

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Estudo da distribuição espacial de canabinoides e
alcaloides em folhas de *Cannabis sativa* e *Erythroxylum*
coca por *Imaging Mass Spectrometry***

***“Study of the spatial distribution of cannabinoids and alkaloids in Cannabis
sativa and Erythroxylum coca leaves by Imaging Mass Spectrometry”***

Nayara Araujo dos Santos

Tese de Doutorado em Química

**Vitória
2022**

Nayara Araujo dos Santos

Estudo da distribuição espacial de canabinoides e alcaloides em folhas de *Cannabis sativa* e *Erythroxylum coca* por *Imaging Mass Spectrometry*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do Título de Doutora em Química

Área de Concentração: Química

Linha de Pesquisa: Química Forense

Orientador: Prof. Dr. Wanderson Romão

**VITÓRIA
2022**

**Estudo da distribuição espacial de canabinoides e
alcaloides em folhas de *Cannabis sativa* e *Erythroxylum*
coca por *Imaging Mass Spectrometry***

Nayara Araujo dos Santos

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Química.

Aprovado(a) em 18/03/2022 por:

Prof. Dr. Wanderson Romão
Instituto Federal de Educação, Ciência
e Tecnologia do Espírito Santo/UFES
Orientador

Prof. Dr. Ricardo Machado Kuster
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Rodrigo Rezende Kitagawa
Universidade Federal do Espírito Santo

Dra. Fernanda Endringer Pinto
University of Copenhagen

Profa. Dra. Gabriela Vanini Costa
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, março de 2022

Dedico este trabalho a minha amada família.

“Que darei eu ao Senhor, por todos os benefícios que me tem feito?”

Salmos 116:12

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I – ESTADO DA ARTE

Figura 1. Folha de <i>Cannabis sativa</i> L.	6
Figura 2. Via biossintética dos canabinoides a partir das moléculas geranil pirofosfato e ácido olivetólico formando o canabinoide CBGA composto por um anel resorcinol (benzeno-1,3-diol) (A), fração terpênica (B), cadeia alquílica (C) e grupo carboxílico (D).	9
Figura 3. Possíveis rotas e produtos de biossíntese e degradação dos principais canabinoides ácidos precursores.	10
Figura 4. Porcentagem das quantidades de Cannabis apreendidas em 2018.	19
Figura 5. Anagrama da palavra cânhamo.	19
Figura 6. Nuvem de palavras com as 50 mais citadas (título, abstract e palavras-chave) nas publicações relacionadas à análise de <i>Cannabis</i> ou canabinoides nos últimos 5 anos. Dados adquiridos a partir de uma pesquisa no banco de dados <i>Web of Science</i> (Clarivate Analytics, Philadelphia, PA, Estados Unidos) usando os termos: “ <i>Cannabis or cannabinoids and analysis</i> ”.	22
Figura 7. Ilustração da contribuição científica por países, demonstrada a partir da intensidade de cor, com a temática <i>Cannabis</i> /canabinoides e análises.	23
Figura 8. Reação colorimétrica simplificada entre os reagentes Duquenois-Levine + Δ^9 -THC (coloração roxa), sal Fast Blue B + Δ^9 -THC (coloração vermelha) e sal Fast Blue BB + Δ^9 -THC (coloração vermelha).	25
Figura 9. Gráfico que correlaciona o número de publicações com as temáticas <i>Cannabis</i> /canabinoides e diferentes técnicas analíticas, RAMAN, NMR, IR, GC, HPLC/LC e MS, nos últimos 5 anos. Os dados foram adquiridos a partir de uma pesquisa no banco de dados <i>Web of Science</i> (Clarivate Analytics, Philadelphia, PA, Estados Unidos) usando os termos: “ <i>Cannabis or cannabinoids and RAMAN</i> ”; “ <i>Cannabis or cannabinoids and NMR</i> ”; “ <i>Cannabis or cannabinoids and IR</i> ”; “ <i>Cannabis or cannabinoids and GC</i> ”; “ <i>Cannabis or cannabinoids and HPLC or LC</i> ”; “ <i>Cannabis or cannabinoids and MS</i> ”.	26
Figura 10. Representação da planta <i>Erythroxylum coca</i>	29
Figura 11. Alcaloides: a) Cocaína, b) Benzoilecgonina, c) Cinamoilcocaína e d) Truxilina.	32
Figura 12. Porcentagem das quantidades de cocaína apreendidas em 2019.	34
Figura 13. Nuvem de palavras com as 50 mais citadas no <i>abstract</i> das publicações relacionadas à análise de <i>Erythroxylum coca</i> ou <i>cocaine</i> nos últimos 5 anos. Dados adquiridos a partir de uma pesquisa no banco de dados <i>Web of Science</i> (Clarivate Analytics, Philadelphia, PA, Estados Unidos) usando os termos: “ <i>Erythroxylum coca or cocaine and analysis</i> ”.	35
Figura 14. Ilustração da contribuição científica por países, demonstrada a partir da intensidade de cor, com a temática <i>Erythroxylum coca</i> ou cocaína e análises.	36
Figura 15. Reação de cor simplificada entre os reagentes Scott (tiocianato de cobalto) e a molécula da cocaína (coloração azulada).	36
Figura 16. Gráfico que correlaciona o número de publicações com as temáticas <i>Erythroxylum coca</i> /cocaína e diferentes técnicas analíticas, RAMAN, NMR, IR, GC, HPLC/LC e MS, nos últimos 5 anos. Os dados foram adquiridos a partir de uma pesquisa no banco de dados <i>Web of Science</i> (Clarivate Analytics, Philadelphia, PA, Estados Unidos) usando os termos: “ <i>Erythroxylum coca or cocaine and RAMAN</i> ”; “ <i>Erythroxylum coca or cocaine and NMR</i> ”; “ <i>Erythroxylum coca or cocaine and IR</i> ”; “ <i>Erythroxylum coca or cocaine and GC</i> ”; “ <i>Erythroxylum coca or cocaine and HPLC or LC</i> ”; “ <i>Erythroxylum coca or cocaine and MS</i> ”.	38
Figura 17. Representação de uma linha do tempo contendo a evolução dos analisadores de massas.	44
Figura 18. Ilustração esquemática do uso da fonte de ionização MALDI em três etapas: a) adição do reagente matricial na amostra previamente fixada na placa MALDI; b) após cristalização da matriz, é demonstrada a incidência do laser na superfície da amostra, c) ionização do analito.	45

Figura 19. Ilustração esquemática do método de imageamento por MS; **a)** A área da amostra é totalmente subdividida (conceitualmente) em pixels, que são analisados individualmente ponto a ponto (*pixel per pixel*) exemplificado pela incidência do *laser* (vermelho) e os íons gerados levados ao analisador (representação por seta); **b)** para cada *pixel*, um único espectro de massa é armazenado em conjunto com suas coordenadas espaciais; **c)** após toda a superfície ser analisada, há conversão em arquivo de imagem, e a partir de um espectro de massas médio são criadas imagens que podem ser individualmente visualizadas atribuindo uma cor a cada *m/z* específico; **d)** bem como a junção de vários *m/z* na mesma imagem (*colocalization*)..... 52

CAPÍTULO II – ARTIGO CIENTÍFICO I

Figura 1. Matrizes MALDI: a) MBT; b) DHB; e c) CHCA.	69
Figura 2. (a,e) LDI(-) MS, (b-d) MALDI(-) MS de folhas de <i>Cannabis</i> frescas e (f-h) folhas envelhecidas em função de diferentes matrizes: (b,f) MBT, (c,g) CHCA, (d,h) DHB, na concentração de 0,1 mg mL ⁻¹	70
Figura 3. MALDI(-)MS (a-i) de folhas frescas de <i>Cannabis</i> usando a matriz MBT nas concentrações de 0,1 a 25,0 mg mL ⁻¹ . Espectros de massas da folha de <i>Cannabis</i> sem matriz (LDI(-) MS) e apenas da solução matriz são mostrados nas figuras (j) e (k) , respectivamente.	72
Figura 4. <i>Imaging</i> MS a) LDI(-); e MALDI(-) de folhas envelhecidas (2015) de <i>Cannabis</i> com diferentes matrizes na concentração 0.1 mg mL ⁻¹ : b) MBT; c) CHCA; d) DHB. As imagens mostram a distribuição dos canabinoides: CBN, <i>m/z</i> 309 (azul), Δ ⁹ -THC, <i>m/z</i> 313 (verde), CBNA, <i>m/z</i> 353 (vermelho) e Δ ⁹ -THCA, <i>m/z</i> 357 (amarelo).	74
Figura 5. <i>Imaging</i> MS a) LDI(-); e MALDI(-) de folhas frescas (2018) de <i>Cannabis</i> com diferentes matrizes na concentração 0.1 mg mL ⁻¹ : b) MBT; c) CHCA; d) DHB. As imagens mostram a distribuição dos canabinoides: CBN, <i>m/z</i> 309 (azul), Δ ⁹ -THC, <i>m/z</i> 313 (verde), CBNA, <i>m/z</i> 353 (vermelho) e Δ ⁹ -THCA, <i>m/z</i> 357 (amarelo).	75
Figura 6. MALDI(-) <i>imaging</i> MS, com a matriz MBT na concentração de 0.1 mg mL ⁻¹ , mostrando a distribuição dos canabinoides: a) CBNA (<i>m/z</i> 353, vermelho); b) Δ ⁹ -THCA (<i>m/z</i> 357, amarelo); e <i>colocalizations</i> : c) CBNA e Δ ⁹ -THCA (<i>m/z</i> 353 e 357) e d) Δ ⁹ -THC, CBNA e Δ ⁹ -THCA (<i>m/z</i> 313, 353, 357, verde, vermelho e amarelo, respectivamente), na superfície da folha fresca de <i>Cannabis</i>	77
Figura 7. MALDI(-) <i>imaging</i> MS, com matriz MBT (0,1 mg mL ⁻¹), mostrando a distribuição de a) CBNA, <i>m/z</i> 353 e b) Δ ⁹ -THCA, <i>m/z</i> 357 em folhas frescas de <i>Cannabis</i> extraídas com solvente hexano.	78

CAPÍTULO III – ARTIGO CIENTÍFICO II

Figura 1. Representações da folha de <i>Erythorylum coca</i> : a) adaxial, b) abaxial, c) regiões da folha, e d-f) divisões das folhas.	87
Figura 2. Espectros de massas de folhas de cocaína pelas fontes: a) ESI(+) (0,02 mg mL ⁻¹ em metanol), b) LDI(+) (1 cm ² da folha) e c) MALDI(+) (1 cm ² da folha com matriz DHB, 2 mg mL ⁻¹).	92
Figura 3. Experimentos CID para o <i>m/z</i> 304 que corresponde a molécula da cocaína e, <i>m/z</i> 304, e proposta de mecanismo de fragmentação dos íons de <i>m/z</i> 182 e 272....	95
Figura 4. LDI(+) <i>imaging</i> mostrando análise da superfície foliar com o monitoramento da: a) cocaína cationizada com potássio ([C ₁₇ H ₂₁ NO ₄ +K] ⁺ , e <i>m/z</i> 342.1798), em escala	

colorida; e b) em cor ficta verde; a c) molécula de truxilina ($[\text{C}_{38}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_8+\text{K}]^+$ de m/z 697.2949) monitorada pela imagem com cor ficta rosa; d) e o <i>colocalization</i> das moléculas de cocaína e truxilina. Todas as imagens foram obtidas com resolução espacial de $150 \times 150\mu\text{m}$	96
Figura 5. LDI(+) <i>imaging</i> MS mostrando a distribuição espacial, nas regiões adaxial e abaxial, do alcaloide cocaína, m/z 342 na folha de coca adaxial e abaxial, resolução de $150 \times 150\mu\text{m}$	97
Figura 6. MALDI(+)IMS e LDI(+)IMS de quatro partes da folha de coca com diferentes matrizes (2 mg mL^{-1}): a) CHCA; b) LDI; c) DHB e d) MBT. Os resultados mostram a distribuição espacial, em escala colorida, da cocaína (m/z 342).	99
Figura 7. Espectros de MALDI(+) MS de folhas de coca avaliadas com adição de cinco concentrações da matriz DHB: a) 0,5; b) 1,0; c) 2,0; d) 4,0 e e) 8,0 mg mL^{-1}	100
Figura 8. Relação entre a abundância relativa dos sinais de cocaína em cada uma das cinco concentrações da matriz DHB (0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg mL^{-1}).	101
Figura 9. MALDI(+) <i>imaging</i> MS mostrando a distribuição de cocaína protonada (m/z 304, vermelha) e com aduto de potássio (m/z 342, verde) em cinco diferentes concentrações (0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg mL^{-1}), sendo o experimento realizado em duplicata.	102
Figura 10. MALDI <i>imaging</i> , modo positivo, mostrando a distribuição dos compostos na superfície da folha coca, com matriz DHB em uma concentração de $2,0\text{ mg mL}^{-1}$: a) cocaína protonada (vermelho), m/z 304,1265, b) cocaína cationizada (verde), m/z 342,1502, c) truxilina com aduto de potássio, m/z 697,2998 (rosa), e d) <i>colocalization</i> dos três sinais (cocaína protonada e cationizada na cor verde e truxilina com aduto de potássio na cor rosa).	103
Figura 11. Demonstração da síntese natural da molécula de truxilina a partir de duas moléculas de cinamoilcocaína por fotodimerização.	104
12. MALDI <i>imaging</i> , modo positivo, mostrando a distribuição dos compostos na superfície da folha coca, com matriz DHB em uma concentração de $2,0\text{ mg mL}^{-1}$. a) <i>colocalization</i> : moléculas cationizadas cinamoilcocaína (amarelo) e truxilina (rosa) e b) benzoilecgonina cationizada (cinza).	105
Figura 13. MALDI <i>imaging</i> , modo positivo, mostrando a distribuição dos flavonoides: a) Isoquercitrin, b) kaempferol, c) herbacetin, d) carlinoside, e) peltatoside e f) rutin na superfície da folha coca, com matriz DHB em uma concentração de $2,0\text{ mg mL}^{-1}$. ..	106
Figura 14. LDI <i>imaging</i> de folhas de coca lavadas com os solventes: a) metanol, b) acetonitrila, c) tolueno e d) diclorometano, com resolução de $150 \times 150\mu\text{m}$	107
Figura 15. LDI(+) <i>imaging</i> de folha de coca, resolução de $50 \times 50\mu\text{m}$, pós secção de corte de $50\mu\text{m}$: a) distribuição espacial da molécula cocaína protonada e com aduto de sódio; b) distribuição espacial da molécula cocaína (protonada e com aduto de sódio) e da molécula truxilina.	108
Figura 16. LDI(+) <i>imaging</i> de folha de coca, resolução de $50 \times 50\mu\text{m}$, pós secção de corte de $50\mu\text{m}$, monitoring flavonoids molecules: a) isoquercitrina, b) kaempferol, c) herbacetina, d) carlinosídeo, e) peltatosídeo e f) rutina.	109

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I – ESTADO DA ARTE

Tabela 1. Onze grupos da classe canabinoides, sua estrutura química representativa e breve referência histórica.	11
Tabela 2. Contribuições históricas (2700 a.C. a 2022) e direções terapêuticas com uso da <i>Cannabis</i> /cannabinoides. ³⁵	13
Tabela 3. Etapas do processo e discussão relacionados a regulamentação da <i>Cannabis</i> para uso medicinal. ⁵⁸	21
Tabela 4. Artigos publicados que utilizaram a técnica MALDI no estudo de <i>Cannabis</i> e/ou cannabinoides (incluindo os endocannabinoides e sintéticos), <i>Erythroxylum coca</i> e/ou cocaína, e suas respectivas informações resumidas em: ano de publicação, objetivo do estudo, matriz MALDI utilizada e analisador de massas. Os dados foram adquiridos a partir de uma pesquisa no banco de dados <i>Web of Science</i> (<i>Clarivate Analytics</i> , Philadelphia, PA, Estados Unidos) usando os termos: “ <i>Cannabis or cannabinoids and MALDI</i> ” e “ <i>Cannabis or cannabinoids and matrix-assisted laser-desorption ionization</i> ”; “ <i>Erythroxylum coca or cocaine and MALDI</i> ” e “ <i>Erythroxylum coca or cocaine and matrix-assisted laser-desorption ionization</i> ” ..	46

CAPÍTULO II – ARTIGO CIENTÍFICO I

Tabela 1. Detecção dos cannabinoides CBN, Δ^9 -THC, CBNA e Δ^9 -THCA em função da concentração (0.1-25 mg mL ⁻¹) das matrizes MBT, DHB e CHCA, usando a técnica de MALDI(-) MS.	68
Tabela 2. Informações de fórmula, DBE, m/z medido e TIC da análise de folhas novas (2018) e envelhecidas (2015) de <i>Cannabis</i>	71

CAPÍTULO III – ARTIGO CIENTÍFICO II

Tabela 1. Compostos identificado por ESI(+)-MS e suas respectivas classes, fórmulas moleculares, valores de m/z medido, m/z teórico, erros de massa (ppm), DBE, intensidade relativa (%) e TIC.	93
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIR – Análise de Impacto Regulatório

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AP – Afinidade de prótons

CHCA – *α -cyano-4-hydroxycinnamic acid*

CID – *Collision-induced dissociation*

DBE – Double bound equivalente

DCB – Denominações Comuns Brasileiras

DESI – *desorption electrospray ionization*

DHB – *2,5-dihydroxybenzoic acid*

Du-Le – Duquenois-Levine

ESI – *Electrospray ionization*

FBB – *Fast Blue B*

FBBB – *Fast Blue BB*

FT-ICR MS – *Fourier transform ion cyclotron resonance*

FT-ICR MS – *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*

GC – *Gas Chromatography*

GC×GC – *Comprehensive two-dimensional gas chromatography*

GC-MS – *Gas Chromatography Mass Spectrometry*

GT – Grupo de Trabalho

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

IMMS – Ion mobility mass spectrometry

IMS – *Imaging mass spectrometry*

IR – *Infrared spectroscopy*

IT – *Ion Trap*

LC – *Liquid Chromatography*

LC-MS – *Liquid Chromatography mass spectrometry*

LDI – *laser desorption/ionization*

LP – *laser power*

LTQ – *Linear Ion Trap*

MALDI – *matrix-assisted laser desorption/ionization*

MAO – monoamino-oxidase

MBT – *2-mercaptobenzothiazole*

MIKES – *Mass-analyzed ion kinetic energy spectrometry*

MS – Mass Spectrometry

Mw – *Average molecular weight*

NCQP – Núcleo de Competências em Química do Petróleo

NMR – *Nuclear Magnetic Resonance*

OCT – *optimal cutting temperature polymer*

PC-ES – Polícia Civil do Espírito Santo

PF-RS – Polícia Federal do Rio Grande do Sul

Q/TRAP – *Triple quadrupole linear ion trap*

QIT-TOF – *Quadrupole Ion Trap TOF*

QQQ – *triple quadrupole*

Q-TOF – *Quadrupole TOF*

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

TDAH – Transtorno de *déficit* de atenção/hiperatividade

TIC – *total ion current*

TOF – *time-of-flight*

UFES – Universidade Federal do Espírito Santo

UNODC – *United Nations Office on Drugs and Crime*

RESUMO

As plantas são organismos versáteis, constituídos em diversos tecidos e possuem complexas composições químicas com numerosa quantidade de moléculas, muitas das quais sofrem mudanças durante o seu desenvolvimento, o que representa um grande desafio para a área científica, especialmente a metabolômica. Particularmente as plantas milenares *Cannabis* e *Erythroxylum coca* possuem uma relação muito próxima com a sociedade, seja devido as suas ações benéficas, com possíveis aplicações em tratamentos de doenças e sintomas, como por suas ações deletérias, relacionadas aos seus produtos para fins ilícitos e abusivos. Ainda assim, são extraordinários os avanços que norteiam a linha evolutiva científica destas plantas, como os estudos dos seus principais constituintes que somados à evolução da instrumentação analítica tornam-se capazes de fornecer novos *insights*, além de melhorar a compreensão da sua composição e organização histológica. Destarte, conceitos gerais relacionados a *Cannabis* e *Erythroxylum coca*, bem como a evolução da espectrometria de massas, com destaque ao imageamento químico de superfícies intactas usando a técnica ionização por dessorção a laser assistida por matriz, do inglês *matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry* – MALDI IMS, são abordados no presente estado da arte.

Palavras-chave: *Cannabis*, *Erythroxylum coca*, canabinoides, alcaloides, composição química, *imaging*, espectrometria de massas.

ABSTRACT

Plants are versatile organisms, made up of different tissues and have complex chemical compositions with numerous molecules, many of which undergo changes during their development, which represents a great challenge for the scientific area, especially metabolomics. Particularly, the ancient plants *Cannabis* and *Erythroxylum coca* have a very close relationship with society, either due to their beneficial actions, with possible applications in the treatment of diseases and symptoms, or for their deleterious actions, related to their products for illicit and abusive purposes. Even so, the advances that guide the scientific evolutionary line of these plants are extraordinary, such as the studies of their main constituents that, added to the evolution of analytical instrumentation, become capable of providing new insights, in addition to improving the understanding of their composition and histological organization. Thus, general concepts related to *Cannabis* and *Erythroxylum coca*, as well as the evolution of mass spectrometry, with emphasis on chemical imaging of intact surfaces using the matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry – MALDI IMS technique, are addressed in the present state of the art.

Keywords: *Cannabis*, *Erythroxylum coca*, cannabinoids, alkaloids, chemical composition, imaging mass spectrometry.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – ESTADO DA ARTE	5
1. <i>Cannabis</i>: um breve resumo de uma longa e antiga história.....	5
1.1 Avanços em canabinômica: de testes colorimétricos a técnicas analíticas.....	22
2. <i>Erythroxylum coca</i> e seu contexto histórico e científico	28
2.1. Avanços em alcaloideômica de folhas de coca: de testes colorimétricos a técnicas analíticas.....	34
3. A evolução da espectrometria de massas até o imageamento químico	43
CONCLUSÕES.....	54
REFERÊNCIAS – PARTE I.....	55
CAPÍTULO II – ARTIGO CIENTÍFICO I	68
“LDI e MALDI-FT-ICR <i>Imaging</i> MS em folhas de <i>Cannabis</i>: estudo da distribuição espacial de canabinoides”	68
RESUMO	68
1. INTRODUÇÃO.....	69
2. METODOLOGIA	72
2.1 Amostras e Reagentes	72
2.1.1 Preparação das amostras e matrizes MALDI.....	72
2.2 LDI(-) e MALDI(-) MS e <i>Imaging</i>	72
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	74
3.1 LDI(-) e MALDI(-) MS.....	74
3.2 LDI(-) e MALDI(-) IMS.....	79
CONCLUSÕES	85
AGRADECIMENTOS	85
REFERÊNCIAS – PARTE II	86
CAPÍTULO III - ARTIGO CIENTÍFICO II.....	89
“Análises de folhas de <i>Erythroxylum coca</i> por espectrometria de massa de imagem (MALDI-FT-ICR IMS)”	89
RESUMO	89
1. INTRODUÇÃO	90
2. METODOLOGIA.....	92
2.1. Amostras e Reagentes	92
2.2. Avaliação de matrizes MALDI	93
2.3. Efeito da concentração da matriz MALDI	94
2.4. Efeito de solventes orgânicos na lavagem de folhas de coca.....	94
2.5. Seccionamento do tecido vegetal	94
2.6. ESI(+)MS, ESI(+)MS/MS, LDI(+), MALDI(+)MS e IMS	94
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	96
3.1. ESI(+)MS, LDI/MALDI(+)MS e IMS	96
CONCLUSÕES	115
AGRADECIMENTOS	115
REFERÊNCIAS – PARTE III	116

CAPÍTULO I – ESTADO DA ARTE

1. *Cannabis*: um breve resumo de uma longa e antiga história

A planta *Cannabis*, erva anual que pertence à família *Cannabaceae*, é considerada uma das plantas mais antigas conhecida pelo homem.^{1,2} Seu histórico milenar, norteador por evoluções, descobertas e novas aplicações, teve início milênios antes de Cristo (a.C.) registrados em evidências arqueológicas descobertas na Ásia Central que indicam o cultivo desta planta para uso como fibra e corda cerca de 12.000 anos a.C., além disso, artefatos de tecidos de cânhamo, com datação há vários milênios, também foram descobertos na China.³

Apesar dos milhares de anos da sua utilização para diversos fins, a classificação botânica da *Cannabis* tem sido objeto de debate e alterações desde o final do século XVIII.⁴ Ainda assim, a comunidade internacional reconhece o ano de 1753 como ponto de partida para a nomenclatura botânica moderna desta planta, quando foi realizada a primeira publicação oficial com uso da denominação científica de espécies, *Latin binomials Linnaeus's Species Plantarum, Cannabis sativa*.⁵

Atualmente, apesar das muitas variedades de *Cannabis*, mais de 600 disponíveis comercialmente,⁶ e inexistência de um acordo geral sobre a classificação taxonômica de vários grupos dentro do gênero *Cannabis*, de acordo com *United States Department of Agriculture (2021)*⁷ a classificação taxonômica da espécie *Cannabis sativa* L. atual é:

Classificação taxonômica:

Reino: *Plantae* (plantas)
Sub-reino: Tracheobionta (plantas vasculares)
Superdivisão: Spermatophyta (plantas com sementes)
Divisão: Magnoliophyta (plantas com flores)
Classe: Magnoliopsida (dicotiledôneas)
Subclasse: Hamamelididae
Ordem: Urticales
Família: Cannabaceae
Gênero: *Cannabis*
Espécie: *Cannabis sativa* L.⁷

Em 1974, Schultes, Klein, Plowman e Lockwood distinguiram três espécies dentro do gênero *Cannabis*: *sativa* L., *indica* Lam. e *ruderalis*.⁸ No entanto, atualmente é comumente aceito que a planta *Cannabis* é monotípica e as demais espécies são reconhecidas como variedades de *Cannabis sativa* L. (**figura 1**).⁹⁻¹² O nome “*Cannabis*” significa “semelhante à cana”, enquanto o nome do gênero “*sativa*” tem o significado de “plantada ou semeada”, que faz referência ao fato da planta ser propagada a partir das sementes.⁵



Figura 1. Folha de *Cannabis sativa* L. Fonte: Própria autora.

A *Cannabis* é uma planta dióica (flores masculinas e femininas que se desenvolvem em plantas separadas), com sementes que germinam geralmente entre três a sete dias, possui cultivo anual e cresce rapidamente sob condições adequadas, atingindo até cinco metros de altura de quatro a oito meses da primavera ao outono.¹³

Entre os aspectos morfológicos macroscópicos da planta, destacam-se: i) os caules que são angulares, ramificados, sulcados, lenhosos no interior e, por vezes ocos nos entrenós; ii) as raízes, que apresentam maiores ramificações em solos úmidos; iii) folhas com aspecto verde e palmadas, com tamanho variável de acordo com a origem genética, disposição de arranjo oposto, alternativo ou espiral, margens

serrilhadas, superfícies adaxial e abaxial verdes, e com tricomas resinosos distribuídos; iv) inflorescências estaminada (flor masculina) ou pistiladas (flores femininas), encontradas nos caules folhosos de cada axila (junção dos ramos com o pecíolo) da folha; e v) sementes, do tipo aquênio, que possui casca rígida, com cerca de 2–5 mm de comprimento, de cor acastanhado e mosqueado.^{5,14}

Já as estruturas microscópicas da superfície foliar que caracterizam a planta *Cannabis* são os tricomas, protuberâncias epidérmicas que cobrem as folhas, brácteas e caules das plantas.^{14,15} Estes compreendem um conjunto diversificado de estruturas e diferentes tipos, como, tricomas glandular e não-glandular, que podem ser observados na mesma folha.⁵

Particularmente nos tricomas glandulares a resina de *Cannabis* é produzida e armazenada, e a estes estão associados às estruturas das flores da planta, capazes também de serem encontrados nas regiões inferiores das folhas e caules. No entanto, é a combinação dos diferentes tricomas que possibilita a identificação positiva até mesmo de material fragmentado da planta *Cannabis*.^{14,16}

Esta planta pode ser cultivada em condições internas e externas, este último modo de cultivo é normalmente limitado a uma safra por ano. No cultivo ao ar livre, conhecido como método *outdoor*, as sementes podem ser semeadas em vasos, posteriormente as mudas saudáveis são transplantadas para o campo, onde também, alternativamente, as sementes podem ser diretamente plantadas.¹⁶

Já no modo interno, *indoor*, há possibilidade de controlar as condições ambientais, regulando assim o ciclo da planta e, portanto, gerindo a qualidade desta. As plantas cultivadas nesta condição geralmente têm menor biomassa em comparação com as plantas cultivadas em condições externas. Ainda assim, para produção de *Cannabis* com perfil químico mais específico, por exemplo para uso farmacêutico, este método pode ser mais adequado.¹⁶

Atualmente, a planta *Cannabis* está distribuída em todo o mundo pois cresce em altitudes e condições de solo e clima variáveis.¹⁷ Inclusive a sua composição química pode variar significativamente, pois a concentração de muitos dos seus componentes dependem de fatores como: tipo e idade da planta, variedade, condições de crescimento (nutrição, umidade e níveis de luz), tempo de colheita, condições de armazenamento entre outros. Portanto, além do controle no processo de cultivo, o estudo do conteúdo químico desta planta é de grande importância,

considerando que as concentrações dos seus constituintes e possíveis interações entre estes podem produzir efeitos medicinais e efeitos colaterais adversos.¹⁸

A *Cannabis* tem sido extensivamente estudada ao longo dos anos e é considerada uma planta complexa e polimórfica, que produz uma ampla variedade de metabólitos bioativos.⁶ Atualmente mais de 700 constituintes naturais, que se dividem em diferentes classes/grupos, como flavonoides, terpenos, esteroides, fenantrenos, ácidos graxos, compostos nitrogenados, bifenilos, xantonas, canabinoides entre outros, já foram identificados nesta planta.¹⁹⁻²¹

Particularmente os canabinoides detectados na *Cannabis* também são nomeados como fitocanabinoides, para distinguir este grupo em particular dos demais canabinoides como os sintéticos e os endocanabinoides (ligantes do receptor de canabinoides quimicamente endógenos em mamíferos).¹⁸ No entanto, neste trabalho, para nitidificar, os fitocanabinoides serão denominados apenas como canabinoides, e quaisquer demais variedade será nominalmente identificada.

A classe dos canabinoides contempla os principais compostos responsáveis pelas atividades biológicas da planta *Cannabis*, e são, em sua maioria, compostos terpenofenólicos, tricíclicos e possuem uma fração benzopirano em suas estruturas.²² Além disso, grande parte dos canabinoides possuem 21 ou 22 átomos de carbono, e possíveis variações no comprimento de suas cadeias laterais (C₁-C₅) unidas ao anel aromático. Nos homólogos mais comuns, quando a cadeia lateral *n*-pentila é substituída por *n*-propila, esses análogos são nomeados usando o sufixo "*varin*", como por exemplo: *tetraidrocanabivarin* (THCV) e *canabidivarin* (CBDV).²³

É sabido também que a *Cannabis* possui genoma diploide composto por nove autossomos e um par de cromossomos sexuais (X e Y), e seu genoma foi recentemente sequenciado.²⁴

Quanto a biossíntese dos canabinoides, esta é exclusiva da planta *Cannabis*,²² e o início da via biossintética acontece a partir da formação do ácido olivetólico e do pirofosfato de geranilo, derivados das vias policetídeo e fosfato de desoxililulose, respectivamente, que formam o precursor central dos canabinoides: o ácido canabigerólico (CBGA), que possui uma estrutura química composta por um anel resorcinol (benzeno-1,3-diol) **(A)**, fração terpênica **(B)**, cadeia alquílica **(C)** e grupo carboxílico **(D)**, **figura 2**.^{13,18,25,26}

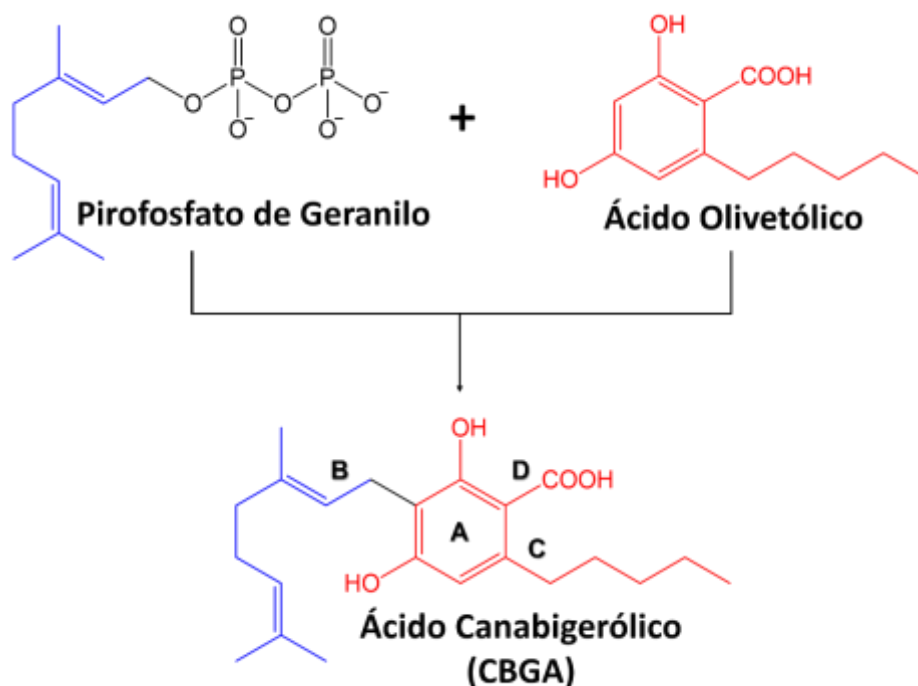
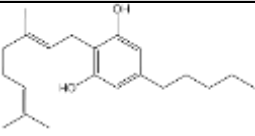
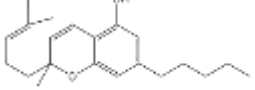
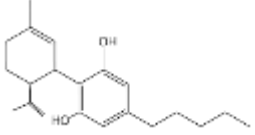
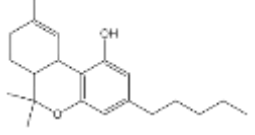
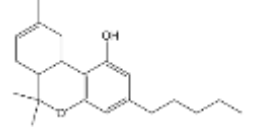
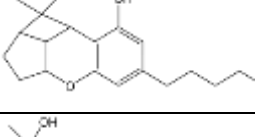
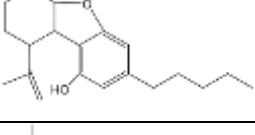
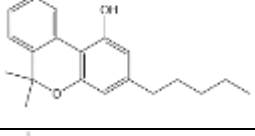
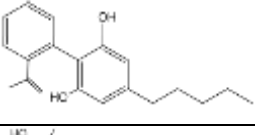
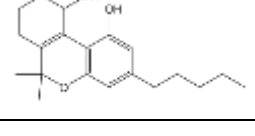


Figura 2. Via biossintética dos canabinoides a partir das moléculas geranil pirofosfato e ácido olivetólico formando o canabinoide CBGA composto por um anel resorcinol (benzeno-1,3-diol) **(A)**, fração terpênica **(B)**, cadeia alquílica **(C)** e grupo carboxílico **(D)**. Fonte: Chandra *et al.*, 2017 – Adaptada.²⁵

Os demais canabinoides que derivam inicialmente do CBGA apresentam similaridade em termos de estruturas químicas (destacado em vermelho na **figura 3**). Os ácidos Δ^9 -tetraidrocanabinólico (Δ^9 -THCA), canabidiólico (CBDA) e canabícromênico (CBCA), **figura 3** (1, 2 e 3) diferem-se apenas pela ciclização enzimática da fração terpênica. Os ácidos canabinodiólico (CBNDA) e canabinólico (CBNA) são as formas totalmente aromatizadas resultantes da oxidação de CBDA e Δ^9 -THCA, respectivamente. O ácido Δ^8 -tetraidrocanabinólico (Δ^8 -THCA) é formado quando a ligação dupla no nono carbono é isomerizada, a partir de Δ^9 -THCA, na oitava posição. Enquanto o ácido canabiciclólico (CBLA) é formado pela criação de dois anéis adicionais ao CBCA por reação fotoquímica. O ácido canabielsóico (CBEA) é formado a partir da hidroxilação e a ligação de um dos dois átomos de oxigênio fenólicos na ligação dupla endocíclica da unidade de monoterpene do CBDA. Por fim, o ácido canabitriólico (CBTA) é a forma hidroxilada de Δ^9 -THCA com dois grupos hidroxila adicionais em posições diferentes.¹⁸

Tabela 1. Onze grupos da classe canabinoides, sua estrutura química representativa e breve referência histórica.

Grupo	Estrutura	Referência Histórica
CBG		O primeiro canabinoide isolado da <i>Cannabis</i> em uma forma pura, 1964, e seu precursor, o ácido canabigerólico (CBGA) é o primeiro canabinoide biogênico formado na planta. ¹³
CBC		Descoberto em 1966, e por consequência outros compostos do tipo CBC foram sequencialmente identificados. ^{12,23}
CBD		Isolado em 1940, no entanto, a sua estrutura química foi corretamente elucidada apenas em 1963. ^{13,29}
Δ^9 -THC		Foi isolado pela primeira vez em 1942, mas a correta atribuição da estrutura ocorreu apenas em 1964. ^{12,30}
Δ^8 -THC		Isolado em 1966 e correta estrutura química proposta em 1970. Este grupo contém a menor quantidade de canabinoides atribuídos (2 canabinoides). ^{12,31}
CBL		Foi considerado estruturalmente semelhante ao Δ^9 -THC, porém em 1967 foi renomeado para canabicyclol. ^{12,13,31}
CBE		Relatado na literatura pela primeira vez no ano 1973, pode ser formado a partir do CBDA e CBD. ¹²
CBN		Elucidado estruturalmente em 1940 e é considerado produto de degradação do Δ^9 -THC. ¹³
CBND		Os canabinoides desse grupo são derivados do CBD. A primeira molécula dessa classe foi identificada em 1972. ¹²
CBT		Isolado pela primeira vez em 1966, e sua estrutura determinada em 1976. ^{12,32}
“tipos diferentes”	-	EISOHly e Slade, em 2005, propuseram esse grupo para atribuir os canabinoides que não se enquadram nos demais, além dos canabinoides que apresentam a função orgânica cetona. ^{5,13}

- Não possui estrutura química representativa.

Ainda assim, apesar de todos as descobertas e pesquisas relacionadas, a diversidade estrutural dentro da classe canabinoides está longe de ter sido extensivamente estudada, como exemplificado pela descoberta do *cannabimovone* (CBM) e o *cannabioxepane* (CBX), novos canabinoides tetracíclico recentemente identificados.²⁷ Além disso, em muitos casos as semelhanças entre as propriedades físico-químicas e de estruturas dos canabinoides representam um obstáculo para o seu devido isolamento na forma química pura e investigação subsequente de suas bioatividades.³³

Particularmente em relação ao Δ^9 -THC, que teve a sua estrutura química relatada pela primeira vez por Gaoni e Mechoulam em 1964,³⁰ e possui nomenclatura IUPAC atual: 6,6,9-trimetil-3-pentil-6h-dibenzo[b,d]piran-1-ol, fórmula molecular $C_{21}H_{30}O_2$, massa molar = 314 Da, é considerado o principal composto psicoativo da planta,^{23,25,34,35} e possui teor variável nas regiões da *Cannabis*, com ordem decrescente a partir das suas partes superiores. Nas flores, o teor de Δ^9 -THC varia entre 10 a 12%, nas folhas, de 1 a 2 %, e em proporções muito menores nas partes inferiores; caule, de 0,1 a 0,3% e raízes, < 0,03%.¹⁴

Nas sementes, a presença do Δ^9 -THC ainda é um tema discutível entre pesquisadores.^{13,14} Elsohly e colaboradores (2007) sugerem que de acordo com a variedade da planta, a concentração de Δ^9 -THC na semente pode ser inferior a 0,5µg/g.¹³ No entanto, em 2009, segundo a Organização das Nações Unidas sobre Drogas e Crimes (*United Nations Office on Drugs and Crime*, UNODC) não há Δ^9 -THC nas sementes, e é sustentada a ideia de que quando este é detectado possivelmente seja por contato das sementes com as brácteas e/ou flores da planta, que possuem alto teor deste canabinoide.¹⁴

Foi a partir da descoberta dos efeitos psicoativos do canabinoide Δ^9 -THC que a busca pela base farmacológica para os seus efeitos psicotrópicos foi impulsionada. Esta busca resultou em outras três descobertas importantes: i) dois novos receptores acoplados à proteína G, denominados como receptor canabinoide tipo 1 (CB1) e tipo 2 (CB2); ii) a percepção da ativação desses receptores por Δ^9 -THC; e iii) efeitos na função cerebral associados à ativação do CB1 produzidos pelo Δ^9 -THC.^{27,35}

Por um período após a sua descoberta, acreditava-se que o receptor CB1 era expresso principalmente no sistema nervoso central (SNC) e, assim, era considerado

um receptor canabinoide do cérebro. No entanto, hoje é sabido que está presente em numerosos órgãos periféricos.³⁴

Atualmente, os estudos das ações farmacológica com os canabinoides têm avançado e vem sendo explorados como alvos farmacêuticos com possíveis aplicações no tratamento de sintomas e doenças como: dor, inflamação, êmese (vômito), anorexia, esclerose múltipla, distúrbios neurodegenerativos, epilepsia, câncer, distúrbios cardiovasculares entre outros.¹⁸ No entanto, o uso da *Cannabis* para fins medicinais remonta a milênios.³⁶

As circunstâncias em que a *Cannabis* foi usada medicinalmente pela primeira vez se perderam no tempo. No entanto, Russo (2014) elencou de forma cronológica (2700 a.C. a 2012) algumas possíveis direções terapêuticas e importantes descobertas em épocas distintas na história, que são apresentadas objetivamente na **Tabela 2**, seguidas pelos próximos dez anos (2013 a 2022), onde outros trabalhos notórios, desenvolvidos por diferentes grupos de pesquisas e registrados na literatura, também são elencados.³⁵

Tabela 2. Contribuições históricas (2700 a.C. a 2022) e direções terapêuticas com uso da *Cannabis*/canabinoides.³⁵

Ano/Período	Aplicações e desenvolvimento do uso da <i>Cannabis</i> /canabinoides
2700 a.C.	Shen Nong Ben Cao Jing observa efeitos alucinatórios, estimulação do apetite, efeitos tônicos e anti-envelhecimento com uso oral de <i>Cannabis</i>
c.2000 a.C.	Sementes de <i>Cannabis</i> em Margiana, parte de rituais religiosos
c.1800 a.C.	30 citações da Suméria Antiga e Acadiana para tristeza, epilepsia, neuralgia e pediculicida (piolhos)
1534 a.C.	<i>Ebers Papyrus</i> (tratado médico mais antigo e reconhecido), Egito, indicações para uso ginecológico e condições oftalmológicas etc
c.1500 a.C.	Atharva Veda (texto do hinduísmo), "bhanga": bebida preparada com <i>Cannabis</i> para "nos libertar da ansiedade"
c.600 a.C.	Na Pérsia, Avesta (escrituras sagradas do zoroastrismo), uso em rituais combinados para produzir aborto espontâneo
c.214 a.C.	China, Erh-Ya (dicionário chinês), descreve status dióico, masculinos para fibras e femininos para intoxicação
século I d.C.	O suco extraído quando verde é utilizado para dores de ouvido. Plínio, o Velho, descreveu como <i>Gelotophyllis</i> ("Folhas de riso") que produz alucinações; também raiz para contração irregular articulares e gota, erva para queimaduras, entre outros
Século II d.C.	Galen, uso de folhas para flatos e suco de sementes para otalgia
Final do século II d.C.	Livro médico egípcio de Fayyum, indicações para tumores
Século VIII	Pérsia/Iraque, Jabir Ibn Hayyan nota psicoatividade
850	Na Pérsia, Ibn Sahl usa medicamento com suco de flor, via intranasal, para enxaqueca e dores uterinas
875	Iraque, relaxante muscular

Século IX	O antigo herbário inglês recomenda cânhamo triturado (ou sua seiva) para feridas e "dor nas entranhas"
Século X	Cânhamo como parte do "bálsamo sagrado" em Lacnunga (textos médicos e orações anglo-saxões)
1000	Médico Al-Mayusi faz primeira menção em epilepsia
Século XI	Raízes para febre, tumores, e suco de ervas para ouvidos e folhas para caspa
Século XI	Herbário inglês antigo, cânhamo aplicado ao peito para dispersar inchaço e eliminar a matéria doente
Século XII	Na Espanha, o médico Sheshet Benveniste recomendava <i>Cannabis</i> com outros componentes como tônico para curar esterilidade, estômago e cabeça
1158	Hildegard von Bingen, indicava uso para dor de cabeça e compressa para feridas
1200	Na Índia, aumenta a longevidade
Século XIII	Itália, pomada para inchaço mamário e dor
1546	Raiz fervida para gota, músculos doloridos, articulações rígidas, reumatismo; e crua para queimaduras, entre outros
1563	O cânhamo indiano provoca risos, alívio da ansiedade, aumento do apetite
1596	Li Shi-Chen, indicava flores para distúrbios menstruais, suco de raiz para placenta retida e hemorragia pós-parto
Século XVII	No Extremo Oriente, para tratamento de gonorreia, pleurisia, hérnia
Século XVIII	Na Índia, para remover caspa e vermes, tratar diarreia, gonorréia, pó para feridas, feridas, erva para prolongar a vida
1753	Nomenclatura binomial: <i>Cannabis sativa</i> ; ponto de partida para a nomenclatura botânica moderna
1839	O'Shaughnessy, médico que fez testes em cães e pacientes para tétano, raiva, epilepsia e doença reumatóide
1843	O cânhamo indiano trata a tosse na tuberculose, coqueluche, enxaqueca, dores reumáticas nas articulações, entre outros
1843	Sucesso do tratamento das convulsões
1843	O haxixe utilizado para tratar a peste bubônica
1843	Testes em psiquiatria
1845	Na Irlanda, Donovan trata enxaqueca, neuralgia e dores musculoesqueléticas
1851	Aumento das contrações uterinas no trabalho de parto
1860	Restaura o sono natural em 1000 pacientes
1860	Guerra Civil Americana, empregado para ferimentos de guerra
1888	Enxaqueca, tremor de parkinsonismo
1890	Senilidade, dismenorreia e convulsões infantis
1890	Dor gastrointestinal
1890	Estado confusional breve e vômito cíclico
1894	enxaqueca, dor sífilítica e gastrointestinal funcional
1899	Dor, incluindo herpes zoster
1942	Enxaqueca menstrual.
1964	Gaoni e Mechoulam isolam e sintetizam o Δ^9 -THC
1968	Investigação clínica de referência em homens com produto da <i>Cannabis</i>
1971	<i>Cannabis</i> na diminuição da pressão intraocular
1973	Efeitos anticonvulsivantes do CBD
1975	Δ^9 -THC antineoplásico em adenocarcinoma de pulmão
1975	Δ^9 -THC antiemético para quimioterapia contra câncer
1976	Δ^9 -THC efeito semelhante ao salbutamol como broncodilatador
1981	Anticonvulsivante CBD em humanos
1982	CBD reduz a ansiedade após Δ^9 -THC
1985	Canflavina A, componente anti-inflamatório, isolado da <i>Cannabis</i>
1985	Δ^9 -THC sintético, Marinol®, aprovado para náuseas de quimioterapia nos EUA

1988	Descoberta do receptor canabinoide
1990	Caracterização molecular do primeiro receptor CB1 acoplado à proteína G
1991	Estudo aponta que o Δ^9 -THC é 20 vezes mais potente que a aspirina como anti-inflamatório
1992	Descoberta de canabinoide endógeno anandamida
1993	Caracterização molecular de um receptor canabinoide (CB2)
1995	Respostas promissoras ao uso de Δ^8 -THC em crianças em tratamento quimioterápico, eficaz para náuseas e vômitos
1995	CBD melhora sintomas de psicose
2000	O CBD antagoniza o fator de necrose tumoral alfa em modelo reumatoide
2002	Redução de sintomas de náusea com CBD
2003	Primeiros ensaios do medicamento Sativex® em sintomas de esclerose múltipla
2003	Δ^9 -THC melhora os sintomas de Tourette sem sequelas neuropsicológicas
2004	Extratos de <i>Cannabis</i> para redução de sintomas urológicos na esclerose múltipla
2004	Δ^9 -THC reduz a dor da esclerose múltipla
2006	CBD e outros canabinoides testados em carcinoma de mama
2008	Cannabis apresenta melhora da dor neuropática, como alternativa para pacientes que não respondem ou não toleram outras drogas
2010	Medicamento Sativex® demonstra redução da dor de cânceres resistentes a opióides
2010	Anticonvulsivante THCv
2010	THCV reduz a hiperalgesia em animais
2010	Canabidivarina, anticonvulsivante THCv
2011	Publicação do Genoma da <i>Cannabis</i>
2012	CBD potencialmente promissor como novo tratamento da esquizofrenia, com resultados semelhantes a antipsicótico padrão
2015	Estudo para verificar a influência do THCv no aumento da ativação dos receptores 5-HT1A <i>in vitro</i> e induzir quaisquer efeitos antipsicóticos aparentes mediados pelo receptor 5-HT1A <i>in vivo</i>
2016	Avaliação da eficácia e segurança do uso dos canabinoides CBD e THCv nos parâmetros glicêmicos e lipídicos em pacientes com diabetes tipo 2
2017	Um estudo piloto com o medicamento Sativex em pacientes adultos com transtorno de déficit de atenção/hiperatividade
2018	Avaliação exploratória do uso de CBD além de medicação antipsicótica regular em pacientes esquizofrênicos.
2019	Estudo observacional prospectivo com pacientes diagnosticados com fibromialgia
2020	A relação entre os níveis de expressão dos receptores canabinóides CB1 e CB2 com as características clínicas de pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas, bem como com o efeito de Δ^9 -THC e CBD na proliferação, transição epitelial-mesenquimal e migração <i>in vitro</i> em linhas celulares de câncer de pulmão
2021	Estudos iniciais e em andamento que apontam para o uso do CBD como potencial agente para o tratamento da COVID-19
2022	Avaliação da ação do CBD no bloqueio da infecção por SARS-CoV-2 nos estágios iniciais e até posteriores da infecção. Os resultados pré-clínicos mostram que o tratamento com CBD reduziu os títulos virais nos pulmões e nos cornetos nasais de camundongos infectados pelo vírus.

