



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS – ICE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – PPGQ
LINHA DE PESQUISA: QUÍMICA DE PRODUTOS NATURAIS E
BIOMOLÉCULAS

ANOTAÇÃO DE ALCALOIDES ISOQUINOLINOS DE ESPÉCIES DE
ANNONACEAE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS E REDES
MOLECULARES

CARLOS VINICIUS AZEVEDO DA SILVA

Manaus/AM

Julho/2022

CARLOS VINICIUS AZEVEDO DA SILVA

ANOTAÇÃO DE ALCALOIDES ISOQUINOLINOS DE ESPÉCIES DE
ANNONACEAE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS E REDES
MOLECULARES

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Química, com ênfase na linha de pesquisa em Química de Produtos Naturais e Biomoléculas.

Prof. Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen
Orientador

Prof. Dr. Felipe Moura Araújo da Silva
Coorientador

Manaus/AM
Julho/2022

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586a Silva, Carlos Vinicius Azevedo da
Anotação de alcaloides isoquinolinos de espécies de Annonaceae
por espectrometria de massas e redes moleculares / Carlos Vinicius
Azevedo da Silva . 2022
160 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Hector Henrique Ferreira Koolen
Coorientador: Felipe Moura Araújo da Silva
Dissertação (Mestrado em Química de Prod. Naturais) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Annonaceae. 2. Alcaloides isoquinolinos. 3. Lc-ms/ms. 4.
Redes moleculares. I. Koolen, Hector Henrique Ferreira. II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

*Anotação de Alcaloides Isoquinolinos de Espécies de
Annonaceae por Espectrometria de Massas e Redes
Moleculares*

CARLOS VINICIUS AZEVEDO DA SILVA

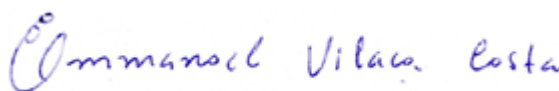
Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química,
do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como
requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre (a) em Química.

Aprovada em, 15 de julho de 2022.



HECTOR HENRIQUE FERREIRA KOOLEN (PPGQ/UFAM)

Presidente/Orientadora



EMMANOEL VILAÇA COSTA (PPGQ/UFAM)

Membro Interno



PAULO WENDER PORTAL GOMES
(DORRESTEIN LABORATORY/UCSD)

Membro Externo

Universidade Federal do Amazonas
Manaus, 15 de julho de 2022.

Dedico este trabalho a Deus, à minha família e a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para realização desta etapa.

AGRADECIMENTOS

A minha família, em especial a minha mãe Adna, pelo amor, apoio e todo o esforço em prol a minha educação;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Hector Koolen, meus sinceros agradecimentos por todo ensinamento, paciência, incentivo, confiança e conselhos para vida acadêmica.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Felipe Moura, sempre solicito a ajudar, suas contribuições foram muito valiosas.

Aos colegas do laboratório do grupo de pesquisa em Metabolômica e Espectrometria de Massas (MMSRG-UEA), onde fui muito bem recebido, em especial ao Dr. Weider Henrique pelo auxílio e ensinamentos desde o início do mestrado. Aos parceiros de laboratório Gleucinei Castro e Eldrinei Peres, pelas conversas, trocas de conhecimento e momentos de descontração.

À Universidade Federal do Amazonas, pela oportunidade de aprimoramento;

Aos laboratórios parceiros pela realização das análises;

À FAPEAM, pela bolsa de estudos concedida;

E a todos que torceram por mim;

Muito obrigado!

RESUMO

A família Annonaceae apresenta ampla distribuição no Brasil, principalmente na região amazônica, onde suas espécies são utilizadas na medicina popular para tratar diferentes enfermidades, como leishmaniose, malária e diabetes. Além disso, cientificamente muitas propriedades biológicas já foram conferidas à família, como citotóxicas, antioxidantes, anti-inflamatórias, antinociceptiva e antiparasitárias. Estas propriedades são conferidas principalmente à presença de metabólitos secundários, como alcaloides isoquinolinos, largamente reportados nos gêneros. Baseado nisso, este trabalho descreve uma investigação química desta classe de alcaloides em seis espécies de Annonaceae da Região Amazônica, bem como propõe padrões de fragmentação para ajudar na caracterização química destes metabólitos. Para isso, realizou-se experimentos via cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução e os espectros MS/MS adquiridos foram analisados por abordagem de redes moleculares. Os resultados revelaram famílias moleculares compostas por alcaloides aporfinos, benzilisoquinolinos, tetraidroprotoberberinos e oxoaporfinos, e 30 compostos foram anotados em nível 2. A caracterização das estruturas foram posteriormente explicadas pela análise manual dos espectros de fragmentação permitindo propagar 30 anotações manuais de alcaloides em nível 3. Dentre as moléculas conhecidas, anotou-se mutualmente a anonaina, assimlobina e a liriodenina em *D. calycina*, *G. olivacea*, *P. leiophylla* e *E. amazonicus*, reforçando a relevância quimiofenética desses alcaloides para a família Annonaceae, bem como a estreita relação dos gêneros *Duguetia* e *Guatteria*. Os resultados obtidos corroboram que as seis espécies estudadas são exímias produtoras de alcaloides isoquinolinos, destacando-se os aporfinos, classe ubíqua na família. O estudo de fragmentação com os alcaloides 7,7-dimetilaporfinos que apresentam insaturação no anel b isoquinolino corroborou os estudos de Carnevale Neto e seus colaboradores, revelando a eliminação de radical metila como principal informação. Adicionalmente, estendeu-se os estudos de fragmentação para 7,7-dimetilaporfinos que não apresentam insaturação no anel B isoquinolino, até onde sabemos, relatados neste trabalho pela primeira vez.

Palavras-chave: Annonaceae, alcaloides isoquinolinos, LC-MS/MS, redes moleculares

ABSTRACT

The Annonaceae family is widely distributed in Brazil, mainly in the Amazon region, where its species are used in folk medicine to treat different diseases, such as leishmaniasis, malaria and diabetes. In addition, scientifically, many biological properties have already been conferred on the family, such as cytotoxic, antioxidant, anti-inflammatory, antinociceptive and antiparasitic. These properties are mainly attributed to the presence of secondary metabolites, such as isoquinoline alkaloids, widely reported in the genera. Based on this, this work describes a chemical investigation of this class of alkaloids in six species of Annonaceae from the Amazon region, as well as proposes fragmentation patterns to help in the chemical characterization of these metabolites. For this, experiments were carried out via liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry and the acquired MS/MS spectra were analyzed by molecular network approach. The results revealed molecular families composed of aporphine alkaloids, benzyloisoquinolines, tetrahydroprotoberberines and oxoaporphines, and 30 compounds were annotated at level 2. The characterization of the structures was further explained by the manual analysis of the fragmentation spectra, allowing propagation of 30 manual annotations of alkaloids at level 3. Among the known molecules, anonaine, asimilobin and liriodenine were mutually noted in *D. calycina*, *G. olivacea*, *P. leiophylla* and *E. amazonicus*, reinforcing the chemophenetic relevance of these alkaloids to the Annonaceae family, as well as the close relationship between genera *Duquetia* and *Guatteria*. The results obtained corroborate that the six species studied are excellent producers of isoquinoline alkaloids, especially the aporphines, a ubiquitous class in the family. The fragmentation study with the 7,7-dimethylaporphine alkaloids that present unsaturation in the b isoquinoline ring corroborated the studies by Carnevale Neto and his collaborators, revealing the elimination of the methyl radical as the main information. Additionally, fragmentation studies were extended to 7,7-dimethylaporphines that do not show unsaturation in the isoquinoline B ring, as far as we know, reported in this work for the first time.

Keywords: Annonaceae, isoquinoline alkaloids, LC-MS/MS, molecular networking

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACGs	Acetogeninas de anonáceas
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
CID	<i>Collision Induced Dissociation</i>
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
ETD	<i>Electron Transfer Dissociation</i>
GEQBiom	Grupo de Estudos Químicos de Biomoléculas (grupo de pesquisa)
GNPS	<i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i>
HCD	<i>Higher-energy Collisional Dissociation</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry</i>
LC-UV	<i>Liquid Chromatography-Ultraviolet Detection</i>
LC-NMR	<i>Liquid Chromatography-Nuclear Magnetic Resonance</i>
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MeCN	Abreviação de acetonitrila (metilcianeto)
MMSRG	<i>Metabolomics and Mass Spectrometry Research Group</i>
MN	<i>Molecular Networking</i>
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MS ²	Espectros de íons de produtos de 1 ^a geração
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i>
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
PNs	Produtos Naturais
Q-Tof	<i>Quadrupole time-of-flight</i>
UHPLC	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura geral de VA's antineoplásicos.....	18
Figura 2: Mapa de distribuição geográfica mundial da família Annonaceae.....	19
Figura 3: Exemplos de compostos não alcaloídicos relatados na família Annonaceae.	26
Figura 4: (A) Exemplos de alcaloides derivados do esqueleto isoquinolino relatados na família Annonaceae; (B) Exemplos de aporfinos relatados na família Annonaceae.	27
Figura 5: Formação da rede molecular a partir da inserção dos dados de MSn, comparação dos espectros de massas para a geração do espectro de consenso e formação de agrupamento por similaridade (clusters).	31
Figura 6: Diagrama geral da obtenção dos extratos brutos das cascas do caule de <i>E. amazonicus</i>	34
Figura 7: Diagrama geral do tratamento ácido-base do extrato metanólico das cascas do caule de <i>E. amazonicus</i>	35
Figura 8: Rede molecular das frações alcaloídicas das espécies de Annonaceae analisados por LC/MS, utilizando ionização por Electrospray em modo positivo.	40
Figura 9: Representação da Família Molecular 1 com indicação das estruturas e <i>m/z</i> dos alcaloides isoquinolinos anotados pela Biblioteca GNPS.	41
Figura 10: Representação da Família Molecular 2 com indicação das estruturas e <i>m/z</i> dos alcaloides isoquinolinos anotados pela Biblioteca GNPS.	42
Figura 11: Representação da Família Molecular 3, 4 e 5 com indicação das estruturas e <i>m/z</i> dos alcaloides isoquinolinos anotados pela Biblioteca GNPS.	43
Figura 12: Mecanismos de fragmentação chave de aporfinas com presença do grupo metilenodioxi adjacentes ao anel aromático.....	54
Figura 13: Mecanismos de fragmentação para o alcaloide norushinsunina.....	55
Figura 14: Mecanismos de fragmentação chave de aporfinas com presença de metoxilas vicinais adjacentes ao anel aromático.....	57
Figura 15: Mecanismos de fragmentação chave de aporfinas com presença de metoxila e hidroxila vicinal adjacentes ao anel aromático.....	58
Figura 16: Via de fragmentação proposta para o oxoaporfino oxoasimilobina (B2).....	61
Figura 17: Mecanismos de fragmentação dos oxoaporfinos liriodenina e lanuginosina....	62
Figura 18: Via de fragmentação proposta para os oxoaporfinos lisicamina, dicentrinona e oxofoebina	63

Figura 19: Principais mecanismos de fragmentação de formação dos íons diagnósticos dos benzilisoquinolinos C1 a C9.....	65
Figura 20: Via de fragmentação proposta para a perda da fração amino dos benzilisoquinolinos: C6, C7, C10, C11, C12	66
Figura 21: Via de fragmentação proposta para os compostos vailatina (I1) e 6,10-dihidroxi-3-desmetildi-hidrobenezofenantridínio (I2)	69
Figura 22: Alcaloides 7,7-dimetilaporfinos analisados por ESI-MS/MS.....	72
Figura 23: Espectro de massas do alcaloide 6,6a-dihidrodemetoxiguadiscina (H-1)	73
Figura 24: Via de fragmentação proposta para o alcaloide 6,6a-dihidrodemetoxiguadiscina (H-1)	74
Figura 25: Espectro de massas do alcaloide guateriopsiscina (H-2)	76
Figura 26: Via de fragmentação proposta para o alcaloide guateriopsiscina (H-2).	77
Figura 27: Espectro de massas do alcaloide (<i>R</i>)-Diidroguateriscina (H-20).....	78
Figura 28: Via de fragmentação proposta para o alcaloide (<i>R</i>)-Diidroguateriscina (H-20)	79
Figura 29: Espectro de massas do alcaloide 9-hidroxiguatescina (H-3).	81
Figura 30: Proposta de fragmentação para o alcaloide 9-hidroxiguatescina (H-3).	82
Figura 31: Espectro de massas do alcaloide 9-hidroxiguaterfriesina (H-4).	83
Figura 32: Proposta de fragmentação para o alcaloide 9-hidroxiguaterfriesina (H-4).	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Usos populares e atividades biológicas de algumas espécies da família Annonaceae.	21
Tabela 2: Exemplos de compostos não alcaloídicos relatados em espécies de anonáceas.	24
Tabela 3: Estudos com espécies de Annonaceae envolvendo o uso de Redes Moleculares.	30
Tabela 4: Informações de coleta do material botânico das espécies estudadas.....	33
Tabela 5: Alcaloides isoquinolinos anotados por rede molecular e análise manual dos espectros de LC-MS/MS: O prefixo A antes da numeração dos compostos designa alcaloides pertencentes a classe dos aporfinos.	45
Tabela 6: Alcaloides isoquinolinos anotados por rede molecular e análise manual dos espectros de LC-MS/MS: Os prefixos antes da numeração dos compostos designa alcaloides pertencentes suas classes: (B) Oxoaporfinos; (C) Benzilisoquinolinos.	46
Tabela 7: Alcaloides isoquinolinos anotados por rede molecular e análise manual dos espectros de LC-MS/MS: Os prefixos antes da numeração dos compostos designa alcaloides pertencentes suas classes: (E) Fenantrenos; (F) Tetraidroprotoberberinos; (G) Protoberberinos.....	47
Tabela 8: Alcaloides isoquinolinos desreplicados pela rede molecular e HPLC-MS/MS das espécies de Annonaceae analisadas.	48

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3. REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1 Produtos naturais de origem vegetal: Considerações gerais, importância e principais fármacos.....	17
3.2 Família Annonaceae	18
3.2.1 Etnobotânica	19
3.2.2 Fitoquímica da família Annonaceae	23
3.3 Abordagens integrativas	28
3.4 Redes moleculares	29
4. METODOLOGIA.....	33
4.1 Coletas das espécies vegetais	33
4.2 Obtenção de extratos da espécie <i>Ephedranthus amazonicus</i>	33
.....	34
4.2.1 Tratamento ácido-base do extrato metanólico das cascas do caule de <i>E. amazonicus</i>	34
4.3 Análise por espectrometria de massas tandem (MS/MS).....	36
4.3.1 Análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) da espécie <i>E. amazonicus</i>	36
4.3.2 Análise por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial (UHPLC-MS/MS) das espécies <i>D. calycina</i> , <i>G. olivacea</i> e <i>P. leiophylla</i>	37
4.3.3 Análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS) dos padrões de alcaloides 7,7-dimetilaporfinos.....	37
4.4 Análise por redes moleculares (GNPS).....	38
5. RESULTADOS	39
5.1 Anotação de alcaloides do tipo isoquinolino	39
5.1.1 Anotação de alcaloides usando bibliotecas do GNPS	39
5.1.2 Interpretação manual e estudo de fragmentações dos espectros de MS/MS	44

5.2 Estudo e propostas de vias de fragmentação para alcaloides 7,7-dimetilaporfinos ..	71
CONCLUSÃO.....	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
APÊNDICES	97

1. INTRODUÇÃO

Os organismos vivos produzem uma variedade de metabolitos, também conhecidos por produtos naturais (PNs), que desempenham diferentes funções nas células e geralmente não estão envolvidos no processo de crescimento e reprodução, e por esta razão são chamados de metabolitos secundários ou especializados (GARAGOUNIS; DELKIS; PAPADOPOULOU, 2021). Estes metabolitos podem ser encontrados em diferentes espécies de seres vivos, como plantas, fungos, bactérias e outros (PHAM *et al.*, 2019), ampliando o interesse por produtos naturais, visto que possuem um papel fundamental na descoberta de novas substâncias biologicamente ativas que servem de matéria prima para o desenvolvimento de fármacos e consequentemente o tratamento de diferentes patologias humanas (SIDDIQUI *et al.*, 2014).

Neste sentido, a região amazônica é notável pela rica diversidade de animais e vegetais, muitos ainda não catalogados ou pouco estudados (GREBNER *et al.*, 2022, p. 45). Especificamente do reino Plantae, na Amazônia encontram-se diversos representantes da família Annonaceae, amplamente distribuídas e utilizadas na medicina tradicional (LOPES; MELLO-SILVA, 2014).

Do ponto de vista fitoquímico, as anonáceas estão entre as mais representativas na produção de alcaloides derivados das isoquinolinas, grupo de grande interesse científico pelas ocorrência de metabolitos bioativos de alta relevância, como o analgésico morfina e o antibacteriano berberina (SHANG *et al.*, 2020).

As fontes naturais promissoras devem ser submetidas à triagem química ou perfil de metabólito, que visa distinguir compostos já conhecidos (desreplicação/anotação), evitando o isolamento tedioso dos mesmos e direcionando-o para o enfoque novos constituintes (WOLFENDER; QUEIROZ; HOSTETTMANN, 2006). Recentes avanços e desenvolvimentos da técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (LC-MS), alinhado a ferramentas de bioinformática como a plataforma *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS), vem revolucionando o campo de descobertas de metabolitos presentes em misturas complexas, possibilitando rapidez e eficiência na descoberta e anotação de metabólitos bioativos já conhecidos bem como desconhecidos, redirecionando o isolamento bio-guiado de novas moléculas (COSTA *et al.*, 2020; GOMES *et al.*, 2021; PAZ *et al.*, 2019).

Neste contexto, o presente trabalho descreve uma investigação química de seis espécies de Annonaceae, com objetivo de contribuir para o conhecimento quimiossistemático da família, fomentando os bancos de dados e facilitando os futuros processos de desreplicação.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Contribuir com o conhecimento quimiofenético da família Annonaceae a partir da anotação de alcaloides isoquinolinos e propor vias de fragmentação como alternativa para melhor caracterizar este grupo de metabolitos.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar o perfil químico de seis espécies de Annonaceae através de Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS/MS).
- Analisar os espectros de MS/MS adquiridos por meio da abordagem de redes moleculares na plataforma GNPS.
- Compreender o padrão de fragmentação de alcaloides da classe dos 7,7-dimetilaporfinos e propor vias de fragmento condizentes visando contribuir para sua identificação por MS.

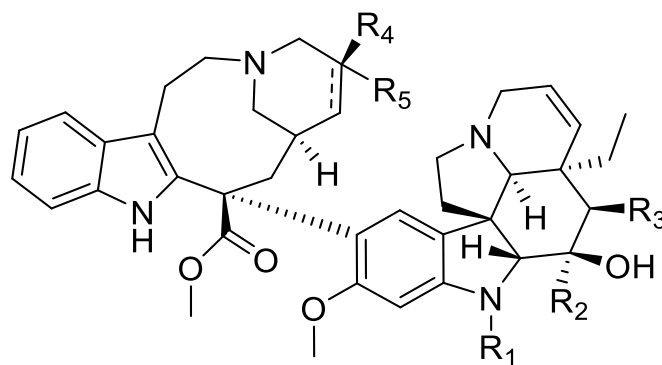
3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Produtos naturais de origem vegetal: Considerações gerais, importância e principais fármacos

Os produtos naturais (PNs) são responsáveis pela realização de processos que desempenham funções importantes na sobrevivência de um organismo em seu habitat, caracterizando as particularidades de cada indivíduo em seu nicho ecológico. As ações de defesa química das plantas, por exemplo, são realizadas pelos chamados metabolitos secundários ou especializados, que secretam no organismo produtos químicos com efeitos tóxicos, repelentes ou antinutricionais sobre os herbívoros, insetos e humanos (WAR *et al.*, 2012). Esses metabolitos são classificados como: alcaloides, flavonoides, quinonas, lignanas, esteroides, terpenos, saponinas, curcuminas e antocianinas; sendo responsáveis pela maioria dos produtos naturais com bioatividade e importantes para biotecnologia, agricultura, medicina e comércio (DAVIES; RYAN, 2012; DEWICK, 2009).

Os compostos químicos isolados de plantas são opções promissoras nos desenvolvimentos de fármacos, tendo em visto o potencial descoberto nessa fonte. Dentre os principais exemplos, pode-se citar os alcaloides de vinca (vinblastina, vincristina e vindesina), fitoterápicos com qualidades anticancerígenas originalmente isoladas das espécies de *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). Atualmente, esses compostos e derivados semissintéticos, como a vinorelbina e vinflunina, estão disponíveis no mercado e são usados no tratamento de várias doenças e síndromes, como a doença de Hodgkin, linfossarcoma, neuroblastoma, carcinoma da mama, etc. (Figura 1) (DHYANI *et al.*, 2022; MARTINO *et al.*, 2018).

Os PNs vegetais também possuem representantes importantes que inibem o parasita da malária, muitos deles anotados a partir da medicina tradicional. A artemisinina, um antimalárico comum na medicina chinesa e identificada como uma sesquiterpenlactona, foi isolado de espécies do gênero *Artemisia* (WANG *et al.*, 2019). Atualmente, seus derivados representam o grupo peróxido de lactona sesquiterpênica, importantes agentes antimaláricos no mundo todo, dentre eles o Arteether (BUTLER, 2004). Em estudos com a mefloquina, derivado da quinina, observou-se alta expectativa na quimioprevenção da malária por apresentar espectro de atuação sobre todas as espécies de causadoras da doença e atividade contra as cepas resistentes a cloroquina (SCHLAGENHAUF *et al.*, 2010).



	Fármaco	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Vimblastina ^I	Velban®	-CH ₃	-CO ₂ CH ₃	-OCOCH ₃	-OH	-CH ₂ CH ₃
Vincristina ^I	Oncovin®	-CHO	-CO ₂ CH ₃	-OCOCH ₃	-OH	-CH ₂ CH ₃
Vindesina ^{II}	Eldisine®	-CH ₃	-CONH ₂	-OH	-OH	-CH ₂ CH ₃
Vinorelbina ^{II}	Navelbine®	-CH ₃	-CO ₂ CH ₃	-OCOCH ₃	-	-CH ₂ CH ₃
Vinflunina ^{II}	Javlor®	-CH ₃	-CO ₂ CH ₃	-OCOCH ₃	-H	-CF ₂ CH ₃

I=natural / **II**=derivados semissintéticos

Figura 1: Estrutura geral de VA's antineoplásicos.

Fonte: Modificado e adaptado de Martino *et al.* (2018).

Atualmente, cerca de 53% dos agentes terapêuticos aprovadas de pequenas moléculas entre anos de 1981 a 2019 estão relacionadas à produtos naturais, derivados semissintéticos ou imitações (farmacóforo é/era de um produto natural) (NEWMAN; CRAGG, 2020). Esses dados exprimem grande interesse científico na busca por novas entidades químicas, e os recursos ainda não explorados podem levar a resultados positivos na identificação de um novo bioativo, como em investigações de espécies ainda não identificadas ou com poucos dados conhecidos.

3.2 Família Annonaceae

A família Annonaceae, catalogada por Antoine Laurent de Jussieu em 1789 (IPNI, 2021), apresenta-se como um dos táxons mais diversificados e importantes da ordem Magnoliales, com cerca de 2.400 espécies distribuídas em aproximadamente 110 gêneros (XUE *et al.*, 2020). Seus membros são classificados em quatro subfamílias, *Anaxagoreoideae*, *Annonoideae*, *Ambavioideae* e *Malmeoideae* (CHATROU *et al.*, 2012).

A ocorrência das espécies é pantropical, predominantemente em florestas tropicais, tornando-as grupo modelo para estudos da diversificação de angiospermas neste bioma (RICHARDSON *et al.*, 2004).

A distribuição geográfica revela abrangência na região neotropical com aproximadamente 40 gêneros e mais de 900 espécies (Figura 2) (MAAS *et al.*, 2007). No Brasil, foram identificados cerca de 31 gêneros distribuídos em 387 espécies, com maior representatividade na floresta Amazônica e Atlântica (LOBÃO *et al.*, 2020). A Amazônia abriga três quartos da diversidade das anonáceas, com 27 gêneros e 280 espécies, seguida da Mata Atlântica, com a maior parte restante: 15 gêneros e 91 espécies (LOPES; MELLO-SILVA, 2014).

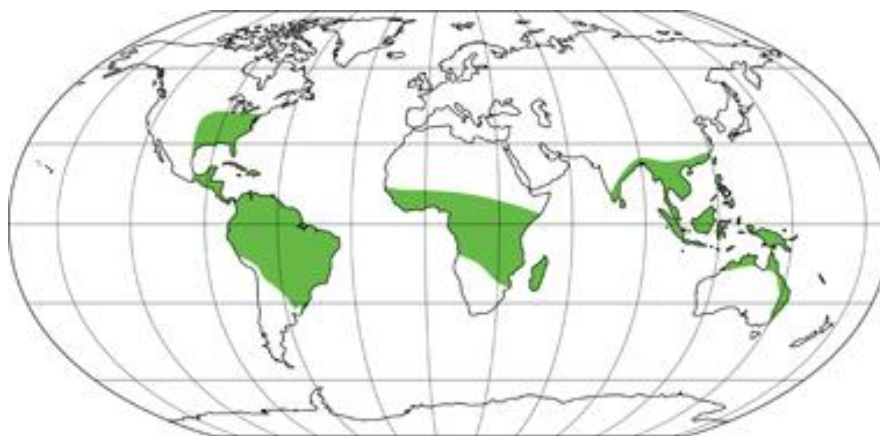


Figura 2: Mapa de distribuição geográfica mundial da família Annonaceae.

Fonte: http://www.thecompositaeht.com/www_tch/webcurso_spv/familias_pv/annonaceae.html

As espécies da família são reconhecidas pela característica arbórea ou muitas vezes na forma de arvoretas, raramente na forma de lianas (videiras lenhosas), com madeira e folhas muitas vezes aromáticas (WFO, 2022). Além disso, podem ser reconhecidas pelo odor forte exalado ao cortar-se o tronco ou seus ramos, prática comum devido a presença de fibras longas e resistentes da casca (RIBEIRO *et al.*, 1999).

3.2.1 Etnobotânica

Apesar de apenas os gêneros *Annona*, *Asimina*, *Duguetia* e *Uvaria* produzirem frutos comestíveis, a família Annonaceae destaca-se pelo interesse econômico dos seus frutos, considerados exóticos e nutricionais (PADMANABHAN; PALIYATH, 2015). Agregado a isto, constatou-se que as anonáceas possuem boa adaptabilidade as diferentes condições

edafoclimáticas, comportando-se bem nas zonas tropicais e apresentando bons índices de produtividade (SÃO JOSÉ *et al.*, 2014).

O apreço pelos frutos das espécies é visto no comércio popular em feiras abertas, nas quais são vendidas para consumo *in natura* e utilizadas para diferentes derivados alimentícios. Dentre os conhecidos, estão incluídos o papaw (*Asimina triloba*), fruto do conde (*A. squamosa*), graviola (*A. muricata*) e o beribá (*A. mucosa*) (AL KAZMAN; HARNETT; HANRAHAN, 2022).

Na indústria comercial, os frutos são amplamente empregadas no preparo de bebidas, balas, sorvetes, shakes e xaropes, além dos óleos essenciais muito estimados devido a aromaticidade presente em folhas e sementes, sendo a mais reportada, o óleo essencial extraído da espécie asiática *Cananga odorata*, chamado de *ylang-ylang* (FEITOSA *et al.*, 2021).

Outra parte bastante utilizada das anonáceas são as fibras do caule, a exemplo das espécies de *Guatteria poeppigiana* e *Guatteria villosissima*, endêmicas do Brasil, que são utilizadas para fins de atracação de cercas de habitação (PAIVA, 2011). Na amazônia, são utilizadas as madeiras de *Xylopia aethiopica* e *Xylopia villosa* na construção de casas e das espécies de *Guatteria* spp. pelas tribos Palikur, Yanomami e Waimiri-Atroari com mesma função (OGERON *et al.*, 2018). Em termos culinários, os frutos e sementes esverdeados de *Xylopia parviflora*, normalmente fervidos, são triturados e usados em alimentos cozidos ou no tempero de molhos e bebidas tradicionais da região ocidental de Camarões (WOGUEM *et al.*, 2014).

Outro ponto de destaque da família Annonaceae são seus múltiplos usos na medicina tradicional, entre estes, pode-se citar os tratamentos contra malária, casos de picada de cobras, problemas estomacais e respiratórios, repelentes de insetos entre outras. Neste quesito, destacam-se os gêneros *Annona*, *Xylopia* e *Guatteria* que comandam um grande número de relatos (FRAUSIN *et al.*, 2014; MOGHADAMTOUSI *et al.*, 2015; TSABANG *et al.*, 2012). Alguns usos etnomedicinais e identificados através de pesquisas farmacológicas é apresentada na tabela 1.

Tabela 1: Usos populares e atividades biológicas de algumas espécies da família Annonaceae.

Espécie	Uso tradicional	Parte usada	Preparação	Ref.	Atividade Biológica
<i>Annona crassiflora</i>	Tratamento de picadas de cobra	SM	ND	[1]	Atividade nematocida [2]; Propriedades antioxidantes, antiproliferativas e cicatrizantes [3]
<i>Annona muricata</i>	Disenteria	SM	Infusão	[4]	Efeito antiproliferativo, atividades anti-inflamatórias e antinociceptiva [6]
	Sintomas de Malária	ND	ND	[5]	
	Reumatismo e nevralgia	FL	Decocção	[6]	
	Abcessos e reumatismo	FL	Cozimento		
	Anti-helmínticas	SM	Trituração		
<i>Annona squamosa</i>	Inseticida	SM	ND	[7]	Citotoxicidade, antioxidante, antidiabética, anti-hipertensiva, hepatoprotetora, antiparasitária, antimalárica, inseticida, microbicida e moluscicida [8]
	Tratamento de úlceras e feridas	FL	Maceração		
	Diarreia	CC	ND		
	Dores Estomacais	FL	Infusão	[4]	
	Dores de cabeça e nevralgias	FL	Sinapismo		
<i>Duguetia confinis</i>	Piolhos do corpo	CC	Decocção ou Maceração	[9]	Atividade antiparasitária [9]
<i>Duguetia. staudtii</i>	Sintomas de Malária (Vômito, astenia, artrite, dor de cabeça, tosse)	CC	Maceração de 500 g em 3 L de água sob luz solar por 6h	[10]	Atividades anti-inflamatória e inibidora da uréase [11]
<i>Duguetia duckei</i>	Febre	CC	Decocção	[12]	-

SM: sementes, FL: Folhas, FR: Frutos CC: Casca do Caule; ND: Não determinado

Tabela 1. Usos populares e atividades biológicas de algumas espécies da família Annonaceae (Continuação).

Espécie	Uso tradicional	Parte usada	Preparação	RF	Atividade Biológica
<i>Monodora myristica</i>	Escabiose, helmintíase, malária e síndrome disentérica	ND	ND	[13]	Atividade Antiparasitária [13];
	Dor de cabeça, prisão de ventre, feridas, infecções por vermes	RZ SM CC	ND	[14]	Atividade antibacteriana e antifúngica [14]
<i>Guatteria discolor</i>	Febres	CC	Decocção	[15]	-
<i>Guatteria boliviana</i>	Febrífugo e Vermífugo	ND	ND	[16]	Atividade antiparasitária [16]
<i>Guatteria foliosa</i>	Inseticida	ND	ND	[17]	Atividade antiparasitária [17]
<i>Annona mucosa</i>	Tratamento de tumores	ND	ND	[18]	Atividade antiplaquetária [18]
	Coagulação sanguínea.	FR	ND	[19]	
<i>Uvaria scheffleri</i>	Tratamento da malária	RZ FL	Decocção Infusão	[20]	Atividade antimalárica [21]
<i>Unonopsis spectabilis</i>	Antirreumático e antimicrobiano	ND	ND	[22]	Atividade Antimalárica e Antileishmania <i>in vitro</i> [22]

SM: sementes, FL: Folhas, FR: Frutos CC: Casca do Caule; RZ: Raízes; ND: Não determinado.

Fonte: [1] (DA SILVA *et al.*, 2007); [2] (MACHADO *et al.*, 2015); [3] (PRADO *et al.*, 2020); [4] (BRAGA, 1976); [5] (WILLCOX; BODEKER, 2004); [6] (MOGHADAMTOUSI *et al.*, 2015); [7] (YANG *et al.*, 2002); [8] (MA *et al.*, 2017); [9] (BOYOM *et al.*, 2003); [10] (TSABANG *et al.*, 2012); [11] (NGOUONPE *et al.*, 2019); [12] (FRAUSIN *et al.*, 2014); [13] (OKPEKON *et al.*, 2004); [14] (TATSADJIEU *et al.*, 2003); [15] (GRENAND *et al.*, 2004); [16] (MAHIOU *et al.*, 2000); [17] (MAHIOU *et al.*, 1994); [18] (KUO *et al.*, 2001); [19] (PAIVA, 2011); [20] (MUTHAURA *et al.*, 2007); [21] (NKUNYA *et al.*, 1991); [22] (SATALAYA R. *et al.*, 2009).

3.2.2 Fitoquímica da família Annonaceae

A família Annonaceae caracteriza-se quimicamente pela presença de diversos constituintes químicos de interesse biológico, incluindo alcaloides isoquinolinos e acetogeninas (**1-3**), assim como polifenóis (**13-21**) (Tabela 2). Além disso, a literatura também destaca compostos de interesse (**4-12**) em óleos essenciais, e as estruturas de alguns destes metabólitos secundários são ilustradas na figura 3.

As acetogeninas de anonáceas (ACGs), como são conhecidas, são um grupo extenso de moléculas não-terpênicas originadas da via do policetídeo e diferenciam-se das acetogeninas encontradas em algas por apresentarem cadeias maiores (C35 ou C37) contendo grupos éter e geralmente com ausência de halogênio (WANKE *et al.*, 2015). O esqueleto químico variado permite serem classificadas em seis tipos principais: ACGs lineares sem presença de anéis THF, ACGs epóxi, ACGs mono-THF, ACGs bis-THF, ACGs tri-THF e ACGs irregulares com um anel de tetraidropirano (THP) (GONZÁLEZ-ESQUINCA *et al.*, 2014).

O primeiro isolamento de uma ACGs na família data no ano de 1982 das cascas da espécie *Uvaria acuminata*, posteriormente identificadas em outros 14 gêneros, incluindo *Annona* (27), *Artabotrys* (1), *Asimina* (3), *Cananga* (1), *Dasymaschalon* (1), *Disepalum* (2), *Goniothalamus* (5), *Mitrephora* (2), *Ophrypetalum* (1), *Polyalthia* (2), *Porcelia* (1), *Saccopetalum* (1), *Uvaria* (9) e *Xylopia* (2) (JOLAD *et al.*, 1982; NESKE *et al.*, 2020).

Os constituintes alcaloídicos da família Annonaceae foram revisados em três estudos mais abrangentes, identificando-se no trabalho mais recente cerca de 934 alcaloides presentes em 254 espécies, destes aproximadamente 800 alcaloides são derivados do esqueleto isoquinolino (LÚCIO *et al.*, 2015).

Foram relatadas diferentes subclasses de isoquinolinos na família, subdividindo-se em: isoquinolinas simples (**22**); benziltetraidroisoquinolinas (**23**), bisbenziloisoquinolinas (**24**); bisbenziltetraidroisoquinolinas (**25**); protoberberinas (**26**) e tetraidroprotoberberinas (**27**), proaporfinos (**28**), aporfinóides, que incluem aporfinos (**29**), aporfinos 7,7-dimetil-substituídas (**30**), desidroaporfinos (**31**); oxoaporfinos (**32**), fenantrenos (**33**) e alcaloides do tipo isoquinolina diversos (**34**). Além disso, relatou-se recentemente novos isoquinolinos, incluindo as inéditas oxahomoaporfina (**35**) e 8-oxohomoaporfina (**36**) (Figura 04).

Tabela 2: Exemplos de compostos não alcaloídicos relatados em espécies de anonáceas.

Nº	Classe/Nome do Composto	Espécie	Extrato/parte vegetal	Ref.
Acetogeninas				
1	Giganina	<i>Goniothalamus giganteus</i>	Casca do caule	[1]
2	Epoximurina-A	<i>A. muricata</i>	Extrato hexânico da casca do caule	[2]
3	Uvaricina	<i>U. acuminata</i>	Extrato etanólico das raízes	[3]
Terpenos				
Monoterpenos e Hidrocarbonetos sesquiterpênicos				
4	α-Pineno	<i>Xylopia langsdorffiana</i>	OE dos frutos frescos	[4]
5	β-Pineno	<i>Xylopia sericea</i>	OE e extrato de diclorometano das folhas	[5]
6	Limoneno	<i>Annona leptopetala</i>	Óleo volátil das folhas frescas	[6]
Sesquiterpenos				
7	Cariofileno	<i>Annona pickelii</i> ; <i>Annona salzmannii</i>	OE das folhas	[7]
8	Espatulenol	<i>Xylopia aromatica</i>	OE das folhas	[8]
9	Óxido de cariofileno	<i>Guatteria blepharophylla</i>		
Triterpenos				
10	Polícarpol	<i>Unonopsis duckei</i> ; <i>Unonopsis floribunda</i> ; <i>Unonopsis rufescens</i> ; <i>Unonopsis stipitata</i> ; <i>Onychopetalum amazonicum</i> ; <i>Bocageopsis pleiosperma</i> .	Extrato hexânico/acetato de etila das partes aéreas (galhos e cascas do tronco)	[9]
Benzenóides				
11	Metil benzoato	<i>Xylopia benthamii</i>	Aromas florais	[10]
12	Álcool 2-feniletílico	<i>X. aromatica</i>	adsorvidas	

Fonte: [1] (NESKE *et al.*, 2020); [2] (HISHAM *et al.*, 1993); [3] (JOLAD *et al.*, 1982); [4] (MOURA *et al.*, 2016); [5] (GONTIJO *et al.*, 2020); [6] (BRITO *et al.*, 2018); [7] (COSTA *et al.*, 2013); [8] (ALCÂNTARA *et al.*, 2017); [9] (DA SILVA *et al.*, 2015); [10] (JÜRGENS; WEBBER; GOTTSBERGER, 2000).

Tabela 2: Exemplos de compostos não alcaloídicos relatados em espécies de anonáceas (Continuação).

Nº	Classe/Nome do Composto	Espécie	Extrato/parte vegetal	Ref.
<i>Polifenóis</i>				
Ácidos fenólicos				
13	Ácido cafeico	<i>A. muricata</i>	Extrato etanólico da polpa do fruto	[11]
14	Ácido p-cumárico	<i>A. muricata</i>		
15	Ácido ferúlico	<i>A. triloba</i>		
<i>Flavonoides</i>				
16	Quercetina-3-O-glucosídeo	<i>A. crassiflora</i>	Extrato metanólico das folhas secas e em pó	[12]
17	Canferol-3-O-glucosídeo	<i>X. aromatica</i>		
18	Apigenina-7-O-glucosídeo	<i>Hornschuchia citriodora</i>		
19	Luteolina-7-O-glucosídeo	<i>Annona tomentosa</i>		
20	Catequina	<i>A. muricata</i>		
21	Epicatequina			

Fonte: [11] (DE MORAES *et al.*, 2020); [12] (SANTOS; SALATINO, 2000)

Os aporfinos representam a subclasse mais comum entre alcaloides encontrados na família, descritos principalmente nos gêneros *Annona*, *Artabotrys*, *Duguetia*, *Guatteria*, *Polyalthia* e *Xylopia* (LÚCIO *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2015). A diversificação estrutural deste grupo é proveniente das múltiplas substituições no núcleo tetracíclico aromático, provenientes dos substituintes metóxi, metilenodioxi ou hidroxilas, comumente aderidos nas posições 9, 10 e com menor frequência nas posições 11 e 3. Alguns derivados também exibem o substituinte hidroxila nas posições 7 ou 4 (Figura 4b) (STÉVIGNY; BAILLY; QUETIN-LECLERCQ, 2005).

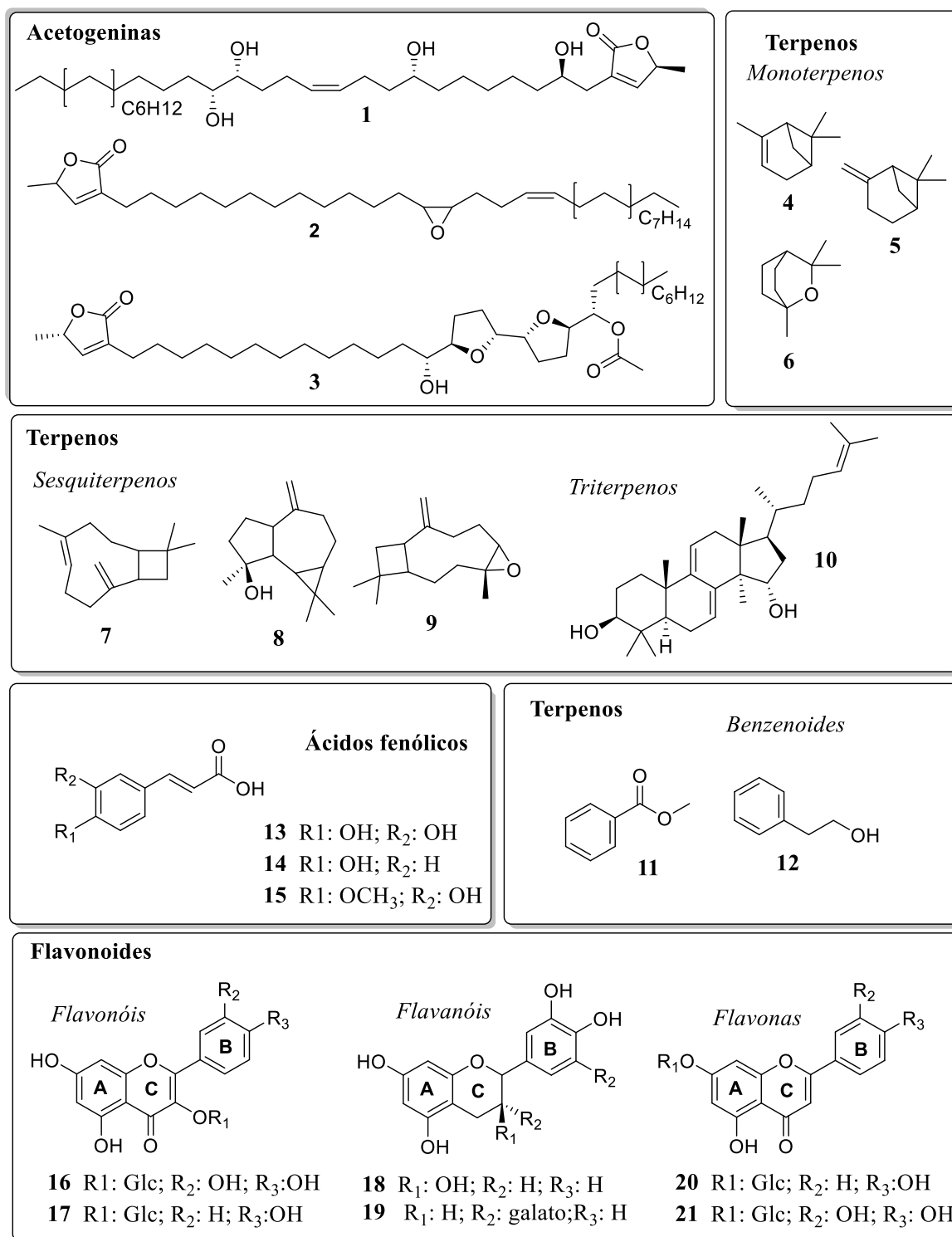


Figura 3: Exemplos de compostos não alcaloídicos relacionados na família Annonaceae.

Fonte: (CASCAES et al., 2021; DE MORAES et al., 2020; NESKE et al., 2020; SANTOS; SALATINO, 2000)

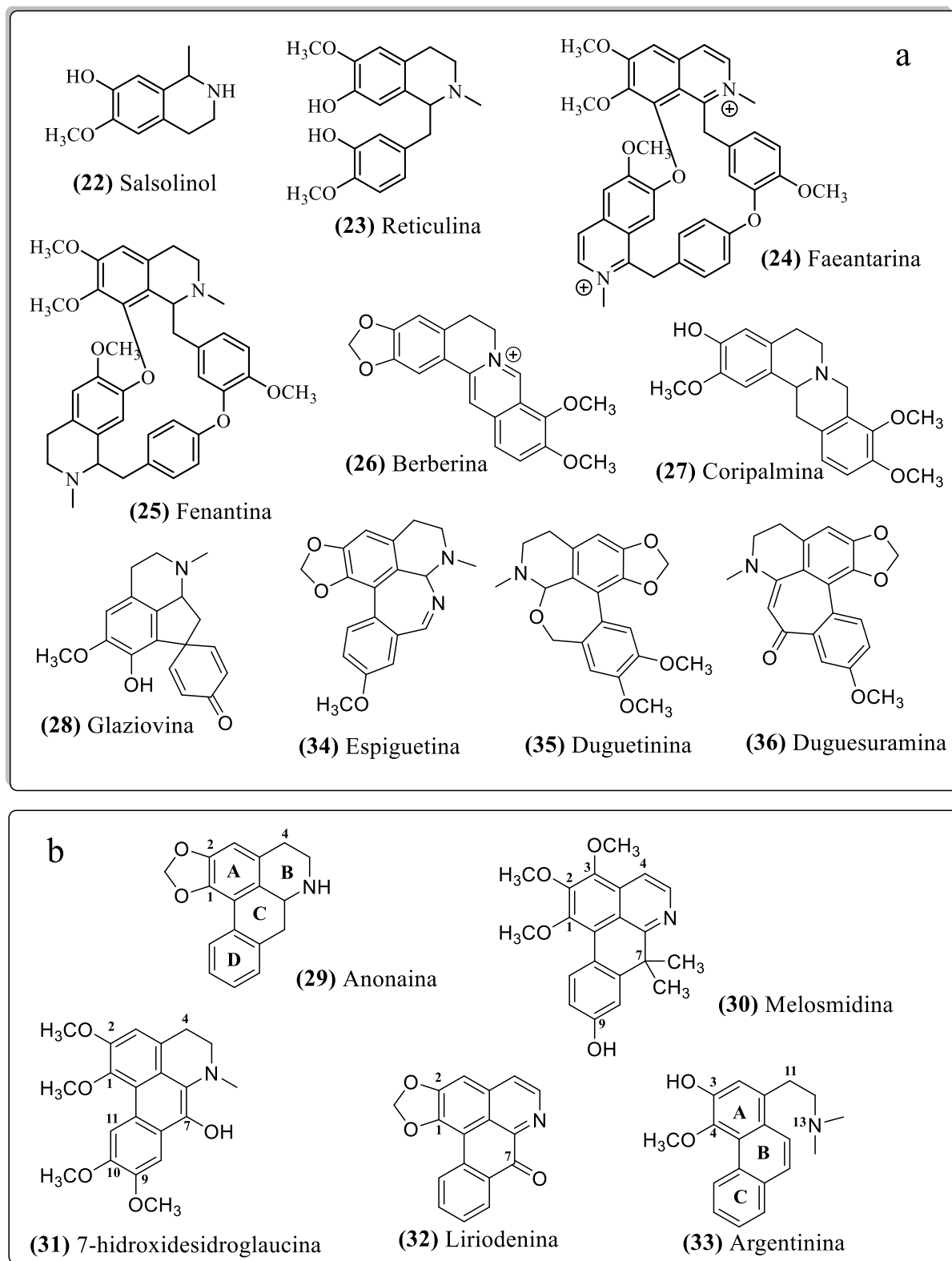


Figura 4: (A) Exemplos de alcaloides derivados do esqueleto isoquinolino relatados na família Annonaceae; (B) Exemplos de aporfinos relatados na família Annonaceae.

Fonte: [22-23; 26-31; 33, 36] (LÚCIO et al., 2015); [24-25] (LEBOEUF et al., 1980); [32] (LÓPEZ-MARTÍN et al., 2002); [34-35] (PAZ et al., 2019)

3.3 Abordagens integrativas

Os métodos cromatográficos são uma ferramenta indispensável na área de produtos naturais (PNs) pois representam a base para caracterização de constituintes presentes em matrizes biológicas complexas, como extratos vegetais (SIMÕES *et al.*, 2019).

A triagem química a partir de técnicas hifenizadas como LC-UV, LC-MS e LC-NMR possibilitam separar, detectar e caracterizar metabolitos presentes em matrizes de modo mais eficaz (ZHANG *et al.*, 2012). Dentre as vantagens, a identificação de compostos já conhecidos permite redirecionar o esforços de trabalho para o isolamento de novos metabólitos (WOLFENDER; QUEIROZ; HOSTETTMANN, 2006).

Apesar da espectroscopia de NMR de ^1H e ^{13}C ser a técnica principal para a elucidação total de estruturas (WITKOWSKI; WAWER, 2013), a técnica de LC-MS apresenta-se como uma alternativa capaz de fornecer informações importantes sobre as características de determinado metabolito (VILLAS-BÔAS *et al.*, 2005). Assim, a razão massa/carga de íons precursores, bem como tempo de retenção e mecanismo de fragmentação, são informações essenciais para auxiliar no processo de anotação de um metabolito (ERNST *et al.*, 2014).

No entanto, um único experimento LC-MS pode gerar centenas de milhares de sinais de metabolitos, e a análise manual torna-se inviável. Com isso, muitos avanços no campo da bioinformática têm disponibilizado ferramentas capazes de organizar e facilitar a interpretação dos dados espectrais adquiridas. Por exemplo, as redes moleculares, disponíveis na plataforma colaborativa GNPS é considerada a principal abordagem para anotação de metabolitos em matrizes complexas, pois usa espectros MS^2 e referência contra dados experimentais de amostras a serem analisadas (LIU *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2016).

3.4 Redes moleculares

A Global Social Molecular Networking (GNPS) é uma plataforma online, de acesso gratuito e colaborativa, que permite organizar e visualizar conjuntos de dados de espectrometria de massas representados de forma gráfica e compreensível, auxiliando no processo de anotação (PILON *et al.*, 2021; VINCENTI *et al.*, 2020).

A biblioteca do GNPS também usa (não exclusivamente) dados MS/MS de diferentes bibliotecas espectrais, que incluem *MassBank* (Japan - <http://massbank.jp>), *EU Mass Bank* (<https://massbank.eu/MassBank/>), *ReSpec* (<http://spectra.psc.riken.jp/>), *NIST* (<http://www.nist.gov/srd/nist1a.cfm>), *Lichen Data-Base* (LDB), *MIADB Spectral Library*, *Sumner Spectral Library*, *CASMI Spectral Library* e *North America Mass Bank* (<http://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/>) (PILON *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2016). A plataforma também oferece consulta ao repositório *MassIVE* (*Mass Spectrometry Interactive Virtual Environment*), que permite o armazenamento e reanálise de dados públicos (PILON *et al.*, 2021).

A principal abordagem disponível no GNPS chama-se rede molecular (do inglês “*Molecular Networking*”), e inicialmente foi desenvolvida para proteômica (WATROUS *et al.*, 2012), posteriormente sendo adaptada para análises de metabolômica de diferentes organismos, incluindo plantas, animais e humanos (WANG *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2013). Em termos de campo de atuação, essa ferramenta está presente nas áreas voltadas a produtos naturais, ciências nutricionais, forense, marinha, ambiental e metabolômica clínica entre outras (LEÃO *et al.*, 2021).

Buscando abranger diferentes meios de ionização e diferentes métodos de aquisição MS/MS, a plataforma permite correlações entre diferentes fontes, como ESI, APCI e MALDI, bem como diversas fontes de fragmentação, como CID (do inglês *Collision Induced Dissociation*), HCD (do inglês *Higher-energy collisional dissociation*) e ETD (do inglês *Electron-transfer dissociation*) (PILON *et al.*, 2021).

Atualmente, diferentes estudos com espécies de Annonaceae vem utilizando as redes moleculares como estratégia para anotar metabolitos conhecidos de extratos biológicos complexos e direcionar os estudos para a descoberta e isolamento de novas substâncias (Tabela 3). Recentemente, a biblioteca do GNPS foi fomentada com 320 espectros MS/MS de alcaloides típicos em Annonaceae, provenientes da colaboração internacional entre os laboratórios *Chimie des Substances Naturelles* (Université Paris-Saclay) e *Laboratoire de*

Constitution et Réaction de la Matière (LCRM - Université Félix Houphouët-Boigny), juntamente as universidades públicas UFAM e UEA, localizadas na cidade de Manaus - Brasil (AGNÈS *et al.*, 2022). A importância desta colaboração foi evidente nos processos de anotação da classe alvo deste trabalho (Tópico 5.1.1).

Tabela 3: Estudos com espécies de Annonaceae envolvendo o uso de Redes Moleculares.

Espécies	Nº Compostos Desreplicados	Compostos isolados	Classes químicas	Ref.
<i>Cardiopetalum calophyllum</i> ; <i>Duguetia furfuracea</i> ; <i>X. aromatica</i> ; <i>Xylopia emarginata</i>	38	4	flavonoides, diterpenos, feoforbídeos, alcaloides e fenilpropanóides.	[1]
<i>A. salzmannii</i>	31	-	Alcaloides isoquinolinos (benziltetraidroisoquinolinos, aporfinos, proaporfinos e protoberberinos).	[2]
<i>Duguetia surinamensis</i>	24	11	Alcaloides (oxahomoaporfinas, benzilisoquinolinos, aporfinos, oxoaporfinos); fenilpropanóides	[3]
<i>X. emarginata</i>	17	-	Alcaloides, amidas, terpenóides, compostos fenólicos e derivados do ácido jasmônico	[4]

Fonte: [1] (DE SOUSA *et al.*, 2020); [2] (LIMA *et al.*, 2021); [3] (PAZ *et al.*, 2019); [4] (PARES *et al.*, 2021).

Para geração das redes moleculares clássicas é necessário a conversão de arquivos brutos em formatos *.mzXML* ou *.mzML*, que podem ser facilmente convertidos pelo software MSConvert ProteoWizard ou ferramenta de conversão de formato GNPS (*Conversion Drag and Drop* - <https://gnps-quickstart.ucsd.edu/conversion>) (SCHMID *et al.*, 2021). Posteriormente os dados podem ser carregados na plataforma diretamente pelo site (quando não ultrapassarem 20 MB), por protocolos de transferência do tipo FTP (do inglês *File*

Transfer Protocol) para arquivos maiores de 20 MB ou mediante a interface de acesso rápido do GNPS (<https://gnps-quickstart.ucsd.edu/>) (LEÃO et al., 2021; WANG et al., 2016)

Uma vez realizado o upload e inferidos os parâmetros para desenvolvimento da rede molecular, ocorre o alinhamento computacional dos espectros de MS/MS, avaliados por algoritmos, classificando-os de acordo com um valor de similaridade do cosseno entre os espectros da amostra e os espectros de referência presentes nos bancos de dados (QUINN et al., 2017).

Visto que cada substância pode apresentar um conjunto de espectros, estes são agrupados e ilustrados por uma círculo chamado de nó (node) (ARON et al., 2020). A partir disso, esses nodos podem ser conectados a outros por meios de arestas, agrupados por similaridade espectral com análogos e filtrados com base em um valor de cosseno pré-estabelecido pelo usuário (varia entre 1-0, onde 1 indica 100% similaridade e 0, totalmente diferentes) (PILON et al., 2021) (Figura 05).

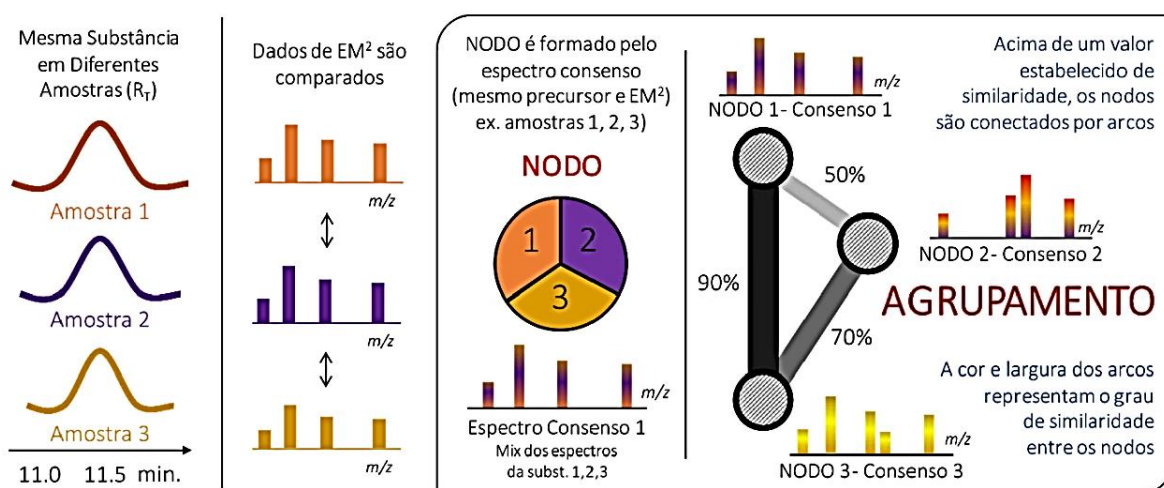


Figura 5: Formação da rede molecular a partir da inserção dos dados de MSn, comparação dos espectros de massas para a geração do espectro de consenso e formação de agrupamento por similaridade (clusters).

Fonte: (PILON et al., 2021)

Finalmente, o *job* é concluído e a rede molecular criada pode ser visualizada na própria plataforma ou exportado para o software *Cytoscape*, possibilitando a exploração e interpretação dos dados de forma simples e intuitiva (QUINN et al., 2017; WANG et al., 2016).

É possível ainda, utilizar outras ferramentas que estão disponíveis no GNPS, como a possibilidade de reanalisar as redes moleculares criadas, por meio do ReDu (do inglês

Reanalysis of Data User Interface), disponível em <https://redu.ucsd.edu/>, que permite os usuário manter atualizados os *jobs* criados juntos os novos dados disponíveis nos repositórios (LEÃO *et al.*, 2021). Outro exemplo, é o recurso *Merge Network Polarity*, onde o usuário pode mesclar duas redes moleculares criadas em modos diferentes de ionização (aquisição de dados em modo positivo e negativo), facilitando a avaliação das classes e compostos presentes nas amostras estudadas (PILON *et al.*, 2021).

Portanto, de acordo com as especificações de cada campo de pesquisa, as redes moleculares mostram-se como uma ferramenta revolucionaria para auxiliar nos processos de anotação, devido a diminuição do tempo de análise e consequente aumento da produtividade de identificação de metabolitos.

4. METODOLOGIA

4.1 Coletas das espécies vegetais

Os materiais botânicos das espécies trabalhadas foram coletados em diferentes períodos no Museu da Amazônia (MUSA), localizado na cidade de Manaus – Amazonas. O acesso ao patrimônio genético foi concedido pelo SISGEN e outras informações de coleta estão disponíveis na tabela 4.

Tabela 4: Informações de coleta do material botânico das espécies estudadas

Espécies	Nº da exsicata / Herbário Depositado	Registro SISGEN	Localização	Responsável
<i>D. calycina</i>	10.810 - (HUAM/UFAM)	A70EDCD	02°53'36,1" S e 59°58'28,9" W	Costa <i>et al.</i> (2021)
<i>F. longifolia</i>	526 - INPA	-	3°0'12" S e 59°56'23" O	Adrião <i>et al.</i> (2020)
<i>G. olivacea</i>	11.423 - (HUAM/UFAM)	A70EDCD	2° 54" 47" S e 59° 58" 48" W	De Souza Araújo <i>et al.</i> (2020)
<i>P. leiophylla</i>	11.424 – (HUAM/UFAM)	A70EDCD	2°53'00.0" S e 59° 58'00.0" W	Nascimento Neto <i>et al.</i> (2021)
<i>E. amazonicus</i>	-	-	-	Os autores do presente estudo
<i>D. surinamensis</i>	9282 - INPA	A70EDCD	02°55'37,4" S e 059°58'36,0" W	Paz <i>et al.</i> (2022)

Nota: Os procedimentos de obtenção das frações alcaloídicas das espécies *D. calycina*; *F. longifolia*; *G. olivacea*; *P. leiophylla* e *D. surinamensis* podem ser encontradas nos trabalhos mencionados na tabela 04, ressaltando que os procedimentos realizados nestes estudos são baseados na metodologia de Costa *et al.* (2016).

4.2 Obtenção de extratos da espécie *Ephedranthus amazonicus*

As cascas do caule de *E. amazonicus* foram secas à sombra em temperatura ambiente por cerca de 3 dias e posteriormente submetidas à estufa (Marconi®) de ar circulante, com temperatura de 45 °C. Após a secagem, o material foi pulverizado em moinho de facas (Marconi®) até granulometria de 5 mm. Em seguida, as amostras foram pesadas em uma balança semi-analítica (Shimadzu®), obtendo-se 1,65 kg de material.

Todo o material pulverizado foi submetido à extração por maceração com solventes orgânicos à temperatura ambiente e na proporção de 250 g de material botânico para 1 L de solvente. A extração foi realizada utilizando solventes grau P.A em *n*-hexano (Qhemis®) e metanol (Tedia®), com renovação de solvente a cada 48 horas (9 bateladas). A cada etapa de extração, as amostras foram filtradas e concentradas em evaporador rotativo à pressão reduzida e temperatura entre 40 e 50 °C. No fim do processo, obteve-se 0,2826 kg para extrato hexânico e 0,3212 kg para o extrato metanólico, enquanto que o resíduo vegetal final da extração foi adequadamente descartado. Além disso, os solventes provenientes da rotaevaporação dos extratos foram recuperados e destilados. O fluxograma da obtenção dos extratos está descrito na figura 6.

