

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

LUCAS DE OLIVEIRA PEREIRA RIBEIRO

**IDENTIFICAÇÃO E RASTREABILIDADE DE *CANNABIS SATIVA* POR MEIO DE SISTEMA  
MULTIPLEX DE MICROSSATÉLITE (STR).**

Porto Alegre  
2019

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul

**Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul**  
**Escola de Ciências**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**Identificação e rastreabilidade de *Cannabis sativa* por meio de sistema  
multiplex de microssatélite (STR).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da PUCRS como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

**LUCAS DE OLIVEIRA PEREIRA RIBEIRO**

**ORIENTADOR**

**CLARICE SAMPAIO ALHO**

Porto Alegre, RS

Junho de 2019

## Ficha Catalográfica

R484i Ribeiro, Lucas de Oliveira Pereira

Identificação e rastreabilidade de Cannabis sativa por meio de sistema multiplex de 19 loci de microssatélite (STR) / Lucas de Oliveira Pereira Ribeiro . – 2019.

25 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Clarice Sampaio Alho.

1. Cannabis sativa. 2. Rastreabilidade. 3. Identificação. 4. Microssatélite. 5. Forense. I. Alho, Clarice Sampaio. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Clarissa Jesinska Selbach CRB-10/2051

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Professora Clarice Sampaio Alho, pela atenção, paciência, conhecimento e especial a amizade e carinho que sempre teve para comigo.

Agradeço ao amigo e quase Doutor Eduardo Ávila, pelos ensinamentos, mentoria, parceria e discussões de engrandecimento pessoal.

Agradeço aos meus colegas de laboratório pela harmonia do ambiente e companheirismo ao longo da jornada.

Agradeço aos membros da banca pela disposição em colaborar com o enriquecimento deste trabalho.

Agradeço à Fernanda, pessoa especial que esteve ao meu lado neste momento tão importante, suportando e assistindo a mim sempre que necessário.

Agradeço, por fim, à minha família que, mesmo geograficamente longe, nunca estive distante. A família foi e é para mim mais que um laço genético ou uma herança sanguínea. Sua definição, ainda que não completa, foi representada em cada gesto, palavra e carinho direcionados a mim.

## RESUMO

O consumo de substâncias psicoativas que podem causar dependência ou algum dano à saúde do indivíduo é uma preocupação social e médica desde 1925. Atualmente, a maconha ainda é a droga ilícita mais consumida mundialmente. Apesar da queda no consumo ilegal observada em países europeus, no continente americano o inverso é observado. No Brasil, segundo os últimos relatórios, aproximadamente 225 mil kg de *Cannabis sp.* foram apreendidos pela Polícia Federal. Por tratar-se de uma substância ilegal em vários países, a aquisição dessa droga dá-se através do mercado ilícito. Mundialmente, estima-se que 65% do crime organizado está envolvido com o narcotráfico. No Brasil, um terço da população carcerária responde pelo crime de tráfico e no Estado do Rio Grande do Sul (RS) esse número é de 26%. A maconha apreendida no Rio Grande do Sul possui pelo menos três principais rotas com origens conhecidas: Paraguai, Uruguai e Polígono da Maconha (extensão territorial que contempla cidades da Bahia e Pernambuco, ao longo do rio São Francisco). Além destas rotas, emerge uma nova forma de tráfico, visível através do aumento no número de sementes apreendidas embalagens transportadas via correio nos últimos anos. Através da análise de dois painéis multiplex de 13-loci STR (propostos por Houston e colaboradores, 2015 e 2017)(HOUSTON et al., 2015, 2017)(HOUSTON et al., 2015, 2017)(HOUSTON et al., 2015, 2017)(HOUSTON et al., 2015, 2017)(HOUSTON et al., 2015, 2017), 94 amostras de *Cannabis sativa* foram analisadas. Ambos os sistemas analisados foram eficazes em individualizar e rastrear a origem geográfica de cada indivíduo. A chance de duas amostras aleatórias terem o mesmo genótipo no Painel 2015 e no Painel 2017 é de uma em 65 bilhões e uma em 430 milhões, respectivamente. Não obstante, o Painel 2015 classificou corretamente 99% das amostras, enquanto o Painel 2017 classificou 96%. Para o Painel 2015, a análise de coordenadas principais (PCoA) baseadas na distância genética foi capaz de agrupar os indivíduos de acordo com a sua origem geográfica. De forma geral, a comparação entre os resultados obtidos permitiu identificar uma melhora significativa na eficiência em identificar e rastrear, de acordo com a origem, as amostras brasileiras de maconha utilizando o painel proposto em 2015 quando comparado ao Painel 2017. Utilizando o genótipo dos 19 STRs foi possível observar uma variação genética entre os grupos, concordante com a região geográfica de cada apreensão. Em comparação, a análise dos 19 marcadores de microssatélites coletivamente demonstrou melhores resultados do que os obtidos pelo Painel 2015. Esse ganho de informação é esperado, dado o acréscimo de 7 marcadores STR. Contudo, o esforço e os custos necessários para a análise de dois sistemas de 13-loci STR para a obtenção dos 19 loci devem ser avaliados e podem não ser vantajosos. Em conclusão, o Painel 2015 (proposto por Houston e colaboradores em 2015) demonstrou melhores resultados quando comparado ao Painel 2017, podendo ser utilizado como uma ferramenta de inteligência pela Polícia brasileira.

## PALAVRAS-CHAVE

*Cannabis sativa*; Rastreabilidade, Identificação, Microssatélite, Forense.

## **ABSTRACT**

The consumption of psychoactive substances that may cause harm to the individual is a medical and social concern since 1925. Nowadays, marijuana still is the most consumed drug worldwide. Despite the decrease of illegal consumption in European countries, in the America continent it is growing. In Brazil, according to reports, approximately 225 thousand kilograms were apprehended by the Brazilian Federal Police. As an illicit drug in most of the countries, marijuana acquisition by consumers occurs through the illicit market. It is estimated that, worldwide, 65 per cent of the organized crime is involved with narcotraffic. One third of Brazilian prison population respond for crimes associated with drugs markets, in Rio Grande do Sul (RS) this number is about one quarter. The marijuana seized in RS come from three main sources: Paraguay, Uruguay, and Marijuana Polygon (region alongside São Francisco river that extends between the states of Bahia and Pernambuco). Besides these known paths, a new incoming source can be observed through postal office seeds apprehension in the past few years. The analysis of two 13-loci STR multiplex panels (proposed by Houston and collaborators, 2015 and 2017), 94 samples of *Cannabis sativa* trafficked in Brazil were investigated. Both systems were effective in individualizing and origin differentiating each sample. The random match probability of two unrelated samples for Panel 2015 and Panel 2017 were one in 65 billion and one in 430 million, respectively. In addition, Panel 2015 correctly classified 99% of all samples according to its region, while Panel 2017 classified 96%. The Principal Coordinate Analysis (PCoA) of Panel 2015 clearly distinguish the groups of seizure according to their regions. Overall, the comparison of the forensic results obtained for both panels allowed to observe a significant efficiency improvement in individualization and origin identification of Brazilian samples when using Panel 2015. Utilizing the genotype of all 19 markers, it was possible to identify a genetic variance among the groups concordant with the geographical region of each seizure. In comparison, the analysis of all STR markers collectively showed better results than those obtained with Panel 2015. This gain in informative power was expected, since 7 STRs were added. Although, the effort and cost of analyzing two 13-loci STR systems in order to obtain all 19 loci should be considered and might not be advantageable. In conclusion, Panel 2015 proposed by Houston *et al.* (2015) demonstrated better results when compared with Panel 2017, being a reliable tool for the Brazilian Police intelligence.

## **KEY-WORDS**

*Cannabis sativa*; Identification, Traceability, Forensic, Microsatellite

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Imagem ilustrativa, retirada do livro <i>Köhler's Medicinal Plants</i> , das partes morfológicas da planta de <i>Cannabis sativa</i> _____	<b>03</b>
<b>Figura 2:</b> Capítulo terceiro do acordo assinado na II Conferência Internacional do Ópio, em Genebra _____	<b>04</b>
<b>Figura 3:</b> Capítulo quarto do acordo assinado na II Conferência Internacional do Ópio, em Genebra _____	<b>05</b>
<b>Figura 4:</b> Distribuição do total de apreensões de droga, em 2016, segundo o UNODC, 2018 _____	<b>07</b>
<b>Figura 5:</b> Imagem do artigo " <i>Molecular Cytogenetic Characterization of the Dioecious Cannabis sativa with an XY Chromosome Sex Determination System</i> " demonstrando o cariótipo da <i>Cannabis sativa</i> masculino (i) e feminino (j) _____	<b>09</b>
<b>Figura 6:</b> Análise de Coordenadas Principais do estudo piloto realizado no Laboratório de Genética Humana e Molecular, PUCRS _____	<b>11</b>

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Painei *set 13 loci* STR utilizado no primeiro estudo realizado no Laboratório de Genética Humana e Molecular – Genética Forense (PUCRS) aplicado às 72 amostras e demais especificações \_\_\_\_\_ **10**



## ABREVIATURAS

CA – California

CBD – Canabidiol

CBN – Canabiol

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

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EUROPOL – *European Police*

ISFG – *International Society of Forensic Genetic*

MA – Massachusetts

MS – Ministério da Saúde

PPGBCM – Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular, PUCRS, Brasil

PUCRS – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

RAPD – Reação de Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

RFU – Unidades Reativas de Florescência (*Relative Fluorescence Unity*)

STR – Microssatélites (*Short Tandem Repeats*)

SVS – Secretaria de Vigilância e Segurança, Brasil

SWGDM – *Scientific Working Group on DNA Analysis Methods*

THC –  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol

UNODC – *United Nations Office on Drugs and Crime*

## SUMÁRIO

<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>01</b>
Histórico	01
A planta como alucinógeno	02
Questões legais	04
Consumo ilegal	06
Tráfico e plantio	06
Rastreabilidade	08
STR para <i>Cannabis sp.</i>	09
<b>OBJETIVO</b>	<b>14</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>15</b>
<b>ARTIGO CIENTÍFICO</b>	<b>21</b>
Tables and Figures	34
References	42
Supplementary Data	45
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>50</b>

## REFERENCIAL TEÓRICO

### HISTÓRICO DA *Cannabis sativa*

Popularmente conhecida como 'maconha', a *Cannabis sativa* é uma planta herbácea da família Cannabaceae, descrita no século XVIII (LINNÉ & SALVIUS, 1753). A família *Cannabaceae* é composta pelos gêneros *Aphananthe*, *Cannabis*, *Chaetachme*, *Celtis*, *Gironniera*, *Humulus*, *Lozanella*, *Parasponia*, *Pteroceltis* e *Trema* (YANG *et al.*, 2013). A subdivisão do gênero *Cannabis sp.* não é um consenso dentro da literatura, sendo a espécie ora descrita como politípica e outrora como monotípica (WATTS, 2006). Ao passo que outras duas espécies foram descritas por Jean-Baptist Lamarck e por Janischevsky, *Cannabis indica* e *Cannabis ruderalis*, respectivamente, estudos sugerem que estas duas seriam subdivisões, ou até mesmo variações, da espécie *Cannabis sativa* e não outras espécies (HONG & CLARKE, 1949). Adotando a visão monotípica, a mesma utilizada pelas autoridades brasileiras, a classificação, de acordo com o *United States Department of Agriculture* (2016) é a seguinte:

NOME DA ESPÉCIE: *Cannabis sativa* L.

TAXONOMIA:

Reino: Plantae (planta)

Subreino: Tracheobionta (planta vascular)

Subdivisão: Spermatophyta (planta com sementes)

Divisão: Magnoliophyta (planta com flores)

Classe: Magnoliopsida (Dicotiledônea)

Subclasse: Hamamelididae

Ordem: Urticales

Família: Cannabaceae

Gênero: *Cannabis* L.

Espécie: *Cannabis sativa* L.

Subespécies: *sativa*, *indica*, *ruderalis*, *spontanea*

A planta caracteriza-se por possuir entre um metro e meio a três metros de comprimento, podendo atingir, em alguns casos, até sete metros, dependendo do tipo e condições de cultivo. O caule é fino, ereto e com ramificação monopodial, sua coloração pode variar de verde-claro a verde-escuro, apresentando coloração bordô devido à presença de antocianina (molécula responsável pela pigmentação vermelha azulada das flores e frutos) e áspero, com angulações estriais longitudinais bem visíveis; fistuloso e fibroso

com camada exterior rígida. Conhecido também como cânhamo é utilizado para fabricação têxtil, graças à sua característica resistente, desde o oitavo milênio a.C. (NASCIMENTO, 2014).

As folhas são simples, longas e lanceoladas com segmentos ímpares (3 a 11), com ápice acuminado e base atenuada a cuneada; bordas serreadas e de tamanho variável, podendo atingir mais de 15 cm (Figura 1); consistência membranácea a papirácea; levemente ásperas. As flores unissexuais e inconspícuas têm tricomas glandulares que, nas femininas, secretam resina (SOUZA *et al.*, 2006). A polinização é realizada pelo vento, através da liberação do pólen presente nos estames masculinos. Originária da Ásia, os primeiros registros do uso da planta devido a suas características têxteis, para fabricação de tecidos, roupas e equipamentos de pesca datam cerca de 6000 anos. Já o uso das inflorescências femininas, está presente no livro de medicina *Pên-Ts'ao Ching*, escrito há 4000 anos atrás, e relata o uso da planta para obtenção de efeitos alucinógenos (IVERSEN, 2009).

## **A PLANTA COMO ALUCINÓGENO**

Os principais efeitos alucinógenos, são decorrentes da ação dos canabinóides (grupo de moléculas produzidas especificamente pela *C. sativa*, tendo variação nas suas concentrações de acordo com a parte da planta), sendo os principais, o  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol (THC), Canabidiol (CBD) e Canabiol (CBN). Dentre os canabinóides, o de maior importância psicoativa é o THC. O acúmulo dessa substância depende da parte da planta e das condições de plantio (local, condições do solo e manutenção do plantio), e tem sua maior concentração nas inflorescências femininas (KÖHNEMANN *et al.*, 2012).

O uso da planta para fins recreacionais é difundido no mundo inteiro, tendo as mais variadas formas de consumo e preparo. A forma mais comum é a inalação dos vapores produzidos pela incineração da planta seja em forma de cigarro ou através de ferramentas que auxiliem na queima e “[...] induz uma variedade de efeitos sensoriais e psicológicos, incluindo devaneio leve e euforia; intensificada consciência sensorial, criatividade e empatia; memória prejudicada em curto prazo; sentido alterado de tempo e espaço; apetite e desejo sexuais 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)



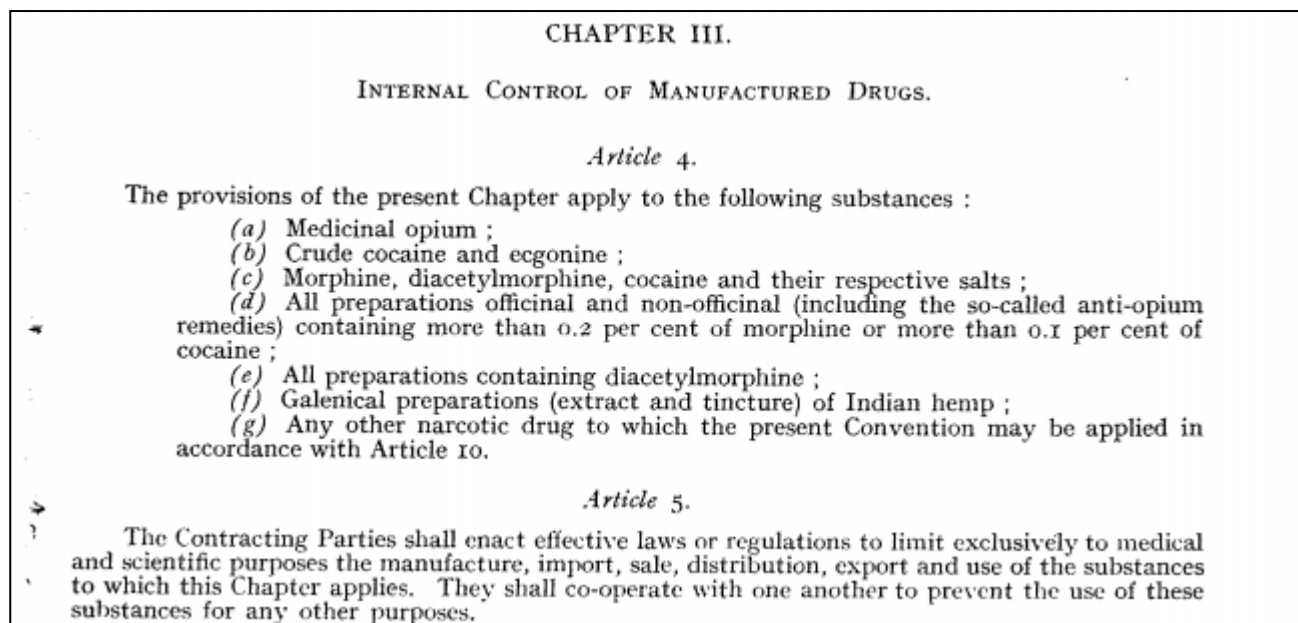
**Figura 1:** Ilustração das partes anatômicas da planta *Cannabis sativa*. **Legenda:** (A) inflorescências de uma planta masculina; (B) planta feminina semeada; 1- flor masculina; 2, 3- anteras, dois ângulos diferentes; 4- Pólen segmentado; 5- flor feminina com brácteas; 6- flor feminina sem brácteas; 7- flor feminina mostrando o ovário; 8- fruto com brácteas; 9, 10- fruto sem bráctea; 11, 12- fruto sem bráctea, seccionado; 13- semente sem tegumento. **Fonte:** Köhler, Hermann Adolph (1887) *Köhler's Medicinal Plants*.

