Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**Estudos sobre a fragmentação em fase gasosa de alcaloides homolictóricos
de espécies de *Hippeastrum* por espectrometria de massas sequencial com
ionização por eletrospray**

Guilherme Brinker Willrich

Dissertação apresentada à Faculdade
de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das exigências
para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área:
Química

RIBEIRÃO PRETO -SP

2021

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**Estudos sobre a fragmentação em fase gasosa de alcaloides homolicoarínicos
de espécies de *Hippeastrum* por espectrometria de massas sequencial com
ionização por eletrospray**

Guilherme Brinker Willrich

Orientador: Prof. Dr. Antônio Eduardo Miller Crotti

Dissertação apresentada à Faculdade
de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das exigências
para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área:
Química

RIBEIRÃO PRETO -SP

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Willrich, Guilherme Brinker

Estudos sobre a fragmentação em fase gasosa de alcaloides homolicorínicos de espécies de *Hippeastrum* por espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray. Ribeirão Preto, 2021.

101 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química.

Orientador: Crotti, Antônio Eduardo Miller.

1. Alcaloides homolicorínicos. 2. Fragmentação. 3. Química de íons em fase gasosa.

GUILHERME BRINKER WILLRICH

Estudos sobre a fragmentação em fase gasosa de alcaloides homolicorínicos de espécies de *Hippeastrum* por espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray

Presidente: _____

Nome: Prof. Dr. Antônio Eduardo Miller Crotti

Instituição: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP

Titular 1: _____

Nome: Prof. Dr. Warley de Souza Borges

Instituição: Universidade Federal do Espírito Santo

Titular 2: _____

Nome: Prof. Dr. Vladimir Constantino Gomes Heleno

Instituição: Universidade de Franca (UNIFRAN)

Titular 3: _____

Nome: Prof. Dr. Ricardo Vessecchi

Instituição: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP

Dedicatória

*D*edico esta dissertação de mestrado a João Willich Bernal.

Agradecimentos

Ao meu orientador, por nunca desistir de mim, por valorizar meus pontos fortes e me ajudar a corrigir os pontos fracos. Por estar sempre disposto a me orientar quando nada parecia fazer sentido. Por sempre ter uma boa piada para animar o meu dia!

Ao Dr. Eduardo José Crevelin, por me auxiliar por infindáveis horas na realização dos meus experimentos e sempre de bom humor;

À minha esposa, Victória e ao meu pequeno filho, João, que me dão forças para continuar todos os dias, que acreditam em mim mesmo quando eu não acredito. Eles são meu motivo de continuar em frente!

À minha mãe, Elisangela, por ser minha mãe e meu pai, por ter sempre dado o seu máximo.

Aos meus professores de faculdade da Universidade Federal do Pampa, por me auxiliarem no início de minha jornada de Químico;

Aos meus colegas de LSO, Herbert, Tatiana e Matheus, por serem grandes companheiros e por acolherem um “gaúcho” (sou catarinense)!

A educação tem raízes amargas, mas os seus frutos são doces (Aristóteles).

Sumário

Lista de Esquemas e Figuras	v
Lista de Tabelas e Quadros.....	vii
Lista de Anexos	viii
Lista de Abreviaturas.....	ix
1. Introdução	10
1.1. O gênero <i>Hippeastrum</i> (Amaryllidaceae)	1
1.2. Alcaloides de espécies de <i>Hippeastrum</i> e suas potencialidades	3
1.3 Espectrometria de massas com ionização por eletrospray	6
1.3.1. Ionização por eletrospray (ESI-MS)	6
1.4.2 Espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray (ESI-MS/MS).....	8
1.5 ESI-MS e ESI-MS/MS no estudo de alcaloides homolitorínicos.....	10
2. Objetivos.....	1
3. Materiais e Métodos.....	1
3.1 Obtenção dos alcaloides homolitorínicos de <i>Hippeastrum</i>	12
3.2 Análises por espectrometria de massas	12
3.2.1 Estudo das vias de fragmentação dos compostos 1-7 protonados	12
4. Resultados e Discussão	1
4.1 Seleção da energia de colisão (E_{lab}) “ótima”	14
4.2 Relações estrutura-fragmentação dos alcaloides 1-7	23
4.3 Considerações gerais sobre a fragmentação dos alcaloides homolitorínicos 1-7	26
4.3.1. A questão do sítio de protonação	26
4.3.2. Eliminações de H^+ , CH_3^+ , CO e CH_2O a partir de grupos metoxila.....	28
4.3.3. Eliminações de H_2O , CH_3OH , NH_3 e CH_3NH_2	30
4.4 Formação dos íons produtos gerais B, C, D e E.....	35
4.4.1. Formação dos íons produtos derivados de B.....	37
4.4.2. Formação dos íons produtos derivados de C.....	42
4.4.3. Formação dos íons produtos derivados de D	49
4.4.4. Formação dos íons produtos derivados de E e F	52
5. Conclusões	1

6. Referências	1
7. Anexos.....	1

Resumo

Neste trabalho, as fragmentações de sete alcaloides homolicorínicos (AHL) foram investigadas empregando espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray (ESI-MS/MS). As vias de fragmentação dos compostos selecionados em suas formas protonadas e sob condições de dissociação induzida por colisão (CID) foram associadas às suas respectivas estruturas. Além das relações estrutura-fragmentação, dados de espectrometria de massas de múltiplos estágios (MS^n) e experimentos com troca de deutério foram também utilizados para a elucidação das vias de fragmentação. Os resultados dos estudos sobre a fragmentação dos alcaloides homolicorínicos **1-7** protonados revelaram que a maioria dos íons formados na energia de 20 eV são resultantes de eliminações de $CH_3^\bullet$, NH_3 , H_2O , CO , CH_2O , CH_3NH_2 e CH_3OH . Os processos de fragmentação comuns incluem as perdas de H_2O e de $CH_3^\bullet$ e a ocorrência de duas reações de retro-Diels-Alder competitivas, a partir dos quais é possível identificar alguns íons fragmentos diagnósticos de grupos funcionais específicos. Fragmentos formados por perdas consecutivas de dois radicais $CH_3^\bullet$ foram úteis para distinguir os compostos 8,9-dimetoxilados **5-7** de **1-4**, que apresentam grupamento metilenodioxi fundido a C8 e C9. Eliminações consecutivas de três moléculas de H_2O foram indicativas da presença de um grupo hidroxila em C3, enquanto a presença de um grupo metoxilo na mesma posição pôde ser diagnosticada por meio da perda de metanol diretamente do íon precursor. Por fim, as eliminações de NH_3 e de CH_3NH_2 permitiram identificar a natureza do substituinte ligado diretamente ao nitrogênio (H ou CH_3). Os dados obtidos deste estudo podem ser utilizados de forma conjunta para a elaboração de estratégias para a identificação desses compostos em extratos brutos de Amaryllidaceae utilizando a técnica HPLC-MS/MS sem a necessidade de padrões.

Palavras-chave: fragmentação, química de íons em fase gasosa, retro-Diels-Alder

Abstract

In this work, the fragmentation of seven homolcorine-type alkaloids (HLA) was investigated by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). The fragmentation pathways of the selected alkaloids in their protonated forms and under collision-induced dissociation (CID) were associated to their respective structures. Besides the structure-fragmentation relationships, multiple-stage mass spectrometry (MS^n) data and experiments with deuterium exchange were also employed to elucidate the fragmentation pathways. The results revealed that most of the product ions of protonated HLA **1-7** formed at the collision energy of 20 eV were the result of $CH_3^\bullet$, NH_3 , H_2O , CO , CH_2O , CH_3NH_2 , and CH_3OH eliminations. The common fragmentation processes include H_2O and $CH_3^\bullet$ eliminations from the precursor ion, as well as the occurrence of two competitive retro-Diels-Alder (RDA) reaction. These RDA reactions enable the identification of some product ions that are diagnostic for specific functional groups. Two consecutive losses of $CH_3^\bullet$ were useful to distinguish the 8,9-dimethoxy compounds from those that display a methylenedioxy ring fused to C8 and C9. Consecutive eliminations of three H_2O molecules were diagnostic for the hydroxy group at C3, whereas the presence of a methoxy group at the same position could be identified on the basis of a methanol elimination directly from the precursor ion. Finally, eliminations of NH_3 and CH_3NH_2 were useful to identify the nature of the substituent at the nitrogen (H or CH_3). Data obtained in this study can be used along for the elaboration of HPLC-ESI-MS/MS-based strategies for the identification of HLA in *Hippeastrum* crude extracts.

Keywords: fragmentation, gas-phase ion chemistry, retro-Diels-Alder reaction

Lista de Esquemas e Figuras

Figura 1	Algumas espécies de <i>Hippeastrum</i> (Amaryllidaceae).....	1
Figura 2	Estruturas dos alcaloides homolicorínicos I-VII	5
Figura 3	Esquema geral de uma fonte de ionização por eletrospray.....	8
Figura 4	Estrutura dos alcaloides homolicorínicos XI-XII	11
Figura 5	Estruturas químicas dos alcaloides homolicorínicos 1-7	12
Figura 6	Gráficos da intensidade relativa (%) dos íons produtos dos alcaloides homolicorínicos 1-7 desprotonadas em função energia de colisão (E_{lab} , em eV).	16
Figura 7	Espectro de íons produtos dos alcaloides homolicorínicos protonados 1-7 (QqQ, Ar, $E_{lab} = 20$ eV).....	17
Figura 8	Numeração dos carbonos e designação dos anéis da estrutura básica dos alcaloides homocorínicos 1-7	24
Esquema 1	Vias de fragmentação da 7-metoxinormasonina (1) protonada (m/z 316).....	18
Esquema 2	Vias de fragmentação da 7-metoxi-masonina (2) protonada (m/z 330).....	18
Esquema 3	Vias de fragmentação da candimina (3) protonada (m/z 346).....	18
Esquema 4	Vias de fragmentação da 2-O-metil-candimina (4) protonada (m/z 360).....	19
Esquema 5	Vias de fragmentação da 2 α -metoxi-homolicorina (5) protonada (m/z 346).....	19
Esquema 6	Vias de fragmentação da albomaculina (6) protonada (m/z 346).....	20
Esquema 7	Vias de fragmentação da 2 α ,7-dimetoxihomolicorina (7) protonada (m/z 376)....	20
Esquema 8	Visão geral das vias de fragmentação dos alcaloides homolicorínicos 1-7	23
Esquema 9	Protômeros mais prováveis para os alcaloides homolicorínicos 1-7	27
Esquema 10	Eliminações de radicais $CH_3\bullet$ e $H\bullet$ e de CO e CH_2O envolvendo os grupos OCH_3	30
Esquema 11	Eliminação de água a partir do anel δ -lactônico dos alcaloides 1-7	31
Esquema 12	Eliminação de água a partir da candimina (3) protonada (m/z 346) com participação de 2-OH.....	31
Esquema 13	Eliminação de metanol a partir dos alcaloides 4, 5 e 7 protonados.....	32
Esquema 14	Proposta para a formação do íon produto P4	33
Esquema 15	Eliminação de CO seguida pela eliminação de R_2H nos compostos 3, 4, 5 e 7 ...	34
Esquema 16	Proposta para a eliminação de amônia ($R_1=H$) e metilamina ($R_1=CH_3$).....	34
Esquema 17	Formação dos íons produtos B, C, E e F	36
Esquema 18	Formação do íon produto P1 para os compostos 5, 6 e 7	38
Esquema 19	Formação dos íons produtos P2, P9 e P21 para o alcaloide 7	39
Esquema 20	Formação do íon produto P17 (m/z 257).....	41
Esquema 21	Formação dos íons produtos P3, P6, P18 e P36 para os alcaloides 1-4	41
Esquema 22	Formação dos íons produtos B, P2, P3, P7 e P23 para os alcaloides homolicorínicos 5, 6 e 7	42
Esquema 23	Formação dos íons produtos C e P8	43
Esquema 24	Formação dos íons produtos B, C e P11	44
Esquema 25	Possíveis rearranjos do carbocátion arílico P11	45
Esquema 26	Formação dos íons P18, P23 e P24 para os compostos 1, 2, 5 e 6 . A formação de P18 e P24 dos compostos 1 e 2 a partir de P11.2 , embora possível, não foi representada.....	46
Esquema 27	Possíveis vias de formação do íon produto C (A – H_2O) para a Candimina (3).	47
Esquema 28	Formação dos íons produtos P11 e P28 para o composto 3	47

Esquema 29	Formação dos íons P16 e P13 para o composto 3	48
Esquema 30	Formação dos íons produtos P20 , P31 , P32 e P37	49
Esquema 31	Formação dos íons produtos D , P8 , P10 e P22 para o composto 4	50
Esquema 32	Formação do íon produto P14	51
Esquema 33	Formação dos íons produtos dos compostos 1-4 derivados de E	52
Esquema 34	Formação dos produtos de RDA para os compostos 5 , 6 e 7	53
Esquema 35	Formação dos íons produtos derivados de F	53
Esquema 36	Formação do íon produto P52, diagnóstico de substituintes em C2.....	54
Esquema 37	Fragmentação da 7-metoxi-normasonina (1) protonada (m/z 316).....	55
Esquema 38	Fragmentação da 7-metoxi-masonina (2) protonada (m/z 330).....	56
Esquema 39	Fragmentação da candimina (3) protonada (m/z 346).....	57
Esquema 40	Fragmentação da 2-O-metil-candimina (4) protonada (m/z 346).....	58
Esquema 41	Fragmentação da 2 α -metoxi-homolicorina (5) protoanda (m/z 346).....	59
Esquema 42	Fragmentação da albomaculina (6) protonada (m/z 346).....	60
Esquema 43	Fragmentação da 2 α ,7-dimetoxi-homolicorina (7) protonada (m/z 376).....	61

Lista de Tabelas e Quadros

Quadro 1	Algumas espécies de <i>Hippeastrum</i> e suas respectivas atividades biológicas.	2
Tabela 1	Principais picos observados nos espectros de íons produtos dos alcaloides 1-7 protonados (QQ, Ar, $E_{\text{lab}} = 20$ eV).....	21

.