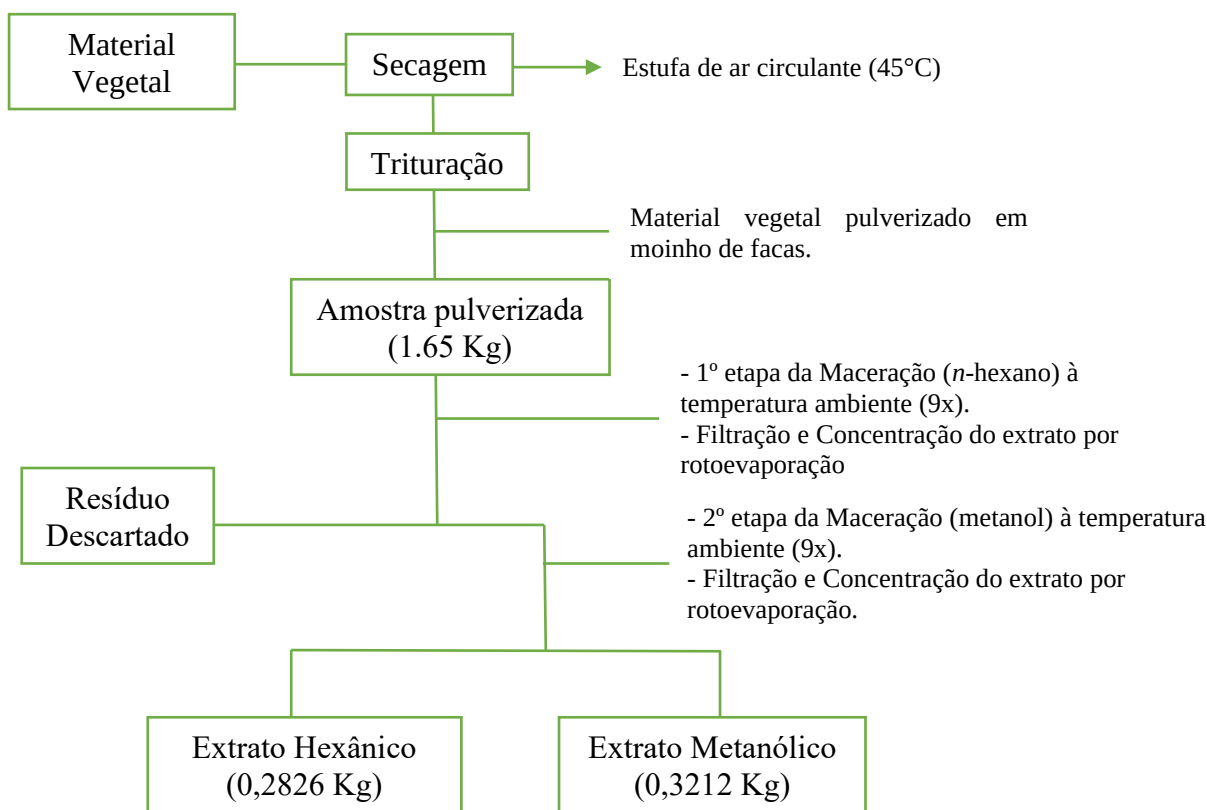


Figura 6: Diagrama geral da obtenção dos extratos brutos das cascas do caule de *E. amazonicus*.

4.2.1 Tratamento ácido-base do extrato metanólico das cascas do caule de *E. amazonicus*

O tratamento ácido-base foi aplicado conforme metodologia descrita por Costa *et al.* (2016). Inicialmente, 0,25 kg do extrato metanólico foi transferido para um Erlenmeyer de 1 L contendo 500 mL de clorofórmio (CHCl₃) e solubilizado com auxílio de banho

ultrassom. Posteriormente, adicionou-se 250 mL de ácido clorídrico (HCl 3%), agitou-se por 3 minutos e em seguida manteve-se em repouso por 10 minutos. Por fim, observou-se a formação de três fases: (1) fração clorofórmica neutra, (2) fração aquosa ácida (presença de alcaloides protonados) e (3) uma fração insolúvel.

A fração aquosa ácida e clorofórmica neutra foram coletadas em diferentes Erlenmeyer com auxílio de um funil de separação. A fração aquosa ácida foi transferida para um Erlenmeyer de 3 L, onde adicionou-se cinco adições extras de 250 mL de HCl 3%, até coloração incolor evidente (quinta etapa do processo). A fase aquosa apresentou pH ácido e foi basificada com NH_4OH até atingir o pH 10 através de um pHmetro (Bel Engineering ®).

Utilizando um funil de separação, a fase aquosa foi extraída via partição líquido-líquido com CHCl_3 (3x), resultando em duas subfrações: subfração aquosa básica e uma subfração orgânica alcaloídica. A subfração rica em alcaloides foi concentrada com evaporador rotativo, enquanto a fase aquosa foi adequadamente descartada. Após a secagem em dessecador, obteve-se 10,27 g da fração alcaloídica, apresentando rendimento de 3,2%. O fluxograma de trabalho do procedimento ácido-base está descrito na figura 7.

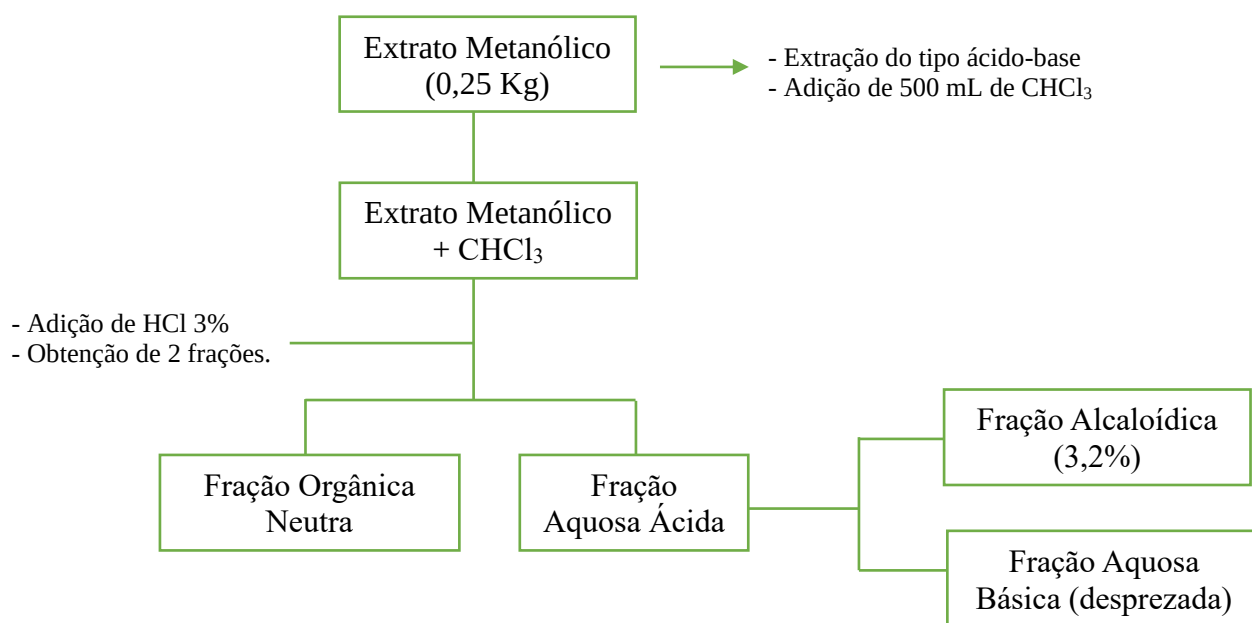


Figura 7: Diagrama geral do tratamento ácido-base do extrato metanólico das cascas do caule de *E. amazonicus*

4.3 Análise por espectrometria de massas tandem (MS/MS)

As subfrações alcaloídicas das espécies *D. calycina*; *G. olivacea*, *P. leiophylla* e *E. amazonicus* foram submetidas a análise de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em colaboração com parceiros do laboratório MMSRG - UEA.

Além disso, os espectros referentes à *F. longifolia* e *D. surinamensis* foram cedidos pela Me. Asenate Aline Xavier Adrião e pelo Dr. Weider Henrique Ferreira Paz, respectivamente. As configurações detalhadas e métodos de aquisição podem ser consultados nas respectivas literaturas mencionadas na tabela 4.

4.3.1 Análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) da espécie *E. amazonicus*

Este experimento foi realizado em colaboração com a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), sob a coordenação da Prof. Dr. Rafael Garret.

Em tubos de ensaio, 2,0 mg de material seco foi solubilizado com 1 mL de metanol (Grau HPLC). A mistura foi levada ao agitador vórtex por 30 s, seguida de banho ultrassom por 15 minutos à 30 °C até total solubilidade da amostra. Novamente, cada amostra foi levada a agitador vórtex por 1 min e posteriormente foram centrifugadas por 10 minutos a 9000 RPM. O sobrenadante de cada amostra foi removido para outro tubo de ensaio. Finalmente, foi retirado 100 µL de sobrenadante da amostra e adicionado 100 µL da mistura de metanol-água (MeOH:H₂O) (1:1) para uma concentração final de 1 mg.mL⁻¹ em vials de 250 µL para a análise por LC-MS/MS.

A solução à 1 mg.mL⁻¹ da subfração alcaloídica da espécie *E. amazonicus* foi analisada por um sistema de cromatografia líquida acoplado a espectrometria de massa de alta resolução (LC-MS/MS). O equipamento utilizado foi o Cromatógrafo Líquido Dionex LC UltiMate 3000 acoplado ao espectrômetro de massas Thermo QExactive Plus com fonte de ionização *Eletrospray*. A coluna utilizada foi uma Hypersil Gold C18 (50 mm x 2,1 mm; 1,9 µm), fase móvel A (H₂O) e B (MeOH), ambos com 0,1 % de ácido fórmico e 5 mM formiato de amônio. A eluição cromatográfica foi realizada em modo gradiente: 0-0,5 min, (30 % de B), 10-12 min (95 % de B), 12,1-16,0 min (30 % de B), sob fluxo constante de 350 µL.min⁻¹, volume de injeção de 3 µL, temperatura da coluna à 40 °C.

4.3.2 Análise por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial (UHPLC-MS/MS) das espécies *D. calycina*, *G. olivacea* e *P. leiophylla*

Este ensaio foi realizado em colaboração com a Universidade Federal de São Paulo, sob a coordenação da Profa. Dra. Livia Soman de Medeiros.

Das subfrações alcaloídicas das espécies *D. calycina*, *G. olivacea* e *P. leiophylla* foram retiradas em tubos de ensaio, 2,0 mg de material seco e destinadas a experimento. Um volume de 2 µL de cada amostra foi analisado por um sistema de cromatografia líquida de ultra desempenho (UHPLC) (sistema Nexera X2 Shimadzu, Kyoto, Japão) acoplado a um espectrômetro de massa de tempo de voo quadrupolo (MicroTOF-QII; Bruker Daltonics, MA, EUA) com uma fonte de Eletrospray. As fases moveis A (MeCN) e B (H₂O) ambos acidificados com ácido fórmico 20 mM foram utilizadas na separação cromatográfica em uma coluna Luna C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) (Phenomenex, EUA) à 50 °C, e fluxo de 350 µL.min⁻¹. O método se deu de 0 a 2 min em modo isocrático (15:85), seguindo gradiente linear até 95% de MeCN de 2-12 min. Após isso, a taxa de 95% foi mantida por 5 min, retornando a 15% de B e mantendo-se por 4 min antes da próxima injeção

Por fim, as configurações da fonte de ionização *Eletrospray* foram fixadas em energia do capilar de 4.500 V, temperatura do gás de dessolvatação à 200 °C, fluxo de 9 mL.min⁻¹, e pressão de 4 bar. Os espectros de massa foram adquiridos no modo positivo de ionização em uma faixa de 50 a 1200 Da. O instrumento Q-Tof foi operado em modo de varredura e MS/MS automático, e experimentos MS² topk5 para os cinco íons mais intensos de cada varredura MS¹. Os dados foram visualizados usando o software *Data Analysis* 4.2 (Bruker Daltonics ®).

4.3.3 Análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS) dos padrões de alcaloides 7,7-dimetilaporfinos

As sete amostras dos padrões isolados de alcaloides derivados da classe dos 7,7-dimetil foram cedidos pelo Dr. Emmanoel Vilaça Costa, coordenador do Grupo de Estudos Químicos de Biomoléculas (GEQBiom/UFAM). Os padrões cedidos foram referentes aos compostos: 6,6a-diidrodemetoxiguadiscina (**H-1**), guateriopsiscina (**H-2**), 9-hidroxiuatescina (**H-3**), 9-hidroxi guaterfriesina (**H-4**), 3-metoxiguadiscina (**H-5**), (*R*)-diidroguateriscina (**H-20**), guatterfriesidina (**H-22**).

Os experimentos de obtenção dos espectros de massas dos padrões isolados foram realizados em colaboração com a Universidade Paris-Saclay (França), sob coordenação do Dr. Mehdi A. Beniddir e Dr. Pierre Le Pogam.

As amostras foram solubilizadas em metanol grau HPLC a 0,5 mg.mL⁻¹ e colocadas em vials de 1,5 mL. As amostras foram analisadas usando um Agilent 6546 Accurate-Mass Q-TOF hifenizado com um sistema LC 1290 Agilent Infinity II. O sistema cromatográfico foi equipado com uma coluna Zorbax RRHD Eclipse Plus C18 (2,1 x 50 mm, 1,8 µm). Utilizou-se H₂O Milli-Q + (A) e acetonitrila (B) como fases móveis, ambas acidificadas a 0,1% de ácido fórmico. Método: 0 a 8 min (5-100% de B), 8-12 min (100% de B), 12-14 min (5% de B). A fonte de ionização manteve-se à temperatura do capilar em 320 °C, energia do capilar em 3,5 kV e uma taxa de fluxo de gás de bainha a 10 L/min. A aquisição foi realizada em modo positivo em uma janela de 100 a 1200 Da. Para coleta de espectros MS/MS um método DDA foi utilizado e selecionou-se os três íons mais intensos (topk3) detectados em cada varredura MS¹. A energia de colisão normalizada (ECN) foi fixada em 50 eV, máximo de carga +1, largura de isolamento de ± 2 Da. As varreduras completas foram adquiridas com uma resolução de 60.000 (*m/z* 922) e 35.000 (*m/z* 121). A análise de todas essas substâncias resultou em arquivos com o formato padrão Agilent (.d).

4.4 Análise por redes moleculares (GNPS)

Os arquivos brutos (formato .d) foram convertidos para o formato .mzXML com o auxílio do software MSConvert (<https://proteowizard.sourceforge.io/>) (QUINN *et al.*, 2017). Em seguida, os arquivos convertidos foram carregados no repositório de usuário GNPS, com auxílio do software WinSCP (<https://winscp.net/eng/download.php>) (WANG *et al.*, 2016). Os arquivos .mzXML das subfrações alcalóidicas das espécies *D. calycina*; *F. longifolia*; *G. olivacea*; *P. leiophylla*; *E. amazonicus* e *D. surinamensis*, foram submetidas à análise por rede molecular clássica na plataforma GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>). Os parâmetros adotados para construção da rede molecular foram ajustados e a massa dos íons precursores e as tolerâncias de íons fragmentos foram fixadas em 0.02 Da. As arestas entre dois nós foram mantidas na rede se e somente se cada um dos nós aparecesse nos respectivos 10 nós mais semelhantes, com mínimo de 6 íons fragmentos correspondentes e pontuação de 0,7 de cosseno. A busca por similaridade espectral de referência foi realizada contra as bibliotecas espectrais do GNPS. Finalmente, os dados foram visualizados no software Cytoscape 3.9.1,

disponível em (<https://cytoscape.org/>). A rede molecular gerada está disponível no site do GNPS através do link: <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=61f24d59d90847159736780f52b0b93e>.

5. RESULTADOS

5.1 Anotação de alcaloides do tipo isoquinolino

5.1.1 Anotação de alcaloides usando bibliotecas do GNPS

A rede molecular consistiu no agrupamento de metabolitos presentes nas seguintes espécies: *Diclinanona calycina* (casca); *Fusaea longifolia* (casca e folha); *Guatteria olivacea* (casca); *Pseudoxandra leiophylla* (folha); *Ephedranthus amazonicus* (casca) e *Duguetia surinamensis* (casca). A Figura 8 apresenta as famílias moleculares bem como a distribuição de metabolitos em cada espécie.

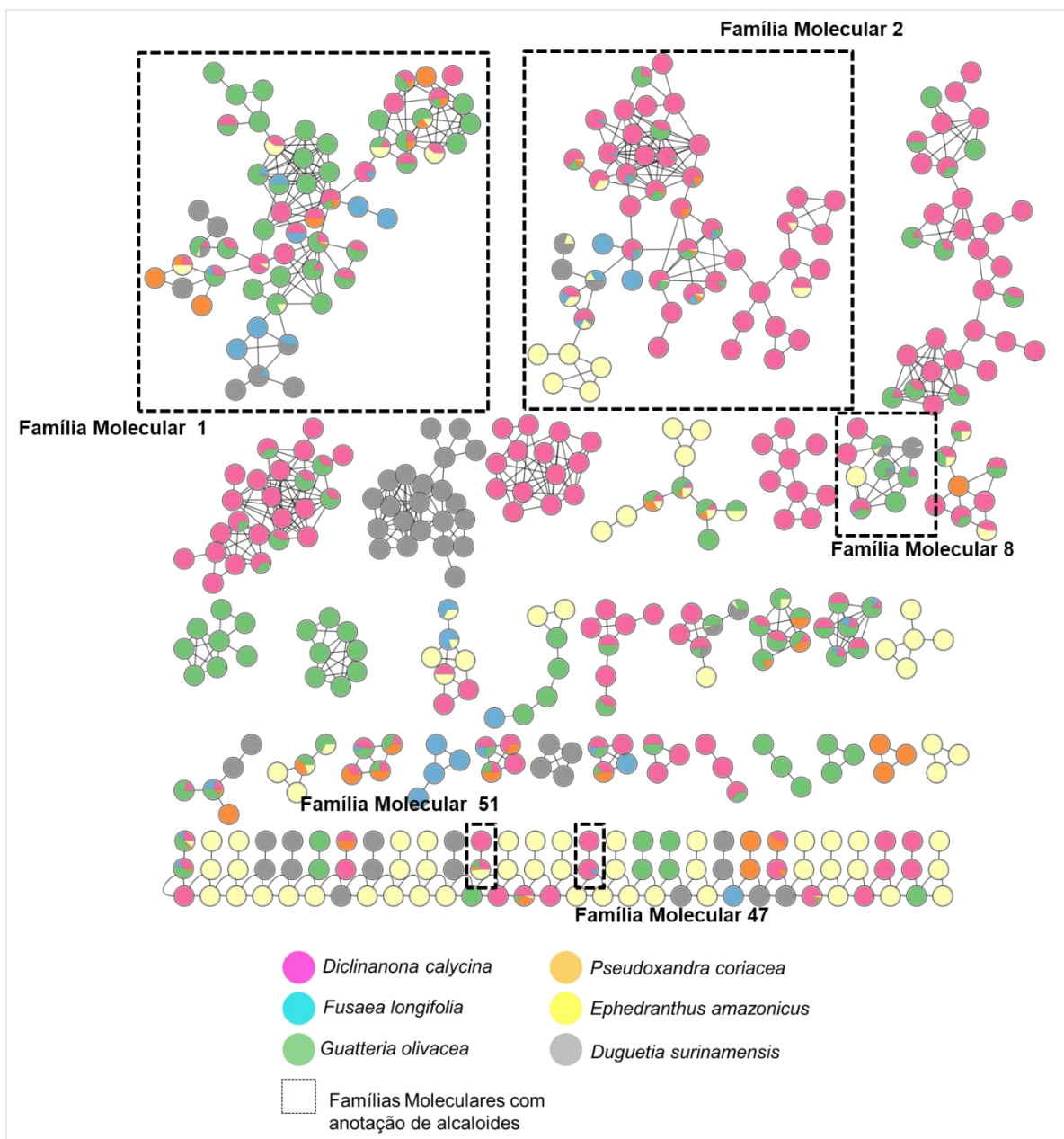


Figura 8: Rede molecular das frações alcaloídicas das espécies de Annonaceae analisados por LC/MS, utilizando ionização por Electrospray em modo positivo.

Cada nó (esfera) representa um possível metabólito na rede espectral e são distinguidos por meio das massas dos íons precursores (a rede molecular completa e detalhada pode ser consultada no link descrito no item 4.4). Os nós foram codificados por cores: (I) Nós coloridos indicam a qual espécie corresponde a amostra analisada (Ver legenda). Os gráficos de pizza dentro dos nós representam a proporção com que os íons foram observados em cada uma das espécies.

Na Rede Molecular apresentada na figura 8, destaca-se os *clusters* 1 e 2, que apresentaram as maiores contagens de nodos e anotação de alcaloides isoquinolinos. A família molecular 1, com 60 nodos, permitiu mediante correspondência com a biblioteca

espectral do GNPS e similaridade entre seus nodos, anotar 16 alcaloides, sendo: 11 aporfinos; três fenantrenos; um oxoaporfino e um protoberberino (Figura 9).

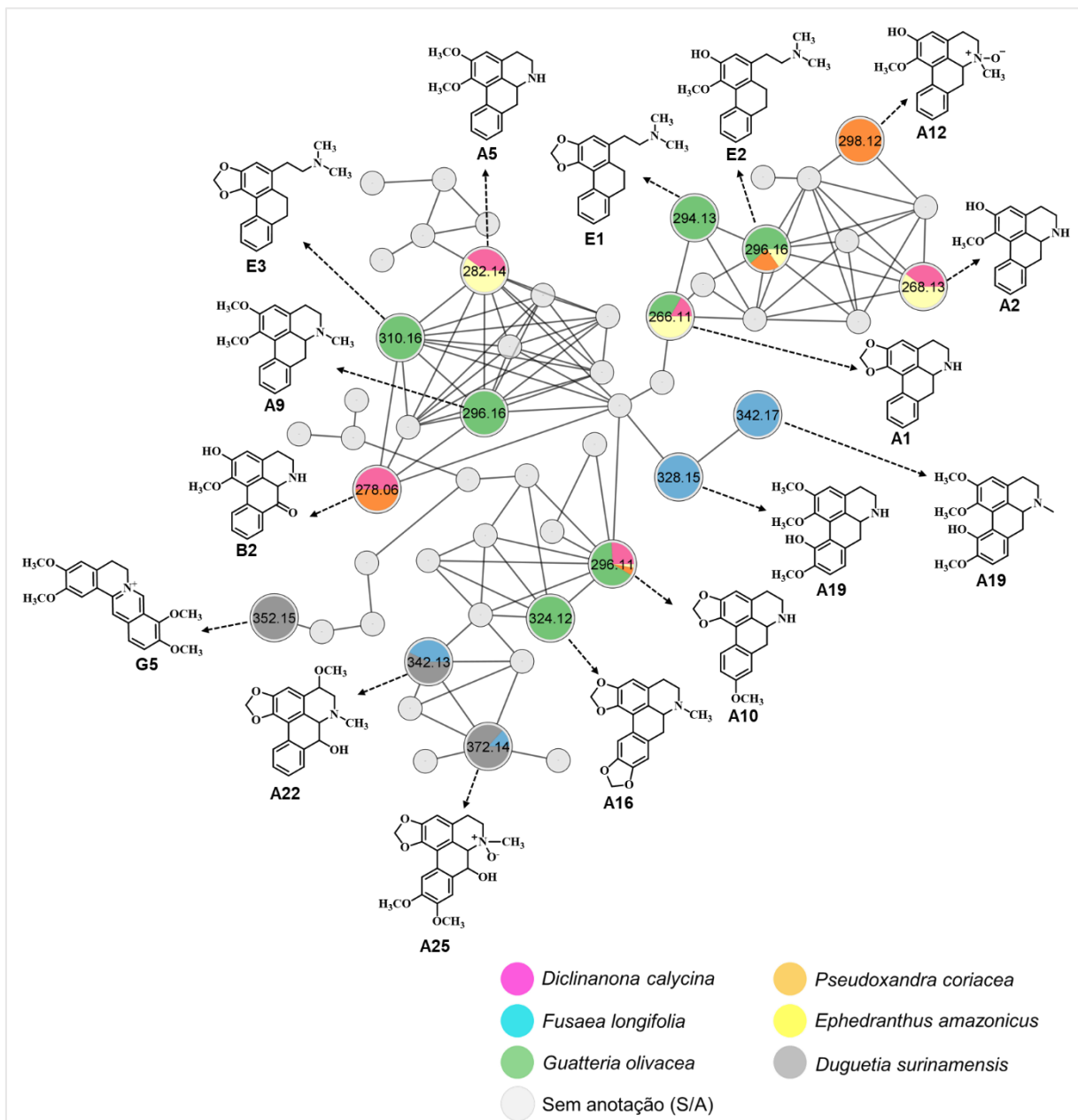


Figura 9: Representação da Família Molecular 1 com indicação das estruturas e m/z dos alcaloides isoquinolinos anotados pela Biblioteca GNPS.

Um total de 16 alcaloides foram anotados, sendo: (A) Aporfinos; (B) Oxoaporfinos; (E) Fenantrenos; (G) Tetraidroprotoberberinos. Os nós foram codificados por cores: (I) Nós coloridos indicam a qual espécie corresponde a amostra analisada (Ver legenda); (II) nós cinza sem descrição de m/z não puderam ser anotados.

A família molecular 2, com 53 nodos, dentre as anotações, a maioria corresponde a classe de alcaloides benzilisoquinolinos, possibilitando anotar nove representantes desta classe (Figura 10).

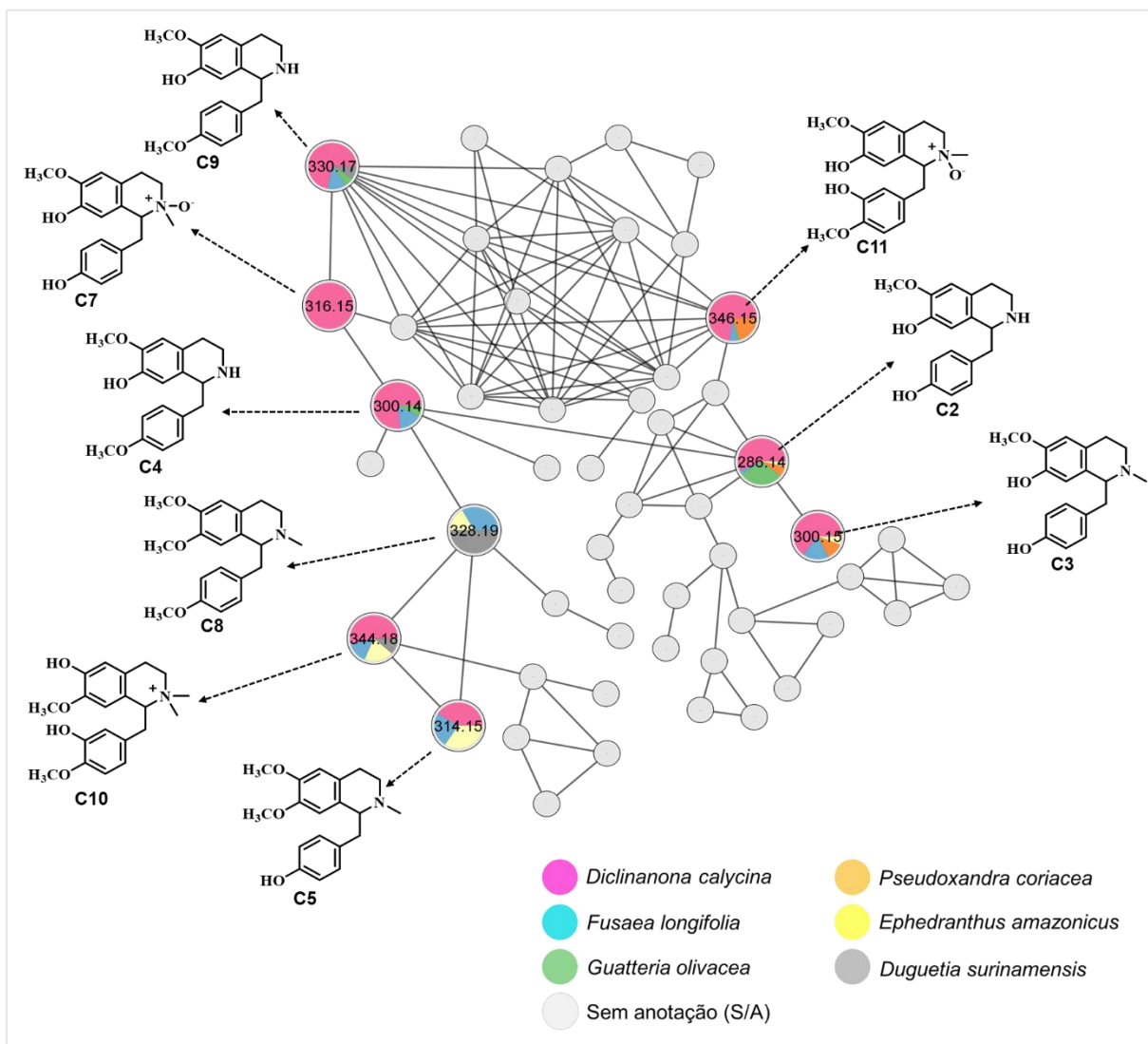


Figura 10: Representação da Família Molecular 2 com indicação das estruturas e m/z dos alcaloides isoquinolinos anotados pela Biblioteca GNPS.

Um total de 9 alcaloides foram anotados, todos correspondentes a classe dos benzilisoquinolinos. Os nós foram codificados por cores: (I) Nós coloridos indicam a qual espécie corresponde a amostra analisada (Ver legenda); (II) nós cinza sem descrição de m/z não puderam ser anotados.

As famílias 3, 4 e 5 exibiram correspondência espectral com outros alcaloides isoquinolinos. No *clusters* 3, predominou a presença de alcaloides tetraidroprotoberberinos,

com quatro compostos anotados. Os *clusters* 4 e 5, permitiram anotar um alcaloide aporfino e um oxoaporfino, respectivamente (Figura 11).

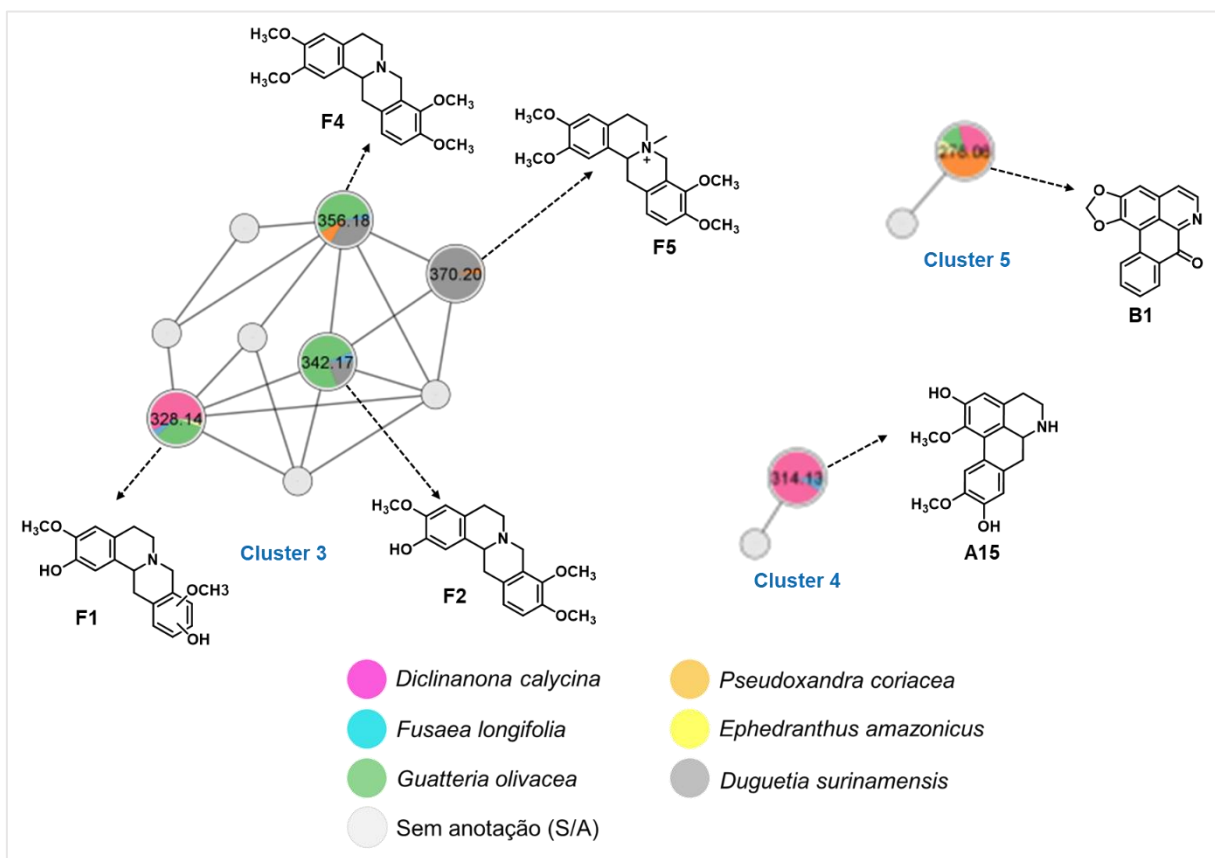


Figura 11: Representação da Família Molecular 3, 4 e 5 com indicação das estruturas e m/z dos alcaloides isoquinolinos anotados pela Biblioteca GNPS.

Um total de 6 alcaloides foram anotados, sendo: (A) Aporfino; (B) Oxoaporfino; (F) Tetraidroprotoberberinos. Os nós foram codificados por cores: (I) Nós coloridos indicam a qual espécie corresponde a amostra analisada (Ver legenda); (II) nós cinza sem descrição de m/z não puderam ser anotados.

Mediante análise dos matches entre espectros experimentais e espectros de referência do GNPS, anotou-se em nível 2, um total de 30 alcaloides isoquinolinos, cujas estruturas foram posteriormente corroboradas com dados da literatura, comparação com bibliotecas espectrais públicas, mecanismos de fragmentação e seus respectivos íons diagnósticos (SCHYMANSKI et al., 2014; SUMNER et al., 2007).

5.1.2 Interpretação manual e estudo de fragmentações dos espectros de MS/MS

Mediante comparação com dados bibliográficos e interpretação manual dos espectros de fragmentação, foram anotados 60 alcaloides conhecidos, sendo 30 destes previamente anotados usando a biblioteca GNPS, como descrito no item anterior. As estruturas de cada alcaloide estão disponíveis nas tabelas 5, 6 e 7, suas informações pertinentes estão representadas na tabela 8 e os espectros de MS/MS podem ser consultados nas figuras 1 a 60 dos apêndices.

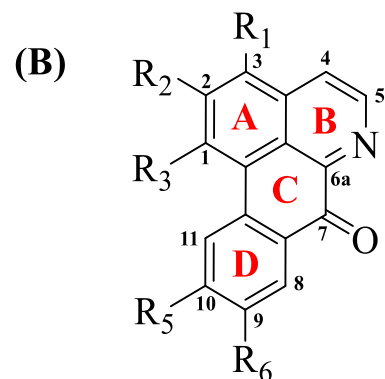
Tabela 5: Alcaloides isoquinolinos anotados por rede molecular e análise manual dos espectros de LC-MS/MS: O prefixo A antes da numeração dos compostos designa alcaloides pertencentes a classe dos aporfinos.

(A)

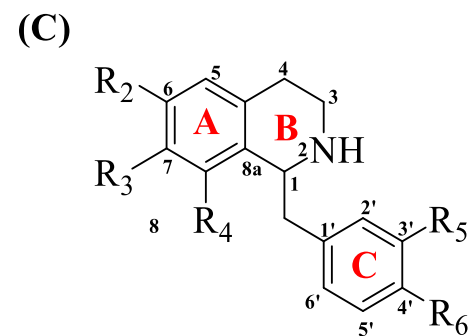
Composto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	N-	m/z
A1	H	-O-CH ₂ -O-	H	H	H	H	H	H	266
A2	H	OH	O-CH ₃	H	H	H	H	H	268
A3	H	-O-CH ₂ -O-	H	H	H	H	H	CH ₃	280
A4	H	OH	O-CH ₃	H	H	H	H	CH ₃	282
A5	H	O-CH ₃	O-CH ₃	H	H	H	H	H	282
A6	H	-O-CH ₂ -O-	H	H	OH	H	H	H	282
A7	H	-O-CH ₂ -O-	H	H	H	OH	H	H	282
A8	H	-O-CH ₂ -O-	H	H	H	H	CH ₂ O	H	294
A9	H	O-CH ₃	O-CH ₃	H	H	H	H	CH ₃	296
A10	H	-O-CH ₂ -O-	H	H	O-CH ₃	H	H	H	296
A11	O-CH ₃	O-CH ₃	OH	H	H	H	H	H	298
A12	H	OH	O-CH ₃	H	H	H	H	N-óxido	298
A13	O-CH ₃	O-CH ₃	O-CH ₃	H	H	H	H	H	312
A14	H	-O-CH ₂ -O-	H	O-CH ₃	OH	H	H	H	312
A15	H	O-CH ₃	OH	H	O-CH ₃	OH	H	H	314
A16	H	-O-CH ₂ -O-	H	-O-CH ₂ -O-	H	CH ₃	H	H	324
A17	H	O-CH ₃	O-CH ₃	H	-O-CH ₂ -O-	H	H	H	326
A18	H	O-CH ₃	OH	H	O-CH ₃	OH	H	CH ₃	328
A19	H	O-CH ₃	O-CH ₃	OH	O-CH ₃	H	H	H	328
A20	H	-O-CH ₂ -O-	H	O-CH ₃	O-CH ₃	H	CH ₃	H	340
A21	H	O-CH ₃	O-CH ₃	OH	O-CH ₃	H	CH ₃	H	342
A22	O-CH ₃	-O-CH ₂ -O-	H	H	H	HO	N-óxido	H	342
A23	H	OH	O-CH ₃	H	O-CH ₃	O-CH ₃	H	(CH ₃) ₂	356
A24	H	-O-CH ₂ -O-	H	O-CH ₃	O-CH ₃	OH	CH ₃	H	356
A25	H	-O-CH ₂ -O-	H	O-CH ₃	O-CH ₃	OH	N-óxido	H	372

Fonte: Da Silva et al. (2013); Tian; Zhang; Guo (2017).

Tabela 6: Alcaloides isoquinolinos anotados por rede molecular e análise manual dos espectros de LC-MS/MS: Os prefixos antes da numeração dos compostos designa alcaloides pertencentes suas classes: (B) Oxoaporfinos; (C) Benzilisoquinolinos.



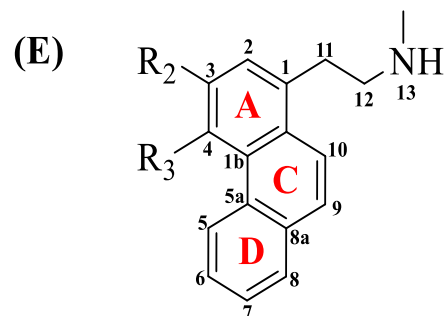
Composto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₅	R ₆	m/z
B1	H	-O-CH ₂ -O-		H	H	276
B2	H	OH	O-CH ₃	H	H	278
B3	H	O-CH ₃	O-CH ₃	H	H	292
B4	H	-O-CH ₂ -O-		H	O-CH ₃	306
B5	H	O-CH ₃	O-CH ₃	-O-CH ₂ -O-		336
B6	O-CH ₃	O-CH ₃	O-CH ₃	-O-CH ₂ -O-		366



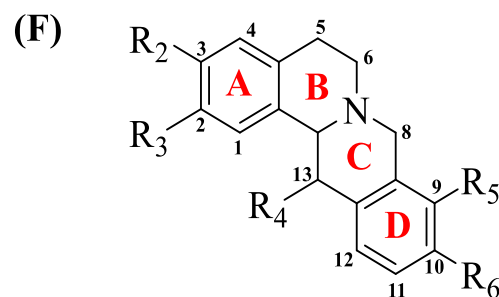
Composto	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	N-	m/z
C1	OH	OH	H	H	OH	H	272
C2	O-CH ₃	OH	H	H	OH	H	286
C3	O-CH ₃	OH	H	H	OH	CH ₃	300
C4	O-CH ₃	O-CH ₃	H	H	OH	H	300
C5	O-CH ₃	O-CH ₃	H	H	OH	CH ₃	314
C6	H	O-CH ₃	OH	H	OH	(CH ₃) ₂	314
C7	O-CH ₃	OH	H	H	OH	N-óxido	316
C8	O-CH ₃	O-CH ₃	H	H	O-CH ₃	CH ₃	328
C9	O-CH ₃	OH	H	OH	O-CH ₃	CH ₃	330
C10	OH	O-CH ₃	H	OH	O-CH ₃	(CH ₃) ₂	344
C11	O-CH ₃	OH	H	OH	O-CH ₃	N-óxido	346
C12	H	O-CH ₃	O-CH ₃	OH	O-CH ₃	(CH ₃) ₂	358

Fonte: Da Silva *et al.* (2017); Conceição *et al.* (2020).

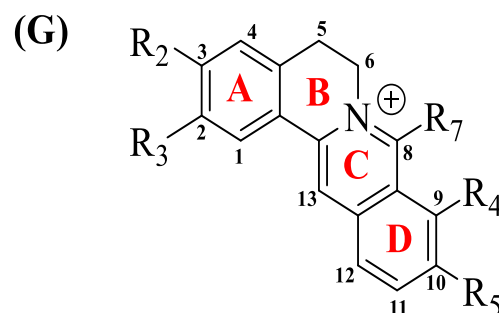
Tabela 7: Alcaloides isoquinolinos anotados por rede molecular e análise manual dos espectros de LC-MS/MS: Os prefixos antes da numeração dos compostos designa alcaloides pertencentes suas classes: (E) Fenantrenos; (F) Tetraidroprotoberberinos; (G) Protoberberinos.



Composto	R ₂	R ₃	N-	m/z
E1	-O-CH ₂ -O-		H	294
E2	OH	O-CH ₃	CH ₃	296
E3	O-CH ₃	O-CH ₃	CH ₃	310
E4	O-CH ₃	O-CH ₃	N-óxido	326



Composto	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	N-	m/z
F1	O-CH ₃	OH	H	O-CH ₃	OH	H	328
F2	O-CH ₃	OH	H	OH	O-CH ₃	H	342
F3	O-CH ₃	O-CH ₃	CH ₃	OH	OH	H	342
F4	O-CH ₃	O-CH ₃	H	O-CH ₃	O-CH ₃	H	356
F5	O-CH ₃	O-CH ₃	H	O-CH ₃	O-CH ₃	CH ₃	370



Composto	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₇	m/z
G1	-O-CH ₂ -O-		OH	O-CH ₃	H	322
G2	OH	OH	O-CH ₃	O-CH ₃	H	324
G3	-O-CH ₂ -O-		O-CH ₃	O-CH ₃	H	336
G4	OH	O-CH ₃	O-CH ₃	O-CH ₃	H	338
G5	O-CH ₃	O-CH ₃	O-CH ₃	O-CH ₃	H	352
G6	O-CH ₃	OH	O-CH ₃	O-CH ₃	CO	354

Fonte: López-Martín *et al.* (2002); Wang *et al.* (2017); Tian; Zhang; Guo (2017).

Tabela 8: Alcaloides isoquinolinos desreplicados pela rede molecular e HPLC-MS/MS das espécies de Annonaceae analisadas.

Nº	[M + H] ⁺ ou [M] ⁺		Erro (ppm)	Compostos Anotados	Fórmula Molecular	Principais Fragmentos	Espécies
	Massa Teórica (m/z)	Massa Observada (m/z)					
A1	266.1181	266.1182	0.4	Anonaina	C ₁₇ H ₁₅ NO ₂	249, 219, 191	<i>D. calycina</i>
		266.1186	1.9				<i>G. olivacea</i>
		266.1174	2.6				<i>P. leiophylla</i>
		266.1175	2.3				<i>E. amazonicus</i>
A2	268.1338	268.1333	1.9	Asimilobina	C ₁₇ H ₁₇ NO ₂	251, 219, 191, 236	<i>D. calycina</i>
		268.1328	4.0				<i>G. olivacea</i>
		268.1337	0,4				<i>P. leiophylla</i>
		268.1332	2.2				<i>E. amazonicus</i>
A3	280.1338	280.1331	2.5	N-metilanonaina	C ₁₈ H ₁₇ NO ₂	249, 219, 191	<i>E. amazonicus</i>
A4	282.1494	282.1484	3.5	N-metilasimilobina	C ₁₈ H ₁₉ NO ₂	251, 219, 191, 236	<i>G. olivacea</i>
		282.1487	2.5				<i>E. amazonicus</i>
A5	282.1494	282.1485	3.2	Nornuciferina	C ₁₈ H ₁₉ NO ₂	265, 250, 235, 207, 234, 219	<i>D. calycina</i>
		282.1487	2.5				<i>E. amazonicus</i>
A6	282.1130	282.1125	1.8	Anolobina	C ₁₇ H ₁₅ NO ₃	265, 235, 207	<i>G. olivacea</i>
		282.1128	0.7				<i>P. leiophylla</i>
A7	282.1130	282.1117	4.6	Norushinsunina	C ₁₇ H ₁₅ NO ₃	264, 234, 206	<i>D. calycina</i>
		282.1124	2.1				<i>E. amazonicus</i>
A8	294.1130	294.1097	11.2	N-formilanonaina	C ₁₈ H ₁₅ NO ₃	249, 219, 191	<i>G. olivacea</i>
A9	296.1651	296.1645	2.0	Nuciferina	C ₁₉ H ₂₁ NO ₂	265, 250, 234	<i>E. amazonicus</i>
A10	296.1287	296.1261	8.8	Xilopina	C ₁₈ H ₁₇ NO ₃	279, 264, 234, 206, 249, 221	<i>D. calycina</i>
		296.1288	0.3				<i>G. olivacea</i>
		296.1278	3.0				<i>E. amazonicus</i>
A11	298.1443	298.1436	2.3	Isopilina	C ₁₈ H ₁₉ NO ₃	281, 266, 250	<i>E. amazonicus</i>
A12	298.1443	298.1429	4.7	N-óxido de N-metilasimilobina	C ₁₈ H ₁₉ NO ₃	251, 219, 191	<i>P. leiophylla</i>
A13	312.1600	312.1589	3.5	O-Metilisopilina	C ₁₉ H ₂₁ NO ₃	295, 280, 264, 249	<i>D. calycina</i>
A14	312.1236	312.1225	3.5	Actinodafnina	C ₁₈ H ₁₇ NO ₄	295, 265, 237, 263	<i>G. olivacea</i>
A15	314.1392	314.1392	0	Norisoboldina	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	297, 265, 237, 282	<i>D. calycina</i>

Tabela 8 – Alcaloides isoquinolinos desreplicados pela rede molecular e HPLC-MS/MS das espécies de Annonaceae analisadas (Continuação)

Nº	[M + H] ⁺ ou [M] ⁺		Erro (ppm)	Compostos Anotados	Fórmula Molecular	Principais Fragmentos	Espécies
	Massa Teórica (m/z)	Massa Observada (m/z)					
A16	324.1236	324.1229	2.2	Neolitsina	C ₁₉ H ₁₇ NO ₄	293, 263, 235	<i>G. olivacea</i>
A17	326.1392	326.1389	0.9	Nornantenina	C ₁₉ H ₁₉ NO ₄	309, 294, 279, 278	<i>G. olivacea</i>
A18	328.1549	328.1547	0.6	Isoboldina	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	297, 265, 237	<i>F. longifolia</i> (caule)
A19	328.1549	328.1556	2.1	Norisocoridina	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	311, 296, 279	<i>F. longifolia</i> (folha)
A20	340.1549	340.1544	1.5	Dicentrina	C ₂₀ H ₂₁ NO ₄	309, 279, 251, 236	<i>D. surinamensis</i>
A21	342.1705	342.1719	4.0	Isocoridina	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	311, 296, 279, 280	<i>F. longifolia</i> (folha)
		342.1707	0.6				<i>D. surinamensis</i>
		342.1349	2.0				<i>F. longifolia</i> (caule)
A22	342.1342	342.1352	3.0	<i>N</i> -óxido de guaterina	C ₁₉ H ₂₀ NO ₅	342, 324, 295, 265, 237	<i>F. longifolia</i> (folha)
		342.1347	1.5				<i>D. surinamensis</i>
A23	356.1862	356.1855	2.0	<i>N</i> -Metilpredicentrina	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄	311, 296, 279, 251	<i>E. amazonicus</i>
A24	356.1498	356.1500	0.7	Duguetina	C ₂₀ H ₂₁ NO ₅	325, 295, 267	<i>G. olivacea</i>
		356.1498	0				<i>D. surinamensis</i>
A25	372.1447	372.1439	2.1	<i>N</i> -óxido de duguetina	C ₂₀ H ₂₁ NO ₆	325, 295, 267, 310	<i>F. longifolia</i> (folha)
		372.1445	0.5				<i>D. surinamensis</i>
B1	276.0661	276.0665	1.4	Liriodenina	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	248, 220	<i>D. calycina</i>
		276.0667	2.1				<i>G. olivacea</i>
		276.0650	4.0				<i>P. leiophylla</i>
		276.0655	2.2				<i>E. amazonicus</i>
B2	278.0817	278.0807	4.0	Oxoasimilobina	C ₁₇ H ₁₁ NO ₃	263, 250, 235	<i>P. leiophylla</i>
B3	292.0974	292.0964	3.4	Lisicamina	C ₁₈ H ₁₃ NO ₃	277, 248	<i>G. olivacea</i>
		292.0966	2.7				<i>E. amazonicus</i>
B4	306.0766	306.0763	1.0	Lanuginosina	C ₁₈ H ₁₁ NO ₄	291, 263, 235	<i>D. calycina</i>
		306.0771	1.6				<i>F. longifolia</i> (caule)
		306.0775	3.0				<i>F. longifolia</i> (folha)
		306.0762	1.3				<i>G. olivacea</i>
		306.0764	0.7				<i>P. leiophylla</i>

Tabela 8 – Alcaloides isoquinolinos desreplicados pela rede molecular e HPLC-MS/MS das espécies de Annonaceae analisadas (Continuação)

Nº	[M + H] ⁺ ou [M] ⁺		Erro (ppm)	Compostos Anotados	Fórmula Molecular	Principais Fragmentos	Espécies
	Massa Teórica (m/z)	Massa Observada (m/z)					
B5	336.0872	336.0875 336.0867	0.9 1.5	Dicentrinona	C ₁₉ H ₁₄ NO ₅	321, 293, 278	<i>G. olivacea</i> <i>F. longifolia</i> (caule)
B6	366.0978	366.0965	3.6	Oxofoebina	C ₂₀ H ₁₅ NO ₆	351, 336, 321, 308	<i>G. olivacea</i>
C1	272.1287	272.1277	3.7	Desmetilcoclaurina	C ₁₆ H ₁₇ NO ₃	255, 237, 107	<i>E. amazonicus</i>
C2	286.1443	286.1439	1.4	Coclaurina	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	269, 237, 209, 254, 107	<i>D. calycina</i>
		286.1457	4.9				<i>F. longifolia</i> (folha)
		286.1430	4.5				<i>P. leiophylla</i>
		286.1436	2.4				<i>E. amazonicus</i>
C3	300.1600	300.1590	3.3	N-Metilcoclaurina	C ₁₈ H ₂₁ NO ₃	269, 237, 209, 254, 107	<i>D. calycina</i>
		300.1602	0.7				<i>F. longifolia</i> (folha)
		300.1611	3.7				<i>F. longifolia</i> (caule)
C4	300.1600	300.1618	6.0	Norarmepavina	C ₁₈ H ₂₁ NO ₃	283, 268, 252, 107	<i>F. longifolia</i> (folha)
		300.1586	4.7				<i>P. leiophylla</i>
		300.1593	2.3				<i>E. amazonicus</i>
C5	314.1756	314.1763	2.2	Armepavina	C ₁₉ H ₂₃ NO ₃	283, 268, 252, 107	<i>F. longifolia</i> (folha)
C6	314.1756	314.1780	7.6	Oblongina	C ₁₉ H ₂₄ NO ₃ ⁺	269, 237, 209, 107	<i>F. longifolia</i> (folha)
		314.1750	2.0				<i>E. amazonicus</i>
C7	316.1549	316.1543	1.9	N-óxido de N-Metilcoclaurina	C ₁₈ H ₂₁ NO ₄	269, 237, 209, 254, 107	<i>P. leiophylla</i>
C8	328.1913	328.1925	5.8	O-Metilarmepavina	C ₂₀ H ₂₅ NO ₃	297, 282, 121, 206	<i>F. longifolia</i> (folha)
		328.1906	2.1				<i>E. amazonicus</i>
		328.1910	1.2				<i>D. surinamensis</i>
C9	330.1705	330.1734	8.8	Reticulina	C ₁₉ H ₂₃ NO ₄	299, 267, 239, 192, 137	<i>D. calycina</i>
		330.1705	0				<i>F. longifolia</i> (caule)
		330.1718	4.0				<i>F. longifolia</i> (folha)
		330.1677	8.5				<i>G. olivacea</i>

Tabela 8 – Alcaloides isoquinolinos desreplicados pela rede molecular e HPLC-MS/MS das espécies de Annonaceae analisadas (Continuação)

Nº	[M + H] ⁺ ou [M] ⁺ Massa Teórica (m/z)	Massa Observada (m/z)	Erro (ppm)	Compostos Anotados	Fórmula Molecular	Principais Fragmentos	Espécies
C9	330.1705	330.1688 330.1705	5.1 0	Reticulina	C ₁₉ H ₂₃ NO ₄	299, 137, 192	<i>P. leiophylla</i> <i>D. surinamensis</i>
C10	344.1862	344.1878 344.1854	4.6 2.3	Xilopinidina	C ₂₁ H ₂₇ NO ₄	299, 267, 239, 192, 137	<i>F. longifolia</i> (folha) <i>E. amazonicus</i>
C11	346.1655	346.1668 346.1657	3.8 0.6	N-óxido de reticulina	C ₁₉ H ₂₁ NO ₅	299, 267, 239, 192, 137	<i>D. calycina</i> <i>F. longifolia</i> (caule)
C12	358.2018	358.2017	0.3	8-metoxi-isotembetatrina	C ₂₁ H ₂₇ NO ₄	313, 298, 282, 137	<i>D. surinamensis</i>
E1	294.1494	294.1473	7.1	Estefenantrina	C ₁₉ H ₁₉ NO ₂	249, 219, 191	<i>G. olivacea</i>
E2	296.1651	296.1644	2.4	Argentinina	C ₁₉ H ₂₁ NO ₂	251, 236, 219, 191	<i>G. olivacea</i>
E3	310.1807	310.1818	3.5	Aterosperminina	C ₂₀ H ₂₃ NO ₂	265, 250, 234	<i>G. olivacea</i>
E4	326.1756	326.1760	1.2	N-óxido Aterosperminina	C ₂₀ H ₂₃ NO ₃	265, 250, 234	<i>G. olivacea</i>
F1	328.1549	328.1549 328.1536 328.1542 328.1538	0 4.0 2.1 3.4	Estefolidina	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	178, 151	<i>G. olivacea</i> <i>F. longifolia</i> (caule) <i>P. leiophylla</i> <i>D. surinamensis</i>
F2	342.1705	342.1707 342.1707 342.1708 342.1713	0.6 0.6 0.9 2.3	Isocoripalmina	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	178, 165, 151	<i>G. olivacea</i> <i>F. longifolia</i> (caule) <i>F. longifolia</i> (folha) <i>D. surinamensis</i>
F3	342.1705	342.1695	3.0	Coridalmina	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	192, 177; 326, 176; 151	<i>D. surinamensis</i>
F4	356.1862	356.1865	0.8	Tetraidropalmatina	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄	192, 177, 165	<i>D. surinamensis</i>
F5	370.2018	370.2012 370.2019	1.6 1.9	N-metiltetraidropalmatina	C ₂₂ H ₂₈ NO ₄ ⁺	206, 190	<i>E. amazonicus</i> <i>D. surinamensis</i>

Tabela 8 – Alcaloides isoquinolinos desreplicados pela rede molecular e HPLC-MS/MS das espécies de Annonaceae analisadas (Continuação)

Nº	[M+H] ⁺ ou [M] ⁺		Erro (ppm)	Composto Identificado	Fórmula Molecular	Principais Fragmentos	Espécies
	Massa Teórica (m/z)	Massa Observada (m/z)					
G1	322.1079	322.1082 322.1072	0.9 2.8	Berberrubina	C ₁₉ H ₁₆ NO ₄ ⁺	307, 279, 292, 264	<i>F. longifolia</i> (caule) <i>E. amazonicus</i>
G2	324.1236	324.1226 324.1221 324.1230 324.1236	3.1 4.6 1.9 0	Demetilenoberberina	C ₁₉ H ₁₈ NO ₄ ⁺	309, 294, 266, 292, 280	<i>G. olivacea</i> <i>P. leiophylla</i> <i>E. amazonicus</i> <i>D. surinamensis</i>
G3	336.1236	336.1234 336.1224	0.6 3.6	Berberina	C ₂₀ H ₁₈ NO ₄ ⁺	321, 306, 291, 263	<i>F. longifolia</i> (caule) <i>F. longifolia</i> (folha)
G4	338.1392	338.1387 338.1392 338.1383 338.1386 338.1398	1.5 0 2.7 1.8 1.8	Jatrorrizina	C ₂₀ H ₂₀ NO ₄ ⁺	323, 308, 280, 322, 294	<i>D. calycina</i> <i>G. olivacea</i> <i>P. leiophylla</i> <i>E. amazonicus</i> <i>D. surinamensis</i>
G5	352.1549	352.1542 352.1540 352.1546	2.0 2.6 0.8	Palmatina	C ₂₁ H ₂₂ NO ₄ ⁺	337, 322, 294, 279, 336, 308	<i>D. calycina</i> <i>G. olivacea</i> <i>D. surinamensis</i>
G6	354.1342	354.1337	1.4	8-Oxojatrorrizina	C ₂₀ H ₁₉ NO ₅	339, 324, 296, 338, 310	<i>D. surinamensis</i>
I1	358.1655	358.1646	2.5	Vailatina	C ₂₀ H ₂₄ NO ₅	358, 340, 194, 176	<i>G. olivacea</i>
I2	384.1447	384.1441	1.6	6,10-di-hidroxil-3-desmetildi-hidrobenzofenantridínio	C ₂₁ H ₂₁ NO ₆	366, 351, 336, 369, 354	<i>E. amazonicus</i>

Os alcaloides que apresentaram íons fragmentos característicos de perdas neutras de 17 Da (NH_3); 31 Da (NH_2CH_3); 45 Da [NHCH_2 / $\text{NH}(\text{CH}_3)_2$] ou 47 Da (NHOCH_3), e subsequentes a perdas características de grupos periféricos, como 30 Da (CH_2O), 32 Da (CH_3OH) ou 15 Da ($\bullet\text{CH}_3$) e 31 Da ($\bullet\text{OCH}_3$), evidenciaram a presença do esqueleto aporfino (DANTAS *et al.*, 2020; LÚCIO *et al.*, 2015; QING *et al.*, 2020; STÉVIGNY *et al.*, 2004).

Estudos sugerem que a clivagem heterocíclica inicial do grupo amino ocorre mediante abertura do anel heterocíclico seguida de eliminação de Hoffmann, o que possibilita a formação de um carbocátion primário estabilizado via conjugação π (CARNEVALE NETO *et al.*, 2020). A perda de 17 Da corresponde a fração amina ($-\text{NH}_3$); de 31 Da à fração *N*-metilamina (NH_2CH_3); 45 Da à fração *N*-formil (NHCH_2O) ou *N*-dimetilamina [$\text{NH}(\text{CH}_3)_2$] e de 47 Da à fração *N*-metil *N*-óxido (NHOCH_3) (CONCEIÇÃO *et al.*, 2020; LIMA *et al.*, 2021; SHANGGUAN *et al.*, 2018).

Eliminações correspondentes ao grupo amino ocorreram nos íons de m/z 266 (**A1**), m/z 280 (**A3**), m/z 282 (**A6**), m/z 294 (**A8**), m/z 296 (**A10**), m/z 312 (**A14**), m/z 324 (**A16**), m/z 340 (**A20**) m/z 342 (**A22**), m/z 356 (**A24**) e m/z 372 (**A25**), além disso, estes apresentaram perdas neutras de metanal (CH_2O , 30 Da) e monóxido de carbono (CO , 28 Da), que caracteriza a presença de uma ponte metileno dióxido adjacente nos anéis A ou D (SHIM *et al.*, 2013). Os mecanismos de fragmentação principais para esses íons estão discriminados na figura 12.

Adicionalmente, o composto de m/z 282 (**A7**) exibiu perdas e íons fragmentos semelhantes ao composto **A6**, no entanto, evidenciou perda inicial de 18 Da (H_2O) (Figura 13). Tal característica de fragmentação foi atribuída ao alcaloide 7-hidroxiaporfino, norushinsunina, que corrobora com relatos na literatura para *Onychopetalum amazonicum*, *Unonopsis floribunda* e *Asimina triloba* (AVULA *et al.*, 2018; DA SILVA *et al.*, 2018; DE LIMA *et al.*, 2020).