Além dos efeitos acima descritos, o uso da maconha está associado à piora de condições patológicas, como taquicardia, intensificação ou desencadeamento de síndromes psiquiátricas e perda de flexibilidade mental, formação de conceitos e limitação na capacidade de abstração. (ALMEIDA *et al.*, 2008; SANCHES & MARQUES, 2010).

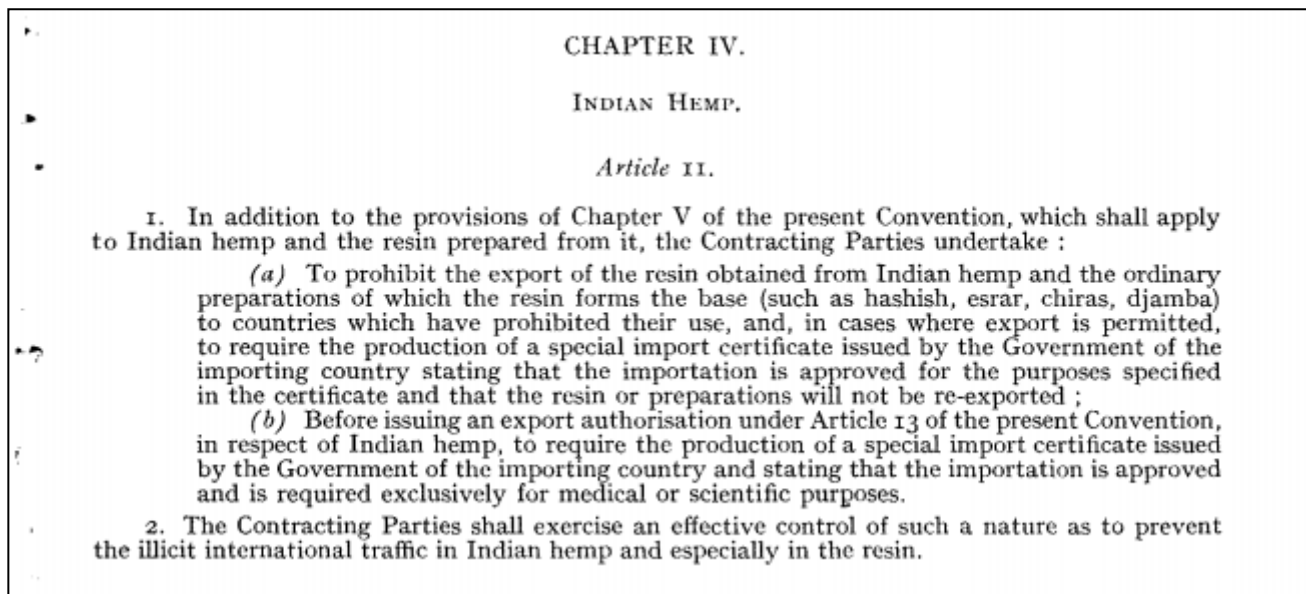
A primeira e recente revisão sobre o uso de maconha e possíveis danos à saúde encontrou uma associação significativa entre o consumo de *Cannabis sp.* na adolescência e o aumento do risco de depressão e intenções suicidas na vida adulta (GOBBI *et al.*, 2019). Estes resultados precisam ser replicados, porém levantam um alerta sobre o crescente consumo da planta como alucinógeno.

## QUESTÕES LEGAIS

A primeira proibição do uso da *C. sativa* ocorreu em 19 de fevereiro de 1925, durante a II Conferência Internacional do Ópio, em Genebra (Figura 2 e 3). Na convenção, a exportação, venda, produção, distribuição e uso da resina ou qualquer extração proveniente da planta foram proibidos, sendo apenas o uso científico permitido, mediante prévia autorização (LEAGUE OF NATIONS, 1925).



**Figura 2:** Capítulo terceiro, artigos 4º e 5º da convenção assinada na II Conferência Internacional do Ópio, em Genebra, 1925. **Fonte:** Texto original disponível em JSTOR (*Journal Storage*) <http://www.jstor.org/stable/2187338>



**Figura 3:** Capítulo quarto, artigo segundo da convenção assinada na II Conferência Internacional do Ópio, em Genebra, 1925. **Fonte:** Texto original disponível em JSTOR (*Journal Storage*) <http://www.jstor.org/stable/2187338>

Ao final de 1930, após assinatura do termo, a repressão e apreensão aos plantios de maconha iniciaram-se no Brasil. Apesar daquele combate inicial à planta, somente em 1976, a primeira lei foi implementada no país. A lei nº 6.368, de 21 de outubro, proibiu plantio, cultivo, colheita, exploração ou consumo de qualquer planta que apresentasse substâncias psicotrópicas.

Atualmente, a *Cannabis sativa* está relacionada na lista E – lista de plantas proscritas no território nacional, que podem originar substâncias entorpecentes e/ou psicotrópicas – e o THC citado na lista F2 – lista de substâncias de uso proscrito, no Brasil, sendo uma substância psicotrópica aquela que pode determinar dependência física ou psíquica – de acordo com a vigente Portaria SVS/MS nº 344, de 12 de maio de 1998.

A tipificação criminal do uso e/ou tráfico de drogas está disposta na lei nº 11.343, de outubro de 2006. Apesar do previsto no parágrafo segundo do artigo 28, o qual legisla que

*“Para determinar se a droga destinava-se a consumo pessoal, o juiz atenderá à natureza e à quantidade da substância apreendida, ao local e às condições em que se desenvolveu a ação, às circunstâncias sociais e pessoais, bem como à conduta e aos antecedentes do agente”;*

a discriminação entre usuário e traficante é subjetiva e está fortemente relacionada às características socioeconômicas do indivíduo abordado. O usuário, caracterizado no Artigo 28, não possui penas privativas de liberdade, ao passo que o traficante, caracterizado no Artigo 33, pode cumprir até 15 anos de reclusão.

A subjetividade da definição entre usuário e traficante trouxe diversos problemas, principalmente à nível carcerário. Após a “nova lei das drogas”, como é conhecida a lei nº 11.343, houve um considerável aumento nas prisões de indivíduos tipificados no artigo 33, especialmente homens de 18 a 29 anos, negros e de baixa renda. Esse é um tema delicado e foge do escopo do presente estudo e, dessa forma, não será aprofundado ao longo dessa dissertação.

## **CONSUMO ILEGAL**

De acordo com o último levantamento da *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNODC), cerca de 275 milhões de pessoas utilizaram algum tipo de droga, pelo menos uma vez, em 2016. Esse valor representa 5.6% da população adulta mundial entre 15-64 anos de idade, sendo que 11% desses usuários (0,6% da população mundial) sofrem com problemas de abuso com drogas (UNODC, 2018).

Atualmente, os opioides são o grupo de drogas que causam mais danos à saúde do indivíduo. Contudo, 3,8% da população utilizou *Cannabis sp.* no último ano, mantendo-a como a substância ilícita mais consumida no nível mundial. Apesar do nível de consumo de drogas ter se mantido estável nos últimos cinco anos, e o consumo de maconha também estabilizado ou diminuído em partes da Europa, nas Américas, o consumo aumentou (UNODC, 2018).

No Brasil, a maconha mantém-se como a droga mais consumida: em 2010, 3000 indivíduos entre 14 e 65 anos foram entrevistados e 2,1% deles usavam *Cannabis sp.* há pelo menos um ano (JUNGERMAN *et al.*, 2010). O último levantamento, 2015, feito pelo Centro de Referência em Álcool, Tabaco e Outras Drogas (CRATOD), com jovens de 12 a 18 anos atendidos pelo programa, apontou que 67% dos entrevistados atendidos pelo CRATOD já haviam utilizado ou ainda utilizam a substância.

## **TRÁFICO E PLANTIO**

Tratando-se de uma droga ilícita em muitos países, a obtenção da maconha dá-se pela compra no mercado ilícito ou de plantações *indoor*. O narcotráfico representa hoje um dos maiores agentes causadores de dano à sociedade e é responsável por consumir grande parte dos recursos públicos. No entanto, por tratar-se de um mercado rentável, ele torna-se cada vez mais atrativo. O levantamento feito pela *European Police* (EUROPOL), em 2017, demonstrou que 65% do crime organizado estão envolvidos no tráfico de drogas, representando um aumento de 35% desde 2013 (EUROPEAN UNION, 2017). A rentabilidade proporcionada



por esse mercado pode ter grande influência na economia de uma cidade, estado ou até mesmo um país. Um exemplo do narcotráfico internacional foi o Cartel de Medellín, o qual gerou milhões de dólares e exerceu influência direta na economia e no governo da Colômbia. Em 1988, na Convenção Contra o Narcotráfico e Tráfico Ilícito de Drogas Psicotrópicas, as Nações Unidas declararam que:

*“[I]llicit traffic generates large financial profits and wealth enabling transnational criminal organizations to penetrate, contaminate and corrupt the structures of government, legitimate commercial and financial business, and society at all its levels”.*

Da população carcerária do Brasil, um terço responde pelo crime de tráfico de entorpecentes. Já no Rio Grande do Sul, 26% dos presos são por tráfico, fato que demonstra o intenso envolvimento de indivíduos com o este delito (VELASCO *et al.*, 2017). Concomitante, o mercado ilícito de drogas não é apenas um problema de segurança, mas também uma questão de saúde pública, visto que o produto oferecido pelo narcotráfico também sofre adições e alterações, a fim de gerar uma maior rentabilidade/lucro. Tais alterações podem causar danos ainda maiores ao consumidor.

O combate às drogas, em nível global, vem sendo intensificado. No levantamento feito pela UNODC, em 2015, foram reportados 2,4 milhões de casos de apreensão às drogas, no mundo inteiro (Figura 4). A apreensão de *Cannabis sp.* ocupa mais de metade das apreensões feitas em 65 dos 135 países que reportaram plantações da planta em seu território (território que cobre 92% da população global) (UNODC, 2017).

A quantidade de *Cannabis sp.* apreendida em 2016, segundo os relatórios repassados a UNODC, aproxima-se de 10000 toneladas, tendo o México como país que reportou o maior número de apreensões e o Brasil ocupando a sexta posição, atrás do Paraguai e dos Estados Unidos no continente Americano (UNODC, 2018). Segundo a Polícia Federal, no ano de 2016, cerca de 225 mil kg de maconha foram apreendidos em território nacional. As principais rotas de tráfico no país incluem drogas provenientes do Polígono da Maconha – área territorial brasileira composta por diversas cidades do estado da Bahia e de Pernambuco, localizadas ao longo do Rio São Francisco e o norte do estado baiano –, do Paraguai e do Uruguai.

O controle do cultivo da droga no país tem diversas dificuldades, pois os plantios situam-se sempre em região de difícil acesso, territorialmente ampla e isolada. Aliado a isso, o controle necessita ser recorrente, visto que a cada ação policial, um novo plantio é realizado e em uma diferente localidade (MOREIRA, 2005). Pontes (2014) estimou que, no Polígono da Maconha, aproximadamente, 40 mil trabalhadores estão envolvidos no plantio de *Cannabis sp.*, direta ou indiretamente.

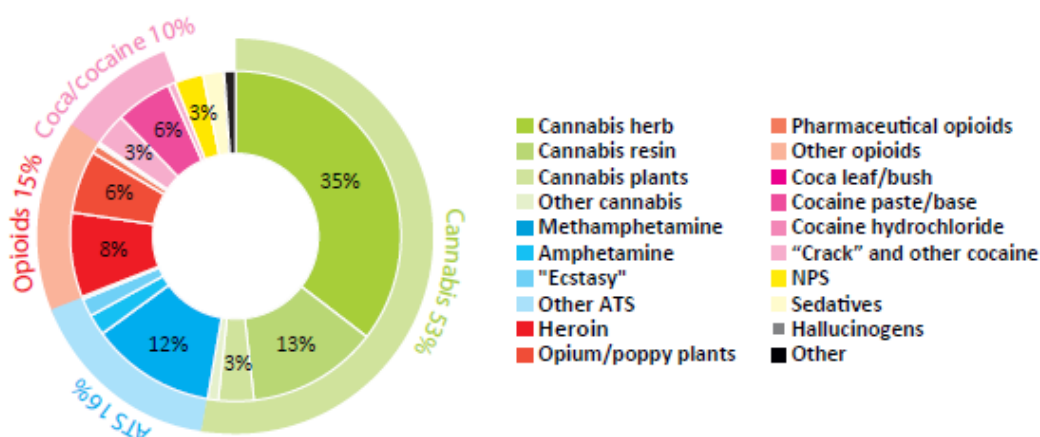


Figura 1. Source: UNODC, responses to the annual report questionnaire.

casos). Fonte: UNODC. Global Overview Of Drug Demand And Supply, 2018.

is de

Além disso, nos últimos anos, a forma de traficar drogas está mudando. A Polícia Federal verificou um aumento exponencial no número de apreensões de sementes de *Cannabis sp.* nos correios. Esta mudança pode ser uma consequência do aumento dos programas de erradicação de plantações em larga escala e à preferência por plantios em estufas, o qual possibilita maior controle de qualidade e de rendimento. Tal tendência também foi observada no continente europeu (DE BACKER *et al.*, 2012; UNODC, 2017). Na Bélgica, o aumento de 250% nas apreensões de cultivos *indoor* foi observado entre um período de oito anos (2007 a 2015), sendo que 43% das apreensões de 2015 continham mais de 50 plantas (CUYPERS *et al.*, 2017). Esse mesmo alto número de plantas nos cultivos *indoor* também foi observado na Espanha, onde, em 2013, 748 plantações foram apreendidas, sendo que destas 86% possuíam mais de duzentas plantas (ALVAREZ *et al.*, 2016). Aliado ao problema de tráfico, os cultivos *indoor*, demandam uma grande quantidade de energia elétrica, muitas vezes também obtida de forma ilegal. Estima-se que, anualmente, o gasto energético para produção de *Cannabis sp. indoor* seja de seis bilhões de dólares (MILLS, 2012).

## RASTREABILIDADE

Considerando o cenário do narcotráfico atual, fazem-se necessárias metodologias capazes de rastrear possíveis origens da *Cannabis sp.* Tais técnicas permitem, aos órgãos competentes, a obtenção de informações complementares, como origem e rotas de tráfico, a fim de auxiliar no monitoramento, na fiscalização e na apreensão da droga. Segundo a UNODC, os métodos para identificação e análise da *Cannabis sp.* são divididos em: Métodos Físicos, Métodos Químicos e Outros Métodos (UNODC, 2017).

Os métodos físicos são aqueles que avaliam a morfologia da planta, macro e microscopicamente, variações nas flores, folhas e/ou frutos, bem como na cor e indicam diferentes áreas e condições de cultivo.

Os métodos químicos avaliam o teor de THC por meio de cromatografia associada a diferentes detectores. No Brasil, esse é o único teste realizado pela Polícia Federal em casos de apreensão. Diversas outras análises entram na classificação de outros métodos. Dentre eles, estão às análises isotópicas, as quais observam as variações isotópicas de carbono e nitrogênio; os métodos mineralógicos, os quais analisam as concentrações e diversidades de minerais que variam de local para local e os métodos moleculares.

Os métodos moleculares para análise e rastreabilidade da maconha contemplam uma variedade de técnicas genéticas, além de novas propostas metodológicas que continuam emergindo. Alguns estudos moleculares, na tentativa de identificação geográfica, avaliaram marcadores RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) (JAGADISH *et al.*, 1996), DNA organelar (GILMORE; PEAKALL; ROBERTSON, 2007; HOUSTON *et al.*, 2018a; RIBEIRO *et al.*, 2013) e STRs (*short tandem repeats*) (ALGHANIM & ALMIRALL, 2003a; HOUSTON *et al.*, 2015, 2017).

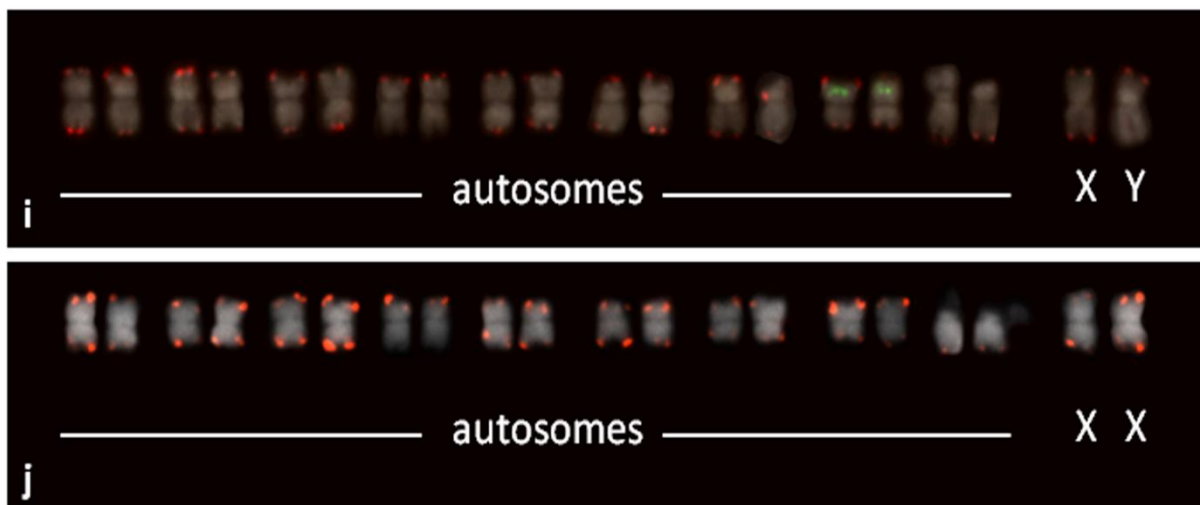
Neste âmbito, os STRs vêm ganhando importância devido ao perfil genético individual de cada planta que pode ser gerado a partir da escolha de painéis específicos. *Short tandem repeats* são definidos como curtas sequências (2 a 6 nucleotídeos) que se repetem em tandem, ocorrendo em plantas e animais, em média, uma sequência a cada 33kb em plantas e uma a cada 6kb em humanos (WANG *et al.*, 1994). Normalmente, estão localizados em regiões não codificantes, e a quantidade varia de acordo com o tamanho genômico do organismo (TÓTH *et al.*, 2000). Weber (1990) dividiu a estrutura de repetição dos microssatélites em três grupos: repetições perfeitas (sem interrupções ex. (CAG)<sub>6</sub>), repetições imperfeitas (interrompidas por uma base aleatória ex. (CAG)<sub>3</sub>(T)<sub>1</sub>(CAG)<sub>3</sub>) e repetições complexas (duas ou mais repetições adjacentes uma a outra ex. (CAG)<sub>3</sub>(TTTA)<sub>3</sub>). A relativa fácil reprodutibilidade dos experimentos de STR, utilização de PCR multiplex, a heterozigotidade e o alto polimorfismo caracterizam os STRs como o principal método de escolha para análises forenses.

