

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

**Análise da distribuição espacial de *designer drugs* em  
selos por MALDI FT-ICR *Imaging* MS**

**MALDI FT-ICR imaging MS analysis of designer drugs distribution in blotter  
papers**

**Camila Medeiros de Almeida**

**Dissertação de Mestrado em Química**

**VITÓRIA  
2020**

Camila Medeiros de Almeida

Dissertação 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 Mestre em Química.

**Área de Concentração:** Química

**Linha de Pesquisa:** Química Forense

**Orientador:** Prof. Dr. Wanderson Romão

**VITÓRIA  
2020**

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

A447a Almeida, Camila Medeiros de, 1991-  
Análise da distribuição espacial de designer drugs em selos por MALDI FT-ICR Imaging MS. / Camila Medeiros de Almeida. - 2020.  
75 f. : il.

Orientador: Wanderson Romão.  
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Exatas.

1. Designer drugs. 2. Derivados feniletilamínicos. 3. Maldi MSI. I. Romão, Wanderson. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Exatas. III. Título.

CDU: 54

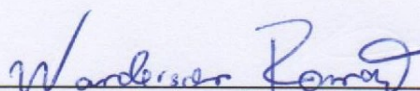
---

Análise da distribuição espacial de *designer drugs* em selos por  
MALDI FT-ICR *Imaging MS*

Camila Medeiros de Almeida

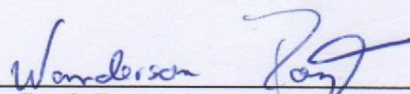
Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da  
Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do  
grau de Mestre em Química.

Aprovada em 18 de fevereiro de 2020 por:




---

Prof. Dr. Wanderson Romão  
Instituto Federal do Espírito Santo  
Orientador



---

Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes<sup>1</sup>  
Universidade de São Paulo



---

Prof. Dr. Warley de Souza Borges  
Universidade Federal do Espírito Santo

---

<sup>1</sup> Em conformidade com as normas prescritas na Portaria Normativa PRPPG/ UFES nº 02/2016, a assinatura do membro externo (Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes) será representada neste documento pela respectiva assinatura do Presidente da comissão julgadora, o Prof. Dr. Wanderson Romão.

À toda minha família, em especial meus avós (*in memoriam*), Jarbas e Rachel, por todo apoio e amor.

## AGRADECIMENTOS

A Deus que me deu força para que eu não desistisse no meio do caminho, que foi meu consolo quando as coisas davam errado e minha gratidão quando eu encontrava o caminho certo, toda honra e toda glória a Ti Senhor.

Aos meus pais, Lucas e Valéria, que me deram a vida e me ensinaram a desfrutá-la com dignidade, sempre apoiando todas as minhas escolhas, vocês junto com minha irmã são minha base, com quem eu sei que posso contar em todos os momentos.

A minha irmã Isabela que me ajudou em vários momentos, muitos deles relacionados a esse trabalho. Juntamente ao meu cunhado, Roney, sempre estiveram ao meu lado.

Aos meus avós, Jarbas e Rachel, *in memoriam*, que não viram esse ciclo se concluir, mas que em todos os momentos me deram e continuam me dando forças para nunca desistir, mesmo nos momentos de minha ausência, sempre me entenderam e torciam pela minha vitória.

Aos meus amigos e familiares que entenderam as ausências e nunca deixaram de acreditar em mim.

Ao meu orientador, Wanderson Romão, por todos os ensinamentos, sendo o principal o amor pela ciência e a coragem de enfrentar novos desafios.

Ao Laboratório Petrolômica e Forense por serem muito mais que um simples grupo de pesquisa, afinal, juntos dividimos, o espaço, as cobranças, as tristezas, as experiências e principalmente as alegrias. Vocês tornam meus dias mais felizes.

A Nayara, Lindamara e Fernanda obrigada por me ensinarem e aprenderem junto comigo a técnica MALDI MSI. A Fernandinha e André obrigada pela companhia durante as análises. A Flávia, Rayana, Radigya, João e Dani obrigada pelo compartilhamento e companhia nos congressos. A Clebson, Iago, Victor, Eliane, Natã, Layla, Juliana e Jadson obrigada pela vivência, ensinamentos e companhia. Em especial agradeço à Nayara por me ajudar na finalização desse trabalho e por ser uma parceira no estudo dessa técnica encantadora que é MALDI MSI, e a Deus por colocar pessoas tão especiais na minha vida, sem elas com certeza teria sido muito mais difícil. Muito Obrigada!

Aos professores PPGQUI, por todos os ensinamentos, em especial aos professores Valdemar e Paulo que me auxiliaram em diversos momentos.

Aos membros da banca, os professores Norberto e Warley, por aceitaram o convite e pelas considerações e acréscimo neste trabalho.

À Polícia Civil do Estado do Espírito Santo por fornecer o material para a realização da pesquisa, mediante acordo de cooperação técnico-científico entre a Polícia Civil do Estado do Espírito Santo e o Programa de Pós-Graduação em Química da UFES, nº 1007/2012, processo nº 23068.011398/2012-72.

À CAPES (23038.007083/2014-40, edital pro-forense) e pela bolsa concedida; à FAPES (EDITAL CNPq/FAPES nº 23/2018 - PROGRAMA DE APOIO A NÚCLEOS EMERGENTES - PRONEM) e ao CNPq (445987/2014-6, e 465450/2014- 8).

Ao PPGQUI – UFES, especialmente ao Alex e Michel, por todo suporte durante esses 2 anos.

Ao LabPetro e seus funcionários, Suzy, Carlão, Oscar, Marcos e Maria pela atenção e carinho.

A todos que por algum momento estiveram presente e ajudaram a concretizar esse sonho, o meu MUITO OBRIGADA!

“Faça as coisas o mais simples que você puder, porém não se restrinja às mais simples.”

Albert Einstein

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Estruturas das substâncias psicoativas 2C-X, 25X-NBOH e 25X-NBOMe, em que X pode ser: C, quando o ligante for o Cloro; B, quando o ligante for o Bromo e I, quando o ligante for o Iodo..... 18
- FIGURA 2.** Diferentes selos contendo designer drugs..... 19
- FIGURA 3.** Diagrama esquemático de um espectrômetro de massas.<sup>38</sup> ..... 23
- FIGURA 4.** Estrutura química das substâncias psicoativas encontradas em selos. .25
- FIGURA 5.** Esquema da ionização do substrato (S) por MALDI, utilizando matriz (M).  
..... 27
- FIGURA 6.** Esquema com as principais etapas de uma análise por MALDI MSI: (a) preparação da amostra; (b) aplicação da matriz; (c) subdivisão da área analisada; (d) aquisição dos espectros pontuais; (e) geração das imagens a partir da seleção dos íons..... 29
- FIGURA 7.** Matrizes MALDI utilizadas em estudos forenses: CHCA, DHB, SA, Ditranol, Umbeliferona, MBT, NpCCA, CICC A e PNA. .... 35
- FIGURA 8.** Espectro LDI(+) de sete selos mostrando a presença de designer drugs: (a-f) 25I-NBOMe identificado pelos íons  $[C_{18}H_{22}INO_3+H]^+$  e  $[C_{18}H_{22}INO_3+Na]^+$  de m/z 428,07 e 450,05 respectivamente, e (g) 25I-NBOH, identificado pelos íons  $[C_{17}H_{20}INO_3+H]^+$ ,  $[C_{17}H_{20}INO_3+Na]^+$  e  $[C_{17}H_{20}INO_3+K]^+$  de m/z 414,06 436,04 e 452,01 respectivamente. .... 40
- FIGURA 9.** (a) Espectros LDI(+) MS/MS para o íon de m/z 428 e proposta de mecanismos de fragmentação para os íons detectados: (b) m/z 291; (c) m/z 276; e (d) m/z 306..... 42
- FIGURA 10.** (a) Espectros LDI(+) MS/MS do íon de m/z 414 e propostas de mecanismos de fragmentação para os íons detectados: (b) m/z 291; e (c) m/z 308. .43
- FIGURA 11.** Imagens de MS mostrando a distribuição da molécula 25I-NBOH de m/z 414,05 na superfície da amostra S7: utilizando (a) LDI(+), e (b-c) MALDI(+), (b)

aplicação da matriz CHCA pela pipeta automática (c) aplicação com um pulverizador auxiliado pelo probe da fonte ESI. Espectros de LDI(+) (d) e MALDI(+) (e-f) de suas respectivas imagens, a e b-c, respectivamente. ....45

**FIGURA 12.** Imagens por MALDI(+) MSI da distribuição do composto 25I-NBOMe, m/z 428,07 na superfície da amostra S5 utilizando quatro matrizes diferentes: (a) DHB, (b) SA, (c) TCNQ e (d) CHCA em diferentes concentrações (de 5 a 25 mg.mL<sup>-1</sup>). .....46

**FIGURA 13.** Imagens adquiridas por MALDI(+) MSI da distribuição do 25I-NBOMe de m/z 428,07 na superfície de pedaços de papel filtro de 0.5 cm x 0.5 cm dopado com sete concentrações diferentes de 25I-NBOMe: coluna 1, 0,0125 mg.mL<sup>-1</sup>; coluna 2, 0,025 mg.mL<sup>-1</sup>; coluna 3, 0,0375 mg.mL<sup>-1</sup>; coluna 4, 0,05 mg.mL<sup>-1</sup>; coluna 5, 0,0625 mg.mL<sup>-1</sup>; coluna 6, 0,075 mg.mL<sup>-1</sup> e coluna 7, 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>. Papeis filtro revestidos com a matriz CHCA em cinco concentrações diferentes, exibidas nas linhas: (a) (5 mg.mL<sup>-1</sup>), (b) (10 mg.mL<sup>-1</sup>), (c) (15 mg.mL<sup>-1</sup>), (d) (20 mg.mL<sup>-1</sup>) e (e) (25 mg.mL<sup>-1</sup>). .....48

**FIGURA 14.** (a) Gráfico de barras e (b) Gráfico de dispersão relacionando a intensidade do 25I-NBOMe (m/z 428,07) do espectro médio por pixel em função de sua concentração para cada uma das cinco concentrações da matriz CHCA. A equação de regressão linear para cada concentração de matriz também é exibida. 50

**FIGURA 15.** Gráfico de dispersão mostrando a razão da intensidade do 25I-NBOMe (m/z 428) por 25B- NBOMe (m/z 380) em função de sua concentração em cinco diferentes concentrações da matriz CHCA. A equação de regressão linear para cada concentração de matriz também é apresentada no gráfico. ....51

**FIGURA 16.** Imagens MALDI(+) MSI da distribuição de 25I-NBOMe de m/z 428,07 na frente e no verso dos selos apreendidos (a-f), amostras S1 a S6, revestida com a matriz CHCA na concentração de 25 mg.mL<sup>-1</sup>. .....52

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>TABELA 1.</b> Designer Drugs identificadas em selos por técnicas analíticas.....   | 21 |
| <b>TABELA 2.</b> Identificação de substâncias psicoativas em selos analisados por espectrometria de massas utilizando diversas fontes. .... | 24 |
| <b>TABELA 3.</b> MALDI MSI aplicado a diversas amostras forenses, utilizando diferentes matrizes MALDI. ....                                | 34 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ABDF - bromobenzodifuranilisopropilamina (bromo-Dragonfly)
- ATR-FTIR - *attenuated total reflection fourier transform infrared spectroscopy*
- BZDs - benzodiazepínicos
- CHCA - ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico
- CID - *collision-induced dissociation*
- CI-CCA - ácido 4-cloro- $\alpha$ -cianocinâmico
- DAPPI - *desorption atmospheric pressure photoionization*
- DART - direct analysis in real time
- DHB - ácido 2,5-di-hidroxibenzóico
- DOB - 2,5-dimetoxi-4-bromoanfetamina
- DOC - 2,5-dimetoxi-4-cloroanfetamina
- DSA - direct sample analysis
- EASI - *easy ambient sonic-spray ionization*
- ESI - *electrospray ionization*
- FTIR - *fourier-transform infrared spectroscopy*
- GC-MS - *gas chromatography–mass spectrometry*
- HR-MAS NMR - *high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance*
- HPLC - High-Performance Liquid Chromatography
- LC-ESI-QTOF-MS - *liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole-time of flight-mass spectrometry*
- LC-MS - *Liquid chromatography mass spectrometry*
- LC-QTOF MS - *liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry*
- LDI - *laser desorption ionization*
- LOD - *limit of detection*
- LSD - *Lysergsäurediethylamid*
- MALDI - *matrix-assisted laser desorption/ionization*
- MALDI-FT-ICR - *matrix-assisted laser desorption/ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry*
- MALDI-TOF - *matrix-assisted laser dessorção/ionização time of flight*
- MBT - 2-Mercaptobenzotiazol
- MDMA - 3,4-metilenodioximetanfetamina

MPPP - 4'-metil- $\alpha$ -pirrolidinopropiofenona

MS - *mass spectrometry*

MSI - *mass spectrometry imaging*

NpCCA - Ácido (E) -2-ciano-3- (2-naftil) acrílico

NPS - *new psychoactive substances*

NMR - *nuclear magnetic resonance*

PBP -  $\alpha$ -pirrolidinobutiofenona

PC - ES - Polícia Civil do Espírito Santo

PNA - para-Nitroaniline

PPP -  $\alpha$ -pirrolidinopropiofenona

PVP -  $\alpha$ -pirrolidinovalerofenona

PSI - *paper spray ionization*

SA - ácido sinápico

SNC - sistema nervoso central

SWV - *square wave voltammetry*

TCNQ - 7,7,8,8-tetracianoquinodimetano

TIC - *total ion current*

THC - Tetrahydrocannabinol

TLC - *Thin layer chromatography*

25B-NBOMe - (2- (4-bromo-2,5-dimetoxifenil) -N - [(2- metoxifenil) metil]) etanamina

25C-NBOMe - (2- (4-cloro-2,5-dimetoxifenil) -N - [(2- metoxifenil) metil]) etanamina

25D-NBOMe - 2- (2,5-dimetoxi-4-metilfenil) -N- (2-metoxibenzil) etanamina

25H-NBOMe - 2- (2,5-dimetoxifenil) -N- (2-metoxibenzil) etanamina.

25I-NBOH - (2-[[2- (4-iodo-2,5-dimetoxifenil) etil] amino} metil] fenol

25I-NBOMe - (2- (4-iodo-2,5-dimetoxifenil) -N - [(2- metoxifenil) metil]) etanamina

2C - 2,5-dimetoxifenetilamina

## LISTA DE SÍMBOLOS

cm - centímetro

Da - unidade de massa atômica

Hz - hertz

$\mu$ L - microlitro

$\mu$ m - micrometro

mg - miligrama

mL - mililitro

min - minuto

*m/z* - razão massa carga

n° - número

ng - nanograma

nm - nanômetro

ppm - partes por milhão

psi - libra-força por polegada quadrada

s - segundo

V - Volt

## RESUMO

Os derivados feniletilamínicos, conhecidos como NBOMes, são potentes alucinógenos, frequentemente comercializados como selos. Mudanças em suas estruturas moleculares são constantemente realizadas, como a troca do halogênio ligado ao carbono 4 (C4) ou a substituição do grupo metil por uma hidroxila, observado na modificação do NBOMe e formação do NBOH, sempre conservando os efeitos psicoativos das moléculas. Neste estudo, a técnica de espectrometria de massa (*mass spectrometry* – MS) por ionização/dessorção a laser assistida por matriz, (*matrix-assisted laser desorption/ionization* - MALDI), e espectrometria de massa de imagem (*mass spectrometry imaging* - MSI), acoplado ao espectrômetro de massa de ressonância de íon ciclotrônica com transformada de fourier, foi utilizada para analisar selos contendo 25I- NBOH (2 - ([2- (4-iodo-2,5-dimetoxifenil) etil] amino) metil) fenol,  $m/z$  414,05) e 25I- NBOMe ((2- (4-iodo-2,5-dimetoxifenil) -N - [(2- metoxifenil) metil] etanamina),  $m/z$  428,07). Um estudo de otimização foi realizado para avaliar a aplicação da matriz (pipeta automática *versus* pulverizador assistido por um probe da fonte ESI); o efeito das matrizes (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA), ácido 2,5-di-hidroxibenzóico (DHB), 7,7,8,8-tetracianoquinodimetano (TCNQ) e ácido sinápico(SA)) no processo de ionização e dessorção; e sua concentração (de 5 a 25 mg.mL<sup>-1</sup>). Posteriormente, foi realizado um estudo da distribuição espacial dos derivados NBOMes detectados sobre a superfície da frente e do verso do selo. Os resultados de MALDI MS e MALDI MSI mostraram que o melhor método de aplicação da matriz foi utilizando o pulverizador, no qual permitiu uma detecção homogênea do composto quando comparado a aplicação com a pipeta automática. A matriz CHCA, com concentração  $\geq 15$  mg.mL<sup>-1</sup>, apresentou maior eficiência de ionização do composto 25I-NBOMe, comumente detectado em selos, onde uma distribuição homogênea e intensa foi observada em relação a outras matrizes. A distribuição do composto psicoativo estudado na frente e no verso dos selos analisados mostraram que três apresentavam maior concentração do composto em um dos lados (dois no verso e um na frente), enquanto os demais apresentavam distribuição em ambos os lados.

**Palavras-chave:** *Designer drugs*, 25I-NBOMe, 25I-NBOH, MALDI MSI.

## ABSTRACT

The phenethylamines derivatives, the NBOMes, N-bomb or Smiles, are potent hallucinogens, which are often sold as blotter paper. Changes in their molecular structures are constantly carried out, such as the exchange of halogen in the carbon 4 (C4) or the substitution of the methyl to a hydroxyl, observed in the modification of NBOMe to NBOH. This happens so that the new substances are not classified as illicit and preserved the psychoactive effects of molecules. In order to follow the dynamics of designer drugs market, the use of different analytical methods for the identification of these substances has been a solution. In this study, the matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI MS) and MALDI mass spectrometry imaging (MALDI MSI) were coupled to a Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer (FT-ICR MS) and used to analyze seven blotter papers of NBOMes containing 25I-NBOH (2-([2-(4-iodo-2,5-dimethoxyphenyl) ethyl]amino)methyl) phenol,  $m/z$  414,05) and 25I-NBOMe ((2-(4-iodo-2,5-dimethoxyphenyl)-N-[(2-methoxyphenyl) methyl]ethanamine),  $m/z$  428,07). An optimization study was performed to evaluate the matrix application (pipette versus sprayer assisted by an ESI probe); the matrices ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA), 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB), 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane (TCNQ) and sinapinic acid (SA)) effect in the process of desorption and ionization and their concentration (from 5 to 25 mg.mL<sup>-1</sup>). After, a study of the spatial distribution of the NBOMes derivatives detected in the front and back of the blotter paper surface was performed. MALDI MS and MALDI MSI results showed that the matrix sprayer was the best method for matrix application, which allowed a homogeneous detection of the compound when compared to the pipette application. The CHCA matrix, in a concentration  $\geq 15$  mg.mL<sup>-1</sup>, displayed a higher ionization efficiency of the 25I-NBOMe compound, commonly detected in blotter paper, where an intense distribution was observed in relation to others matrices. The distribution of the active ingredient studied in the front and back between the six blotter papers analyzed showed that the three of them had a higher concentration of the active ingredient in only one of the sides (two in the back and one in the front), while the others presented a similar distribution in both sides.

**Keywords:** Blotter paper, Designer drugs, 25I-NBOMe, 25I-NBOH, MALDI imaging, FT-ICR MS.

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....   | 17 |
| 1.1 <i>Designer drugs</i> .....   | 17 |
| 1.2 Técnicas analíticas para identificação de <i>designer drugs</i> ..... | 20 |
| 1.2.1. Espectrometria de massas .....                                     | 21 |
| 1.2.1.1. MALDI.....   | 26 |
| 1.2.1.2. MALDI <i>Imaging</i> .....                                       | 28 |
| 1.2.1.3. MALDI MSI aplicado à química forense .....                       | 30 |
| 2. OBJETIVOS .....  | 36 |
| 2.1. Geral .....  | 36 |
| 2.2. Específico .....   | 36 |
| 3. METODOLOGIA.....   | 37 |
| 3.1. Amostras e reagentes.....  | 37 |
| 3.2. Preparação das amostras e matrizes .....                             | 37 |
| 3.3. Análise por LDI(+), MALDI(+) e MALDI(+) MSI .....                    | 38 |
| 3.3.1 Análise por LDI(+) MS/MS .....                                      | 38 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....  | 40 |
| 4.1. Análise LDI(+) MS e LDI(+) MS/MS .....                               | 40 |
| 4.2. Análise por MALDI(+) MS e MALDI(+) MSI .....                         | 43 |
| 5. CONCLUSÃO.....   | 53 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                       | 54 |

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 *Designer drugs*

A utilização de substâncias psicoativas começou com o consumo de plantas, como folhas de coca, *Cannabis* e ópio. Com o passar do tempo, por meio do isolamento dos princípios ativos presentes nas plantas, potencializou-se o efeito dessas substâncias, chegando assim, em uma substância totalmente sintetizada em laboratórios com ações psicoativas similares. Tais substâncias, geralmente, utilizadas para fins recreativos, são denominadas de *designer drugs*.<sup>1</sup>

Com a popularização da internet, houve uma enorme divulgação e distribuição dessas substâncias e o número de novos usuários aumentou de forma significativa, bem como relatos de apreensão de diversas *designer drugs* em todo o mundo.<sup>1,2</sup>

A proliferação das novas drogas sintéticas é favorecida por uma série de circunstâncias, como a aquisição da matéria-prima, que pode ser obtida pela compra em sites, além de ter um alto rendimento, o que torna mais fácil sua importação e manuseio (ou contrabando, nos países onde as substâncias já são proibidas), enquanto que a fabricação dos entorpecentes tradicionais, como por exemplo a cocaína, depende de plantas cultivadas em países com fatores climáticos específicos, como Bolívia, Colômbia e Afeganistão.<sup>3,4</sup>

A *design drug* por ser uma versão sintética (produzida quimicamente) de uma droga ilícita, é modificada com o intuito de potencializar ou criar seus efeitos psicoativos. Para evitar que seja classificada como ilícita, mudanças em sua estrutura molecular, podem fazer com que essas novas substâncias não sejam classificadas como ilegais por ainda não serem proscritas.<sup>1,5</sup>

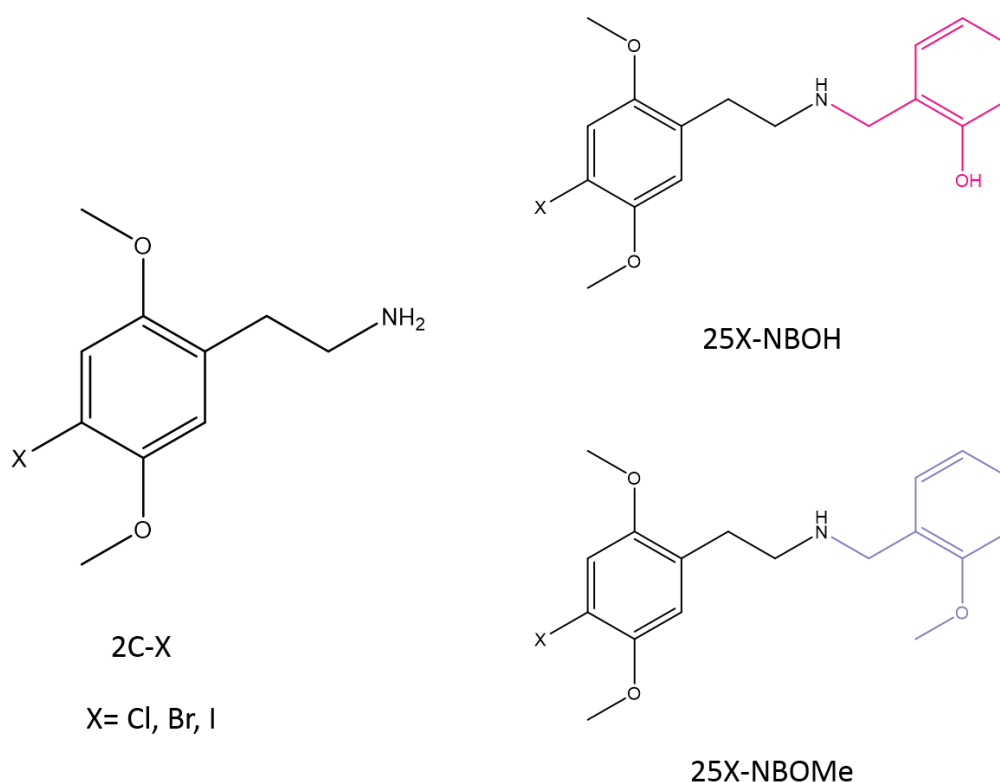
No Brasil, para que uma nova substância psicoativa seja proscrita ela precisa constar nominalmente em uma das diversas listas da Portaria nº 344 – SVS/MS, criada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). O processo de inclusão de uma nova droga é demorado, e nesse período, pode ser que a droga sintética já tenha saído do mercado e tenha sido substituída por outra que ainda não consta na lista, fazendo com que o comércio de *designer drugs* se torne cada vez mais dinâmico.

As novas substâncias psicoativas, conhecidas pelo termo NPS (do inglês, *new psychoactive substances*) são criadas a partir de compostos estruturalmente

modificados que causam efeitos psicotr3picos no organismo tais como: estimulantes, alucin3genos, sedativos ou a jun33o dos mesmos.<sup>6,7</sup>

As principais classes de NPS s3o categorizadas por suas estruturas e efeitos em: anfetaminas (feniletilaminas), catinonas, piperazinas, canabin3ides, cetaminas, fenilciclidina, benzofuranos, triptaminas e opi3ides.<sup>8,9</sup> A classe mais estudada de compostos psicoativos s3o as feniletilaminas e altera33es sutis em suas mol3culas d3o origem a uma variedade de propriedades farmacol3gicas que possuem a33o psicoativa e efeitos estimulantes no sistema nervoso central (SNC).<sup>10</sup>

Algumas feniletilaminas substituídas foram classificadas como compostos alucin3genos, essas incluem a 2,5-dimetoxifenetilaminas (2C) e suas deriva33es N- metoxibenzila (NBOMe) e N- benzilhidroxil (NBOH), **figura 1**, as subst3ncias 2C (2C-I, 2C-C e 2C-B) diferem dos compostos (25I, 25C, 25B) NBOMe pela adi33o de um grupo metoxibenzila ao nitrog3nio e dos (25I, 25C, 25B) NBOH pela adi33o do grupo hidroxibenzila, o an3logo desmetilado de NBOMe.<sup>11,12</sup>



**FIGURA 1.** Estruturas das subst3ncias psicoativas 2C-X, 25X-NBOH e 25X-NBOMe, em que X pode ser: C, quando o ligante for o Cloro; B, quando o ligante for o Bromo e I, quando o ligante for o Iodo.

