

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLOGIA
MESTRADO EM AGRONOMIA

KAMILA KAROLINE DE SOUZA LOS

**ESTUDO DA FORMAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS EM FRUTOS
DE MELÃO CLIMATÉRICO E NÃO-CLIMATÉRICO AO LONGO DA MATURAÇÃO.**

PONTA GROSSA
2020

KAMILA KAROLINE DE SOUZA LOS

ESTUDO METABOLÔMICO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS EM FRUTOS DE MELÃO CLIMATÉRICO E NÃO-CLIMATÉRICO AO LONGO DA MATURAÇÃO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, Curso de Mestrado da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Linha de pesquisa: Fisiologia, Melhoramento e Manejo de Culturas.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antônio Ayub

Co-Orientadora: Profa. Dra. Carolina Weigert Galvão

PONTA GROSSA – PR
2020

L878

Los, Kamila Karoline de Souza

Estudo da formação de compostos orgânicos voláteis em frutos de melão climatérico e não-climatérico ao longo da maturação. / Kamila Karoline de Souza
Los. Ponta Grossa, 2020.
100 f.

Dissertação (Mestrado em Agronomia - Área de Concentração: Agricultura),
Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antônio Ayub.
Coorientadora: Profa. Dra. Carolina Weigert Galvão.

1. Aroma. 2. Cv. Eldorado. 3. Cv. Gaúcho. I. Ayub, Ricardo Antônio. II.
Galvão, Carolina Weigert. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Agricultura. IV.T.

CDD: 630



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação: “**Estudo da formação de compostos orgânicos voláteis em frutos de melão climatérico e não-climatérico ao longo da maturação.**”.

Nome: **Kamila Karoline de Souza Los**

Orientador: **Ricardo Antonio Ayub**

Aprovado pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Ricardo Antonio Ayub

Dr^a Michelle Orane Semberger

Prof^a Dr^a Aline Coqueiro

Ponta Grossa 30, de abril de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Michelle Orane Semberger, Usuário Externo**, em 30/04/2020, às 11:04, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Aline Coqueiro, Usuário Externo**, em 30/04/2020, às 11:13, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Antonio Ayub, Professor(a)**, em 30/04/2020, às 14:47, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.





A autenticidade do documento pode ser conferida no site
<https://sei.uepg.br/autenticidade> informando o código verificador
0204908 e o código CRC **A44BCC27**.

20.000014840-0

0204908v4

AGRADECIMENTOS

Meu primeiro e mais profundo agradecimento é certamente ao meu querido Deus que criou todas as coisas que hoje eu me maravilho em estudar. E por ter cuidadosamente selecionado pessoas incríveis para caminhar junto comigo nessa jornada que foi o mestrado.

Ao meu marido Lucas, a melhor pessoa que eu conheço. Que sempre me deu suporte nas várias áreas da minha vida. Que está sempre do meu lado nos momentos bons e ruins. Que me chama a atenção quando me vê procrastinando. Que me prepara café quando estou sonolenta. Que me encoraja, motiva e incentiva em tudo que eu faço. Sou imensamente grata por poder dividir minha vida com alguém que eu amo e admiro tanto.

À minha mãe que sempre me apoiou nos estudos e em todas as decisões que eu tomei nessa área, mesmo muitas vezes sem entender o que exatamente eu estava fazendo. Que sempre me encorajou a aceitar as oportunidades que apareciam mesmo quando elas me levavam milhares de quilômetros para longe dela.

Ao meu sogro e sogra Karel e Wilhelmina Los por terem me recebido aqui no Paraná quando fui aprovada no mestrado e por toda ajuda e suporte que eles me deram durante toda minha estadia no Paraná.

Ao meu orientador Ricardo Ayub que em nossa primeira conversa me apresentou o desafio de trabalhar com a biologia molecular e confiou a mim esse projeto que tanto me fez crescer pessoal e profissionalmente. Por sempre ter se disposto a correr atrás do que fosse necessário para que nós pudéssemos fazer as análises e obter bons resultados.

À minha amiga Keren Jemima, cuja amizade foi um presente imenso que eu ganhei durante o mestrado. Por sempre ser uma criatura imensamente altruísta e solidária por quem eu tenho grande admiração. Ao meu amigo Silas Shishido que sempre se disponibilizou a ajudar no que fosse possível e que deu um grande suporte técnico no cultivo dos frutos usados neste trabalho.

À Leticia Reis, Marília Stroka e Michele Orane que gentilmente se disponibilizaram a me ensinar tudo que eu precisava saber para conduzir este trabalho e por quem eu carrego um profundo apreço e admiração.

À Danielle Domingues, Mariana Celano e Juliana Hay que ajudaram na realização dos experimentos. Desde o cultivo dos frutos até às últimas análises laboratoriais. Que sempre demonstraram boa disposição em ajudar mesmo quando as demandas aconteciam nas férias ou se alongavam até tarde da noite. Foi um prazer imenso trabalhar na companhia de vocês.

À equipe do LABFRUTI, Jessé, Isabela, Lygia, Daurimar, Warlyton, Camila Audrey e todos os outros que sempre se disponibilizaram a ajudar no que fosse necessário, agradeço por saber que eu posso contar com cada um de vocês. Levarei uma grande admiração por essa equipe por onde quer que eu vá.

Aos professores Rafael Etto e Carolina Galvão, agradeço imensamente por toda ajuda que me deram. Por todas as vezes que me ouviram com paciência e me ajudaram quando minhas análises davam errado e eu não tinha ideia de como proceder. Por nunca terem hesitado em ajudar com conselhos, com motivação, com materiais, com reagentes, dentre tantas outras coisas. Carrego em mim um carinho imenso por vocês.

À equipe do LABMOM, Daiane Hyeda, Heliemary, Raphael, Ligia, Fernanda, Laís, Salomé, Larissa, Daniel, William e todas as outras pessoas fantásticas com quem tive o privilégio de trabalhar neste ambiente. Agradeço muito por sempre se posicionarem de forma solícita a ajudar durante toda a parte experimental deste projeto.

Enfim, a todos que aqui não foram mencionados, mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, deixo registrado meu imenso agradecimento.