### **STR PARA *Cannabis sp.***

O primeiro painel de STR para *Cannabis sp.* foi desenvolvido em 2003, por Gilmore e colaboradores (2003). Neste estudo, os autores buscaram em todo genoma da planta unidades de dois a quatro nucleotídeos com, pelo menos, dez repetições. Como resultado, o grupo descreveu 11 microssatélites capazes de discriminar as amostras individualmente e de relacioná-las (GILMORE *et al.*, 2003). Apesar de não possuírem uma descrição exata da posição genômica, estudos complementares vêm relatando novos STRs para a *Cannabis sp.*, bem como, a utilização deles para fins forenses (ALGHANIM & ALMIRALL, 2003b; HOWARD *et al.*, 2008, 2009).

O genoma parcial da *Cannabis sativa* foi descrito apenas em 2011 e com auxílio de outros estudos, foi possível caracterizar o seu cariótipo. A planta é um organismo diploide com 10 cromossomos, sendo dois

sexuais (X e Y) (VAN BAKEL et al., 2011; DIVASHUK et al., 2014). Os cromossomos possuem, em média, o mesmo tamanho, sendo o Y o maior deles (Figura 5).



**Figura 5:** Cariótipo da *Cannabis sativa* masculina (i) e feminina (j) produzido através da técnica de FISH. Fonte: Divashuk *et al.* (2014) “Molecular Cytogenetic Characterization of the Dioecious *Cannabis sativa* with an XY Chromosome Sex Determination System

Na reprodução sexuada (polinização da planta feminina pelo pólen da planta masculina) há segregação de cromossomos na meiose e, conseqüente transmissão para a planta filha, sendo o perfil da planta filha composto a partir do perfil dos genitores. Na reprodução clonal, na qual mudas da planta original são propagadas, o mesmo perfil genético é mantido ao longo das gerações.

Um estudo utilizando STRs previamente descritos para *Cannabis sp.*, seguindo os protocolos da *International Society of Forensic Genetic (ISFG)* e o *Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM)*, desenvolveu um Painel Multiplex de 13 loci de STR. Os resultados demonstraram a aplicabilidade deste painel para identificação da planta (HOUSTON *et al.*, 2015) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Painel contendo 13 loci STR (*set 13-loci STR*), segundo Houston *et al.* (2015), utilizado no primeiro estudo realizado Laboratório de Genética Humana e Molecular | Genética Forense, PUCRS: marcadores, tipo de STR, motivo da repetição, tipo de repetição e alelos observados.

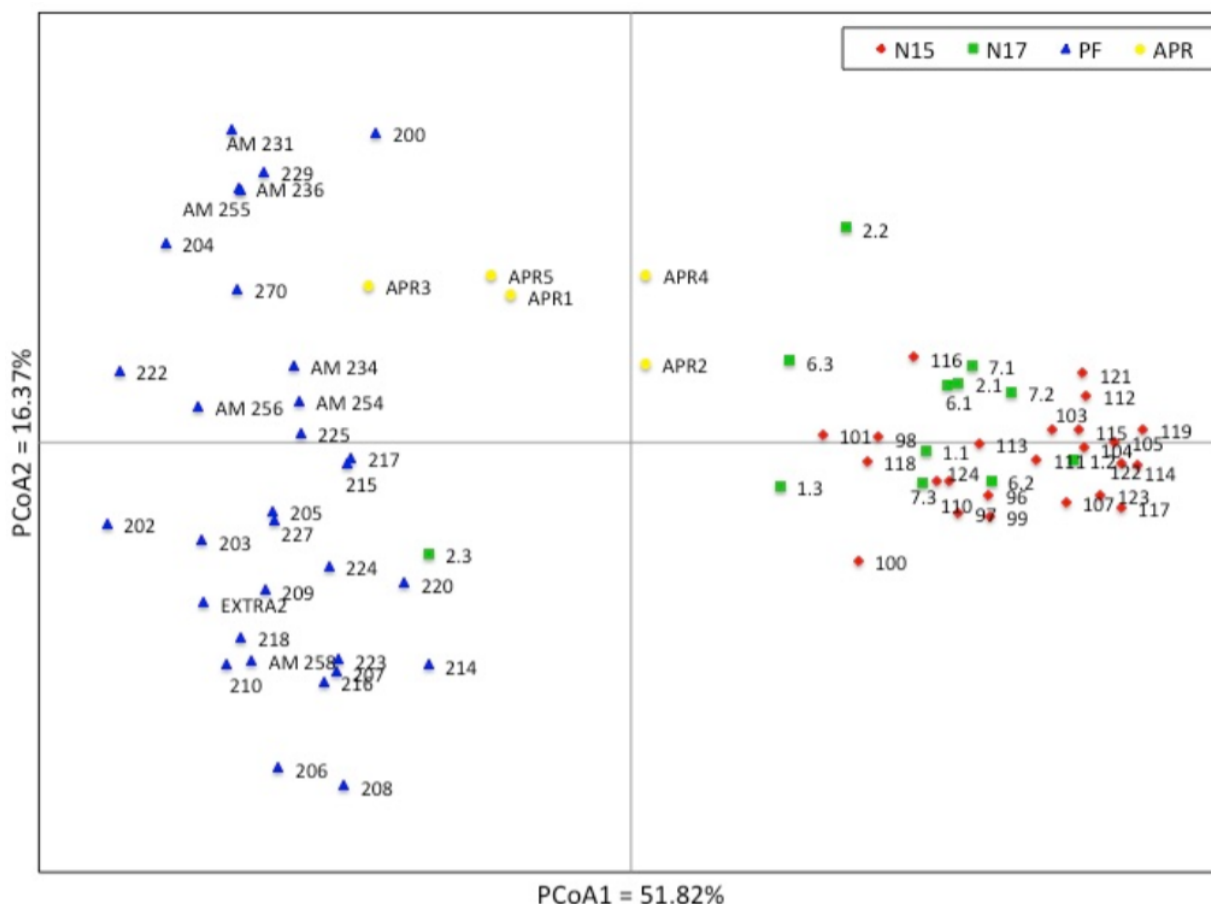
MARCADOR	TIPO	MOTIVO	REPETIÇÃO	ALELOS OBSERVADOS
D02	Tri-nucleotide	(GTT)	Simples	6, 7, 8
C11	Tri-nucleotide	(TGA) (TGG)	Composta/Indel	13, 14, 15
H09	Bi-nucleotide	(GA)	Simples	11, 12, 16, 18, 19, 20, 21, 22,23, 24
B01	Complexo	(GAA) (A)(GAA)	Complexa	10, 13, 14, 15
E07	Tri-nucleotide	(ACT)	Simples	7, 8, 9
305	Tri-nucleotide	(TGG)	Simples	4, 8, 9

308	Bi-nucleotide	(TA)	Simple	3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13
B05	Tri-nucleotide	(TGG)	Simple	7, 8, 9, 10
H06	Tri-nucleotide	(ACG)	Simple	7, 8, 9
ANUCS501	Penta-nucleotide	(TTGTG)	Simple	4, 5, 6
CS1	Hexa-nucleotide	(CACCAT)	Simple	12, 14, 17, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30
302	Tri-nucleotide	(ACA) (ACA) (ACA)	Composta	22, 29, 31, 33, 36
301	Tri-nucleotide	(TTA)	Simple	6, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 24, 25

Seguindo os propósitos do estudo de Houston *et al.* (2015), assim que foi publicado, a equipe do laboratório de Ciências do Solo, UFRGS, coordenado pelo Dr. Flávio Anastácio de Oliveira Camargo, juntamente com peritos da Polícia Federal do RS, estabeleceu no Laboratório de Genética Humana e Molecular – Genética Forense (PUCRS) um sistema de detecção por STR utilizando o painel de 13 loci para *Cannabis sp.* desenvolvido no artigo supracitado.

Durante os anos de 2014 e 2017, amostras de maconha de 72 lotes apreendidos pela PF foram coletadas e analisadas. Destas amostras, 36 são provenientes de duas operações de erradicação (entende-se por operação de erradicação a ação policial realizada nos plantios com o intuito de erradicar a plantação e possível distribuição do entorpecente) realizadas no nordeste brasileiro em dois anos diferentes, sendo 24 amostras em 2015 e 12 amostras em 2017. Através da apreensão de sementes nos correios de Guarulhos, SP, a Polícia Federal semeou e cultivou 31 amostras de diferentes *labels* e origem vegetal desconhecida. As demais cinco amostras foram provenientes de apreensões feitas no Rio Grande do Sul, porém não foi possível localizar a origem da plantação, obtendo-se apenas o bloco prensado da droga; apesar disso, acredita-se que esta amostra seja proveniente do Paraguai, dado o histórico do tráfico presente em documentos oficiais da Polícia Federal do RS.

Todas as amostras foram amplificadas e analisadas utilizando o painel de 13 loci de STR proposto por Houston *et al.* (2015), no entanto, o perfil completo só foi gerado para 33 amostras (40,3%). A análise de coordenadas principais, utilizando dois componentes, permitiu a discriminação das amostras de acordo com a origem geográfica das apreensões. Apesar de coletadas em anos diferentes, através da variabilidade genética entre essas amostras, as amostras apreendidas no nordeste brasileiro agruparam-se entre si (com exceção de uma amostra 2.3 de 2017). De forma visual, a Análise de Coordenadas Principais (PCoA) permite visualizar o agrupamento das amostras de acordo com a sua região de apreensão (Figura 6).



**Figura 6:** Análise de Coordenadas Principais realizada nas 72 amostras apreendidas no Brasil pela Polícia Federal. **Legenda:** N15: Amostras apreendidas no nordeste brasileiro no ano de 2015; N17: Amostras apreendidas no nordeste brasileiro no ano de 2017; PF: Amostras cultivadas pela Polícia Federal a partir de sementes apreendidas nos correios de Guarulhos, SP e APR: Apreensões de “prensados” no estado do Rio Grande do Sul. **Fonte:** Parte dos resultados obtidos no estudo de doutorado realizado por Mauro Sander Fett no Laboratório de Genética Humana e Molecular, PUCRS em parceria com a Polícia Federal e Laboratório de Solos, UFRGS.

A análise de componentes múltiplos para cada alelo de cada genótipo/amostra, considerando o seu lote de apreensão permitiu a classificação de 100% das amostras dentro dos grupos pré-definidos e, para todos os grupos analisados, a combinação dos 13 loci de STR foi suficiente para diferenciar os genótipos das amostras. Estes resultados fazem parte da Tese de doutorado do Dr. Mauro Sander Fett realizado no Laboratório de Genética Humana e Molecular, PUCRS em parceria com o Laboratório de Ciências do Solo, UFRGS, e a Polícia Federal. O artigo original é intitulado “13-LOCI STR MULTIPLEX SYSTEM TO GENOTYPE BRAZILIAN *Cannabis sativa* SEIZURE” pode ser encontrado através do DOI: 10.1007/s00414-018-1940-3.

Baseados no próprio último estudo, Houston *et al.* (2017) publicaram um artigo com um novo painel de 13 loci de STR de *Cannabis sp.* otimizado para análises forenses. Neste novo set os autores substituíram 6 loci que demonstraram baixa eficiência por 6 novos loci tetranucleotídeos (motivo de repetição igual a quatro nucleotídeos) recentemente descritos na literatura. A reação de PCR, número de ciclos e temperatura de anelamento, foram otimizados equiparando a robustez do método ao método de identificação humana por STR. De acordo com os autores, o novo painel possui eficiência superior (100%) quando comparado ao painel

de 2015 (64%), propondo, dessa forma o recente painel como o mais indicado para fins forenses na população de plantas por eles analisados.

## **OBJETIVO**

### **OBJETIVO GERAL**

- Testar dois sistemas multiplex de análises de microssatélites a fim de identificar o melhor conjunto de marcadores de STR capaz de identificar e de rastrear a origem de *Cannabis sativa* apreendida em território brasileiro.

### **OBJETIVO ESPECÍFICO**

- Determinar a eficácia, sendo está a capacidade do sistema de individualizar amostras de *Cannabis sp.* quanto à identidade e origem geográfica, de cada um dos dois painéis STR, com 13 loci cada, e do conjunto total dos 19 marcadores STR.
- Aferir, dentre os dois painéis avaliados, o mais eficiente, considerando os parâmetros forenses para identificação e rastreabilidade geográfica, para amostras de *Cannabis sp.* traficadas em território brasileiro.
- Comparar a eficiência obtida através do Painel eleito como mais eficiente com a eficiência do conjunto total dos 19 marcadores STR, bem como avaliar se há vantagens na utilização do conjunto completo.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKRAM, Nuzhat A. **DNASF: A Statistical Package to Analyze the Distribution and Polymorphism of CODIS STR Loci in a Heterogeneous Population** *Journal of Forensic Research OMICS International*, , 2012. Disponível em: <<https://www.omicsonline.org/dnasf-a-statistical-package-to-analyze-the-distribution-and-polymorphism-of-codis-str-loci-in-a-heterogeneous-population-2157-7145.1000170.php?aid=10374>>
- ALGHANIM, H. J.; ALMIRALL, J. R. Development of microsatellite markers in Cannabis sativa for DNA typing and genetic relatedness analyses. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 376, n. 8, p. 1225–1233, 2003. a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12811461>>. Acesso em: 31 out. 2017.
- ALGHANIM, H. J.; ALMIRALL, J. R. Development of microsatellite markers in Cannabis sativa for DNA typing and genetic relatedness analyses. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 376, n. 8, p. 1225–1233, 2003. b. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00216-003-1984-0>>. Acesso em: 14 nov. 2017.
- ALLGEIER, Lindsay et al. Field Testing of Collection Cards for Cannabis sativa Samples With a Single Hexanucleotide DNA Marker\*, †. **Journal of Forensic Sciences**, [s. l.], v. 56, n. 5, p. 1245–1249, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2011.01818.x>>
- ALMEIDA, Priscila Previato et al. Revisão: funcionamento executivo e uso de maconha. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 69–76, 2008. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-44462008000100013&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-44462008000100013&lng=pt&tlng=pt)>. Acesso em: 17 out. 2017.
- ALVAREZ, Arturo; GAMELLA, Juan F.; PARRA, Iván. Cannabis cultivation in Spain: A profile of plantations, growers and production systems. **International Journal of Drug Policy**, [s. l.], v. 37, p. 70–81, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27619556>>. Acesso em: 8 nov. 2017.
- BRENNER, Charles. Paternity Index Calculations in Single Locus Hypervariable DNA Probes : Validation and Other Studies. **Proceedings for The International Symposium on Human Identification 1989**, [s. l.], p. 21–53, 1990. Disponível em: <<https://ci.nii.ac.jp/naid/10025752766/en/>>
- BUDOWLE, Bruce et al. Mixture interpretation: defining the relevant features for guidelines for the assessment of mixed DNA profiles in forensic casework. **Journal of forensic sciences**, United States, v. 54, n. 4, p. 810–821, 2009.
- CHAKRABORTY, Ranajit. Analysis of Genetic Structure of Populations: Meaning, Methods, and Implications BT - Human Population Genetics: A Centennial Tribute to J. B. S. Haldane. In: MAJUMDER, Partha P. (Ed.). Boston, MA: Springer US, 1993. p. 189–206.
- CUYPERS, Eva et al. The use of pesticides in Belgian illicit indoor cannabis plantations. **Forensic Science International**, [s. l.], v. 277, p. 59–65, 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0379073817301871?via%3Dihub>>. Acesso em: 8 nov. 2017.
- DATWYLER, Shannon L.; WEIBLEN, George D. Genetic variation in hemp and marijuana (Cannabis sativa L.)

according to amplified fragment length polymorphisms. **Journal of forensic sciences**, United States, v. 51, n. 2, p. 371–375, 2006.

DE BACKER, Benjamin et al. Evolution of the Content of THC and Other Major Cannabinoids in Drug-Type Cannabis Cuttings and Seedlings During Growth of Plants\*. **Journal of Forensic Sciences**, [s. l.], v. 57, n. 4, p. 918–922, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22390363>>. Acesso em: 10 nov. 2017.