Além dessas descobertas e estudos desenvolvidos que foram organizadas cronologicamente por Russo até o ano de 2012,³⁵ dezenas de outros trabalhos continuaram a ser desenvolvidos por pesquisadores interessados nas ações

farmacológicas e medicinais da *Cannabis*. Como em 2013, quando Johnson e colaboradores, realizaram testes a longo prazo com *spray* de Δ^9 -THC/CBD em 43 pacientes com dor relacionadas ao câncer, e como resultado observaram permanência do efeito para alívio da dor.³⁷

Em 2014, Chagas *et al.* selecionaram 21 pacientes com doença de *Parkinson* sem demência ou comorbidades psiquiátricas, divididos em três grupos de sete indivíduos cada, e os trataram com placebo ou 75 mg/dia ou 300 mg/dia de CBD. Como resultado, este estudo apontou para um possível efeito do CBD, principalmente na maior dose avaliada (300 mg/dia), na melhoria das medidas que são relacionadas à qualidade de vida dos pacientes com esta doença.³⁸

Jetly e colaboradores, 2015, fizeram um estudo clínico, tratamento duplo-cego com 0,5 mg do canabinoide sintético Nabilone (*Cesamet*, *Valeant* Canada) ou placebo, com dez militares canadenses do sexo masculino com transtorno de estresse pós-traumático. Apesar do reduzido número de pacientes, este foi o primeiro estudo duplo-cego controlado por placebo usando Nabilone para tratar pesadelos relacionados a transtorno de estresse pós-traumático, e os resultados positivos sugerem que o tratamento seja promissor e clinicamente relevante para pacientes que não respondem às terapias tradicionais.³⁹

No ano seguinte, 2016, Jadoon e colaboradores, avaliaram a eficácia e segurança do uso dos canabioides CBD e THCV em parâmetros glicêmicos e lipídicos em pacientes com diabetes tipo 2. Neste estudo randomizado, duplo-cego controlado por placebo, foram selecionados 62 indivíduos com diabetes tipo 2 não tratados com insulina. Como resposta a esse estudo, particularmente o THCV diminuiu significativamente a glicose plasmática em jejum, comparada aos resultados do placebo, mostrando-se como um novo possível agente terapêutico no controle glicêmico em indivíduos com diabetes tipo 2. Já o CBD não apresentou efeitos metabólicos detectáveis apesar das mudanças produzidas em algumas adipocinas.⁴⁰

Cooper *et al.*, 2017, realizaram estudo piloto randomizado e controlado por placebo do medicamento Sativex em 30 adultos com transtorno de déficit de atenção/hiperatividade (TDAH), e como resultado foram observadas melhorias significativas para hiperatividade e impulsividade, além de tendências para melhorias para desatenção e labilidade emocional. No entanto, a descoberta de que Sativex não

possui efeito negativo sobre o desempenho cognitivo no TDAH é o fator principal, visto que o uso de *Cannabis* está geralmente associado a função cognitiva prejudicada.⁴¹

Já em 2018, McGuire e colaboradores, desenvolveram um estudo exploratório com pacientes que apresentavam quadro de esquizofrenia, randomizados em uma proporção de 1: 1 para receber CBD (1000 mg/dia; n = 43) ou placebo (n = 45) adicionalmente a sua medicação antipsicótica regular. Após seis semanas de tratamento, o grupo que recebeu CBD apresentou níveis mais baixos de sintomas psicóticos em comparação ao grupo de placebo. O CBD foi bem tolerado e as taxas de eventos adversos foram semelhantes entre os grupos CBD e placebo.⁴²

Sagy *et al.*, 2019 realizaram um estudo observacional prospectivo, no qual 367 pacientes com fibromialgia foram tratados com *Cannabis* por seis meses. No total 81,1% dos pacientes obtiveram resposta ao tratamento, e como resultado diminuição da intensidade da dor significativamente de uma mediana de 9 (início) para 5 (em seis meses), usando uma escala de classificação numérica de 0 (sem dor) a 10 (dor aguda).⁴³

Milian *et al.*. 2020 avaliaram a relação entre os níveis de expressão dos receptores canabinoides CB1 e CB2 com as características clínicas de uma coorte de pacientes com câncer de pulmão. Os canabinoides Δ^9 -THC e CBD mostraram potencial de inibição na proliferação e expressão de fator de crescimento epidérmico nas células de câncer de pulmão estudadas.⁴⁴

Em 2021, Malinowska e colaboradores, destacaram diversas ações e potencialidades, estudos pré-clínicos e estudos clínicos incipientes (informações obtidas do banco de dados de estudos clínicos conduzidos em todo mundo: ClinicalTrials.gov) a partir do uso do canabinoide CBD como um potencial agente para o tratamento de COVID-19. Entre os vários apontamentos, foi identificado que o CBD diminui a regulação das proteínas responsáveis pela entrada do vírus e inibe a replicação do SARS-CoV-2, além de resultados pré-clínicos que demonstraram eficácia contra doenças do aparelho respiratório, bem como propriedades cardioprotetoras, nefroprotetoras, entre outros. Por fim, enfatizaram a importância da adequada administração e cuidados imprescindíveis com a questão da interação medicamentosa, destacando a necessidade de novos estudos clínicos para comprovar eficiência no tratamento de COVID-19.⁴⁵

Neste ano, 2022, Nguyen et al. desenvolveram um estudo que sugerem ação do canabinoide CBD no bloqueio da infecção por SARS-CoV-2 nos estágios iniciais e até posteriores da infecção. Além disso, estudos pré-clínicos mostram que o tratamento com CBD reduziu os títulos virais nos pulmões e nas cornetas nasais de camundongos infectados com SARS-CoV-2.⁴⁶

Vale ressaltar que algumas das muitas ações terapêuticas não são restritas a classe canabinoide, outros constituintes da planta *Cannabis*, como por exemplo os terpenos, também foram associados a variadas e potentes propriedades de promoção da saúde.¹⁵

Mediante o exposto, embora todos esses notáveis estudos e aplicações utilizando a *Cannabis* e/ou os canabinoides, desenvolvidos para tratamentos de várias doenças e sintomas graves, como glaucoma, depressão, *Parkinson*, esclerose múltipla, *Alzheimer*, câncer entre outros,³⁵ ainda são observados alguns efeitos nocivos resultantes do uso direto da planta, como: batimentos cardíacos acelerados, ansiedade, possível perda de coordenação motora e memória prejudicada.³⁶ Ainda, podem ser afetadas as habilidades críticas do usuário, como aquelas necessárias para operar veículos, devido ao julgamento da distância e tempo de reação prejudicados, além da possibilidade de induzir sintomas psicóticos. Alguns desses distúrbios podem ser contribuídos pela ação do Δ^9 -THC.^{36,47}

Não menos importante, o consumo irregular ou indiscriminado da planta, ainda que para fins medicinais, pode afetar seus usuários por possíveis infecções por organismos patogênicos, resultantes de micro-organismos e fungos que podem surgir na planta.^{36,47} Portanto, para que não se torne uma panacéia contra todas as doenças e sintomas, nem seja utilizada como medicamento baseado em evidências anedóticas, estudos científicos que incluem desde informações químicas da planta *Cannabis* até os efeitos de seus constituintes são fortemente encorajados no campo da química e da medicina.

Além disso, ainda que existam notórios avanços da utilização da planta *Cannabis*, em especial da classe canabinoide na área medicinal, segundo o Relatório Mundial de Drogas (*World Drug Report*, WDR) de 2020 da UNODC, a *Cannabis* e seus produtos continuam sendo a droga ilícita mundialmente mais utilizada, com cerca de 192 milhões de usuários em 2018. As maiores quantidades de produtos de *Cannabis* apreendidos neste mesmo ano foi de 44% na América do Sul, seguida da

África (19%), América do Norte (17%), Ásia (12%), Europa (7%) e América Central/Caribe (1%) e Oceania 0,1%, **figura 4**.⁴⁸

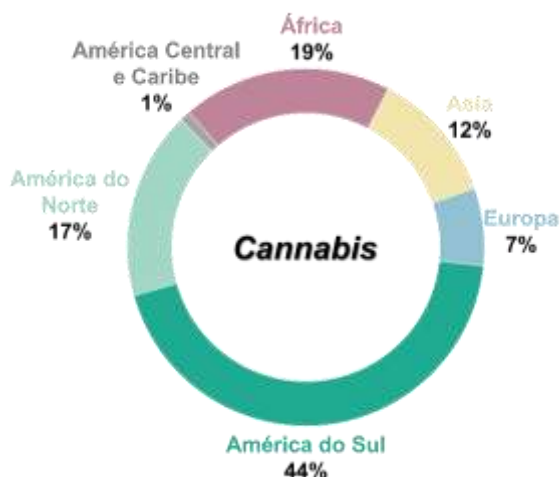


Figura 4. Porcentagem das quantidades de Cannabis apreendidas em 2018. Fonte: UNODC 2020 – Adaptada.⁴⁸

Ademais, ao longo dos anos, os métodos de produção da planta têm sido aperfeiçoados, resultando em metodologias cada vez mais sofisticadas e gerando uma maior variedade de produtos, com diversificadas concentrações do Δ^9 -THC cultivadas para fins recreativos, que são disponibilizados em mercados lícitos e ilícitos em praticamente todo o globo.¹⁴ Esse aperfeiçoamento dinâmico resulta na disponibilidade de diferentes produtos com variadas composições e estrutura, o que torna indispensável o desenvolvimento e aperfeiçoamento de métodos de identificação desta droga para a devida identificação, quantificação e rastreio.

No Brasil, o principal produto da *Cannabis* utilizado como droga recreativa é a maconha, mundialmente conhecida como *marijuana*, cuja palavra em português é formada a partir do anagrama da palavra cânhamo, **figura 5**, que é uma variedade no propósito de cultivo desta planta utilizada na fabricação de papel, roupas, calçados, velas, cordas, bioconstrução, cosméticos, biocombustíveis etc.⁴⁹⁻⁵¹



Figura 5. Anagrama da palavra cânhamo. Fonte: Carlini 2006 – Adaptada.⁵¹

Outros produtos comuns da planta *Cannabis* produzidas para fins ilícitos são: o haxixe (extraído das inflorescências da planta), óleo de haxixe, *skunk* (híbrido do cruzamento entre a *Cannabis sativa* × *indica*, cultivada em condições específicas), entre outros.^{12,14,52}

Até o início do século XX, a *Cannabis* e alguns de seus produtos já foram considerados medicamentos no Brasil e em diversos países, e eram amplamente utilizados para várias enfermidades. Na mesma época, também já havia registro de uso com fins abusivos por indivíduos interessados em sentir diferentes sensações. A proibição veio como consequência dessa utilização indiscriminada, não apenas no Brasil, mas em quase todo mundo.⁵¹

Especificamente no Brasil, a primeira proibição formal da droga ocorreu em 25/11/1938, pelo decreto-lei nº 891 do Governo Federal, que elenca no capítulo I, artigo I, nominalmente àquelas substâncias que fossem consideradas entorpecentes, e, especificamente no inciso XVI, considerou-se: “O cânhamo *Cannabis sativa* e variedade índica (maconha, meconha, diamba, liamba e outras denominações vulgares)”.⁵³

Em 1976, surge lei nº 6.368.16, mais conhecida como Lei Antitóxicos, que foi posteriormente revogada pela lei nº 11.343 de 23 de agosto de 2006, usualmente denominada como “nova Lei de drogas”, vigente no país desde 08 de outubro de 2006.⁵⁴⁻⁵⁶ Esta lei contém seu Artigo 1º, parágrafo único a seguinte descrição: “Para fins desta Lei, consideram-se como drogas as substâncias ou os produtos capazes de causar dependência, assim especificados em lei ou relacionados em listas atualizadas periodicamente pelo Poder Executivo da União.”⁵⁶

O órgão responsável pela revisão e atualização das listas supracitadas é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). A mais recente atualização relacionada a *Cannabis* foi publicada no Diário Oficial da União, em 24 de janeiro de 2020, Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 335/2020, que descreve os critérios e procedimentos para a importação de produto derivado da *Cannabis*, por pessoa física, para uso próprio para tratamento de saúde, mediante prescrição de profissional legalmente habilitado.⁵⁷

Particularmente em relação ao uso da *Cannabis* e seus componentes para fins medicinais no Brasil, a **Tabela 3** elenca as etapas concernente a esse processo e

discussão sobre sua regulamentação, bem como as medidas implementadas pela Anvisa.⁵⁸

Tabela 3. Etapas do processo e discussão relacionados a regulamentação da Cannabis para uso medicinal.⁵⁸

Ano	Etapas
2014	- Aprovação do Projeto de Lei Complementar – PLC 37/2013. - Adoção de medidas para importação excepcional de produtos à base de <i>Cannabis</i> medicinal. - Ações individuais reivindicam na Justiça permissão para que a Anvisa permita o acesso a produtos à base de <i>Cannabis</i> medicinal.
2015	- Publicada a RDC 17/2015, com normas para importação de medicamentos à base de canabidiol em caráter excepcional. - Empresas começam a solicitar à Anvisa autorização para o cultivo da planta para produção de medicamentos e realização de pesquisas científicas.
2016	- A <i>Cannabis</i> medicinal é incluída na lista de plantas e substâncias de controle especial (RDC 66/2016) da Portaria 344, de 1998, do Ministério da Saúde. A atualização possibilita o registro de medicamentos à base dos derivados da planta. - Divulgada a atualização da lista de produtos com canabidiol com autorização simplificada para a importação.
2017	- Divulgada a aprovação do primeiro registro no Brasil de medicamento feito à base de <i>Cannabis</i> medicinal, o Mevatyl®. - Foi criado o Grupo de Trabalho (GT) para discutir requisitos de segurança e controle para o cultivo da <i>Cannabis</i> medicinal. O GT concluiu as atividades indicando a necessidade de abertura de processo regulatório sobre o assunto. - Publicada a RDC 156/2017, que inclui a <i>Cannabis</i> na lista das Denominações Comuns Brasileiras (DCBs), códigos e números estabelecidos pela agência para denominar fármacos e princípios ativos aprovados pelo órgão federal.
2019	- Finalizado o Relatório Preliminar de Análise de Impacto Regulatório (AIR) sobre o tema. - A Diretoria Colegiada aprova propostas de consultas públicas relacionadas à regulamentação da <i>Cannabis</i> medicinal (requisitos técnicos para o cultivo da planta para fins medicinais e científicos e registro e monitoramento de medicamentos). - Publicadas no Diário Oficial da União as Consultas Públicas 654 (requisitos para registro e monitoramento) e 655 (requisitos para cultivo), ambas do dia 13/06/2019. O prazo para contribuições foi de 60 dias (21 de junho a 19 de agosto). - A Diretoria Colegiada da Anvisa faz avaliação das propostas finais de regulamentação sobre o cultivo da <i>Cannabis</i> para fins medicinais ou científicos e de registro e monitoramento de medicamentos. - Criada a RDC 327/2019, que elenca os requisitos necessários para a regularização de produtos de <i>Cannabis</i> para fins medicinais no Brasil.
2020	- Entre em vigor a RDC 327/2019, em 10/03/2020; - Entra em vigor a RDC 335/2020, que define os critérios e procedimentos para solicitação de importação, por pessoa física para o tratamento de saúde, de produto derivado de <i>Cannabis</i>, mediante a prescrição de profissional habilitado.
2022	O décimo primeiro produto medicinal à base de <i>Cannabis</i> aprovado pela Agência. Dos onze produtos, cinco são à base de extratos de <i>Cannabis</i> sativa e seis de canabidiol.

1.1 Avanços em canabinômica: de testes colorimétricos a técnicas analíticas

Por consequência da sua complexidade, variedades de componentes e usos associados tanto na medicina como para fins recreativos, além das inúmeras aplicações ainda não exploradas, a planta *Cannabis* e uma das suas classes mais importantes; os canabinoides, têm sido estudados ao longo dos anos com várias metodologias e técnicas analíticas para caracterização química, seja em casos de apreensões de materiais suspeitos de drogas, como para alcançar amplitude nas informações a respeito da sua composição global.

Assim, para ilustrar, a **figura 6**, construída a partir do banco de dados *Web of Science* (Clarivate Analytics, Philadelphia, PA, Estados Unidos), usando os termos: “*Cannabis or cannabinoids and analysis*”, e software “RStudio”, mostra a bibliometria, no formato de “WordCloud”, das 50 palavras de maior destaque (título, *abstract* e palavras-chave) nas produções científicas dos últimos 5 anos, que é capaz de apontar as possíveis direções e maior interesse em determinadas linhas de estudo relacionadas a *Cannabis* e seus produtos. É possível observar que entre as palavras mencionadas, as de maior evidência, ou seja, mais frequentemente citadas nesse levantamento, são: “*Cannabis*”, “*analysis*”, “*marijuana*”, “*cannabinoids*”, “*study*”, “*treatment*”, “*drug*” entre outras.

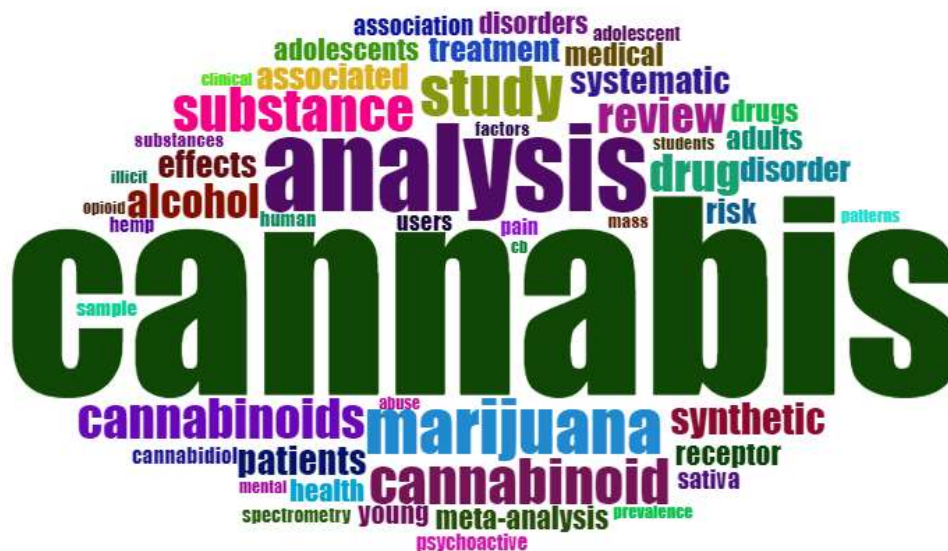


Figura 6. Nuvem de palavras com as 50 mais citadas (título, abstract e palavras-chave) nas publicações relacionadas à análise de *Cannabis* ou canabinoides nos últimos 5 anos. Dados adquiridos a partir de uma pesquisa no banco de dados *Web of Science* (Clarivate Analytics, Philadelphia, PA, Estados Unidos) usando os termos: “*Cannabis or cannabinoids and analysis*”. Fonte: *Web of Science* e *R Studio*.

Ainda, com o mesmo conjunto de dados, a **figura 7** aponta, ilustrado com as intensidades da cor azul, os países que mais colaboraram para a produção dos trabalhos sobre análises de *Cannabis* ou canabinoides nos últimos cinco anos. Isso mostra um envolvimento e interesse, para diversos fins, praticamente mundial no estudo da planta milenar *Cannabis*, bem como dos seus produtos derivados. Além disso, as linhas vermelhas destacam as colaborações entre os países.

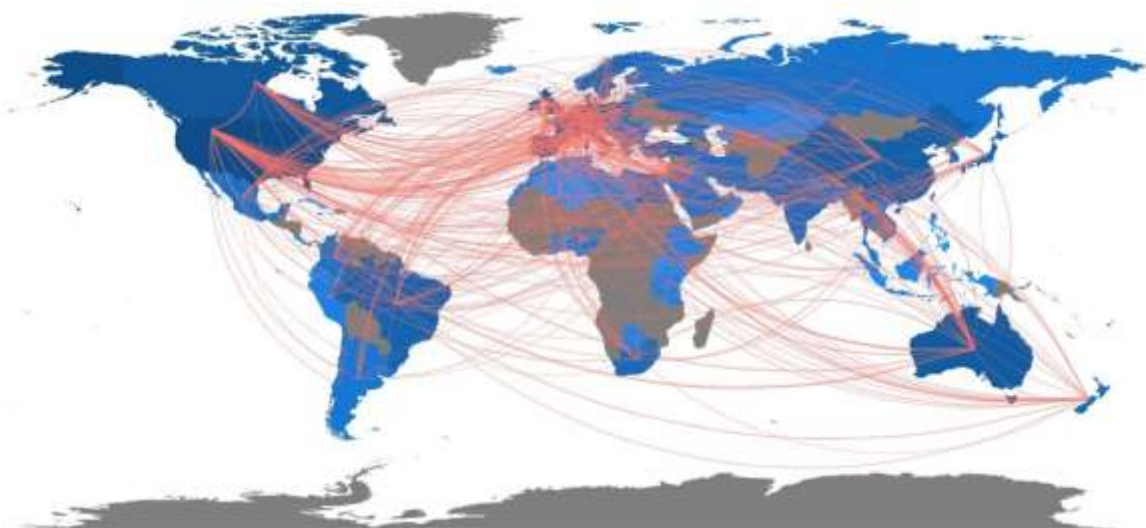


Figura 7. Ilustração da contribuição científica por países, demonstrada a partir da intensidade de cor, com a temática *Cannabis*/canabinoides e análises.

Fonte: *Web of Science* e software “RStudio”.

Mediante o exposto, serão apresentados, de forma concisa, os principais métodos e análises, desde testes rápidos até o uso de técnicas analíticas instrumentais, aplicáveis as plantas *Cannabis* e seus produtos derivados.

Em geral, o uso e o tráfico de drogas têm aumentado consideravelmente nos últimos anos de acordo com as estatísticas nacionais, oriundas das secretarias de segurança pública federal e estaduais, e internacionais de acordo com a UNODC.⁴⁹ Assim, o aumento na quantidade de apreensões aumenta também a necessidade de análises de caráter definitivo do material apreendido, desde que feita a análise preliminar corretamente. Isto faz com que esses testes sejam amplamente usados como primeiro passo para análise de material suspeito de conter substâncias ilícitas. Nas análises, tanto os resultados positivos quanto os negativos são consideravelmente importantes devido as informações para identificação definitiva das substâncias apreendidas.⁴⁹

Nesse sentido, os testes de cor geralmente são realizados como etapa de triagem em amostras que precisam ser investigadas, como em casos de grande

volume de apreensões policiais.^{59,60} O resultado positivo é alcançado quando há uma mudança específica da cor observada a olho nu, que ocorre como resposta a reação entre o reagente colorimétrico e os componentes da amostra.⁶¹

Particularmente em relação a *Cannabis* e seus produtos, como a maconha, os testes colorimétricos, considerados de triagem, consolidados e amplamente utilizados pela polícia forense são: Duquenois-Levine (Du-Le), *Fast Blue B* (FBB) e *Fast Blue BB* (FBBB).⁶¹ O reagente Du-Le é composto de etanol, acetaldeído e vanilina, que em meio ácido reagem com a posição *para* livre do grupo fenol de Δ^9 -THC, formando uma dupla camada roxa para possíveis resultados positivos.⁶²

Por outro lado, nos ensaios colorimétricos utilizando os sais FBB e FBBB a reação ocorre em meio alcalino, e a mudança da cor advém da formação de nova molécula composta pelo sal (B ou BB) e os canabinoides extraídos da amostra em etapa anterior. A coloração avermelhada resultante da reação é a combinação das cores específica das novas moléculas formadas principalmente com três canabinoides e o sal revelador, são elas; i) sal e Δ^9 -THC = cromóforo vermelho; ii) sal e CBN = cromóforo púrpura; e iii) sal e CBD = cromóforo laranja.^{14,60}

Geralmente, nestes ensaios o tom avermelhado é obtido como cor predominante na resposta devido ao Δ^9 -THC ser comumente o canabinoide mais abundante frente aos demais na planta *Cannabis*.^{60,63}

As reações simplificadas do canabinoide Δ^9 -THC com os reagentes colorimétricos supracitados (Du-Le, FBB e FBBB) estão ilustradas na **figura 8**.⁶¹

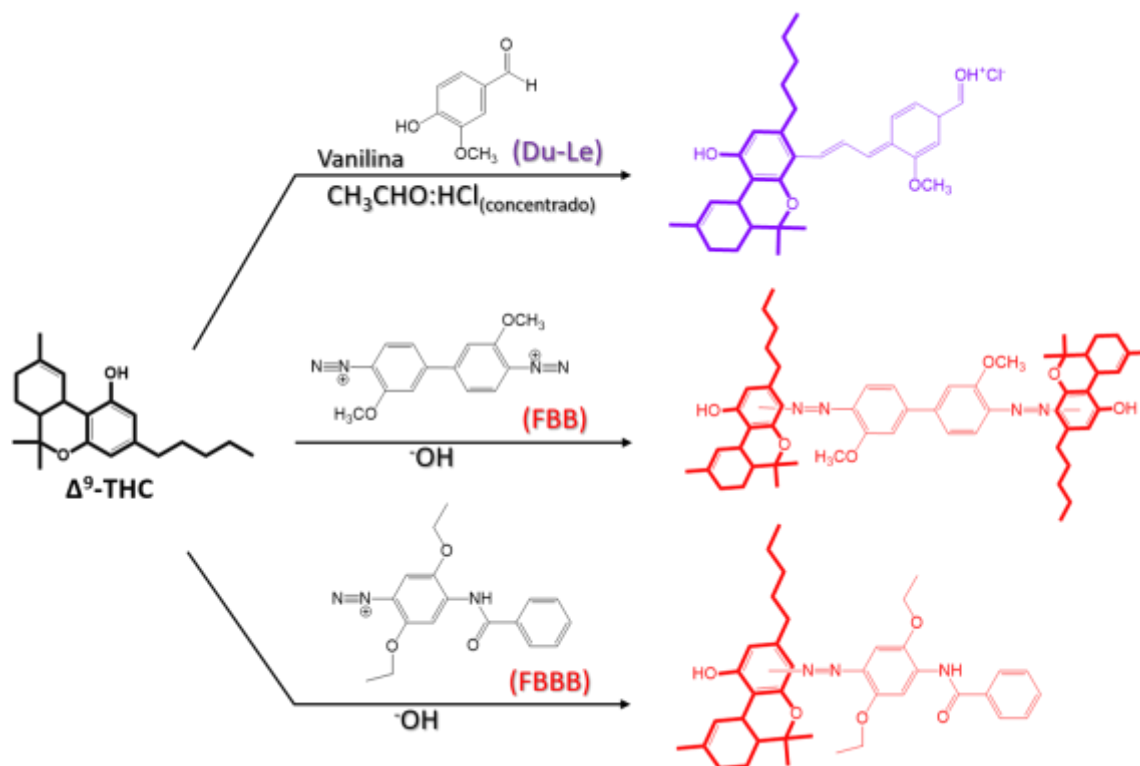


Figura 8. Reação colorimétrica simplificada entre os reagentes Duquenois-Levine + Δ^9 -THC (coloração roxa), sal Fast Blue B + Δ^9 -THC (coloração vermelha) e sal Fast Blue BB + Δ^9 -THC (coloração vermelha).

Fonte: França 2020 – Adaptada.⁶¹

Apesar da funcionalidade, rapidez e possível aplicação em trabalho de campo dos testes colorimétricos, a sua especificidade é baixa devido a reação colorimétrica ser atribuída a natureza fenólica das moléculas canabinoides, e pela alta variedade de moléculas abundantes em produtos naturais que compartilham esta característica, como comprovado por Bordin e colaboradores (2012), que ao analisar diferentes espécies de plantas com características macroscópicas semelhantes à *Cannabis*, identificaram possíveis interferentes para os testes colorimétricos, Du-Le e FBB. No entanto, FBB mostrou-se mais seletivo, uma vez que apontou menor número de resultados falso-positivos para as amostras vegetais investigadas.⁵⁹

Assim, diante desta limitação dos testes colorimétricos, análises posteriores com técnicas consolidadas e específicas para comprovação dos apontamentos preliminares são indispensáveis.⁵⁹

Atualmente, uma grande variedade de técnicas como, *Infrared spectroscopy* (IR),^{64,65} *RAMAN*^{66,67} e *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR),⁶⁸ *Liquid Chromatography* (LC),⁶⁹ *Gas Chromatography* (GC),²⁰ e *Mass Spectrometry* (MS),^{34,70} esta última com suas diversificadas fontes de ionização e analisadores, foram

testadas e métodos desenvolvidos ao longo dos anos, buscando a otimização e aperfeiçoamento de metodologias existentes, como também desenvolver novas compreensões a partir da comprovação de suas aplicações no estudo da *Cannabis* e seus produtos, possibilitando assim, que novas evidências científicas pudessem ser alcançadas com mais clareza e exequibilidade.

A **figura 9**, resultado de uma pesquisa realizada no banco de dados *Web of Science*, exemplifica essa correlação das análises de *Cannabis*/canabinoides com diferentes técnicas instrumentais nos últimos 5 anos (2018-2022).

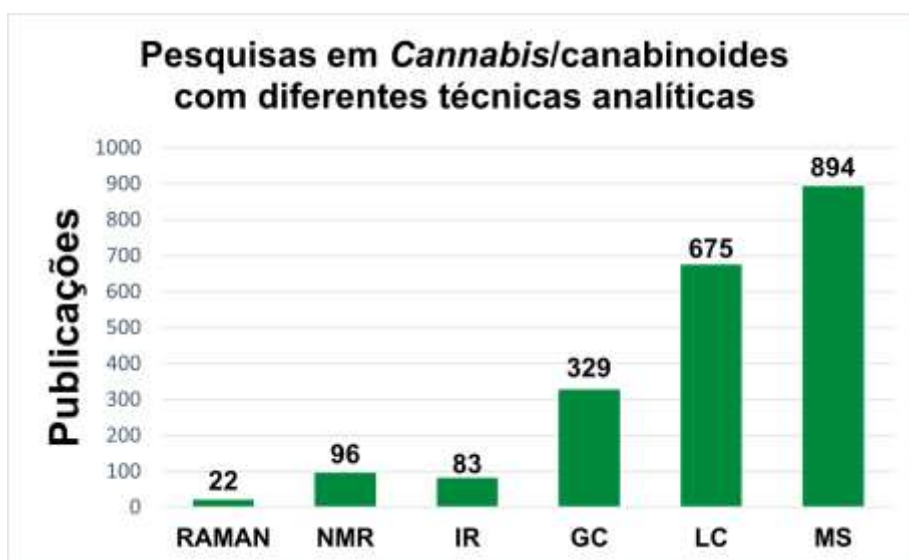


Figura 9. Gráfico que correlaciona o número de publicações com as temáticas *Cannabis*/canabinoides e diferentes técnicas analíticas, RAMAN, NMR, IR, GC, HPLC/LC e MS, nos últimos 5 anos. Os dados foram adquiridos a partir de uma pesquisa no banco de dados *Web of Science* (*Clarivate Analytics*, Philadelphia, PA, Estados Unidos) usando os termos: “*Cannabis or cannabinoids and RAMAN*”; “*Cannabis or cannabinoids and NMR*”; “*Cannabis or cannabinoids and IR*”; “*Cannabis or cannabinoids and GC*”; “*Cannabis or cannabinoids and HPLC or LC*”; “*Cannabis or cannabinoids and MS*”.

Fonte: *Web of Science*.

Neste contexto, a metabolômica, que inclui os estudos das alterações dos metabólitos (produtos intermediários ou finais do metabolismo em amostras biológicas), tem se caracterizado como uma ferramenta ideal que pode auxiliar o processo de pesquisa de matrizes complexas como a *Cannabis*. No geral, as ciências “ômicas” tem como objetivo alcançar o entendimento do funcionamento celular dos organismos e suas possíveis alterações biológicas.^{71,72}

Assim, em 2020, Aliferis e Bernard-Perron⁶ introduziram o termo “canabinômica” para as aplicações da metabolômica em pesquisas de *Cannabis*, que pode ser aplicada tanto na taxonomia das variedades de *Cannabis*, pesquisas sobre novas descoberta e avaliação de novas fontes de bioatividade baseadas nesta planta,

desenvolvimento de novos produtos, toxicologia, otimização do cultivo, entre outros. Estima-se que a utilização da canabinômica forneça além de conteúdo direcionado de acordo com a demanda de aplicação, também *insights* que possam auxiliar diversos setores em diferentes ramos de pesquisas.⁶

Destarte, apesar da GC ser uma das técnicas mais utilizada em canabinômica, com mais de 400 publicações nos últimos 5 anos (**figura 9**), esta não permite a determinação de canabinoides ácidos sem etapa de preparo anterior, como a derivatização, pois o aquecimento necessário para análise resulta na descarboxilação dos canabinoides ácidos em suas formas neutras ou até mesmo em produtos da sua degradação térmica.⁷³

Ainda, devido à composição complexa do material vegetal, e em alguns casos similaridades entre seus constituintes, a análise dos principais canabinoides por cromatografia não é facilmente alcançada pois pode haver a sobreposição de picos, como mostrado por Mariotti e colaboradores em 2016, que ao analisar *Cannabis* por cromatografia acoplada ao MS, os isômeros CBC e CBD, foram identificado com mesmo tempo de retenção cromatográfico, separando-se apenas do isômero Δ^9 -THC, com tempo de retenção distinto.²⁰

No entanto, a cromatografia a gás bidimensional *Two Dimensional Gas Chromatography* (GC×GC), oferece algumas vantagens em comparação à cromatografia monodimensional clássica (GC), como o aumento do sinal (maior relação sinal/ruído) e maior capacidade de separação, alcançado pela utilização sequencial de duas colunas cromatográficas (convencional e a outra curta), com fases estacionárias distintas, que levam os analitos, proveniente da primeira à segunda coluna através de um modulador.⁷⁴

Um estudo conduzido por Santos e colaboradores (2018) fez uso da GC×GC como uma das técnicas de análises de *Cannabis*. Os autores observaram que a utilização da cromatografia bidimensional proporcionou a identificação e distinção dos canabinoides isômeros de forma substancialmente melhor, inclusive com a separação dos canabinoides isômeros (CBC e CBD) citados no estudo anterior, porém, informações químicas mais completas, como o maior número de detecção de canabinoides isoméricos, foram obtidas a partir das análises por LC, inclusive combinada ao *ion mobility* MS.⁷⁵

A técnica LC, que se configura como a segunda técnica mais utilizada no estudo de *Cannabis* e seus produtos nos últimos 5 anos, **figura 9**, é capaz de identificar tanto os canabinoides neutros, como seus ácidos precursores devido a inexistência da etapa de aquecimento durante a análise.^{18,75,76} Para exemplificar o uso dessa técnica e sua aplicabilidade no estudo dos canabinoides, Berman *et al.*, 2018, desenvolveram uma pesquisa utilizando a LC acoplada a MS, para obtenção do perfil metabólico abrangente dos canabinoides em 36 plantas *Cannabis*. Ao todo, mais de 90 canabinoides (ácidos e neutros) foram identificados pelos autores.¹⁸

Em geral, o acoplamento das técnicas cromatográficas, especialmente a LC (devido a maior preservação da composição química da *Cannabis*), à técnica MS une a habilidade de separação, identificação e até mesmo quantificação de espécies químicas, proporcionados pela cromatografia, com o alto poder de resolução, seletividade e sensibilidade na detecção de massa da MS.⁷⁷

No entanto, embora as consolidadas combinações GC-MS e LC-MS sejam amplamente utilizadas para análises de tecidos vegetais, inclusive *Cannabis* e seus produtos, são requeridos processos de extrações anteriores. Tal abordagem ainda que capaz de detectar os analitos extraídos, tem a sua informação de distribuição espacial original na amostra perdida na etapa de preparo.⁷⁸

Por outro lado, considera-se MS como principal técnica de estudo na área de canabinômica, embora seja recomendável que haja a integração de informações de diferentes técnicas analíticas, principalmente para matrizes que possuem metabolomas (metabólitos com baixa massa molecular, até 1500 Da)⁷¹ altamente complexos como a *Cannabis* e seus produtos.⁶ No entanto, um extenso e contínuo caminho tem sido percorrido ao longo dos anos até a consolidação da MS como técnica analítica, que possibilita desde a obtenção do perfil químico da amostra até o estudo da distribuição espacial de moléculas a partir do imageamento químico de superfícies.

2. *Erythroxylum coca* e seu contexto histórico e científico

O gênero *Erythroxylum*, família Erythroxylaceae, contém mais de 200 espécies de árvores e arbustos tropicais.⁷⁹ Destas, duas possuem maior notoriedade, a *Erythroxylum coca* Lam. (coca) e *Erythroxylum novogranatense* (D. Morris) Hieron. Estas espécies têm sido cultivadas há milhares de anos e, tornaram-se fontes

para a produção da cocaína (droga de abuso), normalmente utilizado para o comércio ilícito.⁸⁰

Em geral, as diferentes espécies de *Erythroxylum* produzem folhas que podem variar em tamanho e aparência. No entanto, todas as espécies têm em comum a parte superior da folha (adaxial) mais escura em relação a inferior (abaxial), que pode ser cinza-esverdeada. Além disso, na parte abaxial das folhas são encontradas duas linhas paralelas à nervura central que são consideradas características da espécie

Figura 10.⁸¹

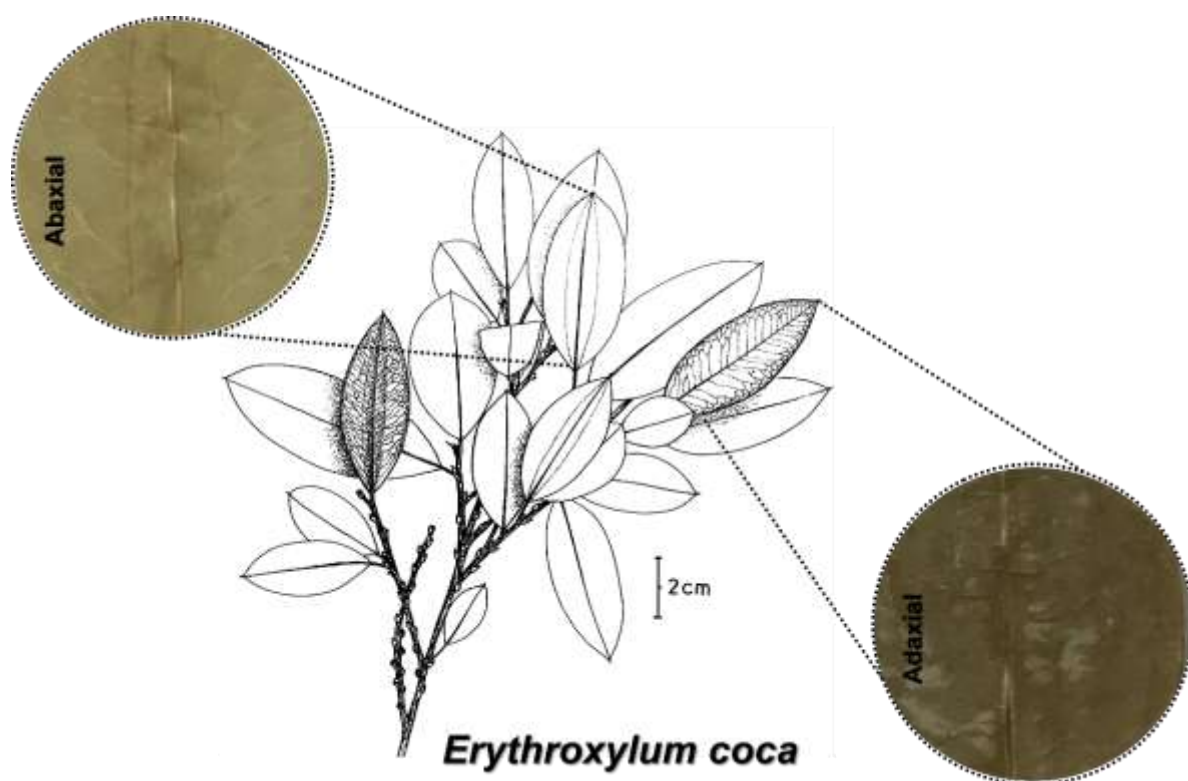


Figura 10. Representação da planta *Erythroxylum coca*. Fonte: Sauvain 1997 – Adaptada.⁸²

O interesse do meio científico pelo gênero se intensificou a partir no século XIX, após a descoberta das atividades farmacológicas das folhas de coca, que também é considerada um dos vegetais nativos mais antigos da América do Sul, e possui porte arbóreo, e quando cultivada é mantida com cerca de 2 m.^{83,84}

A nomenclatura moderna “coca” se origina da palavra “Khoka” em Aymará (povo estabelecido no sul do Peru, na Bolívia, na Argentina e no Chile) que significa “a árvore”.^{85,86} O seu cultivo ocorre principalmente nas zonas montanhosas do leste dos Andes, devido ao ambiente tropical favorável, que inclui alto índice pluviométrico, clima ameno, solo bem drenado e rico em minerais.⁸⁴ Além disso, seu uso ainda se

perpetua em cidades como Cusco e Machu Picchu, no Peru, onde as folhas são mascadas ou ingeridas na forma de chá devido à sua ação estimulante leve, para alívio da fadiga e para suportar grandes altitudes.⁸⁴

Algumas espécies da planta *Erythroxylum* contêm de 0,2 a 0,8% de alcaloides em sua composição química, desses até 80% representam a molécula cocaína.^{84,87} Ainda, mais de 150 alcaloides tropânicos, que possui em comum uma estrutura bicíclica, denominada tropano [3,2,1]octano, já foram isolados.^{87,88}

Particularmente em relação a coca, esta é quimicamente caracterizada pela abundância da molécula cocaína (*Methyl (1S,3S,4R,5R)-3-benzoyloxy-8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]octane-4-carboxylate*, C₁₇H₂₁NO₄ (303,4 g/mol), que possui ponto de fusão na faixa de 96-98°C e pK_b = 5,4, e é o principal composto psicoestimulante deste vegetal em relação as demais alcaloides do grupo tropânico, a maioria derivada da pirrolidina.⁸⁹⁻⁹¹

A aparência da cocaína é de um cristal branco puro e inodoro, insolúvel em água (1:600), e solúvel em clorofórmio (1:0,7), éter etílico (1:3), etanol (1:7) e em outros solventes orgânicos, como acetona, benzeno, acetato de etila, éter de petróleo entre outros.⁹²

A molécula cocaína foi isolada em 1860 pelo pesquisador alemão Dr. Albert Niemann,⁸⁵ que notou o sabor amargo e efeito na língua, tornando-a insensível. Alguns anos depois, em 1880, a cocaína foi utilizada como anestésico local por William Stewart Halsted, conhecido como o “pai da cirurgia moderna”.^{84,92}

Considerado o primeiro alcaloide natural com efeito anestésico de longa duração, alta lipossolubilidade e forte poder de penetração e boa afinidade pelo tecido nervoso, a cocaína era comumente utilizada para anestesia local na boca, nariz, faringe, ouvido, uretra, entre outras. O seu principal efeito colateral está na possibilidade de excitar o córtex cerebral. Além disso, pode excitar o centro respiratório e cardiovascular, causar vômito, depressão respiratória, insuficiência cardíaca e até levar o usuário ao óbito.⁹²

A cocaína é absorvida no corpo a partir das membranas e mucosas. A meia-vida deste composto no plasma é de aproximadamente de uma a duas horas. A sua aplicação local bloqueia o início da condução do impulso nervoso. A redução do apetite deve-se também à ação anestésica local.⁸⁵ É um estimulante potente do SNC. Os seus efeitos estimulantes estão relacionados à sua habilidade de inibir o

transportador de dopamina, ligado à membrana. A cocaína inibe a monoaminoxidase (MAO), aumentando a noradrenalina e a serotonina, causando midríase e vasoconstrição periférica e mantendo o anestésico mais tempo no local.⁸⁴ Além das ações citadas, a cocaína também pode inibir a recaptura de catecolaminas nas terminações adrenérgicas; que é o processo responsável pela estimulação do sistema cardiovascular e SNC.

