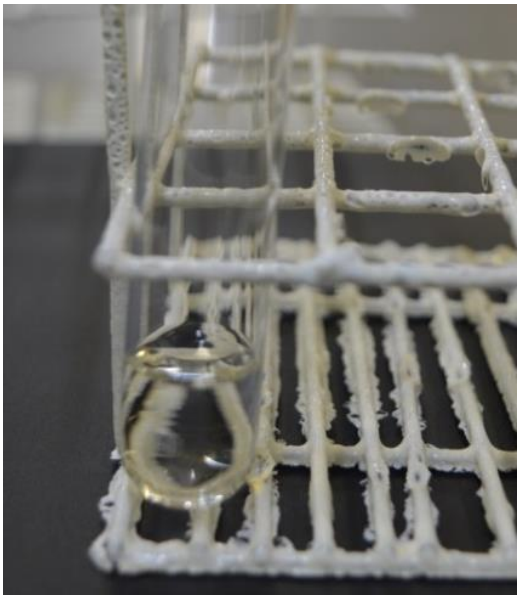
A solução de Fast Blue B 0,35%(m/v) foi preparada no momento da primeira análise (*in natura*) pela dissolução de 0,035g do sal de Fast Blue B (cloreto de di-o-anisidina tetrazolio – Sigma-Aldrich®) em 10mL de água deionizada

3.3.1.2 – Procedimento analítico

O teste de Fast Blue B foi realizado em triplicata e com utilização do branco de reagentes (Figura 1.3). A análise colorimétrica foi realizada em tubos de ensaio sem a evaporação do solvente e em papel filtro, com a solução antes e após a evaporação da mesma. O branco de reagentes foi preparado à partir da adição do teste colorimétrico em questão numa solução de etanol 95% P.A.

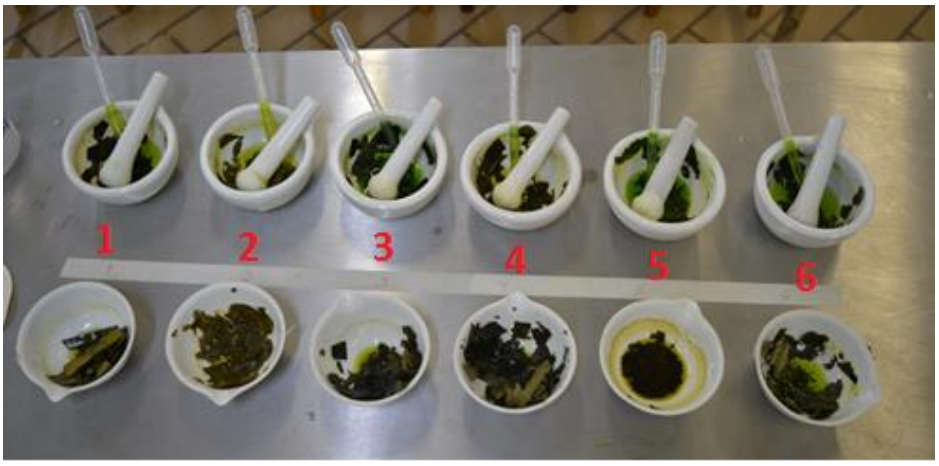
A importância da utilização do branco de reagentes é relacionada à indicação da interferência de outras espécies na amostra, ou seja, a partir dessa medida pode-se detectar se algum analito pode contaminar as novas análises, garantindo assim que nenhuma substância interfira na análise experimental de modo a reagir com os testes empregados gerando algum resultado.

Figura 1.3 – Solução branco para o teste de Fast Blue B em álcool 95% (v/v)



Para realização em tubos de ensaio preparou-se o extrato das folhas das plantas descritas, macerando em um almofariz 1,0 grama de cada amostra em 15,0 mL de etanol 95% (v/v) (Figura 1.4). Em seguida, verteu-se 2,0 mL do extrato etanólico nos tubos e adicionou-se cerca de 6 a 8 gotas da solução de Fast Blue B, observando a coloração adquirida.

Figura 1.4 – Preparação dos extratos dos espécimes 1 (*Pinus taiwanensis*), 2 (*Eugenia uniflora*),3 (*Zanthoxylum rhoifolium*), 4 (*Michelia chumpaca*), 5 (*Ricinus communis*) e 6 (*Tabebuia alba*) *in natura*.



Na realização do teste em papel filtro, foi empregado o mesmo extrato preparado para cada uma das amostras, adicionando cerca de 5 gotas de cada amostra em dois papéis filtro e borrifando a solução de Fast Blue B 0,35%(m/v) imediatamente sob um papel filtro e, após a evaporação do extrato etanólico no outro e observando a coloração adquirida.

3.3.2 – Teste de Duquenóis-Levine

O teste de Duquenóis-Levine consiste num teste colorimétrico elaborado a partir de uma solução de vanilina etanoica que, após adicionada ao tubo de ensaio que contém o extrato da espécie vegetal em questão e com a posterior adição de ácido clorídrico concentrado resultará na formação de um anel azul-violáceo para resultados positivos.

3.3.2.1 Preparação da Solução de vanilina etanolica 2%

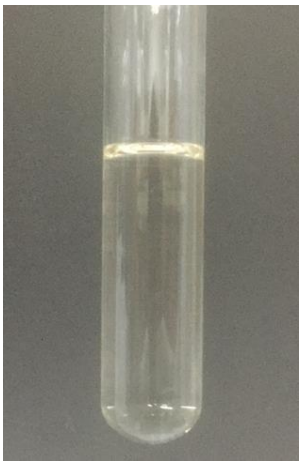
A solução de vanilina etanolica 2% (m/v) foi preparada no momento da primeira análise (*in natura*) pela dissolução de 1,0 grama de vanilina P.A. em etanol 95% P.A. e, posteriormente, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL; então foram adicionados 2,0 mL de ácido sulfúrico P.A. e o restante elevado à volume com etanol 95% P.A.

3.3.2.2 – Procedimento analítico

Para o teste de Fast Blue B, inicialmente foi empregado o branco de reagentes (Figura 1.5), a fim de se obter um panorama de coloração entre os reagentes e o revelador de Fast Blue B. Então, a análise colorimétrica foi realizada em tubos de ensaio sem a evaporação do solvente.

O branco de reagentes foi preparado à partir da adição do teste colorimétrico em questão numa solução de etanol 95% P.A.

Figura 1.5 – Solução branco para o teste de Duquenóis Levine em álcool 95% (v/v).



Para realização em tubos de ensaio preparou-se o extrato das folhas das plantas descritas, macerando em um almofariz 1,0 grama de cada amostra com 10 mL de etanol 95% (v/v). Em seguida, verteu-se 2,0 mL do extrato etanólico nos tubos e foram adicionados 2,0 mL da solução de vanilina etanolica 2%. Por fim, a cada tubo, foram adicionados 2,0 mL de ácido clorídrico P.A., observando a coloração adquirida pelas amostras.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Podemos observar na Tabela 1.2 a seguir as massas das amostras com o decorrer das observações.

Tabela 1.2 – Massas das amostras analisadas no intervalo de 6 horas, retirando 1,25 grama a cada análise para execução dos testes com Fast Blue B e Duquenóis-Levine.

Amostra	Espécie	Massa	6h	12h	18h	24h	30h	36h
1	*Pinus taiwanensis*	28g	12,38g	11,96g	10,10g	9,14g	5,96g	4,39g
2	*Eugenia uniflora*	28g	10,89g	9,84g	8,75g	7,71g	6,65g	5,81g
3	*Zanthoxylum rhoifolium*	28g	10,46g	9,23g	8,15g	7,05g	4,93g	3,11g
4	*Michelia chumpaca*	28g	6,59g	5,56g	4,52g	3,45g	2,47g	1,56g
5	*Ricinus communis*	28g	5,63g	4,54g	3,51g	2,50g	1,50g	0,50g
6	*Tabebuia alba*	28g	11,14g	10,08g	9,08g	7,96g	6,96g	5,95g
7	*Manihot esculenta*	28g	8,35g	7,00g	6,29g	5,45g	3,65g	2,53g
8	*Phaseolus vulgaris*	28g	7,76g	6,44g	5,11g	4,89g	3,14g	1,73g

4.1 – Teste de Fast Blue B em papel filtro

4.1.1 – Pinus (*Pinus taiwanensis*)

As folhas de pinus *in natura* não apresentaram resultado falso-positivo para o teste Fast Blue B, conforme mostra a Figura 2.1.a. Em 12 horas de secagem pode-se notar uma coloração avermelhada, como sendo um indicativo de falso-positivo, no entanto inconclusiva. Após 12 horas de secagem não é mais observada coloração aparente, conforme observado na Figura 2.1.b

Figura 2.1.a - Extrato em papel filtro (úmido e seco) da espécie *Pinus taiwanensis in natura*

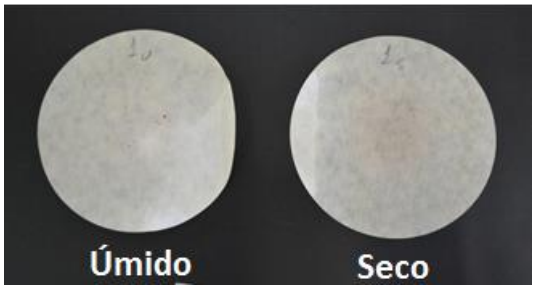
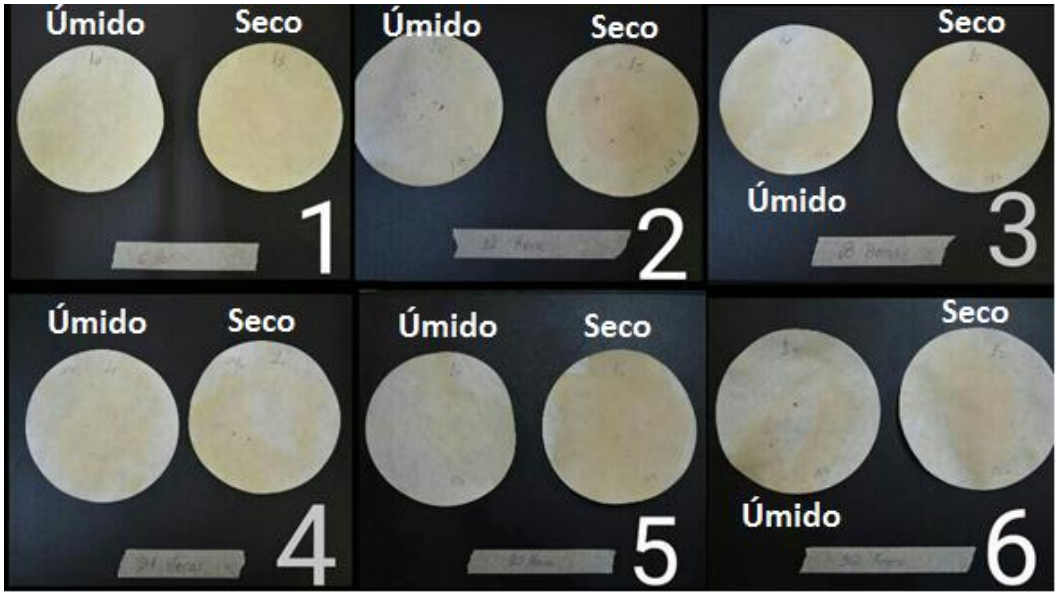


Figura 2.1.b – Extratos em papel filtro (úmido e seco) da espécie *Pinus taiwanensis* após 6 horas (1); 12 horas (2); 18 horas (3); 24 horas (4); 30 horas (5) e 36 horas (6).