RESUMO

O meloeiro (*Cucumis melo* L.) é uma espécie cultivada de grande importância mundial. O Brasil é o décimo sexto maior produtor tendo o melão, especialmente a variedade de melão 'Amarelo', como a fruta *in natura* mais exportada do país. Frutos de melão, também apresentam uma ampla diversidade em características, tendo dentro da mesma espécie variedades climatéricas e não climatéricas, o que a torna de extremamente importante para os estudos relacionados à maturação de frutos e a atributos de qualidade. Isto possibilita a comparação de comportamento entre os genótipos com diferentes tipos de maturação e diferentes características de qualidade. Um dos principais atributos de qualidade em frutos é o aroma, que juntamente com o sabor compõe o *flavor*, um dos principais indicadores da apreciação de um vegetal. Alguns genes relacionados à biossíntese de compostos orgânicos voláteis (VOC), moléculas que conferem o aroma aos frutos, já foram detectados em diversas variedades de melões, bem como vários voláteis que compõe a formação total de aroma nestes frutos. É, portanto, nosso objetivo traçar o perfil de expressão de sete genes que codificam enzimas relacionadas à formação de VOCs (*CmLOX9*, *CmLOX18*, *CmBCAT1*, *CmArAT1*, *CmPDC1*, *CmADH1* e *CmAAT1*) bem como analisar o padrão dos VOCs a elas relacionados e trazer uma correlação entre a expressão dos genes e a quantidade detectada destes compostos em melões Eldorado (melão 'amarelo' não-climatérico) e Gaúcho (climatérico). Para a análise dos genes foram feitas RT-qPCRs com o cDNA de melões aos 35 e 45 D.A.P, utilizando primers especificamente desenhados para cada um dos genes. Os dados dos voláteis foram coletados por SPME-GC-MS TOF utilizando amostras de frutos aos 15, 25, 35 e 45 D.A.P. Nós encontramos correlação positiva do gene *CmLOX9* com o VOC (*E,Z*)-2,6-*nonadienal* em melões Eldorado; uma correlação negativa do gene *CmLOX18* com o VOC *hexanol* em Gaúcho. Os VOC o *2-methylbutanol*, *ethyl 2-methylbutanoate*, *2-methyl propanol* e *ethyl 3-mehtylbutanoate* foram positivamente correlacionados a *CmBCAT1* em melões Gaúcho e o *2-methylbutyl acetate* em Eldorado. O gene *CmPDC1* apresentou uma correlação positiva com o *butyl acetate*, *2-methylbutyl acetate*, *2-methylpropanol* e *2-methylpropyl acetate* em Gaúcho. O gene *CmADH1* mostrou correlação positiva com o *hexanol* em Eldorado e negativa do *2-mehtylbutanol* em Gaúcho. Esta é a primeira vez que estes genes e estes voláteis são identificados em melão 'Amarelo', que é o principal tipo de melão cultivado no Brasil e melões Gaúcho, que tem uma alta expressão comercial no sul do país. Estas informações permitem um olhar panorâmico em como trabalham os mecanismos responsáveis por conferir o aroma nestas variedades e promovem informações valiosas para a aplicação em estudos de melhoria de atributos de qualidade, tornando estes frutos mais atrativos e gerando visibilidade da produção brasileira no cenário internacional.

Palavras-chave: Aroma. cv. Eldorado. cv. Gaúcho.

ABSTRACT

Melon (*Cucumis melo* L.) is a cultivated species of great importance worldwide. Brazil ranks the sixteenth position in its production, especially with the 'Yellow' melon variety, which is the most important fresh fruit exported by the country. Melon fruits also present a wide diversity in characteristics, having both climatic and non-climatic varieties within the species, what makes it extremely important for studies related to fruit ripening and quality attributes, enabling the comparison of behavior across genotypes with different types of maturation patterns and different quality characteristics. One of the main quality attributes in fruits is the aroma, which combined with the taste composes the flavor, one of the main indicators for consumer appreciation in a vegetable. Some genes related to the biosynthesis of volatile organic compounds (VOC) have already been identified in several varieties of melons, as well as hundreds of volatiles that make up the total aroma formation in these fruits. It is, therefore, the goal in this study to bring forth the expression profile of seven genes that encode enzymes related to the formation of VOCs (*CmLOX9*, *CmLOX18*, *CmBCAT1*, *CmArAT1*, *CmPDC1*, *CmADH1*, and *CmAAT1*) as well as to analyze the pattern of the VOCs related to them and bring a correlation between the gene expression and the detected amount of these compounds in Eldorado (non-climacteric 'yellow' melon) and Gaúcho (climacteric) melons. For the analysis of the genes, it was used RT-qPCRs with the cDNA of three different fruits both at 35 and 45 days after pollination (D.A.P), using specific primers designed for each of the genes. Volatile data were collected by SPME-GC-MS TOF using fruit samples at 15, 25, 35 and 45 D.A.P. a Pearson method was used to base the correlation between the genes and the VOCs. The total VOCs composition in Eldorado melon consisted mostly of aldehydes, alcohols, and hydrocarbons as for Gaúcho of esters, aldehydes, and alcohols. Considering the interaction between the volatiles and the genes, we found a positive correlation between *CmLOX9* and the VOC (E, Z) -2,6-nonadienal in Eldorado melons; a negative correlation of *CmLOX18* with hexanol in Gaúcho. The VOCs 2-methylbutanol, ethyl 2-methylbutanoate, 2-methyl propanol, and ethyl 3-methylbutanoate were positively correlated to *CmBCAT1* in Gaúcho and 2-methylbutyl acetate in Eldorado. *CmPDC1* showed a positive correlation with butyl acetate, 2-methylbutyl acetate, 2-methylpropanol e 2-methylpropyl acetate in Gaúcho. *CmADH1* demonstrated a positive correlation with hexanol in Eldorado and a negative correlation with 2-methylbutanol in Gaúcho. This is the first time that these genes and volatiles have been identified in 'Yellow' melons, which are the main type of melons grown in Brazil and Gaúcho melons, which have high commercial expression in the south of the country. This information allows a panoramic look at how the mechanisms responsible for imparting the aroma of these varieties work and provides valuable information for application in studies to improve quality attributes, making these fruits more attractive and generating great visibility to Brazil on the world stage with their production.

