

Artigo

Composição Química das Flores e Frutos de *Clusia nemorosa* G. Mey. (Clusiaceae) Utilizando UPLC-DAD-qTOF-MS^E**Gomes, A. N. P.; Ferreira, J. O.; Souza, K. M. S.; Ferreira, L. C. A.; Silva, M. P.; Camara, C. A.; Silva, T. M. S.****Rev. Virtual Quim.*, 2020, 12 (5), 1161-1175. Data de publicação na Web: 19 de Agosto de 2020<http://rvq.s bq.org.br>**Chemical Composition of Fruits and Flowers from *Clusia nemorosa* G. Mey. (Clusiaceae)**

Abstract: The species *Clusia nemorosa* is popularly known as “camaçari”. The flowers are visited by bees, mainly native and the floral resin is used for the construction of nests, being the polyisoprenylated benzophenones the main components of this resin. The present work aimed to analyze the chemical constituents of the flowers and fruits of *Clusia nemorosa*. The flowers and fruits were extracted with ethanol. The ethanolic extract was subjected to extraction in solid phase with methanol. Analyzes of the methanolic fraction by ultra-performance liquid chromatography coupled with a diode array detector and quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-DAD-qTOF-MS) and combined with the use of data-independent acquisition (MS^E) for the profiling and structural characterisation of the compounds. The compounds were identified as condensed tannins, steroids and isomers of prenylated benzophenones. The chemical profile when compared of flowers and fruits showed little variation. The analysis of the high resolution mass spectra allowed to identify, classify and separate the two main types of nuclei from the prenylated benzophenones present in the flowers and fruits of *Clusia nemorosa*.


Keywords: Clusiaceae; *Clusia nemorosa*; UPLC-DAD-qTOF-MS^E; benzophenones.

Resumo

A espécie *Clusia nemorosa* é popularmente conhecida como “camaçari”. As flores são visitadas por abelhas, principalmente nativas e a resina floral é utilizada para a construção de seus ninhos, sendo as benzofenonas poliisopreniladas os principais componentes desta resina. O presente trabalho teve como objetivo analisar os constituintes químicos das flores e frutos de *Clusia nemorosa*. As flores e frutos foram extraídos com etanol. O extrato etanólico foi submetido a extração em fase sólida com metanol. As análises da fração metanólica foram realizadas através da cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massas por tempo de voo. Os compostos foram identificados como taninos condensados, esteroide e isômeros de benzofenonas preniladas. O perfil químico das flores e frutos quando comparado apresentou pouca variação. A análise dos espectros de massas de alta resolução permitiu identificar, classificar e separar os dois principais tipos de núcleos das benzofenonas preniladas presentes nas flores e frutos de *Clusia nemorosa*.

Palavras-chave: Clusiaceae; *Clusia nemorosa*; UPLC-DAD-qTOF-MS^E; benzofenonas.

* Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Química, Laboratório de Bioprospecção Fitoquímica, CEP 52171-900, Recife-PE, Brasil.

 sarmentosilva@gmail.com
DOI: [10.21577/1984-6835.20200094](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200094)

Composição Química das Flores e Frutos de *Clusia nemorosa* G. Mey. (Clusiaceae) Utilizando UPLC-DAD-qTOF-MS^E

Ayala Nara Pereira Gomes,^a Jennifer Oberger Ferreira,^b Karoline Mirella Soares de Souza,^b Laisla Carolina Andrade Ferreira,^b Márcia Pereira da Silva,^b Celso Amorim Camara,^a Tania Maria Sarmiento Silva^{a,b*}

^a Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Química, Laboratório de Bioprospecção Fitoquímica, CEP 52171-900, Recife-PE, Brasil.

^b Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-graduação em Biociência Animal, CEP 52171-900, Recife-PE, Brasil.

*sarmentosilva@gmail.com

Recebido em 24 de Setembro de 2019. Aceito para publicação em 21 de Julho de 2020.

1. Introdução

2. Material e Métodos

2.1. Material vegetal

2.2. Extração e fracionamento por SPE das flores e frutos de *Clusia nemorosa*

2.3. Análises por UPLC-PDA-qTOF-MS^E

3. Resultados e Discussão

3.1. Desrepliação dos compostos por UPLC-DAD-qTOF-MS^E

4. Conclusão

1. Introdução

O gênero *Clusia* (Clusiaceae) é considerado neotropical e possui cerca de 200 espécies amplamente distribuídas em regiões da América Central e América do Sul.¹ A espécie *Clusia nemorosa* é encontrada desde a costa norte do Brasil até o Rio de Janeiro e nas florestas e vegetação de "Campo Rupestre" da Amazônia até a Bahia e Pernambuco,² e é popularmente conhecida como "camaçari", "orelha-de-burro", "clusia-capelinha" entre outros. Apresenta-se como árvore arbustiva comum na Região do Nordeste brasileiro exibindo flores brancas e frutos verdes.³ Estudos anteriores levaram ao isolamento de benzofenonas poliisopreniladas,⁴

derivados de floroglucinol,⁵ esteroides,^{5,6} terpenos⁷ e flavonoides.⁵ Estas substâncias são produzidas pelas plantas principalmente como mecanismo de defesa.^{5,7} As principais atividades biológicas relatadas para *Clusia nemorosa* são as atividades analgésica⁸ e anti-inflamatória.⁹

O presente trabalho teve como objetivo analisar os constituintes químicos das flores e frutos de *Clusia nemorosa*. As análises foram realizadas através da Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência Acoplada ao Detector de Arranjo de Diodos e Espectrômetro de Massas por Tempo de Voo (UPLC-DAD-qTOF-MS^E). A desrepliação dos compostos foi realizada com esta técnica devido a versatilidade, rapidez, alta sensibilidade e precisão dos dados. O trabalho é uma continuação dos estudos com a espécie

*Clusia nemorosa*⁵ e faz parte do estudo químico de flores visitadas por abelhas na região Nordeste do Brasil. A resina floral de *Clusia nemorosa* é utilizada pelas abelhas para a construção de seus ninhos, sendo as benzofenonas poliisopreniladas os principais componentes desta resina, uma classe de compostos biologicamente ativos.¹⁰

2. Material e Métodos

2.1. Material vegetal

As amostras das flores e frutos de *Clusia nemorosa* foram coletadas no Campus da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, Brasil. Uma exsicata (Voucher número 51474) encontra-se depositada no Herbário Vasconcelos Sobrinho, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Número de cadastro no SisGen A506D25.

2.2. Extração e fracionamento por SPE das flores e frutos de *Clusia nemorosa*

As flores (16,0 g) e frutos (67,7 g) de *Clusia nemorosa* foram extraídas com etanol absoluto (30 minutos) em banho de ultrassom (Unique, USC-1600, São Paulo, Brasil). A solução extrativa foi filtrada e concentrada em rotaevaporador fornecendo os extratos etanólico bruto das flores (1,9 g) e frutos (6,0 g). Uma porção dos extratos etanólicos (100,0 mg) foi dissolvida em 1 mL de metanol grau HPLC e aplicada em cartucho Sep-Pak plus C₁₈ (Waters, Manchester, UK) para extração em fase sólida (SPE) e foi sequencialmente condicionado com 10 mL de metanol e 10 mL de água. Em seguida os compostos foram eluídos com metanol (10 mL) fornecendo as frações metanólicas que foram rotaevaporadas, redissolvidas em metanol e filtradas em membrana com poros de 0,45 µm de diâmetro (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). As frações metanólicas foram submetidas as análises por UPLC-DAD-qTOF-MS^E para avaliação do perfil químico e identificação dos compostos.

2.3. Análises por UPLC-PDA-qTOF-MS^E

Os experimentos analíticos de LC-DAD-MS foram realizados utilizando um cromatógrafo

líquido de ultra eficiência ACQUITY UPLC H-Class (Waters Corporation, Milford, MA, EUA), acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução (Xevo G2-XS qTOF, Waters, EUA) com ionização por *electrospray* (ESI). As separações cromatográficas foram realizadas utilizando uma coluna ACQUITY UPLCTM BEH C₁₈ (2,1 x 50 mm x 1,7µm, Waters, EUA) a 40 °C. A eluição foi realizada com solução de ácido fórmico 0,1% (v/v) (A) e acetonitrila 0,1% de ácido fórmico (B) nas seguintes condições: 0-8 min, 40-99% (B), e 8-11 min, 99% (B), fluxo de 0,4 mL.min⁻¹ e em cada análise foram injetados 4,0 µL da amostra, após acondicionamento da coluna. O monitoramento foi feito a 290 e 320 nm (UPLC-DAD). O espectrômetro de massas foi operado em modo positivo de ionização (ESI⁺), em modo sensibilidade. A detecção foi realizada no modo centroide MS^E em uma faixa de massa *m/z* 50-1200 Da. A voltagem do capilar foi ajustada em 3,5 kV para ESI; gás de dessolvatação (N₂) 800 L.h⁻¹ e 450 °C. A taxa de fluxo de gás 50 L.h⁻¹ e temperatura de 120 °C. Foi utilizada uma rampa em relação à alta energia de 10 a 30 eV. Todas as análises foram realizadas utilizando *lockspray* para garantir a precisão e reprodutibilidade dos valores de massas. Leucina-encefalina (200,0 pg.mL⁻¹) foi utilizado como padrão/referência para calibração. A aquisição e análise dos dados foi realizada utilizando o software Waters MassLynx. Os solventes utilizados foram de grau analítico ou grau LC-MS. Foram usados filtros de membrana com poros de 0,45 µm de diâmetro (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) para filtração das amostras e dos solventes: metanol, acetonitrila (J. T. Baker, Phillipsburger, EUA) e água Mili-Q (Millipore, EUA). A determinação estrutural foi realizada através da busca da fórmula molecular em bases de dados como o *SciFinder Scholar* ou Metlin (<http://metlin.scripps.edu/index.php>) e identificação por propostas mecanísticas de fragmentação (obtidas em experimentos *tandem*).