DIVASHUK, Mikhail G. et al. Molecular Cytogenetic Characterization of the Dioecious Cannabis sativa with an XY Chromosome Sex Determination System. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. e85118, 2014. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0085118>>. Acesso em: 14 nov. 2017.

DNEYA (QIAGEN). **Mericon Food Handbook**. Valencia, CA: Qiagen, 2010.

DNEYA (QIAGEN). **Plant Handbook**. Valencia, CA: Qiagen, 2013.

EUROPEAN UNION. **SERIOUS AND ORGANISED CRIME THREAT ASSESSMENT**. [s.l: s.n.].

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, [s. l.], v. 14, n. 8, p. 2611–2620, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>>

FETT, Mauro Sander et al. 13-loci STR multiplex system for Brazilian seized samples of marijuana: individualization and origin differentiation. **International journal of legal medicine**, Germany, 2018.

GAO, Chunsheng et al. Diversity analysis in Cannabis sativa based on large-scale development of expressed sequence tag-derived simple sequence repeat markers. **PloS one**, United States, v. 9, n. 10, p. e110638, 2014.

GILMORE, Simon; PEAKALL, Rod; ROBERTSON, James. Short tandem repeat (STR) DNA markers are hypervariable and informative in Cannabis sativa: implications for forensic investigations. **Forensic science international**, [s. l.], v. 131, n. 1, p. 65–74, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12505473>>. Acesso em: 14 nov. 2017.

GILMORE, Simon; PEAKALL, Rod; ROBERTSON, James. Organelle DNA haplotypes reflect crop-use characteristics and geographic origins of Cannabis sativa. **Forensic Science International**, [s. l.], v. 172, n. 2–3, p. 179–190, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17293071>>. Acesso em: 31 out. 2017.

GOBBI, Gabriella et al. Association of Cannabis Use in Adolescence and Risk of Depression, Anxiety, and Suicidality in Young Adulthood: A Systematic Review and Meta-analysis Cannabis Use in Adolescence and Risk of Depression, Anxiety, and Suicidality in Young Adulthood Cannabis Us. [s. l.], 2019. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2018.4500>>

GOUY, Alexandre; ZIEGER, Martin. STRAF-A convenient online tool for STR data evaluation in forensic genetics. **Forensic science international. Genetics**, Netherlands, v. 30, p. 148–151, 2017.

HONG, Shao; CLARKE, Robert C. Taxonomic studies of Cannabis in China. **Journal of the International Hemp Association**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 55–60, 1949.

HOUSTON, Rachel et al. Evaluation of a 13-loci STR multiplex system for Cannabis sativa genetic identification. **International Journal of Legal Medicine**, [s. l.], v. 130, n. 3, p. 635–647, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26661945>>. Acesso em: 31 out. 2017.

HOUSTON, Rachel et al. Developmental and internal validation of a novel 13 loci STR multiplex method for Cannabis sativa DNA profiling. **Legal Medicine**, [s. l.], v. 26, p. 33–40, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1344622317300767>>. Acesso em: 31 out. 2017.

HOUSTON, Rachel et al. Nuclear, chloroplast, and mitochondrial data of a US cannabis DNA database. **International journal of legal medicine**, Germany, v. 132, n. 3, p. 713–725, 2018. a.

HOUSTON, Rachel et al. Massively parallel sequencing of 12 autosomal STRs in Cannabis sativa. **Electrophoresis**, Germany, v. 39, n. 22, p. 2906–2911, 2018. b.

HOWARD, Christopher et al. Developmental Validation of a *Cannabis sativa* STR Multiplex System for Forensic Analysis. **Journal of Forensic Sciences**, [s. l.], v. 53, n. 5, p. ???-???, 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1556-4029.2008.00792.x>>. Acesso em: 14 nov. 2017.

HOWARD, Christopher et al. A *Cannabis sativa* STR Genotype Database for Australian Seizures: Forensic Applications and Limitations. **Journal of Forensic Sciences**, [s. l.], v. 54, n. 3, p. 556–563, 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1556-4029.2009.01014.x>>. Acesso em: 14 nov. 2017.

HSIEH, Hsing-Mei et al. A highly polymorphic STR locus in Cannabis sativa. **Forensic Science International**, [s. l.], v. 131, n. 1, p. 53–58, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037907380200395X>>

HSIEH, Hsing-Mei et al. Characterization of the polymorphic repeat sequence within the rDNA IGS of Cannabis sativa. **Forensic science international**, Ireland, v. 152, n. 1, p. 23–28, 2005.

IVERSEN, Leslie Lars. The Science of Marijuana, 2nd edn. **British Journal of Clinical Pharmacology**, [s. l.], v. 67, n. 2, p. 268, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2670388/>>

JAGADISH, Vidya; ROBERTSON, James; GIBBS, Adrian. RAPD analysis distinguishes Cannabis sativa samples from different sources. **Forensic Science International**, [s. l.], v. 79, n. 2, p. 113–121, 1996. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0379073896018981>>. Acesso em: 31 out. 2017.

JEANGKHOWA, Pattaporn et al. Identification of Cannabis sativa L. using the 1-kbTHCA synthase-fluorescence in situ hybridization probe. **Science & justice : journal of the Forensic Science Society**, England, v. 57, n. 2, p. 101–106, 2017.

JUNGERMAN, Flávia S. et al. Prevalence of cannabis use in Brazil: Data from the I Brazilian National Alcohol Survey (BNAS). **Addictive Behaviors**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 190–193, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19892469>>. Acesso em: 18 out. 2017.

KITAMURA, Masashi et al. Development of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for Rapid Detection of Cannabis sativa. **Biological & pharmaceutical bulletin**, Japan, v. 39, n. 7, p. 1144–1149, 2016.

KOHJYOUA, M. et al. Intraspecific variation in Cannabis sativa L. based on intergenic spacer region of chloroplast DNA. **Biological & pharmaceutical bulletin**, Japan, v. 23, n. 6, p. 727–730, 2000.

KÖHNEMANN, Stephan et al. The validation of a 15 STR multiplex PCR for Cannabis species. **International Journal of Legal Medicine**, [s. l.], v. 126, n. 4, p. 601–606, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22573357>>. Acesso em: 16 out. 2017.

KOJOMA, Mareshige et al. DNA fingerprinting of Cannabis sativa using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. **Planta medica**, Germany, v. 68, n. 1, p. 60–63, 2002.

KOJOMA, Mareshige et al. DNA polymorphisms in the tetrahydrocannabinolic acid (THCA) synthase gene in “drug-type” and “fiber-type” Cannabis sativa L. **Forensic science international**, Ireland, v. 159, n. 2–3, p. 132–140, 2006.

KOPELMAN, Naama M. et al. Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. **Molecular Ecology Resources**, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 1179–1191, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12387>>

LEAGUE OF NATIONS. **Albania - International Convention, Adopted by the Second Opium Conference Signed at Geneva**. 1925. Disponível em: <<http://www.worldlii.org/int/other/LNTSer/1928/231.html>>. Acesso em: 17 out. 2017.

LINNÉ, Carl Von; SALVIUS, Lars. **Caroli Linnaei ... Species plantarum :exhibentes plantas rite cognitatas, ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas...** Holmiae : Impensis Laurentii Salvii, 1753. Disponível em: <<https://www.biodiversitylibrary.org/item/13830>>. Acesso em: 14 out. 2017.

MELLO, I. C. T. et al. A segment of rbcL gene as a potential tool for forensic discrimination of Cannabis sativa seized at Rio de Janeiro, Brazil. **International journal of legal medicine**, Germany, v. 130, n. 2, p. 353–356, 2016.

MENDOZA, Maria A. et al. Genetic individualization of Cannabis sativa by a short tandem repeat multiplex system. **Analytical and bioanalytical chemistry**, Germany, v. 393, n. 2, p. 719–726, 2009.

METHODS, Scientific Working Group on DNA Analysis. **SWGDM Validation Guidelines for DNA Analysis Methods**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.swgdam.org/publications>>

MILLS, Evan. The carbon footprint of indoor Cannabis production. **Energy Policy**, [s. l.], v. 46, p. 58–67, 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301421512002285>>. Acesso em: 8 nov. 2017.

MOREIRA, Erika Macedo. A despenalização do trabalhador rural preso no cultivo da Cannabis Sativa. **Confluência - Revista Interdisciplinar de Sociologia e Direito**, [s. l.], 2005. Disponível em: <<http://www.confluencias.uff.br/index.php/confluencias/article/viewFile/232/78>>. Acesso em: 29 out. 2017.

NASCIMENTO, Iendel Rubio Do. Identificação Química em Nível Molecular de Amostras de Maconha por ESI-FT-ICR MS. [s. l.], 2014. Disponível em: <<http://repositorio.ufes.br/handle/10/1233>>. Acesso em: 17 out. 2017.

OLAISEN, B. et al. DNA recommendations 1997 of the International Society for Forensic Genetics. **Vox**

**sanguinis**, England, v. 74, n. 1, p. 61–63, 1998.

PINARKARA, Emine et al. **RAPD analysis of seized marijuana (Cannabis sativa L.) in Turkey**. [s.l.: s.n.]. v. 12

RIBEIRO, ASD et al. O gene rbcL como barcode para identificação forense de Cannabis sativa. **Saúde, Ética & Justiça**, [s. l.], v. 18, n. spe, p. 67, 2013. Disponível em:

<<http://www.revistas.usp.br/sej/article/view/57842>>. Acesso em: 31 out. 2017.

ROTHERHAM, D.; HARBISON, S. A. Differentiation of drug and non-drug Cannabis using a single nucleotide polymorphism (SNP) assay. **Forensic science international**, Ireland, v. 207, n. 1–3, p. 193–197, 2011.

SANCHES, Rafael Faria; MARQUES, João Mazzoncini de Azevedo. Cannabis e humor. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, [s. l.], v. 32, n. 2, p. 173–180, 2010. Disponível em:

<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-44462010000200014&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-44462010000200014&lng=pt&tlng=pt)>.

Acesso em: 17 out. 2017.

SHIBUYA, Elisa K. et al. Carbon and nitrogen stable isotopes as indicative of geographical origin of marijuana samples seized in the city of São Paulo (Brazil). **Forensic Science International**, [s. l.], v. 167, n. 1, p. 8–15, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0379073806003562>>

SHIRLEY, Nicholas et al. Analysis of the NMI01 Marker for a Population Database of Cannabis Seeds. **Journal of Forensic Sciences**, [s. l.], v. 58, n. s1, p. S176–S182, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/1556-4029.12005>>

SMOUSE, Peter E.; PEAKALL, Rod. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 28, n. 19, p. 2537–2539, 2012. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>>

SOLER, Salvador et al. Use of Embryos Extracted from Individual Cannabis sativa Seeds for Genetic Studies and Forensic Applications. **Journal of forensic sciences**, United States, v. 61, n. 2, p. 494–500, 2016.

SOLTIS, Pamela S.; SOLTIS, Douglas E. Polyploidy and genome evolution. **Polyploidy and Genome Evolution**, [s. l.], v. 9783642314, p. 1–415, 2012.

SOUZA, Daniele Z. et al. Roteiro ilustrado para identificação morfológica de Cannabis sativa L. **Perícia Federal**, [s. l.], v. 24, p. 16–22, 2006.

STAGINNUS, Christina; ZORNTLEIN, Siegfried; DE MEIJER, Etienne. A PCR marker linked to a THCA synthase polymorphism is a reliable tool to discriminate potentially THC-rich plants of Cannabis sativa L. **Journal of forensic sciences**, United States, v. 59, n. 4, p. 919–926, 2014.

TÓTH, G.; GÁSPÁRI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome research**, [s. l.], v. 10, n. 7, p. 967–81, 2000. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10899146>>. Acesso em: 14 nov. 2017.

UNODC. GLOBAL OVERVIEW OF DRUG DEMAND AND SUPPLY. [s. l.], 2017. Disponível em:

<[https://www.unodc.org/wdr2017/field/Booklet\\_2\\_HEALTH.pdf](https://www.unodc.org/wdr2017/field/Booklet_2_HEALTH.pdf)>. Acesso em: 18 out. 2017.

UNODC, United Nations Office on Drugs and Crime. **Global overview of drug demand and supply**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <[https://www.unodc.org/wdr2018/prelaunch/WDR18\\_Booklet\\_2\\_GLOBAL.pdf](https://www.unodc.org/wdr2018/prelaunch/WDR18_Booklet_2_GLOBAL.pdf)>

VALVERDE, Laura et al. **Nomenclature proposal and SNPSTR haplotypes for 7 new Cannabis sativa L. STR loci.** *Forensic science international. Genetics* Netherlands, 2014.

VAN BAKEL, Harm et al. The draft genome and transcriptome of Cannabis sativa. *Genome Biology*, [s. l.], v. 12, n. 10, p. R102, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-10-r102>>

VELASCO, Clara; D'AGOSTINO, Rosanne; REIS, Thiago. **Um em cada três presos do país responde por tráfico de drogas | Política | G1.** 2017. Disponível em: <<https://g1.globo.com/politica/noticia/um-em-cada-tres-presos-do-pais-responde-por-traffic-de-drogas.ghtml>>. Acesso em: 18 out. 2017.

WANG, Z. et al. Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, [s. l.], v. 88, n. 1, p. 1–6, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24185874>>. Acesso em: 14 nov. 2017.

WARF, Barney. High Points: An Historical Geography of Cannabis. *Geographical Review*, [s. l.], v. 104, n. 4, p. 414–438, 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1931-0846.2014.12038.x>>. Acesso em: 16 out. 2017.

WATTS, Geoff. Cannabis confusions. *BMJ : British Medical Journal*, [s. l.], v. 332, n. 7534, p. 175–176, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1336775/>>

WEBER, J. L. Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub>.(dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. *Genomics*, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 524–30, 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1974878>>. Acesso em: 14 nov. 2017.

WEIBLEN, George D. et al. Gene duplication and divergence affecting drug content in Cannabis sativa. *The New phytologist*, England, v. 208, n. 4, p. 1241–1250, 2015.

YANG, Mei-Qing et al. **Molecular Phylogenetics and character evolution of Cannabaceae.** [s.l: s.n.]. v. 62

ZHANG, L. G. et al. Analysis of the genetic diversity of Chinese native Cannabis sativa cultivars by using ISSR and chromosome markers. *Genetics and molecular research : GMR*, Brazil, v. 13, n. 4, p. 10490–10500, 2014.

## ARTIGO CIENTÍFICO

Manuscrito preparado segundo as recomendações do *International Journal of Legal Medicine*, para o qual será submetido (recomendações em: [https://www.springer.com/medicine/pathology/journal/414?detailsPage=pltc\\_i\\_1060639](https://www.springer.com/medicine/pathology/journal/414?detailsPage=pltc_i_1060639))

## CERTIFICADO DE SUBMISSÃO

<b>International Journal of Legal Medicine</b>		
<b>Evaluation of Two 13-Loci STR Multiplex System Regarding Identification and Origin Discrimination of Brazilian Cannabis sativa samples.</b>		
<b>--Manuscript Draft--</b>		
Manuscript Number:	IJLM-D-19-00687	
Full Title:	Evaluation of Two 13-Loci STR Multiplex System Regarding Identification and Origin Discrimination of Brazilian Cannabis sativa samples.	
Article Type:	Original Article	
Corresponding Author:	Lucas de Oliveira Pereira Ribeiro, MSc Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul Porto Alegre, Rio Grande do Sul BRAZIL	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Lucas de Oliveira Pereira Ribeiro, MSc	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Lucas de Oliveira Pereira Ribeiro, MSc Eduardo Filipe Ávila Roberta Fogliatto Mariot Mauro Sander Fett Flávio Anastácio de Oliveira Camargo Clarice Sampaio Alho	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Finance Code 001)	Not applicable
Abstract:	<p>Brazilian Cannabis sativa illicit market is mainly supplied by drugs originated from Paraguay and Northeastern Brazil (marijuana polygon region). However, other sources as indoor cultivations (supported by online seeds market), and Uruguay are also in Brazilian Federal Police (BFP) sight. Forensic tools to aid police intelligence were published in the last years. In genetics, microsatellites have gained attention due to their individualization capability. The aim of this study is to evaluate the effectiveness and efficiency of two STR multiplex systems previously proposed in 94 Brazilian samples seized by BFP. Principal coordinate analyses (PCoA), forensic parameters, and genetic structure analysis were executed. Both panels were effective in individualizing and origin discriminating all samples, although the system proposed in 2015 demonstrated better results. For this marker set, PI for a random individual is approximately one in 65 billion, in addition, the PCoA shows a clear genetic distinction among samples according to its origin. Bayesian inference populational structure analysis indicated a significant genetic diversity among seizures groups, matching with its origin. Endorsing preceding results, the 2015 panel was able to achieve its purpose in individualizing and differentiating, according to geographic region, Brazilian Cannabis sp. samples, suggesting an informative and convenient tool to BFP intelligence.</p>	
Author Comments:		
Suggested Reviewers:	Hussain Alghanim, PhD halgh002@fiu.edu Has publications on forensic genetics for Cannabis	

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

	Carlos Azambuja, PhD Director, Genia azambuja@geniageo.com
	Rodrigo Soares de Moura Neto rodrigomouraneto@ufjf.br



**EVALUATION OF TWO 13-LOCI STR MULTIPLEX SYSTEM REGARDING IDENTIFICATION AND ORIGIN  
DISCRIMINATION OF BRAZILIAN *Cannabis sativa* SAMPLES.**

**Lucas de Oliveira Pereira Ribeiro<sup>1,3</sup>; Eduardo Avila<sup>1,2,3</sup>; Roberta Fogliatto Mariot<sup>4</sup>; Mauro Sander Fett<sup>2,3,5</sup>,  
Flávio Anastácio de Oliveira Camargo<sup>3,5</sup>; Clarice Sampaio Alho<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup> Escola de Ciências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup> Departamento de Polícia Federal no Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup> Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – INCT Ciências Forenses

<sup>4</sup> Department of Chemistry and Biochemistry, Florida International University, Miami, Florida 33199, United States

<sup>5</sup> Departamento de Ciências do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Corresponding author information:

Name: Lucas de Oliveira Pereira Ribeiro

Email: [oprucas@gmail.com](mailto:oprucas@gmail.com)

Phone: +55 51 33534534

## ABSTRACT

Brazilian *Cannabis sativa* illicit market is mainly supplied by drugs originated from Paraguay and Northeastern Brazil (marijuana polygon region). However, other sources as indoor cultivations (supported by online seeds market), and Uruguay are also in Brazilian Federal Police (BFP) sight. Forensic tools to aid police intelligence were published in the last years. In genetics, microsatellites have gained attention due to their individualization capability. The aim of this study is to evaluate the effectiveness and efficiency of two STR multiplex systems previously proposed in 94 Brazilian samples seized by BFP. Principal coordinate analyses (PCoA), forensic parameters, and genetic structure analysis were executed. Both panels were effective in individualizing and origin discriminating all samples, although the system proposed in 2015 demonstrated better results. For this marker set, PI for a random individual is approximately one in 65 billion, in addition, the PCoA shows a clear genetic distinction among samples according to its origin. Bayesian inference populational structure analysis indicated a significant genetic diversity among seizures groups, matching with its origin. Endorsing preceding results, the 2015 panel was able to achieve its purpose in individualizing and differentiating, according to geographic region, Brazilian *Cannabis sp.* samples, suggesting an informative and convenient tool to BFP intelligence.