Quando administrada por via endovenosa, pode causar morte imediata por insuficiência cardíaca devido à ação tóxica direta sobre o músculo cardíaco. Em síntese, após a absorção, a cocaína é degradada pelas esterases plasmáticas e pelas enzimas hepáticas em alguns animais.⁸⁴

Estudos histoquímicos, citoquímicos e imunoquímicos, apontaram cocaína nos tecidos fotossintetizantes e vacúolos, ou complexada com fenóis, tanto em caules como nas folhas e nos frutos de coca. Empregando-se o reagente de Dragendorff em cortes histológicos, a cocaína foi detectada principalmente no mesofilo, entre a epiderme superior e inferior.⁹³

Os alcaloides tropânicos são constituídos de uma estrutura bicíclica, denominada tropano, (8-metil-8-azabicyclo[3,2,1]octano). Este anel tropano é constituído pelos anéis pirrolidínico e piperidínico.⁸⁴

Além dos alcaloides serem importantes na terapêutica atual e historicamente pois foram construídos protótipos a partir destes dos quais análogos sintéticos foram desenvolvidos, principalmente das classes de fármacos anticolinérgicos e anestésicos locais. Especialmente para os alcaloides do tipo cocaína, a ação anestésica local ocorre ao se ligarem reversivelmente a canais de sódio, que promovem a inibição do potencial de ação e transmissão do estímulo da dor. Além disso, apresenta também ação no SNC.⁸⁴

A biossíntese de formação do anel tropânico ocorre com a formação do anel pirrolidínico, a partir da descarboxilação dos aminoácidos arginina e ornitina. A seguir, a enzima putrescina-*N*-metiltransferase auxilia na regulação da síntese e direciona o fluxo do substrato para a produção de alcaloides. Por meio de reações enzimáticas de metilação e ciclização é produzido o cátion *N*-metil- Δ^1 -pirrolíneo, responsável pelo átomo de nitrogênio no anel tropânico. Para a formação do segundo anel há duas principais possibilidades, a primeira consiste na condensação com acetoacetato (ácido acético ativo), que, após oxidação e condensação aldólica, completa o anel. E

a segunda considera duas etapas de extensão policetídica com malonil-CoA antes da oclusão do anel. Para os dois casos há uma carbonila cetônica.⁸⁴

Os alcaloides da coca apresentam três estruturas básicas: i) derivados da ecgonina (como as moléculas cocaína, cinamoilcocaína e truxilinas); ii) derivados da tropina (tropacocaína e valerina), que se diferenciam dos anteriores pela ausência da carboxila em C-2 e pela posição da hidroxila; e iii) derivados da higrina (higrolina e cuscoigrina), caracterizados pelo anel N-metil pirrolidina monocíclico. Entre estes, os derivados da ecgonina são mais atrativos comercialmente.⁸⁵

Na revisão publicada por Novák *et al.* (1984) algumas das atividades biológicas de alguns alcalóides menos tóxicos que a cocaína (**Figura 11a**); benzoilecgonina (**Figura 11b**), cinamoilcocaína (**Figura 11c**), truxilina (**Figura 11d**), entre outros, são detalhadas. No entanto, o autor destaca que o uso de produtos de coca pode ser uma soma total de todos os constituintes da planta, e não apenas da cocaína, e isso inclui as calorias, carboidratos, minerais e vitaminas nela contidos.⁹⁴

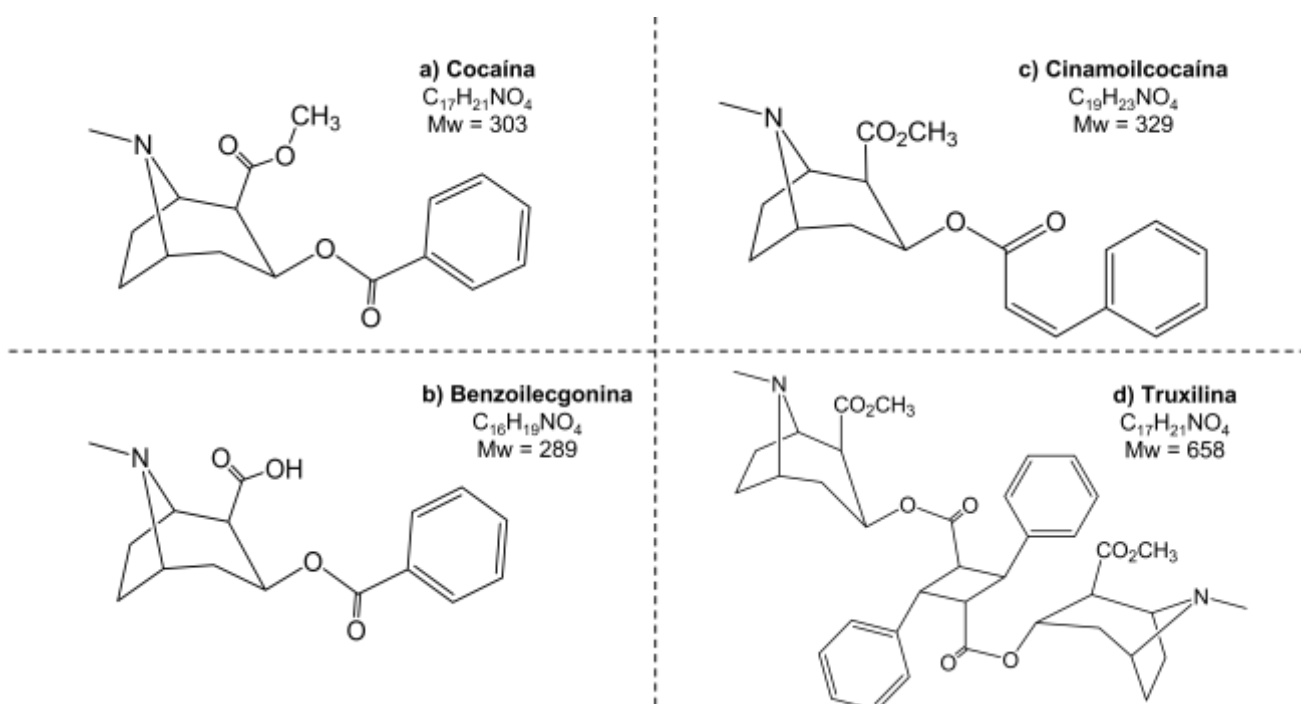


Figura 11. Alcaloides: **a)** Cocaína, **b)** Benzoilecgonina, **c)** Cinamoilcocaína e **d)** Truxilina. Fonte: Própria autora.

A toxicidade de alguns alcaloides foi verificada e estudos realizados em ratos mostraram que a benzoilecgonina e o éster metílico de ecgonina não produzem manifestações tóxicas para as mesmas taxas consideradas tóxicas para a cocaína. Apenas com doses de 30 e 60 vezes maiores são capazes de produzir alteração

neurocomportamental leve. Por outro lado, a benzoilecgonina não se apresentou letal mesmo com administração de doses superiores a 100 vezes a da cocaína.⁹⁵

Em geral, a farmacologia da cocaína é considerada complexa e contém vários sistemas orgânicos que podem ser afetados simultaneamente pela droga. O uso agudo e crônico pode afetar os sistemas psicológicos, neurológicos, renais, cardíacos, pulmonares, gastrointestinais, obstétricos e otorrinolaringológicos. Vale ressaltar que muitos dos efeitos médicos e fisiológicos descritos na literatura concentram-se na cocaína isolada pura. Portanto, devido as diferenças significativas, as pesquisas sobre cocaína (droga) não devem generalizar, nem limitar as investigações em relação a planta.⁸⁵

Estudos arqueológicos na América do Sul apontam o uso da *Erythroxylum coca* há milhares de anos, cerca de 1000 aC no norte do Chile.⁹⁶ Inicialmente, principalmente sob o domínio inca, a coca foi usada para diversos propósitos como usos rituais, sociais e fisiológicos.^{85,97} Após o início da conquista dos incas em 1532, os conquistadores espanhóis tentaram erradicar o uso da coca nas culturas nativas, porém, após esta fracassada tentativa decidiram explorar o cultivo desta planta. Muitos anos depois, o uso de coca continua sendo utilizado por muitos trabalhadores andinos.^{85,98}

A coca passou a ser utilizada e aplicada para muitas finalidades incluindo redução da fadiga, melhora do humor, entre outros. Na medicina moderna, a cocaína é usada como anestésico local ou vasoconstritor, devido ao seu bom efeito anestésico é usado principalmente para anestesia local.⁹² No entanto, o interesse pela planta diminuiu drasticamente após o isolamento da cocaína, resultando em uma escassez de estudos científicos sobre essa temática, junto a ela quaisquer potenciais efeitos medicinais que esta possa ter.⁹⁹ Além disso, as propriedades viciantes e os efeitos colaterais observados com o uso da cocaína também foram fatores que proporcionaram o aumento no desinteresse neste campo de pesquisa.⁸⁵

Assim, apesar de sua importância cultural e medicinal da planta *Erythroxylum coca*, esta é amplamente empregada na produção de drogas de abuso também regido pela lei nº11.343 de 23 de agosto de 2006.⁵⁶ Entre os principais produtos ilícitos estão: i) pasta base, ii) cocaína base, iii) *crack*, iv) merla e o v) cloridrato de cocaína (cocaína). A pasta base (i) é o primeiro produto obtido a partir da extração das folhas de coca. A cocaína base (ii) é a pasta base refinada, após processos de oxidação ou

lavagens. O *crack* (iii) é um produto que contém cocaína na forma de base livre, em formato de pedra. A merla (iv) se apresenta como pasta branca molhada e possui alto teor de água e de sais de sódio. Por fim, o cloridrato de cocaína (v) é a forma de sal, em pó de coloração branca, destinado ao uso por aspiração intranasal ou via intravenosa.^{100,101}

Entre as variadas apresentações da droga, o cloridrato de cocaína, ou apenas cocaína, é uma das mais comuns e utilizadas para fins ilícitos. A sua aparência é de pó cristalino, solúvel em água, etanol ou clorofórmio, mas insolúvel em éter.⁹²

Entre os 15 países que relatam as maiores quantidades de cocaína apreendida em 2019, 10 foram localizadas nas Américas (com 83% da quantidade global interceptada, a maioria sendo na América do Sul, 53%, **figura 12**), 4 na Europa Ocidental e Central e 1 na Ásia. A quantidade total de cocaína apreendida na América do Sul aumentou 5% entre 2018 e 2019, para 755 toneladas, um recorde.¹⁰²



Figura 12. Porcentagem das quantidades de cocaína apreendidas em 2019.
Fonte: UNODC 2021 – Adaptada.¹⁰²

2.1. Avanços em alcaloideômica de folhas de coca: de testes colorimétricos a técnicas analíticas

Neste trabalho o termo “alcaloideômica” refere-se aos estudos e pesquisas que envolvam a investigação de metabólitos, particularmente os alcaloides oriundos de *Erythroxylum coca*.

A planta *Erythroxylum coca*, seu principal produto derivado como droga de abuso (cocaína), e uma das suas classes de maior relevância científica, os alcaloides, têm

sido estudados ao longo dos anos com aplicação de diversificadas metodologias e técnicas analíticas para sua caracterização química.

Neste sentido, para ilustrar, a **figura 13**, construída a partir do banco de dados *Web of Science* (Clarivate Analytics, Philadelphia, PA, Estados Unidos), usando os termos: “*Erythroxylum coca or cocaine and analysis*”, e software “RStudio”, mostra a bibliometria, no formato de “WordCloud”, das 50 palavras de maior destaque no *abstract* das produções científicas dos últimos 5 anos, que indicam as possíveis direções e maior interesse em determinadas linhas de estudo relacionadas a planta *Erythroxylum coca* e seus produtos como a cocaína e o crack. Entre as palavras mais frequentes estão: “Cocaine”, “drug/drugs”, “disorder”, “substance”, “treatment”, “effects” entre outras.

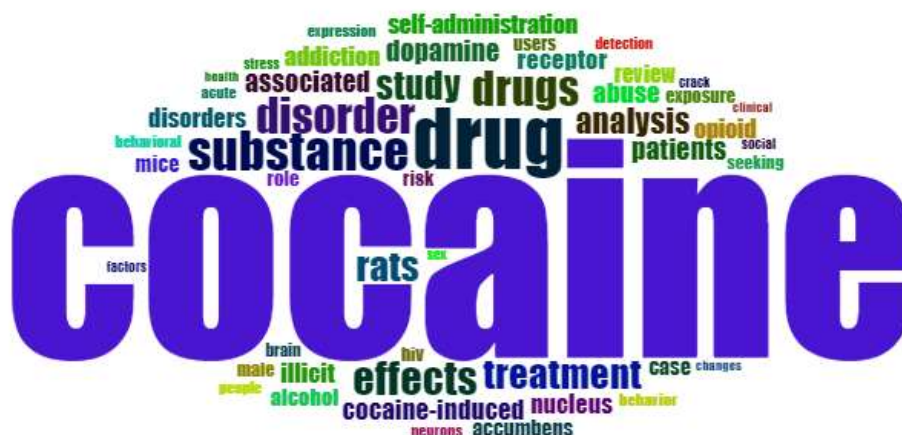


Figura 13. Nuvem de palavras com as 50 mais citadas no *abstract* das publicações relacionadas à análise de *Erythroxylum coca* ou *cocaine* nos últimos 5 anos. Dados adquiridos a partir de uma pesquisa no banco de dados *Web of Science* (Clarivate Analytics, Philadelphia, PA, Estados Unidos) usando os termos: “*Erythroxylum coca or cocaine and analysis*”.

Fonte: *Web of Science* e R Studio.

Ainda, com o mesmo conjunto de dados, a **figura 14** indica, representado pela intensidade da cor azul, os países que mais colaboraram para a produção dos trabalhos sobre análises de *Erythroxylum coca* ou *cocaine* nos últimos cinco anos. Isso aponta o envolvimento e interesse praticamente mundial nesta temática. Ainda, indicado por linhas vermelhas estão dispostos na figura as colaborações nas publicações entre os países.



Figura 14. Ilustração da contribuição científica por países, demonstrada a partir da intensidade de cor, com a temática *Erythroxylum coca* ou cocaína e análises.
Fonte: Web of Science e software "RStudio".

Como droga bruta, a identificação da cocaína é comumente realizada pelo teste de triagem Scott, um teste de cor desenvolvido por Scott em 1973,¹⁰³ e modificado em 1986 por Fansello e Higgins.¹⁰⁴

Este teste preliminar em amostras suspeitas é realizado, em meio ácido, utilizando uma solução de tiocianato de cobalto ($\text{Co}(\text{SCN})_2$), coloração rosa, que reage com a molécula da cocaína e resulta na formação de um complexo de cobalto II, de coloração azul, **Figura 15**.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷

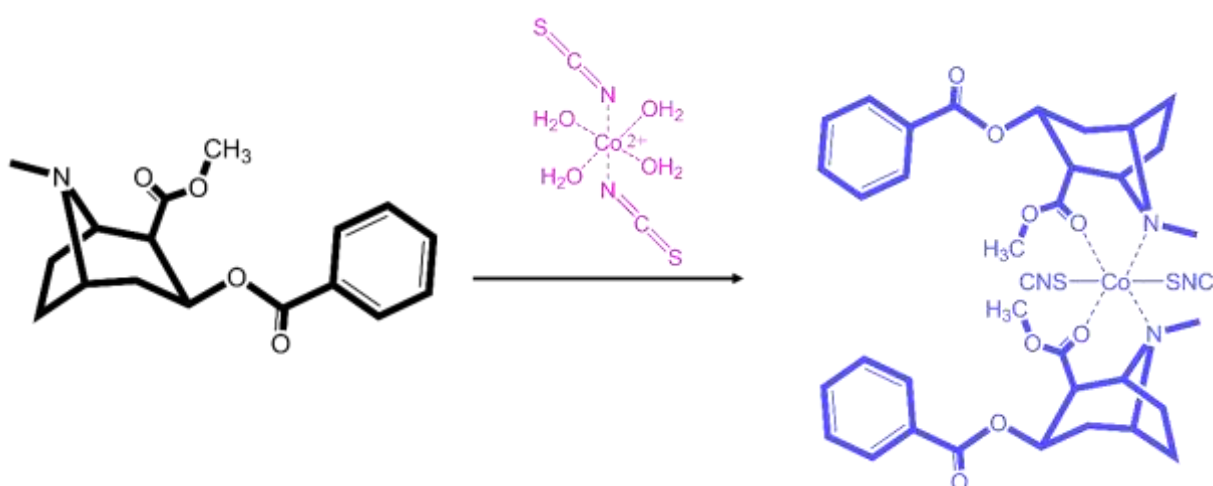


Figura 15. Reação de cor simplificada entre os reagentes Scott (tiocianato de cobalto) e a molécula da cocaína (coloração azulada).
Fonte: Costa 2020 – Adaptada.¹⁰⁶

Apesar da possibilidade de ser realizado em campo ou em laboratório, os testes colorimétricos necessitam de análise conclusiva posterior para confirmação do seu resultado, devido, entre outros fatores, aos possíveis resultados falso-positivo (por exemplo, para prometazina e lidocaína), e resultados inconclusivos com a formação de uma solução arroxeadada (por exemplo, com leite em pó e fermento) ao adicionar o tiocianato de cobalto e, portanto, mascarando o resultado do teste.¹⁰⁸ Isso ocorre pois, geralmente o material apreendido (cocaína) não é comercializado em sua forma pura, e tem acrescida a sua composição adulterantes e diluentes.¹⁰⁸

Os adulterantes detectados na cocaína são substâncias, inclusive anestésicos, utilizados para imitar ou aumentar o efeito da droga, como por exemplo: lidocaína, cafeína, fenacetina, procaína, levamisol e ácido bórico, entre outros.¹⁰⁵ Ao contrário do adulterantes, os diluentes não possuem efeitos similares aos da cocaína, mas são usados para aumentar o volume do produto final, como por exemplo amido, açúcares, carbonatos, bicarbonatos, talco etc.¹⁰⁵

Assim, vale salientar a importância de análises com técnicas consolidadas e específicas, posteriores aos testes de triagem para comprovação dos apontamentos preliminares.⁵⁹

Uma grande variedade de técnicas foram aplicadas no estudo da planta *Erythroxylum* coca e seu principal produto derivado, a cocaína, em busca da criação e otimização de métodos para alcançar novas compreensões científicas. A **figura 16**, resultado de uma pesquisa realizada no banco de dados *Web of Science*, mostra a correlação das principais técnicas instrumentais em análises de *Erythroxylum* coca/cocaína nos últimos 5 anos.

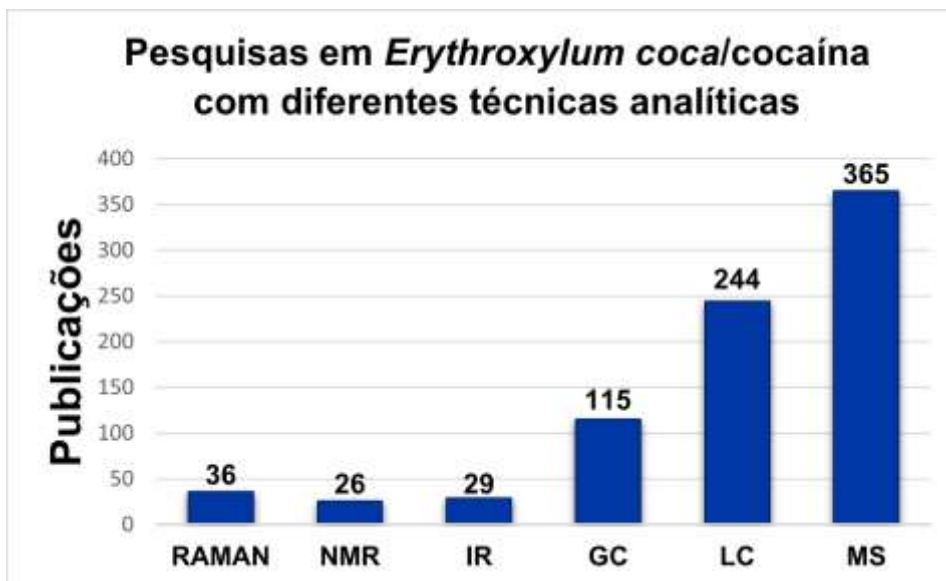


Figura 16. Gráfico que correlaciona o número de publicações com as temáticas *Erythroxylum coca/cocaína* e diferentes técnicas analíticas, RAMAN, NMR, IR, GC, HPLC/LC e MS, nos últimos 5 anos. Os dados foram adquiridos a partir de uma pesquisa no banco de dados *Web of Science* (Clarivate Analytics, Philadelphia, PA, Estados Unidos) usando os termos: “*Erythroxylum coca or cocaine and RAMAN*”; “*Erythroxylum coca or cocaine and NMR*”; “*Erythroxylum coca or cocaine and IR*”; “*Erythroxylum coca or cocaine and GC*”; “*Erythroxylum coca or cocaine and HPLC or LC*”; “*Erythroxylum coca or cocaine and MS*”.
Fonte: *Web of Science*.

Grande parte das pesquisas toxicológicas em alcaloideômica são baseadas no composto isolado puro (cocaína) das folhas de coca ou de seus produtos derivados (drogas de abuso); portanto, a extrapolação para a toxicidade da coca inteira é um tanto limitada.⁸⁵

Desde o primeiro trabalho publicado de análise cromatografia de amostra de cocaína em 1962 por Brochmann-Hanssen e Svendsen¹⁰⁹ muitas técnicas, inclusive cromatográficas, foram testadas para analisar a cocaína em material vegetal ou em amostras de pó (seu principal produto derivado para fins ilícitos) para compreender sua produção. Assim, estão descritos na literatura diversos estudos que incluem as classes de compostos que podem ser utilizados para a determinação de perfis químicos da coca, além de compostos inorgânicos, solventes, razão isotópica entre outros.¹¹⁰

No início dos anos 70, Moore (1973 e 1974) foi o primeiro a detectar e descrever outros alcalóides além da cocaína por GC.^{111,112} Holmstedt e colaboradores, 1977, analisaram o conteúdo de cocaína de treze espécies sul-americanas de *Erythroxylum*. A cocaína foi encontrada apenas em folhas de *Erythroxylum coca*

var. coca, *Erythroxylum novogrunutense* var. *truxillense* e *Erythroxylum novogrunutense* var. *novogrunutense* da Bolívia, Peru e Colômbia. A quantidade de cocaína foi determinada usando cocaína deuterada como padrão interno.¹¹³

Turner, Ma e Elsohly (1979) desenvolveram um método quantitativa com cromatografia gasosa, do inglês *gas chromatography* (GC) para a determinação do teor de cocaína em folhas de coca coletados de diferentes localizações geográficas no Peru. Os autores apontam os níveis de cocaína em folhas secas: 0,60, 0,57 e 0,60%, colhidas em Cuzco, Trujillo e Tingo Maria, respectivamente.¹¹⁴ Estes mesmos autores, em 1981, em um estudo de acompanhamento folhas de coca peruanas coletadas de três locais analisaram o conteúdo de cocaína e cinamoilcocaína e identificaram que as proporções relativas da concentração total destes alcaloides variaram com a origem da amostra.¹¹⁵

River (1981) testou diversos solventes para a extração de alcalóides em folhas de coca. Os extratos obtidos foram analisados por GC-MS. Entre os solventes avaliados, a extração com etanol não apresentou artefatos resultantes da extração. Além disso, o autor verificou mudança na quantidade relativa dos alcaloides com a idade da folha, bem como entre espécies e variedades.¹¹⁶

Ainda em 1979 e 1981, Youssefi *et al.*¹¹⁷ e Cooks *et al.*¹¹⁸ determinaram as proporções de cocaína/cinamoilcocaína em folhas de coca por análise direta, sem separação cromatográfica anterior, usando espectrometria de energia cinética de íons analisada em massa, do inglês *mass-analyzed ion kinetic energy spectrometry* (MIKES). Os autores discutiram a partir dos seus resultados que as plantas de coca de diferentes regiões geográficas podem ser distinguidas com base no teor de alcalóides. Além disso, dados anteriores obtidos por Rivier¹¹⁶ relativos à significativa variação foliar intra-planta em relação às relações cocaína/cinamoilcocaína foram confirmados. Entre as vantagens da utilização de análise direta estão: a pouca quantidade de amostra (1 mg) e o tempo de análise e preparo de amostra reduzidos, em comparação com técnicas tradicionais.

Johnson e Emche, em 1994, que utilizaram GC-MS a fim de monitorar o teor de oito alcaloides em folhas de coca desde os primeiros dias de até sua queda natural. Eles observaram um decrescimento da concentração de cocaína e dos demais alcaloides estudados ao longo do tempo de vida da folha na planta (36 semanas).¹¹⁹

Neste mesmo ano, 1994, Moore e colaboradores desenvolveram uma metodologia, incluindo análise por GC para a determinação de cocaína, e outros alcaloides como cis/trans-cinamoilcocaína, tropacocaína, truxilinas, éster metílico de ecgonina, cusco-higrina e higrina em folhas de coca coletas em campo, na Bolívia, Peru, Equador e Colômbia, e colhidas de plantas de coca cultivadas em estufa.¹²⁰

Em 1995, Johnson analisou folhas colhidas de plantas com 21 meses de idade cultivadas em casa de vegetação. Cada análise foi preparada após divisão das folhas em quatro partes principais para determinar distribuição e três para avaliar o teor de oito moléculas, incluindo a cocaína, por técnicas cromatográficas.¹²¹

Jenkins e colaboradores, 1996, quantificaram cocaína, éster metílico de benzoilecgonina e ecgonina em chás de folhas de coca do Peru e da Bolívia também utilizando GC-MS.¹²²

Sauvian e colaboradores (1997) estudaram a composição química, por cromatografia líquida, de folhas de coca de duas regiões da Bolívia para investigar se os teores de cocaína e outros constituintes das folhas cultivadas justificam a preferência dos nativos Aymara e Quechua que as utilizam para mascar. Os autores realizaram análises quantitativas e concluíram que a preferência camponesa boliviana pela coca das Yungas (florestas tropicais de montanha das encostas orientais dos Andes) não está relacionada à concentração de cocaína.⁸²

Em 2000, Ehleringer e colaboradores desenvolveram um estudo a partir da razão isotópica para identificar folhas de cocaína de diferentes regiões geográficas da América do Sul. De acordo com os autores, as distintas combinações de isótopos de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) possibilitam determinar o país de origem para as principais regiões de cultivo de coca ao longo da Cordilheira dos Andes. Neste estudo foram identificadas corretamente a fonte de 96% de 200 amostras de cocaína.¹²³

No mesmo ano (2000), Brachet e colaboradores desenvolveram um procedimento de otimização para a extração com fluido supercrítico de cocaína das folhas de coca por meio de delineamento experimental. A análise da cocaína nos extratos brutos foi realizada por GC para identificação dos picos.¹²⁴

Bieri e colaboradores, em 2006, estudaram, por GC-MS, folhas de espécies selvagens de *Erythroxylum* originárias dos países Bolívia, Brasil, Equador, Paraguai, Peru, México, EUA, Venezuela e Maurícia. Para isso a cocaína foi extraída de forma eficiente e rápida com metanol, usando microondas.¹²⁵

No mesmo ano, Bieri e colaboradores conduziram um estudo que realizou a combinação da extração assistida por microondas com microextração em fase sólida em etapa anterior a GC para extração seletiva e análise quantitativa de cocaína de folhas de coca. De acordo com os autores, obteve-se um ganho significativo de seletividade com a incorporação da microextração em fase sólida no procedimento de extração, e como consequência colunas mais curtas puderam ser usadas, além da redução no tempo de análise para 6 min.¹²⁶

Torre e colaboradores (2013), propuseram três linhas de evidência sugerindo que os ésteres de quinato de hidroxycinamato se complexam com alcalóides tropânicos em folhas de coca, o que facilitaria o seu armazenamento em vacúolos.⁹³

Casale, Mallette e Jones (2014) desenvolveram um estudo que avaliou, quimiossistematicamente por meio de seus perfis alcalóides, quinze novos cultivos de coca coletados na Colômbia e propagados junto com as três variedades tradicionais locais. Dez cultivares apresentaram perfis consistentes com *Erythroxylum coca var. ipadu*, quatro apresentaram perfis mistos consistentes com a hibridização de *Erythroxylum coca var. ipadu* com *Erythroxylum novogranatense var. novogranatense* ou *Erythroxylum novogranatense var. truxillense*, e apenas um cultígeno não pode ser classificado pois resultou em um perfil de alcalóides heterogêneo.¹²⁷

Casale e Mallette, (2016) conduziram uma pesquisa a partir de amostras de folhas de coca apreendidas no final de 2014 de um campo ilícito no estado de Chiapas, no México. A folha foi identificada quimiossistematicamente e a cocaína extraída dela foi submetida a análises de alcalóides e isótopos para determinar seu perfil geoespacial. Neste estudo, os perfis de alcalóides e isótopos da cocaína extraída eram diferentes de qualquer um dos 19 perfis regionais conhecidos na América do Sul. Além disso, a folha foi determinada como sendo *Erythroxylum novogranatense var. truxillense*, contendo 0,36% de cocaína.¹²⁸

No mesmo ano (2016), Mallette e colaboradores analisaram 572 amostras de folhas de coca: Bolívia (N = 58), Colômbia (N = 361) e Peru (N = 153). A cocaína foi extraída, purificada e analisada quanto ao teor total de alcalóides. Além disso, os isótopos $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ foram medidos em cada amostra. A união da identificação de alcalóides de cocaína, isótopos estáveis e análises estatísticas multivariadas mostrou-se útil para classificar a cocaína ilícita como originária de uma das 19 regiões de cultivo na América do Sul. Além disso, segundo os autores os dados

obtidos por meio desta abordagem mostram-se capazes de descrever as tendências atuais de cultivo e produção de coca, destacar rotas de tráfico, bem como identificar novas regiões de cultivo de coca.¹²⁹

Em 2019, Marín-saéz, Romeo-gonzález e Frenich utilizaram cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, do inglês *liquid chromatography mass spectrometry* (LC-MS) para avaliar a degradação de alcaloides tropânicos em preparo de chás de folhas de coca, resultando na degradação de todos os compostos analisados.¹³⁰

Neste mesmo ano (2019), Rubio e colaboradores desenvolveram uma pesquisa para discriminar mascadores de folhas de coca de usuários de cocaína na América do Sul por análise de cabelo. Ao todo foram 38 voluntários subdivididos em: i) dez voluntários de Buenos Aires que faziam uso ocasional ou moderado de folhas de coca (por mastigação) ou bebendo chá de coca, ii) vinte argentinos fumantes de PACO (pasta de cocaína), e iii) oito alemães usuários de cocaína. As amostras de cabelo foram analisadas por um método de LC-MS validado para cocaína, norcocaína, benzoilecgonina, éster metílico de ecgonina, cocaetileno, cinamoilcocaína, tropacocaína, éster metílico de anidroecgonina, cusco-higrina e higrina. Entre os resultados obtidos os autores destacaram a cusco-higrina como marcador mais adequado para diferenciação de mascadores de folha de coca e usuários pois este não aparece nas análises de cabelo de usuários fumantes argentinos de PACO e usuários alemães de cocaína. Além disso, com objetivo de justificar a detecção de éster metílico de anidroecgonina no cabelo de três mastigadores de coca, e confirmar relatos anteriores de sua presença como constituinte em folhas de coca, amostras diferentes de folhas de coca e de chá de coca foram analisadas.¹³¹

Em geral, do ponto de vista forense as análises de alcaloides na folha de coca são importantes pois esses compostos endógenos, e os subprodutos deles derivados, podem ser detectados em amostras ilícitas de cocaína, e podem ser usados para fins táticos e estratégicos de aplicação da lei.¹³²

Entre a grande variedade de técnicas utilizadas para estudo da composição química dos tecidos vegetais, especialmente de folhas de coca, as técnicas cromatográficas (GC e LC) e a espectrometria de massas possuem um maior destaque como mostrado no gráfico expresso na **Figura 16**.

No entanto, tanto para as análises cromatográficas como para algumas abordagens por espectrometria de massas, requererem do analista a execução de processos de preparo de amostra prévios, como extrações com solvente que levam os analitos a uma solução, que propiciará a determinação do composto na amostra analisada, no entanto, informações como a sua distribuição natural poderão ser perdida na etapa de preparo.¹³³⁻¹³⁵

Uma alternativa para o estudo da composição química de analitos diretamente do tecido vegetal e da sua histologia está disponível por meio da aquisição de imagem por espectrometria de massa, uma técnica promissora e ainda em ascensão para área de produtos naturais.¹³⁴

3. A evolução da espectrometria de massas até o imageamento químico

A trajetória de evolução da MS tem seu início associado a Joseph John Thomson, creditado pela descoberta do elétron em 1897.¹³⁶ Alguns anos mais tarde, Dempster, em 1918, desenvolveu o primeiro espectrômetro que utilizou como analisador de massas um setor magnético e a fonte de ionização por elétrons.¹³⁶ No ano seguinte, 1919, Aston divulgou estudos de isótopos com sua versão de espectrômetro de massas.¹³⁷ Assim, com o passar dos anos outros notórios avanços ocorreram na área da MS tornando-a uma técnica multidisciplinar.

Para entender melhor as contribuições para o desenvolvimento dos espectrômetros de massa, um esquema fundamental, proposto por Hoffmann e Stroobantque, é sugerido como leitura complementar.¹³⁷ Em resumo, na **Figura 17**, são apontadas algumas datas importantes que marcaram o desenvolvimento de alguns analisadores de massa fora em uma linha do tempo.

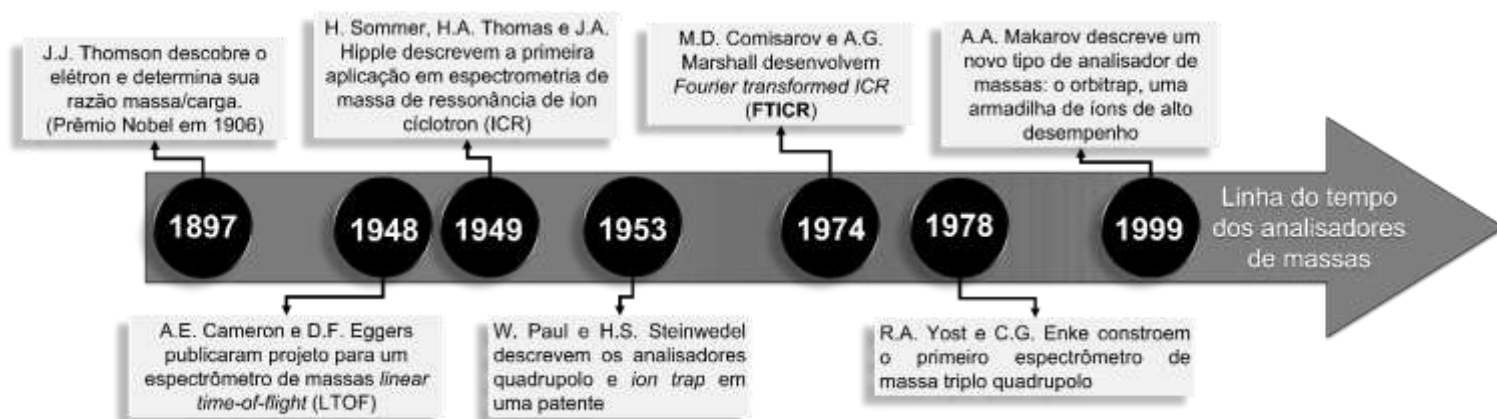


Figura 17. Representação de uma linha do tempo contendo a evolução dos analisadores de massas. Fonte: Própria autora

O funcionamento dos espectrômetros atuais consiste basicamente na ionização das moléculas de interesse e separação dos íons com base em suas diferentes razões massa/carga (m/z), possibilitando detectar, contar e caracterizar átomos e moléculas variadas, com diferentes composições e tamanhos.¹³⁷⁻¹³⁹

A aplicação da MS já foi limitada à análise de moléculas relativamente pequenas, voláteis e preferencialmente puras. No entanto, com o passar dos anos e devido ao avanço da tecnologia instrumental e desenvolvimento de novas fontes de ionização e analisadores de massas, tornou-se possível analisar diversificados tipos de matrizes, inclusive com conteúdo mais complexo.¹⁴⁰

Uma das fontes mais utilizada em MS é a fonte de ionização a pressão atmosférica *electrospray ionization* (ESI), desenvolvida em 1988 por John Fenn, laureado com Nobel em 2002.¹⁴¹ A segunda, e não menos importante, fonte de ionização amplamente utilizada em espectrometria de massas trata-se da *matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI), que foi desenvolvida na mesma época, precisamente um ano antes da fonte ESI, em 1987 pelos pesquisadores Tanaka, Karas e Hillenkamp. Tanaka também foi laureado com o prêmio Nobel em 2002 por esse importante evento na área da espectrometria.¹³⁷

Nas análises de MALDI, ilustrada de forma simplificada em três etapas na **figura 18**, é adicionado às amostras uma solução do reagente matricial (etapa A) que após evaporação do seu solvente forma uma camada de pequenos cristais, inclusive com co-cristalização analito-matriz, que absorvem a energia do laser incidido (etapa B) e liberam os analitos na fase gasosa em um processo que os leva à ionização (etapa C).¹⁴²

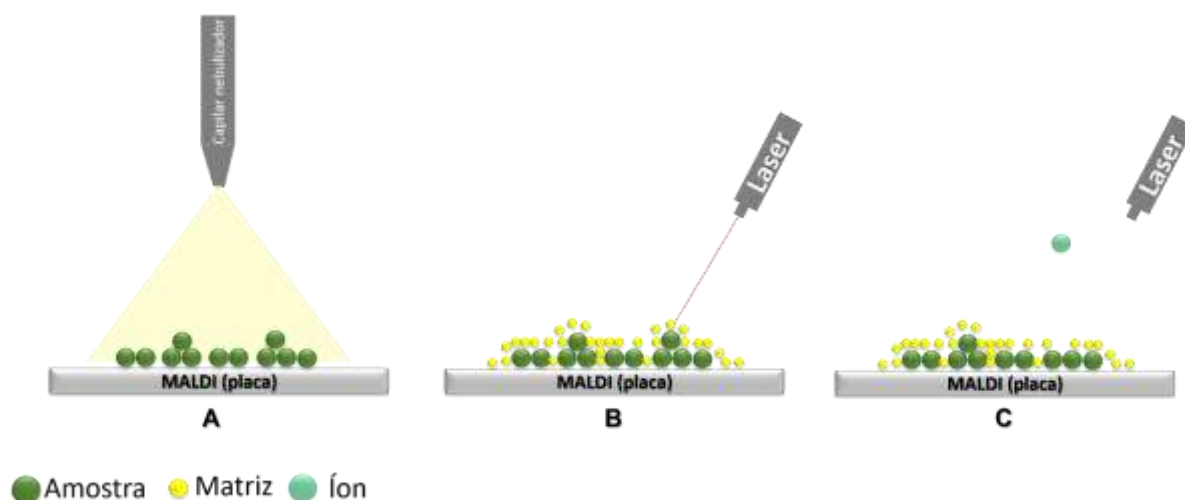


Figura 18. Ilustração esquemática do uso da fonte de ionização MALDI em três etapas: **a)** adição do reagente matricial na amostra previamente fixada na placa MALDI; **b)** após cristalização da matriz, é demonstrada a incidência do laser na superfície da amostra, **c)** ionização do analito.

A simplicidade na preparação das amostras analisadas por MALDI MS é considerada ideal para análises simultâneas, rápidas e de alto rendimento, inclusive no estudo de misturas complexas. Além disso, em comparação com a fonte ESI, MALDI não é tão suscetível à supressão iônica, o que potencializa sua aplicação na análise direta dos produtos à base de plantas.^{143,144}

No decurso da sua criação (1987) até o presente ano (2022), um pouco mais de 40 artigos foram publicados utilizando a técnica MALDI no estudo de *Cannabis*/canabinoides ou *Erythroxylum coca*/cocaína, **tabela 4**, sendo uma das suas primeiras publicações apenas sete anos depois, em 1994, o que evidencia que esta combinação entre técnica (MALDI) e matrizes de estudo (*Cannabis* e seus produtos, e *Erythroxylum coca* e cocaína), mesmo com suas potencialidades, ainda é incipiente em pesquisas científicas.

Tabela 4. Artigos publicados que utilizaram a técnica MALDI no estudo de *Cannabis* e/ou canabinoides (incluindo os endocanabinoides e sintéticos), *Erythroxylum coca* e/ou cocaína, e suas respectivas informações resumidas em: ano de publicação, objetivo do estudo, matriz MALDI utilizada e analisador de massas. Os dados foram adquiridos a partir de uma pesquisa no banco de dados *Web of Science* (*Clarivate Analytics*, Philadelphia, PA, Estados Unidos) usando os termos: “*Cannabis or cannabinoids and MALDI*” e “*Cannabis or cannabinoids and matrix-assisted laser-desorption ionization*”; “*Erythroxylum coca or cocaine and MALDI*” e “*Erythroxylum coca or cocaine and matrix-assisted laser-desorption ionization*”. Fonte: *Web of Science*.

<i>Cannabis</i>				
Ano	Objetivo do Estudo	Matrizes MALDI	Analisador	Referência
1994	Desenvolvimento de método para a determinação de conjugados hapteno-proteína transportadora de Δ^9 -THCA. ¹⁴⁵	AS	TOF	Goto, <i>et al.</i> 1994
2005	Investigação dos efeitos entre o canabinoide endógeno anandamida e o etanol em análise dos oócitos. ¹⁴⁶	DHB	TOF	Oz, <i>et al.</i> 2005
	Estudo de preparações do receptor canabinoide CB1 purificados em uma única etapa e submetidos a digestão de proteínas e posterior análise. ¹⁴⁷	CHCA	TOF	Xu, <i>et al.</i> 2005
2008	Investigação da interação entre os efeitos inibitórios da anandamida em oócitos que expressam receptores α_7 de acetilcolina. ¹⁴⁸	DHB	TOF	Jackson, <i>et al.</i> 2008
2012	Método para análise direta de preparações de misturas de ervas e identificação de canabinoides sintéticos em materiais apreendidos. ¹⁴³	CHCA	TOF	Gottardo, <i>et al.</i> 2012
2013	Determinação de canabinoides e outras drogas em fio de cabelo. ¹⁴⁹	CHCA	Orbitrap	Musshoff, <i>et al.</i> 2013
2014	Procedimento para a coleta eficiente de <i>Cannabis</i> em misturas de ervas. ¹⁵⁰	CHCA	Q-TOF	Kuwayama, <i>et al.</i> 2014
2016	Proposta de derivatização dos canabinoides para estudo da sua distribuição espacial em cabelos. ¹⁵¹	CHCA	Q-TOF	Beasley, <i>et al.</i> 2016
2018	Estudo da aplicabilidade de extratos de <i>Cannabis</i> para síntese rápida e econômica de nanopartículas para possíveis formações de biofilme. ¹⁵²	DHB	TOF	Singh, <i>et al.</i> 2018

	Identificação por imagem de canabinoides sintéticos em cabelo. ¹⁵³	CHCA	QIT-TOF	Kernalleguen, <i>et al.</i> 2018
2019	Detecção e localização por imagem do endocanabinoide 2-araquidonoilglicerol em testículos. ¹⁵⁴	DHB	Orbitrap	Nielsen, <i>et al</i> 2019
	Estudo da distribuição espacial de canabinoides na folha inteira de <i>Cannabis</i> . ¹⁵⁵	CHCA, DHB, MBT	FT-ICR	Santos, <i>et al.</i> 2019
	Identificação e estudo da distribuição espacial de canabinoide sintético em cabelo. ¹⁵⁶	CHCA	FT-ICR e TOF	Lin, <i>et al.</i> 2019
<i>Erythroxylum coca</i>				
1996	Estudo da aplicabilidade da técnica MALDI para triagem rápida de amostras de urina para drogas de abuso, incluindo a cocaína. ¹⁵⁷	FA, DHB, CHCA, MSA	TOF	Muddiman, <i>et al.</i> 1996
	A estequiometria dos resíduos de benzoilecgonina para peroxidase de rábano foi determinada por MALDI. O conjugado <i>Benzoylecgonine-horseradish peroxidase</i> pode ser usado como reagente de diagnóstico para a detecção de cocaína em amostras de drogas ilícitas e em fluidos biológicos. ¹⁵⁸	SA	TOF	Gowda, <i>et al.</i> , 1996
	Análise quantitativa de cocaína usando cromatografia de camada delgada acoplada a MALDI. ¹⁵⁹	CHCA	TOF	Nicola, Gusev & Hercules, 1996
1999	Proposta de utilização de MALDI como uma ferramenta eficaz na confirmação de benzoilecgonina, metabólito da cocaína, em amostras de urina após extração em fase sólida. ¹⁶⁰	DHB	IT	Hall, Goolsby, Brodbelt, 1999
2005	Análise de cérebros de ratos coletados após injeção intraperitoneal de cocaína. A identidade das drogas foi ainda confirmada por MS/MS. ¹⁶¹	DHB	TOF	Wang, <i>et al</i> 2005
2009	Detecção de cocaína, benzoilecgonina e cocaetileno em cabelo por MALDI. ¹⁶²	CHCA	TOF	Vogliardi, <i>et al.</i> 2009
2010	Identificação de 15 fosfoproteínas alteradas pelo uso de cocaína por MALDI. ¹⁶³	-*	TOF	Tannu, Howell & Hemby, 2010

	Desenvolvimento de um método de triagem rápida para detecção de cocaína em cabelo por MALDI. Um total de 304 amostras de cabelo foram analisadas por MALDI e seus resultados comparados com um método de cromatografia gasosa. Os resultados obtidos demonstram especificidade e sensibilidade de 100% para MALDI-MS. ¹⁶⁴	CHCA	TOF	Vogliardi, <i>et al.</i> 2010
	Análise quantitativa de cocaína no tecido cerebral <i>post-mortem</i> de um usuário crônico de cocaína. ¹⁶⁵	DHB	Linear Ion Trap	Reich, <i>et al.</i> 2010
2011	Imagens por MALDI para estudo da distribuição de cocaína e seus metabólitos em amostras intactas de cabelo único de usuários crônicos. ¹⁶⁶	CHCA	Q/TRAP	Porta, <i>et al.</i> 2011
2012	Triagem qualitativa em fluidos biológicos no controle de doping por MALDI para cocaína, seus metabólitos e outras drogas. ¹⁶⁷	DHB	TOF	Galano, <i>etc al.</i> 2012
2013	Determinação de cocaína e outras drogas em fio de cabelo. ¹⁴⁹	CHCA	Orbitrap	Musshoff, <i>et al.</i> 2013
	Estudo quantitativo por MALDI para a análise de cocaína em tecido cerebral usando um padrão interno de cocaína deuterada. ¹⁶⁸	DHB	Q-TOF LTQ	Pirman, <i>et al.</i> 2013
2014	Estudo de impressões digitais latentes reveladas com cianoacrilato e detecção de cocaína em marcas de dedos por MALDI. ¹⁶⁹	DHB	TOF	Sundar & Rowell 2014
	Aplicação da técnica MALDI para análise de drogas de abuso (cocaína e outras). ¹⁷⁰	CHCA	Orbitrap	Ostermann <i>et al.</i> 2014
	Estudo com imageamento por MALDI do efeito do tratamento cosmético sobre a cocaína no cabelo. ¹⁷¹	CHCA	Q-TOF	Cuypers <i>et al.</i> 2014
2015	Estudo da última etapa da via biossintética, catalisada pela enzima BAHD aciltransferase, na produção de cocaína em folhas de <i>Erythoxylum coca</i> , e distribuição de dois alcaloides por MALDI apontando as diferenças entre as superfícies adaxial e abaxial das folhas. ¹⁷²	CHCA	TOF	Schmidt <i>et al.</i> 2015

	Detecção de cocaína e outros alcaloides em impressões digitais latentes usando DESI e MALDI que mostraram uma boa correlação com o teste de fluido oral. ¹⁷³	CHCA	Q-TOF	Bailey <i>et al.</i> 2015
	Estudo com monitoramento de reação selecionada por MALDI como uma abordagem quantitativa e robusta para análises direcionadas a pequenos analitos, como a cocaína, e peptídeos. ¹⁷⁴	CHCA	Q/TRAP	Porta <i>et al.</i> 2015
	Trabalho que explora o potencial de óxido de tungstênio e óxido de rênio como auxiliares no processo de ionização de moléculas pequenas, como a cocaína e outros, por MALDI. ¹⁷⁵	ReO ₃ e WO ₃	TOF	Bernier, Wysocki, Dagan, 2015R
	Proposta de preparação de cortes longitudinais de amostras de cabelo para análise de cocaína por imagens com a técnica MALDI. ¹⁷⁶	CHCA	Q-TOF	Flinders <i>et al.</i> 2015
2017	Proposta de otimização de preparo de amostra e parâmetros instrumentais para análises rápidas de fios de cabelo (usuários de cocaína) por imagens com a técnica MALDI. ¹⁷⁷	CHCA	Q-TOF	Flinders, B <i>et al.</i> 2017
2018	Estudo comparativo entre MALDI e outras técnicas de imagem química para detecção de drogas de abuso, incluindo a cocaína, em impressões digitais. ¹⁷⁸	CHCA	FT-ICR	Skriba & Havlicek, 2018
	Monitoramento com alto rendimento da cocaína e seus metabólitos em amostras de cabelo usando <i>microarrays</i> para análises por MALDI. ¹⁷⁹	CHCA	TOF	Kernalléguen <i>et al.</i> 2018
	Pesquisa que explorou o uso de perfis e imagens por MALDI para a análise de impressões digitais depositadas em cédulas de polímero bem como no estudo de alvos moleculares de importância forense com foco na cocaína. ¹⁸⁰	CHCA	Q-TOF	Scotcher & Bradshaw, 2018
2020	Estudo que propõe um método para caracterizar e localizar cocaína e seus metabólitos em cabelo, após 4	CHCA	QIT-TOF	Kernalléguen <i>et al.</i> 2020

	meses da coleta, por imagens obtidas com a técnica MALDI. ¹⁸¹			
	Estudo de amostras longitudinais e transversais de cabelos embebidos em drogas, de consumidores e contaminados com cocaína em pó foram investigados usando MALDI. ¹⁸²	CHCA	QQQ	Erne <i>et al.</i> 2020
	Desenvolvimento de uma estratégia utilizando MALDI e espectrômetro de alta resolução para a análise qualitativa e quantitativa de drogas clássicas, como a cocaína, e <i>designer drugs</i> . ¹⁸³	CHCA	LTQ-ORBITRAP XL	Joye <i>et al.</i> 2020
2021	Desenvolvimento de método para estudo da distribuição espacial de diferentes alcaloides e flavonoides em folhas de <i>Erythroxylum coca</i> por MALDI e espectrômetro de massas de alta resolução. ¹⁸⁴	MBT, CHCA e MBT	FT-ICR	Dos Santos <i>et al.</i> 2021
	Avaliação da distribuição espacial da cocaína e seu metabólito em uma impressão digital por MALDI para discriminar entre administração e contato dérmico com a droga. ¹⁸⁵	DHB	TOF	Costa <i>et al.</i> 2021

-* Matriz não mencionada; Matrizes: 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid (ferulic acid, FA); 2,5-Dihydroxybenzoic acid (DHB); α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA); 5-methoxy salicylic acid (MSA); 2-mercaptobenzothiazole (MBT); Sinapinic acid (SA).; Analisadores: time-of-flight (TOF); triple quadrupole (QQQ); Fourier transform ion cyclotron resonance (FTICR); Quadrupole TOF (Q-TOF); Linear Ion Trap (LTQ); Triple quadrupole linear ion trap (Q/TRAP); Quadrupole Ion Trap TOF (QIT-TOF); Ion Trap (IT).