Fonte: autoria pr3pria.

Estas drogas e outros alucinógenos clássicos agem como agonistas do receptor 5-HT 2A. A adição de N-hidroxibenzila e N-metoxibenzila na estrutura de núcleo 2C aumenta a seletividade dos compostos NBOH e NBOMe, respectivamente, para os receptores 5-HT 2A. Devido à sua maior afinidade com o receptor 5-HT 2A, as drogas NBOMe e NBOH produzem maiores efeitos subjetivos em menores doses quando comparados com as drogas 2C. Essa estimulação dos receptores 5-HT 2A é responsável por efeitos alucinógenos de drogas recreativas. Além disso, o consumo dessas drogas pode causar sintomas como euforia, alucinações visuais e auditivas e dissociações da realidade.<sup>13-15</sup>

Essas *designer drugs* são geralmente distribuídas em um papel absorvente (denominado selo), muitas vezes perfurado em pequenos quadrados (1 × 1 cm), que representam as doses. Estes são administrados na maioria das vezes de forma sublingual e apresentam desenhos coloridos e temáticos (**figura 2**).<sup>16</sup>



**FIGURA 2.** Diferentes selos contendo *designer drugs*.

Fonte: autoria própria.

## 1.2 Técnicas analíticas para identificação de *designer drugs*.

Selos contendo o composto 25I-NBOMe apareceram no mercado de *designer drugs* a partir de 2011, e desde então numerosos derivados NBOMe foram identificados em selos apreendidos do mercado de drogas ilícitas.<sup>17,18</sup> A presença de 25I-NBOH em selos foi identificada pela primeira vez em laboratórios forenses no Brasil. Para tal identificação o estudo de Arantes *et al.* (2017) utilizou as técnicas cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (do inglês, *gas chromatography–mass spectrometry* (GC-MS)), a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas por tempo de voo (do inglês, *liquid chromatography–quadrupole-time of flight-mass spectrometry* (LC-QTOF MS)), a ressonância magnética nuclear (do inglês, *nuclear magnetic resonance* (NMR)) e a reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (do inglês, *attenuated total reflection fourier transform infrared spectroscopy* (ATR-FTIR)).<sup>19</sup>

O grande desafio analítico nas análises de *designer drugs* de forma inequívoca, está relacionado a inconstantes modificações ocorridas nas moléculas e à velocidade com que surgem no mercado, sendo mais rápido o desenvolvimento de novas moléculas comparado ao desenvolvimento de métodos adequados para identificação das mesmas.

Diferentemente das drogas clássicas, a maioria das NPS não possuem metodologias específicas para a realização de triagens utilizadas na rotina laboratorial.<sup>20</sup> Dessa forma, os laboratórios forenses se empenham cada vez mais em adaptar continuamente os métodos de análises existentes ou desenvolver novos métodos, que permitam a determinação correta de NPS em um tempo menor para combater o tráfico e estudar os possíveis danos à saúde dos usuários.<sup>21</sup>

No geral, a principal técnica utilizada nos laboratórios forenses é a GC-MS, em que as amostras são submetidas a uma separação cromatográfica e identificação por espectrometria de massa. Com isso, a identificação do analito se dá a partir do tempo de retenção e do espectro produzido em comparação com as substâncias referências presentes nas bibliotecas.<sup>22</sup>

No entanto, com o surgimento de NPS que são termicamente instáveis, como as substâncias NBOH e NBOMe, que sofrem degradação térmica para suas respectivas drogas 2C, técnicas alternativas devem ser aplicadas ou adicionadas para evitar erros na identificação.<sup>23</sup>

Algumas técnicas, **tabela 1**, utilizadas para a detecção de *designer drugs* em selos são: LC-ESI-MS (do inglês, *liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry*), FTIR (do inglês, *fourier-transform infrared spectroscopy*), NMR,<sup>22, 24</sup> espectroscopia UV-Vis,<sup>25</sup> cromatografia de camada delgada (do inglês, *Thin layer chromatography*, (TLC)),<sup>25</sup> ATR-FTIR,<sup>26-28</sup> HR-MAS NMR (do inglês, *high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance*),<sup>29</sup> SWV (do inglês, *square wave voltammetry*)<sup>30</sup> e HPLC (do inglês, *high-performance liquid chromatography*).<sup>31</sup>

**TABELA 1.** *Designer Drugs* identificadas em selos por técnicas analíticas.

| Ano            | Substância psicoativa                 | Técnica analítica                       | Ref.  |
|----------------|---------------------------------------|---|-------|
| 2013           | 25D-, 25E - e 25G-NBOMe.              | GC-EI-MS, FTIR, NMR                     | 24    |
| 2013           | 25I - NBMD                            | LC-ESI-MS                               | 22    |
| 2015 e<br>2017 | NBOMes, 2C-H, LSD e metalilcalcalina. | ATR-FTIR                                | 26,28 |
| 2016           | 25C-, 25B- e 25I-NBOMe e LSD          | Espectroscopia na região do UV-Vis, TLC | 25    |
| 2016           | DOB, 25B-NBOMe                        | HR-MAS NMR                              | 29    |
| 2017           | 2C-I                                  | GC-MS                                   | 23    |
| 2017           | 25H-NBOMe                             | SWV                                     | 30    |
| 2019           | 25F-, 25C-, 25B- e 25I-NBOMe          | HPLC                                    | 31    |

### 1.2.1. Espectrometria de massas

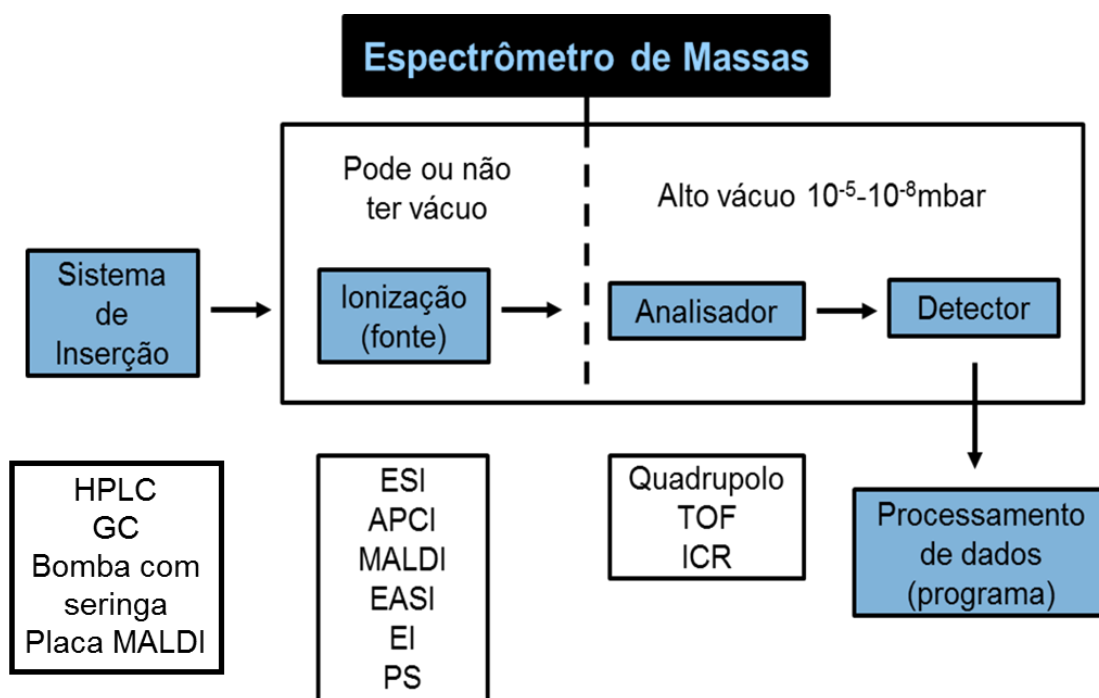
A utilização da espectrometria de massas (do inglês, *mass spectrometry* (MS)), em investigações forenses, era normalmente acoplada a outras técnicas, pois seu uso era limitado a análises de moléculas relativamente pequenas, voláteis e idealmente puras. A MS moderna, no entanto, eliminou essa desvantagem ao se tornar, atualmente, capaz de lidar com a maioria dos tipos de moléculas, mesmo quando os

analitos estão presentes em misturas químicas altamente complexas. Tal melhoria é devido, principalmente, ao desenvolvimento de novas técnicas de ionização, que são capazes de ionizar moléculas com grande diversidade de tamanho e polaridade.<sup>32</sup>

Muitas amostras de drogas são caracterizadas como complexas devido à grande quantidade de moléculas presentes em suas composições, assim, métodos de análise usando a MS têm sido uma ferramenta bastante eficiente na identificação de novos compostos.<sup>33,34</sup>

A MS é uma técnica analítica extremamente valiosa em que utiliza o movimento de íons em campos elétricos e magnéticos para classificá-los de acordo com sua relação massa sobre carga ( $m/z$ ) e apresentá-los sob forma de um espectro de massa.<sup>35</sup> Assim, a análise química de misturas complexas é capaz de fornecer informações qualitativa e quantitativa sobre a composição atômica e molecular de materiais inorgânicos e orgânicos.<sup>36,37</sup>

O funcionamento dos espectrômetros de massas constitui basicamente de cinco etapas: i) sistema de introdução de amostra podendo exigir ou não o preparo de amostra; ii) fonte de ionização (ionização das moléculas de interesse, analito); iii) analisador de massas (separação dos íons formados de acordo com a razão  $m/z$ ); iv) detector, que realiza a “contagem” dos íons e transforma o sinal em corrente elétrica; v) processador que posteriormente, converte a magnitude do sinal elétrico em razão  $m/z$ , ocorrendo a aquisição de um espectro de massas correspondente. O processo descrito é ilustrado na **figura 3**.<sup>35</sup>



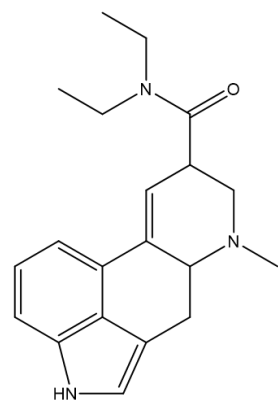
**FIGURA 3.** Diagrama esquemático de um espectrômetro de massas.<sup>38</sup>

Destacam-se como componentes mais importantes no espectrômetro de massas a fonte de ionização e o analisador. Cada método de ionização produz maior abundância de tipos específicos de compostos e discrimina outros, as diferentes formas de ionização juntamente com os analisadores de massas são o que determinam a aplicabilidade da MS.<sup>39</sup> Sendo assim, essas características universais e ilimitadas da MS possibilitaram o desenvolvimento de novos métodos em que há a formação de íons sem a necessidade de uma complexa preparação de amostra, como por exemplo, separações cromatográficas.<sup>36,40</sup>

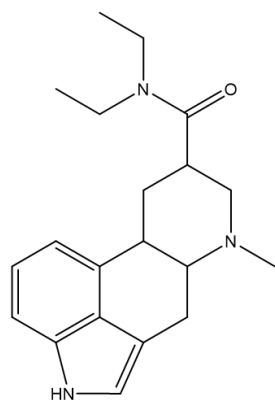
Na identificação de *designer drugs* em selos apreendidos as fontes de ionização mais utilizadas foram: DSA (do inglês, *direct sample analysis*),<sup>41</sup> DART (do inglês, *direct analysis in real time*),<sup>18</sup> DAPPI (do inglês, *desorption atmospheric pressure photoionization*),<sup>42</sup> EASI (do inglês, *easy ambient sonic-spray ionization*),<sup>43</sup> PSI (do inglês, *paper spray ionization*),<sup>44</sup> ESI (do inglês, *electrospray ionization*).<sup>25</sup> Essas fontes foram utilizadas para identificação de algumas substâncias psicoativas mostradas na **tabela 2**, como por exemplo: LSD (do alemão *Lysergsäurediethylamid*), 9,10-di-hidro-LSD, bromobenzodifuranilisopropilamina (ABDF), 2,5-dimetoxi-4-cloroanfetamina (DOC), 2,5-dimetoxi-4-bromoanfetamina (DOB), 25H-NBOMe, 25I-NBOMe, 25C-NBOMe, 25B-NBOMe e 25D-NBOMe (**figura 4**).

**TABELA 2.** Identificação de substâncias psicoativas em selos analisados por espectrometria de massas utilizando diversas fontes.

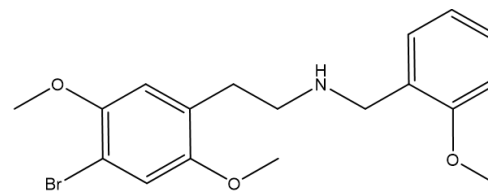
| <b>Ano</b> | <b>Substância psicoativa</b>          | <b>Fonte - MS</b> | <b>Ref.</b> |
|------------|---------------------------------------|-------------------|-------------|
| 2008       | LSD, ABDF                             | DAPPI             | 42          |
| 2012       | LSD, 9,10-di-hidro-LSD                | EASI              | 43          |
| 2015       | 25H-, 25I-, 25C-, 25B- e 25D-NBOMe    | DART              | 18          |
| 2015       | 25I-NBOMe                             | ESI               | 25          |
| 2016       | 25B-NBOMe e 25C-NBOMe                 | DSA               | 41          |
| 2016       | LSD, DOC, DOB, 25C-, 25B- e 25I-NBOMe | PSI               | 44          |



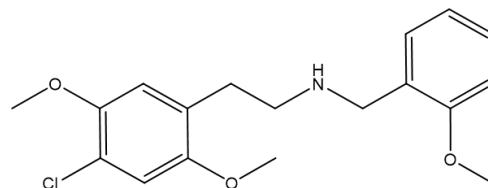
LSD



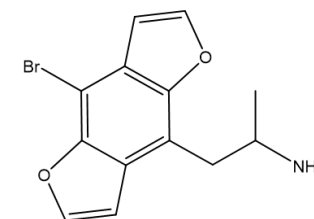
9, 10-di-hidro-LSD



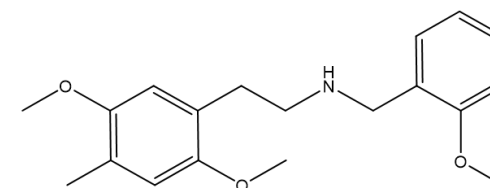
25B-NBOMe



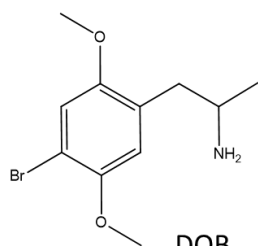
25C-NBOMe



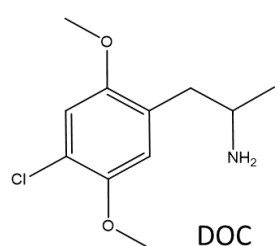
ABDF



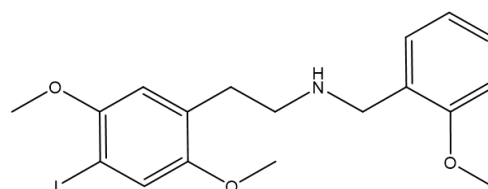
25D-NBOMe



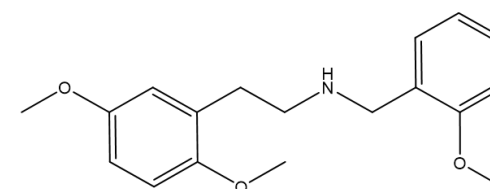
DOB



DOC



25I-NBOMe



25H-NBOMe

**FIGURA 4.** Estrutura química das substâncias psicoativas encontradas em selos.

Fonte: autoria própria.

### 1.2.1.1. MALDI

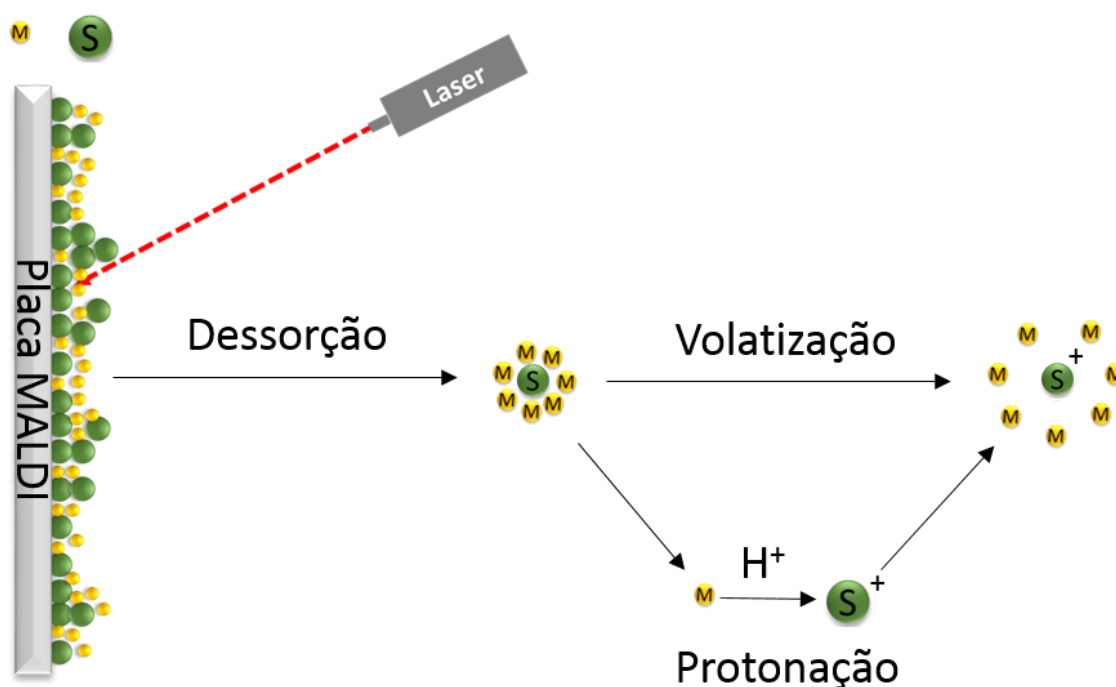
Uma das fontes de ionização utilizadas em análises forenses é a *laser desorption ionization* (LDI) e *matrix assisted laser desorption ionization* (MALDI). Na técnica LDI, os pulsos de laser, que variam de  $10^6$  a  $10^{10}$  W/cm<sup>2</sup>, são incididos na superfície da amostra e focalizados em uma área de  $10^{-3}$  até  $10^{-4}$  cm<sup>2</sup>. Esse laser induz a dessorção do material na camada superficial da amostra, em que as moléculas desprendidas na forma iônica ou neutra podem reagir entre elas na fase de vapor próximo a superfície da amostra. Portanto, o pulso de laser realiza tanto a dessorção como a ionização da amostra. Essa técnica normalmente permite a ionização seletiva das moléculas do analito, por meio do ajuste do comprimento de onda do laser utilizado e sua capacidade de ionização estar relacionada às propriedades físicas das moléculas como a volatilidade e fotoabsorção.<sup>45</sup>

A técnica LDI deu origem à técnica MALDI na década de 80 por Karas *et. al.* (1985).<sup>46,47</sup> Em 2002, Tanaka recebeu o prêmio Nobel em química por seus trabalhos, no desenvolvimento de métodos científicos de identificação e de análise estrutural de macromoléculas biológicas, utilizando a técnica MALDI.<sup>48</sup> Desde então, essa tem sido utilizada como uma poderosa ferramenta para a produção de íons em fase gasosa, por possuir maior sensibilidade e faixa de massas analisáveis, facilidade no preparo de amostras, obtenção de espécies iônicas com pouca ou nenhuma fragmentação e a possibilidade de gerar íons a partir de moléculas com elevada massa molecular, pouco voláteis e termicamente lábeis, tendo assim, maiores aplicações na espectrometria de massa.<sup>45</sup>

As técnicas LDI e MALDI se diferem no preparo das amostras, em MALDI, os analitos são misturados a uma matriz que consiste em uma ou mais substâncias, geralmente compostos orgânicos aromáticos de baixa massa molecular, que absorvem a energia no comprimento de onda do laser que incide sobre essa mistura. A amostra é coberta com a matriz para extrair moléculas de interesse e auxiliar na dessorção e ionização das mesmas, permitindo a ionização até de compostos que não absorvem luz.

Para o processo de ionização, o laser é disparado apenas na camada da matriz, essa absorve a energia emitida e transfere para os compostos da amostra e ao mesmo tempo desencadeia-se um processo de dessorção, o que viabiliza a passagem da amostra do estado sólido para o gasoso, com isso, possibilita a formação de íons

como; protonados,  $[M+H]^+$ , e íons na forma de adutos,  $[M+Na]^+$  ou  $[M+K]^+$  (figura 5).<sup>49,50</sup> Ao selecionar matrizes diferentes e dependendo da tecnologia utilizada, MALDI-TOF MS (do inglês, *matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry*) ou espectrometria de massa de alta resolução como, por exemplo MALDI-FT-ICR MS (do inglês, *matrix-assisted laser desorption/ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry*), diversas classes de analitos podem ser analisadas.



**FIGURA 5.** Esquema da ionização do substrato (S) por MALDI, utilizando matriz (M).

Fonte: autoria própria.

A vantagem da técnica MALDI está na facilidade do preparo das amostras e na habilidade de produzir íons com pouca ou nenhuma dissociação,<sup>45,51</sup> sendo assim, a identificação de drogas por MALDI MS tem sido uma estratégia de análise rápida e de alto rendimento.<sup>52</sup>

Em estudos forenses, segundo Galano *et.al.* (2012),<sup>53</sup> a análise por MALDI é viável para um teste rápido de triagem *antidoping*. Esse estudo demonstrou a análise de um conjunto de 5 drogas sedativas usadas em cavalos e de cocaína e seus metabólitos em humanos. Os compostos de *doping* em cavalos foram detectados com um LoD (do inglês, *limit of detection*) de  $100 \text{ ng.mL}^{-1}$  e para a análise da cocaína e

seu metabólito em amostras de urina humana, LoD de 50 ng.mL<sup>-1</sup>, podendo assim, identificar possíveis candidatos que possam ser investigados por procedimentos *antidoping* já estabelecidos.<sup>53</sup>

A identificação de drogas em fluidos biológicos por MALDI MS também foi observada em outros estudos, nos quais foram identificados catinonas ( $\alpha$ -pirrolidinopropiofenona (PPP), 4'-metil- $\alpha$ -pirrolidinopropiofenona (MPPP),  $\alpha$ -pirrolidinobutiofenona (PBP) e  $\alpha$ -pirrolidinovalerofenona (PVP)), seus derivados,<sup>54,55</sup> benzodiazepínicos (BZDs) e seus metabólitos em sangue,<sup>56</sup> e em fluido oral. Identificou-se a substância psicoativa 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA, *ecstasy*) em 250 amostras em menos de uma hora, comprovando a alta velocidade do método.<sup>57</sup>

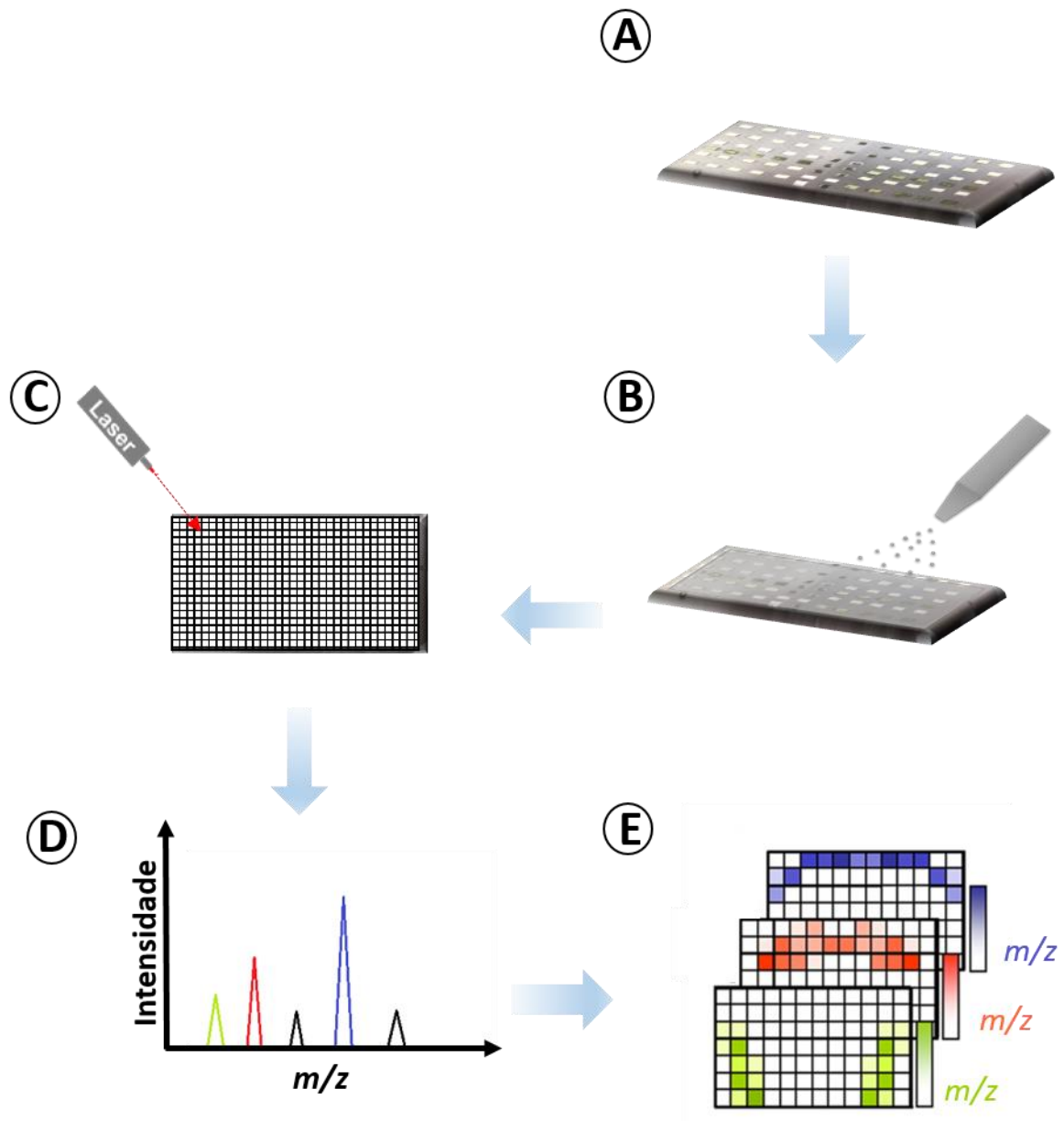
### 1.2.1.2. MALDI *Imaging*

As técnicas baseadas em pulsação de laser na espectrometria de massa têm a capacidade de gerar íons diretamente de uma localização específica das superfícies da amostra, permitindo investigar a sua distribuição espacial química, sendo denominada *mass spectrometry imaging* (MSI) ou "imagem espectral de massa".