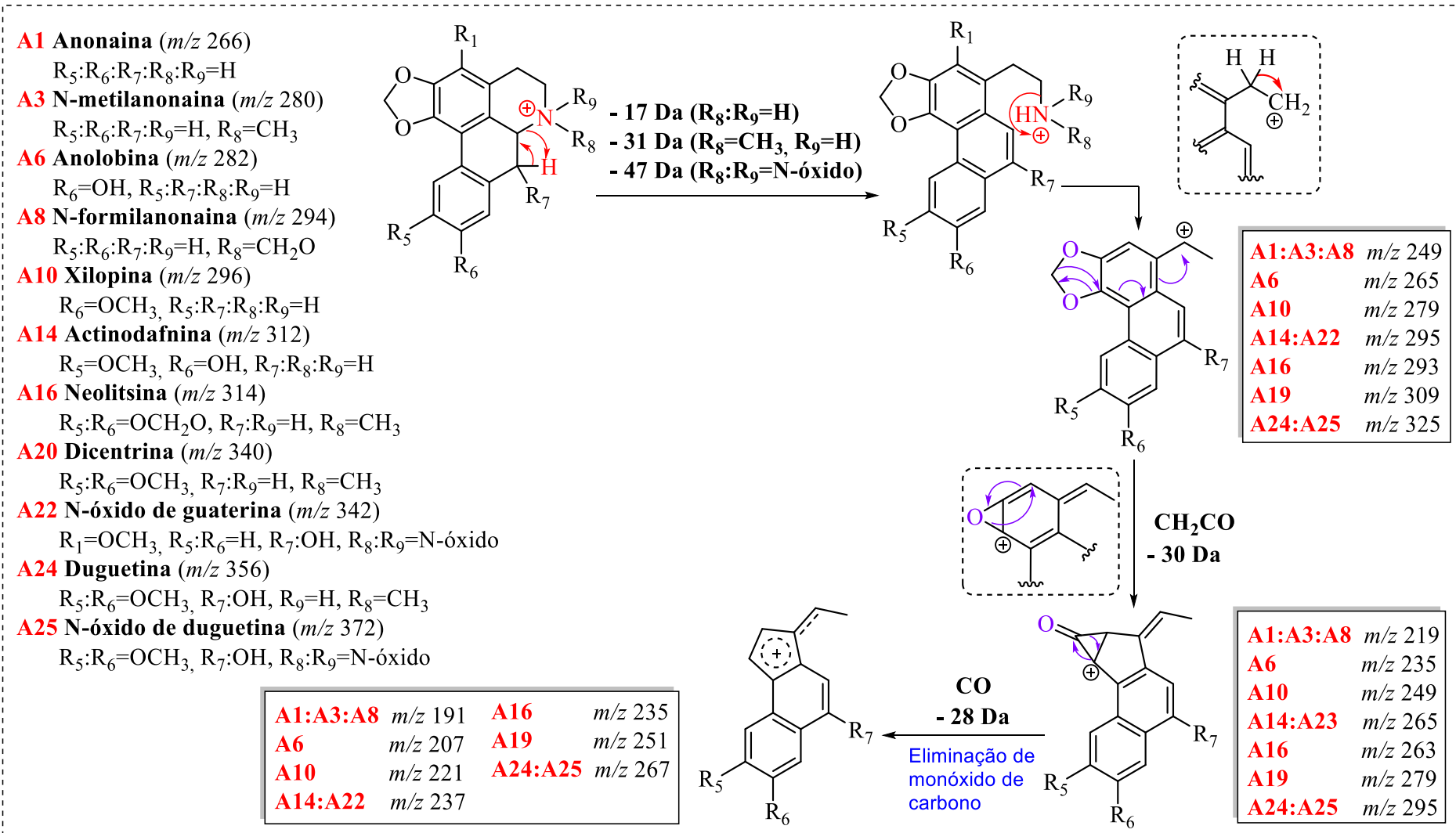


Figura 12: Mecanismos de fragmentação chave de aporfina com presença do grupo metilenodioxi adjacentes ao anel aromático.

Fonte: Adaptado de De Lima *et al.* (2020).

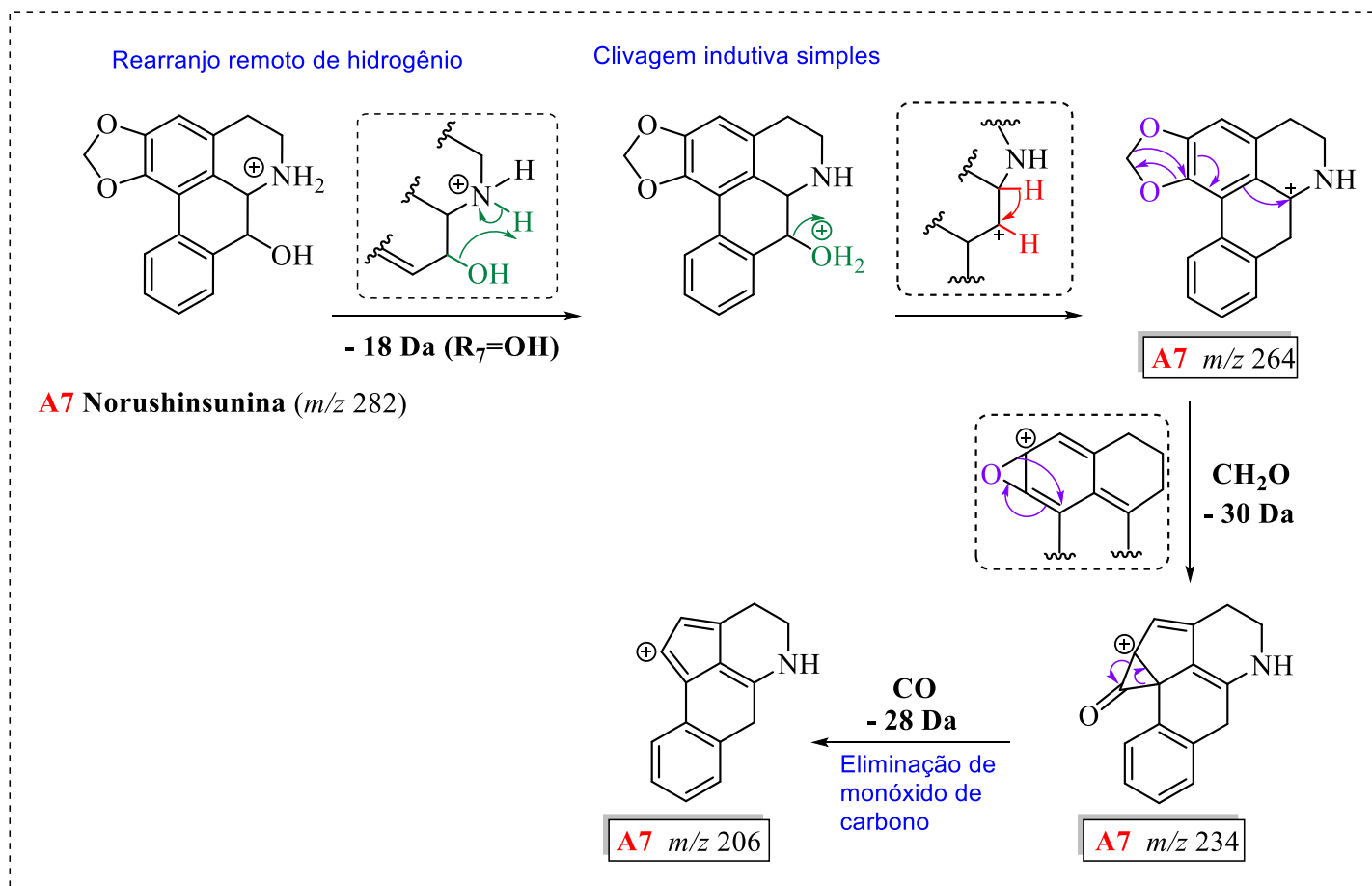


Figura 13: Mecanismos de fragmentação para o alcaloide norushinsunina.

Fonte: Adaptado de De Lima *et al.* (2020).

Os compostos **A22**, **A24** e **A25** também apresentaram fragmentos resultante da perda de -18 Da (H₂O), competitiva a eliminação das porções de *N*-metilamina (NHCH₃) e *N*-metil *N*-óxido (NHOCH₃). Por meio dos caminhos de fragmentos e comparação com dados da literatura, os íons **A22**, **A24** e **A25** foram designados como a *N*-óxido de guaterina, duguetina e a *N*-óxido de duguetina, respectivamente (DE SOUZA *et al.*, 2020; PAZ *et al.*, 2019).

Os espectros de MS/MS dos íons de *m/z* 282 (**A5**), *m/z* 296 (**A9**), *m/z* 312 (**A13**), *m/z* 326 (**A17**), *m/z* 328 (**A19**) e *m/z* 342 (**A21**), demonstraram perdas iniciais de 17 ou 31 Da e similaridade em suas fragmentações posteriores pelas perdas competitivas radicalares de 15 Da ($\bullet$ CH₃) e 31 Da ($\bullet$ OCH₃), pressupondo a presença de um anel aromático com um ou mais grupos metóxi adjacentes (CONCEIÇÃO *et al.*, 2020) (Figura 14). Os compostos **A5** e **A9** produziram os mesmos íons fragmentos em *m/z* 265, 250 e 234, sugerindo-se tratar de um noraporfina e suas forma *N*-metilada. Em comparação com dados da literatura, mecanismos de fragmentação e anotação pela rede molecular, os íons **A5** e **A9** foram caracterizados como normuciferina e nuciferina, respectivamente (DA SILVA *et al.*, 2013; DE LIMA *et al.*, 2020).

Os compostos **A19** e **A21** também sugeriram trata-se de análogos, evidenciando a perda de 32 Da (MeOH), além das fragmentações radicalares (DA SILVA *et al.*, 2016). Está via de fragmentação particular permitiu caracterizar os íons **A19** e **A21** como a norisocoridina e a isocoridina, respectivamente, corroborada por dados da literatura e anotação pela rede molecular (DANTAS *et al.*, 2020; SHANGGUAN *et al.*, 2018; STÉVIGNY *et al.*, 2004).

Os íons de *m/z* 268 (**A2**), *m/z* 282 (**A4**), *m/z* 296 (**A11**), *m/z* 298 (**A12**), *m/z* 314 (**A15**), *m/z* 328 (**A18**) e *m/z* 356 (**A23**), demonstraram perdas sucessivas de 32 Da (MeOH) e 28 Da (CO), características de compostos que possuem grupos com hidroxilas e metoxilas vicinais (STÉVIGNY *et al.*, 2004) (Figura 15).

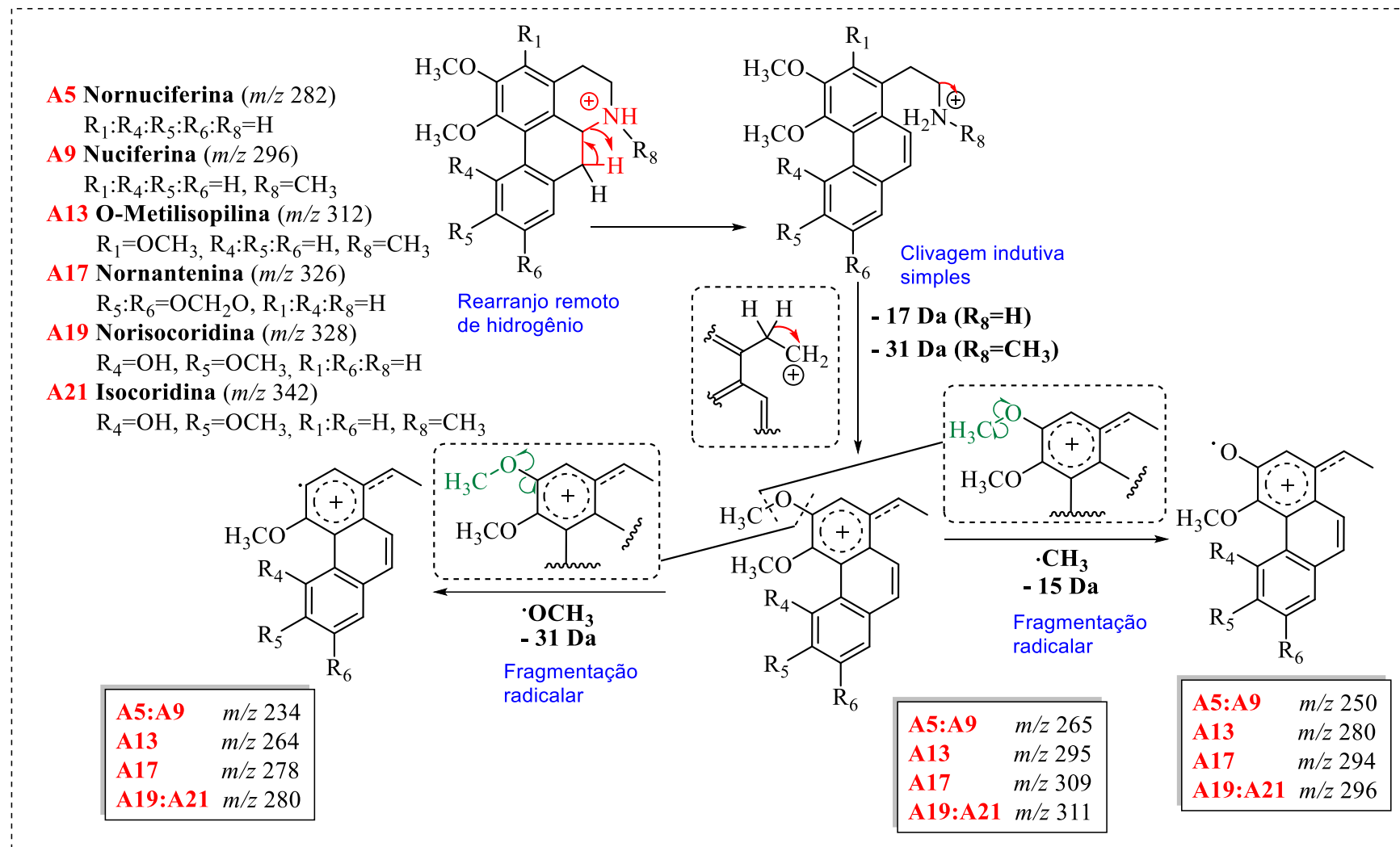
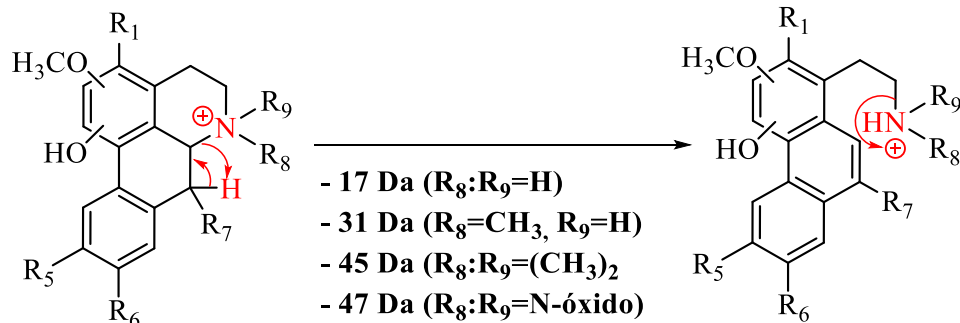


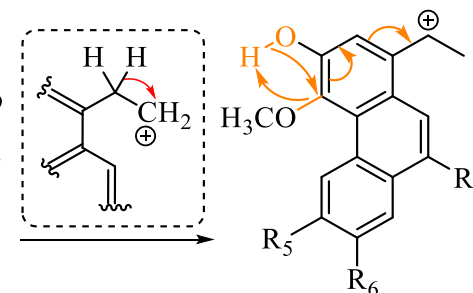
Figura 14: Mecanismos de fragmentação chave de aporfinas com presença de metoxilas vicinais adjacentes ao anel aromático.

Fonte: Adaptado de De Souza *et al.* (2020).

Rearranjo remoto de hidrogênio



Clivagem indutiva simples



A2:A4:A12	<i>m/z</i> 251
A11	<i>m/z</i> 281
A15:A18	<i>m/z</i> 297
A23	<i>m/z</i> 325

A2 Assimilobina (*m/z* 268)

$R_2=OH, R_3=OCH_3, R_5:R_6:R_8:R_9=H$

A4 N-metilasimilobina (*m/z* 282)

$R_2=OH, R_3=OCH_3, R_5:R_6:R_9=H, R_8=CH_3$

A11 Isopilina (*m/z* 298)

$R_1:R_2=OCH_3, R_3=OH, R_5:R_6:R_8:R_9=H$

A12 N-metilasimilobina N-óxido (*m/z* 298)

$R_2=OH, R_3=OCH_3, R_5:R_6=H, R_8:R_9=N\text{-óxido}$

A15 Norisoboldina (*m/z* 314)

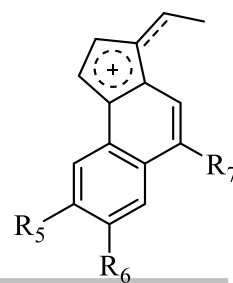
$R_2:R_5=OCH_3, R_3:R_6=OH, R_8:R_9=H$

A18 Isoboldina (*m/z* 328)

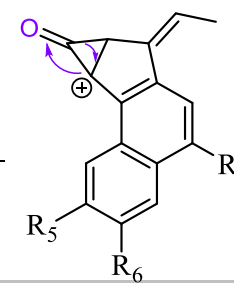
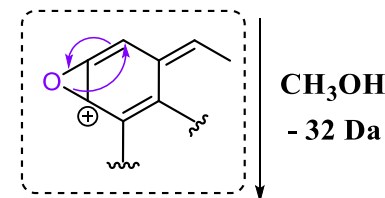
$R_2:R_5=OCH_3, R_3:R_6=OH, R_9=H, R_8=CH_3$

A23 N-Metilpredicentrina (*m/z* 356)

$R_2=OH, R_3:R_5:R_6=OCH_3, R_8:R_9=CH_3$



A2:A4:A12	<i>m/z</i> 191
A11	<i>m/z</i> 221
A15:A18	<i>m/z</i> 237
A23	<i>m/z</i> 265



A2:A4:A12	<i>m/z</i> 219
A11	<i>m/z</i> 249
A15:A18	<i>m/z</i> 265
A23	<i>m/z</i> 293

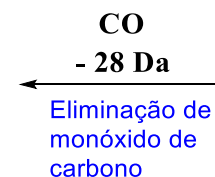


Figura 15: Mecanismos de fragmentação chave de aporfinas com presença de metoxila e hidroxila vicinal adjacentes ao anel aromático.

Fonte: Adaptado de Carnevale Neto *et al.* (2020).

Os compostos **A2**, **A4** e **A12** produziram mesmo íon fragmento em m/z 251, indicando perdas das frações NH_3 (-17 Da), NH_2CH_3 (-31 Da) e NHOCH_3 (-47 Da), respectivamente, demonstrando que a única diferença entre eles são os substituintes do grupo nitrogenado. O composto **A2** e **A12** foram previamente anotados pela rede molecular como sendo a assimilobina e seu homólogo *N*-óxido de *N*-metilasimilobina, respectivamente, corroborado pelas vias de fragmento (CARNEVALE NETO *et al.*, 2020; PAZ *et al.*, 2019). O composto **A4** foi postulado como *N*-metilasimilobina em comparação com o espectro do banco de dados MoNA (do inglês “*MassBank of North America*”) (<https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/>) e dados da literatura (LIMA *et al.*, 2021).

O composto **A23** demonstrou o íon fragmento m/z 311, indicando a perda de -45 Da, previamente atribuído a eliminação da porção *N*-formil ou *N*-dimetilamina, como evidenciado em outros aporfinas, todavia, a massa exata do fragmento é consistente a perda do grupo *N*-dimetilamina. Íons fragmentos menos abundantes em m/z 296 e 280 também foram observados, evidenciando fragmentações radicalares de -15 e 31 Da, supostamente oriundos das metoxilas vicinais adjacentes ao anel D. Em comparação espectral com o banco de dados MoNA e dados da literatura, o composto **A23** foi identificado como *N*-metilpredicentrina (CONCEIÇÃO *et al.*, 2020).

Os compostos **B1** a **B6** não apresentaram evidências de perda da fração amino de quaisquer naturezas, entretanto, foram observados íons fragmentos comuns dos grupos substituintes como $\bullet\text{CH}_3$ (-15 Da) e CO (-28 Da), com pouquíssimos fragmentos abaixo de m/z 200. Essas características de fragmentação são consistentes com alcaloides oxoaporfinos, classe derivada de isoquinolina que exhibe a porção nitrogenada na forma de imina heterocíclica e junção carbonil característica entre os anéis aromáticos B e D (DA SILVA *et al.*, 2017).

O íon de m/z 276 (**B1**) foi previamente identificado pela rede molecular e indicou ser o alcaloide liriodenina, amplamente relatada em espécies de Annonaceae (LÚCIO *et al.*, 2015; NARDELLI *et al.*, 2021). Observou-se nos espectros de MS/MS um pico de m/z 248, indicando a perda de monóxido de carbono (-CO, 28 Da) relativa a porção carbonila em C-7 (DANTAS *et al.*, 2020). A perda subsequente é associada a deslocalização eletrônica entre os anéis A e B, proporcionando a ruptura da ponte metileno dióxido e eliminação neutra de CO, formando o íon fragmento de m/z 220 (DA SILVA *et al.*, 2017).

Os íons de m/z 278 (**B2**), m/z 292 (**B3**), m/z 306 (**B4**), m/z 336 (**B5**) e m/z 366 (**B6**) evidenciaram perdas de 15 e 28 Da sucessivas, correspondentes à clivagem homolítica de substituintes metil dos grupos metoxila e da porção carbonila em C-7. Os compostos **B5** e **B6** apresentaram mais de uma perda de 15 Da, possivelmente resultante da primeira clivagem que gerou um cátion radical distônico que permitiu a deslocalização de elétrons π pelo sistema conjugado, possibilitando a segunda perda radicalar e formação de uma porção carbonila (Figuras 16, 17 e 18) (CARNEVALE NETO *et al.*, 2020; DA SILVA *et al.*, 2017).

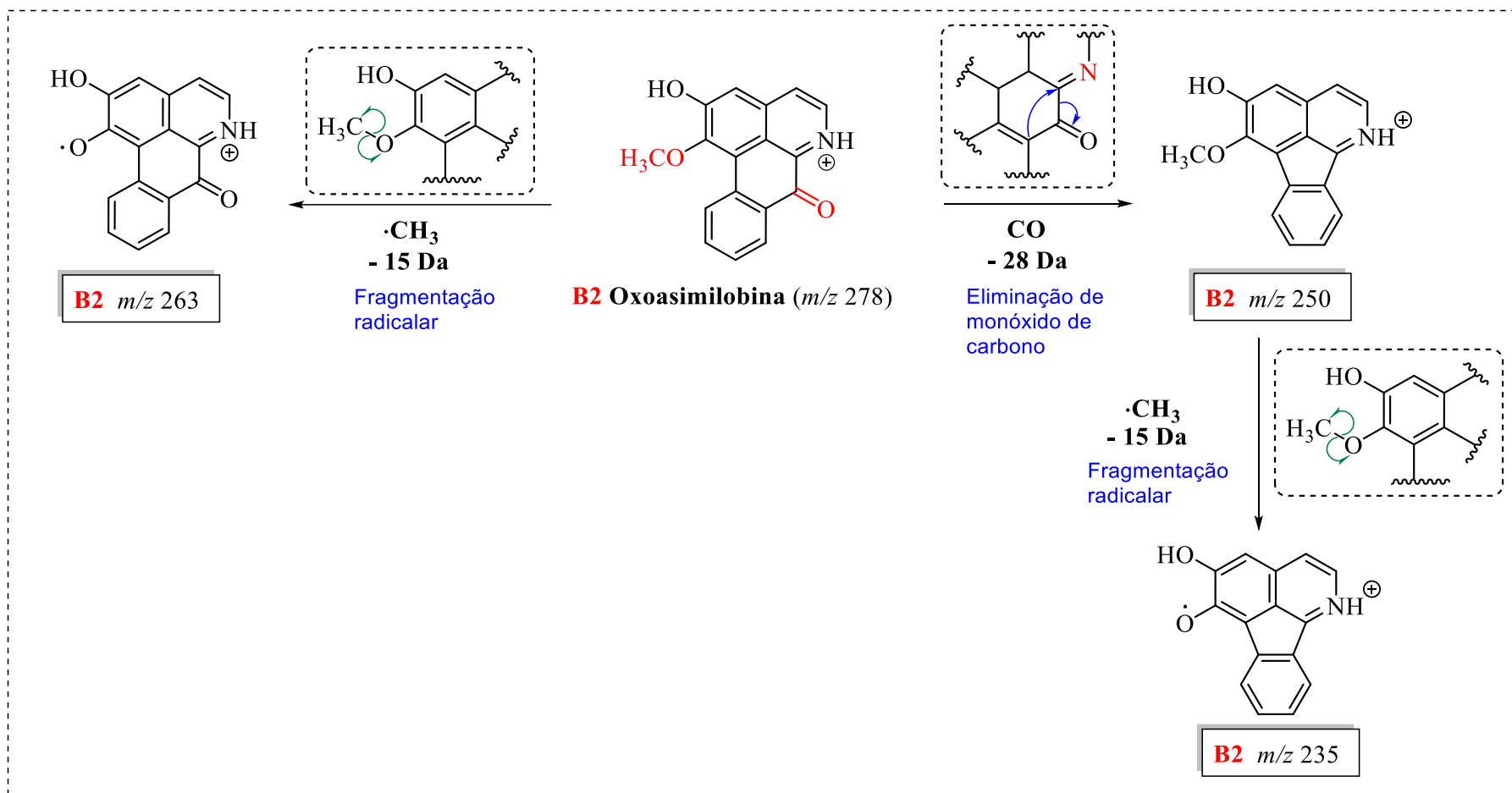


Figura 16: Via de fragmentação proposta para o oxoaporfino oxoasimilobina (**B2**)

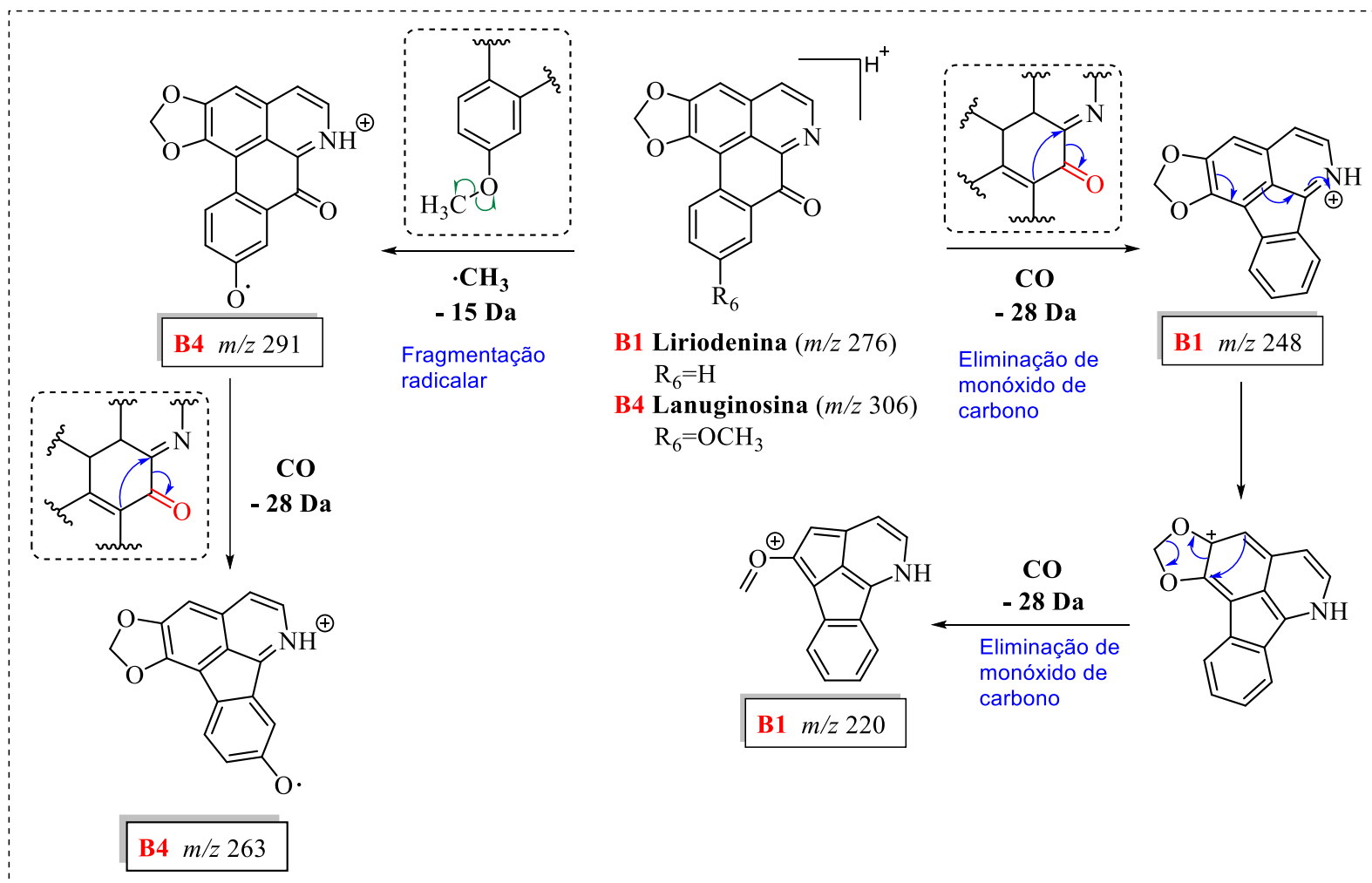


Figura 17: Mecanismos de fragmentação dos oxoaporfins liriodenina e lanuginosina.

Fonte: Adaptado de Da Silva *et al.* (2017).

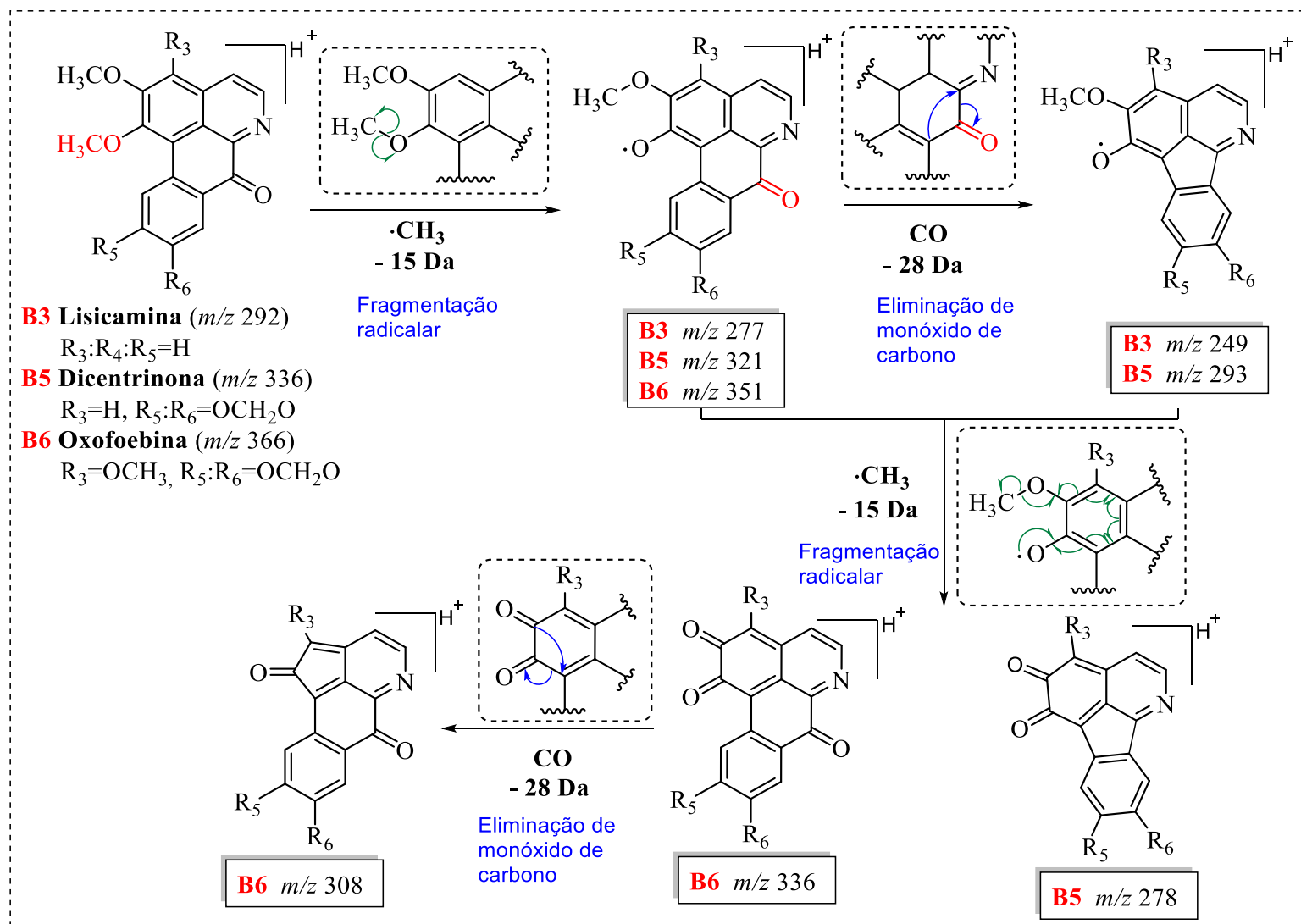


Figura 18: Via de fragmentação proposta para os oxoaporfins lisicamina, dicentrinona e oxofoebina

Os alcaloides **C1** a **C12** apresentaram perdas semelhantes aos compostos aporfinos (**A1** a **A25**), incluindo perdas característicos da clivagem das porções amino e das frações CH_3OH (-32 Da), $\bullet\text{CH}_3$ (-15 Da) ou $\bullet\text{OCH}_3$ (-31 Da), concomitante a eliminação de CO (-28 Da). Contudo, fragmentos abaixo de m/z 200 foram consistentes a íons diagnósticos da classe dos benzilisoquinolinos, como descrito em estudos de fragmentação (SCHMIDT *et al.*, 2005; SHIM *et al.*, 2013). As vias de fragmento sugeridos para perda do grupo amino e formação de íons diagnóstico desta classe estão representadas nas figuras 19 e 20.

Os íons em m/z 286 (**C2**), m/z 300 (**C3**) e m/z 316 (**C7**) revelaram a presença de amina secundária, terciária e quaternária em suas estruturas, exibindo o mesmo íon fragmento em m/z 269, coerente com as perdas de 17 Da, 31 Da e 47 Da, respectivamente. Os dados de MS/MS evidenciaram os fragmentos de m/z 237 e m/z 209 atribuídos as perdas de CH_3OH e CO, enquanto que o íon de m/z 107 indicou a presença da OH no substituinte benzil (Anel C). A rede molecular realizada permitiu identificar esses íons como coclaurina (**C2**), *N*-metilcoclaurina (**C3**) e *N*-óxido de *N*-metilcoclaurina (**C7**), caracterizados pelas vias de fragmentação relatadas (AVULA *et al.*, 2018; TORRES-VEGA *et al.*, 2020)

Os compostos isobáricos de m/z 314 (**C5** e **C6**), apontaram o mesmo íon fragmento em m/z 107, permitindo serem discriminados pelos fragmentos oriundos dos substituintes no anel isoquinolina. O composto **C6** apresentou perda de 45 Da relativo à porção *N*-dimetilamina [$\text{NH}(\text{CH}_3)_2$], seguida de perdas de 32 e 28 Da, sendo atribuído ao alcaloide oblongina (LIMA *et al.*, 2021). O composto **C5** indicou perda de 31 Da correlacionada a fração NHCH_3 , assim como perdas radicalares neutras de 15 e 31 Da, inferindo-o como o alcaloide armepavina (CONCEIÇÃO *et al.*, 2020).

O íon m/z 328 (**C8**) demonstrou fragmentos semelhantes a **C5**, contudo, o íon molecular em m/z 121 evidenciou o grupo metoxila no anel C, postulando-o como *O*-metilarmepavina (Paz *et al.*, 2022).

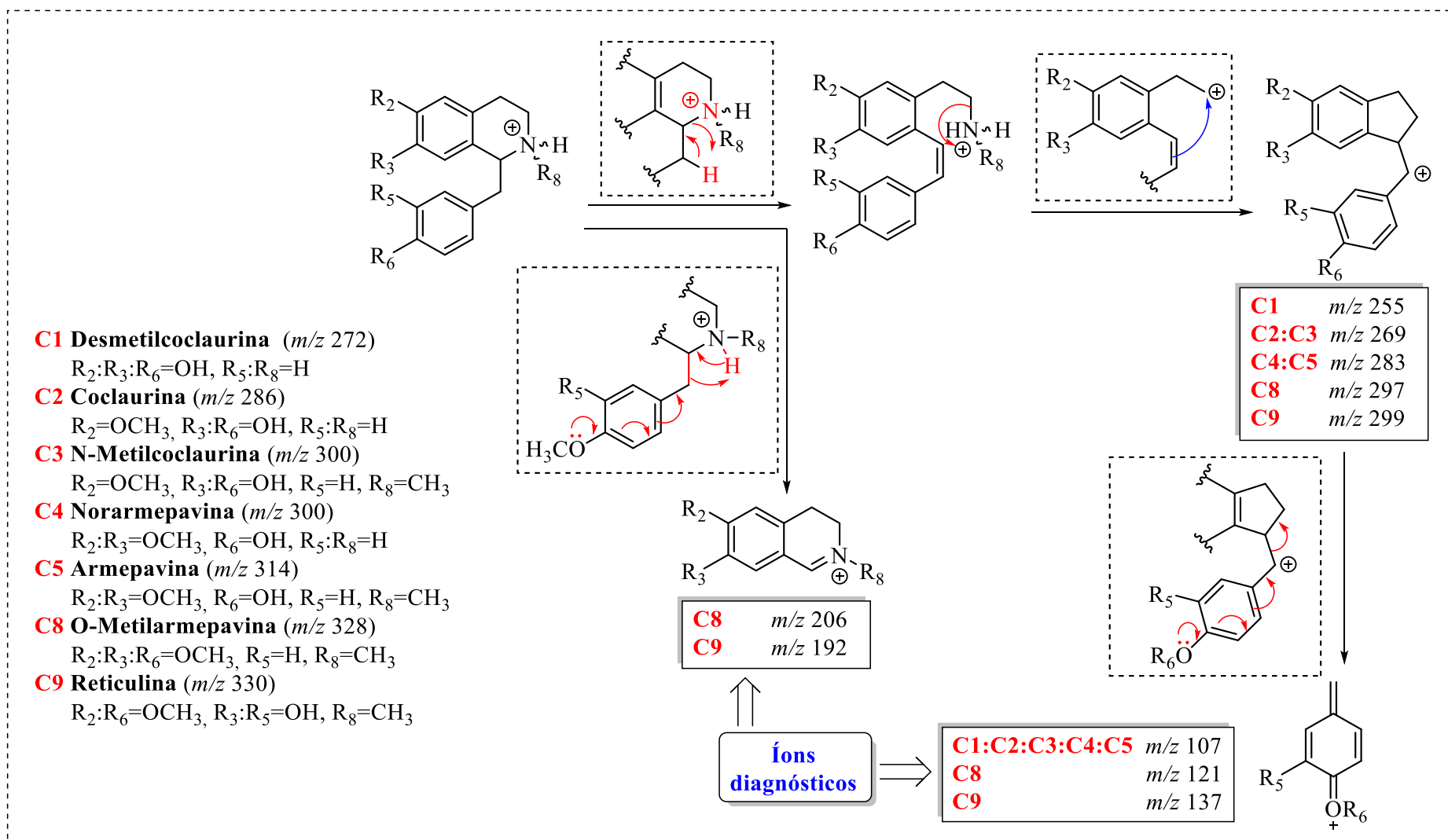


Figura 19: Principais mecanismos de fragmentação de formação dos íons diagnósticos dos benzilisoquinolinos C1 a C9.

Fonte: Adaptado de Qing *et al.* (2020).

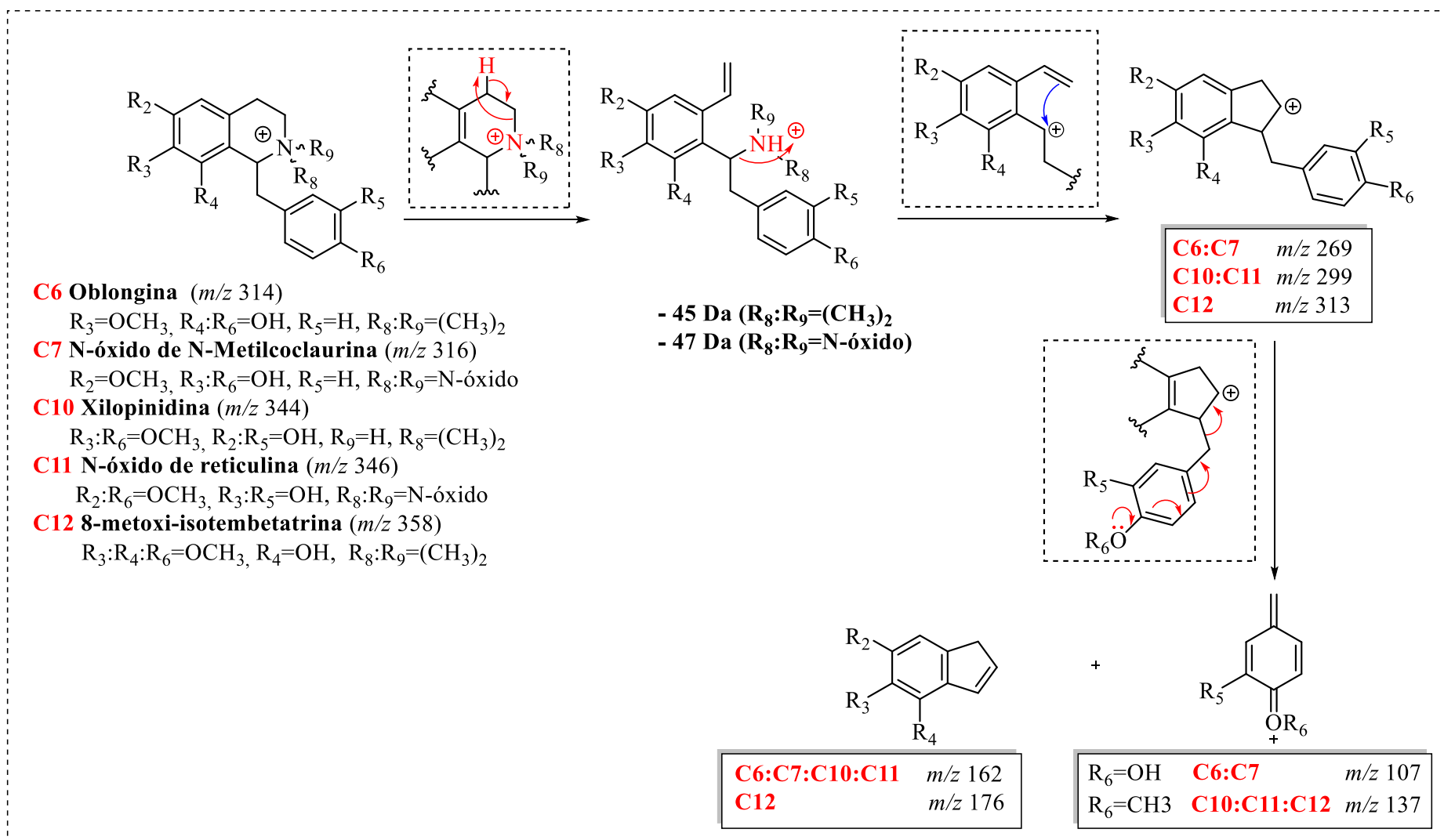


Figura 20: Via de fragmentação proposta para a perda da fração amino dos benzilisoquinolinos: **C6**, **C7**, **C10**, **C11**, **C12**

Os íons m/z 294 (**E1**) e m/z 296 (**E2**) foram previamente anotados pela rede molecular como alcaloides pertencentes a subclasse dos fenantrenos, incentivando a busca por outros representantes. Embora sejam caracterizados por não apresentar o nitrogênio na forma heterocíclica, os compostos deste grupo são estreitamente relacionados aos aporfinos e a seu isolamento em espécies de Annonaceae corroboram as anotações realizadas (CASTEDO; TOJO, 1990; LÚCIO *et al.*, 2015).

A única investigação fitoquímica recente com a espécie *G. olivacea* resultou no isolamento e na caracterização de dez alcaloides aporfinos, incluindo três fenantrenos, o que serviu de base para identificação desses alcaloides neste trabalho (DE SOUZA ARAÚJO *et al.*, 2020). Os espectros de MS/MS dos compostos **E2**, **E3**, **E4** foram condizentes com dados publicados por De Souza *et al.* (2020), demonstrando a clivagem característica da cadeia lateral etilamina, como reforçado em outros estudos com essa classe (SHAMMA, 1972; SHAMMA; MONIOT, 1978). Os íons m/z 296 (**E2**), m/z 310 (**E3**) e m/z 326 (**E4**) foram então designados como argentinina, aterosperminina e *N*-óxido de aterosperminina, respectivamente, anotados somente na espécie de *G. olivacea*. O composto **E1** foi anotado por MN como sendo o alcaloide estefenantrina, caracterizado com base na medição de massa exata, comparação com o espectro do banco de dados MoNA e dados da literatura, sendo coerente apontá-lo como contribuição inédita a espécie (LÓPEZ-MARTÍN *et al.*, 2002) (Tabela 5).

O *cluster* 8 revelou a presença de quatro alcaloides da classe dos tetraidroprotoberberinos, compostos que geram íons diagnósticos por meio de reações de fragmentação retro-Diels-Alder (RDA) (DEMARQUE *et al.*, 2016). Com base nos dados MS/MS detectados, íons m/z 328 (**F1**), m/z 342 (**F2**), m/z 356 (**F4**) e m/z 372 (**F5**), anotados previamente pela rede molecular como estefolidina, isocoripalmina, tetraidropalmatina e *N*-metiltetraidropalmatina, foram condizentes com os dados da literatura (DE LIMA *et al.*, 2020; LIMA *et al.*, 2021; TIAN; ZHANG; GUO, 2017). O composto **F3**, isobárico a **F2**, foi distinguido pelo fragmento abundante de m/z 192 que refletiu o padrão de substituição do anel A com metoxilas vicinais, corroborado pelo íon m/z 176, possivelmente decorrente da perda de metano (16 Da; $-CH_4$) (SHIM *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2017). O íon **F3** foi designado como sendo o alcaloide coridalmina, relatado na espécie *Xylopia vieillardii* e *Annona salzmännii* (JOSSANG *et al.*, 1991; LIMA *et al.*, 2021).

O indicio de alcaloides da classe dos protoberberinos se deu após identificação do composto **G5** pela rede molecular (*cluster* 1). Tendo em vista que este grupo apresenta insaturação no anel C, fragmentos provenientes da clivagem por RDA não são observados (QING *et al.*, 2020). Compostos que evidenciaram somente íons produtos formados das perdas de grupos substituintes como, por exemplo, CH₂O (-30 Da), CH₃ (-15 Da) e CO (-28 Da) foram comparados a estudos com protoberberinos típicos, sendo seis compostos (**G1-G6**) anotados e classificados neste grupo (SINGH *et al.*, 2017; TIAN; ZHANG; GUO, 2017) (Tabela 5).

Os íons *m/z* 358 (**I1**) e *m/z* 384 (**I2**) foram anotados por análise manual dos espectros de MS/MS e apresentaram fragmentações condizentes com outras subclasses de isoquinolinos. O composto **I1** apresentou perda de 18 Da, evidenciado pelo fragmento de *m/z* 340, indicando também o íon *m/z* 194 relativo à porção isoquinolina após clivagem por RDA. Outro indicio importante foi a presença do íon *m/z* 176, possivelmente resultado da perda de H₂O do íon produto *m/z* 194. A perda de H₂O (-18 Da) pode ser usada para distinguir protopinas e tetraidroprotoberberinas (SUN *et al.*, 2014). A proposta de fragmentação para o composto **I1** está representada na figura 21a. Baseando-se em dados da literatura, o composto **I1** foi sugerido como o alcaloide vailatina, identificado neste estudo apenas em *G. olivacea* (QING *et al.*, 2015).

O composto **I2** demonstrou fragmentos condizentes com as perdas neutra de ·CH₃ (-15 Da) e H₂O (-18 Da), não sendo observado o indicio da reação RDA. A falta de íons moleculares abaixo de *m/z* 200 e a perda de H₂O são evidências de alcaloides di-hidrobenzofenantridinas (QING *et al.*, 2015). A proposta de fragmentação para composto **I2** está representada na figura 21b. Baseando-se dados relatos, o íon *m/z* 384 pode ser sugerido como o alcaloide 6,10-di-hidroxil-3-desmetildi-hidrobenzofenantridínio (TIAN; ZHANG; GUO, 2017).

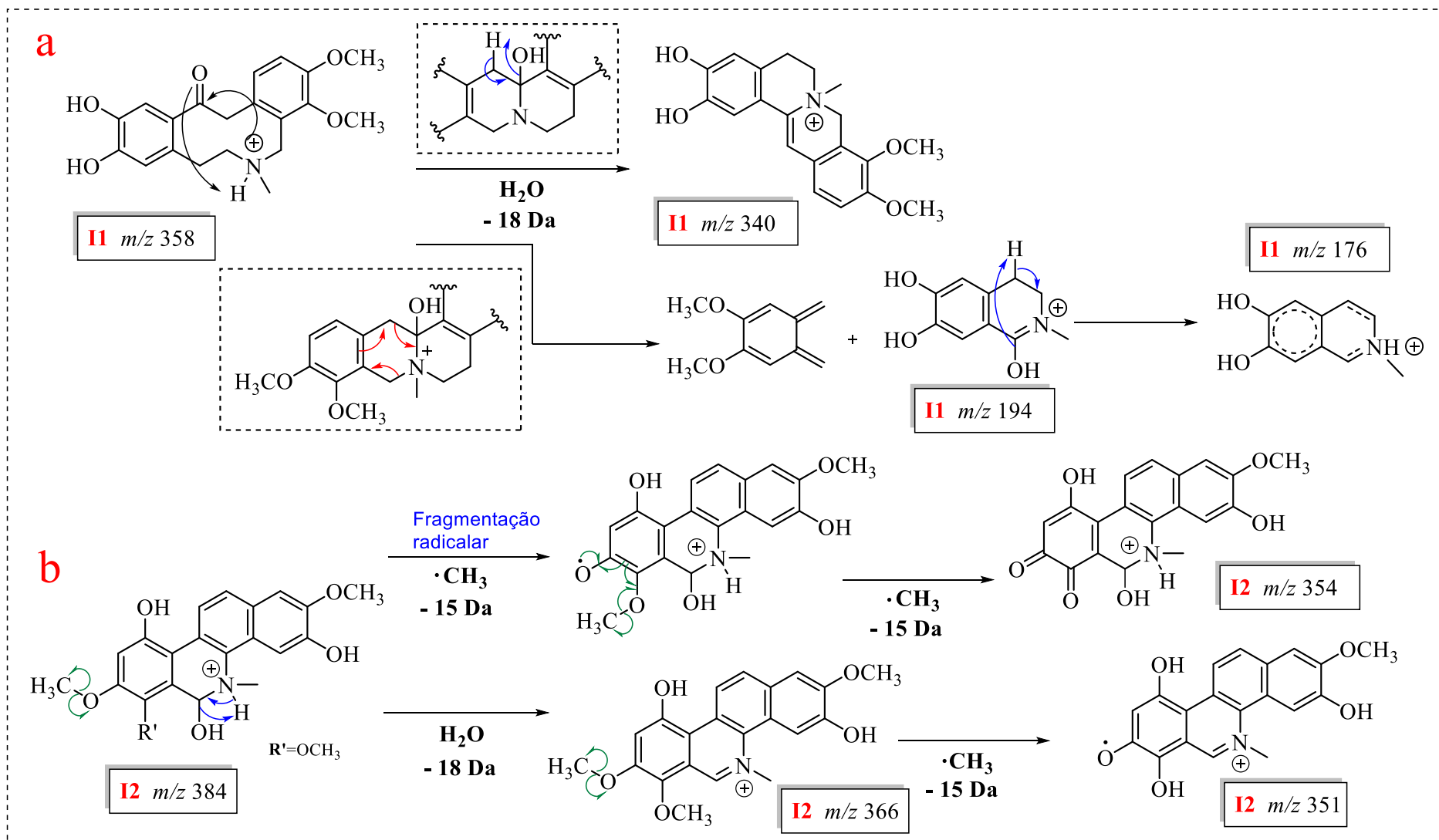


Figura 21: Via de fragmentação proposta para os compostos vailatina (**11**) e 6,10-di-hidroxi-3-desmetildi-hidrobzenofenantridínio (**12**)

O primeiro e recente estudo fitoquímico com a espécie *D. calycina* resultou no isolamento de nove alcaloides isoquinolinos, todos considerados inéditos à espécie e ao gênero (COSTA *et al.*, 2021). O presente trabalho identificou os compostos anonaina (**A1**), liriodenina (**B1**), reticulina (**C9**) e *N*-óxido de reticulina (**C11**), previamente caracterizados por Costa *et al.* (2021), além de 11 compostos não relatados na espécie, classificados em aporfinos (6), oxoaporfinos (1), benzilisoquinolinos (2) e protoberberinos (2)

De acordo com as consultas realizadas nos bancos de dados científicos *Scopus* e *Google scholar*, identificou-se apenas um estudo do perfil alcaloídico da espécie *E. amazonicus*, que resultou no isolamento/identificação de cinco alcaloides oxoaporfinos (ALENCAR *et al.*, 2010), sendo 2 destes evidenciados neste trabalho (**B1** e **B3**). Adicionalmente, identificou-se mais 21 alcaloides considerados contribuições inéditas a espécie.

Avaliações fitoquímicas realizadas com a espécie *F. longifolia* revelaram os benzilisoquinolinos e tetraidroprotoberberinos como as classes químicas principais (TAVARES *et al.*, 2005; ADRIÃO *et al.*, 2020). Este estudo corroborou esta observação devida à identificação de nove benzilisoquinolinos (classe majoritária) e dois tetraidroprotoberberinos, além de aporfinos (5), oxoaporfinos (2) e protoberberinos (2).

Para a espécie *P. leiophylla* foi relatado apenas um estudo realizado por Nascimento Neto *et al.* (2021), levando ao isolamento dos isoquinolinos liriodenina e asimilobina. Com exceção a estes, infere-se que outros alcaloides caracterizados neste estudo para a espécie *P. leiophylla*, são contribuições inéditas.

5.2 Estudo e propostas de vias de fragmentação para alcaloides 7,7-dimetilaporfínicos

Visando prosseguir as investigações com alcaloides isoquinolinos por meio da técnica de espectrometria de massas (MS/MS), realizou-se um estudo com alcaloides da classe dos 7,7-dimetilaporfínicos a fim de correlacioná-los com suas respectivas perdas e estabelecer uma avaliação dos seus comportamentos de fragmentação. Desse modo, selecionou-se sete alcaloides purificados pertencentes ao banco interno do grupo de pesquisa MMSRG e seus respectivos espectros de MS/MS foram analisados.

Os alcaloides selecionados possuem substituintes comuns dos aporfínicos, como metoxilas vicinais ou ponte metilenodioxí presentes nas posições C2-C3 do anel A, bem como presença de hidroxila ou metoxila na posição C-11 do anel D (Figura 22).

Carnevale Neto e seus colaboradores (2020) realizaram um estudo com dez alcaloides 7,7-dimetilaporfínicos e por meio do mapa de potencial eletrostático molecular (MEP) e cálculos da teoria do funcional da densidade (TFD), apontaram o nitrogênio heterocíclico como o átomo ligeiramente mais favorável para a protonação. Esses dados são corroborados avaliando-se outras classes de aporfínicos, indicando que o nitrogênio protonado distribui de forma mais eficaz a carga em torno da molécula, gerando um cátion mais estável (SILVA *et al.*, 2016).

O espectro de MS/MS do composto **H-1** (m/z 294) evidenciou o íon molecular de m/z 261, supondo-se tratar da perda sequencial de 17 Da ($-NH_3$) e 16 Da ($-CH_4$), provenientes da clivagem indutiva do grupo amino heterocíclico e de um rearranjo das duas metilas no C-7 (Figura 23). A clivagem indutiva com retenção de carga do grupo amino geraria a formação de um carbocátion secundário cíclico, que pode ser estabilizado por rearranjo 1,3 de hidreto, levando a uma molécula mais estável. Em seguida, a perda sequencial de formaldeído (-30 Da; CH_2O) leva a formação de um epóxi, concomitante a eliminação de monóxido de carbono (28 Da, CO). Essas clivagens indutivas observadas em MS^3 e MS^4 foram relatadas em outros aporfínicos, o que resulta em um deslocamento de carga para o anel A aromático, estabilizado por ressonância (QING *et al.*, 2020; STÉVIGNY *et al.*, 2004). A proposta de fragmentação do alcaloide 6,6a-dihidrodemetoxiguadiscina (**H-1**) é apresentada na figura 24.

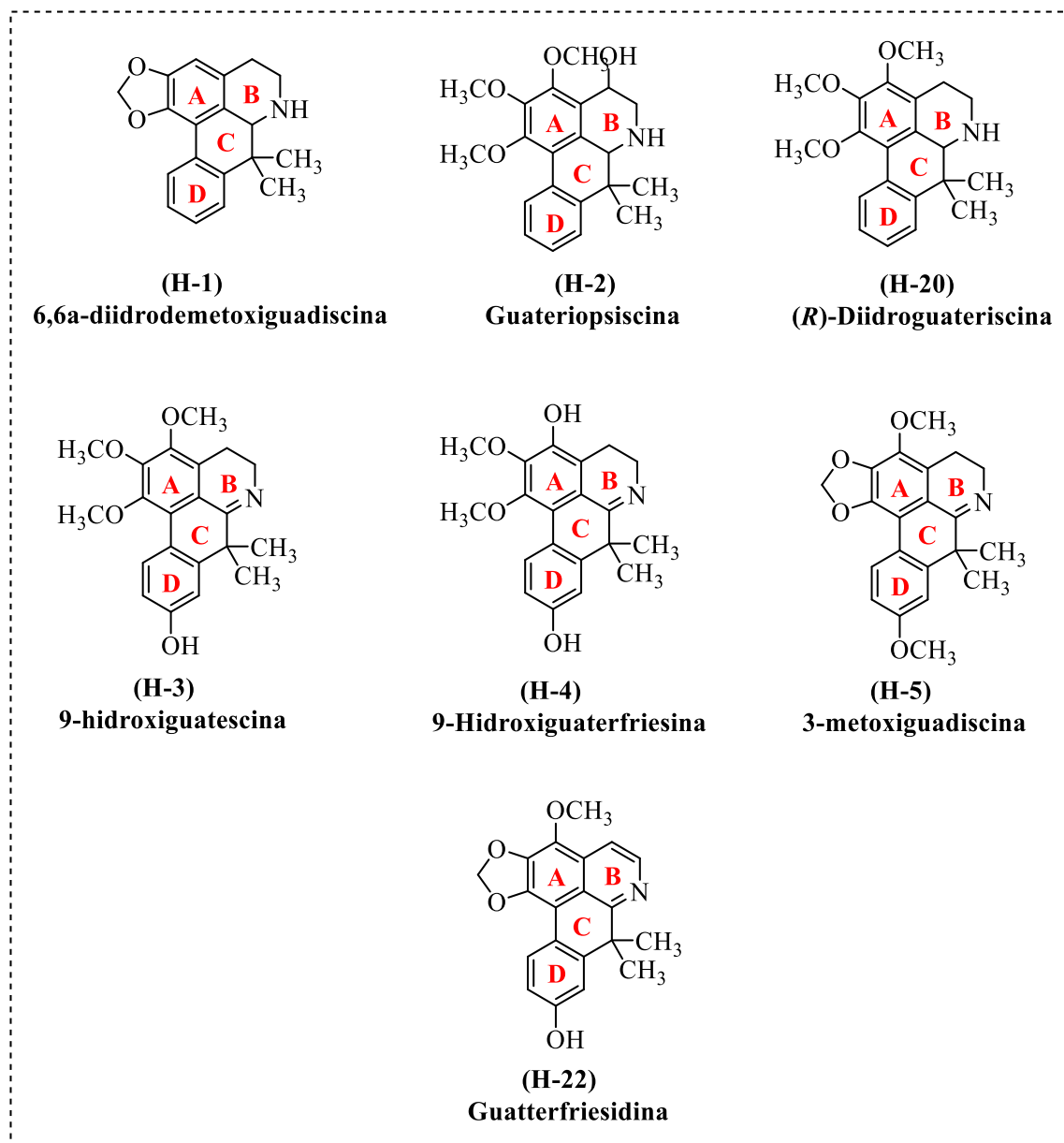


Figura 22: Alcaloides 7,7-dimetilaporfinos analisados por ESI-MS/MS.

Fonte: H-1; H-2 (COSTA *et al.*, 2009); H3-H5 (COSTA *et al.*, 2016); H20-H22 (COSTA *et al.*, 2018).

