

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

FERNANDO COLNAGO GONÇALVES

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE FILOGENÉTICA  
DE AMOSTRAS DE *CANNABIS* APREENDIDAS PELA  
POLÍCIA CIVIL DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO

Vitória  
2015

FERNANDO COLNAGO GONÇALVES

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE FILOGENÉTICA  
DE AMOSTRAS DE *CANNABIS* APREENDIDAS PELA  
POLÍCIA CIVIL DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia.  
Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Iuri Drumond Louro  
Co-orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Greiciane Gaburro Paneto

Vitória

2015

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

---

G635i      Gonçalves, Fernando Colnago, 1985 -  
              Identificação molecular e análise filogenética de amostras de  
Cannabis apreendidas pela Polícia Civil do Estado do Espírito  
Santo / Fernando Colnago Gonçalves – 2015.  
              57 f. : il.

Orientador: Iuri Drummond Louro.  
Coorientador: Greiciane Gaburro Paneto.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade  
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Cannabis. 2. Toxicologia Forense. 3. Tráfico de Droga.  
I. Louro, Iuri Drummond. II. Paneto, Greiciane Gaburro.  
III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências  
da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

---

FERNANDO COLNAGO GONÇALVES

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE FILOGENÉTICA  
DE AMOSTRAS DE *CANNABIS* APREENDIDAS PELA  
POLÍCIA CIVIL DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisição parcial para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em 30 de junho de 2015.

COMISSÃO EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Iuri Drumond Louro  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Orientador

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Greiciane Gaburro Paneto  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Co-orientadora

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia de Paula  
Universidade Federal do Espírito Santo

---

Prof. Dr. Rodrigo Soares de Moura Neto  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Vitória  
2015

## DEDICATÓRIA

*À minha amada esposa, amiga e  
companheira Hananda, grande  
incentivadora e responsável pela  
concretização deste trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

- À Fundação de Amparo a Pesquisa do Espírito Santo (FAPES), pelo financiamento do projeto;
- À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), ao Departamento de Ciências Biológicas, ao Núcleo de Genética Humana e Molecular (NGHM) e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia por terem possibilitado o desenvolvimento deste trabalho;
- À Polícia Civil do Estado do Espírito Santo por ter possibilitado o desenvolvimento deste trabalho, disponibilizando espaço, equipamentos e o material do estudo;
- Ao Dr. Stephan Köhnemann e a Heidi Pfeiffer, do Instituto de Medicina Legal da Universidade de Münster, Alemanha, pela concessão dos *primers* utilizados neste trabalho;
- Ao professor Dr. Iuri Drumond Louro, pela orientação, paciência e confiança;
- À professora Dr<sup>a</sup>. Greiciane Gaburro Paneto, pela co-orientação, ensinamentos e disponibilidade;
- À professora Dr<sup>a</sup>. Flávia de Paula e ao professor Dr. Rodrigo Soares de Moura Neto, por aceitarem o convite de participação da banca e assim contribuírem de forma valiosa com meu aprendizado;
- Ao professor Dr. Rodrigo Pratte, pela ajuda com os testes estatísticos e incentivo;
- À professora Dr<sup>a</sup>. Patrícia Machado Bueno Fernandes, por ceder espaço e equipamentos para o desenvolvimento deste trabalho e a toda equipe do seu laboratório, em especial à Mainã e ao Dr. Oeber, que se disponibilizaram à todo momento, inclusive nos finais de semana, para que algumas análises pudessem ser realizadas;
- Aos meus pais Tim e Dora, pelo carinho, amor e constante incentivo em todas as etapas de minha vida;
- Aos meus sogros Silvio e Ana, por acreditarem, pelo carinho e incentivo em todos os meus pleitos;

- Ao pessoal do NGHM, pelo apoio e incentivo, principalmente Elaine, Raquel, Lidiane e Quézia, que ouviram minhas inúmeras reclamações, minha vontade de desistir, minhas desanimações, mas sempre me deram força e se disponibilizaram a todo momento;

- À toda equipe do Laboratório de Química Legal da PCES - Bianca, Raissa, Caline, Graziany, em especial ao Bruno e à Eliza, pela amizade, paciência, disponibilidade, incentivo e imensa ajuda na pesquisa, identificação e coleta das amostras;

- À toda equipe do Laboratório de DNA Criminal da PCES – Silvana, Deise, Caio, Dr. Luiz Renato e, especialmente, ao Victor Stange, que foi quem me incentivou desde o início para execução deste trabalho e à Carol, pela ajuda, paciência, excelentes conversas no laboratório e incentivo;

- A todos os colegas de laboratório que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho;

- Aos amigos Victor Colombi, Elda, Carol e Victor Stange pelo incentivo, excelentes conversas, revisão e sugestões;

- Aos amigos do SML de Colatina, Lilian, Renato, Renata e Elizabeth, pelas inúmeras trocas de plantões que me possibilitaram assistir todas as aulas durante o primeiro ano de curso;

- Aos Peritos Criminais da turma de 2014, pelo incentivo, ajuda nos plantões, conselhos e amizade, principalmente ao Gabriel Alípio, Marcel, Felipe Sibien, Janine Avelar, Laércio, Marcus Bragança, Marcelo Brandão, Beatriz, Eliza, Fernanda Scarpatti, Olívia, Paula, Camila Simonassi, Flávia e Tainá.

*“Há mais pessoas que desistem, do que pessoas que fracassam”. (Henry Ford)*

## RESUMO

Popularmente conhecida como maconha, a *Cannabis sativa* é a mais usada de todas as drogas ilícitas e seu comércio, em conjunto com outras drogas, é uma das atividades criminosas que mais consomem recursos públicos e está intimamente associado aos homicídios. No Estado do Espírito Santo (ES), 70% dos homicídios tem relação com o tráfico de entorpecentes, apresentando atualmente o segundo maior índice dos países. Apesar da atuação policial, não existem estudos detalhados sobre plantio, distribuição e consumo de *Cannabis* no Brasil, de uma forma geral, sabe-se apenas que a maior parte da droga é produzida no Paraguai ou cultivada dentro do próprio país e acredita-se que o Paraguai seja responsável pelo abastecimento das regiões sul, sudeste e centro-oeste do Brasil. A identificação genética de *Cannabis* apreendidas pela Polícia Civil pode auxiliar na determinação geográfica de plantios e possíveis rotas do tráfico, informação essencial para a ação da polícia no combate ao tráfico de drogas. Com objetivo de caracterizar as amostras de *Cannabis* apreendidas pela Polícia Civil do ES e verificar correlações que pudessem indicar origens comuns, foram analisados 18 *loci* STR de 165 amostras oriundas de 71 dos 78 municípios do Estado. Foram encontrados 89 alelos, variando de 2 (*loci* A501 e 9269) a 12 alelos (*locus* A301). Os *loci* H06 e A305 apresentaram 3 alelos cada e o *locus* B05 apresentou 4 alelos, similar ao encontrado em amostras do Paraguai. Os dados alélicos dos *loci* A305, B05 e H06 sugerem que a região sudeste do Brasil pode estar sendo abastecida por *Cannabis* de origem Paraguaia. Também foi verificado que 4 alelos apareceram apenas nas amostras 176 e 230. A amostra 230 era proveniente de uma apreensão realizada na cidade de Aracruz, onde a Polícia verificou a ligação do proprietário com o tráfico internacional de entorpecentes, e demonstrou ser geneticamente mais próxima de amostras da Alemanha, sugerindo que sua matriz tem origem no exterior podendo, dentre outras possibilidades, ter chegado ao ES através do tráfico pela internet. Os resultados obtidos fornecem mais informações a respeito da maconha comercializada no Brasil, podendo ser utilizados em estudos futuros para elaboração de um banco de dados baseado em STR para aplicação forense.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Cannabis*. Marcadores STR. Aplicação forense. Tráfico de drogas.

## ABSTRACT

Popularly known as marijuana, *Cannabis sativa* is the most used of all illicit drugs and, with other drugs, its trade is one of the criminal activities that most consume public resources and is closely related to homicides. In the Espírito Santo State (ES), 70% of homicides is related to drug trafficking, currently presenting the second highest rate in the country. Despite the police action, there is no detailed studies of planting, distribution and *Cannabis* consumption in Brazil, in general, we only know that most drug is produced in Paraguay or grown within the country and it is believed that Paraguay is responsible for supplying the Brazil's south, southeast and center-west region. Genetic analysis of *Cannabis* seized by the police can assist in determining, geographically, plantations and possible routes of trafficking, essential information for police's action in drug trafficking combat. In order to characterize the *Cannabis* samples seized by the police at ES and verify correlations that could indicate common origins, we analyzed 18 STR *loci* in 165 samples from 71 of 78 municipalities in the State. We have found 89 alleles ranging from 2 (A501 *loci* and 9269) to 12 alleles (A301 *locus*). The *loci* H06 and A305 presented each, 3 alleles and the *locus* B05, 4 alleles, similar to that found in Paraguayan samples. The allelic data of *loci* A305, B05 and H06 suggest that Brazil 's southeast region can be being supplied by Paraguayan *Cannabis*. We also found four alleles that appeared only in samples 176 and 230. Sample 230 was seized in Aracruz city, where the police found owner's connection with international trafficking, and demonstrated to be genetically nearest to German samples, suggesting a foreign origin what could be explained by internet trafficking. The obtained results provide more information about marijuana's market in Brazil and could be used in future studies to develop a STR database for forensic application.

**KEYWORDS:** *Cannabis*. STR markers. Forensic application. Drug trafficking.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição da amostragem com base nas regiões prioritárias: região metropolitana de Vitória (vermelho), municípios de fronteira (amarelo) e demais municípios (verde). .....	28
Figura 2. Característica da maior parte das amostras coletadas; presença de várias partes da planta prensadas. ....	29
Figura 3. Amostras após coleta. ....	30
Figura 4. Processo de extração do kit NucleoSpin® Food (Macherey-Nagel). Lise, homogeneização, quelagem, lavagem e eluição, respectivamente. ....	31
Figura 5. Solução com material genético antes e após extração. ....	31
Figura 6. Capa da matéria do jornal O Globo do dia 09/02/2015 sobre tráfico na internet. Acesso em 25/05/2015. ....	46
Figura 7. Site de vendas de sementes de <i>Cannabis</i> disponível na internet. Acesso em 25/05/2015. ....	46

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração dos reagentes utilizados para a preparação do mix da PCR para um volume final de 7 $\mu$ L. ....	32
Tabela 2. Sequência dos 18 pares de <i>primers</i> utilizados. ....	33
Tabela 3. Condições de amplificação da reação de PCR. ....	34
Tabela 4. Número de homozigotos e heterozigotos nas 165 amostras analisadas. .	37
Tabela 5. Relação de alelos encontrados em cada <i>locus</i> . ....	39
Tabela 6. Lista de amostras. ....	53

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Árvore de distâncias genéticas gerada a partir dos dados alélicos. Detalhe para as amostras 128, 176, 230 (ES) e CP 1,26, CP M141, CP 2,62 e CP 2003.8.1 (Alemanha). .....	41
Gráfico 2. Coeficiente de correlação cofenética. ....	42
Gráfico 3. Análise de componentes principais das amostras do ES e Alemanha (CP 1,26, CP M141, CP 2,62 3 CP 2003.8.1). Detalhe para o agrupamento das amostras do ES, exceto a 128, 176 e 230. ....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C. – antes de Cristo

AFLP – Polimorfismo de Tamanho de Fragmento de Restrição Amplificado (do inglês, *Amplified Fragment Length Polymorphism*)

ACP – Análise de Componentes Principais (do inglês, *Principle Components Analysis – PCA*)

bi – bilhões

BSA - Albumina de Soro Bovino (do inglês, *Bovine Serum Albumin*)

°C – grau Celsius

ccc – Coeficiente de correlação cofenética

CP – controle positivo

CRATOD – Centro de Referência em Álcool, Tabaco e Outras Drogas

DNA – Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, *Deoxyribonucleic Acid*)

dNTP – desoxiribonucleotídeos trifosfatados

Dr. – Doutor

ES – Estado do Espírito Santo

FW – para frente (do inglês, *forward*)

GEAC/SESP-ES – Gerência de Estatística e Análise Criminal da Secretaria Estadual de Segurança Pública e Defesa Social do Estado do Espírito Santo

H<sub>2</sub>O – água

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IDS – Indicadores de Desenvolvimento Sustentável

LQL – Laboratório de Química Legal

m – metro

mM – milimolar

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de magnésio

mg/mL – miligrama por mililitro

mi – milhões

min – minutos

µL – microlitro

N<sub>2</sub> – nitrogênio líquido

ng – nanograma

ng. $\mu\text{L}^{-1}$  – nanograma por microlitro

OMS – Organização Mundial de Saúde

ONU – Organização das Nações Unidas

pb – par de base

PC/ES – Polícia Civil do Estado do Espírito Santo

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*)