O conceito de MSI está relacionado à transformação da amostra, em uma imagem bidimensional, que fornece informação sobre a dispersão das moléculas em cada área particular. No experimento MSI a superfície da amostra é rastreada por varredura (com uma resolução espacial definida *pixel a pixel*), gerando um espectro de massa para cada ponto de medição. Estes são adquiridos em coordenadas pontuais ( $x, y$ ) da superfície e cada espectro de massa individual contém centenas de sinais correspondentes a diferentes analitos presentes nessa posição específica (*pixel*) da amostra.<sup>58,59</sup>

As imagens podem então ser geradas para qualquer um dos íons traçando a intensidade como uma função das coordenadas  $x, y$  da superfície espacial. Essas imagens são geralmente exibidas qualitativamente com base na intensidade relativa, na qual a cor em cada posição é dimensionada a partir do *pixel* de intensidade mais alta no conjunto de dados.<sup>59</sup> Na **figura 6** observa-se as principais etapas presentes nesse experimento, sendo elas: a) a seleção e preparação da amostra; b) a aplicação da matriz de maneira eficiente; c) a subdivisão da área a ser analisada, de acordo com

a resolução da imagem pretendida; d) a dessorção e ionização da amostra com a aquisição dos espectros; e e) o registro da imagem com análise dos dados.<sup>60</sup>



**FIGURA 6.** Esquema com as principais etapas de uma análise por MALDI MSI: (a) preparação da amostra; (b) aplicação da matriz; (c) subdivisão da área analisada; (d) aquisição dos espectros pontuais; (e) geração das imagens a partir da seleção dos íons.

Fonte: autoria própria.

A primeira aplicação de MALDI MSI foi descrita por Spengler *et al.* 1994.<sup>61</sup> Ele demonstrou que moléculas orgânicas maiores tais como peptídeos, termicamente estáveis e que necessitam de assistência matricial para a ionização, podem ser detectadas de um modo espacialmente resolvido, utilizando um feixe de laser UV

pulsado e altamente focalizado.<sup>62</sup> Esse conceito foi retomado e publicado na forma de artigos nos anos seguintes, aplicando a técnica MALDI MSI em tecidos biológicos.<sup>63,64</sup>

A maioria dos estudos usando a técnica de MALDI MSI concentra-se em análises de tecidos originários de modelos animais ou em tecidos clínicos humanos originários de uma intervenção cirúrgica, estudando a distribuição espacial de diferentes classes de compostos, tais como lipídios, proteínas, peptídeos, drogas e seus metabólitos na superfície dos mesmos.<sup>65-67</sup> Tópicos adicionais de estudo incluem a análise de plantas, microrganismos e superfície de comprimidos para avaliar a distribuição espacial do fármaco ativo, por MALDI MSI.<sup>68-70</sup>

### **1.2.1.3. MALDI MSI aplicado à química forense**

No contexto forense, a técnica MALDI MSI começou a ser aplicada em análises de digitais na busca de gerar imagens que pudessem ser comparadas aos padrões de crista característicos de cada indivíduo, visto que o reconhecimento desses padrões é o recurso pelo qual a análise forense se baseia na identificação do suspeito.<sup>71,72</sup>

Em 2009, Wolstenholme *et al.* (2009)<sup>71</sup> utilizou da técnica MALDI MSI para formação de imagens, identificando lipídios endógenos e exógenos em marcas de digitais frescas e envelhecidas, tratadas e não tratadas, esse foi o primeiro estudo comprovando o potencial e a viabilidade da técnica para análise forense de digitais.<sup>71</sup> A partir desse estudo, o aprimoramento para produzir uma imagem espectral de uma marca de digital para comparação com um banco de dados central de impressões digitais foi crescente. Estudos mostraram que a possibilidade de adquirir centenas de espécies dentro de uma única análise permite que muitas imagens da mesma digital sejam obtidas, resultando em uma qualidade aprimorada da evidência física.<sup>72</sup>

No entanto, um dos problemas em estudo de digitais é a sobreposição de digitais distintas e a falha nas revelações dos padrões de crista. Isso se dá devido a recuperação parcial de marcas, distorcidas ou borradas, a inadequação da técnica aplicada resultando em uma má qualidade da imagem, cicatrizes extensas nas pontas dos dedos ou a ausência de registros de impressões digitais de suspeitos no banco de dados. O uso da imagem espectral de massa conseguiu demonstrar que particular a alguns casos, a identificação por MALDI MSI foi mais eficiente do que por técnicas convencionais.<sup>73,74</sup>

Além de informações físicas, é possível obter informações químicas dentro da mesma análise. As informações químicas podem ser essenciais para o perfil do suspeito e suas atividades antes de deixar marcas no local. A identificação mais importante para diferenciação de suspeitos é a de substâncias exógenas que entram em contato com as pontas dos dedos e são transferidas para a superfície de contato, isso seria uma informação valiosa para construir o perfil do suspeito.<sup>72,75</sup>

Como exemplo, no estudo de Groeneveld *et al.* (2015),<sup>76</sup> obteve-se a detecção, confirmação e mapeamento de uma grande variedade de medicamentos e seus metabólitos em marcas de digitais geradas ao contaminar as pontas dos dedos com soluções de anfetamina, cocaína, heroína, entre outras, utilizando a técnica MALDI MSI.

Outra aplicação foi a identificação de compostos característicos de preservativos, nesse cenário, agressores sexuais que usam “camisinha” durante um estupro (para evitar deixar vestígios biológicos) contaminam, inevitavelmente, as pontas dos dedos com os lubrificantes do preservativo. Essa identificação permite aos cientistas forenses fornecer evidências com maior apoio em supostos casos de agressão sexual.<sup>77</sup> Além disso, a assimilação desses compostos auxilia na reconstrução dos eventos que ocorreram em uma cena de crime ou nas características dos suspeitos envolvidos, por isso a importância do estudo químico da composição das amostras.

Ainda na área forense, exames toxicológicos com cabelo, método padrão para identificar usuários crônicos de drogas, são geralmente realizados por GC-MS,<sup>78,79</sup> LC-MS<sup>80</sup> ou LC-MS/MS,<sup>81</sup> onde uma série de segmentos de cabelo divididos da raiz a ponta podem fornecer informações cronológicas sobre o uso de drogas. Essas análises convencionais envolvem uma laboriosa preparação e medição das amostras.

Em 2011, estudos utilizando a técnica MALDI MSI na identificação de substâncias psicoativas ao longo do fio de cabelo começaram a ser realizadas. Em alguns estudos já foi possível identificar a presença de metanfetamina, cocaína, canabinóides, nicotina e alguns medicamentos como a tilidina.<sup>82-88</sup>

Após observar que a imagem por MALDI MSI para a análise de cabelos intactos é uma ferramenta poderosa na detecção de drogas de abuso em aplicações toxicológicas e forenses, o aprimoramento da técnica tornou-se natural. Um estudo feito por Flinders *et al.* (2015)<sup>89</sup> apresentou um método rápido, fácil e reproduzível de preparar seções longitudinais de fios de cabelos, mostrando a melhora na detecção

de substâncias químicas incorporadas na matriz capilar. As imagens obtidas de uma única amostra de cabelo seccionada podem mostrar distribuições moleculares no córtex, na medula e na cutícula capilar. Assim, a imagem MALDI MS de seções longitudinais de cabelos de usuários revelou uma ampla distribuição de cocaína ao longo do fio.<sup>89</sup> Outro estudo realizado pelo mesmo autor, mostrou a otimização da resolução espacial e da velocidade de varredura realizada em amostras intactas de cabelos contaminados também com cocaína.<sup>90</sup>

Segundo Wang, H., e Wang, Y. (2017),<sup>91</sup> um método que também auxiliou nas análises toxicológicas foi o uso de uma matriz não convencional, a umbeliferona, na identificação de compostos químicos em fios de cabelos. Como o cabelo é uma fibra queratinosa, fortemente hidrofóbica e as matrizes MALDI convencionais têm propriedades hidrofílicas e baixa afinidade por compostos hidrofóbicos,<sup>92</sup> o uso de uma matriz alternativa hidrofóbica, a umbeliferona, mostrou uma maior sensibilidade na detecção da metanfetamina comparado ao uso das matrizes convencionais CHCA (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico) e DHB (ácido 2,5-di-hidroxibenzóico).<sup>91</sup>

Apesar de existir melhorias na detecção de drogas em fios de cabelos, outros estudos revelaram a perda da detecção de cocaína e seus produtos de degradação em cabelos após um curto período de tratamento com peróxido de hidrogênio. Como todos os compostos de interesse são encontrados na solução de lavagem juntamente com o peróxido de hidrogênio, isso indica que as evidências do uso de cocaína podem ser perdidas após um tratamento de clareamento dos fios.<sup>93</sup> Assim, apesar de grande avanço nas análises de toxicologia forense, os resultados devem ser interpretados com muita cautela.

Ainda em toxicologia forense, estudos realizados em tecidos animais utilizando a técnica de imageamento, mostraram a distribuição de MDMA e seus principais metabólitos no cérebro, fígado e rim de camundongos,<sup>94</sup> e a capacidade para mapear a toxicodinâmica, alterações associadas a drogas de abuso, em cérebros de ratos com ou sem administração de álcool.<sup>95</sup>

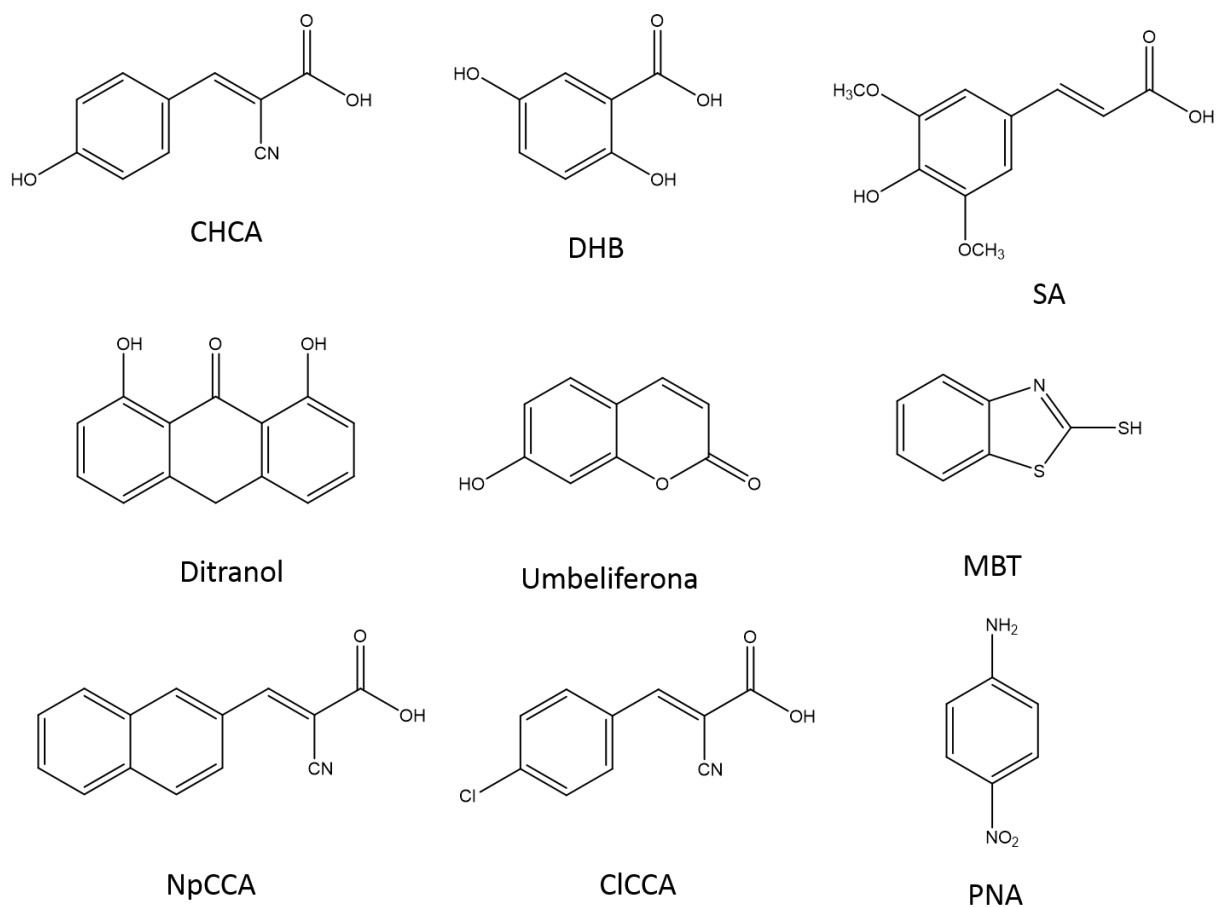
Embora exista uma grande aplicação da técnica MALDI MSI em análises forenses, poucos estudos relataram a distribuição espacial de substâncias psicoativas nas superfícies das drogas de abuso, como apresentado no trabalho de dos Santos *et al.* (2019).<sup>96</sup> Nesse estudo, determinou-se a distribuição de compostos canabinóides na superfície de folhas de *Cannabis* frescas e envelhecidas, avaliando a eficiência de ionização das matrizes estudadas. Rodrigues *et al* (2014)<sup>97</sup> analisaram a

distribuição do fármaco ativo em todo o comprimento do medicamento para fornecer algumas informações quantitativas em relação à dose fabricada do comprimido. Já Earnshaw *et al.* (2010)<sup>70</sup> utilizaram da técnica MALDI MSI para analisar diretamente uma gama de comprimidos, a fim de avaliar a homogeneidade do composto ativo ao longo dos comprimidos de aspirina, paracetamol e citrato de sildenafil.

A **tabela 3** elenca estes e outros trabalhos que colaboraram para o avanço significativo da aplicação da técnica MALDI MSI em estudos forenses, utilizando diferentes matrizes: CHCA, DHB, SA, Ditranol, Umbeliferona, MBT, NpCCA, CICCA e PNA, **figura 7**.

TABELA 3. MALDI MSI aplicado a diversas amostras forenses, utilizando diferentes matrizes MALDI.

| <b>Material analisado</b>                    | <b>Matriz utilizada</b>   | <b>Substância monitorada</b>   | <b>Ref.</b> |
|--|---------------------------|--|-------------|
| <b>Digitais</b>                              | CHCA                      | Lipídios endógenos e seus produtos de degradação                     | 71, 74      |
|  |                           | Sangue (hemoglobina)   | 75          |
|  |                           | Anfetamina, cocaína, heroína, THC                                    | 76          |
|  | Ditranol                  | Lubrificante de preservativo   | 77          |
| <b>Cédulas de dinheiro</b>                   | CHCA                      | Compostos endógenos (digital) e cocaína                              | 98          |
| <b>Fios de cabelo</b>                        | CHCA,<br>Cl-CCA,<br>NpCCA | Cocaína e seus metabólitos benzoilecgonina, etilcocaína e norcocaína | 83          |
|  | CHCA                      | Metanfetamina  | 82          |
|  |                           | Nicotina   | 87          |
|  |                           | Tilidina   | 88          |
|  |                           | Canabinóides   | 84, 85, 86  |
|  | Umbeliferona              | Metanfetamina  | 91          |
| <b>Tecido animal (cérebro, fígado e rim)</b> | CHCA                      | MDMA e seus principais metabólitos                                   | 94          |
|  | DHB                       | Cocaína  | 95          |
| <b>Folhas de <i>Cannabis</i></b>             | MBT, DHB, CHCA            | Canabinóides   | 96          |
| <b>Comprimidos</b>                           | CHCA                      | Aspirina, paracetamol, citrato de sildenafil                         | 70          |
| <b>farmacêuticos</b>                         | SA, CHCA e PNA            | Atorvastatina lactona  | 97          |



**FIGURA 7.** Matrizes MALDI utilizadas em estudos forenses: CHCA, DHB, SA, Ditranol, Umbeliferona, MBT, NpCCA, CICCA e PNA.

Fonte: autoria própria.

Com isso, observa-se que diferentes classes de analitos frequentemente necessitam de diversificados tipos de matrizes,<sup>96</sup> como mostrado na **tabela 3**. Além disso, é sabido que a escolha da matriz e sua forma de aplicação são fatores determinantes para a eficiência dos experimentos por MALDI MSI. Isso evidencia a necessidade da avaliação destas na etapa de desenvolvimento de metodologia, a fim de executá-la de forma eficiente e com mínimo preparo, aumentando a velocidade das respostas forenses.

## 2.OBJETIVOS

### 2.1. Geral

Desenvolver e otimizar método de análise da distribuição espacial de *designer drugs* em selos pela técnica MALDI MSI, acoplado a um analisador FT-ICR.

### 2.2. Específico

- Comparar a eficácia do modo de deposição da matriz sobre a superfície da amostra de selo.
  - Micropipeta automática (Transferpette®);
  - Pulverizador auxiliado pelo probe da fonte ESI.
- Analisar a eficiência de ionização de quatro matrizes:
  - ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA);
  - ácido 2,5-di-hidroxibenzóico (DHB);
  - 7,7,8,8-Tetracianquinodimetano (TCNQ);
  - ácido sinápico (SA).
- Avaliar a melhor concentração (5, 10, 15, 20 e 25 mg.mL<sup>-1</sup>) das matrizes analisadas.
- Investigar a distribuição espacial do composto psicoativo de maior abundância na frente e no verso do selo.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Amostras e reagentes

Sete cartelas de selos, apreendidas e disponibilizadas para essas análises pela Polícia Civil do Estado do Espírito Santo, (mediante acordo de cooperação, processo 23068.011398/2012-72), foram nomeadas/numeradas como S1 a S7. As matrizes DHB, CHCA, SA e TCNQ foram adquiridas pela Sigma-Aldrich Chemicals, EUA. O solvente metanol (pureza analítica superior a 99,5%) adquirido pela Vetec® Química Fina Ltda, Brasil, foi utilizado na solubilização das matrizes.

#### 3.2. Preparação das amostras e matrizes

Os selos foram cortados em um tamanho de 0,2 x 0,5 cm e fixados em uma placa de aço inoxidável com o auxílio de fita dupla-face. As matrizes: DHB, CHCA, SA e TCNQ foram solubilizadas em metanol e preparadas em diferentes concentrações: 5; 10; 15; 20 e 25 mg.mL<sup>-1</sup>.

A aplicação matricial foi avaliada de duas formas: (i) com uma pipeta automática (Transferpette®), onde o volume contendo a solução da matriz foi ajustado para 15 µL, e uma única aplicação foi realizada sobre a superfície do selo; (ii) com um pulverizador auxiliado pelo probe da fonte ESI (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), que utilizou o capilar interno do probe do ESI para transferir a solução de matriz, e o capilar externo para permitir a passagem de gás, induzindo a nebulização da solução da matriz e pulverizando-a sobre a amostra.

No método de aplicação (ii), a matriz foi depositada na superfície da amostra com fluxo contínuo de 10 µL.min<sup>-1</sup> e tempo controlado de 30 s, com intervalo de secagem de 1 min entre as etapas de aplicação. O Gás de nitrogênio a 10 psi foi usado como gás nebulizador nesta etapa de deposição da matriz. Em ambos os casos, o processo foi otimizado com o selo S7 e com a matriz CHCA na concentração de 25 mg.mL<sup>-1</sup>.

Após otimizar o método de aplicação da matriz, a eficiência no processo de ionização foi avaliada em função das quatro matrizes estudadas (DHB, CHCA, SA e TCNQ) e suas respectivas concentrações (de 5 a 25 mg.mL<sup>-1</sup>). Para isso, o composto 25I-NBOMe foi monitorado e, em todos os casos, foi utilizado o selo S5. As matrizes

testadas foram depositadas utilizando o pulverizador auxiliado pelo probe da fonte ESI com fluxo e tempo controlados.

Para confirmar a eficiência da matriz, uma simulação do selo foi realizada com a adição de concentrações conhecidas do composto 25I-NBOMe (0,0125; 0,025; 0,0375; 0,05; 0,0625; 0,075 e 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>) em pedaços de papel filtro Whatman® 903 de tamanho 0,5 cm × 0,5 cm, formando uma curva para cada uma das cinco concentrações (5, 10, 15, 20 e 25 mg.mL<sup>-1</sup>) da matriz CHCA.

Foi também realizada uma investigação da distribuição espacial do composto 25I-NBOMe na frente e no verso das amostras S1-S6, onde a matriz de CHCA foi aplicada na concentração de 25 mg.mL<sup>-1</sup>, utilizando o pulverizador auxiliado pelo probe da fonte ESI, e o íon de  $m/z$  428,07 foi monitorado.

### 3.3. Análise por LDI(+), MALDI(+) e MALDI(+) MSI

As análises LDI(+), MALDI(+) e MALDI(+) MSI foram realizadas em um espectrômetro de massas FT-ICR, modelo 9.4 T Solarix, Bruker Daltonics, Bremen, Germany, equipado com um laser *smartbeam-II*<sup>TM</sup> (355 nm) e fonte de ionização MALDI. Todos os espectros foram calibrados usando uma solução de arginina (0,05 mg.mL<sup>-1</sup>).

Anterior às análises MALDI MSI, uma imagem digital dos selos foi adquirida e, em seguida, a placa foi inserida no FT-ICR MS. Todas as análises foram realizadas em modo positivo de ionização em uma faixa espectral de  $m/z$  200 a 1500, com poder de resolução ( $m/\Delta m_{50\%} \approx 500000$  no  $m/z$  400, onde  $\Delta m_{50\%}$  é a largura máxima do pico a meia altura) e precisão de massa inferior a 4 ppm, o que permite a atribuição de uma fórmula molecular inequívoca para os íons moleculares. Cada análise foi adquirida com 100 *laser shots* por *pixel*, com ajuste de foco de laser (~ 30 µm), frequência de laser de 200 Hz, aumentando o *laser power* até atingir uma melhor potência de 33%. A eficiência de ionização foi avaliada monitorando a relação sinal-ruído e a corrente total de íons (do inglês, *total ion current* (TIC)).

#### 3.3.1 Análise por LDI(+) MS/MS

Experimentos CID (do inglês, *collision-induced dissociation*) foram realizados, em que a janela do quadrupolo foi ajustada a um isolamento de 1 Da, energia de

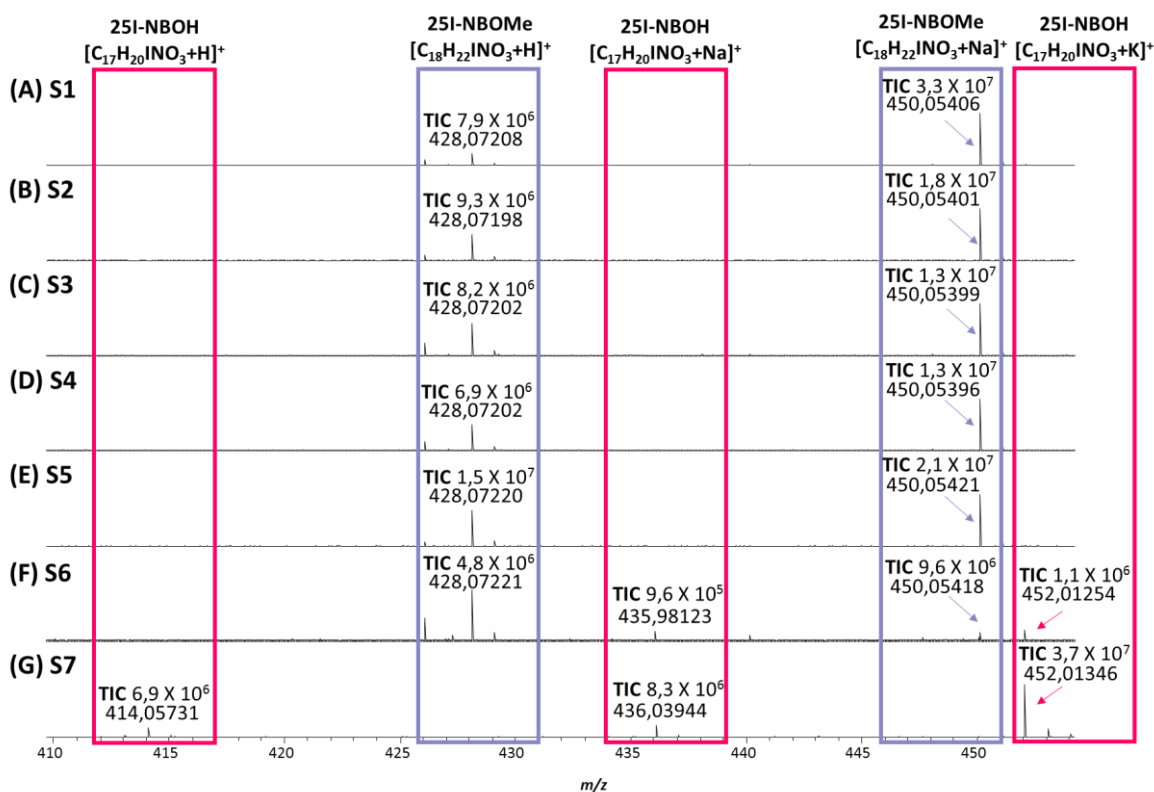
colisão de 14,5 V e 21 V para íons de  $m/z$  414 e 428, respectivamente e *laser power* da fonte de 70%.