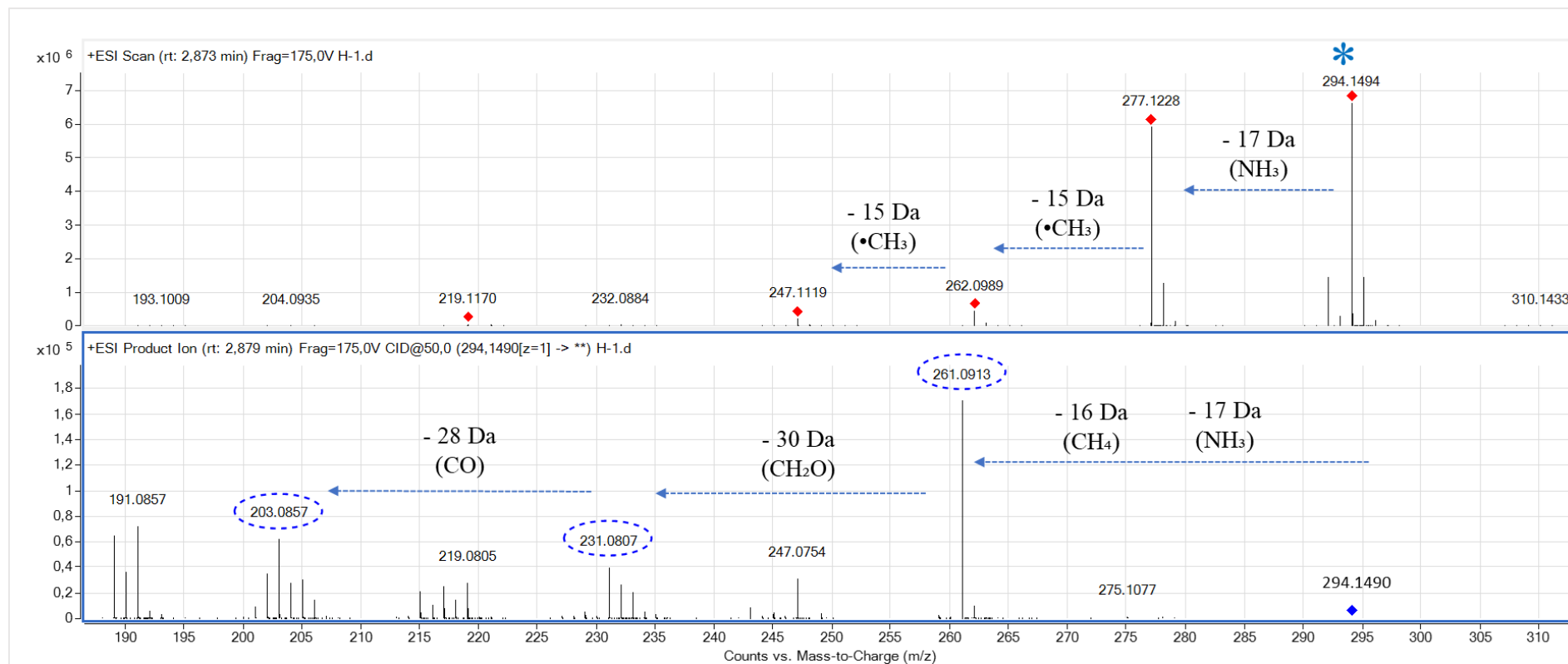


Figura 23: Espectro de massas do alcaloide 6,6a-dihidrodemetoxiguadiscina (**H-1**)

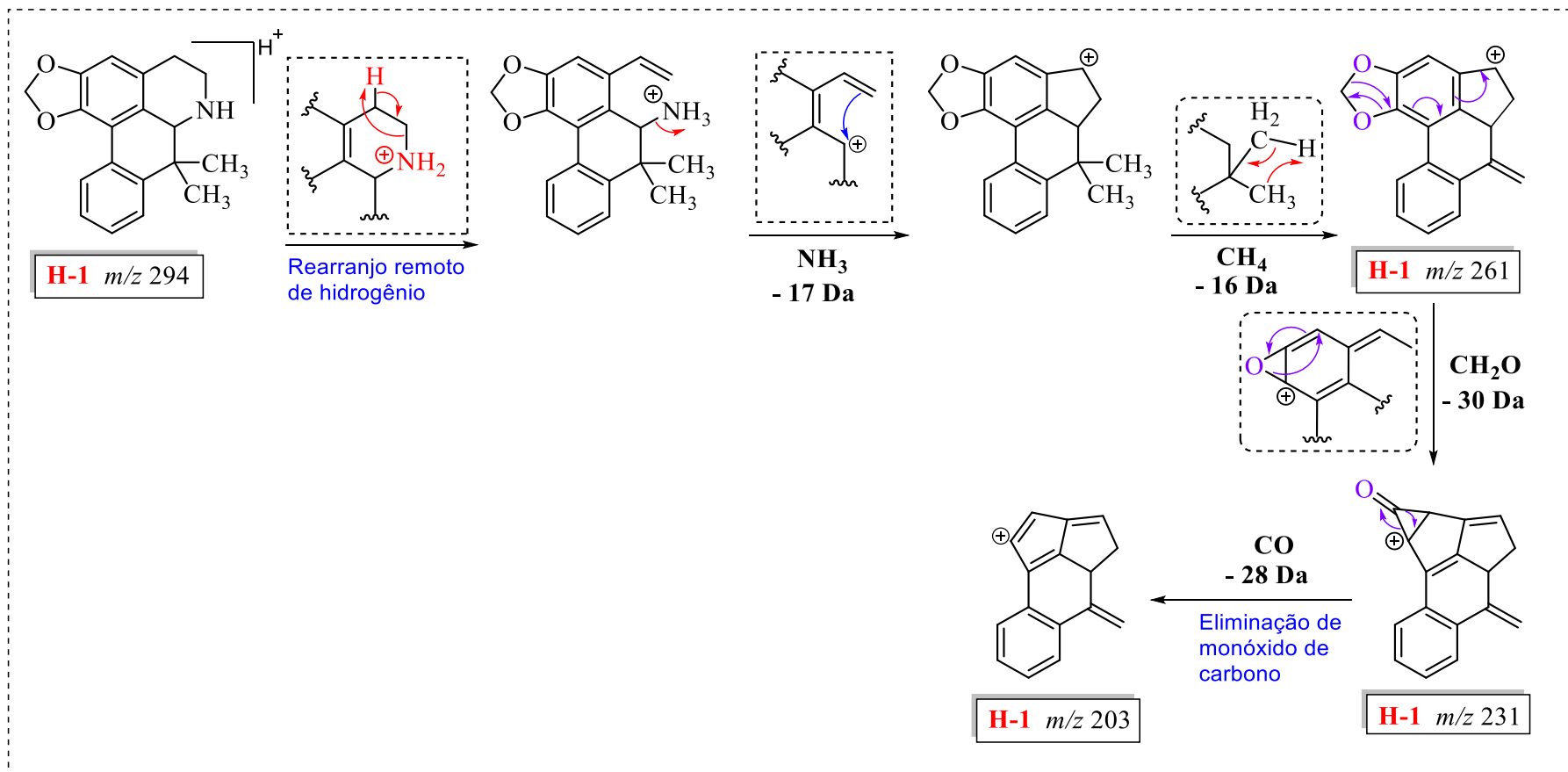


Figura 24: Via de fragmentação proposta para o alcaloide 6,6a-dihidrodemetoxiguadiscina (**H-1**)

Assim como para a 6,6a-dihidrodemetoxiguadiscina (**H-1**), a partir da análise dos espectros de MS/MS, notou-se fragmentações semelhantes para os compostos guateriopsiscina (**H-2**) e (*R*)-diidroguateriscina (**H-20**), corroborando a ideia de uma fragmentação sequencial comum para esses alcaloides. Para **H-2** (m/z 356) foi observado o íon fragmento m/z 291, supondo-se tratar das perdas do grupo amino (17 Da; NH_3); perda de 18 Da ($-\text{H}_2\text{O}$) associado ao possível rearranjo remoto de hidrogênio entre o substituinte hidroxila do C-4 e hidrogênio do C-5, e por fim, duas perdas radiculares de metila (15 Da, $\bullet\text{CH}_3$) (Figura 25). Em seguida, notou-se perda de 16 Da, pressupondo-se tratar do rearranjo das duas metilas em C-7 com saída do grupo metano (m/z 275). Os demais íons fragmentos sugerem perda radicalar de metila (m/z 260), concomitante a perda de monóxido de carbono (m/z 232)

O composto **H-20** apresenta grupos substituintes semelhantes a **H-2**, esperando-se ocorrer fragmentações semelhantes (Figura 27). Notou-se que ambos perdem seus grupos nitrogenados e posteriores fragmentações de radical metila, alternando-se apenas a ordem de perda de 16 Da, associado à saída do grupo metano. A presença de íons radiculares foram observadas em estudos de fragmentação com compostos aromáticos heterocíclicos e quinonas ionizados por eletropulverização (IE), no qual a estabilização do elétron desemparelhado ocorre por ressonância (VESSECCHI *et al.*, 2007).

A proposta de fragmentação dos alcaloides guateriopsiscina (**H-2**) e (*R*)-diidroguateriscina (**H-20**) são apresentadas nas figuras 26 e 28, respectivamente.

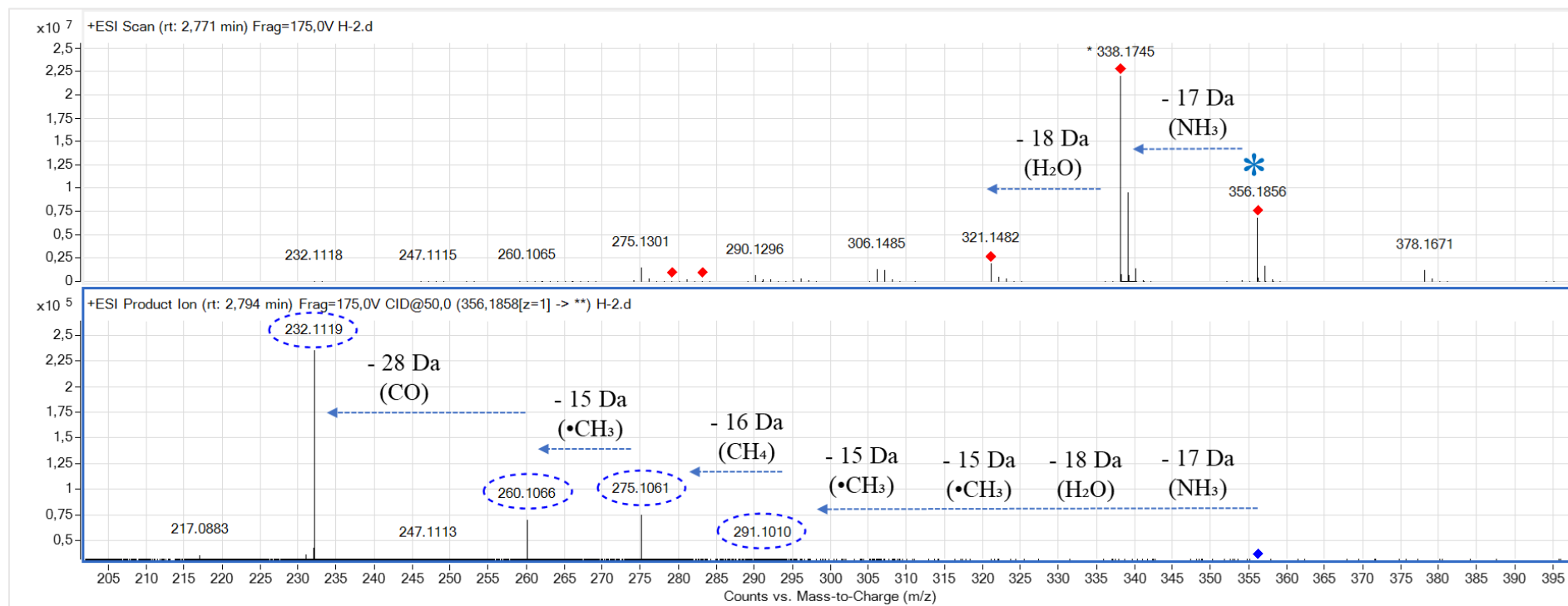


Figura 25: Espectro de massas do alcaloide guateriopsiscina (**H-2**)

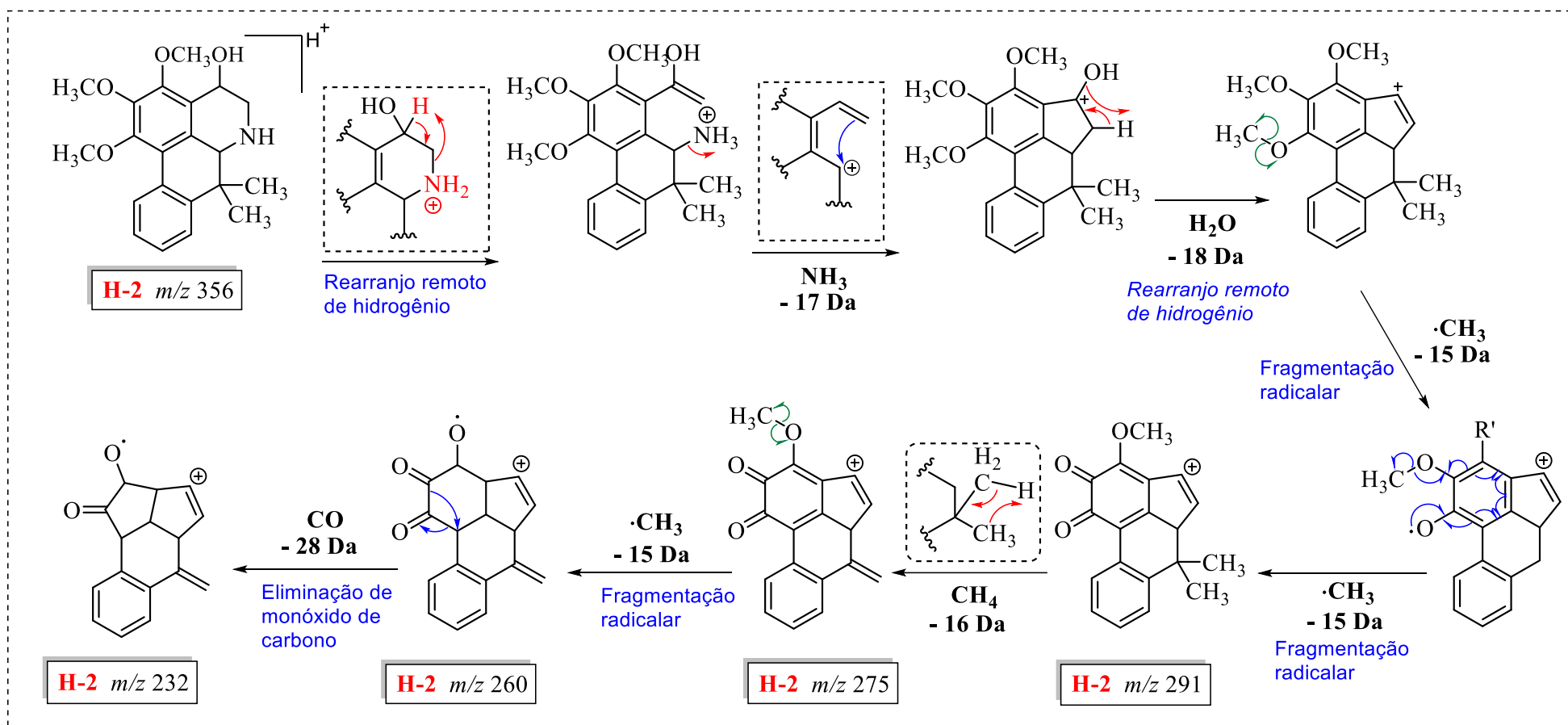


Figura 26: Via de fragmentação proposta para o alcaloide guateriopsiscina (**H-2**).

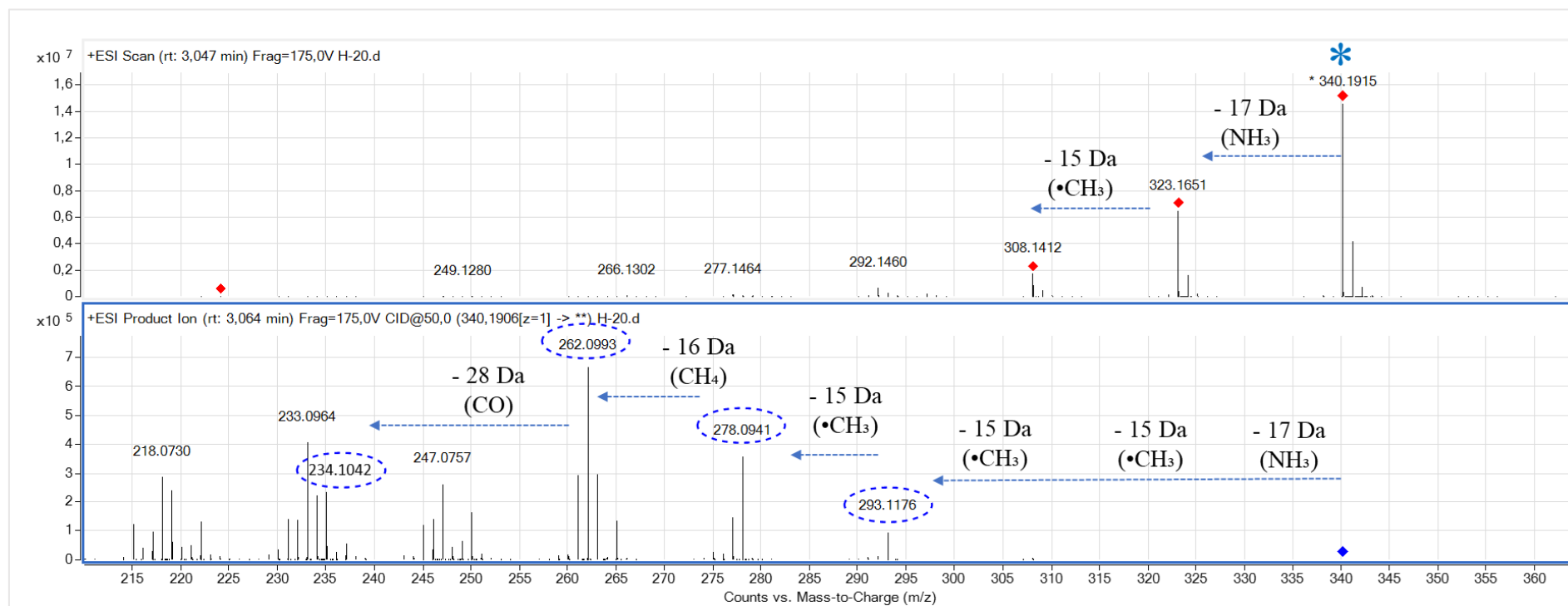


Figura 27: Espectro de massas do alcaloide (R)-Diidroguateriscina (H-20)

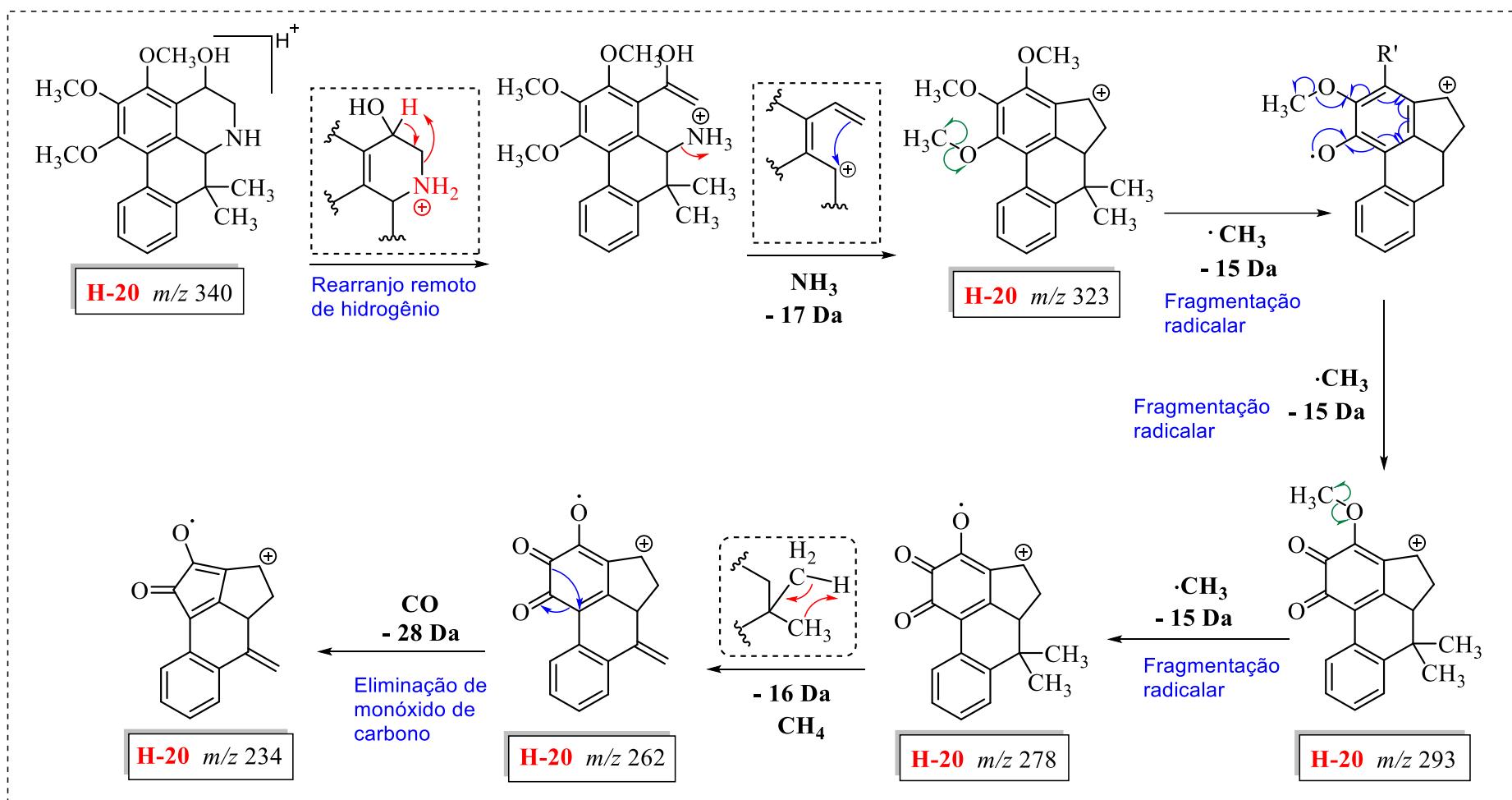


Figura 28: Via de fragmentação proposta para o alcaloide (R)-Diidroguateriscina (H-20)

Os compostos **H-3**, **H-4**, **H-5** e **H-22** apresentaram semelhança entre suas fragmentações, como a ausência da clivagem do grupo amino e perdas consecutivas de $\bullet\text{CH}_3$. Essa observação é condizente ao estudo de Carnevale Neto e seus colaboradores (2020), que revelaram que os derivados 7,7-dimetil que possuem insaturações no anel B exibem a perda radicalar de metila $[\text{M}+\text{H}-15]^+$ como íon produto principal, independentemente dos substituintes periféricos da porção isoquinolina.

A partir da análise dos espectros de MS/MS dos alcaloides 9-hidroxi guatescina (**H-3**) e 9-hidroxi guaterfriesina (**H-4**), observou-se sucessivas perdas radicalares de metila (-15 Da), associada primeiramente a clivagem homolítica em C-7. As demais perdas foram incontestavelmente provenientes das metoxilas adjacentes no anel A, inseridas nos C-1, C-2 e C-3 para **H-3** (Figura 29), e em C1 e C-2 para **H-4** (Figura 31). Após as três fragmentações radicalares consecutivas, foi evidenciada perda de monóxido de carbono (28 Da). Outros íons apontam uma segunda via no qual é deduzida percas de radical metóxi (31 Da), porém em baixa abundância.

A proposta de fragmentação do composto **H-3** e **H-4** são apresentadas na figura 30 e 32, respectivamente.

A análise dos espectros de MS/MS dos alcaloides 3-metoxiguadiscina (**H-5**) e guaterfriesidina (**H-22**) revelou mesmo mecanismo de fragmentação dos alcaloides **H-3** e **H-4**. Por apresentarem ponte metilenodioxí adjacente no anel A, os íons fragmentos resultantes da perda de 30 Da e 28 Da foram associados a abertura da ponte metilenodioxí levando a formação de grupo epóxi, seguida de eliminação de monóxido de carbono. Essas fragmentações apontam que as mesmas fragmentações observadas em outras classes de aporfinos também ocorrem nesse grupo, facilitando a sua identificação e a sua desreplicação. Os espectros de fragmentação e via de mecanismo proposta para o composto **H-5** pode ser consultado nas figuras 61 e 62 dos apêndices, respectivamente. Para o composto **H-22**, nas figuras 63 e 64 dos apêndices.

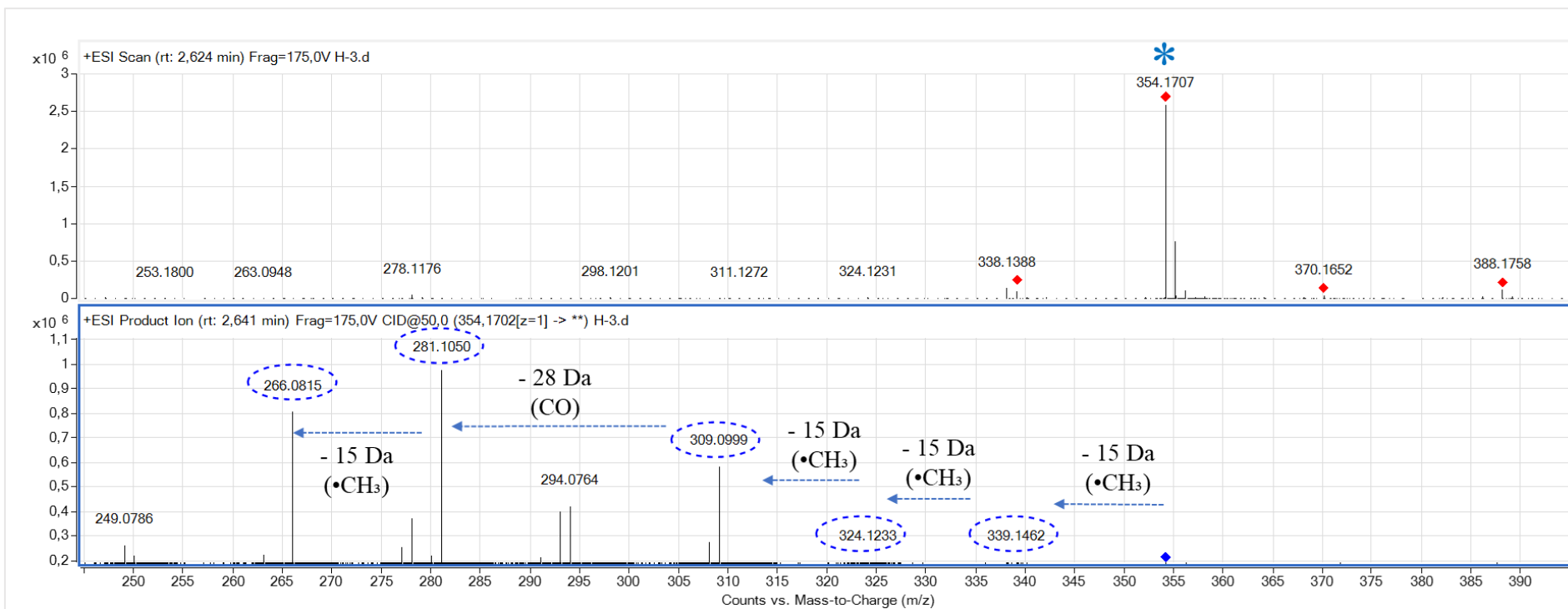


Figura 29: Espectro de massas do alcaloide 9-hidroxi-guatescina (**H-3**).

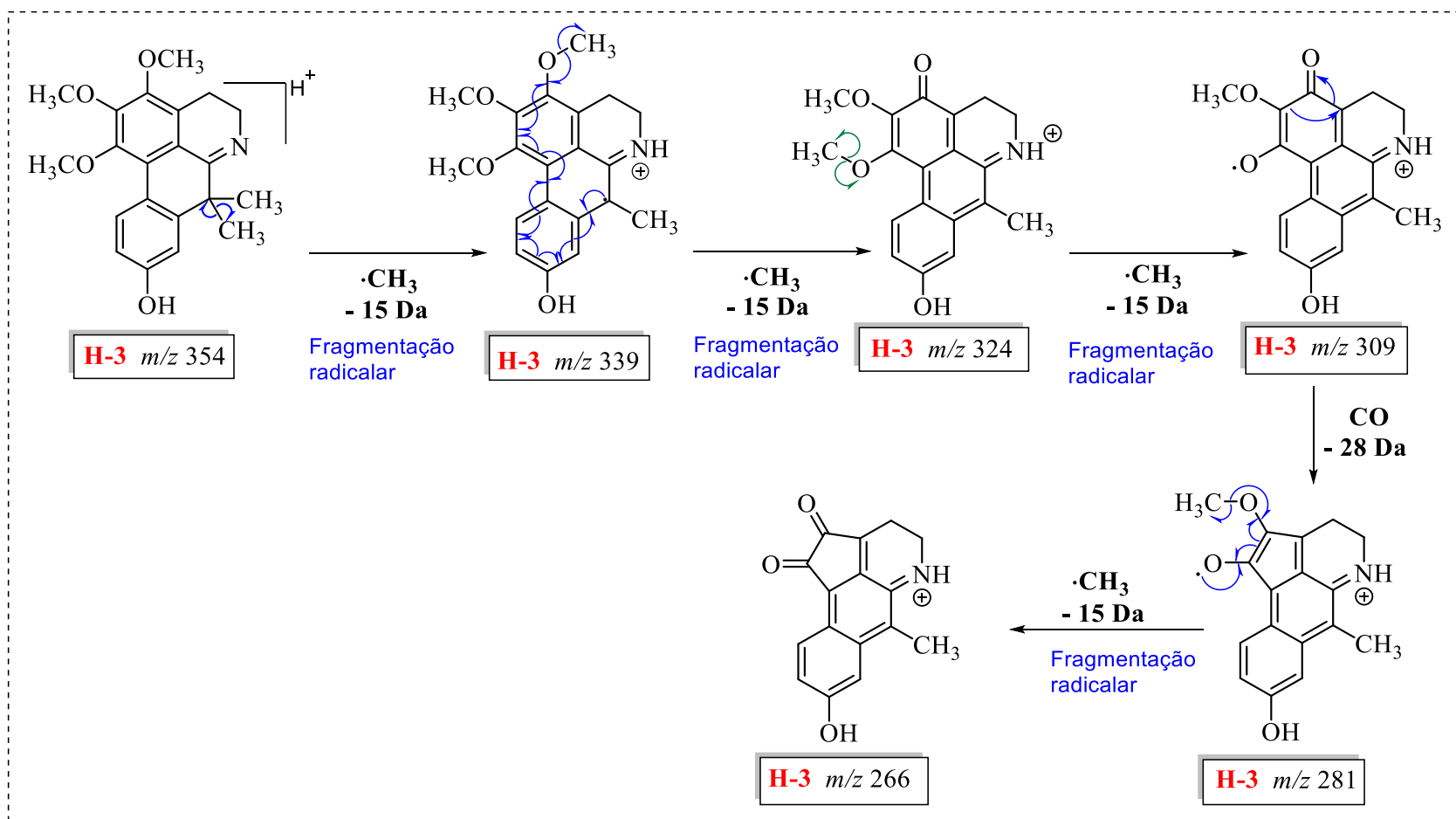


Figura 30: Proposta de fragmentação para o alcaloide 9-hidroxiguatescina (H-3).

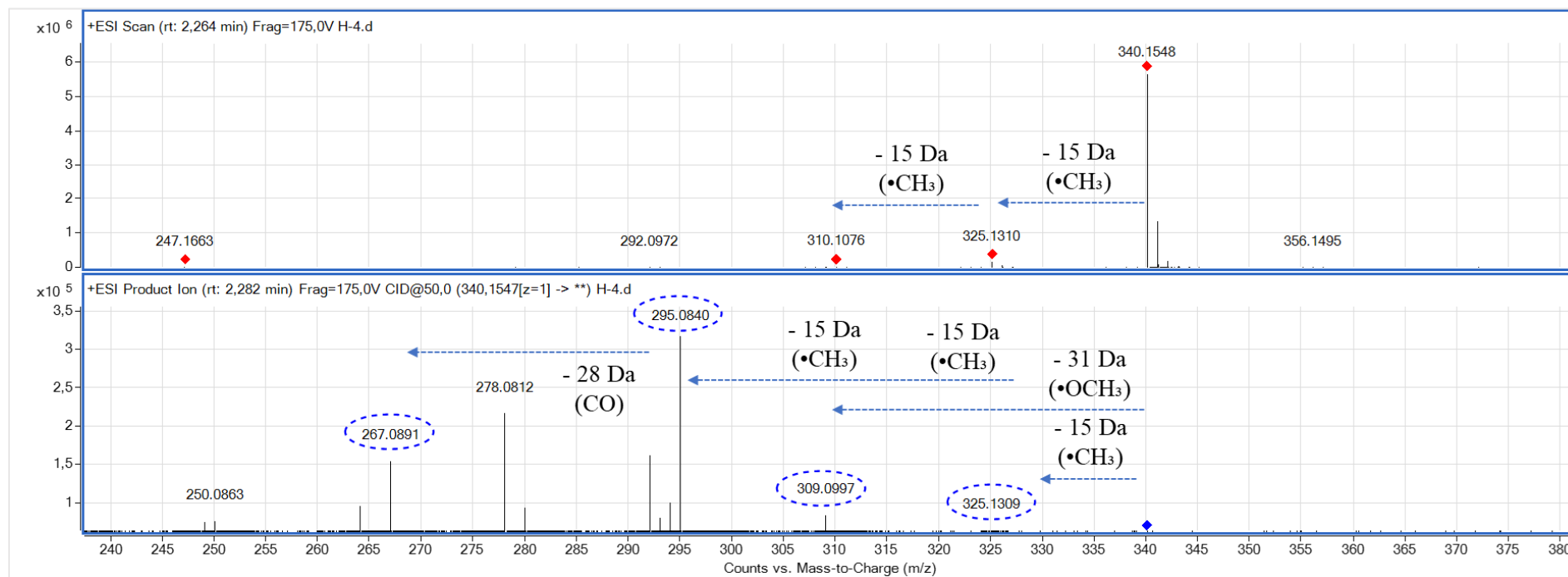


Figura 31: Espectro de massas do alcaloide 9-hidroxiuguaterfriesina (**H-4**).

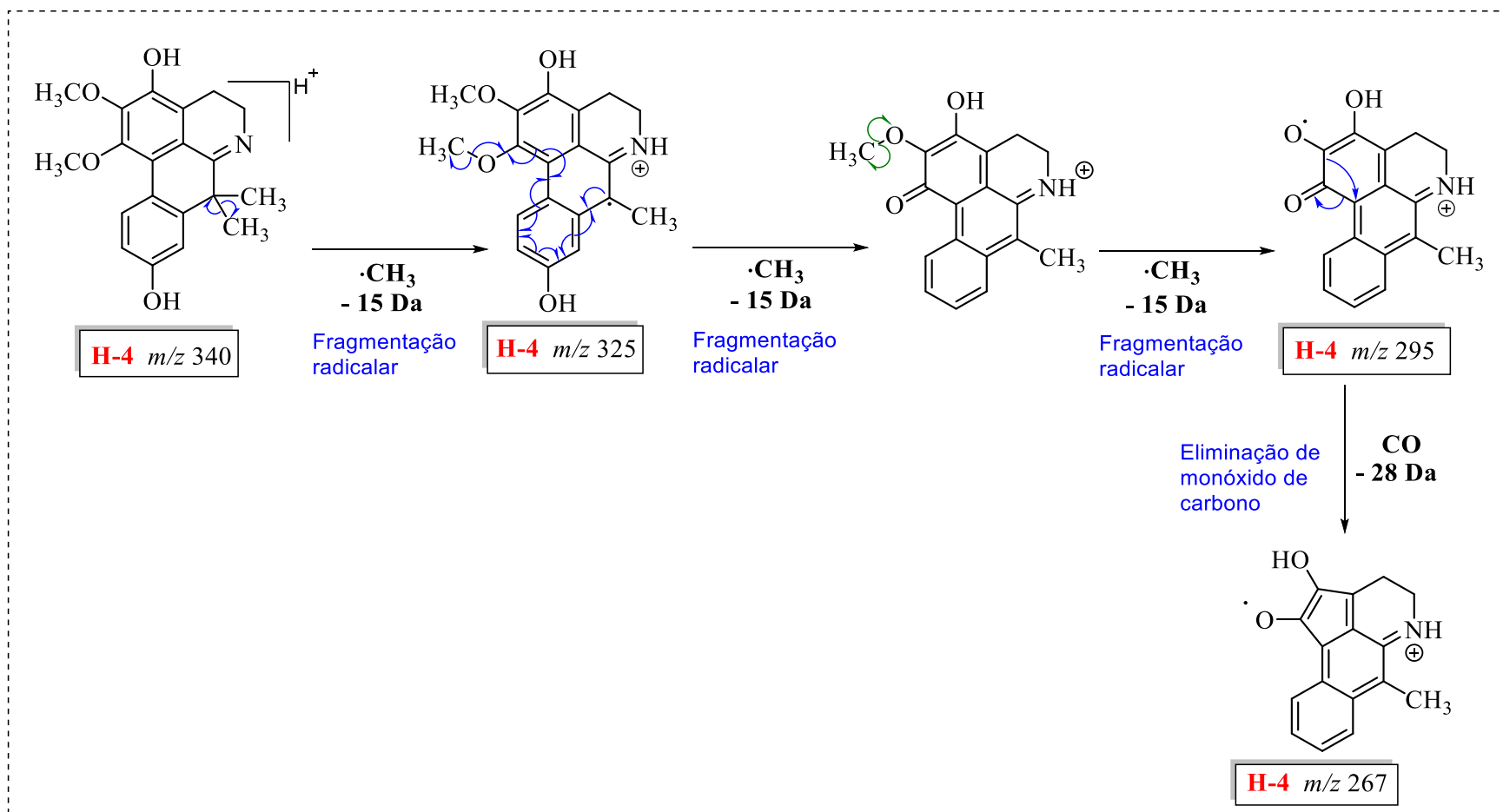


Figura 32: Proposta de fragmentação para o alcaloide 9-hidroxiwaterfriesina (**H-4**).

CONCLUSÃO

Este estudo consistiu em um fluxo de trabalho por meio da técnica de LC-MS/MS e redes moleculares visando explorar a composição alcaloídica do extrato metanólico de seis espécies de Annonaceae encontradas na Região Amazônica, bem como avaliar o perfil de fragmentação de alcaloides da classe dos 7,7-dimetilaporfinos.

O estudo de investigação química com as anonáceas amazônicas resultou na anotação de 60 alcaloides isoquinolinos, distribuídas nas classes dos aporfinos (25), oxoaporfinos (6), benziltetraidroisoquinolinos (12), fenantrenos (4), tetraidroprotoberberinos (5), protoberberinos (6), protopinas (1) e di-hidrobenzofenantridinas (1). Mediante o processo de desreplicação realizado, comprovou-se que as espécies *G. olivacea* e *E. amazonicus* compuseram as frações mais ricas em alcaloides, com 26 e 23 compostos anotados, respectivamente. Adicionalmente, a espécie *E. amazonicus* destaca-se juntamente a *D. calycina* e *P. leiophylla* pelos indícios de 21, 11 e 12 contribuições inéditas as suas espécies, respectivamente.

A partir das análises e vias de fragmentação dos alcaloides 7,7-dimetilaporfinos, observou-se que derivados sem insaturações no anel B apresentaram perdas características de outros isoquinolinos, porém, a eliminação de metano (CH_4) foi comumente evidenciada para este grupo. Adicionalmente, corroborou-se a perda de radical metila como clivagem característica para derivados 7,7-dimetil com insaturação do anel B. As vias de fragmentação propostas surgem como contribuições para identificação desta classe em estudos preliminares por ESI-MS/MS.

Tendo em vista a relevância das investigações com espécies do bioma Amazônico por meio de técnicas hífenas e de bioinformáticas, este estudo apresenta contribuições fitoquímicas para a família Annonaceae, visto que muitos compostos desreplicados possuem atividades biológicas significativas comprovadas, indicando as espécies trabalhadas como potenciais fontes de produtos naturais bioativos e sugerindo a continuação das investigações por meio de futuros ensaios biológicos. Além disso, demonstrou a utilidade da espectrometria de massas como uma ferramenta poderosa na triagem de alcaloides presentes em matrizes vegetais e somando a isto, contribuiu-se com propostas de fragmentação que podem ser utilizadas para a caracterização dos metabolitos anotados e seus derivados em outros estudos fitoquímicos preliminares por LC-MS/MS, fomentando os bancos de dados sobre Annonaceae.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADRIÃO, Asenate Aline Xavier. Investigações Farmacológicas *in vitro* e *in silico* e Análise Química de Alcalóides por LC-MS/MS de Plantas Amazônicas. 2020. 103 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2020
- AGNÈS, S. A. et al. Implementation of a MS/MS database for isoquinoline alkaloids and other annonaceous metabolites. **Scientific Data**, v. 9, n. 1, p. 270, 6 dez. 2022.
- AL KAZMAN, B. S. M.; HARNETT, J. E.; HANRAHAN, J. R. Traditional Uses, Phytochemistry and Pharmacological Activities of Annonaceae. **Molecules**, v. 27, n. 11, p. 3462, 27 maio 2022.
- ALCÂNTARA, J. M. et al. Chemical composition and bactericidal activity of the essential oils of four species of annonaceae growing in brazilian amazon. **Natural Product Communications**, v. 12, n. 4, p. 619–622, 2017.
- ALENCAR, Danielle Cardoso de. Perfil alcaloídico de Anonáceas do campus da UFAM e estudo fitoquímico e biológico de *Ephedranthus amazonicus* R. E. Fries (Annonaceae). 2010. 139f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2010.
- ARON, A. T. et al. Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. **Nature Protocols**, v. 15, n. 6, p. 1954–1991, 2020.
- AVULA, B. et al. Targeted and non-targeted analysis of annonaceous alkaloids and acetogenins from *Asimina* and *Annona* species using UHPLC-QToF-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 159, p. 548–566, 2018.
- BOYOM, F. F. et al. Composition and anti-plasmodial activities of essential oils from some Cameroonian medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 64, n. 7, p. 1269–1275, dez. 2003.
- BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. Mossoró, RN: ESAM, 1976. v. 315
- BRITO, M. T. et al. Antitumor activity and toxicity of volatile oil from the leaves of *Annona leptopetala*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, n. 5, p. 602–609, 2018.
- BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 12, p. 2141–2153, 2004.
- CARNEVALE NETO, F. et al. Characterization of aporphine alkaloids by electrospray ionization tandem mass spectrometry and density functional theory calculations. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 34, n. S3, p. 1–11, 2020.
- CASCAES, M. M. et al. Essential oils from annonaceae species from brazil: A systematic review of their phytochemistry, and biological activities. **International Journal of**

Molecular Sciences, v. 22, n. 22, 2021.

CASTEDO, L.; TOJO, G. Phenanthrene Alkaloids. In: **Alkaloids: Chemistry and Pharmacology**. [s.l: s.n.]. v. 39p. 99–138.

CHATROU, L. W. et al. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 169, n. 1, p. 5–40, 2012.

CONCEIÇÃO, R. S. et al. Rapid structural characterisation of benzyloquinoline and aporphine alkaloids from *Ocotea spixiana* acaricide extract by HPTLC-DESI-MSn. **Phytochemical Analysis**, v. 31, n. 6, p. 711–721, 2020.

COSTA, E. V. et al. Chemical composition of the essential oils of *Annona pickelii* and *Annona salzmannii* (Annonaceae), and their antitumour and trypanocidal activities. **Natural Product Research**, v. 27, n. 11, p. 997–1001, 2013.

COSTA, R. G. A. et al. In vitro and in vivo growth inhibition of human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells by *Guatteria megalophylla* Diels (Annonaceae) leaf essential oil. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 122, n. November 2019, p. 109713, 2020.

COSTA, E. V. et al. 7,7-Dimethylaporphine Alkaloids from the Stem of *Guatteria friesiana*. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 8, p. 1516–1519, 28 ago. 2009.

COSTA, E. V. et al. 7,7-Dimethylaporphine and Other Alkaloids from the Bark of *Guatteria friesiana*. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 6, p. 1524–1531, 2016.

COSTA, E. V. et al. Guaianolide sesquiterpene lactones and aporphine alkaloids from the stem bark of *Guatteria friesiana*. **Phytochemistry**, v. 145, p. 18–25, 2018.

COSTA, E. V. et al. Benzylated dihydroflavones and isoquinoline-derived alkaloids from the bark of *Diclinanona calycina* (Annonaceae) and their cytotoxicities. **Molecules**, v. 26, n. 12, p. 1–13, 2021.

DA SILVA, E. A. A. et al. Germination ecophysiology of *Annona crassiflora* seeds. **Annals of Botany**, v. 99, n. 5, p. 823–830, 2007.

DA SILVA, F. M. A. et al. Phytochemical Study of the Alkaloidal Fractions of *Unonopsis duckei* R. E. Fr. Guided by Electrospray Ionisation Ion-trap Tandem Mass Spectrometry. **Phytochemical Analysis**, v. 25, n. 1, p. 45–49, jan. 2013.

DA SILVA, F. M. A. et al. Polycarpol in *Unonopsis*, *Bocageopsis* and *Onychopetalum* Amazonian species: Chemosystematical implications and antimicrobial evaluation. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 1, p. 11–15, 2015.

DA SILVA, F. M. A. et al. Chemotaxonomy of the Amazonian *Unonopsis* species based on leaf alkaloid fingerprint direct infusion ESI-MS and chemometric analysis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 3, p. 599–604, 2016.

DA SILVA, F. M. A. et al. Positive electrospray ionization ion trap mass spectrometry and ab initio computational studies of the multi-pathway fragmentation of oxoaporphine alkaloids. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 418, p. 30–36, 2017.

DA SILVA, F. M. A. et al. Morphinadienone and other isoquinoline-derived alkaloids from the trunk bark of *Unonopsis floribunda* Diels (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 79, n. April, p. 12–14, 2018.

DANTAS, E. et al. Dereplication of Aporphine Alkaloids by UHPLC-HR-ESI-MS/MS and NMR from *Duguetia lanceolata* St.-Hil (Annonaceae) and Antiparasitic Activity Evaluation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 9, p. 1908–1916, 2020.

DAVIES, J.; RYAN, K. S. Introducing the parvome: Bioactive compounds in the microbial world. **ACS Chemical Biology**, v. 7, n. 2, p. 252–259, 2012.

DE LIMA, B. R. et al. Integrative approach based on leaf spray mass spectrometry, HPLC-DAD-MS/MS, and NMR for comprehensive characterization of isoquinoline-derived alkaloids in leaves of *Onychopetalum amazonicum* R. E. Fr. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 1, p. 79–89, 2020.

DE MORAES, M. R. et al. Phenolic Compounds and Metals in Some Edible Annonaceae Fruits. **Biological Trace Element Research**, v. 197, n. 2, p. 676–682, 2020.

DE SOUSA, F. D. M. et al. Dereplication and Isolation of Larvicidal Compounds From Annonaceae Species Against *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 30, n. 1, p. 123–126, 2020.

DE SOUZA ARAÚJO, M. et al. Isoquinoline-derived alkaloids from the bark of *Guatteria olivacea* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 92, n. June, p. 104105, out. 2020.

DE SOUZA, C. et al. Asarone-derived phenylpropanoids and isoquinoline-derived alkaloids from the bark of *Duguetia pycnastera* (annonaceae) and their cytotoxicities. **Química Nova**, v. 43, n. 10, p. 1397–1403, 2020.

DEMARQUE, D. P. et al. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 3, p. 432–455, 2016.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3rd Editio ed. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd., 2009.

DHYANI, P. et al. Anticancer potential of alkaloids: a key emphasis to colchicine, vinblastine, vincristine, vindesine, vinorelbine and vincamine. **Cancer Cell International**, v. 22, n. 1, p. 1–20, 2022.

ERNST, M. et al. Mass spectrometry in plant metabolomics strategies: from analytical

platforms to data acquisition and processing. **Natural Product Reports**, v. 31, n. 6, p. 784, 2014.

FEITOSA, C. M. et al. Annonaceae Species: A Perspective For Developing Phytomedicines for Alzheimer's Disease. In: BHATTACHARJEE, A.; RAMAKRISHNA, A.; OBULESU, M. (Eds.). . **Phytomedicine and Alzheimer's Disease**. first ed. [s.l.] CRC Press, 2021. p. 1–9.

FRAUSIN, G. et al. Plants of the Annonaceae traditionally used as antimalarials: a review. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. spe1, p. 315–337, 2014.

GARAGOUNIS, C.; DELKIS, N.; PAPADOPOULOU, K. K. Unraveling the roles of plant specialized metabolites: using synthetic biology to design molecular biosensors. **New Phytologist**, v. 231, n. 4, p. 1338–1352, 2021.

GOMES, P. et al. Feature-based molecular network-guided dereplication of natural bioactive products from leaves of *Stryphnodendron pulcherrimum* (Willd.) hochr. **Metabolites**, v. 11, n. 5, 2021.

GONTIJO, D. C. et al. Phytochemistry and antiplasmodial activity of *Xylopia sericea* leaves. **Natural Product Research**, v. 34, n. 24, p. 3526–3530, 2020.

GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R. et al. Alkaloids and acetogenins in Annonaceae development: biological considerations. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. spe1, p. 01–16, 2014.

GREBNER, D. L. et al. Forest regions of the world. In: **Introduction to Forestry and Natural Resources**. [s.l.] Elsevier, 2022. p. 21–79.

GRENAND, P. et al. **Pharmacopées traditionnelles en Guyane : Créoles, Palikur, Wayãpi**. Paris: IRD éditions, 2004.

HISHAM, A. et al. Epoxymurins A and B, two biogenetic precursors of annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. **Tetrahedron**, v. 49, n. 31, p. 6913–6920, 1993.

I.P.N.I - Índice Internacional de Nomes de Plantas. The Royal Botanic Gardens, Kew, Harvard University Herbaria & Libraries e Australian National Botanic Gardens, 2021. Disponível em: <<http://www.ipni.org>>. Acessado em: 24 de mai. de 2021.

JOLAD, S. D. et al. Uvaricin, a New Antitumor Agent from *Uvaria accuminata* (Annonaceae). **Journal of Organic Chemistry**, v. 47, n. 16, p. 3151–3153, 1982.

JOSSANG, A. et al. Alcaloïdes des Annonacées, 96. Déhydroxylopine et Déhydrocorytenchine, Nouveaux Alcaloïdes Isoquinoléiques Isolés de *Xylopia vieillardii*. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 2, p. 466–472, 1 mar. 1991.

JÜRGENS, A.; WEBBER, A. C.; GOTTSBERGER, G. Floral scent compounds of Amazonian Annonaceae species pollinated by small beetles and thrips. **Phytochemistry**, v.

55, n. 6, p. 551–558, 2000.

KUO, R. et al. Antiplatelet activity of N-methoxycarbonyl aporphines from *Rollinia mucosa*. **Phytochemistry**, v. 57, n. 3, p. 421–425, jun. 2001.

LEÃO, T. F. et al. Quick-start infrastructure for untargeted metabolomics analysis in GNPS. **Nature Metabolism**, v. 3, n. 7, p. 880–882, 2021.

LEBOEUF, M. et al. The phytochemistry of the annonaceae. **Phytochemistry**, v. 21, n. 12, p. 2783–2813, jan. 1980.

LIMA, J. M. et al. LC-HRMS and acetylcholinesterase affinity assay as a workflow for profiling alkaloids in *Annona salzmannii* extract. **Journal of Chromatography B**, v. 1164, p. 122493, fev. 2021.

LIU, J. et al. Genomic and Metabolomic Analysis of the Potato Common Scab Pathogen *Streptomyces scabiei*. **ACS Omega**, v. 6, n. 17, p. 11474–11487, 2021.

LOBÃO, A.Q.; Lopes, J.C.; Erkens, R.H.J.; Mendes-Silva, I.; Pontes Pires, A.F.; Silva, L.V.; Oliveira, M.L.B.; Johnson, D.; Mello-Silva, R. (in memoriam) 2020. *Annonaceae in Flora do Brasil 2020*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil2020.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB110219>>. Acesso em: 16 jun. 2021.

LOPES, J. DE C.; MELLO-SILVA, R. Diversidade e caracterização das Annonaceae do Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. spe1, p. 125–131, 2014.

LÓPEZ-MARTÍN, J. et al. Chromone and phenanthrene alkaloids from *Dennettia tripetala*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, n. 12, p. 1613–1615, 2002.

LÚCIO, A. S. S. C. et al. Alkaloids of the Annonaceae: Occurrence and a Compilation of Their Biological Activities. In: KNÖLKER, H.-J. (Ed.). **Alkaloids: Chemistry and Biology**. [s.l: s.n.]. v. 74p. 233–409.

MA, C. et al. A Review on *Annona squamosa* L.: Phytochemicals and Biological Activities. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 45, n. 05, p. 933–964, 31 jan. 2017.

MAAS, P. J. M. et al. Flora da reserva ducke, amazonas, Brasil: Annonaceae. **Rodriguesia**, v. 58, n. 3, p. 617–662, 2007.

MACHADO, A. R. T. et al. Nematicidal activity of *Annona crassiflora* leaf extract on *Caenorhabditis elegans*. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 4–8, 2015.

MAHIOU, V. et al. New Aporphine Alkaloids from *Guatteria foliosa*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 7, p. 890–895, 1 jul. 1994.

MAHIOU, V. et al. Bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Guatteria boliviana* (Annonaceae). **Phytochemistry**, v. 54, n. 7, p. 709–716, ago. 2000.

MARTINO, E. et al. Vinca alkaloids and analogues as anti-cancer agents: Looking back, peering ahead. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 28, n. 17, p. 2816–2826, 2018.

MOGHADAMTOUSI, S. et al. *Annona muricata* (Annonaceae): A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 7, p. 15625–15658, 10 jul. 2015.

MOURA, A. P. G. et al. Essential oil from fruit of *Xylopia langsdorffiana*: antitumour activity and toxicity. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 12, p. 3093–3102, 2016.

MUTHAURA, C. N. et al. Traditional antimalarial phytotherapy remedies used by the Kwale community of the Kenyan Coast. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 377–386, 2007.

NARDELLI, V. B. et al. Isoquinoline-derived alkaloids and one terpene lactone from the leaves of *Duguetia pycnastera* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 94, n. November 2020, p. 23–26, 2021.

NASCIMENTO NETO, Francisco Alberto. Estudo fitoquímico das folhas de *Pseudoxandra leiophylla* (Annonaceae) e investigação do seu efeito citotóxico. 2021. 128 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2021

NESKE, A. et al. Acetogenins from Annonaceae family. Their potential biological applications. **Phytochemistry**, v. 174, n. March, p. 112332, 2020.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020.

NGOUONPE, A. W. et al. Natural products from the medicinal plant *Duguetia staudtii* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 83, n. December 2018, p. 22–25, abr. 2019.

NKUNYA, M. H. H. et al. Antimalarial activity of Tanzanian plants and their active constituents: The genus *Uvaria*. **Planta Medica**, v. 57, n. 4, p. 341–343, 1991.

OGERON, C. et al. Palikur traditional roundwood construction in eastern French Guiana: Ethnobotanical and cultural perspectives. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 14, n. 1, p. 1–18, 2018.

OKPEKON, T. et al. Antiparasitic activities of medicinal plants used in Ivory Coast. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, n. 1, p. 91–97, 2004.

PADMANABHAN, P.; PALIYATH, G. **Annonaceous Fruits**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Ltd., 2015.

PAIVA, A. O. Annonaceae. In: RIOS, M. N. DA S.; PASTORE JÚNIOR, F. (Eds.). . **Plantas da Amazônia: 450 espécies de uso geral**. [s.l: s.n.]. p. 1691.

PARES, R. B. et al. Acaricidal Activity of Annonaceae Plants for *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae) and Metabolomic Profile by HPLC-MS/MS. **Neotropical Entomology**, v. 50, n. 4, p. 662–672, 2021.

PAZ, W. H. P. et al. Structure-Based Molecular Networking for the Target Discovery of Oxahomoaporphine and 8-Oxohomoaporphine Alkaloids from *Duguetia surinamensis*. **Journal of Natural Products**, v. 82, n. 8, p. 2220–2228, 2019.

PAZ, Weider Henrique Pinheiro. Investigação fitoquímica com auxílio de molecular networking e atividade citotóxica de *Duguetia surinamensis* (Annonaceae). 2022. 213 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus (AM), 2021.

PHAM, J. V. et al. A review of the microbial production of bioactive natural products and biologics. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. JUN, p. 1–27, 2019.

PILON, A. et al. Redes moleculares: uma análise sobre anotações e descoberta de novos ativos. **Química Nova**, v. X, n. 00, p. 1–12, 2021.

PRADO, L. G. et al. Antioxidant, antiproliferative and healing properties of araticum (*Annona crassiflora* Mart.) peel and seed. **Food Research International**, v. 133, n. December 2019, p. 109168, 2020.

QING, Z. et al. Investigation of fragmentation behaviours of isoquinoline alkaloids by mass spectrometry combined with computational chemistry. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020.

QING, Z. X. et al. Systematic identification of alkaloids in *Macleaya microcarpa* fruits by liquid chromatography tandem mass spectrometry combined with the isoquinoline alkaloids biosynthetic pathway. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 103, p. 26–34, 2015.

QUINN, R. A. et al. Molecular Networking As a Drug Discovery, Drug Metabolism, and Precision Medicine Strategy. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 38, n. 2, p. 143–154, 2017.

RIBEIRO, J. E. L. S. et al. Annonaceae. In: RIBEIRO, J. E. L. S. et al. (Eds.). . **Guia de Identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central**. Manaus: DFID (Departamento for International Development), INPA, 1999. p. 121–135.

RICHARDSON, J. E. et al. Historical biogeography of two cosmopolitan families of flowering plants: Annonaceae and Rhamnaceae. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 359, n. 1450, p. 1495–1508, 2004.

SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil:

taxonomic significance. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 567–573, nov. 2000.

SANTOS, M. DE F. C. et al. Aporphine alkaloids from the stem bark of *Guatteria pogonopus* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 60, p. 106–109, 2015.

SÃO JOSÉ, A. R. et al. Atualidades e perspectivas das Anonáceas no mundo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. spe1, p. 86–93, 2014.

SATALAYA R., J. et al. Actividad antiparasitaria de plantas medicinales de la Amazonía Peruana. **Biofarbo**, v. 17, n. 2, p. 23–31, 2009.

SCHLAGENHAUF, P. et al. The position of mefloquine as a 21st century malaria chemoprophylaxis. **Malaria Journal**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2010.

SCHMID, R. et al. Ion identity molecular networking for mass spectrometry-based metabolomics in the GNPS environment. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, 2021.

SCHMIDT, J. et al. Analysis of benzyloquinoline-type alkaloids by electrospray tandem mass spectrometry and atmospheric pressure photoionization. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 11, n. 3, p. 325–333, 2005.

SCHYMANSKI, E. L. et al. Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: Communicating confidence. **Environmental Science and Technology**, v. 48, n. 4, p. 2097–2098, 2014.

SHAMMA, M. The Phenanthrene Alkaloids. In: **The Isoquinoline Alkaloids: Chemistry and Pharmacology**. 1. ed. Cambridge: Academic Press Inc, 1972. v. 1p. 261–264.

SHAMMA, M.; MONIOT, J. L. The Phenanthrenes. In: **Isoquinoline Alkaloids Research 1972–1977**. [s.l.] Springer US, 1978. p. 179–183.

SHANG, X. F. et al. Biologically active isoquinoline alkaloids covering 2014–2018. **Medicinal Research Reviews**, v. 40, n. 6, p. 2212–2289, 2020.

SHANGGUAN, Y. et al. Structural Characterisation of Alkaloids in Leaves and Roots of *Stephania kwangsiensis* by LC-QTOF-MS. **Phytochemical Analysis**, v. 29, n. 1, p. 101–111, 2018.

SHIM, H. J. et al. General fragmentations of alkaloids in electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Mass Spectrometry Letters**, v. 4, n. 4, p. 79–82, 2013.

SIDDIQUI, A. A. et al. Role of natural products in drug discovery process. **International Journal of Drug Development and Research**, v. 6, n. 2, p. 172–204, 2014.

SILVA, F. M. A. DA et al. Chemical constituents from *Salacia impressifolia* (Miers) A. C. Smith collected at the Amazon rainforest. **Biochemical Systematics and Ecology**, p. 77–80, 2016.

SIMÕES, O. C. M. et al. **Farmacognosia - Do produto Natural ao Medicamento**. [s.l.] Artmed, 2019.

SINGH, A. et al. Analysis of isoquinoline alkaloids from *Mahonia leschenaultia* and *Mahonia napaulensis* roots using UHPLC-Orbitrap-MSn and UHPLC-QqQLIT-MS/MS. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 7, n. 2, p. 77–86, 2017.

STÉVIGNY, C. et al. Key fragmentation patterns of aporphine alkaloids by electrospray ionization with multistage mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 18, n. 5, p. 523–528, 2004.

STÉVIGNY, C.; BAILLY, C.; QUETIN-LECLERCQ, J. Cytotoxic and antitumor potentialities of aporphinoid alkaloids. **Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents**, v. 5, n. 2, p. 173–182, 2005.

SUMNER, L. W. et al. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis: Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). **Metabolomics**, v. 3, n. 3, p. 211–221, 2007.

SUN, M. et al. Alkaloid profiling of the traditional Chinese medicine *Rhizoma corydalis* using high performance liquid chromatography-tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 4, n. 3, p. 208–216, 2014.

TATSADJIEU, L. N. et al. Antibacterial and antifungal activity of *Xylopi aethiopica*, *Monodora myristica*, *Zanthoxylum xanthoxyloides* and *Zanthoxylum leprieurii* from Cameroon. **Fitoterapia**, v. 74, n. 5, p. 469–472, 2003.

TAVARES, J. F. et al. Alkaloids and volatile constituents from the stem of *Fusaea longifolia* (Aubl.) Saff. (Annonaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 115–118, 2005.

TIAN, Y.; ZHANG, C.; GUO, M. Comparative study on alkaloids and their anti-proliferative activities from three *Zanthoxylum* species. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 1–16, 2017.

TORRES-VEGA, J. et al. Green Extraction of Alkaloids and Polyphenols from *Peumus boldus* Leaves with Natural Deep Eutectic. **Plants**, v. 9, n. 242, p. 2–17, 2020.

TSABANG, N. et al. Ethnopharmacological survey of Annonaceae medicinal plants used to treat malaria in four areas of Cameroon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 171–180, jan. 2012.

VESSECCHI, R. et al. Radical Ion Generation Processes of Organic Compounds in Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 75–87, 2007.

VILLAS-BÔAS, S. G. et al. Mass spectrometry in metabolome analysis. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 24, n. 5, p. 613–646, 2005.

VINCENTI, F. et al. Molecular Networking: A Useful Tool for the Identification of New Psychoactive Substances in Seizures by LC–HRMS. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, n. November, p. 1–9, 2020.

WANG, J. et al. Artemisinin, the Magic Drug Discovered from Traditional Chinese Medicine. **Engineering**, v. 5, n. 1, p. 32–39, 2019.

WANG, M. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828–837, 2016.

WANG, M. et al. Applying target data screening followed by characteristic fragment filtering for the comprehensive screening and identification of alkaloids in *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang by UPLC-Q-TOF/MS E. **RSC Advances**, v. 7, n. 84, p. 53545–53551, 2017.

WANKE, T. et al. C15 acetogenins from the Laurencia complex: 50 years of research– An overview. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 6, p. 569–587, 2015.

WAR, A. R. et al. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, n. 10, p. 1306–1320, 31 out. 2012.

WATROUS, J. et al. Mass spectral molecular networking of living microbial colonies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 26, 2012.

WFO (2021). Annonaceae Juss. Disponível em: <<http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-70000000031>>. Acessado em: 16 jun. 2021

WILLCOX, M. L.; BODEKER, G. Traditional herbal medicines for malaria. **BMJ**, v. 329, n. 7475, p. 1156–1159, 13 nov. 2004.