Lista de Anexos

A1. Espectro de ESI-MS/MS com uso de água deuterada a 20 eV.	129
--	-----

Lista de Abreviaturas

CEM	<i>Chain ejection model</i> , modelo de ejeção do íon
CID	<i>Collision induced dissociation</i> , dissociação induzida por colisão
CRM	<i>Charge residual model</i> , modelo da carga residual
EI-MS	Espectrometria de massas com ionização por elétrons
E_{lab}	Energia de colisão (eV)
ESI	Ionização por Eletrospray
ESI-MS	Espectrometria de massas com ionização por eletrospray
ESI-MS/MS	Espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray
MS ⁿ	Espectrometria de massas de múltiplos estágios com ionização por eletrospray
ESI-TOF	Ionização por eletrospray acoplado a um analisador por tempo de voo
FGW	Fragmentação de Grob-Wharton
GA	Acidez em fase gasosa
GB	Basicidade em fase gasosa
HPLC-ESI-MS	Espectrometria de massas com ionização por eletrospray acoplado à cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-ESI-MS/MS	Espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray acoplado à cromatografia líquida de alta eficiência
IT	<i>Ion trap</i> , equipamento tipo armadilha de íons
MeOH	Metanol
MS	Espectrometria de massas
MS/MS	Espectrometria de massas sequencial
MS ⁿ	Espectrometria de massas de múltiplos estágios
PA	Afinidade protônica
QqQ	Equipamento tipo triplo quadrupolo
Q-TOF	Equipamento híbrido quadrupolo tempo de voo
RDA	Reação de retro-Diels-Alder
UV/vis	Espectroscopia na região do ultra violeta/visível

1. Introdução

1.1. O gênero *Hippeastrum* (Amaryllidaceae)

O gênero *Hippeastrum* (Amaryllidaceae) é constituído por plantas herbáceas endêmicas da América do Sul, especialmente no Brasil, onde foram reconhecidas 30 espécies, sendo 21 endêmicas [1]. As espécies de *Hippeastrum* são conhecidas como lírios, açucenas, tulipas, cebola-do-mato e amaryllis [2], sendo bastante utilizadas para fins ornamentais devido à beleza de suas flores [3]. Na Figura 1 encontram-se imagens de algumas espécies de *Hippeastrum*.

Figura 1. Algumas espécies de *Hippeastrum* (Amaryllidaceae). Fonte: [4].

Em 2013, foram descobertas na Serra da Canastra-MG quatro novas espécies endêmicas do gênero *Hippeastrum*, entre elas, *Hippeastrum canastrense* e *Hippeastrum sanfranciscanum* [5, 6]. O extrato bruto de *Hippeastrum canastrense* apresentou citotoxicidade em células tumorais, destacando-se a atuação em células carcinoma hepatocelular [5], fato que justifica um estudo mais aprofundado dos componentes químicos desta espécie e de suas propriedades farmacológicas. No Quadro 1 encontram-se listadas as atividades biológicas de algumas espécies de *Hippeastrum*. Quimicamente, espécies de *Hippeastrum* são reconhecidas por serem fonte de compostos fenólicos, como flavonoides e, principalmente, alcaloides [12].

Quadro 1. Algumas espécies de *Hippeastrum* e suas respectivas atividades biológicas.

Espécie	Parte da planta	Atividade	Ref.
<i>H. aulicum</i> Herb.	Folhas e bulbos	Alguns alcaloides extraídos desta espécie possuem atividade contra <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Leishmania infantum</i>	[7]
<i>H. breviflorum</i> Herb.	Bulbos	Atividade anti- <i>Trichomonas vaginalis</i>	[8]
<i>H. canastrense</i> Dutilh & R.S. Oliveira	Hastes florais e bulbos	Citotoxicidade frente a células de carcinoma hepatocelular	[5]
<i>H. morelianum</i> Lem.	Bulbos	Atividade anti- <i>Trichomonas vaginalis</i>	[9]
<i>H. morelianum</i> Lem.	Folhas, bulbos e partes aéreas	Potencial antioxidante e anticolinesterásico	[10]
<i>H. santacatarina</i> (Traub) Dutilh	Folhas, bulbos e partes aéreas	Potencial antioxidante e anticolinesterásico.	[10]
<i>H. santacatarina</i> Traub) Dutilh	Bulbos	Atividade anti- <i>Trichomonas vaginalis</i>	[9]
<i>H. vittatum</i> Herb.	Bulbos	Atividade antidepressiva, anticonvulsivante e ansiolítica.	[11]

1.2. Alcaloides de espécies de *Hippeastrum* e suas potencialidades

Os alcaloides isolados de espécies da família Amaryllidaceae estão associados aos efeitos farmacológicos destas plantas [13]. Até o presente momento, mais de 500 alcaloides Amaryllidaceae foram isolados de Amaryllidaceae [12], com potencial para a descoberta de novas espécies e o isolamento de novos alcaloides. Na literatura, artigos de revisão como os de Nair (2013) sobre os efeitos farmacológicos das plantas Amaryllidaceae da África do Sul [14] e os de Jin (2011, 2013 e 2016) [12, 13, 15, 16] buscaram reunir e elucidar o conhecimento já acumulado acerca destes metabólitos.

De forma geral, estudos químicos realizados com espécies de *Hippeastrum* resultaram no isolamento e na identificação de diversos alcaloides, com destaque para os alcaloides com esqueleto do tipo homolicorínico [17]. No artigo de revisão publicado por Ding e colaboradores em 2014 são descritos 47 alcaloides homolicorínicos, como a homolicorina (**I**), que dá nome à classe [18]. Posteriormente, Vicente e colaboradores (2016) isolaram pela primeira vez 5 alcaloides homolicorínicos, entre eles 2 α -metoxihomolicorina (**II**), 7-metoximasonina (**III**), 7-metoxinormasonina (**IV**) e 2-O-metilcandimina (**V**) [5].

Os estudos realizados por Andrade e seus colaboradores (2012) e Szlavik e seus colaboradores (2004), reportaram uma potente atividade antiretroviral na homolicorina (**I**), alcaloide que dá nome a classe [17, 19]. Já a candimina (**VI**) possui atividade de inibição das enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase de *Trichomonas vaginalis*, protozoário causador da tricomoníase, uma doença sexualmente transmissível (DST) induzindo a morte celular ao interromper o ciclo celular do parasita [9, 20, 21]. Este alcaloide também apresentou citotoxicidade frente a células de fibroblastos da linhagem L929, a células tumorais de carcinoma hepatocelular Hep G-2, à adenocarcinoma em glândulas mamárias MCF-7 e ao carcinoma pancreático humano MIAPaCa-2, tendo grande seletividade por células

cancerígenas em relação às células normais de fibroblastos [5]. Este alcaloide também apresentou atividade moderada sobre a enzima acetilcolinesterase, porém não apresentou atividade antibacteriana contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Rhodococcus equi*, *Salmonella choleraesuis* e *Escherichia coli* [2].

Apesar de a albomaculina (VII) ter sido isolada pela primeira vez em 1956, poucos testes biológicos com esse alcaloide são encontrados na literatura. Sabe-se que este composto não é ativo contra o vírus mosaico do tabaco e não é capaz de inibir a enzima acetilcolinesterase [22]. Já a 7-metoxi-O-metillicorenina (VIII) foi testada quanto à sua atividade citotóxica em células cancerosas e normais, mostrando-se inativa frente a linhagens tumorais. Bessa e colaboradores (2015) testaram a atividade antiparasitária de albomaculina (VII) e 7-metoxi-O-metillicorenina (VIII) contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum*, tendo o segundo alcaloide demonstrado atividade contra a forma tripomastigota de *T. cruzi* cinco vezes maior que a do padrão (benzonidanol), além de ser mais seletivo. Este alcaloide também atua na forma intracelular do parasita *L. infantum* [7].

Outras atividades reportadas para alcaloides homolicorínicos incluem a inibição da enzima butirilcolinesterase (BuChe) [23], a atividade antitumoral em células S180 [24], Molt 4, Hep G-2 e LNCaP [25, 26], atuação em enzimas GSK-3 β [23], a inibição dos vírus HIV-1 [19], Herpes simplex tipo 1 [25, 27] e o vírus da gripe A [28], atividade antifúngica contra *Candida albicans* [25, 29], atividade contra *Trypanosoma cruzi* [30], efeito hipotensivo [25, 31], ação anestésica [32], ação vasodepressora [33] e efeito neuroprotetor em células dopaminérgicas SH-SY5Y [34].

Figura 2. Estruturas dos alcaloides homolalicóricos I-VIII.

Recentemente, poucos artigos sobre o isolamento e atividades biológicas e farmacológicas de alcaloides homolalicóricos têm sido publicados. Por outro lado, alguns artigos de revisão sobre esta classe de compostos foram publicados [35-37]. Masi e colaboradores (2020) compilaram as estruturas e as atividades biológicas dos alcaloides Amaryllidaceae na última década [35]. No trabalho desenvolvido por Nair e colaboradores, foram compilados os alcaloides com possível atividade anticancerígena, detalhando as atividades em cada tipo de célula e de quais gêneros da família foram identificados os alcaloides. Os autores concluíram que apesar de os alcaloides homolalicóricos serem desejáveis candidatos para a produção de drogas anticancerígenas devido aos seus efeitos citotóxicos, há uma aparente negligência no estudo desta classe em comparação à atenção dada ao estudo da licorina e seus derivados [36]. Ka e seus colaboradores discutem as potencialidades dos 91 alcaloides Amaryllidaceae descobertos nos últimos 5 anos, o que para eles representa uma significativa expansão na literatura desta classe [37].

1.3 Espectrometria de massas com ionização por eletrospray

1.3.1. Ionização por eletrospray (ESI-MS)

A ionização por eletrospray foi desenvolvida/aplicada por John B. Fenn nas décadas de 1980 e 1990 a partir da ideia de vaporizar moléculas polares de massa molecular elevada, descrita por Malcolm Dole em 1968. Este método de ionização ganhou grande expressão no meio científico, uma vez que expandiu as aplicações da espectrometria de massas a diversas áreas da ciência graças à possibilidade de se analisar compostos polares e com uma grande diversidade de massas moleculares [38]. Além de possibilitar a análise de uma maior diversidade de compostos, a ionização por eletrospray também viabilizou o acoplamento entre cromatografia líquida e espectrometria de massas devido à compatibilidade deste método de ionização com o fluxo e o volume de fase móvel proveniente de cromatógrafos líquidos [39]. Desde então, a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com ionização por eletrospray (HPLC-ESI-MS) passou a ser extensamente empregada em vários campos da química, biologia, medicina, alimentos, proteômica e metabolômica, síntese orgânica, forense, produtos naturais, polímeros, combustíveis e análises clínicas, entre outras [40].

Na ionização por eletrospray (**Figura 3**), a amostra dissolvida em um solvente polar é infundida na fonte de ionização por meio de um capilar metálico (75-150 μm de diâmetro), a um fluxo de 1 a 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. Este capilar é mantido em um potencial elétrico em relação às paredes da fonte e do eletrodo cilíndrico [41]. Esta diferença de potencial, geralmente entre 3 e 5 kV, provoca a migração de carga das espécies em solução para a interface metal-solução, tornando carregada a superfície do líquido e formando, assim, uma dupla camada elétrica [42]. Na ponta do capilar, as forças eletrostáticas que agem sobre os íons pré-formados na dupla camada elétrica contrabalanceiam a tensão superficial, culminando em uma superfície cônica conhecida como cone de Taylor [39]. Um fino spray de pequenas gotas é então formado devido à ação de um gás nebulizante (geralmente N_2),

que é introduzido coaxialmente ao capilar. O volume das gotas que emergem da ponta do capilar é então reduzido pela ação de um gás secante (geralmente N_2), promovendo assim a evaporação do solvente. Com a redução do tamanho das gotas, a repulsão coulômbica entre cargas de mesmo sinal presentes na superfície das gotas aumenta. Quando o limite de Rayleigh é atingido, esta repulsão torna-se maior que a tensão superficial, ocasionando a “explosão coulômbica” [41]. Esta sequência de eventos repete-se até que o raio da curvatura da gota se torne pequeno a ponto de gerar íons individuais, seja por expulsão do íon da gota de solvente (*chain ejection model*, CEM) ou pela eliminação do solvente residual por secagem da gota (*charge residual model*, CRM) [42, 43].

Figura 3. Esquema geral de uma fonte de ionização por eletrospray [39].

De maneira geral, os íons gerados individualmente por ESI são moléculas protonadas ($[M+H]^+$), desprotonadas ($[M-H]^-$), ou mesmo moléculas cationizadas, principalmente com íons metálicos (por exemplo, $[M+Na]^+$ e $[M+K]^+$) [39]. A ionização propriamente dita (isto é, a geração de íons a partir de moléculas) ocorre em solução, no interior do capilar, por meio de reações ácido-base (protonação/desprotonação) e de coordenação com cátions presentes em solução [44]. Além disso, para compostos

polifuncionalizados e de alta massa molecular (por exemplo, proteínas), íons multiplamente carregados podem também ser formados [38].

1.4.2 Espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray (ESI-MS/MS)

Como ESI é considerado um método de ionização brando (do inglês *soft ionization*) – ou seja, produz íons com baixo conteúdo de energia interna – a técnica é adequada para a determinação da massa molecular (equipamentos com analisadores de baixo poder de resolução) e da fórmula molecular (analisadores de alto poder de resolução). Entretanto, a obtenção de informações estruturais é dificultada pela pouca ou nenhuma fragmentação observada nos espectros de massas obtidos por ESI [45].

Em casos em que informações estruturais são também necessárias, utiliza-se a espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray (ESI-MS/MS, do inglês *electrospray ionization tandem mass spectrometry*). Esta técnica consiste na seleção, em um primeiro estágio de MS, de um íon de razão m/z específica (chamado de “íon precursor”) gerado na fonte ESI. Este íon é então ativado para fragmentação e os íons fragmentos formados são analisados em um segundo estágio de MS. Em analisadores híbridos – por exemplo, triplo quadrupolo (QqQ) ou quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF) – os dois estágios de MS ocorrem em analisadores distintos (*MS in space*), enquanto que em analisadores do tipo “armadilha de íons” (IT, do inglês *ion trap*) este processo ocorre em um mesmo analisador (*MS in time*) [46]. Neste último, é também possível estender a análise a outros estágios de MS. Por exemplo, um íon produto formado no segundo estágio de MS pode ser selecionado como íon precursor e ativado para fragmentação (MS^3). O processo descrito pode ser realizado consecutivas (n) vezes e é conhecido como espectrometria de massas de estágios múltiplos (*multiple-stage mass spectrometry*, ou MS^n) [42].