Todos os dados obtidos foram analisados pelo software *DataAnalysis* (Bruker Daltonics, EUA) e as imagens geradas a partir das fontes de ionização LDI e MALDI, resolução espacial de 300  $\mu\text{m}$ , foram processadas com o software *FlexImaging 3.0* (Bruker Daltonics, EUA).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Análise LDI(+) MS e LDI(+) MS/MS

Inicialmente, os selos, amostras S1-S7, foram analisados por LDI(+) MS, e seus respectivos espectros são observados na **figura 8a-g**. Os sete diferentes selos exibiram um perfil espectral similar, com detecção como íon principal, o composto 25I-NBOMe (nas amostras S1-S6, **figura 8a-f**), contendo  $m/z$  428,07171 e 450,05366, moléculas na forma protonada,  $[C_{18}H_{22}INO_3+H]^+$  e com aduto de sódio  $[C_{18}H_{22}INO_3+Na]^+$ , respectivamente, com erros de massa menores que 2 ppm. No selo S7 foi detectada a molécula do composto 25I-NBOH, íons  $[C_{17}H_{20}INO_3+H]^+$ ,  $[C_{17}H_{20}INO_3+Na]^+$  e  $[C_{17}H_{20}INO_3+K]^+$ ,  $m/z$  414,05731, 436,03944 e 452,01346, e erro = 3,02, 3,28 e 3,36 ppm, respectivamente, que também apareceu com menor intensidade no selo S6 com aduto de sódio ( $[C_{17}H_{20}INO_3 + Na]^+$ ,  $m/z$  435,98123, erro= 1,69 ppm) e de potássio ( $[C_{17}H_{20}INO_3+K]^+$ ,  $m/z$  452,01254, erro= 1,31 ppm) **figura 8f- g**.

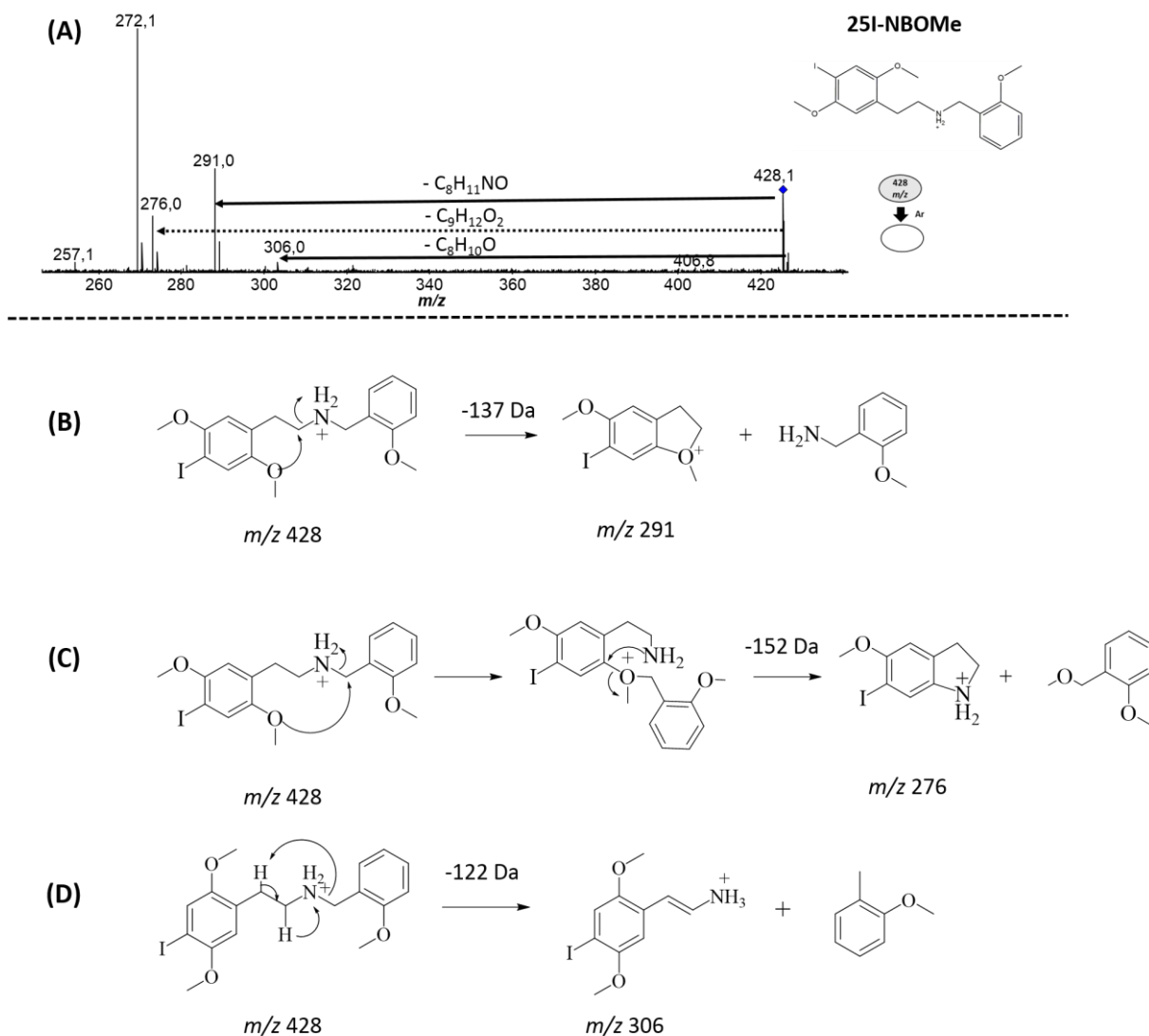


**FIGURA 8.** Espectro LDI(+) de sete selos mostrando a presença de *designer drugs*: (a-f) 25I-NBOMe identificado pelos íons  $[C_{18}H_{22}INO_3+H]^+$  e  $[C_{18}H_{22}INO_3+Na]^+$  de  $m/z$  428,07 e 450,05 respectivamente, e (g) 25I-NBOH, identificado pelos íons  $[C_{17}H_{20}INO_3+H]^+$ ,  $[C_{17}H_{20}INO_3+Na]^+$  e  $[C_{17}H_{20}INO_3+K]^+$  de  $m/z$  414,06 436,04 e 452,01 respectivamente.

Experimentos de CID foram realizados utilizando amostras S2 e S7 com o objetivo de identificar os padrões de fragmentação das moléculas de 25I-NBOMe ( $m/z$  428) e 25I-NBOH ( $m/z$  414). No espectro LDI(+) MS/MS para a amostra S2, **figura 9a**, os padrões de fragmentação do 25I-NBOMe produziram o íon  $[C_{10}H_{12}O_2]^+$  de  $m/z$  291, representando a clivagem  $\alpha$  da ligação C-N, que é interconectada ao grupo dimetoxibenzeno e a perda da molécula neutra  $C_8H_{11}NO$  (137 Da).

Outro fragmento é o íon observado em  $m/z$  276 ( $[C_9H_{11}NOI]^+$ ), formado pela perda de 152 Da ( $C_9H_{12}O_2$ ), devido a um rearranjo na molécula com migração do grupo metoxibenzila para o grupo dimetoxibenzeno, seguido da clivagem  $\alpha$  da ligação C-O e formação de uma amina cíclica de cinco membros conjugada ao anel benzeno.

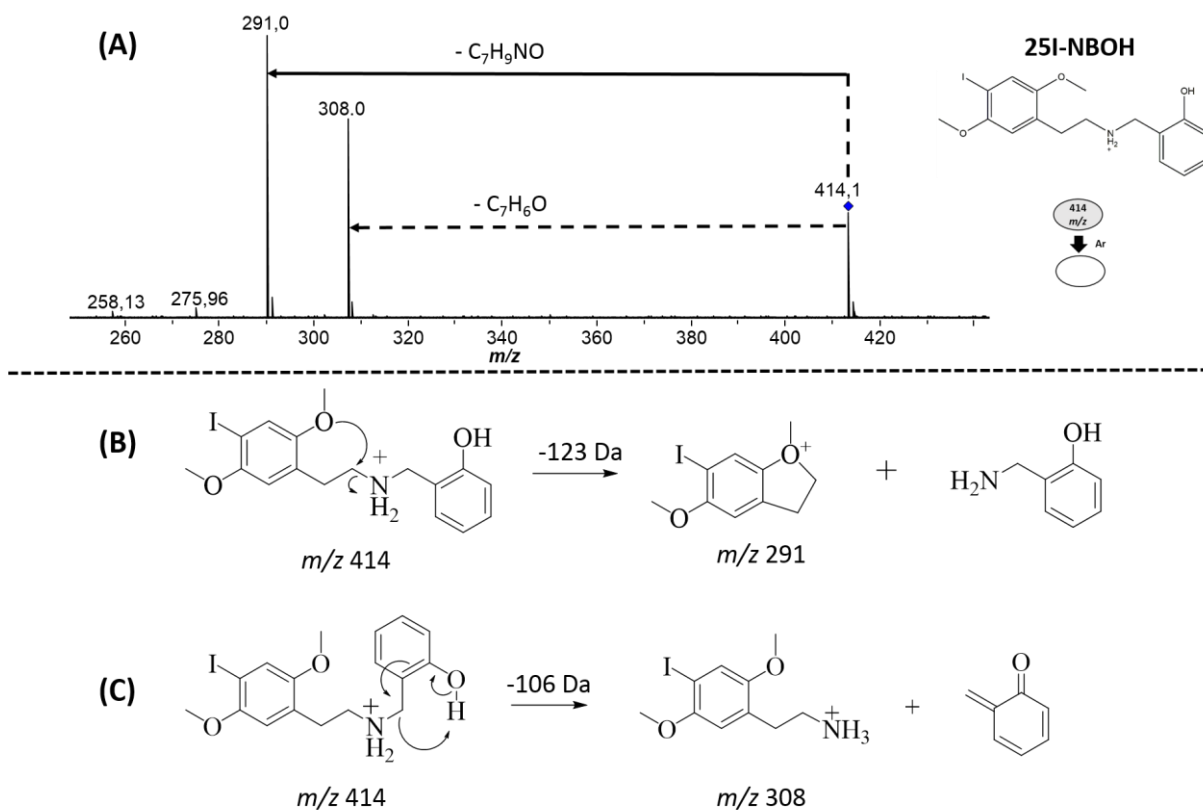
Finalmente, outra possibilidade é observada com a perda de 122 Da ( $C_8H_{10}O$ ), pela migração do hidrogênio do carbono adjacente ao nitrogênio para o nitrogênio, com subsequente clivagem  $\alpha$  da ligação heterolítica CN do carbono ligado ao grupo metoxibenzeno, levando à formação do íon  $[C_{10}H_{11}NO_2]^+$  de  $m/z$  306. Esses principais padrões de fragmentação também foram relatados por outros autores no estudo da molécula 25I-NBOMe.<sup>25,99,100</sup> Os mecanismos propostos de fragmentação do 25I-NBOMe são sugeridos na **figura 9b-d**.



**FIGURA 9.** (a) Espectros LDI(+) MS/MS para o íon de  $m/z$  428 e proposta de mecanismos de fragmentação para os íons detectados: (b)  $m/z$  291; (c)  $m/z$  276; e (d)  $m/z$  306.

No espectro LDI(+) MS/MS do íon de  $m/z$  414, **figura 10a**, observa-se uma perda de 123 Da, representando a clivagem  $\alpha$  CN do carbono que é interconectada ao grupo dimetoxibenzeno e a perda da molécula  $C_7H_9NO$ , justificado para o fragmento do íon  $[C_{10}H_{12}O_2]^+$  de  $m/z$  291.

Outro padrão de fragmentação é a migração do hidrogênio fenólico para o nitrogênio com subsequente clivagem heterolítica da ligação  $\alpha$  CN do carbono ligado ao grupo fenólico, gerando a perda da molécula neutra  $C_7H_6O$  (106 Da) seguido pela formação da molécula 2C-I como íon  $[C_{10}H_{14}INO_2+H]^+$  de  $m/z$  308. Esses padrões de fragmentação foram relatados na literatura.<sup>19,99,101</sup> Os mecanismos propostos de fragmentação do 25I-NBOH são sugeridos na **figura 10b-c**.



**FIGURA 10.** (a) Espectros LDI(+)-MS/MS do íon de  $m/z$  414 e propostas de mecanismos de fragmentação para os íons detectados: (b)  $m/z$  291; e (c)  $m/z$  308.

## 4.2. Análise por MALDI(+)-MS e MALDI(+)-MSI

Um passo crucial na preparação de amostras para um experimento MALDI MSI é a aplicação da matriz, que deve ser depositada formando uma camada homogênea na superfície da amostra, mantendo a distribuição natural dos analitos.<sup>102,103</sup> Neste estudo, dois métodos de aplicação da matriz foram testados, o primeiro utilizando uma pipeta automática e o segundo, um pulverizador assistido por um probe da fonte ESI. Essa otimização foi realizada com a matriz CHCA, uma vez que é comumente utilizada em análises de drogas e de pequenas moléculas por MALDI MSI.<sup>90,104</sup> Nesta análise, a distribuição espacial e os TIC's foram observados para o íon de  $m/z$  414,05 característico da substância 25I-NBOH, presente na amostra S7.

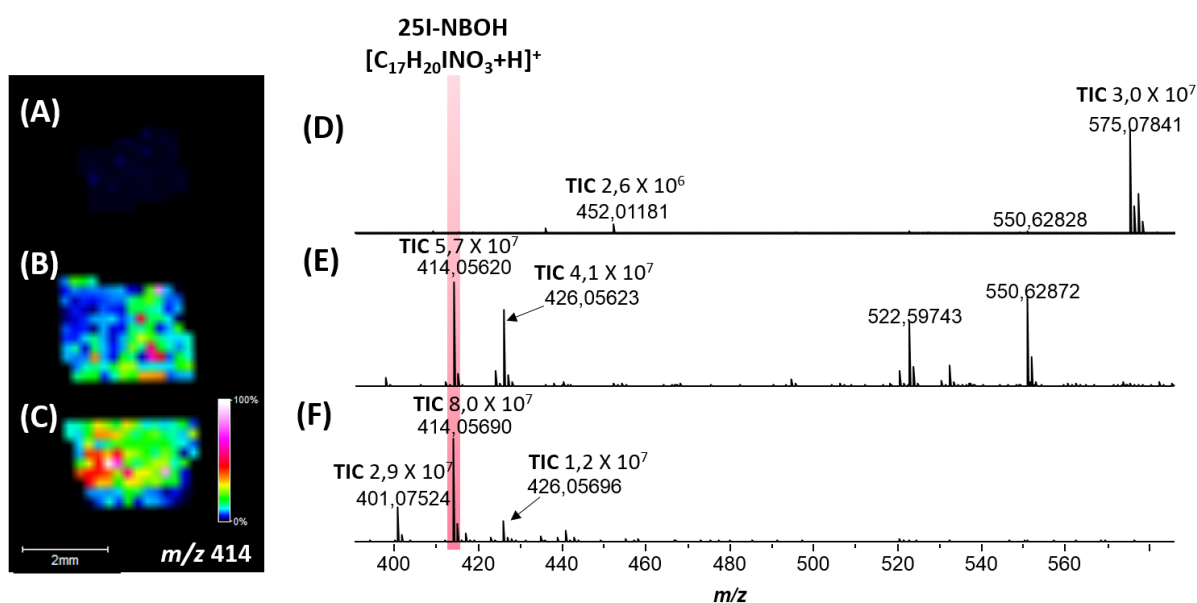
Nas imagens geradas por MALDI(+)-MSI (**figura 11a-c**), a aplicação da matriz com pulverizador auxiliado por um probe da fonte ESI<sup>105</sup> mostrou-se mais eficiente na ionização do composto de  $m/z$  414,05 (**figura 11c**), detectando uma maior intensidade na cor quando monitorado o sinal do mesmo, comparado ao método de aplicação

utilizando a pipeta automática, (**figura 11b**) bem como à técnica LDI(+) MSI, isto é, sem o uso de matriz (**figura 11a**).

Além disso, uma maior sensibilidade, medida pelos valores de TIC para o íon de  $m/z$  414,05 foi observada no espectro MALDI(+) MS na utilização do pulverizador (**figura 11f**), que apresentou um maior valor de TIC ( $8,0 \times 10^7$ ), indicando maior poder de ionização quando comparado aos espectros de massa obtidos com a utilização da pipeta automática (TIC  $5,7 \times 10^7$ , **figura 11e**) e sem o uso da matriz (TIC  $2,7 \times 10^5$ , **figura 11d**).

O uso da matriz se faz necessário para facilitar a ionização do íon de interesse ( $m/z$  414,05) e diminuir a supressão causada pelo sinal do papel,  $m/z$  575,08 (TIC  $3,0 \times 10^7$ ), mostrado no espectro de massa do LDI(+) MS (**figura 11d**). Apesar da aplicação da matriz utilizando a pipeta automática também apresentar a ionização do composto de interesse, outros sinais referentes a íons formados com adutos também estão presentes.

Uma das razões para eficiência da utilização do pulverizador auxiliado com o probe da fonte ESI como aplicador da matriz pode estar relacionada às pequenas gotículas formadas uniformemente pela matriz na superfície da amostra durante o processo de deposição.<sup>105,106</sup> O uso de pipetas automáticas para a aplicação da matriz pode resultar em uma camada de matriz heterogênea e não uniforme, causando uma ionização ineficiente de único íon e possibilitando uma alteração no posicionamento natural das substâncias analisadas na superfície da amostra.<sup>103,107</sup>

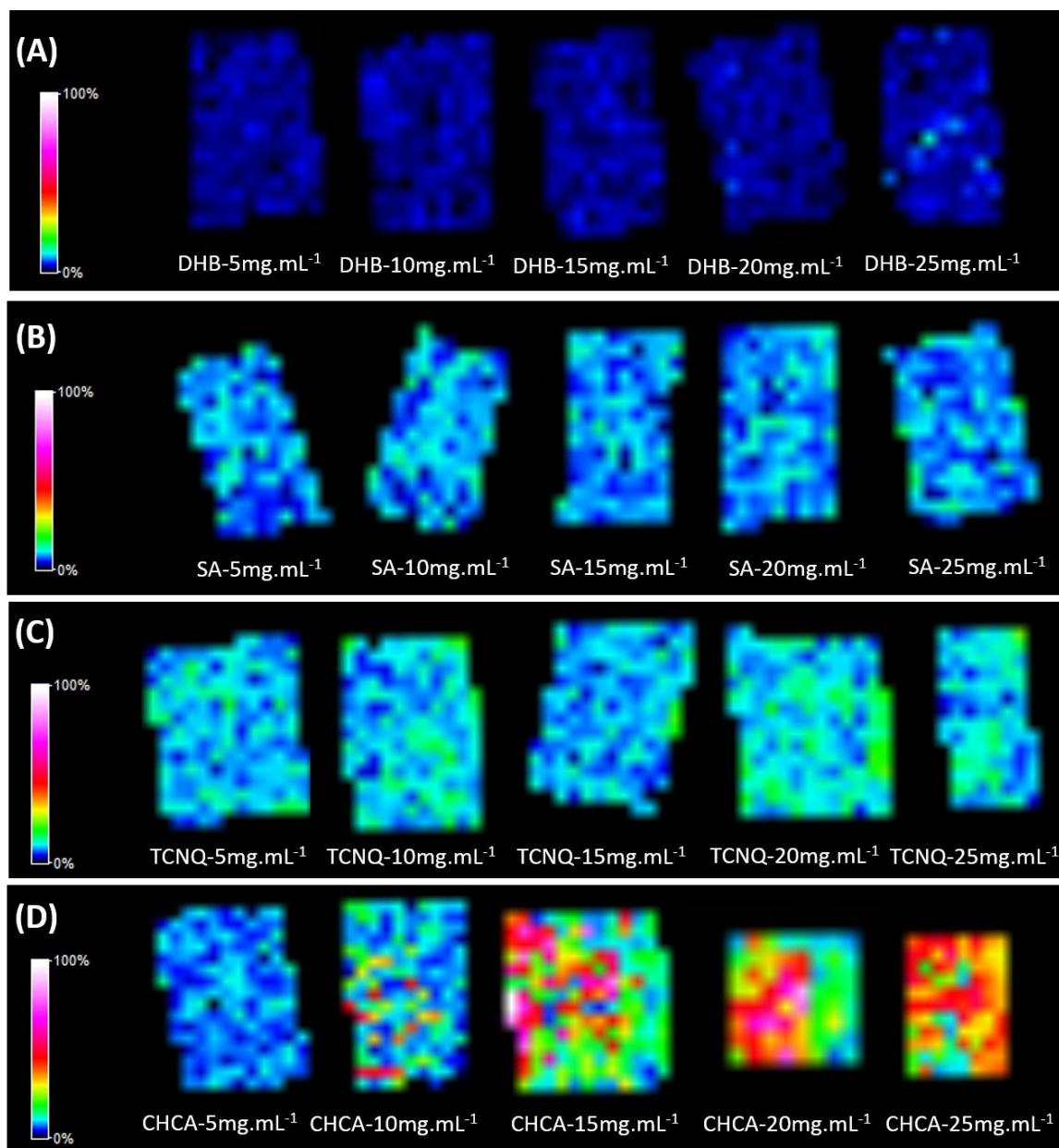


**FIGURA 11.** Imagens de MS mostrando a distribuição da molécula 25I-NBOH de  $m/z$  414,05 na superfície da amostra S7: utilizando (a) LDI(+), e (b-c) MALDI(+), (b) aplicação da matriz CHCA pela pipeta automática (c) aplicação com um pulverizador auxiliado pelo probe da fonte ESI. Espectros de LDI(+) (d) e MALDI(+) (e-f) de suas respectivas imagens, a e b-c, respectivamente.

Após otimizar o método de aplicação da matriz, para avaliar a melhor matriz e sua melhor concentração no estudo da distribuição do alucinógeno 25I-NBOMe,  $m/z$  428,07 na superfície do selo por MALDI(+) MSI, foi utilizado o pulverizador auxiliado pelo probe da fonte ESI para a deposição individual das quatro matrizes: DHB, CHCA, SA e TCNQ, nas concentrações de 5, 10, 15, 20 e 25  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , em pequenos pedaços ( $0,2 \times 0,5$  cm) da amostra S5, **figura 12a-d**.

Imagens por MALDI(+) MSI utilizando a matriz DHB (**figura 12a**) mostram que, embora essa matriz seja amplamente utilizada em análises no modo positivo de ionização para a detecção de moléculas menores e de drogas em tecidos,<sup>108,109</sup> para a análise de substâncias psicoativas diretamente em selo, não se mostrou igualmente eficiente na ionização do íon de  $m/z$  428,07 na superfície da amostra S5. Além disso, o aumento da sua concentração (de 5 para 25  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), não melhorou sua performance de ionização do íon  $[25\text{I-NBOMe}+\text{H}]^+$ . Entre as possíveis causas, a baixa eficiência de ionização de um composto pode ser atribuída a fatores como o alto número de sinais de massa na faixa de massa baixa, resultando em fenômenos de supressão de íons e sobreposição do analito de interesse.<sup>110</sup>

Por outro lado, os resultados da MALDI(+) MSI obtidos pelas matrizes SA (**figura 12b**) e TCNQ (**figura 12c**) apresentaram melhor desempenho na ionização do composto psicoativo, no entanto, nenhuma mudança significativa na intensidade do sinal de  $m/z$  428,07, nas diferentes concentrações avaliadas, foi observada. Neste caso, a baixa ionização de 25I-NBOMe por MALDI MSI utilizando o reagente matricial SA pode estar relacionada à sua maior eficiência na ionização de moléculas com maior Mw, como por exemplo as proteínas.<sup>111</sup> Enquanto isso, a matriz TCNQ é amplamente utilizada em análises de polímeros sintéticos.<sup>112</sup>

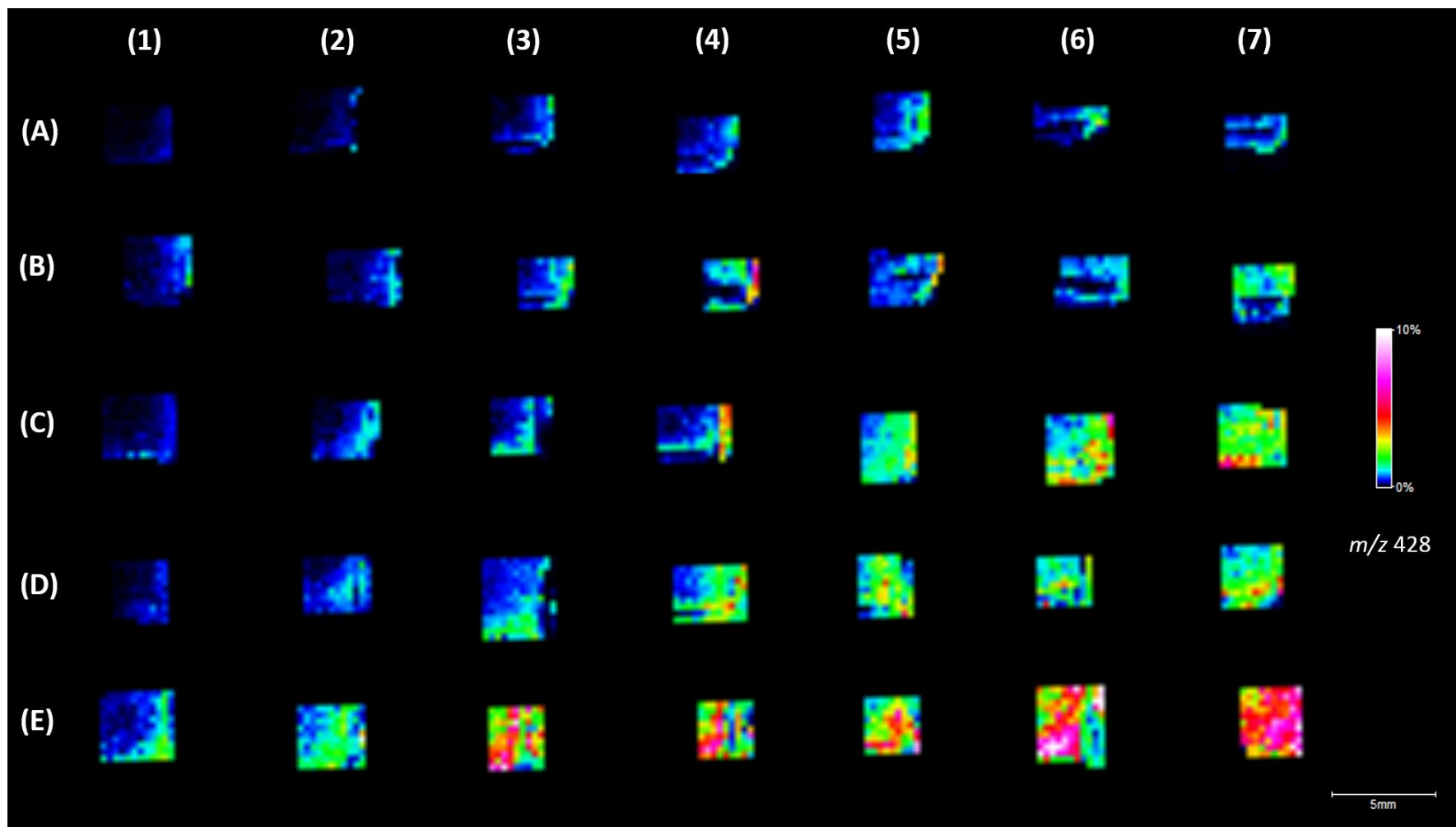


**FIGURA 12.** Imagens por MALDI(+) MSI da distribuição do composto 25I-NBOMe,  $m/z$  428,07 na superfície da amostra S5 utilizando quatro matrizes diferentes: (a) DHB, (b) SA, (c) TCNQ e (d) CHCA em diferentes concentrações (de 5 a 25  $\text{mg.mL}^{-1}$ ).