WITKOWSKI, S.; WAWER, I. NMR Spectroscopy in Drug and Natural Product Analysis. **Stereoselective Synthesis of Drugs and Natural Products**, p. 1–24, 2013.

WOGUEM, V. et al. Volatile oil from striped African pepper (*Xylopia parviflora*, Annonaceae) possesses notable chemopreventive, anti-inflammatory and antimicrobial potential. **Food Chemistry**, v. 149, p. 183–189, 2014.

WOLFENDER, J. L.; QUEIROZ, E. F.; HOSTETTMANN, K. The importance of hyphenated techniques in the discovery of new lead compounds from nature. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 1, n. 3, p. 237–260, 2006.

XUE, B. et al. Accelerated diversification correlated with functional traits shapes extant diversity of the early divergent angiosperm family Annonaceae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 142, p. 106659, jan. 2020.

YANG, J. Y. et al. Molecular networking as a dereplication strategy. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 9, p. 1686–1699, 2013.

YANG, Y.-L. et al. New e nt -Kaurane Diterpenoids with Anti-Platelet Aggregation Activity from *Annona squamosa*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 10, p. 1462–1467, 1 out. 2002.

ZHANG, A. et al. Modern analytical techniques in metabolomics analysis. **Analyst**, v. 137, n. 2, p. 293–300, 2012.

APÊNDICES

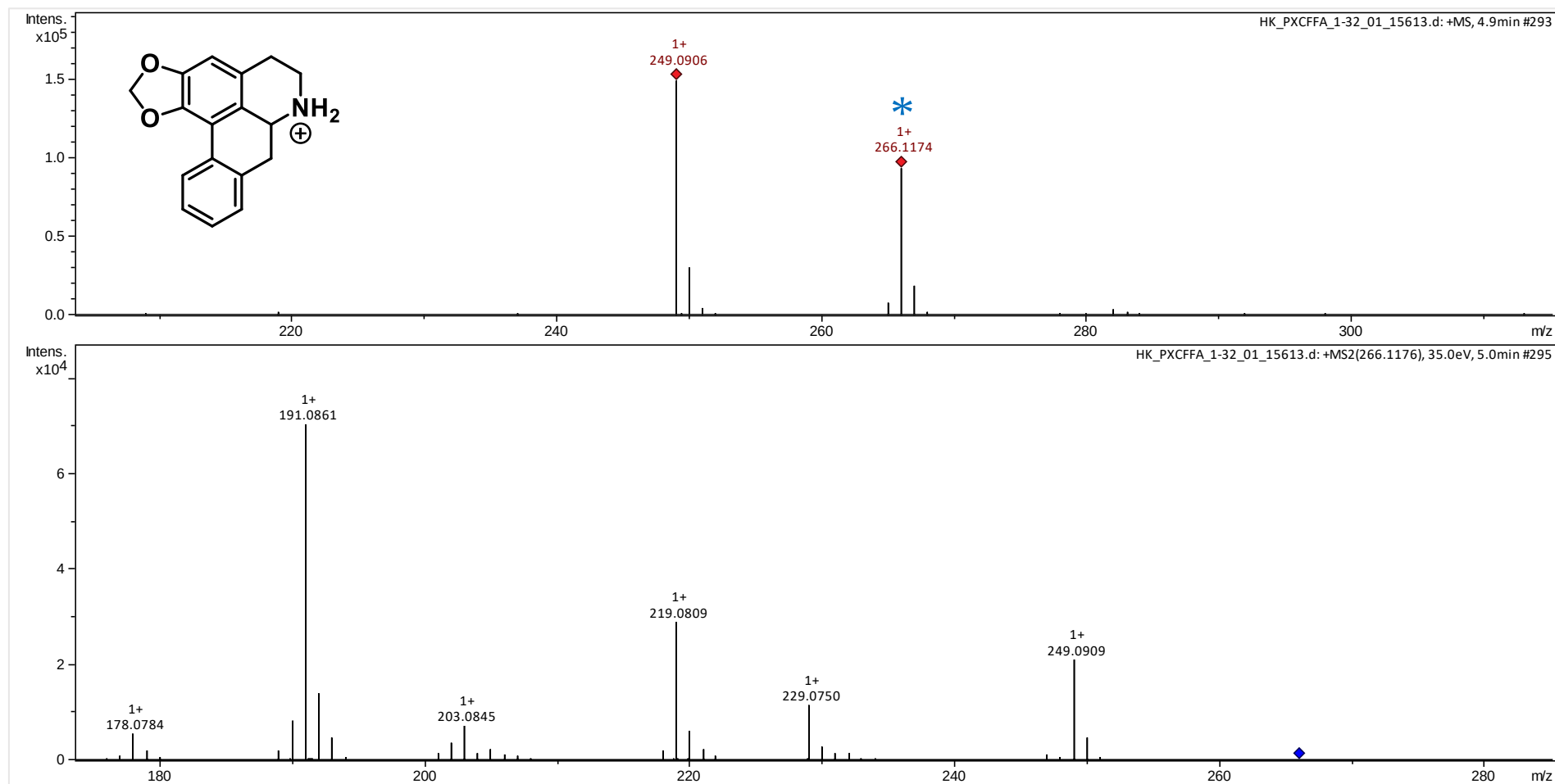


Figura 1 - Espectro de MS e MS/MS do composto anonaina (A1) identificado na espécie *P. leiophylla*

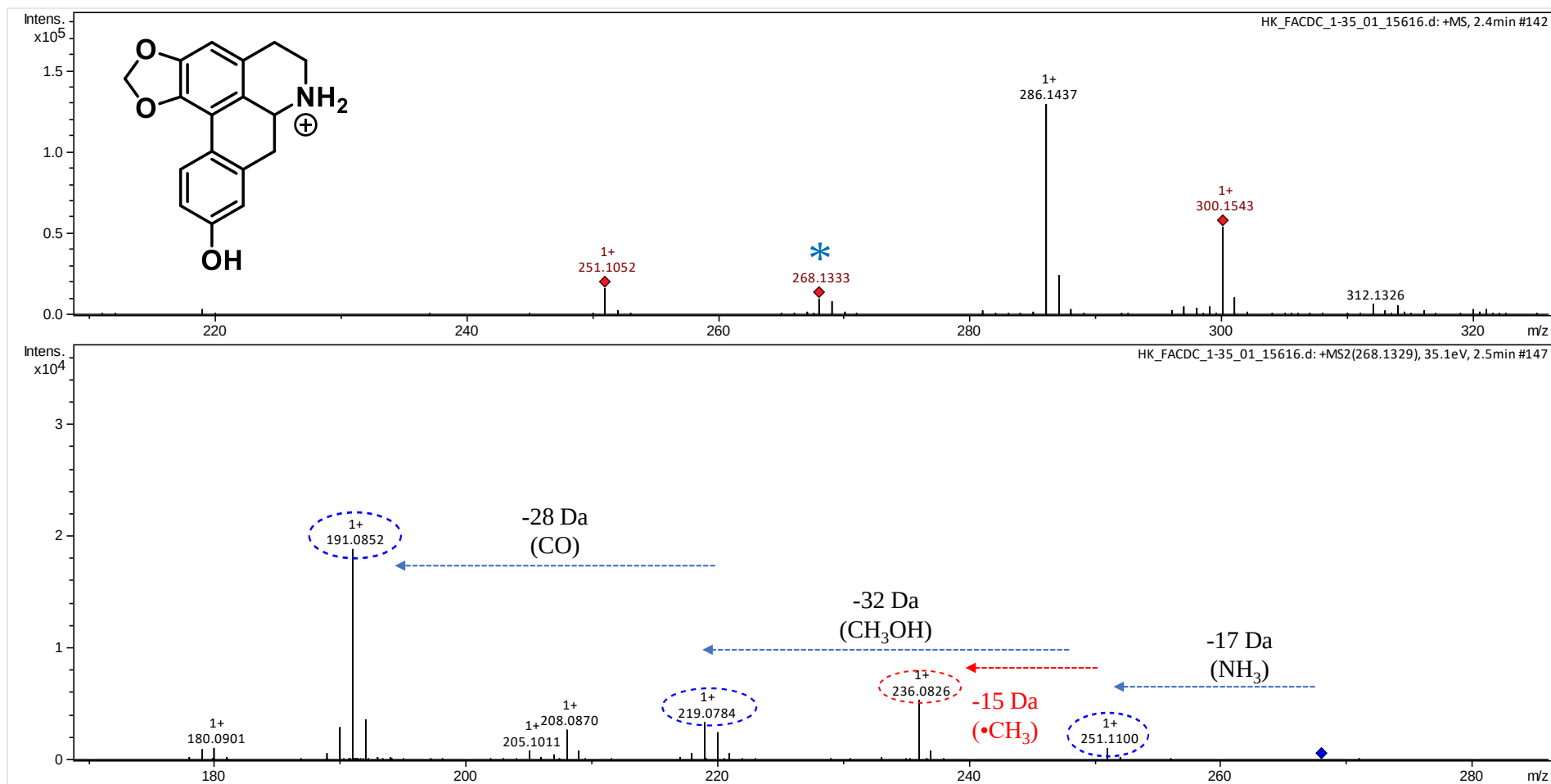
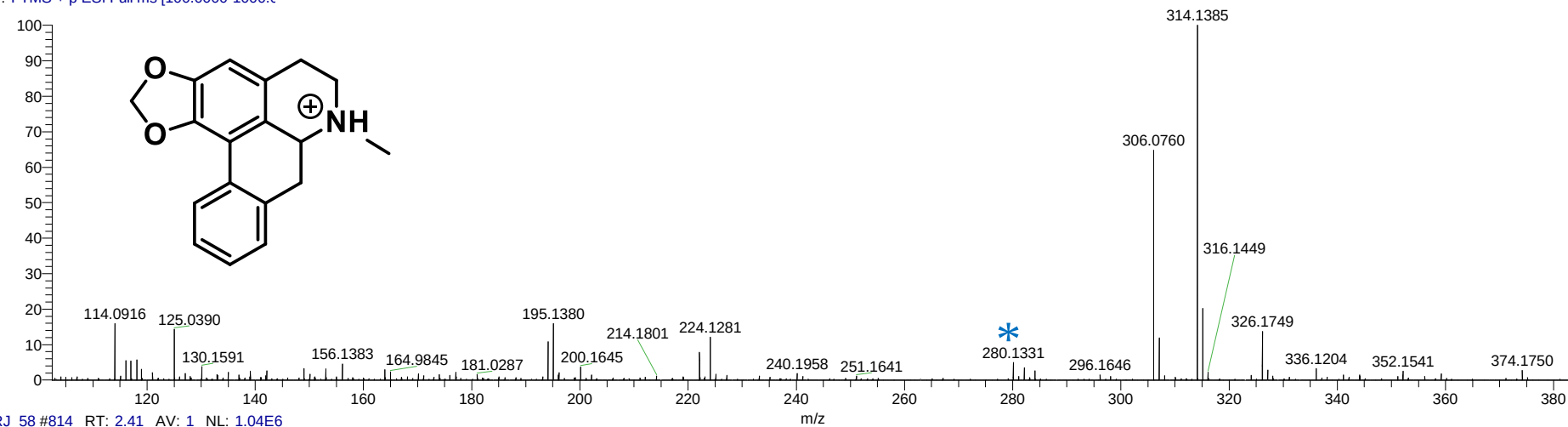


Figura 2 - Espectro de MS e MS/MS do composto asimilobina (A2) identificado na espécie *D. calycina*

RJ_58 #812 RT: 2.40 AV: 1 NL: 4.31E7
T: FTMS + p ESI Full ms [100.0000-1000.0]



RJ_58 #814 RT: 2.41 AV: 1 NL: 1.04E6
T: FTMS + p ESI d Full ms2 280.1331@hc

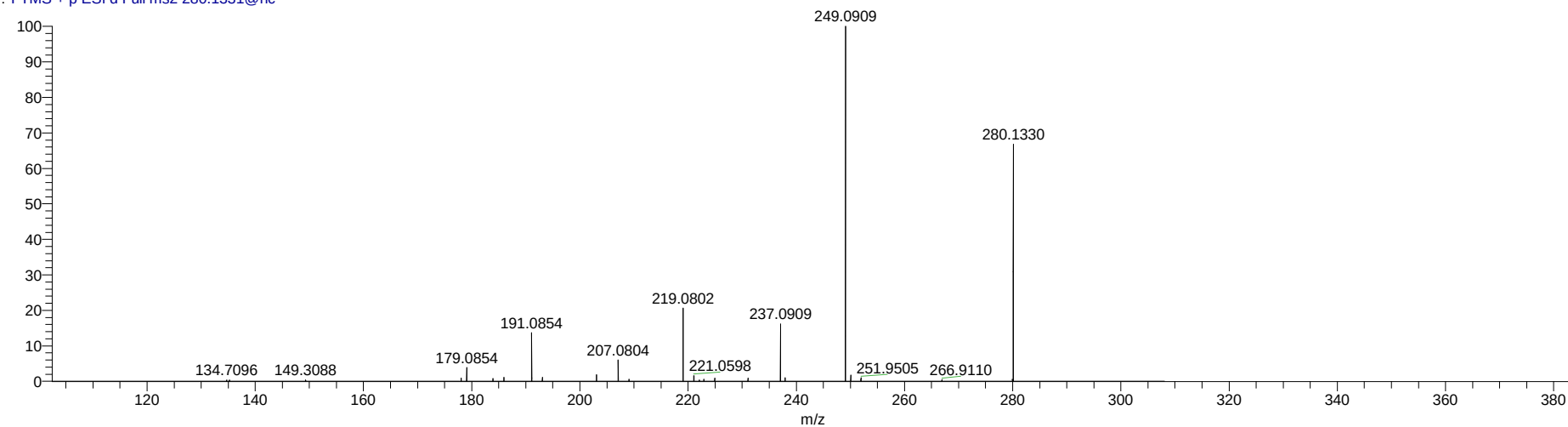
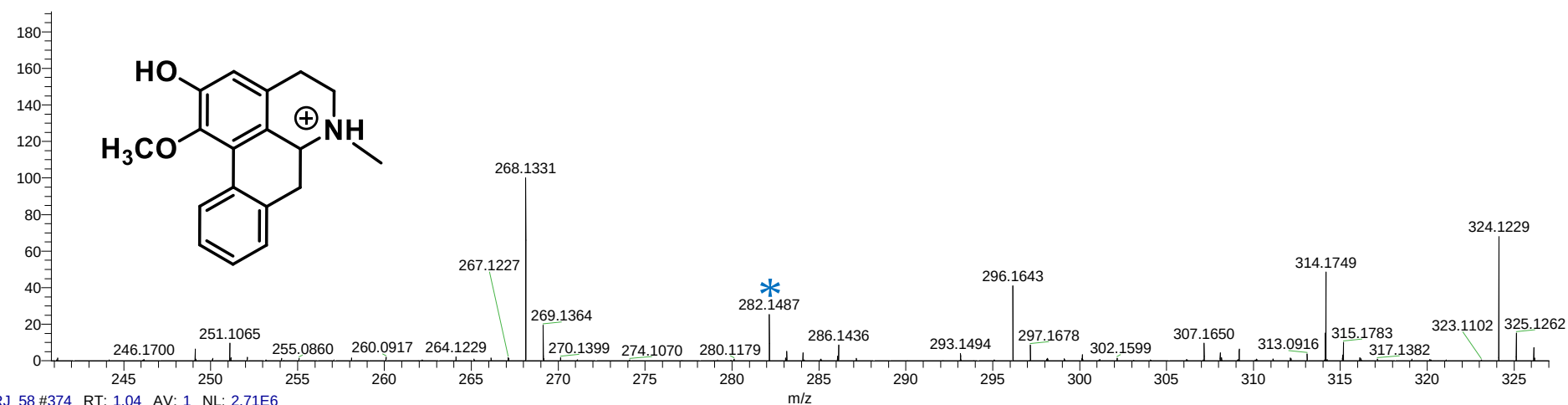


Figura 3 - Espectro de MS e MS/MS do composto *N*-metilanonaina (A3) identificado na espécie *E. amazonicus*

RJ_58 #372 RT: 1.03 AV: 1 NL: 3.07E7
T: FTMS + p ESI Full ms [100.0000-1000.0



RJ_58 #374 RT: 1.04 AV: 1 NL: 2.71E6
T: FTMS + p ESI d Full ms2 282.1487@hc

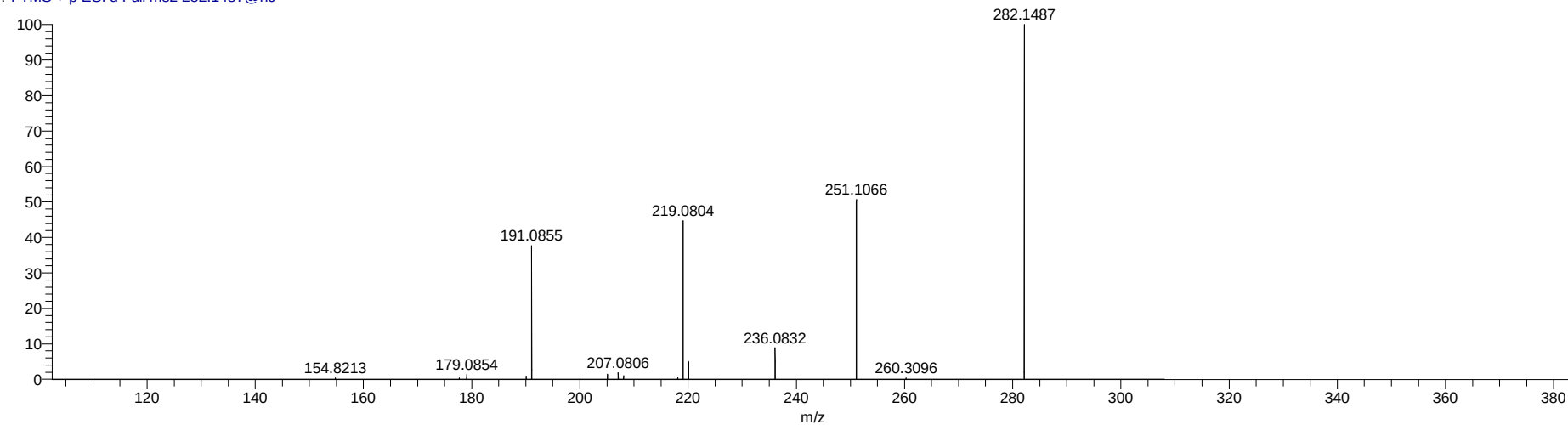


Figura 4 - Espectro de MS e MS/MS do composto *N*-metilasimilobina (A4) identificado na espécie *E. amazonicus*

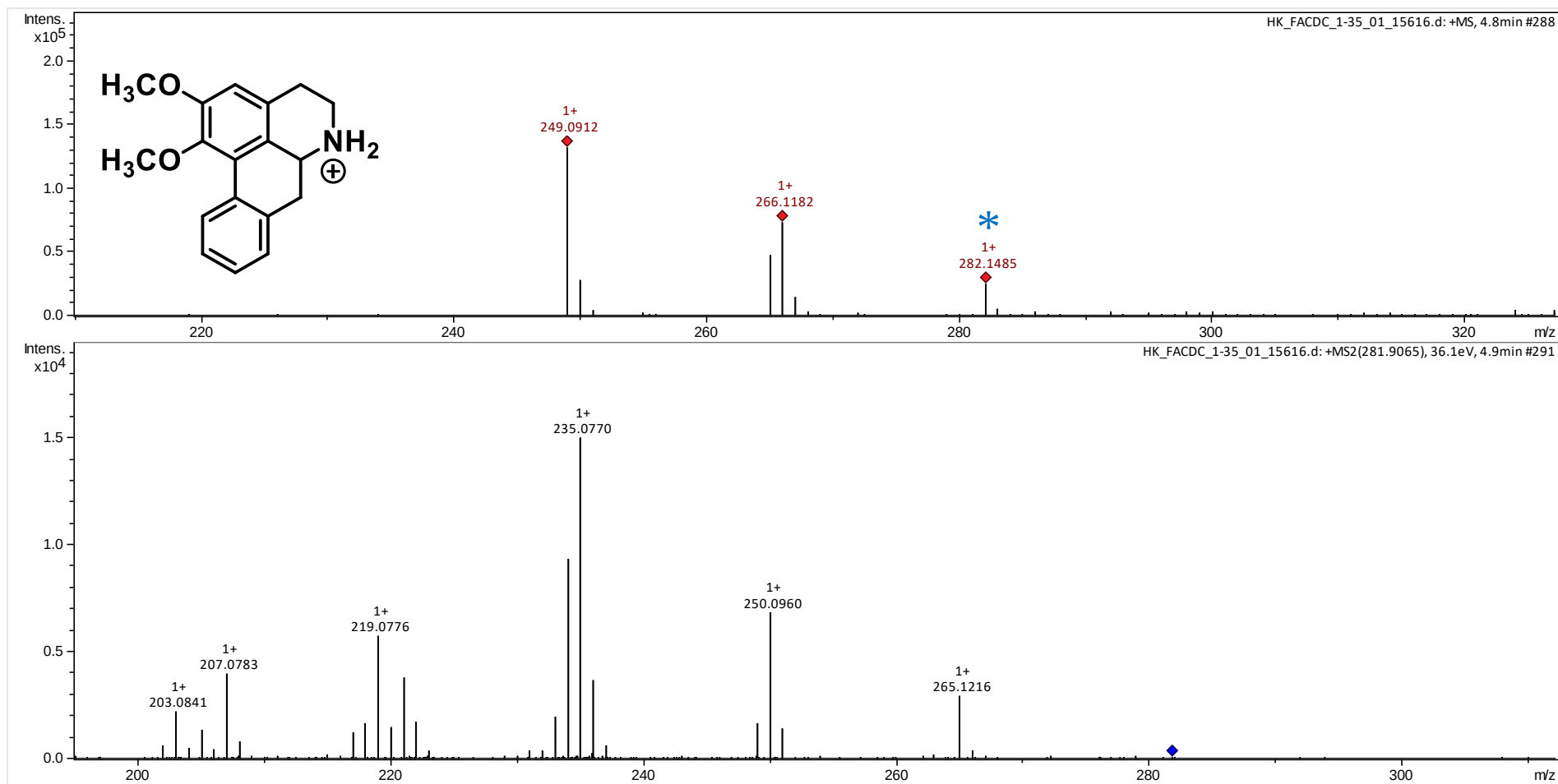


Figura 5 - Espectro de MS e MS/MS do composto nornuciferina (A5) identificado na espécie *D. calycina*

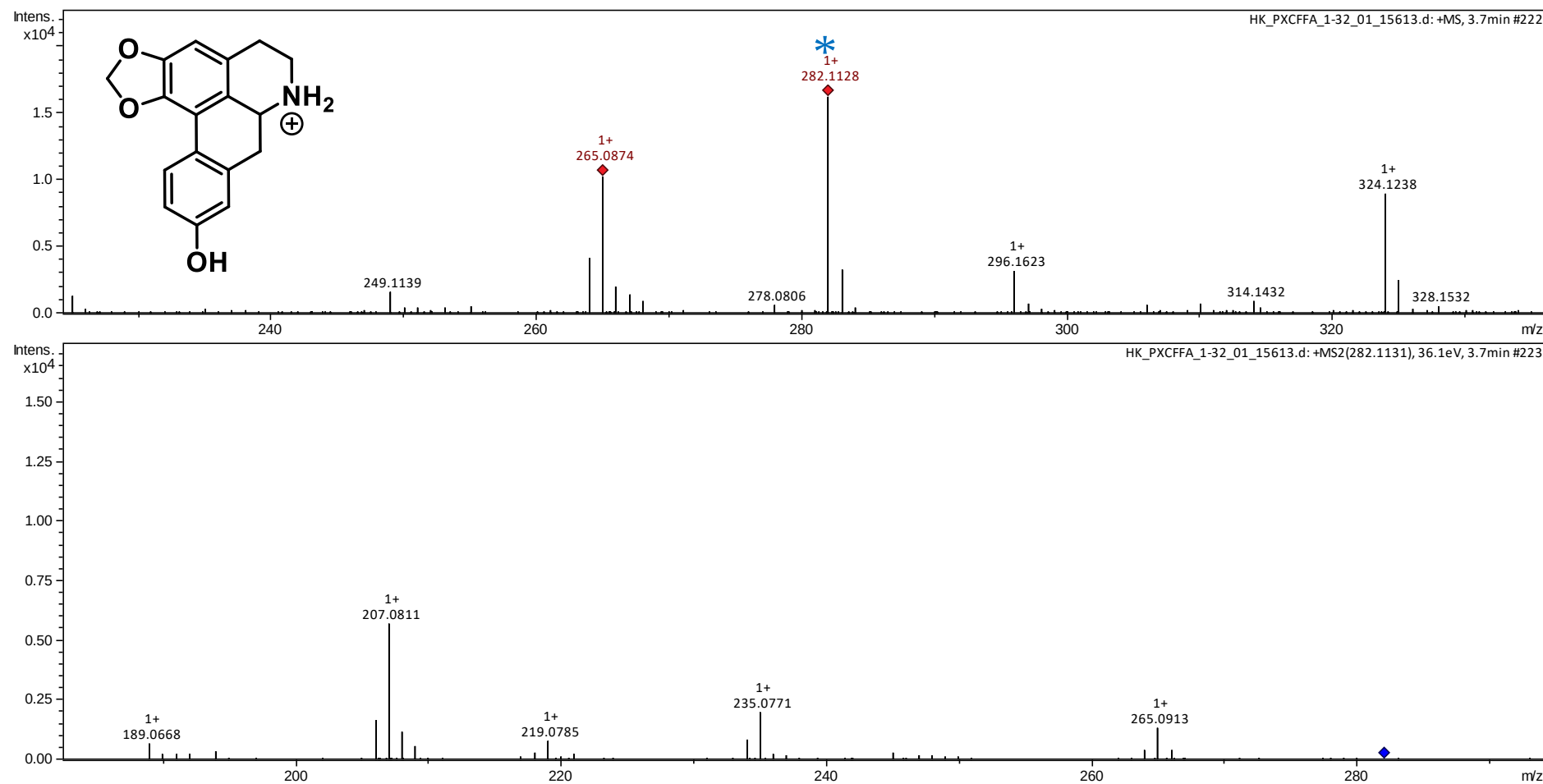


Figura 6 - Espectro de MS e MS/MS do composto anolobina (A6) identificado na espécie *P. leiophylla*

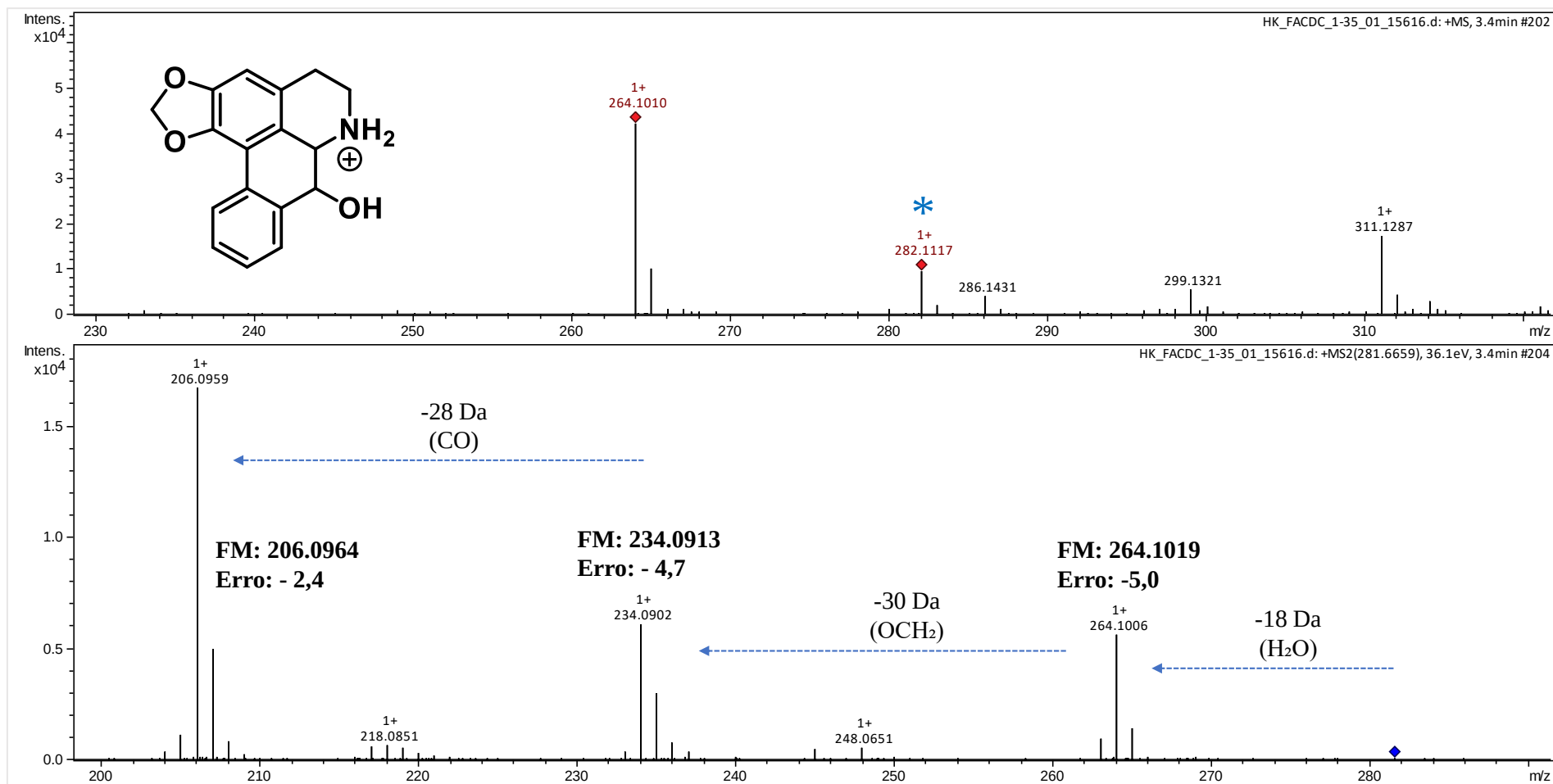


Figura 7 - Espectro de MS e MS/MS do composto norushinsunina (A7) identificado na espécie *D. calycina*

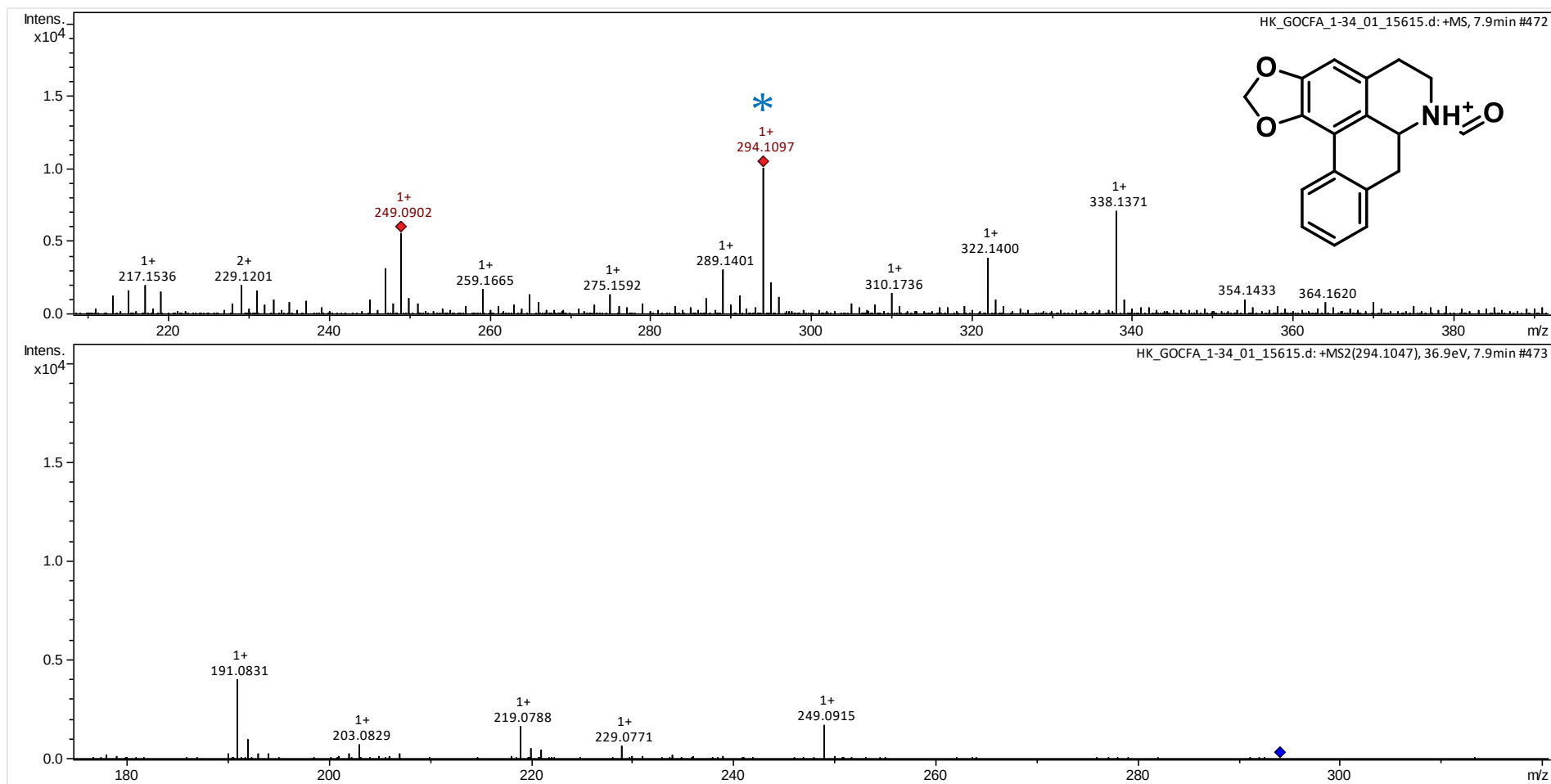
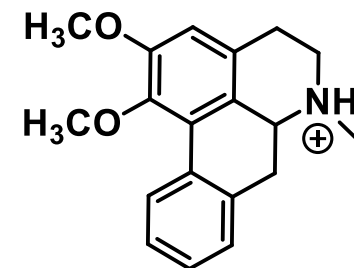
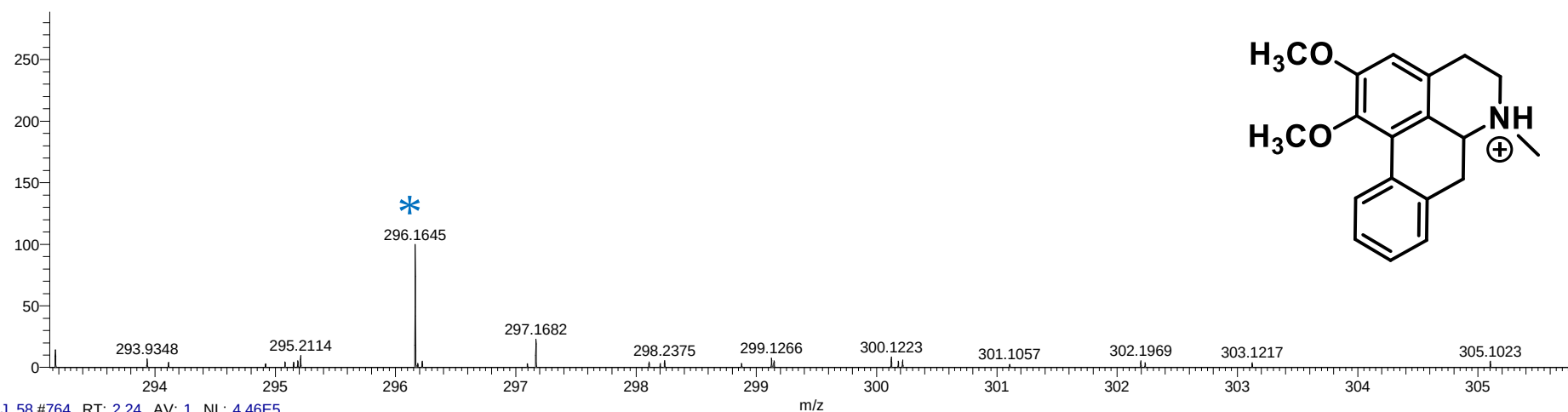


Figura 8 - Espectro de MS e MS/MS do composto *N*-formilanonaina (A8) identificado na espécie *Guatteria olivacea*

RJ_58 #760 RT: 2.23 AV: 1 NL: 1.34E6
T: FTMS + p ESI Full ms [100.0000-1000.0



RJ_58 #764 RT: 2.24 AV: 1 NL: 4.46E5
T: FTMS + p ESI d Full ms2 296.1645@hc

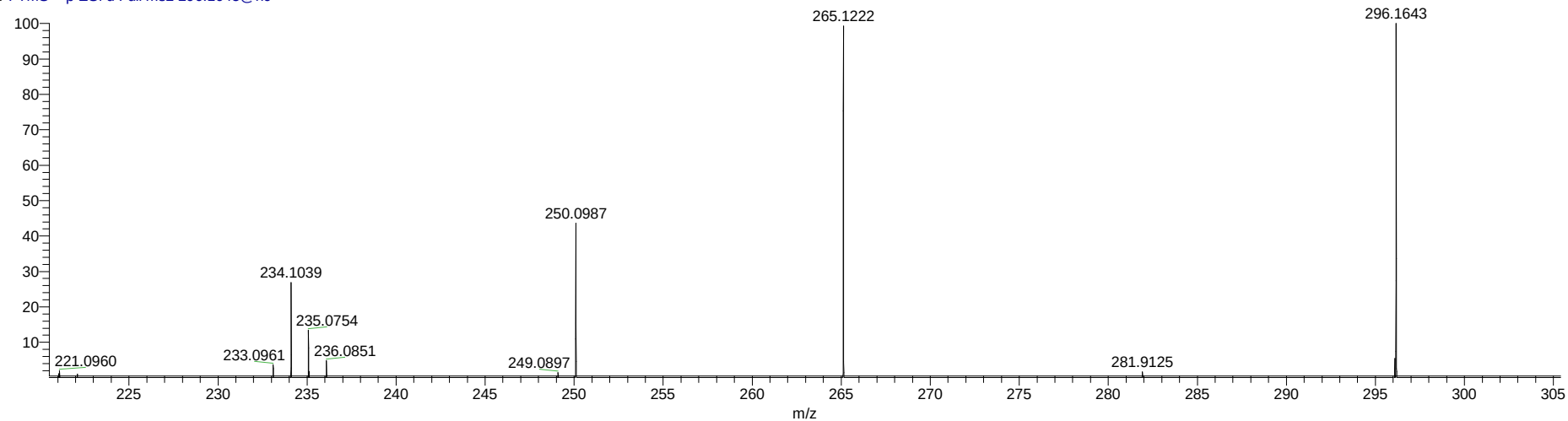


Figura 9 - Espectro de MS e MS/MS do composto nuciferina (A9) identificado na espécie *E. amazonicus*

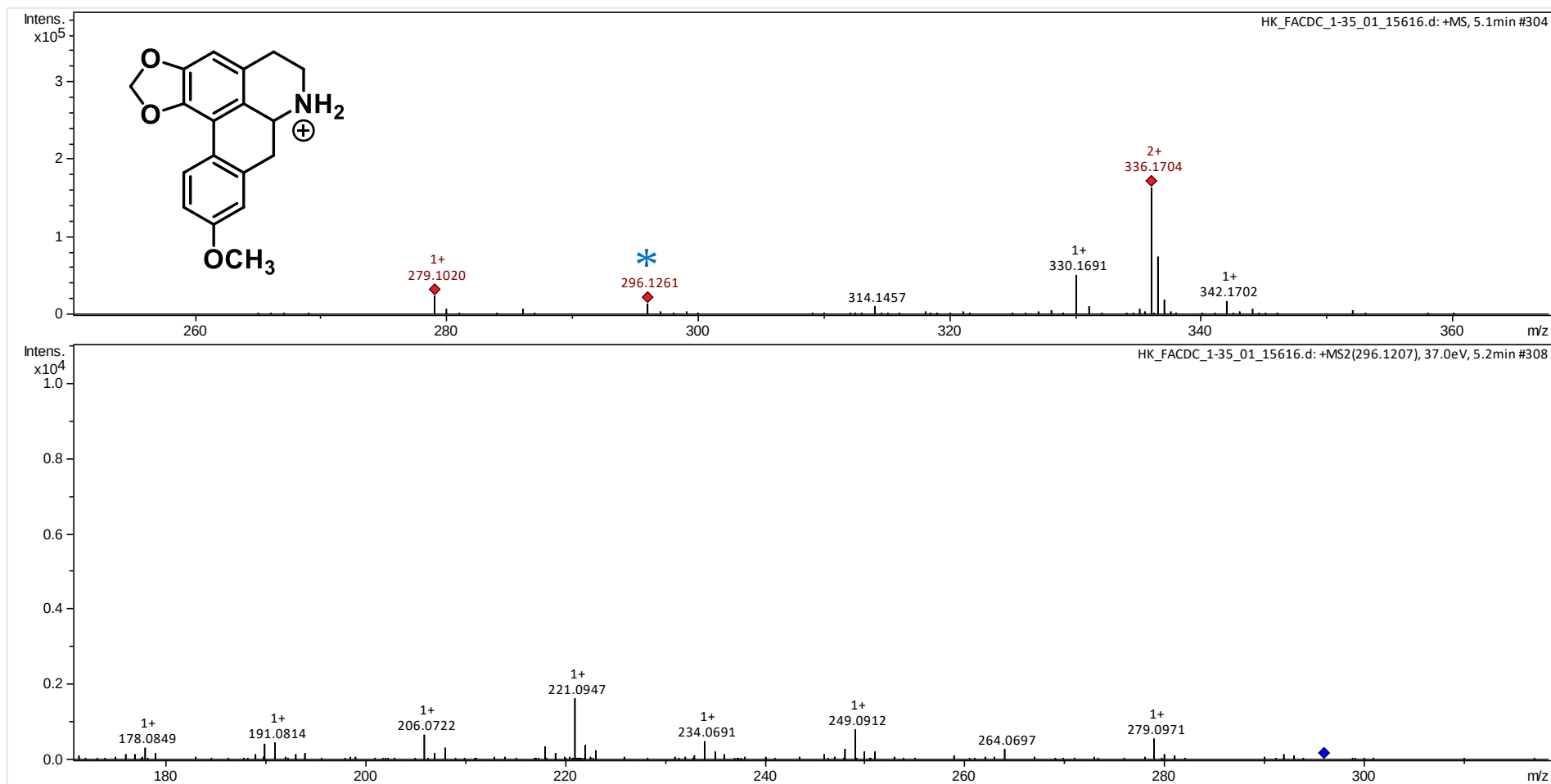
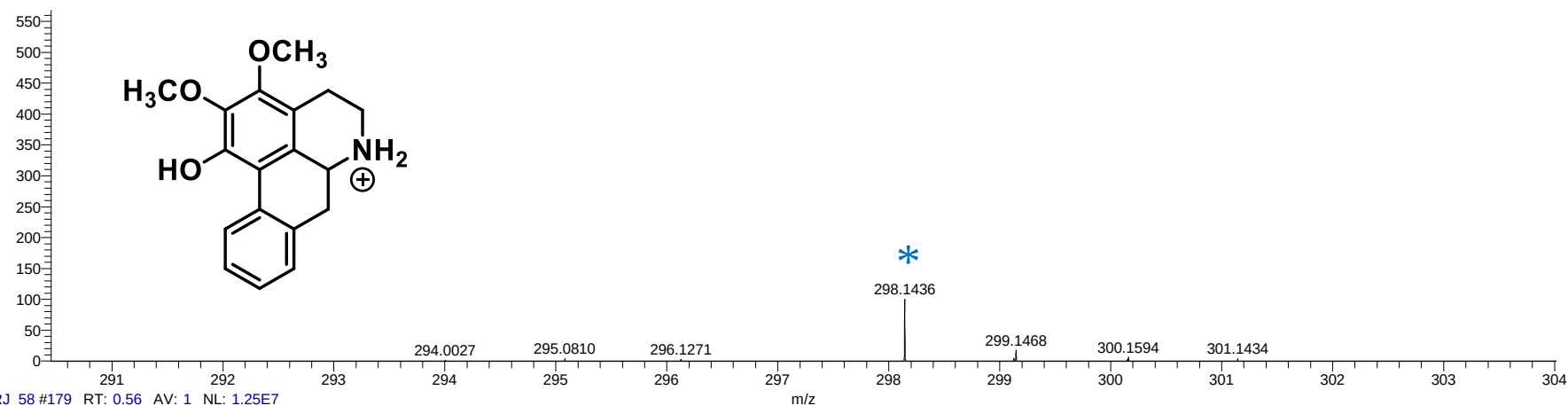


Figura 10 - Espectro de MS e MS/MS do composto xilopina (A10) identificado na espécie *D. calycina*

RJ_58 #176 RT: 0.55 AV: 1 NL: 2.48E7
T: FTMS + p ESI Full ms [100.0000-1000.0



RJ_58 #179 RT: 0.56 AV: 1 NL: 1.25E7
T: FTMS + p ESI d Full ms2 298.1436@hc

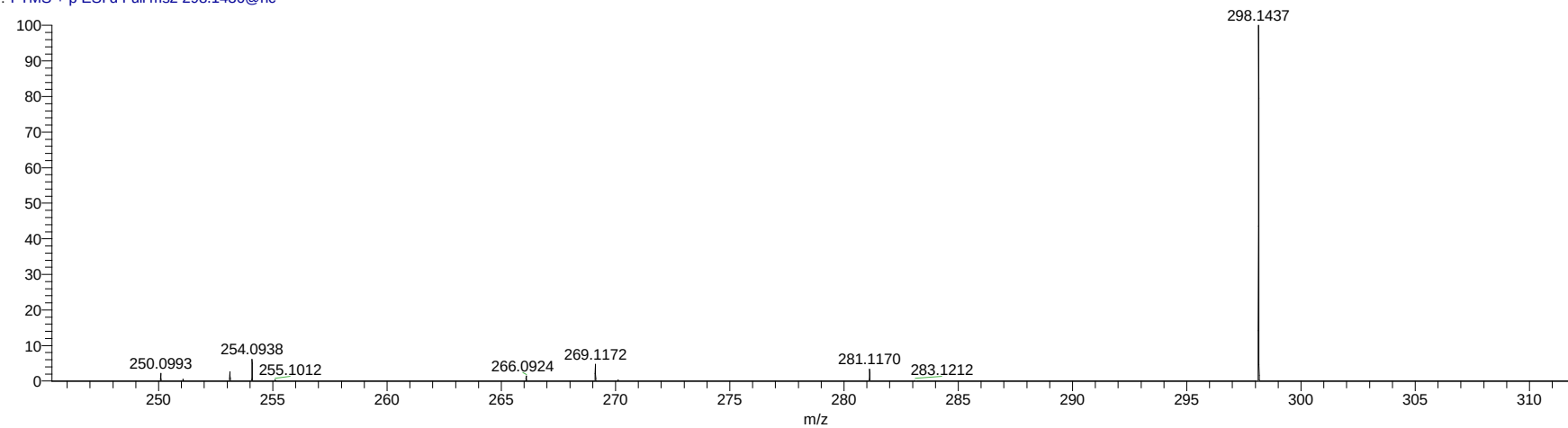


Figura 11 - Espectro de MS e MS/MS do composto isopilina (A11) identificado na espécie *E. amazonicus*

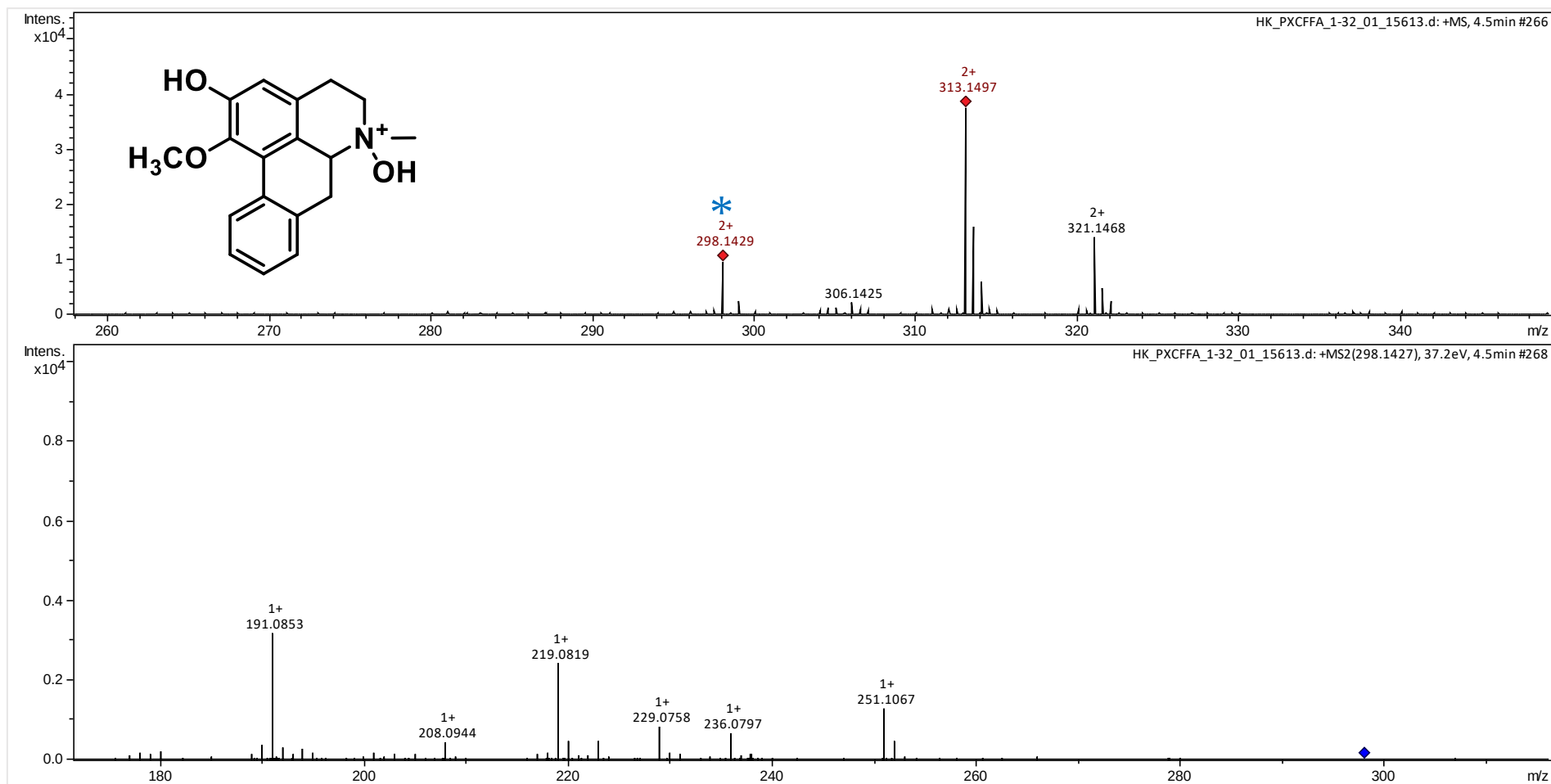


Figura 12 - Espectro de MS e MS/MS do composto *N*-metilasimilobina *N*-óxido (A12) identificado na espécie *P. leiophylla*

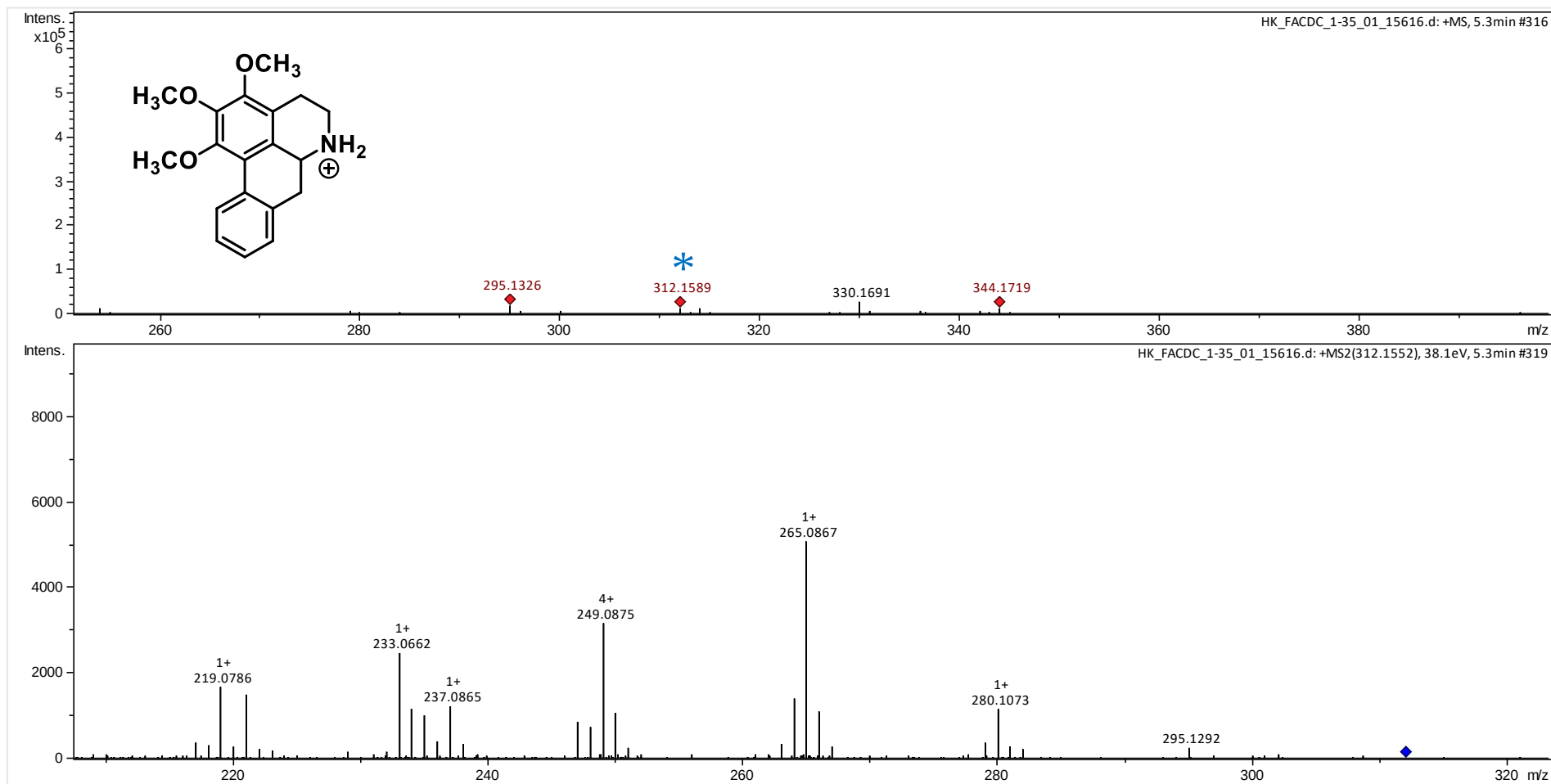


Figura 13 - Espectro de MS e MS/MS do composto *O*-metilisopilina (A13) identificado na espécie *D. calycina*

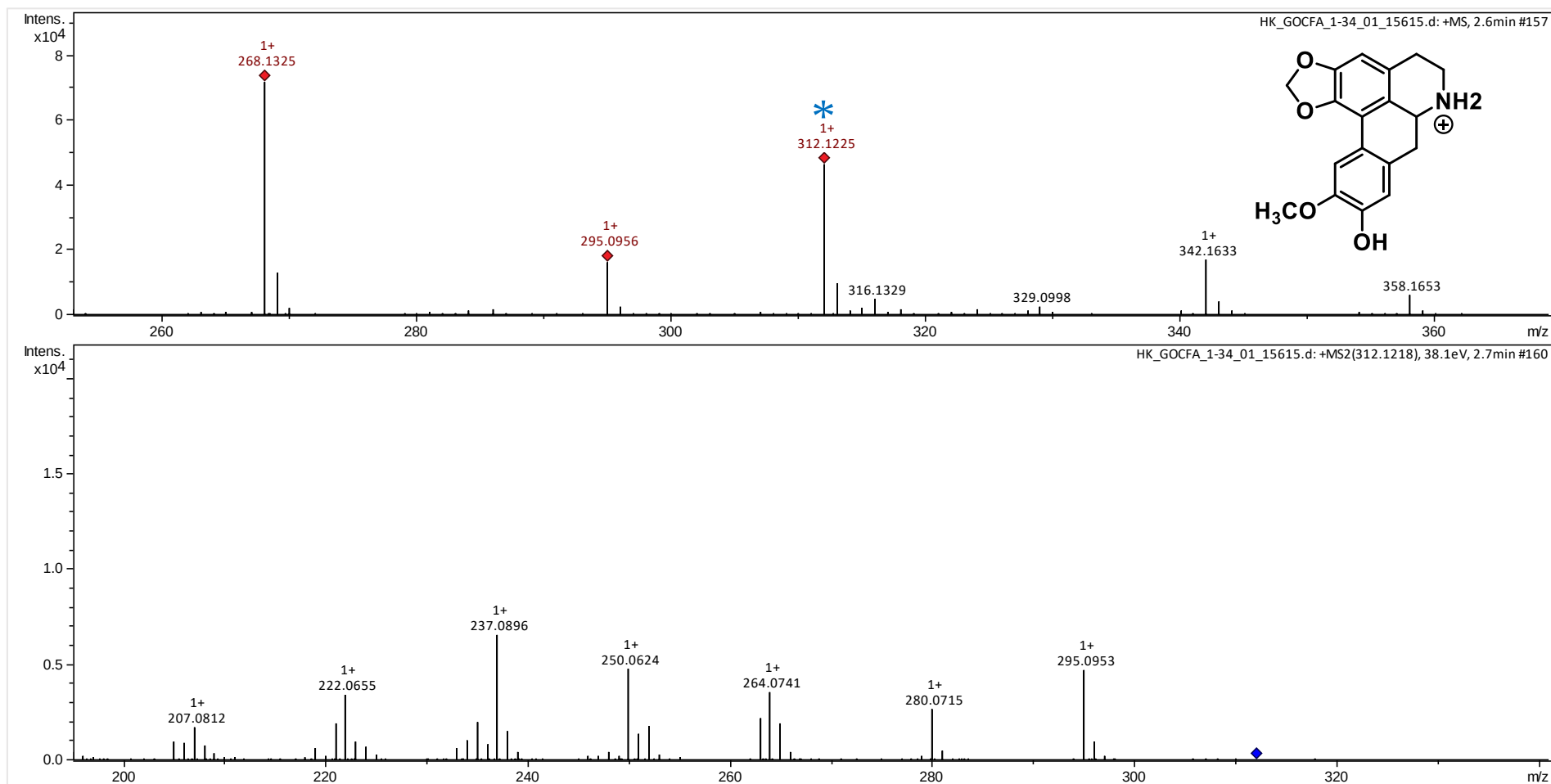


Figura 14 - Espectro de MS e MS/MS do composto actinodafnina (A14) identificado na espécie *G. olivacea*

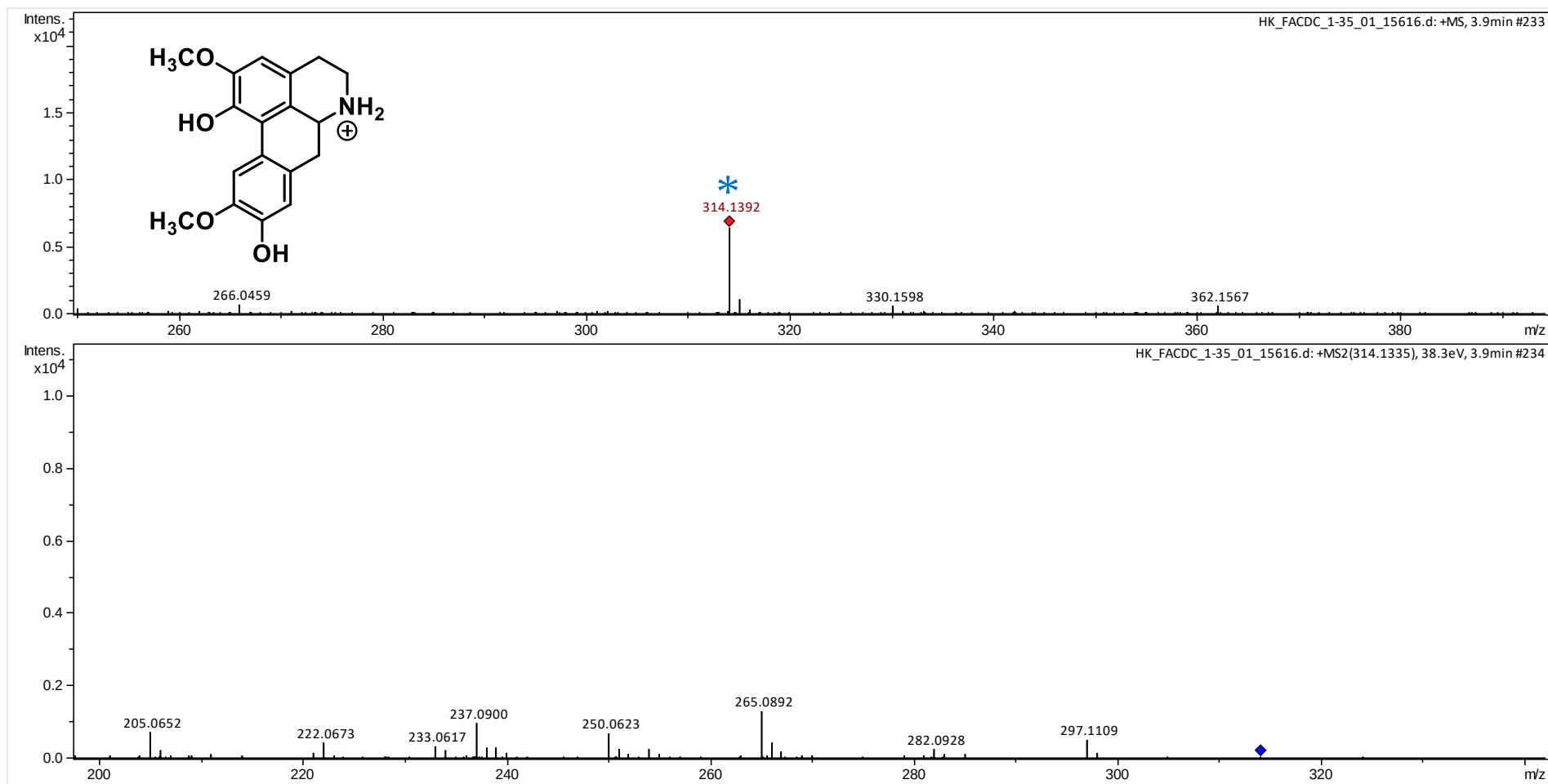


Figura 15 - Cromatograma de íons e espectro de EM do composto norisoboldina (A15) identificado na espécie *D. calycina*