RAPD – Polimorfismo de DNA Amplificado Randomicamente (do inglês, *Random Amplified Polymorphic DNA*)

RFLP – Polimorfismo de Tamanho de Fragmento de Restrição (do inglês, *Restriction Fragment Length Polymorphism*)

RFU – Unidade de fluorescência relativa (do inglês, *Relative Fluorescence Unit*)

RV – reverse (do inglês, *reverse*)

seg – segundos

SENAD – Secretaria Nacional Antidrogas

STR – Repetições Curtas em Tadem (do inglês, *Short Tandem Repeats*)

SVS/MS – Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde

t – toneladas

Taq – Polimerase (do inglês, *Thermus aquaticus polymerase*)

THC – Tetrahydrocannabinol

UNESCO – Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura (do inglês, *United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization*)

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

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

UPGMA - *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*

US\$ - dólares

UV-Vis – Ultravioleta – visível

var. – variedade

# SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	<b>16</b>
<b>1.1. A <i>Cannabis sativa</i></b> .....	<b>16</b>
<b>1.2. O tráfico de drogas e suas implicações</b> .....	<b>18</b>
<b>1.3. Identificação e Individualização de <i>Cannabis</i> por Polimorfismos de DNA...</b>	<b>23</b>
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>25</b>
<b>2.1. Objetivo Geral</b> .....	<b>25</b>
<b>2.2. Objetivos Específicos</b> .....	<b>25</b>
<b>3. Metodologia</b> .....	<b>26</b>
<b>3.1. Amostragem</b> .....	<b>26</b>
3.1.1. <i>Critérios de Amostragem</i> .....	26
3.1.2. <i>Seleção das Amostras</i> .....	29
<b>3.2. Extração do DNA</b> .....	<b>30</b>
3.2.1. <i>Preparação das amostras</i> .....	30
3.2.2. <i>Extração em coluna</i> .....	31
3.2.3. <i>Quantificação do DNA</i> .....	32
<b>3.3. Reação em Cadeia da Polimerase - PCR</b> .....	<b>32</b>
<b>3.4. Genotipagem dos microssatélites</b> .....	<b>34</b>
<b>3.5. Análise dos Dados</b> .....	<b>35</b>
3.5.1. <i>Análise Estatística</i> .....	35
<b>4. Resultados e Discussão</b> .....	<b>36</b>
<b>4.1. Extração do DNA e amplificação dos STR das amostras de <i>Cannabis</i></b> .....	<b>36</b>
<b>4.2. Relações filogenéticas das amostras de <i>Cannabis</i> genotipadas em     apreensões da Polícia Civil do ES</b> .....	<b>40</b>
<b>4.3. Tráfico pela Internet</b> .....	<b>45</b>
<b>5. Conclusão</b> .....	<b>48</b>
<b>6. Referências</b> .....	<b>49</b>
<b>APÊNDICE</b> .....	<b>53</b>

# 1. Introdução

## 1.1. A *Cannabis sativa*

Popularmente conhecida como maconha, a *Cannabis sativa* (Linnaeus, 1753) é uma planta herbácea de origem asiática amplamente distribuída pelo mundo (UNODC, 2014).

Integrante da família Cannabaceae, é composta atualmente por dez gêneros: *Aphananthe*, *Cannabis*, *Chaetachme*, *Celtis*, *Gironniera*, *Humulus*, *Lozanella*, *Parasponia*, *Pteroceltis* e *Trema*, com um total de 109 espécies reconhecidas descritas (YANG *et al.*, 2013). O gênero *Cannabis* não apresenta uma subdivisão clara na literatura, sendo suas diferenças atribuídas à subespécies ou variedades (*Cannabis sativa* var. *indica*, var. *sativa*, var. *ruderalis*, var. *vulgaris*, var. *mexicana*, *etc.*) ou à espécies (*C. sativa*, *C. indica* e *C. ruderalis*) (MACEDO, 2010).

A planta apresenta-se como um arbusto de 1,5-3m de altura, sendo unissexuada e dióica. Segundo Hong (1996) (*apud* CASTRO, 2006), o cariótipo tem número de cromossomos  $2n=20$ , sendo o par de cromossomos sexuais heteromórfico, com a planta feminina XX e a planta masculina XY.

Descrita no século XVIII, é considerada uma das culturas mais antigas e seu uso é documentado por evidências arqueológicas desde o período Neolítico (PILUZZA *et al.*, 2013). A partir da Ásia Oriental, difundiu-se gradualmente para a Índia, Oriente Médio e, mais tardiamente, para a Europa, África e Américas (CASTRO, 2006). O primeiro registro histórico do uso da *Cannabis* é na fabricação de papel e datam de 8.000 anos a.C, na China. Seu uso passou para produção de artigos têxteis, medicina e, mais tarde, outras sociedades, como os gregos, romanos, africanos, indianos e árabes também aproveitaram as qualidades da planta, fosse ela utilizada como alimento, na medicina, como combustível, fibras ou fumo. Sua grande importância histórica se deve ao fato da maconha ter uma fibra natural resistente, podendo ser cultivada em praticamente qualquer tipo de solo. Durante a década de 90, os estudos e investimentos na *Cannabis* se intensificaram, e hoje existem milhares de empresas no mundo que desenvolvem pesquisas visando o melhoramento genético desta planta.

A maconha é a mais usada de todas as drogas ilícitas, suas folhas e inflorescências contém um grupo de substâncias denominadas canabinóides, sendo seu principal componente psicoativo o  $\Delta^9$ -Tetra-hidrocanabinol (THC). O acúmulo do THC varia de acordo com a parte da planta e com as características ambientais do local de cultivo (KÖHNEMANN *et al.*, 2012). O uso como narcótico para fins não medicinais é bastante difundido no mundo inteiro, através de várias formas de preparo e consumo. O uso recreacional da *Cannabis* via inalação do THC, por meio dos vapores produzidos pela queima,

[...] induz uma variedade de efeitos sensoriais e psicológicos, incluindo devaneio leve e euforia; intensificada consciência sensorial, criatividade e empatia; memória prejudicada a curto prazo; sentido alterado de tempo e espaço; apetite e desejo sexual reforçados; sonolência ocasional e uma tendência para melhorar a introspecção, embora esses efeitos variem entre os indivíduos dependendo da idade, dosagem, tempo e frequência de uso (WARF, 2014).

No Brasil, a proibição de seu uso tem início em 1921, sendo iniciada a fase de repressão às plantações em 1930, logo após a *Cannabis* ser considerada, na II Conferência Internacional do Ópio, em Genebra, como uma droga terrível, embora não existisse uma lei proibindo. Em 1976, a lei 6368 de 21 de outubro proíbe o plantio, a cultura, a colheita, a exploração e o consumo de qualquer planta com substâncias psicotrópicas (NASCIMENTO, 2014). Atualmente, a lei 11343 de 23 de outubro de 2006, também conhecida como “nova lei de droga” em seu art. 28, traz as penas para quem adquirir, guardar, manter em depósito, transportar ou trazer consigo para consumo pessoal, drogas sem autorização ou em desacordo com a determinação legal ou regulamentar, que advém da Portaria SVS/MS nº 344, de 12 de maio de 1998, a qual enumera as substâncias proscritas em território nacional, bem como algumas plantas que produzem tais substâncias. Nesta norma existem diversas listas, dentre elas a lista E – contendo a relação de plantas que podem originar substâncias entorpecentes ou psicotrópicas – e a lista F2 – contendo a lista de substâncias psicoativas de uso proscrito em território nacional – nas quais encontram-se, respectivamente, *C. sativa* e o THC.

A despeito dessa proibição, existe um mercado ilegal local e internacional, o qual envolve grandes organizações criminosas.

De acordo com o relatório da *United Nations Office on Drugs and Crime* - UNODC (2014), cerca de 3% da população mundial (185 milhões) faz uso de drogas ilícitas, representando 4,7% da população com idade entre 15 e 64 anos. A maconha (*Cannabis sp*) apresenta cerca de 150 milhões de usuários (2,3% da população mundial), seguida pela anfetamina (30mi), a cocaína (13mi) e a heroína (9mi), representando um dos maiores problemas mundiais em termos de saúde pública. Apesar disto, a maconha ganha grande importância por ser a droga mais produzida e consumida do mundo. Os mesmos dados apontam que aproximadamente 30 mil toneladas de maconha são produzidas por ano no mundo, mas que apenas 15% dela é apreendida em ações antidrogas da polícia. A produção anual estimada para as outras drogas fica em torno de 520t de anfetaminas, 7.000t de cocaína e 4.500t de derivados de ópio.

Neste cenário, a maconha lidera o ranking de drogas mais utilizadas no mundo. O dado é fruto de um levantamento realizado pelo Centro de Referência em Álcool, Tabaco e Outras Drogas – CRATOD, na capital de São Paulo, com jovens entre 12 e 18 anos. A pesquisa foi feita com base nos atendimentos realizados entre o período de 2007 a 2009, incluindo 112 jovens. Seus resultados mostram que 59% dos usuários têm entre 14 e 16 anos, 90% do sexo masculino, sendo a maconha a droga mais consumida por 67% dos entrevistados. O levantamento revelou ainda que o crack e a cocaína dividem o segundo lugar na preferência dos usuários.

## **1.2. O tráfico de drogas e suas implicações**

O tráfico de drogas está entre as atividades criminosas que mais apresentam externalidades sociais negativas e mais consomem recursos públicos, seja no combate à atividade ilícita em si, seja na remediação dos efeitos danosos oriundos da atividade (ONU, 2009). Está intimamente associado ao tráfico de armas e, consequentemente, à taxa de homicídios.

A taxa de homicídios no Brasil cresceu 41% em 17 anos (de 1992 a 2009), de acordo com a pesquisa “Indicadores de Desenvolvimento Sustentável 2012 - IDS” divulgada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2012). Dados mostram que em 2012, a média de assassinatos no país foi de 29 mortes para cada

100 mil habitantes, enquanto em 1992 o índice era de 19,1. O Estado do Espírito Santo (ES) ocupa a segunda posição no cenário nacional, com 47,3 mortes para cada 100 mil habitantes (WAISELFISZ, 2014).

A maioria dos homicídios, cerca de 70%, tem relação com o tráfico de entorpecentes. Além de homicídios, em cerca de 4% dos acidentes de trânsito com vítimas fatais, na região metropolitana da grande Vitória-ES, foi detectado o uso de *Cannabis* (PELIÇÃO, 2014).

Os óbitos por causas externas, denominado o grupo de mortes que não são causadas por doenças, representam em volume, a segunda causa de morte no Brasil, perdendo apenas para as causadas por doenças cardiovasculares. De acordo com o IBGE, o aumento da mortalidade por causas externas já está impactando a esperança de vida dos brasileiros. Segundo a Organização Mundial de Saúde – OMS, há um aumento dessas causas de morte em todas as regiões do mundo, reflexo do aumento constante da violência, desrespeito ao próximo e o processo de individualização que acometem as sociedades contemporâneas (JUNIOR, 2004).

O consumo de drogas movimenta o mercado do tráfico, que é caracterizado pela grande rentabilidade. Por se tratar de uma atividade ilícita, a violência é a única maneira de garantir que o mercado funcione e que os traficantes se mantenham a frente dele. Embora uma parcela significativa dos usuários de drogas tenha sido assassinada por não ter quitado dívidas com traficantes, a questão não se restringe a este aspecto. Muitos homicídios envolvendo usuários de drogas ocorreram porque as vítimas se envolveram em situações de risco para manter o vício. Estas situações geram desdobramentos delituosos e tais usuários acabam sendo mortos em decorrência destes crimes.

Os estudos sobre a origem do crime têm como foco o impacto de drogas ilícitas na dinâmica da criminalidade e neste cenário, toma-se por base o fato de que drogas ilícitas e violência, em especial homicídios, estão intimamente correlacionadas.

Os outros homicídios relacionados à droga ocorrem por dois motivos básicos: confronto pelo domínio de pontos de drogas ou por desacerto entre os criminosos. Para comprar grandes quantidades de entorpecentes, os traficantes se organizam

em uma espécie de consórcio. Na partilha da droga, não é raro ocorrer desentendimentos, que acabam gerando conflitos internos, ocasionando a morte de integrantes de um mesmo grupo.

De acordo com Lima (2003), no Estado de Pernambuco, o grande pano de fundo para a elevação dos índices de homicídio, além da pobreza relativa e extrema miséria que ocorre no interior do Estado, é a questão do plantio de maconha, negócio altamente lucrativo e defendido vorazmente com o uso de armas letais.