A matriz de CHCA mostrou-se mais eficiente no processo de dessorção e ionização da molécula de 25I-NBOMe (**figura 12d**), evidenciada pela maior abundância e uniformidade da distribuição do composto psicoativo na superfície do selo, principalmente com concentrações superiores a 15  $\text{mg.mL}^{-1}$  de CHCA. Para confirmar a eficiência de ionização dessa matriz, foi realizada uma simulação de um selo, onde concentrações conhecidas (0,0125; 0,025; 0,0375; 0,05; 0,0625; 0,075 e 0,1  $\text{mg.mL}^{-1}$ ), do padrão 25I-NBOMe, substância psicoativa mais encontrada nos selos apreendidos, foram aplicadas em pedaços de papel de filtro de 0,5 × 0,5 cm,

construindo uma curva para cada uma das cinco concentrações (5, 10, 15, 20 e 25 mg.mL<sup>-1</sup>) da melhor matriz, CHCA.

Na **figura 13**, a simulação dos selos com concentrações conhecidas de 25I- NBOMe mostra, pela maior intensidade na escala de cores na imagem, que a concentração de 25 mg.mL<sup>-1</sup> da matriz foi mais eficiente na ionização do composto de *m/z* 428,07 da amostra com 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> de 25I-NBOMe (**figura 13. 7e**).

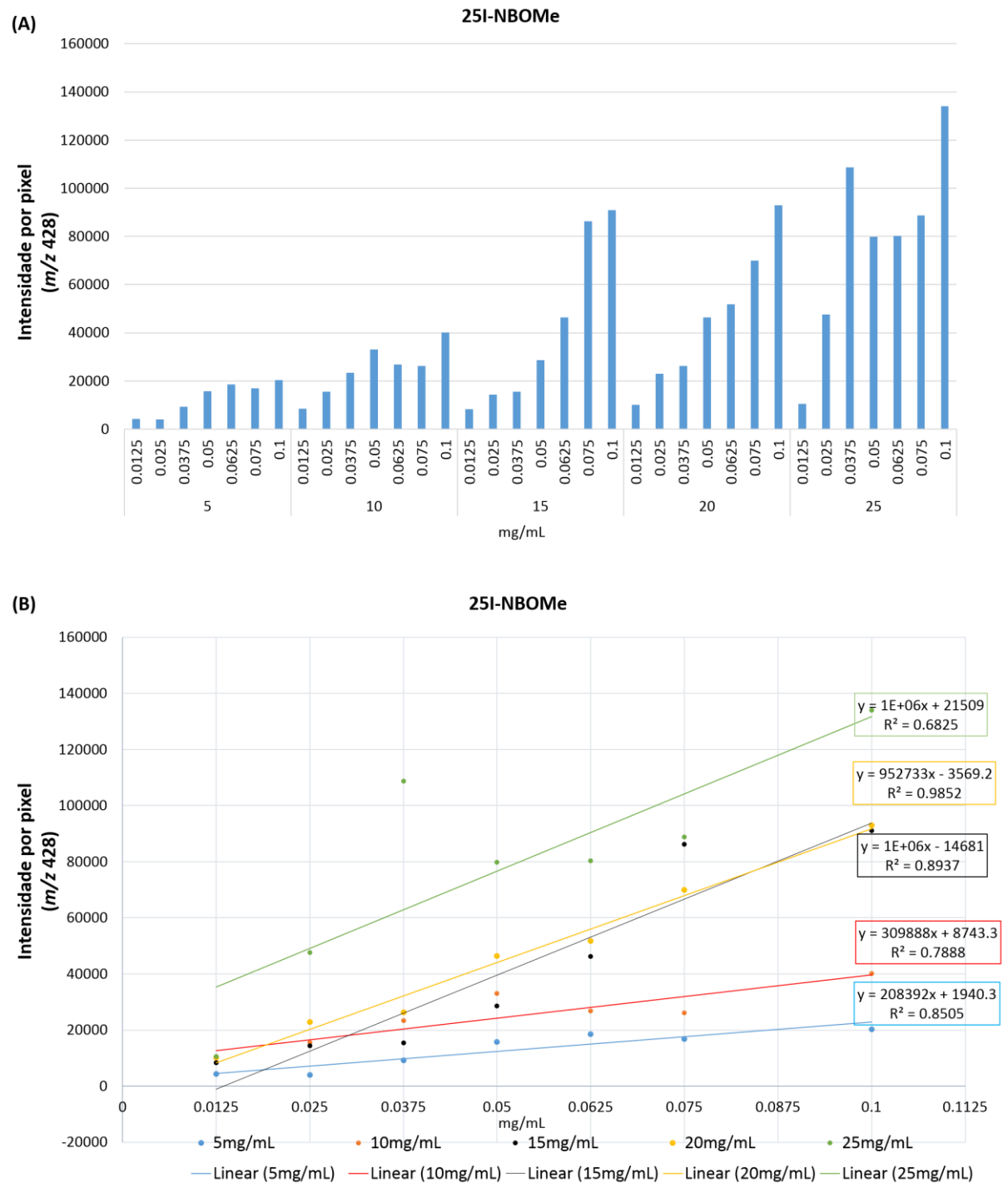


**FIGURA 13.** Imagens adquiridas por MALDI(+)-MSI da distribuição do 25I-NBOMe de  $m/z$  428,07 na superfície de pedaços de papel filtro de 0,5 cm  $\times$  0,5 cm dopado com sete concentrações diferentes de 25I-NBOMe: coluna 1, 0,0125 mg.mL<sup>-1</sup>; coluna 2, 0,025 mg.mL<sup>-1</sup>; coluna 3, 0,0375 mg.mL<sup>-1</sup>; coluna 4, 0,05 mg.mL<sup>-1</sup>; coluna 5, 0,0625 mg.mL<sup>-1</sup>; coluna 6, 0,075 mg.mL<sup>-1</sup> e coluna 7, 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>. Papeis filtro revestidos com a matriz CHCA em cinco concentrações diferentes, exibidas nas linhas: (a) (5 mg.mL<sup>-1</sup>), (b) (10 mg.mL<sup>-1</sup>), (c) (15 mg.mL<sup>-1</sup>), (d) (20 mg.mL<sup>-1</sup>) e (e) (25 mg.mL<sup>-1</sup>).

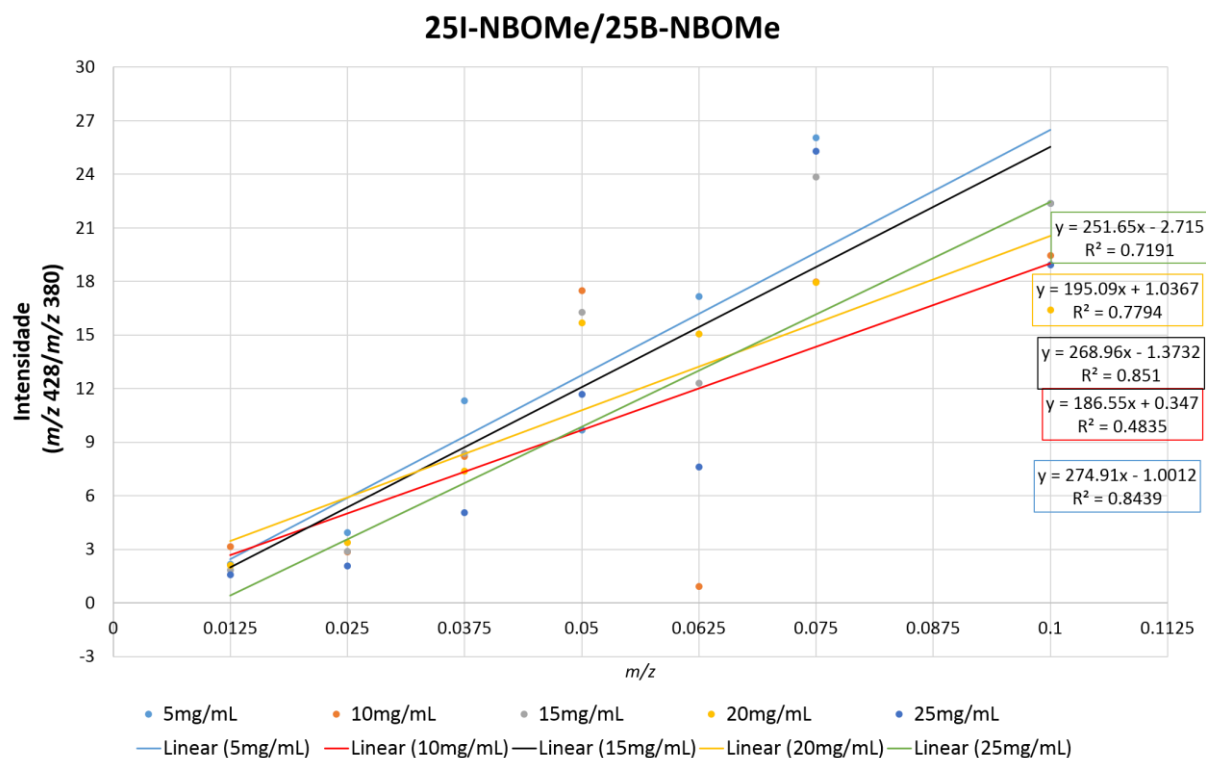
Além disso, nos gráficos de barra e de dispersão relacionando a intensidade absoluta por *pixel* do espectro médio do composto psicoativo (25I-NBOMe) de  $m/z$  428,07 com a concentração impregnada da droga no papel de filtro (**figura 14.a b**) é possível observar que uma maior sensibilidade analítica e linearidade da matriz CHCA é obtida a partir da concentração  $15 \text{ mg.mL}^{-1}$ , visto pelo coeficiente angular da equação de regressão linear.

Ao passo que, quando se adiciona um padrão interno nesse caso, o 25B-NBOMe, o efeito da concentração da matriz na sensibilidade do método diminui, ao relacionar a razão da intensidade absoluta por pixel dos íons de  $m/z$  428/380 (25I-NBOMe/25B-NBOMe) com a concentração do padrão 25I-NBOMe impregnado no papel filtro, como mostrado no gráfico da **figura 15**.

Essa maior eficiência na ionização do 25I-NBOMe, utilizando a matriz CHCA, pode estar relacionada às interações da matriz com o analito através de pontes de hidrogênio.<sup>113</sup> A matriz CHCA é geralmente aplicada na ionização de compostos com valores menores de  $m/z$ , e na identificação de drogas em exames toxicológicos, como nas análise de fios de cabelos e em impressões digitais.<sup>76,83,90</sup>



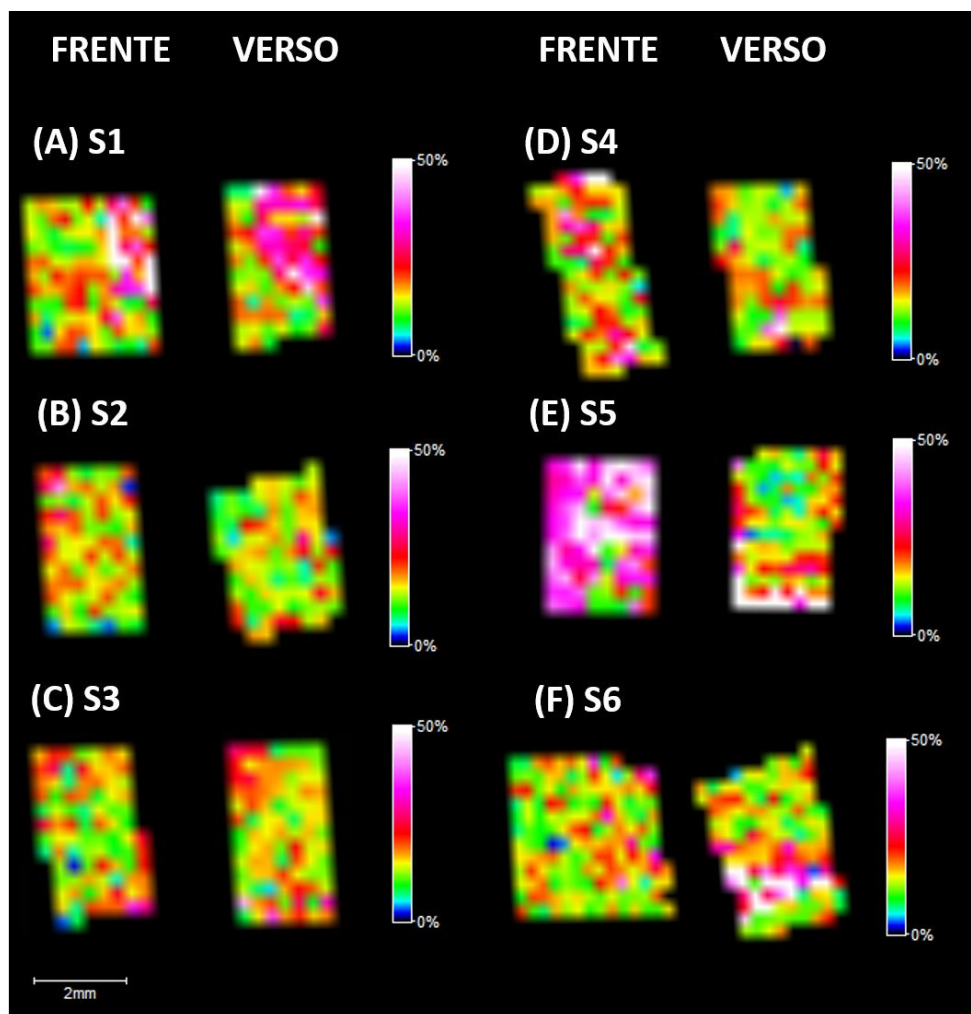
**FIGURA 14.** (a) Gráfico de barras e (b) Gráfico de dispersão relacionando a intensidade do 25I-NBOMe ( $m/z$  428,07) do espectro médio por *pixel* em função de sua concentração para cada uma das cinco concentrações da matriz CHCA. A equação de regressão linear para cada concentração de matriz também é exibida.



**FIGURA 15.** Gráfico de dispersão mostrando a razão da intensidade do 25I-NBOMe ( $m/z$  428) por 25B-NBOMe ( $m/z$  380) em função de sua concentração em cinco diferentes concentrações da matriz CHCA. A equação de regressão linear para cada concentração de matriz também é apresentada no gráfico.

A fim de investigar possíveis diferenças na distribuição espacial do composto 25I-NBOMe na frente e no verso das amostras S1-S6, a matriz CHCA na concentração de  $25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  foi aplicada com pulverizador, e o íon de  $m/z$  428,07 foi monitorado. Análises MALDI(+) MSI mostraram uma distribuição similar em ambos os lados do selo (frente e verso) para as amostras S2-S4, **figura 16b-d**. No entanto, para as amostras S1 e S6, **figura 16a e 16f**, uma maior abundância na distribuição do 25I-NBOMe é observada no verso, enquanto que na amostra S5 (**figura 16e**), a abundância é observada na frente.

Sendo assim, a distribuição espacial sugere que esses selos podem ser de três diferentes registros de apreensão, baseado no perfil químico determinado, ou seja, para as amostras estudadas, três (S2-S4, S1 e S6 e S5) diferentes processos de deposição/aplicação da substância psicoativa no substrato de papel.



**FIGURA 16.** Imagens MALDI(+) MSI da distribuição de 25I-NBOMe de  $m/z$  428,07 na frente e no verso dos selos apreendidos (a-f), amostras S1 a S6, revestida com a matriz CHCA na concentração de  $25 \text{ mg.mL}^{-1}$ .

Portanto, estudos de ionização de compostos psicoativos adicionados a papéis absorventes, comercializados e apreendidos pela polícia local, tiveram suas distribuições espaciais avaliadas pela otimização da metodologia MALDI(+) MSI, que contemplou testes de aplicação de reagentes matriciais, variando suas concentrações e estruturas químicas (quatro matrizes foram avaliadas).

Além disso, procurou-se verificar se houve regularidade no processo de adição da droga ao selo por meio de análises de imagens. Essas informações preliminares devem ser estabelecidas para futuros estudos quantitativos por MALDI MSI onde estudos já indicaram a necessidade da utilização de padrão interno para este propósito.<sup>114</sup>

## 5. CONCLUSÃO

A caracterização inicial pela técnica de LDI(+) MS na análise de selos apreendidos pela polícia local, proporcionou a identificação dos compostos psicoativos 25I-NBOH e 25I-NBOMe,  $m/z$  de 414,05 e 428,07, respectivamente com precisão de massa inferior a 4 ppm. Experimentos de CID foram realizados para ambas as moléculas protonadas, nas quais se produziram como fragmentos de íons principais  $m/z$  308 e 291 para a molécula 25I-NBOH ( $m/z$  414), e  $m/z$  306, 291 e 276 para a molécula 25I-NBOMe ( $m/z$  428). O método de análise de MALDI(+) MS e MALDI(+) MSI foram otimizados, e dentre as formas de aplicação estudadas, o método utilizando pulverizador auxiliado pelo probe da fonte ESI mostrou-se mais adequado comparado ao uso da pipeta automática, pois proporcionou uma maior homogeneidade de deposição na superfície, resultante da detecção dos íons monitorados com maior uniformidade e intensidades. Na avaliação da melhor matriz e concentração, CHCA, em concentrações iguais ou superiores a  $15 \text{ mg.mL}^{-1}$ , foi mais eficiente na ionização do composto 25I-NBOMe em comparação às demais matrizes avaliadas (SA, TCNQ e DHB), apresentando uma distribuição uniforme do composto monitorado na superfície do selo. Além disso, estudos de imagem da frente e do verso dos selos mostraram uma possível irregularidade no método de deposição da substância psicoativa nos papéis de absorção. Estes resultados demonstram o alto poder analítico proporcionado pelas análises de FT-ICR, instrumento de alto desempenho capaz de determinar a composição elementar das *designer drugs* e suas distribuições espaciais na superfície do selo com alta precisão e poder de resolução.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bulcão, R. P., Garcia, S. C., Limberger, R. P., Baierle, M., Arbo, M. D., Chasin, A. A., Tavares, R. G. *Designer drugs: aspectos analíticos e biológicos. Quím. Nova*, **35**, 149-158, 2012.
2. Moro, E. T., Ferraz, A. A. F., Módolo, N. S. P. Anestesia e o usuário de ecstasy. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, **56 (2)**, 183-188, 2006.
3. Henderson, G. L. Designer drugs: past history and future prospects. *Journal of Forensic Science*, **33(2)**, 569-575, 1988.
4. De Letter, E. A., Clauwaert, K. M., Lambert, W. E., Van Bocxlaer, J. F., De Leenheer, A. P., Piette, M. H. Distribution study of 3, 4-methylenedioxymethamphetamine and 3, 4-methylenedioxyamphetamine in a fatal overdose. *J. Anal. Toxicol.*, **26(2)**, 113-118, 2002.
5. Ledberg, A. The interest in eight new psychoactive substances before and after scheduling. *Drug & Alcohol Dependence*, **152**, 73-78, 2015.
6. Gissoni, K. C. DESIGNER DRUGS. *Acta de Ciências e Saúde*, **1**, 1-6, 2016.
7. Ibáñez, M., Sancho, J. V., Bijlsma, L., van Nuijs, A. L., Covaci, A., Hernández, F. Comprehensive analytical strategies based on high-resolution time-of-flight mass spectrometry to identify new psychoactive substances. *Anal. Chem.*, **57**, 107-117, 2014.
8. Honorio, J. C., Kawamura, R. L., Galvao, M. M. R., Herrerias, T., Cabrera, E. R. Legal highs: a public health problem, *Cadernos de Saúde Publica*, **30**, 228-230, 2014.
9. Zawilska, J. B., Andrzejczak, D. Next generation of novel psychoactive substances on the horizon—A complex problem to face. *Drug Alcohol Depend.*, **157**, 1-17, 2015.
10. Eshleman, A. J. Wolfrum. K.. M., John F. Reed, J.F., Kim S. O., Johnson, R. A., Janowsky, A. Neurochemical pharmacology of psychoactive substituted N-benzylphenethylamines: High potency agonists at 5-HT<sub>2A</sub> receptors. *Biochem. Pharmacol.*, **158**, 27-34, 2018.

11. Lawn, W., Barratt, M., Williams, M., Horne, A. A. Winstockthe nbome hallucinogenic drug series: patterns of use, characteristics of users and self-reported effects in a large international sample. *J. Psychopharmacol.*, **28**, 780-78, 2014.
12. Chia, X. W. S., Ong, M. C., Yeo, Y. Y. C., Ho, Y. J., Nasir, E. I. B. A., Tan, L. L. J., Chua, P. Y. Yap, T.W.A., Lim, J. L. W. Simultaneous analysis of 2Cs, 25-nbohs, 25-nbomes and LSD in seized exhibits using liquid chromatography–tandem mass spectrometry: A targeted approach. *Forensic Sci. Int.*, **301**, 394-401, 2019.
13. Rickli A., Luethi D., Reinisch J., Buchy D., Hoener M. C., Liechti M. E. Receptor interaction profiles of novel N-2-methoxybenzyl (nbome) derivatives of 2,5-dimethoxy-substituted phenethylamines (2C drugs). *Neuropharmacology*, **99**, 546-553, 2015.
14. Halberstadt A. L., Geyer, M. A. Effects of the hallucinogen 2,5-dimethoxy-4-iodophenethylamine (2C-I) and superpotent N-benzyl derivatives on the head twitch response. *Neuropharmacology*, **77**, 200-207, 2014.
15. Rose, S. R., Poklis, J. L., Poklis, A. A case of 25I-nbome (25-I) intoxication: a new potent 5-HT<sub>2A</sub> agonist designer drug. *Clin. Toxicol.*, **51 (3)**, 174-177, 2013.
16. Robayo, D. A. S., Mendez, W. F. G., Ocampo, G. T. Moreano, M. R. Analysis of blotter papers employed in the commercialization of new hallucinogenic substances of the 2,5-dimethoxy-N-(2-methoxybenzyl) phenethylamine series seized in the city of Bogotá by applying gas chromatography coupled to a selective mass ion trap detector. *J. Braz. Chem. Soc.*, **27**, 992-997, 2016.
17. Stellpflug, S.J., Kealey, S.E., Hegarty, C.B., Janis, G.C. 2-(4- Iodo-2,5-dimethoxyphenyl)-N-[(2-methoxyphenyl)methyl]ethanamine (25I-nbome): clinical case with unique confirmatory testing. *J. Med. Toxicol.*, **10**, 45–50. 2014.
18. Poklis, J. L., Raso, S. A., Alford, K. N., Poklis, A., Peace, M. R. Analysis of 25I-nbome, 25B-nbome, 25C-nbome and other dimethoxyphenyl-N-[(2-methoxyphenyl)methyl] ethanamine derivatives on blotter paper. *J. Anal. Toxicol.*, **39(8)**, 617-623, 2015.
19. Arantes L. C., Júnior, E. F., de Souza, L. F., Cardoso, A. C., Alcântara, T. L. F., Lião, L. M., Machado, Y., Lordeiro, R. A., Neto, J. C., Andrade, A. F. B. 25I-NBOH: a

new potent serotonin 5-HT 2A receptor agonist identified in blotter paper seizures in Brazil. *Forensic Toxicol.*, **35(2)**, 408-414, 2017.

20. Peters, F. T., Martinez-Ramirez, J. A. Analytical toxicology of emerging drugs of abuse. *In Therapeutic drug monitoring*, **32**, 532-539, 2010.

21. Ibáñez, M., Sancho, J. V., Bijlsma, L., van Nuijs, A. L., Covaci, A., Hernández, F. Comprehensive analytical strategies based on high-resolution time-of-flight mass spectrometry to identify new psychoactive substances. *Anal. Chem.*, **57**, 107-117, 2014.

22. Sekuła, K., Zuba, D., Structural elucidation and identification of a new derivative of phenethylamine using quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **27 (18)**, 2081–2090, 2013.

23. Neto, J.C., Andrade, A.F.B., Lordeiro, R.A., Machado, Y., Elie, M., Júnior, E.F., Arantes, L.C. Preventing misidentification of 25I-NBOH as 2C-I on routine GC–MS analyses, *Forensic Toxicol.*, **35 (2)**, 415–420, 2017.

24. Zuba, D., Sekuła, K. Analytical characterization of three hallucinogenic N-(2-methoxy) benzyl derivatives of the 2C-series of phenethylamine drugs. *Drug Test. Anal.*, **5(8)**, 634-645, 2013.

25. dos Santos, P.F., Souza, L.M., Merlo, B.B., Costa, H.B., Tose, L.V., Santos, H., Vanini, G., Machado, L.F., Ortiz, R.S., Limberger, R.P., Vaz, B.G., Romão, W. 2-(4-Iodo-2, 5 dimetoxifenil)- n-[(2-metoxifenil) metil] etamina ou 25I-NBOMe: caracterização química de uma designer drug, *Química Nova*, **39(2)** 229–237, 2016

26. Pereira, L. S., Lisboa, F. L., Neto, J. C., Valladão, F. N., Sena, M. M. Direct classification of new psychoactive substances in seized blotter papers by ATR-FTIR and multivariate discriminant analysis. *Microchem. J.*, **133**, 96-103, 2017.

27. Pereira, L. S., Lisboa, F. L., Neto, J. C., Valladão, F. N., Sena, M. M. Screening method for rapid classification of psychoactive substances in illicit tablets using mid infrared spectroscopy and PLS-DA. *Forensic Sci. Int.*, **288**, 227-235, 2018.