4.1.2 – Pitanga (*Eugenia uniflora)*

As folhas de pitanga *in natura* apresentaram resultado falso-positivo para o teste Fast Blue B, conforme mostra a Figura 2.2.a. Em 12 horas de secagem pode-se notar uma coloração avermelhada, como sendo um indicativo de falso-positivo, no entanto inconclusiva. Após 12 horas de secagem o teste foi negativo em todas as observações, não sendo mais observada coloração aparente (Figura 2.2.b).

Figura 2.2.a - Extrato em papel filtro (úmido e seco) da espécie *Eugenia uniflora in natura.*

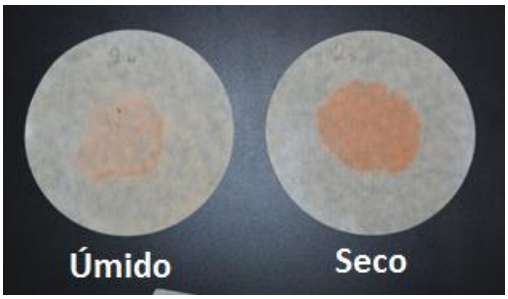
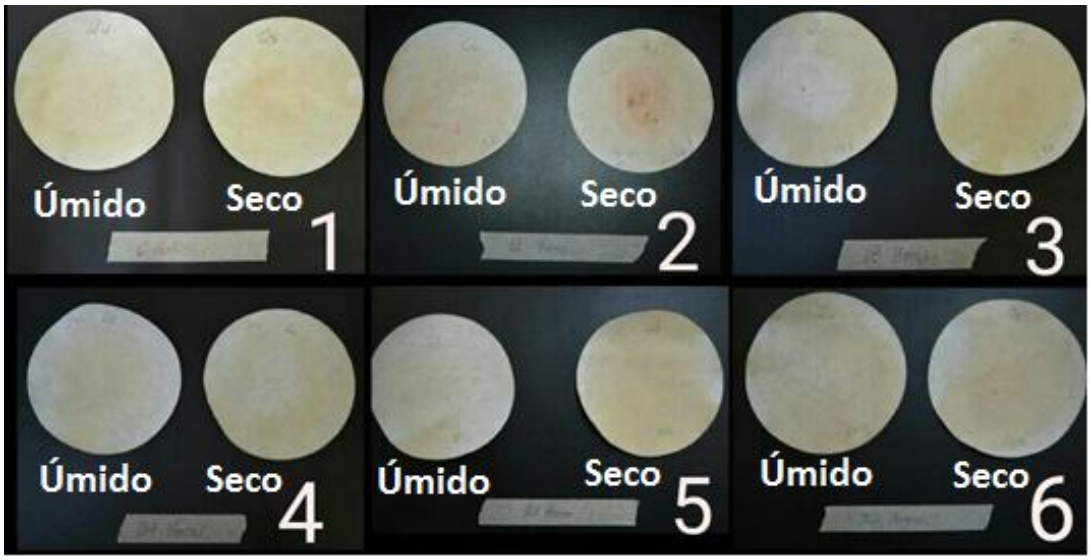


Figura 2.2.b - Extratos em papel filtro (úmido e seco) da espécie *Eugenia uniflora* após 6 horas (1); 12 horas (2); 18 horas (3); 24 horas (4); 30 horas (5) e 36 horas (6).



4.1.3 – Juva (*Zanthoxylum rhoifolium)*

As folhas de juva *in natura* apresentaram resultado falso-positivo para o teste Fast Blue B, conforme a Figura 2.3.a. Após 6 horas de análise o teste foi negativo em todas as observações, não sendo mais observada coloração aparente (Figura 2.3.b).

Figura 2.3.a - Extrato em papel filtro (úmido e seco) da espécie *Zanthoxylum rhoifolium in natura*

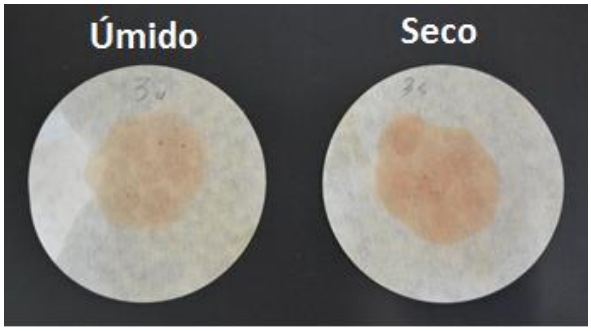
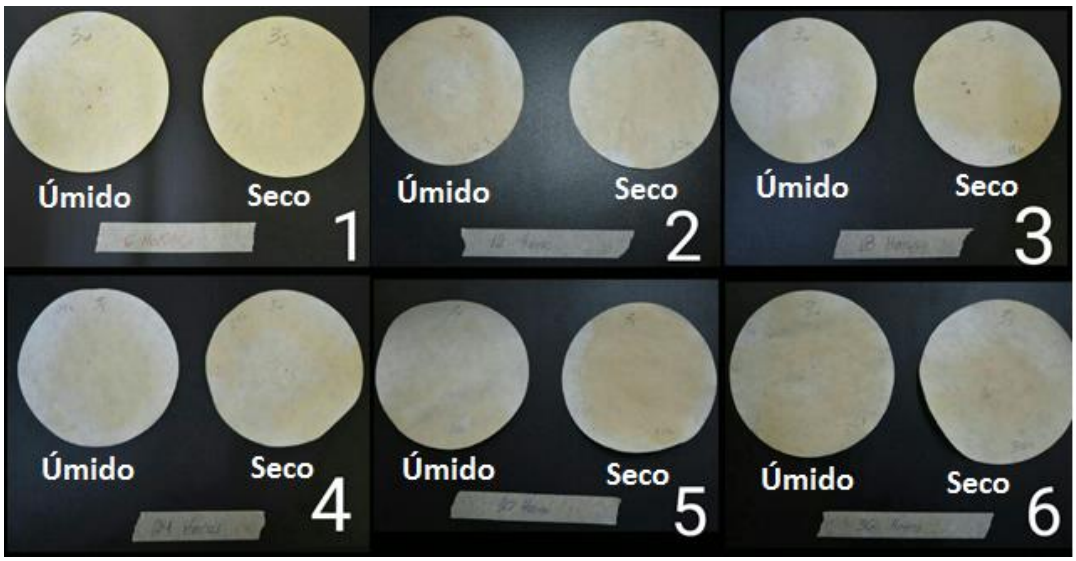


Figura 2.3.b - Extratos em papel filtro (úmido e seco) da espécie *Zanthoxylum rhoifolium* após 6 horas (1); 12 horas (2); 18 horas (3); 24 horas (4); 30 horas (5) e 36 horas (6).



4.1.4 – Magnólia-amarela (*Michelia chumpaca)*

As folhas de magnólia-amarela *in natura* não apresentaram resultado falso-positivo para o teste Fast Blue B, conforme mostra a Figura 2.4.a. Em nenhuma das observações posteriores pode-se notar coloração aparente, como mostra a Figura 2.4.b tratando-se em, todas as análises, de resultados negativos.

Figura 2.4.a - Extrato em papel filtro (úmido e seco) da espécie *Michelia chumpaca in natura*.

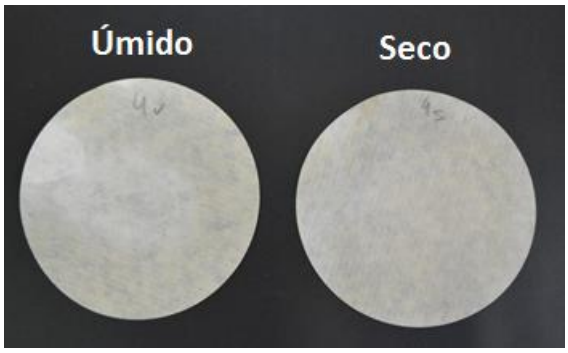


Figura 2.4.b - Extratos em papel filtro (úmido e seco) da espécie *Michelia chumpaca* após 6 horas (1); 12 horas (2); 18 horas (3); 24 horas (4); 30 horas (5) e 36 horas (6).

4.1.5 – Mamona (*Ricinus communis*)

As folhas de mamona *in natura* não apresentaram resultado falso-positivo para o teste Fast Blue B, conforme mostra a Figura 2.5.a. Em nenhuma das observações posteriores pode-se notar coloração aparente, como mostra a Figura 2.5.b tratando-se em, todas as análises, de resultados negativos.