Na Região Sudeste, onde estão três das maiores taxas de homicídio do Brasil, cada Estado apresenta sua especificidade, mas vários estudos apontam para a determinação do narcotráfico na geração de boa parte dos homicídios. Diferente de Pernambuco, na Região Sudeste, onde há a maior circulação da riqueza do País, as mortes violentas associadas ao narcotráfico ocorrem no comércio varejista de maconha e cocaína (BAPTISTA *et al.*, 2000). Grande parte dos homicídios acontece em confrontos de grupos pelo controle dos pontos de distribuição e venda dessas drogas e em confrontos entre gangues e policiais.

É importante salientar que também na área rural as relações de produção de drogas ilícitas fazem parte da configuração da violência que dizima agricultores e os associa a esse mercado ilegal. Tal fenômeno ocorre hoje no chamado “Polígono da Maconha”, uma área agricultável de 118 mil hectares entre Bahia e Pernambuco, envolvendo cerca de 40 mil trabalhadores, dentre os quais, 10 mil crianças e adolescentes. Segundo estudiosos, existe uma tendência de expansão da produção da *Cannabis*, tornando seu cultivo um fenômeno agrário nacional. Numa estrutura capitalista de articulação do agronegócio e da pequena produção familiar, o pequeno produtor tem um papel bastante específico: ser o agente produtor que semeia, cuida da cultura, agiliza a colheita da maconha e dá início a seu beneficiamento, prensando-a para o transporte. A distribuição dos lucros que chega a ele é mínima e não lhe são garantidos direitos trabalhistas e fundamentais. Por ser um tipo de produção ilegal, mantida por seguranças que portam armas de fogo, há ali uma exacerbação dos desmandos, dos conflitos e dos assassinatos, pois a região, tradicionalmente, já era um reduto do coronelismo e de várias formas de violência. Esses conflitos potencializados pelos vínculos da produção agroindustrial da maconha geraram os lugares perigosos e os “lugares de ser homem”, expressões

por meio das quais os patrões açulam os brios dos camponeses envolvidos, aumentando os episódios de homicídios e o aparecimento de grupos de extermínio. Neste ambiente, se criaram grupos de delinquência unidos num movimento denominado Comando Caipira ligado ao Comando Vermelho no Rio de Janeiro, vinculados por meio do mercado ilegal de tóxicos, a violência urbana e a violência no campo, de forma totalmente diferente da que opõe latifundiários e camponeses na luta pela terra (IULIANELLI, s.d). Infelizmente não há dados quantitativos sobre essa situação de trabalho em que muitos agricultores, ao entrarem como mão de obra, podem estar assinando sua sentença de morte. Mas, sabe-se que, em ambos os casos, nos conflitos por terra e nas plantações de maconha, os lavradores se relacionam em condições de desigualdade econômica, social e de poder.

Atualmente, o consumo e produção de drogas atingem praticamente todos os países do mundo, embora sua extensão e características sejam diferentes de região para região, em função de fatores econômicos, sociais e culturais. Esta indústria ilegal movimenta uma enormidade de recursos, mão de obra e uma infraestrutura tão complexa que representa um impacto substancial na economia mundial, principalmente nos países mais pobres, mobilizando por ano cerca de US\$500 bi no mundo todo, segundo estimativas das Nações Unidas. De acordo com um estudo realizado pela Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura - UNESCO, as décadas de 1980 e 1990 foram fortemente marcadas por um verdadeiro crescimento das atividades relacionadas à produção e tráfico de drogas. Neste período surgiram também as grandes organizações criminosas, atualmente espalhadas e enraizadas por todo o mundo. Essa globalização é responsável pelo grande aumento nas rotas de comércio ilícito, tornando todos os países do mundo vulneráveis ao crime organizado (SHIBUYA, 2005).

Embora a Polícia Federal esteja atuando na erradicação destas drogas, não existem até o momento estudos detalhados a respeito da produção, distribuição e consumo da *Cannabis* no país. Dependendo da região do Brasil em que é vendida, a maconha tem origem Paraguaia ou é cultivada dentro do próprio país (CASTRO, 2006).

Com a prática do cultivo em escala, ainda pouco difundido no país, o comércio feito por traficantes alimenta a grande maioria dos consumidores. Acredita-se que a

maconha cultivada no Paraguai seja responsável pelo abastecimento das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. De acordo com a Secretaria Nacional Antidrogas - SENAD, o Brasil recebe aproximadamente 85% da produção de *Cannabis* do país vizinho. Parte deste cultivo é feito em regiões de fronteira, como a cidade de Capitán Bado, no Estado de Amambay-Paraguai (MOREIRA, 2007).

Enquanto o Centro-Sul do Brasil é possivelmente alimentado pela maconha Paraguaia, as regiões Norte e Nordeste são abastecidas por uma produção nacional. Os dados aceitos oficialmente apontam a região do semiárido nordestino, que compreende as cidades de Petrolina, Juazeiro, Cabrobró, Salgueiro, Floresta entre outras, a bacia do rio São Francisco e o norte do Estado da Bahia (o chamado Polígono da Maconha), como uma das áreas de maior produtividade, estimada em aproximadamente de 3.300t ao ano, sendo Pernambuco o Estado líder na produção. É importante observar que Juazeiro e Petrolina se hegemonizam como potências no sertão e são afetadas por áreas de influência como Recife, Salvador, São Luiz, Vitória (ES), Rio de Janeiro, São Paulo, Belo Horizonte e Brasília. Sabe-se que a repressão ostensiva a essas lavouras nos últimos 10 anos vem provocando a migração de parte dos produtores para a região norte. No Estado do Pará são encontradas áreas de cultivo em uma região apelidada de Triângulo do Capim, formada pelos municípios de Tomé-Açu, Concórdia do Pará e Acará e todo o Estado do Maranhão, que vem sendo considerado por alguns especialistas como o maior produtor da droga no país (MOREIRA, 2007).

O plantio de *Cannabis* é realizado comumente por duas formas de propagação: de forma vegetativa, onde são produzidos clones (mudas) e por meio de sementes. As plantas propagadas pela forma vegetativa tornam-se geneticamente idênticas, o que facilita seu rastreamento pela análise de DNA. Já as plantas propagadas por meio de sementes têm sua variabilidade genética aumentada pelos cruzamentos. Segundo Castro (2006), a propagação vegetativa não é a metodologia adotada nos plantios ilegais da América do Sul. Em operações realizadas pela Polícia Federal foi verificada a presença de sementes colhidas para dar origem a outros plantios na mesma região ou serem exportadas para outras regiões. Como esses plantios são ilegais e, de uma forma geral, presentes em regiões afastadas com pequenas extensões territoriais para dificultar a localização, mesmo o uso da técnica de

propagação por sementes pode permitir o rastreamento pela análise de DNA.

Assim, de uma forma geral, sabe-se que a maconha presente no mercado consumidor brasileiro é oriunda de plantios ilegais em solo brasileiro e/ou importadas do Paraguai, entretanto não pode-se afirmar a origem geográfica de uma apreensão (CASTRO, 2006).

### **1.3. Identificação e Individualização de *Cannabis* por Polimorfismos de DNA**

A análise do DNA pode ser considerada um dos principais progressos técnicos para investigação criminal desde a descoberta das impressões digitais. Seu surgimento trouxe novos paradigmas para os critérios utilizados na formulação da culpabilidade em vários campos do Direito. Foi incorporada à rotina forense pelas polícias de países do primeiro mundo e começa a ser introduzida no contexto pericial em alguns Estados do Brasil. A aplicabilidade potencial da tipagem de DNA em amostras forenses foi demonstrada por laboratórios do Reino Unido, Estados Unidos e Canadá, em meados da década de 1980, sendo que com esse estudo, o poder discriminatório pode atingir o limite necessário para inferir a identificação desejada (YUAN *et al.*, 2012).

A identificação dos diferentes cultivares de *Cannabis* pode auxiliar na determinação geográfica dos plantios e das rotas do tráfico, informação essencial para a ação da polícia no combate ao tráfico de drogas. Atualmente, entre os métodos usados para a identificação da *Cannabis* estão o perfil químico de canabinóides e terpenóides, a caracterização morfológica, a relação parasita-hospedeiro e o perfil genético. O uso de ferramentas genéticas para identificação de plantas, especialmente do gênero *Cannabis*, ganhou força na década de 1990. Tendo o DNA nuclear ou de organelas como alvo e utilizando-se de técnicas de RAPD (polimorfismo de DNA amplificado randomicamente); AFLP (polimorfismos de tamanho do fragmento de restrição amplificado) e RFLP (polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição), as técnicas moleculares mostraram potencialidade para identificação de amostras de *Cannabis* a nível molecular. Os produtores da fibra e da *Cannabis* podem ser

identificados a partir da análise das variações genéticas presentes na planta e que podem caracterizar uma plantação inteira, delatando assim a sua origem (MOURA NETO, 2011).

A análise de STR, denominada *Short Tandem Repeats* (STR) ou Repetições Curtas em Tandem (YUAN *et al.*, 2012) é muito utilizada para se identificar indivíduos ou espécies geneticamente, trata-se da análise de sequências repetidas altamente polimórficas, presentes no genoma. Essas sequências consistem em fragmentos de 1 a 6 pares de bases que se repetem em tandem e são altamente multialélicos, o que permite a diferenciação entre indivíduos. Além disso, por apresentar alelos de tamanho reduzido, os marcadores STR são aplicáveis para o uso forense, onde a presença de DNA degradado é comum e a amplificação, por PCR, em alvos de menor tamanho é facilitada.

Atualmente, são descritos cerca de 30 marcadores de STR para *Cannabis*. Técnicas baseadas em marcadores STR localizados no DNA nuclear, cloroplástico e mitocondrial, têm se mostrado muito eficientes para a identificação desse gênero, sendo também muito úteis para a descrição de sua rota de tráfico ou o seu plantio de origem (MOURA NETO, 2011).

O presente trabalho visa identificar os diferentes tipos moleculares da *Cannabis* presente no Estado do Espírito Santo e apreendidas pela Polícia Civil do Estado do Espírito Santo - PC/ES. O problema em questão se refere ao tráfico de drogas, em particular a maconha (*Cannabis*), responsável hoje por grande parcela do número de homicídios no Estado. O objeto de estudo é a maconha, droga ilícita que vicia e é uma das mais utilizadas e traficadas pela população. Espera-se com este trabalho identificar e comparar os perfis genéticos da *Cannabis* presente em nosso Estado, buscando correlações entre indivíduos através da análise genética de *loci* STR.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo Geral

Caracterizar as amostras de *Cannabis* apreendidas pela Polícia Civil nos municípios do Estado do Espírito Santo, por meio de marcadores moleculares STR e comparar seus perfis com intuito de identificar correlações que possam indicar origens comuns e assim auxiliar no combate ao tráfico de entorpecentes.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Selecionar amostras provenientes de apreensões de *Cannabis* realizadas entre os anos de 2012 e 2013, no Espírito Santo;
- Extrair e quantificar o DNA das amostras de *Cannabis*, principalmente aquelas provenientes de apreensões de material prensado;
- Identificar os perfis genéticos das diferentes amostras a partir da análise de 18 *loci* STR;
- Comparar os perfis genéticos através de análises filogenéticas e identificar as possíveis correlações entre indivíduos.

## 3. Metodologia

### 3.1. Amostragem

#### 3.1.1. Critérios de Amostragem

Todo material proveniente de apreensões realizadas pela Polícia Civil que estão relacionadas ao tráfico de entorpecentes, são remetidos, obrigatoriamente, para o Laboratório de Química Legal - LQL. O LQL da Polícia Civil do Estado do Espírito Santo é responsável por identificar o material encaminhado através da análise e identificação química das substâncias presentes. Sempre que uma análise é realizada, parte da substância é arquivada para servir de contraprova, caso um novo exame seja solicitado.

O relatório de tráfico e uso/posse de entorpecentes elaborado pela Gerência de Estatística e Análise Criminal da Secretaria Estadual de Segurança Pública e Defesa Social do Estado do Espírito Santo - GEAC/SESP-ES, no período de janeiro de 2012 à julho de 2013, foi utilizado como base para definição da metodologia de amostragem a ser realizada. Vale ressaltar que o relatório é generalista e inclui todos os tipos de entorpecentes, porém é comum - quase uma regra - a apreensão de *Cannabis* junto às demais drogas, visto que esta é a droga mais consumida.

Os critérios para a amostragem foram: localização do município (região metropolitana de Vitória, municípios de fronteira e outros) e número de apreensões realizadas no ano de 2013. Esses critérios foram adotados visando um melhor entendimento de como a droga se movimenta no Estado do Espírito Santo, desde sua entrada até a comercialização.

A amostragem seguiu os critérios apresentados no Quadro 1.