Ainda, outro avanço significativo na MS foi o desenvolvimento da técnica de *imaging mass spectrometry* (IMS),^{186,187} que possui como um dos diferenciais a maneira como os íons são gerados, por exemplo, por electropulverização de gotículas de solvente carregadas, como em *desorption electrospray ionization* (DESI), gerada por um fluxo baixo ($0,5-10 \mu\text{L min}^{-1}$) de solvente e aplicação de um gás nebulizador, além de um potencial de alta voltagem ($\sim 4-5 \text{ kV}$), que resulta em um feixe de microgotículas carregadas; ou formação dos íons pela incidência de um *laser*, geralmente de N_2 (355 nm), com (MALDI) ou sem (LDI) o uso de reagentes matriciais.^{78,188}

Apesar da fonte DESI permitir análise direta, sem adição de matriz, possui uma resolução espacial limitada, impossibilitando a aquisição de imagens de alta resolução, pois o *spray* da fonte DESI não pode ser focado da mesma maneira que o laser em um experimento MALDI, que por sua vez possui instrumentos comerciais disponíveis oferecendo resoluções espaciais em torno de $20 \mu\text{m}$.⁷⁸

Assim, o IMS combinado com a técnica MALDI (MALDI IMS) tem sido considerado uma ferramenta analítica capaz de determinar, em um único ensaio, a distribuição espacial de diversas classes, tais como lipídios, proteínas, peptídeos, drogas e diversos metabólitos na superfície de diferentes tecidos.¹⁸⁶

Uma das grandes vantagens do imageamento por MALDI é a correlação da informação molecular com a histologia da amostra, mantendo as informações de localização espacial dos analitos após as medições de massas, trazendo uma nova qualidade de dados moleculares.¹⁸⁹

Nas análises de MALDI IMS, ilustrada na **figura 19**, após fixação da amostra à uma placa metálica (etapa A), um espectro de massas individual com as intensidades dos m/z é registrado para cada *pixel* (etapa B). Posterior a esta aquisição dos dados, a formação das imagens é realizada com a conversão do espectro de massas em arquivo de imagem com auxílio de *software*, normalmente fornecido pelo fabricante do equipamento, ou ainda usando o MATLAB a partir da importação dos dados brutos. Assim, com a seleção no espectro médio gerado e atribuição de cor específica para cada m/z (etapa C), os íons são subsequentemente visualizados em uma escala colorida sobre a área total da amostra (etapas C e D).^{186,190}

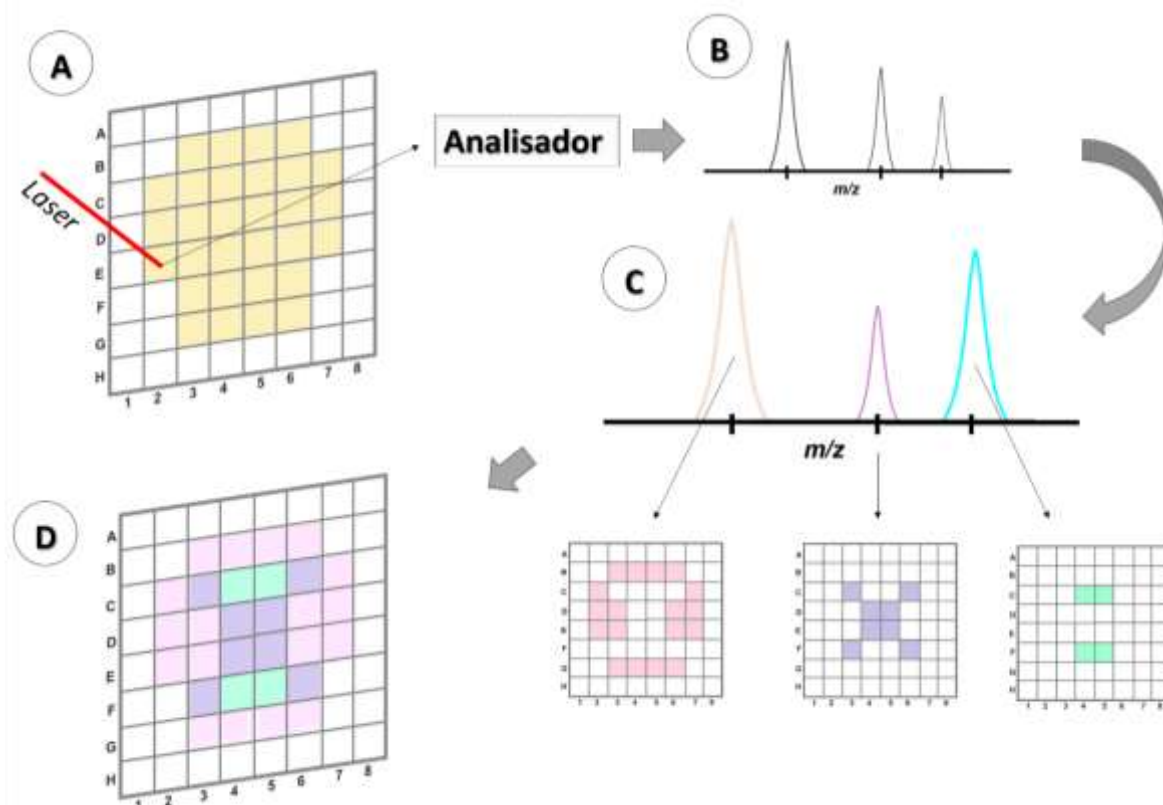


Figura 19. Ilustração esquemática do método de imageamento por MS; **a)** A área da amostra é totalmente subdividida (conceitualmente) em pixels, que são analisados individualmente ponto a ponto (*pixel per pixel*) exemplificado pela incidência do laser (vermelho) e os íons gerados levados ao analisador (representação por seta); **b)** para cada *pixel*, um único espectro de massa é armazenado em conjunto com suas coordenadas espaciais; **c)** após toda a superfície ser analisada, há conversão em arquivo de imagem, e a partir de um espectro de massas médio são criadas imagens que podem ser individualmente visualizadas atribuindo uma cor a cada m/z específico; **d)** bem como a junção de vários m/z na mesma imagem (*colocalization*).

Fonte: Wu *et al.* 2013 – Adaptada.¹⁹⁰

Vale ressaltar que um dos principais fatores em estudos que necessitam de cortes histológicos e análises posteriores por MALDI IMS é a necessidade que o tecido seja estabilizado e forneça uma superfície de corte adequada. Para isso, materiais como parafina e/ou OCT (*optimal cutting temperature polymer*) são amplamente utilizados para esta finalidade, no entanto, estes podem prejudicar a ionização dos analitos da amostra devido a supressão iônica causada por eles. Semelhantemente, o próprio reagente matricial utilizado em MALDI IMS pode ser capaz de interferir na ionização dos analitos pelo mesmo motivo, principalmente na faixa de massa baixa ($m/z < 1000$).^{78,144}

Outro fator importante a ser considerado na etapa de preparo para estudos por MALDI IMS é a aplicação da matriz MALDI, que é responsável pela obtenção de

espectros de massa de alta qualidade, além de manter a integridade espacial da superfície do tecido analisado. Entre os variados métodos de aplicação da matriz destacam-se: os pulverizadores, a sublimação e aplicação da matriz com pipeta. Este último limita-se ao uso para análises de perfil químico por MALDI MS.^{78,144,192}

Apesar dos primeiros relatos da utilização de MALDI IMS surgirem em 1994,^{188,193} Caprioli *et al.*, 1997,¹⁹² foi considerado o pioneiro no imageamento químico em tecidos. Desde então, o imageamento por MALDI vem ganhando espaço no campo científico com identificação e localização de compostos diretamente nas superfícies analisadas, sendo capaz de fornecer novas perspectivas sobre a análise de diferentes amostras, proporcionando resultados de alta resolução.¹⁸⁸

Os estudos em tecidos vegetais por MALDI IMS, para avaliar a distribuição espacial de diferentes compostos, se expandiu rapidamente à medida que as técnicas básicas se tornaram bem estabelecidas e os instrumentos comercialmente disponíveis.⁷⁸ Grande parte dos trabalhos até o momento foram desenvolvidos para comprovar a aplicabilidade da técnica com ênfase no desenvolvimento do método. No entanto, alguns autores desenvolveram suas pesquisas com finalidade de avançar no entendimento da biologia vegetal.^{78,194,195}

Indubitavelmente as plantas estão entre as matrizes mais complexas da natureza, pois além de biossintetizar cerca de até 200.000 diferentes metabólitos, possuem natureza multicelular.^{78,187} Ao analisar seus perfis metabólicos globais, novas descobertas que ligam as vias celulares aos mecanismos biológicos podem ser reveladas, permitindo a compreensão quanto as possíveis relações entre a bioquímica mecanicista com o fenótipo celular.^{72,196}

Com isso, diversificados estudos envolvendo imageamento químico de compostos em produtos naturais, especialmente nos últimos anos, têm exemplificado a evolução da aplicação da técnica MALDI IMS no estudo de tecidos vegetais.^{78,150,188,194,197-205}

Assim, à luz desses estudos emergentes sobre o potencial da aplicação da técnica IMS em tecidos vegetais, e apesar da utilização do imageamento químico nas plantas *Cannabis* e *Erythroxylum coca* incipiente, estima-se que essa, ainda pouco explorada, ferramenta analítica seja amplamente utilizada no estudo e novas descobertas nos campos da canabinômica e alcaloideômica.

CONCLUSÕES

O presente estado da arte buscou apresentar conceitos dirigentes para compreensão e entendimento da linha evolutiva de pesquisa das plantas *Cannabis* e *Erythroxylum coca* ao longo dos anos até as suas aplicações atuais. Para isso, informações históricas, características morfológicas e microscópicas, taxonomia, fitoquímica, classe canabinoide e alcaloide, contribuições na medicina desde evidências anedóticas até comprovações científicas recentes, produtos derivados para fins recreativos, dados sobre o uso abusivo, legislação brasileira vigente, técnicas e metodologias clássicas e atuais no estudo dos seus constituintes, com destaque no possível e ascendente uso do imageamento químico por MS como uma alternativa analítica no campo da canabinômica e alcaloideômica, entre outros, foram organizados. Assim, todos esses importantes e cooperativos apontamentos supracitados evidenciam a amplitude da temática e sua aplicabilidade em várias áreas das Ciências.

REFERÊNCIAS – PARTE I

1. OGA, S., CAMARGO, M. M. A., BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3^a ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2008. 435p.
2. RUSSO, E. B. History of cannabis and its preparations in saga, science, and sobriquet. *Chem. Biodiversity*, **4**(8), 1614, 2007.
3. FRIEDMAN, D., SIRVEN, J. I. Historical perspective on the medical use of cannabis for epilepsy: ancient times to the 1980s. *Epilepsy Behav.*, **70**, 298, 2017.
4. RAMAN, A. The Cannabis plant: botany, cultivation, and processing for use. In *Cannabis: The Genus Cannabis*, Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1998, 29p.
5. FARAG, S., KAYSER, O. **The Cannabis Plant: Botanical Aspects. Handbook of Cannabis and Related Pathologies**, 2017, 3-12.
6. ALIFERIS, K. A., BERNARD-PERRON, D. Cannabinomics: application of metabolomics in Cannabis (*Cannabis sativa* L.) research and development. *Front. Plant Sci.*, **11**, 1, 2020.
7. United States Department of Agriculture (USDA). Natura Resources Conservation Service. Disponível em: <http://plants.usda.gov/classification.html>. Acesso em 23 de fev. 2021.
8. SCHULTES, R. E., KLEIN, W. M., PLOWMAN, T., LOCKWOOD, T. E. Cannabis: an example of taxonomic neglect. *Harvard University Botanical Museum Leaflets*, **23**, 337, 1974.
9. ZULFIQAR, F., ROSS, S. A., SLADE D., AHMED, S. A., RADWAN, M. M., ALI, Z., KHAN, I. A., ELISOHLY, M. A. Cannabisol, a novel Δ -9-THC dimer possessing a unique methylene bridge, isolated from *Cannabis sativa*. *Tetrahedron Lett.*, **53**, 3560, 2012.
10. KARAMEPELA, S., PISTOS, C., MORAITIS, K., STOUKAS, V., PAPOUTSIS, I., ZORBA, E., KOUPPARIS, M., SPILIOPOULOU, C., ATHANASELIS, S. Development and validation of a LC/MS method for the determination of Δ 9-tetrahydrocannabinol 6 and 11-carboxy- Δ 9-tetrahydrocannabinol in the larvae of the blowfly *Lucilia sericata*: Forensic applications. *Sci. Justice*, **55**, 472. 2015.
11. RAIKOS, N., SCHMID, H., NUSSBAUMER, S., AMBACH, L., LANZ, S., LÄNGIN, A., WEINMANN, W. Determination of Δ 9-tetrahydrocannabinolic acid A (Δ 9-THCA-A) in whole blood and plasma by LC–MS/MS and application in authentic samples from drivers suspected of driving under the influence of cannabis. *Forensic Sci. Int.*, **243**, 130, 2014.
12. ELISOHLY, M. A., SLADE, D. Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sci.*, **78**(5), 539-548, 2005.
13. ELISOHLY, M. A. **Marijuana and the Cannabinoids**. Editora Humana Press, Totowa, New Jersey, 2007.
14. United Nations Office On Drugs And Crime – UNODC, 2009. *Recommended methods for the identification and analysis of cannabis and cannabis products*. Manual for use by national drug analysis laboratories. Vienna. Disponível em: <http://www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/WDR-2009.html>. Acesso em 02 jan. 2022.
15. ANDRE, C. M., HAUSMAN, J. F., GUERRIERO, G. Cannabis sativa: the plant of the thousand and one molecules. *Front. Plant Sci.*, **7**, 19, 2016.
16. KINGHORN, A. D., FALK, H., GIBBONS, S., KOBAYASHI, J. I. **Phytocannabinoids**, Springer International Pu, 2017.
17. CLARKE R. C., MERLIN M. D. Cannabis domestication, breeding history, present-day genetic diversity, and future prospects. *Crit. Rev. Plant Sci.* **35**, 293, 2016.

18. BERMAN, P., FUTORAN, K., LEWITUS, G. M., MUKHA, D., BENAMI, M., SHLOMI, T., MEIRI, D. A new ESI-LC/MS approach for comprehensive metabolic profiling of phytocannabinoids in Cannabis. *Sci. Rep.*, **8**(1), 1, 2018.
19. RADWAN, M. M., ELSOHLY, M. A., EL-ALFY, A. T., AHMED, S. A., SLADE, D., HUSNI, A. S., ROSS, S. A. Isolation and Pharmacological Evaluation of Minor Cannabinoids from High-Potency Cannabis sativa. *J. Nat. Prod.*, **78**, 1271, 2015.
20. MARIOTTI, K. C, MARCELO, M. C. A., ORTIZ, R. S., BORILLE, B. T., DOS REIS, M., FETT, M. S., LIMBERGER, R. P. Seized cannabis seeds cultivated in greenhouse: A chemical study by gas chromatography–mass spectrometry and chemometric analysis. *Sci. Justice*, **56**(1), 35, 2016.
21. NOVOTNY, M., LEE, M. L., LOW, C. E., RAYMOND, A. Analysis of marijuana samples from different origins by high-resolution gas-liquid chromatography for forensic application. *Anal. Chem.*, **48**(1), 24, 1976.
22. DE BACKER, B., MAEBE, K., VERSTRAETE, A. G., CHARLIER, C. 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**(4), 918, 2012.
23. THAKUR, G. A., DUCLOS, R. I., MAKRIYANNIS, A. Natural cannabinoids: templates for drug discovery. *Life Sci.*, **78**(5), 454, 2005.
24. VAN BAKEL, H., STOUT, J. M., COTE, A. G., TALLON, C. M., SHARPE, A. G., HUGHES, T. R., PAGE, J. E. The draft genome and transcriptome of Cannabis sativa. *Genome Biol.*, **12**(10), 1, 2011.
25. CHANDRA, S., LATA, H., ELSOHLY, M. A. **Cannabis sativa L.: Botany and Biotechnology**. Editora Springer, 2017. 128-35 p.
26. DEGENHARDT, F., STEHLE, F., KAYSER, O. **The biosynthesis of cannabinoids**, In *Handbook of Cannabis and related pathologies*, Academic Press, 2017, 13-23p.
27. PAGANI, A., SCALA, F., CHIANESE, G., GRASSI, G., APPENDINO, G., TAGLIALATELA-SCAFATI, O. Cannabixepane, a novel tetracyclic cannabinoid from hemp, Cannabis sativa L. *Tetrahedron*, **67**(19), 3369, 2011.
28. WANG, M., WANG, Y. H., AVULA, B., RADWAN, M. M., WANAS, A. S., MEHMEDIC, Z., KHAN, I. A. Quantitative Determination of Cannabinoids in Cannabis and Cannabis Products Using Ultra-High-Performance Supercritical Fluid Chromatography and Diode Array/Mass Spectrometric Detection. *J. Forensic Sci.*, **62**(3), 602, 2017.
29. ADAMS, R., HUNT, M., CLARK, J.H. Structure of cannabidiol, a product isolated from the marihuana extract of Minnesota wild hemp. I, *J. Am. Chem. Soc.*, **62**, 196, 1940.
30. MECOULAM, R. Interview with Prof. Raphael Mechoulam, codiscoverer of THC. *International Journal of the Addictions*, **21**(4-5), 579, 1986.
31. HAZEKAMP, A. **Cannabis: extracting the medicine**. Department of Pharmacognosy, IBL, Leiden University, 2007.
32. OBATA, Y., ISHIKAWA, Y. Constituents of hemp plant (Cannabis sativa). III. Isolation of a Gibbs-positive compound from Japanese hemp. *Agr. Biol. Chem.*, **30**(6), 619, 1966.
33. MECOULAM, R., HANUŠ, L. A historical overview of chemical research on cannabinoids. *Chem. Phys. Lipids*, **108**(1-2), 1, 2000.
34. MECOULAM, R., PARKER, L. A. The endocannabinoid system and the brain. *Annu. Rev Psychol.*, **64**, 21-47, 2013.
35. PERTWEE, R. G. **Handbook of cannabis**, Oxford University Press, USA, 2014.

36. CLARK, P. A., CAPUZZI, K., FICK, C. Medical marijuana: medical necessity versus political agenda. *Med. Sci. Monit.: international medical journal of experimental and clinical research*, **17**(12), RA249, 2011.
37. JOHNSON, J. R., LOSSIGNOL, D., BURNELL-NUGENT, M., FALLON, M. T. An open-label extension study to investigate the long-term safety and tolerability of THC/CBD oromucosal spray and oromucosal THC spray in patients with terminal cancer-related pain refractory to strong opioid analgesics. *J. Pain Symptom Manage.*, **46**(2), 207, 2013.
38. CHAGAS, M. H. N., ZUARDI, A. W., TUMAS, V., PENA-PEREIRA, M. A., SOBREIRA, E. T., BERGAMASCHI, M. M., CRIPPA, J. A. S. Effects of cannabidiol in the treatment of patients with Parkinson's disease: an exploratory double-blind trial. *J. Psychopharmacol.*, **28**(11), 1088, 2014.
39. JETLY, R., HEBER, A., FRASER, G., BOISVERT, D. The efficacy of nabilone, a synthetic cannabinoid, in the treatment of PTSD-associated nightmares: a preliminary randomized, double-blind, placebo-controlled cross-over design study. *Psychoneuroendocrinology*, **51**, 585, 2015.
40. JADOON, K. A., RATCLIFFE, S. H., BARRETT, D. A., THOMAS, E. L., STOTT, C., BELL, J. D., TAN, G. D. Efficacy and safety of cannabidiol and tetrahydrocannabinarin on glycemic and lipid parameters in patients with type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel group pilot study. *Diabetes Care*, **39**(10), 1777, 2016.
41. COOPER, R. E., WILLIAMS, E., SEEGOBIN, S., TYE, C., KUNTSI, J., ASHERSON, P. Cannabinoids in attention-deficit/hyperactivity disorder: A randomised-controlled trial. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, **27**(8), 795, 2017.
42. MCGUIRE, P., ROBSON, P., CUBALA, W. J., VASILE, D., MORRISON, P. D., BARRON, R., WRIGHT, S. Cannabidiol (CBD) as an adjunctive therapy in schizophrenia: a multicenter randomized controlled trial. *Am. J. Psychiatry*, **175**(3), 225, 2018.
43. SAGY, I., BAR-LEV SCHLEIDER, L., ABU-SHAKRA, M., NOVACK, V. Safety and efficacy of medical cannabis in fibromyalgia. *J. Clin. Med.*, **8**(6), 807, 2019.
44. MILIAN, L., MATA, M., ALCACER, J., OLIVER, M., SANCHO-TELLO, M., MARTÍN DE LLANO, J. J., CARDA, C. Cannabinoid receptor expression in non-small cell lung cancer. Effectiveness of tetrahydrocannabinol and cannabidiol inhibiting cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition in vitro. *PLoS One*, **15**(2), 2020.
45. MALINOWSKA, B., BARANOWSKA-KUCZKO, M., KICMAN, A., SCHLICKER, E. Opportunities, Challenges and Pitfalls of Using Cannabidiol as an Adjuvant Drug in COVID-19. *Int. J. Mol. Sci.*, **22**(4), 1986, 2021.
46. NGUYEN, L. C., YANG, D., NICOLAESCU, V., BEST, T. J., GULA, H., SAXENA, D., OSNER, M. R. Cannabidiol inhibits SARS-CoV-2 replication through induction of the host ER stress and innate immune responses. *Sci. Adv.*, **8**, eabi6110, 2022.
47. IZZO, A. A., BORRELLI, F., CAPASSO, R., DI MARZO, V., MECHOULAM, R. Non-psychoactive plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends Pharmacol. Sci.*, **30**(10), 515, 2009.
48. United Nations Office On Drugs And Crime – UNODC, 2020 – Vienna, livro 3. World Drug Report. Disponível em: <http://www.unodc.org/wdr2020>. Acesso em 20 de jan. 2022.
49. MARTINS, B. S., OLIVEIRA, M. F. **Química Forense Experimental**. ed. Cengage Learning, São Paulo, 2016, 100-137p.
50. WARF, B. High points: an historical geography of cannabis. *Geogr. Rev.*, **104**(4), 414, 2014.

51. CARLINI, E. A. A história da maconha no Brasil. *J. Bras. Psiquiatr.*, **55**(4), 314, 2006.
52. PASSAGLI, Marcos. *Toxicologia Forense: Teoria e Prática*. 2. ed. Campinas, São Paulo: Millennium, 2009, 50 p.
53. Decreto-Lei 891 de 25 de novembro de 1938. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto-lei/1937-1946/del0891.htm. Acesso em 01 de jan. 2022.
54. BORILLE, B. T., MARCELO, M. C. A., ORTIZ, R. S., DE CÁSSIA MARIOTTI, K., FERRÃO, M. F., LIMBERGER, R. P. Near infrared spectroscopy combined with chemometrics for growth stage classification of cannabis cultivated in a greenhouse from seized seeds. *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.*, **173**, 318, 2017.
55. BIZZOTTO, A., RODRIGUES, A. B. *Nova lei de drogas: comentários à lei n. 11.343, de 23 de agosto de 2006*. Lúmen Júris, 2007.
56. Lei nº 11.343, de 23 de agosto de 2006. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2006/lei/l11343.htm. Acesso em 30 de jan. 2022.
57. RDC 335/2020, de 24 de jan. 2021. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/legislacao#/visualizar/413870>. Acesso em 27 de jan. 2022.
58. ANVISA - Cannabis medicinal: conheça o histórico da proposta Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2019/cannabis-medicinal-conheca-o-historico-da-proposta>. Acesso em 03 de jan. 2022.
59. BORDIN, D. C., MESSIAS, M., LANARO, R., CAZENAVE, S. O.S., COSTA, J. L. Análise forense: pesquisa de drogas vegetais interferentes de testes colorimétricos para identificação dos canabinóides da maconha (*Cannabis sativa* L.). *Quim. Nova.*, **35**, 2040, 2012.
60. DOS SANTOS, N. A., SOUZA, L. M., DOMINGOS, E., FRANÇA, H. S., LACERDA JR, V., BEATRIZ, A., VAZ, B. G., RODRIGUES, R. R. T., MERLO, B. B, KUSTER, R. M., ROMÃO, W. Evaluating the selectivity of colorimetric test (Fast Blue BB salt) for the cannabinoids identification in marijuana street samples by UV–Vis, TLC, ESI (+) FT-ICR MS and ESI(+)MS/MS. *Forensic Chem.*, **1**, 13, 2016.
61. FRANÇA, H. S., ACOSTA, A., JAMAL, A., ROMAO, W., MULLOOR, J., ALMIRALL, J. R. Experimental and ab initio investigation of the products of reaction from Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) and the fast blue BB spot reagent in presumptive drug tests for cannabinoids. *Forensic Chem.*, **17**, 100212, 2020.
62. JACOBS, A. D., STEINER, R. R. (2014). Detection of the Duquenois–Levine chromophore in a marijuana sample. *Forensic Sci. Int.*, **239**, 1, 2014.
63. VANHOVE, W., VAN DAMME, P., MEERT, N. Factors determining yield and quality of illicit indoor cannabis (*Cannabis* spp.) production. *Forensic Sci. Int.*, **212**(1-3), 158, 2011.
64. DORADO, J., ALMENDROS, G., FIELD, J. A., SIERRA-ALVAREZ, R. Infrared spectroscopy analysis of hemp (*Cannabis sativa*) after selective delignification by *Bjerkandera* sp. at different nitrogen levels. *Enzyme Microb. Technol.*, **28**(6), 550, 2001.
65. BORILLE, B. T., MARCELO, M. C. A., ORTIZ, R. S., DE CÁSSIA MARIOTTI, K., FERRÃO, M. F., LIMBERGER, R. P. Near infrared spectroscopy combined with chemometrics for growth stage classification of cannabis cultivated in a greenhouse from seized seeds. *Spectrochim. Acta, Part A*, **173**, 318, 2017.
66. EBERSBACH, P., STEHLE, F., KAYSER, O., FREIER, E. Chemical fingerprinting of single glandular trichomes of *Cannabis sativa* by Coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy. *BMC Plant Biol.*, **18**(1), 1, 2018.

67. SANCHEZ, L., BALTENSPERGER, D., KUROUSKI, D. Raman-Based Differentiation of Hemp, Cannabidiol-Rich Hemp, and Cannabis. *Anal. Chem.*, **92**(11), 7733, 2020.
68. LEITE, J. D. A., DE OLIVEIRA, M. V., CONTI, R., BORGES, W. D. S., ROSA, T. R., FILGUEIRAS, P. R., NETO, Á. C. Extraction and isolation of cannabinoids from marijuana seizures and characterization by ¹H NMR allied to chemometric tools. *Sci. Justice*, **58**(5), 355, 2018.
69. PATEL, B., WENE, D., FAN, Z. T. Qualitative and quantitative measurement of cannabinoids in cannabis using modified HPLC/DAD method. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **146**, 15, 2017.
70. NIE, B., HENION, J., RYONA, I. The Role of Mass Spectrometry in the Cannabis Industry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **30**(5), 719, 2019.
71. CANUTO, G. A., COSTA, J. L. D., DA CRUZ, P. L., SOUZA, A. R. L. D., FACCIO, A. T., KLASSEN, A., TAVARES, M. F. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. *Quim. Nova*, **41**(1), 75, 2018.
72. FIEHN, O. Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. *Funct. Genomics*, **48**, 155, 2002.
73. DE BACKER, B., DEBRUS, B., LEBRUN, P., THEUNIS, L., DUBOIS, N., DECOCK, L., CHARLIER, C. Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in cannabis plant material. *J. Chromatogr. B*, **877**(32), 4115, 2009.
74. ADAHCHOUR, M., BEENS, J., VREULS, R. J. J., BRINKMAN, U. T. Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC× GC): IV. Further applications, conclusions and perspectives. *TrAC Trends Analyt. Chem.*, **25**(8), 821, 2006.
75. SANTOS, N. A. D., TOSE, L. V., DA SILVA, S. R., MURGU, M., KUSTER, R. M., ORTIZ, R. S., ROMÃO, W. Analysis of isomeric cannabinoid standards and cannabis products by UPLC-ESI-TWIM-MS: a comparison with GC-MS and GC× GC-QMS. *J. Braz. Chem. Soc.*, **30**(1), 60, 2019.
76. TOSE, L. V., SANTOS, N. A., RODRIGUES, R. R., MURGU, M., GOMES, A. F., VASCONCELOS, G. A., ROMÃO, W. Isomeric separation of cannabinoids by UPLC combined with ionic mobility mass spectrometry (TWIM-MS)—Part I. *Int. J. Mass Spectrom.*, **418**, 112, 2017.
77. GROB, R. L., BARRY, E. F. **Modern practice of gas chromatography**. John Wiley & Sons, 2004, 50-52 p.
78. BJARNHOLT, N., LI, B., D'ALVISE, J., JANFELT, C. Mass spectrometry imaging of plant metabolites—principles and possibilities. *Nat. Prod. Rep.*, **31**, 818, 2014.
79. PLOWMAN, T., HENSOLD, N. Names, types, and distribution of neotropical species of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae). *Brittonia*, **56**(1), 1, 2004.
80. RESTREPO, D. A., SAENZ, E., JARA-MUÑOZ, O. A., CALIXTO-BOTÍA, I. F., RODRÍGUEZ-SUÁREZ, S., ZULETA, P., D'AURIA, J. C. *Erythroxylum* in focus: an interdisciplinary review of an overlooked genus. *Molecules*, **24**(20), 3788, 2019.
81. United Nations Office On Drugs And Crime – UNODC, 2012. *Recommended methods for the identification and analysis of cocaine in seized materials*. Manual for use by national drug analysis laboratories. Disponível em: https://www.unodc.org/documents/scientific/Cocaine_Manual_Rev_1.pdf. Acesso em 12 jan. 2022.
82. SAUVAIN, M., RERAT, C., MORETTI, C., SARAVIA, E., ARRAZOLA, S., GUTIERREZ, E., MUÑOZ, V. A study of the chemical composition of *Erythroxylum*

- coca var. coca leaves collected in two ecological regions of Bolivia. *J. ethnopharmacol.*, **56**(3), 179, 1997.
83. PEREIRA, A. G., MENEZES, A. C. S., DOS SANTOS, M. L., VIEIRA, T. S., SANTOS, R. G., LACERDA, E. P. Avaliação da Atividade Citotóxica dos Extratos das Folhas de *Erythroxylum Campestre* (Erythroxylaceae) Frente às Células Sarcoma 180. *Rev. Processos Quím.*, **9**(17), 41-48, 2015.
84. SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., DE MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Ed. Artmed. 2016, 349-365p.
85. BIONDICH, A.S., JOSLIN, J.D. Coca: The History and Medical Significance of an Ancient Andean Tradition. *Emergency Medicine International*, **1**, 1, 2016.
86. KARCH, S. B. The history of cocaine toxicity. *Hum. Pathol.*, **20**(11), 1037, 1989.
87. BRUCE, N. C. **Biotechnology: A Multi-volume Comprehensive Treatise** Cambridge, UK, 1, 326, 2008.
88. LOUNASMAA, M., TAMMINEN, T. The tropane alkaloids. Chapter 1: The tropane alkaloids. In *The alkaloids: chemistry and pharmacology*, Academic Press, 44, 1, 1993.
89. DE SOUZA, L. M., RODRIGUES, R. R., SANTOS, H., COSTA, H. B., MERLO, B. B., FILGUEIRAS, P. R., ROMÃO, W. A survey of adulterants used to cut cocaine in samples seized in the Espírito Santo State by GC–MS allied to chemometric tools. *Sci. Justice*, **56**(2), 73, 2016.
90. ROCHA, W. W., LEITE, J. D. A., CORREIA, R. M., TOSATO, F., MADEIRA, N. C., FILGUEIRAS, P. R., ROMÃO, W., NETO, Á. C. Quantification of cocaine and its adulterants by nuclear magnetic resonance spectroscopy without deuterated solvents (No-D qNMR). *Anal. Methods*, **10**(15), 1685, 2018.
91. MALDANER, A. O., BOTELHO, É. D., ZACCA, J. J., MELO, R. C., COSTA, J. L., ZANCANARO, I., PAIXÃO, T. R. Chemical profiling of street cocaine from different brazilian regions. *J. Braz. Chem. Soc.*, **27**(4), 719, 2016.
92. ZHAO, Y., WANG, J.-H., YANG, X.-Y., DU, G.-H. Cocaine. **Natural Small Molecule Drugs from Plants**, 221, 2018.
93. TORRE J.C., SCHMIDT G.W., PAETZ C., REICHELT M., SCHNEIDER B., GERSHENZON J., The biosynthesis of hydroxycinnamoyl quinate esters and their role in the storage of cocaine in *Erythroxylum coca*. *Phytochemistry*. **91**, 177, 2013.
94. NOVÁK, M., SALEMINK, C. A., KHAN, I. Biological activity of the alkaloids of *Erythroxylum coca* and *Erythroxylum novogranatense*, *J. Ethnopharmacol.*, **10**, 3, 261, 1984.
95. MORISHIMA, H. O., WHITTINGTON, R. A., ISO, A., COOPER, T. B. The comparative toxicity of cocaine and its metabolites in conscious rats. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, **90**(6), 1684, 1999.
96. RIVERA, M. A., AUFDERHEIDE, A. C., CARTMELL, L. W., TORRES, C. M., LANGSJOEN, O. Antiquity of coca-leaf chewing in the south central Andes: a 3,000 year archaeological record of coca-leaf chewing from northern Chile. *J. Psychoact. Drugs*, **37**(4), 455-458, 2005.
97. COBO, B. **History of the Inca Empire: An Account of the Indian's Customs and their Origin, Together with a Treatise on Inca Legend**, University of Texas Press, Austin, Tex, USA, 1979.
98. Carroll, E. Coca: The plant and its use. *Cocaine*, **13**, 35, 1977.
99. D. STREATFEILD. *Cocaine: An Unauthorized Biography*, Picador/St. Marten's Press, New York, NY, USA, 2001.

100. ROMÃO, W., SCHWAB, N. V., BUENO, M. I., SPARRAPAN, R., EBERLIN, M. N., MARTINY, A., MALDANER, A. O. Química forense: perspectivas sobre novos métodos analíticos aplicados à documentoscopia, balística e drogas de abuso. *Quim. Nova*, **34**(10), 1717, 2011.
101. BOTELHO, É. D. Desenvolvimento de uma nova metodologia analítica para identificação e quantificação de truxilinas em amostras de cocaína baseada em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM). 2011. 174 f. Dissertação (Mestrado em Química)-Universidade de Brasília, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, 2011. Disponível em <https://repositorio.unb.br/handle/10482/10144>. Acesso em 14 de fev. 2022.
102. United Nations Office On Drugs And Crime – UNODC, 2021 – Vienna, livro 4. World Drug Report. Disponível em: <http://www.unodc.org/wdr2021>. Acesso em 20 de jan. 2022
103. SCOTT JR, L. J. Specific field test for cocaine. *Microgram*, **6**, 179, 1973.
104. FASANELLO, J., HIGGINS, P. Modified Scott test for cocaine base or cocaine hydrochloride. *Microgram*, **19**, 137, 1986.
105. CONCEIÇÃO, V. N., SOUZA, L. M., MERLO, B. B., FILGUEIRAS, P. R., POPPI, R. J., ROMÃO, W. Estudo do teste de Scott via técnicas espectroscópicas: um método alternativo para diferenciar cloridrato de cocaína e seus adulterantes. *Quim. Nova*, **37**(9), 1538, 2014.
106. COSTA, M. A. F., BRITO, N. M. Requisições de rotina e testes colorimétricos empregados em Química Forense: do preparo das soluções à descrição dos fenômenos químicos. *laboratório*, **3**, 4, 2020.
107. OGURI, K., SACHIKO, W., ETO, S., YAMADA, H. Specificity and mechanism of the color reaction of cocaine with cobaltous thiocyanate. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*. **41**. 274, 1995.
108. MARCELO, M. C. A., MARIOTTI, K. C., ORTIZ, R. S., FERRÃO, M. F., ANZANELLO, M. J. Scott test evaluation by multivariate image analysis in cocaine samples. *Microchem. J.*, **127**, 87, 2016.
109. BROCHMANN-HANSEN, E., SVENDSEN, A. B. Gas chromatography of alkaloids, alkaloidal salts, and derivatives. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **51**(11), 1095, 1962.
110. LOCICIRO, S., HAYOZ, P., ESSEIVA, P., DUJOURDY, L., BESACIER, F., MARGOT, P. Cocaine profiling for strategic intelligence purposes, a cross-border project between France and Switzerland: Part I. Optimisation and harmonisation of the profiling method. *Forensic Sci. Int.*, **167**(2-3), 220, 2007.
111. MOORE, M. Identification of *cis*-cinnamoylcocaine in illicit cocaine seizures, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **56** (5), 1199, 1973.
112. MOORE, J.M. Gas-chromatographic detection of ecgonine and benzoylecgonine in cocaine, *J. Chromatogr.*, **101**(1), 2015, 1974.
113. HOLMSTEDT, B., JÄÄTMAA, E., LEANDER, K., PLOWMAN, T. Determination of cocaine in some South American species of *Erythroxylum* using mass fragmentography. *Phytochemistry*, **16**(11), 1753, 1977.
114. TURNER, C. E., MA, C. Y., ELSOHL, M. A. Constituents in *Erythroxylum coca* I: gas chromatographic analysis of cocaine from three locations in Peru. *Bull. Narc.*, **31**(1), 71, 1979.
115. TURNER, C. E., MA, C. Y., ELSOHL, M. A. Constituents of *Erythroxylum coca* II. Gas-chromatographic analysis of cocaine and other alkaloids in coca leaves. *J. Ethnopharmacol.*, **3**(2-3), 293, 1981.

116. RIVIER, L. Analysis of alkaloids in leaves of cultivated *Erythroxylum* and characterization of alkaline substances used during coca chewing. *J. Ethnopharmacol.*, **3**(2-3), 313, 1981.
117. YOUSSEFI, M., COOKS, R. G., MCLAUGHLIN, J. L. Mapping of cocaine and cinnamoylcocaine in whole coca plant tissues by MIKES. *J. Am. Chem. Soc.*, **101**(12), 3400, 1979.
118. COOKS, R. G., KONDRAT, R. W., YOUSSEFI, M., MCLAUGHLIN, J. L. Mass-analyzed ion kinetic energy (MIKE) spectrometry and the direct analysis of coca. *J. Ethnopharmacol.*, **3**(2-3), 299, 1981.
119. JOHNSON, E. L., EMCHE, S. D. Variation of alkaloid content in *Erythroxylum* coca leaves from leaf bud to leaf drop. *Ann. Bot.* **73** (6), 645, 1994.
120. MOORE, J. M., CASALE, J. F., KLEIN, R. F., COOPER, D. A., LYDON, J. Determination and in-depth chromatographic analyses of alkaloids in South American and greenhouse-cultivated coca leaves. *J. Chromatogr. A*, **659**(1), 163, 1994.
121. JOHNSON, E. L. Content and distribution of *Erythroxylum* coca leaf alkaloids. *Ann. Bot.*, **76**(4), 331, 1995.
122. JENKINS, A. J., LLOSA, T., MONTOYA, I., CONE, E. J. Identification and quantitation of alkaloids in coca tea. *Forensic Sci. Int.*, **77**(3), 179, 1996.
123. EHLERINGER, J. R., CASALE, J. F., LOTT, M. J., FORD, V. L. Tracing the geographical origin of cocaine. *Nature*, **408**(6810), 311, 2000.
124. BRACHET, A. CHRISTEN, P., GAUVRIT, J.Y., LONGERAY, R., LANTERI, P., VEUTHEY, J.L. Experimental design in supercritical fluid extraction of cocaine from coca leaves. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **43**, 353, 2000.
125. BIERI, S., BRACHET, A., VEUTHEY, J. L., CHRISTEN, P. Cocaine distribution in wild *Erythroxylum* species. *J. Ethnopharmacol.*, **103** (3), 439, 2006.
126. BIERI, S., ILIAS, Y., BICCHI, C., VEUTHEY, J. L., CHRISTEN, P. Focused microwave-assisted extraction combined with solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry for the selective analysis of cocaine from coca leaves. *J. Chromatogr. A*, **1112**(1-2), 127, 2006.
127. CASALE, J. F., MALLETTE, J. R., JONES, L. M. Chemosystematic identification of fifteen new cocaine-bearing *Erythroxylum* cultigens grown in Colombia for illicit cocaine production. *Forensic Sci. Int.*, **237**, 30, 2014.
128. CASALE, J. F., MALLETTE, J. R. Illicit coca grown in Mexico: an alkaloid and isotope profile unlike coca grown in South America. *Forensic Chem.*, **1**, 1, 2016.
129. MALLETTE, J. R., CASALE, J. F., JORDAN, J., MORELLO, D. R., BEYER, P. M. Geographically sourcing cocaine's origin–delineation of the nineteen major coca growing regions in South America. *Sci. Rep.*, **6**(1), 1, 2016.
130. MARÍN-SÁEZ, J., ROMERO-GONZÁLEZ, R., FRENICH, A. G. Effect of tea making and boiling processes on the degradation of tropane alkaloids in tea and pasta samples contaminated with Solanaceae seeds and coca leaf. *Food Chem.* **287**, 265, 2019.
131. RUBIO, N. C., KRUMBIEGEL, F., PRAGST, F., THURMANN, D., NAGEL, A., ZYTOWSKI, E., POLIANSKY, N. Discrimination between chewing of coca leaves or drinking of coca tea and smoking of “paco”(coca paste) by hair analysis. A preliminary study of possibilities and limitations. *Forensic Sci. Int.*, **297**, 171, 2019.
132. MOORE, J. M., CASALE, J. F. *In-depth chromatographic analyses of illicit cocaine and its precursor, coca leaves.* *J. Chromatogr. A*, **674**(1-2), 165, 1994
133. KASPAR, S., PEUKERT, M., SVATOS, A., MATROS, A., MOCK, H. P. MALDI-imaging mass spectrometry—an emerging technique in plant biology. *Proteomics*, **11**(9), 1840, 2011,

134. BJARNHOLT, N., LI, B., D'ALVISE, J., JANFELT, C. Mass spectrometry imaging of plant metabolites—principles and possibilities. *Nat. Prod. Rep.*, **31**(6), 818, 2014.
135. KALETAŞ, B. K., VAN DER WIEL, I. M., STAUBER, J., DEKKER, L. J., GÜZEL, C., KROS, J. M., HEEREN, R. M. Sample preparation issues for tissue imaging by imaging MS. *Proteomics*, **9**(10), 2622, 2009.
136. SHARMA, K. S. Mass spectrometry—the early years. *Int. J. Mass Spectrom.*, **349**, 3, 2013.
137. HOFFMANN, E., STROOBANT, V., **Mass Spectrometry: Principles and applications**. John Wiley & Sons, LTD: Chichester, Inglaterra, 2002.
138. KRAJ, A., DESIDERIO, D. M., NIBBERING, N. M. **Mass spectrometry: instrumentation, interpretation, and applications**, 20, John Wiley & Sons, 2008.
139. GHISLAIN, T., FAURE, P., MICHELS, R. Detection and Monitoring of PAH and Oxy-PAHs by High Resolution Mass Spectrometry: Comparison of ESI, APCI and APPI Source Detection. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **23**(4), 530, 2012.
140. CORREA, D. N., SANTOS, J. M., TEUNISSEN, S. F., EBERLIN, L. S., EBERLIN, M. N. Forensic Chemistry and Ambient Mass Spectrometry: A perfect couple destined for a happy marriage? *Anal. Chem.*, **88**, 2515, 2016.
141. COOKS, R. G., OUYANG, Z., TAKATS, Z., WISEMAN, J. M. Ambient mass spectrometry, *Science*, **311**(5767), 1566, 2006.
142. HILLENKAMP, F., PETER-KATALINIC, J. **MALDI MS: a practical guide to instrumentation, methods and applications**. John Wiley & Sons, 2013.
143. GOTTARDO, R., CHIARINI, A., DAL PRÀ, I., SERI, C., RIMONDO, C., SERPELLONI, G., ARMATO, U., TAGLIARO, F. Direct screening of herbal blends for new synthetic cannabinoids by MALDI-TOF MS. *J. Mass Spectrom.*, **47**(1), 141-146, 2012.
144. SCHWARTZ, S. A., REYZER, M. L., CAPRIOLI, R. M. Direct tissue analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: practical aspects of sample preparation. *J. Mass Spectrom.*, **38**(7), 699-708, 2003.
145. GOTO, Y., SHIMA, Y., MORIMOTO, S., SHOYAMA, Y., MURAKAMI, H., KUSAI, A., NOJIMA, K. Determination of tetrahydrocannabinolic acid-carrier protein conjugate by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and antibody formation. *Org. Mass Spectrom.*, **29**(11), 668, 1994.
146. OZ, M., JACKSON, S. N., WOODS, A. S., MORALES, M., ZHANG, L. Additive effects of endogenous cannabinoid anandamide and ethanol on $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor-mediated responses in *Xenopus* oocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **313**(3), 1272, 2005.
147. XU, W., FILPPULA, S. A., MERCIER, R., YADDANAPUDI, S., PAVLOPOULOS, S., CAI, J., MAKRIYANNIS, A. Purification and mass spectroscopic analysis of human CB1 cannabinoid receptor functionally expressed using the baculovirus system. *J. Pept. Res.*, **66**(3), 138, 2005.
148. JACKSON, S. N., SINGHAL, S. K., WOODS, A. S., MORALES, M., SHIPPENBERG, T., ZHANG, L., OZ, M. Volatile anesthetics and endogenous cannabinoid anandamide have additive and independent inhibitory effects on $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor-mediated responses in *Xenopus* oocytes. *Eur. J. Pharmacol.*, **582**(1-3), 42, 2008.
149. MUSSHOF, F., ARREY, T., STRUPAT, K. Determination of cocaine, cocaine metabolites and cannabinoids in single hairs by MALDI Fourier transform mass spectrometry—preliminary results. *Drug Test. Anal.*, **5**(5), 361, 2013.
150. KUWAYAMA, K., YAMAMURO, T., TSUJIKAWA, K., MIYAGUCHI, H., KANAMORI, T., IWATA, Y. T., INOUE, H. Utilization of matrix-assisted laser

desorption/ionization imaging mass spectrometry to search for cannabis in herb mixtures. *Anal. Bioanal. Chem.*, **406**, 4789, 2014.