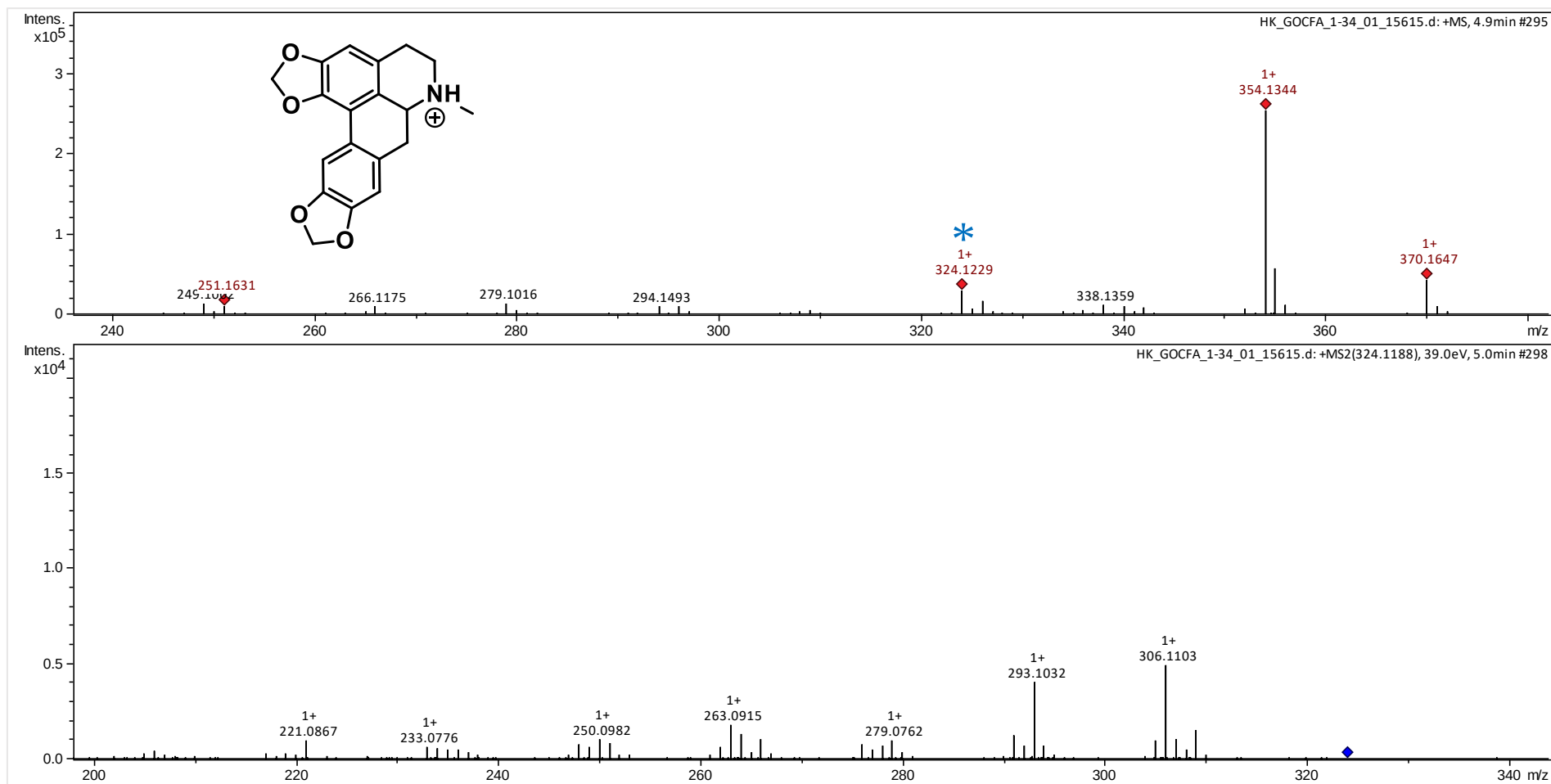


Figura 16 - Espectro de MS e MS/MS composto neolitsina (A16) identificado na espécie *G. olivacea*

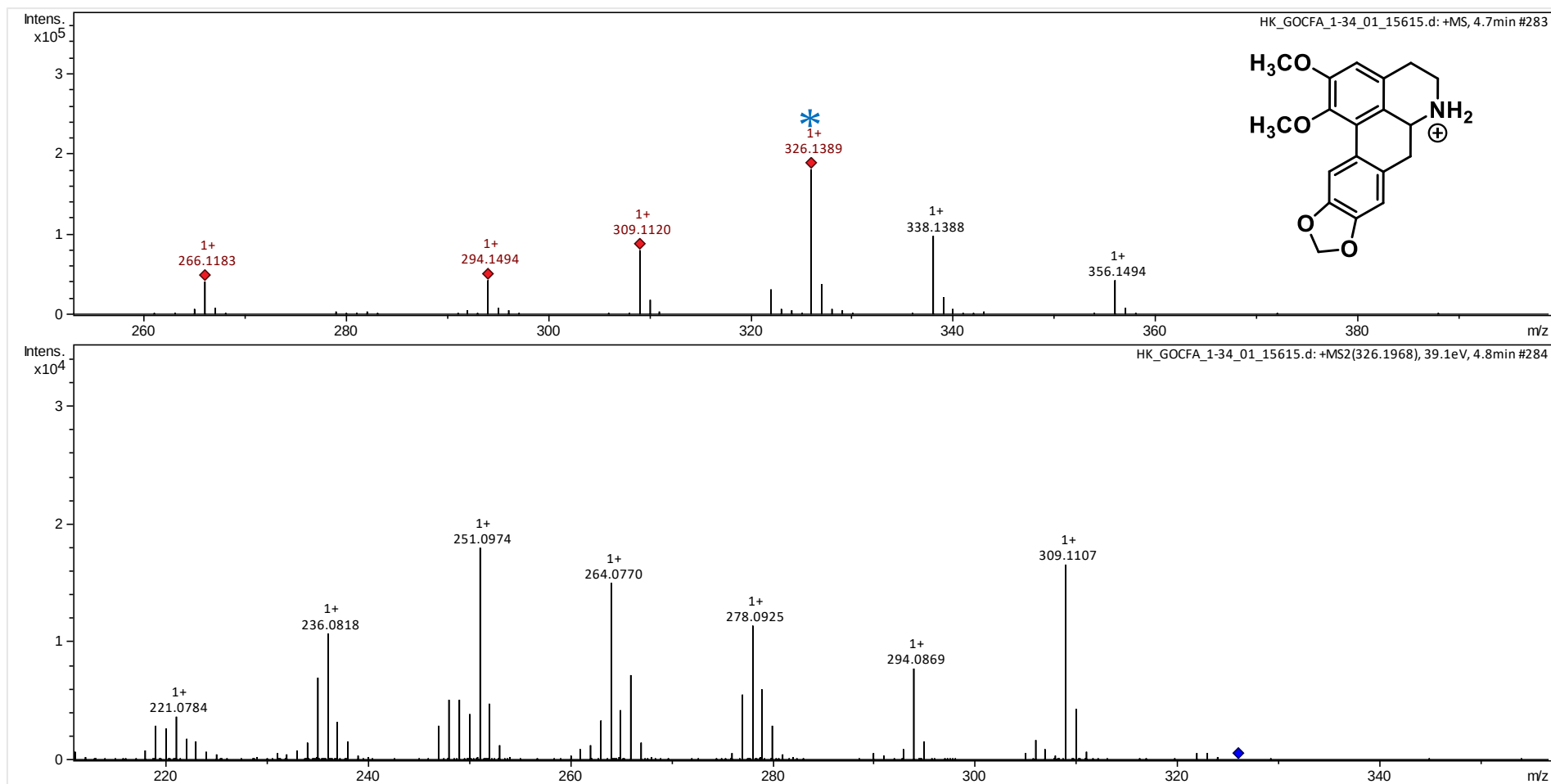


Figura 17 - Espectro de MS e MS/MS do composto nornantenina (A17) identificado na espécie *G. olivacea*

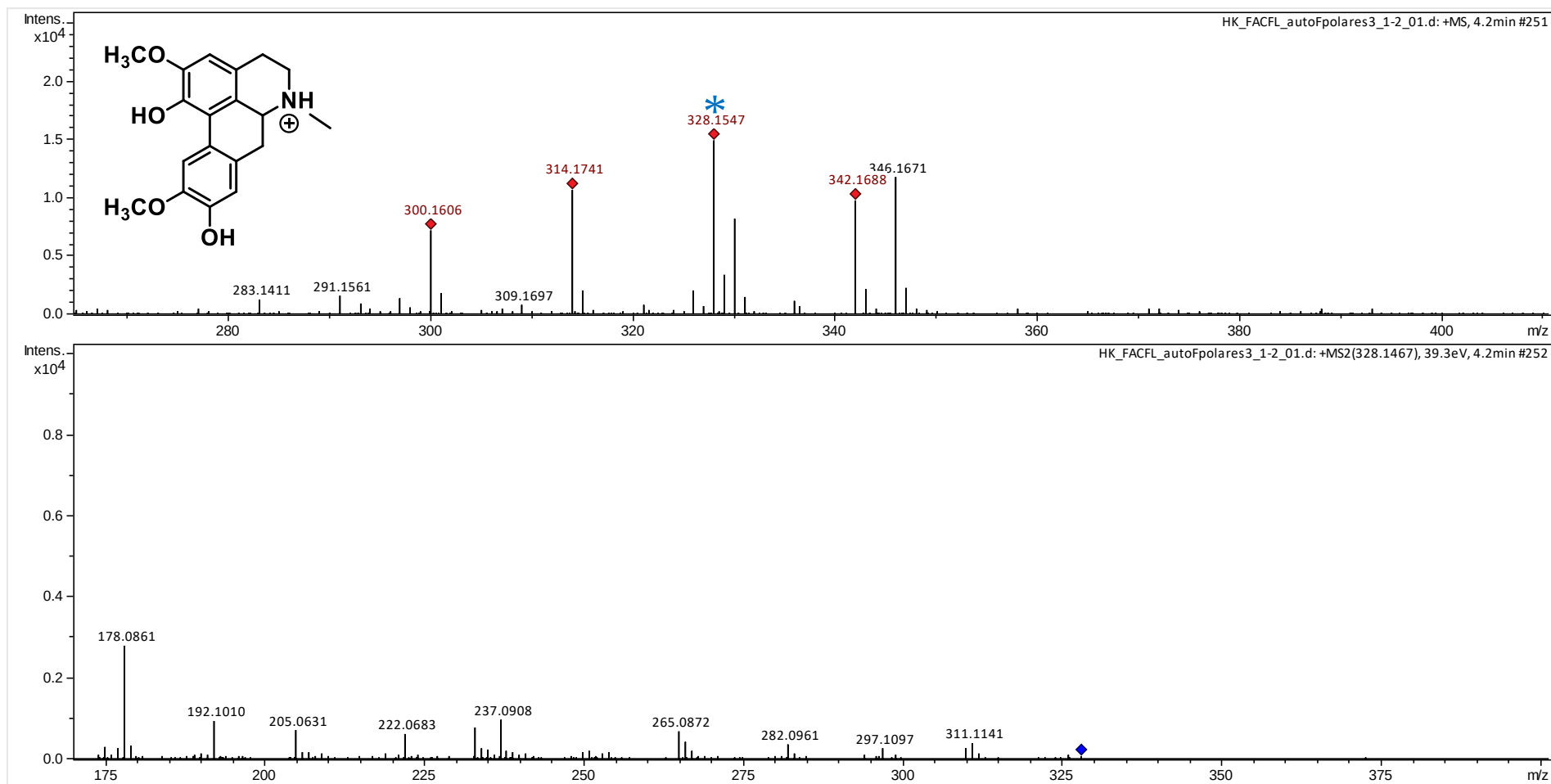


Figura 18 - Espectro de MS e MS/MS do composto isoboldina (A18) identificado na espécie *F. longifolia* (caule)

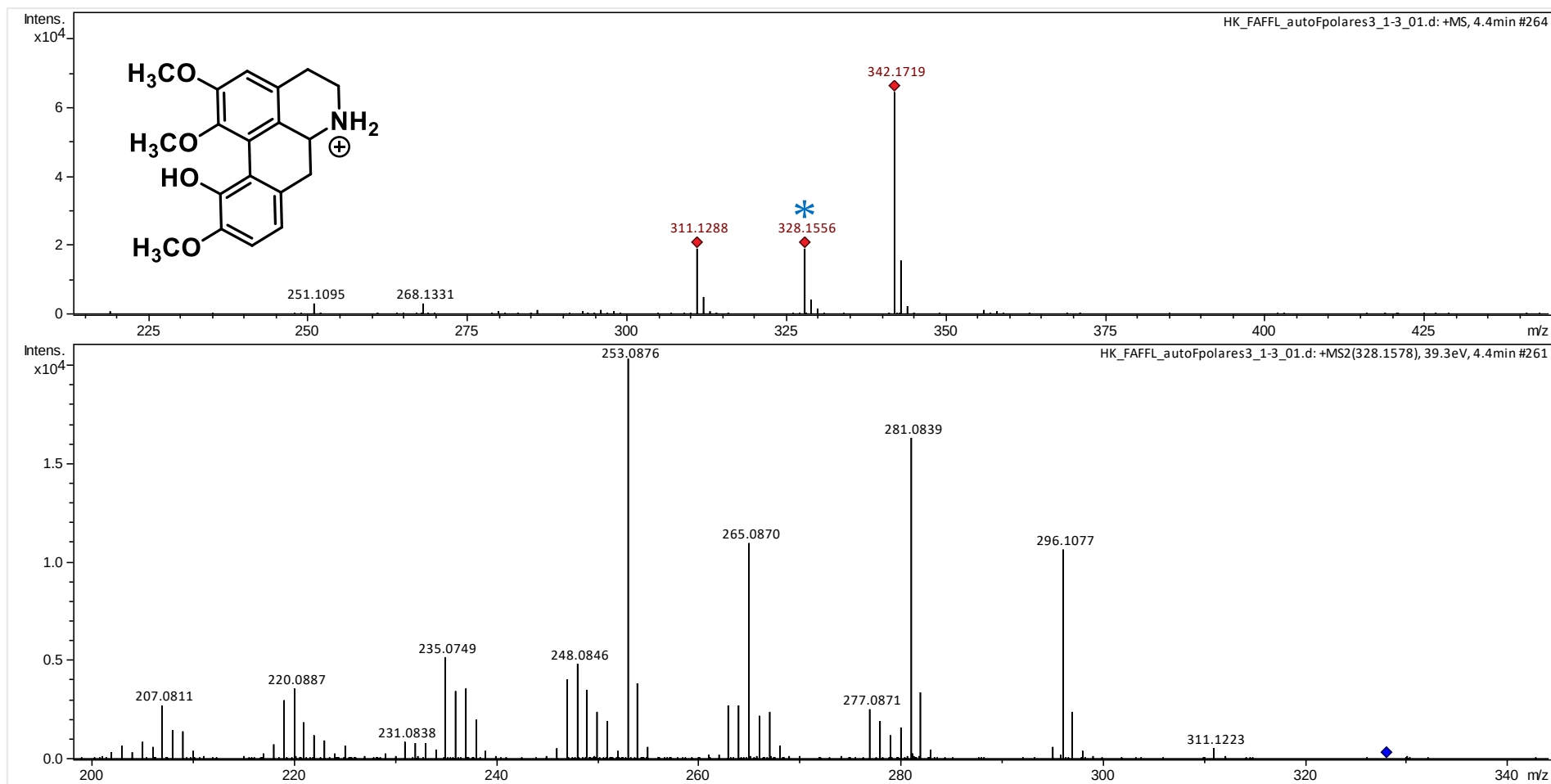


Figura 19 - Espectro de MS e MS/MS do composto norisocoridina (A19) identificado na espécie *F. longifolia* (folha)

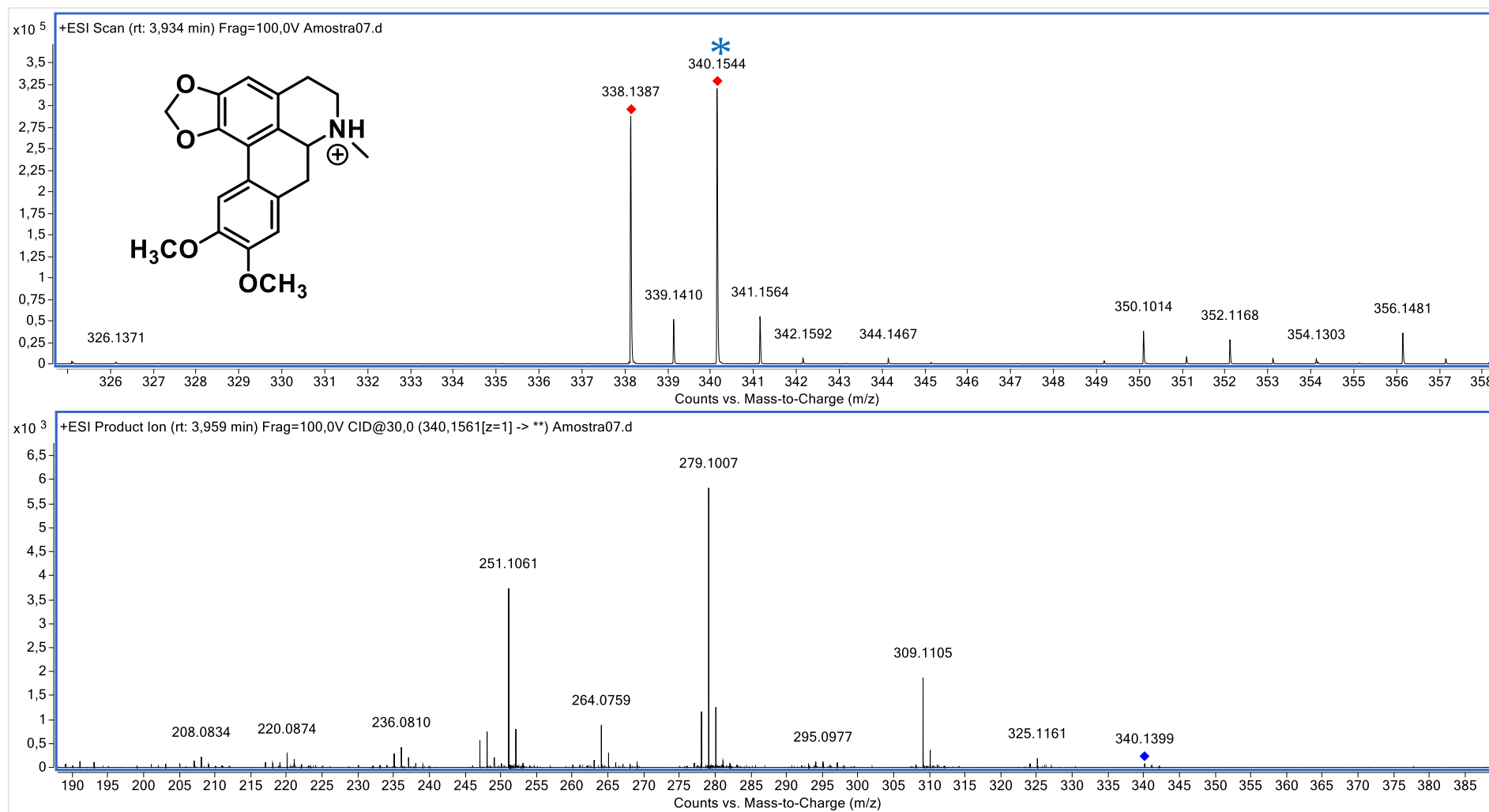


Figura 20 - Espectro de MS e MS/MS do composto Dicentrina (A20) identificado na espécie *D. surinamensis*

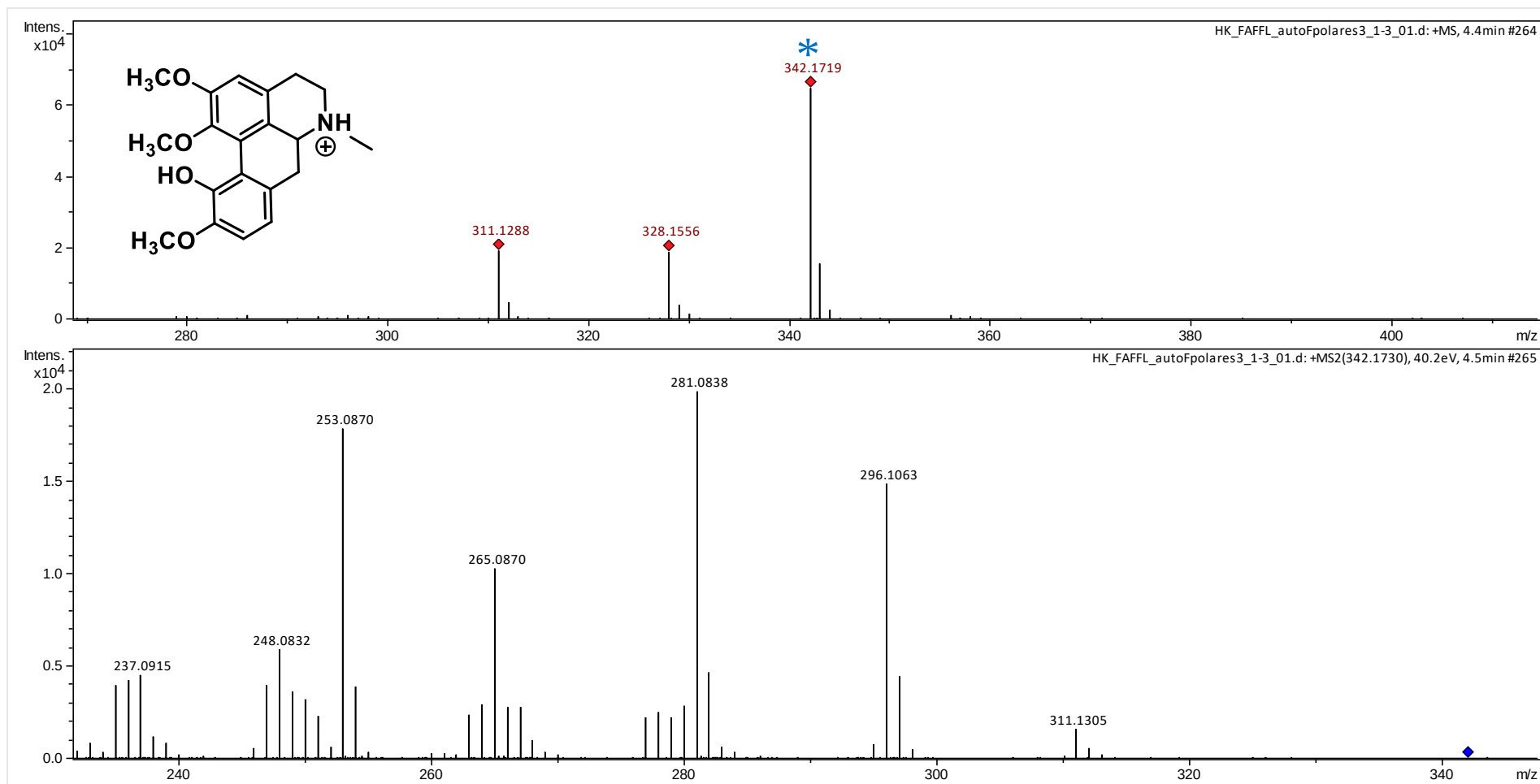


Figura 21 - Espectro de MS e MS/MS do composto isocoridina (A21) identificado na espécie *F. longifolia* (folha)

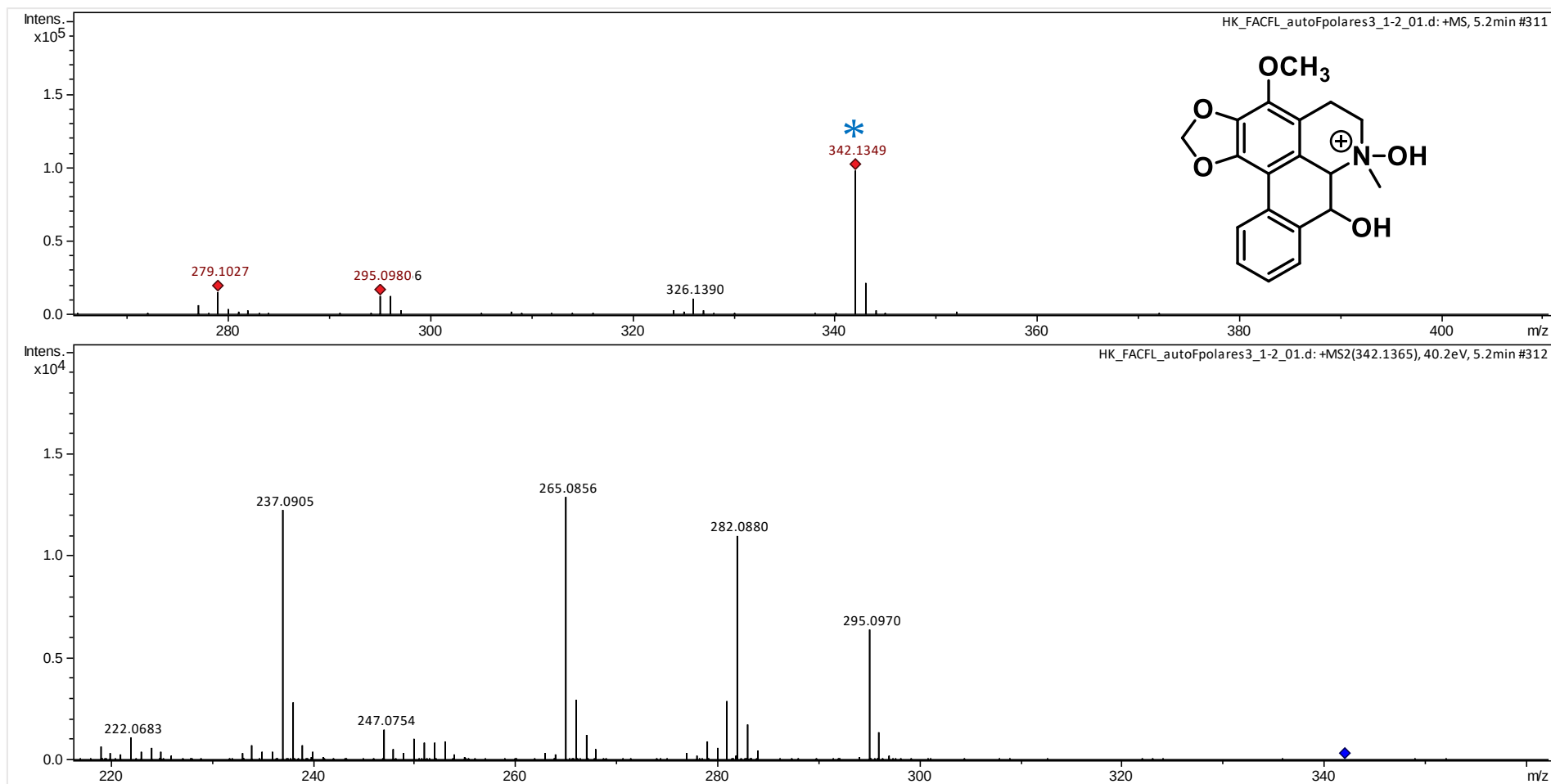
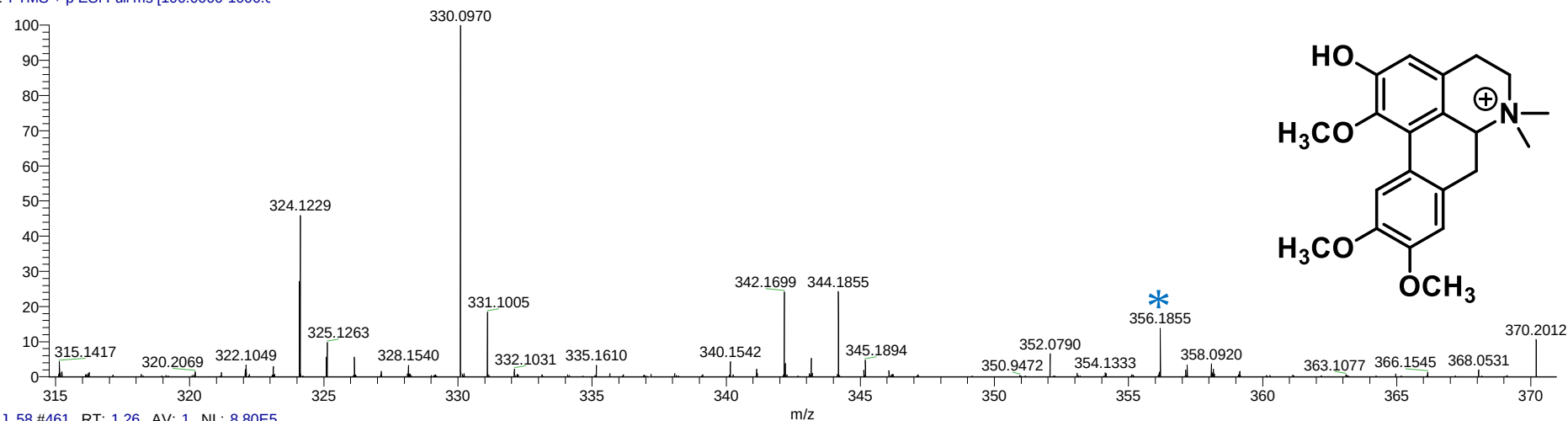


Figura 22 - Cromatograma de íons e espectro de EM do composto *N*-óximo de guaterina (A22) identificado na espécie *F. longifolia* (caule)

RJ: 58 #460 RT: 1.26 AV: 1 NL: 1.46E7
T: FTMS + p ESI Full ms [100.0000-1000.0]



RJ: 58 #461 RT: 1.26 AV: 1 NL: 8.80E5
T: FTMS + p ESI d Full ms2 356.1855@hc

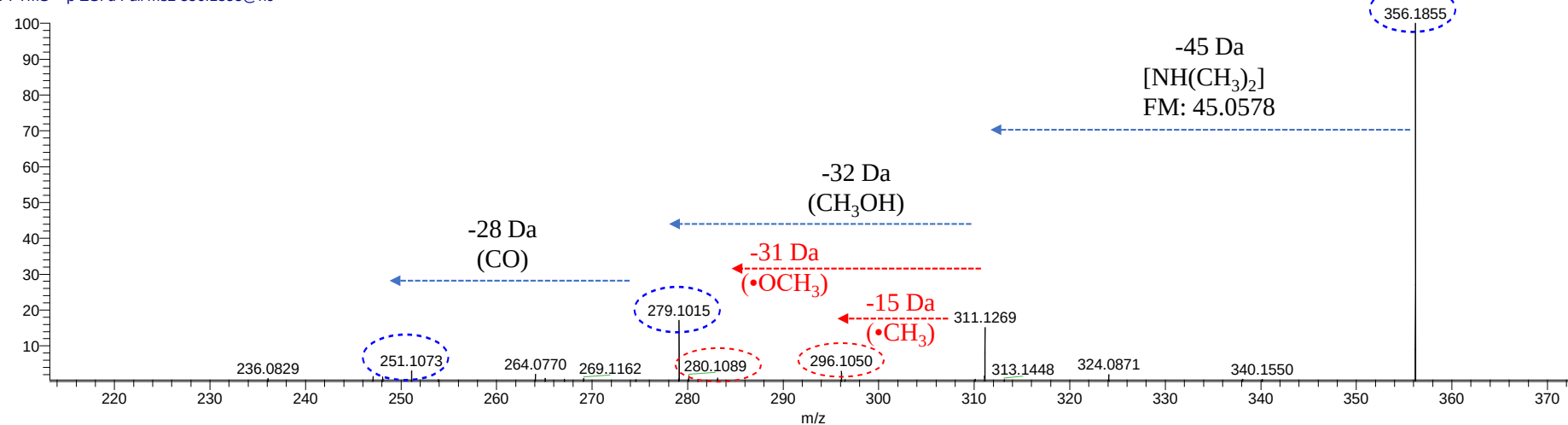


Figura 23 - Espectro de MS e MS/MS do composto *N*-metilpredicentrina (A23) identificado na espécie *E. amazonicus*

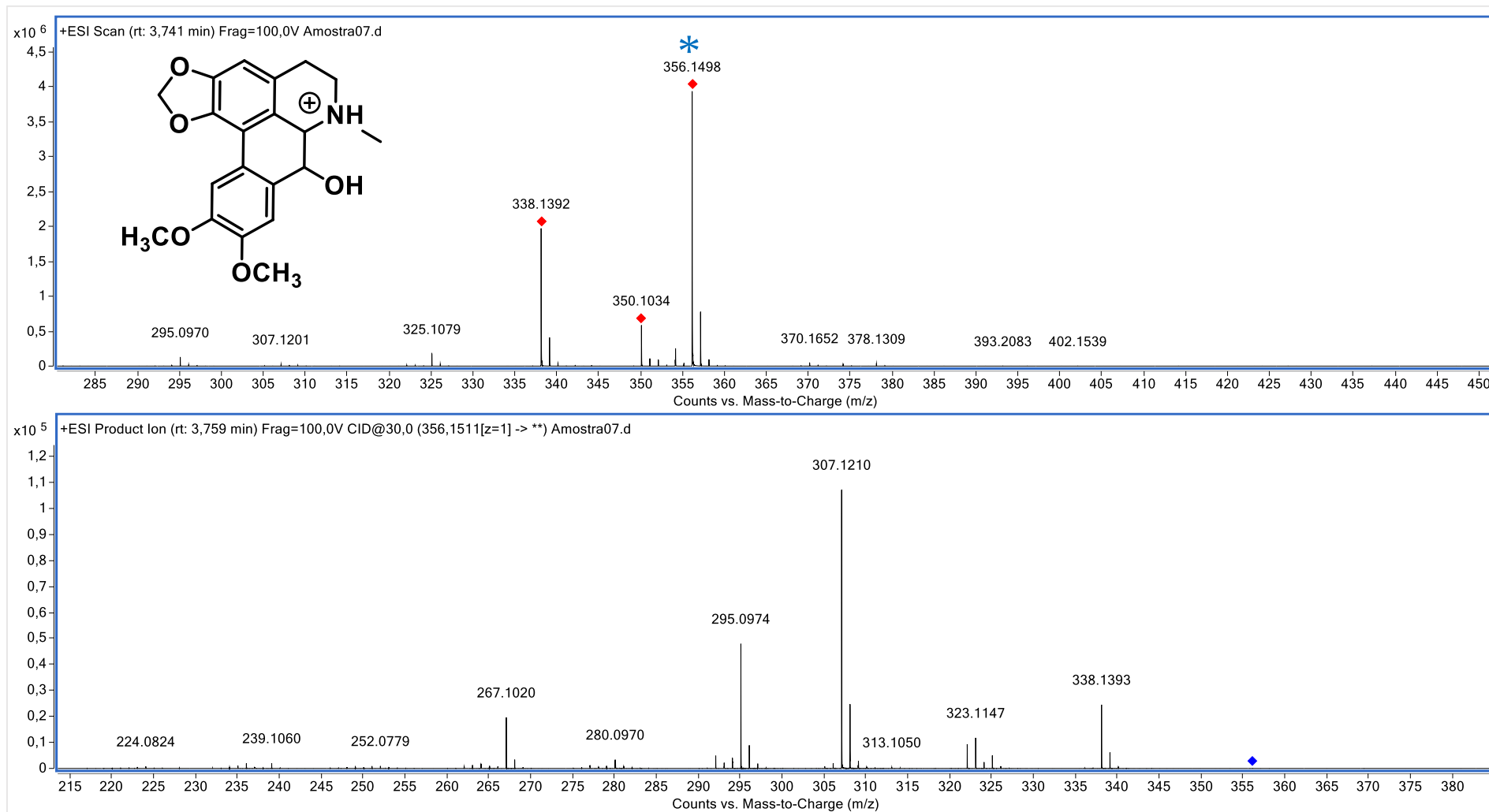


Figura 24 - Espectro de MS e MS/MS do composto duguetina (A24) identificado na espécie *D. surinamensis*

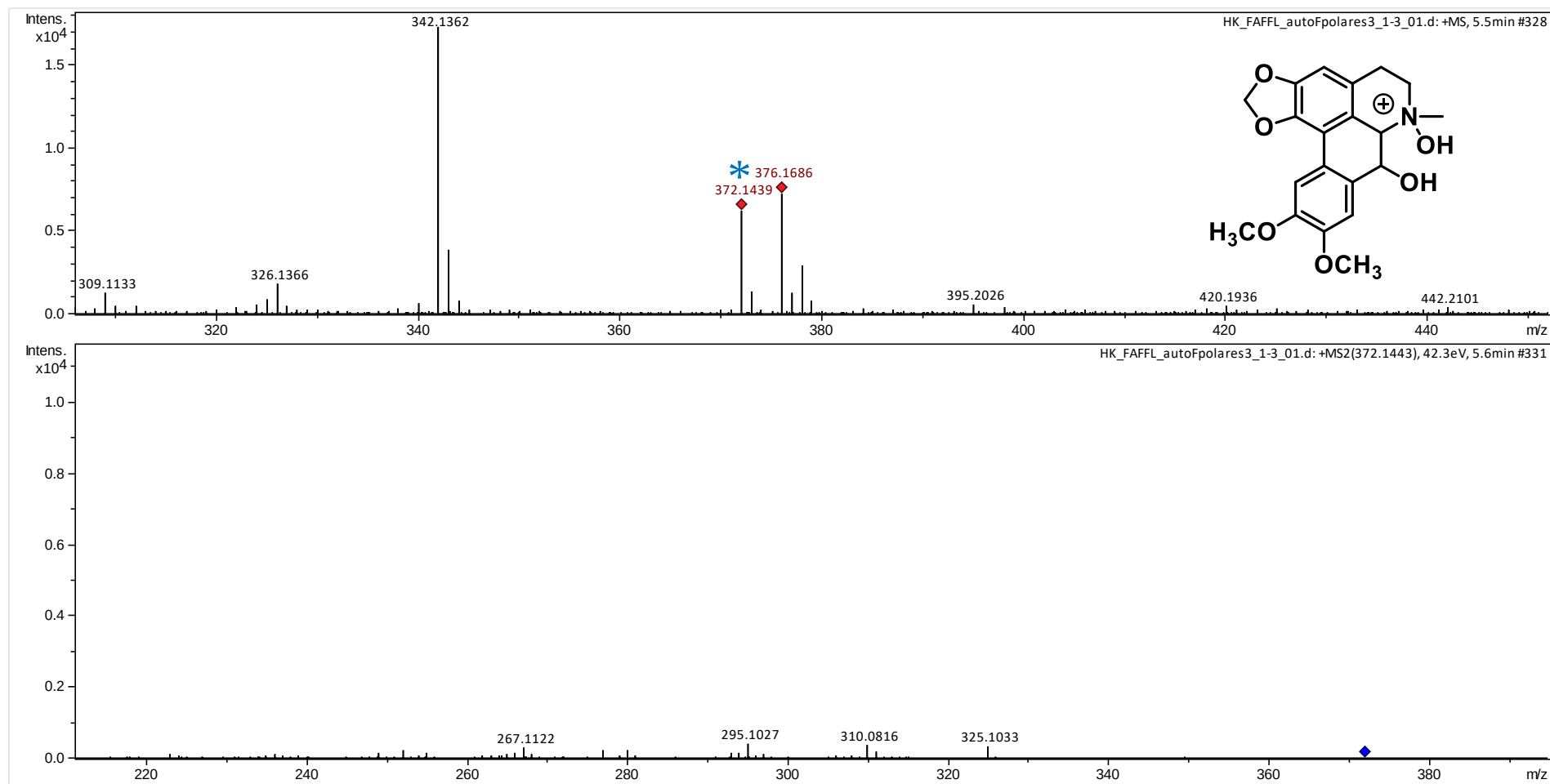


Figura 25 - Espectro de MS e MS/MS do composto *N*-óxido de duguetina (A25) identificado na espécie *F. longifolia* (folha)

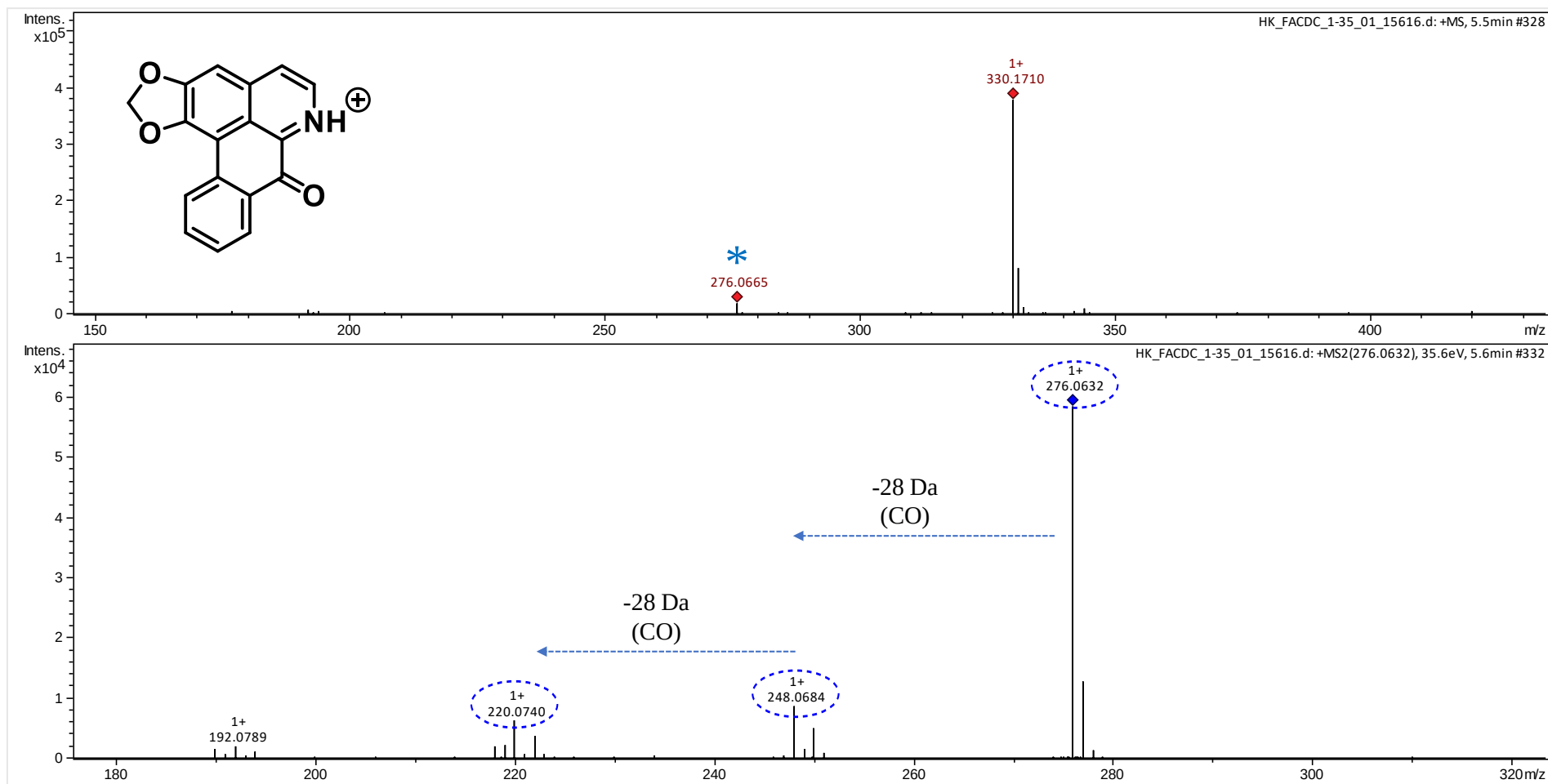


Figura 26 - Espectro de MS e MS/MS do composto liriodenina (B1) identificado na espécie *D. calycina*

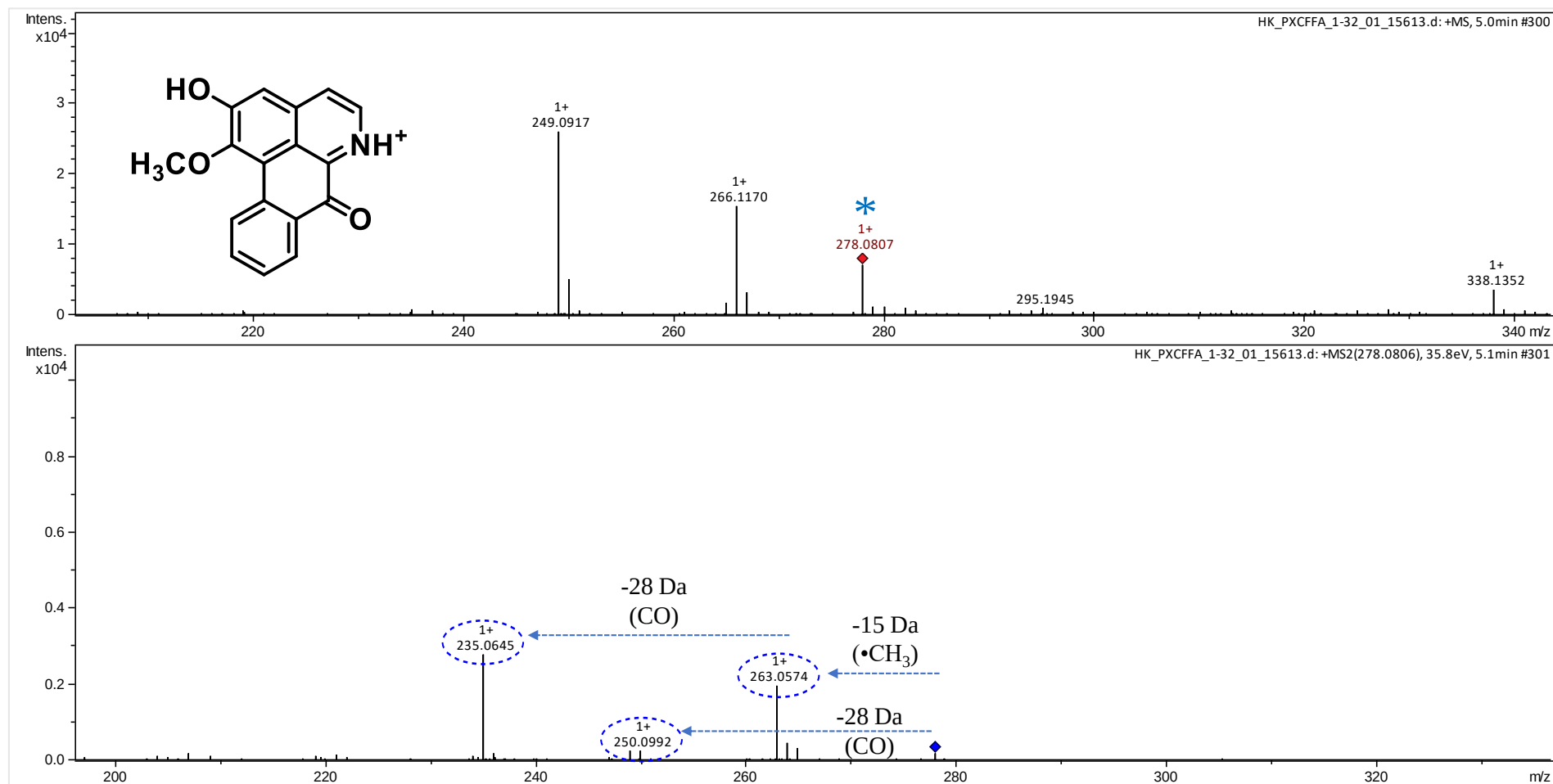
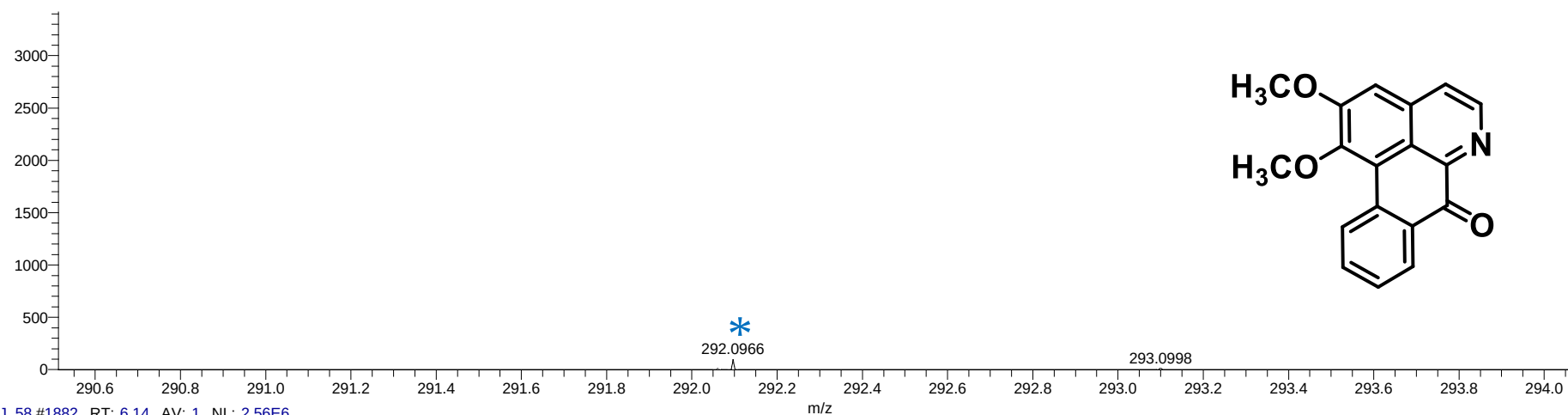


Figura 27 - Espectro de MS e MS/MS do composto oxoasimilobina (B2) identificado na espécie *P. leiophylla*

RJ_58 #1881 RT: 6.14 AV: 1 NL: 4.14E6
T: FTMS + p ESI Full ms [100.0000-1000.C



RJ_58 #1882 RT: 6.14 AV: 1 NL: 2.56E6
T: FTMS + p ESI d Full ms2 292.0966@hc

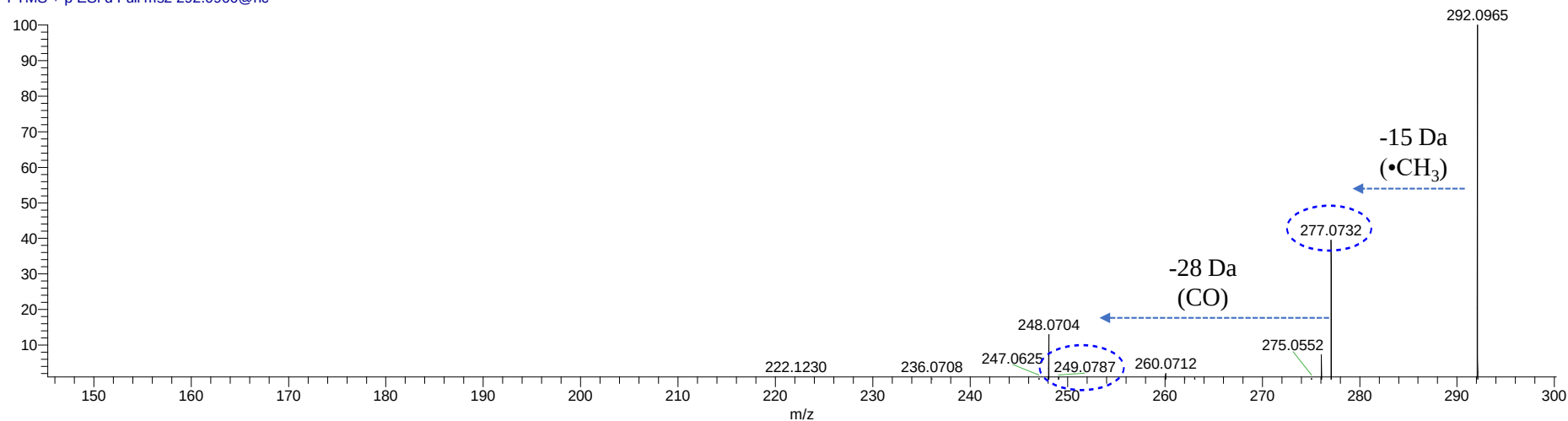


Figura 28 - Espectro de MS e MS/MS do composto lisicamina (B3) identificado na espécie *E. amazonicus*

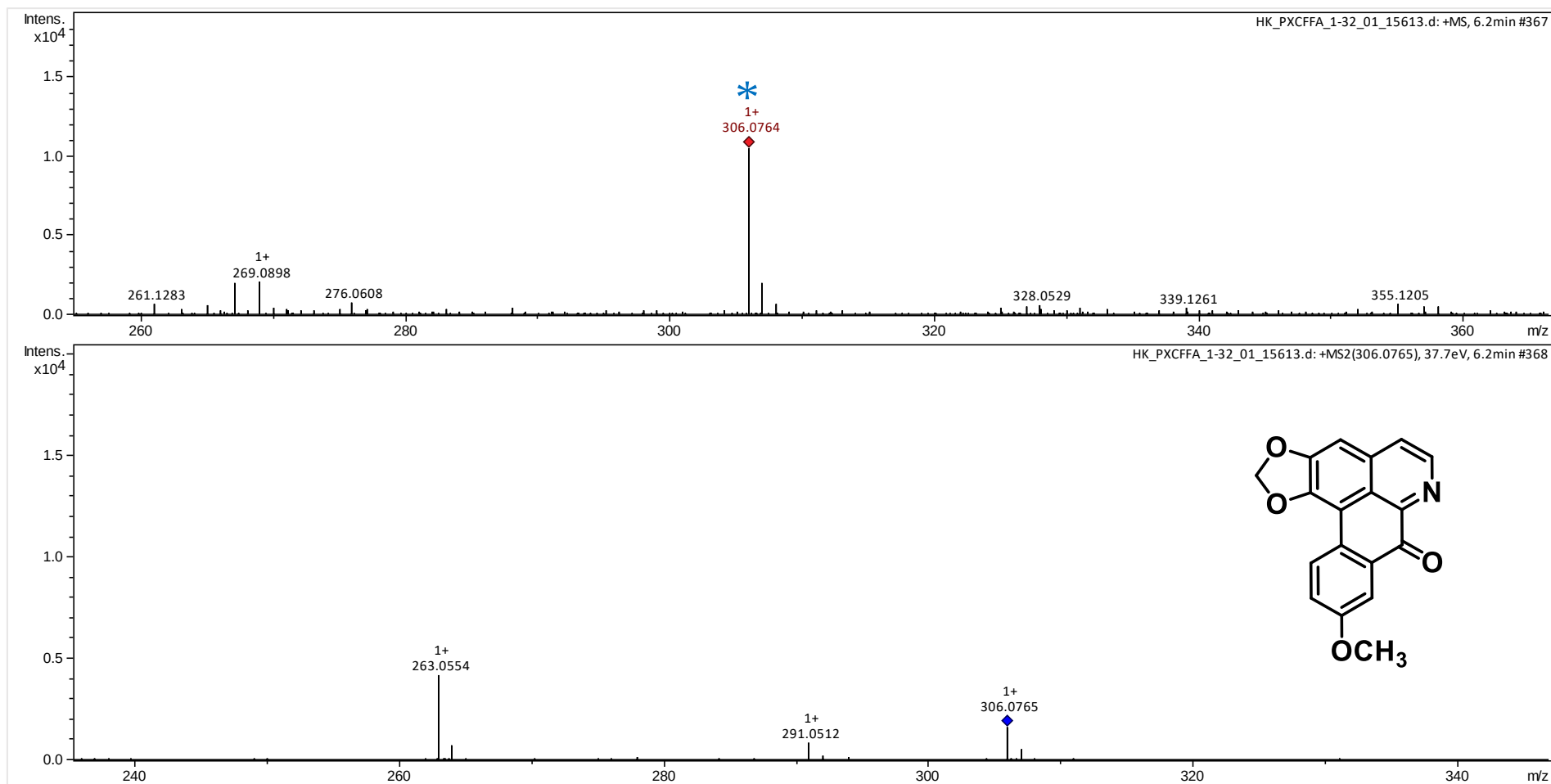


Figura 29 - Espectro de MS e MS/MS do composto lanuginosina (B4) identificado na espécie *P. leiophylla*

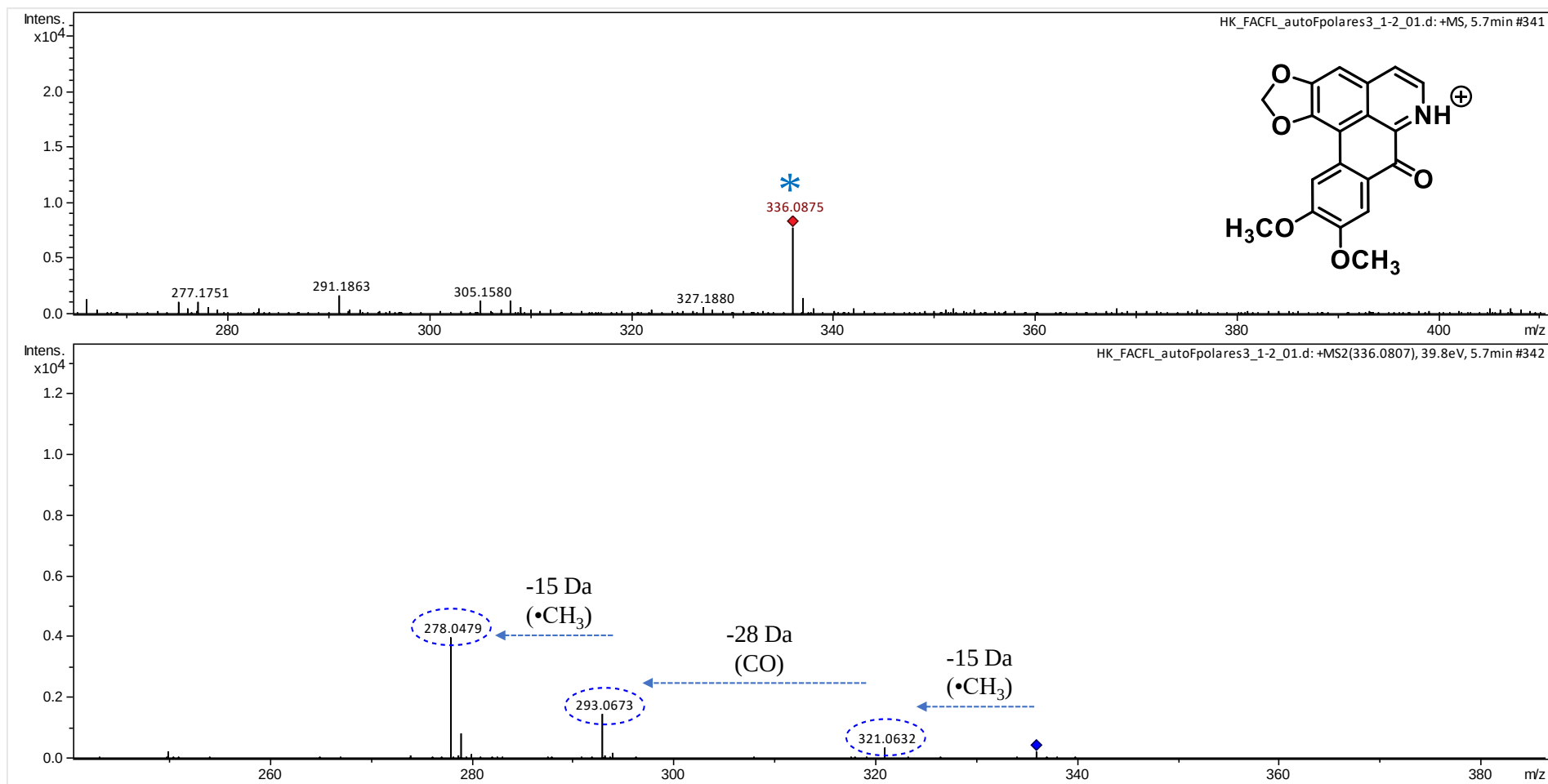


Figura 30 - Espectro de MS e MS/MS do composto dicentrinona (B5) identificado na espécie *F. longifolia* (caule)

