Marina Marques Eiras

APLICAÇÃO DE TÉCNICA METABOLÔMICA EM ANÁLISES TOXICOLÓGICAS FORENSES DE AMOSTRAS DE *CANNABIS SATIVA L.*

CAMPINAS
2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA CLÍNICA

Marina Marques Eiras

APLICAÇÃO DE TÉCNICA METABOLÔMICA EM ANÁLISES TOXICOLÓGICAS FORENSES DE AMOSTRAS DE *CANNABIS SATIVA L.*

ORIENTADOR: Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas.

CAMPINAS – SP
2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP
Bibliotecária: Rosana Evangelista Poderoso – CRB-8ª / 6652

Ei7/a

Eiras, Marina Marques
Aplicação de técnica metabolômica em análises toxicológicas forenses de amostras de *Cannabis sativa L.* / Marina Marques Eiras. -- Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador : Rodrigo Ramos Catharino
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Metabolômica. 2. Biomarcadores. 3. Toxicologia. 4. Drogas - abuso. I. Catharino, Rodrigo Ramos. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês: Application of metabolomic technique in forensic toxicological analysis of *Cannabis sativa L.* samples

Keywords:
- Metabolomics
- Biomarkers
- Toxicology
- Drugs - abuse

Titulação: Mestrado em Ciências Médicas
Área de Concentração: Ciências Biomédicas

Banca examinadora:

Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino
Prof. Dr. Célia Regina Garlipp
Prof. Dr. Patrícia Verardi Abdelnur

Data da defesa: 10-03-2011

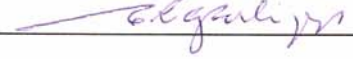
Unidade FCM
T/UNICAMP
Cutter
V. Ed.
Tombo BC
Proc.
C D
Preço
Data
Cód. bit.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Marina Marques Eiras

Orientador(a): Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino

Membros:

1. Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino -
2. Profa. Dra. Patrícia Verardi Abdelnur -
3. Profa. Dra. Célia Regina Garlipp - 

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 10/03/2011

À minha família, Ronaldo, Eliete e Laís, e ao meu noivo, Marcos, pessoas que sempre me amaram, me apoiaram e me incentivaram a aprender mais e mais. AMO VOCÊS!

Agradecimentos

A Deus pelas bênçãos concedidas na minha vida, por esta oportunidade, por estar na universidade que eu sempre sonhei.

Aos meus pais, Ronaldo e Eliete, que nunca mediram esforços para que eu pudesse realizar meus sonhos, meus estudos e vontades.

À minha irmã Laís, minha Lalinha, que do jeitinho único e maravilhoso dela, me apoiou e ajudou na preparação de tantas apresentações e trabalhos.

Ao meu noivo, Marquinhos, pelo apoio e amor incondicionais, por me segurar nos momentos em que eu queria desistir.

Ao meu orientador, professor doutor Rodrigo Ramos Catharino, por sempre ter acreditado em mim, mesmo quando eu mesmo não acreditava, por ter me dado uma oportunidade e por ter me ensinado tantas coisas.

À minha professora e amiga, doutora Sílvia de Oliveira Santos Cazenave, por ter me apresentado ao mundo da toxicologia e possibilitado a realização deste projeto.

À Maria Francesca Riccio e a Mário Benassi Neto pela paciência e tempo gasto em explicações técnicas da melhor qualidade.

A todos do Laboratório ThoMSon de Espectrometria de Massas do IQ-UNICAMP pela ajuda e oportunidade de aprendizado.

À banca examinadora pela leitura e valiosa correção desta tese!

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste projeto!

Aos meus amigos que sempre me apoiaram, oraram e torceram por mim! Todos vocês são muito especiais!

Obrigada!

"Porque o Senhor dá a sabedoria, e da sua boca vem o conhecimento e o entendimento. Ele reserva a verdadeira sabedoria para os retos; escudo é para os que caminham na sinceridade, para que guarde as veredas do juízo e conserve o caminho dos seus santos. Então, entenderás justiça, e juízo, e equidade, e todas as boas veredas. Porquanto a sabedoria entrará no teu coração, e o conhecimento será suave à tua alma."

Provérbios 2: 6-9

RESUMO

A *Cannabis sativa L*. é a droga de abuso ilícita mais consumida e apreendida ao redor do mundo. A identificação de *Cannabis* pode ser alcançada através de diversos métodos, como inspeção visual, cromatografia em camada delgada, cromatografia gasosa e cromatografia líquida, acopladas ou não a espectrometria de massas, entre outros. Entretanto, esses métodos apresentam desvantagens significantes como ambiguidade nos resultados, necessidade de derivatização da amostra, análise relativamente demorada e/ou etapa lenta de preparação da amostra. Neste trabalho, foi desenvolvido um método de *fingerprinting* metabólico através da técnica de ESI-MS para identificação dos principais canabinóides e aditivos em amostras apreendidas de *Cannabis sativa L*., para utilização nos laboratórios de toxicologia forense. Ao fazer a determinação instantânea dos compostos das amostras ou *fingerprinting* metabólico por inserção direta ESI(+)-MS, foi possível observar as diferenças entre os canabinóides e conservantes existentes na *Cannabis*. O resultado é um *fingerprinting* metabólico que tem um grande potencial para ser utilizado como método de *screening* rápido e simples sendo simultaneamente empregado para detectar os canabinóides e conservantes e extrair espectros de diferentes amostras apreendidas em diferentes regiões, além de ser capaz de fazer distinção entre as amostras de uma região e as amostras de outra, o que mostra o potencial da técnica para a certificação de origem geográfica mediante o processo de produção, e possibilidade de ser empregada para outros tipos de drogas de abuso.

ABSTRACT

Cannabis sativa L. is the most used and seized drug worldwide. The identification of *Cannabis* products is achieved by several methods, such as visual inspection, thin layer chromatography, gas chromatography and liquid chromatography coupled or not to mass spectrometry, among others. However, these methods present important disadvantages like ambiguity in the results, the need to sample derivatisation, relatively long analysis or sample preparation. Herein, an ESI-MS metabolic fingerprinting method was tested for the identification of major cannabinoids and additives in seized *Cannabis* samples, to be used in forensic toxicology laboratories. Instantaneous determination of the sample composition via metabolic fingerprinting by direct insertion ESI(+)-MS reveals the differences in cannabinoids and preservatives in *Cannabis* samples. The result is a metabolic fingerprinting that has great potential to be used as a fast and simple screening method detecting cannabinoids and preservatives, being simultaneously applied to detect cannabinoids and preservatives and extracting spectra from different samples seized in different regions, besides being able to distinguish them from each other, which shows the potential of the technique to geographical origin certification by processing markers and the possibility to be applied to other types of drugs of abuse.

LISTA DE ABREVIATURAS

APCI	Ionização química à pressão atmosférica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*)
CBC	Canabicromeno
CBD	Canabidiol
CBDL	Canabinodiol
CBE	Canabielsoin
CBG	Canabigerol
CBL	Canabiciclol
CBN	Canabinol
CBTL	Canabitriol
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
Δ^8-THC	Δ^8- Tetrahidrocanabinol
Δ^9-THC	Δ^9- Tetrahidrocanabinol
ESI	Ionização por Eletrospray (*Electrospray Ionization)*
GC	Cromatografia gasosa (*Gas Chromatography*)
GC-FID	Cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (*Gas Chromatography- Flame Ionization Detector)*
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (*Gas Chromatography- Mass Spectrometry)*
ha	Hectares
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (*High-Performance Liquid Chromatography*)
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (*Liquid Chromatography- Mass Spectrometry*)
LC-MS-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tandem (*Liquid Chromatography- Mass Spectrometry)*

LC-UV	Cromatografia líquida acoplada ao detector ultravioleta (*Liquid Chromatography- Ultraviolet detection*)
LC-TSP-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com Spray Térmico (*Liquid Chromatography- Thermospray Mass Spectrometry*)
MALDI	Ionização e Dessorção a laser assistida por matriz (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*)
MS	Espectrometria de massas (*Mass Spectrometry*)
mt	Metric ton: Unidade de medida baseada no sistema métrico: 1 mt é equivalente a 1000 kg
PC	Componentes Principais (*Principal components*)
PCA	Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis*)
SFC	Cromatografia por fluido supercrítico (*Super Fluid Chromatography*)
SFC-APCI-MS	Cromatografia por fluido supercrítico acoplada à espectrometria de massas com ionização química em pressão atmosférica
TSP	Spray Térmico (*Thermospray*)
UNODC	Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime (*United Nations Office on Drugs and Crime*)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Prevalência global anual do uso de drogas entre a população com idade de 15 – 64 anos.……20

Figura 2: Mapa das áreas climatologicamente adequadas para o cultivo externo de *Cannabis*.……...22

Figura 3: Prevalência anual do uso de *Cannabis* entre a população com idade de 15-64 anos em países selecionados da América do Sul……..24

Figura 4: Uso de *Cannabis* em 2008……26

Figura 5: Apreensões de *Cannabis* (tipo erva) em 2008 (países reportando apreensões de mais de 100 kg)……28

Figura 6: Estrutura química dos principais canabinóides presentes na *Cannabis sativa L*.……30

Figura 7: Ionização por Eletrospray…..……37

Figura 8: Mecanismo de Ionização por Eletrospray no modo positivo…...……37

Figura 9: *Fingerprinting* por ESI-MS dos produtos de *Cannabis* apreendidos em Casa Branca – São Paulo – Brasil……..67

Figura 10: *Fingerprinting* por ESI-MS dos produtos de *Cannabis* apreendidos em Campinas – São Paulo – Brasil…….....……..68

Figura 11: Gráfico com os *scores* do PCA para os dados de ESI(+)-MS dos produtos de *Cannabis* apreendidos em Casa Branca (CasBr) e Campinas (Cps)…..……70

Figura 1 Capítulo 1: ESI-MS fingerprinting of *Cannabis* products seized in Casa Branca – São Paulo – Brazil……..……59

Figura 2 Capítulo 1: ESI-MS fingerprinting of *Cannabis* products seized in Campinas – São Paulo – Brazil……..…….……60

Figura 3 Capítulo 1: PCA scores plot for the ESI(+)-MS data of the *Cannabis* products seized in Casa Branca (CasBr) and Campinas (Cps)…….……61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Capítulo 1: Main polar organic compounds identified via ESI-MS/MS…..63

Tabela 2: Amostras de *Cannabis* apreendidas em Casa Branca…….65

Tabela 3: Amostras de *Cannabis* apreendidas em Campinas……..66

SUMÁRIO

RESUMO ..... **ix**

ABSTRACT ..... **x**

INTRODUÇÃO GERAL **17**

OBJETIVO GERAL **40**

OBJETIVO ESPECÍFICO **42**

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO **44**

CAPÍTULO 1– METABOLIC FINGERPRINTING OF *CANNABIS* PRODUCTS BY ESI-MS: POTENTIAL CERTIFICATION OF GEOGRAPHICAL ORIGIN USING PROCESSING MARKERS **47**

Abstract 49

Introdução 50

Materiais e Métodos 52

Reagentes e amostras 52

Dados de MS 53

Análise quimiométrica 53

Resultados e Discussão 54

Conclusões 56

Referências 57

DISCUSSÃO GERAL **64**

CONCLUSÃO GERAL **71**

PERSPECTIVAS FUTURAS **73**

REFERÊNCIAS DA DISCUSSÃO GERAL **75**

INTRODUÇÃO GERAL

1. Metabolômica

A metabolômica corresponde à análise das moléculas do metaboloma. O metaboloma é o conjunto dos produtos finais resultante da diversidade das atividades enzimáticas integrando as respostas aos estímulos exteriores (mecânicos ou químicos) em um vegetal ou animal (1), ou seja, o conjunto das moléculas de baixo peso molecular geradas pelo metabolismo primário e intermediário.

Uma vez conhecida a composição dos metabólitos através de diferentes técnicas analíticas, poderemos prever, por exemplo, metabólitos resultantes de processos de produção de plantas, avaliar a origem, ou identificar novos biomarcadores existentes nestes organismos (1).

Do ponto de vista analítico, a abordagem do metaboloma para identificação de biomarcadores pode ser sub-dividida em (a) *fingerprinting* metabólico, quando se refere ao perfil de metabólitos intracelulares e (b) *footprinting* metabólico, quando se refere ao perfil de metabólitos extracelulares. Tanto o *fingerprinting* como o *footprinting* podem ser analisados de forma absoluta ou relativa. Inicialmente é realizada a seleção da célula, tecido ou organismo e, em seguida, a preparação da amostra (1). As análises dos metabólitos são realizadas utilizando-se técnicas como a cromatografia com alto poder de separação e/ou técnicas de boa resolução como a ressonância magnética nuclear e a espectrometria de massas para análise final. Após as análises nos equipamentos adequados, existe a necessidade de etapa de tratamento de dados, feita com programas quimiométricos específicos.