Quadro 1. Critérios de amostragem: região metropolitana de Vitória, municípios de fronteira e outros municípios como áreas prioritárias, respectivamente

outros	entre 2 e 3 amostras
municípios de fronteira	entre 3 e 6 amostras
região metropolitana de vitória	entre 4 e 10 amostras
<b>Apreensões em 2013</b>	<b>número de amostras</b>
até 28	2 amostras
acima de 28	3 amostras
<b>Apreensões em 2013</b>	<b>número de amostras</b>
até 9	3 amostras
entre 10 e 19	4 amostras
entre 20 e 29	5 amostras
acima de 29	6 amostras
<b>Apreensões em 2013</b>	<b>número de amostras</b>
até 99	4 amostras
entre 100 e 299	5 amostras
entre 300 e 499	6 amostras
entre 500 e 699	7 amostras
entre 700 e 899	8 amostras
entre 900 e 1099	9 amostras
acima de 1099	10 amostras

Essa configuração de amostragem prioriza a fronteira com os Estados vizinhos e também a região metropolitana de Vitória que é o principal destino dos entorpecentes que entram no Espírito Santo, visto o número de apreensões consideravelmente superior nesses municípios (Figura 1).

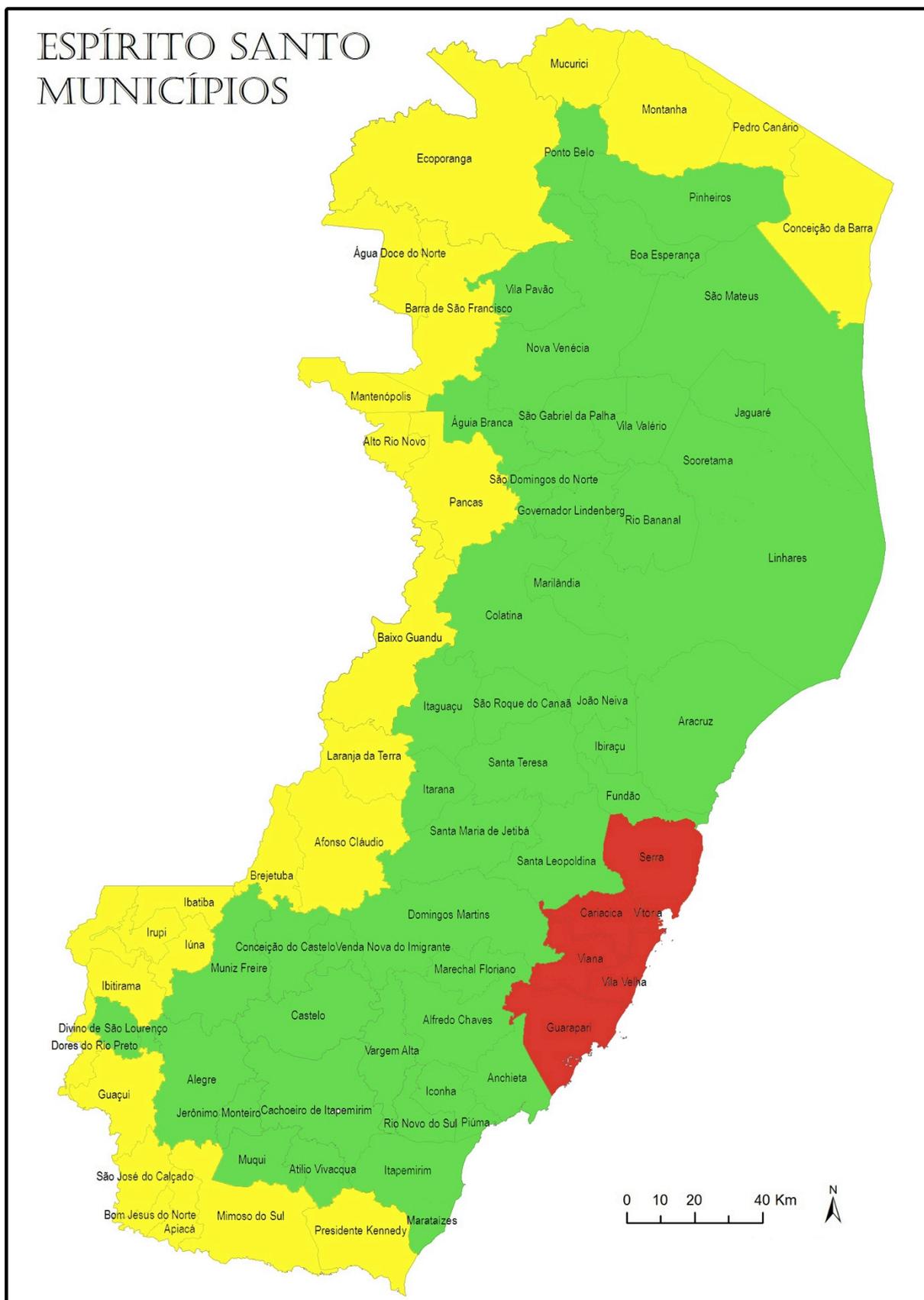


Figura 1. Distribuição da amostragem com base nas regiões prioritárias: região metropolitana de Vitória (vermelho), municípios de fronteira (amarelo) e demais municípios (verde).

### 3.1.2. Seleção das Amostras

Após definição dos critérios de amostragem, a seleção das amostras foi realizada com base nos registros dos materiais encaminhados para o LQL. Através do sistema que gerencia os laudos emitidos pelos Peritos daquele laboratório, foram identificadas as amostras testadas positivamente para THC para posterior verificação da possibilidade de amostragem a partir dos arquivos de contraprova. Essa verificação foi necessária pois, como dito anteriormente, após feita a análise, o laboratório permanece com parte do material como contraprova, sendo assim, nossa amostragem não poderia influenciar na rotina de funcionamento do laboratório. Todo o material foi conferido nos arquivos de contraprova e, quando disponível, aproximadamente 1 grama foi coletado. As coletas não influenciaram na rotina do laboratório e foram previamente autorizadas pela Chefia de Polícia. Vale ressaltar que a maior parte das amostras coletadas eram provenientes de apreensões de material pronto para o comércio ilegal, tendo como característica principal ser um prensado de plantas contendo caules, raízes, folhas e sementes (Figura 2).



Figura 2. Característica da maior parte das amostras coletadas; presença de várias partes da planta prensadas.

Ao todo foram coletadas 165 amostras (Figura 3) em 71 dos 78 municípios do Estado do Espírito Santo. Não foi possível a amostragem nos municípios de: Água Doce do Norte, Divino de São Lourenço, Fundão, Governador Lindenberg, Ibitirama, Venda Nova do Imigrante e Vila Pavão. Desses, apenas dois eram de áreas prioritárias e não apresentaram grandes apreensões de entorpecentes (menos de 5) no período avaliado, segundo relatório da GEAC/SESP-ES.



Figura 3. Amostras após coleta.

## **3.2. Extração do DNA**

### *3.2.1. Preparação das amostras*

Todas as amostras coletadas foram maceradas em nitrogênio líquido ( $N_2$ ), obtendo-se um material pulverizado para melhor ação das enzimas na fase de extração.

### 3.2.2. Extração em coluna

A extração do DNA foi realizada com o kit NucleoSpin® Food (Macherey-Nagel), utilizando 200mg de amostra, seguindo as recomendações do fabricante (Figuras 4 e 5). Após a extração, apenas o DNA foi armazenado, sendo os resíduos da extração descartados no LQL, junto com os resíduos das análises diárias daquele laboratório.

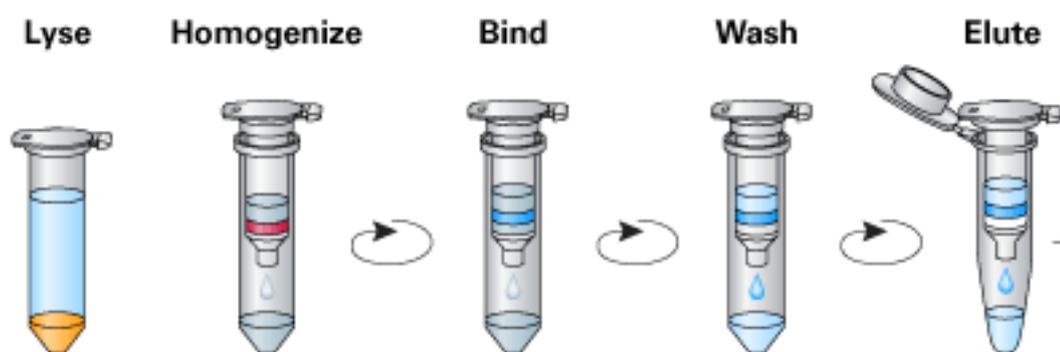


Figura 4. Processo de extração do kit NucleoSpin® Food (Macherey-Nagel). Lise, homogeneização, quelagem, lavagem e eluição, respectivamente.

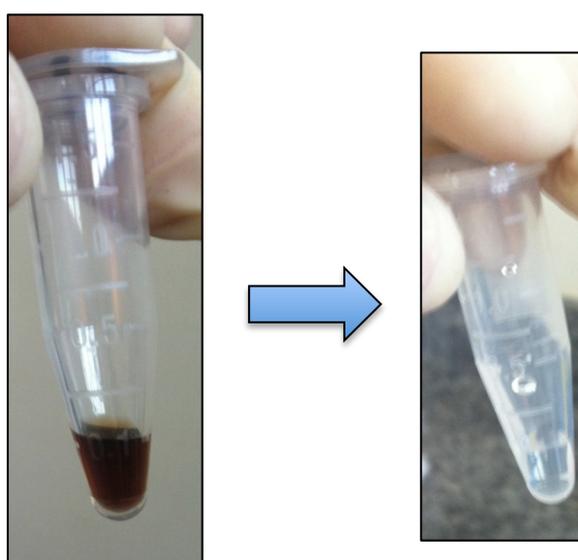


Figura 5. Solução com material genético antes e após extração.

### 3.2.3. Quantificação do DNA

Todas as amostras extraídas foram quantificadas em espectrofotômetro UV-Vis NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

### 3.3. Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

Os 18 marcadores moleculares STR analisados neste estudo foram amplificados por PCR-Multiplex em termociclador GeneAmp 9700 (9600 emulation mode, \* 50% ramp) da marca Applied Biosystems, utilizando *primers* descritos e cedidos por Köhnemann *et al.* (2012) (Tabela 2).

O preparo do mix para a reação de PCR seguiu as concentrações da Tabela 1.

Tabela 1. Concentração dos reagentes utilizados para a preparação do mix da PCR para um volume final de 7 $\mu$ L.

Reagente	[ ]
H <sub>2</sub> O	-
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	6,25.10 <sup>-6</sup> mM
BSA (10 mg/ml)	3,33.10 <sup>-4</sup> mg/ml
Buffer Gold 10X	1x
dNTPs (10mM)	10,41.10 <sup>-7</sup> mM
Primer Mix 10X	1x

Tabela 2. Sequência dos 18 pares de *primers* utilizados.