3. Resultados e Discussão

3.1. Desrepliação dos compostos por UPLC-DAD-qTOF-MS^E

Com o auxílio dos dados de UPLC-DAD-qTOF-MS^E foi possível a tentativa de identificação de 18 compostos nas flores e 21 nos frutos de

Clusia nemorosa, totalizando 23 compostos diferentes (Tabela 1). As substâncias identificadas foram classificadas como taninos condensados (**1** e **2**), derivado esteroide ou triterpeno (**5**), e benzofenonas preniladas (**3**, **4**, **6** a **23**). Os taninos mostraram absorções nos espectros de UV em torno de 280 nm e os compostos do tipo benzofenonas preniladas na faixa de 330 a 380 nm.¹¹ A identificação dos principais compostos foi realizada por uma pesquisa de composição elementar combinado com os resultados dos componentes relatados na literatura para a espécie *Clusia nemorosa* ou em outras espécies pertencentes a mesma família. Os dados foram confirmados pelas análises dos espectros de UV e MS^E. A técnica MS^E permite analisar amostras complexas e obter na mesma análise os espectros de massas de alta resolução com baixa energia de colisão (mostra a presença acentuada do pico do íon protonado e dos adutos formados) e com maior energia de colisão (a abundância relativa dos íons produtos que geram moléculas neutras é aumentada e mais fragmentos são observados). A maioria das substâncias foi encontrada tanto nas flores como nos frutos, com exceção do composto hidroxinemorosa (**10**) que ocorre apenas nas flores, ácido dihidro nemorosínico A (**8**) e ácido nemorosínico A (isômeros **3** e **4**) com ocorrência apenas nos frutos.

As análises dos espectros de massas foram realizadas nos modos de ionização positivo que forneceu informações sobre as estruturas e fragmentos das benzofenonas preniladas. Foram observados os íons [M+H]⁺ e [M+Na]⁺ para os constituintes químicos dos frutos e flores (Tabela 1). Os cromatogramas obtidos por UPLC-qTOF/MS^E em modo positivo da fração SPE metanólica das flores e frutos de *Clusia nemorosa* estão na Figura 1.

Os isômeros **1** e **2** apresentaram absorção máxima no UV em 280 nm. O pico do íon molecular protonado em m/z 1155,2762 [M+H]⁺ com a sequência de três perdas sucessivas de unidades de catequina (m/z 288) é sugestivo da presença de tanino condensado, provavelmente uma tetracatequina.

O composto **5** mostrou pico do íon molecular protonado em m/z 489,2847 [M+H]⁺ com eliminação de H₂O em m/z 471,2755 [M+H-H₂O]⁺ e CO₂ em m/z 445,2578 [M+H-CO₂]⁺. Estes dados juntamente com a ausência de absorção no espectro de UV sugeriu que o composto pode

ser derivado esteroide ou triterpeno. Na literatura já existe relato da presença de esteroides como estigmasterol e β -sitosterol nos frutos de *Clusia nemorosa*.^{5,6}

O perfil de fragmentação dos íons precursores das benzofenonas preniladas detectados por espectrometria de massas de alta resolução permitiu a separação em dois grupos, baseado nos padrões de fragmentação: benzofenonas com íon produto final de 217 Da (**3**, **4**, **6**, **7**, **9**, **11**, **12**, **13**, **14**, **15**, **17**, **18**, **19**, **20**, **21** e **22**) e benzofenonas com íon produto final de 177 Da (**10**, **14** e **17**). A demonstração da formação dos dois tipos de íons produtos é mostrada nas Figuras 2 a 7. Nas Figura 2 a 5 estão os espectros de UV, massas de alta resolução em baixa e alta energia e o mecanismo para formação do íon produto final m/z 217 a partir dos compostos identificados como ácido nemorósico (**9**, Figura 2), ácido nemorosínico A (**11**, Figura 3), ácido nemorosínico B (**16**, Figura 4) e nemorosonol B (**21**, Figura 5). Nas Figuras 6 e 7 estão os espectros de ultravioleta e de massas em baixa e alta energia das benzofenonas caracterizadas como hidroxinemorosa (**10**) e nemorosa (**17**), respectivamente, representando a formação do íon produto final em m/z 177.

Os isômeros **3**, **4** e **11** (ácido nemorosínico A e isômeros) exibiram o pico do íon molecular protonado em m/z 531,2741 [M+H]⁺ e aduto em m/z 553,2560 [M+Na]⁺ com absorção máxima no UV entre 280 e 380 nm. Os espectros MS² forneceram os íons resultantes da eliminação de cadeia alquílica em m/z 463,2113 [M+H-C₅H₈]⁺, além da perda da cadeia alquílica com oxigênio em 309,1113 [M+H-C₅H₈-C₉H₁₄O₂]⁺ sugerindo a presença de ácido carboxílico, seguida pela eliminação de um anel aromático em m/z e 231,0656 [M+H-C₅H₈-C₉H₁₄O₂-C₆H₆]⁺. O íon produto final em m/z 217,0860 [M+H-C₅H₈-C₁₆H₂₂O₂]⁺ é formado pela perda das cadeias alquílicas presentes nas moléculas, características de benzofenonas preniladas. De acordo com o padrão de fragmentação e comparação com os dados da literatura⁴ foi possível sugerir a estrutura como sendo o ácido nemorosínico A e seus isômeros, sendo já isolado dos frutos de *C. nemorosa*. O padrão de formação de íons produtos pode ser estendido para outros compostos com o mesmo íon produto final m/z 217 (Figuras 2 a 5). Os isômeros **15** e **16** (ácido nemorosínico B) mostraram o pico do íon molecular protonado

Tabela 1. Caracterização dos compostos das flores e frutos de *Clusia nemorosa* por UPLC-DAD-qTOF-MSE