2. Uso de drogas: Cenário mundial

De acordo com o relatório mundial sobre drogas, divulgado em 2010, pelo *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNODC), estima-se que entre 155 e 250 milhões de pessoas (3,5% a 5,7% da população com idade entre 15-64 anos) usaram substâncias ilícitas pelo menos uma vez em 2008, no mundo (2). Mas esses números incluem muitos consumidores casuais que podem ter experimentado drogas apenas uma vez durante o ano. Portanto, é importante, também, ter estimativas do número de pessoas que são usuários de drogas constantes ou "problemáticos". Esse grupo consome a maioria das drogas usadas todos os anos; eles são provavelmente dependentes de drogas, se beneficiariam de tratamento e muitos dos impactos na saúde e ordem públicas são provavelmente afetados pelos seus níveis de uso (3).

Baseado nas estimativas globais do número de usuários de *Cannabis sativa L.* (popularmente conhecida como maconha), opióides, cocaína e estimulantes do tipo anfetamina, é estimado que o número de usuários de drogas problemáticos no mundo, em 2008, foi entre 16 e 38 milhões. Isso representa 10% a 15% de todas as pessoas que utilizaram drogas naquele ano. A falta de dados ainda limita o entendimento do problema de uso de drogas em muitos países, principalmente na África, algumas partes da Ásia e Ilhas do Pacífico, e a faixa abrangente das estimativas reflete as incertezas dos dados globais disponíveis (2).

A *Cannabis* continua sendo a droga mais amplamente consumida mundialmente. A prevalência global anual de uso de *Cannabis* é estimada entre 2,9% e 4,3% da população com idade entre 15 - 64 anos. A maior

prevalência é na Oceania (9,3% a 14,8%), seguida pelas Américas (6,3% a 6,6%). Há um número estimado de 15 a 19,3 milhões de usuários anuais de cocaína (prevalência anual de 0,3% a 0,4%) no mundo. A América do Norte (2%), a Oceania (1,4% a 1,7%) e o Oeste Europeu (1,5%) são as regiões com as taxas de prevalência mais altas. Entre 12,8 e 21,8 milhões de pessoas (0,3% a 0,5% da população mundial com idade entre 15 - 64 anos) usaram opióides m 2008. Mais da metade dos usuários mundiais de opióides estão na Ásia. A UNODC estima que entre 13,7 e 52,9 milhões de pessoas com idade entre 15 e 64 anos usaram substâncias do tipo anfetamina no ano passado (0,3% a 1,2% da população), incluindo 10,5 a 25,8 milhões de usuários de ecstasy (0,2% a 0,6% da população). A Oceania, o leste e sudeste da Ásia, América do Norte e Europa Central e Oeste são as regiões com as taxas mais altas de prevalência de uso de estimulantes do tipo anfetamina (2).

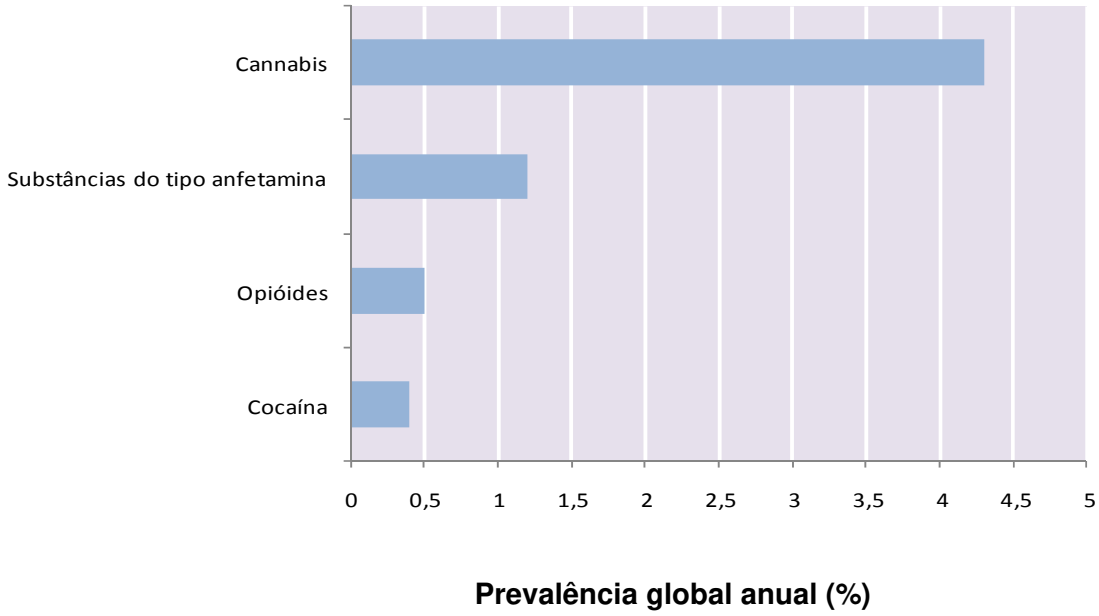


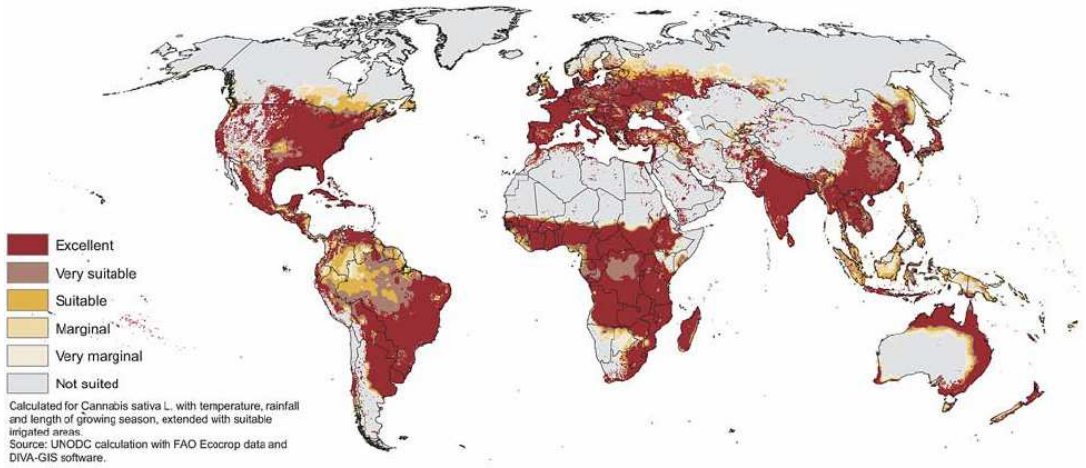
Figura 1. Prevalência global anual do uso de drogas entre a população com idade de 15 – 64 anos.

Além das drogas mencionadas acima, o abuso de drogas prescritas, como opióides sintéticos, benzodiazepínicos ou estimulantes sintéticos prescritos, é um problema de saúde crescente em diversos países desenvolvidos e em desenvolvimento (2).

3. Cannabis sativa L.: Produção, Consumo e Apreensões

3.1. *Cannabis sativa L.*: Produção

O mercado de *Cannabis sativa L.* é o maior mercado de droga ilícita em termos de expansão global de cultivo, volume de produção e número de consumidores. Infelizmente, o domínio da *Cannabis* no mercado de drogas não é refletido na disponibilidade de dados confiáveis. A informação disponível sobre o cultivo e produção de *Cannabis* é fragmentada, não-padronizada e nem sempre baseada em pesquisas científicas. Isso complica a estimativa da produção global total. O mapa abaixo (Figura 2) mostra que praticamente todos os países do mundo têm áreas apropriadas para cultivo externo de *Cannabis*. As áreas reais são ainda mais extensas devido a cruzamentos genéticos que geram variedades que têm adaptabilidade climática mais ampla, os quais não foram levados em consideração nesse mapa. Com a possibilidade de cultivar *Cannabis indoor*, a área potencial pode ser estendida para todas as áreas com acesso a água e eletricidade (3).



Fonte: UNODC, World Drug Report 2010.

Figura 2. Mapa das áreas climatologicamente adequadas para o cultivo externo de *Cannabis*.

Diversos estudos indicaram uma tendência aumentada de cultivo *indoor* de *Cannabis*, além do cultivo *outdoor*. O cultivo *indoor* tem a vantagem de ter chances menores de apreensão, altos rendimentos com diversas colheitas por ano (as condições controladas permitem, geralmente, mais de 6 colheitas por ano) com *Cannabis* de alta potência (as condições controladas, geralmente, crescimento hidropônico, dão uma potência maior ao produto) e preços de venda elevados. Baseado em relatórios governamentais e literatura científica, a UNODC achou evidências de cultivo *indoor* para propósitos comerciais em 29 países, concentradas em zonas temperadas do mundo: América do Norte, Europa (oeste, norte e centro) e Oceania (2).

A UNODC estima que entre 200.000 - 641.800 ha foram usados para cultivo externo de *Cannabis* em 2008. Há altos níveis de incerteza na estimativa de cultivo, já que a *Cannabis* pode ser cultivada - *indoor* e *outdoor*- na maioria dos países do mundo. Por isso, não é possível produzir dados mais

precisos, assim como são produzidos para opióides e cocaína. A produção total de *Cannabis* na forma de erva é estimada na faixa de 13.000 - 66.100 mt (mt: 1 *metric ton*, é uma unidade de medida baseada no sistema métrico e é equivalente a 1000 kg) e para *Cannabis* na forma de resina, a produção é estimada na faixa de 2.200 - 9.900 mt. Essas estimativas mostram a magnitude do problema relacionado ao cultivo e produção de *Cannabis* ilícita (2,3).

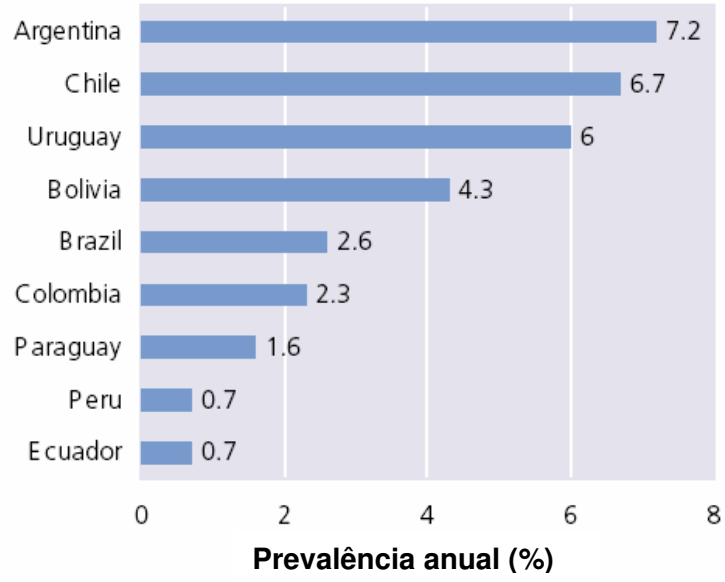
3.2. *Cannabis sativa L.*: Consumo

A *Cannabis* permanece a substância ilícita mais amplamente usada no mundo. Mundialmente, o número de pessoas que usaram *Cannabis* pelo menos uma vez em 2008 é estimado entre 129 e 191 milhões, ou 2,9% a 4,3% da população mundial com idade entre 15 e 64 anos, como mencionado anteriormente (2).

Na América do Norte, o uso de *Cannabis* tem declinado ou estabilizado (dependendo da região) nos últimos anos. Há um número estimado de 29,5 milhões de pessoas que usaram *Cannabis* pelo menos uma vez em 2008, uma diminuição em relação aos 31,2 milhões estimados em 2007. Apesar de um grande declínio desde 2002, a *Cannabis* permanece a droga ilícita mais comumente usada entre os usuários de drogas dos Estados Unidos. Em 2008, a *Cannabis* foi usada por 75,7% dos usuários de drogas ilícitas e foi a única droga usada por 57,3% deles. A prevalência anual entre a população com 15 anos ou mais no Canadá também diminuiu significativamente, de 14,1% em 2004 para 11,4% em 2008. No México, a prevalência anual do uso de *Cannabis* entre a população geral aumentou de 0,6% (dados da pesquisa

anterior, em 2002) para 1%. Apesar do aumento recente, o papel do México como um importante fornecedor de *Cannabis* para o mercado dos Estados Unidos, os resultados das pesquisas familiares continuam a mostrar uma taxa de prevalência consideravelmente mais baixa para o México do que para o Canadá e Estados Unidos (2).

Ao contrário da América do Norte, foi reportado um aumento no uso de *Cannabis* na América do Sul, apesar deste permanecer consideravelmente inferior ao uso na América do Norte. Cerca de 3%, ou uma estimativa de 7,3 – 7,5 milhões de pessoas da população com idade entre 15 e 64 anos, usaram *Cannabis* pelo menos uma vez em 2008. A prevalência mais alta de uso desta droga é encontrada na Argentina (7,2%), seguida pelo Chile (6,7%) e Uruguai (6%). O Brasil se encontra no 5º lugar, entre os países da América do Sul, no que diz respeito à prevalência anual do uso de *Cannabis* (2,6%) entre a população com 15 - 64 anos (Figura 3) (2).



Fonte: UNODC, World Drug Report 2010.

Figura 3. Prevalência anual do uso de *Cannabis* entre a população com idade de 15 - 64 anos em países selecionados da América do Sul (2).

Na África, ainda faltam informações quantitativas, mas se tem notado que o uso de *Cannabis* está aumentando na maior parte do continente. De acordo com as informações disponíveis, entre 27,7 e 52,8 milhões de pessoas, ou de 5,0% a 9,6% da população com idade entre 15 e 64 anos, fizeram uso de *Cannabis* na África, em 2008 (2).