O método de ativação de íons mais comum em espectrômetros de massas comerciais é dissociação induzida por colisão (CID, do inglês *collision-induced dissociation*) [46]. Este método consiste na aceleração do íon precursor devido à interação com campos elétricos e magnéticos para que o mesmo colida-se com moléculas de um gás inerte (geralmente Ar ou N₂) [47]. A energia cinética deste íon precursor é então convertida em energia interna, fazendo com que os mesmos sejam convertidos em íons fragmentos (também chamados de “íons produtos”) por meio da eliminação de partes de sua estrutura na forma de moléculas ou radicais. Essas reações de fragmentações são unimoleculares e ocorrem quando a energia interna do íon precursor no estágio pós-colisional supre a energia crítica para a formação de um íon fragmento específico [42, 48].

No caso de compostos que ocorrem em misturas (por exemplo, metabólitos especiais em extratos oriundos de plantas ou de microrganismos), é possível realizar a identificação de cada um desses compostos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray (HPLC-ESI-MS/MS), sem a necessidade de serem isolados [49]. O potencial desta técnica para a desreplcação de produtos naturais já foi discutido na literatura em trabalho de revisão publicado por nosso grupo de pesquisa [50]. De modo geral, esta identificação requer que os dados obtidos por HPLC-ESI-MS/MS, como o perfil do espectro de UV/vis e o tempo de retenção de um determinado pico sejam comparados com os respectivos dados de padrões autênticos [39]. A disponibilidade de padrões ainda é, na maioria dos casos, indispensável, uma vez que não existe até o momento uma biblioteca espectral comercial de compostos ionizados por eletrospray baseada em dados de MS/MS e MSⁿ [51, 52]. Entretanto, dados da literatura indicam que, em alguns casos, a identificação de um metabólito pode ser realizada com base nos dados de MS/MS mesmo na ausência de um padrão autêntico ou de uma biblioteca comercial. Nesses casos, o conhecimento prévio sobre as rotas de fragmentação pode ser mais importante que o próprio padrão [53]. Entretanto, em revisão

recente, Demarque e colaboradores ressaltaram que a falta de estudos sistemáticos sobre as reações de fragmentação não apenas comprometem a elaboração de bibliotecas espectrais como também podem levar a interpretações errôneas sobre a estrutura do íon precursor [54].

1.5 ESI-MS e ESI-MS/MS no estudo de alcaloides homolicorínicos

Na literatura encontram-se estudos em que a espectrometria de massas é utilizada para a identificação de alcaloides homolicorínicos [55, 56]. A maioria desses estudos reporta a utilização da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) com o uso da ionização por elétrons (EI-MS) como método de ionização. Apesar de ser um método de ionização poderoso e útil, EI-MS requer o aquecimento prévio do composto para promover sua passagem do composto para o estado gasoso, o que pode levar à degradação desses compostos [38].

A técnica ESI-MS/MS reúne as condições desejadas para a identificação de alcaloides homolicorínicos por espectrometria de massas, tais como ionização branda, fragmentação controlada e a não necessidade de passagem prévia para o estado gasoso. Entretanto, apesar do alto potencial, são escassos os dados sobre análises de fragmentação dos alcaloides homolicorínicos utilizando a técnica ESI-MS/MS.

De maneira geral, a técnica ESI é utilizada apenas como um complemento à ressonância magnética nuclear (RMN) para a confirmação da estrutura de alcaloides homolicorínicos, geralmente de espécies de Amarylidaceae. Por exemplo, Andrade e colaboradores (2016) utilizaram HR-ESI-MS para identificar a estrutura de dois novos alcaloides – 9-O-demetillicosénina B (**IX**) e licosenina B (**X**) [57]. A técnica também foi utilizada por Azis e colaboradores (2016) para identificar alcaloides homolicorínicos de *Portulacaoleracea* L., entre eles a homolicorina (**I**) [58], e por Yang e colaboradores (2005) para a identificação das licosininas A (**XI**) e B (**X**) em bulbos de *Lycoris aurea* em suas formas

sodiadas [59]. A técnica também foi utilizada por Huang e colaboradores (2013) [28] e Li e colaboradores (2013) [60], separadamente, utilizaram esta técnica para a identificação de diversos alcaloides conhecidos, além da identificação inédita do alcaloide 2 α -metoxi-6-O-etilodulina (**XII**) (Figura 4).

O único trabalho sobre a fragmentação de alcaloides homolicorínicos por ESI-MS/MS foi reportado recentemente por Torras-Claveria e colaboradores (2020). Os autores compararam o perfil de fragmentação de diversas classes de alcaloides Amaryllidaceae, entre eles diversos homolicorínicos, como a candimina (**VI**) e a homolicorina (**I**) empregando EI-MS e ESI-MS/MS, porém nenhum detalhe sobre as rotas de fragmentação foram fornecidos ou discutidos [61].

Figura 4. Estrutura dos alcaloides homolicorínicos **XI-XII**.

2. Objetivos

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de investigar a fragmentação de alcaloides homolicoarínicos de espécies de *Hippeastrum* utilizando espectrometria de massas com ionização por eletrospray. Mais especificamente, este trabalho teve como objetivos:

- Determinar relações estrutura-fragmentação para uma série de alcaloides homolicoarínicos que possuem um mesmo núcleo estrutural e apresentam pequenas diferenças estruturais;

- Elucidar as vias de fragmentação de alcaloides homolicoarínicos protonados em eletrospray a partir da combinação de dados de espectrometria de massas sequencial (MS/MS), espectrometria de massas de estágios múltiplos (MSⁿ) e de experimentos com troca de deutério.

3. Materiais e Métodos

3.1 Obtenção dos alcaloides homolicorínicos de *Hippeastrum*

Os alcaloides homolicorínicos investigados neste trabalho foram 7-metoxi-normasonina (**1**, $C_{17}H_{17}NO_5$, 315,32 Da), 7-metoxi-masonina (**2**, $C_{18}H_{19}NO_5$, 329,34 Da), candimina (**3**, $C_{18}H_{19}NO_6$, 345,34 Da), 2-O-metil-candimina (**4**, $C_{19}H_{21}NO_6$, 359,37 Da), 2 α -metoxi-homolicorina (**5**, $C_{19}H_{23}NO_5$, 345,15 Da), albomaculina (**6**, $C_{19}H_{23}NO_5$, 345,38 Da), 2 α ,7-dimetoxi-homolicorina (**7**, $C_{20}H_{25}NO_6$, 375,41 Da) (Figura 5). Esses alcaloides foram isolados e identificados de espécies de *Hippeastrum* e gentilmente fornecidos pelo prof. Dr. Warley de Souza Borges, do Departamento de Química da Universidade Federal do Espírito Santo.

Figura 5. Estruturas químicas dos alcaloides homolicorínicos 1-7.

3.2 Análises por espectrometria de massas

3.2.1 Estudo das vias de fragmentação dos compostos 1-7 protonados

Os alcaloides homolicorínicos **1-7** foram dissolvidos em uma mistura de metanol:água 8:2 (v/v) e analisados em espectrômetro de massas Xevo® TQ-S tandem quadrupole (Waters Corporation, Milford, MA, USA) equipado com fonte Z-spray e operando no modo positivo de ionização. As amostras foram dissolvidas com 0,1% de ácido

fórmico, até a concentração de 1,0 µg/mL. As amostras foram infundidas diretamente na fonte de ionização em um fluxo de 0,1 mL/min. No caso dos experimentos com troca por deutério, os compostos **1-7** foram dissolvidos em MeOH:D₂O (1:1 v/v). As voltagens do capilar e do cone foram otimizadas para 3,2 kV e 40 V, respectivamente. Foi utilizado N₂ como gás de dessolvatação, a uma temperatura de 250°C. A temperatura da fonte de ionização foi de 150°C. O volume de amostra injetado foi de 5 µL. Nos experimentos de espectrometria de massas sequencial, argônio (99,999%) foi utilizado como gás de colisão, com energias de colisão (E_{lab}) entre 5 e 50 eV. A faixa de massa/cargas utilizada nos experimentos foi de m/z 50-400. Para a realização dos experimentos com troca por deutério, as amostras dos alcaloides homolicorínicos **1-7** foram solubilizadas em MeOH:D₂O (1:1 v/v).

As análises por espectrometria de massas sequencial (MSⁿ) foram feitas por infusão direta das amostras dissolvidos em metanol em espectrômetro de massas AmaZon Speed (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) equipado com analisador do tipo *ion trap* e fonte de ESI, operando em modo positivo, a um fluxo de 5 mL/min. O gás Nitrogênio foi utilizado tanto para nebulização (6 psi) como para a secagem (8 mL/min, 220 °C). A faixa de massa/carga utilizada nos experimentos foi de m/z 50-400.

4. Resultados e Discussão

4.1 Seleção da energia de colisão (E_{lab}) “ótima”

Inicialmente foram otimizadas algumas condições do equipamento para a obtenção dos espectros de massas (por exemplo, a voltagem do cone extrator) visando maximizar o número de moléculas protonadas de cada alcaloide homolicorínico, que foram selecionadas como íon precursor nos experimentos de espectrometria de massas sequencial (ESI-MS/MS). Como nenhum dos compostos apresentou alta afinidade por sódio, não houve a necessidade de adicionar ácido fórmico 0,1 % à solução para aumentar o número de moléculas protonadas formadas.

Em estudos anteriores, nosso grupo de pesquisa demonstrou a importância das correlações estrutura-fragmentação para a elucidação das vias de fragmentação de uma série de compostos que possuem um mesmo núcleo estrutural [62-64]. Idealmente, essas correlações são deduzidas a partir de espectros de íons produtos obtidos em uma energia de colisão otimizada (E_{lab}), na qual espera-se que ocorra um decréscimo na intensidade relativa da molécula protonada no espectro de EM/EM abaixo de 50%, acompanhado por um aumento na intensidade relativa dos íons fragmentos sem fragmentação excessiva [65]. O uso de um mesmo valor de E_{lab} para comparação dos dados de ESI-EM/EM tem como objetivo minimizar os efeitos dos parâmetros experimentais sobre o perfil de fragmentação e, assim, fazer com que as diferenças entre os espectros de íons produtos de compostos estruturalmente semelhantes possam ser intimamente associadas às diferenças estruturais entre eles. Em estudos anteriores, nosso grupo de pesquisa demonstrou a importância de correlações estrutura-fragmentação para a elucidação das vias de fragmentação de uma série de compostos que possuem mesmo núcleo estrutural, tais como lactonas sesquiterpênicas [62], dicetopiperazinas [66], alcaloides plumerânicos [64], diterpenos labdânicos [67], compostos aroilbenzofurânicos [65] e neolignanas diidrobzofurânicos [68, 69].

Os espectros de íons produtos dos alcaloides homolicoicóricos protonados **1-7** obtidos nesta energia de colisão selecionada foram então analisados e comparados entre si, sendo as diferenças entre esses espectros associadas às diferenças entre as estruturas dos alcaloides correspondentes. Foram então identificados íons produto comuns (ou seja, são formados para todos os compostos analisados) e, íons diagnósticos (aqueles formados apenas para um ou mais compostos que apresentem um grupo funcional específico). A partir desses dados foram elaboradas as propostas de fragmentação visando explicar a formação dos íons mais intensos nos espectros de íons produtos (intensidade acima de 5 % na energia de colisão selecionada).

Na figura 6 (p. 16) encontram-se os gráficos da variação da intensidade relativa de alguns íons produtos dos alcaloides protonados **1-7** em função da energia de colisão (E_{lab}) utilizada. A partir da análise desses gráficos, foi possível concluir que a energia ótima para se comparar os espectros é a de $E_{lab} = 20$ eV. Na figura 7 (p. 17) encontram-se os espectros de íons produtos dos compostos **1-7**, obtidos a 20 eV, obtidos em espectrômetro QqQ (baixa resolução). Os dados desses espectros foram utilizados em combinação com os dados de MS^3 e MS^4 (Anexos 2 a 8) e com os experimentos com troca de deutério para a elucidação das vias de fragmentação desses compostos (Anexo 1). As vias de fragmentação de cada um desses compostos encontram-se mostradas nos esquemas 1 a 7 (p. 18, 19 e 20).

As relações estrutura-fragmentação foram obtidas comparando-se as vias de fragmentação dos compostos **1-7** com as respectivas estruturas. Essas correlações encontram-se sumarizadas no esquema 8 (p. 21) e na tabela 1 (p. 22).

Figura 6. Gráficos da intensidade relativa (%) dos íons produtos dos alcaloides homolicorínicos 1-7 desprotonadas em função energia de colisão (E_{lab} , em eV).

Figura 7. Espectro de íons produtos dos alcaloides homolalicínicos protonados 1-7 (QqQ, Ar, E_{lab} = 20 eV)..

Esquema 1. Vias de fragmentação da 7-metoxinormasonina (1) protonada (m/z 316).

Esquema 2. Vias de fragmentação da 7-metoxi-masonina (2) protonada (m/z 330).

Esquema 3. Vias de fragmentação da candimina (3) protonada (m/z 346).

Esquema 4. Vias de fragmentação da 2-O-metil-candimina (**4**) protonada (m/z 360).

Esquema 5. Vias de fragmentação da 2 α -metoxi-homolicorina (**5**) protonada (m/z 346).

Esquema 6. Vias de fragmentação da albomaculina (6) protonada (m/z 346).

Esquema 7. Vias de fragmentação da 2α,7-dimetoxihomolicorina (7) protonada (m/z 376).

Tabela 1. Principais picos observados nos espectros de íons produtos dos alcaloides **1-7** protonados (QqQ, Ar, $E_{\text{lab}} = 20$ eV).