Tr	λ_{\max} (nm)	[M+H] ⁺ / [M+Na] ⁺ (FM)	Calculado [M+H] ⁺ (ppm)/ [M+Na] ⁺ (ppm)	Fragmentos	Possível substância	Referência	
1	0,36	280	1155,2762/11 77,2506 C ₆₀ H ₅₀ O ₂₄	1155,2764 (0,17)/ 1177,2562 (-4,75)	867,2123 [M+H-catequina] ⁺ , 579,1498 [M+H-2xcatequina] ⁺ , 291,0870 [M+H-3xcatequina] ⁺	Tetracatequina (isômero I)	
2	0,40	280	1155,2764/11 77,2506 C ₆₀ H ₅₀ O ₂₄	1155,2764 (0,17)/ 1177,2562 (-4,75)	867,2123 [M+H-catequina] ⁺ , 579,1498 [M+H-2xcatequina] ⁺ , 291,0870 [M+H-3xcatequina] ⁺	Tetracatequina (isômero II)	
3	4,10	284	531,2741/ 553,2560 (C ₃₃ H ₃₈ O ₆)	531,2741 (0,00)/ 553,2560 (0,00)	463,2113 [M+H-C ₅ H ₈] ⁺ , 309,1113 [M+H-C ₅ H ₈ -C ₉ H ₁₄ O ₂] ⁺ , 231,0656 [M+H-C ₅ H ₈ -C ₉ H ₁₄ O ₂ -C ₆ H ₆] ⁺ , 219,1027 [M+H-C ₅ H ₈ -C ₁₆ H ₂₀ O ₂] ⁺ , 217,0860 [M+H-C ₅ H ₈ -C ₁₆ H ₂₂ O ₂] ⁺	Ácido nemorosínico A (isômero I)**	4
4	4,16	280	531,2741/ 553,2560 (C ₃₃ H ₃₈ O ₆)	531,2741 (0,00)/ 553,2560 (0,00)	463,2113 [M+H-C ₅ H ₈] ⁺ , 309,1113 [M+H-C ₅ H ₈ -C ₉ H ₁₄ O ₂] ⁺ , 231,0656 [M+H-C ₅ H ₈ -C ₉ H ₁₄ O ₂ -C ₆ H ₆] ⁺ , 219,1027 [M+H-C ₅ H ₈ -C ₁₆ H ₂₀ O ₂] ⁺ , 217,0860 [M+H-C ₅ H ₈ -C ₁₆ H ₂₂ O ₂] ⁺	Ácido nemorosínico A (isômero II)**	4
5	4,77	-	489,2847/ 511,2715 (C ₂₈ H ₄₀ O ₇)	489,2847 (0,00)/ 511,2666 (3,32)	471,2755[M+H-H ₂ O] ⁺ , 453,2672 [M+H-2xH ₂ O] ⁺ , 445,2578 [M+H-CO ₂] ⁺	Derivado esteroide ou triterpeno	
6	4,86	287	529,3159/ 551,2977 (C ₃₁ H ₄₄ O ₇)	529,3159 (0,00)/ 551,2979 (-0,36)	461,2543 [M+H-C ₅ H ₈] ⁺ , 307,1540 [M+H-C ₅ H ₈ -C ₉ H ₁₄ -O ₂] ⁺ , 289,1443 [M+H-C ₅ H ₈ -C ₉ H ₁₄ -O ₂ -H ₂ O] ⁺ , 219,0613 [M+H-C ₁₀ H ₁₄ O ₂ -C ₄ H ₁₀ -H ₂ O] ⁺ , 217,0818 [M+H-C ₁₀ H ₁₄ O ₂ -C ₄ H ₁₀ -H ₂ O-2H] ⁺	Ácido nemorósico (isômero I)	5
7	5,04	287, 334	529,3159/ 551,2977 (C ₃₁ H ₄₄ O ₇)	529,3159 (0,00)/ 551,2979 (-0,36)	461,2543 [M+H-C ₅ H ₈] ⁺ , 307,1540 [M+H-C ₅ H ₈ -C ₉ H ₁₄ -O ₂] ⁺ , 289,1443 [M+H-C ₅ H ₈ -C ₉ H ₁₄ -O ₂ -H ₂ O] ⁺ , 219,0613 [M+H-C ₁₀ H ₁₄ O ₂ -C ₄ H ₁₀ -H ₂ O] ⁺ , 217,0818 [M+H-C ₁₀ H ₁₄ O ₂ -C ₄ H ₁₀ -H ₂ O-2H] ⁺	Ácido nemorósico (isômero II)	5
8	5,14	285, 362	533,2897 / 555,2712 (C ₃₃ H ₄₀ O ₆)	533,2897 (0,00)/ 555,2717 (-0,90)	477,2283 [M+H-C ₄ H ₈] ⁺ , 465,2272 [M+H-C ₅ H ₈] ⁺ , 447,2178 [M+H-C ₄ H ₆ O ₂] ⁺ , 409,1646 [M+H-C ₄ H ₈ -C ₅ H ₈] ⁺ , 311,1227 [M+H-C ₅ H ₈ -C ₉ H ₁₄ O ₂] ⁺ , 233,1131 [M+H-C ₅ H ₈ -C ₉ H ₁₄ O ₂ -C ₆ H ₆] ⁺ , 219,1015 [M+H-C ₅ H ₈ -C ₁₆ H ₂₀ O ₂] ⁺ , 217,0863 [M+H-C ₅ H ₈ -C ₁₆ H ₂₂ O ₂] ⁺	Ácido dihidro nemorosínico A**	
9	5,41	287	529,3159/ 551,2977 (C ₃₁ H ₄₄ O ₇)	529,3159 (0,00)/ 551,2979 (-0,36)	461,2543 [M+H-C ₅ H ₈] ⁺ , 307,1540 [M+H-C ₅ H ₈ -C ₉ H ₁₄ -O ₂] ⁺ , 289,1443 [M+H-C ₅ H ₈ -C ₉ H ₁₄ -O ₂ -H ₂ O] ⁺ , 219,0613 [M+H-C ₁₀ H ₁₄ O ₂ -C ₄ H ₁₀ -H ₂ O] ⁺ , 217,0818 [M+H-C ₁₀ H ₁₄ O ₂ -C ₄ H ₁₀ -H ₂ O-2H] ⁺	Ácido nemorósico (isômero III)	5
10	5,51	287	519,3107 / 541,2933 (C ₃₃ H ₄₂ O ₅)	519,3105 (0,38) 541,2924 (1,66)	451,2484 [M+H-C ₅ H ₈] ⁺ , 395,1853 [M+H-C ₅ H ₈ -C ₆ H ₆] ⁺ , 327,1224 [M+H-2xC ₅ H ₈ -C ₄ H ₈] ⁺ , 271,0598 [M+H-2xC ₅ H ₈ -2xC ₄ H ₈] ⁺ , 177,0193 [M+H-2xC ₅ H ₈ -2xC ₄ H ₈ -C ₆ H ₆ O] ⁺	Hidroxinemorosona*	12
11	5,69	270, 380	531,2741 / 553,2560 (C ₃₃ H ₃₈ O ₆)	531,2741 (0,00)/ 553,2560 (0,00)	463,2113 [M+H-C ₅ H ₈] ⁺ , 309,1113 [M+H-C ₅ H ₈ -C ₉ H ₁₄ O ₂] ⁺ , 231,0656 [M+H-C ₅ H ₈ -C ₉ H ₁₄ O ₂ -C ₆ H ₆] ⁺ , 219,1027 [M+H-C ₅ H ₈ -C ₁₆ H ₂₀ O ₂] ⁺ , 217,0860 [M+H-C ₅ H ₈ -C ₁₆ H ₂₂ O ₂] ⁺	Ácido nemorosínico A (isômero III)	4

Continua...

Continuação...