28. Neto, J. C. Rapid detection of NBOME's and other NPS on blotter papers by direct ATR-FTIR spectrometry. *Forensic Sci. Int.*, **252**, 87-92, 2015.
29. Souza, L. F., Vieira, T. S., Alcantara, G. B., Lião, L. M. HR-MAS NMR for rapid identification of illicit substances in tablets and blotter papers seized by police department. *J. Braz. Chem. Soc.*, **27(11)**, 2141-2148, 2016.
30. Oiyee, E.N., Katayama, J.M.T., Ribeiro, M.F.M., de Oliveira, M.F. Electrochem analysis of 25H-nbome by Square Wave Voltammetry, *Forensic Chem.*, **5**, 86–90, 2017.
31. Elbardisy, H. M., Foster, C. W., Marron, J., Mewis, R. E., Sutcliffe, O. B., Belal, T. S., Talaat, W., Daabees, H. G., Banks, C. E. Quick Test for Determination of N-Bombs (Phenethylamine Derivatives, NBOMe) Using High-Performance Liquid Chromatography: A Comparison between Photodiode Array and Amperometric Detection. *ACS omega*, **4(11)**, 14439-14450, 2019.
32. Correa, D. N., Santos, J. M., Eberlin, L. S., Eberlin, M. N., Teunissen, S. F. Forensic Chemistry and ambient mass spectrometry: a perfect couple destined for a happy marriage?. *Anal. Chem.*, **88**, 2515–2526, 2016.
33. Anstetta, A., Chuab, F., Alonsoc, D.E., Smith, R.W. Characterization of 2C-phenethylamines using high-resolution mass spectrometry and Kendrick mass defect filters. *Forensic Chem.*, **7**, 47-55, 2018.
34. Romão, W., Sabino, B. D., Bueno, M. I., Vaz, B. G., Júnior, A. C., Maldaner, A. O., Augusti, R. LSD and 9, 10-dihydro-LSD Analyses in Street Drug Blotter Samples via Easy Ambient Sonic-Spray Ionization massspectrometry (EASI-MS). *J. Forensic Sci.*, **57(5)**, 1307-1312, 2012.
35. Silverstein, R. M., Webster, F. X., Kiemle, D. J., Bryce, D. L. **Spectrometric identification of organic compounds**. 1ª Ed. Estados Unidos: Editora John wiley & sons, 2014. 455 p.
36. Shen, L., Zhang, J., Yang, Q., Manicke, N. E., Ouyang, Z. High throughput paper spray mass spectrometry analysis. *Clin. Chim. Acta*, **420**, 28-33, 2013.

37. Singh, K. D., del Miguel, G. V., Gaugg, M. T., Ibañez, A. J., Zenobi, R., Kohler, M., Sinues, P. M. Translating secondary electrospray ionization–high-resolution mass spectrometry to the clinical environment. *J. Breath Res.*, **12(2)**, 027113, 2018.
38. ROMÃO, W. **Novas Aplicações da Espectrometria de Massas em Química Forense**. Tese de Doutorado –Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2010.
39. 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(3)**, 530-536, 2012.
40. Weston, D. J. Ambient ionization mass spectrometry: current understanding of mechanistic theory; analytical performance and application areas. *Analyst*, **135(4)**, 661-668, 2010.
41. Botch-Jones, S., Foss, J., Barajas, D., Kero, F., Young, C., Weisenseel, J. The detection of NBOMe designer drugs on blotter paper by high resolution time-of-flight mass spectrometry (TOFMS) with and without chromatography, *Forensic Sci. Int.*, **267** 89–95, 2016.
42. Kauppila, T. J., Arvola, V., Haapala, M., Pól, J., Aalberg, L., Saarela, V., Franssila, S., Kotiaho, T., Kostianen, R. Direct analysis of illicit drugs by desorption atmospheric pressure photoionization, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **22(7)**, 979–985, 2008.
43. Romão, W., Sabino, B. D., Bueno, M. I. M., Vaz, B.G., Júnior, A. C., Maldaner, A. O., de Castro, E. V., Lordeiro, R. A., Nascentes, C. C., Eberlin, M. N., Augusti, R. LSD and 9, 10-dihydro-LSD analyses in street drug blotter samples via easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry (EASI-MS), *J. Forensic Sci.*, **57(5)**, 1307–1312, 2012.
44. Carvalho, T. C., Oliveira, I. F., Tose, L. V., Vanini, G., Kill, J. B., Neto, A. C. Romão, W. Qualitative analysis of designer drugs by paper spray ionisation mass spectrometry (PSI-MS). *Anal. Chem.*, **8**, 614-620, 2016.
45. Hoffmann, E., Stroobant, V. **Mass spectrometry, principles and applications**. Chichester. 3ª Ed. Inglaterra: Editora Wiley, 2007. 489 p.

46. Karas, M., Bachmann, D., Hillenkamp, F. Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Anal. Chem.*, **57(14)**, 2935-2939, 1985.
47. Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U., Hillenkamp, F. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int. J. Mass Spectrom. and ion processes*, **78**, 53-68, 1987.
- 48- Nobel Prize in Chemistry Disponível em: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2002/tanaka/facts/> Acesso em 01de agosto de 2019.
- 49- Hillenkamp, F., Peter-katalinic, J. **MALDI MS: a practical guide to instrumentation, methods and applications**. Weinheim: Wiley, 2014. 459 p.
- 50 - Knochenmuss, R. Ion formation mechanisms in UV- MALDI. *Analyst*, **131(9)**, 966-986, 2006.
- 51- Knochenmuss, R., Zenobi, R. MALDI ionization: the role of in-plume processes. *Chemistry Reviews*, **103(2)**, 441-452, 2003.
- 52 - Ostermann, K. M., Luf, A., Lutsch, N. M., Dieplinger, R., Mechtler, T. P., Metz, T. F., Schmid, R., Kasper, D. C. MALDI Orbitrap mass spectrometry for fast and simplified analysis of novel street and designer drugs. *Clin. Chim. Acta*, **433**, 254-258, 2014.
53. 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**, 193-197, 2012.
54. Minakata, K., Yamagishi, I., Nozawa, H., Hasegawa, K., Wurita, A., Gonmori, K., Suzuki, M., Watanabe, K., Suzuki, O. MALDI-TOF mass spectrometric determination of four pyrrolidino cathinones in human blood. *Forensic Toxicol.*, **32(1)**, 169-175, 2014.
55. Minakata, K., Yamagishi, I., Nozawa, H., Hasegawa, K., Wurita, A., Gonmori, K., Suzuki, M., Watanabe, K., Suzuki, O. Determination of new pyrrolidino cathinone derivatives, PVT, F-PVP, MPHP, PV8, PV9 and F-PV9, in human blood by MALDI-Q-TOF mass spectrometry. *Forensic Toxicol.*, **33(1)**, 148-154, 2015.

56. Nozawa, H., Minakata, K., Yamagishi, I., Hasegawa, K., Wurita, A., Gonmori, K., Watanabe, K. MALDI-TOF mass spectrometric determination of eight benzodiazepines with two of their metabolites in blood. *Legal Medicine*, **17(3)**, 150-156, 2015.
57. Poetzsch, M., Steuer, A. E., Hysek, C. M., Liechti, M. E., & Kraemer, T. (2016). Development of a high-speed MALDI-triple quadrupole mass spectrometric method for the determination of 3, 4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in oral fluid. *Drug Test. Anal.*, **8(2)**, 235-240.
58. McDonnell, L. A. E Heeren, R. M. **Imaging mass spectrometry. Mass spectrometry reviews**, 2007, v 26, 606-643.
59. Groseclose, M. R., Castellino, S. A mimetic tissue model for the quantification of drug distributions by MALDI imaging mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **85(21)**, 10099-10106, 2013.
60. Esquenazi, E., Yang, Y. L., Watrous, J., Gerwick, W. H., Dorrestein, P. C. Imaging mass spectrometry of natural products. *Nat. Prod. Rep.*, **26(12)**, 1521-1534, 2009.
61. Spengler, B., Hubert, M., Kaufmann, R. MALDI ion imaging and biological ion imaging with a new scanning UV-laser microprobe. In: Proceedings of the 42nd annual conference on mass spectrometry and allied topics. Chicago, Illinois, May 29–June 3, 1994.
62. Römpf, A., Spengler, B. Mass spectrometry imaging with high resolution in mass and space, *Histochem. Cell Biol.*, **139(6)**, 759–783, 2013.
63. 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)**, 4751-4760, 1997.
64. Stoeckli, M., Chaurand, P., Hallahan, D. E., Caprioli, R. M. Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues. *Nature medicine*, **7(4)**, 493-496, 2001.

65. Smith, A., Piga, I., Galli, M., Stella, M., Denti, V., Del Puppo, M., Magni, F. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Mass Spectrometry Imaging in the Study of Gastric Cancer: A Mini Review. *Int. J. Mol. Sci.*, **18(12)**, 2588, 2017.
66. 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**, 48-60, 2016.
67. Prideaux, B., Stoeckli, M. Mass spectrometry imaging for drug distribution studies. *J. Proteomics*, **75(16)**, 4999-5013, 2012
68. Sturtevant, D., Lee, Y. J., Chapman, K. D. Matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry imaging (MALDI-MSI) for direct visualization of plant metabolites in situ. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **37**, 53-60, 2016.
69. Watrous, J. D., & Dorrestein, P. C. Imaging mass spectrometry in microbiology. *Nat. Rev. Microbiol.*, **9(9)**, 683, 2011.
70. Earnshaw, C. J., Carolan, V. A., Richards, D. S. E Clench, M. R. Direct analysis of pharmaceutical tablet formulations using matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **24**, 1665-1672, 2010.
71. Wolstenholme, R., Bradshaw, R., Clench, M. R., Francese, S. Study of latent fingerprints by matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging of endogenous lipids. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **23(19)**, 3031-3039, 2009.
72. Francese, S., Bradshaw, R., Ferguson, L. S., Wolstenholme, R., Clench, M. R., Bleay, S. Beyond the ridge pattern: multi-informative analysis of latent fingerprints by MALDI mass spectrometry. *Analyst*, **138(15)**, 4215-4228, 2013.
73. Bradshaw, R., Bleay, S., Wolstenholme, R., Clench, M. R., Francese, S. Towards the integration of matrix assisted laser desorption ionisation mass spectrometry imaging into the current fingerprint examination workflow. *Forensic Sci. Int.*, **232(1-3)**, 111-124, 2013.

74. Bradshaw, R., Rao, W., Wolstenholme, R., Clench, M. R., Bleay, S., Francese, S. Separation of overlapping fingermarks by matrix assisted laser desorption ionisation mass spectrometry imaging. *Forensic Sci. Int.*, **222**, 318-326, 2012.
75. Bradshaw, R., Bleay, S., Clench, M. R., Francese, S. Direct detection of blood in fingermarks by MALDI MS profiling and imaging. *Science & justice*, **54(2)**, 110-117, 2014.
76. Groeneveld, G., De Puit, M., Bleay, S., Bradshaw, R., Francese, S. Detection and mapping of illicit drugs and their metabolites in fingermarks by MALDI MS and compatibility with forensic techniques. *Sci. Rep.*, **5**, 11716, 2015.
77. Bradshaw, R., Wolstenholme, R., Blackledge, R. D., Clench, M. R., Ferguson, L. S., Francese, S. A novel matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging based methodology for the identification of sexual assault suspects. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **25(3)**, 415-422, 2011.
78. Miki, A., Katagi, M., & Tsuchihashi, H. Recent improvements in forensic hair analysis for illicit drugs. *Journal of health science*, **49(5)**, 325-332, 2003.
79. Miki, A., Katagi, M., Zaitso, K., Nishioka, H., Tsuchihashi, H. Development of a two-step injector for GC-MS with on-column derivatization, and its application to the determination of amphetamine-type stimulants (ATS) in biological specimens. *J Chromatogr B.*, **865**, 25-32, 2008.
80. Miki, A., Katagi, M., Tsuchihashi, H. Determination of methamphetamine and its metabolites incorporated in hair by column-switching liquid chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol* **27**, 95-102, 2003.
81. Harun, N., Anderson, R. A., Cormack, P. A. Analysis of ketamine and norketamine in hair samples using molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Anal Bioanal Chem.*, **396**, 2449-2459, 2010.
82. Miki, A., Katagi, M., Shima, N., Kamata, H., Tatsuno, M., Nakanishi, T., Tsuchihashi, H., Takubo, T., Suzuki, K. Imaging of methamphetamine incorporated into hair by MALDI-TOF mass spectrometry. *Forensic Toxicol.*, **29(2)**, 111-116, 2011.

83. Porta T, Grivet C, Kraemer T, Varesio E, Hopfgartner G.. Single hair cocaine consumption monitoring by mass spectrometric imaging, *Anal. Chem.*, **83(11)**, 4266–4272, 2011.
84. 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**, 10328–10334, 2016.
85. Kernalléguen, A., Enjalbal, C., Alvarez, J. C., Belgacem, O., Léonetti, G., Lafitte, D., Péliissier-Alicot, A. L. (2018). Synthetic cannabinoid isomers characterization by MALDI-MS3 imaging: application to single scalp hair. *Analytica chimica acta*, **1041**, 87-93, 2018.
86. Lin, H., Zeng, X., Wang, Q., Li, Y., Sun, B., Wang, Y., Wang, H. (2019). Identification and imaging of indole-3-carboxamide cannabinoids in hair using matrix-assisted laser-desorption/ionization mass spectrometry. *Forensic Toxicology*, **38**, 216–226, 2020.
87. Nakanishi, T., Nirasawa, T., Takubo, T. Quantitative mass barcode-like image of nicotine in single longitudinally sliced hair sections from long-term smokers by matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry imaging. *J. Anal. Toxicol.*, **38(6)**, 349-353, 2014
88. Poetzsch, M., Baumgartner, M. R., Steuer, A. E., Kraemer, T. Segmental hair analysis for differentiation of tilidine intake from external contamination using LC-ESI-MS/MS and MALDI-MS/MS imaging. *Drug testing and analysis*, **7(2)**, 143-149, 2015.
89. 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 testing and analysis*, **7(10)**, 859-865, 2015.
90. Flinders, B., Beasley, E., Verlaan, R. M., Cuypers, E., Francese, S., Bassindale, T., Clench, M. R., 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)**, 2462-2468, 2017.

91. Wang, H., Wang, Y. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric imaging for the rapid segmental analysis of methamphetamine in a single hair using umbelliferone as a matrix. *Anal. Chem. Acta*, **975**, 42-51, 2017.
92. Fukuyama, Y., Tanimura, R., Maeda, K., Watanabe, M., Kawabata, S. I., Iwamoto, S., Izumi, S., Tanaka, K. Alkylated dihydroxybenzoic acid as a MALDI matrix additive for hydrophobic peptide analysis. *Anal. Chem.*, **84(9)**, 4237-4243, 2012.
93. 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**, 103-110, 2014.
94. Kuwayama, K., Tsujikawa, K., Miyaguchi, H., Kanamori, T., Iwata, Y.T., Inoue, H. Distribution measurements of 3, 4-methylenedioxymethamphetamine and its metabolites in organs by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry using an automatic matrix spraying system with an air brush and a turntable, *Anal. Bioanal. Chem.*, **404**.1823–1830, 2012.
95. Joye, T., Bararpour, N., Augsburger, M., Boutrel, B., Thomas, A. In situ metabolomic changes in rat hippocampus after acute cocaine administration. *Int. J. Mass Spectrom.*, **437**, 87-91, 2019.
96. 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)**, 1757-1764, 2019.
97. Rodrigues, L. R., de Oliveira, D. N., Ferreira, M. S., Catharino, R. R. In situ assessment of atorvastatin impurity using MALDI mass spectrometry imaging (MALDI-MSI). *Anal. Chem. Acta*, **818**, 32-38, 2014.
98. Scotcher, K., Bradshaw, R. The analysis of latent fingerprints on polymer banknotes using MALDI-MS. *Sci. reports*, **8(1)**, 1-13, 2018.
99. Nielsen, L. M., Holm, N. B., Leth-Petersen, S., Kristensen, J. L., Olsen, L., Linnet, K , Characterization of the hepatic cytochrome P450 enzymes involved in the

metabolism of 25I-NBOMe and 25I-NBOH, *Drug Testing and Analysis*, **9(5)**, 671–679, 2017.

100. Caspar, A. T., Helfer, A. G., Michely, J. A., Auwärter, V., Brandt, S. D., Meyer, M. R., Maurer, H. H. Studies on the metabolism and toxicological detection of the new psychoactive designer drug 2-(4-iodo-2, 5-dimethoxyphenyl)-N-[(2-methoxyphenyl) methyl] ethanamine (25I-NBOMe) in human and rat urine using GC-MS, LC-MS n, and LC-HR-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.*, **407(22)**, 6697-6719, 2015.

101. de Morais, D. R., Barbosa, I. L., Cunha, K. F., Tripodi, G. L., Angolini, C. F. F., Franco, M. F., de Aquino, E.M., Eberlin, M.N., Costa J.L., Costa, J. L. EASI-IMS an expedite and secure technique to screen for 25I-NBOH in blotter papers. *J. Chromatogr. A*, **52(10)**, 701-706, 2017.

102. Francese, S., Dani, F. R., Traldi, P., Mastrobuoni, G., Pieraccini, G., & Moneti, G. MALDI mass spectrometry imaging, from its origins up to today: the state of the art. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, **12(2)**, 156-174, 2009.

103. Van Hove, E. R. A., Smith, D. F., Heeren, R. M. A concise review of mass spectrometry imaging. *J. Chromatogr. A*, **1217(25)**, 3946-3954, 2010.

104. Cohen, L. H., Gusev, A. I. Small molecule analysis by MALDI mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, **373(7)**, 571-586, 2002.

105. Hensel, R. R., King, R. C., Owens, K. G. Electrospray sample preparation for improved quantitation in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **11(16)**, 1785-1793, 1997.

106. Malys, B. J., Owens, K. G. Improving the analyte ion signal in matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry via electrospray deposition by enhancing incorporation of the analyte in the matrix. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **31(9)**, 804-812, 2017.

107. Seeley, E. H., Oppenheimer, S. R., Mi, D., Chaurand, P., Caprioli, R. M. (2008). Enhancement of protein sensitivity for MALDI imaging mass spectrometry after chemical treatment of tissue sections. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **19(8)**, 1069-1077, 2008.

108. Troendle, F. J., Reddick, C. D., Yost, R. A. Detection of pharmaceutical compounds in tissue by matrix-assisted laser desorption/ionization and laser desorption/chemical ionization tandem mass spectrometry with a quadrupole ion trap. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **10(12)**, 1315-1321., 1999.
109. Kinumi, T., Saisu, T., Takayama, M., Niwa, H. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using an inorganic particle matrix for small molecule analysis. *J. Mass Spectrom.*, **35(3)**, 417-422, 2000.
110. Calvano, C. D., Monopoli, A., Cataldi, T. R., Palmisano, F. MALDI matrices for low molecular weight compounds: an endless story?. *Anal. Bioanal. Chem.*, **410(17)**, 4015-4038., 2018.
111. Yalcin, E. B., de la Monte, S. M. Review of matrix-assisted laser desorption ionization-imaging mass spectrometry for lipid biochemical histopathology. *J. Histochem. Cytochem.*, **63(10)**, 762-771, 2015.
112. LI, L. **MALDI mass spectrometry for synthetic polymer analysis**. John Wiley & Sons, 2009, pp. 159–186.
113. Salum, M. L., Giudicessi, S. L., Schmidt De León, T., Camperi, S. A., Erra-Balsells, R. Application of Z-sinapinic matrix in peptide MALDI-MS analysis. *J. Mass Spectrom.*, **52(3)**, 182-186, 2017.
114. de Menezes, M., de Oliveira, D. N., Catharino, R. R. Capillary-induced homogenization of matrix in paper: a powerful approach for the quantification of active pharmaceutical ingredients using mass spectrometry imaging. *Sci. Rep.*, **6**, 29970, 2016.



## Designer drugs analysis by LDI(+), MALDI(+ ) and MALDI(+ ) imaging coupled to FT-ICR MS



Camila M. de Almeida<sup>a,b</sup>, Fernanda E. Pinto<sup>a,b</sup>, Nayara A. dos Santos<sup>a,b</sup>,  
Lindamara M. de Souza<sup>a,b</sup>, Bianca B. Merlo<sup>c</sup>, Christopher J. Thompson<sup>d</sup>, Wanderson Romão<sup>a,b,e,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Petrolômica e Forense, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Avenida Fernando Ferrari, 514, Goiabeiras, Vitória, ES CEP: 29075-910, Brazil

<sup>b</sup> Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Forense (INCT Forense), Brazil

<sup>c</sup> Superintendência de Polícia Técnico-Científica do Estado do Espírito Santo, 29045-402 Vitória, ES, Brazil

<sup>d</sup> Bruker Daltonics, 40 Manning Road, Billerica, MA 01821, United States

<sup>e</sup> Instituto Federal do Espírito Santo (IFES), Av. Ministro Salgado Filho, Soteco, Vila Velha 29106-010, Espírito Santo, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Blotter paper  
Designer drugs  
25I-NBOMe  
25I-NBOH  
MALDI-imaging  
FT-ICR MS

### ABSTRACT

The phenethylamines derivatives, the NBOMes, N-bomb or Smiles, are potent hallucinogens, which are often sold as blotter paper. In this study, the matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) and MALDI mass spectrometry imaging (MALDI-MSI) were coupled to a Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer (FT-ICR MS), a high-resolution equipment with a mass accuracy lower than 4 ppm, and used to analyze seven blotter papers of NBOMes containing 25I-NBOH (2-([2-(4-iodo-2,5-dimethoxyphenyl)ethyl]amino)methyl) phenol,  $m/z$  414) and 25I-NBOMe ((2-(4-iodo-2,5-dimethoxyphenyl)-N-[(2-methoxyphenyl) methyl]ethanamine),  $m/z$  428). An optimization study was performed to evaluate the matrix application (pipette versus sprayer assisted by an ESI probe); the matrix effect in the process of desorption and ionization ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA), 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB), 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane (TCNQ) and sinapinic acid (SA)); and their concentration (from 5 to 25 mg mL<sup>-1</sup>). After, a study of the spatial distribution of the NBOMes derivatives detected in the front and back of the blotter paper surface was performed. MALDI-MS and MALDI-MSI results showed that the matrix sprayer was the best method for matrix application, which allowed a homogeneous detection of the compound when compared to the pipette application. The CHCA matrix, in a concentration higher than 15 mg mL<sup>-1</sup>, displayed a higher ionization efficiency of the 25I-NBOMe compound, commonly detected in blotter paper, where an intense distribution was observed in relation to others matrices. The distribution of the active ingredient studied in the front and back between the six blotter papers analyzed showed that the three of them had a higher concentration of the active ingredient in only one of the sides (two in the back and one in the front), while the others presented a similar distribution in both sides. The ability of MALDI(+ )MS technique in 25I-NBOMe quantification (from 0.0125 to 0.1 mg mL<sup>-1</sup>) was also evaluated, where a better sensitivity and linearity ( $R^2$  0.9852) of the method was observed when high matrix concentrations (15–20 mg mL<sup>-1</sup>) were used.

### 1. Introduction

The term *designer drugs* refers to a synthetic version of an illicit drug modified with the intention to potentialize or create new psychoactive effects [1,2]. Its illicit market is considered dynamic and has been growing worldwide, bringing worries to the government and safety and

public health agencies [3,4].

The main classes of the new psychoactive substances (NPS) are categorized by their structure and effects, being divided in: amphetamines (phenylethylamines); cathinones; piperazines; cannabinoids; ketamine; phenylcyclidine; benzofurans; tryptamines; and opioids [5]. The n-benzylphenethylamines derivatives, such as 25X-NBOMes (2-(4-

**Abbreviations:** MALDI, matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry; LDI, laser desorption/ionization mass spectrometry; MALDI-MSI, matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging; 25I-NBOH, 2-([2-(4-iodo-2,5-dimethoxyphenyl)ethyl]amino)methyl) phenol; 25I-NBOMe, 2-(4-iodo-2,5-dimethoxyphenyl)-N-[(2-methoxyphenyl) methyl]ethanamine; FT-ICR MS, Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry; CHCA,  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid; DHB, 2,5-dihydroxybenzoic acid; TCNQ, 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane; SA, sinapinic acid

\* Corresponding author at: Instituto Federal do Espírito Santo (IFES), Av. Ministro Salgado Filho, Soteco, Vila Velha 29106-010, Espírito Santo, Brazil.

E-mail address: [wanderson.romao@ifes.edu.br](mailto:wanderson.romao@ifes.edu.br) (W. Romão).

<https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104002>

Received 19 February 2019; Received in revised form 12 June 2019; Accepted 12 June 2019

Available online 13 June 2019

0026-265X/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

X-2,5-dimethoxyphenyl)-N-[(2-methoxyphenyl) methyl] ethanamine), and 25X-NBOHs (2-((2-[4-X-2,5dimethoxyphenyl] ethylamino) methyl) phenol), where X could be a halogen like Cl, Br or I, are potent hallucinogens that have a similar hallucinogenic activity to the lysergic acid (LSD) [6]. The NPS are often sold impregnated on blotter paper, which is a highly absorbent paper, being one of the main forms of consumption of NPS, where each small square is sold as a dose [7,8]. They have colorful images printed in its surface as shown in Fig. 1S (see in Supplementary material) and are administrated sublingually [9].

The 2-(4-iodo-2,5-dimethoxyphenyl)-N-[(2-methoxyphenyl)methyl] ethanamine, (25I-NBOMe), Fig. 2S, is a psychedelic drug discovered in 2003 by the chemist Ralf Heim of the University of Berlin, however, blotter papers containing this drug appeared on the illicit market as of 2011 [10]. Since then, derivatives of NBOMes, with halides substitutions, have been identified on blotter papers seized in the illicit drug market [6,11–13].

In Brazil, as of 2014, new compounds derived from the NBOMes were identified, they were called NBOHs, which have a halogen group on carbon 4 ( $C_4$ ) of ring A, similar to the NBOMes, but with the exchange of a methyl group by a hydroxyl group on ring B, such as 2-[[2-(4-iodo-2,5dimethoxyphenyl)ethylamino]methyl] phenol (25I-NBOH) (Fig. 2S) [14].