Key words: Aroma. cv Eldorado. cv Gaúcho.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Esquema representado os precursores, as principais enzimas e os grupos químicos relacionados à formação de aromas em frutos de melão.21
- Figura 2 - Esquema de degradação dos ácido linolêico e α -linolênico em VOCs. Nas caixas mais escuras (à esquerda) estão os compostos derivados da formação de 13(S)-hidroperóxidos catalisada por 13-LOXs.....24
- Figura 3 - Da esquerda para a direita, os aminoácidos de cadeia ramificada L- isoleucina, L-leucina e L-valina.26
- Figura 4 - À esquerda o aminoácido aromático L-fenilalanina seguindo à direita seu respectivo cetoácido e os compostos aromáticos dele derivados.27
- Figura 5 - (A) Frutos de melão cultivares Eldorado e (B) frutos de melão Gaúcho em diferentes estádios de maturação considerando os dias após a polinização (D.A.P.).....33
- Figura 6 - Perfil de expressão relativa de CmLOX9 em melões Eldorado e Gaúcho em diferentes estádios de maturação.43
- Figura 7 - VOCs advindos do catabolismo dos ácidos linoleico e α -linolênico (VINCENTI et al., 2019) e (SILVA et al., 2012).44
- Figura 8 - Gráfico de correlação de Pearson, utilizando os frutos nos estádios 35 e 45 D.A.P. A correlação foi feita entre a expressão do gene CmLOX9 em melões Eldorado, com os resultados obtidos através dos resultados da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e a área normalizada do VOC (E,Z)-2,6-nonadienal obtidos pela técnica de SPME-GC-MS TOF.46
- Figura 9 - Perfil de expressão relativa de CmLOX18 em melões Eldorado e Gaúcho em diferentes estádios de maturação.47
- Figura 10 - VOCs advindos do catabolismo de 13-peróxidos (VINCENTI et al., 2019) e (SILVA et al., 2012).48
- Figura 11 - Perfil de expressão relativa de CmBCAT1 em melões Eldorado e Gaúcho em diferentes estádios de maturação.50
- Figura 12 - VOCs advindos da degradação de aminoácidos ramificados (GONDA et al., 2010). No eixo y, está representada o valor da área normalizada dos voláteis detectados por GC-MS TOF. No eixo x, a representação das variedades estudadas (E para Eldorado e G para Gaúcho) e seus

respectivos estádios (15, 25, 35, 45 D.A.P) A: voláteis advindos da degradação de L-isoleucina: 2-methylbutanal e seus respectivos álcool e ésteres. B: voláteis advindos da degradação de L-leucina: 3-methylbutanal e seus respectivos álcool e ésteres. C: voláteis advindos da degradação de L-valina: 2-methylpropanal e seus respectivos álcool e ésteres.....51

- Figura 13 - Gráfico de correlação de Pearson, utilizando os frutos nos estádios 35 e 45 D.A.P. , entre a expressão do gene CmBCAT1 em melões Gaúcho, com os resultados obtidos através dos resultados da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e a área normalizada dos VOCs advindos da degradação de L-isoleucina. A: 2-methylbutanol. B: ethyl 2-methylbutanoate, obtidos pela técnica de SPME GC-MS TOF.52
- Figura 14 - Gráfico de correlação de Pearson, utilizando os frutos nos estádios 35 e 45 D.A.P., entre a expressão do gene CmBCAT1 em melões Eldorado, com os resultados obtidos através dos resultados da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e a área normalizada dos VOC advindo da degradação de L-isoleucina. Na figura, o composto 2-methylbutyl acetate obtido pela técnica de SPME GC-MS TOF.53
- Figura 15 - Gráfico de correlação de Pearson, utilizando os frutos nos estádios 35 e 45 D.A.P, entre a expressão do gene CmBCAT1 em melões Gaúcho, com os resultados obtidos através dos resultados da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e a área normalizada do metabólito ethyl 3-methylbutanoate advindo da degradação de L-leucina, obtido pela técnica de SPME GC-MS TOF.54
- Figura 16 - Gráfico de correlação de Pearson, utilizando os frutos nos estádios 35 e 45 D.A.P, entre a expressão do gene CmBCAT1 em melões Gaúcho, com os resultados obtidos através dos resultados da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e a área normalizada do metabólito 2-methylpropanol advindo da degradação de L-valina obtido pela técnica de SPME GC-MS TOF.55
- Figura 17 - Perfil de expressão relativa de CmArAT1 em melões Eldorado e Gaúcho em diferentes estádios de maturação.56
- Figura 18 - VOCs advindos da degradação de L-fenilalanina, um aminoácido aromático (GONDA et al., 2010). Começando pelo aldeído phenylacetaldehyde e seguindo para seus respectivos álcool e ésteres. ...57
- Figura 19 - Perfil de expressão relativa de CmPDC1 em melões Eldorado e Gaúcho em diferentes estádios de maturação.58