12	6,27	332	513,3210 / 535,3036 (C ₃₁ H ₄₄ O ₆)	513,3210 (0,00) 535,3030 (1,12)	457,2584 [M+H-C ₄ H ₈] ⁺ , 445,2581 [M+H-C ₅ H ₈] ⁺ , 411,2534 [M+H-C ₄ H ₁₀ -CO ₂] ⁺ , 389,1955 [M+H-C ₅ H ₈ -C ₄ H ₈] ⁺ , 219,1013 [M+H-C ₅ H ₈ -C ₁₆ H ₂₀ O ₂] ⁺ , 217,1018 [M+H-C ₅ H ₈ -C ₁₆ H ₂₂ O ₂] ⁺	Ácido dehidro nemorosínico B (isômero I)	
13	6,30	331	513,3210 / 535,3036 (C ₃₁ H ₄₄ O ₆)	513,3210 (0,00) 535,3030 (1,12)	457,2584 [M+H-C ₄ H ₈] ⁺ , 445,2581 [M+H-C ₅ H ₈] ⁺ , 411,2534 [M+H-C ₄ H ₁₀ -CO ₂] ⁺ , 389,1955 [M+H-C ₅ H ₈ -C ₄ H ₈] ⁺ , 219,1013 [M+H-C ₅ H ₈ -C ₁₆ H ₂₀ O ₂] ⁺ , 217,1018 [M+H-C ₅ H ₈ -C ₁₆ H ₂₂ O ₂] ⁺	Ácido dehidro nemorosínico B (isômero II)	
14	7,09	274	503,3154 / 525,2974 (C ₃₃ H ₄₂ O ₄)	503,3155 (-0,19) 525,2975 (-0,19)	435,2526 [M+H-C ₅ H ₈] ⁺ , 447,2834 [M+H-C ₄ H ₈] ⁺ , 379,1898 [M+H-C ₅ H ₈ -C ₄ H ₈] ⁺ , 311,1272 [M+H-2xC ₅ H ₈ -C ₄ H ₈] ⁺ , 255,0648 [M+H-2xC ₅ H ₈ -2xC ₄ H ₈] ⁺ , 177,0189 [M+H-2xC ₅ H ₈ -2xC ₄ H ₈ -C ₆ H ₆] ⁺	Nemorosona (isômero I)	13, 14
15	6,88	272, 358	511,3054 / 533,2872 (C ₃₁ H ₄₂ O ₆)	511,3054 (0,00) 533,2873 (-0,18)	455,2432 [M+H-C ₄ H ₈] ⁺ , 443,2431 [M+H-C ₅ H ₈] ⁺ , 409,2377 [M+H-C ₄ H ₁₀ -CO ₂] ⁺ , 219,0993 [M+H-C ₅ H ₈ -C ₁₆ H ₂₀ O ₂] ⁺ , 217,0865 [M+H-C ₅ H ₈ -C ₁₆ H ₂₂ O ₂] ⁺	Ácido nemorosínico B (isômero I)	4
16	6,97	272, 335	511,3054 / 533,2872 (C ₃₁ H ₄₂ O ₆)	511,3054 (0,00) 533,2873 (-0,18)	455,2432 [M+H-C ₄ H ₈] ⁺ , 443,2431 [M+H-C ₅ H ₈] ⁺ , 409,2377 [M+H-C ₄ H ₁₀ -CO ₂] ⁺ , 219,0993 [M+H-C ₅ H ₈ -C ₁₆ H ₂₀ O ₂] ⁺ , 217,0865 [M+H-C ₅ H ₈ -C ₁₆ H ₂₂ O ₂] ⁺	Ácido nemorosínico B (isômero II)	4
17	7,09	274	503,3154 / 525,2974 (C ₃₃ H ₄₂ O ₄)	503,3155 (-0,19) 525,2975 (-0,19)	435,2526 [M+H-C ₅ H ₈] ⁺ , 447,2834 [M+H-C ₄ H ₈] ⁺ , 379,1898 [M+H-C ₅ H ₈ -C ₄ H ₈] ⁺ , 311,1272 [M+H-2xC ₅ H ₈ -C ₄ H ₈] ⁺ , 255,0648 [M+H-2xC ₅ H ₈ -2xC ₄ H ₈] ⁺ , 177,0189 [M+H-2xC ₅ H ₈ -2xC ₄ H ₈ -C ₆ H ₆] ⁺	Nemorosona (isômero II)	13, 14
18	7,21	270	483,3466 / 505,3284 (C ₃₁ H ₄₆ O ₄)	483,3468 (-0,41) 505,3286 (-0,39)	427,2838 [M+H-C ₄ H ₈] ⁺ , 415,2835 [M+H-C ₅ H ₈] ⁺ , 359,2209 [M+H-C ₅ H ₈ -C ₄ H ₈] ⁺ , 291,1590 [M+H-2xC ₅ H ₈ -C ₄ H ₈] ⁺ , 235,0960 [M+H-2xC ₅ H ₈ -2xC ₄ H ₈] ⁺ , 219,1012 [M+H-3xC ₅ H ₈ -C ₄ H ₁₀] ⁺ , 217,0856 [M+H-3xC ₅ H ₈ -C ₄ H ₁₀ -2H] ⁺	Nemorosonol B (isômero I)	12
19	7,27	274	483,3466 / 505,3284 (C ₃₁ H ₄₆ O ₄)	483,3468 (-0,41) 505,3286 (-0,39)	427,2838 [M+H-C ₄ H ₈] ⁺ , 415,2835 [M+H-C ₅ H ₈] ⁺ , 359,2209 [M+H-C ₅ H ₈ -C ₄ H ₈] ⁺ , 291,15 90 [M+H-2xC ₅ H ₈ -C ₄ H ₈] ⁺ , 235,0960 [M+H-2xC ₅ H ₈ -2xC ₄ H ₈] ⁺ , 219,1012 [M+H-3xC ₅ H ₈ -C ₄ H ₁₀] ⁺ , 217,0856 [M+H-3xC ₅ H ₈ -C ₄ H ₁₀ -2H] ⁺	Nemorosonol B (isômero II)	12
20	8,07	358	481,3313 / 503,3148 (C ₃₁ H ₄₄ O ₄)	481,3312 (0,20) 503,3131 (1,98)	425,2683 [M+H-C ₄ H ₈] ⁺ , 413,2681 [M+H-C ₅ H ₈] ⁺ , 357,2064 [M+H-C ₄ H ₈ -C ₅ H ₈] ⁺ , 289,1430 [M+H-2xC ₅ H ₈ -C ₄ H ₈] ⁺ , 217,0863 [M+H-3xC ₅ H ₈ -C ₄ H ₁₀ -2H] ⁺	Dehidro nemorosonol B (isômero I)	
21	8,12	332	483,3466 / 505,3284 (C ₃₁ H ₄₆ O ₄)	483,3468 (-0,41) 505,3286 (-0,39)	427,2838 [M+H-C ₄ H ₈] ⁺ , 415,2835 [M+H-C ₅ H ₈] ⁺ , 359,2209 [M+H-C ₅ H ₈ -C ₄ H ₈] ⁺ , 291,1590 [M+H-2xC ₅ H ₈ -C ₄ H ₈] ⁺ , 235,0960 [M+H-2xC ₅ H ₈ -2xC ₄ H ₈] ⁺ , 219,1012 [M+H-3xC ₅ H ₈ -C ₄ H ₁₀] ⁺ , 217,0856 [M+H-3xC ₅ H ₈ -C ₄ H ₁₀ -2H] ⁺	Nemorosonol B (isômero III)	12
22	9,01	273, 380	481,3313 / 503,3148 (C ₃₁ H ₄₄ O ₄)	481,3312 (0,20) 503,3131 (1,98)	425,2683 [M+H-C ₄ H ₈] ⁺ , 413,2681 [M+H-C ₅ H ₈] ⁺ , 357,2064 [M+H-C ₄ H ₈ -C ₅ H ₈] ⁺ , 289,1430 [M+H-2xC ₅ H ₈ -C ₄ H ₈] ⁺ , 217,0863 [M+H-3xC ₅ H ₈ -C ₄ H ₁₀ -2H] ⁺	Dehidro nemorosonol B (isômero II)	
23	9,23	280, 380	481,3313 / 503,3148 (C ₃₁ H ₄₄ O ₄)	481,3312 (0,20) 503,3131 (1,98)	425,2683 [M+H-C ₄ H ₈] ⁺ , 413,2681 [M+H-C ₅ H ₈] ⁺ , 357,2064 [M+H-C ₄ H ₈ -C ₅ H ₈] ⁺ , 289,1430 [M+H-2xC ₅ H ₈ -C ₄ H ₈] ⁺ , 217,0863 [M+H-3xC ₅ H ₈ -C ₄ H ₁₀ -2H] ⁺	Dehidro-nemorosonol B (isômero III)	

*Encontrado apenas nas flores. **Encontrados apenas nos frutos

Clusia Flor MeOH c pos1a

1: TOF MS ES+
BPI
6.49e5

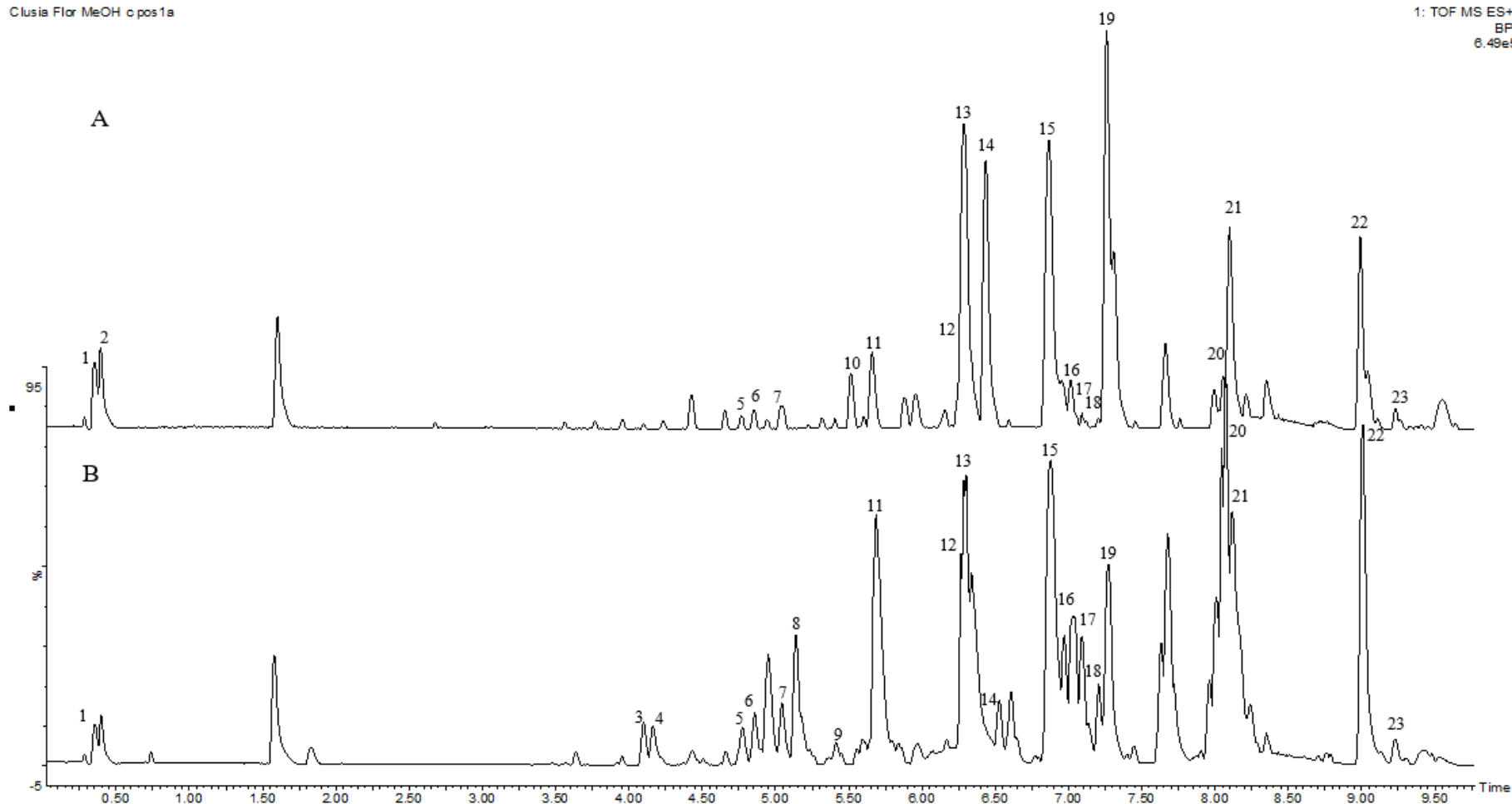


Figura 1. Cromatograma de íon pico base da fração metanólica das flores (A) e frutos (B) de *Clusia nemorosa* obtido UPLC-qTOF/MSE em modo positivo