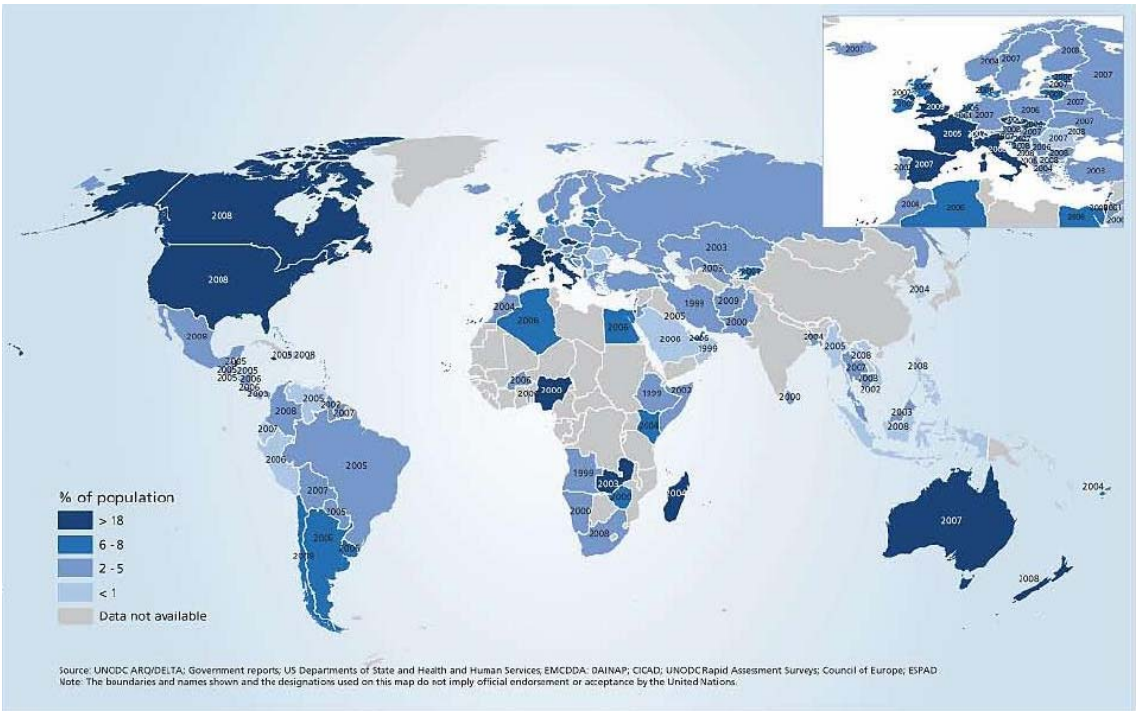
Na Europa, um número estimado de 29,5 milhões de pessoas, ou aproximadamente 5,4% da população com idade entre 15 e 64 anos, fizeram uso de *Cannabis* no ano de 2008. Dentro da Europa, o uso de *Cannabis* difere consideravelmente entre a população geral, com prevalência maior reportada na Europa Oeste e Central (7,7%), do que no Leste e Sudeste Europeu (3%). República Tcheca (15,2% - 2008), Itália (14,6% - 2008) e Espanha (10,1% - 2007) são os três países com as maiores taxas de prevalência de uso de *Cannabis*, sendo responsáveis por um terço de todos os usuários desta droga na Europa (sendo 5 milhões apenas na Itália) (2).

Na região da Oceania, estima-se que entre 2,1 e 3,4 milhões de pessoas (9,3% - 14,8% da população com idade entre 15 - 64 anos) usaram *Cannabis* em 2008. Na Austrália, a prevalência anual do uso desta droga vem declinando desde 1998, com um declínio de quase 1/5 (20%) entre 2004 e 2007. Na Nova Zelândia, a prevalência anual do uso de *Cannabis* caiu de 20,4% em 2003 para 13,3% em 2006, porém aumentou em 2008 para 14,6% (2).

Não há dados recentes ou completos disponíveis na Ásia, no que diz respeito às tendências de uso de *Cannabis.* É estimado que entre 31,5 a 64,6 milhões de pessoas usaram esta droga em 2008. Os países mais populosos da Ásia, China e Índia, não tem estimativas de usuários de *Cannabis* entre a

população geral. No entanto, as autoridades nacionais que se reportam a UNODC indicam um aumento no uso de *Cannabis* naquela região no ano de 2008 (2).

Portanto, pode-se perceber que o uso de *Cannabis* está amplamente difundido no mundo (Figura 4), o que faz dessa droga um objeto de estudo muito importante atualmente.



Fonte: UNODC, World Drug Report 2010.

Figura 4. Uso de *Cannabis* em 2008 (2).

3.3. *Cannabis sativa L.*: Apreensões

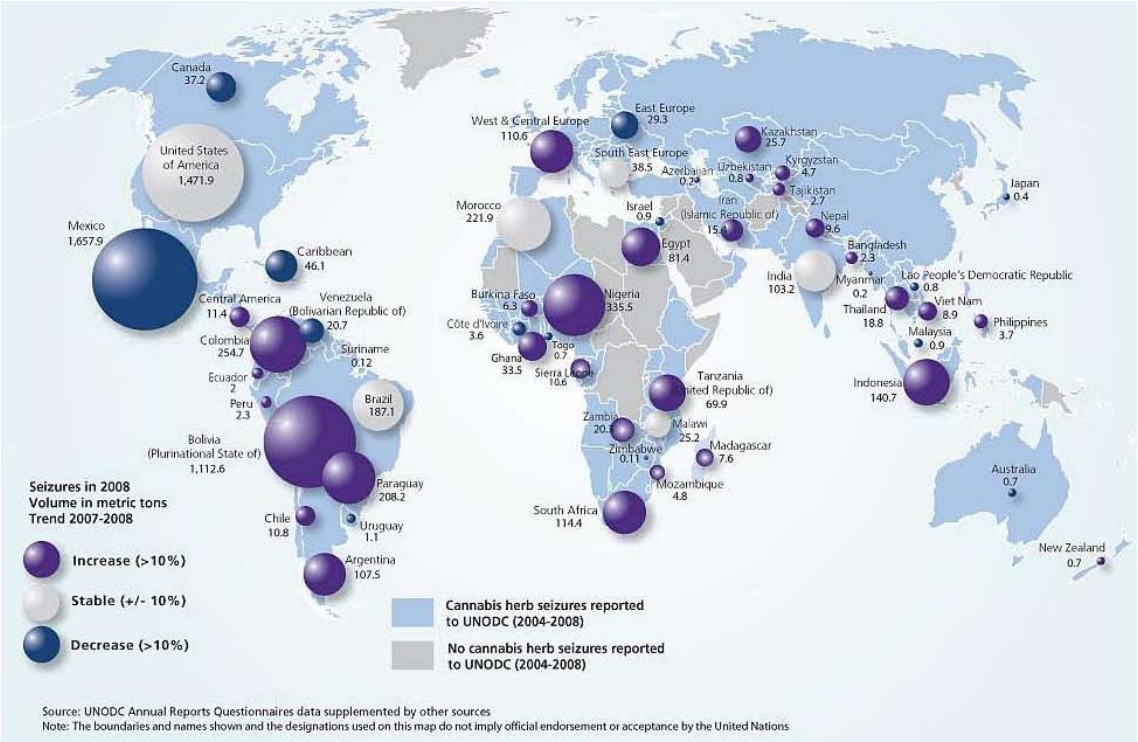
O tráfico de produtos da *Cannabis* (erva, resina e óleo) continua a afetar a maioria dos países ao redor do mundo. Dos 147 países e territórios para os quais a UNODC coletou dados de apreensões de drogas em 2008, 137 apreenderam pelo menos um dos derivados de *Cannabis*: 129 fizeram

apreensões de *Cannabis* do tipo erva, 92 de resina de *Cannabis*, e 126 de óleo de *Cannabis*. Baseado nos dados de 2003-2008, aproximadamente metade dos casos de apreensão relacionados a todas as drogas ilícitas ao redor do mundo envolveram *Cannabis* do tipo erva, resina ou óleo (2).

As Américas são as regiões com a maior parte das apreensões globais, seguidas pela África. Porém, aumentos significativos foram registrados na América do Sul, África, Ásia e Europa. De 2001 em diante, as maiores e segundas maiores apreensões nacionais anuais de *Cannabis* (tipo erva) ao redor do mundo foram reportadas pelo México e pelos Estados Unidos, respectivamente. No México, após dois anos consecutivos de aumentos, as apreensões de *Cannabis* do tipo erva caíram para quase ¼ (25%), chegando a 1658 mt em 2008, o nível mais baixo desde 2002. Esta queda foi compensada por um aumento significativo na América do Sul, principalmente, devido à contribuição da Bolívia (2).

A África foi responsável por 14% das apreensões globais em 2008, com o total de apreensões nesta região subindo para 936 mt em 2008, mais de 1/3 do número de apreensões de 2007. As apreensões de *Cannabis* (tipo erva) aumentaram acentuadamente na Ásia, de 209 mt em 2007 para 340 mt em 2008, devido principalmente a apreensões extraordinariamente grandes reportadas pela Indonésia (141 mt). Um aumento menos pronunciado também foi registrado na Europa, onde as apreensões aumentaram de 144 mt em 2007 para 178 mt em 2008. A Holanda registrou um aumento notável com apreensões aumentando para 42,4 mt em 2008, o maior nível desde 2002. A figura abaixo (Figura 5) mostra o cenário mundial em termos de apreensões de

Cannabis (tipo erva) no ano de 2008, o que nos possibilita visualizar o consumo desta droga no cenário mundial (2).



Fonte: UNODC, World Drug Report 2010.

Figura 5. Apreensões de *Cannabis* tipo erva em 2008 (países reportando apreensões de mais de 100 kg) (2).

4. *Cannabis sativa L.*: Aspectos químicos

Centenas de diferentes compostos já foram isolados da *Cannabis*, incluindo óleos essenciais baseados em terpenos, flavonóides, açúcares, ácidos graxos, espiro-indano fenólicos, dihidroestilbenos e compostos nitrogenados. No entanto, os constituintes mais interessantes são os canabinóides, encontrados nas folhas e concentrados nas brácteas (folhas que cobrem a flor antes de se abrir) e na resina. Os canabinóides são

terpenofenóis, classificados em diversos grupos de acordo com sua estrutura (4). Já foram identificados 70 fitocanabinóides pertencentes a diferentes tipos ou subgrupos: Tetrahidrocanabinol (Δ^9-THC, Δ^8-THC), canabinol (CBN), canabidiol (CBD), canabigerol (CBG), canabicromeno (CBC), canabiciclol (CBL), canabielsoin (CBE), canabinodiol (CBDL) e canabitriol (CBTL) (5).

Dentre todos os fitocanabinóides contidos na *Cannabis sativa L.*, o Δ^9-THC é, reconhecidamente, o principal composto químico com efeito psicoativo. Foi isolado em 1964, apesar da *Cannabis* ser conhecida há quase 5000 anos. Na planta madura, as maiores concentrações de Δ^9-THC localizam-se nas inflorescências, com valores decrescentes nas folhas e somente traços presentes no caule e ramos. As condições ambientais como clima, temperatura, índice pluviométrico, natureza do solo, métodos de cultivo e conservação, influenciam no teor de Δ^9-THC, condicionando sua psicoatividade (5). Além do Δ^9-THC, os principais canabinóides que têm efeitos farmacológicos em humanos incluem (Figura 6) (4):

- Δ^8-THC, que apresenta menor efeito psicoativo em relação ao Δ^9-THC;

- Canabidiol (CBD);

- Canabinol (CBN), que não apresenta efeito psicoativo, mas pode ter efeito antiinflamatório;

- Ácido Δ^8-THC e ácido Δ^9-THC, sendo o último inativo, a não ser que seja aquecido e, portanto, convertido em Δ^9-THC;

- Canabigerol (CBG), não é psicoativo, mas pode apresentar efeito bacteriológico;

- Canabicromeno (CBC), canabiciclol (CBL) e seus ácidos (4).