**KEYWORDS:** Cannabis sativa; Forensic Genetics; Genetic Markers; Origin tracking; Individualization.

## INTRODUCTION

Consumption of *Cannabis sativa*, from this point, referred to as cannabis, as a hallucinogen dates back from 4000b.C and, although consumption levels have stabilized or declined in parts of Europe for the past six years, in the America Continent overall use has increased [1, 2]. According to the last survey published by the United Nations Office on Drugs and Crime, America has the highest rate of marijuana production and traffic, with four out of the top five countries with the largest drug markets located in this continent. Brazil is the fifth nation in this list, with 225 tons of cannabis seized by the Brazilian Federal Police (BFP - Polícia Federal Brasileira) only in 2016, 5% of all seized marijuana worldwide, behind The United States Of America (USA), Mexico, Paraguay, and Egypt, respectively [2].

It is known, through police reports and intelligence that the main supply routes of cannabis for the Brazilian market are composed of drugs cultivated in three countries, Paraguay, Brazil, and Uruguay. South, Southeast and West Central geopolitical regions are supplied by Paraguay and in minority by Uruguay, while

North and Northeast are supplied by the marijuana polygon (Polígono da Maconha) – a region around São Francisco river basin comprising two Brazilian states; Bahia and Pernambuco.

Since the legalization of recreational use of marijuana, Uruguay registered a limited scale of legal supply to date. The official distribution system provided only 30,000 of the estimated 140,000 cannabis users in Uruguay in 2014 [3]. A consequence of this drug shortage might be related to illicit traffic increase and spiking numbers of violent episodes in the border between Brazil and Uruguay [4, 5].

Two other new routes emerged in the past five years in Brazil. Indoor cultivation has grown exponentially, observed through the raise in cannabis seeds seizure in postal distribution offices, a trend also observed in Europe countries as well [2, 6–8]. According to news, exploration of the Solimões route (Rota do Solimões), a path that uses Solimões river to cocaine traffic into Brazil, as a new option to marijuana trade market started last year since a known organized crime group has taken control of drug traffic in Paraguay and Marijuana Polygon routes [9].

The rising in cannabis recreational and medicinal consumption influences decriminalization and legalization movements occurring in countries all over the globe. These phenomena allied with police, academic and industrial interests (e.g. genetic quality control, regulation, and traffic tracking) urge the development of a worldwide genetic database. In order to identify cultivars, origin tracking, and species differentiation, DNA analysis has been increasingly performed over the last two decades. [10–18]

BFP, the main law enforcement agency responsible for national drugs traffic eradication, still lacks scientific methods to help intelligence divisions to track and identify different traffic routes. Additionally, two different studies using sequencing analysis of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (rbcL) gene were not able to differentiate cannabis samples seized in Rio de Janeiro, Brazil. [19, 20]

Short tandem repeats (STRs) are, as its name states, a repetitive short sequence of up to six nucleotides at a defined gene locus in a non-coding region [21], present in both vegetal and animal genomes, and are the gold standard in human identification and forensic methods. STR for cannabis were firstly described in 2003 [22, 23] and, to date, several other studies evaluated and reported new markers optimized for forensic uses [15, 21, 24–26]. Aiming to validate and construct a reliable marker set, Houston *et al.* [15, 26] developed two multiplex panels following the International Society of Forensic Genetics (ISFG) and Scientific Working Group for Analysis of Seized Drugs (SWGDM) guidelines, demonstrating the viability and applicability of STR system for cannabis forensic purpose. In order to improve comprehension, the STR Multiplex system based on Houston *et al.* [15] study will be referred to as Panel 2015, and the system based on Houston *et al.* [26] as Panel 2017.

In a previous study, Fett *et al.* [27] used Panel 2015 to evaluate 72 Brazilian cannabis samples seized by BFP between 2014 and 2017. Results demonstrated an efficient and reliable panel able to individualize and discriminate 100% of the samples based on the geographical group where they were seized. This present

study aimed to compare Panel 2015 and Panel 2017 effectiveness and efficiency in individualizing and origin tracking 94 Brazilian cannabis samples. We also calculated the forensic parameters and analyzed the genetic variance among the groups for all 19 markers collectively.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Cannabis sativa* samples**

A total of 94 cannabis specimens were analyzed, all samples were seized in the Brazilian territory by Brazilian Federal Police. The samples were divided into seven different groups according to the year and region of apprehension, see (Table 1) for a detailed description of the groups.

As positive controls, 2 cannabis samples (*EUA*) with a known genetic profile for both panels were kindly provided by Dr. David Gangitano (Department of Forensic Science, College of Criminal Justice, Sam Houston State University, Huntsville, TX).

### **Extraction and quantification**

Fett *et al.* [27] described two kits used for DNA isolation [28, 29]. According to their results, DNeasy Mericon Food Kit performed better and, hence, was used for DNA extraction in this study, following the same protocols. Samples' DNA concentrations were assessed by Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen Carlsbad, California, USA), following manufacturer instructions.

### **PCR Multiplex Conditions**

Aiming to analyze and compare the two proposed panels [15, 26], two cannabis STR Multiplex were evaluated. Table 2 lists all markers, their respective characteristics, final optimal concentrations, and dyes. The amplification of both panels was performed via polymerase chain reaction (PCR) using the Multiplex PCR Kit (Qiagen, Valencia, CA) on a VERITI 96-well Thermo Cycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

All 94 samples were amplified using Panel 2015 and Panel 2017. PCR volumes and conditions for Panel 2015 were performed as described in Fett *et al.*, [27], and PCR volumes and conditions for Panel 2017 followed Houston *et al.* [26].

Single PCR reactions were required for samples that showed polyploidy content in one or more locus, and when locus dropout occurred. All single PCR reactions were prepared at a 12.5  $\mu$ L volume using 2 ng of

template, 6.25 µL of Taq PCR Master Mix (Qiagen, Hilden, Germany), 0.625 µL of primer forward and reverse, and 4 µL of distilled water. Single PCR reaction was also performed on the Thermo Cycler previously described and its conditions followed: activation for 5 min at 95 °C, followed by 30 cycles of 30 sec at 95 °C, 90 sec at 57°C, and 30 sec at 72 °C, and a final extension of 30 min at 60 °C. All PCR reactions, Single and Multiplex, included one negative and one positive control. DNA samples 1-D1 and 4-A2 were used as a positive control.

### **Fragment Analysis**

Capillary Electrophoresis was carried out in a 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, EUA), used for fragment separation and detection. For both single and multiplex PCR reactions an aliquot of 1µL of PCR multiplex product was added to 9.6µL Hi-Di Formamide® and 0.4µL LIZ® 600 Size Standard (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, EUA), totalizing 11µL of reaction. Then, the samples were denatured at 95°C for 3 minutes followed by 3 min in -20°C and loaded on the 3500 Genetic Analyzer. The conditions utilized for both Panels 2015 and Panel 2017 followed as described on Houston *et al.* [26]: oven at 60°C; pre-run 15kV, 180 sec; injection 1.5kV for 8 sec; run 19.5kV, 1330 sec; capillary length 36cm; polymer POP -4™; and dye set G5.

Genotyping was performed using Gene Mapper Id-X software (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, EUA) v. 1.4. A threshold of 150 relative fluorescence units (RFUs) was set [26] and a bin set, kindly provided by Dr. Giantano, was used to aid genotyping. Allele nomenclature used for allele calls was developed by Houston *et al.* [15, 26], following forensic and nomenclature guidelines [30, 31]. Budowle *et al.* [32] recommended for DNA mixture samples a within-laboratory standard protocol to correctly assignment of peaks. In order to maintain the reliability of peak assignments, Fett *et al.* [27], used forensic guidelines to developed and implement a laboratory protocol for cannabis' mixture, which was used when necessary.

### **Allele 5 of the locus 4910 sequence**

An off-bin peak between the allele 4 and 10 was observed in 50 of all evaluated samples. In order to verify the existence of a new, previously unreported allele, a single PCR reaction for three homozygous samples was performed followed by a Sanger sequencing procedure. For PCR amplification, cycling sequencing, and sequencing the same instruments described above were used. BigDye® Terminator Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, EUA) was used according to manufacturer protocol. Run conditions as follows: oven temperature at 55°C; pre-run 15kV, 180 sec; injection 1.2kV for 12 sec; run 15kV, 1700 sec; capillary length 30cm; polymer POP -4™; and dye set G5.

The software SeqScape v 3.0 (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, EUA) was used to perform data analysis. Allele 5 of the locus 4910 sequence data was submitted to the GeneBank database under accession number MK084769.

### **Statistical Analysis**

In order to determine genetic parameters and evaluate STR markers efficiency for forensic purposes, GenAlEx v.6.503 software [33] and the STRAF online tool [34] were used. Total number of alleles ( $A$ ), effective number of alleles ( $A_E$ ), observed heterozygosity ( $H_o$ ) and expected heterozygosity ( $H_e$ ) and polymorphic information content ( $PIC$ ) were calculated for each locus considering all samples as a single population and for each seizure group separately. Additionally, power of exclusion ( $PE$ ) and probability matching ( $PM$ ) were calculated for each locus per Panel, while the combined power of exclusion ( $CPE$ ), combined probability matching ( $CPM$ ) and power of discrimination ( $PD$ ) were estimated for all locus on each panel [35, 36].

Principal Coordinate Analysis (PCoA) based on individual pairwise codominant genotypic distance was performed for both panels, as well for all markers collectively. In addition, a PCoA based on pairwise population  $F_{ST}$  was also performed. Furthermore, Analysis of Molecular Variance (AMOVA) with 10,000 permutations was performed to assess the amount of genetic variability observed among and within groups. A Region category was created, willing to assess differences between all major seizure regions (Region Northeastern covered N15+N17+N18; Foreign included PF+EUA; Southern comprised APR15+APR17). The APR18 seizure group was removed from AMOVA analysis due to being comprised of a single sample. In addition, Hardy-Weinberg equilibrium was estimated for all alleles.

In order to evaluate efficiency and effectiveness in identifying and discriminating samples, according to the region of the seizures, results obtained for Panel 2015 and Panel 2017 were compared. Later, to measure the gain in power of discrimination, all 19 markers were evaluated collectively.

### **Concordance study**

More than two-thirds of samples (72) were processed using the Panel 2015 [27]. The genotyping results for the seven microsatellites (D02 CANN1, C11 CANN1, ANUCS 305, B05 CANN1, H06 CANN2, ANUCS 501, and CS1) that overlapped with the Panel 2017 were recorded and compared.

## **Genetic structure**

Broadly, genetic structure can be defined as any pattern(s) that explains genetic diversity and distribution observed within and among a set of populations [37]. Structure v2.3.4 software was used to assess the occurrence of genetic structure among all seven seizure groups with five independent runs for each K value, ranging from 2 to 5. Using an Admixture Model and allele frequencies correlated, a 100,000 length Burn-In Period followed by 100,000 steps Monte Carlo Markov Chain (MCMC) procedure was applied. To estimate the best K value fitting the data, the obtained results in the analysis of the genetic structure of populations were processed through CLUMPAK SERVER online tool [38]. In order to obtain a more accurate appraisal of genetic diversity and structure occurrence, genotypes of all 19 loci collectively were used.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **STR Multiplex Amplification**

Regarding Panel 2017, all parameters and conditions, despite the change of polymer POP-7<sup>tm</sup> to POP-4<sup>tm</sup>, described by Houston *et al* [26] were replicated in this study. All 94 samples and positive controls analyzed showed a full DNA profile with no locus dropout (Supplementary 1). However, in Panel 2015, 24 samples suffered locus dropout at ANUCS 301, ANUCS 308, B01 CANN1, H09 CANN2, ANUCS 302, and E07 CANN1 loci. A similar occurrence was already observed for the other 72 samples on Fett *et al.* [27] and for USA's cannabis on Houston *et al.* [15]. The locus dropout missing data was obtained with a Single PCR reaction described in "Materials and Methods", resulting in full genotypes for all samples.

For all samples, the STR profile of the seven markers overlapped in both panels (D02 CANN1, C11 CANN1, ANUCS 305, B05 CANN1, H06 CANN2, ANUCS 501, and CS1) were obtained. Profiles were compared to evaluate concordance between multiplex systems, and a full concordance of STR genotypes was observed for all 94 samples and positive controls.

### **Allele 5 for 4910 marker**

When analyzing the samples from Northeastern Brazil, an off-bin peak was observed between the alleles 4 and 10 in 28 samples. The length of the peak, considered in base pairs, was compatible with a previously unobserved allele of five repeats of the motif. Considering this a possible new allele not previously described, a single PCR followed by sequencing was performed for three homozygous samples.

The sequencing results confirmed an occurrence of five tandem repeats of the motif, corroborating with the hypothesis of a new allele. From the Brazilian Northeast, 28 samples (~54%), being 13 homozygous,

showed the presence of this new allele. From Southern Brazil seizures, 8 samples (~72%) demonstrated the same peak. In total, 36 samples exhibited the presence of this undescribed allele 5, indicating a possible private allele for Southern America samples. This new allele was reported and can be accessed under the GenBank Accession code: MK084769.1

### Forensic Parameters

Considering Panel 2015 and Panel 2017 individually, allele frequencies were calculated for all data set and used to compute the main forensic parameters (Table 3). To reach the most informative locus we analyzed the mean number of alleles, the effective number of alleles, polymorphic content index, power of exclusion, and power of discrimination. The three most informative locus were CS1, 308, and H09 in Panel 2015 and CS1, 3735, and 9043 in Panel 2017. Similar results were observed by Hsieh *et al.*[39], Valverde *et al.*[40], Houston *et al.*[15, 26], and Fett *et al.*[27]. It is important to mention that for Houston *et al.* [26] the 5159 marker was the second most informative locus, which was not observed in our sample, likely due to a high prevalence of allele 6 in the Brazilian seizures (Supplementary 2).

In five samples seized in Northeastern Brazil, one to four alleles of equal peak height were observed for locus CS1. DNA of both samples was extracted directly from leaf material, excluding mixture contamination. This locus was previously described as polyallelic and could be explicated by region duplication or polyploidy [21, 41, 42]. These events are common in vegetal species and may cause none or minimal phenotype/function interference [43]. For those samples, an internal laboratory protocol was followed to determinate the genotype [27].

The p-value for Hardy-Weinberg equilibrium was significant to eleven loci in Panel 2015 and to ten loci in Panel 2017. Likely, observed substructure caused by population stratification is the major contributor to this disequilibrium.

The results obtained on the AMOVA (Table 4) demonstrate that, for Panel 2015, 28% of total variance in the dataset is due to Among-Region differences and only 61% due to within-individual differences. For Panel 2017, only 22% of total differentiation is due to Among-Region differences and 67% due to within-individual differences.

Considering only three major groups, Northeastern = N15+N17+N18; PF; and Southern = APR15+APR17+APR18, the Panel 2015 was able to correctly classify 99% of the samples' origins, while Panel 2017 accuracy was only 96% (Table 5). Further, for all parameters (i.e. Power of Discrimination combined; Power of Exclusion combined; and the Probability of Identity) Panel 2015 performed slightly better than Panel 2017 (Table 6).



The Principal Coordinate Analysis (PCoA) of Panel 2015 visually distinguishes the seizure groups based on their geographical origin (Figure 1). The principal component values Coord.1 and Coord.2 expressed ~36% and ~11%, respectively, of the explained genetic variance (PCoA of Panel 2017 can be consulted in Supplementary 3).

Northeastern Brazil samples even though seized in three different years (N15, N17, and N18), clearly formed a group together (exception of sample 2.3 from N17). Cannabis apprehended by law enforcement in Rio Grande do Sul in three different years (APR15, APR17, and APR18), also formed a separate group. Police investigation and academic studies suggest that the illicit drug markets of Rio Grande do Sul and Southern Brazil region are supplied by Paraguay [44, 45], probably due to the region proximity and extensive borders across both countries. The apprehensions did by BFP in postal facilities (PF) formed a long and scattered group along the y-axis. BFB reports suggest that the seeds came from Europe, as European websites are commonly used for seeds acquisition and all brands identified in the labels could be found in those sites. Precise origin location could not be determined, which could explain the high dispersion of the group. Fett *et al.* [27] found similar results when analyzing 72 samples of the same dataset.