em m/z 511,3054 $[M+H]^+$ além do aduto em m/z 533,2873 $[M+Na]^+$ e absorção máxima no espectro de UV em 272 nm. Os íons produtos encontrados nos espectros foram semelhantes ao ácido nemorosínico A e isômeros (**3**, **4** e **11**), com exceção da ausência da perda de uma unidade benzeno. O íon produto final observado foi também m/z 217,0865 $[M+H-C_5H_8-C_{16}H_{22}O_2]^+$. Com esses dados foi possível sugerir que o composto se trata do ácido nemorosínico B (e isômeros), já isolado dos frutos de *C. nemorosa*.⁴ Os compostos **6**, **7** e **9** ($\lambda_{max} = 287$ nm) apresentaram o pico do íon molecular protonado em m/z 529,3159 $[M+H]^+$ e aduto em m/z 551,2979 $[M+Na]^+$. As análises dos íons produtos em 307,1540 $[M+H-C_5H_8-C_9H_{14}-O_2]^+$, 289,1443 $[M+H-C_5H_8-C_9H_{14}-O_2-H_2O]^+$ e 217,0818 $[M+H-C_{10}H_{14}O_2-C_4H_{10}-H_2O-2H]^+$ e comparação com a literatura,⁵ permitiu identificar **6**, **7** e **9** como sendo o ácido nemorósico e seus isômeros. O ácido nemorósico já foi isolado dos frutos de *C. nemorosa*.⁵

Os isômeros **12** e **13** ($\lambda_{max} = 332$ nm) exibiram o pico do íon molecular protonado em m/z 513,3210 $[M+H]^+$ e perda da molécula neutra (68 Da) referente ao pentadieno em m/z 457,2584 $[M+H-C_4H_8]^+$. O íon m/z 411,2534 $[M+H-C_4H_{10}-CO_2]^+$ sugere a presença de ácido carboxílico na estrutura. Quando comparado ao ácido nemorosínico B e isômero (**15** e **16**) esses compostos mostraram massa de 2 Da a mais. De acordo com as análises dos íons produtos obtidos (Tabela 1), foi possível sugerir as substâncias como sendo isômeros do ácido dehidro-nemorosínico B, até então ainda não reportado na literatura, podendo se tratar de uma nova substância. No entanto apenas pelos dados obtidos nos espectros de massas e UV não é possível confirmar a estrutura inequivocamente, e será necessário o isolamento e análises por outras técnicas, como RMN de 1H e ^{13}C .

Os isômeros **18**, **19** e **21**, m/z 483,3466 $[M+H]^+$ apresentaram perdas de 56 e 68 Da, referentes aos íons produtos em m/z 427,2838 $[M+H-C_4H_8]^+$ e m/z 415,2835 $[M+H-C_5H_8]^+$, respectivamente, característicos de substâncias prenidadas. O íon em m/z 217,0856 $[M+H-3C_5H_8-C_4H_{10}-2H]^+$ é formado ao final através de uma ciclização por desidrogenação. De acordo com os dados obtidos, foi possível sugerir a identificação de nemorosonol B e seus isômeros, composto já isolado dos frutos de *C. Nemorosa*.¹² Finalmente os últimos isômeros

deste grupo **20**, **22** e **23** m/z 481,3313 $[M+H]^+$ mostraram os espectros de massas semelhantes aos isômeros **18**, **19**, **21** menos 2 Da ($-H_2$) devido a ausência de 2 átomos de hidrogenio na estrutura, e foi tentativamente identificado como sendo derivado dehidro-nemorosonol B, apresentando conseqüentemente uma ligação dupla a mais na estrutura. Estes compostos com uma insaturação adicional ainda não foram isolados de espécies de *Clusia* e com apenas os dados do espectro de UV e massas não podem ser identificados adequadamente.

As benzofenonas **10**, **14** e **17** apresentaram o núcleo comum final com o íon produto em m/z 177 nos espectros de massas. Os compostos **14** e **17** (isômeros) apresentaram absorção máxima no espectro de UV em 274 nm e no espectro de massas apresentou pico do íon molecular protonado em m/z 503,3154 $[M+H]^+$ e íons produtos devido a perda dos grupos pentadieno e isobuteno em m/z 435,2526 $[M+H-C_5H_8]^+$; 379,1898 $[M+H-C_5H_8-C_4H_8]^+$; 311,1271 $[M+H-2xC_5H_8-C_4H_8]^+$; 255,0653 $[M+H-2xC_5H_8-2xC_4H_8]^+$ e 177,0196 $[M+H-2xC_5H_8-2xC_4H_8-C_6H_6]^+$ corroborando a presença de prenilas na molécula. De acordo com estes dados, **14** e **17** foram identificados como nemorosona (isômeros), já isolado anteriormente da resina floral de *C. nemorosa*, além de outras espécies do gênero.¹³⁻¹⁶ O mecanismo de fragmentação e formação dos íons produtos de nemorosona por ESI-MS em modo positivo está de acordo com o reportado por Piccinelli et al.¹⁶ O composto **10** com íon molecular protonado em m/z 519,3103 $[M+H]^+$ quando comparado com **17** (nemorosona) apresenta muita semelhança em relação as perdas dos fragmentos nos espectros de massas (Tabela 1), além da presença do íon produto final formado em m/z 177,0182 $[M+H-2xC_5H_8-2xC_4H_8-C_6H_6O]^+$, no entanto é possível observar um valor de 16 Da a mais, além da perda de um fenol para formar o íon produto final, o que sugere a presença de uma hidroxila ligada ao anel aromático, sendo possível sugerir o composto **10** como sendo a hidroxinemorosona, este composto foi observado apenas nas flores e já foi identificado na resina floral de *C. nemorosa*.¹² Os espectros de UV, massas de alta resolução em baixa e alta energia e o mecanismo para formação dos íons produtos do composto **10** e **17** estão nas Figuras 6 e 7, respectivamente.