Figura 2.5.a - Extrato em papel filtro (úmido e seco) da espécie *Ricinus communis in natura*

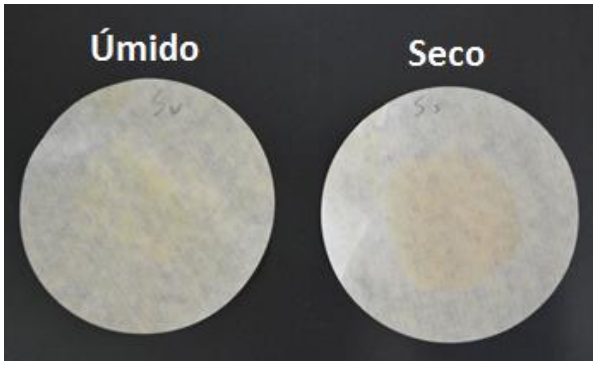
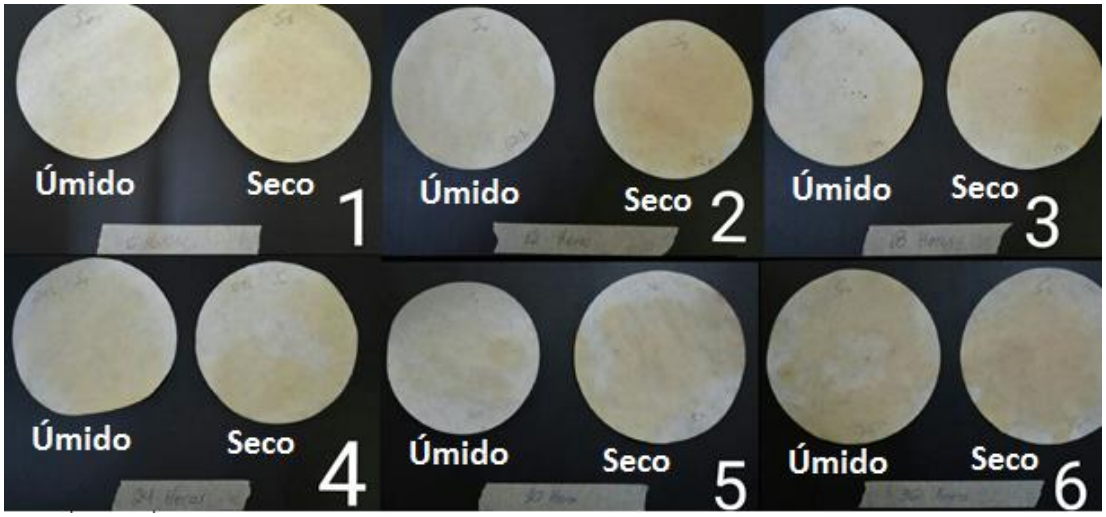


Figura 2.5.b - Extratos em papel filtro (úmido e seco) da espécie *Ricinus communis* após 6 horas (1); 12 horas (2); 18 horas (3); 24 horas (4); 30 horas (5) e 36 horas (6).



4.1.6 – Ipê-amarelo (*Tabebuia alba*)

As folhas de Ipê-amarelo *in natura* não apresentaram resultado falso-positivo para o teste, conforme mostra a Figura 2.6.a. Em nenhuma das observações posteriores pode-se notar coloração aparente, como mostra a Figura 2.6.b tratando-se em, todas as análises, de resultados negativos.

Figura 2.6.a - Extrato em papel filtro (úmido e seco) da espécie *Tabebuia alba in natura*

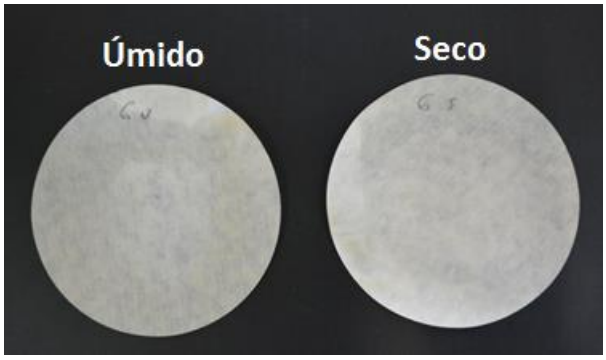
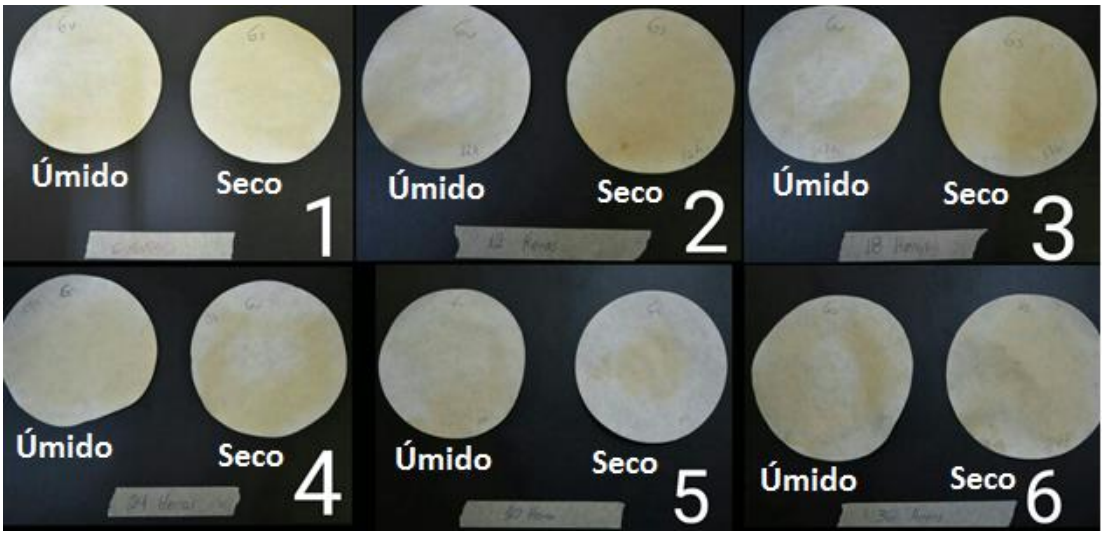


Figura 2.6.b - Extratos em papel filtro (úmido e seco) da espécie *Tabebuia alba* após 6 horas (1); 12 horas (2); 18 horas (3); 24 horas (4); 30 horas (5) e 36 horas (6).



4.1.7 – Mandioca (*Manihot esculenta*)

As folhas de Mandioca *in natura* não apresentaram resultado falso-positivo para o teste, conforme mostra a Figura 2.7.a. Em nenhuma das observações posteriores pode-se notar coloração aparente, como mostra a Figura 2.7.b tratando-se, em todas as análises, de resultados negativos.

Figura 2.7.a - Extrato em papel filtro (úmido e seco) da espécie *Manihot esculenta in natura.*

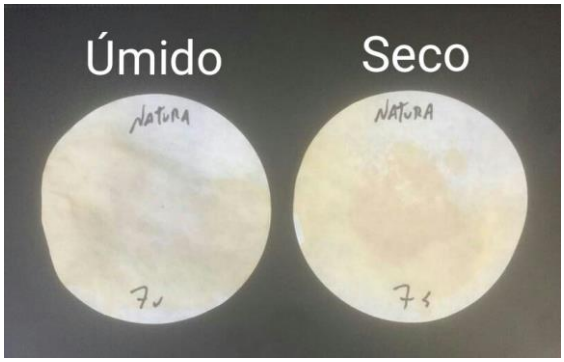
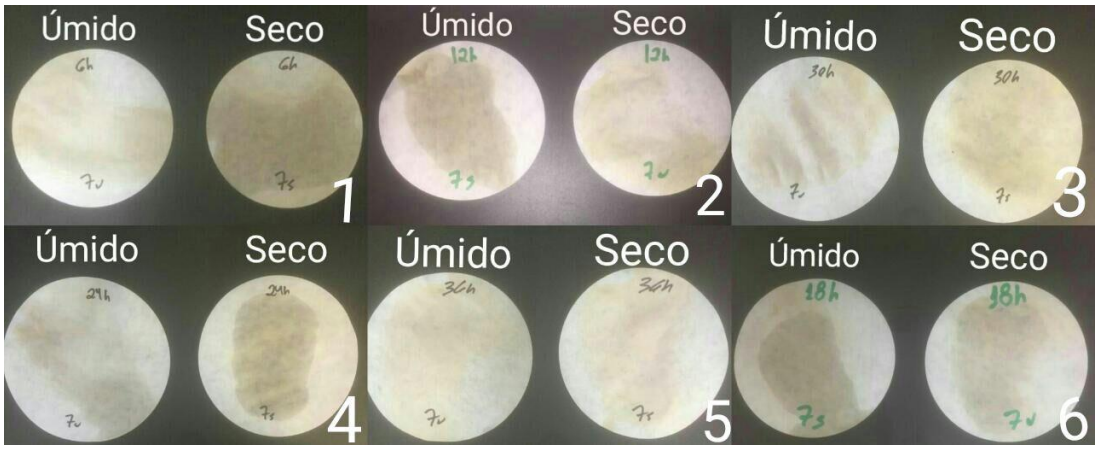


Figura 2.7.b - Extratos em papel filtro (úmido e seco) da espécie *Manihot esculenta* após 6 horas (1); 12 horas (2); 18 horas (3); 24 horas (4); 30 horas (5) e 36 horas (6).



4.1.8 – Vagem (*Phaseolus vulgaris*)

As folhas de Vagem *in natura* não apresentaram resultado falso-positivo para o teste, conforme mostra a Figura 2.8.a. Em nenhuma das observações posteriores pode-se notar coloração aparente, como mostra a Figura 2.8.b tratando-se em, todas as análises, de resultados negativos.

Figura 2.8.a - Extrato em papel filtro (úmido e seco) da espécie *Phaseolus vulgaris in natura.*

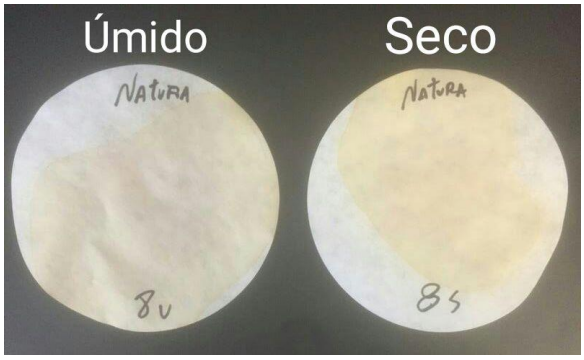
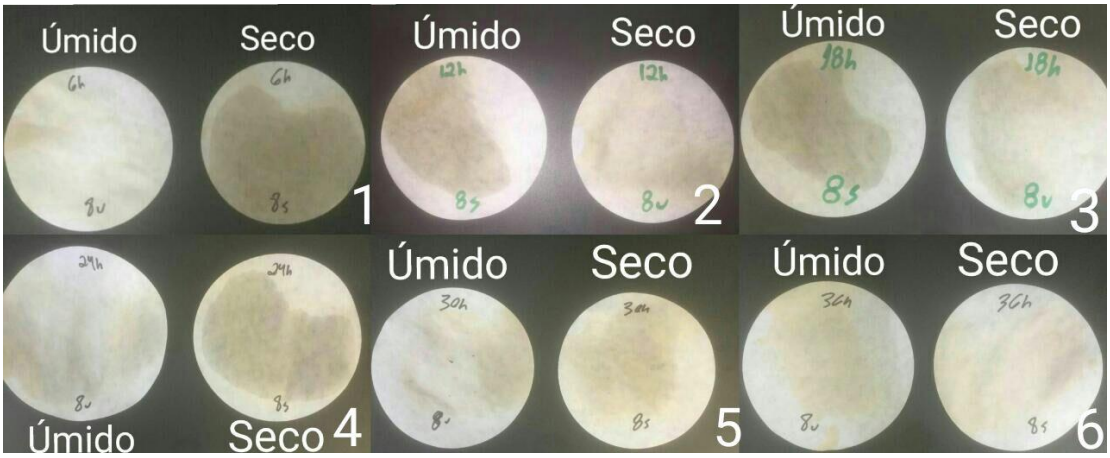


Figura 2.8.b - Extratos em papel filtro (úmido e seco) da espécie *Phaseolus vulgaris* após 6 horas (1); 12 horas (2); 18 horas (3); 24 horas (4); 30 horas (5) e 36 horas (6).