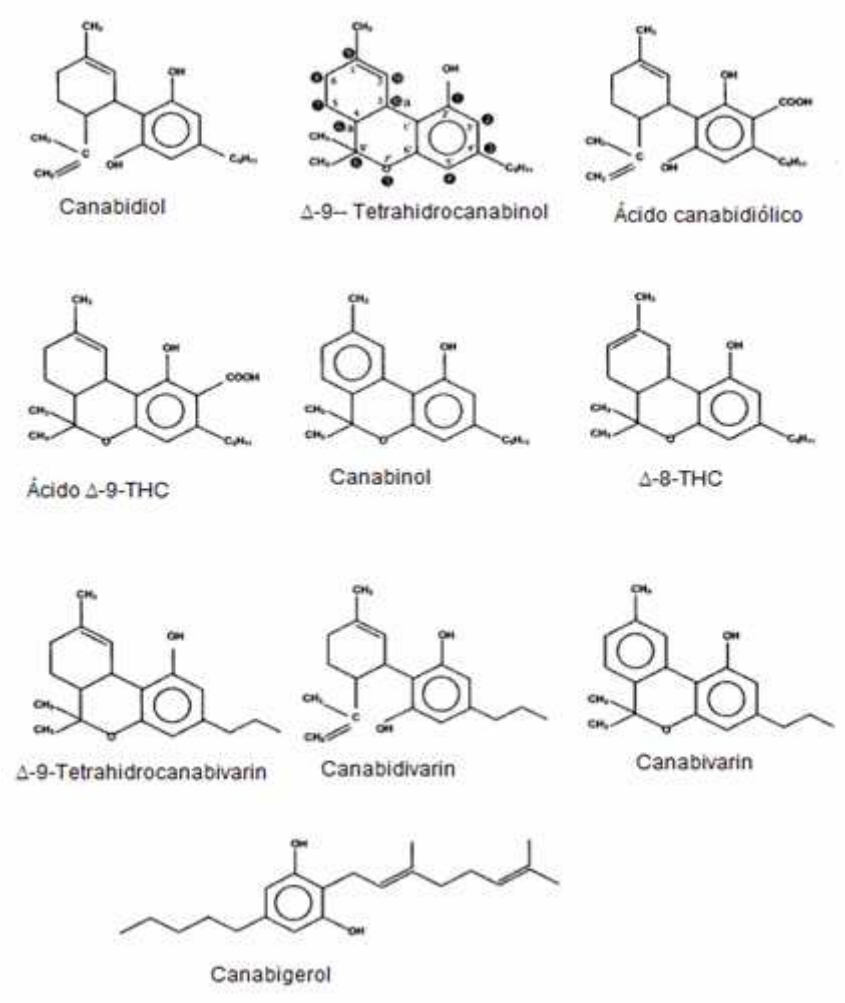


Figura 6. Estrutura química dos principais canabinóides presentes na *Cannabis sativa L.*

As preparações obtidas da *Cannabis* são várias (erva, resina, óleo, Skank, haxixe, etc) e recebem diferentes nomes conforme a parte da planta utilizada e o modo como são preparadas. Portanto, o teor de Δ^9-THC varia bastante (5).

5. *Cannabis sativa L.*: Métodos de análise

As amostras de *Cannabis* submetidas ao laboratório podem se apresentar em uma das três seguintes formas: resina, óleo e, mais comumente no Brasil, na forma de erva. A identificação de *Cannabis* na forma de ervas pode ser alcançada através de inspeção visual. Extratos etanólicos da erva, resina ou óleo podem ser sujeitos à cromatografia em camada delgada (TLC) para *screening* rápido e com propósitos de comparação (6). Apesar da investigação microscópica e da cromatografia em camada delgada com reagentes de visualização serem, frequentemente, consideradas suficientes para análises de rotinas dos constituintes da *Cannabis* (canabinóides) em diversos laboratórios de toxicologia forense, outros métodos instrumentais vêm sendo desenvolvidos para fornecer testes mais sensíveis e específicos.

Métodos utilizando a técnica de cromatografia gasosa - espectrometria de massas (GC-MS) são os mais utilizados em toxicologia analítica, mas a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas *single-stage* (LC-MS) e/ou tandem (LC-MS-MS) tem se tornado cada vez mais importante em análises de rotina (7).

Os diversos métodos mencionados para a análise de amostras de *Cannabis sativa L.,* como testes presuntivos (microscópio óptico e/ou o teste colorimétrico de Duquenois-Levine), cromatografia em camada delgada (TLC) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), são insuficientes para a identificação sem ambiguidade da droga, quando aplicados isoladamente. Enquanto a técnica de GC-MS oferece identificação definitiva, ela tem a desvantagem de ser uma análise demorada (aproximadamente 35

minutos de corrida) e de ser necessária a derivatização da amostra anteriormente à análise (8).

Outro método empregado para análise das amostras apreendidas de *Cannabis sativa L.* pode ser estabelecido usando a cromatografia líquida de alta eficiência (*HPLC*), onde as proporções quantitativas dos analitos principais (canabidiol, Δ^9-THC e canabinol) são todas significativas. Entretanto, o *HPLC* acoplado a um detector de fluorescência ou espectrofotométrico não oferece identificação definitiva da droga, requer um longo tempo de análise (8, 9) e tem uma coluna analítica de vida curta.

A cromatografia por fluido supercrítico (SFC) oferece uma técnica analítica de alta resolução e rapidez devido às propriedades dos fluidos supercríticos (10). Acoplada ao detector ultravioleta e ao espectrômetro de massas contendo uma fonte de ionização química à pressão atmosférica (APCI), a técnica oferece identificação definitiva dos analitos (11, 12, 13). O método de cromatografia por fluido supercrítico acoplado à espectrometria de massas com ionização química à pressão atmosférica (SFC-APCI-MS) é uma técnica rápida e definitiva para a análise de amostras de *Cannabis*. É mais rápido que GC-MS e não necessita de derivatização da amostra, reduzindo o risco de contaminação da mesma, além de ser mais rápido que a análise por HPLC, permitindo a análise de mais amostras por unidade de tempo (14).

Outro trabalho descrito em literatura otimizou um procedimento simples e rápido para a determinação dos três principais canabinóides (Δ^9-THC, canabidiol e canabinol) em preparações de *Cannabis* usando cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (GC-FID). Usando este método, o conteúdo dos canabinóides de 55 produtos de *Cannabis* apreendidos em São

Paulo no período de 2006 a 2007 foi identificado e mensurado. Esta foi a primeira demonstração dos canabinóides presentes em produtos de *Cannabis* consumidos na América Latina (15).

Outro método desenvolvido para análise *on-line* de resinas da *Cannabis sativa L.* foi a Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com uma interface de spray térmico (LC-TSP-MS: *Liquid Chromatography-Thermospray Mass Spectrometry*). A combinação do HPLC com MS usando uma interface *thermospray* (TSP) apresenta boas vantagens sobre outros métodos: os canabinóides, inclusive ácidos carboxílicos termolábeis podem ser detectados sem derivatização. Este método desenvolvido provou ser rápido, específico, sensível e não requerer uma extensa preparação de amostra. Comparado com GC e LC-UV, quantidades pequenas de amostra podem sem analisadas por LC-MS devido ao baixo limite de detecção. O uso de novas interfaces como eletrospray (ESI) ou outras técnicas de ionização à pressão atmosférica podem aperfeiçoar substancialmente a identificação e quantificação desses analitos (16). No entanto, é um método que ainda necessita de preparação de amostra, o que representa custos e tempo maior de análise.

6. Identificação da origem de produtos de *Cannabis sativa L.* apreendidos

As agências policiais responsáveis por todas as ações políticas e analíticas envolvendo drogas são extremamente interessadas nas rotas de tráfico tanto do fornecimento doméstico de maconha como o proveniente do exterior. Desde fontes confidenciais a satélites, estas agências empregam uma

multidão de métodos para acoplar inteligência a recursos diretos, operações de controle de plantas e desenvolvimento de políticas. Uma maneira de determinar a origem da maconha apreendida é usar um sistema de impressão digital (*fingerprinting*) química, um método que se mostrou promissor como uma ferramenta inteligente eficaz para apurar origem geográfica de amostras de *Cannabis* confiscadas (17).

Dos diversos fatores que afetam os constituintes químicos da maconha, é visível que os fatores ambientais consistentemente induzem perfis únicos para cada ambiente. Um “ambiente de origem”, amplo como um continente ou pequeno como um jardim interior, pode ser diferenciado baseado na impressão química digital ou “assinatura” da maconha ali cultivada, se um número estatístico significativo de amostras cultivadas naquele ambiente estiver disponível para comparação. Entretanto, como todos os ambientes não são únicos, a impressão química digital da *Cannabis* não é considerada a última ferramenta para aplicações forenses, apesar da técnica dar suporte efetivamente a outros tipos de evidências e ser certamente de valor interessante para operações de inteligência (17).

Há mais de 35 anos, diversos pesquisadores vêm examinando os compostos químicos únicos na planta de *Cannabis* e reportando que os canabinóides são indicativos do país de origem e que os fatores ambientais afetam os perfis de canabinóides. Durante os anos de 1970, um grande número de publicações que usavam técnicas de cromatografia gasosa (GC), cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para comparar concentrações de canabinóides de maconha cultivada em diversas regiões do mundo foram feitas. Nos anos de 1980 e

1990, essas tecnologias tiveram um grande avanço e os pesquisadores continuaram a alcançar conclusões similares (17).

A maconha de diferentes regiões geográficas também tem sido comparada usando outras técnicas analíticas, incluindo análise elementar, análise por cromatografia gasosa de voláteis em *headspace*, análise de açúcares livres nas plantas, exame microscópico do pólen e até mesmo comparação de espécies de insetos encontrados nos materiais confiscados. Próximo ao século 21, as tecnologias avançaram ainda mais e os cientistas voltaram suas atenções à análise genética da maconha e desenvolveram técnicas muito adequadas para propósitos forenses (17). No entanto, o teste de DNA pode ser caro, longo e refletir apenas uma linhagem da planta, e não o ambiente no qual ela foi cultivada.

Foi relatado o uso de outras técnicas para delinear o perfil cromatográfico da *Cannabis* de forma muito limitada (9, 17), já que o interesse em um sistema de impressão química digital ainda continua. Por exemplo, em um relatório do Gabinete Federal Suíço de Saúde Pública em 2004, foi concluído que um sistema de impressão digital poderia efetivamente determinar a origem da maconha encontrada na Suíça (17).

7. Espectrometria de Massas e Metabolômica

A metabolômica utiliza a espectrometria de massas (MS) como uma das inúmeras alternativas analíticas para identificar as propriedades químicas e estruturais das moléculas (1). A espectrometria de massas na detecção de compostos pode ser realizada em amostras com quantidades tão pequenas

como 10^{-15} g para um composto de massa de 1000 Dalton. Isto significa que os compostos podem ser identificados em concentrações muito baixas (uma parte em 10^{12}) em misturas quimicamente complexas (18).

Os princípios científicos em que a MS se baseia são simples. A essência da técnica envolve a geração de íons que são depois detectados, como *m/z* (relação massa – carga). A sofisticação surge nos métodos que são usados para a geração desses mesmos íons e no modo de analisá-los (18). Uma das técnicas de ionização com maior aplicação em metabolômica é a ionização por eletrospray (ESI) (1).

No processo de ESI os íons são formados em solução, e não na fase gasosa, eliminando-se então os problemas de volatização de substâncias termolábeis e macromoléculas. A Figura 7 mostra uma representação do processo de ionização por ESI, e a Figura 8 descreve o mecanismo de ionização com a transferência dos íons positivos das gotas do *spray* para a fase gasosa. A solução pode conter íons resultantes da dissolução de sais, ou íons formados por protonação ou desprotonação (ou complexação com cátions) de substâncias ácidas ou básicas com ampla faixa de pesos moleculares. Em ESI(+)-MS, a solução é então submetida a um *spray* eletrolítico que deixa as gotas produzidas no *spray* com excesso de íons positivos. ESI(-)-MS, alternativamente, deixa as gotas produzidas no *spray* com excesso de íons negativos (ESI negativo). Através de contra-corrente de nitrogênio aquecido, evapora-se o solvente e reduz-se o volume das gotas. Ocorre então repulsão crescente entre íons de mesma carga, com possível subdivisão das gotas, e estes íons são eventualmente transferidos para a fase gasosa em um processo brando e eficaz. A partir desta etapa, os processos

normais de análise operam na seleção e detecção de íons na fase gasosa por MS (18).

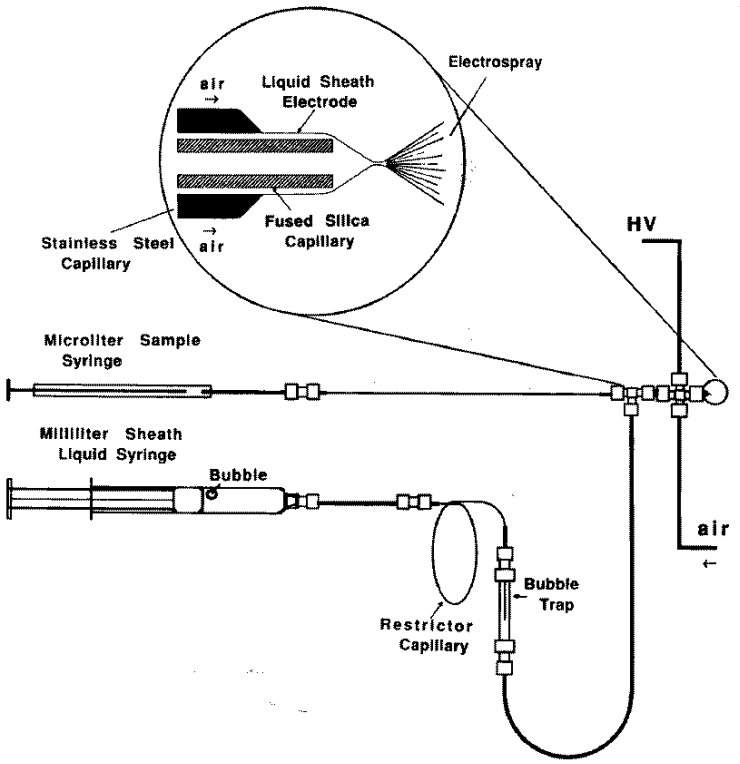


Figura 7. Ionização por Eletrospray.