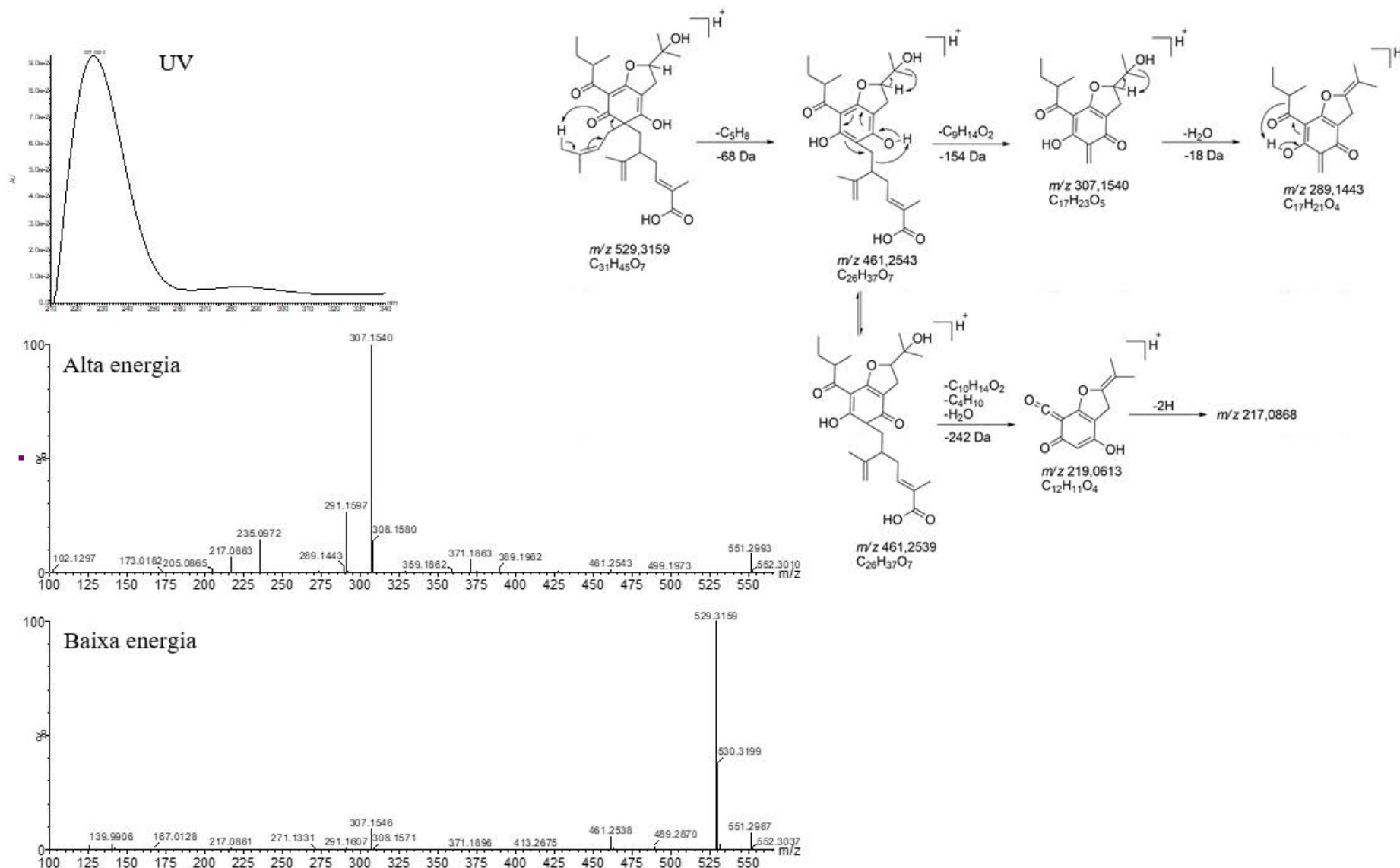


Figura 2. Espectros de UV, massas e proposta de formação dos íons produtos de ácido nemorósico (9)

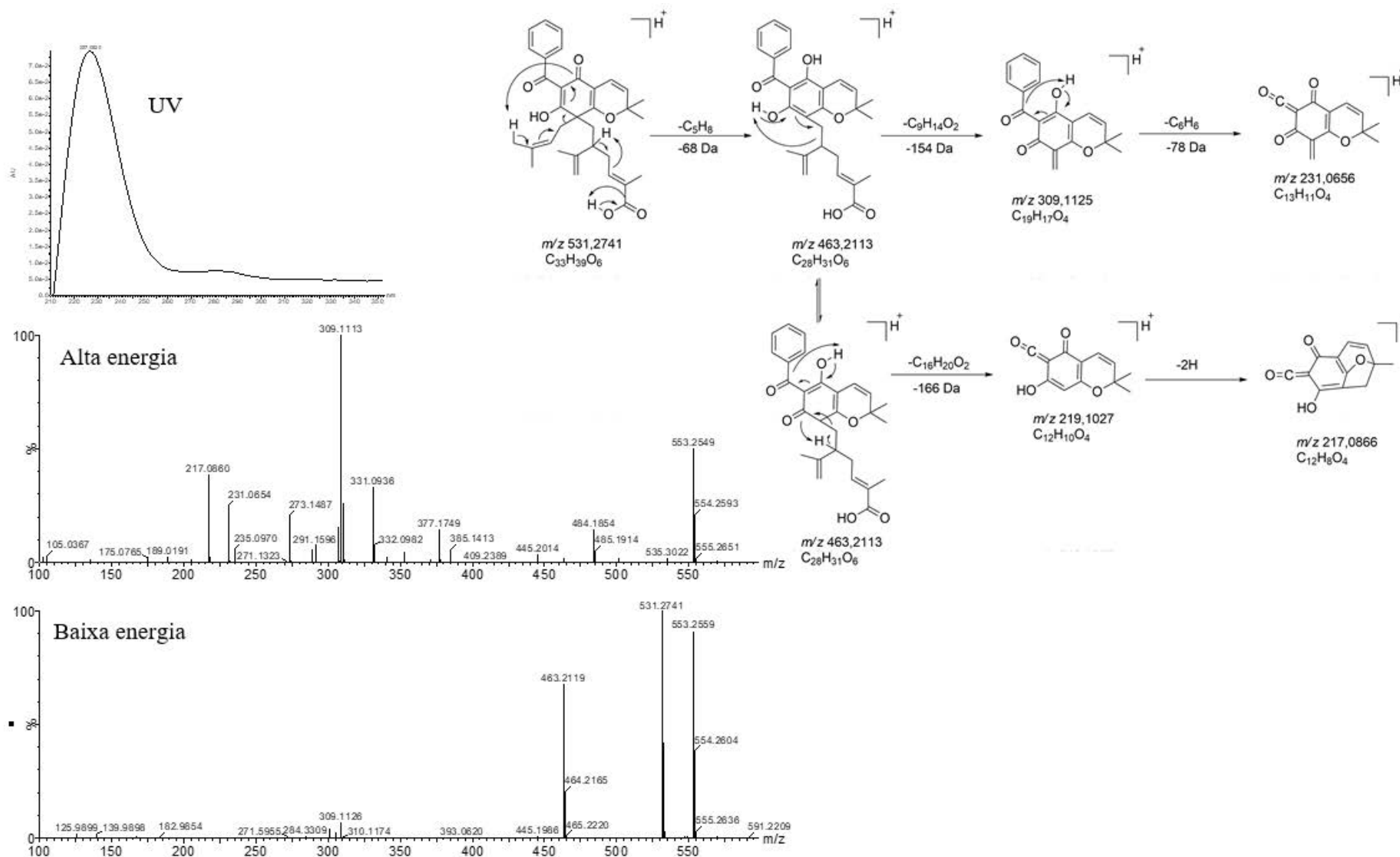


Figura 3. Espectros de UV, massas e proposta de formação dos íons produtos de ácido nemorosínico A (11)

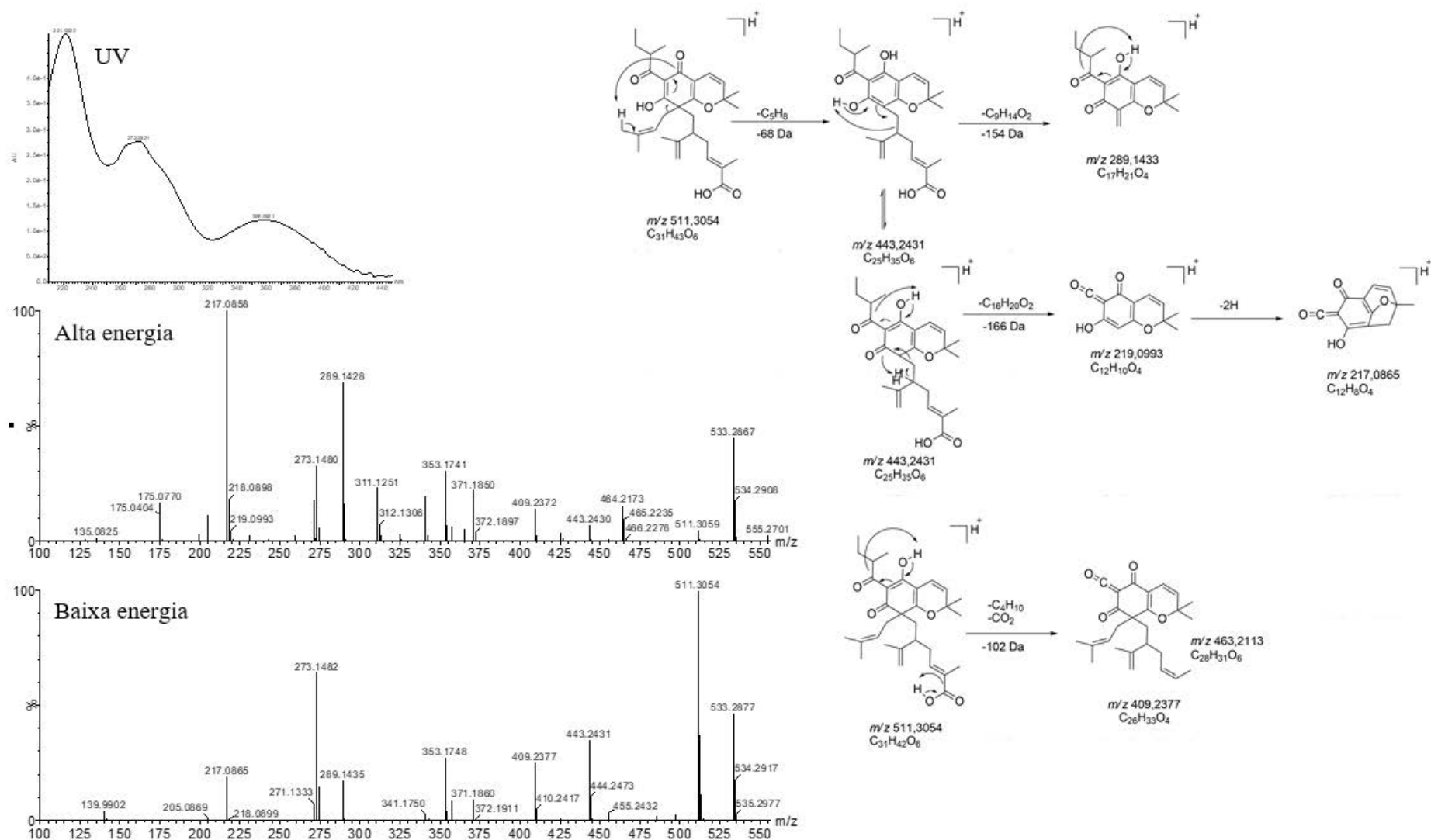


Figura 4. Espectros de UV, massas e proposta de formação dos íons produtos de ácido nemorosínico B (16)