<b>Cannabis</b> <b>Primers 18-Plex</b>	<b>Sequências</b>	<b>Motivos</b>	<b>Cor (dye color)</b>
<b>D02_FW</b>	GGTTGGGATGTTGTTGTTGTG	(GTT)	6FAM
<b>D02_RV</b>	AGAAATCCAAGGTCCTGATGG		
<b>C11_FW</b>	GTGGTGGTGATKATGATRATGG	(GAT)(GGT)	6FAM
<b>C11_RV</b>	TGAATTGGTTAMGATGGCG		
<b>A302_FW</b>	CAACATAAACACCAACAACACTGC	(CAA)(CAA)	6FAM
<b>A302_RV</b>	TGGCTAGAAGCAGAATGTAGG		
<b>B02_FW</b>	TGCCAAGAACGAGCTAATAAACA	(AAG)	6FAM
<b>B02_RV</b>	TCTTGCACCTGCACCCTGC		
<b>5159_FW</b>	CCAGAGCTTGTGGATCTCCT	(AGAT)	6FAM
<b>5159_RV</b>	AGTACGAAAGGGCACTGAGG		
<b>E07_FW</b>	CAAATGCCACACCACCTTC	(CTA)	HEX
<b>E07_RV</b>	GTAGGTAGCCAGGTATAGGTAG		
<b>A305_FW</b>	AAAGTTGGTCTGAGAAGCAAT	(TGG)	HEX
<b>A305_RV</b>	CCTAGGAACCTTCGACAACA		
<b>4910_FW</b>	TCTCCAAAGACATTATTGAACAAA	(AAGA)	HEX
<b>4910_RV</b>	GGTATCAAGAGCCAGGTTTCA		
<b>B05_FW</b>	TTGATGGTGGTGAACGGC	(TTG)	HEX
<b>B05_RV</b>	CCCCAATCTCAATCTCAACCC		
<b>H06_FW</b>	TGGTTTCAGTGGTCCCTCTC	(ACG)	HEX
<b>H06_RV</b>	ACGTGAGTGATGACACGAG		
<b>A501_FW</b>	AGCAATAATGGAGTGAGTGAAC	(TTGTG)	TAMRA
<b>A501_RV</b>	AGAGATSAAGAAATTGAGATTCC		
<b>9269_FW</b>	CCCAAACACTGTTTGTGCC	(ATAA)	TAMRA
<b>9269_RV</b>	ACTTGCACGTGATGTTAGATCC		
<b>9043_FW</b>	AAAGCTCGATGTCATCTCTACAC	(TCTT)	TAMRA
<b>9043_RV</b>	TGCTCAATGCCTTATTCATGCT		
<b>B01_FW</b>	CAGACAGAACTCAAATGGCTC	(GAA)(A)(GAA)	TAMRA
<b>B01_RV</b>	AAACCAAATSTRACAGGYGA		
<b>3735_FW</b>	TGATTCTGTGTTTGTGTGCAAT	(TATG)	ROX
<b>3735_RV</b>	CATCGCACCCACAGGTTAGT		
<b>nH09_FW</b>	TTTCTCRRAMYCCAAACAAGC	(AAT)	ROX
<b>nH09_RV</b>	ACCTTGTTMGGAAAGGGACT		
<b>A301_FW</b>	TGCTTAAGACAATAAAAGYABCTCA	(TTA)	ROX
<b>A301_RV</b>	CGTGARGGTSAAATSGCTTCT		
<b>1528_FW</b>	TTGTCTAGTGCCTTTGTCATGC	(ATTA)	ROX
<b>1528_RV</b>	AGGATGACCAAATTTGCTCCA		

Obs.: FW - Forward; RV - Reverse.

O volume total da reação foi de 7µl, sendo 6µl do mix e 1µl da amostra. Após realização de testes com concentrações de DNA variando de 50-200ng/µl, foi verificado uma melhor amplificação quando utilizada uma concentração de 50ng/µl, sendo essa a concentração padrão neste estudo.

As condições de PCR estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3. Condições de amplificação da reação de PCR.

<b>Denaturação inicial</b>	95°C	10min	
<b>Denaturação</b>	95°C	30seg *	30 ciclos
<b>Anelamento</b>	60°C	30seg *	
<b>Extensão</b>	72°C	45seg *	
<b>Extensão final</b>	72°C	30min	
<b>Hold</b>	10°C	∞	

Obs.: \* Tempo de cada etapa/ciclo.

### 3.4. Genotipagem dos microssatélites

Os produtos de PCR gerados pela reação de multiplex dos marcadores STR foram genotipados através de eletroforese capilar em sequenciador ABI PRISM®3100-Avant (Applied Biosystems). Para a genotipagem 3µl de produto de PCR foram adicionados a 16µl de Formamida/Hi-Di e 0,2µl de GeneScan™500LIZ (Applied Biosystems).

Os resultados foram analisados com o software GeneMapper® ID Analysis v.3.2. As designações alélicas foram realizadas por comparação do tamanho dos fragmentos obtidos com os bins alélicos de cada marcador (Figura 6). Na marcação de alelos nos perfis foi considerado, como limiar (do inglês, *peak threshold*), a medida mínima de 100RFU e, em caso de mistura, foram considerados os picos com leitura igual ou superior a 60% do maior pico de cada marcador (GILL *et al.*, 2006).

### 3.5. Análise dos Dados

A análise dos dados foi baseada na comparação dos perfis genéticos obtidos de todas as 165 (cento e sessenta e cinco) amostras e também das amostras “controle positivo” oriundas da Alemanha (CP 1,26, CP 2,62, CP M141 e CP 2003.8.1), cedidas pelo Dr. Stephan Köhnemann, pesquisador da Universidade de Münster.

#### 3.5.1. Análise Estatística

Os dados alélicos dos 18 *loci* STR foram tabulados em Excel e utilizados como fonte para as análises.

Para a apresentação das variáveis quantitativas discretas foi utilizada a estatística descritiva em tabelas de frequências absolutas e relativas. Para as análises multivariadas realizadas a partir dos marcadores moleculares de *Cannabis sativa*, foram utilizados os métodos: distância Euclidiana simples, agrupamento pelo método hierárquico da ligação média entre grupos (UPGMA) e análise de componentes principais (ACP). A distância Euclidiana foi a medida de dissimilaridade escolhida, por não exigir experimentos que envolvam delineamentos com repetições. A construção do dendrograma pelo método UPGMA e a análise de componentes principais foram realizadas com o auxílio do programa Fitopac 2.1.2.85 (SHEPHERD, 2009).

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Extração do DNA e amplificação dos STR das amostras de *Cannabis*

A extração foi bem sucedida em todas as amostras. Em um total de 165 amostras, 163 eram provenientes de um prensado de plantas, típicos daqueles usados no tráfico, e 2 eram plantas adultas e frescas. A concentração do DNA recuperado na extração variou de 22,8 ng. $\mu\text{l}^{-1}$  a 709,1 ng. $\mu\text{l}^{-1}$ . As amostras foram diluídas em água ultrapura para padronização das concentrações em 50 ng. $\mu\text{l}^{-1}$ , previamente à amplificação.

A amplificação do material genético foi alcançada em 100% das amostras analisadas. Alguns marcadores apresentaram maior sensibilidade para amplificação, sendo que, de 18 regiões analisadas, 11 foram amplificadas em mais de 95% das amostras, 4 em mais de 90% e 1 em mais de 85%. Apenas 2 dos marcadores utilizados, E07 e A301, não possibilitaram a identificação do genótipo de forma satisfatória, sendo o percentual de não identificação de 33,9 e 47,9%, respectivamente (Tabela 4).

Os *loci* considerados não identificados foram aqueles nos quais não ocorreram amplificações ou apresentaram alelos múltiplos com picos RFU's muito próximos, não possibilitando a diferenciação alélica.

Tabela 4. Número de homozigotos e heterozigotos nas 165 amostras analisadas.

Marcadores		Homozigoto		Heterozigoto		Não identificado	
		N	%	N	%	N	%
1	D02	159	96,4	2	1,2	4	2,4
2	C11	87	52,7	70	42,4	8	4,8
3	A302	77	46,7	77	46,7	11	6,7
4	B02	57	34,5	101	61,2	7	4,2
5	5159	146	88,5	6	3,6	13	7,9
6	E07	42	25,5	67	40,6	56	33,9
7	A305	128	77,6	36	21,8	1	0,6
8	4910	54	32,7	107	64,8	4	2,4
9	B05	86	52,1	73	44,2	6	3,6
10	H06	132	80,0	19	11,5	14	8,5
11	A501	163	98,8	2	1,2	0	0,0
12	9269	14	8,5	150	90,9	1	0,6
13	9043	25	15,2	118	71,5	22	13,3
14	B01	163	98,8	2	1,2	0	0,0
15	3735	90	54,5	71	43,0	4	2,4
16	nH09	140	84,8	24	14,5	1	0,6
17	A301	24	14,5	62	37,6	79	47,9
18	1528	147	89,1	8	4,8	10	6,1

A identificação alélica foi baseada no tamanho dos fragmentos e na intensidade dos picos gerados. A quantidade de genótipos não identificados, principalmente nos marcadores citados (E07 e A301) está associada mais com a amplificação de *locus* múltiplos, que pode ocorrer de forma diferenciada por homologia em sítios dentro do mesmo genoma ou da combinação com o genoma do embrião (SHIRLEY *et al.*, 2013), do que com a ineficiência dos marcadores.

Todos os trabalhos publicados até o momento sobre marcadores moleculares em *Cannabis* utilizaram, como material base de extração, tecidos folheares coletados em plantas adultas ou gerados a partir de sementes germinadas (KÖHNEMANN *et al.*, 2012; HOWARD *et al.*, 2009; HOWARD *et al.*, 2008; MENDOZA *et al.*, 2009; GILMORE *et al.*, 2003; CASTRO, 2006), o que torna a extração e amplificação mais fáceis. Esse é o primeiro estudo de análise de STR em *Cannabis* que se tem conhecimento, no qual o material base de extração são plantas prensadas em

formato de tabletes, frutos de operações de combate ao tráfico de entorpecentes (Figura 2).

Por essa característica diferenciada, na qual várias plantas podem estar presentes e também sementes, algumas amostras apresentaram mistura de perfis, amplificando alelos múltiplos em algumas regiões. Mesmo sendo considerados os picos iguais ou maiores que 60% do maior pico de determinado marcador (GILL *et al.*, 2006), alguns genótipos não puderam ser diferenciados, sendo assim, foram considerados como não identificados.

Foram detectados um total de 89 alelos nas 165 amostras analisadas, variando de 2 (*loci* A501 e 9269) a 12 alelos (*locus* A301) em cada *locus* (Tabela 5). Observa-se que, apesar de ter apresentado uma maior quantidade de genótipos não identificados, o *locus* A301 apresentou-se mais polimórfico.

Se compararmos com Gilmore *et al.* (2003), que encontrou, em 5 *loci*, 79 alelos em apenas 93 amostras, variando de 6 a 29 alelos por *locus*, e com Castro (2006), que encontrou, em 11 *loci*, 75 alelos em 477 amostras, variando de 3 a 15 alelos por *locus*, temos uma menor diversidade, visto que analisamos quase o dobro de marcadores que Castro (2006) e 4 vezes mais que Gilmore *et al.* (2003). Essa menor variabilidade era esperada, visto que Gilmore *et al.* (2003) analisaram amostras de 15 regiões distribuídas pelo mundo e que Castro (2006) analisou amostras do Brasil e Paraguai, sendo todas provenientes de plantios.

Assim como Alghanim e Almirall (2003) e Castro (2006), foram encontrados 4 alelos diferentes para o *locus* B05 e 3 alelos diferentes para o *locus* H06. Já o *locus* A305 apresentou 3 alelos distintos, assim como encontrado por Castro (2006), porém os *primers* utilizados para amplificação desse *locus*, modificados por Castro (2006), resultaram em fragmentos variando entre 200pb e 212pb enquanto que nesse estudo, os fragmentos gerados variaram entre 142pb e 156pb.

Os *loci* H06 e A305 apresentaram 3 alelos, sendo similar ao observado por Castro (2006) em amostras oriundas do Paraguai. Esses mesmos *loci* mostraram-se monomórficos em amostras do Brasil analisadas por Castro (2006), o que indica um ancestral comum entre as amostras do ES com a *Cannabis* Paraguaia, visto que o

ES se encontra na região Sudeste do Brasil, teoricamente abastecida pela maconha proveniente do Paraguai (CASTRO, 2006). Resultado semelhante foi observado no *locus* B05, onde Castro (2006) encontrou fragmentos de tamanho entre 236pb e 239pb apenas em amostras do Brasil enquanto que, no Paraguai, foram amplificados fragmentos variando entre 236pb e 245pb assim como nas amostras desse estudo, indicando que a *Cannabis* do ES apresenta, em pelo menos 3 marcadores, maior similaridade com a *Cannabis* do Paraguai.

Dos 89 alelos encontrados, 4 apareceram somente nas amostras 176 e 230. O alelo 6 do *locus* A501 e o alelo 14 do *locus* B01 foram detectados apenas nas amostras 176 e 230, estando também presentes em amostras da Alemanha, já o alelo 15 do *locus* B01 e o alelo 2 do *locus* 3735 só foram detectados na amostra 230 (Tabela 5).

Tabela 5. Relação de alelos encontrados em cada *locus*.

Marcadores		Alelos encontrados	TOTAL
1	D02	6,7 e 8	3
2	C11	13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 e 20	8
3	A302	32, 34, 36, 37 e 38	5
4	B02	7, 8, 9 e 10	4
5	5159	3, 4, 5, 6, 7 e 9	6
6	E07	6, 7, 8 e 9	4
7	A305	4, 5 e 8	3
8	4910	4, 5, 5.2, 10 e 15	5
9	B05	7, 8, 9 e 10	4
10	H06	7, 8 e 9	3
11	A501	4 e 6**	2
12	9269	5.3 e 6	2
13	9043	3, 4, 5, 6 e 7	5
14	B01	10, 12, 14** e 15*	4
15	3735	2*, 5, 6 e 7	4
16	nH09	6, 7, 8, 9, 17, 18 e 19	7
17	A301	14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 e 25	12
18	1528	2, 3, 4, 5, 6.3, 7, 7.3 e 8	8
TOTAL			89

Obs.:\* presente apenas na amostra 230; \*\* presentes nas amostras 230 e 176, apenas.