- Figura 20 - VOCs relacionados à atuação do gene CmPDC1 em melões (EL-SHARKAWY et al., 2005). Em cada uma das figuras são apresentados um álcool e seus respectivos ésteres. No eixo y, está representada o valor da área normalizada dos voláteis detectados por GC-MS TOF. No eixo x, a representação das variedades estudadas (E para Eldorado e G para Gaúcho) e seus respectivos estádios (15, 25, 35, 45 D.A.P). A: pyruvate e os voláteis originados de seu catabolismo. B: 2-oxohexanoate e os voláteis originados de seu catabolismo. C: 2-oxobutanoate e os voláteis originados de seu catabolismo. D: 2-oxopentanoate e os voláteis originados de seu catabolismo.60
- Figura 21 - Gráfico de correlação de Pearson, utilizando os frutos nos estádios 35 e 45 D.A.P, entre a expressão do gene CmPDC1 em melões Gaúcho, com os resultados obtidos através dos resultados da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e a área normalizada do metabólito butyl acetate obtido pela técnica de SPME-GC-MS TOF.62
- Figura 22 - VOCs relacionados à atuação do gene CmPDC1 em melões (EL-SHARKAWY et al., 2005). Em cada uma das figuras são apresentados um álcool e seus respectivos ésteres. No eixo y, está representada o valor da área normalizada dos voláteis detectados por GC-MS TOF. No eixo x, a representação das variedades estudadas (E para Eldorado e G para Gaúcho) e seus respectivos estádios (15, 25, 35, 45 D.A.P). A: ketoisocaproate e os voláteis originados de seu catabolismo. B: ketomethylvalerate e os voláteis originados de seu catabolismo. C: ketoisovalerate e os voláteis originados de seu catabolismo. D: Phenyl pyruvate63
- Figura 23 - Gráfico de correlação de Pearson, utilizando os frutos nos estádios 35 e 45 D.A.P, entre a expressão do gene CmPDC1 em melões Gaúcho, com os resultados obtidos através dos resultados da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e a área normalizada do metabólito 2-methylbutyl acetate obtido pela técnica de SPME-GC-MS TOF.65
- Figura 24 - Gráfico de correlação de Pearson, utilizando os frutos nos estádios 35 e 45 D.A.P, entre a expressão do gene CmPDC1 em melões Gaúcho, com os resultados obtidos através dos resultados da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e a área normalizada dos metabólitos 2-methylpropanol (A) e 2-methylpropyl acetate (B) obtidos pela técnica de SPME-GC-MS TOF.....66
- Figura 25 - Perfil de expressão relativa de CmADH1 em melões Eldorado e Gaúcho em diferentes estádios de maturação.67

- Figura 26 - VOCs relacionados à atuação da enzima codificada pelo gene CmADH1 em melões (MANRÍQUEZ et al., 2006). Em cada uma das figuras são apresentados um aldeído e seu respectivo álcool. No eixo y, está representada o valor da área normalizada dos voláteis detectados por GC-MS TOF. No eixo x, a representação das variedades estudadas (E para Eldorado e G para Gaúcho) e seus respectivos estádios (15, 25, 35, 45 D.A.P).....69
- Figura 27 - Gráfico de correlação de Pearson, utilizando os frutos nos estádios 35 e 45 D.A.P, entre a expressão do gene CmADH1 em melões Gaúcho, com os resultados obtidos através dos resultados da equação $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e a área normalizada dos metabólito hexanol obtido pela técnica de SPME-GC-MS TOF.....70
- Figura 28 - Gráfico de correlação de Pearson, utilizando os frutos nos estádios 35 e 45 D.A.P, entre a expressão do gene CmADH1, com os resultados obtidos através dos resultados da equação $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e a área normalizada do composto 2-methylbutanol obtido pela técnica de GC-MS TOF.71
- Figura 29 - Perfil de expressão relativa de CmAAT1 em melões Eldorado e Gaúcho em diferentes estádios de maturação.72
- Figura 30 - VOCs relacionados à atuação da enzima codificada pelo gene CmAAT1 em melões (EL-SHARKAWY et al., 2005). Em cada uma das figuras são apresentados um álcool e seus respectivos ésteres. No eixo y, está representada o valor da área normalizada dos voláteis detectados por GC-MS TOF. No eixo x, a representação das variedades estudadas (E para Eldorado e G para Gaúcho) e seus respectivos estádios (15, 25, 35, 45 D.A.P).....73
- Figura 31 - Gráfico de correlação de Pearson, utilizando os frutos nos estádios 35 e 45 D.A.P, entre a expressão do gene CmAAT1 em melões Gaúcho, com os resultados obtidos através dos resultados da equação $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e a área normalizada do metabólito ethanol, obtido pela técnica de SPME GC-MS TOF.75
- Figura 32 - Gráfico de correlação de Pearson, utilizando os frutos nos estádios 35 e 45 D.A.P, entre a expressão do gene CmAAT1 em melões Gaúcho, com os resultados obtidos através dos resultados da equação $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e a área normalizada dos metabólitos Hexanol (A) e hexyl acetate (B), obtidos pela técnica de SPME GC-MS TOF.....76

Figura 33 - Gráfico de correlação de Pearson, utilizando os frutos nos estádios 35 e 45 D.A.P, entre a expressão do gene CmAAT1 em melões Gaúcho, com os resultados obtidos através dos resultados da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e a área normalizada do metabólito 2-methylpropanol obtido pela técnica de SPME GC-MS TOF.....77

Figura 34 - Gráfico de correlação de Pearson, utilizando os frutos nos estádios 35 e 45 D.A.P, a expressão do gene CmAAT1 em melões Gaúcho, com os resultados obtidos através dos resultados da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e a área normalizada dos metabólitos 2-methylbutanol (A) e 2-methylbutyl acetate (B) obtidos pela técnica de SPME GC-MS TOF.....78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primers utilizados nas análises de RT – qPCR.....	35
Tabela 2 - Reagentes utilizados na reação de qPCR, e suas concentrações.....	36
Tabela 3 - Configurações do termociclador para a amplificação dos fragmentos referentes aos genes estudados.....	36
Tabela 4 - Quantidades de VOCs (por grupos químicos) encontrados em melões Eldorado utilizando a técnica de GC-MS TOF.....	41
Tabela 5 - Quantidades de VOCs (por grupos químicos) encontrados em melões Gaúcho utilizando a técnica de GC-MS TOF.....	42

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1	A CULTURA DO MELÃO	18
2.2	CLASSES DE MATURAÇÃO	19
2.3	AROMA EM FRUTOS	20
2.3.1	Lipoxigenases (LOXs)	22
2.3.2	<i>Branched-Chain Amino Transferases</i> (BCATs).....	25
2.3.3	<i>Aromatic Amino Transferases</i> (ArATs).....	27
2.3.4	Piruvato Descarboxilases (PDCs)	28
2.3.5	Alcool Desidrogenases (ADHs)	29
2.3.6	Alcool Acil Transferases (AATs).....	30
3	OBJETIVO	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1	MATERIAL VEGETAL	32
4.2	EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL	34
4.3	TRATAMENTO COM DNase E SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR (cDNA).....	34
4.4	ANÁLISE DE EXPRESSÃO RELATIVA RT-qPCR	34
4.6	ANÁLISE DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS (SPME-GC-MS TOF)	37
5	RESULTADOS	40
5.1	PERFIL DE VOLÁTEIS EM MELÕES ELDORADO E GAÚCHO	40
5.3	GENES RELACIONADOS À BIOSÍNTESE DE VOCs.....	42
5.3.1	<i>CmLOX9</i>	42
5.3.2	<i>CmLOX18</i>	46
5.3.3	<i>CmBCAT1</i>	49
5.3.4	<i>CmArAT1</i>	55
5.3.5	<i>CmPDC1</i>	57
5.3.6	<i>CmADH1</i>	67
5.3.7	<i>CmAAT1</i>	72
6	DISCUSSÃO	80