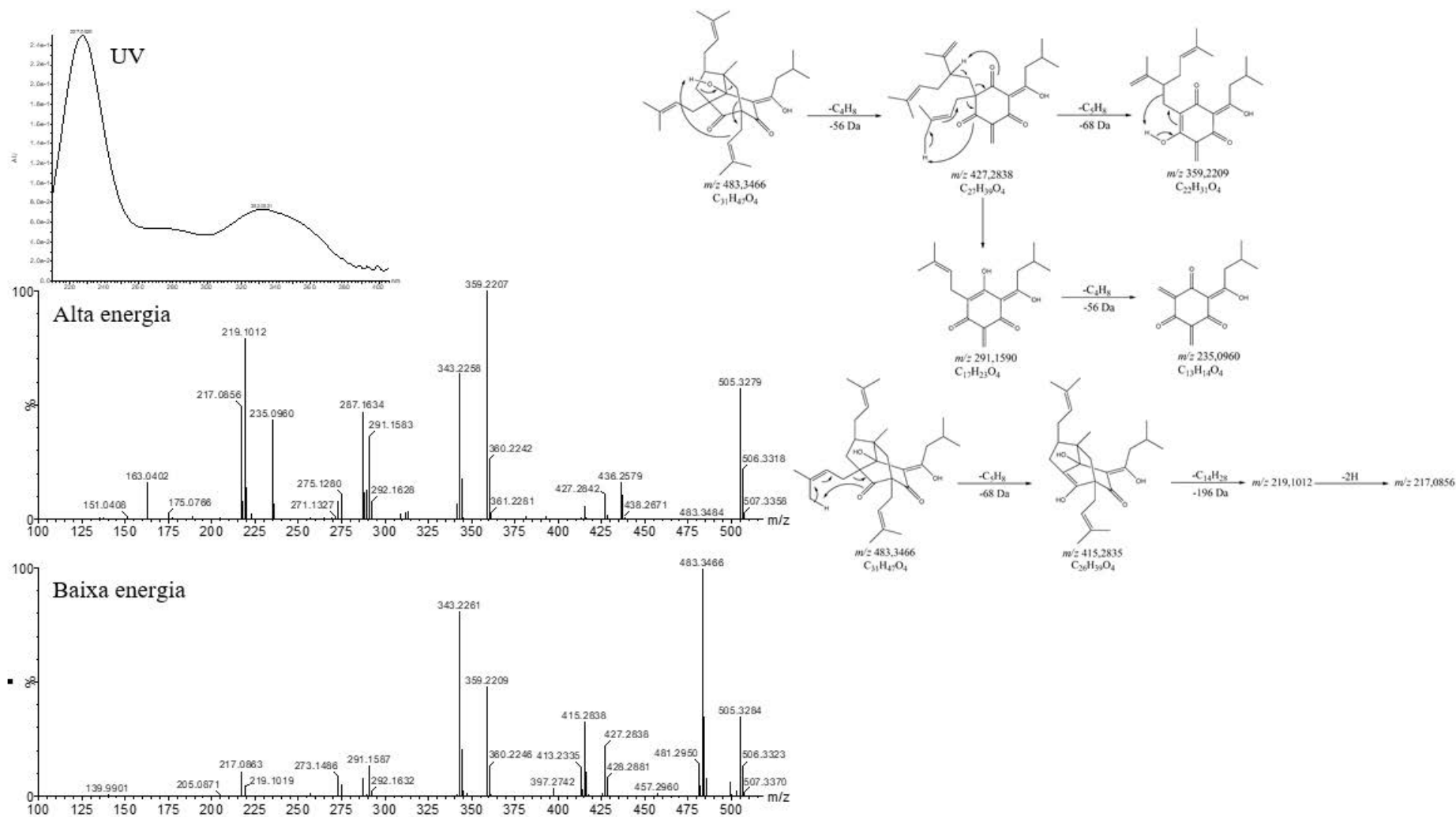


Figura 5. Espectros de UV, massas e proposta de formação dos íons produtos de nemorosonol B (21)

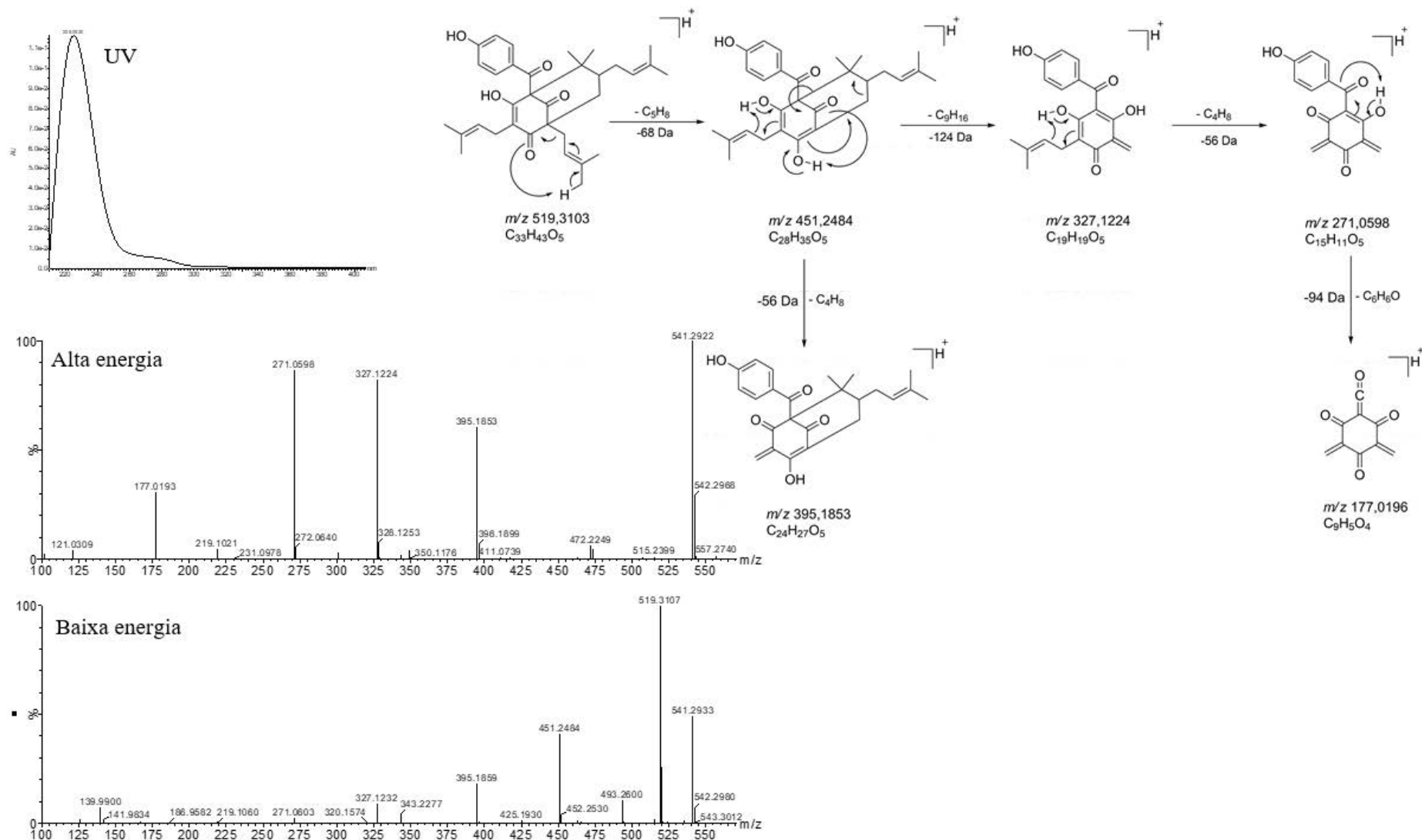


Figura 6. Espectros de UV, massas e proposta de formação dos íons produtos de hidroxinemorosona (10)