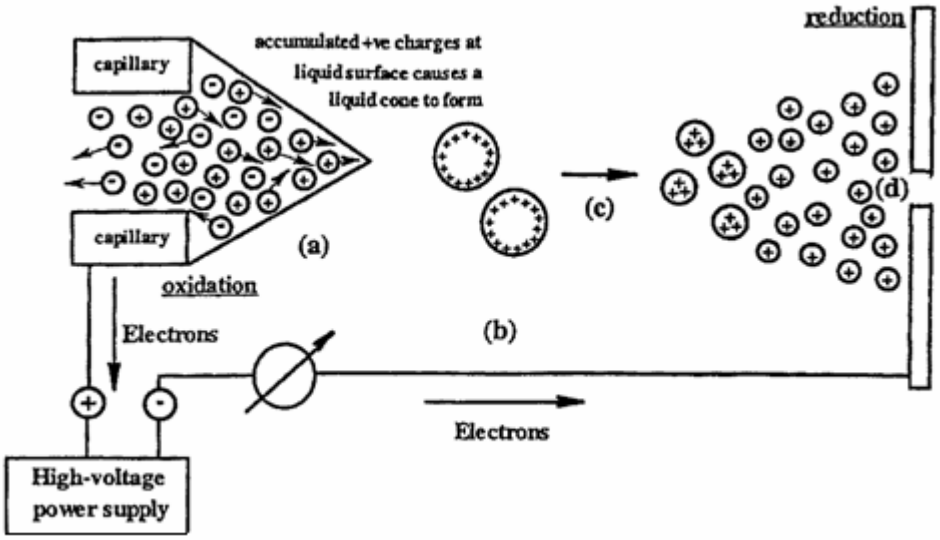


Figura 8. Mecanismo de Ionização por Eletrospray no modo positivo.

O enorme sucesso da técnica de ESI-MS deve-se às possibilidades de elucidação de vários compostos ao mesmo tempo, além de sua aplicação em compostos com baixa massa molecular, sendo umas das técnicas mais utilizadas na plataforma metabolômica, por sua vez sendo aplicada no *fingerprinting* metabólico de várias matrizes complexas (1, 18).

8. Processamento de Dados em Metabolômica

O objetivo do processamento de dados é mostrar, com a maior clareza possível, as principais diferenças observadas nos níveis dos metabólitos presentes nas amostras a serem comparadas entre si, para descoberta de biomarcadores (19). Com freqüência, os resultados de níveis ou perfis metabólicos são apresentados em gráficos de barras, o que muitas vezes é bastante confuso, tornando-se inviável à medida que aumenta o número de metabólitos detectados e o número de variáveis a serem comparadas. Desta forma, diversos *softwares* estão disponíveis no mercado e na internet, muitos deles gratuitos, que permitem realizar tratamentos de dados multivariados, ou seja, dados gerados a partir de uma multiplicidade de amostras que representam uma multiplicidade de variáveis.

Não há um único ou melhor método para se tratar dados multivariados. O método mais utilizado como ferramenta quimiométrica em metabolômica é a "Análise dos Componentes Principais" (*Principal Component Analysis* ou PCA). A análise do PCA é normalmente utilizada para o processamento de informações que envolvam muitos dados, como é o caso da metabolômica. Os dados são processados a partir da matriz que pode ser composta pela relação

massa-carga (*m/z*) do íon e a sua respectiva intensidade em ordem de significância, podendo ser agrupados os dados ou diferenciados, auxiliando na escolha dos melhores biomarcadores (20).

OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de metodologia baseada em *fingerprinting* metabólico, através da técnica de ESI-MS, para a identificação dos principais canabinóides e aditivos em amostras apreendidas de *Cannabis sativa L.*, para posterior utilização nos laboratórios de toxicologia forense.

OBJETIVO ESPECÍFICO

Caracterização de compostos químicos existentes nas amostras de *Cannabis sativa L.* apreendidas e encaminhadas ao Instituto de Criminalística de Campinas por ESI-MS. Aplicação do *fingerprinting* metabólico para identificação da origem das amostras através dos compostos químicos (canabinóides ou outros marcadores) encontrados nas amostras de *Cannabis* apreendidas em diferentes regiões da região metropolitana de Campinas. Disponibilizar, ao fim, um *screening* rápido e eficiente para as agências governamentais responsáveis pelas políticas públicas que envolvem o tráfico e consumo de drogas.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

(1) Kaddurah-Daouk R, Kristal BS, Weinshilboum RM. Metabolomics: A Global Biochemical Approach to Drug Response and Disease. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2008 February; 48: 653-83.

(2) United Nations Office on Drugs and Crime. World Drug Report 2010. Vienna: UNODC; 2010.

(3) United Nations Office on Drugs and Crime. World Drug Report 2009. Vienna: UNODC; 2009.

(4) Stambouli H, El Bouri A, Bellimam MA, Bouayoun T, El Karni N. Cultivation of Cannabis sativa L. in Northern Morocco. Bull Narc. 2005; LVII (1 and 2): 79-118.

(5) Moreau RLM. *Cannabis*. In: Oga S, Camargo MMA, Batistuzzo JAO. Fundamentos de Toxicologia. 3ª edição. São Paulo: Atheneu; 2008: 435-45.

(6) Rendle DF. Advances in chemistry applied to forensic science. Chem Soc Rev. 2005 October; 34: 1021-30.

(7) Maurer HH. Advances in analytical toxicology: the current role of liquid chromatography–mass spectrometry in drug quantification in blood and oral fluid. Anal Bioanal Chem. 2005; 381: 110-8.

(8) Gillan R, Cole MD, Linacre A, Thorpe JW, Watson ND. Comparison of *Cannabis sativa* by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and HPLC of cannabinoids: a preliminary study. Sci Justice. 1995 July; 35 (3): 169-77.

(9) Lehmann T, Brenneisen R. High performance liquid chromatographic profiling of Cannabis products. J Liq Chromatogr Relat Technol. 1995; 18 (4): 689-700.

(10) Bevan CD, Marshall PS. The use of supercritical fluids in the isolation of natural products. Nat Prod Rep. 1994; 11: 451-66.

(11) Olesik SV. Recent advances in supercritical fluid chromatography/mass spectrometry. J High Resolut Chromatogr. 1991 January; 14 (1): 5-9.

(12) Huang E, Henion J, Covey TR. Packed-column supercritical fluid chromatography-mass spectrometry and supercritical fluid chromatography-tandem mass spectrometry with ionization at atmospheric pressure. J Chromatogr A. 1990; 511: 257-70.

(13) Tyrefors LN, Moulder RX. and Markides KE. Interface for open tubular column supercritical fluid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. Anal Chem. 1993 October; 65(20): 2835-40.

(14) Bäckström B, Cole MD, Carrott MJ, Jones DC, Davidson G, Coleman K. A preliminary study of the analysis of Cannabis by supercritical fluid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization mass spectroscopic detection. Sci Justice. 1997 April; 37(2): 91-7.

(15) Oliveira GL, Voloch MH, Sztulman GB, Neto ON, Yonamine M. Cannabinoid contents in cannabis products seized in São Paulo, Brazil, 2006–2007. Forensic Toxicol. 2008 June; 26(1): 31-5.

(16) Ndjoko K, Wolfender J-L, Hostettmann K. Analysis of cannabinoids by liquid chromatography-thermospray mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Chromatographia. 1998 January; 47(1/2): 72-6.

(17) ElSohly MA, Stanford DF, Murphy TP. Chemical Fingerprinting of *Cannabis* as a Means of Source Identification. In: ElSohly MA. Marijuana and the Cannabinoids (Forensic Science and Medicine). New Jersey: Humana Press Inc; 2007: 51-66.

(18) Kussmann M, Nordhoff E, Rahbek-Nielsen H, Haebel S, Rossel-Larsen M, Jakobsen L, Gobom J, Mirgorodskaya E, Kroll-Kristensen A, Palm L, Roepstorff P. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry sample preparation techniques designed for various peptide and protein analytes. J Mass Spectrom. 1997; 32 (6): 593-601.

(19) Jiye A, Huang Q, Wang G, Zha W, Yan B, Ren H, Gu S, Zhang Y, Zhang Q, Shao F, Sheng L, Sun J. Global analysis of metabolites in rat and human urine based on gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry. Anal Biochem. 2008; 379(1): 20-6.

(20) Fardet A, Llorach R, Martin JF, Besson C, Lyan B, Pujos-Guillot E, Scalbert A. A liquid chromatography-quadrupole time-of-flight (LC-QTOF)-based metabolomic approach reveals new metabolic effects of catechin in rats fed high-fat diets. J Proteome Res. 2008; 7(6): 2388-98.

CAPÍTULO 1

Metabolic fingerprinting of *Cannabis* products by ESI-MS: Potential Certification of Geographical Origin Using Processing Markers

Artigo submetido na revista "ARCHIVES OF TOXICOLOGY".

Marina Marques Eiras, Mario Benassi Neto, Maria Francesca Riccio, Marcos N. Eberlin, Silvia O. S. Cazenave and Rodrigo R. Catharino

Departamento de Patologia Clínica - FCM – UNICAMP
C.P. 6121 CEP - 13083-970
rrc@fcm.unicamp.br

Metabolic fingerprinting of *Cannabis* products by ESI-MS: Potential Certification of Geographical Origin Using Processing Markers

Marina Marques Eiras,[1] Mario Benassi,[2,3] Maria Francesca Riccio,[1] Marcos N. Eberlin,[2] Silvia O. S. Cazenave [4] and Rodrigo R. Catharino[1]*

[1]*Pharmacy, Department of Clinical Pathology, School of Medical Sciences, University of Campinas, UNICAMP Caixa Postal 6111, 13083-887 Campinas, SP, Brazil*

[2]*ThoMSon Mass Spectrometry Laboratory, Institute of Chemistry, UNICAMP, 13083-970 Campinas, SP, Brazil*

[3] *Current Address: Institute for Inorganic and Analytical Chemistry, Justus Liebig University, Schubertstrasse 60, Haus 16, D-35392, Giessen, Germany*

[4] *São Paulo Civil Police, Criminal Institute of Campinas, Campinas, SP, Brazil*

ABSTRACT

Metabolic fingerprinting (MF) of water : methanol extracts of *Cannabis sativa L.* have been obtained by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). The samples from two different geographical regions provide characteristic profiles of chemotaxonomic markers, such as cannabinoids. Metabolic fingerprinting appears to be the easiest yet reliable approach to metabolomics and to provide complementary information of component structures revealing important components and markers. ESI-MS allows secure identification of the *Cannabis sativa L.* samples with high speed, sensitivity and selectivity

combined with minimal sample preparation. The profiles of cannabinoids constituents allow the certification of geographical origin in different processing.

Keywords: Metabolomics, ESI-MS; *Cannabis sativa L.*, geographical origin.

*Correspondence to: Farmácia, Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas; Universidade Estadual de Campinas, 13083-887, Campinas, SP, Brazil, Phone/Fax: +55-19-3521-7370 - e-mail: rrc@fcm.unicamp.br

Introduction:

Metabolic fingerprinting is aimed at determining the whole or major composition of metabolic compounds in a sample. Mass spectrometry analysis of different samples has been shown to detect and identify many metabolites of biological relevance in complex matrices.[1]

The *Cannabis sativa L*. (Cannabaceae) is the most widely abused and readily available illicit drug in the world. According to the World Drug Report (2010) of the United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), the number of people who had used *Cannabis* at least once in 2008 is estimated between 129 and 191 million, or 2.9% to 4.3% of the world's population aged 15 to 64. *Cannabis* is also one of the most seized drug around the world. It has been estimated that currently one half of seizure cases related to all drugs of abuse worldwide involved *Cannabis* products, which makes it a drug of global concern.[2]

Efficient toxicological analysis is the basis of competent toxicological judgment and consultation in forensic toxicology. With regard to their analysis,

the forensic scientist's main tasks are to (a) determine whether or not a controlled substance is present in the sample, (b) determine how much of the substance is present, and (c) eventually determine the relationship of drug samples to each other through comparison or ''profiling''. [3]

The analysis, comparison and profiling of the seized drugs are also important for drug enforcement agencies that are keenly interested in trafficking routes of both foreign and domestically grown supplies of the *Cannabis* products.[4] These agencies employ a multitude of methods to gather intelligence to direct resources, plan control operations, and develop policies. A practical means to recognize the source of seized marijuana would be a valuable tool for such purposes. One way to determine origin is via chemical fingerprinting, a method that has shown promise as an effective intelligence tool to ascertain the geographic origin of confiscated *Cannabis* products. [5] There are many factors that affect the chemical constituents of *Cannabis* such as environmental factors, storage of the products as well as the preparation process of the *Cannabis* products.[6] Although chemical fingerprinting of *Cannabis* is not considered to be an ultimate tool for forensic applications, profiling may effectively support other types of evidence and is certainly of particular value in intelligence operations.[7] During many years, a number of researchers have examined the chemical compounds unique to *Cannabis* products and have consistently reported that the cannabinoids are indicative of the country of origin and also that many other factors affect cannabinoid profiles.[6, 7]

Although microscopic investigation [8] and thin layer chromatography [9] with visualizing reagents are often considered sufficient for routine analyses of

Cannabis constituents (cannabinoids) in many forensic laboratories, instrumental methods have been developed to provide more sensitive and reliable tests.[10] Gas chromatography (GC) and liquid chromatography (LC) coupled or not coupled to mass spectrometry (MS) are the main techniques used for determination of cannabinoids contents in *Cannabis* products.[11-13]. Direct infusion electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS), matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI-MS) and easy ambient sonic spray ionization mass spectrometry (EASI -MS) have also been used for metabolic fingerprinting in forensic science with excellent results, for instance, for oils[14], plants[15], beverages[16] and perfumes[17].