151. BEASLEY, E., FRANCESE, S., BASSINDALE, T. Detection and mapping of cannabinoids in single hair samples through rapid derivatization and matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **88**(20), 10328, 2016.

152. SINGH, P., PANDIT, S., GARNÆS, J., TUNJIC, S., MOKKAPATI, V. R., SULTAN, A., MIJAKOVIC, I. Green synthesis of gold and silver nanoparticles from *Cannabis sativa* (industrial hemp) and their capacity for biofilm inhibition. *Int. J. Nanomed.*, **13**, 3571, 2018.

153. KERNALLÉGUEN, A., ENJALBAL, C., ALVAREZ, J. C., BELGACEM, O., LÉONETTI, G., LAFITTE, D., PÉLISSIER-ALICOT, A. L. Synthetic cannabinoid isomers characterization by MALDI-MS3 imaging: application to single scalp hair. *Anal. Chim. Acta*, **1041**, 87, 2018.

154. NIELSEN, J. E., ROLLAND, A. D., RAJPERT-DE MEYTS, E., JANFELT, C., JØRGENSEN, A., WINGE, S. B., SKAKKEBAEK, N. E. Characterisation and localisation of the endocannabinoid system components in the adult human testis. *Sci. Rep.*, **9**(1), 1, 2019.

155. DOS SANTOS, N. A., DE SOUZA, L. M., PINTO, F. E., MACRINO, C. D. J., DE ALMEIDA, C. M., MERLO, B. B., ROMÃO, W. LDI and MALDI-FT-ICR imaging MS in Cannabis leaves: optimization and study of spatial distribution of cannabinoids. *Anal. Methods*, **11**(13), 1757, 2019.

156. LIN, H., ZENG, X., WANG, Q., LI, Y., SUN, B., WANG, Y., WANG, H. Identification and imaging of indole-3-carboxamide cannabinoids in hair using matrix-assisted laser-desorption/ionization mass spectrometry. *Forensic Toxicol.*, **38**(1), 216, 2020.

157. MUDDIMAN, D. C., GUSEV, A. I., MARTIN, L. B., HERCULES, D. M. Direct quantification of cocaine in urine by time-of-flight mass spectrometry. *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **354**(1), 103, 1996.

158. GOWDA, D. C., AMBEKAR, S. Y., GUPTA, P., LECCHI, P., PANNELL, L. K., DAVIDSON, E. A. Benzoylecgonine hydrazides: synthesis, coupling to horseradish peroxidase, and characterization of the conjugates. *Bioconjugate Chem.*, **7**(2), 265, 1996.

159. NICOLA, A. J., GUSEV, A. I., HERCULES, D. M. Direct quantitative analysis from thin-layer chromatography plates using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Appl. Spectrosc.*, **50**(12), 1479, 1996.

160. HALL, B. J., GOOLSBY, B., BRODBELT, J. S. Solid-Phase Extraction in Conjunction with Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization/Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry for the Determination of Benzoylecgonine in Urine. *Appl. Spectrosc.*, **53**(11), 1361, 1999.

161. WANG, H. Y. J., JACKSON, S. N., MCEUEN, J., WOODS, A. S. Localization and analyses of small drug molecules in rat brain tissue sections. *Anal. Chem.*, **77**(20), 6682, 2005.

162. VOGLIARDI, S., FAVRETTO, D., FRISON, G., FERRARA, S. D., SERAGLIA, R., TRALDI, P. A fast screening MALDI method for the detection of cocaine and its metabolites in hair. *J. Mass Spectrom.*, **44**(1), 18, 2009.

163. TANNU, N. S., HOWELL, L. L., HEMBY, S. E. Integrative proteomic analysis of the nucleus accumbens in rhesus monkeys following cocaine self-administration. *Mol. Psychiatry*, **15**(2), 185, 2010.

164. VOGLIARDI, S., FAVRETTO, D., FRISON, G., MAIETTI, S., VIEL, G., SERAGLIA, R., FERRARA, S. D. Validation of a fast screening method for the detection of cocaine in hair by MALDI-MS. *Anal. Bioanal. Chem.*, **396**(7), 2435, 2010.

- 165 REICH, R. F., CUDZILO, K., LEVISKY, J. A., YOST, R. A. Quantitative MALDI-MS n analysis of cocaine in the autopsied brain of a human cocaine user employing a wide isolation window and internal standards. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **21**(4), 564, 2010.
166. PORTA, T., GRIVET, C., KRAEMER, T., VARESIO, E., HOPFGARTNER, G. Single hair cocaine consumption monitoring by mass spectrometric imaging. *Anal. Chem.*, **83**(11), 4266, 2011.
167. GALANO, E., FIDANI, M., BAIA, F., PALOMBA, L., MARINO, G., AMORESANO, A. Qualitative screening in doping control by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry: A proof-of-evidence. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **71**, 193, 2012.
168. PIRMAN, D. A., REICH, R. F., KISS, A., HEEREN, R. M., YOST, R. A. Quantitative MALDI tandem mass spectrometric imaging of cocaine from brain tissue with a deuterated internal standard. *Anal. Chem.*, **85**(2), 1081, 2013.
169. SUNDAR, L., ROWELL, F. Detection of drugs in lifted cyanoacrylate-developed latent fingerprints using two laser desorption/ionisation mass spectrometric methods. *Analyst*, **139**(3), 633, 2014.
170. OSTERMANN, K. M., LUF, A., LUTSCH, N. M., DIEPLINGER, R., MECHTLER, T. P., METZ, T. F., KASPER, D. C. MALDI Orbitrap mass spectrometry for fast and simplified analysis of novel street and designer drugs. *Clin. Chim. Acta*, **433**, 254, 2014.
171. CUYPERS, E., FLINDERS, B., BOSMAN, I. J., LUSTHOF, K. J., VAN ASTEN, A. C., TYTGAT, J., HEEREN, R. M. Hydrogen peroxide reactions on cocaine in hair using imaging mass spectrometry. *Forensic Sci. Int.*, **242**, 103, 2014.
172. SCHMIDT, G. W., JIRSCHITZKA, J., PORTA, T., REICHELT, M., LUCK, K., TORRE, J. C. P., D'AURIA, J. C. The last step in cocaine biosynthesis is catalyzed by a BAHD acyltransferase. *Plant Physiol.*, **167**(1), 89, 2015.
173. BAILEY, M. J., BRADSHAW, R., FRANCESE, S., SALTER, T. L., COSTA, C., ISMAIL, M., DE PUIT, M. Rapid detection of cocaine, benzoylecgonine and methylecgonine in fingerprints using surface mass spectrometry. *Analyst*, **140**(18), 6254, 2015.
174. PORTA, T., LESUR, A., VARESIO, E., HOPFGARTNER, G. Quantification in MALDI-MS imaging: what can we learn from MALDI-selected reaction monitoring and what can we expect for imaging?. *Anal. Bioanal. Chem.*, **407**(8), 2177, 2015.
175. BERNIER, M. C., WYSOCKI, V. H., DAGAN, S. Laser desorption ionization of small molecules assisted by tungsten oxide and rhenium oxide particles. *J. Mass Spectrom.*, **50**(7), 891, 2015.
176. FLINDERS, B., CUYPERS, E., ZEIJLEMAKER, H., TYTGAT, J., HEEREN, R. M. Preparation of longitudinal sections of hair samples for the analysis of cocaine by MALDI-MS/MS and TOF-SIMS imaging. *Drug Test. Anal.*, **7**(10), 859, 2015.
177. FLINDERS, B., BEASLEY, E., VERLAAN, R. M., CUYPERS, E., FRANCESE, S., BASSINDALE, T., HEEREN, R. M. Optimization of sample preparation and instrumental parameters for the rapid analysis of drugs of abuse in hair samples by MALDI-MS/MS imaging. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **28**(11), 2462, 2017.
178. SKRIBA, A., HAVLICEK, V. Mass spectrometry imaging of illicit drugs in latent fingerprints by matrix-free and matrix-assisted desorption/ionization techniques. *Eur. J. Mass Spectrom.*, **24**(1), 124, 2018.
179. KERNALLÉGUEN, A., STEINHOFF, R., BACHLER, S., DITTRICH, P. S., SAINT-MARCOUX, F., EL BAKHI, S., ZENOBI, R. High-throughput monitoring of cocaine and its metabolites in hair using microarrays for mass spectrometry and matrix-assisted

- laser desorption/ionization-tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **90**(3), 2302, 2018.
180. SCOTCHER, K., BRADSHAW, R. The analysis of latent fingerprints on polymer banknotes using MALDI-MS. *Sci. Rep.*, **8**(1), 1, 2018.
 181. KERNALLÉGUEN, A., SAINT-MARCOUX, F., EL BALKHI, S., VORSPAN, F., LEONETTI, G., LAFITTE, D., PELISSIER, A. L. Quand le cheveu unique révèle une habitude de consommation: imagerie des cocaïniques par désorption/ionisation laser assistée par matrice et comparaison avec la chromatographie liquide. *Toxicol. Anal. Clin.*, **32**(2), 97, 2020.
 182. ERNE, R., BERNHARD, L., KAWECKI, M., BAUMGARTNER, M. R., KRAEMER, T. Using time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS) and matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) for investigations on single hair samples to solve the contamination versus incorporation issue of hair analysis in the case of cocaine and methadone. *Analyst*, **145**(14), 4906, 2020.
 183. JOYE, T., WIDMER, C., MORGER MÉGEVAND, R., LONGÈRE, S., AUGSBURGER, M., THOMAS, A. High-Throughput Qualitative and Quantitative Drug Checking by MALDI HRMS. *Front. Chem.*, **8**, 695, 2020.
 184. DOS SANTOS, N. A., DE ALMEIDA, C. M., GONÇALVES, F. F., ORTIZ, R. S., KUSTER, R. M., SAQUETTO, D., ROMÃO, W. Analysis of Erythroxylum coca Leaves by Imaging Mass Spectrometry (MALDI-FT-ICR IMS). *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **32**(4), 946, 2021.
 185. COSTA, C., JANG, M., DE JESUS, J., STEVEN, R. T., NIKULA, C. J., ELIA, E., BAILEY, M. J. Imaging mass spectrometry: a new way to distinguish dermal contact from administration of cocaine, using a single fingerprint. *Analyst*, **146**(12), 4010, 2021.
 186. ERIKSSON, C., MASAKI, N., YAO, I., HAYASAKA, T., SETOU, M. MALDI imaging mass spectrometry—A mini review of methods and recent developments. *Mass Spectrom.*, **2**, S0022, 2013.
 187. ESQUENAZI, E., YANG, Y. L., WATROUS, J., GERWICK, W. H., DORRESTEIN, P. C. Imaging mass spectrometry of natural products. *Nat. Prod. Rep.*, **26**, 1521, 2009.
 188. GRASSL, J., TAYLOR, N. L., MILLAR, A. Matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging and its development for plant protein imaging. *Plant Methods*, **7**, 21, 2011.
 189. AICHLER, M., WALCH, A. MALDI Imaging mass spectrometry: current frontiers and perspectives in pathology research and practice. *Lab. Invest.*, **95**(4), 422, 2015.
 190. WU, C., DILL, A. L., EBERLIN, L. S., COOKS, R. G., IFA, D. R. Mass spectrometry imaging under ambient conditions. *Mass Spectrom. Rev.*, **32**(3), 218-243, 2013.
 191. OSMAN, A. G., ELOKELY, K. M., YADAV, V. K., CARVALHO, P., RADWAN, M., SLADE, D., KLEIN, M. L. Bioactive products from singlet oxygen photooxygenation of cannabinoids. *Eur. J. Med. Chem.*, **143**, 983, 2018.
 192. CAPRIOLI R.M., FARMER T.B., GILE J., Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Anal. Chem.*, **69**(23), 4751, 1997.
 193. SPENGLER B., HUBERT M., KAUFMANN R., **MALDI ion imaging and biological ion imaging with a new scanning UV-laser microprobe**. Proceedings of the 42nd Annual Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics. 1994, Chicago, Illinois, 1041p.
 194. LOPES, A. A., PINA, E. S., SILVA, D. B., PEREIRA, A. M. S., DA SILVA, M. F. D. G., DA COSTA, F. B., PUPO, M. T. A biosynthetic pathway of sesquiterpene lactones in *Smallanthus sonchifolius* and their localization in leaf tissues by MALDI imaging. *Chem. Commun.*, **49**(85), 9989, 2013.

195. KASPAR, S., PEUKERT, M., SVATOS, A., MATROS, A., MOCK, H. P. MALDI-imaging mass spectrometry—an emerging technique in plant biology. *Proteomics*, **11**(9), 1840, 2011.
196. PATTI, G. J., YANES, O., SIUZDAK, G. Metabolomics: the apogee of the omics trilogy: Innovation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 263, 2012.
197. SHROFF, R., VERGARA, F., MUCK, A., SVATOŠ, A., GERSHENZON, J. Nonuniform distribution of glucosinolates in *Arabidopsis thaliana* leaves has important consequences for plant defense. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **105**, 6196, 2008.
198. VRKOSLAV, V., MUCK, A., CVAČKA, J., SVATOŠ, A. MALDI imaging of neutral cuticular lipids in insects and plants. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **21**, 220, 2010.
199. POTH, A. G., MYLNE, J. S., GRASSL, J., LYONS, R. E., MILLAR, A. H., COLGRAVE, M. L., CRAIK, D. J. Cyclotides associate with leaf vasculature and are the products of a novel precursor in petunia (Solanaceae). *J. Biol. Chem.*, **287**, 27033, 2012.
200. KORTE, A. R., YANDEAU-NELSON, M. D., NIKOLAU, B. J., LEE, Y. J. Subcellular-level resolution MALDI-MS imaging of maize leaf metabolites by MALDI-linear ion trap-Orbitrap mass spectrometer. *Anal. Bional. Chem.*, **407**, 2301, 2015.
201. BECK, S., STENGEL, J. Mass spectrometric imaging of flavonoid glycosides and biflavonoids in *Ginkgo biloba* L. *Phytochemistry*, **130**, 201, 2016.
202. SILVA, D. B., ASCHENBRENNER, A. K., LOPES, N., SPRING, O. Direct analyses of secondary metabolites by mass spectrometry imaging (MSI) from sunflower (*Helianthus annuus* L.) Trichomes. *Molecules*, **22**, 774, 2017.
203. SUGAHARA, K., KITAO, K., WATANABE, T., YAMAGAKI, T. Imaging mass spectrometry analysis of flavonoids in blue viola petals and their enclosure effects on violanin during color expression. *Anal. Chem.*, **91**, 896, 2018.
204. QIN, L., ZHANG, Y., LIU, Y., HE, H., HAN, M., LI, Y., WANG, X. Recent advances in matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging (MALDI-MSI) for in situ analysis of endogenous molecules in plants. *Phytochem. Anal.*, **29**(4), 351, 2018.
205. MAIA, M., FIGUEIREDO, A., CORDEIRO, C., SOUSA SILVA, M. (2021). FT-ICR-MS-based metabolomics: A deep dive into plant metabolism. *Mass Spectrom. Rev.*, **1**, 1, 2021.

CAPÍTULO II – ARTIGO CIENTÍFICO I

“LDI e MALDI-FT-ICR Imaging MS em folhas de *Cannabis*: estudo da distribuição espacial de canabinoides”

“*LDI and MALDI-FT-ICR imaging MS in Cannabis leaves: study of spatial distribution of cannabinoids*”

RESUMO

A técnica *matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry* (MALDI IMS) é considerada uma ferramenta analítica capaz de determinar a identidade química e a distribuição de centenas de moléculas em uma única análise que resulta em dados de localização espacial dos analitos na amostra a partir da determinação de seus valores de m/z com a conservação da sua histologia natural. No entanto, há ausência de trabalhos que utilizam MALDI IMS no estudo da distribuição de canabinoides pela extensão da folha de *Cannabis*. Diante dessa premissa, esta pesquisa utilizou as técnicas de LDI(-)/MALDI(-)MS e IMS para detecção e estudo da distribuição espacial de compostos canabinoides em folhas de *Cannabis* frescas (2018) e envelhecidas (2015), e avaliou a eficiência de três reagentes matriciais: α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA), 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) e 2-mercaptobenzothiazole (MBT) em função de suas concentrações que variaram de 0,1 a 25 mg mL⁻¹. Os resultados de MALDI(-) MS e IMS obtidos mostraram maior eficiência de ionização dos canabinoides com a utilização de baixas concentrações (0,1 e 0,5 mg mL⁻¹) das matrizes. Além disso, dentre as matrizes estudadas, destacou-se a MBT, na concentração de 0,1 mg mL⁻¹, que resultou em maiores valores de *total ion current* (TIC) e excelente exatidão de massas quando comparado aos demais reagentes matriciais estudados, bem como ao LDI(-). Ainda, com intuito de remover possíveis compostos apolares da superfície da folha de *Cannabis*, uma folha da mesma planta e mesmo caule, foi mergulhada no solvente hexano e submetida à análise de MALDI IMS com a adição da matriz MBT (0,1 mg mL⁻¹), entretanto, não houve eficiência significativa na detecção dos canabinoides. Portanto, o desenvolvimento deste estudo apresenta, além da aplicabilidade do imageamento químico por MALDI IMS em folha de *Cannabis*, a concentração e matriz mais eficientes no processo de ionização e o monitoramento da distribuição espacial dos canabinoides na superfície foliar.

Palavras-chave: Folhas de *Cannabis*, canabinoides, espectrometria de massas, imageamento químico, distribuição espacial.

1. INTRODUÇÃO

Em metabolômica, a maioria das análises de espectrometria de massas (*Mass Spectrometry* - MS), são realizadas em combinação com técnicas de separação tradicionais, tais como a cromatografia gasosa e líquida (*Gas Chromatography* - GC e *Liquid Chromatography* - LC). As análises de tecidos vegetais a partir dessas metodologias tradicionais de MS necessitam de preparo prévio, como por exemplo extrações, permitindo a identificação do composto na amostra, porém, toda informação sobre a sua distribuição espacial e histológica é perdida no procedimento experimental.¹

Atualmente, é possível analisar diferentes compostos por MS devido ao desenvolvimento de novas fontes de ionização,² como por exemplo a ionização por dessorção a laser (*laser desorption ionization* - LDI), que utiliza *lasers* com energia na região do ultravioleta (UV) ou *Infrared* (IR) para a direta dessorção e ionização de compostos de uma superfície analisada.¹ Esta técnica necessita de uma preparação mínima da amostra, diminuindo a perturbação e preservando a sua integridade.³

Neste contexto, *matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI), que difere do LDI devido ao uso de uma matriz previamente adicionada ao tecido em estudo, é considerada uma técnica de ionização “branda”, pois os íons são formados a pressão reduzida ($\sim 10^{-6}$ mbar), como consequência, pouca ou nenhuma fragmentação é formada, permitindo a detecção de moléculas não voláteis e lábeis.^{1,4,5}

Especificamente para uso da fonte de ionização MALDI, a matriz adicionada sobre a amostra é cristalizada e após a evaporação do solvente resulta na formação de uma camada de pequenos cristais, que podem variar de tamanho, na superfície do tecido.⁴ Esta matriz adicionada à amostra absorve luz a um determinado comprimento de onda do *laser* e permite que o analito seja dessorvido e ionizado, inclusive sem excessiva fragmentação, portanto geralmente a adição da matriz melhora a sensibilidade da técnica quando comparada com a que utiliza a fonte LDI, protegendo o analito da incidência direta do *laser* e auxiliando no processo de dessorção/ionização.¹

A ionização por MALDI MS pode ocorrer, dentre outras maneiras, através de reações do tipo ácido-base (protonação e desprotonação) entre a matriz e o analito.⁶ Além disso, em dependência das características do analito, há diferentes matrizes, de composição química específica, que podem ser utilizadas. Portanto, a escolha da

matriz, bem como sua adequada concentração são fatores determinantes para a eficiência nos experimentos por MALDI.⁷

Ainda, a simplicidade na preparação da amostra é considerada uma vantagem da técnica de MALDI MS frente a outras técnicas de ionização, como por exemplo a fonte *electrospray ionization* (ESI), devido a sua maior resistência a contaminantes externos, isto é, efeitos de matriz ou problemas relacionados a supressão iônica, que permite assim, análises diretas das amostras de produtos naturais.⁸⁻¹⁰

Particularmente nos últimos anos a combinação das técnicas MALDI e *imaging mass spectrometry* (MALDI IMS) tem sido considerada uma técnica analítica capaz de determinar a identidade e a distribuição espacial de diversas moléculas em tecido animal ou vegetal em um único ensaio. Este método é adequado para o estudo de diferentes classes e moléculas como lipídios, proteínas, peptídeos, drogas e seus metabólitos, diretamente da superfície dos tecidos.^{11,12,13,14}

Durante as análises de MALDI MS os dados adquiridos são registrados como um gráfico, com m/z no eixo x e intensidade relativos dos íons no eixo y. Em MALDI IMS além do armazenamento dos dados adquiridos, a distribuição dos íons pode ser visualizada pela criação de imagens químicas em que a escala de cores representa a intensidade normalizada de cada íon específico. Assim, cada *pixel* da imagem da área analisada pode ser associado ao seu espectro de massas original, adquirido em uma determinada posição.¹⁵

Logo, MALDI IMS correlaciona a informação molecular com a histologia tradicional do tecido analisado, proporcionando identificar a localização espacial dos analitos em função dos seus valores de m/z , resultando assim em uma nova dimensão de dados moleculares.^{1,14,16-24} Ainda, MS é considerada uma das técnicas analíticas mais utilizadas para a aquisição de imagens químicas, devido, entre outros fatores, a *sensibilidade* (técnica capaz de detectar quantidades extremamente baixas de metabólitos) e a seletividade da técnica (distinção de analitos semelhantes ou interferentes), além dos recursos de identificação como informações de massa exata.¹ Ainda, ao contrário das técnicas de imagem óptica tradicionais, IMS possui informação química que é uma parte inerente das imagens construídas.

Em geral, a obtenção de imagens com a técnica IMS, especialmente no estudo de tecidos vegetais, ainda se mantém longe da rotina de laboratórios, fazendo-se necessário adaptar protocolos e principalmente desenvolver métodos adequadas para

as diferentes plantas.^{1,24} Além disso, considera-se também a complexidade do tipo amostral, visto que as plantas estão entre as matrizes mais complexas da natureza.¹⁵ Portanto, os tecidos vegetais sustentam muitos desafios para compreensão dos seus processos biológicos, cujo perfil metabólico ainda é capaz de mudar drasticamente durante o seu desenvolvimento.^{1,15,25,26}

Particularmente em relação à planta *Cannabis sativa* L.,²⁷⁻²⁹ cujas evidências arqueológicas indicam cultivo na Ásia Central há milhares de anos,³⁰ a sua prodigalidade fitoquímica é comprovada pela presença de vários constituintes naturais, que se organizam em diferentes classes químicas, como: flavonoides, esteroides, fenantrenos, nitrogenados, ácidos graxos, canabinoides (mais de 100 identificados) entre outros.³⁰⁻³² Portanto, esta planta é considerada uma matriz de estudo muito complexa devido não apenas ao seu grande número de constituintes, como também as possíveis interações entre eles.³³ Assim, tanto no estudo *Cannabis* como para outras plantas, um considerável número de pequenas moléculas altamente diversa representa um grande desafio para a metabolômica, especialmente nas análises das distribuições espaciais dos metabólitos.^{1,25,26}

Em 2014, Kuwayama e colaboradores desenvolveram um procedimento usando MALDI IMS para otimizar a seleção e identificação de *Cannabis* de forma eficiente em misturas de ervas produzidas para evitar a regulamentação do seu país (Japão). Para isso, após análise das misturas por MALDI IMS, a partir da seleção do sinal de m/z 315, para Δ^9 -THC/canabinodiol (CBD) e m/z 311 para CBN, a distribuição dos canabinoides na amostra foi visualizada, e as peças com canabinoides foram coletadas seletivamente. Em seguida, os procedimentos comuns de exames morfológicos mostraram que a maioria das peças selecionadas apresentavam tricomas, característicos da *Cannabis*, o que resultou na economia de tempo e trabalho na pesquisa destes nas misturas herbais.²⁰

Outros trabalhos foram desenvolvimentos envolvendo principalmente metabólitos de drogas de abuso, inclusive da *Cannabis*, usando MALDI IMS,³⁴⁻³⁶ no entanto, nenhum estudo até o ano 2018 fez referência a distribuição espacial de canabinoides pela extensão das folhas inteiras de *Cannabis* por MALDI IMS. Portanto, o presente trabalho desenvolveu um método de análise utilizando as técnicas de LDI e MALDI(-) MS e IMS na identificação e distribuição espacial dos compostos canabinoides presentes nas folhas frescas (2018) e envelhecidas (2015) de *Cannabis*,

onde a eficiência de três reagentes matriciais (*α -cyano-4-hydroxycinnamic acid* (CHCA), *2,5-dihydroxybenzoic acid* (DHB) e *2-mercaptobenzothiazole* (MBT)), em nove diferentes concentrações (0,1; 0,5; 1,5; 3; 5; 10; 15; 20 e 25 mg mL⁻¹) foram avaliados no processo de ionização dos compostos de interesse.

2. METODOLOGIA

2.1 Amostras e Reagentes

Folhas de *Cannabis* frescas, apreendidas pela Polícia Civil do Espírito Santo (PC-ES) e analisadas até três meses após sua apreensão em 2018, e envelhecidas, apreendidas em 2015 pela Polícia Federal do Rio Grande do Sul (PF-RS) foram fornecidas ao laboratório de Petroleômica e Forense para desenvolvimento da pesquisa. Estas folhas foram previamente selecionadas e inicialmente cortadas, na dimensão de 0,2 × 0,1 cm, posteriormente analisadas com e sem aplicação da solução dos reagentes matriciais: CHCA, DHB e MBT, adquiridos pela *Sigma-Aldrich Chemicals*, USA. Folhas inteiras de *Cannabis* fresca também foram analisadas após desenvolvimento da metodologia.

2.1.1 Preparação das amostras e matrizes MALDI

Em etapa anterior a adição dos reagentes matriciais nas amostras de folhas de *Cannabis*, estas matrizes: DHB, CHCA e MBT foram solubilizadas em metanol (matrizes: DHB e CHCA) e acetona (matriz: MBT), solventes com grau de pureza analítica superior a 99,5% (Vetec® Química Fina Ltda, Brasil), e preparadas em nove concentrações diferentes: 0,1; 0,5; 1,5; 3,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 e 25,0 mg mL⁻¹.

Além disso, o solvente hexano, grau de pureza analítica superior a 99,5%, Vetec® Química Fina Ltda, Brasil, foi utilizado em uma etapa particular de extração da folha de *Cannabis* para avaliar uma possível diminuição do efeito de supressão iônica nas análises de MALDI(-) *imaging* MS.

2.2 LDI(-) e MALDI(-) MS e *Imaging*

O espectrômetro de massas utilizado foi o *Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry* (FT-ICR MS), modelo 9.4 T Solarix, Bruker Daltonics, Bremen, Germany, equipado com um laser *smartbeam* II (355 nm), e com as fontes

LDI/MALDI. Todos os espectros foram calibrados externamente usando uma solução de arginina (m/z 200-1500).

As análises MALDI MS foram realizadas com intuito de avaliar o efeito das matrizes e suas diferentes concentrações na ionização dos canabinoides presentes nas folhas frescas e envelhecidas de *Cannabis*. Para isso, vários pedaços de uma mesma folha, na dimensão $\sim 0,2 \times 0,1$ cm, foram fixados a uma placa de aço inoxidável, com auxílio de fita dupla face. Posteriormente, foram individualmente adicionados os reagentes matriciais, nas nove diferentes concentrações, com auxílio do capilar nebulizador da fonte ESI, com fluxo contínuo e tempo controlado de $30 \mu\text{L min}^{-1}$ por 30 segundos. Além disso, as adições das matrizes foram realizadas em triplicata para cada folha, com intervalo de secagem de 1 minuto entre as etapas. Por fim, após a evaporação do solvente, cristalização da matriz e total secagem das folhas, a placa foi digitalizada e inserida no FT-ICR MS para análise.

Os espectros de massas foram adquiridos no modo de ionização negativo, na faixa de massa entre m/z 200 e 1500, e os demais parâmetros experimentais foram: frequência do *laser*: 200 Hz, *plate offset*: -100,0 V, *deflector plate*: -210.0 V, *laser shots*: 100, foco do *laser*: *small*, *scans*: 16, e modo do *laser*: *enable random walk*. A intensidade do *laser* foi modificada de acordo com a energia necessária para a ionização dos sinais em cada amostra (15-50% – folhas envelhecidas de *Cannabis* e 15-60% – folhas frescas de *Cannabis*).

Nas análises de MS, a precisão de massa foi determinada a partir do erro de massa ($\text{erro} = ((M_{\text{medido}} - M_{\text{teórico}}) / M_{\text{teórico}}) \times 10^6$), e o valor de *double bond equivalent* (DBE)³⁷ calculado com a equação (1):

$$\text{DBE} = [\text{IV}] - [\text{I}/2] + [\text{III}/2] + 1 \quad (1)$$

Onde, **I** representa átomos monovalentes, como o hidrogênio, cloro, bromo e iodo; **III** átomos trivalentes, por exemplo nitrogênio e fósforo; e **IV** representa os átomos tetravalentes, como o carbono, na fórmula molecular.

Para a etapa de imageamento por LDI(-) e MALDI(-), utilizou-se o mesmo *laser smartbeam II*, com acumulação de 1 *scan* com 100 *laser shots* por *pixel* para cada espectro de FT-ICR, com resolução espacial de 200 μm e intensidade média do laser de 40% para a ionização de cada amostra. Todos os dados espectrais e de imagens foram processados com os softwares *DataAnalysis* e *FlexImaging 3.0* (Bruker), respectivamente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 LDI(-) e MALDI(-) MS

Inicialmente, o processo de ionização da técnica MALDI(-)FT-ICR MS foi otimizado usando pequenos pedaços (dimensão $\sim 0,2 \times 0,1$ cm cada) de folhas de frescas (2018) e envelhecidas (2015) de *Cannabis*, e avaliada a eficiência dos três reagentes matriciais: DHB, CHCA e MBT, nas concentrações de 0,1 a 25 mg mL⁻¹.

Os resultados das análises, elencados na **Tabela 1**, mostram maior eficiência de ionização dos canabinoides CBN, Δ^9 -THC, CBNA e Δ^9 -THCA quando se utilizou as matrizes DHB e MBT, principalmente nas concentrações $\leq 0,5$ mg mL⁻¹. Observa-se ainda, que as análises de MALDI(-) MS usando a matriz CHCA apresentou ineficiência na ionização dos analitos monitorados, principalmente nas análises das folhas frescas de *Cannabis*.

Tabela 1. Detecção dos canabinoides CBN, Δ^9 -THC, CBNA e Δ^9 -THCA em função da concentração (0.1-25 mg mL⁻¹) das matrizes MBT, DHB e CHCA, usando a técnica de MALDI(-) MS.

MALDI(-)FT-ICR MS																					
Folha fresca de <i>Cannabis</i>										Folha envelhecida de <i>Cannabis</i>											
mg mL ⁻¹										mg mL ⁻¹											
		0,1	0,5	1,5	3	5	10	15	20	25			0,1	0,5	1,5	3	5	10	15	20	25
MBT	CBN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MBT	CBN	X	X	-	-	X	-	-	-	-
	Δ ⁹ -THC	X	-	-	-	X	-	-	-	-		Δ ⁹ -THC	X	X	-	-	X	-	-	-	-
	CBNA	X	X	-	-	X	X	X	X	X		CBNA	X	X	-	-	X	-	-	-	X
	Δ ⁹ -THCA	X	X	-	-	X	X	X	X	X		Δ ⁹ -THCA	X	X	-	-	-	-	-	-	X
DHB	CBN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DHB	CBN	X	X	-	-	-	-	-	-	-
	Δ ⁹ -THC	-	-	-	-	-	-	-	-	-		Δ ⁹ -THC	X	X	-	-	-	-	-	-	-
	CBNA	-	-	-	-	-	-	-	-	-		CBNA	X	X	-	-	-	-	-	-	-
	Δ ⁹ -THCA	X	X	-	-	X	X	X	-	X		Δ ⁹ -THCA	X	X	X	-	-	-	-	X	-
CHCA	CBN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CHCA	CBN	X	-	-	-	-	-	-	-	-
	Δ ⁹ -THC	-	-	-	-	-	-	-	-	-		Δ ⁹ -THC	X	-	-	-	-	-	-	-	-
	CBNA	-	-	-	-	-	X	-	-	-		CBNA	X	-	-	-	-	-	-	-	-
	Δ ⁹ -THCA	X	-	-	-	X	X	X	X	-		Δ ⁹ -THCA	X	-	-	-	X	-	-	X	-

X: detectado e - : não detectado

Em geral as matrizes MALDI são compostos orgânicos que desempenham papel como mediadores de energia para facilitar o processo de ionização das moléculas³⁸ que neste estudo são representadas pelos canabinoides. Além disso, também cooperam na formação de ânions através da desprotonação dos analitos, durante o processo de ionização por MALDI, devido à basicidade e afinidade de prótons (AP) das moléculas das matrizes.³⁹

Assim, a maior eficiência no auxílio do processo de ionização dos canabinoides, como agente desprotonante e receptor da incidência do *laser*, da matriz MBT, pode

ser relacionada ao seu maior valor de AP = 214 kcal/mol e $pK_a = \sim 7,0$, **figura 1a**, comparado aos demais, DHB (AP = 204 kcal/mol e $pK_a = \sim 3,0$) e CHCA (AP = 183 kcal/mol e $pK_a = \sim 1,2$), **figura 1b-c**. Pois, de acordo com a teoria de Brønsted-Lowry sobre o comportamento ácido-base, entre as matrizes (moléculas ácidas) avaliadas, a MBT (ácido mais fraco, $pK_a = \sim 7,0$) terá a base conjugada mais forte que agirá como agente desprotonante dos analitos (canabinoides).

Ainda, apesar da grande aplicabilidade do reagente matricial CHCA para diversas matrizes de estudo usando a técnica MALDI-MS,⁴⁰⁻⁴² este, devido ao seu grupo ácido na molécula, torna-se ideal para protonação de analitos, o que é preferível em análises no modo positivo de ionização.⁴³

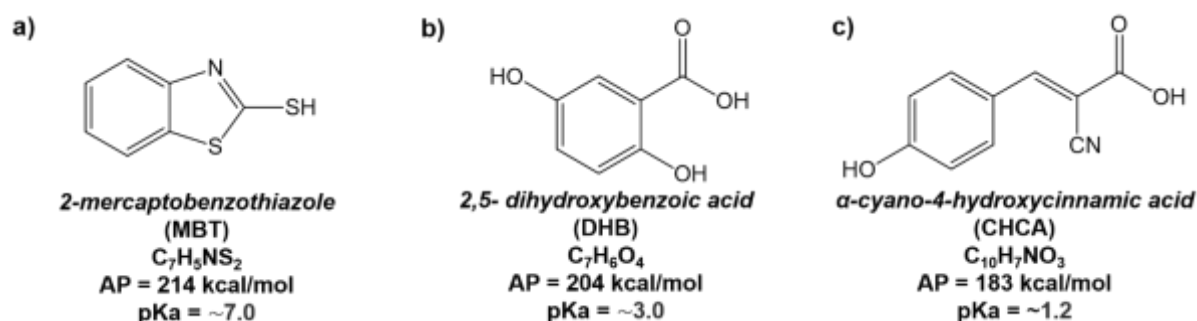


Figura 1. Matrizes MALDI: **a)** MBT; **b)** DHB; e **c)** CHCA. Fonte: Própria autora.

Nos espectros de LDI(-) MS, análise sem adição de matriz, **figura 2a,e**, é observada a elevada relação sinal/ruído, além do elevado TIC = $1,0 \times 10^7$ para a ânion da molécula de CBN ($[C_{21}H_{26}O_2-H]^-$, m/z 309,18689, DBE = 9), principalmente nas folhas de *Cannabis* envelhecidas, **figura 2e**, indicando que a incidência direta do laser pode potencializar a formação de CBN, a partir de um processo de degradação do Δ^9 -THC ou a partir do seu precursor o Δ^9 -THCA, bem como do CBNA. Assim, esse resultado evidencia a necessidade da utilização de uma matriz que absorva parte da energia do *laser*, melhorando assim, o processo de dessorção e ionização dos analitos, sem afetar a composição inicial da amostra.³

Nos espectros de folhas de *Cannabis* fresca, **figura 2b-d**, e envelhecida, **figura 2f-h**, por MALDI(-) MS das três matrizes: MBT (**figura 2b,f**), CHCA (**figura 2c,g**) e DHB (**figura 2d,h**), na menor concentração = 0.1 mg mL^{-1} , é possível observar que com o uso do reagente matricial MBT, o íon do Δ^9 -THCA ($[C_{22}H_{30}O_4-H]^-$, m/z 357,20726, DBE = 8) é detectado como espécie mais abundante ($TIC_{\Delta^9\text{-THCA}} = 2,6 \times 10^7$, **figura 2b**). Semelhantemente, a eficiência de ionização com esta matriz é observada

nas análises das folhas de *Cannabis* envelhecidas, **figura 2f**, que proporcionou a detecção dos canabinoides CBN (m/z 309,18878, DBE= 9), Δ^9 -THC ($[C_{21}H_{30}O_2-H]^-$, m/z 313,22005, DBE= 7), CBNA ($[C_{22}H_{26}O_4-H]^-$, m/z 353,17952, DBE = 10) e Δ^9 -THCA (m/z 357,21085, DBE = 8), com valores de $TIC_{CBN} = 3,6 \times 10^6$; e $TIC_{\Delta^9-THC} = 1,2 \times 10^6$, $TIC_{CBNA} = 8,3 \times 10^6$ e $TIC_{\Delta^9-THCA} = 2,5 \times 10^7$, respectivamente.

Os espectros de MALDI(-) MS com a matriz DHB também apresentaram resultados satisfatórios, principalmente para as análises de folhas envelhecidas, **figura 2h**, na detecção dos quatro canabinoides monitorados: Δ^9 -THCA (m/z 357,20906, DBE = 8), CBNA ($[C_{22}H_{26}O_4-H]^-$, m/z 353,17771, DBE = 10), CBN (m/z 309,18740, DBE= 9), Δ^9 -THC ($[C_{21}H_{30}O_2-H]^-$, m/z 313,21864, DBE= 7), e $TIC_{\Delta^9-THCA} = 1,1 \times 10^7$; $TIC_{CBNA} = 9,0 \times 10^6$; $TIC_{CBN} = 4,1 \times 10^6$; e $TIC_{\Delta^9-THC} = 1,3 \times 10^6$, com desempenho similar ao observado com a matriz MBT.

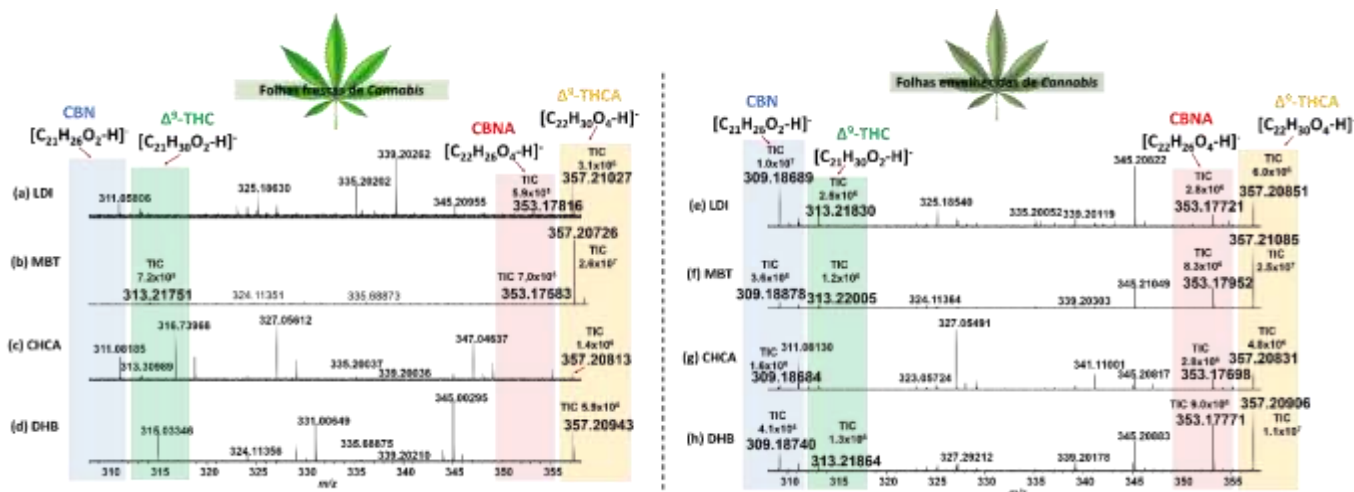


Figura 2. (a,e) LDI(-) MS, (b-d) MALDI(-) MS de folhas de *Cannabis* frescas e (f-h) folhas envelhecidas em função de diferentes matrizes: (b,f) MBT, (c,g) CHCA, (d,h) DHB, na concentração de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$. Fonte: Própria autora.

Por outro lado, a utilização do reagente matricial CHCA, apresentou espectros MALDI(-)MS, **figuras 2c,g**, com menor eficiência de ionização entre os avaliados, com valores de $TIC_{CBN} = 1,6 \times 10^6$; e $TIC_{\Delta^9-THC} = 1,2 \times 10^6$, $TIC_{CBNA} = 2,8 \times 10^6$ e $TIC_{\Delta^9-THCA} = 4,8 \times 10^6$ para as folhas envelhecidas, **figura 2g**, e detecção unicamente do Δ^9 -THCA, m/z 357,20813, DBE = 8 e $TIC_{\Delta^9-THCA} = 1,4 \times 10^6$ para a folha fresca, **figura 2c**. Tal resposta, pode ser relacionada principalmente a presença de sinais interferentes na região de massa baixa resultantes da utilização do reagente matricial CHCA, evidenciado, por exemplo, pela abundância majoritária do íon de m/z 327, o qual pode causar supressão iônica das moléculas dos canabinoides. Todos os quatro

canabinoides detectados utilizando este e os demais reagentes matriciais estão elencados na **tabela 2**, que informa detalhadamente suas fórmulas moleculares, DBE, m/z experimental, DBE e TIC.

Tabela 2. Informações de fórmula, DBE, m/z medido e TIC da análise de folhas novas (2018) e envelhecidas (2015) de *Cannabis*. Fonte: Própria autora.

	Canabinoides	Fórmula molecular	DBE	m/z medido Folha Nova (2018)	m/z medido Folha Envelhecida (2015)	TIC Folha (2018)	TIC Folha (2015)
MBT	Δ^9 -THCA	$[C_{22}H_{30}O_4-H]^-$	8	357.20726	357.21085	$2,6 \times 10^7$	$2,4 \times 10^7$
	CBNA	$[C_{22}H_{26}O_4-H]^-$	10	353.17583	353.17952	$7,0 \times 10^5$	$8,3 \times 10^6$
	Δ^9 -THC	$[C_{21}H_{30}O_2-H]^-$	7	313.21751	313.22005	$7,2 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6$
	CBN	$[C_{21}H_{26}O_2-H]^-$	9	-	309.18878	-	$3,6 \times 10^6$
CHCA	Δ^9 -THCA	$[C_{22}H_{30}O_4-H]^-$	8	357.20813	357.20831	$1,4 \times 10^6$	$4,8 \times 10^6$
	CBNA	$[C_{22}H_{26}O_4-H]^-$	10	-	353.17698		$2,8 \times 10^6$
	Δ^9 -THC	$[C_{21}H_{30}O_2-H]^-$	7	-	313.21825		$1,2 \times 10^6$
	CBN	$[C_{21}H_{26}O_2-H]^-$	9	-	309.18684		$1,6 \times 10^6$
DHB	Δ^9 -THCA	$[C_{22}H_{30}O_4-H]^-$	8	357.20943	357.20906	$5,9 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$
	CBNA	$[C_{22}H_{26}O_4-H]^-$	10	-	353.17771	-	$9,0 \times 10^6$
	Δ^9 -THC	$[C_{21}H_{30}O_2-H]^-$	7	-	313.21864	-	$1,3 \times 10^6$
	CBN	$[C_{21}H_{26}O_2-H]^-$	9	-	309.18740	-	$4,1 \times 10^6$

- não detectado

Ainda, uma melhor compreensão do desempenho da matriz MBT em baixas concentrações, $\leq 0.5 \text{ mg mL}^{-1}$, pode ser alcançada a partir da **figura 3a-k**, que mostra uma expansão dos espectros de MALDI(-)FT-ICR MS de folhas frescas de *Cannabis* na região de m/z 352 a 358. A **figura 3a-i** refere-se aos resultados de MALDI(-) MS usando o reagente matricial MBT em nove concentrações variando de 25,0 a 0,1 mg mL^{-1} (ordem decrescente), e as **figuras 3j** e **3k** mostram os resultados de LDI(-)MS da mesma folha de *Cannabis* e o espectro apenas da solução da matriz, respectivamente. Essa faixa de expansão espectral (m/z 352 a 358) foi escolhida devido à abundância dos canabinoides ácidos em folhas de *Cannabis* fresca nessa região do espectro, destacando os canabinoides ácidos que foram detectados na forma de íons: CBNA ($[C_{22}H_{26}O_4-H]^-$, m/z 353,17) e Δ^9 -THCA ($[C_{22}H_{30}O_4-H]^-$, m/z 357,20).