Overall, Panel 2015 proposed by Houston *et al.* [15] is more efficient and effective in identification and region discrimination of Brazilian cannabis samples. This result is somehow unexpected since Panel 2017 was supposed to present enhancements when compared to Panel 2015 [26]. Considering our data set, the random match probability (chance of two unrelated samples have the same genotype) is in one in 65 billion, for Panel 2015, and one in 430 million, for Panel 2017 (Table 6). The reduction of effectiveness and efficiency not expected for Panel 2017 could be explained by low heterozygosity presented by Brazilian samples in the new seven proposed loci (Table 3). It is important to mention that, despite the better performance of Panel 2015, Panel 2017 is efficient in individualizing and discriminating Brazilian samples as well (Supplementary 4). To date, a few STR markers for cannabis were published and none national or international database was constructed. Thus, it is necessary to evaluate and select a group of markers that best suits the analyzed dataset; due to population heterozygosity, different markers can be useful for one scenario and not for others.

In order to obtain the genotypes for all 19 markers, the profiles of Panel 2015 and Panel 2017 were analyzed together. Considering all 19 loci, private alleles were observed for 11 loci (Table 7). The new allele 5 in locus 4910 was present in Northeastern (N15, N17, N18) and Southern apprehensions (APR15, APR17, APR18) samples. As mentioned, the absence of this allele in PF and positive control samples suggests that it could be a private allele for South America samples. PF group presented the largest number of private alleles, possibly due to its distinct European origin and possible cannabis varieties or cultivar selection.

When analyzing results for all 19 markers collectively, an increase in Power of Exclusion combined and in Probability of Identity can be observed, however, no significant increment was observed in the Power

of Discrimination combined (Table 6). The low gain in information of all STR loci collectively could, also, be explained by the low heterozygosity of some markers in the Brazilian samples (Table 3).

The results of the analysis of the genetic structure of populations for all groups seem to suggest a significant genetic variance according to the major geographic region of the seizure (Northeastern, Southern, and Foreign samples) (Figure 2). A diverse number of layers comprising general genetic structure can be visualized through alternative K values selection. Utilizing Evanno's method [46] the ideal number of clusters for our dataset was estimated as K = 3. The genetic difference between Brazilian and non-Brazilian samples could be observed with two clusters (K = 2), although at optimum K (K = 3) genetic structure seems to be associated with the major region origin of the seizures. At K = 4, some of the genetic diversity present in the PF group might be associated with North America's genetic inheritance. This association needs to be treated carefully since the North America group comprises only two samples. In addition, some level of genetic diversity was observed among Northeastern (N15, N17, N18) samples (K = 5).

## CONCLUSION

The STR multiplex systems (Panel 2015 and Panel 2017) accomplished the aim of individualization and origin discrimination of all 94 Brazilian seized *Cannabis sativa* samples evaluated in this study. Despite the enhancements in Panel 2017 [15], for our dataset, the Panel 2015 demonstrated high efficiency and effectiveness regarding identification and origin discrimination of Brazilian cannabis samples. Corroborating with Fett *et al.* [27], Panel 2015 exhibits confident results and may be used as an intelligence tool for the Brazilian police to track drug pathways and establish a link between different crime cases. The analysis of 19 markers collectively showed better results than Panel 2015. The gain in information power due to increased informative loci number is expected; however, the effort and cost in analyzing two 13-loci STR multiplex to obtain 19 informative loci must be considered and we consider not advantageable.

To date, little is known about cannabis STR markers and its characteristics (e.g. populational heterozygosity, genome location). This results in issues as non-informative locus, depending on the population, or polyallelic locus due to genomic duplication. A new microsatellite multiplex system comprising the most informative loci for Brazilian *Cannabis sativa* samples would be ideal for forensic and law enforcement purposes. In addition, regarding international drug traffic and commercialization of legal cannabis, the creation of a collaborative, international database with reliable and efficient markers for all cannabis individuals would be ideal.

Acknowledgments: We would like to thank Pietra Graebin and Catieli Lindholz for the technical support.

## **COMPLIANCE WITH ETHICAL STATEMENT**

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest. Funders had no participation in this study or preparation of manuscript.

Funding: This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 (grant PRO-FORENSE 25/2014) and National Institute of Forensic Science and Technology (N°16/2014).

**TABLES AND FIGURES**

**Table 1** Characteristics of all 19 STR markers and their disposal in Panel 2015 and Panel 2017 based on Houston et al., 2015/2017.

	Marker	Dye	Motif	Type of Repeat	Observed Alleles	Final Primer Concentration (μM)
<b>Panel 2015</b>	D02	FAM	(GTT)	Simple	6, 7, 8	0.04
	C11	FAM	(TGA) <sub>x</sub> (TGG) <sub>y</sub>	Compound	13, 14, 15, 18, 21	0.05
	H09	FAM	(GA)	Simple	11, 12, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24	0.08
	B01	FAM	(GAA) <sub>x</sub> (A)(GAA) <sub>y</sub>	Compound	10, 12, 13, 14, 15	0.09
	E07	VIC	(ACT)	Simple	7, 8, 9	0.30
	305	VIC	(TGG)	Simple	4, 8, 9	0.08
	308	VIC	(TA)	Simple	3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13	0.13
	B05	VIC	(TTG)	Simple	7, 8, 9, 10	0.03
	H06	VIC	(ACG)	Simple	7, 8, 9	0.07
	302	PET	(ACA) <sub>x</sub> (ACA) <sub>y</sub> (ACA) <sub>z</sub>	Compound	4, 22, 29, 31, 33, 35, 36, 37	0.08
	301	PET	(TTA)	Simple	15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25	0.30
	501	NED	(TTGTG)	Simple	4, 5, 6	0.10
	CS1	NED	(CACCAT)	Simple	10, 11, 12, 14, 17, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31	0.14
	<b>Panel 2017</b>	501	FAM	(TTGTG)	Simple	4, 5, 6
9269		FAM	(ATAA)	Simple	5.3, 6	0.10
4910		FAM	(AAGA) <sub>x</sub> (TAGA) <sub>y</sub> (AAAA) <sub>z</sub>	Compound	4, 5, 10, 15	0.20
5159		FAM	(AGAT)	Simple	3, 4, 4.2, 6, 7, 10	0.30
305		VIC	(TGG)	Simple	4, 8, 9	0.10
9043		VIC	(TCTT) <sub>x</sub> (CCTT) <sub>y</sub> (TCTT) <sub>z</sub>	Compound	3, 5, 6, 7	0.15
B05		VIC	(TTG)	Simple	7, 8, 9, 10	0.15
1528		VIC	(ATTA)	Simple	6, 7	0.30
D02		PET	(GTT)	Simple	6, 7, 8	0.15
C11		PET	(TGA) <sub>x</sub> (TGG) <sub>y</sub>	Compound	11, 12, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24	0.15
H06		PET	(ACG)	Simple	7, 8, 9	0.10
3735		NED	(TATG)	Simple	3, 4, 5, 6, 7	0.25
CS1		NED	(CACCAT)	Simple	11, 12, 14, 17, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31	0.15

**Table 2** Parameters of Forensic interest of Panel 2015 and Panel 2017 in all *Cannabis sativa* (n=96) seized in Brazil

		301	302	308 B01	E07	H09	305	501 B05	C11	CS1	D02	H06	1528	3735	4910	5159	9043	9269	
Panel 2015	A	4	3	3	3	2	4	2	2	3	2	6	2	2					
	Ae	1.661	1.806	2.250	1.657	1.531	2.474	1.568	1.230	2.079	1.426	<b>4.113</b>	1.804	1.383					
	Ho	0.361	0.589	0.194	0.287	0.397	0.604	0.450	0.151	0.684	0.215	<b>0.853</b>	0.527	0.262					
	He	0.341	0.426	0.479	0.357	0.290	0.571	0.317	0.145	0.498	0.238	0.724	0.436	0.209					
	PIC	0.661	0.720	0.765	0.587	0.385	0.723	0.325	0.221	0.480	0.399	<b>0.881</b>	0.440	0.392					
	PE	0.154	0.216	0.052	0.056	0.056	0.197	0.105	0.024	0.248	0.056	<b>0.528</b>	0.124	0.064					
	PD	0.840	0.855	0.862	0.743	0.604	0.884	0.558	0.372	0.729	0.599	<b>0.964</b>	0.702	0.610					
	pHW	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.108	<b>0.004</b>	0.262	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>					
Panel 2017	A						2	2	3	2	6	2	2	1	3	3	3	3	2
	Ae						1.568	1.230	2.079	1.426	<b>4.113</b>	1.804	1.383	1.135	2.207	1.911	1.559	1.987	1.270
	Ho						0.450	0.151	0.684	0.215	<b>0.853</b>	0.527	0.262	0.082	0.437	0.582	0.341	0.511	0.095
	He						0.317	0.145	0.498	0.238	0.724	0.436	0.209	0.091	0.448	0.468	0.264	0.447	0.180
	PIC						0.325	0.221	0.480	0.399	<b>0.881</b>	0.440	0.392	0.118	0.692	0.542	0.290	0.565	0.375
	PE						0.105	0.024	0.248	0.056	<b>0.528</b>	0.124	0.064	0.002	0.206	0.138	0.056	0.206	0.003
	PD						0.558	0.372	0.729	0.599	<b>0.964</b>	0.702	0.610	0.174	0.864	0.783	0.499	0.799	0.556
	pHW						0.108	<b>0.002</b>	0.262	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.001</b>	0.063	<b>0.005</b>	<b>0.000</b>

A = mean number of alleles; Ae = mean effective number of alleles; Ho = mean observed heterozygosity; He = mean expected heterozygosity; PIC = polymorphic content index; PE = power of exclusion; PD = power of discrimination; pHW = p-value for Hardy-Weinberg Equilibrium

**Table 3** AMOVA of Panel 2015 and Panel 2017 for all dataset

	Source	Df	SS	MS	Est. Var.	%
Panel 2015	Among Regions	3	148.694	49.565	1.194	28% *
	Among Pops	3	17.012	5.671	0.091	2% *
	Among Indiv	88	294.552	3.347	0.371	9% *
	Within Indiv	95	247.500	2.605	2.605	61% *
	Total	189	707.758		4.261	100%
Panel 2017	Among Regions	3	109.532	36.511	0.794	22% *
	Among Pops	3	22.543	7.514	0.184	5% *
	Among Indiv	88	248.061	2.819	0.217	6% **
	Within Indiv	95	226.500	2.384	2.384	67% *
	Total	189	606.637		3.580	100%

\*P(rand  $\geq$  data) = 0.001    \*\*P(rand  $\geq$  data) = 0.003

Df = Degrees of freedom; SS = Sum-of-Squares; MS = Mean of Squares; % = Percentage of variance explained

**Table 4** Classification of samples per major group and percentage of correctly assignment for Panel 2015 and Panel 2017

	Panel 2015			Panel 2017		
	Northeastern	PF	Southern	Northeastern	PF	Southern
Northeastern	51	1		49	2	1
PF		31			31	
Southern			11	1		10
Percent Accuracy	99%			96%		

Northeastern = N15+N17+N18; PF = Cannabis samples cultivated from foreign seeds seized by Brazilian postal services; Southern = APR15+APR17+APR18

**Table 5** Power of Discrimination combined (PD<sub>comb</sub>), Power of Exclusion combined (PE<sub>comb</sub>), Probability of Identity (PI) of Panel 2015, Panel 2017, and 19 Markers combined for all Brazilian *Cannabis sativa* samples

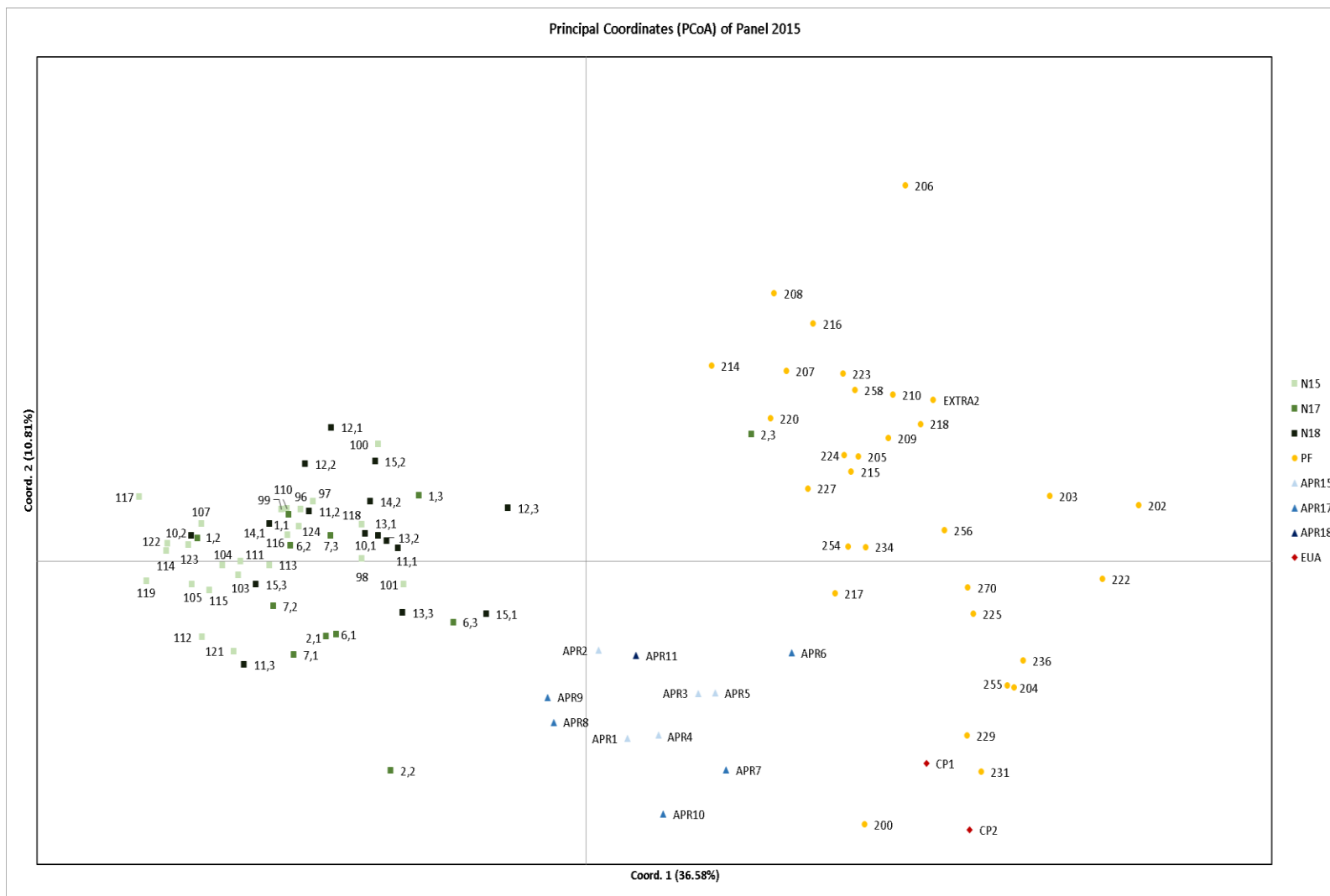
	PD <sub>comb</sub>	PE <sub>comb</sub>	PI*
Panel 2015	9.999999993E-01	0.892	6.50E-10
Panel 2017	9.9999996E-01	0.878	4.30E-08
19 Markers	9.99999999995E-01	0.968	4.60E-13