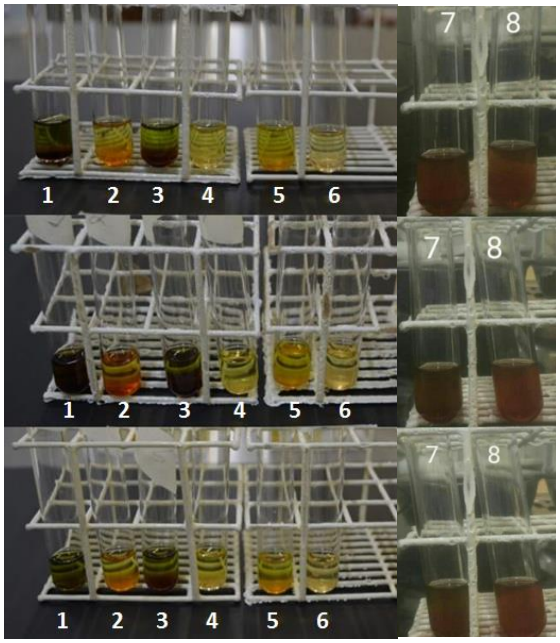
4.2 – Teste de Fast Blue B em tubos de ensaio

A Figura 3.1 traz os testes realizados em triplicata das espécies estudadas sendo que o tubo 1 apresentou uma coloração vermelho-sangue com poucas gotas do reagente Fast Blue B, mostrando um resultado falso-positivo para a maconha, no teste *in natura*. No tubo 2 a coloração adquirida foi de tonalidade muito clara, tratando-se de uma resposta negativa ou inconclusiva. No tubo 3 pode-se notar a coloração vermelho-sangue, tratando-se de um resultado falso-positivo para maconha no teste *in natura.* Nos tubos 4, 5 e 6 não houve alterações na coloração do extrato etanólico, sendo, portanto, resultados negativos. Nos tubos referentes às amostras 7 e 8 houve alteração na coloração do extrato para uma tonalidade

avermelhada, semelhante à coloração do reagente diluído, no entanto, esta coloração não figura um resultado falso-positivo, portanto as espécies 7 e 8 são resultados inconclusivos ou negativos.

Nos testes realizados para as amostras *in natura*, as espécies *Pinus Taiwanensis* e *Zanthoxylum rhoifolium* apresentaram respostas positivas, sendo consideradas falso-positivos quando realizado o teste colorimétrico.

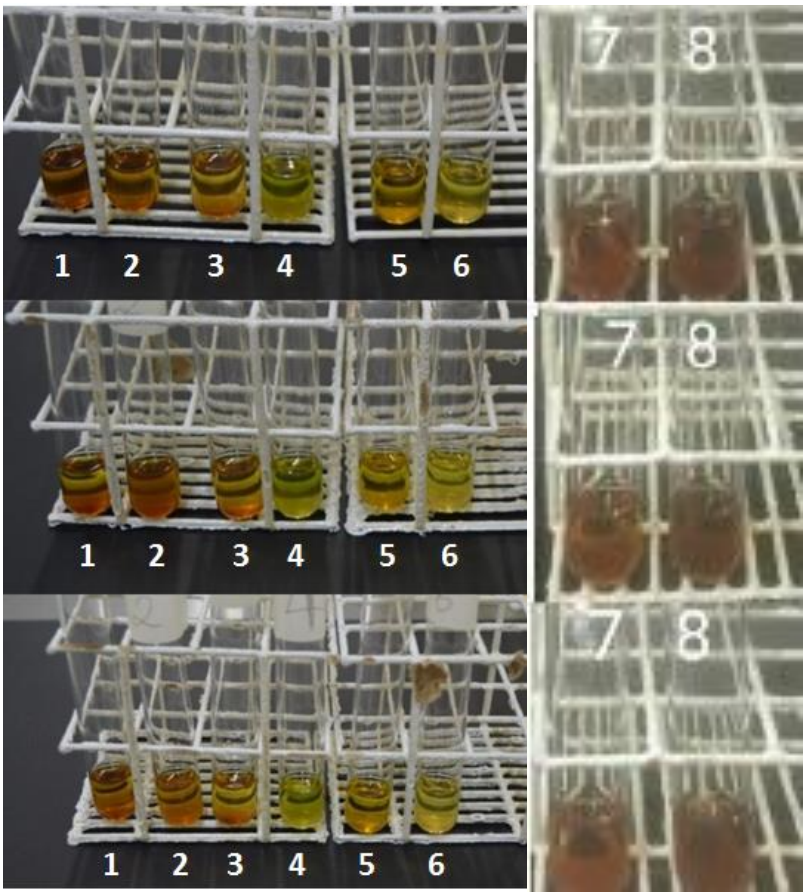
Figura 3.1 - Teste de Fast Blue B realizado em triplicata nas espécies *in natura*. Espécies 1 (*Pinus taiwanensis*), 2 (*Eugenia uniflora),* 3 (*Zanthoxylum rhoifolium*), 4 (*Michelia chumpaca*), 5 (*Ricinus communis*), 6 (*Tabebuia alba*), 7 (*Manihot esculenta*) e 8 (*Phaseolus vulgaris*).



A figura 3.2 traz os testes realizados em triplicata das espécies estudadas após 6 horas de secagem, sendo que os tubos 1 (Pinus), 2 (Pitanga) e 3 (Juva) apresentaram como resposta uma coloração de tonalidade muito clara, tratando-se de uma resposta negativa ou inconclusiva para o teste Fast Blue B. No tubo 5 (Mamona) a alteração na coloração do extrato etanólico foi mínima e quase imperceptível e nos tubos 4 (Magnólia-amarela) e 6 (Ipê Amarelo) não houve alterações na coloração, sendo, portanto, resultados negativos. Os tubos 7 (Mandioca) e 8 (Vagem) apresentaram uma coloração avermelhada bem clara,

também se tratando de respostas negativas. Sendo assim, nenhuma das espécies apresentou resposta falso-positiva ao teste colorimétrico em tubos de ensaio.

Figura 3.2 - Teste de Fast Blue B realizado em triplicata nas espécies após 6 horas. Espécies 1 (*Pinus taiwanensis*), 2 (*Eugenia uniflora),* 3 (*Zanthoxylum rhoifolium*), 4 (*Michelia chumpaca*), 5 (*Ricinus communis*), 6 (*Tabebuia alba*), 7 (*Manihot esculenta*) e 8 (*Phaseolus vulgaris*).

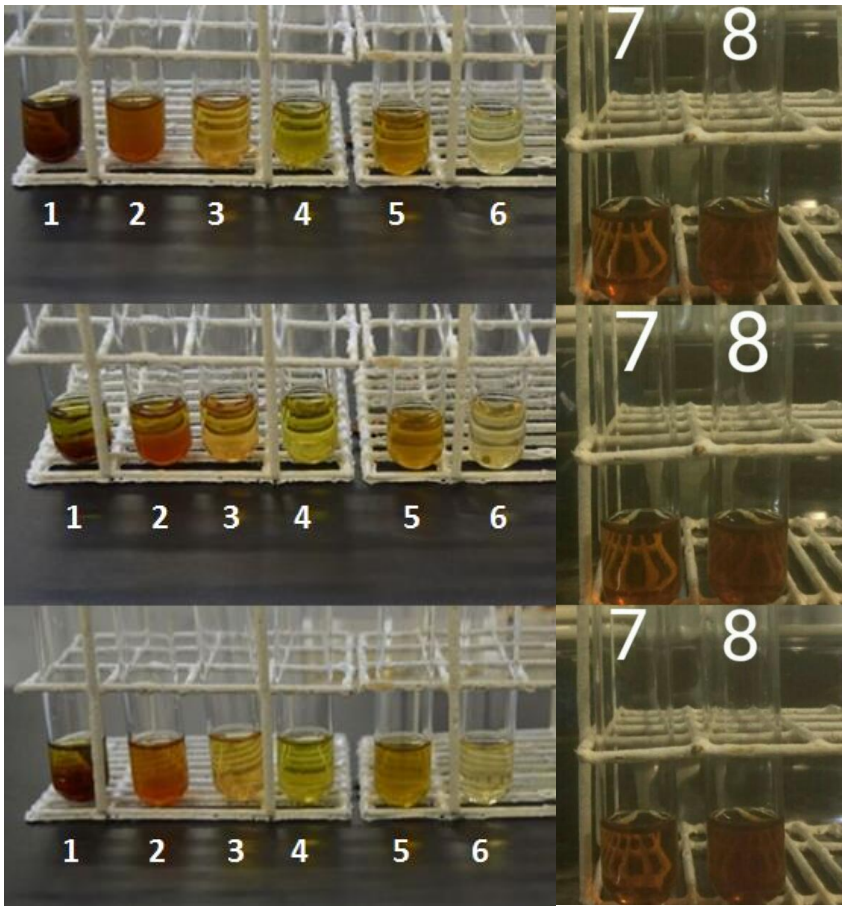


A Figura 3.3 traz os testes realizados em triplicata das espécies estudadas após 12 horas de secagem, sendo que o tubo 1 (Pinus) apresentou uma coloração vermelho escuro, mostrando um resultado falso-positivo para a maconha quando empregado o teste Fast Blue B. No tubo 2 (Pitanga) a coloração adquirida foi de tonalidade muito clara, tratando-se de uma resposta negativa ou inconclusiva. Os tubos 3 (Juva), 4 (Magnólia-amarela), 5 (Mamona) e 6 (Ipê-amarelo) não apresentaram alterações na coloração do extrato etanólico, sendo, portanto, resultados negativos. Os tubos 7 (Mandioca) e 8 (Vagem) apresentaram coloração

vermelha, mas diferem da tonalidade adequada para serem caracterizadas como resultado positivo; sendo portanto respostas negativas ou inconclusivas para o teste colorimétrico.

Nos testes realizados para a amostra da espécie *Pinus Taiwanensis* após 12 horas de secagem, a resposta foi positiva, sendo considerada um falso-positivo para o teste colorimétrico.

Figura 3.3 - Teste de Fast Blue B realizado em triplicata nas espécies após 12 horas. Espécies 1 (*Pinus taiwanensis*), 2 (*Eugenia uniflora),* 3 (*Zanthoxylum rhoifolium*), 4 (*Michelia chumpaca*), 5 (*Ricinus communis*), 6 (*Tabebuia alba*), 7 (*Manihot esculenta*) e 8 (*Phaseolus vulgaris*).