Therefore in this work, a rapid and simple metabolomics procedure was tested to analyze cannabinoids and additives content of *Cannabis* products seized in two different but close geographical origins. The cannabinoids as well as their abundance in the samples were analyzed in order to evaluate similarities and differences between the two samples. The hope was that specific cannabinoids and preservatives could provide distinct profiles according to the origin of the seizure.

Material and Methods:

Reagents and samples

All reagents used were of analytical grade. Formic acid and methanol (HPLC grade) were purchased from Merck SA (Rio de Janeiro, Brazil). Deionized water was obtained from a MilliQ purification unit (Millipore, Bedford, MA, USA). *Cannabis* products' samples seized in two different cities from São Paulo:

Campinas and Casa Branca were provided by the Brazilian Civil Police Campinas - São Paulo-Brazil between the years 2007 and 2008.

MS data

ESI-MS data were collected in the positive ion mode on an API5000 mass spectrometer (Applied Biosystems/MDS Analytical Technologies, Ontario, Canada). Typical ESI-MS conditions were as follows: curtain gas, ion source gas and ion transfer voltage were 10 (Arbitrary Scale), 15, and 4 kV, respectively, with a dessolvation temperature of 200° C. To each sample (0.1 mL), 1 mL of a methanol/water solution (1:1 v/v) and 0.1 mL of a methanol solution of formic acid (0.1% v/v) were added. That diluted solution was then directly infused into the ESI source at a flow rate of 10 μL min-1 via a micro syringe pump. The mass analyzer was set to scan along the *m/z* range of 50–1000. ESI-MS/MS experiments were carried out by selecting a specific ion by Q1 and then submitting it to CID with argon in the collision chamber. The collision energy was optimized for each ion; varying from 15 to 50 V. ESI-MS data from the sample were extracted by using the software Analyst 1.4.1 (Applied Biosystems/MDS Analytical Technologies, Ontario, Canada). Mass spectra data were accumulated over 60 s. The high mass accuracy obtained using Micromass-Waters Q-TOF mass spectrometer (Manchester, England) allows confirmation of cannabinoids molecular composition.

Chemometric analysis

ESI-MS data of the *Cannabis* samples were extracted using Analyst 4.1 (Applied Biosystems). Mass spectra data were accumulated, centered and aligned to generate a final data matrix of all samples for ions ranging from *m/z*

100 to 1250. To classify the *Cannabis* products, principal component analysis (PCA) was performed, for simplicity, on the total ESI-MS data with cannabinoid or impurity ions. The Pirouette v. 3.11 program was used.

Results and Discussion:

The ESI-MS fingerprints of the samples of *Cannabis* products (Figures 1 and 2) show similarities but some important differences. The predominant ions were related to cannabinoids such as the ions of *m/z* 301 (Cannabidiol-C4), *m/z* 311 (Cannabinodiol/ Cannabinol), *m/z* 315 (Delta-9-THC / Cannabidiol / Cannabichromene) and *m/z* 329 (10-oxo-Δ6a(10a)- tetrahydrocannabinol OTHC/ Cannabicoumaronone CBCON-C5) . The spectrum from Casa Branca (Fig. 1) is characterized by seven major ions of *m/z* 167 (Ethyl 4-hydroxybenzoate), *m/z* 181 (Propyl 4-hydroxybenzoate), *m/z* 195 (Butyl 4-hydroxybenzoate), *m/z* 301 (Cannabidiol-C4), *m/z* 311 (Cannabinodiol/ Cannabinol), *m/z* 315 (Delta-9-THC / Cannabidiol / Cannabichromene) and *m/z* 329 (10-oxo-Δ6a(10a)- tetrahydrocannabinol OTHC/ Cannabicoumaronone CBCON-C5) (Table 1). However, the most abundant ions for the *Cannabis* products extract from Campinas (Fig. 2) is rather distinctive and characterized by seven major ions of *m/z* 167 (Ethyl 4-hydroxybenzoate), *m/z* 181 (Propyl 4-hydroxybenzoate), *m/z* 195 (Butyl 4-hydroxybenzoate), *m/z* 209 (unknown), *m/z* 279 (unknown), *m/z* 301 (Cannabidiol-C4) and *m/z* 315 (Delta-9-THC and/or Cannabidiol and/or Cannabichromene), (Table 1).

The results presented here clearly show that metabolic fingerprinting of *Cannabis* products by ESI-MS has a great potential to certify geographical

origin. This is so because the ESI-MS of the polar organic compounds extracts display therefore characteristic and reproducible profiles of cannabinoids and preservatives that allow prompt differentiation between *Cannabis* products seized in the cities of Casa Branca (Fig. 1) and Campinas (Fig. 2). The ratios between the different compounds were calculated according to Catharino and collaborators[18]. Herein, cannabinoids and preservatives alterations probably reflect the many factors that affect the chemical constituents of *Cannabis* products that were also observed by Martone et al [19], Pitts et al [20] and Strömberg et al [21] . The reduced intensities of preservatives in *Cannabis* products from Casa Branca indicate its preparation mode with fewer conservatives leading to a reduced shelf-life.

Principal component analysis (PCA) reveals the relationships between *Cannabis* products without peak-choice bias and without neglecting a significant amount of the information in the mass spectra. Herein, PCA was used to treat the metabolic fingerprint data acquired using ESI(+)-MS so as to statistically evaluate the performance of this method in differentiating *Cannabis* products from Casa Branca or from Campinas. Fig. 3 shows the PC1 versus PC2 scores plot. It is observed that indeed the two classes of samples are grouped: Casa Branca (CasBr) and Campinas (Cps). PCA describes the underlying orthogonal variables in the set of multivariate data as a set of principal components (PC), being a linear additive model in which each PC accounts for a portion of the total variance of the data, resynthesizing the data as a function of two or three PCs. Plotting our data in the space provided by these PCs (scores plot) permits the rapid discrimination of these samples and a clear visualization of their similarities and differences.

Conclusions

Instantaneous determination of the sample composition via metabolic fingerprinting by direct insertion ESI(+)-MS reveals, therefore, major cannabinoids and preservatives. This information changes and shows a great potential for the certification of geographical origin of *Cannabis* products and is useful to group samples prepared by different processes.

This work shows a potential metabolic fingerprinting, which is a fast, simple and powerful screening method that can be used to simultaneously detect cannabinoids and preservatives from different *Cannabis* products seized in two different cities from the state of São Paulo, Brazil, besides being able to distinguish them from each other.

Acknowledgments: This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – 09/51948-9), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico INCT- Obesidade e Diabetes.

References:

[1] A. Yilmaz, N.T. Nyberg, P. Molgaard, J. Asili, J.W. Jaroszewski, Metabolomics, 6 511.
[2] J. Tomas-Rossello, R.A. Rawson, M.J. Zarza, A. Bellows, A. Busse, E. Saenz, T. Freese, M. Shawkey, D. Carise, R. Ali, W. Ling, Subst. Abus., 31 251.
[3] D.F. Rendle, Chem. Soc. Rev., 34 (2005) 1021.
[4] E.K. Shibuya, J.E.S. Sarkis, O.N. Neto, M.Z. Moreira, R.L. Victoria, Forensic Sci.Int., 160 (2006) 35.
[5] E.K. Shibuya, J.E.S. Sarkis, O. Negrini-Neto, J. Ometto, J. Braz. Chem. Soc., 18 (2007) 205.
[6] P.B. Baker, T.A. Gough, B.J. Taylor, Bulletin on Narcotics, 32 (1980) 31.
[7] M.A. ElSohly, D.F. Stanford, T.P. Murphy, Marijuana and the Cannabinoids, Humana Press, 2007, p. 51.
[8] I. Katona, E.A. Rancz, L. Acsady, C. Ledent, K. Mackie, N. Hajos, T.F. Freund, J. Neurosci., 21 (2001) 9506.
[9] J. Pothier, N. Galand, C. Viel, Journal of Chromatography, 634 (1993) 356.
[10] K. Ndjoko, J.L. Wolfender, K. Hostettmann, Chromatographia, 47 (1998) 72.
[11] E. Jagerdeo, J.E. Schaff, M.A. Montgomery, M.A. LeBeau, Rapid Commun. Mass Spectrom., 23 (2009) 2697.
[12] M.R. Moeller, G. Doerr, S. Warth, J. Forensic Sci., 37 (1992) 969.
[13] A. Caligiani, G. Palla, B. Bernardelli, J. Forensic Sci., 51 (2006) 1096.
[14] S.A. Saraiva, E.C. Cabral, M.N. Eberlin, R.R. Catharino, J. Agric. Food Chem., 57 (2009) 4030.
[15] R. Roesler, R.R. Catharino, L.G. Malta, M.N. Eberlin, G. Pastore, Food Chem., 104 (2007) 1048.
[16] P.P. de Souza, H.G.L. Siebald, D.V. Augusti, W.B. Neto, V.M. Amorim, R.R. Catharino, M.N. Eberlin, R. Augusti, J. Agric. Food Chem., 55 (2007) 2094.
[17] L.D. Marques, R.R. Catharino, R.E. Bruns, M.N. Eberlin, Rapid Commun. Mass Spectrom., 20 (2006) 3654.
[18] R.R. Catharino, H.M.S. Milagre, S.A. Saraiva, C.M. Garcia, U. Schuchardt, M.N. Eberlin, Energy Fuels, 21 (2007) 3698.
[19] G. Martone, E. Dellacasa, Forensic Sci.Int., 47 (1990) 147.
[20] J.E. Pitts, P.J. Oneil, K.P. Leggo, J. Pharm. Pharmacol., 42 (1990) 817.
[21] L. Strömberg, Journal of Chromatography A, 96 (1974) 99.

Figure Legends:

Fig. 1: ESI-MS fingerprinting of *Cannabis* products seized in Casa Branca – São Paulo – Brazil.

Fig. 2: ESI-MS fingerprinting of *Cannabis* products seized in Campinas – São Paulo – Brazil.

Fig. 3: PCA scores plot for the ESI(+)-MS data of the *Cannabis* products seized in Casa Branca (CasBr) and Campinas (Cps).

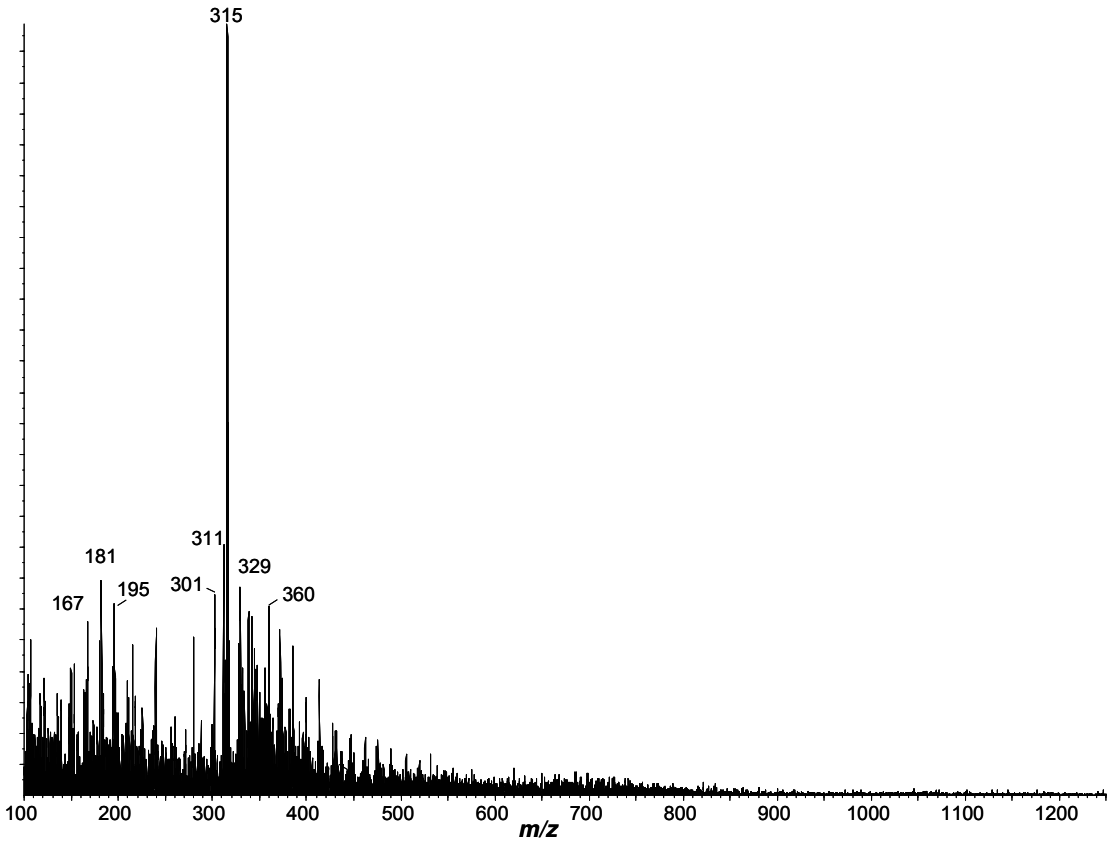

315
311
181
329
195
301
167
360
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
1100
1200
m/z

Fig. 1.