6.2	<i>CmLOX9</i>	80
6.3	<i>CmLOX18</i>	81
6.4	<i>CmBCAT1</i>	82
6.5	<i>CmArAT1</i>	84
6.6	<i>CmPDC1</i>	85
6.7	<i>CmADH1</i>	86
6.8	<i>CmAAT1</i>	87
7	CONCLUSÕES	89
	REFERÊNCIAS	91
	APÊNDICE A - TABELA COM VOCS DETECTADOS EM MELÕES ELDORADO E GAÚCHO E SUAS RESPECTIVAS ÁREA RELATIVA	96

1 INTRODUÇÃO

O meloeiro (*Cucumis melo* L.) é uma importante espécie cultivada pertencente à família das cucurbitaceas, seu fruto possui uma grande importância mundial na produção de frutas com uma área colhida de aproximadamente 1.4 milhão de ha e uma produção de cerca de 40 milhões de toneladas em 2018 em todo o globo (FAO, 2018). O Brasil é o décimo sexto maior produtor mundial de melão com uma produção de 581 mil toneladas em 2018 alcançando o pódio de fruta *in natura* mais exportada pelo país, tendo o melão Amarelo como a variedade mais cultivada no território nacional (IBGE, 2018; ABRAFRUTAS, 2019; SEBRAE, 2016).

Frutos de melão, além de possuírem um inegável potencial econômico, também apresentam uma ampla diversidade em características fenotípicas, justificando assim a separação da espécie em diversos grupos como por exemplo o grupo *cantalupensis* que possui como representantes melões climatéricos, de polpa alaranjada e casca rendilhada em alguns frutos; e o grupo *inodorus* que apresenta frutos não-climatéricos, de polpa branca e casca lisa (PARIS; TADMOR; SCHAFFER, 2017; PITRAT; HANELT; HAMMER, 2000).

Visto que a espécie *C. melo* apresenta frutos tanto climatéricos como não-climatéricos, isto a torna de extrema importância também para os estudos relacionados à maturação de frutos e a atributos de qualidade, possibilitando assim a comparação de comportamento entre os genótipos com diferentes tipos de maturação e diferentes características de qualidade que compõem a alta diversidade desta espécie (OBANDO-ULLOA et al., 2009a, 2009b; PECH; BOUZAYEN; LATCHÉ, 2008).

Várias diferenças metabólicas ocorrem nos diferentes grupos de melões atualmente conhecidos em relação ao seu comportamento na maturação, uma delas é a produção de compostos orgânicos voláteis que são responsáveis pelo aroma exalado pelos frutos. Os frutos de variedades climatéricas são considerados mais aromáticos, isso se deve ao fato de que alguns voláteis só são produzidos em rotas de biossíntese dependentes de etileno (FLORES et al., 2002).

A produção de aromas de um fruto é um atributo que juntamente com o sabor e a textura afetam diretamente na preferência dos consumidores e é um grande indicativo de um *flavor* agradável que é geralmente associado ao seu consumo (GALPAZ et al., 2018).

Alguns genes relacionados à biossíntese de compostos orgânicos voláteis (VOC), que conferem o aroma aos frutos, já foram identificados em diversas variedades de melões, dentre eles estão os genes codificadores das enzimas álcool acil transferase (*CmAAT*), álcool desidrogenase (*CmADH*), lipoxigenases (*CmLOX*) dentre outros (GALAZ et al., 2013; GONDA et al., 2016; JIN et al., 2016).

O avanço na área de identificação de voláteis por cromatografia gasosa é um grande aliado nas novas descobertas relacionadas a metabólitos capazes de influenciar no *flavor* em diversos frutos. Bem como na área de detecção de voláteis, a aplicação de técnicas moleculares de expressão gênica possibilita estudos aprofundados sobre os diversos genes que são responsáveis por codificar enzimas que atuam em diversos processos que ocorrem durante o desenvolvimento de um fruto. É nosso objetivo com este trabalho analisar o comportamento dos VOCs presentes em frutos de melão não-climatéricos (melão amarelo var. Eldorado) e climatéricos (melão gaúcho/caipira). Bem como trazer uma comparação entre diferentes genes atuantes da formação de VOC comparando nestes dois tipos de melão em diferentes estádios de maturação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A CULTURA DO MELÃO

O meloeiro (*Cucumis melo* L.) é uma importante espécie cultivada pertencente à família das cucurbitaceas juntamente com o pepino, melancia, abóbora e o jerimum. Possui uma expressiva produção mundial chegando à aproximadamente 40 milhões de toneladas em 2018, sendo a China seu principal produtor seguido da Turquia, Irã, Egito e Índia (FAO, 2018). O Brasil ocupa a décima sexta posição no ranking mundial e a primeira posição na América do Sul com uma produção de aproximadamente 581 mil toneladas no último censo agropecuário levantado no país (FAO, 2018; IBGE 2018).

É uma planta diploide com 12 pares de cromossomos ($2n=24$), possuindo uma origem controversa com hipóteses indicando que a espécie tenha procedência na Ásia e outras na África (BURGER et al., 2010; KIRKBRIDE, 1993; PARIS; TADMOR; SCHAFFER, 2017).

Os frutos de melão possuem vários benefícios nutricionais, especialmente aqueles que apresentam polpa alaranjada. São uma fonte natural de vitaminas A e C, e possuem uma expressiva quantidade de açúcar, fibras, cálcio, iodo e potássio (DE OLIVEIRA et al., 2017). O que torna seu consumo altamente valioso para uma dieta equilibrada e saudável.