The new psychoactive substances found in the blotter paper over the years have been identified and characterized by several analytical techniques such as: square wave voltammetry [15], attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) [7,16], high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance (HR-MAS NMR) [17] and near infrared spectroscopy (NIR) [18]. In addition, mass spectrometry (MS) has been widely used in forensic investigations of designer drugs, being extremely versatile, as it allows the use of different sources of ionization (paper spray [8,19], direct sample analysis (DSA) [20,21], electrospray ionization (ESI) [22], desorption atmospheric pressure photoionization (DAPPI) [23], easy ambient sonic-spray ionization (EASI) [24], and matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) [25]). MS also allows to be coupled with separation techniques as gas chromatography (GC) [14,26] and liquid chromatography (LC) [27]. Among the methods cited, MALDI-MS technique has been a rapid analysis strategy for the identification of new substances in drugs of abuse and in the study of active pharmaceutical ingredients and their metabolites in the blood [25,28]. It is based on the emission of laser pulses in femtoseconds that have the ability to desorb the analyte of interest as well as the organic matrix. The chemical matrix absorbs the laser energy at a given laser wavelength, and thus, to transfer protons from the matrix to the components of the sample, allowing the analyte to be desorbed and ionized as a function of their position in a x,y plane [29,30]. This spatial sampling capability allows investigating the chemical distribution on a surface of interest, which is called mass spectrometry imaging (MSI). Due to the soft ionization characteristic of MALDI, MALDI-MSI has been used mainly to study the spatial distribution of native molecules, drugs of abuse and drugs in biological tissues; in addition to active pharmaceutical ingredients on the surface of tablets [31–36]. In the forensic context, it has been applied mainly to the detection of drugs in hair, tissues, blood, and fingerprints present in banknotes [35,37–40]. The main challenge of the MALDI-MSI technique lies in the sample preparation, being the choice of the organic matrix and application, which is used in the desorption and ionization process of the analyte of interest, a crucial step in sample preparation that can have a significant effect on the outcome results of a MSI experiment [41,42].

In this study, analysis of blotter papers containing NBOMes was explored using the laser desorption ionization (LDI), MALDI and MALDI-MSI techniques combined with Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (FT-ICR MS). In order to optimize the ionization process, four matrices were evaluated:  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA), 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB), 7,7,8,8-

tetracyanoquinodimethane (TCNQ) and sinapinic acid (SA) at concentrations of 5, 10, 15, 20 and 25 mg mL<sup>-1</sup>.

## 2. Experimental

### 2.1. Samples and reagents

Seven blotter papers seized and made available by the Civil Police of the State of Espírito Santo (PC-ES), Brazil, were numbered from S1 to S7. DHB, CHCA, SA and TCNQ matrices were purchased from Sigma-Aldrich Chemicals, USA. 25I-NBOMe and 25B-NBOMe standards (both in a 1 mg mL<sup>-1</sup> concentration) were supplied by Cerilliant® Analytical Reference Standards (Texas, USA). Methanol solvent (analytical purity > 99.5%) was purchased by Vetec® Química Fina Ltda, Brazil, and was used in the solubilization of the matrices.

### 2.2. Matrix and sample preparation

Blotter papers were cut to a size of 0.2 × 0.5 cm and fixed on a stainless steel plate with the aid of double-sided tape. The matrices: DHB, CHCA, SA and TCNQ were solubilized in methanol and prepared in different concentrations: 5; 10; 15; 20 and 25 mg mL<sup>-1</sup>. Matrix application was evaluated, being performed in two ways: (i) small volumes (15  $\mu$ L) of matrix was directly spotted onto the surface of the blotter paper using an automatic pipette (Transferpette®); and (ii) with a sprayer assisted by an ESI probe (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), which was accomplished by using the inner capillary of the ESI probe to transfer the matrix solution, and the outer capillary of the probe was used for the nebulization of the matrix solution, to uniformly spray the matrix onto the sample, resulting in a thin circular layer of matrix on the blotter paper surface [43]. In both cases, the process was optimized using blotter paper S7, and, CHCA matrix at a concentration of 25 mg mL<sup>-1</sup>. In application method (ii), the matrix was deposited on the surface of the same sample with continuous flow and controlled time of 30  $\mu$ L min<sup>-1</sup> and 30 s, respectively, with a drying interval of 1 min between the application steps. Nitrogen gas at 10 psi was used as the sheath gas in this matrix deposition step. After optimization of the matrix application method, the ionization efficiency was evaluated in function of the four matrices studied (DHB, CHCA, SA and TCNQ) and their respective concentrations (from 5 to 25 mg mL<sup>-1</sup>). The ionization efficiency was evaluated for the 25I-NBOMe compound and in all cases, blotter paper S5 was used. The matrices tested were deposited using the matrix sprayer with controlled flow and time. To confirm the efficiency of the matrix, a blotter paper simulation was performed with the addition of a known concentrations of the 25I-NBOMe compound (0.0125, 0.025, 0.0375, 0.05, 0.0625, 0.075 and 0.1 mg mL<sup>-1</sup>) into 0.5 cm × 0.5 cm pieces of Whatman® 903 filter paper, forming a curve for each one of the five concentrations (5, 10, 15, 20 and 25 mg mL<sup>-1</sup>) of the CHCA matrix. The linearity of method was evaluated monitoring the abundance of ion of  $m/z$  428; and of the relative intensity of 25I-NBOMe ( $m/z$  428) by 25B-NBOMe ( $m/z$  380) and of CHCA matrix ( $m/z$  401).

An investigation of the spatial distribution of the 25I-NBOMe compound on the front and back of the S1-S6 samples was also conducted, where CHCA matrix was applied at a concentration of 25 mg mL<sup>-1</sup> by the matrix sprayer and the  $m/z$  428 was monitored.

### 2.3. LDI(+), MALDI(+) and MALDI(+) MSI analyses

The LDI(+), MALDI(+) and MALDI(+) MSI analyses were performed on a 9.4 T Solarix FT-ICR mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), equipped with a smartbeam-II™ laser (355 nm) and MALDI source. All spectra were externally calibrated using a solution of arginine (0.05 mg mL<sup>-1</sup>). Prior to MALDI-MSI analyses, a digital image of the blotter papers was acquired and then the plate was inserted into

the FT-ICR MS. All analyses were performed in positive ionization mode in a spectral range between  $m/z$  200 and 1500, with resolving power ( $m/\Delta m_{50\%} \approx 500,000$  at  $m/z$  400, where  $\Delta m_{50\%}$  is the full peak width at half-maximum peak height) and the mass accuracy lower than 4 ppm, which allows the assignment of an unambiguous molecular formula for all singly charged molecular ions. Each analysis was the result of 100 laser shots per pixel, with laser focus setting small ( $\sim 30 \mu\text{m}$ ), laser frequency of 200 Hz and laser power of 33%. In the LDI analyses, 16 average spectra were acquired in enable random walk mode. The ionization efficiency was evaluated monitoring the signal-to-noise ratio and the total ion current (TIC).

Collision-induced dissociation (CID) experiments were performed, where the mass resolution quadrupole was adjusted to an isolation of 1  $m/z$  unit, with laser power of 70% and collision energy of 14.5 V and 21 V for ions of  $m/z$  414 and 428, respectively. Data were analyzed with DataAnalysis software (Bruker Daltonics, USA). The LDI and MALDI images were acquired in a spatial resolution of 300  $\mu\text{m}$  and processed with FlexImaging 3.0 software (Bruker Daltonics, USA).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. LDI(+)-MS and LDI(+)/MS/MS analysis

Initially, blotter papers, samples S1–S7, seized by PC-ES, were analyzed by LDI(+)-MS, and their respective mass spectra are observed in Fig. 1A–G. Blotter papers exhibited a similar spectral profile, with detection mainly of 25I-NBOME (in samples S1–S6, Fig. 1A–F) containing  $m/z$  428.07208 and 450.05406, in protonated form,  $[\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{INO}_3 + \text{H}]^+$ , and as a sodium adduct  $[\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{INO}_3 + \text{Na}]^+$ , respectively, with mass errors of  $< 2$  ppm. The molecule of 25I-NBOH,

$[\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{INO}_3 + \text{H}]^+$ ,  $[\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{INO}_3 + \text{Na}]^+$  and  $[\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{INO}_3 + \text{K}]^+$  ions,  $m/z$  414.05731, 436.03944 and 452.01346, and error = 3.02, 3.28 and 3.36 ppm, respectively, on the other hand, was detected only on the blotter paper S7, Fig. 1G.

CID experiments were performed using samples S2 and S7 for the purpose of identifying the fragmentation patterns of the 25I-NBOME ( $m/z$  428) and 25I-NBOH ( $m/z$  414) molecules. In the LDI(+)/MS/MS spectrum for sample S2, Fig. 2A, the fragmentation patterns of the 25I-NBOME produced the ion at  $m/z$  272 (loss of 156 Da), result from a structural rearrangement, where the neutral molecule,  $\text{CH}_3\text{IN}$ , is released. Another fragment ion is observed at  $m/z$  291, representing the cleavage of the C–N bond and the loss of the neutral molecule  $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}$  (137 Da). Finally, another possibility is observed with the loss of 122 Da, ion of  $m/z$  306, resulting from the cleavage of benzyl followed by a loss of the neutral molecule  $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}$ . These major fragmentation patterns have also been reported by other authors in the study of the 25I-NBOME molecule [44–46]. The proposed mechanisms of fragmentation of 25I-NBOME are suggested in Fig. 2B–D.

In the LDI(+)/MS/MS spectrum of ion of  $m/z$  414, Fig. 3A, an initial loss of 106 Da, fragment ion at  $m/z$  308, is observed, which corresponds to the cleavage of the N–C bond followed by loss of the neutral molecule  $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}$ , resulting in the formation of the 2C-I molecule as  $[\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{INO}_2 + \text{H}]^+$  ion. Sequentially,  $m/z$  308  $\rightarrow$  291 transition, new cleavage of C–N bond releases mass losses of 17 Da, corresponding to elimination of  $\text{NH}_3$  molecule. Another fragmentation pattern can be justified for the fragment ion at  $m/z$  291, with neutral loss of 123 Da, representing the heterolytic cleavage of the C–N bond and loss of the  $\text{C}_7\text{H}_9\text{NO}$  molecule. These fragmentation patterns have been reported in the literature [14,45,47]. The proposed mechanisms of fragmentation of 25I-NBOH are suggested in Fig. 3B–C.

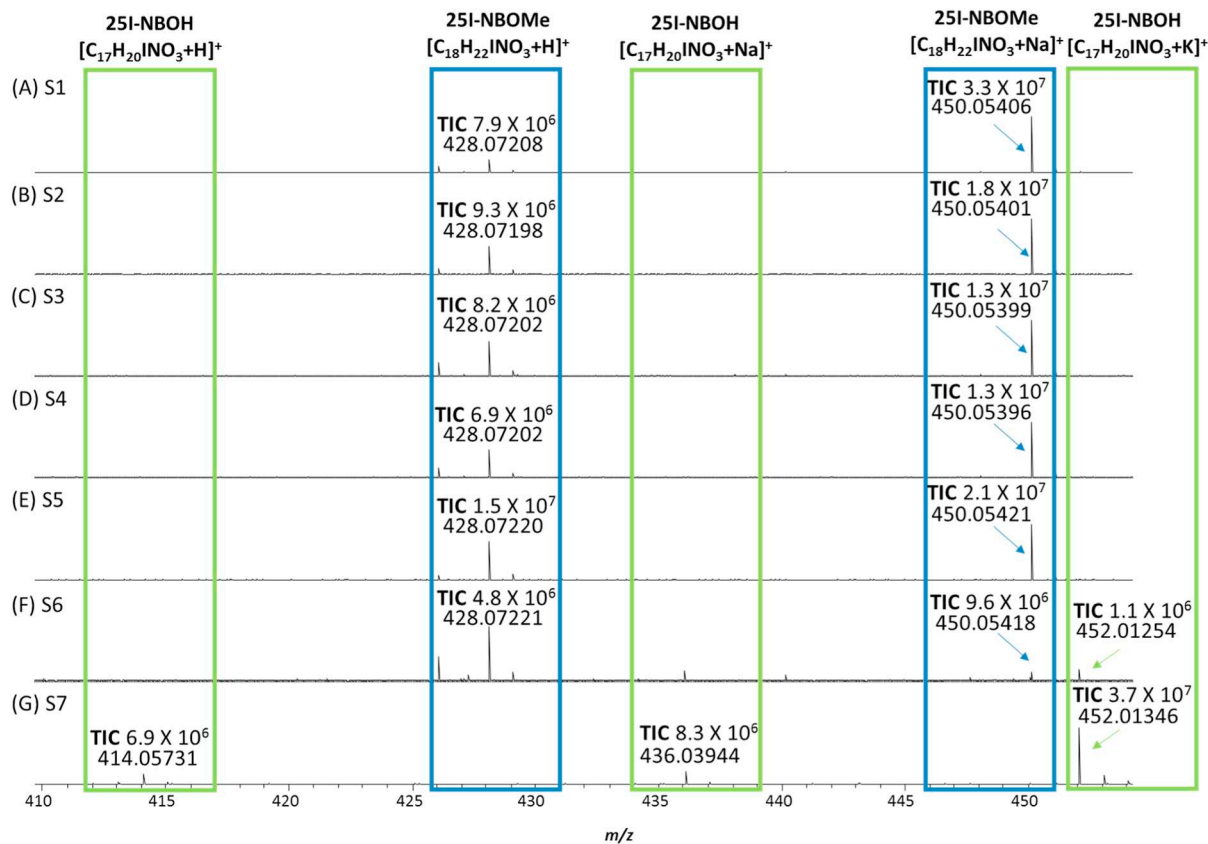


Fig. 1. LDI(+) mass spectra of seven blotter papers showing the presence of designer drugs: (A–F) 25I-NBOME detected as  $[\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{INO}_3 + \text{H}]^+$  and  $[\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{INO}_3 + \text{Na}]^+$  ions at  $m/z$  428 and 450, respectively, and (G) 25I-NBOH, detected as  $[\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{INO}_3 + \text{H}]^+$ ,  $[\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{INO}_3 + \text{Na}]^+$  and  $[\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{INO}_3 + \text{K}]^+$  ions at  $m/z$  414, 436 and 452, respectively.

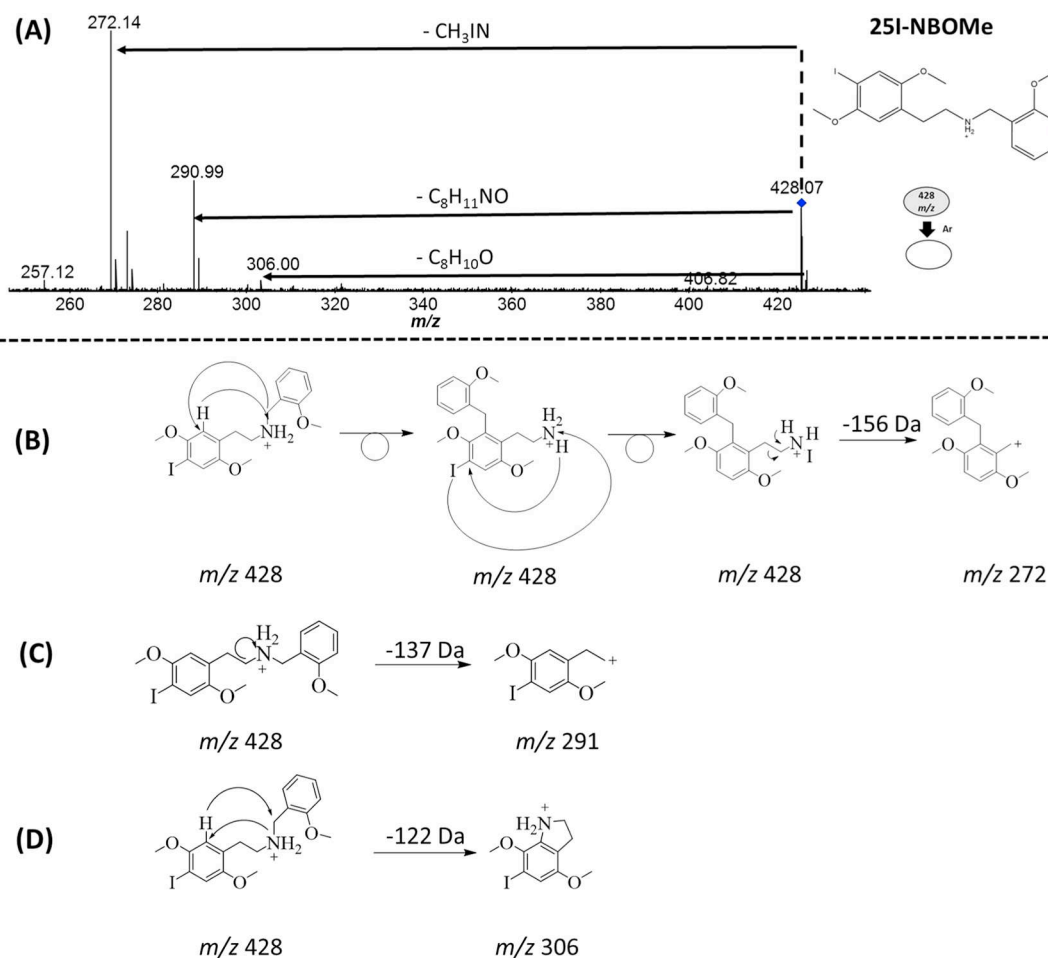


Fig. 2. (A) LDI(+)-MS/MS spectrum for ion of  $m/z$  428 and proposed mechanism from main fragments detected: (B)  $m/z$  272; (C)  $m/z$  291; and (D)  $m/z$  306.

### 3.2. MALDI-MS and MALDI-MSI analyses

A crucial step in sample preparation for a MALDI-MSI experiment is the application of the matrix [48], which must be deposited as a homogeneous layer on the surface of the sample, maintaining the natural arrangement of the analytes in the sample [49].

Two methods of matrix application were tested, the first using an automatic pipette and the second, a sprayer assisted by an ESI probe. This optimization was performed with the CHCA matrix, since it is commonly used in drugs and small molecules analyzes by MALDI-MSI [34,50]. In this analysis, the spatial distribution and the TIC was observed for the ion of  $m/z$  414, characteristic of substance 25I-NBOH, present in the sample S7.

In the images generated by MALDI(+) MSI (Fig. 4A–C), the application of the matrix with sprayer assisted by an ESI probe [51] proved to be more efficient in the ionization of ion of  $m/z$  414 (Fig. 4C), detecting a higher signal intensity of the compound of interest on the blotter paper surface when compared to the automatic pipette method (Fig. 4B) as well as the LDI(+)-MS technique, i.e., without the use of matrix (Fig. 4A). In addition, a higher sensitivity, measured by the TIC values for the ion of  $m/z$  414, was observed using the matrix sprayer in the MALDI(+) mass spectrum (Fig. 4F), which presented a higher value of TIC ( $8.0 \times 10^7$ ). This indicates that the matrix sprayer had a higher ionization power when compared to the mass spectra obtained by the automatic pipette (TIC  $5.7 \times 10^7$ , Fig. 4E) and without the use of the matrix. Therefore, it is necessary to facilitate the ionization of the ion of interest ( $m/z$  414) and to decrease the suppression caused by the paper signal, i.e., ion of  $m/z$  575.07841 (TIC  $3.0 \times 10^7$ , Fig. 4D). One of the reasons for this efficiency may be related to the small droplets

uniformly formed by the matrix on the surface of the sample during the process of deposition by the matrix sprayer [51,52]. The use of automatic pipettes for the application of the matrix can result in a heterogeneous layer, causing an inefficient ionization and likely to change the arrangement of the analyzed substances on the surface of the sample [49,53].

To evaluate the best matrix and their concentration in the distribution study of 25I-NBOMe hallucinogen,  $m/z$  428, the spatial distribution of this ion was measured on the surface of the blotter paper by MALDI-MSI from the individual deposition of four matrices: DHB, CHCA, SA and TCNQ, in the concentrations of 5, 10, 15, 20 and 25 mg mL<sup>-1</sup> in small pieces ( $0.2 \times 0.5$  cm) of sample S5, Fig. 5A–D. The matrices were applied with the matrix sprayer [51].

MALDI(+)-MS images using the DHB matrix (Fig. 5A) show that, although this matrix is widely used in positive ionization analysis for the detection of drugs in tissues, [54] for the analysis of psychoactive substances in blotter papers, it was not efficient in detecting the spatial distribution of the ion of  $m/z$  428. Furthermore, the effect of increasing its concentration (from 5 to 25 mg mL<sup>-1</sup>), does not improve the ionization efficiency of the  $[25I-NBOMe+H]^+$  ion. Among the possible causes of a low ionization efficiency of a compound can be attributed to factors such as: matrix effects, signal interference, or analyte suppression [55]. Conversely, the MALDI-MSI results obtained by SA (Fig. 5B) and TCNQ (Fig. 5C) matrices showed better performance. However, no significant change in signal intensity of  $m/z$  428 was observed at the different concentrations evaluated. In this case, the low ionization of 25I-NBOMe by MALDI-MSI using the matrix reagent SA may be related to its higher efficiency only in the ionization of molecules with higher  $M_w$ , such as proteins [56]. Meanwhile, the TCNQ matrix is widely used

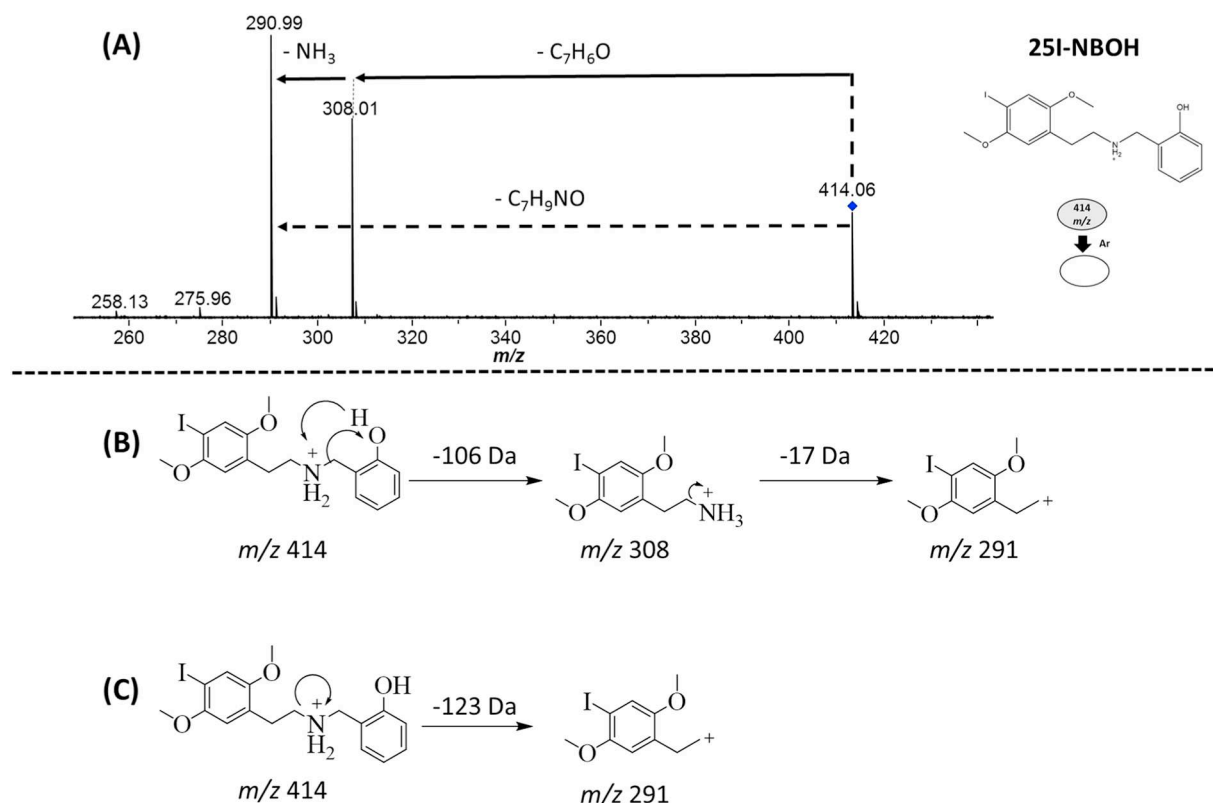


Fig. 3. (A) LDI(+)MS/MS spectrum for ion of  $m/z$  414 and proposed mechanism from main fragments detected: (B)  $m/z$  308 and  $m/z$  291; and (C)  $m/z$  291.

in analyses of synthetic polymers [57].

The CHCA matrix showed to be more efficient in the ionization of 25I-NBOMe (Fig. 5D), evidenced by the higher abundance and uniform distribution of the compound on the surface of the blotter paper, especially at concentrations higher than  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ . In order to confirm the ionization efficiency of the CHCA matrix, a blotter paper simulation was performed, where known concentrations of 25I-NBOMe ( $0.0125, 0.025, 0.0375, 0.05, 0.0625, 0.075$  and  $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$ ), the most common compound found in the blotter papers, was applied into

$0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$  pieces of filter papers, constructing a curve for each of the five concentrations ( $5, 10, 15, 20$  and  $25 \text{ mg mL}^{-1}$ ) of the CHCA matrix. In the Fig. 3S of the Supplementary material, the blotter paper simulation of known concentrations of 25I-NBOMe shows that the highest concentration of matrix ( $25 \text{ mg mL}^{-1}$ ) was more efficient in the sample with  $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$  of 25I-NBOMe, expressed by the higher intensity in the color scale. Besides, the bar and scatter plots of Fig. 4SA and B (Supplementary material) show that a higher analytical sensitivity and linearity of the CHCA matrix is ever obtained when its

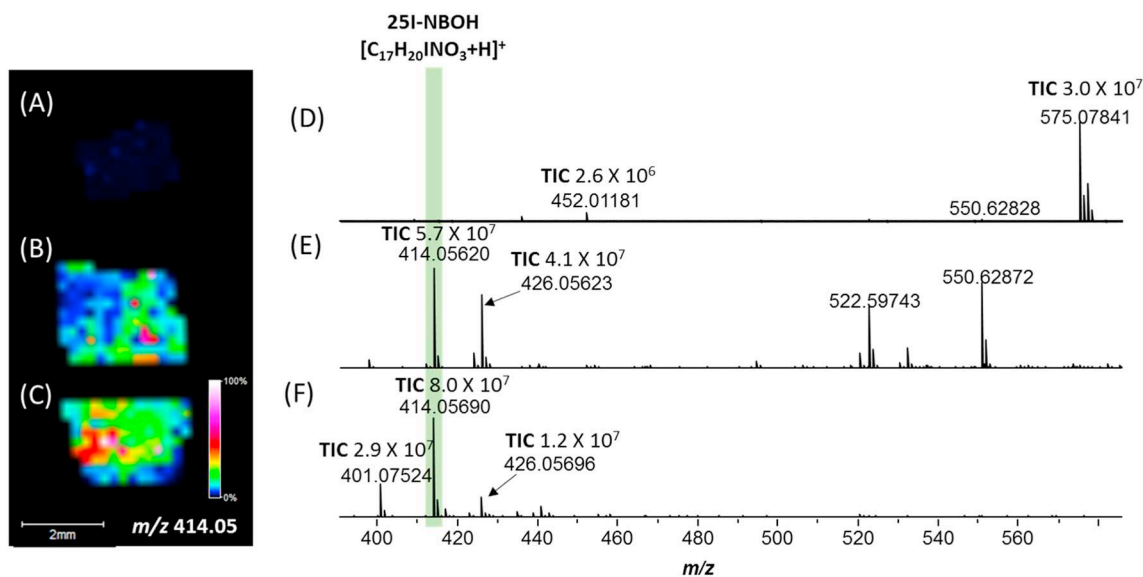


Fig. 4. MS images showing the distribution of 25I-NBOH molecule at  $m/z$  414 on the surface of sample S7: using (A) LDI(+), and (B–C) MALDI(+), (B) with CHCA matrix applied via automatic pipette and (C) with a sprayer assisted by an ESI probe. LDI(+) (D) and MALDI(+) (E–F) mass spectra of their respective MS images, A and B–C, respectively.