Atribuição	1	2	3	4	5	6	7
A ($[M+H]^+$)	316 (57)	330 (65)	346 (41)	360 (70)	346 (52)	346 (43)	376 (42)
B (A – $\text{CH}_3^\bullet$)	301 (10)	315 (8)	331 (5)	345 (10)	331 (8)	331 (5)	361 (5)
P1 (B – $\text{H}^\bullet$)	—	—	—	—	330 (12)	330 (3)	360 (5)
C (A – H_2O)	298 (75)	312 (100)	328 (15)	342 (6)	328 (8)	328 (50)	358 (5)
P2 (B – $\text{CH}_3^\bullet$)	—	—	—	—	—	—	346 (6)
D (A – CH_3OH)	—	—	—	328 (7)	314 (30)	—	344 (8)
P3 (B – H_2O ou C – $\text{CH}_3^\bullet$)	283 (19)	297 (18)	313 (7)	—	313 (5)	313 (8)	—
P4 (C – H_2O)	280 (100)	294 (80)	310 (12)	—	310 (5)	310 (12)	—
P5 (P1 – CH_2O)	—	—	—	—	300 (5)	300 (8)	—
P6 (B – CH_3OH ou D – $\text{CH}_3^\bullet$)	—	—	—	313 (10)	299 (5)	—	—
P7 (P3 – $\text{CH}_3^\bullet$)	—	—	—	—	298 (18)	298 (35)	—
P8 (C – CH_3OH ou D – H_2O)	—	—	—	310 (35)	296 (58)	—	326 (14)
P9 (P2 – $\text{C}_2\text{H}_7\text{N}$)	—	—	—	—	—	—	315 (20)
P10 (D – CO)	—	—	—	300 (22)	—	—	—
P11 (C – CO)	270 (24)	284 (10)	300 (5)	—	—	—	—
P12 (P8 – $\text{CH}_3^\bullet$)	—	—	—	295 (80)	—	—	311 (50)
P13 (P4 – $\text{CH}_3^\bullet$)	265 (80)	279 (75)	295 (9)	—	295 (6)	295 (24)	—
P14 (P8 – H_2O)	—	—	—	292 (95)	278 (70)	—	308 (10)
P15 (P9 – $\text{CH}_3^\bullet$)	—	—	—	—	—	—	300 (7)
P16 (P4 – H_2O)	—	—	292 (10)	—	—	—	—
P17 (B – CO_2)	257 (33)	—	—	—	—	—	—
P18 (P3 – CO ou P11 – $\text{CH}_3^\bullet$)	255 (10)	269 (18)	285 (13)	—	285 (57)	285 (11)	—
P19 (P8 – CH_2O / P12 – $\text{CH}_3^\bullet$)	—	—	—	—	—	—	296 (40)
P20 (P4 – CH_2O)	—	—	—	—	280 (3)	280 (20)	—
P21 (P9 – CH_2O)	—	—	—	—	—	—	285 (20)
P22 (P6 – CO)	—	—	—	285 (18)	271 (30)	—	—
P23 (P7 – CO)	—	—	—	—	270 (30)	270 (12)	—
P24 (P11 – CH_2O ou P18 – $\text{CH}_3^\bullet$)	240 (34)	254 (10)	—	—	—	—	—
P25 (P8 – CO)	—	—	—	282 (20)	—	—	—
P26 (P14 – CH_2O)	—	—	—	—	—	—	278 (12)

P27 (P14 – CH₃• / P12 – H₂O)	—	—	—	277 (40)	—	—	—
P28 (P11 – CH₃NH₂)	—	—	269 (18)	—	—	—	—
P29 (P10 – CH₃NH₂)	—	—	—	269 (35)	—	—	—
P30 (P19 – CO)	—	—	—	—	—	—	268 (30)
P31 (P13 – CO)	—	—	—	—	267 (18)	267 (12)	—
P32 (P31 – H•)	—	—	—	—	—	266 (12)	—
P33 (P8 – CH₃NH₂)	—	—	—	—	265 (100)	—	—
P34 (P18 – CO)	—	—	257 (10)	—	—	—	—
P35 (P18 – CH₂O)	—	—	—	—	255 (50)	—	—
P36 (P18 – NH₂R₁)	238 (12)	238 (10)	254 (8)	—	—	—	—
P37 (P31– CH₃•)	—	—	—	—	—	252 (22)	—
P38 (P25 – CH₂O)	—	—	—	252 (40)	—	—	—
P39 (P29 – CO)	—	—	—	241 (45)	—	—	—
P40	—	—	—	—	234 (70)	—	—
E	221 (40)	221 (50)	221 (100)	221 (100)	207 (64)	237 (100)	237 (100)
P41 (E – CH₃•)	206 (23)	206 (21)	206 (18)	206 (23)	192 (12)	222 (19)	222 (10)
P42 (P41 – H•)	205 (20)	205 (18)	205 (17)	205 (40)	191 (41)	221 (13)	221 (10)
P43 (E – CO)	193 (8)	193 (9)	193 (11)	193 (18)	179 (30)	209 (20)	209 (20)
P44 (P42 – CH₃•)	—	—	—	—	—	206 (10)	206 (16)
P45 (P41– CO ou P42–CH₃•)	178 (20)	178 (11)	178 (18)	178 (20)	164 (5)	194 (5)	194 (5)
P46 (P42–CO ou E – CO₂)	177 (12)	177 (10)	177 (12)	177 (22)	163 (12)	193 (19)	193 (18)
P47 (P44– CO)	—	—	—	—	—	178 (14)	178 (16)
F	96 (4)	110 (9)	126 (10)	140 (18)	140 (20)	110 (10)	140 (20)
P48 (F – H₂)	---	108 (13)	124 (8)	138 (5)	138 (5)	108 (12)	138 (5)
P49 (F – CH₄)	---	94 (29)	110 (8)	124 (18)	124 (10)	94 (18)	124 (20)
P50 (F – CH₂O)	—	—	—	110 (8)	110 (10)	—	110 (13)
P51 (F – R₂H)	—	—	108 (5)	108 (12)	108 (22)	—	108 (8)
P52 (P48 ou P49 – CH₂O)	—	—	96 (20)	94 (55)	94 (60)	—	94 (25)
P53 (P52 – H₂)	—	—	94 (10)	—	—	—	—
P54 (F – C₂H₄)	---	82 (8)	82 (6)	82 (8)	82 (5)	82 (5)	82 (5)

Esquema 8. Visão geral das vias de fragmentação dos alcaloides homolicoarínicos **1-7**.

4.2 Relações estrutura-fragmentação dos alcaloides 1-7

Com o objetivo de facilitar a discussão dos resultados, os anéis do núcleo homolicorínico dos compostos **1-7** foram nomeados com as letras A, B, C e D, enquanto os substituintes desses anéis foram genericamente representados por R₁, R₂, R₃ e R₄, conforme mostrado na figura 8 (p. 24). Nos alcaloides **1-4**, os grupos R₄ estão unidos, formando uma estrutura cíclica dioximetilênica, enquanto nos alcaloides **5-7** os grupos R₄ são dois grupos metoxilas. As posições do esqueleto foram numeradas conforme proposto por Ghosal e colaboradores (1985) [32].

Figura 8. Numeração dos carbonos e designação dos anéis da estrutura básica dos alcaloides homocorínicos **1-7**.

A análise do mapa de fragmentação elaborado a partir dos espectros de íons produtos de íons produtos obtidos em $E_{\text{lab}} = 20$ eV revelou que a maioria dos íons produtos dos alcaloides **1-7** são resultantes de perdas de H_2O , CO , CH_3OH , CH_2O e de $\text{CH}_3^\bullet$. Eliminações de água ou de radicais metila ($\text{CH}_3^\bullet$) ocorrem a partir do íon precursor de todos os alcaloides homolcorínicos investigados nesse estudo, porém resultam em íons de menor intensidade relativa. Para os compostos **3**, **4**, **5** e **7**, que possuem R_3 diferente de hidrogênio, eliminações de R_3H (H_2O para o composto **3** e de CH_3OH para os compostos **4**, **5** e **7**) também podem ocorrer, tanto a partir do íon precursor como a partir de outros íons produtos.

Após a eliminação de $\text{CH}_3^\bullet$ a partir do íon precursor dos alcaloides homolcorínicos **1-7**, que resulta na formação do íon produto **B**, a fragmentação pode ocorrer seguindo quatro vias competitivas, com eliminação de espécies radicalares ($\text{CH}_3^\bullet$ e $\text{H}^\bullet$) ou neutras (H_2O , CO_2 ou CH_3OH) a partir de **B**. Para os compostos **1**, **2** e **6**, para os quais $\text{R}_2=\text{H}$, a eliminação de uma molécula de H_2O para formação de **P3** é o processo predominante. Por outro lado, a formação do íon produto **P1** por meio da eliminação de $\text{H}^\bullet$ ocorreu apenas para os compostos **5**, **6** e **7**, que possuem grupos metoxilas ligados a C8 e C9, não ocorrendo no caso dos compostos **1**, **2**, **3** e **4**, em que esses carbonos são parte de um grupamento metilenodióxi. Este fato pode ser indicativo de que a formação de **P1** está

associada à homólise da ligação C-H do grupamento metoxila ligado a C8 e C9 de **5**, **6** e **7**. A eliminação de $\text{CH}_3^\bullet$ a partir de **B** para formar o íon **P2** é diagnóstica para o composto **7**, estando vinculada à presença de grupos metoxila vicinais a partir dos quais esse processo pode ocorrer.

Comparando-se as vias de fragmentação da 7-metoxi-normasonina (**1**) (esquema 1, p. 18) e da 7-metoximasonina (**2**) (esquema 2, p. 18), que diferem entre si apenas quanto ao substituinte R_1 ($\text{R}_1 = \text{H}$ para **1** e $\text{R}_1 = \text{CH}_3$ para **2**), é possível verificar muitas similaridades. Em ambos os espectros os picos correspondentes aos íons produtos **C** ($\text{A} - \text{H}_2\text{O}$), **P4** ($\text{C} - \text{H}_2\text{O}$), **P13** ($\text{C} - \text{CH}_3^\bullet$) e **E** ($\text{A} - \text{C}_2\text{H}_4 - \text{C}_6\text{H}_7\text{NR}_1\text{R}_2$) são os mais intensos. Além disso, é possível observar que os picos no espectro de íons produtos de **2** diferem dos correspondentes picos no espectro de **1** em 14 Da, indicando que são formados pelas mesmas vias e mantêm em suas estruturas o substituinte R_1 . No entanto, este substituinte é eliminado no processo de fragmentação que leva à formação de **P36** (**P18** - R_1NH_2), de m/z 238. A principal diferença entre os espectros dos dois alcaloides é a presença do pico correspondente ao íon **P17** (**B** - CO_2), que é formado apenas para o composto **1**.

As estruturas da candimina (**3**) e da 2-O-metil-candimina (**4**) diferem da 7-metoximasonina (**2**) quanto à presença de um substituinte oxigenado em C3 ($\text{R}_2 = \text{OH}$ para **3**; $\text{R}_2 = \text{OCH}_3$ para **4**). No caso do alcaloide **4**, a eliminação deste grupo na forma de metanol (MeOH , 32 Da) diretamente do íon precursor (**A**) leva à formação do íon produto **D** ($\text{A} - \text{MeOH}$), que compete com a eliminação de água (formação de **C**) e leva à formação de vários outros íons produtos, todos resultantes de eliminações de CH_3 , H_2O , CO , CH_2O e CH_3NH_2 . Como diferenças entre os espectros de íons produtos de **3** e **4** merecem ser destacadas a eliminação consecutiva de três moléculas de água para o composto **3**, que culmina na formação do íon produto **P16** (**P4** - H_2O), e para **4**, a eliminação de metanol (32 Da) para formar o íon produto **D**.

Ao contrário dos compostos **1** (7-metoxi-normasonina), **2** (7-metoximasonina) e **3** (candimina), que exibem um grupamento dioximetilênico fundido a C8 e C9, os compostos **5** (2 α -metoxihomolicorina), **6** (albomaculina) e **7** (2 α ,7-dimetoxihomolicorina) apresentam grupos metoxila (OCH₃) ligados a C8 e a C9. A presença desses grupos aumenta a tendência para a ocorrência de eliminações radicalares de CH₃[•] e H[•] e de fragmentos moleculares, especialmente CO e CH₂O, em relação aos compostos **1-4**. Este fato explica por que os íons produtos **P5** (**P1** – CH₂O), **P7** (**P3** – CH₃[•]), **P23** (**P7** – CH₃[•] ou **P7** – CO), **P30** (**P19** – CO) e **P31** (**P13** – CO) não foram observados para os compostos **1-4** protonados.

4.3 Considerações gerais sobre a fragmentação dos alcaloides homolicorínicos 1-7

Para facilitar a discussão das vias de fragmentação dos alcaloides homolicorínicos, serão abordados nessa seção alguns aspectos mecanísticos envolvidos nas eliminações de CH₃[•] (15 Da), NH₃ (17 Da), H₂O (18 Da), CO (28 Da), CH₂O (30 Da), e NH₂CH₃ (31 Da), que são responsáveis pela formação da maioria dos íons produtos observados nos espectros de íons produtos desses compostos protonados. As eliminações listadas podem ocorrer tanto a partir da molécula protonada (íon precursor) como a partir de diferentes íons produtos, porém os mecanismos envolvidos são essencialmente os mesmos, conforme discutidos a seguir. Parte dos mecanismos apresentados nesta seção serão posteriormente omitidos dos esquemas com o intuito de reduzir o número de estruturas em cada esquema.

4.3.1. A questão do sítio de protonação

Em termos gerais, sabe-se que em espectrometria de massas a protonação pode ocorrer em vários sítios possíveis. No entanto, estudos para se determinar os sítios da estrutura de um composto orgânico mais suscetíveis à protonação são de grande valia, uma vez que nos dão uma ideia não apenas de qual população de espécies protonadas se encontra

em excesso em relação às demais, mas também permite estimar as energias envolvidas em processos de migrações de próton entre esses sítios [70]. Uma das ferramentas mais poderosas para se estimar os sítios de protonação é a Química Quântica Computacional, por meio da qual são estimados os valores de basicidade em fase gasosa (GB, do inglês, *gas-phase basicity*) e afinidade protônica (PA, do inglês *proton affinity*).

Analisando-se a estrutura dos alcaloides homolicoicônicos **1-7**, e considerando os dados de basicidade em fase gasosa disponíveis na literatura [71, 72], é possível sugerir que os sítios mais suscetíveis à protonação são o átomo de nitrogênio e de oxigênio da carbonila. Como neste trabalho os valores de GB e de AP não foram calculados, consideraremos um excesso a população de espécies protonadas no nitrogênio. Para explicar a formação de íons a partir de outras espécies protonadas, migrações do próton do átomo de nitrogênio para outros sítios menos básicos (por exemplo, o oxigênio do anel δ -lactônico) serão consideradas plausíveis após a ativação colisional (esquema 9). Nesses casos, essas migrações serão propostas com base nos resultados dos experimentos de troca com deutério.