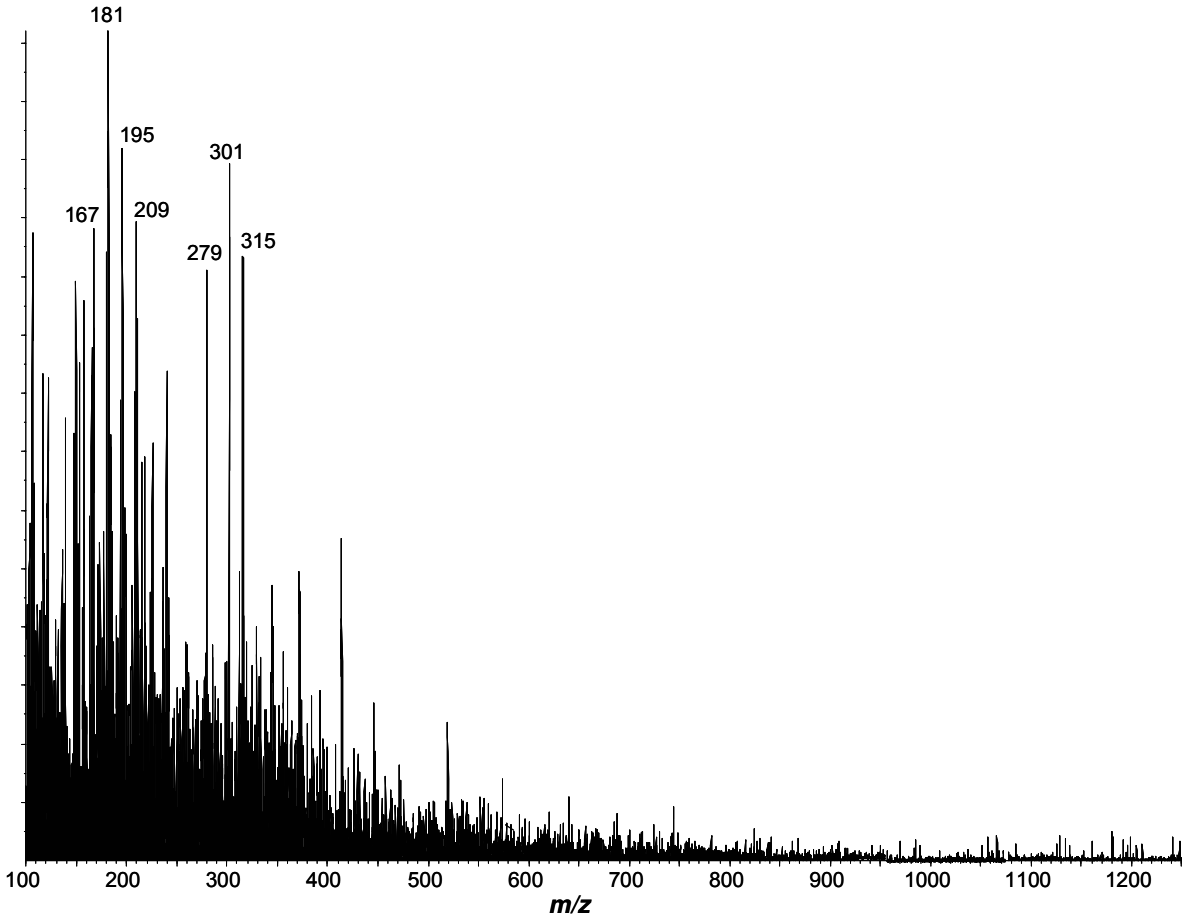

181
195
301
167
209
279
315
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
1100
1200
m/z

Fig 2.

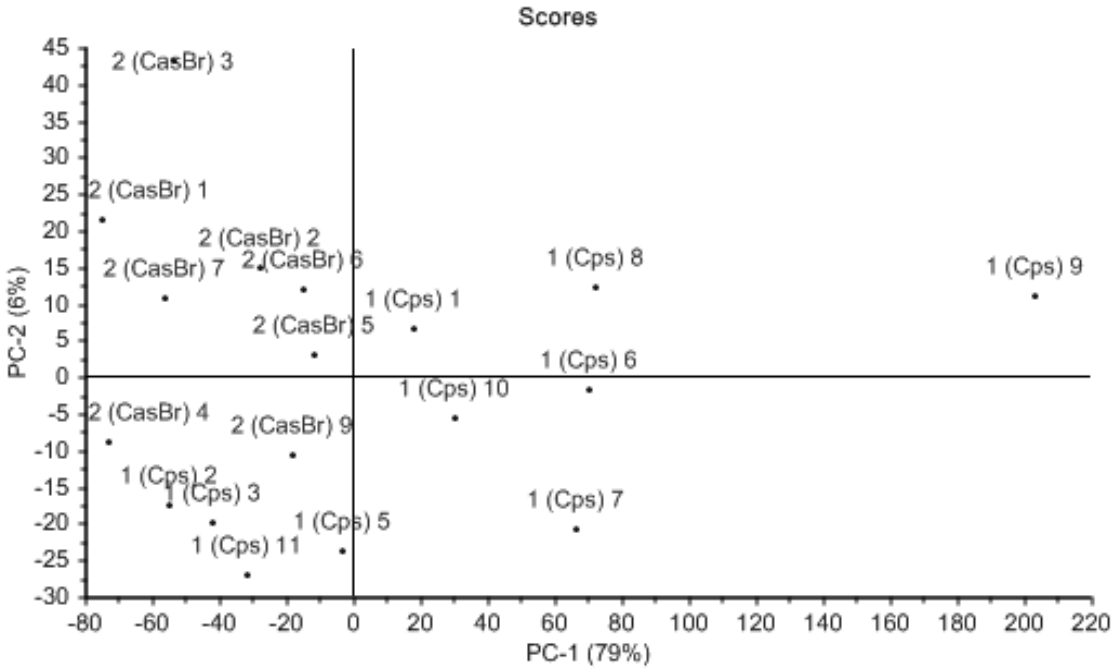

Scores
2 (CasBr) 3
2 (CasBr) 1
2 (CasBr) 2
2 (CasBr) 7
2 (CasBr) 6
1 (Cps) 8
1 (Cps) 9
1 (Cps) 1
2 (CasBr) 5
1 (Cps) 6
1 (Cps) 10
2 (CasBr) 4
2 (CasBr) 9
1 (Cps) 2
1 (Cps) 3
1 (Cps) 7
1 (Cps) 5
1 (Cps) 11
PC-2 (6%)
PC-1 (79%)

Fig 3.

Table Legend:

Table 1: Main polar organic compounds identified via ESI-MS/MS.

Table 1

ESI- MS ions (*m/z*)		
Compound	Protonated Ions $[M+H]^+$ *m/z*	MS/MS *m/z*
Benzoic acid	123	105, 77
Ethyl 4-hydroxybenzoate	167	139,121
Propyl 4-hydroxybenzoate	181	139,121
Butyl 4-hydroxybenzoate	195	139,121
Cannabidiol-C4	301	259,181
Cannabinodiol/ Cannabinol	311	201, 193
Delta-9-THC / Cannabidiol / Cannabichromene	315	297, 259, 193,181
10-Oxo-Δ6a(10a)- tetrahydrocannabinol OTHC/ Cannabicoumaronone CBCON-C5	329	311, 193
Cannabigerol monomethyl ether/ Cannabichromevarinic acid A/ Cannabidivarinic acid	331	201, 193
Δ9- Tetrahydrocannabinolic acid-C4 A and/or B	345	193, 299

DISCUSSÃO GERAL

Caracterização das Amostras de Diferentes Origens por Diferenças de Produção:

Estudos feitos entre 1990 e 1992 mostraram que uma das maneiras de se determinar a origem é utilizando um sistema de *fingerprinting* químico, um método que já se mostrou uma promessa como uma ferramenta eficaz para certificar a origem geográfica de amostras confiscadas de produtos de *Cannabis*. O *fingerprinting* químico dos produtos de *Cannabis* não é considerado uma ferramenta decisiva para aplicações forenses, porém a técnica pode apoiar efetivamente outros tipos de evidência e é certamente de valor muito importante nas operações táticas envolvendo apreensões de drogas (1).

Após a realização do trabalho com as amostras de *Cannabis sativa L.* apreendidas nas diferentes regiões (Tabelas 2 e 3), verificamos experimentalmente que as amostras apresentavam similaridades e diferenças entre si, facilmente caracterizadas pelos íons (*m/z*) correspondentes aos canabinóides. Essas diferenças são observadas, principalmente, pelo modo de preparo da droga.

Tabela 2. Amostras de *Cannabis* apreendidas em Casa Branca:

Amostras de Casa Branca	N° laudo	Data de apreensão
CasBr 1	7903/08	30/12/2008
CasBr 2	7902/08	30/12/2008
CasBr 3	7806/08 (1)	10/12/2008
CasBr 4	7900/08	30/12/2008
CasBr 5	7789/08	10/12/2008
CasBr 6	7765/08	10/12/2008

CasBr 7	7797/08	10/12/2008
CasBr 8	7265/08	10/12/2008
CasBr 9	7807/08	10/12/2008
CasBr 10	7898/08	30/12/2008

Tabela 3. Amostras de *Cannabis* apreendidas em Campinas:

Amostras de Campinas	**N° laudo**	**Data de apreensão:**
Cps 1	7767/08 (1)	22/12/2008
Cps 2	7754/08	10/12/2008
Cps 3	7753/08	10/12/2008
Cps 4	6791/08	12/11/2008
Cps 5	7035/08	10/11/2008
Cps 6	7591/08 (1)	27/11/2008
Cps 7	7627/08	27/11/2008
Cps 8	6910/08 (1)	27/11/2008
Cps 9	7059/08	07/11/2008
Cps 10	7036/08 (1)	10/11/2008
Cps 11	7467/08	26/11/2008

As figuras abaixo (Figuras 9 e 10) comparam os espectros de massas por ESI-MS das amostras apreendidas em Casa Branca e Campinas, respectivamente. Os extratos foram analisados por infusão direta no espectrômetro de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) no modo positivo e negativo. O ESI no modo positivo (ESI(+)-MS) produziu um espectro de massas mais característico para a determinação dos compostos por *fingerprinting* metabólico. Esse método fornece um método sensível e seletivo

para a identificação de compostos orgânicos polares com sítios básicos, como os canabinóides e compostos conservantes encontrados nas amostras de *Cannabis.*

O ESI(+)-MS de extratos de compostos orgânicos polares apresentam perfis característicos dos canabinóides e “conservantes” que permitem uma diferenciação imediata entre as amostras apreendidas em Casa Branca (Figura 9) e em Campinas (Figura 10).

O espectro de Casa Branca (Figura 9) é caracterizado por sete íons principais de *m/z* 167 (etil 4-hidroxibenzoato), *m/z* 181 (propil 4-hidroxibenzoato), *m/z* 195 (butil 4-hidroxibenzoato), *m/z* 301 (canabidiol-C4), *m/z* 311 (Canabinodiol / canabinol), *m/z* 315 (Δ^9-THC/ canabidiol/ canabicromeno) e *m/z* 329 (10-oxo-Δ6a(10a)- tetrahidrocanabinol OTHC/ Cannabicoumaronone CBCON-C5) (Tabela 1 - capítulo 1).