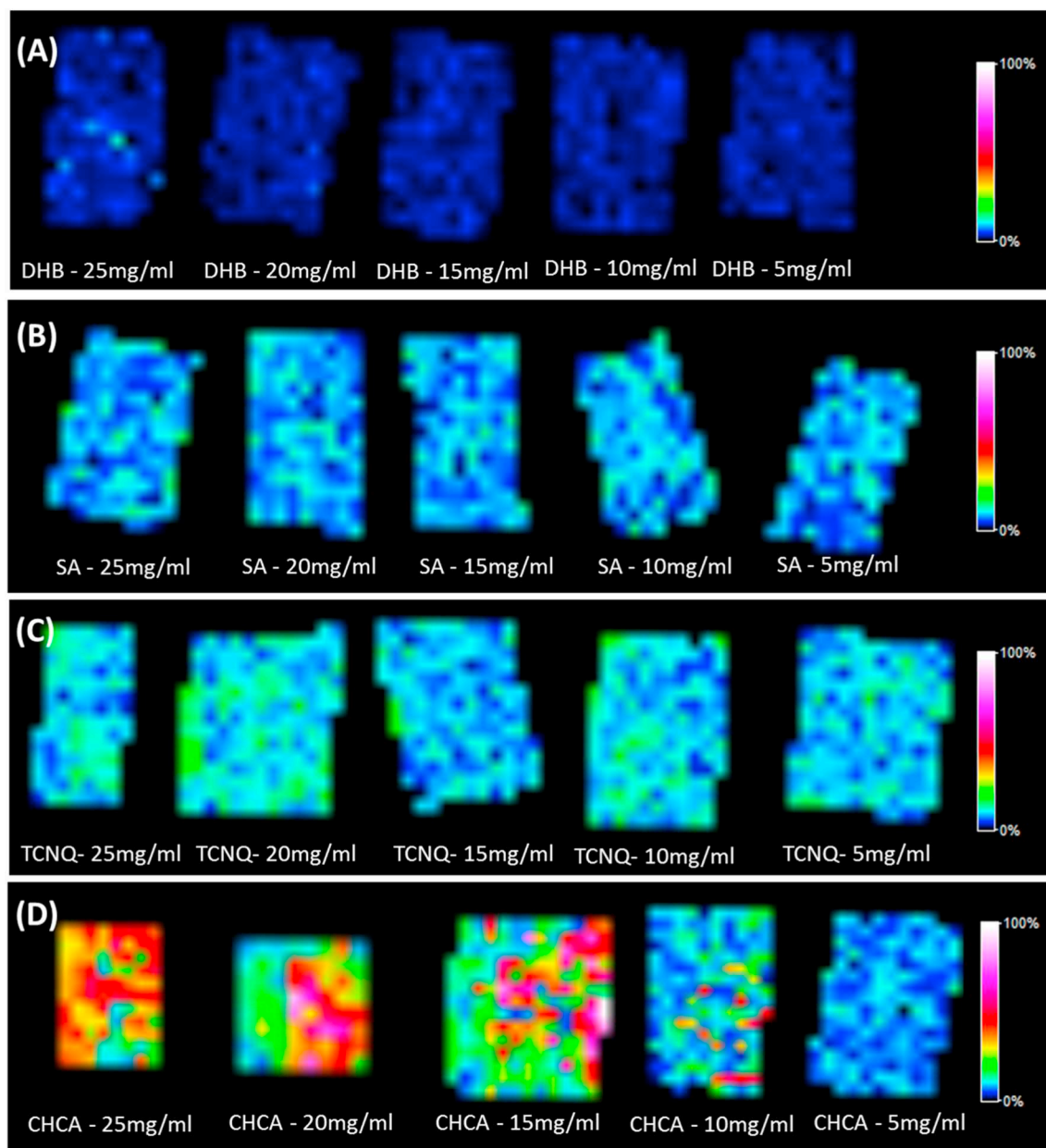


Fig. 5. Positive MALDI MS images showing the distribution of 25I-NBOME at  $m/z$  428 on the surface of sample S5 coated with four different matrices: (A) DHB, (B) SA, (C) TCNQ and (D) CHCA in different concentrations (from 5 to 25  $\text{mg mL}^{-1}$ ).

concentration is higher than 15  $\text{mg mL}^{-1}$ , Fig. 4SB. This behavior can be observed by the angular coefficient of the linear regression equation from monitoring of abundance intensity of  $m/z$  428 signal (Fig. 4S). On other hand, the effect of matrix concentration in sensitivity of method can be reduced when an external standard (in this case, 25B-NBOME) is added such as the results showed from monitoring of the relative intensity of ions of  $m/z$  428/380 (25I-NBOME/25B-NBOME), Fig. 5Sa. This higher efficiency in the ionization of 25I-NBOME, provided using the CHCA matrix, may be related to the interactions of the matrix with the analyte through hydrogen bonds [58]. The CHCA matrix is generally applied in the ionization of compounds of lower  $m/z$  values, also commonly used in forensic analysis [34,59].

In order to investigate possible differences in the spatial distribution of the 25I-NBOME compound on the front and back of the S1-S6 samples, the CHCA matrix at 25  $\text{mg mL}^{-1}$  concentration was applied with matrix sprayer, and the ion of  $m/z$  428 was monitored. MALDI-MSI analyses showed a similar distribution on both sides of the blotter

papers (front and back) for the samples S2-S4, Fig. 6SB-D. Conversely, for samples S1 and S6, Fig. 6SA and F, a greater abundance for the distribution of 25I-NBOME is observed on the back, whereas in sample S5 (Fig. 6SE), a greater abundance is on the front. Therefore, the spatial distribution suggests that these blotter papers could be from three distinct seizure records based on the chemical profile determined, that is, for the samples studied, three (S2-S4, S1 and S6, and S5) different processes of deposition/application of the active ingredient on the paper substrate.

Ionization studies of psychoactive compounds intentionally added to absorption papers, illegally commercialized and seized by the local police, had their spatial distributions evaluated by optimizing MALDI (+)MSI methodology, that contemplated tests of matrix reagent application forms, varying their concentrations and chemical structures (four matrices were evaluated). In addition, we sought to verify if there was regularity in the process of addition of the drug to the blotter paper by imaging analyses. This preliminary information should be

established for future quantitative studies by MALDI-MSI, which will be carried out by the group, where other studies have already indicated the need to use an internal standard for this purpose [60].

#### 4. Conclusions

The initial characterization by the LDI(+)-MS technique in the analysis of blotter papers seized by PC-ES provided the identification of the psychoactive compounds 25I-NBOH and 25I-NBOMe, having  $m/z$  values of 414 Da and 428 Da, respectively and mass accuracy lower than 4 ppm. CID experiments were performed for both protonated molecules, in which produced major fragment ions at  $m/z$  308 and 290 for the 25I-NBOH molecule ( $m/z$  414), and fragment ions at  $m/z$  306, 291 and 272 for the 25I-NBOMe molecule ( $m/z$  428). The experiments of MALDI(+)MS and MALDI(+)MSI were optimized, where among the application forms studied, the matrix sprayer showed to be the best method, compared to the use of the automatic pipette, providing a greater surface homogeneity, resulting in the detection of the monitored ions with greater uniformity and intensity. In the evaluation of the best matrix and concentration, the CHCA, in concentrations higher than  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ , were more efficient in the ionization of compound 25I-NBOMe in comparison to the other matrices evaluated, presenting a uniform distribution of the drug throughout the blotter paper surface. In addition, imaging studies on the front and back of the blotter papers showed a possible irregularity of the deposition method of the drug to the absorption papers. These results have demonstrated the high analytical power provided by the FT-ICR MS technique, reaching the elemental composition of the drugs compounds with high mass accuracy and resolving power. Future work on quantification will be developed in the study of this drug by MALDI-MSI, aiming to classify the samples in function of their production process, since the technique is a powerful analytical tool on the rise in analyses of forensic chemistry.

#### Declaration of Competing Interest

None.

#### Acknowledgements

The authors thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) (23038.007083/2014-40), FAPES, Brazil (73309516/16), and CNPq, Brazil (445987/2014-6, and 465450/2014-8) for financial support. The authors would also like to thank the Núcleo de Competências em Química do Petróleo and LabPetro for using their installations and the Civil Police of Espírito Santo for providing the samples.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104002>.

#### References

- R.P. Bulcão, S.C. Garcia, R.P. Limberger, M. Baierle, M.D. Arbo, A.A.M. Chasin, F.V. Thiesen, R.G. Tavares, Designer drugs: aspectos analíticos e biológicos, *Quím Nova* 35 (1) (2012) 149–158, <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000100027>.
- A. Ledberg, The interest in eight new psychoactive substances before and after scheduling, *Drug Alcohol Depend.* 152 (2015) 73–78, <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2015.04.020>.
- United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC) World Drug Report 2016. United Nations, New York. [https://www.unodc.org/doc/wdr2016/WORLD\\_DRUG\\_REPORT\\_2016\\_web.pdf](https://www.unodc.org/doc/wdr2016/WORLD_DRUG_REPORT_2016_web.pdf), 2016 (Accessed 1 July 2018).
- J.C. Honorio, R.L. Kawamura, M.M.R. Galvao, T. Herrerias, E.R. Cabrera, Legal highs: a public health problem, *Cad. Saúde Pública.* 30 (2) (2014) 228–230, <https://doi.org/10.1590/0102-311XPPE010214>.
- J.B. Zawilska, D. Andrzejczak, Next generation of novel psychoactive substances on the horizon—a complex problem to face, *Drug Alcohol Depend.* 157 (2015) 1–17, <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2015.09.030>.
- J. L. Poklis, S. A. Raso, K. N. Alford, A. Poklis, M. R. Peace, Analysis of 25I-NBOMe, 25B-NBOMe, 25C-NBOMe and other dimethoxyphenyl-N-[(2-methoxyphenyl) methyl] ethanamine derivatives on blotter paper, *J. of Anal Toxicol.* 39(8) (2015) 617–623. doi:0.1093/jat/bkv073.
- J.C. Neto, Rapid detection of NBOMe's and other NPS on blotter papers by direct ATR-FTIR spectrometry, *Forensic Sci. Int.* 252 (2015) 87–92, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.04.025>.
- T.C. Carvalho, I.F. Oliveira, L.V. Tose, G. Vanini, J.B. Kill, A.C. Neto, L.F. Machado, J.C.L. Ambrosio, V.L. Júnior, B.G. Vaz, W. Romão, Qualitative analysis of designer drugs by paper spray ionisation mass spectrometry (PSI-MS), *Anal. Methods* 8 (3) (2016) 614–620, <https://doi.org/10.1039/C5AY01265A>.
- United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), Recommended Method for Testing Lysergide (LSD). Manual for Use by National Narcotic Laboratories, United Nations Publication, (1989) (Vienna, Austria).
- S.R. Rose, J.L. Poklis, Poklis, A case of 25I-NBOMe (25-I) intoxication: a new potent 5-HT<sub>2A</sub> agonist designer drug, *Clin. Toxicol.* 51 (3) (2013) 174–177, <https://doi.org/10.3109/15563650.2013.772191>.
- P. Nikolaou, I. Papoutsis, M. Stefanidou, C. Spiliopoulou, S. Athanaselis, 2C-I-NBOMe, an “N-bomb” that kills with “Smiles”, *Toxicological and legislative aspects, Drug Chem. Toxicol.* 38 (1) (2015) 113–119, <https://doi.org/10.3109/01480545.2014.911882>.
- D. Zuba, K. Sekula, A. Buczek, 25C-NBOMe - new potent hallucinogenic substance identified on the drug market, *Forensic Sci. Int.* 227 (1–3) (2013) 7–14, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2012.08.027>.
- M.H.Y. Tang, C.K. Ching, M.S.H. Tsui, F.K.C. Chu, T.W.L. Mak, Two cases of severe intoxication associated with analytically confirmed use of the novel psychoactive substances 25B-NBOMe and 25C-NBOMe, *Clin. Toxicol.* 52 (5) (2014) 561–565, <https://doi.org/10.3109/15563650.2014.909932>.
- L.C. Arantes, E.F. Júnior, L.F. de Souza, A.C. Cardoso, T.L.F. Alcântara, L.M. Lião, Y. Machado, R.A. Lordeiro, J.C. Neto, A.F.B. Andrade, 25I-NBOH: a new potent serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor agonist identified in blotter paper seizures in Brazil, *Forensic Toxicol* 35 (2) (2017) 408–414, <https://doi.org/10.1007/s11419-017-0357-x>.
- E.N. Oiyee, J.M.T. Katayama, M.F.M. Ribeiro, M.F. de Oliveira, Electrochem analysis of 25H-NBOMe by Square Wave Voltammetry, *Forensic Chem* 5 (2017) 86–90, <https://doi.org/10.1016/j.forc.2017.07.001>.
- L.S. Pereira, F.L. Lisboa, J.C. Neto, F.N. Valladão, M.M. Sena, Direct classification of new psychoactive substances in seized blotter papers by ATR-FTIR and multivariate discriminant analysis, *Microchem. J.* 133 (2017) 96–103, <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.03.032>.
- L.F. Souza, T.S. Vieira, G.B. Alcântara, L.M. Lião, HR-MAS NMR for rapid identification of illicit substances in tablets and blotter papers seized by police department, *J. Braz. Chem. Soc.* 27 (11) (2016) 2141–2148, <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160106>.
- L.O. Magalhães, L.C. Arantes, J.W.B. Braga, Identification of NBOMe and NBOH in blotter papers using a handheld NIR spectrometer and chemometric methods, *Microchem. J.* 144 (2019) 151–158, <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.08.051>.
- E. Domingos, T.C. de Carvalho, I. Pereira, G.A. Vasconcelos, C.J. Thompson, R. Augusti, R.R.T. Rodrigues, L.V. Tose, H. Santos, J.R. Araujo, B.G. Vaz, W. Romão, Paper spray ionization mass spectrometry applied to forensic chemistry—drugs of abuse, inks and questioned documents, *Anal. Methods* 9 (30) (2017) 4400–4409, <https://doi.org/10.1039/C7AY01091E>.
- S. Botch-Jones, J. Foss, D. Barajas, F. Kero, C. Young, J. Weisenseel, The detection of NBOMe designer drugs on blotter paper by high resolution time-of-flight mass spectrometry (TOFMS) with and without chromatography, *Forensic Sci. Int.* 267 (2016) 89–95, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.08.008>.
- M.K. McGonigal, J.A. Willhide, P.B. Smith, N.M. Elliott, F.L. Dorman, Analysis of synthetic phenethylamine street drugs using direct sample analysis coupled to accurate mass time of flight mass spectrometry, *Forensic Sci. Int.* 275 (2017) 83–89, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.02.025>.
- K. Sekula, D. Zuba, Structural elucidation and identification of a new derivative of phenethylamine using quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 27 (18) (2013) 2081–2090, <https://doi.org/10.1002/rcm.6667>.
- T.J. Kauppila, V. Arvola, M. Haapala, J. Pól, L. Aalberg, V. Saarela, S. Franssila, T. Kotiaho, R. Kostiaainen, Direct analysis of illicit drugs by desorption atmospheric pressure photoionization, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22 (7) (2008) 979–985, <https://doi.org/10.1002/rcm.3461>.
- W. Romão, B.D. Sabino, M.I.M. Bueno, B.G. Vaz, A.C. Júnior, A.O. Maldaner, E.V. de Castro, R.A. Lordeiro, C.C. Nascentes, M.N. Eberlin, R. Augusti, LSD and 9, 10-dihydro-LSD analyses in street drug blotter samples via easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry (EASI-MS), *J. Forensic Sci.* 57 (5) (2012) 1307–1312, <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2012.02237.x>.
- K.M. Ostermann, A. Luf, N.M. Lutsch, R. Dieplinger, T.P. Mechtler, T.F. Metz, R. Schmid, D.C. Kasper, MALDI Orbitrap mass spectrometry for fast and simplified analysis of novel street and designer drugs, *Clin. Chim. Acta* 433 (2014) 254–258, <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.03.013>.
- J.C. Neto, A.F.B. Andrade, R.A. Lordeiro, Y. Machado, M. Elie, E.F. Júnior, L.C. Arantes, Preventing misidentification of 25I-NBOH as 2C-I on routine GC–MS analyses, *Forensic Toxicol* 35 (2) (2017) 415–420, <https://doi.org/10.1007/s11419-017-0362-0>.
- J.L. Poklis, K.G. Devers, E.F. Arbefeville, J.M. Pearson, E. Houston, A. Poklis, Postmortem detection of 25I-NBOMe [2-(4-iodo-2, 5-dimethoxyphenyl)-N-[(2-methoxyphenyl) methyl] ethanamine] in fluids and tissues determined by high

- performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry from a traumatic death, *Forensic Sci. Int.* 234 (2014) e14–e20, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.10.015>.
- [28] H. Nozawa, K. Minakata, I. Yamagishi, K. Hasegawa, A. Wurita, K. Gonmori, O. Suzuki, K. Watanabe, MALDI-TOF mass spectrometric determination of eight benzodiazepines with two of their metabolites in blood, *Legal Med.* (3) (2015) 150–156, <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2014.12.004>.
- [29] F. Hillenkamp, J. Peter-Katalinic, MALDI MS: A Practical Guide to Instrumentation, *Methods and Applications*, John Wiley & Sons, Germany, 2013.
- [30] N. Bjarnholt, B. Li, J. D'Alvise, C. Janfelt, Mass spectrometry imaging of plant metabolites—principles and possibilities, *Nat. Prod. Rep.* 31 (6) (2014) 818–837, <https://doi.org/10.1039/c3np70100j>.
- [31] Y. Fujiwara, M. Furuta, S. Manabe, Y. Koga, M. Yasunaga, Y. Matsumura, Imaging mass spectrometry for the precise design of antibody-drug conjugates, *Sci. reports* 6 (2016) 24954, <https://doi.org/10.1038/srep24954>.
- [32] A. Smith, I. Piga, M. Galli, M. Stella, V. Denti, M. Del Puppo, F. Magni, Matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging in the study of gastric cancer: a mini review, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (12) (2017) 2588, <https://doi.org/10.3390/ijms18122588>.
- [33] B. Prideaux, M. Stoeckli, Mass spectrometry imaging for drug distribution studies, *J. Proteome* 75 (16) (2012) 4999–5013, <https://doi.org/10.1016/j.jpropt.2012.07.028>.
- [34] B. Flinders, E. Beasley, R.M. Verlaan, E. Cuyppers, S. Francese, T. Bassindale, M.R. Clench, R.M. Heeren, 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) (2017) 2462–2468, <https://doi.org/10.1007/s13361-017-1766-0>.
- [35] E. Beasley, S. Francese, T. Bassindale, Detection and mapping of cannabinoids in single hair samples through rapid derivatization and matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry, *Anal. Chem.* 88 (2016) 10328–10334, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03551>.
- [36] C.J. Earnshaw, V.A. Carolan, D.S. Richards, M.R. Clench, Direct analysis of pharmaceutical tablet formulations using matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24 (2010) 1665–1672, <https://doi.org/10.1002/rcm.4525>.
- [37] K. Kuwayama, K. Tsujikawa, H. Miyaguchi, T. Kanamori, Y.T. Iwata, H. Inoue, Distribution measurements of 3, 4-methylenedioxyamphetamine and its metabolites in organs by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry using an automatic matrix spraying system with an air brush and a turntable, *Anal and Bioanal Chem* 404 (6–7) (2012) 1823–1830, <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6279-x>.
- [38] T. Porta, C. Grivet, T. Kraemer, E. Varesio, G. Hopfgartner, Single hair cocaine consumption monitoring by mass spectrometric imaging, *Anal. Chem.* 83 (11) (2011) 4266–4272, <https://doi.org/10.1021/ac200610c>.
- [39] R. Bradshaw, N. Denison, S. Francese, Implementation of MALDI MS profiling and imaging methods for the analysis of real crime scene fingerprints, *Analyst* 142 (9) (2017) 1581–1590, <https://doi.org/10.1039/C7AN00218A>.
- [40] K. Scotcher, R. Bradshaw, The analysis of latent fingerprints on polymer banknotes using MALDI-MS, *Sci. reports* 8 (1) (2018) 8765, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27004-0>.
- [41] A. Römpf, B. Spengler, Mass spectrometry imaging with high resolution in mass and space, *Histochem. Cell Biol.* 139 (6) (2013) 759–783, <https://doi.org/10.1007/s00418-013-1097-6>.
- [42] A. Römpf, U. Karst, Current trends in mass spectrometry imaging, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 2023–2025, <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8479-7>.
- [43] S. S. Rubakhin, J. V. Sweedler, Mass Spectrometry Imaging. Rubakhin SS, Sweedler JV, (Eds.), p. 21-49, 2010.
- [44] P.F. dos Santos, L.M. Souza, B.B. Merlo, H.B. Costa, L.V. Tose, H. Santos, G. Vanini, L.F. Machado, R.S. Ortiz, R.P. Limberger, B.G. Vaz, W. Romão, 2-(4-Iodo-2, 5-dimethoxyfenil)-n-[(2-metoxifenil) metil] etamina ou 25I-NBOMe: caracterização química de uma designer drug, *Quim Nova* 39 (2) (2016) 229–237, <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150178>.
- [45] L.M. Nielsen, N.B. Holm, S. Leth-Petersen, J.L. Kristensen, L. Olsen, K. Linnet, Characterization of the hepatic cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of 25I-NBOMe and 25I-NBOH, *Drug Test. Anal.* 9 (5) (2017) 671–679, <https://doi.org/10.1002/dta.2031>.
- [46] A.T. Caspar, A.G. Helfer, J.A. Michely, V. Auwärter, S.D. Brandt, M.R. Meyer, H.H. Maurer, Studies on the metabolism and toxicological detection of the new psychoactive designer drug 2-(4-iodo-2, 5-dimethoxyphenyl)-N-[(2-methoxyphenyl) methyl] ethanamine (25I-NBOMe) in human and rat urine using GC-MS, LC-MSn, and LC-HR-MS/MS, *Anal and Bioanal Chem* 407 (22) (2015) 6697–6719, <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8828-6>.
- [47] D.R. de Moraes, I.L. Barbosa, K.F. Cunha, G.L. Tripodi, C.F.F. Angolini, M.F. Franco, E.M. de Aquino, M.N. Eberlin, J.L. Costa, EASI-IMS an expedite and secure technique to screen for 25I-NBOH in blotter papers, *J. Mass Spectrom.* 52 (10) (2017) 701–706, <https://doi.org/10.1002/jms.3977>.
- [48] A. Thomas, J.L. Charbonneau, E. Fournaise, P. Chaurand, 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) (2012) 2048–2054, <https://doi.org/10.1021/ac2033547>.
- [49] E.R. Amstalden van Hove, D.F. Smith, R.M.A. Heeren, A concise review of mass spectrometry imaging, *J. Chromatogr. A* 1217 (25) (2010) 3946–3954, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.01.033>.
- [50] L.H. Cohen, A.I. Gusev, Small molecule analysis by MALDI mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 571–586, <https://doi.org/10.1007/s00216-002-1321-z>.
- [51] R.R. Hensel, R.C. King, K.G. Owens, Electrospray sample preparation for improved quantitation in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11 (16) (1997) 1785–1793, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(19971030\)11:16<1785::AID-RCM78>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(19971030)11:16<1785::AID-RCM78>3.0.CO;2-Q).
- [52] B.J. Malys, K.G. Owens, Improving the analyte ion signal in matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry via electrospray deposition by enhancing incorporation of the analyte in the matrix, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 31 (9) (2017) 804–812, <https://doi.org/10.1002/rcm.7848>.
- [53] E.H. Seeley, S.R. Oppenheimer, D. Mi, P. Chaurand, R.M. Caprioli, Enhancement of protein sensitivity for MALDI imaging mass spectrometry after chem treatment of tissue sections, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 19 (8) (2008) 1069–1077, <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2008.03.016>.
- [54] F.J. Troendle, C.D. Reddick, R.A. Yost, Detection of pharmaceutical compounds in tissue by matrix-assisted laser desorption/ionization and laser desorption/chemical ionization tandem mass spectrometry with a quadrupole ion trap, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 10 (12) (1999) 1315–1321, [https://doi.org/10.1016/S1044-0305\(99\)00103-8](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(99)00103-8).
- [55] C.D. Calvano, A. Monopoli, T.R. Cataldi, F. Palmisano, MALDI matrices for low molecular weight compounds: an endless story? *Anal and Bioanal Chem* 410 (2018) 4015–4038, <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1014-x>.
- [56] E.B. Yalcin, S.M. de la Monte, Review of matrix-assisted laser desorption ionization-imaging mass spectrometry for lipid biochemical histopathology, *J. Histochem. Cytochem.* 63 (10) (2015) 762–771, <https://doi.org/10.1369/0022155415596202>.
- [57] S. Trimpin, Solvent-free MALDI sample preparation, in: J.D. Winefordner (Ed.), *Maldi Mass Spectrometry for Synthetic Polymer Analysis*, 2009, pp. 159–186, <https://doi.org/10.1002/9780470567234.ch7>.
- [58] M.L. Salum, S.L. Giudicessi, T. Schmidt De León, S.A. Camperi, R. Erra-Balsells, Application of Z-sinapinic matrix in peptide MALDI-MS analysis, *J. Mass Spectrom.* 52 (3) (2017) 182–186, <https://doi.org/10.1002/jms.3908>.
- [59] A. Skriba, V. Havlicek, Mass spectrometry imaging of illicit drugs in latent fingerprints by matrix-free and matrix-assisted desorption/ionization techniques, *European J. Mass Spectrom.* 24 (1) (2018) 124–128, <https://doi.org/10.1177/1469066717728007>.
- [60] M. de Menezes, D.N. de Oliveira, R.R. Catharino, Capillary-induced homogenization of matrix in paper: a powerful approach for the quantification of active pharmaceutical ingredients using mass spectrometry imaging, *Sci. Reports* 6 (2016) 29970, <https://doi.org/10.1038/srep29970>.