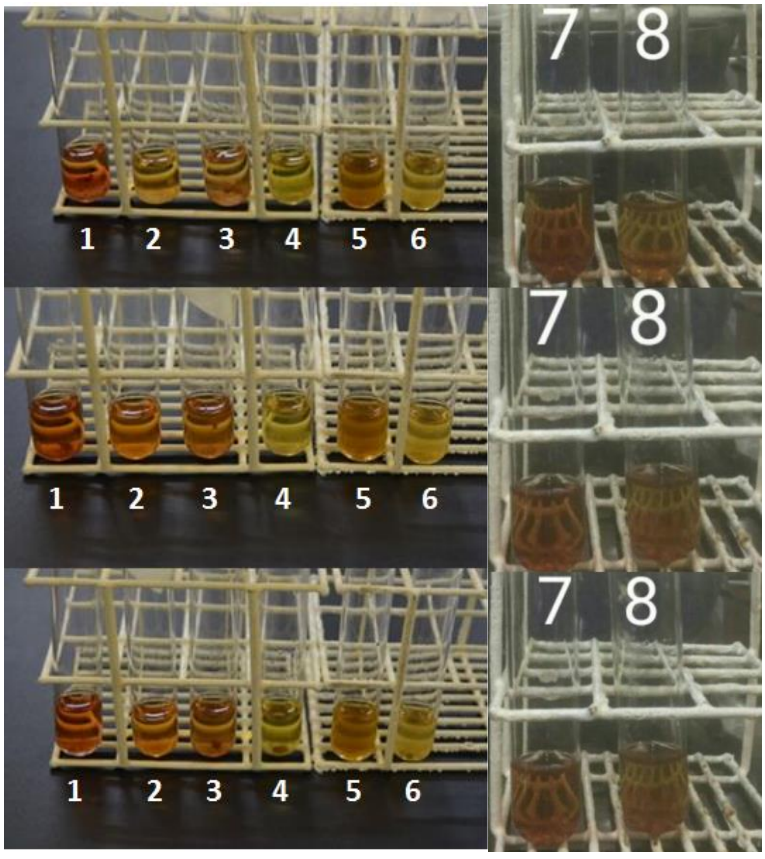


A figura 3.4 traz os testes realizados em triplicata das espécies estudadas após 18 horas de secagem em estufa, sendo que o tubo 1 (Pinus) apresentou uma coloração vermelho claro, tratando-se de um resultado negativo ou inconclusivo para o teste Fast Blue B. Nos tubos 2 (Pitanga), 3 (Juva), 4 (Magnólia-amarela), 5 (Mamona) e 6 (Ipê-amarelo) as alterações nas colorações dos extratos etanólicos

foram mínimas apresentando-se, portanto, como resultados negativos. Nos tubos 7 (Mandioca) e 8 (Vagem) as colorações observadas foram muito claras, apresentando transparências no extrato.

Nos testes realizados para as amostras após 18 horas, nenhuma das espécies apresentou resposta falso-positiva para o teste colorimétrico.

Figura 3.4 - Teste de Fast Blue B realizado em triplicata nas espécies após 18 horas. Espécies 1 (*Pinus taiwanensis*), 2 (*Eugenia uniflora),* 3 (*Zanthoxylum rhoifolium*), 4 (*Michelia chumpaca*), 5 (*Ricinus communis*), 6 (*Tabebuia alba*), 7 (*Manihot esculenta*) e 8 (*Phaseolus vulgaris*).

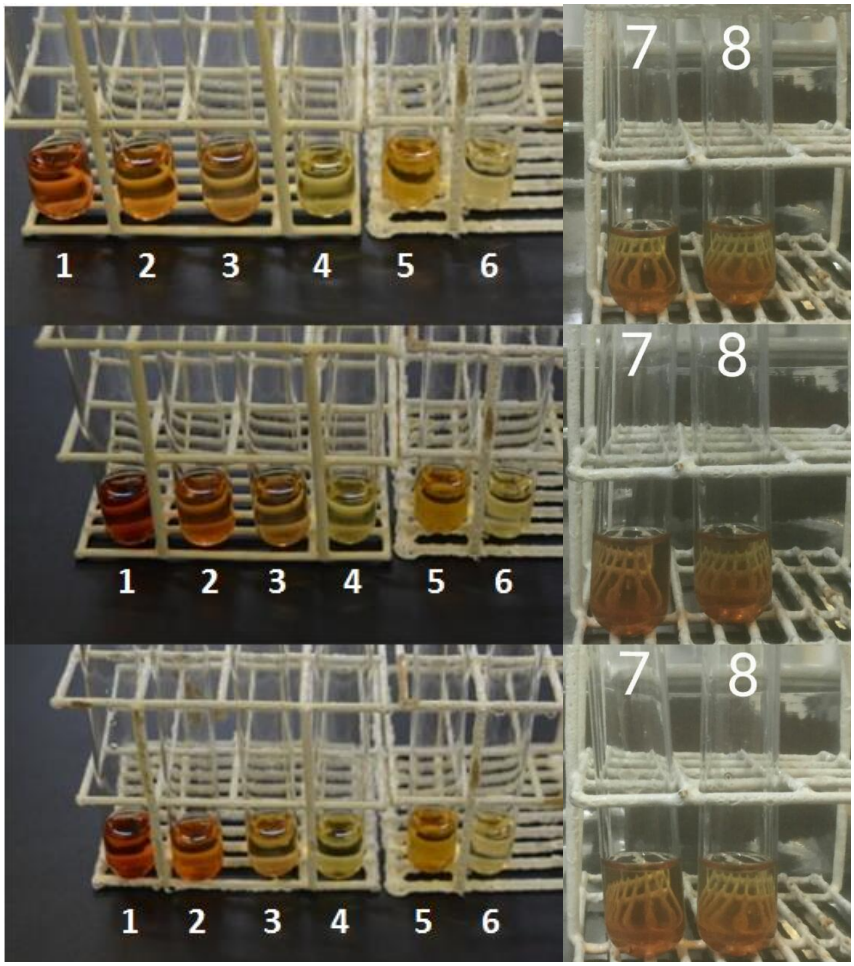


A figura 3.5 abaixo mostra os testes realizados em triplicata das espécies estudadas após 24 horas, sendo que o tubo 1 (Pinus) apresentou uma coloração avermelhada, indicativa da presença de compostos fenólicos, mas figuram resultado negativo ou inconclusivo para o teste.

Nos tubos 2 (Pitanga), 3 (Juva), 4 (Magnólia-amarela), 5 (Mamona) e 6 (Ipê-amarelo) as alterações na coloração do extrato etanólico foram mínimas, sendo, portanto, resultados negativos. Nos tubos 7 (Mandioca) e 8 (Vagem) a coloração observada foi muito clara, tornando-se também ainda mais transparente em relação à análise anterior.

Nos testes realizados para as amostras após 24 horas, nenhuma das espécies apresentaram respostas falso-positivas para o teste colorimétrico.

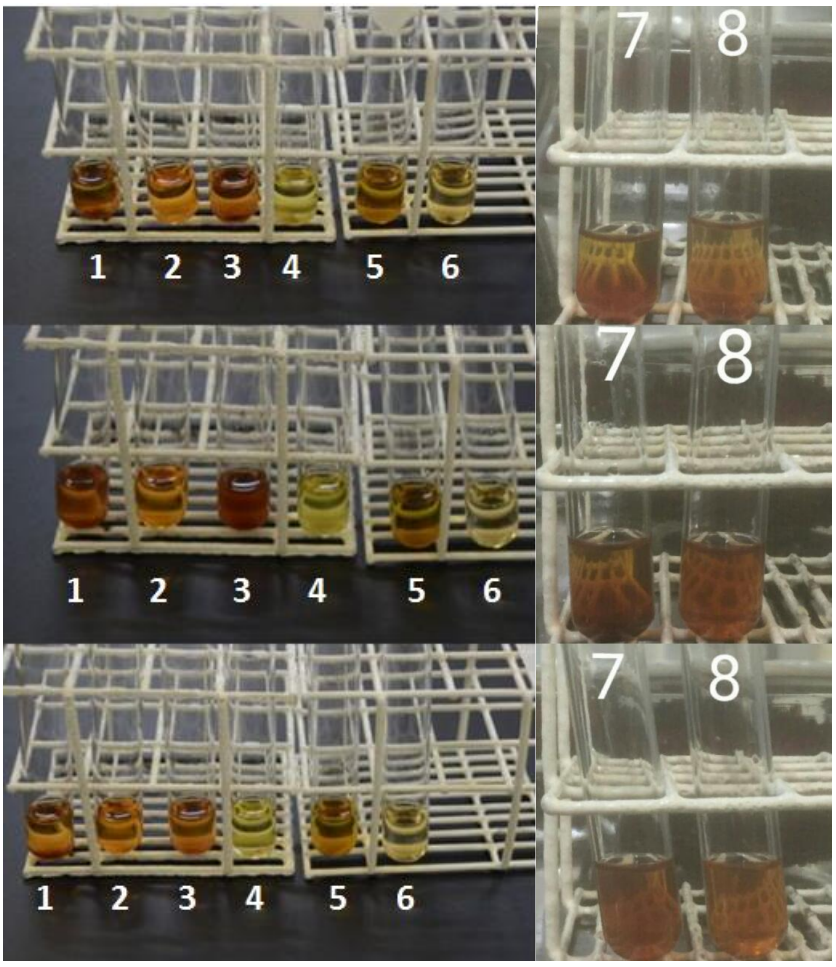
Figura 3.5 - Teste de Fast Blue B realizado em triplicata nas espécies após 24 horas. Espécies 1 (*Pinus taiwanensis*), 2 (*Eugenia uniflora),* 3 (*Zanthoxylum rhoifolium*), 4 (*Michelia chumpaca*), 5 (*Ricinus communis*), 6 (*Tabebuia alba*), 7 (*Manihot esculenta*) e 8 (*Phaseolus vulgaris*).



A figura 3.6 mostra resultados dos testes realizados em triplicata das espécies estudadas, após 30 horas; sendo que os tubos 1 (Pinus) e 3 (Juva) apresentaram coloração avermelhada, indicativo da presença de compostos fenólicos, conforme já supracitado no texto, mas figuram resultado negativo ou inconclusivo para o teste. Nos tubos 2 (Pitanga), 4 (Magnólia-amarela), 5 (Mamona), 6 (Ipê-amarelo), 7 (Mandioca) e 8 (Vagem) as alterações na coloração do extrato etanólico foram mínimas, sendo, portanto, resultados negativos.

Nos testes realizados para as amostras após 30 horas, nenhuma das espécies apresentaram respostas falso-positivas para o teste colorimétrico.