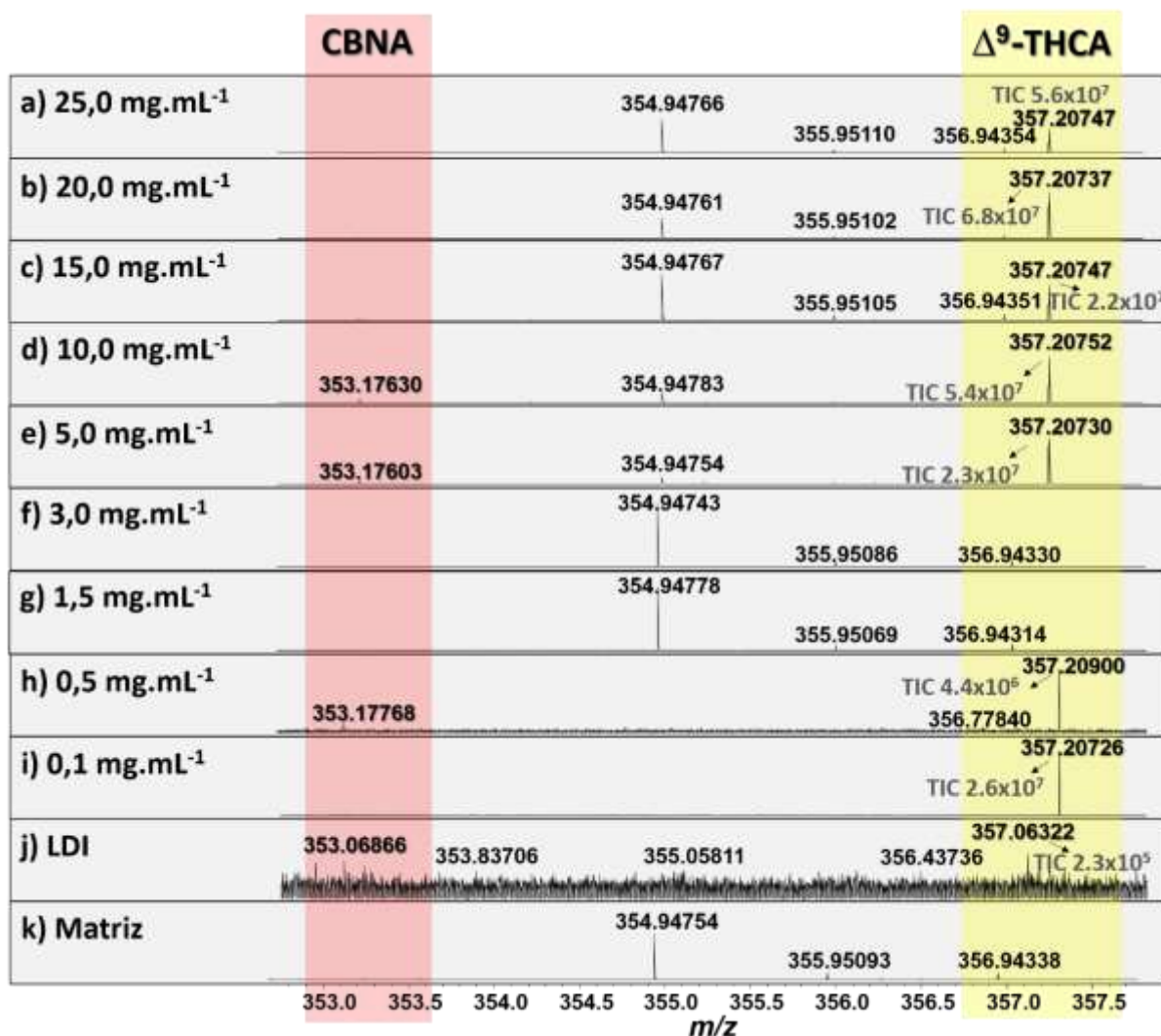


Figura 3. MALDI(-)MS (a-i) de folhas frescas de *Cannabis* usando a matriz MBT nas concentrações de 0,1 a 25,0 mg mL⁻¹. Espectros de massas da folha de *Cannabis* sem matriz (LDI(-) MS) e apenas da solução matriz são mostrados nas figuras (j) e (k), respectivamente.

A concentração da matriz também é um fator importante a ser considerado devido a variedade e até desconhecimento das concentrações reais dos analitos na amostra, pois a alta concentração da matriz pode resultar no efeito de supressão de íons do analito (como visto na **figura 2c,g**, com a matriz CHCA) e resultar na detecção de sinais relacionados a composição da matriz, principalmente na análise de moléculas com baixo peso molecular.⁴⁴

Como pode ser observado na **figura 3 a-k**, com o aumento da concentração da matriz, > 0,5 mg mL⁻¹, um aumento na abundância do sinal de m/z 354,94, interferente presente na composição química do espectro da solução da matriz, **figura 3k**, é também observado nas folhas analisadas contendo de 1,5 a 25,0 mg mL⁻¹ do reagente matricial MBT, **figura 3a-g**. Diferentemente, nos espectros com baixas concentrações

de MBT, 0,1 e 0,5 mg mL⁻¹, este sinal é suprimido, e a eficiência de ionização do Δ^9 -THCA, por exemplo, se mantém, apresentando TIC = $2,6 \times 10^7$ quando usada a concentração de 0,1 mg mL⁻¹ e TIC = $4,4 \times 10^6$ com a concentração de matriz = 0,5 mg mL⁻¹

Além disso, o espectro da folha de *Cannabis* adquirido com a menor concentração do reagente matricial (0,1 mg mL⁻¹), proporcionou maior exatidão, erro = 0,36 ppm, em comparação aos demais espectros com as diferentes concentrações da matriz MBT: 0,5 mg mL⁻¹, erro = 5,23 ppm; 5,0 mg mL⁻¹, erro = 0,47 ppm; 10,0 mg mL⁻¹, erro = 1,09 ppm; 15,0 mg mL⁻¹, erro = 0,95 ppm; 20,0 mg mL⁻¹, erro = 0,67 ppm; 25,0 mg mL⁻¹, erro = 0,95 ppm.

Por fim, outra característica importante da matriz que é considerada determinante para se obter uma boa resolução espacial na geração de espectros de IMS é a formação e o tamanho dos seus cristais.⁴⁵ Neste caso, o reagente matricial MBT novamente se destaca pois segundo a literatura, esta matriz forma cristais pequenos e uniformes quando comparado com outras matrizes convencionais.⁴⁵

3.2 LDI(-) e MALDI(-) IMS

Nos experimentos de *imaging* deste trabalho, foi utilizada a fonte de ionização LDI/MALDI acoplada ao FT-ICR MS. Em geral, nas análises de imagem, após o preparo da amostra com (MALDI) ou sem (LDI) adição de uma solução de matriz em sua superfície, esta receberá a incidência do *laser* nos pontos ou *pixels*, e um espectro de massa completo que consiste em sinais das espécies desorvidas e ionizadas daquela região será armazenado junto a sua coordenada. Sequencialmente, a imagem é construída a partir do monitoramento dos sinais selecionados, que demonstraram através da intensidade da cor atribuída, a sua abundância ou ausência em cada *pixel* de toda superfície da imagem.⁴⁶

Neste trabalho, inicialmente, para desenvolvimento do método de imageamento químico, os experimentos foram realizados com pedaços de folhas envelhecidas da planta *Cannabis*, na dimensão 0.5 x 0.5 cm, cada. As imagens geradas com as fontes LDI(-) IMS (**figura 4a**) e MALDI(-) IMS (**figura 4b-d**), esta última com a adição de 0.1 mg mL⁻¹ das matrizes MBT, DHB, CHCA, mostram a distribuição espacial dos quatro ânions das moléculas canabinoides monitoradas a partir das intensidades das cores específicas atribuídas: azul para o CBN, verde para o Δ^9 -THC, vermelho para o CBNA

e amarelo para o Δ^9 -THCA, **figura 4a-d**. Essas imagens químicas foram construídas a partir das intensidades absolutas oriundas dos espectros médios, gerados a partir de cada espectro armazenado por *pixel*, e mostra a localização dos canabinoides pela extensão da área da folha analisada.

Na **figura 4a**, as imagens obtidas por LDI(-) *imaging* mostram que na folha de *Cannabis* envelhecida, todos os quatro canabinoides (CBN, *m/z* 309; Δ^9 -THC, *m/z* 313; CBNA, *m/z* 353; e Δ^9 -THCA, *m/z* 357) foram detectados, e os íons mais abundantes foram o CBN (*m/z* 309) e o Δ^9 -THC (*m/z* 313). Esse resultado sugere uma ação energética do *laser* na formação dessas espécies a partir dos seus precursores canabinoides ácidos, Δ^9 -THCA e CBNA, via reações de descarboxilação, perda de CO₂.⁴⁸⁻⁵⁰ Diferentemente, a técnica de MALDI(-) *imaging* com adição da matriz MBT, **figura 4b**, mostra uma distribuição espacial mais homogênea e com pequenos pontos de maior abundância de todos os quatro canabinoides estudados (CBN, Δ^9 -THC, CBNA e Δ^9 -THCA), enquanto o desempenho do reagente matricial CHCA resultou na ionização e detecção apenas do canabinoides CBN e Δ^9 -THC, **figura 4c**, e com detecção do Δ^9 -THCA como canabinoide mais abundante em relação aos demais, CBN, Δ^9 -THC e CBNA ao se utilizar a matriz DHB, **figura 4d**.

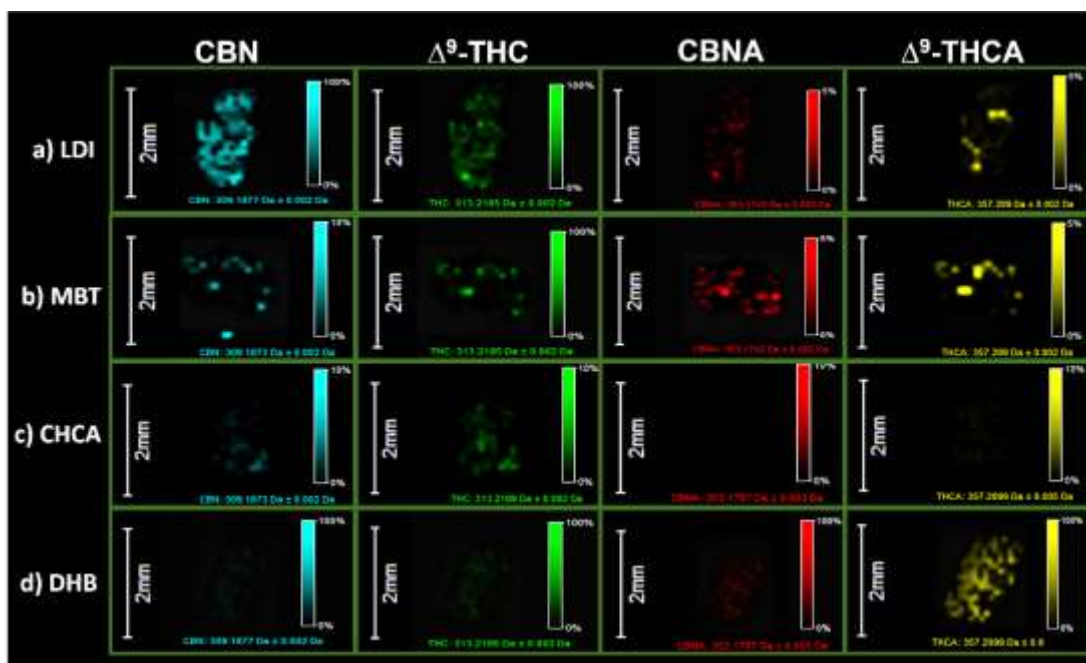


Figura 4. *Imaging* MS a) LDI(-); e MALDI(-) de folhas envelhecidas (2015) de *Cannabis* com diferentes matrizes na concentração 0.1 mg mL⁻¹: b) MBT; c) CHCA; d) DHB. As imagens mostram a distribuição dos canabinoides: CBN, *m/z* 309 (azul), Δ^9 -THC, *m/z* 313 (verde), CBNA, *m/z* 353 (vermelho) e Δ^9 -THCA, *m/z* 357 (amarelo). Fonte: Própria autora.

O mesmo experimento de imagem por LDI/MALDI(-) foi realizado para folhas de *Cannabis* frescas (2018), e na **figura 5a-d** é possível observar uma reduzida detecção dos quatro canabinoides monitorados, comparado às análises de *imaging* de folhas envelhecidas, especialmente do canabinoide CBN, corroborando com a literatura que o define como um produto de degradação natural da planta, principalmente a partir do canabinoide Δ^9 -THC.^{48,49,51,52}

Nas imagens de LDI(-) *imaging* MS, **figura 5a**, uma maior abundância do canabinoide CBNA pode ser observada em relação ao canabinoide comumente mais abundante em folhas de *Cannabis* frescas; o Δ^9 -THCA, indicando, novamente, uma possível ação acentuada devido à luz do *laser* quando incidida diretamente na amostra, potencializando a conversão do Δ^9 -THCA em CBNA, forma totalmente aromatizadas do seu precursor (Δ^9 -THCA).⁴⁷

Por outro lado, as imagens obtidas por MALDI(-) *imaging* MS, usando a matriz MBT (concentração de 0,1 mg mL⁻¹) os canabinoides Δ^9 -THC, CBNA e Δ^9 -THCA, apesar da menor abundância, foram detectados com uma distribuição homogênea com pequenos pontos de maior abundância na superfície analisada, **figura 5b**, semelhantemente as análises das folhas envelhecidas, **figura 4b**. No entanto, as matrizes CHCA, **figura 5c**, e DHB, **figura 5d**, apresentaram baixa eficiência na ionização e detecção dos canabinoides monitorados.

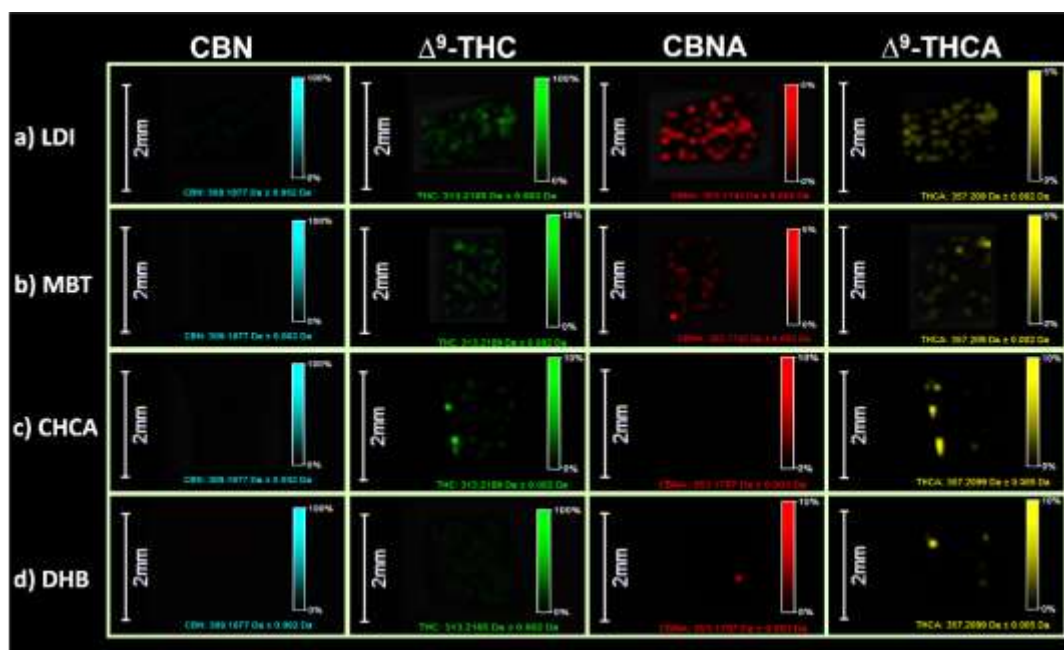


Figura 5. *Imaging* MS a) LDI(-); e MALDI(-) de folhas frescas (2018) de *Cannabis* com diferentes matrizes na concentração 0.1 mg mL⁻¹: b) MBT; c) CHCA; d) DHB. As imagens mostram a distribuição dos canabinoides: CBN, *m/z* 309 (azul), Δ^9 -THC, *m/z* 313 (verde), CBNA, *m/z* 353 (vermelho) e Δ^9 -THCA, *m/z* 357 (amarelo). Fonte: Própria autora.

Após desenvolvimento do método, foi dado prosseguimento às análises de imagem da folha fresca (2018) inteira de *Cannabis* (7,0 × 2,0 cm) por MALDI(-)FT-ICR IMS, com o reagente matricial MBT na concentração de 0,1 mg mL⁻¹, e na **figura 6a-d** é mostrada imagem detalhada com a distribuição de canabinoides (Δ^9 -THC (m/z 313, cor verde), CBNA (m/z 353, cor vermelha) e Δ^9 -THCA (m/z 357, cor amarela) pela extensão do tecido vegetal. É importante salientar que cada imagem gerada na **figura 6a-d** é resultado de apenas uma análise de toda extensão do mesmo tecido vegetal, as diferentes respostas (imagens) são geradas da seleção de um ou mais sinais (*colocalization*) de massa com m/z específico.

Na **figura 6a** é possível observar a detecção do íon do canabinoide CBNA com maior intensidade em algumas áreas, como na região central e interna (próxima ao caule) da folha, além de ser observada na extremidade externa da folha, sugerindo uma possível região de conversão do Δ^9 -THCA em CBNA,^{50,53} iniciada de fora para dentro na posição adaxial da folha. Essa provável degradação pode ser relacionada a diversos fatores, tais como: incidência do laser, armazenamento (mesmo que a curto tempo), entre outros.

Por outro lado, na **figura 6b** a imagem gerada a partir da seleção do m/z 357, referente a molécula ionizada do Δ^9 -THCA, o aponta como canabinoide mais abundante, inclusive em comparação ao íon de CBNA. Além disso, é possível notar pequenas áreas de maior abundância do sinal m/z 357 que são: região central e parte interna próximo ao caule. Ademais, a combinação destes dois sinais, m/z 353 e 357, **figura 6c**, aponta a prevalência desses sinais nas mesmas regiões das folhas.

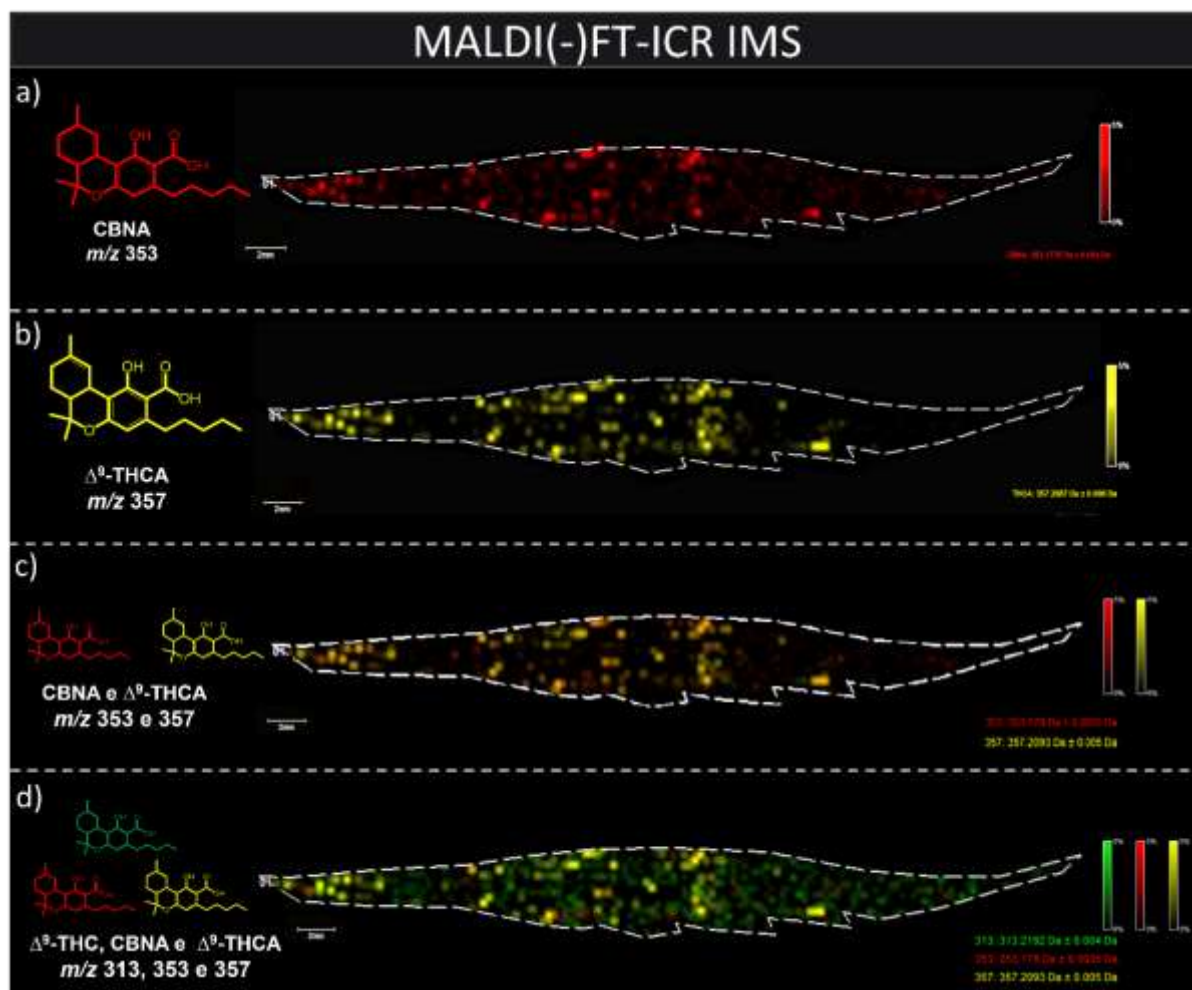


Figura 6. MALDI(-) *imaging* MS, com a matriz MBT na concentração de 0.1 mg mL^{-1} , mostrando a distribuição dos canabinoides: **a)** CBNA (m/z 353, vermelho); **b)** Δ^9 -THCA (m/z 357, amarelo); e *colocalizations*: **c)** CBNA e Δ^9 -THCA (m/z 353 e 357) e **d)** Δ^9 -THC, CBNA e Δ^9 -THCA (m/z 313, 353, 357, verde, vermelho e amarelo, respectivamente), na superfície da folha fresca de *Cannabis*. Fonte: Própria autora.

Ainda, a imagem química da distribuição do íon Δ^9 -THC (m/z 313, verde) sobre a superfície de uma folha inteira de *Cannabis*, juntamente com os canabinoides ácidos CBNA (m/z 353, vermelho) e Δ^9 -THCA (m/z 357, amarelo) também é mostrada na **figura 6d**. Nesta imagem é possível observar a distribuição homogênea de Δ^9 -THC por toda a extensão da folha, e pequenas áreas de maior abundância nas mesmas regiões que os demais canabinoides monitorados. No entanto, na extremidade externa da folha, é possível notar a detecção do Δ^9 -THC e ausência do Δ^9 -THCA, **figura 6b,d**, que aponta uma possível conversão do ácido ao seu respectivo canabinoide neutro, o Δ^9 -THC. Esta ação pode ser associada há diversos fatores, entre eles a própria anatômica da folha, cuja maior exposição natural à luz, e, portanto, absorção da radiação UV-B ocorre nas regiões mais externas ao caule.^{54,55}

Por fim, com intuito de retirar possíveis interferentes da superfície da folha *Cannabis*, como por exemplo compostos apolares, favorecendo assim o processo de ionização dos canabinoides, uma folha de *Cannabis* foi mergulhada em hexano por 5 min. Após essa extração, o solvente foi evaporado, e realizada adição da matriz MBT na concentração de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ (melhor concentração e matriz no desenvolvimento do método). Esta folha foi analisada por MALDI(-)IMS, **figura 7a-b**, e nenhuma melhora significativa na ionização de compostos ácidos terpenofenólicos após a extração da folha com solvente foi observada.

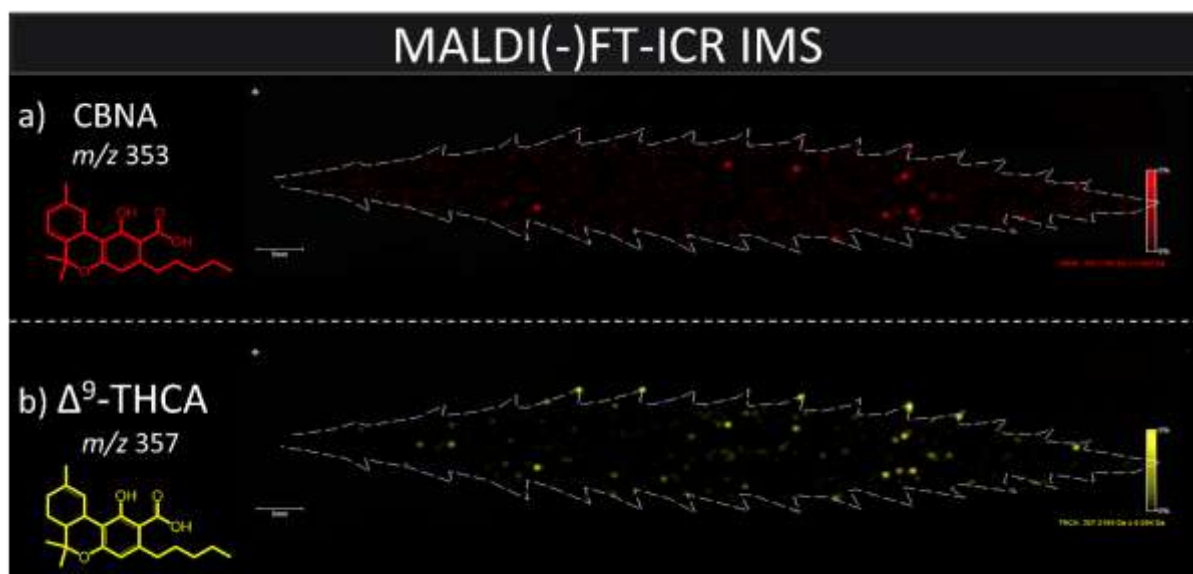


Figura 7. MALDI(-) *imaging* MS, com matriz MBT ($0,1 \text{ mg mL}^{-1}$), mostrando a distribuição de **a)** CBNA, m/z 353 e **b)** Δ^9 -THCA, m/z 357 em folhas frescas de *Cannabis* extraídas com solvente hexano. Fonte: Própria autora.

CONCLUSÕES

Este trabalho evidenciou a possibilidade de monitorar a distribuição espacial de canabinoides a partir da análise direta da folha de *Cannabis* por MALDI(-)FT-ICR MS. O reagente matricial MBT foi o mais eficiente no processo de dessorção e ionização dos canabinoides entre os três avaliados: CHCA, DHB e MBT. Além disso, entre as nove concentrações estudadas (0,1 a 25 mg mL⁻¹), as menores concentrações (0,1 e 0,5 mg mL⁻¹) resultaram em uma melhor detecção dos íons de interesse: *m/z* 309, 313, 353 e 357, referente as moléculas desprotonadas dos canabinoides: CBN, Δ^9 -THC, CBNA e Δ^9 -THCA, respectivamente. Na análise da folha inteira de *Cannabis*, usando a matriz MBT na concentração 0,1 mg mL⁻¹, foi possível monitorar a distribuição espacial dos canabinoides ácidos (CBNA e Δ^9 -THCA) que mostraram pequenas áreas de maior abundância nas regiões centrais e em direção ao caule, bem como o canabinoide Δ^9 -THC que apresentou maior homogeneidade na sua distribuição por toda a extensão da folha, com áreas de maior abundância nas mesmas regiões que os demais canabinoides monitorados, mostrando a preservação da histologia natural da planta. Por fim, a extração das folhas inteiras de *Cannabis* com solvente apolar (hexano) não forneceu uma melhora no desempenho do processo de ionização. Portanto, a comprovação inédita da aplicabilidade do imageamento químico por MALDI IMS na folha inteira de *Cannabis*, avaliando concentração e matriz mais eficientes no processo de ionização e por consequência proporcionando o monitoramento da distribuição espacial dos canabinoides na superfície foliar, colabora com a evolução e o estado da arte da área de canabinômica, bem como abre caminhos para novos estudos que buscam explicações sobre a histologia desta planta.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, e projetos: CAPES (23038.007083/2014-40), CNPq/FAPES Nº 23/2018 - Programa de Apoio a Núcleos Emergentes – PRONEM – Outorga 597/2018), e CNPq (305359/2017-7 e 422555/2018-5). Agradecemos ao INCT Ciências Forenses pela bolsa, ao Núcleo de Competências em Química do Petróleo - NCQP e LabPetro pelo uso de suas instalações, e as Polícias Civil do ES e Federal do RS pelo fornecimento das amostras.

Artigo

O artigo apresentado “PARTE II – ARTIGO CIENTÍFICO” encontra-se publicado na *Analytical Methods*, volume 11(13), edição de fevereiro/2019. Link para acesso: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2019/AY/C9AY00226J#!divAbstract>

REFERÊNCIAS – PARTE II

1. BJARNHOLT, N., LI, B., D'ALVISE, J., JANFELT, C. Mass spectrometry imaging of plant metabolites—principles and possibilities. *Nat. Prod. Rep.*, **31**, 818, 2014.
2. CORREA, D. N., SANTOS, J. M., TEUNISSEN, S. F., EBERLIN, L. S., EBERLIN, M. N. Forensic Chemistry and Ambient Mass Spectrometry: A perfect couple destined for a happy marriage? *Anal. Chem.*, **88**, 2515, 2016.
3. WEYERMANN, C., KIRSCH, D., COSTA-VERA, C., SPENGLER, B. Photofading of ballpoint dyes studied on paper by LDI and MALDI MS. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **17**(3), 297, 2006.
4. HILLENKAMP, F., PETER-KATALINIC, J. **MALDI MS: a practical guide to instrumentation, methods and applications**. John Wiley & Sons, 2013.
5. KARAS, M., BACHMANN, D., BAHR, U., HILLENKAMP, F. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **78**, 53, 1987.
6. SILVA, R., LOPES, N. P., SILVA, D. B. Application of MALDI mass spectrometry in natural products analysis. *Planta Medica*, **82**(08), 671, 2016.
7. CRAMER, R. **Advances in MALDI and laser-induced soft ionization mass spectrometry**, Springer, 2016, 227-246p.
8. GOTTARDO, R., CHIARINI, A., DAL PRÀ, I., SERI, C., RIMONDO, C., SERPELLONI, G., TAGLIARO, F. Direct screening of herbal blends for new synthetic cannabinoids by MALDI-TOF MS. *J. Mass Spectrom.*, **47**(1), 141, 2012.
9. SCHWARTZ, S. A., REYZER, M. L., CAPRIOLI, R. M. Direct tissue analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: practical aspects of sample preparation. *J. Mass Spectrom.*, **38**(7), 699, 2003.
10. RAHARJO, T. J., WIDJAJA, I., ROYTRAKUL, S., VERPOORTE, R. Comparative proteomics of Cannabis sativa plant tissues. *J. Biomolecular Techn.: JBT*, **15**(2), 97, 2004.
11. ERIKSSON, C., MASAKI, N., YAO, I., HAYASAKA, T., SETOU, M. MALDI imaging mass spectrometry - A mini review of methods and recent developments. *Mass Spectrometry*, **2** (Special_Issue), S0022, 2013.
12. HUNT, N. J., PHILLIPS, L., WATERS, K. A., Machaalani, R. Proteomic MALDI-TOF/TOF-IMS examination of peptide expression in the formalin fixed brainstem and changes in sudden infant death syndrome infants. *J. Proteomics*, **138**, 48, 2016.
13. RÖMPP, A., SPENGLER, B. Mass spectrometry imaging with high resolution in mass and space. *Histochem. Cell Biol.*, **139**(6), 759, 2013.
14. GRASSL, J., TAYLOR, N. L., MILLAR, A. Matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging and its development for plant protein imaging. *Plant methods*, **7**(1), 1, 2011.
15. ESQUENAZI, E., YANG, Y. L., WATROUS, J., GERWICK, W. H., DORRESTEIN, P. C. Imaging mass spectrometry of natural products. *Nat. Prod. Rep.*, **26**(12), 1521, 2009.
16. TAKATS, Z., WISEMAN, J. M., GOLOGAN, B., COOKS, R. G. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. *Science*, **306**(5695), 471, 2004.
17. AICHLER, M., WALCH, A. MALDI Imaging mass spectrometry: current frontiers and perspectives in pathology research and practice. *Lab. Invest.*, **95**(4), 422, 2015.
18. LOPES, A. A., PINA, E. S., SILVA, D. B., PEREIRA, A. M. S., DA SILVA, M. F. D. G., DA COSTA, F. B., PUPO, M. T. A biosynthetic pathway of sesquiterpene lactones in

Smallanthus sonchifolius and their localization in leaf tissues by MALDI imaging. *Chem. Commun.*, **49**(85), 9989, 2013.

19. LI, C., WANG, Z., JONES, A. D. Chemical imaging of trichome specialized metabolites using contact printing and laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Bioanalytical Chem.*, **406**(1), 171, 2014.
20. KUWAYAMA, K., YAMAMURO, T., TSUJIKAWA, K., MIYAGUCHI, H., KANAMORI, T., IWATA, Y. T., INOUE, H. Utilization of matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry to search for cannabis in herb mixtures. *Anal. Bioanalytical Chem.*, **406**(19), 4789, 2014.
21. HORN, P. J., SILVA, J. E., ANDERSON, D., FUCHS, J., BORISJUK, L., NAZARENS, T. J., CHAPMAN, K. D. Imaging heterogeneity of membrane and storage lipids in transgenic *C. amelina sativa* seeds with altered fatty acid profiles. *The Plant J.*, **76**(1), 138, 2013.
22. HORN, P. J., JAMES, C. N., GIDDA, S. K., KILARU, A., DYER, J. M., MULLEN, R. T., CHAPMAN, K. D. Identification of a new class of lipid droplet-associated proteins in plants. *Plant Physiol.*, **162**(4), 1926, 2013.
23. ZAIMA, N., GOTO-INOUE, N., HAYASAKA, T., SETOU, M. Application of imaging mass spectrometry for the analysis of *Oryza sativa* rice. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **24**(18), 2723, 2010.
24. KASPAR, S., PEUKERT, M., SVATOS, A., MATROS, A., MOCK, H. P. MALDI-imaging mass spectrometry—an emerging technique in plant biology. *Proteomics*, **11**(9), 1840, 2011.
25. FIEHN, O. Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. *Funct. Genomics*, **48**, 155, 2002.
26. LEE, Y. J., PERDIAN, D. C., SONG, Z., YEUNG, E. S., NIKOLAU, B. J. Use of mass spectrometry for imaging metabolites in plants. *The Plant J.*, **70**(1), 81, 2012.
27. DE CÁSSIA MARIOTTI, K., MARCELO, M. C. A., ORTIZ, R. S., BORILLE, B. T., DOS REIS, M., FETT, M. S., LIMBERGER, R. P. Seized cannabis seeds cultivated in greenhouse: A chemical study by gas chromatography–mass spectrometry and chemometric analysis. *Sci. Justice*, **56**(1), 35, 2016.
28. ELSOHLY, M. A., SLADE, D. Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sci.*, **78**(5), 539-548, 2005.
29. ELSOHLY, M. A. **Marijuana and the Cannabinoids**. Editora Humana Press, Totowa, New Jersey, 2007.
30. FRIEDMAN, D., SIRVEN, J. I. Historical perspective on the medical use of cannabis for epilepsy: Ancient times to the 1980s. *Epilepsy Behav.*, **70**, 298, 2017.
31. RADWAN, M. M., ELSOHLY, M. A., EL-ALFY, A. T., AHMED, S. A., SLADE, D., HUSNI, A. S., ROSS, S. A. Isolation and pharmacological evaluation of minor cannabinoids from high-potency *Cannabis sativa*. *J. Nat. Prod.*, **78**(6), 1271, 2015.
32. CHANDRA, S., LATA, H., ELSOHLY, M. A. ***Cannabis sativa* L.: Botany and Biotechnology**. Editora Springer, 2017. 128-35 p.
33. AHMED, S. A., ROSS, S. A., SLADE, D., RADWAN, M. M., ZULFIQAR, F., ELSOHLY, M. A. Cannabinoid ester constituents from high-potency *Cannabis sativa*. *J. Nat. Prod.*, **71**(4), 536, 2008.
34. HSIEH, Y., CHEN, J., KORFMACHER, W. A. Mapping pharmaceuticals in tissues using MALDI imaging mass spectrometry. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **55**(2), 193, 2007.
35. GROENEVELD, G., DE PUIT, M., BLEAY, S., BRADSHAW, R., FRANCESE, S. Detection and mapping of illicit drugs and their metabolites in fingerprints by MALDI MS and compatibility with forensic techniques. *Sci. Rep.*, **5**(1), 1, 2015.
36. BRADSHAW, R., DENISON, N., FRANCESE, S. Implementation of MALDI MS profiling and imaging methods for the analysis of real crime scene fingerprints. *Analyst*, **142**(9), 1581, 2017.
37. BORILLE, B. T., ORTIZ, R. S., DE CÁSSIA MARIOTTI, K., VANINI, G., TOSE, L. V., LIMBERGER, R., ROMÃO, W. Chemical Profiling and Classification of Cannabis through Electrospray ionization coupled to Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry and Chemometrics. *Anal. Methods*, **9**, 4070, 2017.

38. GUO, Z., HE, L. A binary matrix for background suppression in MALDI-MS of small molecules. *Anal. Bioanal. Chem.*, **387**(5), 1939, 2007.
39. KRIVOSHEINA, M. S., BORISOV, R. S., ZHILYAEV, D. I., MATVEEVA, M. D., ZAIKIN, V. G. New suitable deprotonating matrices for the analysis of carboxylic acids and some acidic compounds by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in negative ion mode. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **35**(1), e8954, 2021.
40. MULLEN, A. K., CLENCH, M. R., CROSLAND, S., SHARPLES, K. R. Determination of agrochemical compounds in soya plants by imaging matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **19**(18), 2507, 2005.
41. ANDERSON, D. M., CAROLAN, V. A., CROSLAND, S., SHARPLES, K. R., CLENCH, M. R. Examination of the distribution of nicosulfuron in sunflower plants by matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **23**(9), 1321, 2009.
42. POTH, A. G., MYLNE, J. S., GRASSL, J., LYONS, R. E., MILLAR, A. H., COLGRAVE, M. L., CRAIK, D. J. Cyclotides associate with leaf vasculature and are the products of a novel precursor in petunia (Solanaceae). *J. Biol. Chem.*, **287**(32), 27033, 2012.
43. BURTON, R. D., WATSON, C. H., EYLER, J. R., LANG, G. L., POWELL, D. H., AVERY, M. Y. Proton affinities of eight matrices used for matrix-assisted laser desorption/ionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **11**(5), 443, 1997.
44. MCCOMBIE, G., KNOCHENMUSS, R. Small-molecule MALDI using the matrix suppression effect to reduce or eliminate matrix background interferences. *Anal. Chem.*, **76**(17), 4990, 2004.
45. ASTIGARRAGA, E., BARREDA-GOMEZ, G., LOMBARDERO, L., FRESNEDO, O., CASTANO, F., GIRALT, M. T., FERNANDEZ, J. A. Profiling and imaging of lipids on brain and liver tissue by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using 2-mercaptobenzothiazole as a matrix. *Anal. Chem.*, **80**(23), 9105, 2008.
46. CHAURAND, P., SCHWARTZ, S. A., REYZER, M. L., CAPRIOLI, R. M. Imaging mass spectrometry: principles and potentials. *Toxicol. Pathol.*, **33**(1), 92, 2005.
47. BERMAN, P., FUTORAN, K., LEWITUS, G. M., MUKHA, D., BENAMI, M., SHLOMI, T., MEIRI, D. A new ESI-LC/MS approach for comprehensive metabolic profiling of phytocannabinoids in Cannabis. *Sci. Rep.*, **8**(1), 1, 2018.
48. LINDHOLST, C. Long term stability of cannabis resin and cannabis extracts. *Aust. J. Forensic Sci.*, **42**(3), 181, 2010.
49. BROSEUS, J., ANGLADA, F., ESSEIVA, P. The differentiation of fibre-and drug type Cannabis seedlings by gas chromatography/mass spectrometry and chemometric tools. *Forensic Sci. Int.*, **200**(1-3), 87, 2010.
50. SANTOS, N. A. D., TOSE, L. V., DA SILVA, S. R., MURGU, M., KUSTER, R. M., ORTIZ, R. S., ROMÃO, W. Analysis of isomeric cannabinoid standards and cannabis products by UPLC-ESI-TWIM-MS: a comparison with GC-MS and GC × GC-QMS. *J. Braz. Chem. Soc.*, **30**(1), 60, 2019.
51. VANHOVE, W., VAN DAMME, P., MEERT, N. Factors determining yield and quality of illicit indoor cannabis (Cannabis spp.) production. *Forensic Sci. Int.*, **212**(1-3), 158, 2011.
52. PAOLINO, M. C., FERRETTI, A., PAPETTI, L., VILLA, M. P., PARISI, P. Cannabidiol as potential treatment in refractory pediatric epilepsy. *Expert Rev. Neurother.*, **16**(1), 17, 2016.
53. THAKUR, G. A., DUCLOS JR, R. I., MAKRIYANNIS, A. Natural cannabinoids: templates for drug discovery. *Life Sci.*, **78**(5), 454, 2005.
54. DE BACKER, B., DEBRUS, B., LEBRUN, P., THEUNIS, L., DUBOIS, N., DECOCK, L., CHARLIER, C. Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in cannabis plant material. *J. Chromatogr. B*, **877**(32), 4115, 2009.
55. LYDON, J., TERAMURA, A. H., COFFMAN, C. B. UV-B radiation effects on photosynthesis, growth and cannabinoid production of two Cannabis sativa chemotypes. *Photochem. Photobiol.*, **46**(2), 201-206, 1987.

CAPÍTULO III - ARTIGO CIENTÍFICO II

“Análises de folhas de *Erythroxylum coca* por espectrometria de massa de imagem (MALDI-FT-ICR IMS)”

“*Analysis of Erythroxylum coca Leaves by Imaging Mass Spectrometry (MALDI-FT-ICR IMS)*”

RESUMO

A combinação da fonte de ionização *matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI) com a técnica de imagens por espectrometria de massas, *imaging mass spectrometry* (IMS) é capaz de determinar a identidade química e a distribuição espacial de várias moléculas na superfície de um tecido em uma única análise, conservando a sua histologia natural. No entanto, apesar da sua trajetória progressiva em tecidos vegetais, esta combinação ainda é considerada incipiente em especial no estudo da distribuição espacial de alcaloides em folhas de *Erythroxylum coca*. Portanto, neste trabalho, a técnica MALDI IMS associada ao espectrômetro de alta resolução, *Fourier-transform ion cyclotron resonance* (FT-ICR) foi utilizada para identificar e analisar a distribuição de alcalóides na superfície de folhas de coca, avaliando a eficiência de ionização de três matrizes (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA), 2-mercaptobenzothiazole (MBT), e 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB)). Esta última foi escolhida como a melhor matriz neste estudo, e foi estudada em cinco concentrações (0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg mL⁻¹), onde 2 mg mL⁻¹ mostrou-se mais eficiente. Além disso, a lavagem das folhas de coca com os solventes orgânicos (acetonitrila, metanol, tolueno e diclorometano) testados não aumentou o desempenho no processo de ionização. Por fim, uma seção de tecido, com 50 μ m, foi utilizada para estudar a parte interna do tecido foliar, onde foram detectados alcaloides e moléculas de flavonoides.

Palavras-chave: MALDI, *imaging mass spectrometry*, alcaloides, flavonoides, *Erythroxylum coca*.

1. INTRODUÇÃO

A possibilidade de criar imagens com alta resolução espacial, a partir de informações químicas obtidas diretamente dos tecidos é essencial para entender processos moleculares complexos que ocorrem nos sistemas dos seres vivos, vinculando estruturas moleculares às funções e origens biológicas.¹ Com o avanço das tecnologias instrumentais é possível visualizar a distribuição espacial de diversos tipos e classes de moléculas em seus ambientes nativos com alta sensibilidade, resolução e especificidade química proporcionada pelo uso de técnicas avançadas de instrumentação, como a técnica de espectrometria de massa por imagem, *imaging mass spectrometry* (IMS).¹⁻⁴

A principal vantagem do IMS sobre outras técnicas de imagem está na possibilidade de mapeamento de diversos compostos presentes nas superfícies biológicas sem a necessidade de predefinir ou rotular substâncias antes da análise do tecido. Como resultado, um grande volume de dados pode ser gerado sem investimento excessivo na preparação da amostra.²

Outra vantagem é que as imagens obtidas pelo IMS são tipicamente produzidas no modo “*full scan*”, que registra um espectro de massa para cada *pixel* da área do tecido analisado, isto é, para cada coordenada na amostra, permitindo a construção posterior de uma imagem química onde todos os compostos ionizados e detectados podem ser visualizados simultaneamente. Assim, é possível “navegar” por toda a lista de massas do espectro médio e observar quais íons mostram distribuições interessantes na amostra.⁵⁻⁸

O principal foco na geração de imagens por IMS está na obtenção de informações químicas em tecidos com alta resolução espacial sem comprometer as distribuições espaciais naturais das moléculas de interesse. Para isso, considera-se de alta importância a escolha da fonte de ionização, do analisador de massas, bem como a etapa de preparação da amostra.⁹

Na fonte de ionização *matrix assisted laser desorption ionization* (MALDI), um *laser* de comprimentos de onda típicos 266, 337 ou 355 nm é focado diretamente no analito, com ou sem o uso de uma matriz.^{5,10,11} Quando a matriz não é utilizada, a técnica é nomeada de *laser desorption ionization* (LDI).

A maioria dos espectrômetros de massas para análise de imagem por MALDI possui como analisador de massa o *time-of-flight* (TOF) ou, menos frequentemente

Fourier transform ion cyclotron resonance (FT-ICR). No entanto, a alta resolução do FT-ICR torna MALDI-FTICR-MS uma importante ferramenta para identificação de composições elementares (C_xH_yN_zO_wS_v), com maior exatidão de massas e potencial para diferenciar um grande número de moléculas.^{10,12}

A escolha e a aplicação da matriz na técnica MALDI-IMS também são determinantes para o sucesso da análise, pois a inadequação da matriz pode ter consequências diretas na resolução das imagens, como uma possível realocação artificial dos compostos no tecido, bem como a ineficiência de ionização, uma vez que o tipo de molécula ionizada é altamente dependente da matriz escolhida.^{5,13} Entre as diversas matrizes utilizadas para análise com fonte MALDI ao longo dos anos, destacam-se *2,5-Dihydroxybenzoic acid* (DHB) e *α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid* (CHCA).^{3,13-15}

Particularmente nos estudos de tecidos vegetais, a geração de imagens por IMS ainda se mantém longe da rotina de laboratórios, sendo necessário adaptar protocolos e desenvolver metodologias adequadas para os tecidos específicos de diferentes plantas.^{2,5} Além disso, a complexidade da amostra também é considerada, pois as plantas estão entre as matrizes mais habilidosas da natureza e biossintetizam milhares de metabólitos diferentes.⁶

A planta *Erythroxylum coca*, encontrada principalmente na América do Sul, possui em sua composição química alcaloides tropânicos,¹⁶⁻¹⁹ entre eles destaca-se a molécula cocaína, conhecida por sua ação psicoativa que afeta o sistema nervoso central, e apesar do seu uso medicinal reconhecido, é capaz de causar danos à saúde humana,²⁰ o que torna a temática controversa no campo científico e político. Para maior entendimento, a leitura complementar das revisões propostas por Bauer (2019) e Restrepo e colaboradores (2019) são sugeridas.^{21,22}

Em geral, a literatura apresenta diversos trabalhos de análises químicas em folhas da planta *Erythroxylum coca*, onde muitos destes utilizam a combinação de técnicas cromatográficas e espectrometria de massas.²³⁻²⁷ No entanto, tal abordagem requer preparo prévio, que vão desde cortes no tecido vegetal até maceração e extrações com solventes, o que permite a identificação da molécula na amostra, porém a sua distribuição espacial natural pode ser perdida na etapa de preparo.^{2,5,9} Por outro lado, a análise direta de tecidos vegetais, por MALDI, busca superar essa limitação, e sua aplicação no campo dos produtos naturais tem percorrido um longo

caminho nos últimos anos, tornando-se significativamente mais difundida atualmente. Com isso, estima-se que a técnica MALDI-IMS se tornará ainda mais relevante para esta área de pesquisa, especialmente para a comunidade científica focada no estudo de plantas.⁵

Assim, à luz dos estudos em ascensão da técnica IMS e suas aplicações em tecidos vegetais, o presente trabalho buscou estudar a distribuição química de diferentes alcaloides e flavonoides diretamente na superfície foliar da planta *Erythroxylum coca*, com mínima preparação, utilizando LDI, MALDI-MS, e técnicas de LDI/MALDI-IMS. Assim, foi desenvolvida uma metodologia baseada na otimização de parâmetros de ionização e condições de análise avaliando a eficiência de três matrizes, o efeito da concentração da melhor matriz, o efeito da lavagem das folhas de coca com solventes orgânicos, e por fim o estudo da parte mais interna do tecido foliar.