#### **4.2. Relações filogenéticas das amostras de *Cannabis* genotipadas em apreensões da Polícia Civil do ES.**

Os dados alélicos obtidos após a genotipagem foram compilados e analisados pelo método UPGMA. O dendograma gerado com base nesses resultados demonstrou grande similaridade entre a maior parte das amostras analisadas, exceto as amostras 128, 176, 230 e as amostras da Alemanha (CP 1,26, CP M141, CP 2,62 e CP 2003.8.1). Segundo Pilluza *et al.* (2013), o salto observado nas distâncias euclidianas entre as amostras é onde se evidencia a diferenciação entre elas (Gráfico 1).

O valor do coeficiente de correlação cofenética (ccc) indica a qualidade do agrupamento realizado pelo método UPGMA. Segundo Sokal e Rohlf (1962), quanto maior o valor do coeficiente de correlação cofenética melhor é o agrupamento e quando esse valor está abaixo de 0,7 o agrupamento está inadequado (ROHLF, 1970). O coeficiente de correlação cofenética calculado foi de 0,913762 (Gráfico 2), valor próximo do ccc 0,943 encontrado por Pilluza *et al.* (2013), o que indica um agrupamento adequado.

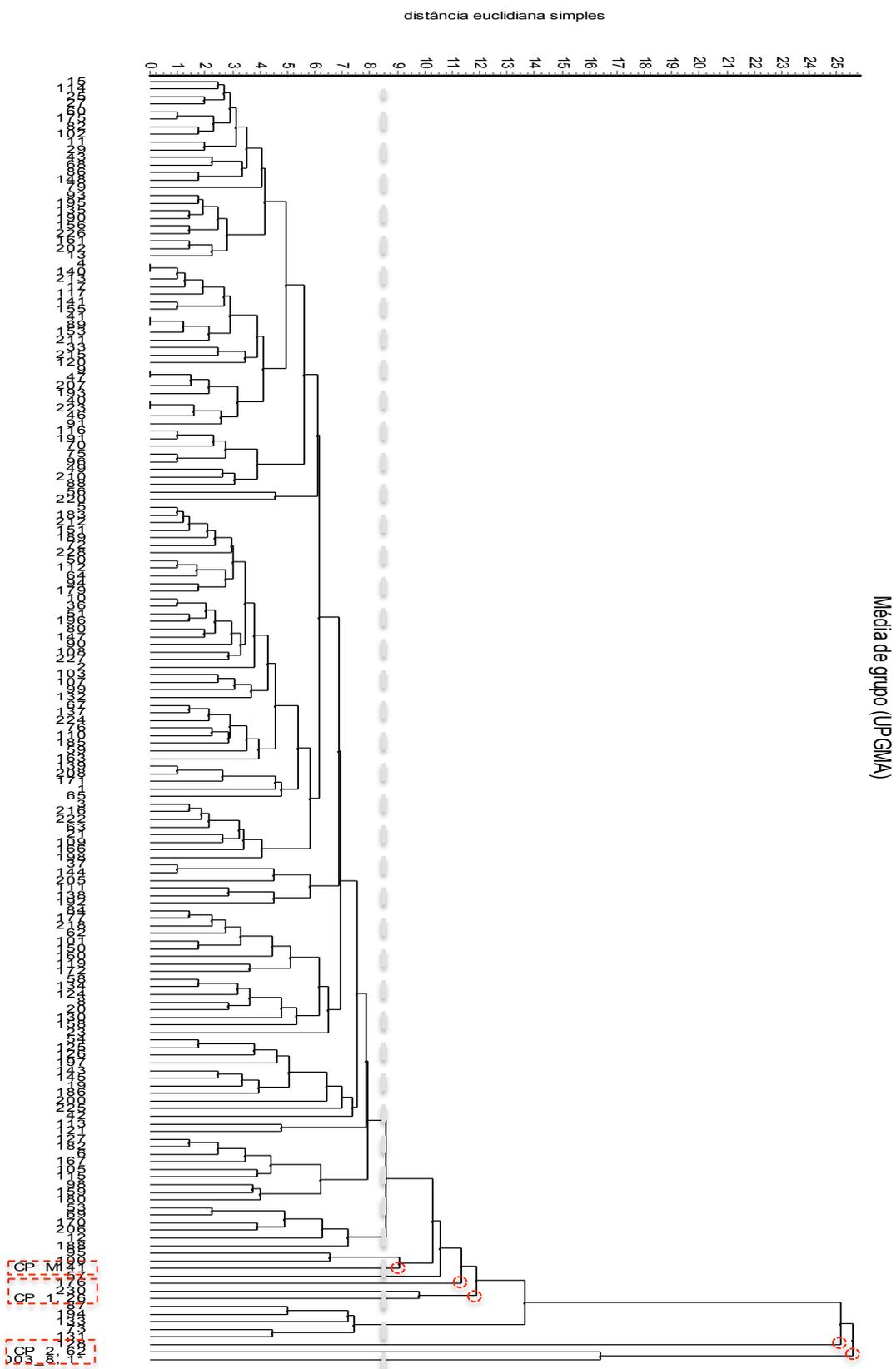


Gráfico 1. Árvore de distâncias genéticas gerada a partir dos dados alélicos. Detalhe para as amostras 128, 176, 230 (ES) e CP 1,26, CP M141, CP 2,62 e CP 2003.8.1 (Alemanha).

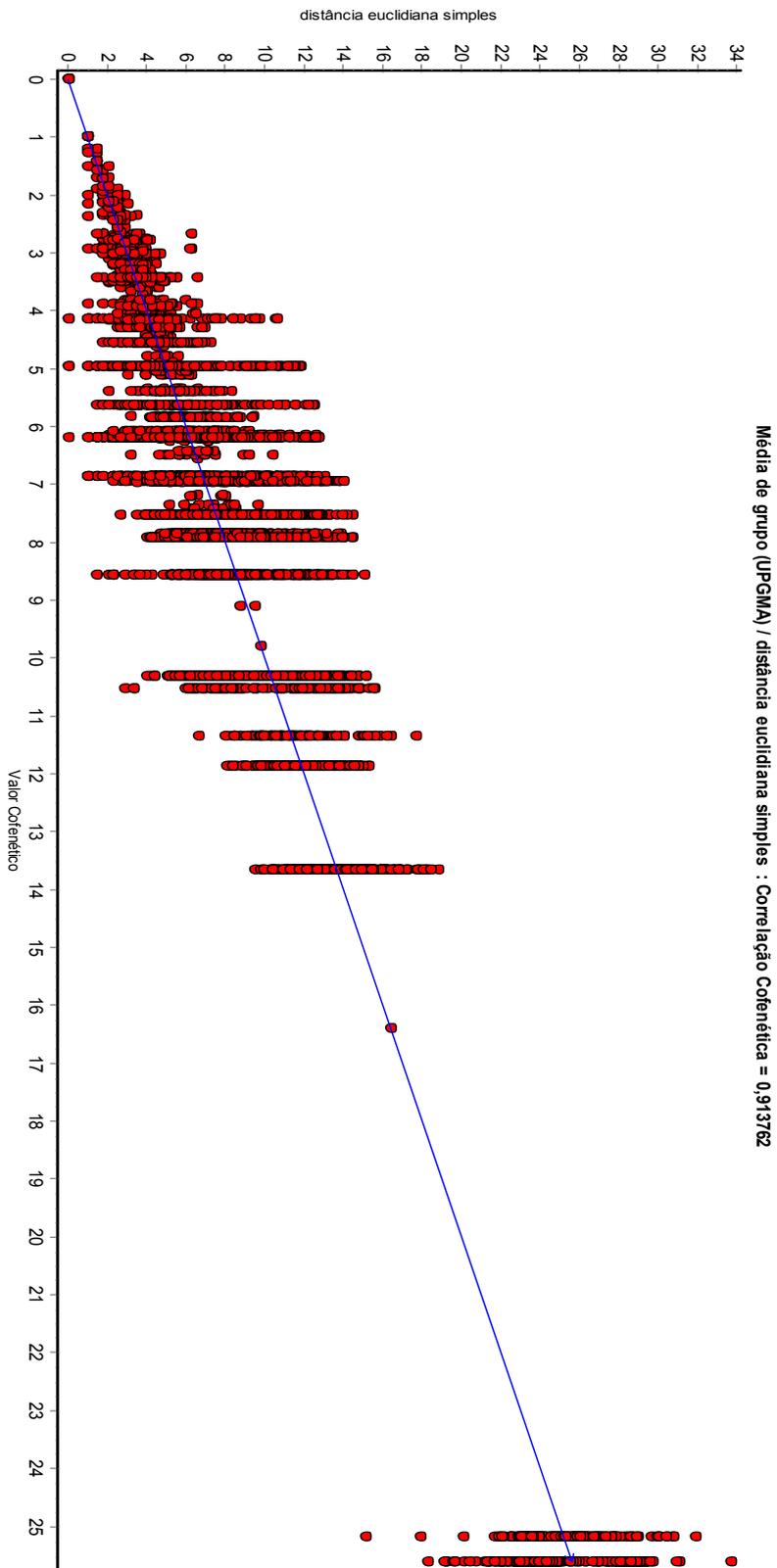


Gráfico 2. Coeficiente de correlação cofenética.

A presença de um grande grupo mais próximo (amostras do ES) e de algumas amostras mais diferenciadas, caso daquelas provenientes da Alemanha e também das amostras 230 (-12,5, -6), 176 (-7, -5) e 128 (2, 10) são bem evidenciadas na forma do gráfico de Análise de Componentes Principais – ACP (do inglês, *Principle Component Analysis – PCA*) (Gráfico 3).

A ACP é uma análise complexa dos principais eixos de variação de um conjunto multidimensional de dados, mas quando há grupos distintos, os primeiros dois ou três eixos revelam a separação entre grupos, demonstrando graficamente a relação genética entre indivíduos (CASTRO, 2006).

Uma característica comum das amostras 230 e 176, além das amostras da Alemanha, é que ambas eram plantas que foram apreendidas pela Polícia Civil quando estavam sendo cultivadas, diferentemente das demais amostras que eram provenientes de tabletes de maconha prensada, incluindo a amostra 128.

Como a *Cannabis* é uma planta que apresenta propriedades tóxicas, seu cultivo ou posse é proibido em diversos países (HOWARD *et al.*, 2009; GILMORE *et al.*, 2003). Na América do Sul, essa ilegalidade acaba por restringir os locais de plantio e também a forma como esses são conduzidos. Segundo Castro (2006), a propagação desses plantios a partir de sementes é a predominante. Em operações da Polícia Federal em conjunto com outras forças policiais dos países vizinhos ao Brasil, foi verificado que antes da prensagem para posterior distribuição da droga, sementes de *Cannabis* são coletadas da própria plantação e são utilizadas para originar novos plantios na mesma região ou em outras (CASTRO, 2006). A propagação por meio de sementes oriundas de mesmo plantio ou por qualquer outra forma de cruzamento seletivo acaba por gerar redução na variação genética, pois isso sugere que plantas aparentadas cruzem entre si (CASTRO, 2006; MENDOZA *et al.*, 2009), o que acaba explicando a baixa diversidade genética em *Cannabis* utilizadas como psicotrópicas, que apresentam maior índice de THC (GILMORE *et al.*, 2003).