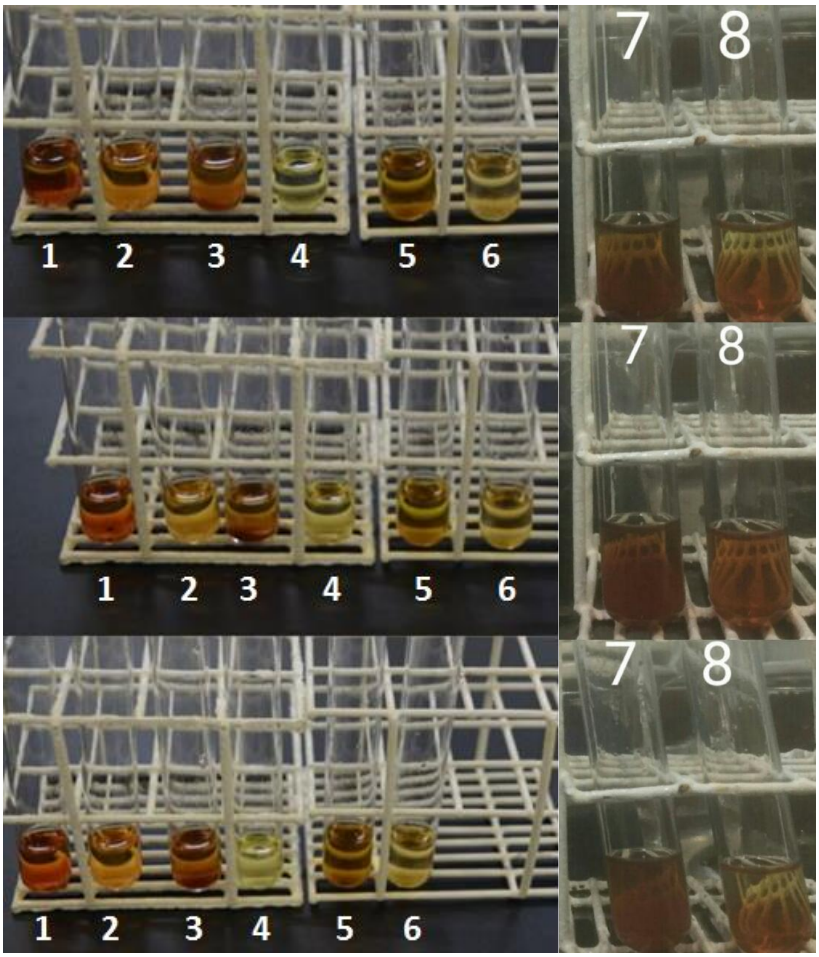
Figura 3.6 - Teste de Fast Blue B realizado em triplicata nas espécies após 30 horas. Espécies 1 (*Pinus taiwanensis*), 2 (*Eugenia uniflora),* 3 (*Zanthoxylum rhoifolium*), 4 (*Michelia chumpaca*), 5 (*Ricinus communis*), 6 (*Tabebuia alba*), 7 (*Manihot esculenta*) e 8 (*Phaseolus vulgaris*).



A figura 3.7 traz os testes realizados em triplicata das espécies estudadas após 36 horas, sendo que os tubos 1 (Pinus) e 3 (Juva) apresentaram uma coloração vermelha, mais uma vez, indicativo da presença de compostos fenólicos, mas figuram resultado negativo ou inconclusivo para o teste. Nos tubos 2 (Pitanga), 4 (Magnólia-amarela), 5 (Mamona), 6 (Ipê-amarelo), 7 (Mandioca) e 8 (Vagem) as alterações na coloração do extrato etanólico foram mínimas, portanto, mostrando-se como resultados negativos.

Nos testes realizados para as amostras após 36 horas, nenhuma das espécies apresentaram respostas falso-positivas para o teste colorimétrico.

Figura 3.7 - Teste de Fast Blue B realizado em triplicata nas espécies após 36 horas. Espécies 1 (*Pinus taiwanensis*), 2 (*Eugenia uniflora),* 3 (*Zanthoxylum rhoifolium*), 4 (*Michelia chumpaca*), 5 (*Ricinus communis*), 6 (*Tabebuia alba*), 7 (*Manihot esculenta*) e 8 (*Phaseolus vulgaris*).

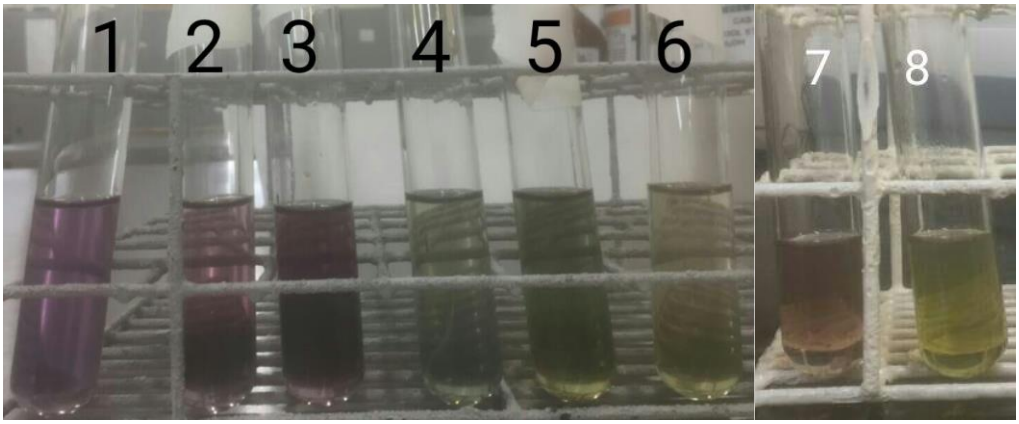


4.3 – Teste de Duquenóis-Levine em tubos de ensaio

A Figura 4.1 traz os testes realizados *in natura* nas espécies estudadas sendo que o tubo 2 apresentou uma coloração violeta, com formação de um anel na região inferior do extrato após a conclusão do teste, mostrando um resultado falso-positivo para maconha no teste *in natura* com as folhas empregadas. Nos tubos 1 e 3 a coloração adquirida também foi violeta, caracterizando uma resposta indicativa de falso-positivo, no entanto inconclusiva. Nos tubos 4, 5, 6 e 8 as alterações na coloração do extrato não evidenciaram nenhum tipo de resposta falso-positiva, indicativa ou conclusiva. O tubo 7 apresentou uma coloração violeta bem clara, sendo também uma resposta negativa para a reação estudada.

Desta forma; para as amostras *in natura*, a espécie *Eugenia Uniflora* foi a única que apresentou resposta falso-positiva, conforme já discutido. E as espécies *Pinus taiwanensis* e *Zanthoxylum rhoifolium* podem ser consideradas resultados indicativos de falso-positivos, no entanto inconclusivos, quando realizado o teste colorimétrico.

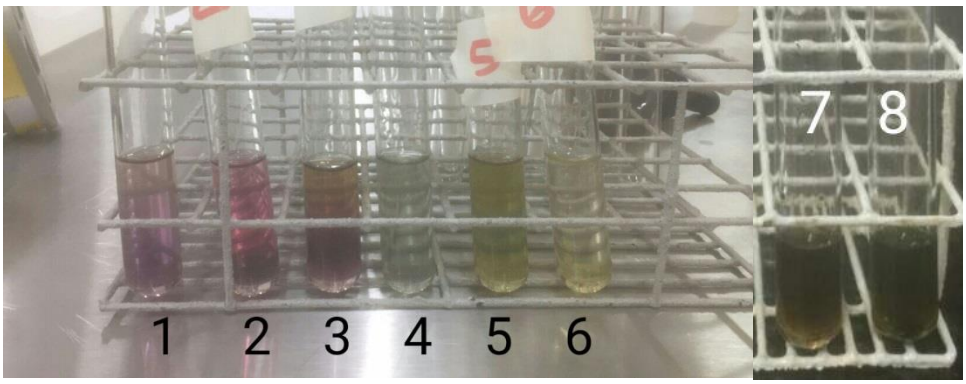
Figura 4.1 - Teste de Duquenóis-Levine realizado nas espécies *in natura*. Espécies 1 (*Pinus taiwanensis*), 2 (*Eugenia uniflora),* 3 (*Zanthoxylum rhoifolium*), 4 (*Michelia chumpaca*), 5 (*Ricinus communis*), 6 (*Tabebuia alba*), 7 (*Manihot esculenta*) e 8 (*Phaseolus vulgaris*).



A figura 4.2 traz os testes realizados nas espécies estudadas após 6 horas de secagem; sendo que os tubos 1 (Pinus) e 3 (Juva) apresentaram uma coloração violeta, caracterizando respostas inconclusivas para o teste colorimétrico. O tubo 2 (Pitanga) apresentou como resultado uma coloração mais clara, mantendo a formação de um anel mais escuro na região inferior, podendo ser considerado um indicativo de falso-positivo. Nos tubos 4 (Magnólia-amarela), 5 (Mamona) e 6 (Ipê-amarelo) as alterações na coloração do extrato etanólico foram mínimas, sendo, portanto, resultados negativos. Os tubos 7 (Mandioca) e 8 (Vagem) apresentaram uma coloração mais escura em relação à tonalidade do extrato original, figurando também resultados negativos.

Logo; nos testes realizados para as amostras após 6 horas, apenas a espécie do tubo 2 apresenta resposta indicativa de falso-positivo para o teste colorimétrico empregado.

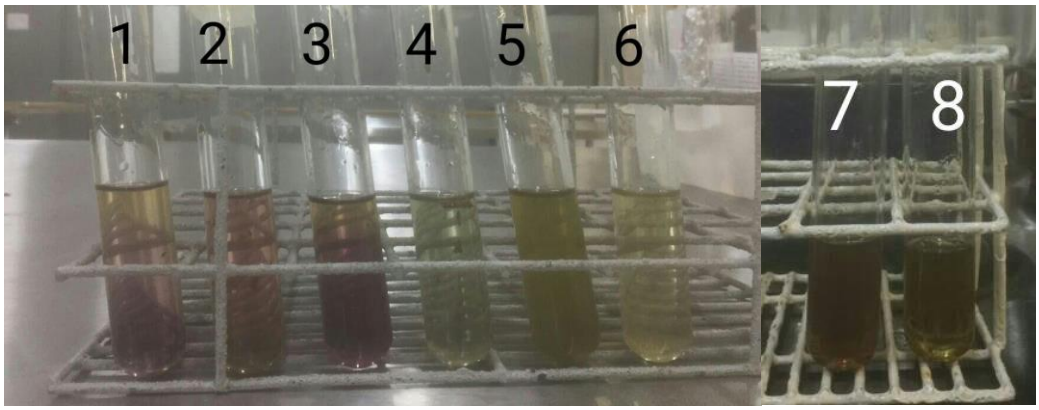
Figura 4.2 - Teste de Duquenóis-Levine realizado nas espécies após 6 horas. Espécies 1 (*Pinus taiwanensis*), 2 (*Eugenia uniflora),* 3 (*Zanthoxylum rhoifolium*), 4 (*Michelia chumpaca*), 5 (*Ricinus communis*), 6 (*Tabebuia alba*), 7 (*Manihot esculenta*) e 8 (*Phaseolus vulgaris*).