Esquema 9. Protômeros mais prováveis para os alcaloides homolicoicônicos **1-7**.

4.3.2. Eliminações de $\text{H}^\bullet$, $\text{CH}_3^\bullet$, CO e CH_2O a partir de grupos metoxila

As moléculas protonadas ($[\text{M}+\text{H}]^+$) dos alcaloides homolicorínicos **1-7** selecionadas como íons precursores são íons elétron-pares (EE^+ , do inglês *even-electron ion*). De acordo com a “Regra do Elétron-Par”, a fragmentação de íons dessa natureza ocorre preferencialmente por meio da eliminação de fragmentos neutros, gerando assim novos íons elétron-pares [73]. Neste contexto, a eliminação de um radical metila ($\text{CH}_3^\bullet$) a partir do íon precursor (EE^+) é uma violação à tendência estabelecida pela Regra do Elétron-Par. No entanto, a homólise da ligação C-O de grupos metoxilas (OCH_3) ligados a anéis aromáticos são processos energeticamente viáveis, uma vez que levam à formação de radicais fenoxila ($\text{PhO}^\bullet$), que são estabilizados por deslocalização do elétron desemparelhado. Eliminações desta natureza têm sido reportadas na literatura para diversas classes de compostos, tais como neolignanais diidrobenzofurânicos [69] e alcaloides indólicos [64].

Para os compostos **1-4**, que apresentam apenas um grupo metoxila ligada ao anel aromático, mais especificamente em C7, a eliminação de $\text{CH}_3^\bullet$ pode ocorrer apenas desta posição, formando o íon **P13** (**P4** – $\text{CH}_3^\bullet$). No caso do composto **5**, as eliminações podem ocorrer a partir dos grupos metoxilas ligados a C8 e C9, sendo que para os compostos **6** e **7** as eliminações também são possíveis a partir da metoxila em C7, formando os íons **B** (**A** – $\text{CH}_3^\bullet$), **P3** (**C** – $\text{CH}_3^\bullet$), **P18** (**P11** – $\text{CH}_3^\bullet$). Conforme mencionado anteriormente, essas eliminações dão origem a um íon elétron-ímpar, que pode fragmentar-se por meio da eliminação de outro radical ou de uma molécula. De acordo com a “Regra do Elétron-Ímpar”, íons desta natureza ($\text{OE}^{\bullet+}$) tendem a se fragmentar via eliminação de um radical para formar um íon elétron-par [73]. Contudo, perdas de fragmentos neutros também podem ocorrer.

Eliminações de $\text{CH}_3^\bullet$ a partir de grupos metoxila aromáticos podem ser acompanhadas pela eliminação de CO , que resulta da contração do anel do radical fenoxila

de 6 para 5 membros (esquema 10, p 30). Como esse processo é acompanhado por perda da aromaticidade do anel, as vias de eliminação de CO são geralmente desfavorecidas energeticamente, resultando na formação de íons produtos que são relativamente pouco intensos no espectro de íons produtos.

Para compostos que apresentam grupos metoxilas em posição *orto* no substituinte R5, como os alcaloides **5**, **6** e **7**, o radical fenoxila formado após a eliminação de $\text{CH}_3^\bullet$ pode eliminar um segundo radical $\text{CH}_3^\bullet$, conforme representado no esquema 10. Em alguns casos, dependendo da estrutura, eliminações de $\text{H}^\bullet$ também podem ocorrer. Além disso, o grupo metoxila também pode ser eliminado na forma de formaldeído (CH_2O , 30 u) para formar um íon produto de mesma massa nominal que o íon resultante de duas eliminações consecutivas de dois radicais $\text{CH}_3^\bullet$.

Em resumo: 1) a eliminação de um radical $\text{CH}_3^\bullet$, CO e CH_2O é possível para todos os alcaloides homolicorínicos analisados; 2) as eliminações dois radicais $\text{CH}_3^\bullet$, consecutivas ou não, e de hidrogênio radicalar ($\text{H}^\bullet$) ocorrem apenas para os compostos **5**, **6** e **7**; 3) as eliminações de três radicais $\text{CH}_3^\bullet$, consecutivas ou não, podem ocorrer apenas para os compostos **6** e **7**.

Esquema 10. Eliminações de radicais $\text{CH}_3^\bullet$ e $\text{H}^\bullet$ e de CO e CH_2O envolvendo os grupos OCH_3 .

4.3.3. Eliminações de H_2O , CH_3OH , NH_3 e CH_3NH_2

Os alcaloides homolimonícos **1-7** apresentam em suas estruturas um anel δ -lactônico. A eliminação de água (18 Da) tanto da molécula protonada como de outros íons produtos requerem a abertura do anel δ -lactônico, que é iniciada pela migração do próton (prototropismo) do átomo de nitrogênio (sítio mais básico da estrutura) para o oxigênio do éster, que se encontra ligado entre C1 e C6. Com base em dados termoquímicos estimados por Química Computacional, Crotti e colaboradores (2004) demonstraram que em γ -lactonas a protonação deste sítio enfraquece a ligação entre o carbono carbonílico e o oxigênio do

éster da lactona, facilitando a sua ruptura e a consequente formação de um íon acílio [74]. A eliminação de água ocorre por meio de um rearranjo de hidrogênio remoto ao sítio de carga e é dirigida tanto pela extensão do sistema conjugado do íon produto em relação ao íon precursor como pela estabilização da carga positiva pelo par de elétrons do oxigênio adjacente no íon acílio (Esquema 11) [54].

Esquema 11. Eliminação de água a partir do anel δ -lactônico dos alcaloides 1-7.

No caso da candimina (**3**), a presença do grupo hidroxila em C2 oferece uma via adicional para a eliminação de água por meio de um rearranjo de hidrogênio remoto à carga. O hidrogênio envolvido nessa eliminação dependerá da estrutura do íon precursor a partir do qual a eliminação vai ocorrer. Por exemplo, a eliminação de água a partir da molécula protonada envolvendo o grupo OH em C2 ocorrerá possivelmente com a participação de H4a, conforme representado no Esquema 12.

Esquema 12. Eliminação de água a partir da candimina (**3**) protonada (m/z 346) com participação de 2-OH.

Reações de fragmentação similares às representadas no Esquema 12 podem também levar à formação do íon **D** por meio da eliminação de metanol (CH_3OH , 32 Da) a partir dos compostos **4**, **5** e **7**, conforme representado no esquema 13 (p. 32).

Esquema 13. Eliminação de metanol a partir dos alcaloides 4, 5 e 7 protonados.

Ao contrário da eliminação de água a partir do anel δ -lactônico, que é um processo bem descrito e estabelecido na literatura, a eliminação de uma segunda molécula de água durante a fragmentação dos alcaloides homolalicorínicos **1-7** é um processo muito menos evidente e naturalmente mais complexo. A elaboração de um mecanismo plausível para explicar este processo, que estivesse de acordo com a alta intensidade relativa dos íons **P4** (para **1, 2, 3, 5 e 6**) e **P14** (para **4, 5 e 7**) representou o maior desafio deste trabalho.

Uma proposta para a formação do íon **P4** para os compostos **1-3** encontra-se apresentada no esquema 14 (p. 33). A proposta fundamenta-se no ataque nucleofílico da nuvem π entre C1 e C10b dirigida pela formação de um carbocátion benzílico. Na sequência, o par de elétrons do oxigênio da carbonila abstrai o próton α à carbonila, formando um íon oxônio α,β -insaturado. Na próxima etapa ocorre o ataque nucleofílico de hidreto oriundo de C4a ao carbono da carbonila em C6, com a formação de um íon imínio α,β -conjugado e de uma hidroxila. Finalmente, ocorre a eliminação de água por meio de um rearranjo de hidrogênio remoto, que ocorre com participação de H12. A formação de **P14** para os compostos **4, 5 e 7** ocorre pelo mesmo mecanismo, uma vez que as posições 2, 3, 4 e 11 envolvidas na eliminação de metanol para formar **D** não estão participam deste mecanismo.

Esquema 14. Proposta para a formação do íon produto **P4**.

A eliminação de CO a partir de íons acílios é bem reportada na literatura e requer a clivagem heterolítica simples de ligação C-C, com consequente formação de um carbocátion. Em solução, esses processos são facilitados pelo processo de solvatação, por meio do qual o solvente estabiliza a carga positiva que vai se formando no estado de transição envolvido. No entanto, devido à ausência deste efeito estabilizante em fase gasosa, processos que envolvem separação de carga são geralmente menos favorecidos em relação àqueles que ocorrem com retenção de carga [73]. No caso da eliminação de CO a partir do íon acílio, a estabilização por ressonância não é possível, uma vez que o orbital vazio do carbocátion estará orientado perpendicularmente aos orbitais p do anel. Além disso, o carbono sp é relativamente mais eletronegativo, o que compromete ainda mais a acomodação da carga positiva em C6a. Por essa razão, a perda de CO a partir do acílio formado pode ocorrer por outros mecanismos (por exemplo, a contração do anel do radical fenoxila, discutida anteriormente no esquema 10, p. 30) ou então é seguida por uma rápida transferência de hidreto, possivelmente de H4a para C6a (para os alcaloides **1-7**) ou do grupamento dioximetilênico para C6a (apenas para os alcaloides **1-4**) (Esquema 15). Neste caso, a eliminação de R_2H (H_2O para o composto **3** e CH_3OH para os compostos **4, 6 e 8**) ocorrerá com participação de H11.

Esquema 15. Eliminação de CO seguida pela eliminação de R_2H nos compostos **3**, **4**, **5** e **7**

As eliminações de amônia (NH_3) para a 7-metoxi-normasonina (**1**) e de metilamina (CH_3NH_2) para os demais alcaloides homolicorínicos investigados requerem a clivagem das ligações C4a–N e C12–N. O mecanismo mais provável envolve inicialmente a heterólise da ligação C4a–N, com consequente formação de um carbocátion alílico estabilizado por ressonância. A clivagem da ligação C12–N se dá por meio de um rearranjo de hidrogênio remoto à carga, conforme mostrado no Esquema 16.

Esquema 16. Proposta para a eliminação de amônia ($R_1=H$) e metilamina ($R_1=CH_3$).

É importante ressaltar que apesar de a eliminação de amônia e metilamina terem sido representadas no Esquema 16 (p. 33) a partir do íon precursor, esta eliminação não foi observada diretamente da molécula protonada dos alcaloides homolicorínicos **1-7**. Esta eliminação é precedida, em todos os casos, pela eliminação de água, que pode introduzir uma ligação dupla entre C10b e C1. Essa ligação dupla contribui para a estabilização adicional da carga positiva que vai se formando em C4a no estado de transição enquanto a ligação C4a–N vai sendo rompida.

Embora a maioria dos íons produtos dos alcaloides **1-7** protonados seja formada pelas perdas de $\text{CH}_3^\bullet$, NH_3 , H_2O , CO , CH_2O e NH_2CH_3 , as reações de fragmentação que levam a essas perdas são competitivas e ocorrem de maneira sucessiva, podendo ocorrer a partir de diferentes íons produtos e, assim, resultar em um espectro de íons com um grande número de íons fragmentos. Além disso, as pequenas diferenças estruturais exercem um papel chave tanto na termodinâmica (estabilidade intrínseca dos íons produtos) como na cinética (velocidade de decomposição em outros íons produtos) dessas reações de fragmentação. Nas sessões a seguir encontram-se algumas propostas para a formação dos principais íons fragmentos dos espectros de íons produtos dos alcaloides homolicorínicos protonados **1-7**.

4.4 Formação dos íons produtos gerais B, C, D e E

A análise conjunta dos espectros de íons produtos (Figura 7, p. 17), da tabela 1 (p. 21) e das vias de fragmentação dos compostos **1-7** protonados (esquemas 1-7 p. 18 a 20) revelou que, na energia de colisão selecionada ($E_{\text{lab}} = 20 \text{ eV}$), existem pelo menos quatro vias de fragmentação que são comuns aos alcaloides homolicorínicos selecionados para a execução deste trabalho (vias **a**, **b**, **c** e **e**, Esquema 17, p. 35) e uma via que é diagnóstica para os compostos **4**, **5** e **7** (via **d**), .

Esquema 17. Formação dos íons produtos **B**, **C**, **E** e **F**.

A eliminação de água (via **b**, esquema 17) leva à formação do íon **C** (**A** – H₂O).

Comparando-se a estrutura dos compostos, e considerando que o grupamento δ -lactônico é comum a todos eles, é possível concluir que essa eliminação ocorre segundo o mecanismo descrito no esquema 11 (p. 31). A ocorrência desse mecanismo pode ser sustentada pelos experimentos de troca com deutério (Anexo A1), onde a eliminação de HDO (19 Da) suporta não apenas a migração de próton do nitrogênio do anel D para o oxigênio entre C6 e C1 como também a participação de um dos hidrogênios do anel C (possivelmente H10b ou H2) na formação do íon produto **C** (Esquema 12, p. 31).

A segunda via de fragmentação (via **b**) comum aos compostos **1-7** protonados é a eliminação de CH₃[•] pelo mecanismo discutido anteriormente (esquema 10, p. 29). Apesar de esta via de fragmentação levar à formação de vários íons produtos e aumentar a complexidade do espectro de íons produtos na energia de colisão (E_{lab}) de 20 eV, a menor intensidade do íon produto **B** (**A** – CH₃[•]) e dos íons produtos dele originados em relação aos íons produtos derivados da via **a** indica que a via de fragmentação **b** é menos favorecida que a via **b**, que se inicia pela formação do íon **C** (**A** – H₂O). Devido à baixa intensidade desses

íons no espectro de MS/MS, não foi possível selecionar íons desta via de fragmentação para a realização e experimentos de MSⁿ.

Os íons das vias de fragmentação **d** e **e** são originados a partir de uma reação de retro-Diels-Alder (RDA) que ocorre no anel C. Esta reação é típica de anéis de seis membros que exibem uma ligação dupla endocíclica e sua ocorrência é frequentemente reportada na fragmentação de várias classes de produtos naturais, tais como flavonoides [54]. A natureza dos íons formados a partir desta reação dependerá do sítio em que o próton estiver ligado. No entanto, o íon produto **E** possui maior intensidade relativa que o **F** em todos os espectros obtidos em energias abaixo de 30 eV. No caso do produto **F**, apenas para o composto **1** (R₁ = H) a sua intensidade relativa é menor que 5%, o que pode indicar que o grupo metila (R₁ = CH₃) nos demais compostos exerce efeito estabilizante sobre a carga formal positiva no átomo de nitrogênio.