A grande similaridade verificada entre as amostras apreendidas no Espírito Santo (Gráfico 3), somada ao alto nível de manipulação dos cruzamentos nessa espécie de planta (MENDOZA *et al.*, 2009) e a conhecida propagação por sementes geradas

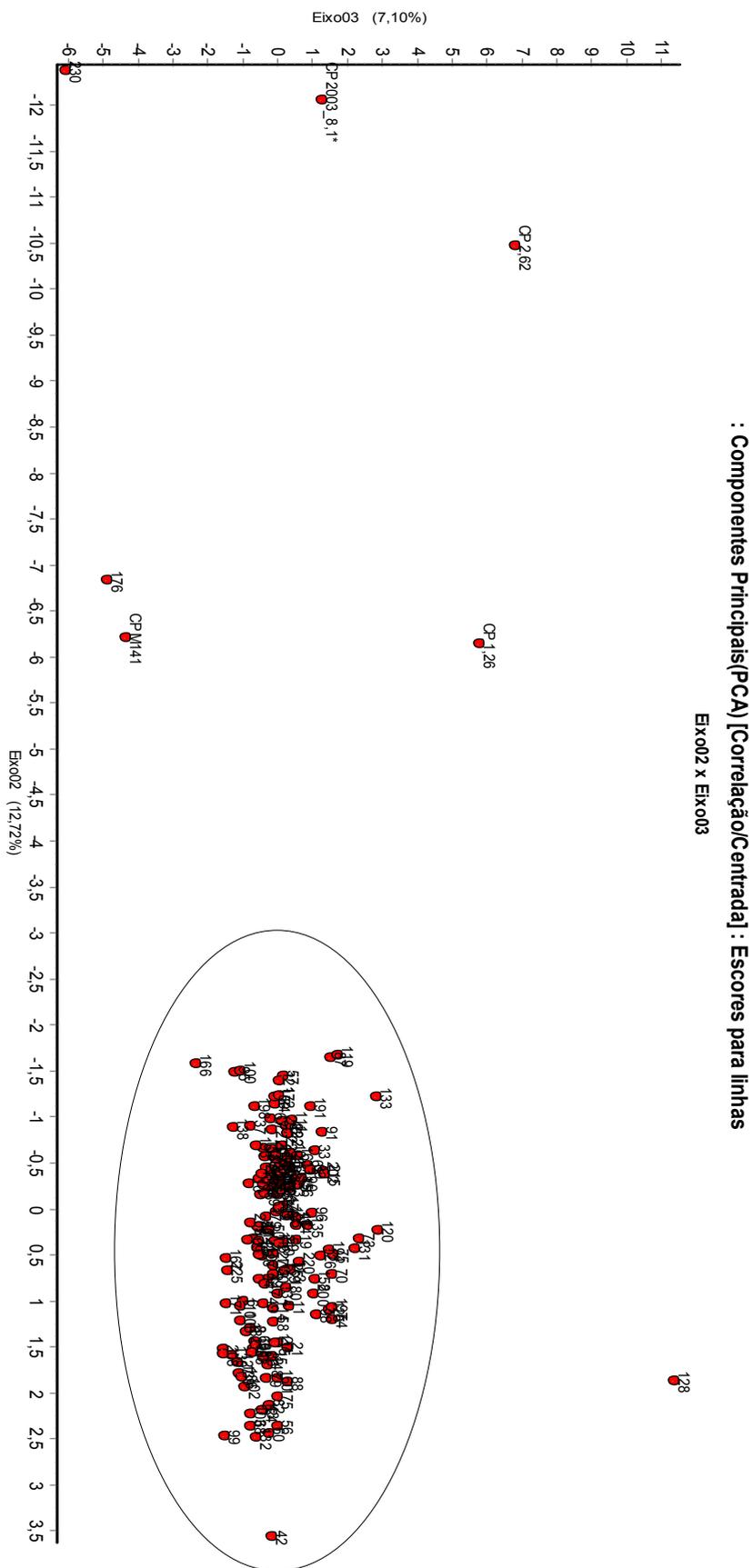


Gráfico 3. Análise de componentes principais das amostras do ES e Alemanha (CP 1,26, CP M141, CP 2,62 3 CP 2003.8.1). Detalhe para o agrupamento das amostras do ES, exceto a 128, 176 e 230.

em plantios anteriores indicam a possibilidade da existência de um gargalo genético pela presença de elevados níveis de endocruzamentos (CASTRO, 2006).

Resultado semelhante foi observado em um estudo com amostras de *Cannabis* no Rio de Janeiro, que se mostraram geneticamente idênticas quando analisado o gene *rbcL*, sugerindo possivelmente serem provenientes de cultivares próximos ou idênticos, diferentemente do observado quando comparadas com amostras da China, Estados Unidos e Reino Unido, que indicou diferenciação total (RIBEIRO *et al.*, 2013). O gene *rbcL* de algumas dessas amostras do ES também foi estudado e não demonstrou diferença com as amostras do Rio de Janeiro (MOURA NETO, 2015).

Das amostras provenientes de prensados de planta, a única que mostrou ser bem diferenciada de todas as outras foi a 128 (Gráfico 3). Como é sugerido que o sudeste do Brasil é abastecido, principalmente, por maconha proveniente do Paraguai (CASTRO, 2006) mas que há também plantios em solo brasileiro, estudos posteriores serão necessários para melhor entender as possíveis rotas do tráfico, sendo possível, no entanto, sugerir que a amostra 128 tem origem diferenciada das demais amostras do ES analisadas.

### **4.3. Tráfico pela Internet**

De uma forma geral, a *Cannabis* presente no território brasileiro tem origem interna ou então é importada do Paraguai, apesar de não ser possível essa afirmação pela falta de rastreamento do tráfico pela inteligência policial (CASTRO, 2006). A existência de organizações criminosas que alimentam o mercado negro do tráfico é inquestionável, apesar disso, os esforços governamentais para combatê-las são limitados pela impossibilidade de ligá-las aos produtores.

Uma matéria do site O Globo publicada no dia 09/02/2015 relata a explosão do tráfico de drogas na internet após o fim do site “Silk Road” (Figura 7), considerado um dos maiores sites de venda de produtos ilícitos, na chamada web profunda (do inglês, deep web), dentre eles os entorpecentes, principalmente a maconha.

Se aproveitando da navegação anônima e criptografada, criminosos disponibilizam e comercializam diversos produtos ilícitos, dentre os quais, sementes de *Cannabis* (MATSUURA, 2015).

O sistema é tão popular que as páginas disponibilizam formas de avaliação com comentários para classificação dos comerciantes. Além desse, outros sites que vendem sementes de *Cannabis* podem ser facilmente encontrados em uma busca rápida pelo Google (Figura 8).



Figura 6. Capa da matéria do jornal O Globo do dia 09/02/2015 sobre tráfico na internet. Acesso em 25/05/2015.



Figura 7. Site de vendas de sementes de *Cannabis* disponível na internet. Acesso em 25/05/2015.

O jornal Folha de São Paulo também divulgou a existência do tráfico de drogas na web em uma publicação de 26/02/2002, onde consta que na Holanda e Reino Unido a internet é utilizada para a venda de maconha para todo o mundo (FRANCE-PRESSE, 2002).

No ES, um laboratório de produção de *Cannabis* foi descoberto pela Polícia Civil em dezembro de 2013. No local havia um sistema sofisticado de produção com controle de iluminação e refrigeração automatizados, visando uma maior qualidade da droga. Segundo apurado pela Polícia Civil, o suspeito tinha ligação com uma quadrilha de tráfico de drogas internacional.

A amostra 230 foi coletada dessa apreensão e demonstrou características genéticas bem distintas das demais amostras analisadas, se aproximando mais das amostras da Alemanha do que das amostras do Espírito Santo. A ligação com o tráfico internacional e a possibilidade de compra de sementes de outros países pela internet sustentam a possibilidade da matriz ser de origem estrangeira, explicando a distância genética das demais amostras. O mesmo pode ser atribuído à amostra 176.

A genética molecular pode oferecer solução na identificação e individualização pela investigação da relação genética entre indivíduos/populações (PINARKARA *et al.*, 2009). Marcadores polimórficos de DNA têm sido aplicados amplamente em ciências forenses e podem ser utilizados para a determinação da origem de drogas apreendidas (GILMORE *et al.*, 2003; MENDOZA *et al.*, 2009). Os marcadores STR conseguem diferenciar indivíduos de forma bem clara e esse potencial aumenta a medida que o número de *locus* analisados também aumenta, fazendo com que os dados gerados por esses marcadores sejam utilizados em análises forenses (GILMORE *et al.*, 2003; MENDOZA *et al.*, 2009).

## 5. Conclusão

Foi possível a extração, quantificação e amplificação do material genético das amostras de *Cannabis*, mesmo aquelas oriundas de material prensado (98%).

O uso do STR multiplex mostrou-se eficiente para individualização de *Cannabis*. O fato de demonstrar a diferença entre a grande maioria de amostras do ES em relação as poucas plantas apreendidas e também em relação as amostras da Alemanha indicam que a análise STR de *Cannabis* é um bom método para individualização e que é promissor para aplicação forense de combate ao tráfico de drogas após estudos mais aprofundados. Foi possível a diferenciação da amostra 230, mostrando ser essa, de origem diversas das demais amostras do ES e sugerindo sua origem estrangeira.

Os dados alélicos obtidos para os *loci* A305, B05 e H06 sustentam a hipótese de que a região sudeste do Brasil pode estar sendo abastecida por *Cannabis* de origem Paraguaia, visto que foram encontrados alelos nas amostras do ES que estão presentes apenas em plantações do Paraguai.

Estudos a partir da análise de amostras apreendidas pelas polícias (plantas prensadas) dos Estados vizinhos ao Espírito Santo e também de amostras provenientes de plantações, principalmente do Polígono da Maconha (Pernambuco) e Paraguai, devem ser executados para que, a exemplo da Austrália - que desenvolveu um banco de dados baseado em marcadores STR de *Cannabis* - o Brasil também possa criar o seu, o que tornará essa técnica extremamente aplicável a rotina forense permitindo a comparação de uma amostra desconhecida com genótipos do banco de dados, assim como é feito com perfis de DNA humano.

## 6. Referências

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.

BAPTISTA M., *et al.* **Estudo global sobre o mercado ilegal de drogas no Rio de Janeiro.** Rio de Janeiro: NEPAD/CLAVES. 2000.

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

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Introduction to conservation genetics.** 2. ed. New York: Cambridge University Press, 2011. 618p.

GILL, P. *et al.* **DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendations on the interpretation of mixtures.** Forensic Science International, 160: p90–101. 2006.

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, p65–74. 2003.

HOWARD, C.; GILMORE, S.; ROBERTSON, J.; PEAKALL, R. **A *Cannabis sativa* STR genotype database for Australian seizures: forensic applications and limitations.** J. Forensic Sci., vol. 54, No. 3, p556-563. 2009.

HOWARD, C.; GILMORE, S.; ROBERTSON, J.; PEAKALL, R. **Developmental validation of a *Cannabis sativa* multiplex system of forensic analysis.** J. Forensic Sci., vol. 53, No. 5, p1061-1067. 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFICA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Indicadores de Desenvolvimento Sustentável.** Rio de Janeiro, 2012.

IULIANELLI, J. A. S. **O sistema das drogas: estrutura produtiva e usos e costumes.** Disponível em: <<http://www.koinonia.org.br/narco/artigos.htm>>. Acesso em: 22 abr. 2015.

JUNIOR, C. S. D. **O impacto da mortalidade por causas externas e dos homicídios na expectativa de vida: uma análise comparativa entre cinco regiões metropolitanas do Brasil.** In: 2º Congresso Português de Demografia, Lisboa. 2004.

KÖHNEMANN, S.; NEDELE, J.; SCHWOTZER, D.; MORZFELD, J.; PFEIFFER, H. **The validation of a 15 STR multiplex PCR for *Cannabis* species.** Int. J. Legal Med. 126: p601–606, 2012.

LIMA, M. L. C. **A trajetória dos homicídios no Estado de Pernambuco: uma abordagem epidemiológica nas duas últimas décadas do século XX.** 2003. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2003.

MACEDO, M. P. **Investigação sobre origem geográfica de amostras de *Cannabis sativa* por meio de fragmentos de insetos associados à droga prensada: um estudo exploratório.** 2010. 101f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

MATSUURA, S. **Relatório denuncia explosão de tráfico de drogas na web após fim do “Silk Road”.** Rio de Janeiro, 09 fev. 2015. Disponível em: <<http://oglobo.globo.com/sociedade/tecnologia/relatorio-denuncia-explosao-de-traffic-de-drogas-na-web-apos-fim-do-silk-road-15282018>>. Acesso em 22 abr. 2015.

MENDOZA, M. A *et al.* **Genetic individualization of *Cannabis sativa* by a short tandem repeat multiplex system.** Anal. Bioanal. Chem., 393: p719–726. 2009.

MOREIRA, E.M. **A criminalização dos trabalhadores rurais no polígono da maconha.** 2007. Dissertação (Mestrado em Sociologia e Direito) - Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2007.

MOURA NETO, R. S. **Vinculação Geográfica da *Cannabis sativa* através do Perfil de DNA: Ferramenta de Inteligência Policial no Estado do Rio de Janeiro.** Projeto apresentado ao Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2011.

MOURA NETO, R. S. **I Simpósio de Ciências Forenses da UFES.** 2015. Palestra ministrada, Vitória. 2015.

NASCIMENTO, I. R. **Identificação química em nível molecular de amostras de maconha por ESI-FT-ICR MS.** 2014. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2014.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS - ONU. **World Drug Report 2009**. New York, 314f. 2009.

PELIÇÃO, F. S. **Avaliação da presença de drogas de abuso em amostras de sangue colhidas de vítimas fatais de acidente de trânsito na Região Metropolitana de Vitória – ES**. 2014. Tese (Doutorado em Toxicologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2014.

PILUZZA, G.; DELOGO, G.; CABRAS, A.; MARCEDDU, S.; BULLITTA, S. **Differentiation between fiber and drug types of hemp (*Cannabis sativa* L.) from a collection of wild and domesticated accessions**. Genet. Resour. Crop. Evol. 60: p2331–2342, 2013.