Abaixo, a figura 4.3 mostra os resultados dos testes realizados nas espécies após 12 horas de secagem, sendo que nos tubos 1 (Pinus) e 2 (Pitanga) a coloração adquirida foi de tonalidade muito clara, tratando-se de uma resposta negativa. O tubo 3 (Juva) apresentou uma coloração um pouco mais escura em relação aos tubos 1 e 2, mas ainda não suficiente para caracterizar uma resposta falso-positiva. Nos tubos 4 (Magnólia-amarela), 5 (Mamona) e 6 (Ipê-amarelo) as alterações nas colorações do extrato etanólico foram mínimas, sendo, portanto, resultados negativos. Os tubos 7 (Mandioca) e 8 (Vagem) também mantiveram como respostas as colorações do extrato original em tonalidades mais escuras, caracterizando, também, respostas negativas.

Portanto; nos testes realizados após 12 horas de secagem, nenhuma das espécies apresentou resposta falso-positiva para o teste colorimétrico, levando a crer que o processo de secagem, desta forma, possivelmente contribui para a eliminação de resultados falso-positivos

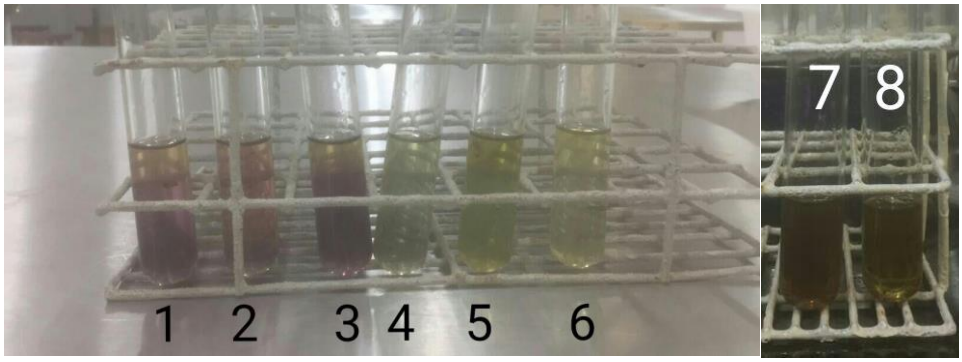
Figura 4.3 - Teste de Duquenóis-Levine realizado nas espécies após 12 horas. Espécies 1 (*Pinus taiwanensis*), 2 (*Eugenia uniflora),* 3 (*Zanthoxylum rhoifolium*), 4 (*Michelia chumpaca*), 5 (*Ricinus communis*), 6 (*Tabebuia alba*), 7 (*Manihot esculenta*) e 8 (*Phaseolus vulgaris*).



Analogamente, a figura 4.4 traz os testes realizados nas espécies estudadas após 18 horas de secagem, sendo que os tubos 1 (Pinus), 2 (Pitanga) e 3 (Juva) apresentaram como resposta uma coloração violácea, no entanto, mostrando-se como resposta negativa para o teste. Nos tubos 4 (Magnólia-amarela), 5 (Mamona), 6 (Ipê-amarelo), 7 (Mandioca) e 8 (Vagem) não houve alterações significativas na coloração, sendo, para todos, resultados negativos.

Pode-se concluir, portanto, que após 18 horas nenhuma das espécies apresentou resposta falso-positiva ao teste colorimétrico.

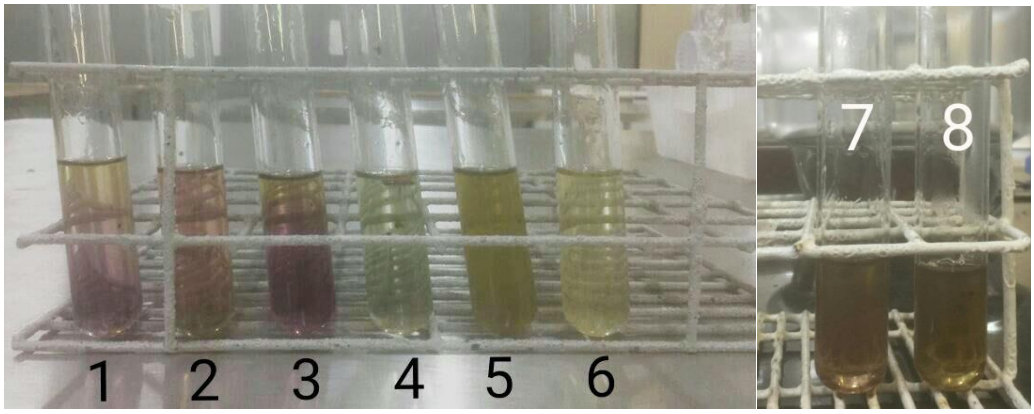
Figura 4.4 - Teste de Duquenóis-Levine realizado nas espécies após 18 horas. Espécies 1 (*Pinus taiwanensis*), 2 (*Eugenia uniflora),* 3 (*Zanthoxylum rhoifolium*), 4 (*Michelia chumpaca*), 5 (*Ricinus communis*), 6 (*Tabebuia alba*), 7 (*Manihot esculenta*) e 8 (*Phaseolus vulgaris*).



A figura 4.5 explicita os testes realizados nas espécies estudadas após 24 horas de secagem, sendo que, para esta análise, ainda que os tubos 1 (Pinus) e 2 (Pitanga) apresentem uma coloração violeta bem clara, caracterizam resultado negativo para o teste. O tubo 3 (Juva) manteve a coloração violeta levemente escura, ainda mostrando-se como resultado negativo. Nos tubos 4 (Magnólia-amarela), 5 (Mamona), 6 (Ipê-amarelo), 7 (Mandioca) e 8 (Vagem) as alterações na coloração do extrato etanólico foram mínimas e o resultado negativo também predomina sobre essas amostras.

Assim, nenhuma das espécies estudadas apresentaram resposta falso-positiva para o teste colorimétrico de Duquenóis-Levine após 24 horas de secagem.

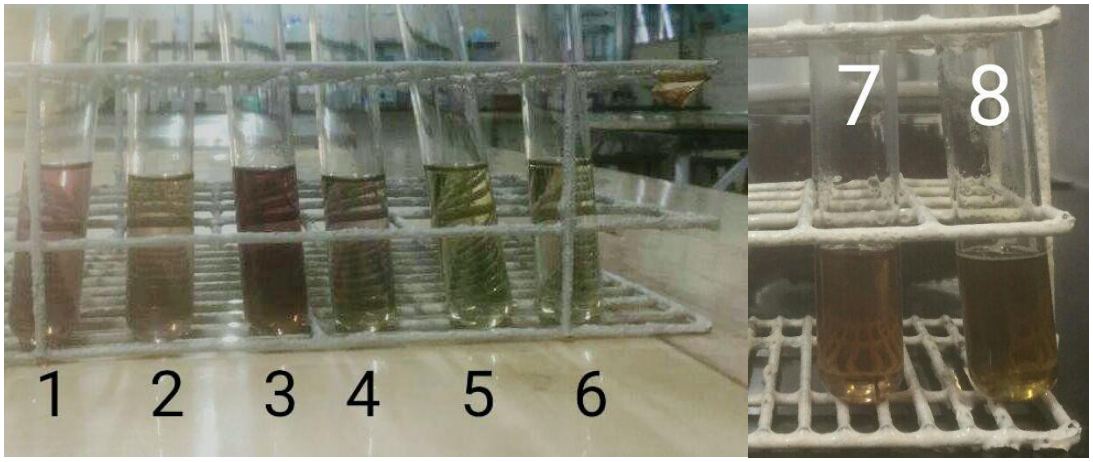
Figura 4.5 - Teste de Duquenóis-Levine realizado nas espécies após 24 horas. Espécies 1 (*Pinus taiwanensis*), 2 (*Eugenia uniflora),* 3 (*Zanthoxylum rhoifolium*), 4 (*Michelia chumpaca*), 5 (*Ricinus communis*), 6 (*Tabebuia alba*), 7 (*Manihot esculenta*) e 8 (*Phaseolus vulgaris*).



Abaixo, a figura 4.6 traz os testes realizados nas espécies estudadas após o intervalo de 30 horas de secagem. Os tubos 1 (Pinus) e 2 (Pitanga) apresentaram uma coloração rosa-violácea figurando resultados negativos para o teste colorimétrico. No tubo 3 (Juva), a coloração observada foi consideravelmente mais escura em relação às amostras dos tubos 1 e 2, mas ainda assim constitui um resultado negativo. Nos tubos 4 (Magnólia-amarela), 5 (Mamona), 6 (Ipê-amarelo), 7 (Mandioca) e 8 (Vagem) as alterações na coloração não foram relevantes, tornando-se apenas um pouco mais translúcidas e tratando-se, portanto, de resultados negativos.

Nos testes realizados para as amostras após 30 horas, nenhuma das espécies apresentaram resposta falso-positiva quando empregado o teste colorimétrico de Duquenóis-Levine.

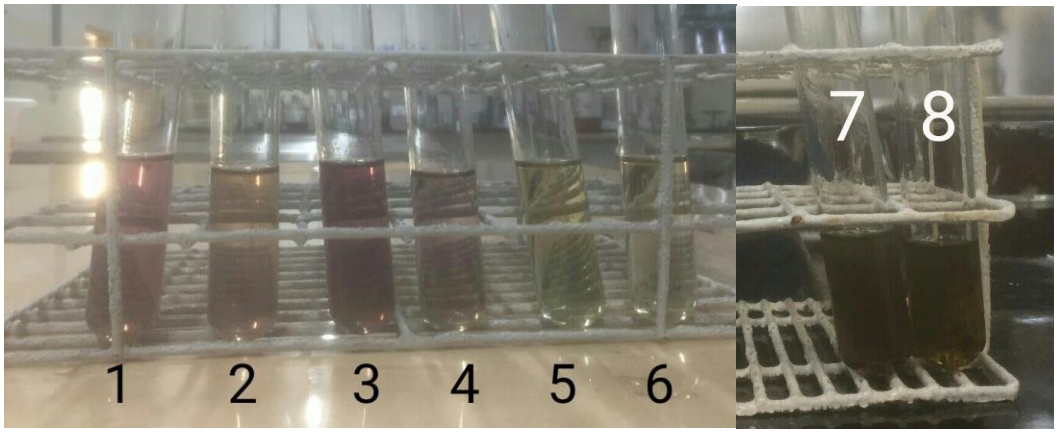
Figura 4.6 - Teste de Duquenóis-Levine realizado nas espécies após 30 horas. Espécies 1 (*Pinus taiwanensis*), 2 (*Eugenia uniflora),* 3 (*Zanthoxylum rhoifolium*), 4 (*Michelia chumpaca*), 5 (*Ricinus communis*), 6 (*Tabebuia alba*), 7 (*Manihot esculenta*) e 8 (*Phaseolus vulgaris*).