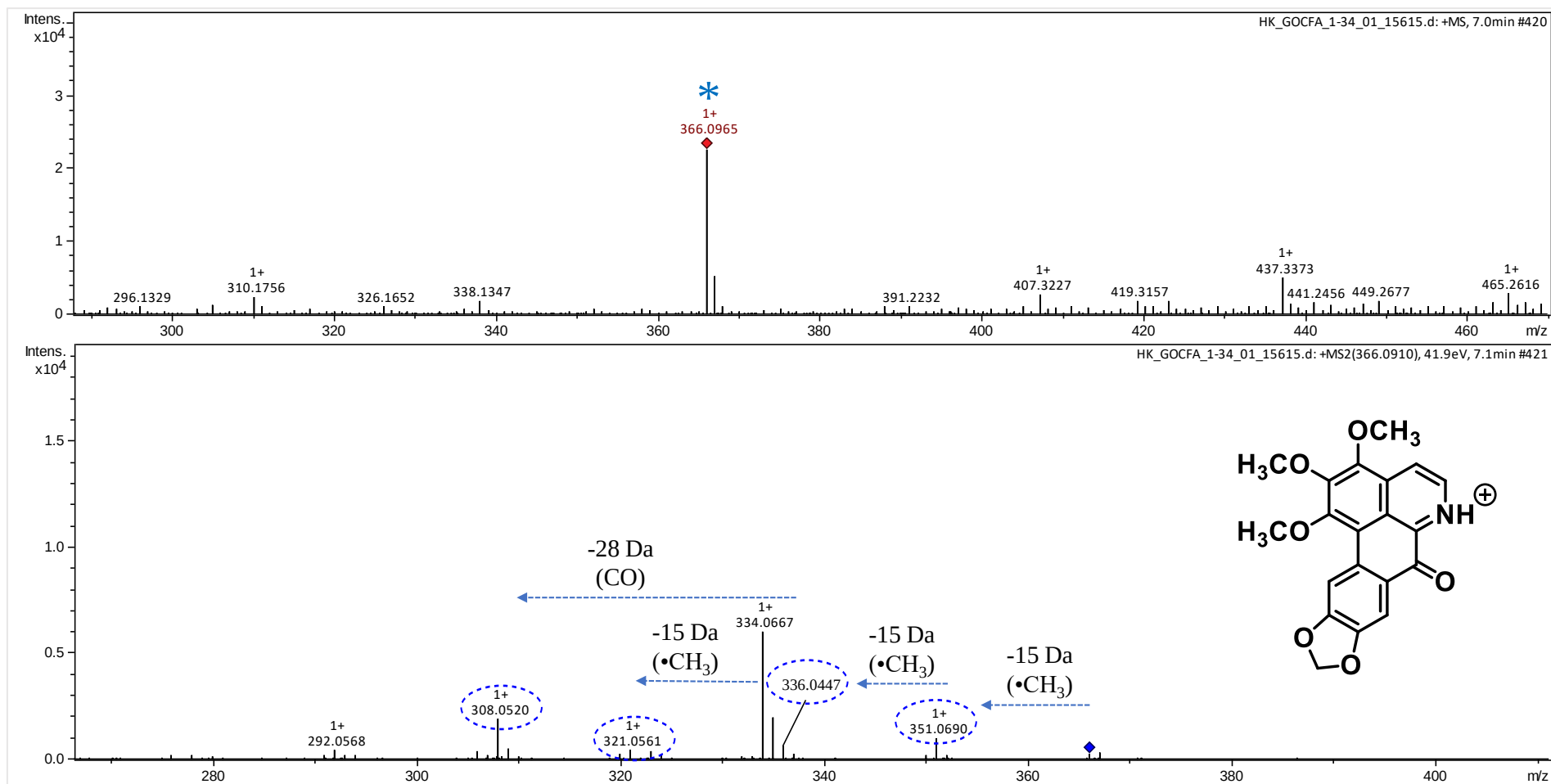


Figura 31 - Espectro de MS e MS/MS do composto oxofoebina (B6) identificado na espécie *G. olivacea*

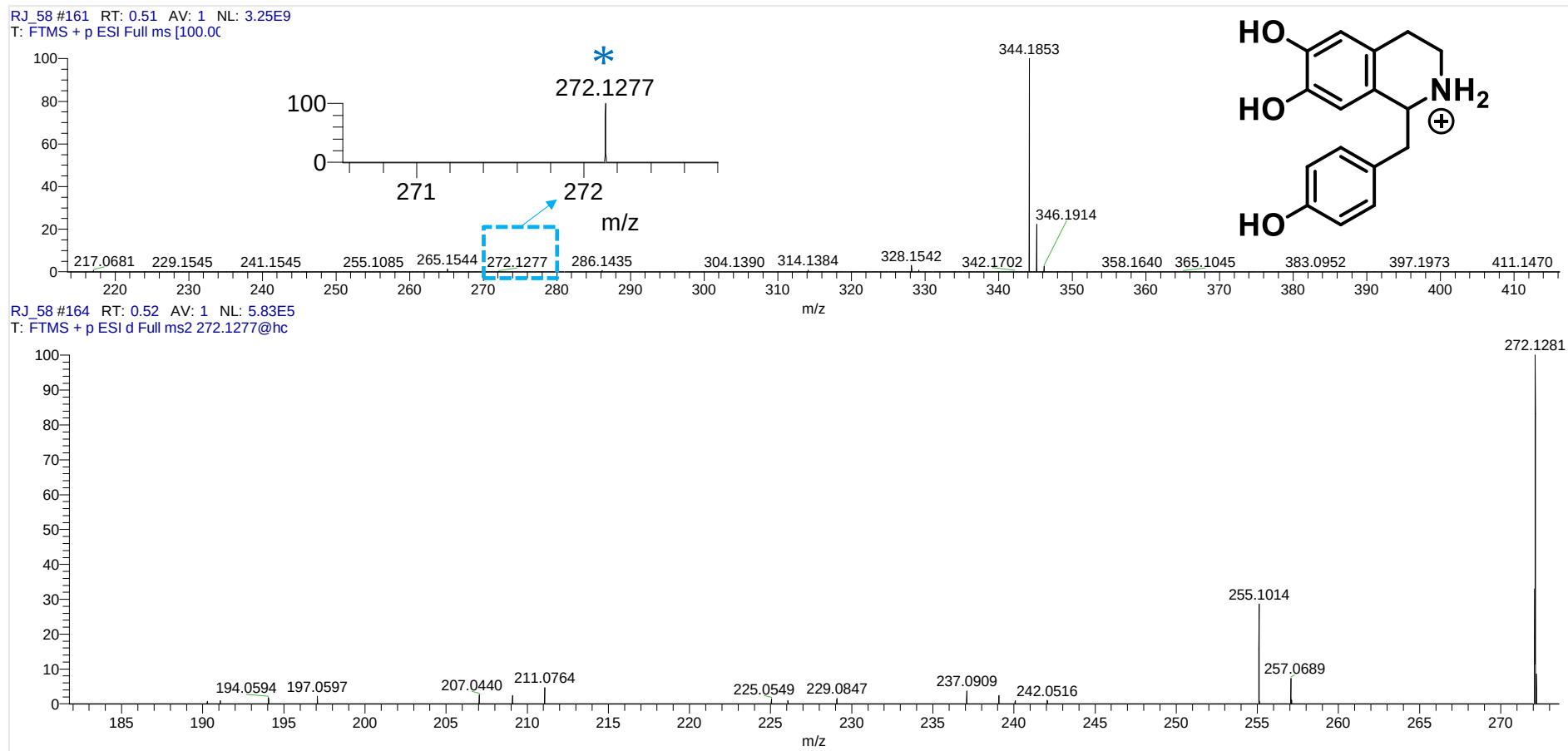


Figura 32 - Espectro de MS e MS/MS do composto desmetilcoclaurina (C1) identificado na espécie *E. amazonicus*

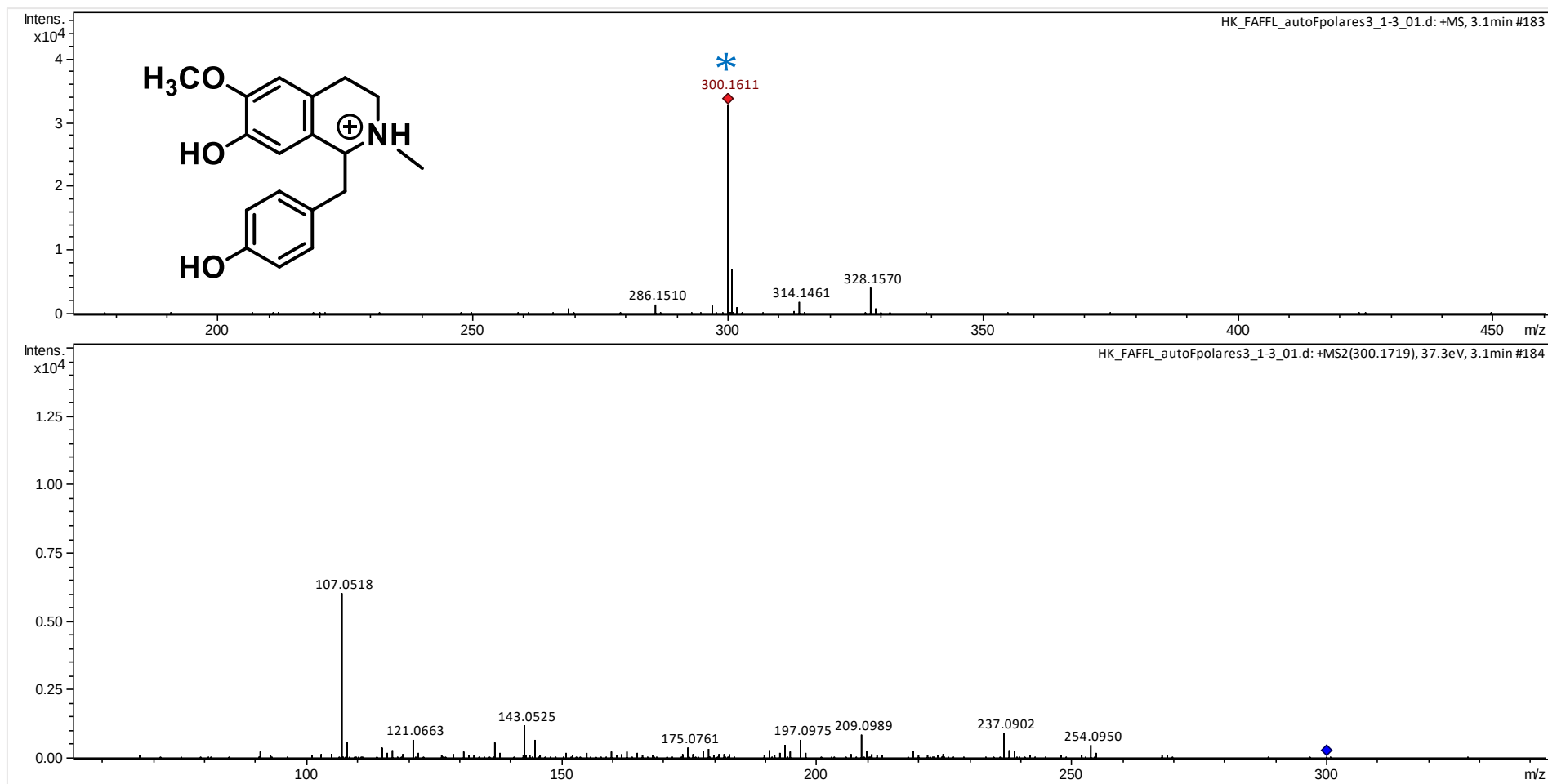


Figura 34 - Espectro de MS e MS/MS do composto *N*-metilcoclorina (C3) identificado na espécie *F. longifolia* (folha)

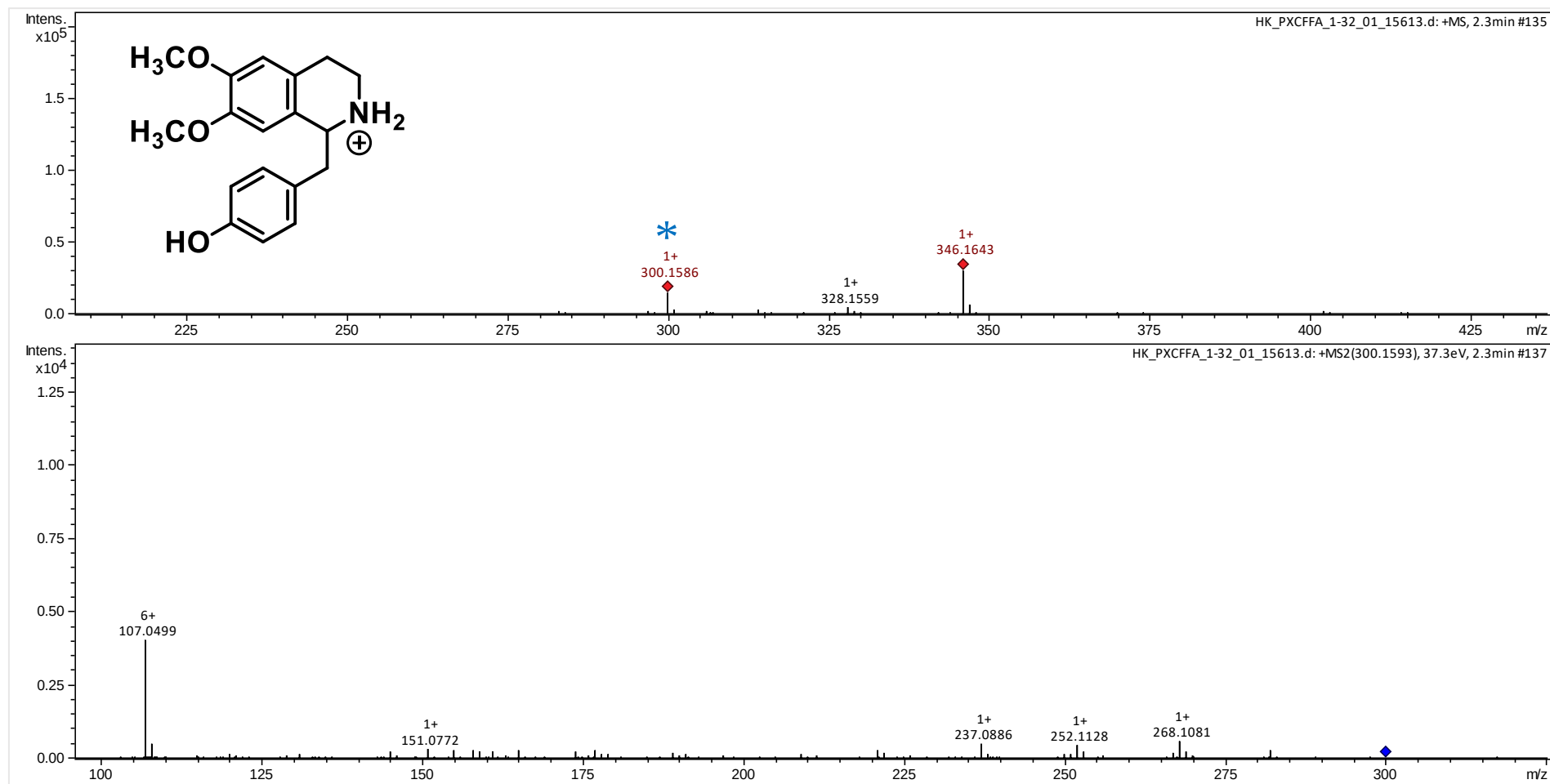


Figura 35 - Espectro de MS e MS/MS do composto norarmepavina (C4) identificado na espécie *P. leiophylla*

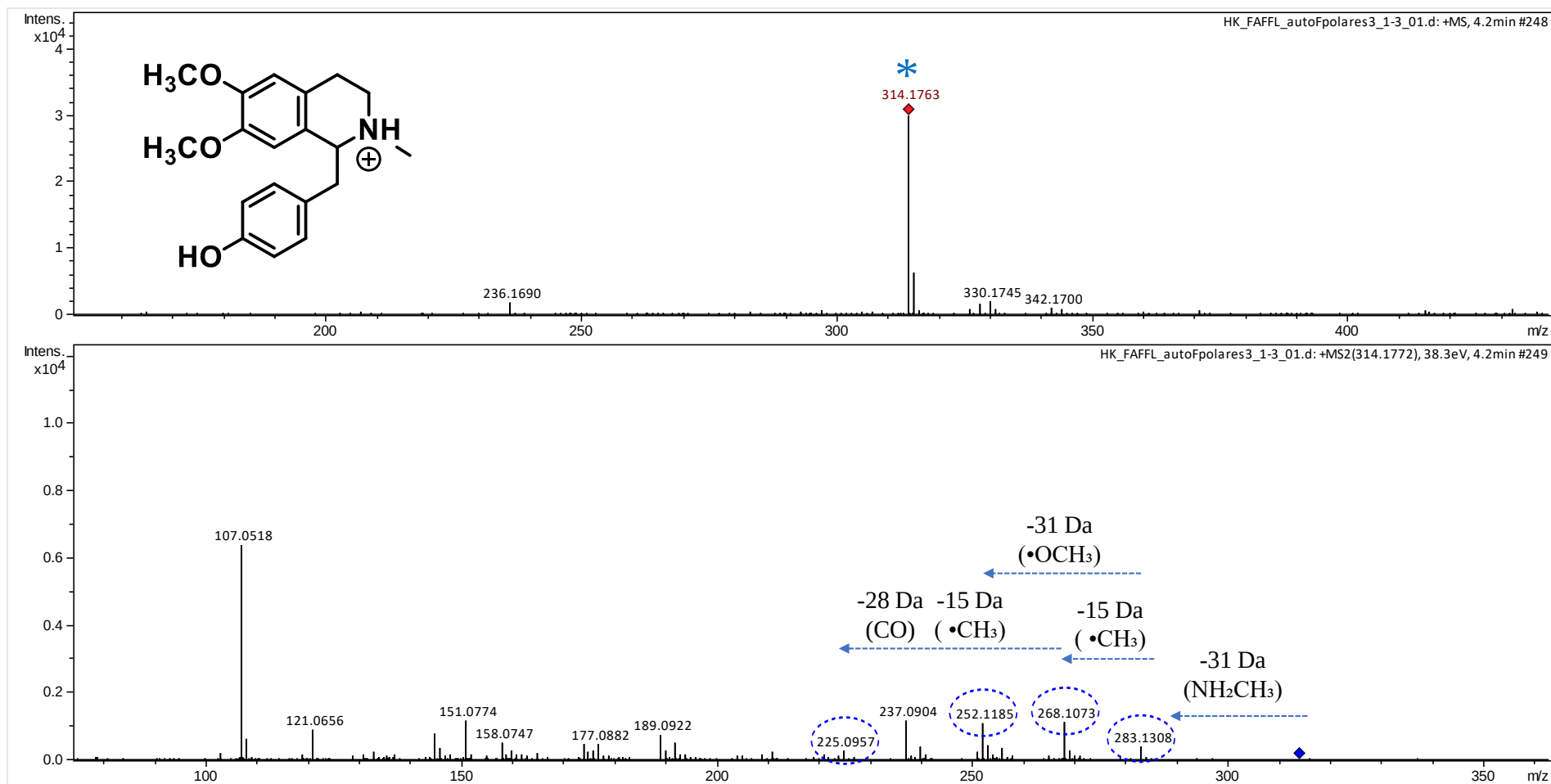


Figura 36 - Espectro de MS e MS/MS do composto armepavina (C5) identificado na espécie *F. longifolia* (folha)

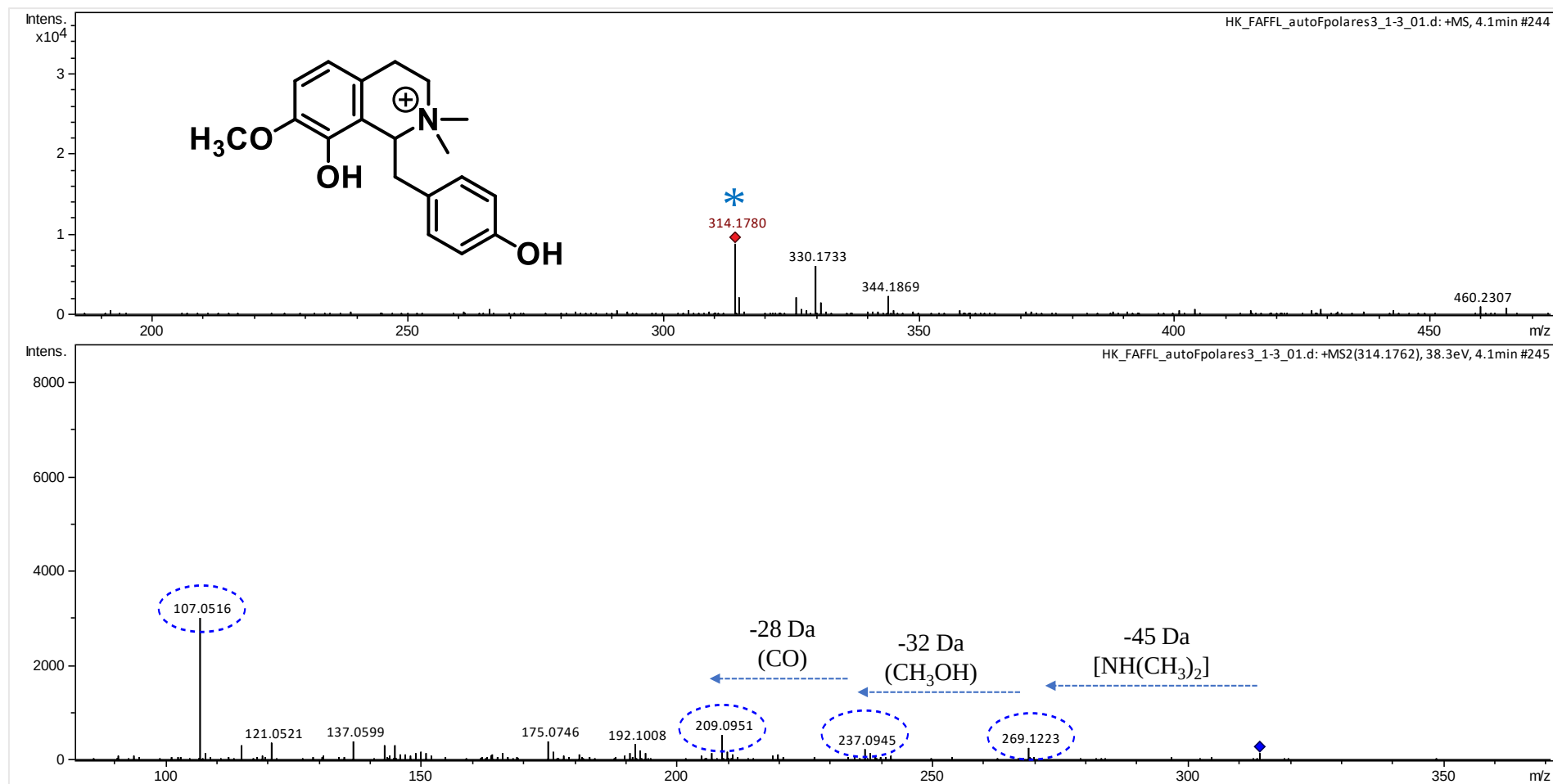


Figura 37 - Espectro de MS e MS/MS do composto oblongina (C6) identificado na espécie *F. longifolia* (folha)

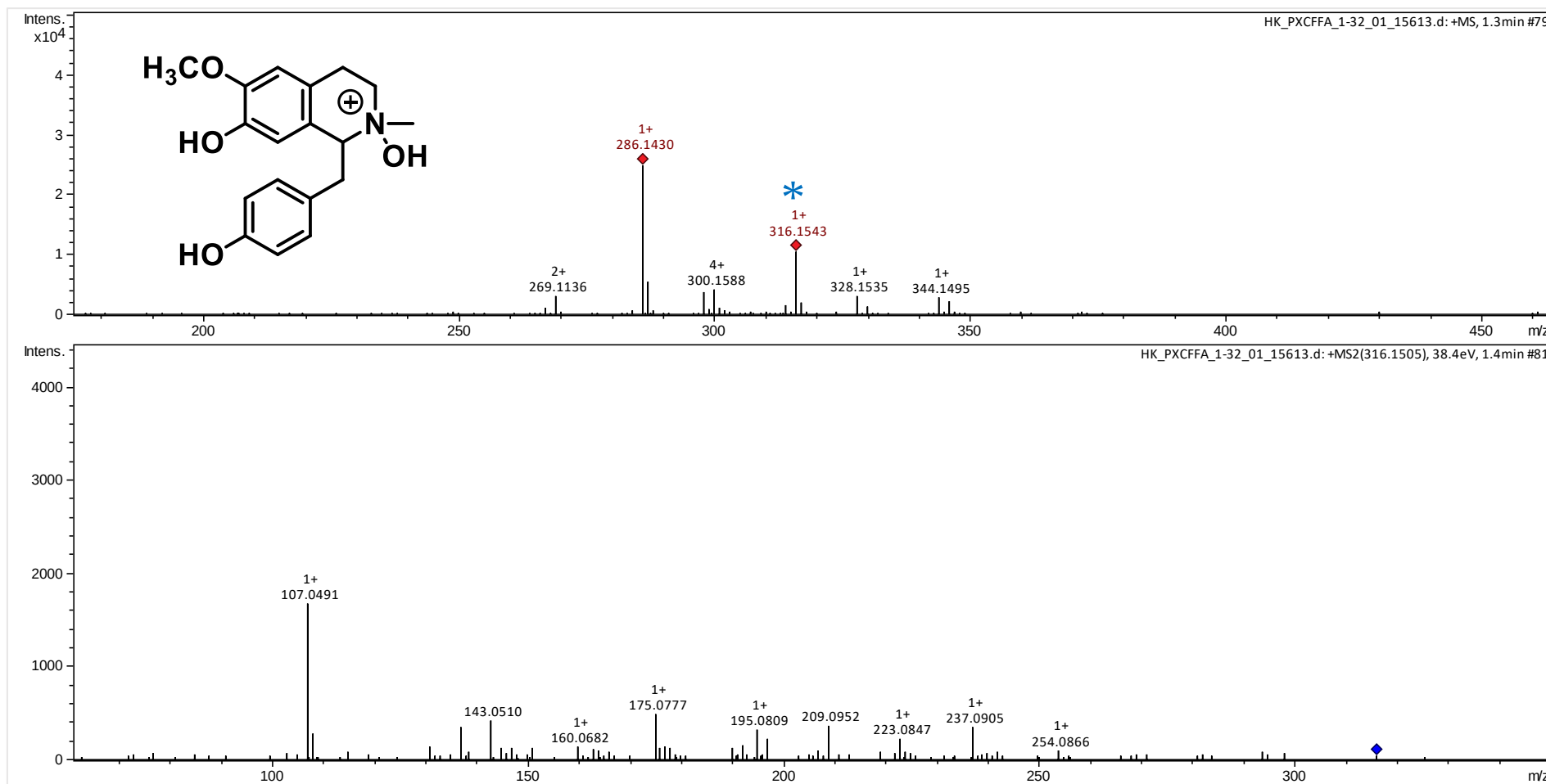


Figura 38 - Espectro de MS e MS/MS do composto *N*-óxido de *N*-metilcoclaurina (C7) identificado na espécie *P. leiophylla*

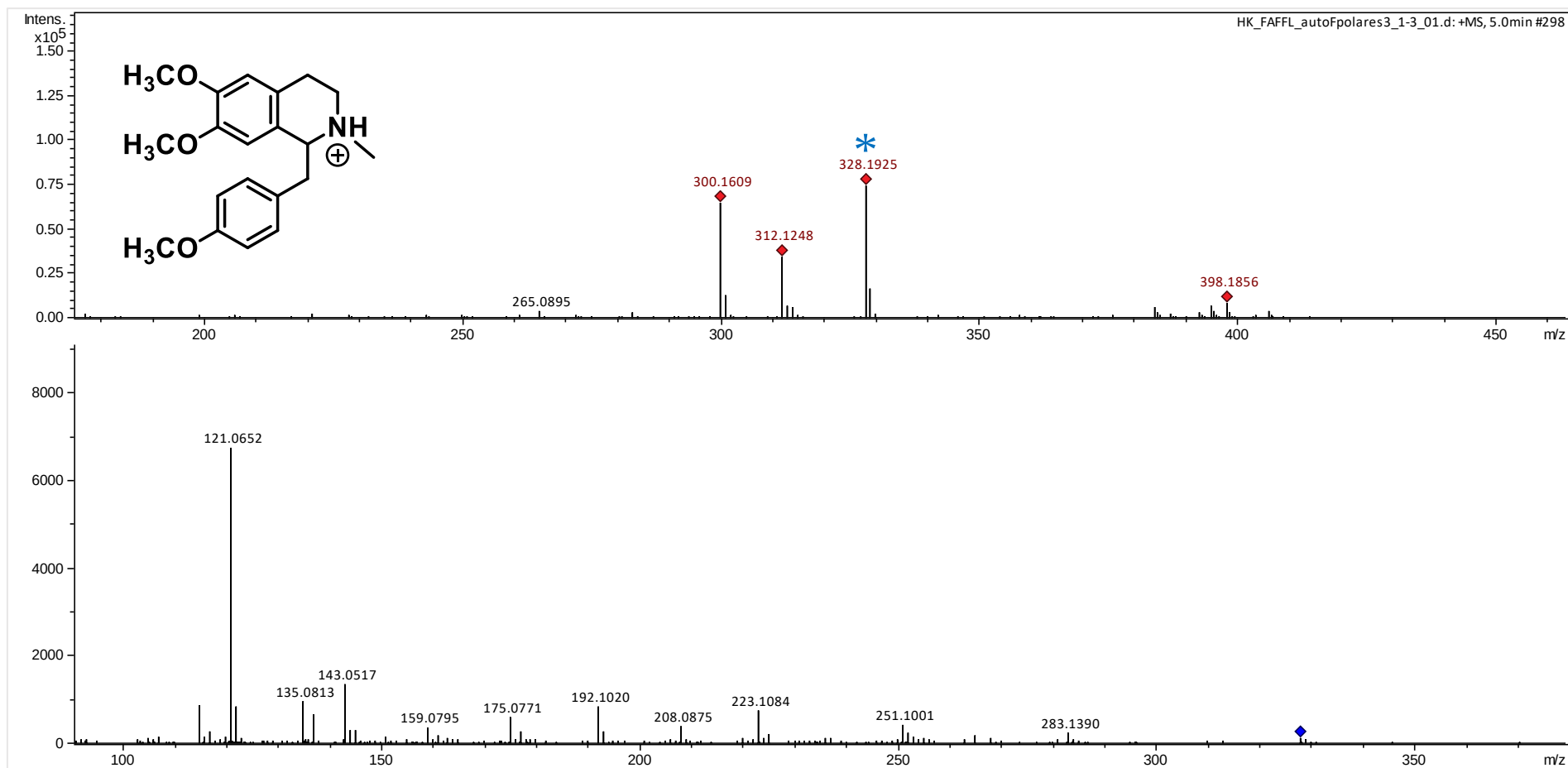


Figura 39 - Espectro de MS e MS/MS do composto *O*-metilarmepavina (C8) identificado na espécie *F. longifolia* (folha)

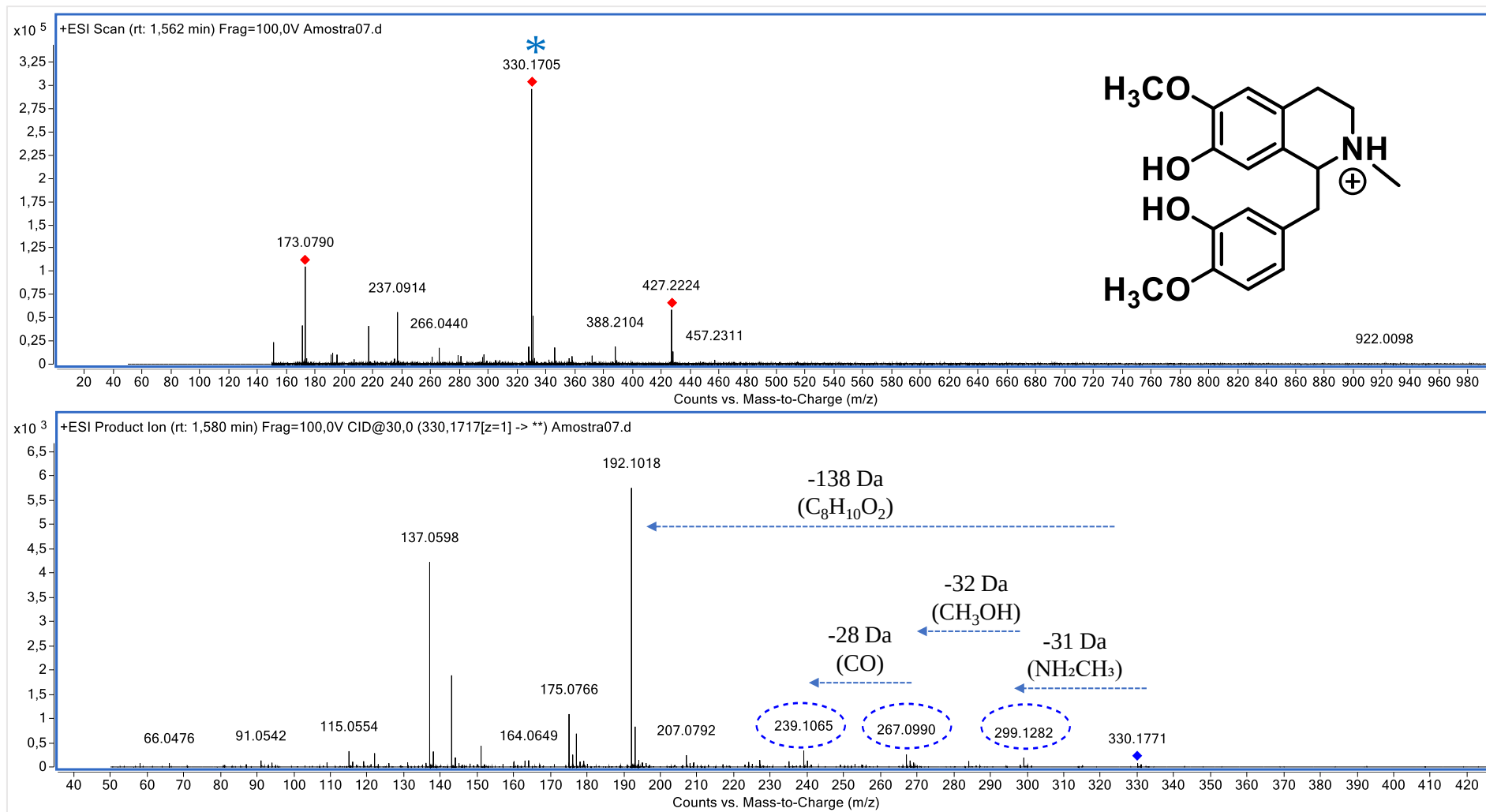


Figura 40 - Espectro de MS e MS/MS do composto reticulina (C9) identificado na espécie *D. surinamensis*

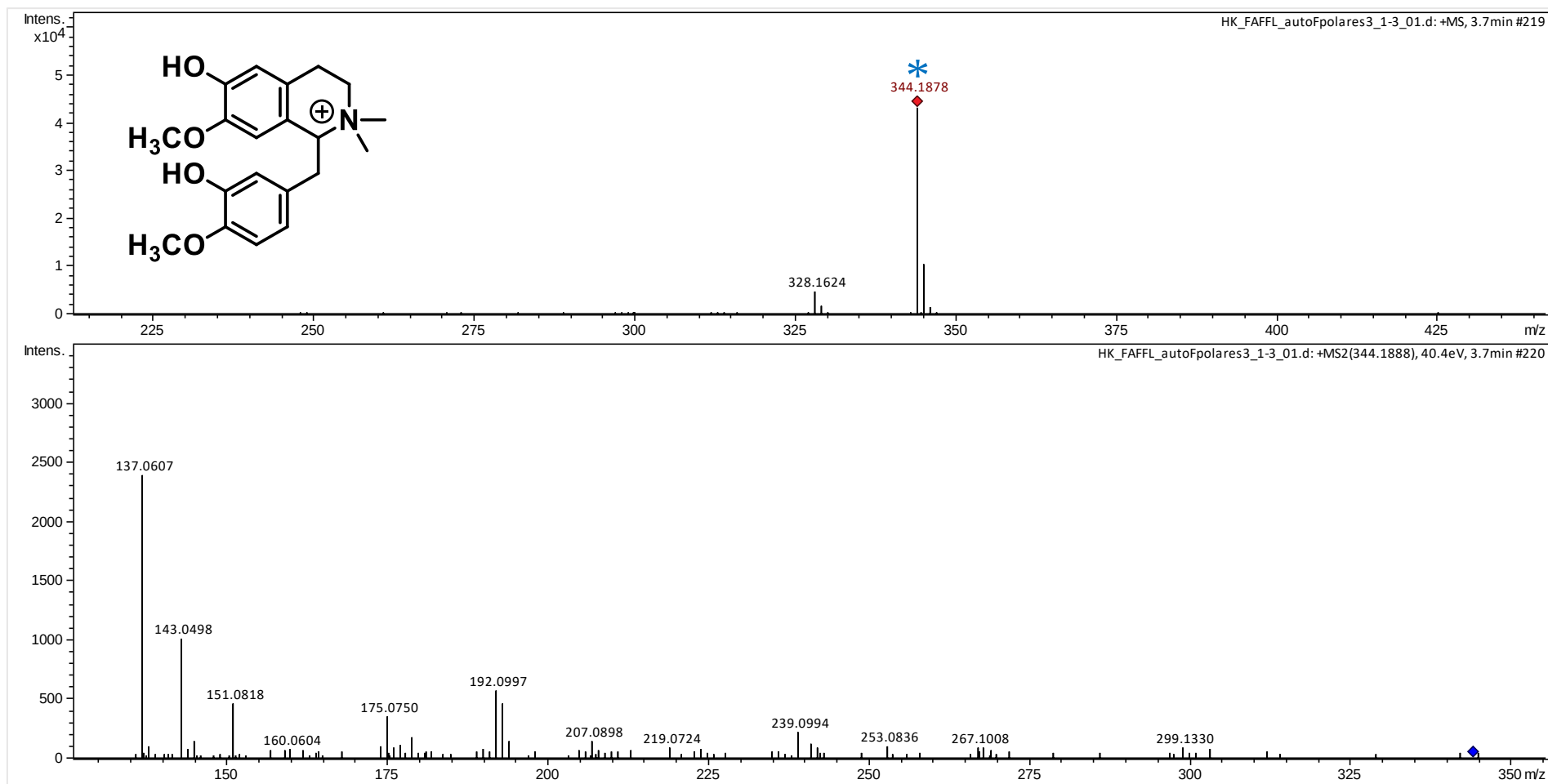


Figura 41 - Espectro de MS e MS/MS do composto xilopinidina (C10) identificado na espécie *F. longifolia* (folha)

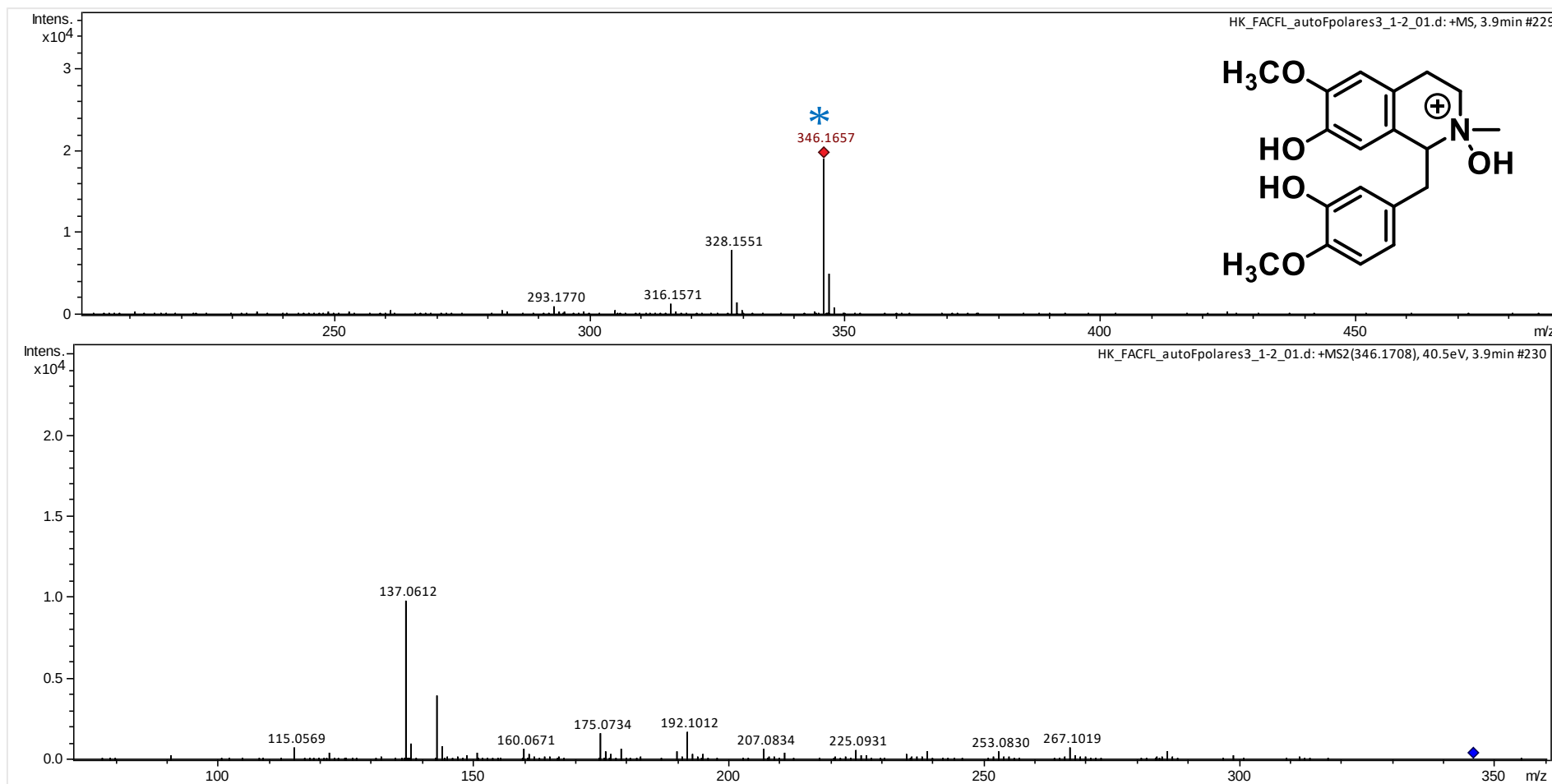


Figura 42 - Espectro de MS e MS/MS do composto *N*-óxido de reticulina (C11) identificado na espécie *F. longifolia* (caule)

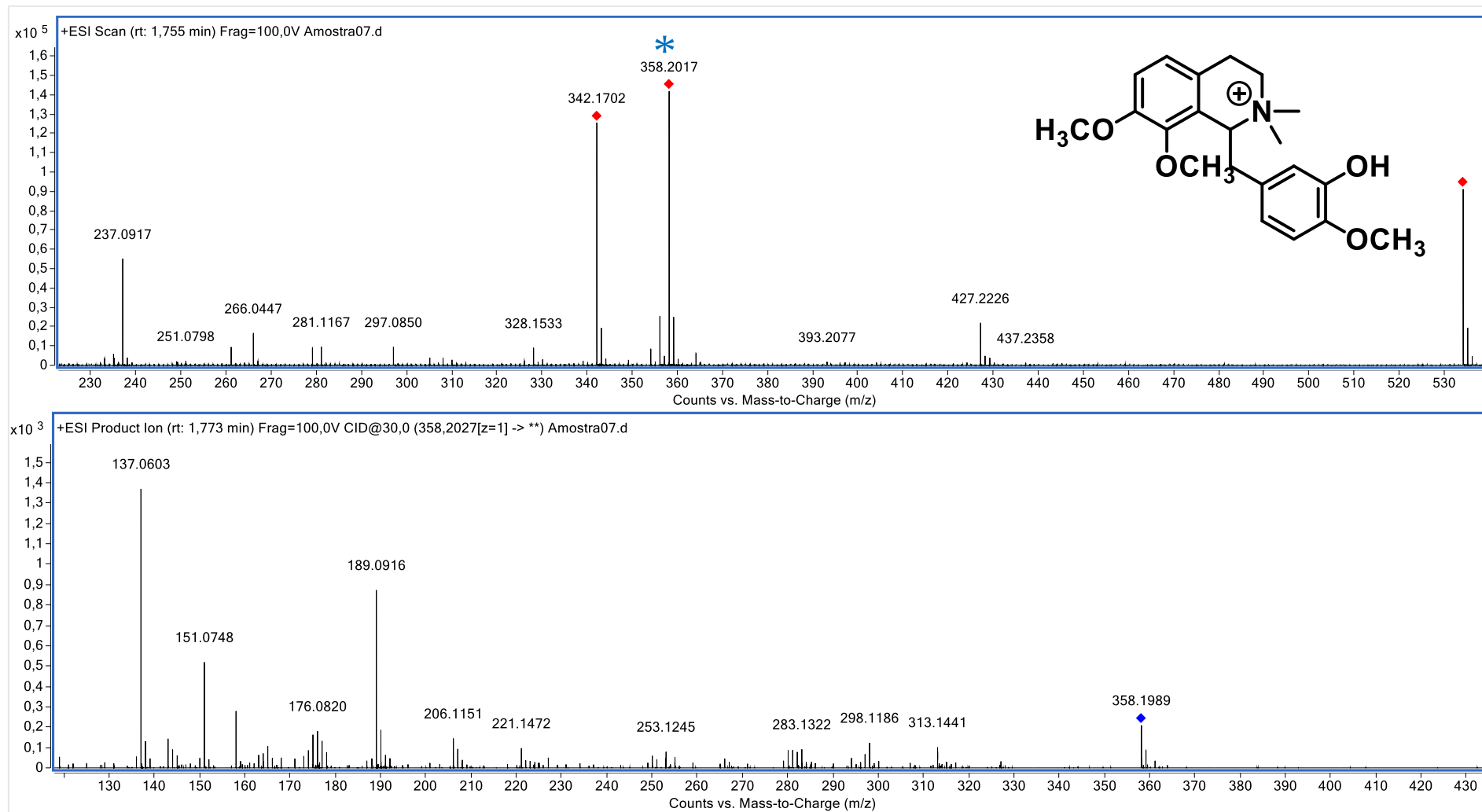


Figura 43 - Espectro de MS e MS/MS do composto 8-metoxi-isotembetetrina (C12) identificado na espécie *D. surinamensis*

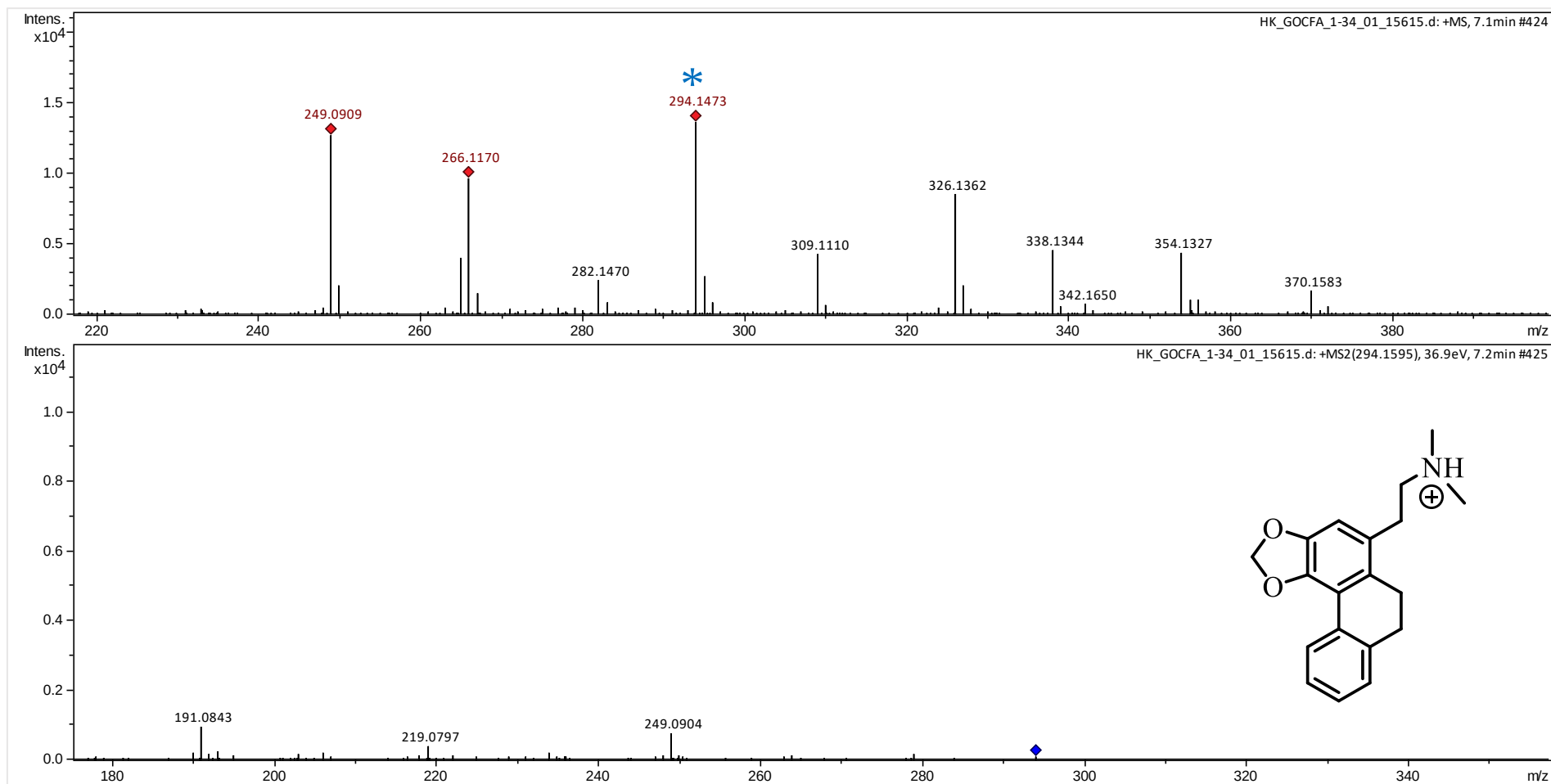


Figura 44 - Espectro de MS e MS/MS do composto estefenantrina (E1) identificado na espécie *G. olivacea*

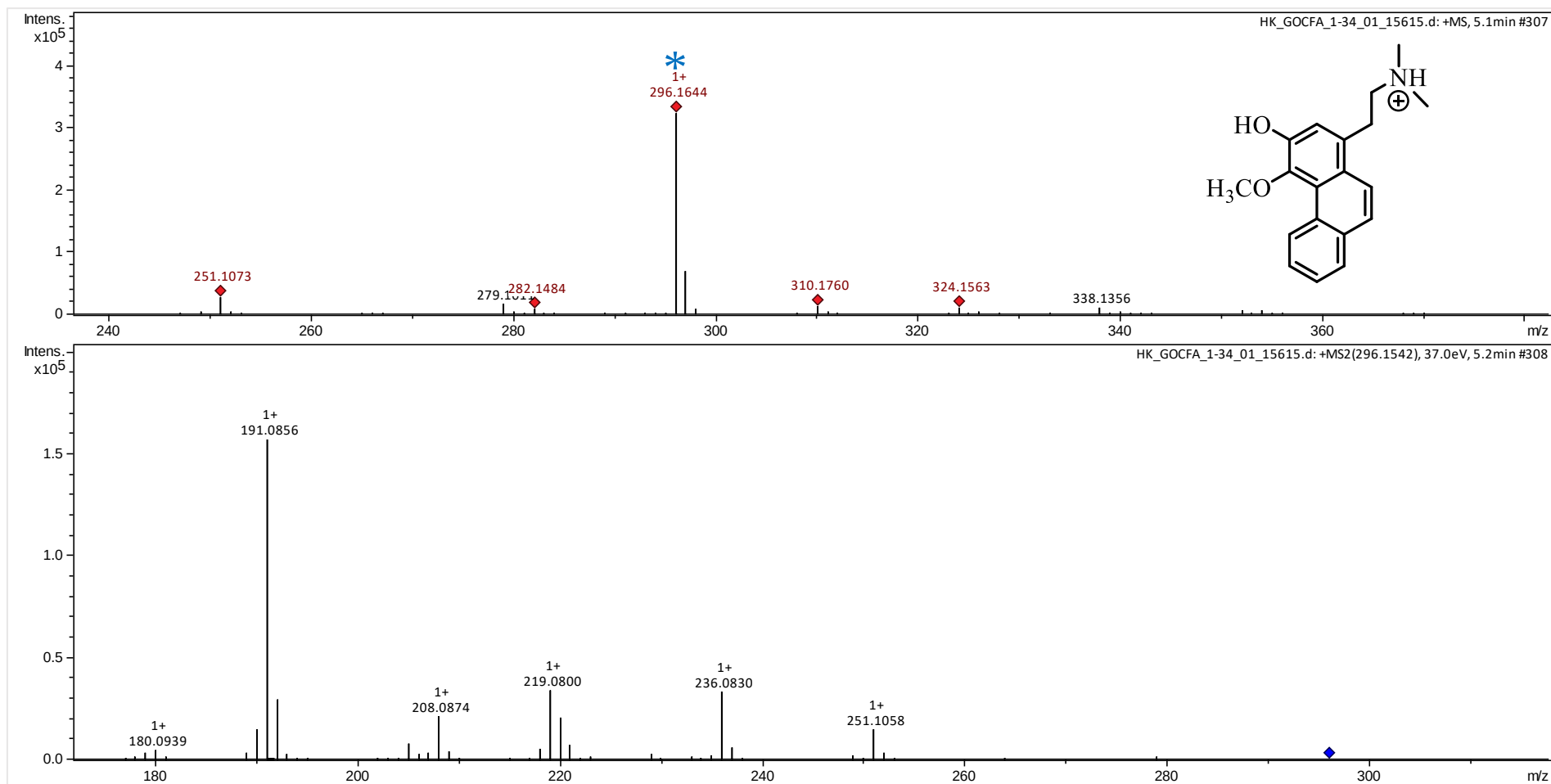


Figura 45 - Espectro de MS e MS/MS do composto argentinina (E2) identificado na espécie *G. olivacea*

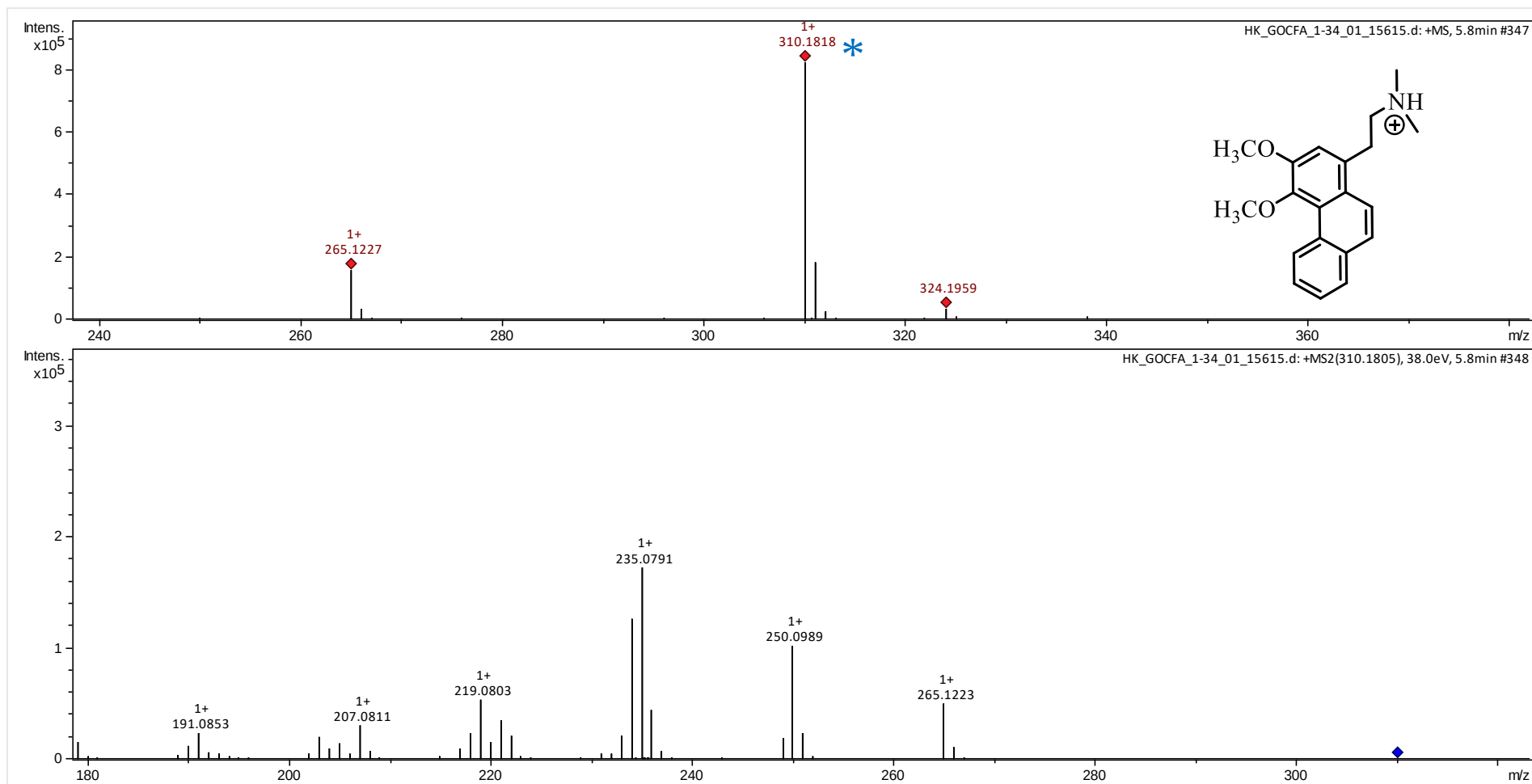


Figura 46 - Espectro de MS e MS/MS do composto atersperminina (E3) identificado na espécie *G. olivacea*

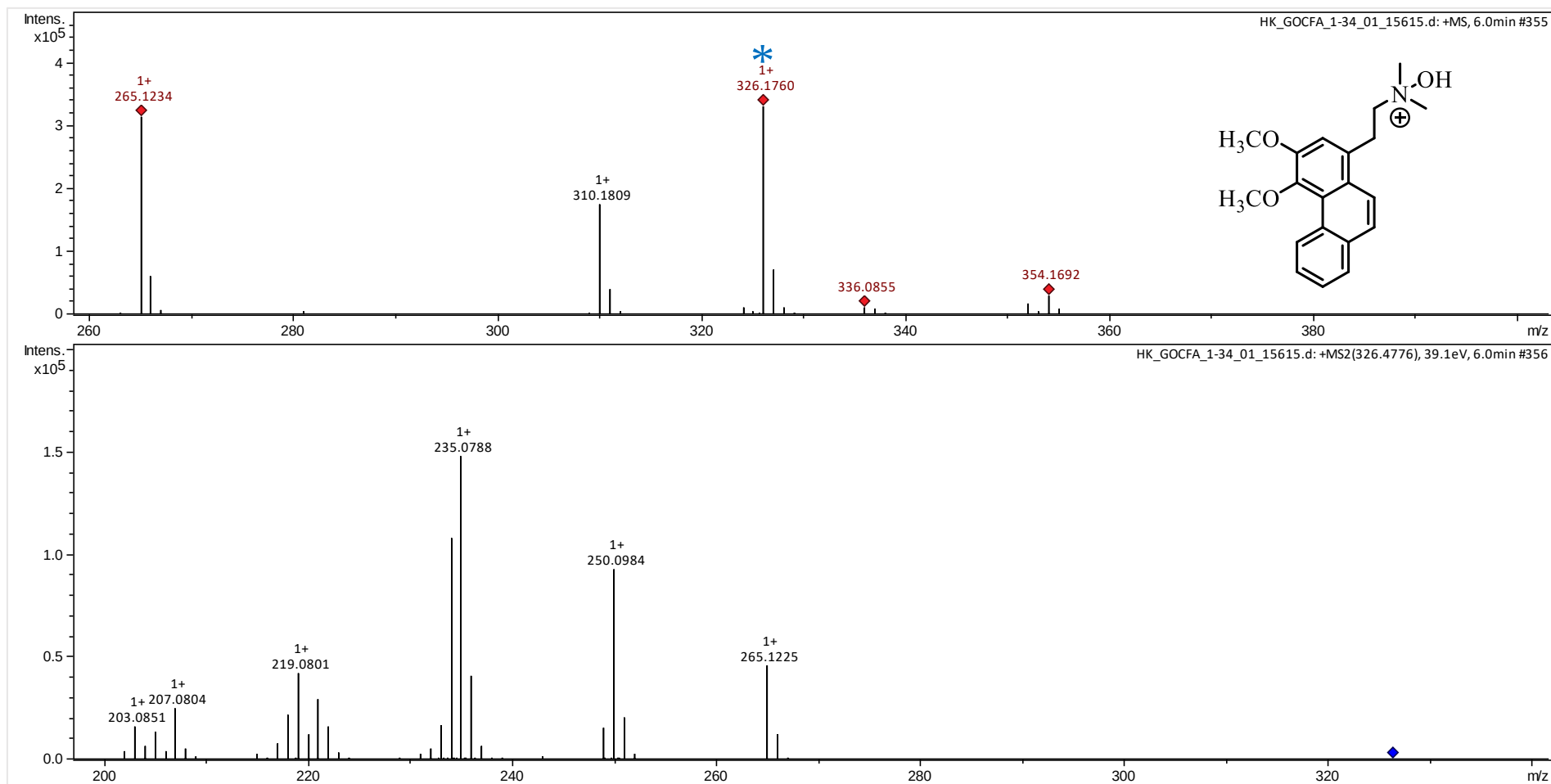


Figura 47 - Espectro de MS e MS/MS do composto *N*-óxido aterosperminina (E4) identificado na espécie *G. olivacea*

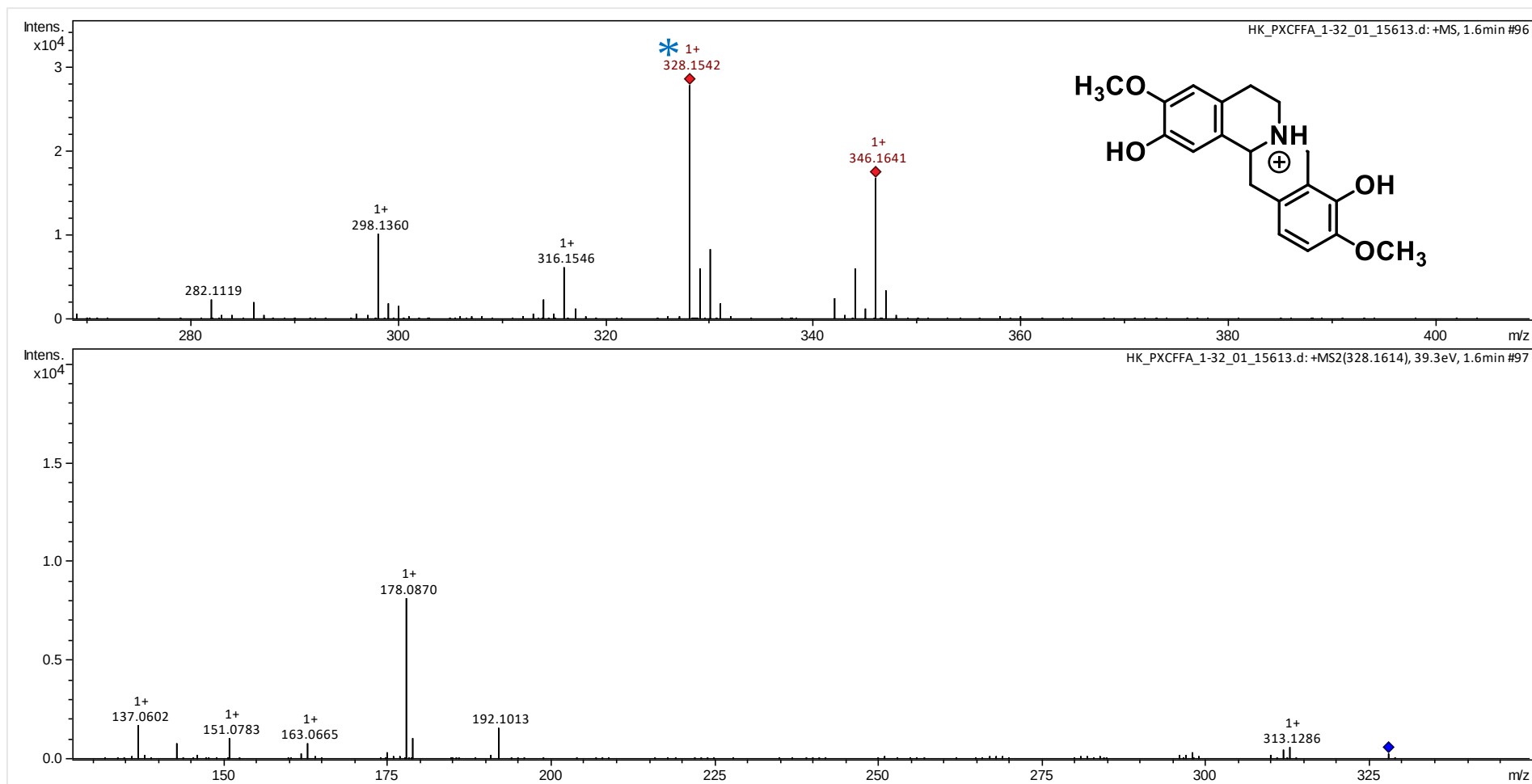


Figura 48 - Espectro de MS e MS/MS do composto estefolidina (F1) identificado na espécie *P. leiophylla*.