4.4.1. Formação dos íons produtos derivados de B

A formação do íon produto **B** (**A** a partir dos alcaloides homolicorínicos protonados **1-7** se dá por meio da eliminação radicalar de CH₃• e é um processo que viola a Regra do Elétron-Par, o que está em concordância com sua baixa intensidade relativa no espectro de íons produtos desses compostos [73]. Apesar de a Regra do Elétron-ímpar preconizar a tendência para a eliminação de um radical a partir de **B** (por exemplo, H• ou CH₃•), moléculas como água e metanol também podem ser eliminadas, conforme será abordado a seguir (Esquema 8, p. 23 e esquema 10, p. 30).

Conforme discutido anteriormente, a formação do íon produto **P1** (**B** – H•) é diagnóstica dos alcaloides **5**, **6** e **7**, que apresentam grupos metoxilas vicinais (em C8 e C9) ao invés de um grupo dióximetilênico. Considerando que os compostos **1-4** podem também formar o íon **B** por meio da eliminação de CH₃• e que a posterior eliminação de H• só ocorre

para **5**, **6**, e **7**, é possível concluir que para esses três alcaloides a primeira eliminação de $\text{CH}_3^\bullet$ deve necessariamente ocorrer a partir do grupo metoxila em C8 (Esquema 18).

Esquema 18. Formação do íon produto **P1** para os compostos **5**, **6** e **7**.

Outro processo de fragmentação radicalar que pode ocorrer a partir de **B** e que compete com a formação de **P1** ($\text{B} - \text{H}^\bullet$) é a eliminação de $\text{CH}_3^\bullet$. A formação do íon produto **P2** (m/z 346) foi observada apenas para a 2 α ,7-dimetoxihomolicorina (**7**). Uma possível explicação para este fato seria a presença de três grupos metoxilas no anel aromático do composto **7** (posições C7, C8 e C9), que podem ser perdidas por diferentes vias de fragmentação e levam à formação de íons isobáricos (isto é, com mesmo valor de m/z). O composto **6** também apresenta as três metoxilas no anel aromático, porém a competição com a formação de **P3** ($\text{B} - \text{H}_2\text{O}$), que não ocorre para o composto **7**, contribui para que o íon **P2** ($\text{B} - \text{CH}_3^\bullet$) seja observado apenas no espectro do alcaloide **7**. A eliminação de metilamina (CH_3NH_2 , 31 Da) a partir de **P2** leva à formação do íon produto **P9** (m/z 315), que posteriormente decompõe-se no em **P21** (m/z 285) após a eliminação de formaldeído (CH_2O , 30 Da) ou **P15**, pela eliminação de radical metila (Esquema 19, p. 39).

Esquema 19. Formação dos íons produtos **P2**, **P9**, **P15** e **P21** para o alcaloide **7**.

Apesar de representarem uma violação à Regra do Elétron-ímpar, as eliminações de água e de metanol a partir de **B** são possíveis e competem com as eliminações radiculares de $H^\bullet$ ou $CH_3^\bullet$. A análise comparativa dos dados de ESI-MS/MS dos alcaloides **1-7** indicaram que as eliminações radiculares a partir de **B** ocorrem preferencialmente para os compostos **5**, **6** e **7**, que exibem grupos metoxilas em C8 e C9. Por outro lado, a eliminação de água a partir de **B** ($A - CH_3^\bullet$) para formar **P3** ($B - H_2O$) ocorre para os compostos **1**, **2**, **3**, **5** e **6** e requer a abertura do anel δ -lactônico pelo mesmo mecanismo discutido anteriormente (esquema 11, p. 31).

Para os compostos **1**, **2**, **3** e **4** a eliminação de $CH_3^\bullet$ a partir de **B** para formar **P2** torna-se impossibilitada devido à presença de apenas uma metoxila aromática na estrutura desses compostos. A posição em que esse grupo metoxila está ligado (C7) também

impossibilita a eliminação de $H^\bullet$. Dessa forma, outros processos de fragmentação, tais como a eliminação de água (18 Da) tornam-se mais relevantes para esses compostos.

No caso dos compostos **5**, **6** e **7**, as formações de **P1** ($B - H^\bullet$) compete com as eliminações de H_2O para formar **P3** ($B - H_2O$) e, para o composto **7**, também compete com a formação de **P2** ($B - CH_3^\bullet$). Contudo, a formação de **P2** pode ocorrer com a participação de duas metoxilas diferentes (em C7 e C9) e, por isso, torna-se um processo relativamente mais favorecido que a eliminação de água. Consequentemente, o pico correspondente ao íon **P3** ($B - H_2O$) não foi observado no espectro de íons produtos da 2 α ,7-dimetoxihomolicorina (**7**).

Os compostos protonados **1** (7-metoxi-normasonina, m/z 316) e **2** (7-metoximasonina, m/z 330) diferem entre si quanto à natureza de R1 (H para **1** e CH_3 para **2**). A comparação entre os espectros de íons produtos desses compostos (figura 7, p. 17 e esquemas 1 e 2, p. 18) revelou que as vias de fragmentação desses compostos são idênticas, de forma que a diferença de 14 unidades se reproduz na maioria dos íons de um espectro para outro. No entanto, o íon produto **P17** ($B - CO_2$, m/z 257) foi observado apenas no espectro do composto **1**. Portanto, a formação desse íon deve estar relacionada à natureza do substituinte R1 ligado ao átomo de nitrogênio.

Com o auxílio de um modelo molecular, é possível visualizar que a estrutura dos alcaloides homolicorínicos **1-7** é bastante rígida, com um pequeno grau de liberdade conformacional devido à fusão dos anéis A, B, C e D. Uma possível explicação para o fato de a formação de **P17** ser sido formado apenas para o composto **1** pode ser dada considerando-se que o volume do grupo metilo é muito maior que o do hidrogênio, o que aumenta a barreira energética para a interconversão entre as conformações envelope do anel pirrolidina no composto **2** em relação ao **1**. Consequentemente, o alinhamento adequado do orbital não-ligante do nitrogênio contendo com as ligações C4a–C10b, C10b–C1 e C1–O

para a ocorrência de uma fragmentação do tipo Grob-Wharton [54] representado no esquema 20 seria possível, na energia de $E_{\text{lab}}=20$ eV para o alcaloide **1**.

Esquema 20. Formação do íon produto **P17** (m/z 257).

As formações dos íons produto **P7** (**P3** – $\text{CH}_3^\bullet$) e **P23** (**P7** – CO) são diagnósticas para os compostos **5** e **6** que, ao contrário dos compostos **1**, **2** e **3**, possuem grupos metoxilas nas posições 8 e 9. A formação desses íons encontra-se proposta no esquema 22 (p. 42). Veremos que o íon produto **P23**, para **5** e **6** é isobárico do íon **P24**, porém, formado por vias de fragmentação diferentes.

Esquema 21. Formação dos íons produtos **P3**, **P6**, **P18** e **P36** para os alcaloides **1-4**.

Esquema 22. Formação dos íons produtos **B**, **P2**, **P3**, **P7** e **P23** para os alcaloides homolicorínicos 5, 6 e 7.

4.4.2. Formação dos íons produtos derivados de C

Ao contrário da formação de **B**, que envolve um processo que viola a Regra do Elétron-par – a perda de $\text{CH}_3^\bullet$ – a formação do íon produto **C** e dos íons que dele derivam se dá majoritariamente por meio de eliminações de moléculas de água (18 Da), monóxido de carbono (28 Da), formaldeído (30 Da), metilamina (31 Da) e metanol (32 Da). Nesta via de fragmentação, a eliminação de $\text{CH}_3^\bullet$ ocorre para a formação de **P3**, cuja formação a partir de **B** já foi discutida anteriormente (Esquema 10) e, por isso, não será abordada em detalhes. Outras eliminações do radical metila ocorrem em terminações de vias de fragmentação.

O íon produto **C** (**A** – H_2O) é intenso nos espectros de todos os alcaloides homolicorínicos investigados neste trabalho. Consequentemente, os íons produtos derivados dessa via de fragmentação tendem também a serem intensos nos espectros de íons produtos desses compostos, ainda que a intensidade relativa desses íons varie de composto para composto. Dentre as cinco vias de fragmentação de **C**, as eliminações de água e de R_2H são as mais favorecidas, conforme evidenciado por suas intensidades relativas nos espectros de massas. Para os compostos **3**, **4**, **5** e **7**, que apresentam grupo R_2 (OH para **3** e OCH_3 para **4**,

5 e 7), a eliminação de R_2H a partir de **C** é favorecida. Por outro lado, para os compostos **1**, **2**, **3** e **7**, a eliminação de água é o processo de fragmentação majoritário. Vale ressaltar que o composto **3** foi listado em ambos os casos porque as eliminações de R_2H e de H_2O a partir de **C** levam à formação de íons isobáricos.

Esquema 23. Formação dos íons produtos **C** e **P8**.

Conforme discutido anteriormente, a eliminação de CO (28 Da) nos alcaloides homolicorínicos **1-7** pode ocorrer segundo dois mecanismos distintos: (a) contração de anel, com expulsão de CO e retenção da carga, e (b) clivagem heterolítica da ligação C6a–C6 do íon acílio formado a partir da abertura do anel δ -lactônico, com migração da carga de C6 para C6a. Como nos alcaloides deste estudo o primeiro mecanismo requer a eliminação radicalar de $CH_3^\bullet$, as eliminações de CO a partir de **C** e **P8** ocorrerão por meio da clivagem do íon acílio, com consequente formação de um íon arílico. Como o orbital p vazio do carbocátion arílico formado está perpendicular aos orbitais p do anel aromático, a carga positiva no carbocátion arílico formado não estará deslocalizada por ressonância. Este fato, somado à eletronegatividade relativamente maior do carbono sp no qual a carga positiva do cátion arílico está acomodada, são fatores que contribuem para a baixa estabilidade do carbocátion formado. Desta forma, é possível que este sofra um rearranjo dirigido pela estabilização da carga. Neste sentido, as diferenças entre as vias de fragmentação do íon

produto **P11** (**C** – CO) dos compostos **1**, **2**, **5** e **6** serão diretamente afetadas pelo rearranjo sofrido por esse carbocátion (Esquema 24).

Esquema 24. Formação dos íons produtos **B**, **C** e **P11**.

Na literatura, carbocátions arílicos são descritos como espécies que possuem alta afinidade por hidretos [75]. Neste sentido, existem duas vias pelas quais o carbocátion arílico **P11** dos compostos **1**, **2**, **5** e **6** pode rearranjar-se, conforme mostrado no Esquema 25 (p. 45). Uma delas ocorre apenas com os compostos **1** e **2** e envolve a abstração de um hidreto do grupamento dioximetilênico, com formação de um íon oxônio. A outra via envolve a abstração do hidreto de C4a, que leva à formação de um íon imínio, podendo ocorrer tanto para **1** e **2** como para **6** e **7**. Em ambos a carga positiva encontra-se estabilizada pelo par de elétrons do heteroátomo adjacente. No caso do íon imínio, a carga positiva encontra-se adicionalmente estabilizada pela conjugação com as ligações duplas entre C2 e C3 e entre C1 e C10b.

Esquema 25. Possíveis rearranjos do carbocátion arílico **P11**.

A comparação entre as fragmentações dos compostos **1** e **2**, que possuem apenas uma metoxila ligada ao anel aromático, com a dos compostos **6** e **7**, indica que o íon **P11** – 30 Da (**P24**) dos compostos **1** e **2** é formado pela perda de formaldeído (CH_2O) e não de duas perdas consecutivas de radicais $\text{CH}_3^\bullet$. No caso dos compostos **6** e **7**, que possuem três grupos metoxilas aromáticas, tanto a perda de CH_2O (**P24**) como as perdas consecutivas de $\text{CH}_3^\bullet$ (**P18** e **P23**) podem levar à formação de **P11** – 30 Da.

Esquema 26. Formação dos íons **P18**, **P23** e **P24** para os compostos **1**, **2**, **5** e **6**. A formação de **P18** e **P24** dos compostos **1** e **2** a partir de **P11.2**, embora possível, não foi representada.

Para a candimina (**3**), a formação do íon **P11** (**C** – **CO**) ocorre segundo uma via de fragmentação diferente, que envolve a participação do grupo hidroxila em C3. Graças à presença desse grupo, a eliminação de água pode ocorrer antes da abertura do anel δ -lactônico, formando assim um dieno conjugado. O rearranjo de hidrogênio remoto à carga envolvido nessa eliminação pode ocorrer com participação de H1, H4a ou H11, conforme mostrado no esquema 27 (pg. 47). Com isso, a ligação dupla pode ser formada em uma posição diferente, permitindo assim a assistência anquimérica da hidroxila formada após a abertura do anel δ -lactônico na eliminação de CO.

Esquema 27. Possíveis vias de formação do íon produto **C** (A - H₂O) para a Candimina (**3**).

Esquema 28. Formação dos íons produtos **P11** e **P28** para o composto **3**.

O íon produto **P4** (C - H₂O) foi observado nos espectros dos compostos **1**, **2**, **3**, **5** e **6**. Para o composto **3**, a eliminação de uma segunda molécula de água pode ser associada à presença de uma hidroxila em **C2**, conforme discutido anteriormente. No entanto, os compostos **1**, **2**, **5** e **6** não apresentam hidroxilas em suas estruturas. A eliminação de duas moléculas de água consecutivamente também foi observada para formar os íons de

m/z 310 e 292 para o composto **4**, m/z 296 e 278 do composto **5** e m/z 326 e 308 do composto **7**. Além disso, para o composto **3** também foi observada a formação do íon produto **P16** após a eliminação de uma terceira molécula de água. Esses dados, quando analisados em conjunto, evidenciam que a eliminação de uma segunda molécula de água pode ocorrer para todos os alcaloides homolictóricos investigados neste estudo. Desta forma, é possível concluir que a eliminação da segunda molécula de água ocorre em uma parte da estrutura que é comum a todos os compostos analisados – o anel δ -lactônico segundo o mecanismo proposto no esquema 14 (p. 33).

Para o composto **3**, a formação dos íons **P16** (m/z 292) é diagnóstica da presença da hidroxila em C2 e se dá por meio de um rearranjo de hidrogênio remoto envolvendo a referida hidroxila e o hidrogênio alílico H11. A formação do íon produto **P16** e do íon produto **P13** (m/z 295), para o composto **3**, encontra-se no esquema 29.