Por fim, a figura 4.7 mostra os testes realizados nas espécies estudadas após 36 horas de secagem, sendo que a amostra contida no tubo 3 (Juva) foi a única que apresentou coloração mais escura, caracterizando, resultado negativo para o teste de Duquenóis-Levine. As amostras contidas nos tubos 1 (Pinus) e 2 (Pitanga), apresentam coloração violeta muito clara, configurando, de antemão respostas negativas. Nas amostras dos tubos 4 (Magnólia-amarela), 5 (Mamona) e 6 (Ipê-amarelo) as alterações nas colorações dos extratos foram mínimas e pode-se observar também que estas tornaram-se mais translúcidas em relação à análise anterior, sendo, portanto, resultados negativos. Ainda, as amostras dos tubos 7 (Mandioca) e 8 (Vagem) também não apresentaram alterações significativas, mantendo a resposta negativa à análise colorimétrica realizada.

Em suma, nenhuma das espécies apresentou resposta falso-positiva para o teste colorimétrico, após 36 horas de secagem.

Figura 4.7 - Teste de Duquenóis-Levine realizado nas espécies após 36 horas. Espécies 1 (*Pinus taiwanensis*), 2 (*Eugenia uniflora),* 3 (*Zanthoxylum rhoifolium*), 4 (*Michelia chumpaca*), 5 (*Ricinus communis*)*,* 6 (*Tabebuia alba*), 7 (*Manihot esculenta*) e 8 (*Phaseolus vulgaris*).



5 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a partir do presente trabalho, conforme explicitam os resultados obtidos nos testes colorimétricos das oito espécies vegetais estudadas, que os testes de Fast Blue B e Duquenóis-Levine apresentam resultados falso-positivos para Cannabis.

De acordo com as análises in natura, as espécies que apresentaram falso-positivos para o teste colorimétrico Fast Blue B foram Pinus taiwanensis (Pinus) e *Zanthoxylum rhoifolium* (Juva), nos testes realizados em tubos de ensaio. A espécie *Zanthoxylum rhoifolium* ainda manteve seu resultado falso-positivo no teste realizado em papel filtro.

Após 12 horas de secagem do material foliar, as amostras *de Pinus taiwanensis* e *Eugenia uniflora* apresentaram resultado falso-positivo para o teste colorimétrico Fast Blue B, que foi realizado em tubos de ensaio. No entanto, nenhuma das espécies apresentou resultado falso-positivo quando empregado o mesmo teste colorimétrico em papel filtro. Ainda, após as 12 horas de secagem em estufa não houve mais resultados falso-positivos para as análises realizadas em tubos de ensaio e em papel filtro para as análises empregado este teste colorimétrico.

As espécies *Michelia chumpaca* (Magnólia-amarela), *Ricinus communis* (Mamona), *Tabebuia alba* (Ipê-amarelo), *Manihot esculenta* (Mandioca) e *Phaseolus vulgaris* (Vagem) não apresentaram, em nenhum momento colorações indicativas de falso-positivos em nenhum dos testes de Fast Blue B realizados, tanto em tubos de ensaio quanto em papel filtro.

Num segundo momento, foi empregado o teste colorimétrico Duquenóis-Levine, observando que a amostra 2 (Pitanga) apresentou resultado falso-positivo e as amostras 1 (Pinus) e 3 (Juva) apresentaram colorações de tonalidades similares à que ocorre no resultado positivo para a maconha, sendo considerados resultados inconclusivos. A amostra 7 (Mandioca) mostrou uma leve alteração na coloração, no entanto, não caracterizando resultado falso-positivo. Já as demais amostras não revelaram alterações na coloração do extrato, figurando também resultados negativos para o teste colorimétrico empregado.

Após 6 horas de secagem pode-se observar que as colorações reveladas, principalmente nas amostras 1, 2 e 3, tornaram-se mais claras e até mesmo

translúcidas em algumas regiões; não caracterizando em nenhuma das amostras um resultado falso-positivo, podendo considerar apenas a amostra 2 (Pitanga) como resultado inconclusivo e as demais como negativo.

Passadas 12 horas de secagem, as amostras 1, 2 e 3 tendem a perder sua coloração violeta clara, tonando-se mais translúcidas a cada intervalo de observação. O restante das amostras não apresentam alterações na coloração do extrato ou tornam-se mais escuras quando em contato com o reagente, configurando também respostas negativas. Após as 12 horas, nenhuma das amostras apresentou resposta falso-positiva para o teste colorimétrico Duquenóis-Levine, em discussão.

Além disso, nota-se que geralmente estes resultados falso-positivos tendem a ser eliminados com a secagem do material foliar, possivelmente devido à evaporação ou a degradação de compostos fenólicos que reagiam com os reagentes colorimétricos Fast Blue B e/ou Duquenóis-Levine.

Em ambos os testes colorimétricos, que são empregados pela polícia técnico-científica, nota-se falhas na especificidade dos mesmos, sendo possível, com poucos exemplares de espécimes vegetais, relatar uma incidência considerável de resultados falso-positivos ou indicativos de falso-positivos.

As análises evidenciam também que a secagem do material foliar pode eliminar um resultado falso-positivo. Além disso, uma alternativa que pode aprimorar as análises de interferentes vegetais está na junção de mais de um método de análise colorimétrica em questão, pois não houve incidência de um mesmo resultado-falso-positivo na mesma amostra vegetal para todos os testes realizados, ou a realização da cromatografia em camada delgada, que pode minimizar a incidência de erros, pois apresenta resultados com maiores precisões.

Os resultados obtidos evidenciam e retomam a importância do trabalho desenvolvido, já que uma espécie encontrada em determinado local ou transportada por algum indivíduo pode ser julgada similar à Cannabis e submetido a uma análise colorimétrica onde os resultados sejam falso-positivos devido à baixa seletividade do teste empregado ou até mesmo em razão de uma má interpretação do resultado atingido.

O presente trabalho desenvolvido contribui para o meio científico a partir dos resultados atingidos com a série de testes realizados, ressalta a importância dos estudos na área, da necessidade de novos meios de análise mais precisos, da

identificação de espécimes que geram resultados falso-positivos, ressalta a importância da associação de métodos já empregados e procura identificar quais os possíveis fatores causadores de respostas falso-positivas, além de justificar a necessidade do desenvolvimento de novas técnicas analíticas no estudo da maconha.

O tema do projeto foi selecionado para apresentação oral no II IFCiência (Congresso de Ciência e Tecnologia do IFSP – Câmpus Catanduva), sendo apresentado e ressaltada a importância dos estudos e análises desenvolvidas, da metodologia empregada nas pesquisas e dos resultados atingidos até o momento.

Por fim, fica evidente a importância da pesquisa em análises forenses que venham a contribuir com o meio científico, lançando mão de novos métodos de análise e enriquecendo a literatura e, sobretudo, contribuir com a sociedade, minimizando a ocorrência de falsos resultados que podem, porventura, gerar uma falsa justiça.

REFERÊNCIAS

BALBINO, M. A. et al. Investigação de falsos positivos na identificação preliminar de D9- THC utilizando o reagente Fast Blue B. In: ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA FORENSE, 3., 2012, Ribeirão Preto. Anais do 3º Encontro Nacional de Química Forense. Ribeirão Preto, 2012.

BORDIN, Dayanne Cristiane et al. Análise forense: pesquisa de drogas vegetais interferentes de testes colorimétricos para identificação dos canabinoides da maconha (Cannabis Sativa L.). Quím. Nova, São Paulo , v. 35, n. 10, p. 2040-2043, 2012.

FARIAS, R.F. Introdução à Química Forense. Campinas: Editora Átomo, 2007.

GONTIÈS, B; ARAÚJO, L. F. Maconha: Uma perspectiva histórica, farmacológica e antropológica. Rio Grande do Norte: Revista Mneme, v.4, n.07, 2003.

KELLY, J. False positive equals false justice. Washington, D.C.: The Marijuana Policy Project, 2008.

KOVAR, K. A.; LAUDSZUN, M. Chemistry and Reaction Mechanisms of Rapid Tests for Drugs of Abuse and Precursors Chemicals. Scientific and Technical Notes: UNODC, 1989.

LANARO, R; Determinação de paraquat e glifosato em amostras de Cannabis sativa encaminhadas para exame pericial. 2008. 191f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo, 2008.

LUCHIARI, E. E.; SILVA, J. G. Comentários á Nova Lei sobre Drogas: Lei 11.343/06. Campinas: Millennium, 2007.

MENEZES, M. M. T; Desenvolvimento de sensores piezelétricos para análises forenses de ∆9-THC e cocaína. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010. (Dissertação de Mestrado).

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A; BATISTUZZO, J. A. O. Fundamentos de Toxicologia. São Paulo: Atheneu, 3 ed., 2008.

PASSAGLI, M. et al. – Toxicologia Forense. Campinas: Millennium Editora, 1 ed., 2008.

REIS, Lúcia Margarete dos; UCHIMURA, Taqueco Teruya; OLIVEIRA, Magda Lúcia Félix de. Perfil socioeconômico e demográfico em uma comunidade vulnerável ao uso de drogas de abuso. Acta paul. enferm., São Paulo , v. 26, n. 3, p. 276-282, 2013 .

SOUZA, D.Z; MICHELIN, K. & HOLLER, M.G. – Roteiro Ilustrado para a Identificação Morfológica da Cannabis sativa L.. Revista: Perícia Federal, Brasília, Distrito Federal, maio-agosto de 2006, ano VII, número 24, p. 16.

STAMBOULI, H. et al. Cultivation of Cannabis sativa L. in northern Morocco. Bulletin on Narcotics, v.57, n.1/2, p.79-118, jan./dez. 2005.

UNODC. Disponível em< http://www.unodc.org/documents/scientific/ST-NAR-40-Ebook.pdf > Acesso em 29/10/2016.

UNODC. Disponível em< http://www.unodc.org/lpo-brazil/pt/frontpage/2018/06/relatorio-mundial-drogas-2018.html> Acesso em 02/02/2019.

WEXLER, P. Encyclopedia of Toxicology. Amsterdã: Elsevier, 2 ed., 2005.