\*Considering all frequencies in all dataset

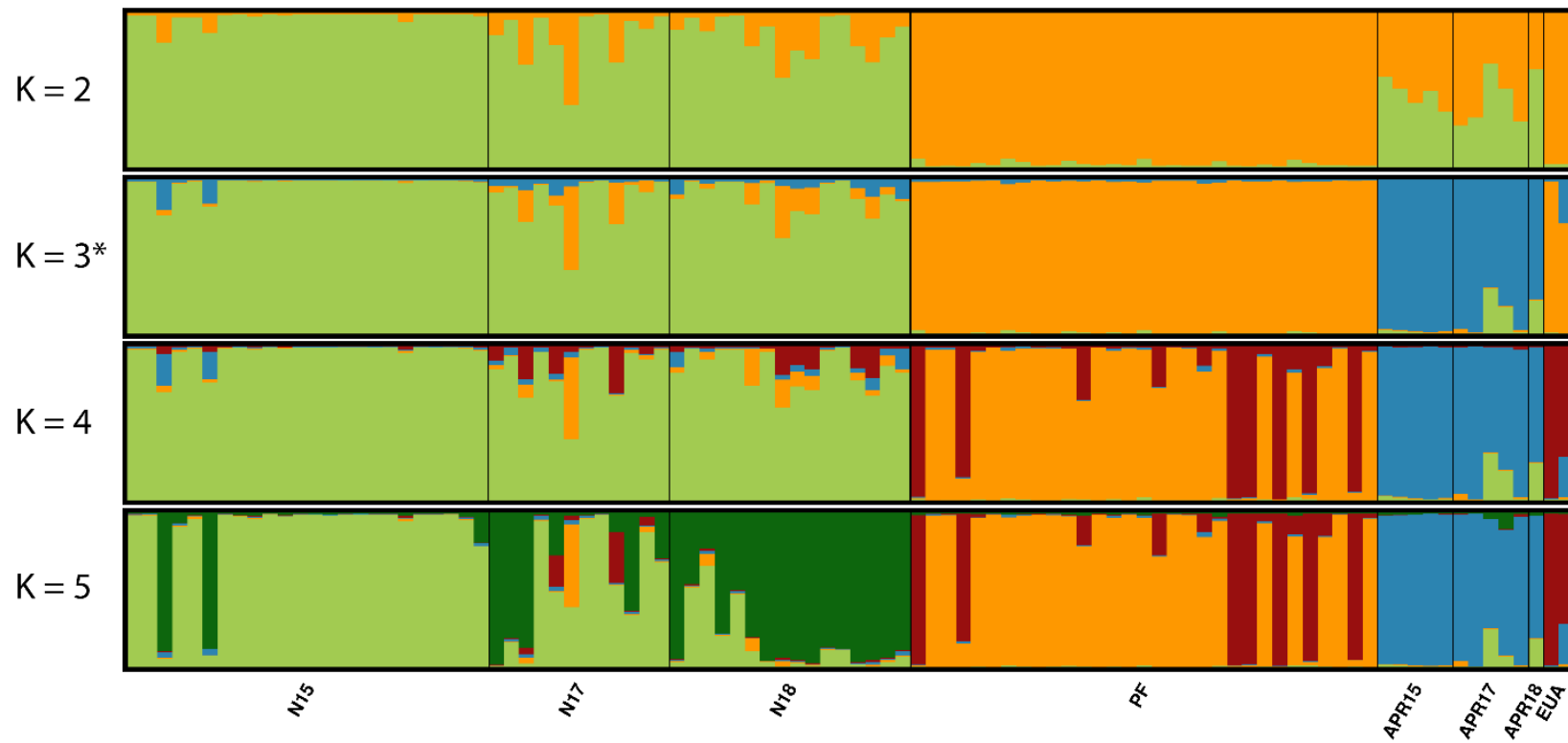


**Table 6** List of private allele observed per group of samples for all markers

<b>Seizure Group</b>	<b>Locus</b>	<b>Allele</b>	<b>Freq</b>
N15	308	6	0.021
N15	H09	22	0.042
N15	H09	23	0.021
N17	302	35	0.083
N18	B01	12	0.156
N18	C11	18	0.031
N15 + N17	5159	7	0.031
N17 + N18	301	23	0.067
Northeastern Brazil	301	19	0.031
Northeastern Brazil	CS1	25	0.101
Northeastern Brazil	CS1	26	0.313
Northeastern Brazil	H09	12	0.031
PF	308	3	0.048
PF	308	11	0.032
PF	4910	15	0.032
PF	5159	10	0.032
PF	9043	7	0.016
PF	301	24	0.065
PF	301	25	0.016
PF	302	22	0.016
PF	302	29	0.048
PF	305	9	0.032
PF	CS1	21	0.113
PF	CS1	30	0.016
PF	CS1	31	0.016
PF	H09	16	0.387
PF	H09	24	0.032
APR15 + APR17	CS1	11	0.300
APR17 + APR18	H09	17	0.350
EUA	302	4	0.500
EUA	302	37	0.250
EUA	C11	21	0.250
EUA	CS1	10	0.250



**Figure 1** Principal Coordinate Analysis (PCoA) of Panel 2015 based on genetic distance of all dataset (n=96). Percentage of variation explained by the axes expressed inside the parenthesis. N15 = *Cannabis sp.* samples seized at Northeastern Brazil in 2015; N17 = *Cannabis sp.* samples seized at Northeastern Brazil in 2017; N18 = *Cannabis sp.* samples seized at Northeastern Brazil in 2018; PF = *Cannabis sp.* seeds apprehended in postal office and cultivated by law enforcements; APR15 = Official drug seizures from Rio Grande do Sul in 2015; APR17 = Official drug seizures from Rio Grande do Sul in 2017; APR18 = Official drug seizures from Rio Grande do Sul in 2018; EUA = *Cannabis sativa* samples seized in USA used as positive control.



**Figure 2** Genetic structure of all samples analysed based on 19 STR loci. Each row represents the increasing number of clusters (K). Vertical lines correspond to a different individual, with each color representing relative proportion of association with each inferred cluster, assigned by distinct colors. Groups abbreviations are described in “Materials and Methods”. \*Ideal number of clusters according to Evanno’s method [52].

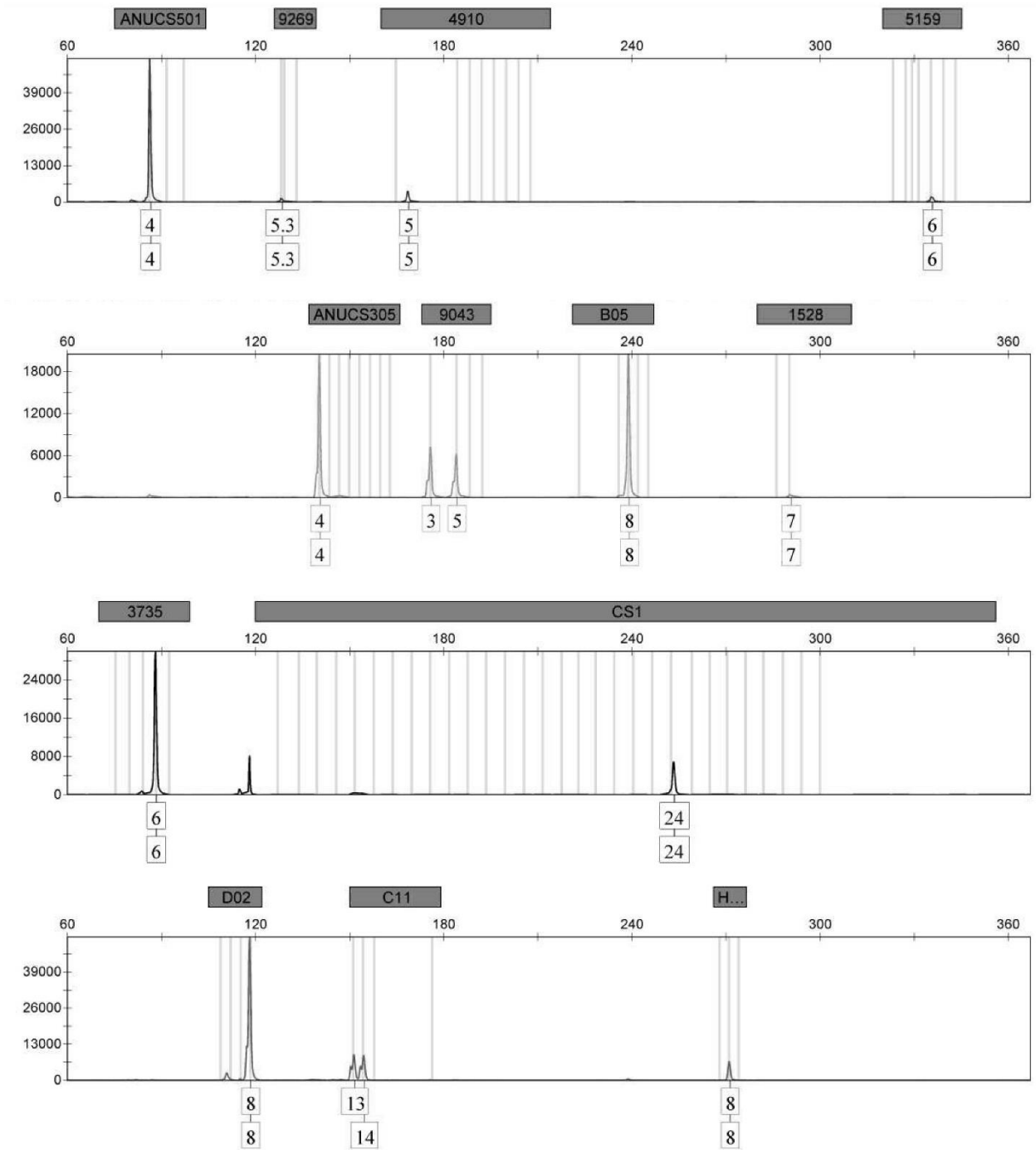
## REFERENCES

1. Iversen LL (2009) The Science of Marijuana, 2nd edn. *Br J Clin Pharmacol* 67:268. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2008.03355.x>
2. UNODC (2017) GLOBAL OVERVIEW OF DRUG DEMAND AND SUPPLY
3. UNODC UNO on D and C (2018) Global overview of drug demand and supply
4. De Backer B, Maebe K, Verstraete AG, Charlier C (2012) Evolution of the Content of THC and Other Major Cannabinoids in Drug-Type Cannabis Cuttings and Seedlings During Growth of Plants\*. *J Forensic Sci* 57:918–922. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2012.02068.x>
5. Cuypers E, Vanhove W, Gotink J, et al (2017) The use of pesticides in Belgian illicit indoor cannabis plantations. *Forensic Sci Int* 277:59–65. <https://doi.org/10.1016/J.FORSCIINT.2017.05.016>
6. Alvarez A, Gamella JF, Parra I (2016) Cannabis cultivation in Spain: A profile of plantations, growers and production systems. *Int J Drug Policy* 37:70–81. <https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2016.08.003>
7. Kohjyouma M, Lee IJ, Iida O, et al (2000) Intraspecific variation in *Cannabis sativa* L. based on intergenic spacer region of chloroplast DNA. *Biol Pharm Bull* 23:727–730
8. Kojoma M, Iida O, Makino Y, et al (2002) DNA fingerprinting of *Cannabis sativa* using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Planta Med* 68:60–63. <https://doi.org/10.1055/s-2002-19875>
9. van Bakel H, Stout JM, Cote AG, et al (2011) The draft genome and transcriptome of *Cannabis sativa*. *Genome Biol* 12:R102. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-10-r102>
10. Köhnmann S, Nedele J, Schwotzer D, et al (2012) The validation of a 15 STR multiplex PCR for *Cannabis* species. *Int J Legal Med* 126:601–606. <https://doi.org/10.1007/s00414-012-0706-6>
11. Shirley N, Allgeier L, LaNier T, Coyle HM (2013) Analysis of the NMI01 Marker for a Population Database of Cannabis Seeds. *J Forensic Sci* 58:S176–S182. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12005>
12. Gao C, Xin P, Cheng C, et al (2014) Diversity analysis in *Cannabis sativa* based on large-scale development of expressed sequence tag-derived simple sequence repeat markers. *PLoS One* 9:e110638. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110638>
13. Staginnus C, Zorntlein S, de Meijer E (2014) A PCR marker linked to a THCA synthase polymorphism is a reliable tool to discriminate potentially THC-rich plants of *Cannabis sativa* L. *J Forensic Sci* 59:919–926. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12448>
14. Valverde L, Lischka C, Erlemann S, et al (2014) Nomenclature proposal and SNPSTR haplotypes for 7 new *Cannabis sativa* L. STR loci. *Forensic Sci. Int. Genet.* 13:185–186
15. Zhang LG, Chang Y, Zhang XF, et al (2014) Analysis of the genetic diversity of Chinese native *Cannabis sativa* cultivars by using ISSR and chromosome markers. *Genet Mol Res* 13:10490–10500. <https://doi.org/10.4238/2014.December.12.10>
16. Weiblen GD, Wenger JP, Craft KJ, et al (2015) Gene duplication and divergence affecting drug content in *Cannabis sativa*. *New Phytol* 208:1241–1250. <https://doi.org/10.1111/nph.13562>
17. Houston R, Birck M, Hughes-Stamm S, Gangitano D (2015) Evaluation of a 13-loci STR multiplex system for *Cannabis sativa* genetic identification. *Int J Legal Med* 130:635–647. <https://doi.org/10.1007/s00414-015-1296-x>
18. Kitamura M, Aragane M, Nakamura K, et al (2016) Development of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for Rapid Detection of *Cannabis sativa*. *Biol Pharm Bull* 39:1144–1149. <https://doi.org/10.1248/bpb.b16-00090>
19. Hsieh H-M, Hou R-J, Tsai L-C, et al (2003) A highly polymorphic STR locus in *Cannabis sativa*. *Forensic Sci Int* 131:53–58. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(02\)00395-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0379-0738(02)00395-X)

20. Soler S, Borrás D, Vilanova S, et al (2016) Use of Embryos Extracted from Individual Cannabis sativa Seeds for Genetic Studies and Forensic Applications. *J Forensic Sci* 61:494–500. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12995>
21. Jeangkhwoa P, Bandhaya A, Umpunjun P, et al (2017) Identification of Cannabis sativa L. using the 1-kbTHCA synthase-fluorescence in situ hybridization probe. *Sci Justice* 57:101–106. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2016.11.002>
22. Houston R, Birck M, Hughes-Stamm S, Gangitano D (2017) Developmental and internal validation of a novel 13 loci STR multiplex method for Cannabis sativa DNA profiling. *Leg Med* 26:33–40. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2017.03.001>
23. Houston R, Mayes C, King JL, et al (2018) Massively parallel sequencing of 12 autosomal STRs in Cannabis sativa. *Electrophoresis* 39:2906–2911. <https://doi.org/10.1002/elps.201800152>
24. Houston R, Birck M, LaRue B, et al (2018) Nuclear, chloroplast, and mitochondrial data of a US cannabis DNA database. *Int J Legal Med* 132:713–725. <https://doi.org/10.1007/s00414-018-1798-4>
25. Hsieh H-M, Liu C-L, Tsai L-C, et al (2005) Characterization of the polymorphic repeat sequence within the rDNA IGS of Cannabis sativa. *Forensic Sci Int* 152:23–28. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2005.02.022>
26. Datwyler SL, Weiblen GD (2006) Genetic variation in hemp and marijuana (Cannabis sativa L.) according to amplified fragment length polymorphisms. *J Forensic Sci* 51:371–375. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2006.00061.x>
27. Kojoma M, Seki H, Yoshida S, Muranaka T (2006) DNA polymorphisms in the tetrahydrocannabinolic acid (THCA) synthase gene in “drug-type” and “fiber-type” Cannabis sativa L. *Forensic Sci Int* 159:132–140. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2005.07.005>
28. Howard C, Gilmore S, Robertson J, Peakall R (2009) A Cannabis sativa STR Genotype Database for Australian Seizures: Forensic Applications and Limitations. *J Forensic Sci* 54:556–563. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2009.01014.x>
29. Mendoza MA, Mills DK, Lata H, et al (2009) Genetic individualization of Cannabis sativa by a short tandem repeat multiplex system. *Anal Bioanal Chem* 393:719–726. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2500-3>
30. Pinarkara E, Kayis S, Hakki E, Sag A (2009) RAPD analysis of seized marijuana (Cannabis sativa L.) in Turkey
31. Rotherham D, Harbison SA (2011) Differentiation of drug and non-drug Cannabis using a single nucleotide polymorphism (SNP) assay. *Forensic Sci Int* 207:193–197. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.10.006>
32. Ribeiro A, Dias V, Mello I, et al (2013) O gene rbcL como barcode para identificação forense de Cannabis sativa. *Saúde, Ética & Justiça* 18:67. <https://doi.org/10.11606/issn.2317-2770.v18ispep67-71>
33. Mello ICT, Ribeiro ASD, Dias VHG, et al (2016) A segment of rbcL gene as a potential tool for forensic discrimination of Cannabis sativa seized at Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Legal Med* 130:353–356. <https://doi.org/10.1007/s00414-015-1170-x>
34. Gilmore S, Peakall R, Robertson J (2003) Short tandem repeat (STR) DNA markers are hypervariable and informative in Cannabis sativa: implications for forensic investigations. *Forensic Sci Int* 131:65–74
35. Alghanim HJ, Almirall JR (2003) Development of microsatellite markers in Cannabis sativa for DNA typing and genetic relatedness analyses. *Anal Bioanal Chem* 376:1225–1233. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-1984-0>
36. Howard C, Gilmore S, Robertson J, Peakall R (2008) Developmental Validation of a Cannabis sativa STR Multiplex System for Forensic Analysis. *J Forensic Sci* 53:??-?? <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2008.00792.x>
37. Fett MS, Mariot RF, Avila E, et al (2018) 13-loci STR multiplex system for Brazilian seized samples of marijuana: individualization and origin differentiation. *Int J Legal Med*.