Esquema 29. Formação dos íons **P16** e **P13** para o composto **3**.

Para os compostos **1** e **2**, que exibem apenas uma metoxila ligada ao anel A, o íon produto se fragmenta por meio da eliminação de $\text{CH}_3^\bullet$, formando um íon **P13** de estrutura similar ao do composto **3** (Esquema 10, p. 29). No caso dos compostos **5** e **6**, que exibem três grupos metoxila no anel A, a perda de $\text{CH}_3^\bullet$ é seguida pela eliminação de CO, para a formação de **P31**. O composto **6** sofre eliminação radicalar de $\text{H}^\bullet$ ou $\text{CH}_3^\bullet$, com formação dos íons produtos **P32** e **P37**, respectivamente.

Esquema 30. Formação dos íons produtos **P20**, **P31**, **P32** e **P37**.

4.4.3. Formação dos íons produtos derivados de D

Para os compostos **4**, **5** e **7**, que apresentam um grupo metoxila (OCH_3) em C2, a eliminação de metanol pode ocorrer diretamente do íon precursor, competindo com as eliminações de $\text{CH}_3^\bullet$ (formação de **B**) e de água (formação de **C**). Comparando-se as estruturas desses compostos, é possível concluir que as diferenças entre as fragmentações dos compostos **4** e **7** estão associadas à presença de um grupamento dioximetilênico entre C8 e C9 (**4**) e aos dois grupos metoxila em C8 e C9 (**7**), enquanto as diferenças entre as fragmentações **6** e **7** são devido à presença ou ausência da metoxila em C2.

Após a eliminação do substituinte metoxila em C2, ocorre a abertura do anel δ -lactônico, para ocorrer a eliminação de água, formando o íon produto **P8**, ou a eliminação do íon acílio na forma de monóxido de carbono, formando o íon produto **P10**, que ocorreu somente para o composto **4**.

Esquema 31. Formação dos íons produtos **D**, **P8**, **P10** e **P29**.

Conforme discutido anteriormente, a eliminação de uma molécula de água requer a abertura prévia do anel δ -lactônico. No entanto, as eliminações do grupo R_2 na forma de R_2H (H_2O para o composto **3** e CH_3OH para o composto **4**) competem com a abertura do anel δ -lactônico e que envolvem rearranjos de hidrogênio remotos à carga que ocorrem com retenção da carga. Isto pode ser evidenciado pelo fato de que para o composto **4** o íon **D** (**A** – CH_3OH) é observado com intensidade relativa considerável, enquanto o íon que seria resultante da eliminação de água **C** (**A** – H_2O) não foi observado na energia de colisão (E_{lab}) de 35 eV.

O íon produto **P8**, cuja estrutura foi apresentada no esquema 23 (p. 43) e no esquema 31 (p. 50), é um elo entre as vias de fragmentação **b** e **c**, visto que a eliminação de

CH_3OH (R_2H) e H_2O geram este íon, independente da ordem em que ocorrem, conforme os dados obtidos por experimentos em Espectrometria de massas de múltiplos estágios (MS^n). Entre os íons produtos de **P8**, destacam-se os íons **P14**, formado a partir da eliminação de uma nova molécula de água, e **P33**, no qual há a eliminação de R_1NH_2 . Conforme mencionado anteriormente e apresentado no esquema 14 (p. 33), este íon é análogo ao **P4**, porém, **P14** ocorre somente para os compostos **4**, **5** e **7**, após a eliminação de $\text{R}_2 = \text{OCH}_3$. O íon **P33** (**P8** – CH_3NH_2) ocorre somente para o composto **5**, sendo o pico base na energia de colisão analisada.

Esquema 32. Formação do íon produto **P14**.

4.4.4. Formação dos íons produtos derivados de E e F

O íon produto **E** é o pico base nos compostos 3, 4, 6 e 7, sendo proveniente de reações Retro-Diels-Alder (RDA) diretamente dos alcaloides protonados, assim como o íon **F**. A diferença entre os dois consiste no local em que a protonação ocorreu, por consequência onde ficou a carga positiva. As eliminações a partir do íon produto **E** são semelhantes aos já relatados anteriormente, formando produtos neutros, como **P43** (**E**-CO) a partir da carbonila do anel B, e radicalares, como a eliminação de hidrogênio para formar o íon **P42**, e metilas a partir das metoxilas em C8 e C9, dos compostos 5, 6 e 7, para formar o íon **P41**. Por possuir $R_2 = H$, o íon **P44** (**P42**-CH₃•) não ocorre em 5. Essas vias de fragmentação são apresentadas nos esquemas 33 (p. 52) e 34 (p. 53).

Esquema 33. Formação dos íons produtos dos compostos 1-4 derivados de **E**.

Esquema 34. Formação dos produtos de RDA para os compostos **5**, **6** e **7**.

O íon produto **F** possui intensidade relativa baixa, em comparação com o íon produto **E**. Pela análise da literatura, foi constatado que isto é uma consequência do processo de ionização ESI, enquanto pelo processo de ionização por impacto de elétrons (EI-MS), há maior intensidade do íon cuja carga elétrica mantém-se com o Nitrogênio. Os íons filhos de **F** são obtidos pela eliminação dos fragmentos neutros H_2 , CH_2O , CH_4 e C_2H_4 , conforme apresentado no esquema 35 (p. 54).

Esquema 35. Formação dos íons produtos derivados de **F**.

Os íons **P51** e **P52** são diagnósticos da presença de substituintes em C2. Para a formação de **P51**, o composto **3**, cujo substituinte em R2 é a hidroxila, há a eliminação de uma molécula de H₂O (18 Da), enquanto os compostos **4**, **5** e **7** fragmentam-se eliminando CH₃OH (32 Da). Para a formação de **P52**, há a eliminação de CH₂O, processo que ocorre de forma distinta, conforme o substituinte. No caso do composto **2**, esta eliminação ocorre diretamente de **F**, sendo possível pelo equilíbrio entre as formas enol e aldeído neste íon. Nos compostos **4**, **5** e **7**, a eliminação de CH₂O ocorre após o íon **F** eliminar molécula de metano, para formar o íon **P49**, conforme o esquema 36 (p. 54).

Esquema 36. Formação do íon produto **P52**, diagnóstico de substituintes em C2.

Abaixo, nos esquemas 37 a 43 encontram-se as fragmentações de todos os compostos investigados neste trabalho.

Esquema 37. Fragmentação da 7-metoxi-normasonina (1) protonada (m/z 316).

Esquema 38. Fragmentação da 7-metoxi-masonina (2) protonada (m/z 330).

Esquema 39. Fragmentação da candimina (3) protonada (m/z 346).

Esquema 40. Fragmentação da 2-O-metil-candimina (**4**) protonada (m/z 346).

Esquema 41. Fragmentação da 2 α -metoxi-homolicorina (**5**) protonada (m/z 346).

Esquema 42. Fragmentação da albomaculina (6) protonada (m/z 346).

Esquema 43. Fragmentação da 2α,7-dimetoxi-homolicorina (7) protonada (m/z 376).

5. Conclusões

Os resultados dos estudos sobre a fragmentação dos alcaloides homolicorínicos **1-7** protonados revelaram que a maioria dos íons formados na energia de 20 eV são resultantes de eliminações de $\text{CH}_3^\bullet$, NH_3 , H_2O , CO , CH_2O , CH_3NH_2 e CH_3OH . Os processos de fragmentação comuns incluem as perdas de H_2O e de $\text{CH}_3^\bullet$ e a ocorrência de duas reações de retro-Diels-Alder competitivas, a partir dos quais é possível identificar alguns íons fragmentos diagnósticos de grupos funcionais específicos. Fragmentos formados por perdas consecutivas de dois radicais $\text{CH}_3^\bullet$ foram úteis para distinguir os compostos **8,9**-dimetoxilados **5-7** de **1-4**, que apresentam grupamento metilenodioxi fundido a C8 e C9. Eliminações consecutivas de três moléculas de H_2O foram indicativas da presença de um grupo hidroxila em C2, enquanto a presença de um grupo metoxila na mesma posição pôde ser diagnosticada por meio da perda de metanol diretamente do íon precursor. Por fim, as eliminações de NH_3 e de CH_3NH_2 permitiram identificar a natureza do substituinte ligado diretamente ao nitrogênio (H ou CH_3).

Apesar de as propostas apresentadas neste trabalho explicarem de forma satisfatória os resultados experimentais, dados de massas acuradas e dados termoquímicos estimados por Química Quântica Computacional deverão ser obtidos para comprovar a validade das propostas elaboradas. No entanto, os dados obtidos deste estudo podem ser utilizados de forma conjunta, ainda que com certa cautela, para a elaboração de estratégias para a identificação desses compostos em extratos brutos de Amaryllidaceae utilizando a técnica HPLC-MS/MS sem a necessidade de padrões.

6. Referências

- [1] Dutilh, J. H. A.; Oliveira, R. S. *Amaryllidaceae*. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB4354>. 30/03/2021.
- [2] Giordani, R. B. Estudo químico e farmacológico em *Hippeastrum morelianum* Lem. e *Hippeastrum santacatarina* (Traub) Dutilh: duas espécies de Amaryllidaceae. - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.
- [3] Oliveira, R. S. O gênero *Hippeastrum* Herb. (Amaryllidaceae) no Brasil: Evidência de evolução reticulada e análise de caracteres florais. - Universidade Estadual de Campinas, 2012.
- [4] Fuentes, A. F.; Lara, R.; Huayalla, H.; Vásquez, R. *Hippeastrum* (Amaryllidaceae) de la región del Madidi. https://fieldguides.fieldmuseum.org/sites/default/files/rapid-color-guides-pdfs/1141_bolivia_hippeastrum_of_madidi_region.pdf.
- [5] Vicente, A. R. Alcaloides isoquinolínicos e atividade citotóxica *in vitro* de *Hippeastrum canastrense* J. Dutilh & R.S. Oliveira (Amaryllidaceae). - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, 2016.
- [6] Oliveira, R. S.; Semir, J.; Dutilh, J. H. A. Four new endemic species of *Hippeastrum* (Amaryllidaceae) from Serra da Canastra, Minas Gerais State, Brazil. *Phytotaxa* **2013**, *145*, 38-46.
- [7] Bessa, C. D. P. B. Estudo químico e biológico em alcaloides de *Hippeastrum aulicum* (Ker Gawl.) Herb.: uma espécie da família Amaryllidaceae. - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2015.
- [8] Vieira, P. B.; Giordani, R. B.; De Carli, G. A.; Zuanazzi, J. A. S.; Tasca, T. Screening and bioguided fractionation of Amaryllidaceae species with anti-*Trichomonas vaginalis* activity. *Planta Med.* **2011**, *77*, 1054-1059.
- [9] Giordani, R. B.; Weizenmann, M.; Rosember, D. B.; de Carli, G. A.; Bogo, M. R.; Zuanazzi, J. A. S.; Tasca, T. *Trychomonas vaginalis* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase and ecto-5'-nucleotidase activities are inhibited by lycorine and candimine. *Parasitol. Int.* **2010a**, *59*, 226-231.
- [10] Giordani, R. B.; Pagliosa, L. B.; Henriques, A. T.; Zuanazzi, J. A. S.; Dutilh, J. H. A. Antioxidant and anticolinesterasic effects of *Hippeastrum* species (Amaryllidaceae). *Quim. Nova* **2008**, *31*, 2042-2046.
- [11] da Silva, A. F. S.; de Andrade, J. P.; Bevilacqua, L. R. M.; de Souza, M. M.; Izquierdo, I.; Henriques, A. T.; Zuanazzi, J. A. S. Anxiolytic-, antidepressant- and anticonvulsant-like

- effects of the alkaloid montanine isolated from *Hippeastrum vittatum*. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2006**, *85*, 148-154.
- [12] Jin, Z.; Yao, G. Amaryllidaceae and *Sceletium* alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* **2019**, *36*, 1462-1488.
- [13] Jin, Z. Amaryllidaceae and *Sceletium* alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 1126-1142.
- [14] Nair, J. J. V. S., J. Pharmacological and toxicological insights to the South African Amaryllidaceae. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *62*, 262-275.
- [15] Jin, Z. Amaryllidaceae and *Sceletium* alkaloids. *Natural Products Reports* **2013**, *30*, 849-868.
- [16] Jin, Z. Amaryllidaceae and *Sceletium* alkaloids. *Natural Products Reports* **2016**, *33*, 1318-1343.
- [17] de Andrade, J. P.; Pigni, N. B.; Torras-Claveria, L.; Guo, Y.; Berkov, S.; Reyes-Chilpa, R.; El Amrani, A.; Zuanazzi, J. A. S.; Codina, C.; Viladomat, F.; Bastida, J. Alkaloids from the *Hippeastrum* genus: chemistry and biological activity. *Rev. Latinoam. Quim.* **2012a**, *40*, 83-98.
- [18] Ding, Y.; Qu, D.; Zhang, K. M.; Cang, X. X.; Kou, Z. N.; Xiao, W.; Zhu, J. B. Phytochemical and biological investigations of Amaryllidaceae alkaloids: a review. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2016**, *19*, 53-100.
- [19] Szilávik, L.; Gyuris, A.; Minárovits, J.; Forgo, P.; Molnár, J.; Hohmann, J. Alkaloids from *Leucojum vernum* and antiretroviral activity of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta Med.* **2004**, *70*, 871-873.
- [20] Giordani, R. B.; Vieira, P. B.; Weizenmann, M.; Rosemberg, D. B.; Souza, A. P.; Bonorino, C.; de Carli, G. A.; Bogó, M. R.; Zuanazzi, J. A. S.; Tasca, T. Lycorine induces cell death in the amitochondriate parasite, *Trichomonas vaginalis*, via an alternative non-apoptotic death pathway. *Phytochemistry* **2011**, *72*, 645-650.
- [21] Giordani, R. B.; Vieira, P. B.; Weizenmann, M.; Rosemberg, D. B.; Souza, A. P.; Bonorino, C.; de Carli, G. A.; Bogó, M. R.; Zuanazzi, J. A. S.; Tasca, T. Candimine-induced cell death of the amitochondriate parasite *Trychomonas vaginalis*. *J. Nat. Prod.* **2010b**, *73*, 2019-2023.
- [22] Wang, Y. H.; Zhang, Z. K.; Yang, F. M.; Sun, Q. Y.; P., H. H.; T., D. Y.; Mu, S. Z.; Lu, Y.; Chang, Y.; Zheng, Q. T.; Ding, M.; Dong, J. H.; Hao, X. J. Benzylphenethylamine alkaloids from *Hosta plantaginea* with inhibitory activity against tobacco mosaic virus and acetylcholinesterase. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1458-1461.
- [23] Hulcová, D.; Breiterová, K.; Siatka, T.; Klímová, K.; Davani, L.; Safratová, M.; Hostáľkova, A.; de Simone, A.; Andrisano, V.; Čahlíková, L. Amaryllidaceae alkaloids as potential glycogen synthase kinase-3 β inhibitors. *Molecules* **2018**, *23*, 719-727.