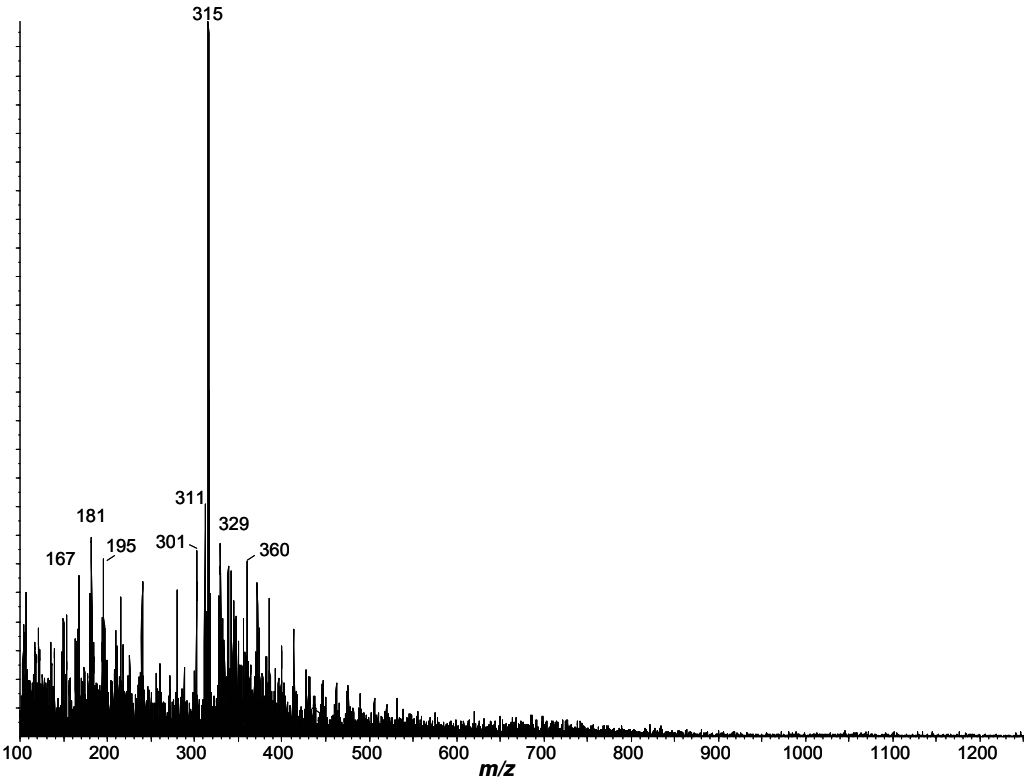


Figura 9. *Fingerprinting* por ESI-MS dos produtos de *Cannabis* apreendidos em Casa Branca – São Paulo – Brasil.

Já os íons mais abundantes dos extratos das amostras apreendidas em Campinas (Figura 10) são distintos. O espectro das amostras de Campinas é caracterizado pelos sete íons principais de *m/z* 167 (etil 4-hidroxibenzoato), *m/z* 181 (propil 4-hidroxibenzoato), *m/z* 195 (butil 4-hidroxibenzoato), *m/z* 209 (desconhecido), *m/z* 279 (desconhecido), *m/z* 301 (canabidiol-C4) e *m/z* 315 (Δ^9-THC/ canabidiol/ canabicromeno) (Tabela 1 – capítulo 1).

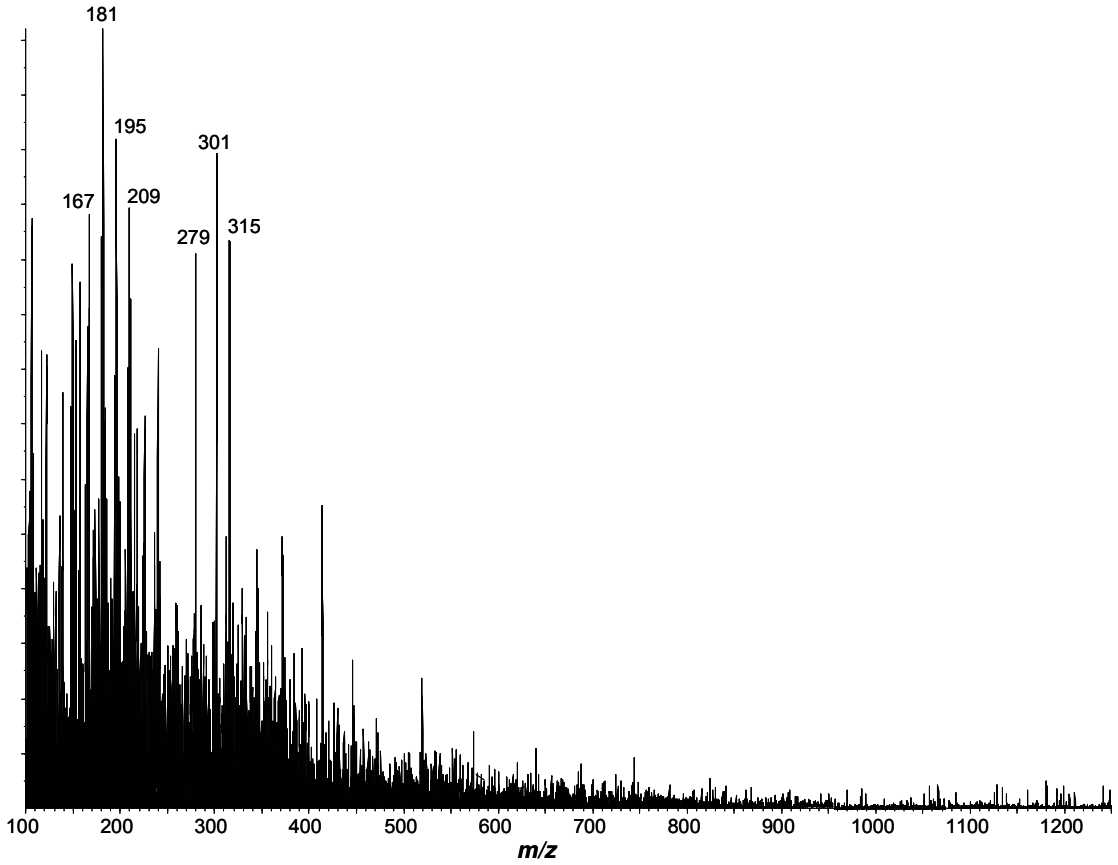


Figura 10. *Fingerprinting* por ESI-MS dos produtos de *Cannabis* apreendidos em Campinas – São Paulo – Brasil.

As proporções entre os diferentes compostos foram calculadas de acordo com Catharino e colaboradores (2). As diferenças entre os canabinóides e “conservantes” provavelmente refletem os diversos fatores que afetam os constituintes químicos dos produtos da Cannabis que também foram observados por Martone et al (3), Pitts et al (4) e Strömberg et al (5). As intensidades menores de “conservantes” nos produtos da Cannabis apreendidos em Casa Branca indicam um modo de preparação com menos conservantes levando a uma menor vida-de-prateleira.

Análise Exploratória dos Dados:

Para testar a eficiência do método metabolômico proposto na caracterização das amostras apreendidas de *Cannabis sativa L.* de diferentes origens (Campinas e Casa Branca), os dados foram tratados por meio da análise de componentes principais (PCA).

A análise de PCA é uma metodologia empregada na caracterização de amostras, onde é necessário extrair informação de um grande número de variáveis. Trata-se de uma ferramenta útil na análise e classificação de um grupo de amostras, pois permite visualizar os dados obtidos a partir das amostras em um gráfico bi ou tridimensional (6).

Os componentes principais (PC) são obtidos em ordem decrescente de variância, onde o componente principal (PC1) detém mais informação estatística que o PC2, e assim por diante. Portanto a janela PC1 x PC2 é a mais importante estatisticamente (*scores*). A análise de PCA também pode ser usada para ver quais variáveis (*loadings*) têm maior importância no agrupamento das amostras. Quando há um número grande de variáveis, o uso

do PCA tri-dimensional, onde visualizamos a janela PC1 x PC2 x PC3, pode ser mais adequado (7). Ao colocar os dados nos espaços fornecidos por esses PCs, é possível fazer uma rápida discriminação das amostras e visualizar claramente suas similaridades e diferenças.

Neste trabalho, o PCA foi utilizado para tratar o *fingerprinting* metabólico dos dados obtidos por ESI(+)-MS e também para avaliar estatisticamente a performance deste método na diferenciação das amostras de *Cannabis* apreendidas em Casa Branca e as amostras de *Cannabis* apreendidas em Campinas. A Figura 11 mostra o gráfico com os *scores* PC1 versus PC2. Observa-se que realmente as duas classes de amostras estão agrupadas: Casa Branca (CasBr) e Campinas (Cps). As diferenças nos canabinóides e conservantes presentes nas diferentes amostras, provavelmente, refletem os diversos fatores que afetam os constituintes químicos dos produtos de *Cannabis.*

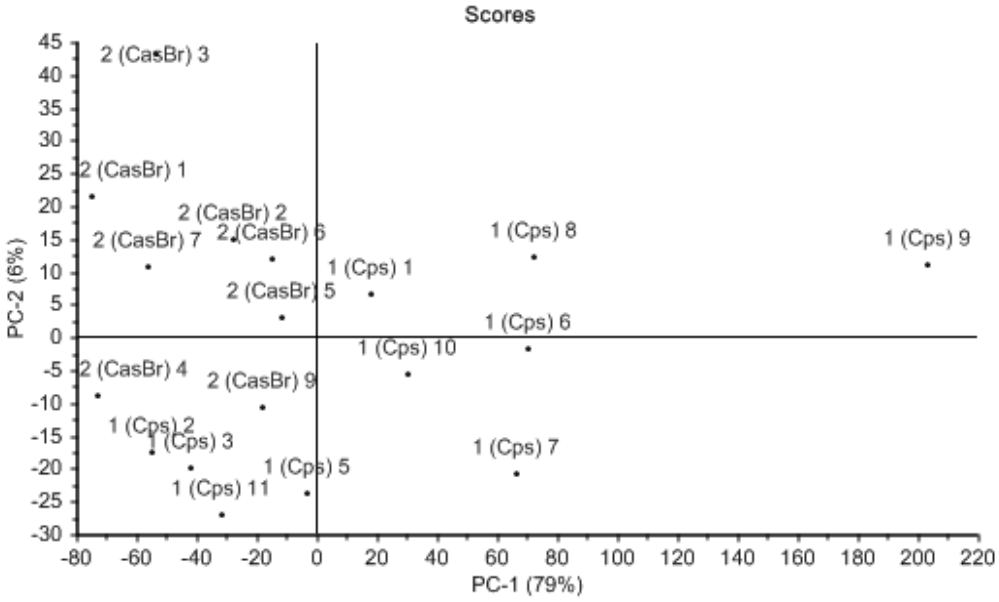


Figura 11. Gráfico com os *scores* do PCA para os dados de ESI(+)-MS dos produtos de *Cannabis* apreendidos em Casa Branca (CasBr) e Campinas (Cps).

CONCLUSÃO GERAL

Ao fazer a determinação instantânea dos compostos das amostras ou *fingerprinting* metabólico por inserção direta ESI(+)-MS, foi possível observar as diferenças entre os canabinóides e conservantes existentes na *Cannabis,* uma droga muito importante no cenário mundial, por ser a mais consumida e apreendida mundialmente. O resultado é um *fingerprinting* metabólico que tem um grande potencial para ser utilizado como método de *screening* rápido e simples, sendo simultaneamente empregado para detectar os canabinóides e conservantes e extrair espectros de diferentes amostras apreendidas em diferentes regiões, além de ser capaz de fazer distinção entre as amostras de uma região e as amostras de outra. Isso facilitaria a identificação das drogas apreendidas, o fluxo de trabalho e o delineamento de políticas públicas nos laboratórios de toxicologia forense espalhados pelo país.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram claramente que o *fingerprinting* metabólico das amostras de *Cannabis* por ESI-MS tem um grande potencial para a certificação de origem geográfica mediante ao processo de produção, podendo ser empregado para outros tipos de drogas de abuso.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Estudar um maior número de regiões e um maior número de produtos provenientes da *Cannabis* para validar o efeito do processo além dos fatores edafoclimáticos para certificação de origem da droga.

Estudar a “vida de prateleiras” dos produtos provenientes de *Cannabis* para observação de possíveis interações entre as substancias adicionadas e as substâncias endógenas para utilização em certificação de origem.

Utilizar outras técnicas e outras drogas no *fingerprinting* metabólico para comparação das técnicas que possam ser empregadas em um maior número possível de drogas visando menor custo, menor tempo e maior aplicação de análise.

REFERÊNCIAS DA DISCUSSÃO GERAL

(1) ElSohly MA, Stanford DF, Murphy TP. Chemical Fingerprinting of *Cannabis* as a Means of Source Identification. In: ElSohly MA. Marijuana and the Cannabinoids (Forensic Science and Medicine). New Jersey: Humana Press Inc; 2007: 51-66.

(2) Catharino RR, Milagre HMS, Saraiva SA, Garcia CM, Schuchardt U, Eberlin MN. Biodiesel Typification and Quality Control by Direct Infusion Electrospray Ionization Mass Spectrometry Fingerprinting. Energy Fuels. 2007; 21 (6): 3698-701.

(3) Martone G, Dellacasa E. Analysis of the ageing processes in hashish samples from different geographic origin. Forensic Sci Int. 1990; 47(2): 147-55.

(4) Pitts JE, Oneil PJ, Leggo KP. Variation in the THC content of illicitly imported Cannabis products--1984-1989. J. Pharm Pharmacol. 1990; 42 (12) 817-20.

(5) Strömberg L. Minor components of cannabis resin: IV. Mass spectrometric data and gas chromatographic retention times of terpenic components with retention times shorter than that of cannabidiol. J Chromatogr A. 1974; 96 (1): 99-114.

(6) Lopez-Lopez A, Rodriguez-Gomez F, Cortes-Delgado A, Montano A, Garrido-Fernandez A. Influence of Ripe Table Olive Processing on Oil Characteristics and Composition As Determined by Chemometrics. J Agric Food Chem. 2009; 57 (19): 8973-81.

(7) Kadegowda AKG, Piperova LS, Erdman RA. Principal Component and Multivariate Analysis of Milk Long-Chain Fatty Acid Composition During Diet-Induced Milk Fat Depression. *J Dairy Sci.* 2008; 91(2): 749-59.