Por haver uma ampla gama de características dentro da espécie *C. melo*, seus frutos são divididos em duas subespécies *melo* e *agrestis* e separados em vários grupos distintos com base em suas diferenças fenotípicas. Para a subespécie *melo* os grupos são *casabas*, *chate*, *flexuosus*, *tibish*, *adana*, *ameri*, *cantalupensis*, *chandalak*, *reticulatus*, *inodorus* e *dudaim*; para a subespécie *agrestis* os grupos são *acidulus*, *conomon*, *momordica*, *makuwa* e *chinensis* (PARIS; TADMOR; SCHAFFER, 2017; PITRAT, 2008). Os vários grupos formados exibem uma grande diversidade em seus caracteres, podendo variar em tamanho, forma, teor de açúcar, acidez, cor e aroma externo e interno (HAVKIN-FRENKEL; DUDAI, 2016).

Os grupos *Cantalupensis* e *Inodorus* são os principais cultivados nos países ocidentais, como os EUA e os países europeus, e são conhecidos por sua polpa doce e sua casca rendilhada em algumas frutas. Os outros grupos são distribuídos principalmente na Ásia (LIU; KAKIHARA; KATO, 2004). No Brasil os melões do grupo *Inodorus* são os mais expressivamente consumidos e cultivados, tendo a região nordeste liderando a produção nacional com cerca de 98% do total de frutas colhidas no país (DE OLIVEIRA et al., 2017).

Quando se trata da fisiologia da maturação, o meloeiro pode apresentar variedades climatéricas que incluem, por exemplo os grupos *cantalupensis* e *reticulatus* e não climatéricas como as pertencentes aos grupos *inodorus* e *dudaim* (PARIS; TADMOR; SCHAFFER, 2017; PITRAT; HANELT; HAMMER, 2000; SALADIÉ et al., 2015).

2.2 CLASSES DE MATURAÇÃO

Com base nos padrões respiratórios durante a maturação os frutos carnosos são divididos em duas classes: climatéricos e não-climatéricos. Frutos climatéricos apresentam um acentuado pico de respiração seguido de uma síntese autocatalítica de etileno no início do amadurecimento enquanto em frutos não climatéricos esse comportamento é ausente (BAPAT et al., 2010).

O metabolismo dos frutos exibe diferenças marcantes a depender da presença ou ausência desse pico de respiração seguido pela produção de etileno, essas diferenças são expressas na formação de açúcares, ácidos orgânicos, coloração e na formação de aroma. Frutos climatéricos são considerados mais aromáticos se comparados aos não-climatéricos visto que alguns compostos aromáticos só são produzidos em rotas bioquímicas dependentes de etileno (FLORES et al., 2002).

2.3 AROMA EM FRUTOS

O aroma em frutos é determinado pela combinação de centenas de compostos orgânicos voláteis que podem inferir tantos odores agradáveis como desagradáveis, criando assim uma combinação de diferentes *flavors* que são geralmente associados com o consumo de frutas (ANDERSEN; BROCKHOFF; HYLDIG, 2019; GONDA et al., 2016). O *flavor* é considerado como a interação entre o gosto e as percepções olfativas orto e retronasal, comumente denominadas gosto e aroma. Sendo assim um dos mais expressivos fatores de qualidade que unidos à textura é responsável pela disposição de um consumidor a comprar um determinado fruto (LAMIKANRA, 2002).

Os compostos orgânicos voláteis desempenham então um importante papel no *flavor* dos frutos e a correlação que existe entre os vários voláteis em um fruto e seus respectivos atributos sensoriais podem potencialmente contribuir para satisfazer as preferências dos consumidores e assim tornar um produto mais apreciado além de aumentar sua representatividade no contexto nutricional na alimentação ao redor do mundo (KLEE, 2010).

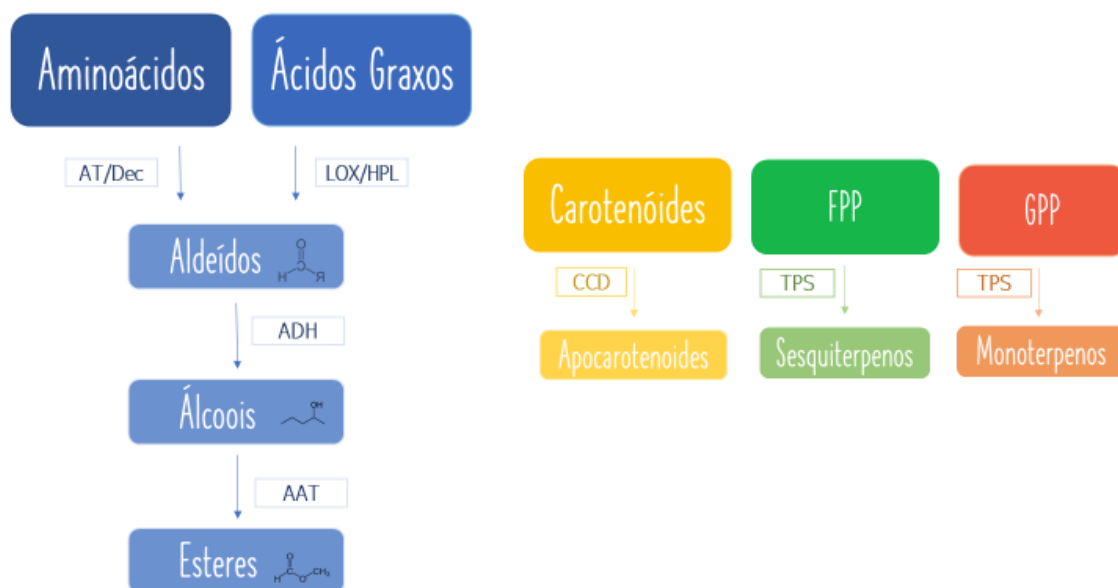
A ampla variedade de características encontradas na espécie *C. melo* também refletem no aroma produzido pelos frutos, estes são distribuídos em um conjunto de diferentes fragrâncias que são determinadas pelas proporções dos compostos voláteis chaves bem como a presença ou ausência de componentes únicos que são manifestos dentre os muitos grupos e variedades hoje conhecidas (TUCKER, 1993; TANG et al., 2015).