- [24] Liao, N.; Ao, M.; Zhang, P.; Yu, L. Extract of *Lycoris aurea* induce apoptosis in Murine Sarcoma S180 cells. *Molecules* **2012**, *17*, 3723-3735.
- [25] Bastida, J.; Berkov, S.; Torras-Claveria, L.; B., P. N.; P., d. A. J.; Martinez, V.; Codina, C.; Viladomat, F. Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. In: D., M.-T. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*, Kerala, India: Transworld Research Network, 2011.
- [26] Weniger, B.; Italiano, J. P.; Beck, L.; Bastida, J.; Bergonon, S.; Codina, C. Cytotoxic activity of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta Med.* **1995**, *61*, 77-79.
- [27] Renard-Nozaki, J.; Kim, T.; Imakura, Y.; Kihara, M.; Kobayashi, S. Effect of alkaloids isolated from Amaryllidaceae on *Herpes simplex* virus. *Res. Virol.* **1989**, *140*, 115-128.
- [28] Huang, S. D.; Zhang, Y.; He, H. P.; Li, S. F.; Tang, G. H.; Chen, D. Z.; Cao, M. M.; Di, Y. T.; Hao, X. J. A new Amaryllidaceae alkaloid from the bulbs of *Lycoris radiata*. *Chin. J. Nat. Med.* **2013**, *11*, 406-410.
- [29] Nair, J. J.; Van Staden, J. Antifungal constituents of the plant family Amaryllidaceae. *Phytother. Res.* **2018**, *32*, 976-984.
- [30] de Andrade, J. P.; Pigni, N. B.; Torras-Claveria, L.; Berkov, S.; Codina, C.; Viladomat, F.; Bastida, J. Bioactive alkaloid extracts from *Narcissus broussonetii*: mass spectral studies. *J. Pharm. Biom. Anal.* **2012b**, *70*, 13-25.
- [31] Schmeda-Hirschmann, G.; Rodríguez, J. A.; Loyola, J. I.; Astudillo, L.; Bastida, J.; Francesc, V.; Codina, C. Activity of Amaryllidaceae alkaloids on the blood pressure of normotensive rats. *Pharm. Pharmacol. Commun.* **2000b**, *6*, 309-312.
- [32] Ghosal, S.; Saini, K. S.; Razdan, S. *Crinum* alkaloids: their chemistry and biology. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 2141-2156.
- [33] Miyasaka, K.; Hiramatsu, Y. Pharmacological studies of lycorenine, an alkaloid of *Lycoris radiata* Herb.: II. Effects of blood pressure in rats and dogs and the mechanism of Tachyphylaxis to the vasodepressor action of lycorenine in rats. *Japan. J. Pharmacol.* **1980**, *30*, 655-664.
- [34] Li, X.; Yu, H. Y.; Wang, Z. Y.; Pi, H. F.; Zhang, P.; Ruan, H. L. Neuroprotective compounds from the bulbs of *Lycoris radiata*. *Fitoterapia* **2013**, *88*, 82-90.
- [35] Masi, M.; Di Leece, R.; Cimmino, A.; Evidente, A. Advances in the chemical and biological characterization of Amaryllidaceae alkaloids and natural analogues isolated in the last decade. *Molecules* **2020**, *25*, 5621.
- [36] Nair, J. J.; Van Staden, J. The plant family Amaryllidaceae as a source of cytotoxic homolycorine alkaloid principles. *S. Afr. J. Bot.* **2021**, *136*, 157-174.

- [37] Ka, S.; Koirala, M.; Mérindol, N.; Desgagné-Penix, I. Biosynthesis and biological activities of newly discovered Amaryllidaceae alkaloids. *MOlecules* **2020**, *25*, 4901.
- [38] Medhe, S. Ionization techniques in mass spectrometry: a review. *Mass Spectrom. Purif. Tech.* **2018**, *4*, 1000126.
- [39] Dias, H. J.; Melo, N. I.; Crotti, A. E. M. Electrospray ionization tandem mass spectrometry as a tool for the structural elucidation and dereplication of natural products: an overview. In: Prasain, J. *Tandem mass spectrometry: applications and principles*, London, UK.: Intech Open, 2012.
- [40] Ernst, M.; Silva, D. B.; Silva, R. R.; Vêncio, R. Z. N.; Lopes, N. P. Mass spectrometry in plant metabolomics strategies: from analytical platforms to data acquisition and processing. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*, 784-806.
- [41] Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **1989**, *246*, 64-71.
- [42] Dias, H. J. Síntese e estudos sobre a fragmentação de compostos benzofurânicos empregando espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray. tese - Universidade de São Paulo, 2018.
- [43] Konermann, L.; Ahadi, E.; Rodriguez, A. D.; Vahidi, S. Unraveling the mechanism of electrospray ionization. *Anal. Chem.* **2012**, *85*, 2-9.
- [44] Vessecchi, R.; Galembeck, S. E.; Lopes, N. P.; Nascimento, P. G. B. D.; Crotti, A. E. M. Aplicação da química quântica computacional no estudo de processos químicos envolvidos em espectrometria de massas. *Quím. Nova* **2008**, *31*, 840-853.
- [45] Sleno, L.; Volmer, D. A. Ion activation methods for tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2004**, *39*, 1091-1112.
- [46] Watson, J. T.; Sparkman, O. D. *Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications and strategies for data interpretation*, 4a. Chichester, England: John Wiley & Sons, 2007.
- [47] Cooks, G. Special feature: Historical. Collision-induced dissociation: Readings and commentary. *J. Mass Spectrom.* **1994**, *30*, 1215-1221.
- [48] McLuckey, S. A. Principles of collisional activation in analytical mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectr.* **1991**, *3*, 599-614.
- [49] Kind, T.; Fiehn, O. Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry. *Bioanal. Rev.* **2010**, *2*, 23-60.
- [50] Dias, H. J.; Melo, N. I.; Crotti, A. E. M. Electrospray ionization tandem mass spectrometry as a tool for the structural elucidation and dereplication of natural products: an

- overview. In: Prasain, J. *Prasain, J.K. Applications of Tandem Mass Spectrometry*, Rijeka, Croatia: InTech Open Access Publisher, 2011.
- [51] Herrera-Lopes, S.; Hernando, M. D.; Garcia-Calvo, E.; Fernandez-Alba, A. R.; Ulaszewska, M. M. Simultaneous screening of targeted and non-targeted contaminants using an LC-QTOF-MS system and automated MS/MS library searching. *J. Mass Spectrom.* **2014**, *49*, 878-893.
- [52] Oberacher, H.; Whitley, G.; Bernd, B. Evaluation of the sensitivity of the 'Wiley registry of tandem mass spectral data, MSforID' with MS/MS data of the 'NIST/NIH/EPA mass spectral library'. *J. Mass Spectrom.* **2013**, *48*, 487-496.
- [53] Schaab, E. H.; Crotti, A. E. M.; Iamamoto, Y.; Kato, M. J.; Lotufo, L. V. C.; Lopes, N. P. Biomimetic oxidation of piperine and pipartine catalyzed by iron(III) and manganese(III) porphyrins. *Biol. Pharm. Bull.* **2010**, *33*, 912-916.
- [54] Demarque, D. P.; Crotti, A. E. M.; Vessecchi, R.; Lopes, J. L. C.; Lopes, N. P. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*, 432-455.
- [55] Kreh, M.; Matusch, R.; Witte, L. Capillary gas chromatography-mass spectrometry of Amaryllidaceae alkaloids. *Phytochemistry* **1995**, *38*, 773-776.
- [56] Berkov, S.; Bastida, J.; Viladomat, F.; Codina, C. Analysis of galanthamine-type alkaloids by capillary gas chromatography-mass spectrometry in plants. *Phytochem. Anal.* **2008**, *19*, 285-293.
- [57] de Andrade, J. P.; Giordani, R. B.; Torras-Claveria, L.; Pigni, N. B.; Berkov, S.; Font-Bardia, M.; Calvet, T.; Kohrath, E.; Bueno, K.; Sachett, L. G.; H., D. J.; Borges, W. S.; Viladomat, F.; Henriques, A. T.; Nair, J. J.; Zuanazzi, J. A. S.; Bastida, J. The Brazilian Amaryllidaceae as a source of acetylcholinesterase inhibitory alkaloids. *Phytochem. Rev.* **2016**, *15*, 147-160.
- [58] Aziz, D. M.; Taher, S. G.; Hama, J. R. Isolation and identification of new alkaloids from Purslane (*Portulacaoleracea* L.) leaves using HPLC/ESI-MS. *MOJ Food Proc. Technol.* **2016**, *2*, 148-151.
- [59] Yang, Y.; Huang, S.-X.; Zhao, Y.-M.; Zhao, Q.-S.; Sun, H.-D. Alkaloids from the bulbs of *Lycoris aurea*. *Helv. Chim. Acta* **2005**, *88*, 2550-2553.
- [60] Li, X.; Yu, H.-Y.; Wang, Z.-Y.; Pi, H.-F.; Zhang, P.; Ruan, H.-L. Neuroprotective compounds from the bulbs of *Lycoris radiata*. *Fitoterapia* **2013**, *88*, 82-90.

- [61] Torras-Claveria, L.; Berkov, S.; Viladomat, F.; Bastida, J. QToF exact mass and ESI fragmentation of bioactive Amaryllidaceae alkaloids. *S. Afr. J. Bot.* **2020**, *136*, 81-90.
- [62] Crotti, A. E. M.; Lopes, J. L. C.; Lopes, N. P. Triple quadrupole tandem mass spectrometry of sesquiterpene lactones: a study of goyazensolide and its congeners. *J. Mass Spectrom.* **2005**, *40*, 1030-1034.
- [63] Crotti, A. E. M. B.-U., E. S.; Nascimento, P. G. D.; Donate, P. M.; Galembeck, S. E.; Vessecchi, R.; Lopes, N. P. Gas-phase fragmentation of γ -lactone derivatives by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2009**, *44*, 1733-1741.
- [64] Aguiar, G. P.; Wakabayashi, K. A. L.; Luz, G. F.; Oliveira, V. B.; Mathias, L.; Vieira, I. J. C.; Braz-Filho, R.; Crotti, A. E. M. Fragmentation of plumeran indole alkaloids from *Aspidosperma spruceanum* by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **2010**, *24*, 295-308.
- [65] Dias, H. J.; Vieira, T. M.; Crevelin, E. J.; Donate, P. M.; Vessecchi, R.; Crotti, A. E. M. Fragmentation of 2-arylbenzofuran derivatives by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2017**, *52*, 809-816.
- [66] Furtado, N. A. J. C.; Vessecchi, R.; Tomaz, J. C.; Galembeck, S. E.; Bastos, J. K.; Lopes, N. P.; Crotti, A. E. M. Fragmentation of diketopiperazines from *Aspergillus fumigatus* by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). *J. Mass Spectrom.* **2007**, *42*, 1279-1286.
- [67] Aguiar, G. P.; Crevelin, E. J.; Dias, H. J.; Ambrósio, S. R.; Bastos, J. K.; Heleno, V. C. G.; Vessecchi, R.; Crotti, A. E. M. Electrospray ionization tandem mass spectrometry of labdane-type acid diterpenes. *J. Mass Spectrom.* **2018**, *53*, 1086-1096.
- [68] Dias, H. J.; Baguenard, M.; Crevelin, E. J.; Palaretti, V.; Gates, P. J.; Vessecchi, R.; Crotti, A. E. M. Gas-phase fragmentation reactions of protonated benzofuran- and dihydrobenzofuran-type neolignans investigated by accurate-mass electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2018**, *54*, 35-46.
- [69] Dias, H. J.; Crevelin, E. J.; Palaretti, V.; Vessecchi, R.; Crotti, A. E. M. Electrospray ionization tandem mass spectrometry of deprotonated dihydrobenzofuran neolignans. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **2020**, *35*, e8990.
- [70] Boyd, R.; Somogyi, A. The mobile proton hypothesis in fragmentation of protonated peptides: a perspective. *J. Am. Soc. Mass Spectr.* **2010**, *21*, 1275-1278.
- [71] Hunter, E. P. L.; Lias, S. G. Evaluated gas phase basicities and proton affinities of molecules: An update. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1998**, *27*, 413-656.

- [72] Bouchox, G. Gas-phase basicities of polifunctional molecules. Part 4: Carbonyl groups as basic sites. *Mass Spectrom. Rev.* **2007**, *34*, 493-534.
- [73] McLafferty, F. W. T., F. *Interpretation of mass spectra* Mill Valley, CA: University Science Book, 1993.
- [74] Crotti, A. E. M.; Fonseca, T.; Hong, H.; Staunton, J.; Galembeck, S. E.; Lopes, N. P.; Gates, P. J. The fragmentation mechanism of five-membered lactones by electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **2004**, *232*, 271-276.
- [75] Bouchox, G. From the mobile proton to wandering hydride ion: mechanistic aspects of gas-phase ion chemistry. *J. Mass Spectrom.* **2013**, *48*, 505-518.

7. Anexos

A1. Espectro de ESI-MS/MS com uso de água deuterada a 20 eV.

Estudo da fragmentação de alcaloides de Hippeastrum por ESI-MS/MS
Guilherme Brinker Wilrich

A2. Espectro de MS^N do alcaloide 1.

A3. Espectro de MS^N do alcaloide 2.

A4. Espectro de MS^N do alcaloide 3.

A5. Espectro de MS^N do alcaloide 4.

A6. Espectro de MS^N do alcaloide 5.

A7. Espectro de MS^N do alcaloide 6.

A8. Espectro de MS^N do alcaloide 7.