PINARKARA, E.; KAYIS, S. A.; HAKKI, E. E.; SAG, A. **RAPD analysis of seizure marijuana (*Cannabis sativa* L.) in Turkey**. Electronic Journal of Biotechnology, vol.12 no.1. 2009.

RIBEIRO, A. S. D. *Et al.* **O gene *rbcl* como barcode para identificação forense de *Cannabis sativa***. Saúde, Ética & Justiça, 18(Ed. Especial): p67-71. 2013.

ROHLF, F.J. **Adaptative hierarquical clustering schemes**. Systematic Zoology, v.19, n.1, p.58-82. 1970.

SHEPHERD, G.J. **FITOPAC 2.1 (versão preliminar)**. Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Estadual de Campinas. 2009.

SHIBUYA, E. K. **Rastreamento da origem geográfica de amostras de maconha apreendidas nas ruas de São Paulo, por meio de assinaturas químicas**. 2005. 155f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

SHIRLEY, N. B. S.; ALLGEIER, L. M. S.; LANIER, T.; COYLE, H. M. **Analysis of NMI01 marker for a population databases of *Cannabis* seeds**. J. Forensic Sci., vol. 58, No. S1. p176-182. 2013.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **The comparison of dendrograms by objective methods**. Taxonomy, 11: p33-40. 1962.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME – UNODC. **World Drug Report 2014**. United Nations publication, Sales No. E.14.XI.7. 2014.

WAISELFISZ, J. J. **Mapa da Violência 2014: os jovens do Brasil**. Flacso Brasil, Rio de Janeiro. 170f. 2014.

WARF, B. **High Points: An Historical Geography of Cannabis**. Geographical Review. New York, 104 (4): p414–438. 2014.

YANG, M. Q., *et al.* **Molecular phylogenetics and character evolution of Cannabaceae**. Taxon 62 (3): 473–485. 2013.

YUAN G., *et al.* **Genetic data provided by 21 autosomal STR loci from Chinese Tujia ethnic group**. Mol. Biol. Rep. 39: p10265-10271. 2012.

## APÊNDICE

Tabela 6. Lista de amostras.

<b>Número da amostra</b>	<b>Município</b>	<b>Laudos</b>	<b>Data</b>
1	AFONSO CLÁUDIO	6736/13	08/07/13
2	AFONSO CLÁUDIO	3675/13	15/04/13
3	AFONSO CLÁUDIO	1525/13	18/02/13
4	AFONSO CLÁUDIO	1454/13	14/02/13
5	AFONSO CLÁUDIO	861/13	28/01/13
6	AFONSO CLÁUDIO	602/13	21/01/13
8	ÁGUIA BRANCA	1922/13	26/02/13
9	ÁGUIA BRANCA	304/13	14/01/13
10	ALEGRE	8863/13	04/09/13
11	ALEGRE	10757/13	17/10/13
12	ALEGRE	3421/13	04/04/13
13	ALFREDO CHAVES	9339/12	29/11/12
15	ALTO RIO NOVO	9624/12	07/12/12
17	ALTO RIO NOVO	7313/12	19/09/12
19	ANCHIETA	2602/13	15/03/13
20	ANCHIETA	2002/13	27/02/13
21	APIACÁ	7212/13	23/07/13
23	ARACRUZ	9282/13	12/09/13
25	ARACRUZ	10216/13	07/10/13
27	ATÍLIO VIVÁCQUA	5198/12	11/07/12
29	BAIXO GUANDU	7154/13	22/07/13
33	BAIXO GUANDU	2936/13	25/03/13
36	BARRA DE SÃO FRANCISCO	4811/13	16/05/13
37	BARRA DE SÃO FRANCISCO	3540/13	09/04/13
40	BOA ESPERANÇA	2659/13	18/03/13
41	BOA ESPERANÇA	2370/13	07/03/13
42	BOM JESUS DO NORTE	7574/13	01/08/13
43	BOM JESUS DO NORTE	7575/13	01/08/13
46	BREJETUBA	3595/12	18/05/12

47	CACHOEIRO DE ITAPEMIRIM	9492/13	12/09/13
49	CACHOEIRO DE ITAPEMIRIM	13/13	02/01/13
50	CARIACICA	6569/13	02/07/13
51	CARIACICA	8932/13	04/09/13
53	CARIACICA	8923/13	04/09/13
54	CARIACICA	1510/13	15/02/13
56	CARIACICA	3325/13	02/04/13
57	CASTELO	9353/13	13/09/13
58	CASTELO	8800/12	08/11/12
59	COLATINA	9921/13	27/09/13
60	COLATINA	6803/13	10/07/13
62	CONCEIÇÃO DA BARRA	8995/13	05/09/13
63	CONCEIÇÃO DA BARRA	6817/13	10/07/13
64	CONCEIÇÃO DA BARRA	3553/13	10/04/13
65	CONCEIÇÃO DA BARRA	3128/13	27/03/13
67	CONCEIÇÃO DA BARRA	8991/13	05/09/13
68	CONCEIÇÃO DO CASTELO	10773/13	17/10/13
69	CONCEIÇÃO DO CASTELO	9836/12	13/12/12
70	DOMINGOS MARTINS	2187/13	04/03/13
72	DORES DO RIO PRETO	8042/12	11/10/12
73	ECOPORANGA	6794/13	10/07/13
75	ECOPORANGA	1414/13	07/02/13
76	ECOPORANGA	2889/13	21/03/13
79	GUAÇUÍ	4562/13	08/05/13
80	GUAÇUÍ	4565/13	08/05/13
82	GUAÇUÍ	2643/13	15/03/13
84	GUAÇUÍ	822/13	25/01/13
86	GUARAPARI	6206/13	24/06/13
87	GUARAPARI	6379/13	27/06/13
88	GUARAPARI	3902/13	19/04/13
89	GUARAPARI	787/13	24/01/13
90	IBATIBA	9070/13	09/09/13
91	IBATIBA	9252/12	28/11/12

<b>93</b>	IBATIBA	7877/12	08/10/12
<b>94</b>	IBATIBA	6258/12	15/08/12
<b>95</b>	IBATIBA	5294/12	13/07/12
<b>96</b>	IBIRAÇU	3178/13	28/03/13
<b>98</b>	IBIRAÇU	527/13	17/01/13
<b>99</b>	ICONHA	6279/13	25/06/13
<b>100</b>	ICONHA	997/13	30/01/13
<b>101</b>	IRUPI	2758/13	19/03/13
<b>102</b>	IRUPI	5988/12	07/08/12
<b>103</b>	IRUPI	6675/12	28/08/12
<b>105</b>	ITAGUAÇU	2893/12	27/04/12
<b>107</b>	ITAPEMIRIM	3931/13	19/04/13
<b>108</b>	ITAPEMIRIM	2125/13	01/03/13
<b>109</b>	ITARANA	2094/13	28/02/13
<b>110</b>	ITARANA	8040/12	11/10/12
<b>111</b>	IUNA	1389/13	06/02/13
<b>112</b>	IUNA	356/13	14/01/13
<b>113</b>	IUNA	360/13	14/01/13
<b>114</b>	JAGUARÉ	8483/13	26/08/13
<b>115</b>	JAGUARÉ	2986/13	25/03/13
<b>116</b>	JERONIMO MONTEIRO	1123/13	01/02/13
<b>117</b>	JERONIMO MONTEIRO	1629/13	20/02/13
<b>119</b>	JOÃO NEIVA	213/13	09/01/13
<b>120</b>	LARANJA DA TERRA	863/13	28/01/13
<b>121</b>	LARANJA DA TERRA	1521/13	18/02/13
<b>124</b>	LINHARES	7109/13	18/07/13
<b>125</b>	LINHARES	4883/13	20/05/13
<b>126</b>	MANTENÓPOLIS	4904/12	29/06/12
<b>127</b>	MANTENÓPOLIS	2913/13	22/03/13
<b>128</b>	MANTENÓPOLIS	2409/13	08/03/13
<b>130</b>	MARATAÍZES	8613/13	28/08/13
<b>131</b>	MARATAÍZES	3488/13	04/04/13
<b>132</b>	MARATAÍZES	1796/13	22/02/13

<b>133</b>	MARECHAL FLORIANO	9144/13	11/09/13
<b>134</b>	MARECHAL FLORIANO	2879/13	21/03/13
<b>135</b>	MARECHAL FLORIANO	6305/12	16/08/12
<b>137</b>	MARILANDIA	2095/13	28/02/13
<b>138</b>	MIMOSO DO SUL	8935/13	05/09/13
<b>139</b>	MIMOSO DO SUL	4914/13	20/05/13
<b>140</b>	MIMOSO DO SUL	4234/13	26/04/13
<b>141</b>	MIMOSO DO SUL	1944/13	26/02/13
<b>143</b>	MONTANHA/MUCURICI/PONTO BELO	1514/13	18/02/13
<b>144</b>	MONTANHA/MUCURICI/PONTO BELO	2654/13	18/03/13
<b>145</b>	MONTANHA/MUCURICI/PONTO BELO	45/13	07/01/13
<b>147</b>	MUNIZ FREIRE	3280/13	02/04/13
<b>148</b>	MUNIZ FREIRE	2233/13	05/03/13
<b>150</b>	MUQUI	9908/12	17/12/12
<b>151</b>	NOVA VENÉCIA	1450/13	14/02/13
<b>153</b>	NOVA VENÉCIA	4268/12	06/06/12
<b>155</b>	PANCAS	3217/13	01/04/13
<b>156</b>	PANCAS	1511/13	18/02/13
<b>158</b>	PANCAS	4280/12	11/06/12
<b>159</b>	PEDRO CANÁRIO	8493/13	26/08/13
<b>160</b>	PEDRO CANÁRIO	001/13	02/01/13
<b>161</b>	PEDRO CANÁRIO	1453/13	14/02/13
<b>163</b>	PINHEIROS	3507/13	05/04/13
<b>166</b>	PIÚMA	1519/13	18/02/13
<b>167</b>	PRESIDENTE KENNEDY	10241/12	27/12/12
<b>170</b>	RIO BANANAL	3628/13	12/04/13
<b>171</b>	RIO BANANAL	2373/13	07/03/13
<b>172</b>	RIO NOVO DO SUL	2412/13	08/03/13
<b>175</b>	SANTA LEOPOLDINA	1086/12	10/02/12
<b>176</b>	SANTA MARIA DE JETIBÁ	9445/13	17/09/13
<b>177</b>	SANTA MARIA DE JETIBÁ	3777/13	16/04/13
<b>179</b>	SANTA TERESA	1810/13	22/02/13
<b>180</b>	SÃO DOMINGOS DO NORTE	10176/12	20/12/12

182	SÃO GABRIEL DA PALHA	3444/13	04/04/13
183	SÃO GABRIEL DA PALHA	3441/13	04/04/13
185	SÃO JOSÉ DO CALÇADO	8864/12	12/11/12
186	SÃO JOSÉ DO CALÇADO	4645/12	20/06/12
188	SÃO MATEUS	8197/13	19/08/13
189	SÃO MATEUS	3948/13	19/04/13
190	SÃO MATEUS	5097/13	24/05/13
191	SÃO ROQUE DO CANAÃ	3599/12	18/05/12
192	SERRA	7722/13	06/08/13
193	SERRA	7921/13	09/08/13
194	SERRA	6262/13	25/06/13
195	SERRA	6882/13	12/07/13
196	SERRA	1925/13	26/02/13
197	SERRA	5934/13	18/06/13
198	SERRA	130/13	08/01/13
200	SOORETAMA	2938/13	25/03/13
202	VARGEM ALTA	1323/13	06/02/13
205	VIANA	6132/13	21/06/13
206	VIANA	2134/13	01/03/13
207	VIANA	2135/13	01/03/13
208	VIANA	1750/13	21/02/13
210	VILA VALÉRIO	1650/13	20/02/13
211	VILA VELHA	7298/13	24/07/13
212	VILA VELHA	9076/13	10/09/13
213	VILA VELHA	10085/13	02/10/13
215	VILA VELHA	9816/13	25/09/13
216	VILA VELHA	7552/13	31/07/13
218	VILA VELHA	2802/13	20/03/13
220	VITÓRIA	9693/13	23/09/13
222	VITÓRIA	9402/13	16/09/13
223	VITÓRIA	8491/13	26/08/13
224	VITÓRIA	6892/13	12/07/13
225	VITÓRIA	5581/13	10/06/13

<b>226</b>	VITÓRIA	3453/13	04/04/13
<b>227</b>	VITÓRIA	6738/13	08/07/13
<b>228</b>	VITÓRIA	4488/13	06/05/13
<b>230</b>	ARACRUZ	12404/13	03/12/13