A identificação dos compostos orgânicos voláteis dentre os muitos grupos diferentes em *C. melo* não é uma tarefa simples. Mesmo que os frutos sejam classificados botanicamente em uma só espécie, as características distintas encontradas nesta ampla gama de genótipos são muitas. Em variedades climatéricas como os melões do grupo cantalupensis, por exemplo, os compostos voláteis de maior expressão são ésteres; já em variedades não-climatéricas como as pertencentes ao grupo Inodorus, os voláteis mais expressivos são álcoois e aldeídos (TANG et al., 2015, GONDA et al., 2016).

Mesmo que os compostos voláteis produzidos em ambos os grupos de maturação de frutos, climatéricos e não-climatéricos, sejam derivados das mesmas rotas bioquímicas que são principalmente as rotas de metabolismo de aminoácidos e a rota de metabolismo de ácidos graxos, cada grupo químico apresentado em maior expressão em cada grupo de frutos produzem um conjunto de aromas diferentes (KOURKOUTAS et al. 2006; GONDA *et al.*, 2010; GONDA *et al.*, 2016).

Além de ésteres, álcoois e aldeídos; outros grupos químicos também podem ser relacionados ao aroma dos frutos como é o caso dos apocarotenoides, sesquiterpenos e monoterpenos (GONDA *et al.*, 2016). As principais vias metabólicas que levam à formação destes compostos foram descritas como mostrado na figura 1.

Figura 1 - Esquema representado os precursores, as principais enzimas e os grupos químicos relacionados à formação de aromas em frutos de melão. Os precursores são mostrados nas caixas mais escuras no topo da figura. As enzimas envolvidas na formação de voláteis são mostradas ao lado das setas. GPP (difosfato de giranil), FPP (difosfato farnesil), TPS (terpeno sintase), CCD (Caroteno dioxigenase – Carotene cleavage dioxygenase) LOX (lipoxigenase), HPL (Hidroperoxido liase), ADH (álcool desidrogenase), ATT (álcool acil transferase), AT (aminotransferase ou transaminase), Dec (descarboxilase).



Fonte: Esquema adaptado de GONDA et al., (2016).

Nas últimas décadas houve um grande avanço em diversas áreas da ciência, uma tarefa que no passado era extremamente árdua como a detecção de compostos voláteis hoje é possível graças ao grande avanço nas técnicas de cromatografia gasosa e espectrometria de massas (GUO, 2014).

Uma outra área cujos avanços são extremamente valiosos na compreensão do estudo de moléculas em geral é a biologia molecular. Estudos nesta área permitiram um grande progresso em várias áreas do conhecimento (Voelckel *et al.*, 2017), dentre elas estão inseridos estudos voltados à elucidação da biossíntese de voláteis em frutos (GONDA *et al.*, 2010; TANG *et al.*, 2015; SPADAFORA *et al.*, 2019). Estes estudos mostram que com o uso de análises transcritômicas, ou seja dos produtos de transcrição gênica, é possível trazer à luz os genes relacionados à formação de alguma molécula que por sua vez possua um papel no que diz respeito ao metabolismo de compostos relacionados à maturação (SCHWAB; DAVIDOVICH-RIKANATI; LEWINSOHN, 2008).

Para melão, já existem centenas de compostos voláteis identificados e muitos deles já são caracterizados em nível de notas aromáticas (GONDA *et al.*, 2016). Assim como nos metabólitos, análises transcritômicas já realizadas em algumas variedades de melões, já elucidaram alguns genes relacionados à formação de compostos orgânicos voláteis (GONDA *et al.*, 2016; SCHWAB; DAVIDOVICH-RIKANATI; LEWINSOHN, 2008; TANG *et al.*, 2015). Nas sessões seguintes serão explorados o papel de algumas enzimas relacionados à formação de VOC e os metabólitos por elas formados.

2.3.1 Lipoxigenases (LOXs)

LOXs são enzimas amplamente distribuídas em plantas e são codificadas por uma família de múltiplos genes (TANG *et al.*, 2015). Elas são conhecidas por desempenharem papéis fundamentais no metabolismo de plantas, atuando em seu crescimento e desenvolvimento (PORTA; ROCHA-SOSA, 2002); na resposta a estresses bióticos e abióticos (GAO *et al.*, 2007; JU *et al.*, 2018) bem como no mecanismo de resistência a patógenos (HUANG; SCHWAB, 2011). Além de atuar de diversas formas no metabolismo de plantas em geral, LOXs são essenciais na síntese de vários compostos orgânicos

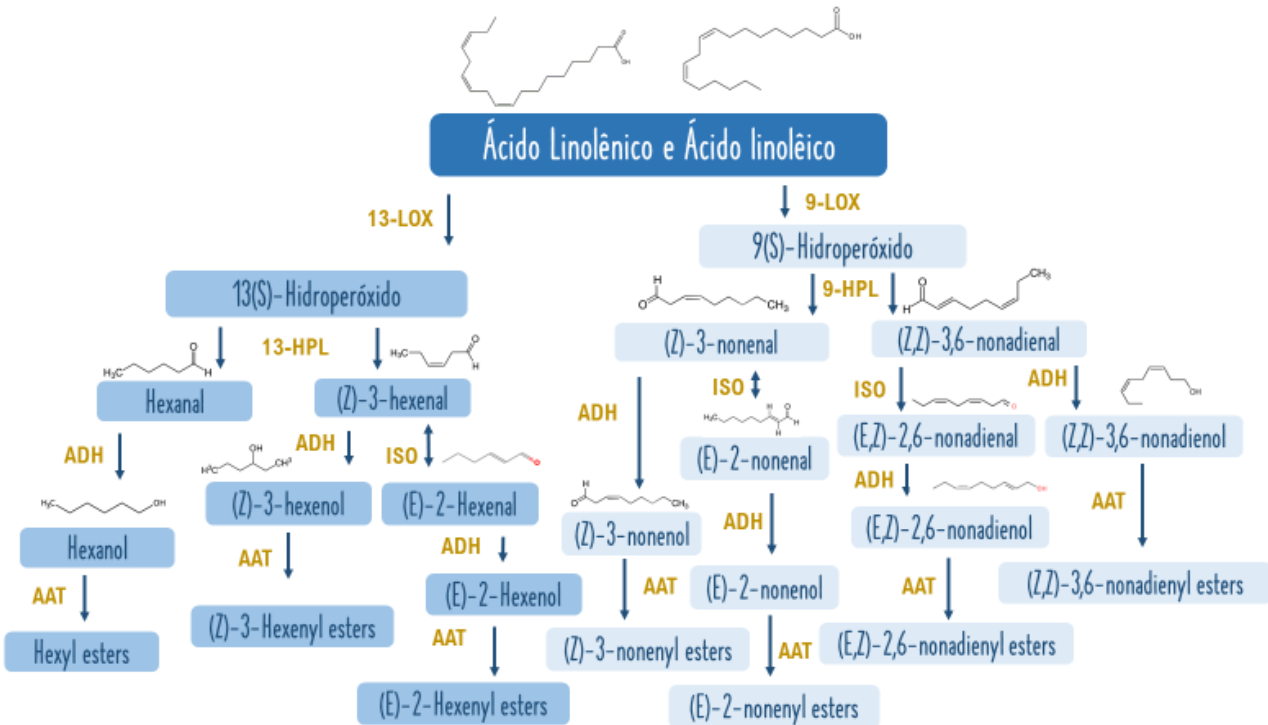
voláteis em grande número de plantas e frutos (ESPINO-DÍAZ et al., 2016; TANG et al., 2015; ZHANG et al., 2010).