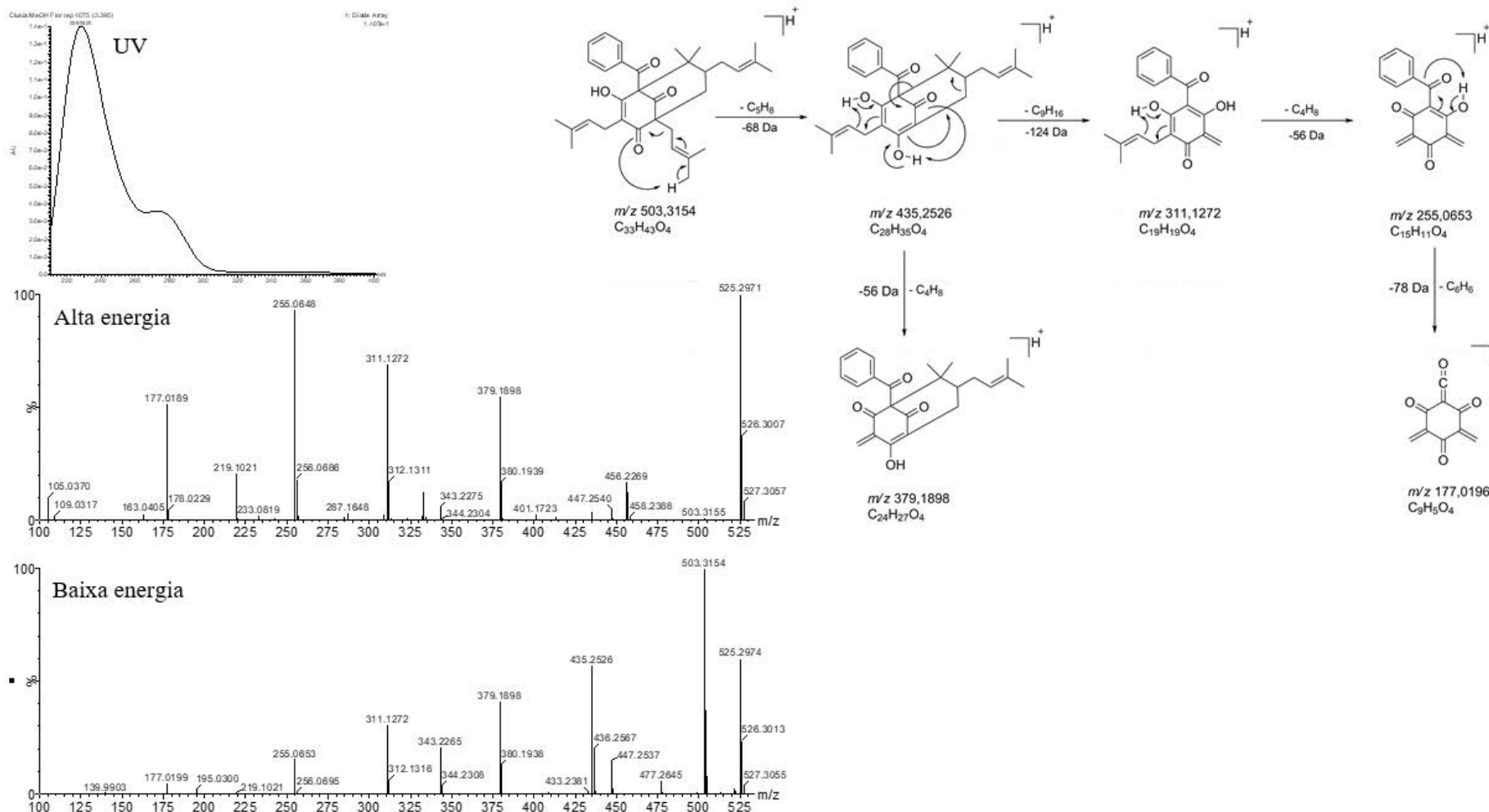


Figura 7. Espectros de UV, massas e proposta de formação dos íons produtos de nemorosona (17)

4. Conclusão

A análise por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência Acoplada ao Detector de Arranjo de Diodos e Espectrômetro de Massas por Tempo de Voo (UPLC-DAD-qTOF-MS^E) permitiu a identificação dos principais constituintes químicos dos frutos e flores de *C. nemorosa*, sendo uma fonte rica em benzofenonas preniladas, algumas já isoladas anteriormente desta espécie (ácido nemorosínico A e B, ácido nemorósico, nemorosona, hidroxinemosona e nemorosonol B) e outras ainda não isoladas (ácido dihidro nemorosínico A, ácido dehidro nemorosínico B e dehidro nemorosonol B) podendo se tratar de novas substâncias. Através das análises foi possível propor os mecanismos para formação dos dois principais núcleos com os íons produtos finais (m/z 217 e 177) que identificam e separam as duas classes de benzofenonas preniladas presentes nas flores e frutos de *C. nemorosa*. O estudo químico das flores de *C. nemorosa* é inédito.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-301935/2018-1), Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE-PRONEM número 0741.1.06/14), Centro de Apoio a Pesquisa - Universidade Federal Rural de Pernambuco (CENAPESQ-UFRPE) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências Bibliográficas

- ¹ Bittrich, V.; Amaral, M. C. E. Flower Morphology and Pollination Biology of Some *Clusia* Species from the Gran Sabana (Venezuela). *Kew Bulletin* **1996**, *51*, 681. [[Link](#)]
- ² Lopes, A. V.; Machado, I. C. Floral biology and reproductive ecology of *Clusia nemorosa* (Clusiaceae) in northeastern Brazil. *Plant, Systematics and Evolution* **1999**, *21*, 71. [[CrossRef](#)]
- ³ Lorenzi, H.; *Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*, 1a ed., Instituto Plantarum: Nova Odessa, 2009. [[Link](#)]
- ⁴ Monache, F. D.; Monache, G. D.; Gacs-Baitz, E. Two polyisoprenylated ketones from *Clusia nemorosa*. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 2305. [[CrossRef](#)]
- ⁵ Ferreira, R. O.; Silva, T. M. S.; Carvalho, M. G. New polyprenylated phloroglucinol and other compounds isolated from the fruits of *Clusia nemorosa* (Clusiaceae). *Molecules* **2015**, *20*, 14326. [[CrossRef](#)]
- ⁶ Andrade, M. R.; Almeida, E. X.; Conserva, L. M. Alkyl chromone and other compounds from *Clusia nemorosa*. *Phytochemistry* **1998**, *47*, 1431. [[CrossRef](#)]
- ⁷ Camara, C. A. G.; Marsaioli, A. J.; Bittrich, V. Chemical constituents of apolar fractions from fruit latex of twelve *Clusia* species (Clusiaceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **2018**, *90*, 1919. [[CrossRef](#)]
- ⁸ Ferro, J. N. S.; Silva, J. P.; Conserva, L. M.; Barreto, E. Leaf extract from *Clusia nemorosa* induces an antinociceptive effect in mice via a mechanism that is adrenergic systems dependent. *Chinese Journal of Natural Medicines* **2013**, *11*, 385. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)]
- ⁹ Farias, J. A. C.; Ferro, J. N. S.; Silva, J. P.; Agra, I. K. R.; Oliveira, F. M.; Candea, A. L. P.; Conte, F. P.; Ferraris, F. K.; Henriques, M. G. M. O.; Conserva, L. M.; Barreto, E. Modulation of inflammatory processes by leaves extract from *Clusia nemorosa* both *in vitro* and *in vivo* animal models. *Inflammation* **2012**, *35*, 764. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)]
- ¹⁰ Oliveira, C. M. A.; Porto, A. L. M.; Bittrich, V.; Marsaioli, A. J. Two polyisoprenylated benzophenones from the foral resins of three *Clusia* species. *Phytochemistry* **1999**, *50*, 1073. [[CrossRef](#)]
- ¹¹ Ngwoke, K. G.; Orame, N.; Liu, S.; Okoye, F. B. C.; Daletos, G.; Proksch, P. A new benzophenone glycoside from the leaves of *Mitracarpus villosus*. *Natural Product Research* **2017**, *31*, 2354. [[CrossRef](#)]
- ¹² Monache, F. D. Nemorosonol B, a polyisoprenylated alkyl-aryl ketone from *Clusia nemorosa*. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia* **1990**, *4*, 67. [[Link](#)]
- ¹³ Oliveira, C. M. A.; Porto, A. M.; Bittrich, V.; Vencato, I.; Marsaioli, A. J. Floral resins of *Clusia* spp.: Chemical composition and biological function. *Tetrahedron Letters* **1996**, *37*, 6427. [[CrossRef](#)]
- ¹⁴ Cuesta-Rubio, O.; Velez-Castro, H.; Frontana-Urbe, B. A.; Cárdenas, J. Nemorosone, the major constituent of floral resins of *Clusia rosea*. *Phytochemistry* **2001**, *57*, 279. [[PubMed](#)]
- ¹⁵ Porto, A. L. M.; Machado, S. M. F.; Oliveira, C. M. A.; Bittrich, V.; Amaral, M. C. E.; Marsaioli, A. J. Polyisoprenylated benzophenones from *Clusia* foral resins. *Phytochemistry* **2000**, *55*, 755. [[CrossRef](#)]
- ¹⁶ Piccinelli, A. L.; Campone, L.; Piaz, F. D.; Cuesta-Rubio, O.; Rastrelli, L. Fragmentation pathways of polycyclic polyisoprenylated benzophenones and degradation profile of nemorosone by multiple-stage tandem mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. **2009**, *20*, 1688. [[CrossRef](#)]