2. METODOLOGIA

2.1. Amostras e Reagentes

As folhas de *Erythroxylum coca* (doravante, coca), **Figura 1a–e**, foram fornecidas pela Polícia Federal do Rio Grande do Sul (PF-RS), Brasil. Inicialmente, para a análise do perfil espectral, três pedaços obtidos a partir de uma mesma folha, contendo uma área de aproximadamente 1 cm², como detalhado na **Figura 1c**, foram analisados em três fontes de ionização: MALDI, LDI e *electrospray* (ESI). No último caso, os analitos foram extraídos da folha usando 1 mL de metanol, com grau de pureza analítica superior a 99,5% (Vetec® Química Fina Ltda, Brasil), posteriormente, 10 µL do produto da extração foi diluído com 990 mL de metanol e analisador por ESI.

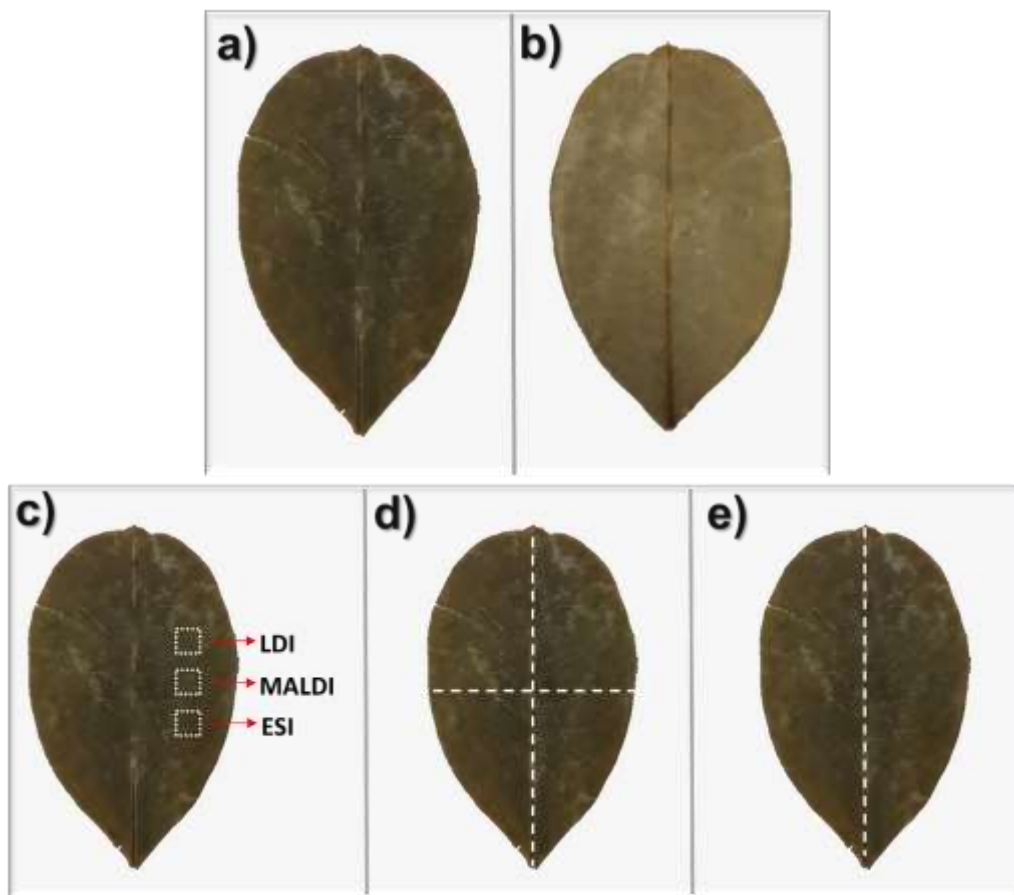


Figura 1. Representações da folha de *Erythorylum coca*: **a)** adaxial, **b)** abaxial, **c-e)** divisões das folhas. Fonte: Própria autora.

2.2. Avaliação de matrizes MALDI

As matrizes CHCA, DHB and MBT, adquiridas pela *Sigma-Aldrich Chemicals*, St. Louis, MO, USA, foram preparadas na concentração de 2 mg mL^{-1} em metanol, e utilizadas para avaliar a sensibilidade das técnicas MALDI(+)MS e IMS na ionização e detecção de compostos alcaloides, principalmente a cocaína na superfície foliar. Para isso, uma mesma folha foi dividida em quatro partes ($2,5 \times 1,5 \text{ cm}$), **Figura 1d**, e fixadas a uma placa metálica. Posteriormente, as matrizes foram adicionadas com o auxílio do capilar nebulizador de ESI, com fluxo contínuo e tempo controlado de $50 \mu\text{L min}^{-1}$ e 1 min, respectivamente. As deposições de cada matriz foram realizadas em triplicata para cada parte, com intervalo de secagem de um minuto entre as etapas. Cada matriz foi avaliada separadamente em cada $\frac{1}{4}$ da folha.

2.3. Efeito da concentração da matriz MALDI

A partir do resultado obtido na etapa anterior, e visando avaliar o efeito da concentração da matriz na ionização dos analitos, aplicou-se, em triplicata, concentrações 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg mL⁻¹ apenas para a matriz que apresentou o melhor desempenho no processo de ionização dos analitos monitorados. Esta análise foi feita sobre a superfície de pedaços de folha de coca (1 × 1 cm), com a matriz depositada com auxílio do capilar nebulizador do ESI, com fluxo contínuo e tempo controlados de 50 µL min⁻¹ e 1 min, respectivamente.

2.4. Efeito de solventes orgânicos na lavagem de folhas de coca

Com intuito de melhorar a qualidade das imagens por IMS e intensidade dos sinais das moléculas de interesse nas análises, foram mergulhadas folhas de coca durante 5 min (cada pedaço) da mesma folha, dividida em quatro partes (~ 2,5 × 1,5 cm), **Figura 1d**, em solventes de diferentes polaridades: metanol, diclorometano, acetonitrila e tolueno (Vetec, pureza de 99,5% UV/HPLC). Após a secagem total, as folhas foram fixadas à placa metálica e as suas superfícies adaxiais, **Figura 1a**, foram analisadas por LDI(+) IMS.³

2.5. Seccionamento do tecido vegetal

Para a análise da parte mais interna do tecido foliar, um pedaço de folha de coca (0,25 cm²) foi congelado e armazenado em um freezer a 4°C, e posteriormente seccionado horizontalmente, 50 µm, a -20°C em um criostato (modelo CM3050-S; Leica *Microsystems* SA, França). Após o corte, o tecido vegetal foi imediatamente depositado à placa metálica e analisado por LDI(+) IMS.

2.6. ESI(+)MS, ESI(+)MS/MS, LDI(+), MALDI(+)MS e IMS

O espectrômetro de massas FT-ICR MS, Modelo 9.4 T Solarix, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha, equipado com um *laser Smartbeam II*[®] (355 nm) e com as fontes LDI/MALDI e ESI, foi utilizado nas análises das folhas de coca. Todos os espectros de massas foram calibrados externamente usando uma solução de arginina (0,05 mg mL⁻¹), adquirida pela *Sigma-Aldrich Chemicals*, St. Louis, MO, USA.

2.6.1. ESI(+)^{MS} e ESI(+)^{MS/MS}

Após a extração e diluição, a solução da amostra de folha de coca foi injetada na fonte de ESI a um fluxo de 5 $\mu\text{L min}^{-1}$, com uma faixa dinâmica de aquisição de íons na cela de ICR de m/z 154-1200. Os demais parâmetros da fonte de ESI foram: i) voltagem no capilar (cone): 4000-4200 V; ii) *end plate offset* = 500 V; iii) temperatura e fluxo do gás de secagem: 250 °C e 2 L min^{-1} , respectivamente; vi) pressão do gás nebulizador: 1.5 bar; e v) *skimmer* = 25 V. Na transmissão de íons, o tempo de acumulação de íons no hexapolo (*ion accumulation time*) e o TOF foram de 0,015 s e 0.9 ms, respectivamente, com acumulação de 16 *scans*, no domínio de tempo de 4M (*mega-point*) e erros de massa inferior a 5 ppm fornecendo atribuições inequívocas de fórmula molecular para íons moleculares com carga única.

O experimento de dissociação induzida por colisão, do inglês *collision-induced dissociation* (CID)²⁸ foi realizado com a resolução de quadrupolo de massa ajustada para uma unidade de isolamento de 1 m/z e a energia de colisão de 22 V. O espectro de massa foi adquirido acumulando 16 *scans* em 512 k no domínio do tempo e processados usando o *software DataAnalysis*.

2.6.2. LDI(+), MALDI(+)^{MS} e IMS

Para as análises de LDI/MALDI(+)^{MS} e IMS, após a fixação do tecido vegetal na placa metálica, com (MALDI) ou sem (LDI) etapa de adição da matriz, foi adquirida uma imagem digital da placa e posteriormente a placa foi inserida no equipamento FT-ICR MS. Os espectros de massas foram adquiridos no modo de ionização positivo na faixa de massas entre m/z 180-900, e os principais parâmetros experimentais utilizados foram: *laser frequency*, 200 Hz; *plate offset*, -100.0 V; *deflector plate*, -210.0 V; *laser shots*, 100; *laser focus*, “small”; 16 *scans*; e modo de *laser* “enable random walk”. A intensidade do laser foi modificada de acordo com o limiar de energia necessário para a ionização de cada amostra (15-90%).

Para as análises de LDI(+) e MALDI(+) IMS, o espectro de massas foi acumulado por 100 *laser shots* por *pixel*, modo de *laser*: automatizado, com uma resolução espacial e intensidade de *laser* variando de 50×50 a 160×160 μm e 30-80%, respectivamente. Todos os dados de IMS e MS foram processados pelos *softwares FlexImaging 3.0* e *DataAnalysis*, respectivamente.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. ESI(+)-MS, LDI/MALDI(+)-MS e IMS

Inicialmente avaliou-se o perfil de ionização das folhas de coca utilizando as fontes de ionização ESI(+), LDI(+), e MALDI(+), **Figura 2a-c**. O modo positivo de ionização é o mais comum nas análises de folhas de coca e seus produtos derivados^{20,29-32} pois possuem alcaloides (bases de Lewis) em suas composições, sendo assim, o modo mais bem-sucedido para essa classe de compostos polares, favorecendo a ionização principalmente por transferência de prótons.¹³

A **Figura 2a** mostra o espectro de ESI(+)-MS, uma técnica de ionização bem consolidada no estudo de produtos naturais,³³⁻³⁵ da folha de coca com a detecção de dez compostos, elencados na **Tabela 1**, pertencentes a diferentes classes química: alcaloides, alcaloide ciclopeptídico, esfingolípido, flavonoide, dissacarídeo e micotoxina. Entre eles, o composto mais abundante no espectro foi o alcaloide cocaína, detectado na forma de íon protonado $[C_{17}H_{21}NO_4+H]^+$, m/z 304,15420, resolução do sinal = 517,670, erro = 0.43 ppm, DBE = 8 (devido ao seu anel aromático (4), ligação C=O dos dois grupos ésteres (2) e núcleo tropânico (2)), semelhantemente ao retratado por outros autores, onde é afirmada a maior abundância desse alcaloide frente aos demais encontrados na planta.^{18,36}

Por outro lado, a análise da folha de coca com a fonte LDI(+)-MS, **Figura 2b**, com direta dessorção e ionização de compostos (lâmpada UV 355 nm), resultou na abundante detecção da cocaína, entretanto, na forma de aduto de potássio, íon $[C_{17}H_{21}NO_4+K]^+$, m/z 342,11068. Com a fonte MALDI(+)-MS, **Figura 2c**, a detecção da cocaína é observada em duas formas simultaneamente: protonada $[Coc+H]^+$ e como aduto de potássio $[Coc+K]^+$, sendo mais abundante a primeira forma, isto é, íon $[C_{17}H_{21}NO_4+H]^+$, de m/z 304,15509.

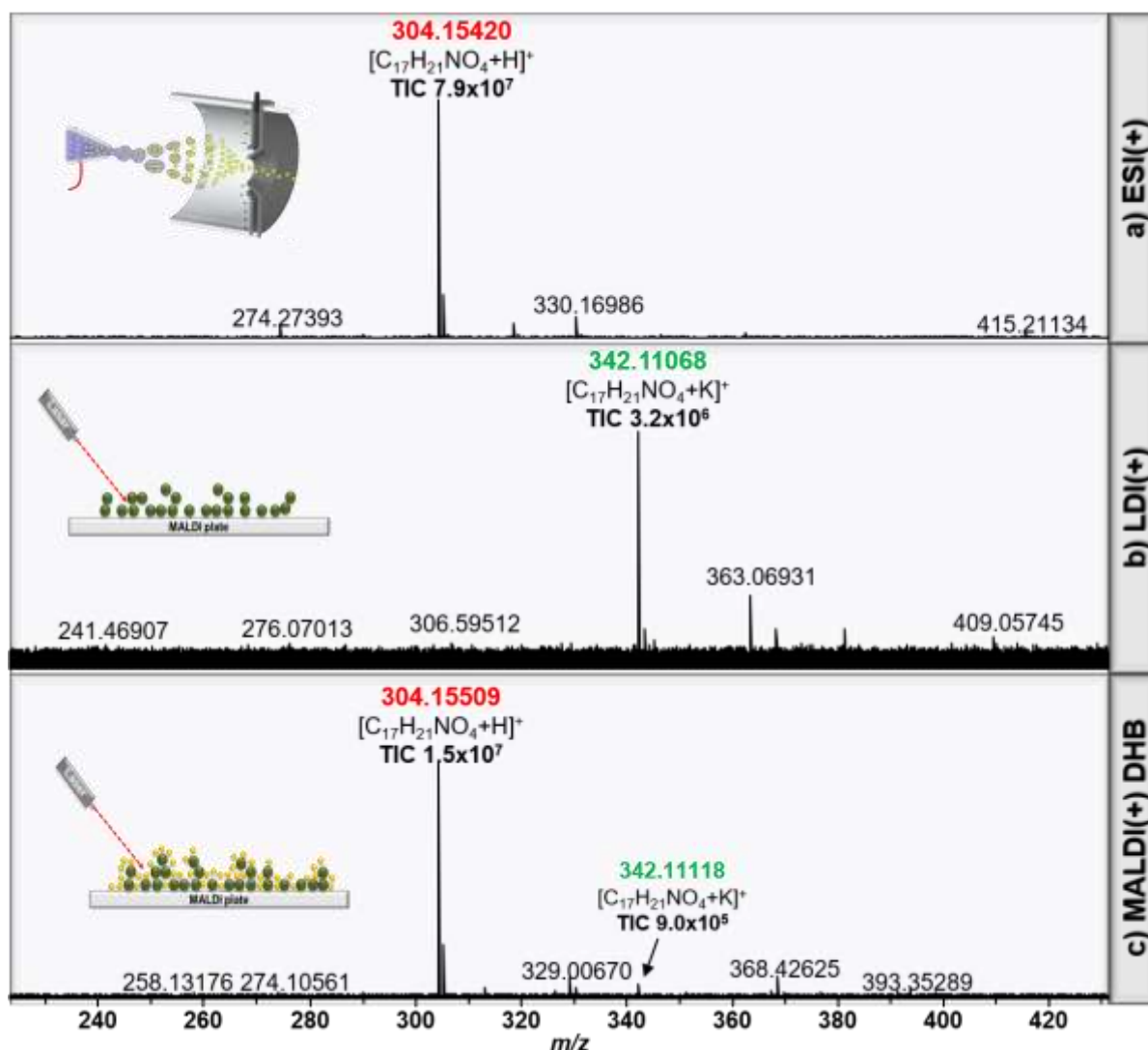


Figura 2. Espectros de massas de folhas de cocaína pelas fontes: **a)** ESI(+) ($0,02 \text{ mg mL}^{-1}$ em metanol), **b)** LDI(+) (1 cm^2 da folha) e **c)** MALDI(+) (1 cm^2 da folha com matriz DHB, 2 mg mL^{-1}). Fonte: Própria autora.

Em geral, as técnicas de LDI(+) e MALDI(+) são operadas por incidência de *laser*,⁵ destarte, nesse estudo observa-se que a co-cristalização da matriz com o analito, isto é, em MALDI(+), proporcionou um aumento na sensibilidade quando comparada com a técnica de LDI(+)MS, avaliada nos valores de *total ion current* (TIC), $TIC_{LDI:[Coc+K]^+} = 3,2 \times 10^6$ e $TIC_{MALDI:[Coc+H]^+} = 1,5 \times 10^7$. Esse melhor desempenho ao utilizar a fonte MALDI(+) pode estar relacionado ao fato da matriz proteger o analito da incidência direta do *laser*,³ favorecendo o mecanismo de transferência de prótons, e auxiliando assim o processo de dessorção/ionização e formação de moléculas protonadas.⁵

Tabela 1. Compostos identificado por ESI(+)MS e suas respectivas classes, fórmulas moleculares, valores de m/z_{medido} , $m/z_{\text{teórico}}$, erros de massa (ppm), DBE, intensidade relativa (%) e TIC.

Classe	Compostos	Fórmula Molecular	m/z medido	m/z teórico	Erro (ppm)	D B E	Intensidade relativa (%)	TIC
Alcaloides	Cocaína	$[\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_4+\text{H}]^+$	304,15420	304,15433	0,43	8	100,0	$7,8 \times 10^7$
	Cinamoilcocaína	$[\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_4+\text{H}]^+$	330,16985	330,16998	0,39	9	8,63	$6,8 \times 10^6$
	Benzoilecgonina	$[\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{NO}_4+\text{H}]^+$	290,13858	290,13868	0,36	8	1,23	$9,7 \times 10^5$
	Trimetoxicocaína	$[\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{NO}_7+\text{H}]^+$	394,18596	394,18603	0,17	8	0,38	$2,9 \times 10^5$
	Ecgonina metil éster	$[\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{NO}_3+\text{H}]^+$	200,12800	200,12812	0,60	3	2,50	$1,9 \times 10^6$
Alcaloides ciclopeptídicos	Jubanine A	$[\text{C}_{40}\text{H}_{49}\text{N}_5\text{O}_6+\text{Na}]^+$	718,35787	718,35751	-0,51	19	7,13	$5,6 \times 10^6$
Esfingolipídeos	Safingol	$[\text{C}_{18}\text{H}_{39}\text{NO}_2+\text{H}]^+$	302,30522	302,30536	0,44	0	1,54	$1,2 \times 10^6$
Flavonoides	Carlinosídeo	$[\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{15}+\text{Na}]^+$	603,13195	603,13204	0,16	13	0,49	$3,8 \times 10^5$
Dissacarídeo	Glicose	$[\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6+\text{Na}]^+$	203,05248	203,05261	0,66	1	0,61	$4,8 \times 10^5$
		$[\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6+\text{K}]^+$	219,02642	219,02655	0,57	1	0,51	$4,0 \times 10^5$
Micotoxina	Citrinina	$[\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_5+\text{H}]^+$	251,0909	251,09140	2,00	7	0,46	$3,5 \times 10^5$

Experimento CID, com a fonte ESI(+), foi realizado para identificar o perfil de fragmentação da molécula cocaína, m/z 304, principal alcaloide psicoativo da planta *Erythroxylum coca*, **Figura 3**.¹⁶ Para isso, é importante identificar quimicamente o local da protonação da molécula, para posteriormente explicar a migração do próton da parte mais básica para outras partes menos básicas da estrutura química, iniciando assim, o processo de fragmentação de acordo com o modelo “*mobile próton*”.^{20,33,37} À luz desse entendimento, considera-se, nesse estudo, que a cocaína pode ser protonada a partir do átomo de nitrogênio, presente no núcleo tropânico composto por uma amina terciária, e nos oxigênios, pertencentes aos grupos ésteres da molécula.

Neste contexto, Dias e colaboradores, 2018, usaram descritores quânticos para confirmarem o local de protonação mais favorável, que especificamente para a molécula cocaína foi o átomo de nitrogênio. Além disso, os autores sugerem, a partir do cálculo das energias de Gibbs e os valores de basicidade da fase gasosa, a conformação da estrutura como cadeira frente a conformação barco.²⁰

Assim, inicialmente ocorre a protonação no nitrogênio do anel tropânico para a formação do íon de m/z 304. Posteriormente, a transição principal observada no espectro do experimento CID dá-se por m/z 304 $\rightarrow$ 182 Da, resultante da formação da dupla ligação entre os carbonos 2 e carbono 3 do anel tropânico e consequentemente a eliminação do ácido benzóico ($C_7H_6O_2$, 122 Da) da cocaína, resultando na detecção do íon $[C_{10}H_{15}NO_2+H]^+$, m/z 182, **Figura 3**.³⁸ A alta intensidade desse sinal (m/z 182) no espectro de MS/MS da cocaína pode ser associada à sua formação por diferentes vias de fragmentação competitivas e energeticamente favoráveis a partir do m/z 304. Outra via de fragmentação pode ser justificada pela transição m/z 304 $\rightarrow$ 272, com migração do próton do nitrogênio para o oxigênio do grupo éster ligado ao carbono 2 do anel tropânico, resultando na eliminação da molécula metanol, perda neutra de 32 Da (CH_3OH), e detecção do íon $[C_{16}H_{17}NO_3+H]^+$, m/z 272.³⁸

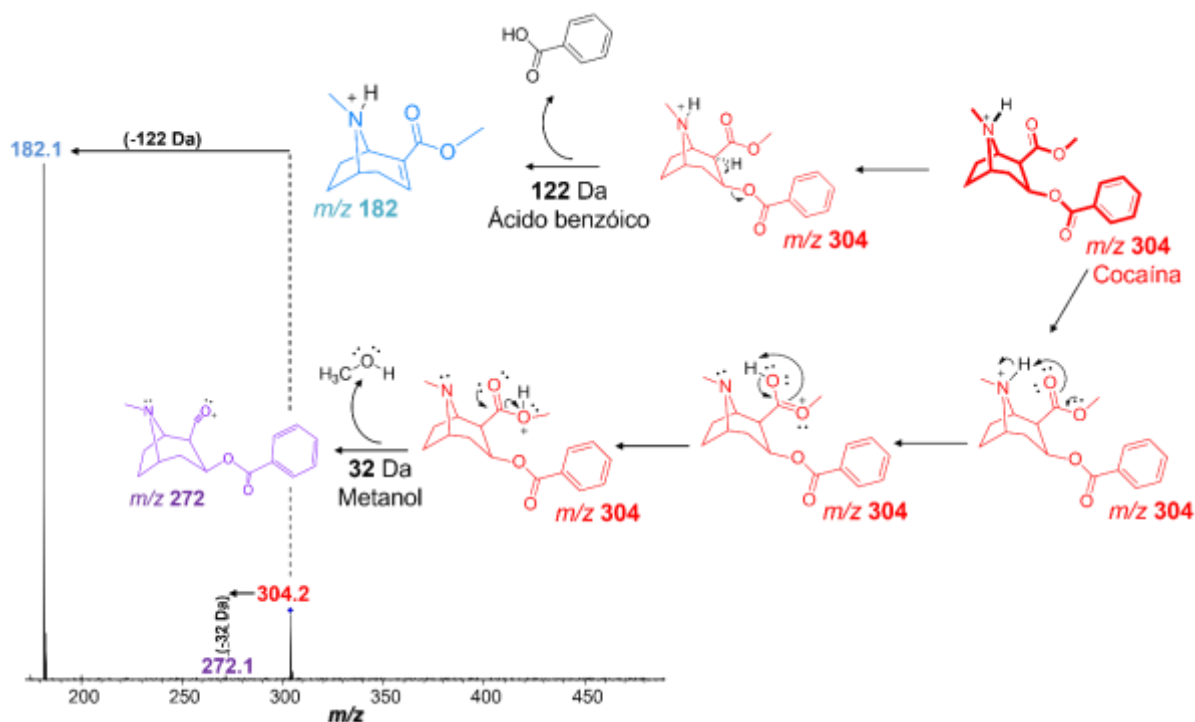


Figura 3. Experimentos CID para o m/z 304 que corresponde a molécula da cocaína e, m/z 304, e proposta de mecanismo de fragmentação dos íons de m/z 182 e 272. Fonte: Própria autora.

Em seguida, realizou-se análise *untargeted* a partir da técnica de LDI(+)IMS em metade da folha de coca (7,5 cm²), com resolução espacial de 150 × 150 µm. A **Figura 4a** mostra a imagem obtida, construída com cor ficta verde atribuída ao monitoramento da cocaína na sua única forma disponível no espectro médio, isto é, cationizada com aduto de potássio, [C₁₇H₂₁NO₄+K]⁺, m/z 342,1798. Esse resultado inicial mostra que é possível fazer o monitoramento de cocaína na superfície do tecido vegetal e que esse composto se distribui por toda extensão da área analisada, com pequenas áreas de maior abundância na região central do tecido foliar.

Nas **Figura 4b e 4c** são mostradas as imagens obtidas com o monitoramento da distribuição espacial do composto truxilina [C₃₈H₄₆N₂O₈+K]⁺ (m/z 697,2949, cor ficta rosa), e *colocalization* das duas moléculas: cocaína e truxilina, respectivamente. A truxilina, que assim como a cocaína é naturalmente detectado em folhas de coca, possui maior abundância de distribuição nas regiões periféricas, isto é, no contorno do tecido foliar. Na **Figura 4c** é evidenciada as distribuições citadas a partir da imagem do *colocalization* destes dois componentes naturais.

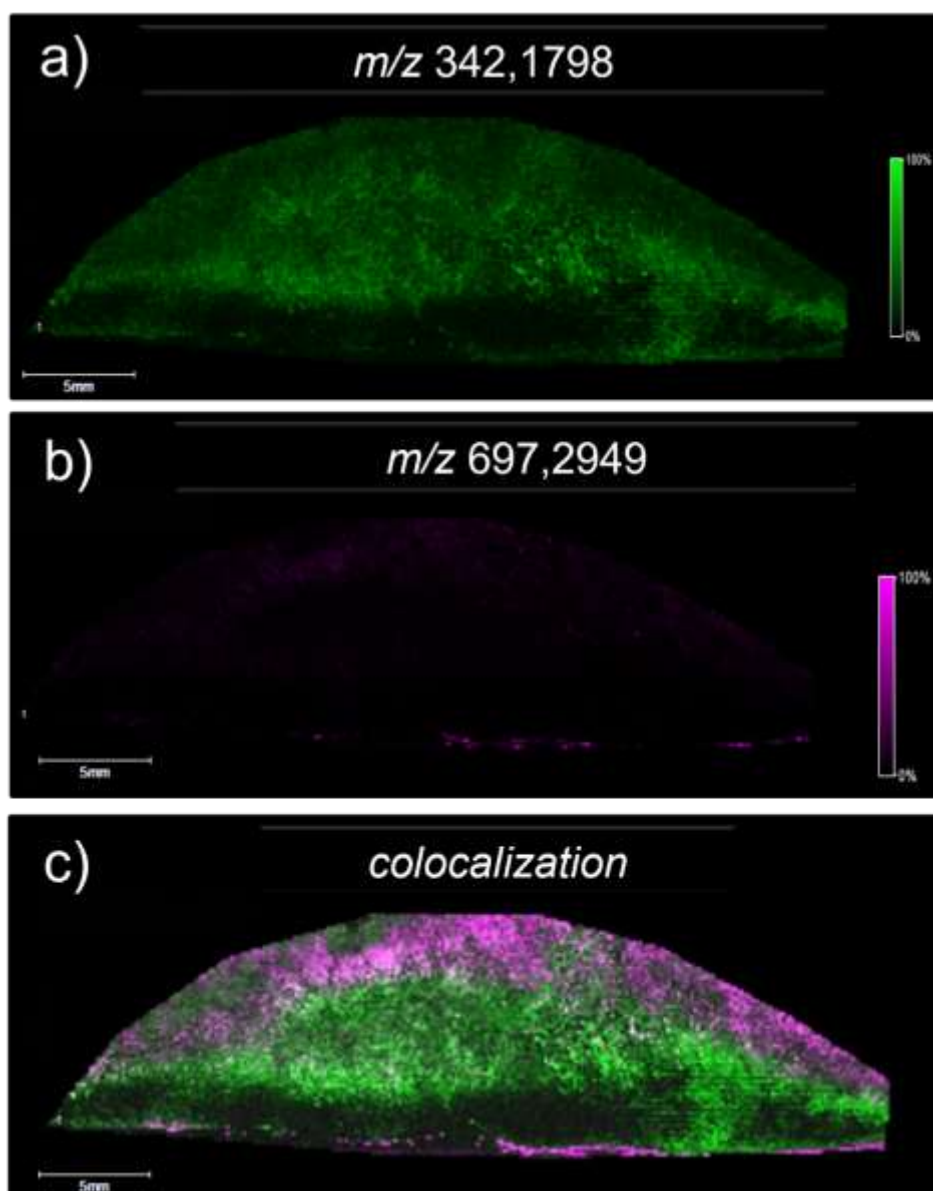


Figura 4. LDI(+) *imaging* mostrando análise da superfície foliar com o monitoramento da: **a)** cocaína cationizada com potássio ($[C_{17}H_{21}NO_4+K]^+$, e m/z 342,1798), cor ficta verde; **b)** molécula truxilina com aduto de potássio ($[C_{38}H_{46}N_2O_8+K]^+$ de m/z 697.2949) monitorada pela imagem com cor ficta rosa; **c)** *colocalization* das moléculas de cocaína e truxilina. Todas as imagens foram obtidas com resolução espacial de $150 \times 150 \mu m$. Fonte: Própria autora.

A distribuição do alcaloide cocaína, sinal de m/z 342,145, também foi monitorada nas duas partes da folha de coca, isto é, na forma adaxial (anverso) e abaxial (verso), **Figura 5**. A imagem mostra uma distribuição similarmente homogênea, porém menos abundante no verso em relação ao anverso da folha, mostrando que o alcaloide pode estar presente em toda composição do tecido vegetal.

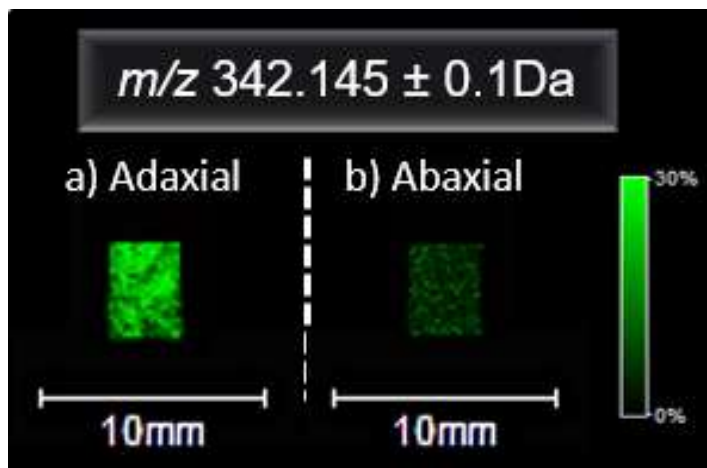


Figura 5. LDI(+) *imaging* MS mostrando a distribuição espacial do alcaloide cocaína, $m/z\ 342$, nas regiões **a)** adaxial e **b)** abaxial, na folha de coca, resolução de $150 \times 150\mu\text{m}$. Fonte: Própria autora.

Sequencialmente, buscou-se a otimização na análise de *imaging* avaliando a utilização de matrizes com intuito de aumentar a eficiência no processo de ionização utilizando a técnica de MALDI(+)IMS. Para isso, testou-se três diferentes matrizes: CHCA, DHB e MBT na concentração de 2 mg mL^{-1} , e os resultados foram comparados com a técnica de LDI(+)IMS. De acordo com estudo dirigido por Thomas e colaboradores, 2012, as três matrizes supracitadas apresentaram alto desempenho quando avaliadas no modo positivo de ionização.³⁹ Além disso, essas matrizes possuem propriedades importantes, como; altas absorvâncias molares e a capacidade de se dissolver em solventes comuns, como metanol, além de formar cristais rapidamente após a evaporação do solvente.⁴⁰

Assim, uma única folha de coca foi dividida em 4 partes ($\frac{1}{4}$ de folha = $3,75\text{ cm}^2$, cada), **Figura 1d**, e fixada na placa metálica da fonte de LDI/MALDI. Sobre cada parte da folha analisada, exceto para o LDI(+)IMS, foi adicionada individualmente $150\ \mu\text{L}$ de cada matriz, sendo três aplicações de $50\ \mu\text{L min}^{-1}$ com intervalo de 1 min entre as aplicações. As imagens de MALDI(+) obtidas com a deposição das matrizes MBT, DHB, CHCA (na concentração de 2 mg mL^{-1}) e LDI(+), **Figura 6a-d**, mostram a distribuição espacial do íon $m/z\ 342,1798$, $[\text{Coc}+\text{K}]^+$. Esse m/z foi selecionado por ser o sinal mais abundante de alcaloide nos espectros médios, e por estar disponível em todas as quatro partes da folha analisada. A distribuição e abundância deste sinal são representadas pela intensidade de cores no histograma, usando uma escala colorida.

Apesar da branda condição de análise, *laser power* (LP) de 30%, o uso da matriz CHCA resultou em uma menor eficiência de ionização da molécula monitorada e alta ionização dos componentes interferentes que, devido a supressão iônica, não permitiram a real detecção da cocaína, **Figura 6a**.

Por outro lado, a imagem formada utilizando a matriz DHB, ainda que com LP de 80%, **Figura 6c**, mostra maior eficiência no processo de ionização do alcaloide monitorado, onde uma distribuição homogênea pode ser observada com pequena área de maior frequência de detecção na região central da folha. Essa matriz além de ser conveniente para muitos comprimentos de onda, de 300 a 360 nm,⁴¹ possui energia de desprotonação relativamente baixa (323 kcal/mol), de modo que o próton se transfere com maior facilidade da matriz para o analito, produzindo íon analito protonado.⁴²

Além disso, as imagens químicas das folhas geradas a partir da técnica LDI(+)-IMS (LP 70%) e MALDI(+)-IMS utilizando a matriz MBT (LP 85%), **Figura 6b** e **d**, respectivamente, também se mostram úteis para detecção da cocaína na superfície foliar, porém, com menor eficiência no processo de ionização quando comparada com a análise de MALDI(+)-IMS utilizando a matriz DHB, **Figura 6c**. Portanto, observa-se que nesse estudo a adição de matriz beneficia o processo de dessorção e ionização do analito de interesse, melhorando assim a construção da imagem química da folha analisada.

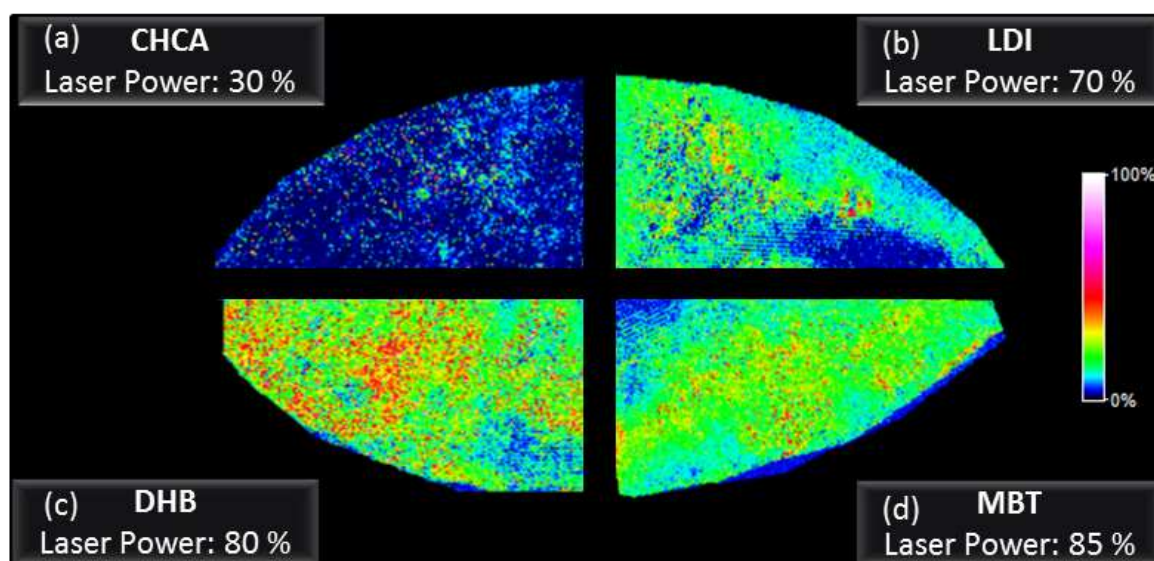


Figura 6. MALDI(+)-IMS e LDI(+)-IMS de quatro partes da folha de coca com diferentes matrizes (2 mg mL⁻¹): **a)** CHCA; **b)** LDI; **c)** DHB e **d)** MBT. Os resultados mostram a distribuição espacial, em escala colorida, da cocaína (*m/z* 342). Fonte: Própria autora.

Após determinação da matriz DHB como mais eficiente na geração das imagens pela técnica de MALDI(+), buscou-se avaliar o efeito da sua concentração (0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg mL⁻¹) na eficiência de ionização dos compostos de interesse. Para isso, 10 pedaços de folhas de coca (~5 × 4 mm), foram fixados na placa metálica, sendo os experimentos realizados em duplicata.

Os espectros de MALDI(+)MS, **Figura 7a-e**, mostram que nas folhas com as concentrações de 0,5 e 1,0 mg mL⁻¹ de matriz, **Figura 7a e b**, respectivamente, apresentam maior intensidade do sinal da cocaína como aduto de potássio, [C₁₇H₂₁NO₄+K]⁺ de *m/z* 342,11, em relação a molécula protonada, [C₁₇H₂₁NO₄+H]⁺, *m/z* 304,15. A detecção majoritária dos íons cationizados de potássio, semelhante à técnica de LDI(+) MS, **Figuras 2 e 4**, neste caso, pode retratar a baixa disponibilidade de prótons e maior abundância natural de potássio nessa matriz vegetal, maximizando a formação de íons coordenados com metais alcalinos.

Diferentemente, a adição de matriz com concentração ≥ 2,0 mg mL⁻¹ resultou na maior abundância do sinal da cocaína protonada em relação a sua forma cationizada, **Figura 7c-e**, com valores de TIC do sinal [C₁₇H₂₁NO₄+H]⁺ e *m/z* 304,15 de 1,5x10⁷, 1,2x10⁷ e 1,7x10⁷ e erros de -2.49, -3.21, -4.90 ppm para as concentrações de 2.0, 4.0 e 8.0 mg mL⁻¹ da matriz, respectivamente.

Em geral, para que a transferência de prótons ocorra, a afinidade de prótons (AP) do receptor deve ser maior que a do doador,⁴³ e nos alcaloides, particularmente na cocaína, a presença da ligação amina com sua alta afinidade potencializa a formação da molécula protonada por transferência de prótons da matriz DHB (AP = 204±4 kcal/mol).⁴⁴ Essa matriz por se tratar de um ácido de Brønsted-Lowry, pKa = 2,97,⁴¹ além da sua utilidade na recepção e redistribuição da energia do *laser* incidido sobre a amostra,⁵ proporciona também maior abundância e disponibilidade de hidrogênio, exceto para as suas baixas concentrações, como observado na **Figura 7a-b**. Nesta condição o DHB auxiliou também na formação de íons protonados, da base orgânica cocaína, pKa = 8,6,⁴⁵ menos abundantes, com TIC do sinal [C₁₇H₂₁NO₄+H]⁺ e *m/z* 304,15 de 3,9x10⁵ e 3,3x10⁵, para as suas concentrações de 0,5 e 1,0 mg mL⁻¹.

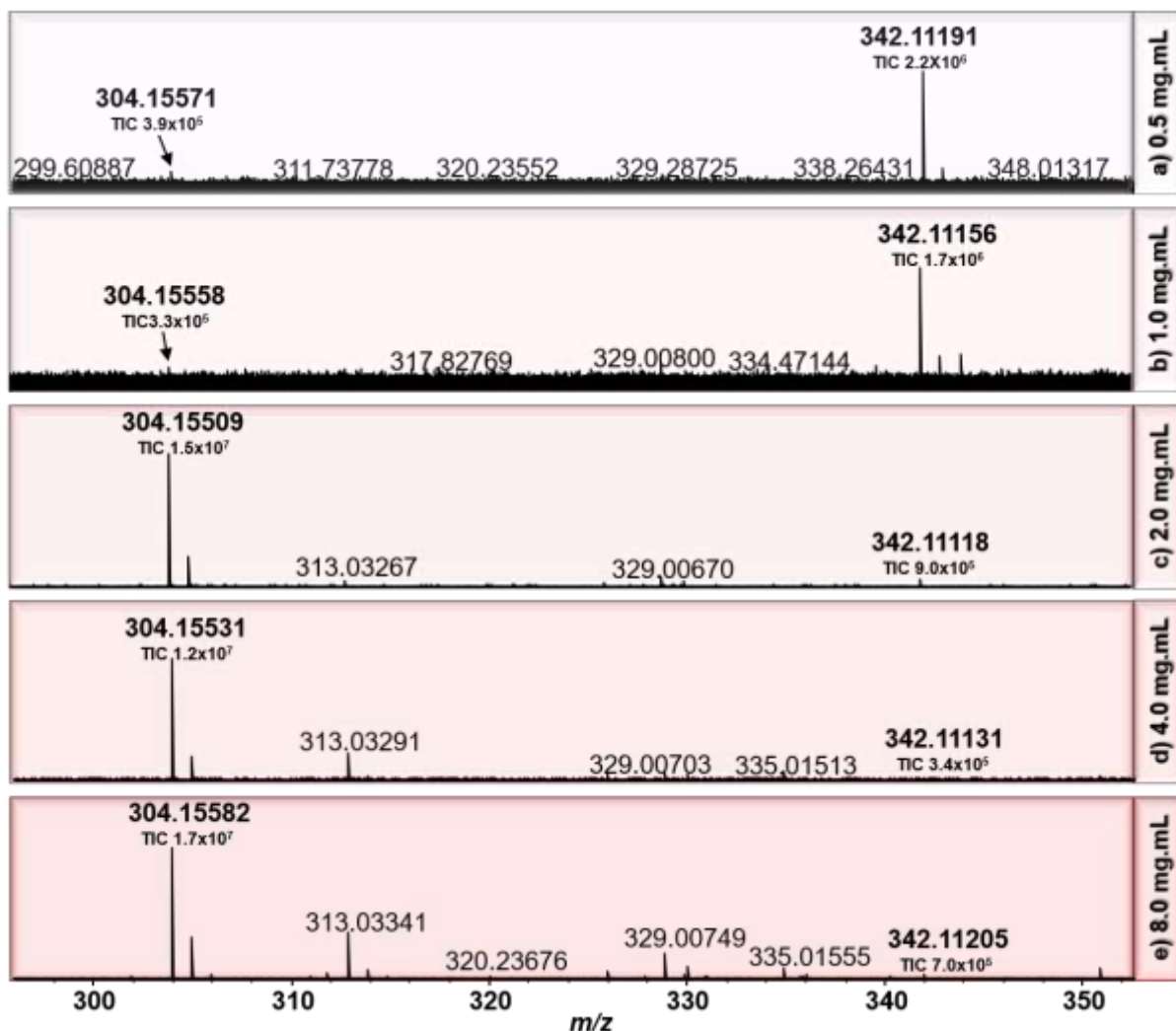


Figura 7. Espectros de MALDI(+) MS de folhas de coca avaliadas com adição de cinco concentrações da matriz DHB: **a)** 0,5; **b)** 1,0; **c)** 2,0; **d)** 4,0 e **e)** 8,0 mg mL⁻¹. Fonte: Própria autora.

Uma melhor compreensão do efeito da concentração da matriz na eficiência de ionização da técnica MALDI(+) pode ser alcançada observando a **Figura 8**, que mostra a variação da abundância relativa dos sinais de cocaína em função da concentração da matriz DHB. Observa-se que quando a concentração de matriz é ≥ 2 mg mL⁻¹, as moléculas de cocaína são facilmente detectadas como íons $[C_{17}H_{21}NO_4+H]^+$.

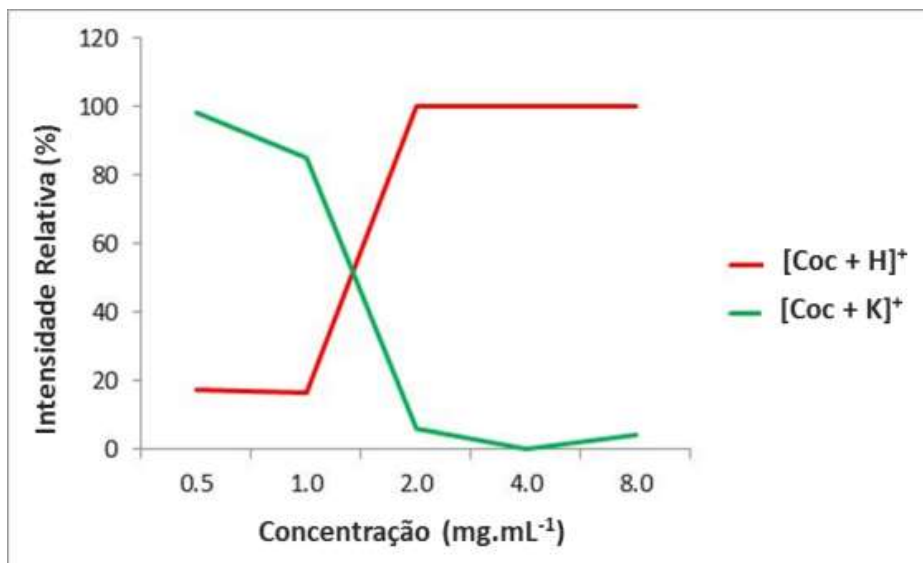


Figura 8. Relação entre a abundância relativa dos sinais de cocaína em cada uma das cinco concentrações da matriz DHB (0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg mL⁻¹). Fonte: Própria autora.

Corroborando ao observado com as **Figuras 7 e 8**, na **Figura 9**, imagens químicas foram produzidas por MALDI(+)IMS, representadas com as intensidades das cores fictas específicas no histograma: vermelho para a cocaína protonada, $[C_{17}H_{21}NO_4+H]^+$, m/z 304,1701 e verde para a cocaína com aduto de potássio $[C_{17}H_{21}NO_4+K]^+$, m/z 342,1485. Nota-se uma homogeneidade na superfície analisada, com maior abundância do sinal de $[C_{17}H_{21}NO_4+K]^+$ para as menores concentrações de DHB (isto é, quando $[DHB] < 2,0$ mg mL⁻¹) e do sinal de $[C_{17}H_{21}NO_4+H]^+$ quando se utilizou $[DHB] \geq 2,0$ mg mL⁻¹.

Assim, além da matriz DHB atender as características básicas das matrizes em experimentos MALDI, como: possuir propriedades ácidas suficientes para permitir a geração de íons; mesma solubilidade (metanol) que o analito, o que pode promover uma co-cristalização uniforme entre a matriz e o analito; absorvância no comprimento de onda (355 nm) com o qual o *laser* foi irradiado na amostra,^{40,41} também proporcionou melhor desempenho no processo de ionização dos analitos de interesse no presente estudo, principalmente nas concentrações de matriz $\geq 2,0$ mg mL⁻¹.