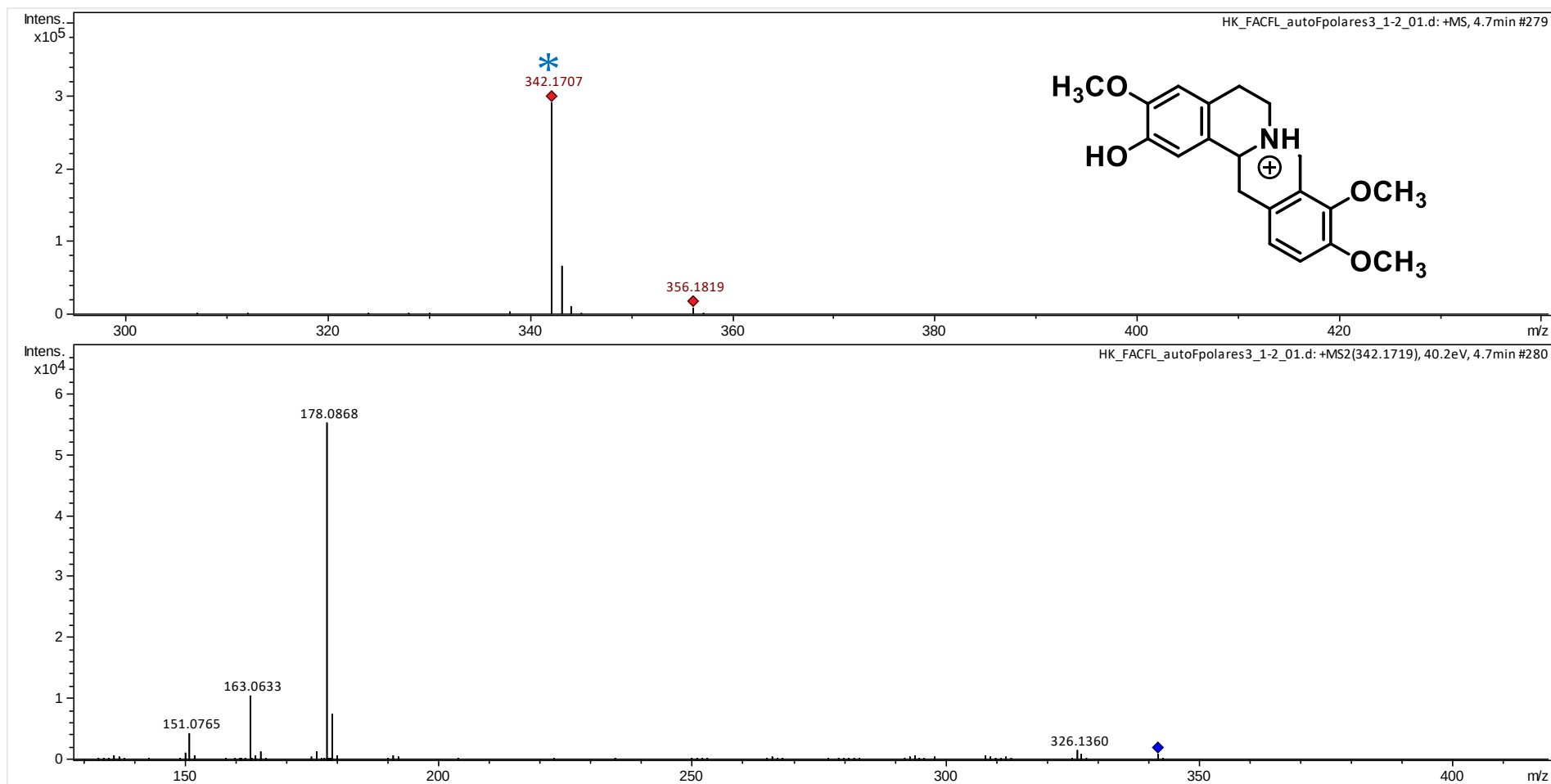


Figura 49 - Espectro de MS e MS/MS do composto isocoripalmina (F2) identificado na espécie *F. longifolia* (caule)

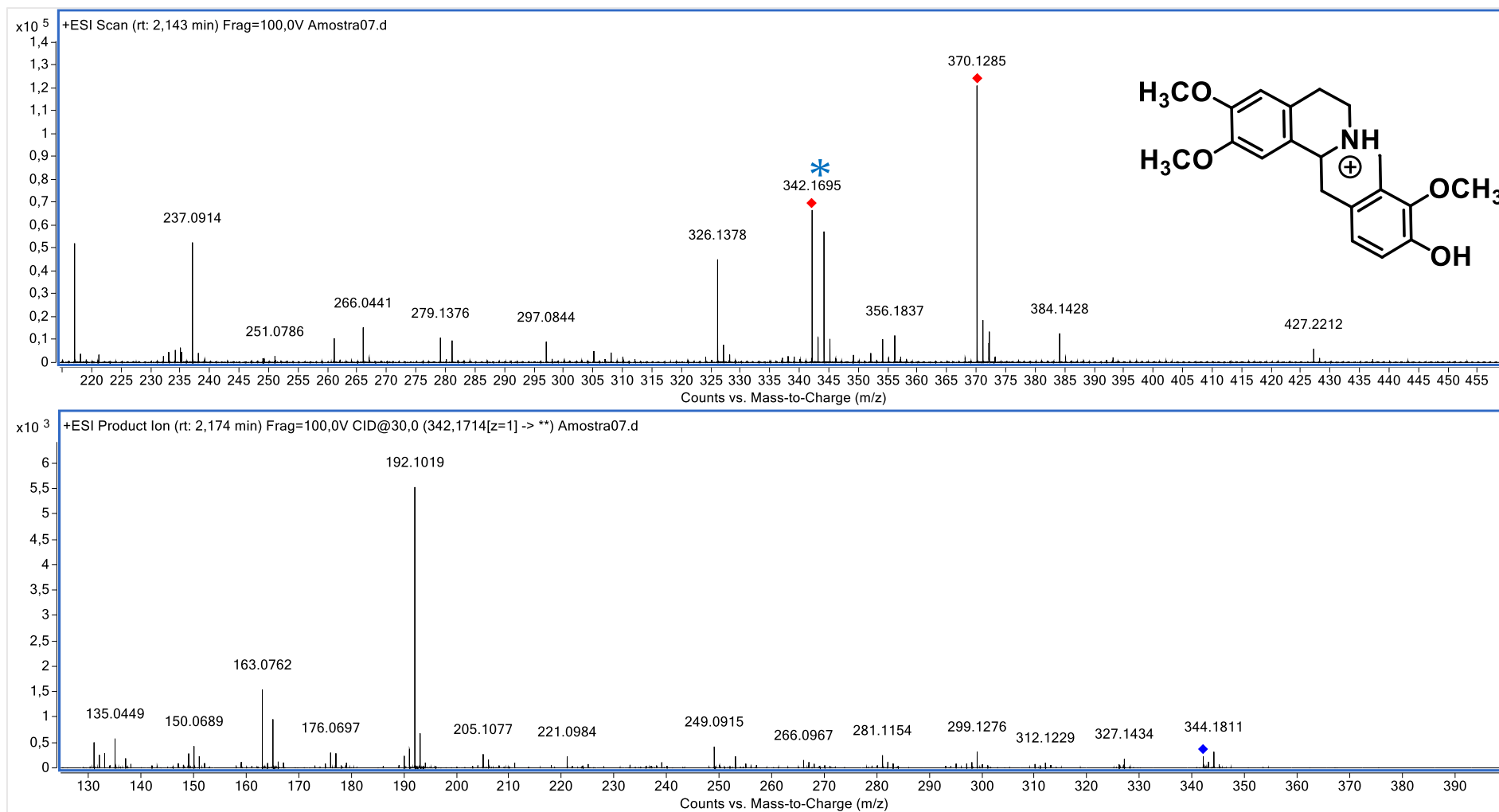


Figura 50 - Espectro de MS e MS/MS do composto coridalmine (F3) identificado na espécie *D. surinamensis*

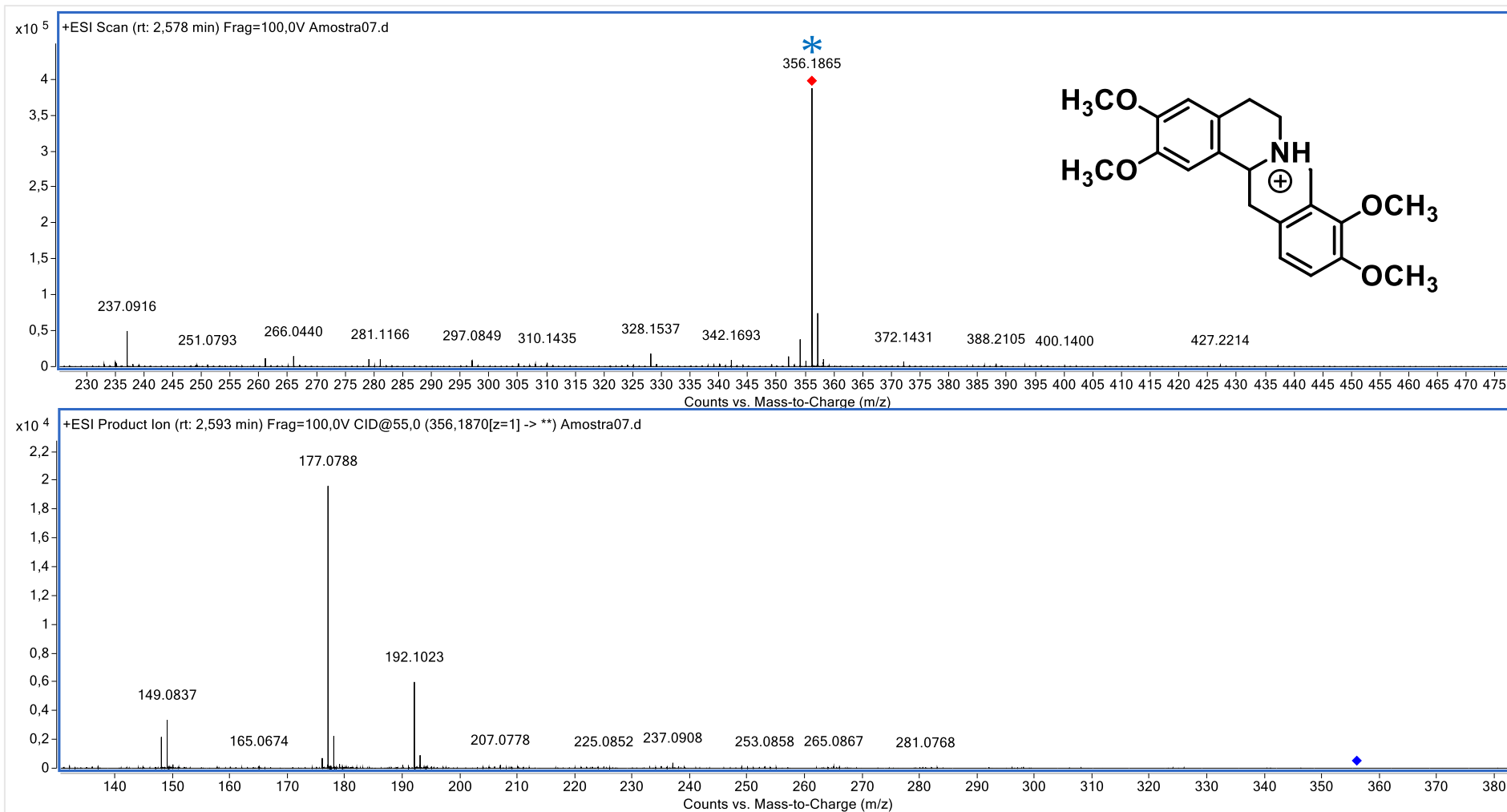


Figura 51 - Espectro de MS e MS/MS do composto tetraidropalmatina (F4) identificado na espécie *D. surinamensis*

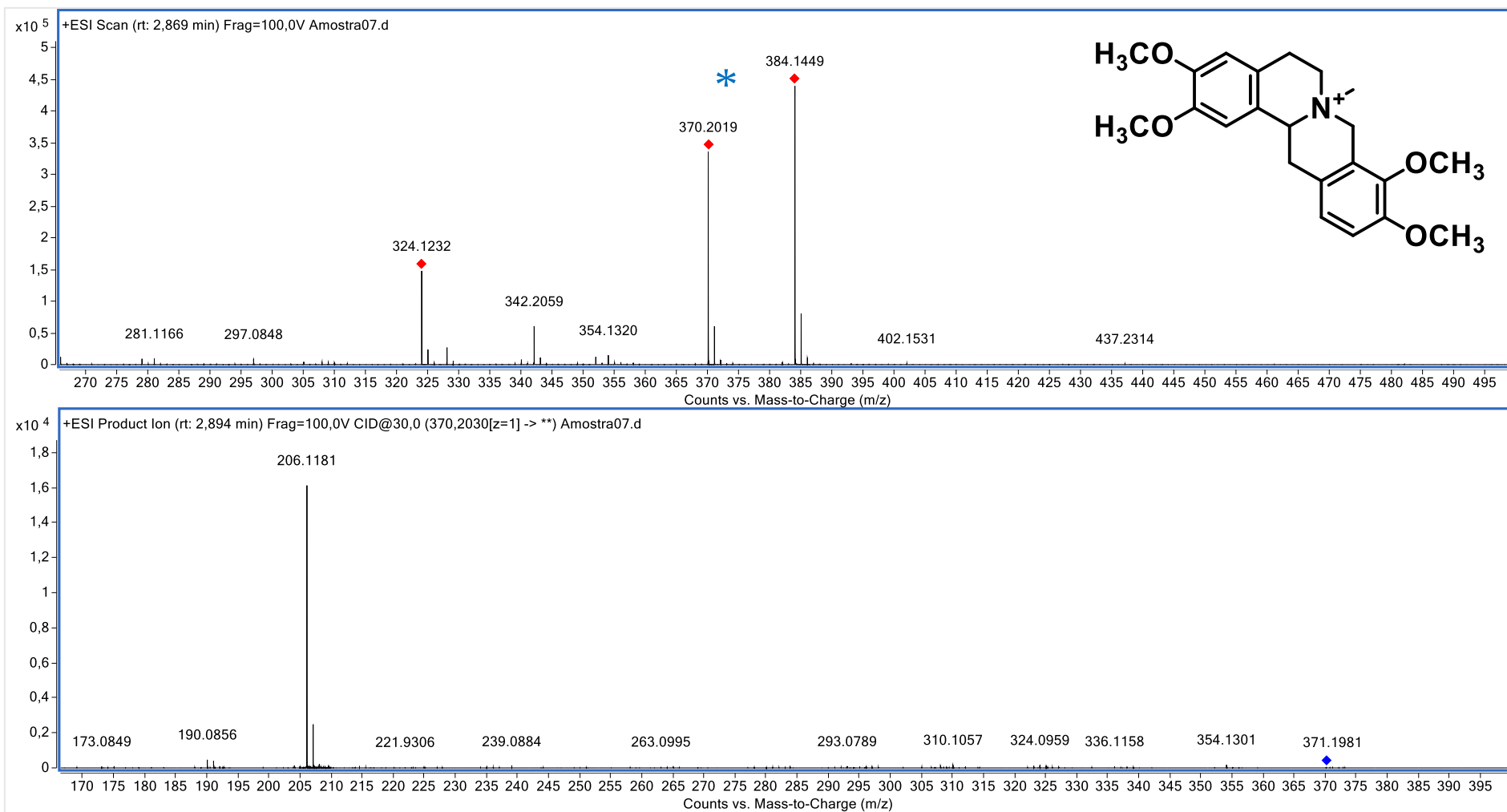


Figura 52 - Espectro de MS e MS/MS do composto *N*-metiltetraidropalmatina (F5) identificado na espécie *D. surinamensis*

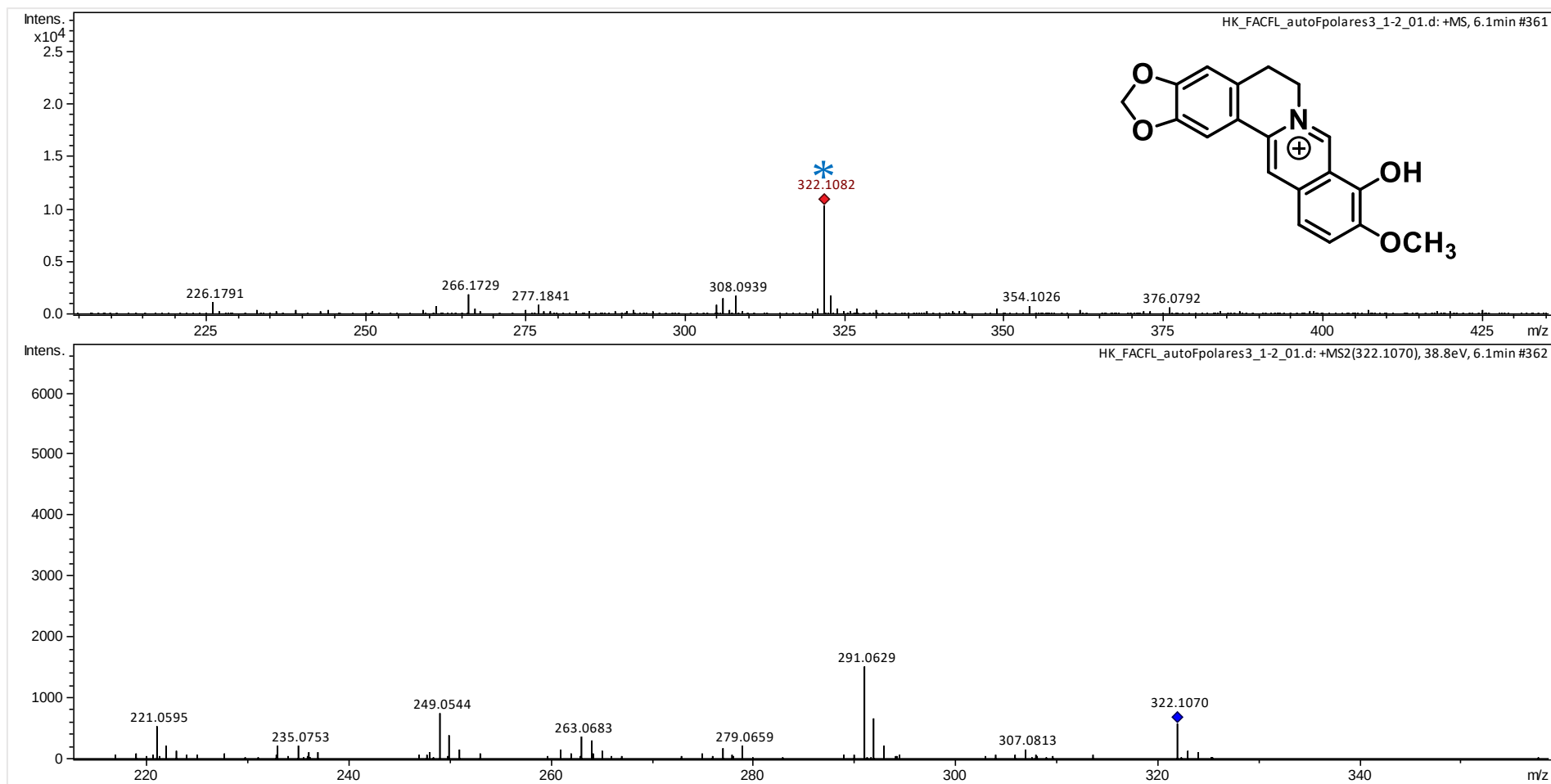


Figura 53 - Espectro de MS e MS/MS do composto berberrubina (G1) identificado na espécie *F. longifolia* (caule)

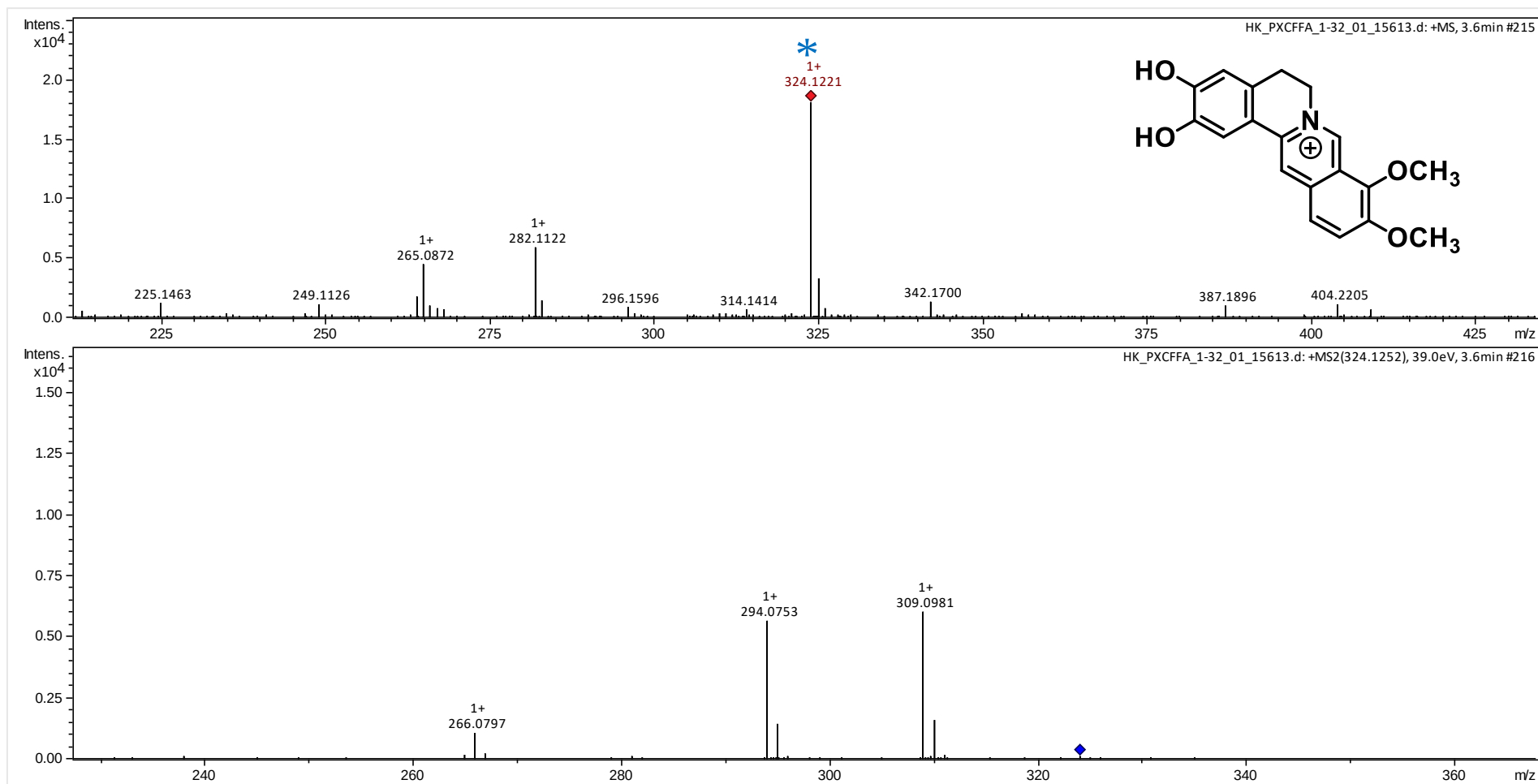


Figura 54 - Espectro de MS e MS/MS do composto demetilenoberberina (G2) identificado na espécie *P. leiophylla*

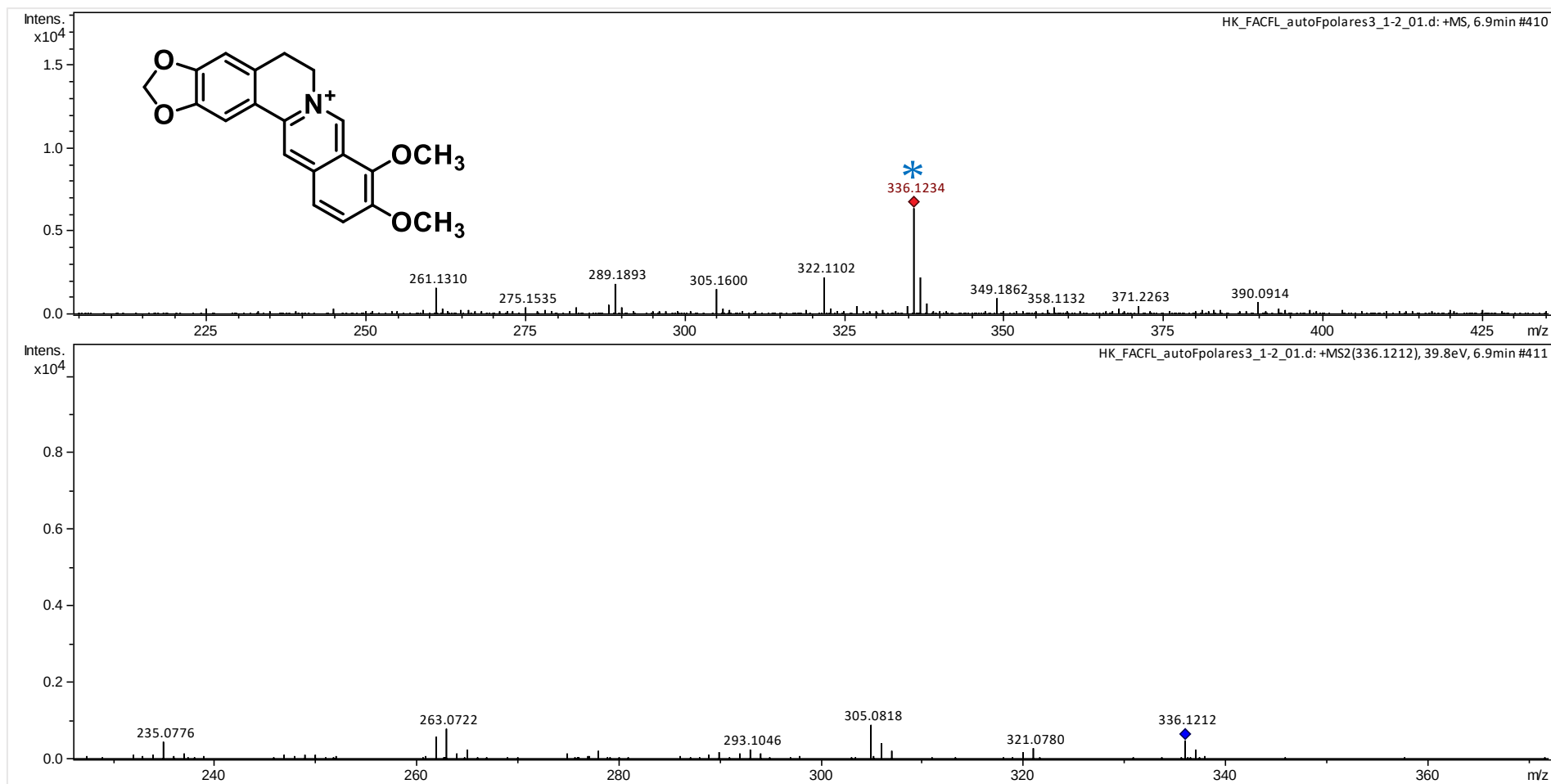


Figura 55 - Espectro de MS e MS/MS do composto berberina (G3) identificado na espécie *F. longifolia* (caule)

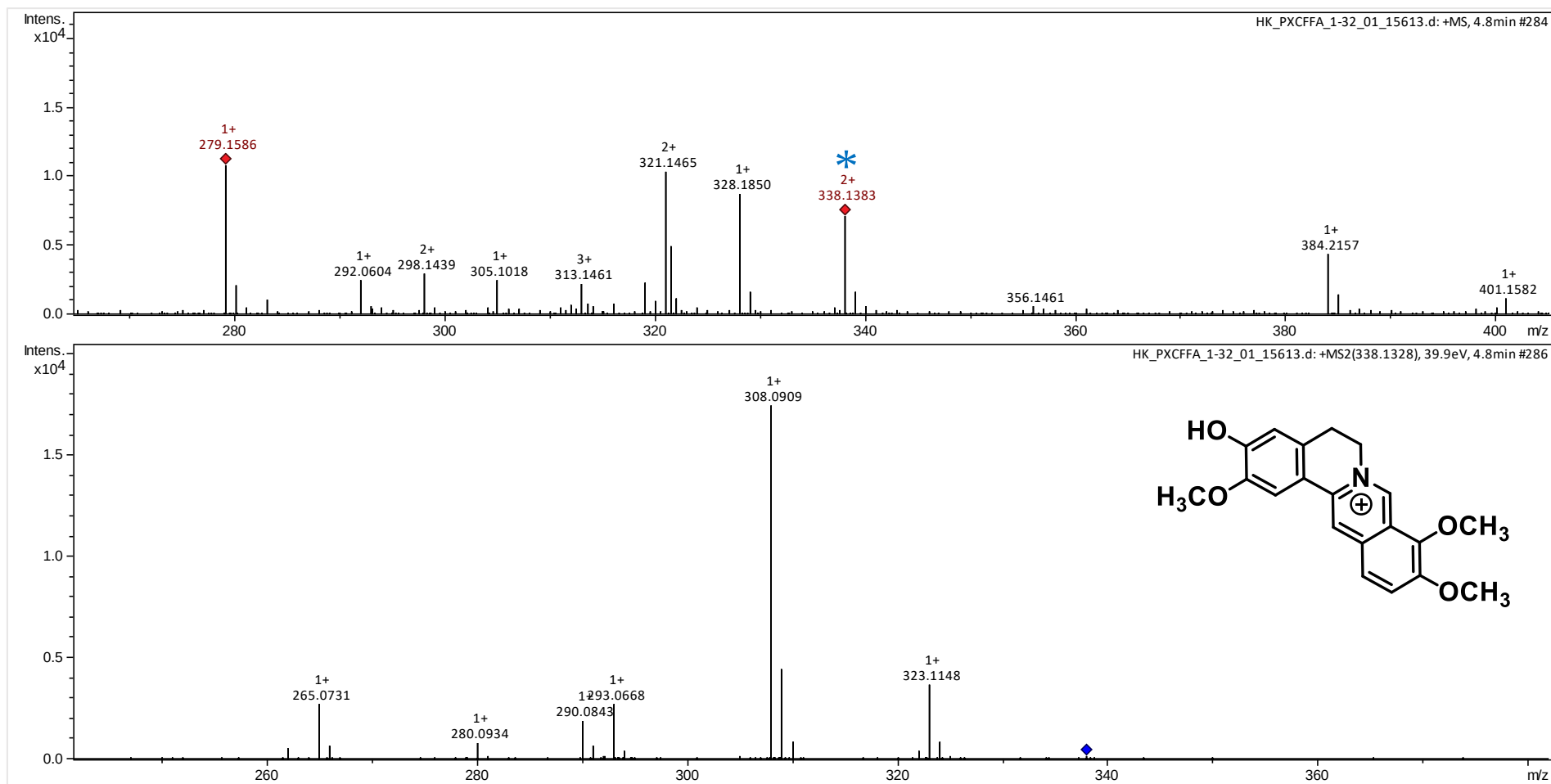


Figura 56 - Espectro de MS e MS/MS do composto jatrorrizina (G4) identificado na espécie *P. leiophylla*

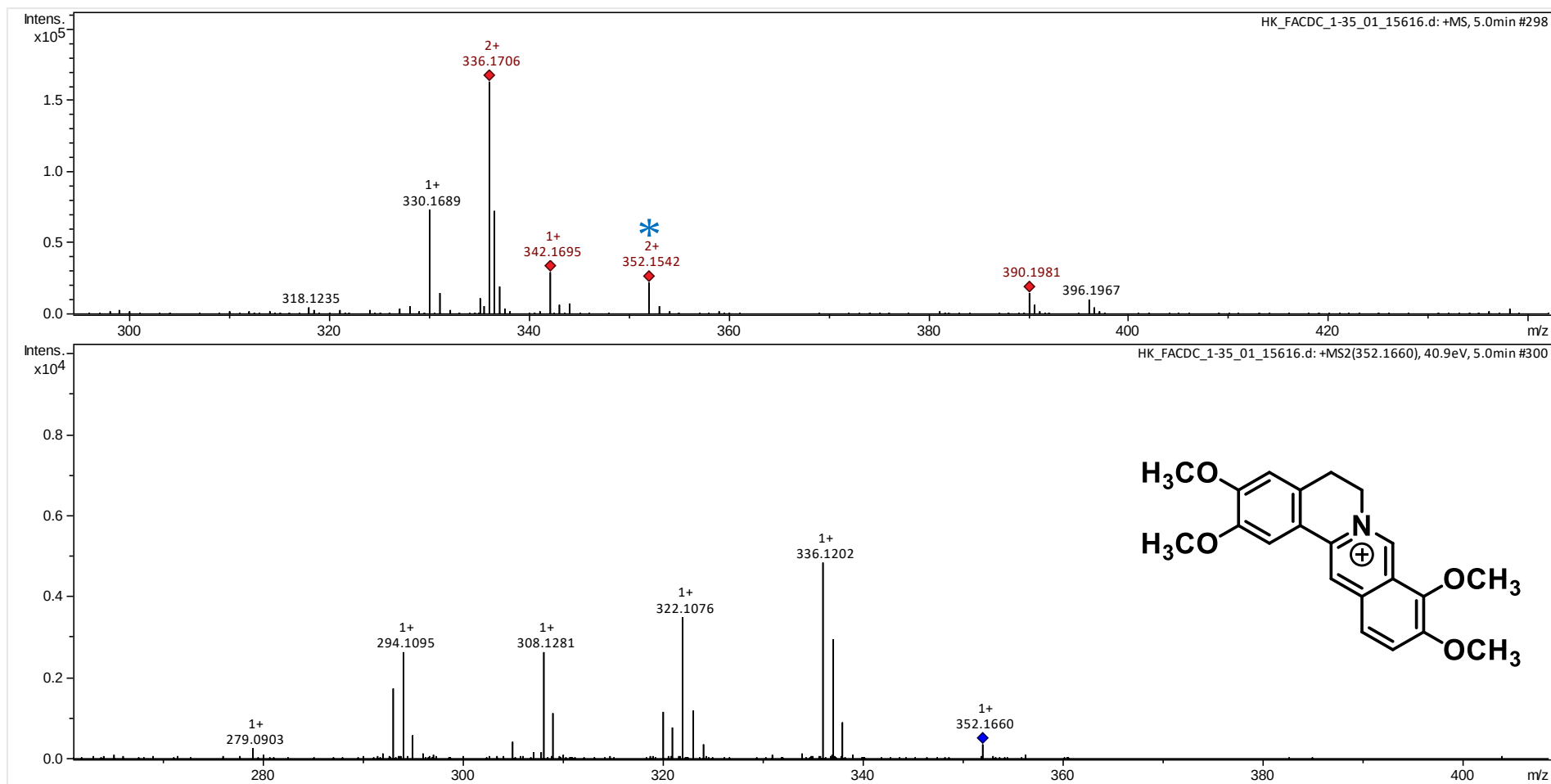


Figura 57 - Espectro de MS e MS/MS do composto palmatina (G5) identificado na espécie *D. calycina*.

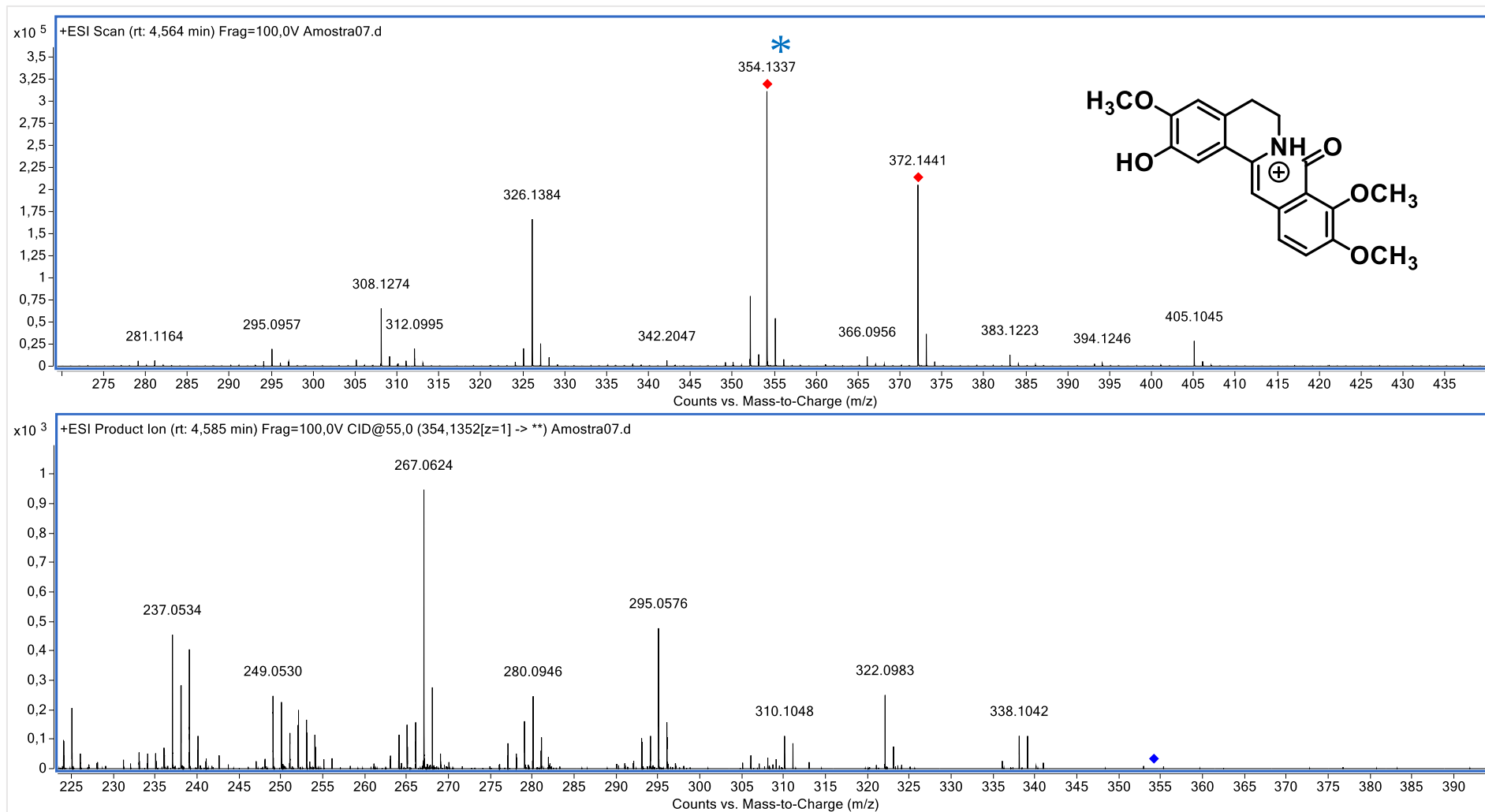


Figura 58 - Espectro de MS e MS/MS do composto 8-oxojatrorrizina (G6) identificado na espécie *D. surinamensis*

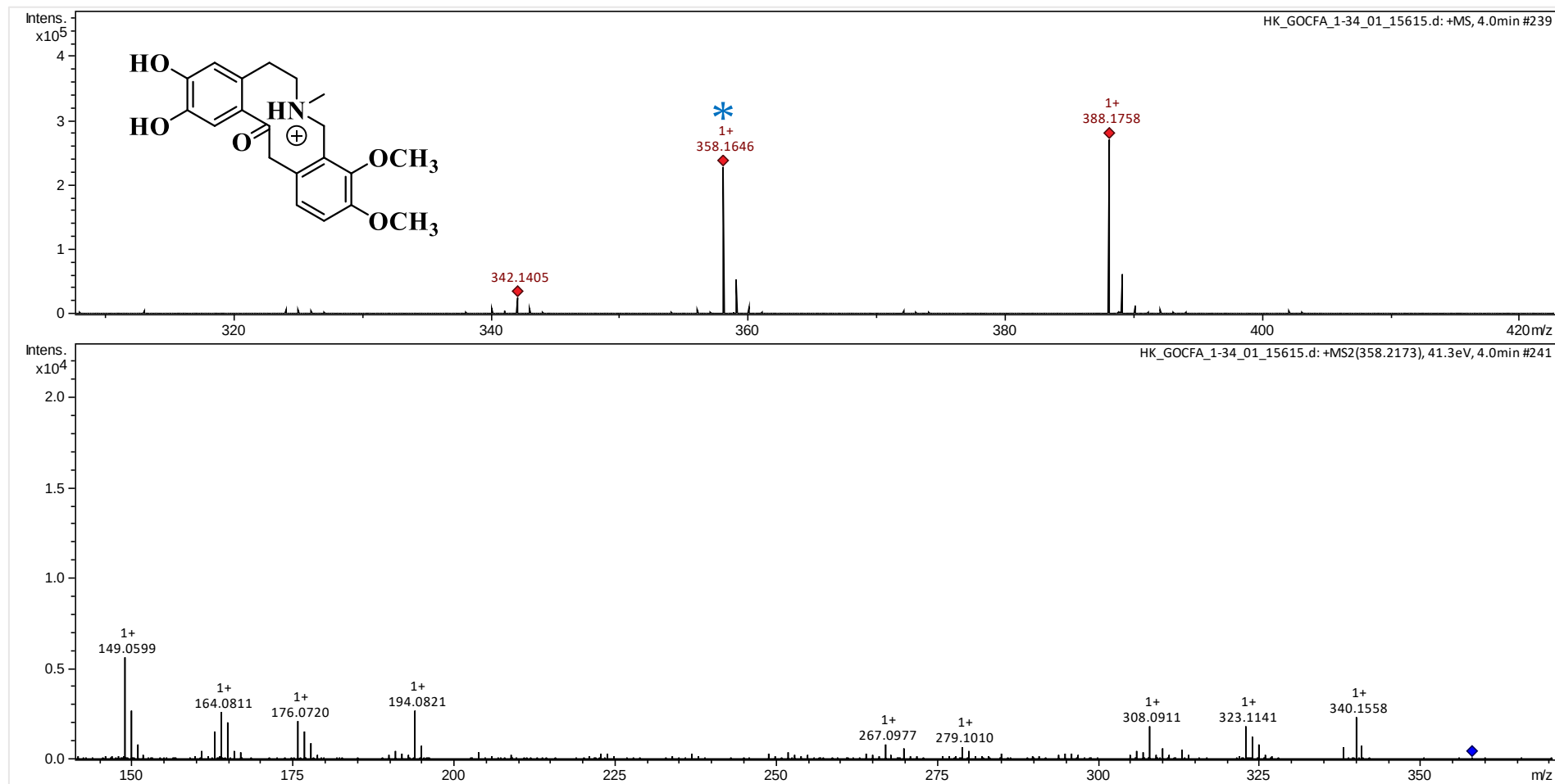
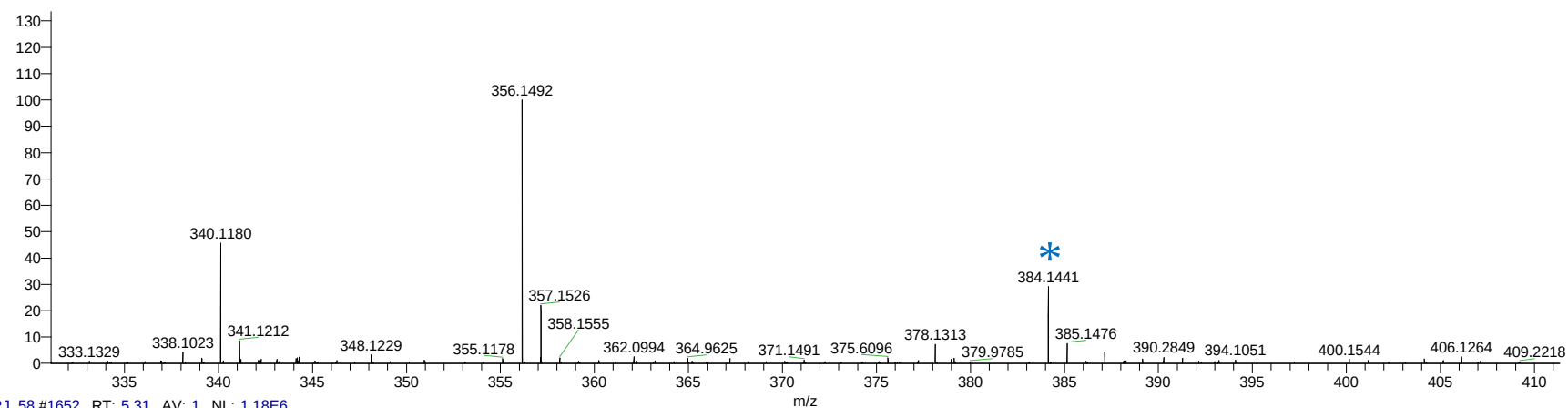


Figura 59 - Espectro de MS e MS/MS do composto vailatina (**11**) identificado na espécie *G. olivacea*

RJ_58 #1651 RT: 5.31 AV: 1 NL: 8.35E6
T: FTMS + p ESI Full ms [100.0000-1000.0



RJ_58 #1652 RT: 5.31 AV: 1 NL: 1.18E6
T: FTMS + p ESI d Full ms2 384.1441@hc

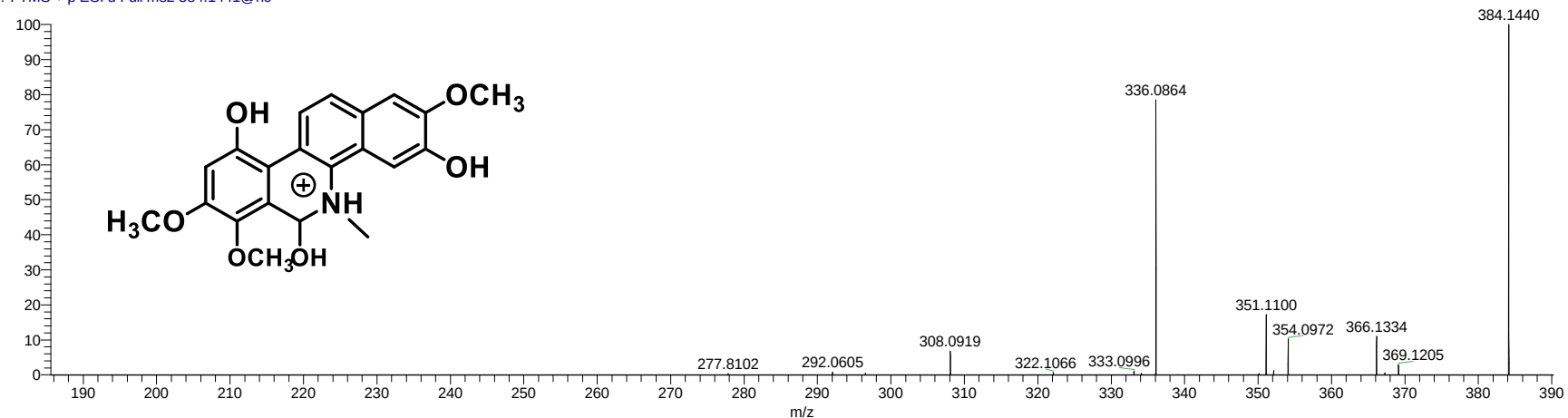


Figura 60 - Espectro de MS e MS/MS do composto 6,10-di-hidroxi-3-desmetildi-hidrobenezofenantridínio (**I2**) identificado na espécie *E. amazonicus*

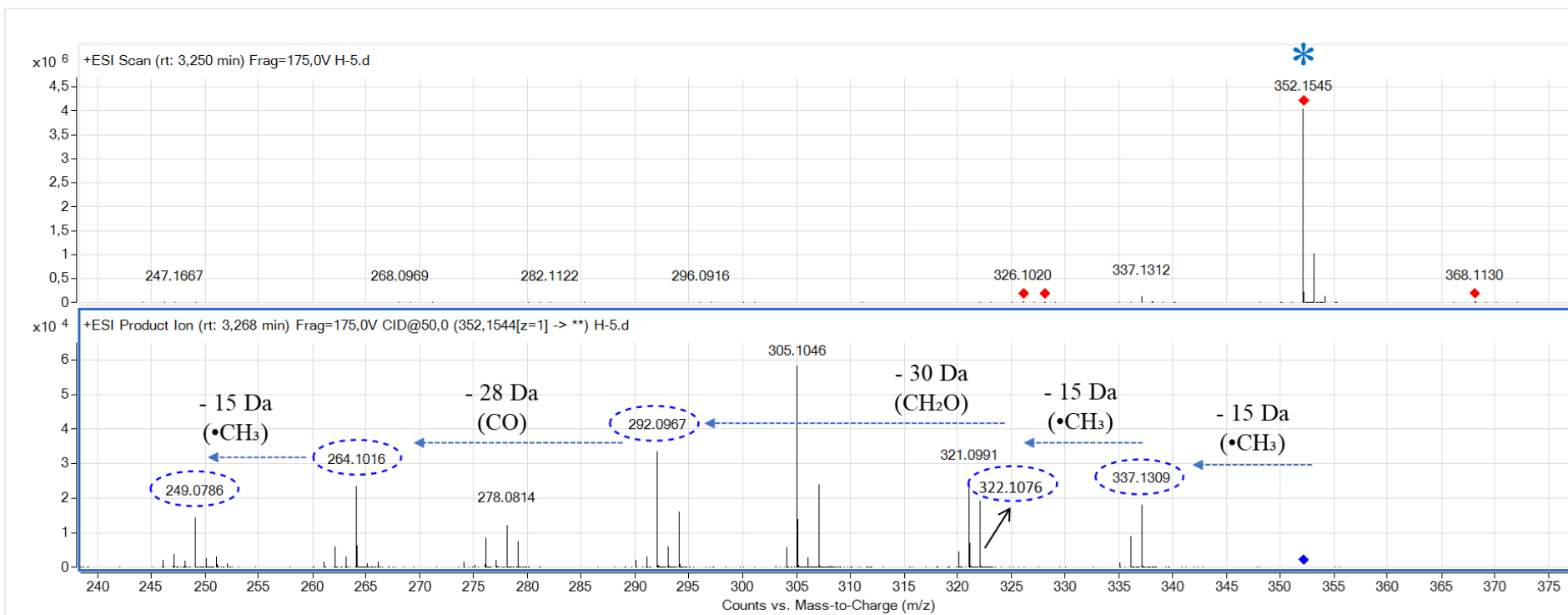


Figura 61 - Espectro de massas do alcaloide 3-metoxiguadiscina (**H-5**)

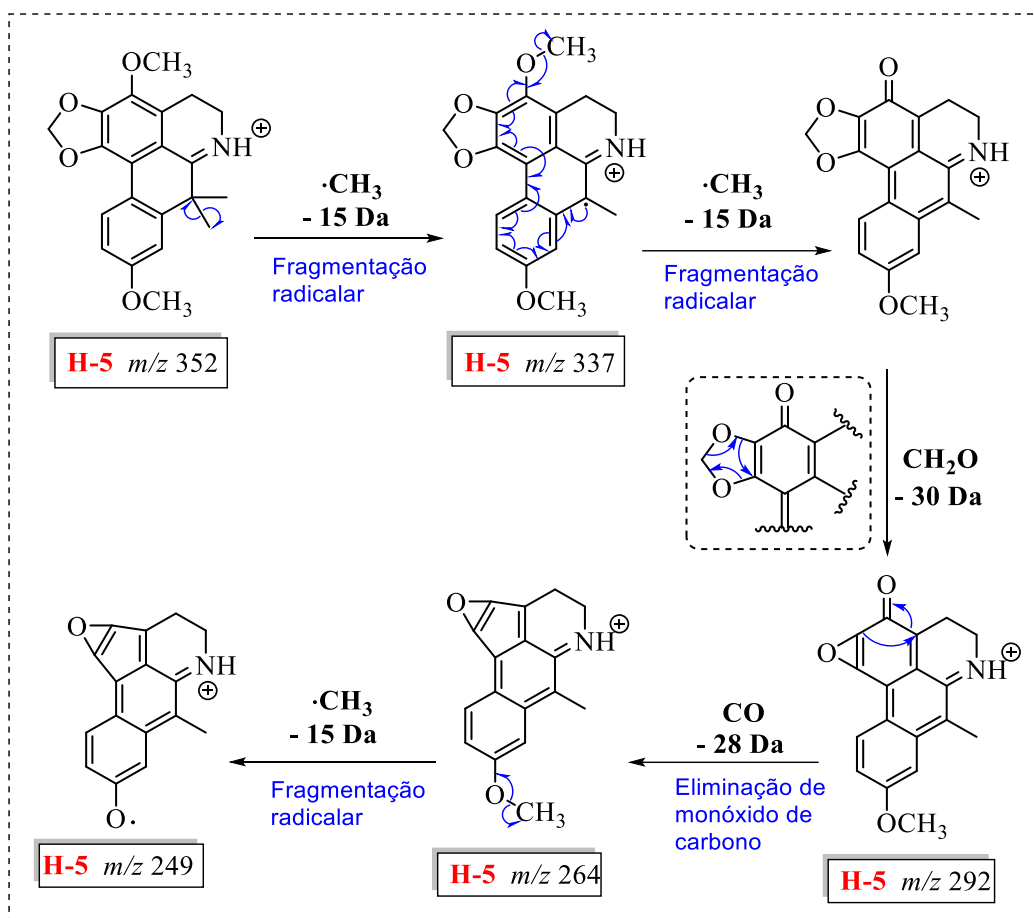


Figura 62 - Proposta de fragmentação para o alcaloide 3-metoxiguadiscina (**H-5**)

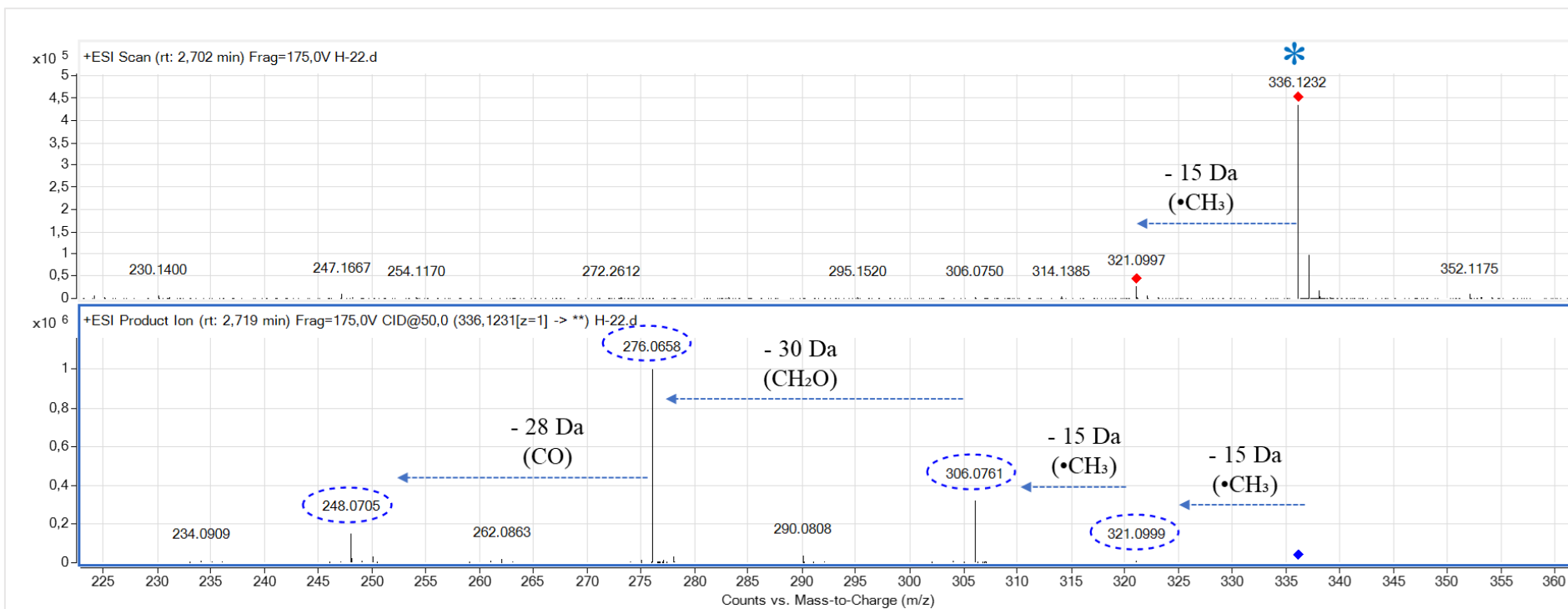


Figura 63 - Espectro de massas do alcaloide guaterfriesidina (**H-22**)

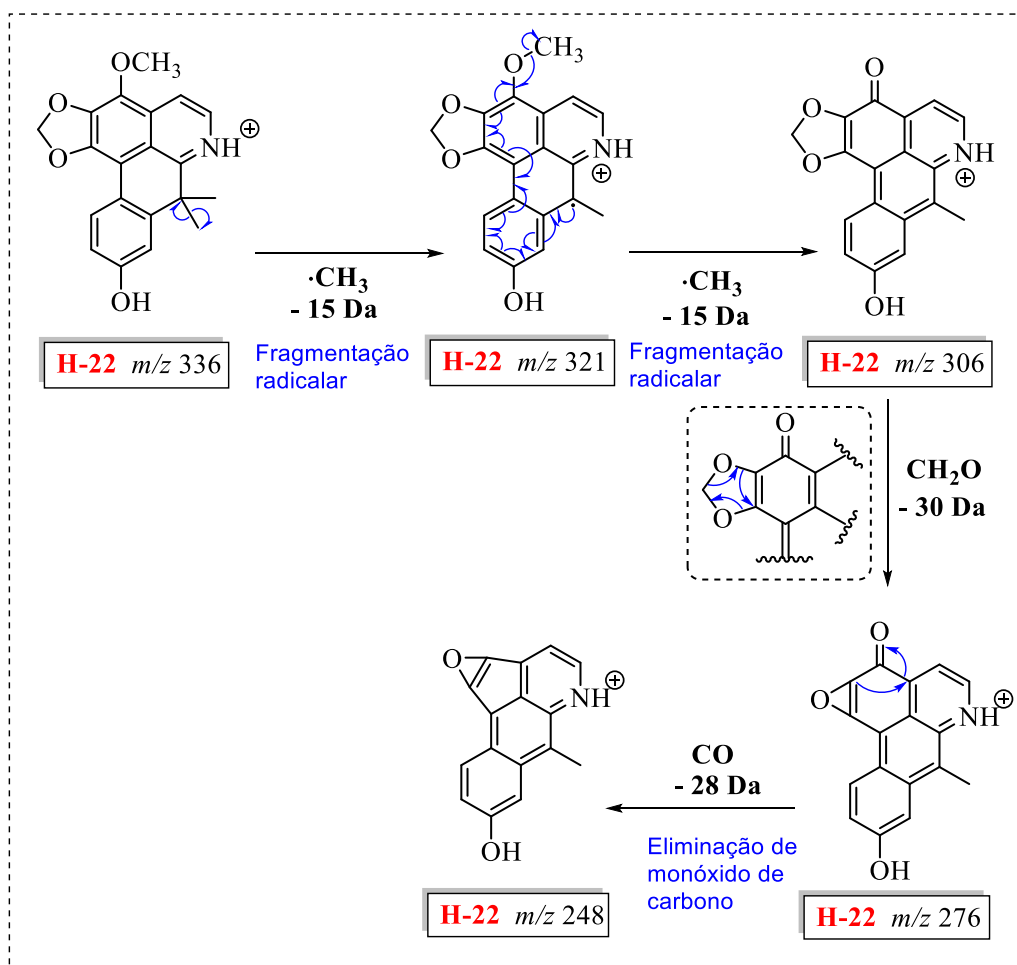


Figura 64 - Proposta de fragmentação para o alcaloide guaterfriesidina (**H-22**)