- <https://doi.org/10.1007/s00414-018-1940-3>
38. DNeay (Qiagen) (2013) Plant Handbook. Qiagen, Valencia, CA
  39. DNeay (Qiagen) (2010) Mericon Food Handbook. Qiagen, Valencia, CA
  40. Olaisen B, Bar W, Brinkmann B, et al (1998) DNA recommendations 1997 of the International Society for Forensic Genetics. *Vox Sang* 74:61–63
  41. Methods SWG on DA (2016) SWGDAM Validation Guidelines for DNA Analysis Methods
  42. Smouse PE, Peakall R (2012) GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28:2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
  43. Gouy A, Zieger M (2017) STRAF-A convenient online tool for STR data evaluation in forensic genetics. *Forensic Sci Int Genet* 30:148–151. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.07.007>
  44. BRENNER C (1990) Paternity Index Calculations in Single Locus Hypervariable DNA Probes : Validation and Other Studies. *Proc Int Symp Hum Identif* 1989 21–53
  45. Akram NA (2012) DNASF: A Statistical Package to Analyze the Distribution and Polymorphism of CODIS STR Loci in a Heterogeneous Population. *J. Forensic Res.* 3:1–7
  46. Chakraborty R (1993) Analysis of Genetic Structure of Populations: Meaning, Methods, and Implications BT - Human Population Genetics: A Centennial Tribute to J. B. S. Haldane. In: Majumder PP (ed). Springer US, Boston, MA, pp 189–206
  47. Kopelman NM, Mayzel J, Jakobsson M, et al (2015) Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Mol Ecol Resour* 15:1179–1191. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12387>
  48. Budowle B, Onorato AJ, Callaghan TF, et al (2009) Mixture interpretation: defining the relevant features for guidelines for the assessment of mixed DNA profiles in forensic casework. *J Forensic Sci* 54:810–821. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2009.01046.x>
  49. Allgeier L, Hemenway J, Shirley N, et al (2011) Field Testing of Collection Cards for Cannabis sativa Samples With a Single Hexanucleotide DNA Marker\*, †. *J Forensic Sci* 56:1245–1249. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2011.01818.x>
  50. Soltis PS, Soltis DE (2012) Polyploidy and genome evolution. *Polyploidy Genome Evol* 9783642314:1–415. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-31442-1>
  51. Moreira EM (2005) A despenalização do trabalhador rural preso no cultivo da Cannabis Sativa. *Confluência - Rev Interdiscip Sociol e Direito*
  52. Shibuya EK, Sarkis JES, Negrini-Neto O, Martinelli LA (2007) Carbon and nitrogen stable isotopes as indicative of geographical origin of marijuana samples seized in the city of São Paulo (Brazil). *Forensic Sci Int* 167:8–15. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.06.002>
  53. EVANNO G, REGNAUT S, GOUDET J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol Ecol* 14:2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>

**SUPPLEMENTARY DATA**



**Supplementary 1** Electropherogram of Panel 2017 of sample 117. At 4910 locus is possible to visualize the new allele 5 described.

Locus	Allele	N15	N17	N18	PF	APR15	APR17	APR18	EUA
D02	6	0.292	0.542	0.813	0.806	0.600	0.600	0.500	0.500
	7	0.000	0.000	0.000	0.194	0.000	0.000	0.000	0.500
	8	0.708	0.458	0.188	0.000	0.400	0.400	0.500	0.000
	13	0.125	0.000	0.063	0.145	0.000	0.000	0.000	0.000
C11	14	0.854	0.917	0.813	0.403	1.000	0.900	1.000	0.750
	15	0.021	0.083	0.094	0.452	0.000	0.100	0.000	0.000
	18	0.000	0.000	0.031	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	21	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.250
	7	0.000	0.083	0.094	0.597	0.000	0.000	0.000	0.500
H06	8	0.958	0.875	0.813	0.290	1.000	1.000	1.000	0.500
	9	0.042	0.042	0.094	0.113	0.000	0.000	0.000	0.000
	11	0.000	0.042	0.000	0.097	0.000	0.000	0.000	0.250
H09	12	0.021	0.042	0.031	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	16	0.000	0.000	0.000	0.387	0.000	0.000	0.000	0.000
	17	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.200	0.500	0.000
	18	0.021	0.167	0.219	0.306	0.400	0.200	0.000	0.750
	19	0.583	0.542	0.594	0.145	0.600	0.500	0.000	0.000
	20	0.229	0.167	0.031	0.016	0.000	0.100	0.500	0.000
	21	0.083	0.042	0.125	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000
	22	0.042	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	23	0.021	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	24	0.000	0.000	0.000	0.032	0.000	0.000	0.000	0.000
B01	10	0.875	0.708	0.625	0.000	0.000	0.200	0.000	0.000
	12	0.000	0.000	0.156	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	13	0.042	0.000	0.219	0.242	0.200	0.200	0.000	0.250
	14	0.063	0.208	0.000	0.742	0.800	0.600	1.000	0.750
	15	0.021	0.083	0.000	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000
E07	7	0.063	0.000	0.031	0.065	0.000	0.200	0.500	0.000
	8	0.000	0.167	0.000	0.387	0.500	0.800	0.500	1.000
	9	0.938	0.833	0.969	0.548	0.500	0.000	0.000	0.000
ANUCS 305	4	0.979	0.833	0.781	0.565	0.600	0.500	1.000	0.250
	8	0.021	0.167	0.219	0.403	0.400	0.500	0.000	0.750
	9	0.000	0.000	0.000	0.032	0.000	0.000	0.000	0.000
308	3	0.000	0.000	0.000	0.048	0.000	0.000	0.000	0.000
	5	0.000	0.000	0.000	0.387	0.200	0.000	0.000	0.500
	6	0.021	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	7	0.271	0.125	0.000	0.226	0.000	0.000	0.000	0.000
	8	0.500	0.417	0.594	0.016	0.000	0.200	1.000	0.000
	9	0.208	0.417	0.344	0.000	0.800	0.700	0.000	0.500
	10	0.000	0.000	0.000	0.032	0.000	0.100	0.000	0.000
	11	0.000	0.000	0.000	0.032	0.000	0.000	0.000	0.000
	12	0.000	0.042	0.000	0.081	0.000	0.000	0.000	0.000
	13	0.000	0.000	0.063	0.177	0.000	0.000	0.000	0.000
B05	7	0.354	0.208	0.281	0.000	0.200	0.400	0.500	0.000
	8	0.646	0.583	0.531	0.758	0.800	0.600	0.500	0.250
	9	0.000	0.125	0.063	0.177	0.000	0.000	0.000	0.500
	10	0.000	0.083	0.125	0.065	0.000	0.000	0.000	0.250
ANUCS 302	4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.500
	22	0.000	0.000	0.000	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000
	29	0.000	0.000	0.000	0.048	0.000	0.000	0.000	0.000
	31	0.292	0.167	0.031	0.113	0.500	0.500	0.500	0.250
	33	0.708	0.708	0.875	0.210	0.200	0.200	0.000	0.000
	35	0.000	0.083	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	36	0.000	0.042	0.094	0.613	0.300	0.300	0.500	0.000
	37	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.250
ANUCS 301	15	0.000	0.000	0.000	0.613	0.900	0.900	1.000	0.250
	16	0.000	0.042	0.000	0.016	0.000	0.000	0.000	0.750
	17	0.125	0.250	0.094	0.161	0.000	0.100	0.000	0.000
	19	0.021	0.042	0.031	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	20	0.792	0.583	0.719	0.097	0.000	0.000	0.000	0.000
	21	0.042	0.042	0.063	0.000	0.100	0.000	0.000	0.000
	22	0.021	0.000	0.000	0.032	0.000	0.000	0.000	0.000
	23	0.000	0.042	0.094	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	24	0.000	0.000	0.000	0.065	0.000	0.000	0.000	0.000
	25	0.000	0.000	0.000	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000
ANUCS 501	4	1.000	0.917	0.906	0.694	1.000	1.000	1.000	0.750
	5	0.000	0.083	0.094	0.081	0.000	0.000	0.000	0.000
	6	0.000	0.000	0.000	0.226	0.000	0.000	0.000	0.250
9269	5.3	0.938	0.708	0.750	0.016	0.100	0.200	1.000	0.000
	6	0.063	0.292	0.250	0.984	0.900	0.800	0.000	1.000
4910	4	0.292	0.583	0.781	0.597	0.500	0.700	0.000	0.250
	5	0.646	0.167	0.219	0.000	0.500	0.200	0.500	0.000
	10	0.063	0.250	0.000	0.371	0.000	0.100	0.500	0.750
	15	0.000	0.000	0.000	0.032	0.000	0.000	0.000	0.000
5159	3	0.000	0.042	0.000	0.000	0.000	0.200	0.000	0.000
	4	0.000	0.042	0.000	0.016	0.000	0.000	0.000	0.250
	4.2	0.021	0.042	0.031	0.306	0.000	0.200	0.000	0.250
	6	0.958	0.833	0.969	0.645	1.000	0.600	1.000	0.500
	7	0.021	0.042	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	10	0.000	0.000	0.000	0.032	0.000	0.000	0.000	0.000
9043	3	0.292	0.625	0.281	0.581	0.400	0.200	0.000	0.000
	5	0.708	0.333	0.438	0.065	0.600	0.500	1.000	0.250
	6	0.000	0.042	0.281	0.339	0.000	0.300	0.000	0.750
	7	0.000	0.000	0.000	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000
1528	6	0.000	0.000	0.031	0.177	0.000	0.000	0.000	0.250
	7	1.000	1.000	0.969	0.823	1.000	1.000	1.000	0.750
3735	3	0.000	0.042	0.000	0.371	0.000	0.000	0.000	0.000
	4	0.313	0.458	0.188	0.065	0.000	0.000	0.000	0.250
	5	0.083	0.000	0.063	0.194	0.000	0.400	0.000	0.000
	6	0.604	0.458	0.531	0.113	1.000	0.600	1.000	0.250
	7	0.000	0.042	0.219	0.258	0.000	0.000	0.000	0.500
	10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.250
CS1	11	0.000	0.000	0.000	0.000	0.400	0.200	0.000	0.000
	12	0.021	0.000	0.125	0.048	0.400	0.500	0.500	0.000
	14	0.000	0.000	0.000	0.048	0.000	0.000	0.000	0.000
	17	0.063	0.083	0.188	0.258	0.200	0.200	0.500	0.250
	21	0.000	0.000	0.000	0.113	0.000	0.000	0.000	0.000
	23	0.042	0.000	0.031	0.274	0.000	0.000	0.000	0.250
	24	0.188	0.125	0.125	0.032	0.000	0.100	0.000	0.000
	25	0.104	0.167	0.031	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	26	0.292	0.333	0.313	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	27	0.146	0.208	0.000	0.129	0.000	0.000	0.000	0.000
	28	0.146	0.000	0.063	0.000	0.000	0.000	0.000	0.250
	29	0.000	0.083	0.125	0.065	0.000	0.000	0.000	0.000
30	0.000	0.000	0.000	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000	
31	0.000	0.000	0.000	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000	

Supplementary 2 Allele frequencies for all loci per population.

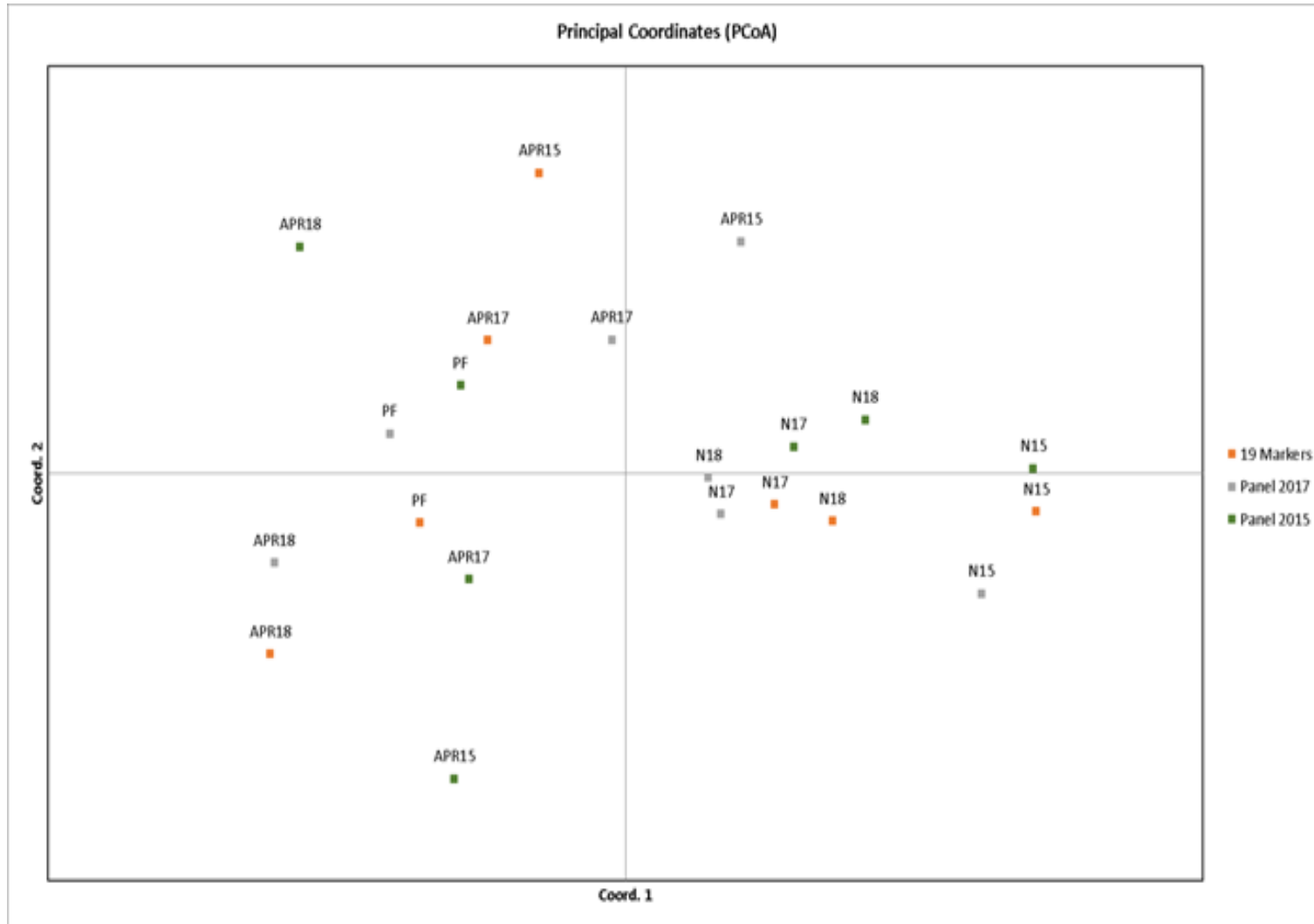




**Supplementary 3** Principal Coordinate Analysis (PCoA) of Panel 2017 based on genetic distance of all dataset (n=96). Percentage of variation explained by the axes expressed inside the parenthesis. N15 = *Cannabis sp.* samples seized at Northeastern Brazil in 2015; N17 = *Cannabis sp.* samples seized at Northeastern Brazil in 2017; N18 = *Cannabis sp.* samples seized at Northeastern Brazil in 2018; PF = *Cannabis sp.* seeds apprehended in postal office and cultivated by law enforcements; APR15 = Official drug seizures from Rio Grande do Sul in 2015; APR17 = Official drug seizures from Rio Grande do Sul in 2017; APR18 = Official drug seizures from Rio Grande do Sul in 2018; EUA = *Cannabis sativa* samples seized in USA used as positive control.



**Supplementary 4** Principal Coordinate Analysis (PCoA) of all 19 Markers based on genetic distance of all dataset (n=96). Percentage of variation explained by the axes expressed inside the parenthesis. N15 = *Cannabis sp.* samples seized at Northeastern Brazil in 2015; N17 = *Cannabis sp.* samples seized at Northeastern Brazil in 2017; N18 = *Cannabis sp.* samples seized at Northeastern Brazil in 2018; PF = *Cannabis sp.* seeds apprehended in postal office and cultivated by law enforcements; APR15 = Official drug seizures from Rio Grande do Sul in 2015; APR17 = Official drug seizures from Rio Grande do Sul in 2017; APR18 = Official drug seizures from Rio Grande do Sul in 2018; EUA = *Cannabis sativa* samples seized in USA used as positive control.



**Supplementary 5** Principal Coordinate Analysis (PCoA) of the three STR systems (all 19 Markers, Panel 2017, and Panel 2015) for all samples. The analysis was based on genetic distance between the populations expressed on  $F_{ST}$ .

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O ainda crescente consumo de *Cannabis sativa* no continente americano traz consigo um atuante mercado ilícito de drogas. Estratégias forenses nos mais variados campos de estudo vêm sendo propostas a fim de auxiliar a inteligência policial à repressão do tráfico. No âmbito da biologia celular e molecular, o uso de marcadores microssatélites (*short tandem repeats*; STR) ganham destaque devido a sua heterozigosidade e alto polimorfismo entre e dentre os indivíduos e as populações. Nos últimos dez anos, diversos estudos propuseram conjuntos de STRs capazes de individualizar e rastrear geograficamente amostras de maconha.

Os resultados obtidos pelo nosso trabalho permitiram a visualização da eficácia de dois sistemas de 13-loci STR recentemente divulgados na comunidade científica. Em comparação ao Painel 2015, o painel proposto em 2017 retirou seis marcadores, dado que haviam sido considerados de pior desempenho, e incluiu seis novos loci STR, já anteriormente testados. Contudo, nosso estudo concluiu que os valores de heterozigosidade dos novos marcadores foram baixos nas amostras brasileiras de *Cannabis sativa*; sendo a eficiência do Painel 2017 com 13-loci STR menor em relação a do Painel 2015, verificada pela diminuição do poder de discriminação e do poder de identificação da origem biogeográfica. Em concordância com o estudo prévio de nosso grupo, o Painel 2015, de fato, fornece informações concisas e suficientes para identificação de amostra e para rastreabilidade segundo a origem de *Cannabis sp.* traficada em território nacional.

A análise dos 19 marcadores STR juntos apresentou um ganho na discriminação individual de cada amostra, bem como na diferenciação da sua origem, como era esperado dado um aumento no número de marcadores. A eficiência demonstrada por apenas um dos sistemas pode ser suficiente para a caracterização de amostra quando a possibilidade de investimento financeiro e de recursos humanos, para análise dos dois painéis de 13-loci STR, for limitada.

Um sistema com marcadores de *Cannabis sp.* configura uma ferramenta útil para investigação forense, e o presente trabalho mostrou o quão informativo e específico ele pode ser para amostras traficadas no território brasileiro, passando, finalmente, a viabilizar a utilização deste recurso às unidades policiais.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Pró-Reitoria de Graduação  
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar  
Porto Alegre - RS - Brasil  
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564  
E-mail: [prograd@pucrs.br](mailto:prograd@pucrs.br)  
Site: [www.pucrs.br](http://www.pucrs.br)