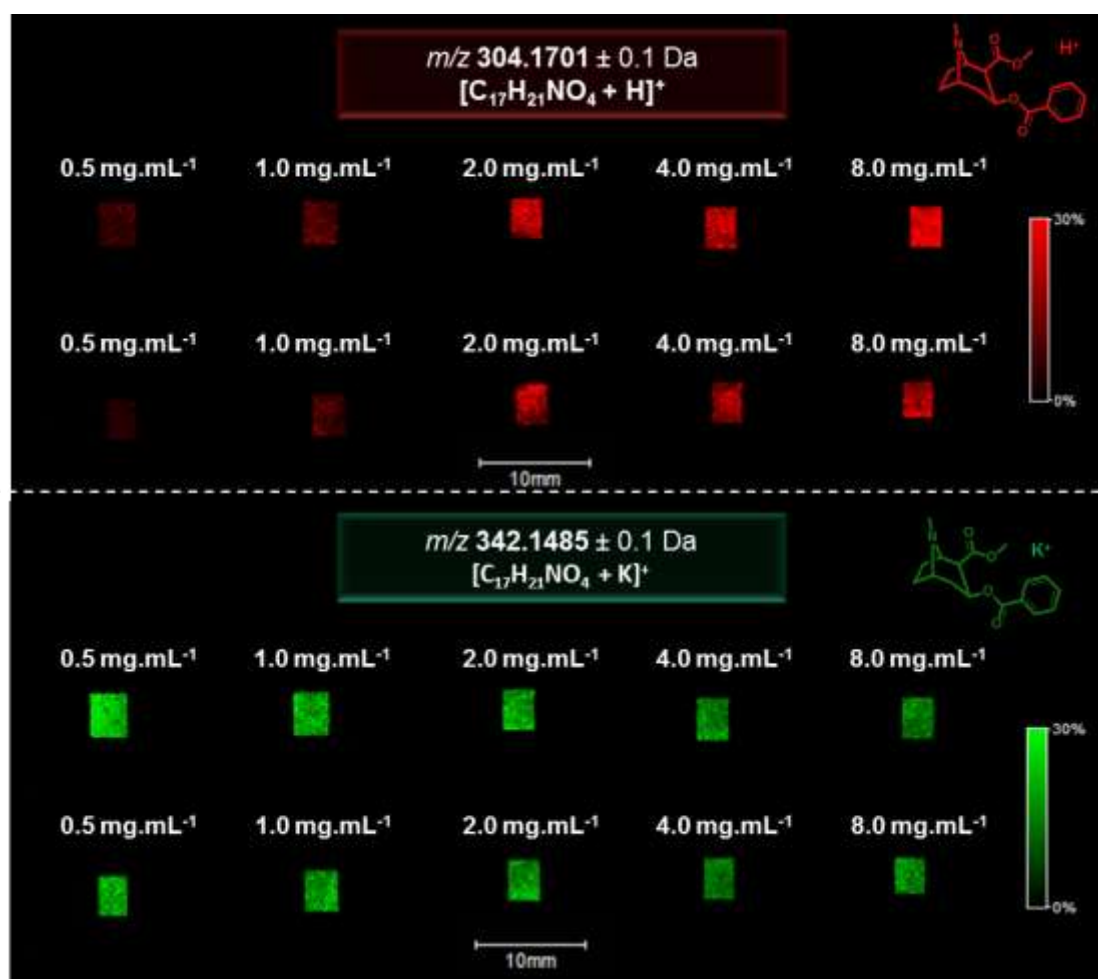


Figura 9. MALDI(+) *imaging* MS mostrando a distribuição de cocaína protonada (m/z 304, vermelho) e com aduto de potássio (m/z 342, verde) em cinco diferentes concentrações (0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg mL⁻¹). Fonte: Própria autora.

Após a otimização do método de ionização do MALDI(+)IMS, $\frac{1}{2}$ da folha de coca (correspondendo a uma área de 7,5 cm² e com resolução espacial de 150×150 μ m), **Figura 1e**, foi analisada e os sinais de m/z 304,1265 e 342,1502 monitorados ($[C_{17}H_{21}NO_4 + H]^+$, cor vermelho, **Figura 10a**; e $[C_{17}H_{21}NO_4 + K]^+$, cor verde, **Figura 10b**, respectivamente). Nota-se, nas duas formas detectadas, uma distribuição de ambos os sinais por toda extensão do tecido vegetal, com pequenas regiões de maior abundância, principalmente observada na parte central da folha (para a molécula cationizada) e próxima ao meio da folha (para a molécula protonada).

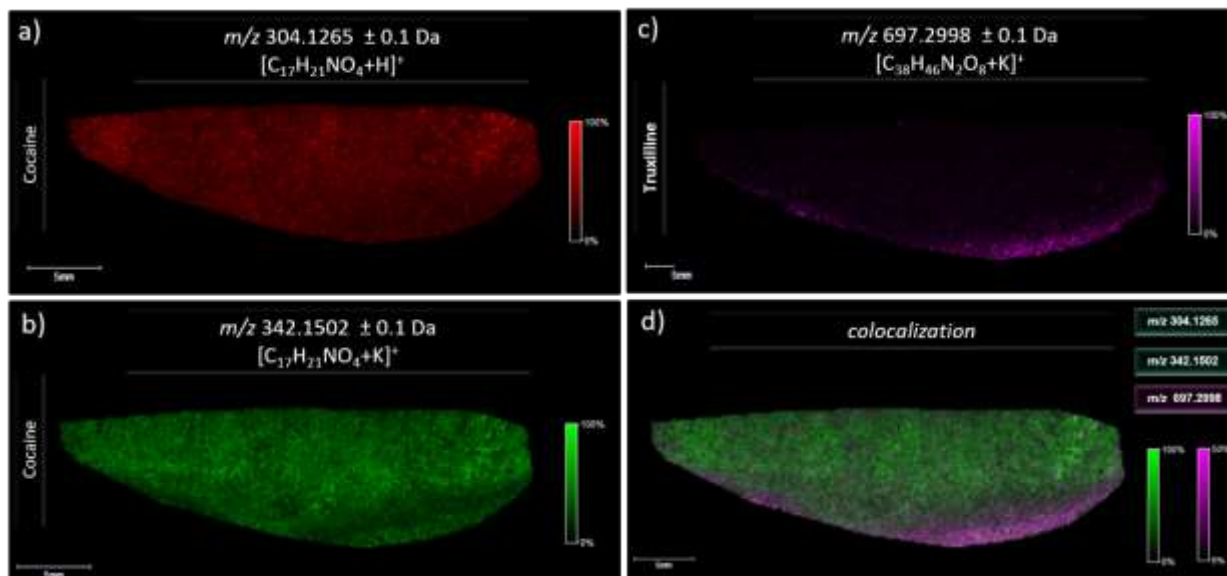


Figura 10. MALDI *imaging*, modo positivo, mostrando a distribuição dos compostos na superfície da folha coca, com matriz DHB em uma concentração de 2,0 mg mL⁻¹: **a)** cocaína protonada (vermelho), m/z 304,1265, **b)** cocaína cationizada (verde), m/z 342,1502, **c)** truxilina com aduto de potássio, m/z 697,2998 (rosa), e **d)** *colocalization* dos três sinais (cocaína protonada e cationizada na cor verde e truxilina com aduto de potássio na cor rosa). Fonte: Própria autora.

Além da cocaína, a técnica de MALDI(+)IMS foi utilizada para monitorar a distribuição espacial da truxilina, detectada na sua forma cationizada, ($[C_{38}H_{46}N_2O_8+K]^+$, m/z 697,2949, cor ficta rosa, **Figura 10c**), onde mostrou distribuição e maior abundância nas regiões periféricas no contorno do tecido foliar. A formação das truxilinas ocorre por fotodimerização, 2+2 das *cis*- e/ou *trans*-cinamoilcocaína, **Figura 11**.^{37,46,47} Essa cicloadição é naturalmente favorecida pela reação fotoquímica promovida pela radiação solar ultravioleta (UV) que a planta é exposta durante seu cultivo. Lydon e colaboradores, 2009, sugerem que as truxilinas possam inferir a respeito da origem geográfica do plantio da coca devido principalmente a relação dos níveis de UV com a elevação e a latitude (aumento de quase 1% no UV-B com uma alteração de 1 grau na latitude), e ao fato da radiação UV promover a produção dessas moléculas.⁴⁶

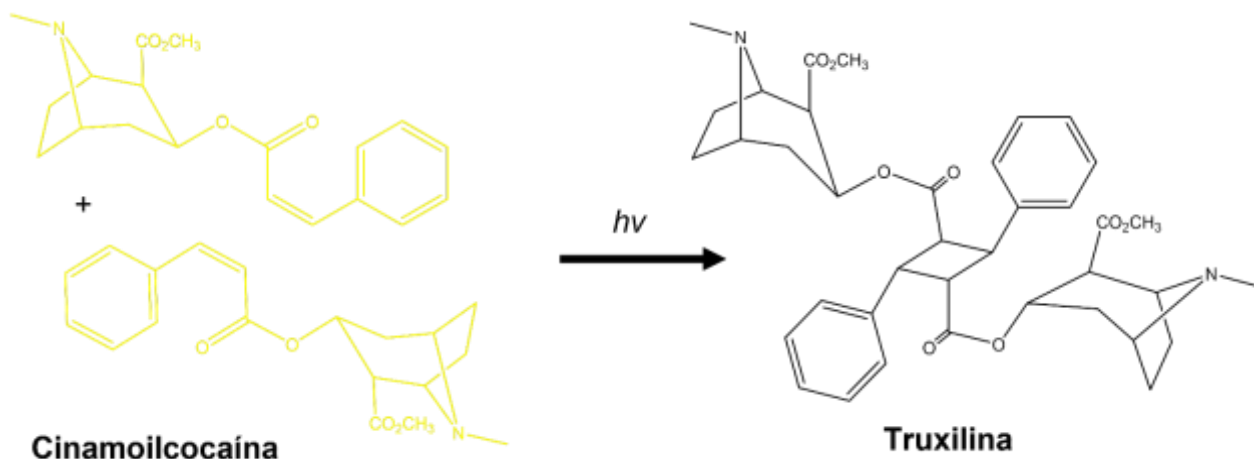


Figura 11. Demonstração da síntese natural da molécula truxilina a partir de duas moléculas de cinamoilcocaína por fotodimerização. Fonte: Própria autora.

Na **Figura 10d** é mostrada a imagem obtida do *colocalization* dos três sinais; molécula da cocaína protonada e cationizada, cor ficta única verde e truxilline representado pela cor ficta rosa, onde a maior abundância da detecção das moléculas de truxilina nas regiões periféricas pode ser justificada pela maior exposição natural das bordas das folhas ao sol ainda na planta.

Além disso, o *colocalization* dos sinais da molécula truxilina e de sua precursora cinamoilcocaína ($[C_{19}H_{23}NO_4+K]^+$, de m/z 368,1303, cor ficta amarela), **Figura 12a**, também evidencia a maior abundância da truxilina nas regiões periféricas da folha (área mais exposta a incidência da radiação) e de sua precursora nesta mesma região e de forma mais homogênea nas partes mais internas e centrais (regiões naturalmente mais preservadas da incidência da radiação solar), como também observado por Schmidt e colaboradores.⁴⁸

Ainda, é possível notar que a adição da matriz à folha resultou em uma imagem química com menor intensidade da cor ficta rosa, referente à molécula da truxilina, **Figura 10d**, diferentemente da análise por LDI(+) IMS, **Figura 4d**, que possui incidência direta do laser (355 nm) e com isso maior abundância, representada pela intensidade da cor ficta rosa na imagem obtida, ressaltando a importância da utilização da matriz nos estudos de imageamento para preservação da amostra e sua composição natural.⁵

Ademais, a distribuição da molécula benzoilecgonina, alcaloide tropânico, composto endógeno da planta e também subproduto da hidrólise da cocaína que pode ocorrer durante o armazenamento, ainda que pouco explorado a respeito da sua

disponibilidade nas folhas de coca em comparação a sua determinação como o principal metabólito da droga de abuso cocaína em fluidos biológicos,⁴⁹ foi monitorada ($[C_{16}H_{19}NO_4+K]^+$, de m/z 328,0747, cor ficta cinza), **Figura 12b**, e, semelhantemente à molécula de cocaína, uma distribuição homogênea por toda superfície foliar analisada pode ser observada.

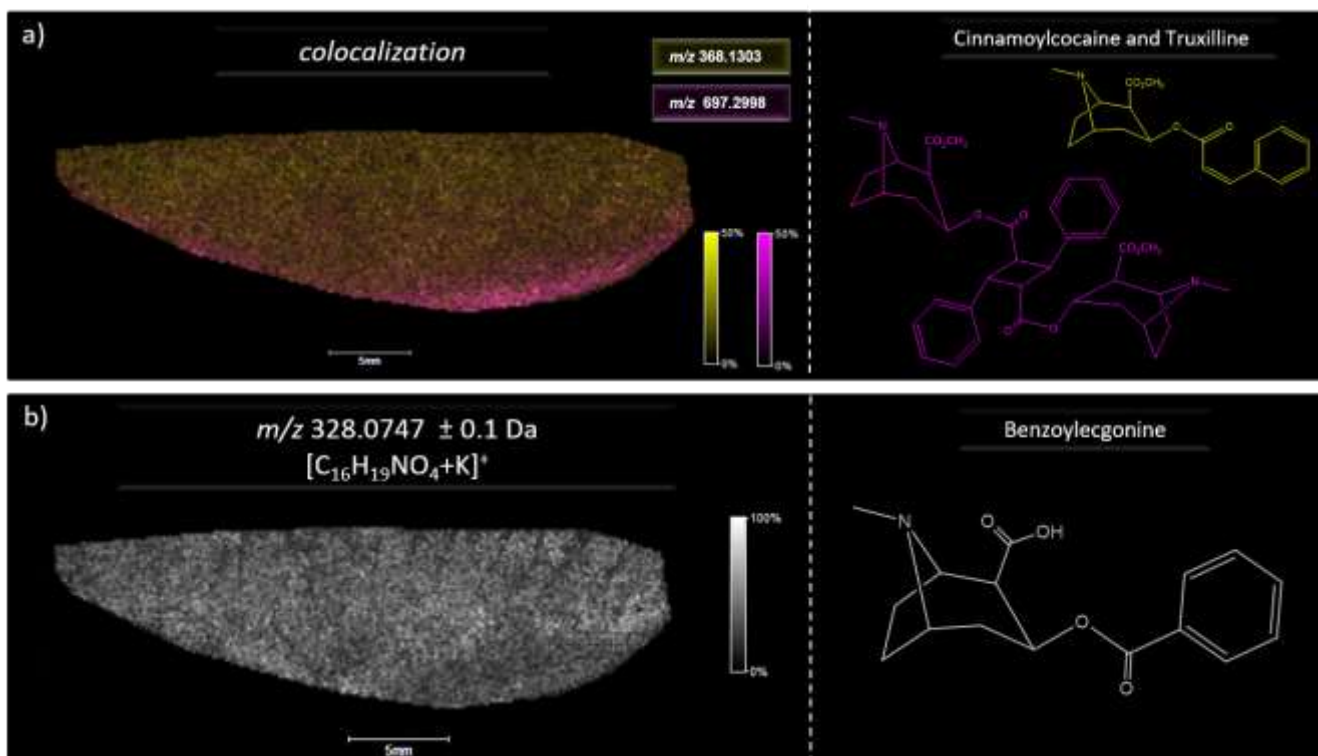


Figura 12. MALDI *imaging*, modo positivo, mostrando a distribuição dos compostos na superfície da folha coca, com matriz DHB em uma concentração de 2,0 mg mL⁻¹. **a)** *colocalization*: moléculas cationizadas cinamoilcocaína (amarelo) e truxilina (rosa), e **b)** benzoilecgonina cationizada (cinza). Fonte: Própria autora.

Além disso, seis flavonóides,⁵⁰⁻⁵⁵ compostos polifenólicos, também foram monitorados na folha de *Erythroxylum coca*, **Figuras 13a-f**. A molécula isoquercitrina, detectada na forma cationizada $[C_{21}H_{20}O_{12}+K]^+$, m/z 503,0444, DBE = 12, **Figura 13a**, mostrou na imagem por MALDI IMS, dois pontos de maior abundância desse composto na região central. Os demais flavonoides; kaempferol ($[C_{25}H_{26}O_{14}+K]^+$, m/z 589,0703, DBE = 11), herbacetina ($[C_{25}H_{26}O_{15}+K]^+$, m/z 605,0818, DBE = 11), carlinosídeo ($[C_{26}H_{28}O_{15}+K]^+$, m/z 619,1344, DBE = 13), peltatosídeo ($[C_{26}H_{28}O_{16}+K]^+$, m/z 635,1438, DBE = 13) e rutina ($[C_{27}H_{30}O_{16}+K]^+$, m/z 649,0905, DBE = 13), **Figuras 13b-f**, respectivamente, mostraram maior abundância de detecção nas regiões

periféricas da folha, e para os flavonoides peltatosídeo e rutina, **Figuras 13e e f**, na parte central do tecido analisado, na mesma região dos flavonoide isoquercitrina, **Figura 13 a**, porém menos abundante.

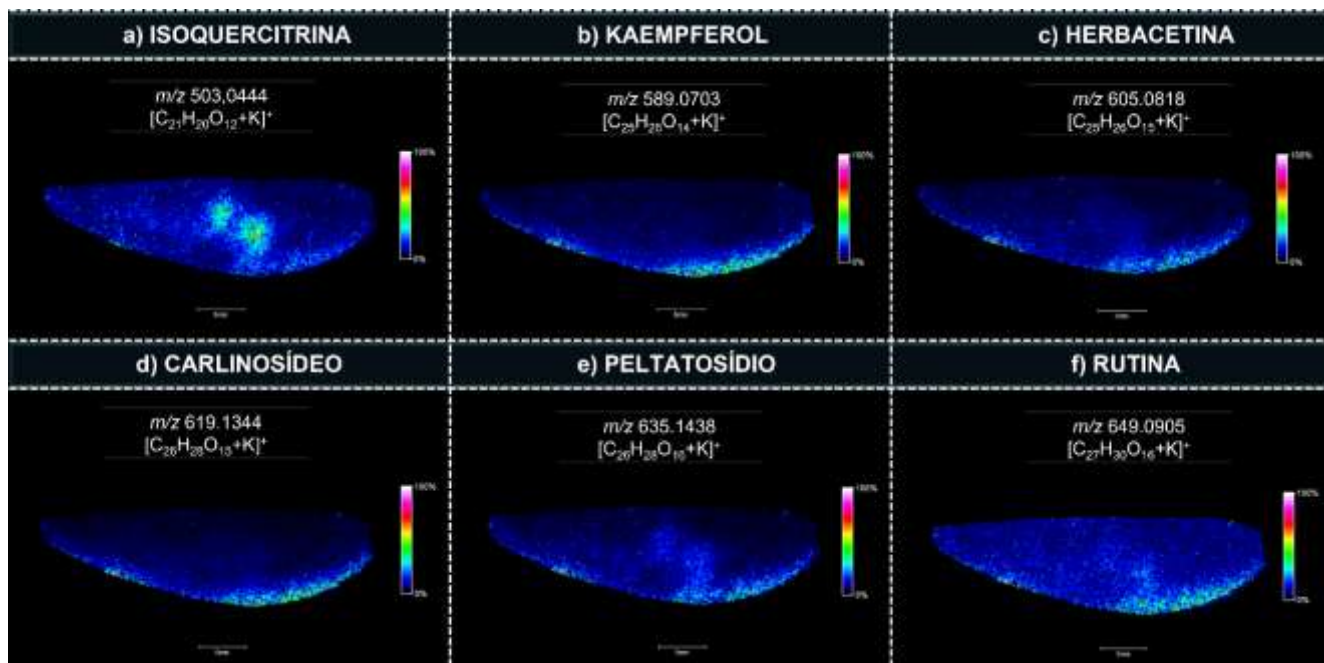


Figura 13. MALDI *imaging*, modo positivo, mostrando a distribuição dos flavonoides: **a)** Isoquercitrina, **b)** kaempferol, **c)** herbacetina, **d)** carlinosídeo, **e)** peltatosídeo e **f)** rutina na superfície da folha coca, com matriz DHB em uma concentração de 2,0 mg mL⁻¹. Fonte: Própria autora.

Sequencialmente, com intuito de melhorar a qualidade e intensidade do sinal de outros compostos alcaloides presentes na planta, bem como avaliar o efeito dos solventes na extração da cocaína, foi proposto dividir a mesma folha (2,5 × 1,5 cm) em quatro partes, **Figura 1d**, e lavá-las com os solventes orgânicos metanol, acetonitrila, diclorometano e tolueno antes das análises por LDI(+) IMS, **Figura 14a-d**.⁹

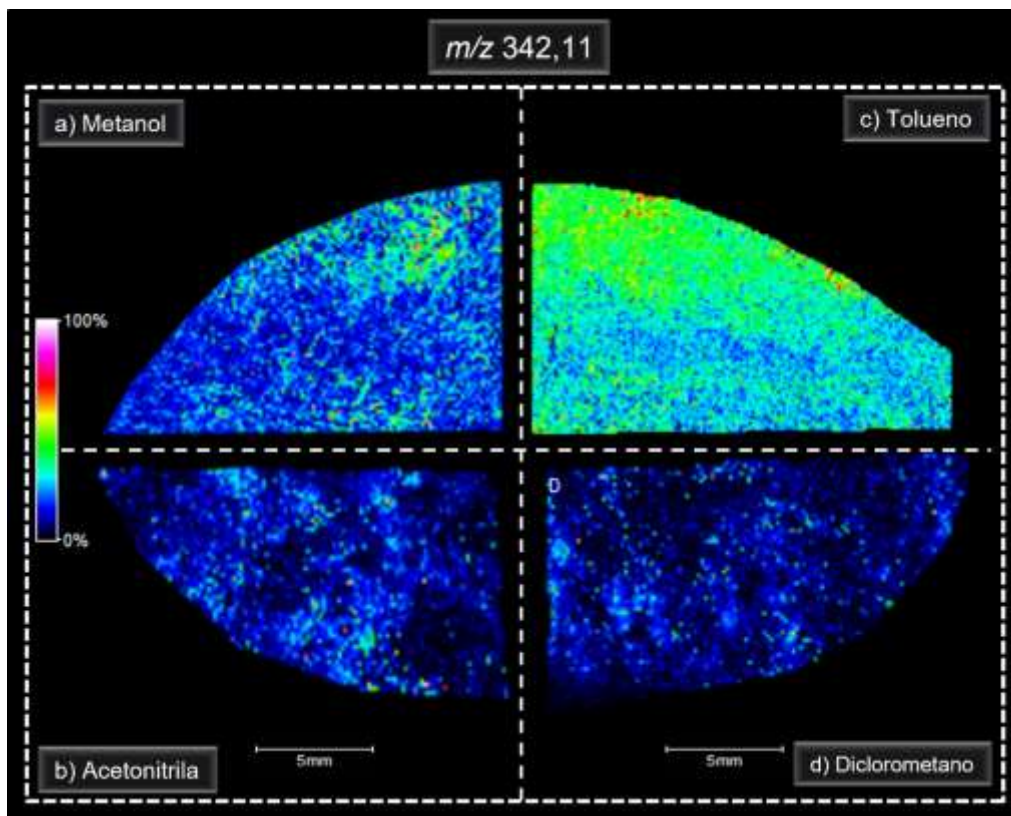


Figura 14. LDI *imaging* de folhas de coca lavadas com os solventes: **a)** metanol, **b)** acetonitrila, **c)** tolueno e **d)** diclorometano, com resolução de $150 \times 150 \mu\text{m}$. Fonte: Própria autora.

O monitoramento da cocaína, como íon m/z 342 foi avaliado, onde uma maior eficiência da remoção do composto pode ser observada usando o solvente acetonitrila e diclorometano, **Figuras 14b e d**. Entretanto, não houve aumento significativo da abundância de outros alcaloides presentes nas folhas de coca descritos na literatura. A molécula cocaína representa cerca de 80% dos alcaloides presentes na composição química da planta *Erythroxylum coca*, e sua remoção pode resultar na retirada de componentes com características semelhantes, tais como; estruturais, propriedades físico-químicas, entre outros.¹⁹⁻²⁵ Portanto, a utilização de solventes com intuito de diminuir o efeito de supressão iônica da cocaína na ionização por LDI(+) sobre outros alcaloides, não resultou em uma modificação significativa nesse estudo.

A técnica de IMS também foi testada para avaliar a presença do alcaloide cocaína nas regiões internas do tecido vegetal. Para isso, um corte horizontal foi realizado, $50 \mu\text{m}$, na folha de coca a -20°C . Após o corte, imagens de LDI(+) IMS foram obtidas com resolução espacial de $50 \mu\text{m}$, **Figura 15a-b**.

Observa-se a detecção do sinal referente a molécula cocaína, nas suas duas formas, na imagem do *colocalization* dos sinais de m/z 304 (vermelho) e 342 (verde), **Figura 15a**, onde ambas são abundantes nas mesmas regiões, destacando uma maior intensidade de cor para o m/z 342, referente ao alcaloide com aduto de potássio. Além disso, a **Figura 5** corrobora com o resultado obtido nessa análise, visto que na região abaxial da folha há detecção da distribuição química da cocaína, mesmo que em menor intensidade quando comparada à região adaxial.

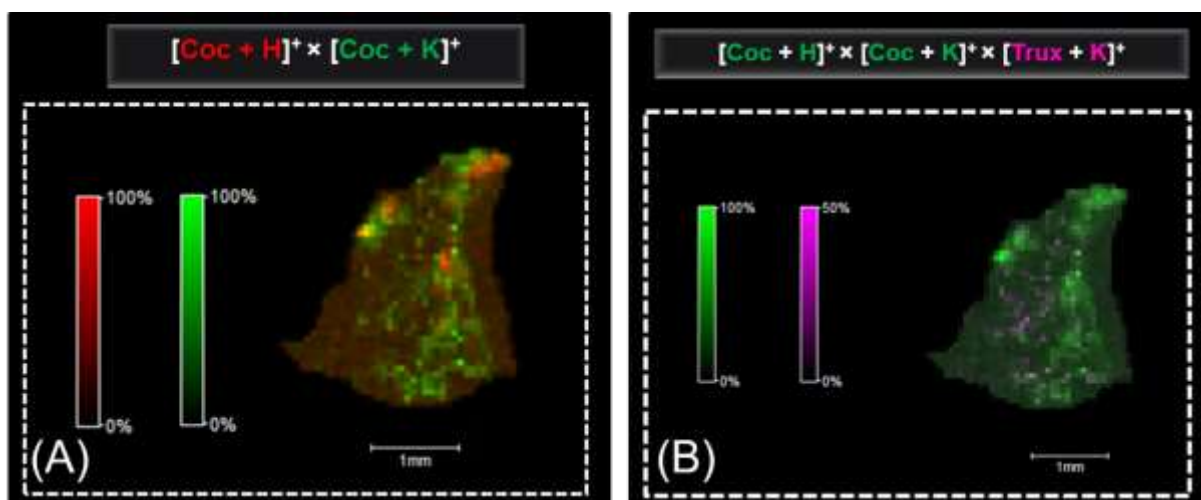


Figura 15. LDI(+) *imaging* da folha de coca, resolução de $50 \times 50 \mu\text{m}$, pós secção de corte de $50 \mu\text{m}$: **a)** *colocalization* da molécula cocaína protonada (vermelha) e com aduto de potássio (verde); **b)** distribuição espacial da molécula cocaína (protonada e com aduto de potássio) e da molécula truxilina. Fonte: Própria autora.

O *colocalization* dos sinais da cocaína e truxilina, **Figura 15b**, na folha de coca após seccionamento, mostram a detecção da truxilina até nas regiões mais internas do tecido foliar, ainda que em menor abundância, indicada pela intensidade da cor ficta rosa, comparada a cocaína, representada na cor ficta verde. Portanto, a avaliação da distribuição química das truxilinas por análise direta mostrou-se uma alternativa eficiente frente a outras técnicas convencionais, como por exemplo a cromatografia gasosa, pois além da alta massa molecular, as truxilinas são moléculas termoinstáveis e podem sofrer degradação térmica, necessitando de etapa anterior de derivatização ou outro método de preparação da amostra para sua preservação.

Por fim, foi avaliado por LDI(+)IMS na região interna do tecido foliar, a distribuição dos mesmos seis flavonoides (isoquercitrina, kaempferol, herbacetina, carlinosídeo, peltatosídeo e rutina) estudados anteriormente na superfície da folha de

coca. Vale ressaltar que todos os seis flavonoides citados nesse estudo possuem atividades biológicas registradas por outros autores na literatura.⁵⁰⁻⁵⁵

Na **Figura 16a-f** as imagens obtidas mostram similaridade na região de detecção mais abundante dos flavonoides, destacando maior abundância da molécula peltatosídeo frente as demais monitoradas, **Figura 16e**. Além disso, esse flavonoide, detectado também em outros produtos naturais, trata-se de um análogo da quercetina, que possui efeitos farmacológicos, incluindo atividades analgésicas.

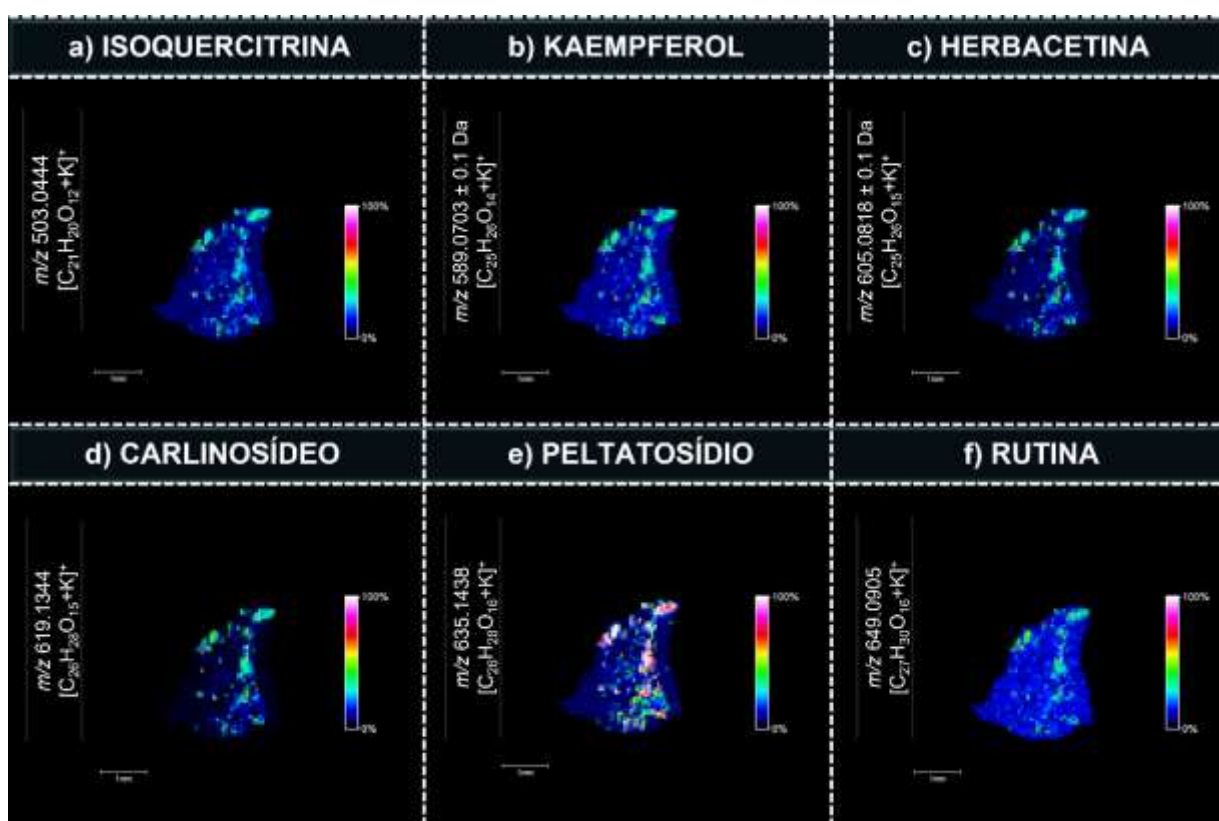


Figura 16. LDI(+) *imaging* de folha de coca, resolução de 50×50 µm, pós secção de corte de 50µm, monitorando moléculas flavonoides: **a)** isoquercitrina, **b)** kaempferol, **c)** herbacetina, **d)** carlinosídeo, **e)** peltatosídeo e **f)** rutina. Fonte: Própria autora.

CONCLUSÕES

A matriz DHB foi a mais eficiente no processo de dessorção e ionização do alcaloide cocaína monitorado entre as três testadas nesse estudo: CHCA, DHB e MBT. A menor concentração com maior eficiência de ionização foi a de 2 mg mL⁻¹, entre as cinco concentrações avaliadas (0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg mL⁻¹). Porém, resultados obtidos com concentração ≥ 20 mg mL⁻¹ também poderiam ser úteis em estudos da distribuição de alcaloide na superfície foliar de coca. No geral, a adição da matriz MALDI possibilitou a preservação da amostra e de sua histologia, e com isso foi possível observar maior abundância de detecção e distribuição espacial do alcaloide cocaína em folhas de coca, bem como de outros alcaloides como a benzoilecgonina e cinamoilcocaína nas regiões mais centrais e internas, e a truxilina na região periférica ou de contorno foliar. Ainda, foram avaliadas a distribuição de seis flavonoides mais abundantes nas folhas de *Erythroxylum* coca que possuem atividades biológicas citadas por outros pesquisadores. Também, neste estudo, a lavagem da folha de coca com solventes orgânicos: metanol, acetonitrila, diclorometano e tolueno com intuito de reduzir o efeito de supressão iônica não apresentou resultado significativo. Por fim, uma secção de corte horizontal, 50 μ m, realizada na folha de coca, possibilitou estudar a distribuição da cocaína nas regiões mais internas do tecido foliar. Portanto, tais comprovações que vão desde a aplicabilidade do imageamento químico por MALDI-FT-ICR IMS em folhas de coca, perpassando etapas fundamentais para o desempenho do estudo, como a avaliação da melhor matriz e concentração, que resultam no monitoramento da distribuição espacial dos compostos na superfície foliar, asseveram a evolução no campo da alcaloideômica e contribuem para o estado da arte da área de imageamento químico de tecidos vegetais.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, e projetos: CAPES (23038.007083/2014-40), CNPq/FAPES Nº 23/2018 - Programa de Apoio a Núcleos Emergentes – PRONEM – Outorga 597/2018), e CNPq (305359/2017-7 e 422555/2018-5). Agradecemos ao INCT Ciências Forenses pela bolsa, ao Núcleo de Competências em Química do Petróleo - NCQP e LabPetro pelo uso de suas instalações, e as Polícias Civil do ES e Federal do RS pelo fornecimento das amostras.

Artigo

O artigo apresentado “PARTE III – ARTIGO CIENTÍFICO II” encontra-se publicado na *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, volume 32(4), edição de março/2021. Link para acesso: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jasms.0c00449>

REFERÊNCIAS – PARTE III

1. KOMPAUER, M., HEILES, S., SPENGLER, B. Atmospheric pressure MALDI mass spectrometry imaging of tissues and cells at 1.4- μ m lateral resolution. *Nat. Methods*, **14**(1), 90, 2017.
2. KASPAR, S., PEUKERT, M., SVATOS, A., MATROS, A., MOCK, H. P. MALDI-imaging mass spectrometry—an emerging technique in plant biology. *Proteomics*, **11**(9), 1840, 2011.
3. DOS SANTOS, N. A., DE SOUZA, L. M., PINTO, F. E., MACRINO, C. D. J., DE ALMEIDA, C. M., MERLO, B. B., ROMÃO, W. LDI and MALDI-FTICR imaging MS in Cannabis leaves: optimization and study of spatial distribution of cannabinoids. *Anal. Methods*, **11**(13), 1757, 2019.
4. VRKOSLAV, V., MUCK, A., CVAČKA, J., SVATOŠ, A. MALDI imaging of neutral cuticular lipids in insects and plants. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **21**(2), 220, 2010.
5. BJARNHOLT, N., LI, B., D'ALVISE, J., JANFELT, C. Mass spectrometry imaging of plant metabolites—principles and possibilities. *Nat. Prod. Rep.*, **31**(6), 818, 2014.
6. ESQUENAZI, E., YANG, Y. L., WATROUS, J., GERWICK, W. H., DORRESTEIN, P. C. Imaging mass spectrometry of natural products. *Nat. Prod. Rep.*, **26**(12), 1521, 2009.
7. KUWAYAMA, K., YAMAMURO, T., TSUJIKAWA, K., MIYAGUCHI, H., KANAMORI, T., IWATA, Y. T., INOUE, H. Utilization of matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry to search for cannabis in herb mixtures. *Anal. Bioanal. Chem.*, **406**(19), 4789, 2014.
8. HORN, P. J., SILVA, J. E., ANDERSON, D., FUCHS, J., BORISJUK, L., NAZARENUS, T. J., CHAPMAN, K. D. Imaging heterogeneity of membrane and storage lipids in transgenic *C. amelina sativa* seeds with altered fatty acid profiles. *Plant J.*, **76**(1), 138, 2013.
9. KALETAŞ, B. K., VAN DER WIEL, I. M., STAUBER, J., DEKKER, L. J., GÜZEL, C., KROS, J. M., HEEREN, R. M. Sample preparation issues for tissue imaging by imaging MS. *Proteomics*, **9**(10), 2622, 2009.
10. GRASSL, J., TAYLOR, N. L., MILLAR, A. Matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging and its development for plant protein imaging. *Plant Methods*, **7**(1), 21, 2011.
11. LI, B., HANSEN, S. H., JANFELT, C. Direct imaging of plant metabolites in leaves and petals by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.*, **348**, 15, 2013.
12. HILLENKAMP, F., PETER-KATALINIC, J. **MALDI MS: a practical guide to instrumentation, methods and applications**, John Wiley & Sons, 2013.
13. NAZIM BOUTAGHOU, M., COLE, R. B. 9, 10-Diphenylanthracene as a matrix for MALDI-MS electron transfer secondary reactions. *J. Mass Spectrom.*, **47**(8), 995, 2012.

14. ANDERSON, D. M., CAROLAN, V. A., CROSLAND, S., SHARPLES, K. R., CLENCH, M. R. Examination of the distribution of nicosulfuron in sunflower plants by matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **23**(9), 1321, 2009.
15. HORN, P. J., KORTE, A. R., NEOGI, P. B., LOVE, E., FUCHS, J., STRUPAT, K., CHAPMAN, K. D. Spatial mapping of lipids at cellular resolution in embryos of cotton. *Plant Cell*, **24**(2), 622, 2012.
16. BRUCE, N. C. **Biotechnology: A Multi-volume Comprehensive Treatise**, 1, 326, 2008.
17. DE SOUZA, L. M., RODRIGUES, R. R., SANTOS, H., COSTA, H. B., MERLO, B. B., FILGUEIRAS, P. R., ROMÃO, W. A survey of adulterants used to cut cocaine in samples seized in the Espírito Santo State by GC–MS allied to chemometric tools. *Sci. Justice*, **56**(2), 73, 2016.
18. ROCHA, W. W., LEITE, J. D. A., CORREIA, R. M., TOSATO, F., MADEIRA, N. C., FILGUEIRAS, P. R., ROMÃO, W., NETO, Á. C. Quantification of cocaine and its adulterants by nuclear magnetic resonance spectroscopy without deuterated solvents (No-D qNMR). *Anal. Methods*, **10**(15), 1685, 2018.
19. MALDANER, A. O., BOTELHO, É. D., ZACCA, J. J., MELO, R. C., COSTA, J. L., ZANCANARO, I., PAIXÃO, T. R. Chemical profiling of street cocaine from different brazilian regions. *J. Braz. Chem. Soc.*, **27**(4), 719, 2016.
20. DIAS, H. J., BENTO, M. V., DA SILVA, É. H., SATURNINO-JÚNIOR, A., DE OLIVEIRA, M. F., VESSECCHI, R., CROTTI, A. E. Gas-phase fragmentation reactions of protonated cocaine: new details to an old story. *J. Mass Spectrom.*, **53**(3), 203, 2018.
21. BAUER, I. Travel medicine, coca and cocaine: demystifying and rehabilitating Erythroxylum—a comprehensive review. *Trop. Diseases Trav. Med. Vaccines*, **5**(1), 1, 2019.
22. RESTREPO, D. A., SAENZ, E., JARA-MUÑOZ, O. A., CALIXTO-BOTÍA, I. F., RODRÍGUEZ-SUÁREZ, S., ZULETA, P., D'AURIA, J. C. Erythroxylum in focus: an interdisciplinary review of an overlooked genus. *Molecules*, **24**(20), 3788, 2019.
23. JOHNSON, E. L., EMCHE, S. D. Variation of alkaloid content in Erythroxylum coca leaves from leaf bud to leaf drop. *Ann. Bot.*, **73**(6), 645, 1994.
24. JOHNSON, E. L. Content and distribution of Erythroxylum coca leaf alkaloids. *Ann. Bot.*, **76**(4), 331, 1995.
25. JENKINS, A. J., LLOSA, T., MONTROYA, I., CONE, E. J. Identification and quantitation of alkaloids in coca tea. *Forensic Sci. Int.*, **77**(3), 179, 1996.
26. BIERI, S., BRACHET, A., VEUTHEY, J. L., CHRISTEN, P. Cocaine distribution in wild Erythroxylum species. *J. Ethnopharmacol.*, **103**(3), 439, 2006.
27. MARÍN-SÁEZ, J., ROMERO-GONZÁLEZ, R., FRENICH, A. G. Effect of tea making and boiling processes on the degradation of tropane alkaloids in tea and pasta samples contaminated with Solanaceae seeds and coca leaf. *Food Chem.*, **287**, 265, 2019.
28. VESSECCHI, R., LOPES, N. P., GOZZO, F. C., DÖRR, F. A., MURGU, M., LEBRE, D. T., RIVEROS, J. M. Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa. *Quím. Nova*, **34**, 1875, 2011.
29. SONG, D., ZHANG, S., KOHLHOF, K. Determination of a trace amount of cocaine on a bank note by gas chromatography-positive ion chemical-ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **731**(1–2), 355, 1996.
30. HU, B., PENG, X., YANG, S., GU, H., CHEN, H., HUAN, Y., QIAO, X. Fast quantitative detection of cocaine in beverages using nanoextractive electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **21**(2), 290, 2010.

31. DE CARVALHO, T. C., TOSATO, F., SOUZA, L. M., SANTOS, H., MERLO, B. B., ORTIZ, R. S., ROMÃO, W. Thin layer chromatography coupled to paper spray ionization mass spectrometry for cocaine and its adulterants analysis. *Forensic Sci. Int.*, **262**, 56, 2016.
32. CLAUWAERT, K., DECAESTECKER, T., MORTIER, K., LAMBERT, W., DEFORCE, D., VAN PETEGHEM, C., VAN BOCXLAER, J. The determination of cocaine, benzoylecgonine, and cocaethylene in small-volume oral fluid samples by liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.*, **28**(8), 655, 2004.
33. MØLLER, J. K., CATHARINO, R. R., EBERLIN, M. N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of essential oils: Spices from the Labiatae family. *Food Chem.*, **100**(3), 1283, 2007.
34. NASCIMENTO, I. R., COSTA, H. B., SOUZA, L. M., SOPRANI, L. C., MERLO, B. B., ROMÃO, W. Chemical identification of cannabinoids in street marijuana samples using electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry. *Anal. Methods*, **7**(4), 1415, 2015.
35. VON ROEPENACK-LAHAYE, E., DEGENKOLB, T., ZERJESKI, M., FRANZ, M., ROTH, U., WESSJOHANN, L., CLEMENS, S. Profiling of Arabidopsis secondary metabolites by capillary liquid chromatography coupled to electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Plant Physiol.*, **134**(2), 548, 2004.
36. DE CARVALHO, T. C., TOSATO, F., SOUZA, L. M., SANTOS, H., MERLO, B. B., ORTIZ, R. S., ROMÃO, W. Thin layer chromatography coupled to paper spray ionization mass spectrometry for cocaine and its adulterants analysis. *Forensic Sci. Int.*, **262**, 56, 2016.
37. BOUCHOUX, G. From the mobile proton to wandering hydride ion: mechanistic aspects of gas-phase ion chemistry. *J. Mass Spectrom.*, **48**(4), 505, 2013.
38. NIESSEN, W. M. **Interpretation of MS-MS mass spectra of drugs and pesticides**, John Wiley & Sons, 2017.
39. THOMAS, A., CHARBONNEAU, J. L., FOURNAISE, E., CHAURAND, P. Sublimation of new matrix candidates for high spatial resolution imaging mass spectrometry of lipids: enhanced information in both positive and negative polarities after 1, 5-diaminonaphthalene deposition. *Anal. Chem.*, **84**(4), 2048, 2012.
40. CORNETT, D. S., REYZER, M. L., CHAURAND, P., CAPRIOLI, R. M. MALDI imaging mass spectrometry: molecular snapshots of biochemical systems. *Nat. Methods*, **4**(10), 828, 2007.
41. SCHILLER, J., SÜß, R., FUCHS, B., MÜLLER, M., PETKOVIĆ, M., ZSCHÖRNIG, O., WASCHIPKY, H. The suitability of different DHB isomers as matrices for the MALDI-TOF MS analysis of phospholipids: which isomer for what purpose? *Eur. Biophys. J.*, **36**(4-5), 517, 2007.
42. HUANG, P., HUANG, C. Y., LIN, T. C., LIN, L. E., YANG, E., LEE, C., CHOU, P. T. Toward the Rational Design of Universal Dual Polarity Matrix for MALDI Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, **92**(10), 7139, 2020.
43. BURTON, R. D., WATSON, C. H., EYLER, J. R., LANG, G. L., POWELL, D. H., AVERY, M. Y. Proton affinities of eight matrices used for matrix-assisted laser desorption/ionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **11**(5), 443, 1997.
44. JEANVILLE, P. M., ESTAPÉ, E. S., DE JEANVILLE, I. T. N. The effect of liquid chromatography eluents and additives on the positive ion responses of cocaine, benzoylecgonine, and ecgonine methyl ester using electrospray ionization. *Int. J. Mass Spectrom.*, **227**(2), 247, 2003.

45. CROUCH, D. J., ALBURGES, M. E., SPANBAUER, A. C., ROLLINS, D. E., MOODY, D. E., CHASIN, A. A. Analysis of cocaine and its metabolites from biological specimens using solid-phase extraction and positive ion chemical ionization mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.*, **19**(6), 352, 1995.
46. LYDON, J., CASALE, J. F., KONG, H., SULLIVAN, J. H., DAUGHTRY, C. S., BAILEY, B. The effects of ambient solar UV radiation on alkaloid production by *Erythroxylum novogranatense* var. *novogranatense*. *Photochem. Photobiol.*, **85**(5), 1156, 2009.
47. LURIE, I. S., MOORE, J. M., KRAM, T. C., COOPER, D. A. Isolation, identification and separation of isomeric truxillines in illicit cocaine. *J. Chromatogr. A*, **504**, 391, 1990.
48. SCHMIDT, G. W., JIRSCHITZKA, J., PORTA, T., REICHELT, M., LUCK, K., TORRE, J. C. P., D'AURIA, J. C. The last step in cocaine biosynthesis is catalyzed by a BAHD acyltransferase. *Plant physiol.*, **167**(1), 89, 2015.
49. BRACHET, A., CHRISTEN, P., VEUTHEY, J. L. Focused microwaveassisted extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves. *Phytochem. Anal.*, **13**(3), 162, 2002.
50. VALENTOVÁ, K., VRBA, J., BANCÍŘOVÁ, M., ULRICHOVÁ, J., KŘEN, V. Isoquercitrin: pharmacology, toxicology, and metabolism. *Food Chem. Toxicol.*, **68**, 267, 2014.
51. CALDERON-MONTANO, M., BURGOS-MORÓN, J., PÉREZ-GUERRERO, E., LÓPEZ-LÁZARO, C., M. A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini-Rev. Med. Chem.*, **11**(4), 298, 2011.
52. HARBORNE, J. B. Gossypetin and herbacetin as taxonomic markers in higher plants. *Phytochemistry*, **8**(1), 177, 1969.
53. DAS, S., TEJA, K. C., MUKHERJEE, S., SEAL, S., SAH, R. K., DUARY, B., BHATTACHARYA, S. S. Impact of edaphic factors and nutrient management on the hepatoprotective efficiency of Carlinoside purified from pigeon pea leaves: an evaluation of UGT1A1 activity in hepatitis induced organelles. *Environ. Res.*, **161**, 512, 2018.
54. OLIVEIRA, C., VELOSO, C., FERREIRA, R., LAGE, G., PIMENTA, L., DUARTE, I., ROMERO, T., PEREZ, A. Peltatoside isolated from *Annona crassiflora* induces peripheral antinociception by activation of the cannabinoid system. *Planta Med.*, **83**, 261, 2017.
55. SALUJA, A. K., GANESHPURKAR, A. The Pharmacological Potential of Rutin. *Saudi Pharm. J.*, **25**(2), 149, 2017.