Com base na posição específica de oxigenação, LOXs são divididas em três tipos: 9-LOX, quando a oxigenação ocorre no carbono 9 do substrato; 13-LOX, quando a oxigenação ocorre no carbono 13 do substrato; e 9/13-LOX quando a enzima possui a capacidade de oxigenar tanto o carbono 9 quanto o carbono 13 do substrato. A partir de qual carbono foi oxigenado, o hidroperóxido resultante desta reação é formado, podendo ser um 9-hidroperóxido ou um 13-hidroperóxido (FEUSSNER; WASTERACK, 2002).

A depender de seu tipo, LOXs são conhecidas por promoverem diferentes papéis de atuação nas plantas e frutos. 13-LOX, por exemplo, são amplamente conhecidas pela formação de voláteis que conferem as conhecidas *green notes* em tecidos vegetais (HUANG; STUDART-WITKOWSKI; SCHWAB, 2010), enquanto 9-LOX são mais relacionadas aos processos metabólicos anteriormente mencionados, embora haja relatos de que LOX deste tipo atuem na produção de compostos como (*3Z*)-*nonenal* e (*2E*)-*nonenol* que são produtos voláteis de alta expressividade em plantas (VINCENTI et al., 2019). Estas informações, no entanto, não agem de forma restritiva nas atividades destas enzimas sabendo que o papel destas moléculas em plantas ainda está longe de ser completamente descrito.

A principal função bioquímica das LOXs é fazer com que os ácidos graxos poliinsaturados, por exemplo o ácido linoleico e ácido linolênico, formem hidroperóxidos (LIAVONCHANKA; FEUSSNER, 2006). Estes hidroperóxidos são catalisados por hidroperóxido liases (HPL), dando origem a aldeídos, os quais são convertidos a álcoois a partir da atividade das álcool desidrogenases (ADHs) (TIJET et al., 2001). Os álcoois por sua vez compõem grande parte dos voláteis totais, principalmente em melões não-climatéricos e também atuam como substrato para a formação de ésteres (GONDA et al., 2010; PORTA; ROCHA-SOSA, 2002). O esquema de degradação do ácido linolênico e linoléico em compostos voláteis é apresentado na figura 2.

Figura 2 - Esquema de degradação dos ácido linolênico e α -linolênico em VOCs. Nas caixas mais escuras (à esquerda) estão os compostos derivados da formação de 13(S)-hidroperóxidos catalisada por 13-LOXs. Nas caixas mais claras (à direita) estão os compostos derivados da formação de 9(S)-hidroperóxidos, reação catalisada por 9-LOXs. Em amarelo, seguem as enzimas conhecidas por atuarem nesta via: 13-HPL (13-hydroperoxide lyase), 9-HPL (9-hydroperoxide lyase), ISO (isomerase), ADH (alcohol dehydrogenase) e AAT (alcohol acyl transferase).



Fonte: Esquema adaptado de Vincenti et al., (2019).

Em melão foram encontrados 18 genes que codificam lipoxigenases (*CmLOX01-18*). (ZHANG et al., 2013; TANG et al., 2015). No entanto, nem todos os 18 genes identificados possuem um papel relevante na produção de aromas em frutos. No estudo de Tang et al., (2015) são apresentados *CmLOX03*, *CmLOX05*, *CmLOX11*, *CmLOX12*, *CmLOX16* e *CmLOX18* como possíveis genes atuantes na produção de ésteres voláteis, que são o último grupo a ser formado na cadeia de produção de VOCs. Destes genes apresentados, o *CmLOX18*, que é uma 13-LOX, foi sugerido recentemente como o responsável pela formação de voláteis de 6 carbonos como (*Z*)-3-hexanal e (*Z*)-3-hexenol que por sua vez estão presentes de forma expressiva na composição total de voláteis produzidos por frutos de melão (ZHANG et al., 2017).

9-LOXs como anteriormente citado, possuem a capacidade reportada de produção de compostos voláteis importantes no aroma total de plantas e frutos. Notamos em um

estudo de sequenciamento de transcritos feito por (SCHEMBERGER et al., 2020) que os valores de expressão do gene que codifica *CmLOX9*, uma 9-LOX, seguem uma tendência de decréscimo entre frutos verdes e frutos maduros que esta mesma tendência também é apresentada para alguns voláteis relacionados à atividade de 9-LOXs. A relação entre esta enzima e estes voláteis ainda não foi descrita.

2.3.2 Branched-Chain Amino Transferases (BCATs)

Voláteis derivados da degradação de aminoácidos estão presentes tanto em variedades climatéricas como em não-climatéricas de melões. Nas variedades climatéricas os compostos presentes são, em sua maioria, esterificados e sua quantidade total são geralmente maiores se comparado às variedades não-climatéricas que apresentam aldeídos e álcoois como compostos mais expressivos (GONDA et al., 2016).

Várias etapas do processo bioquímico de formação de voláteis derivados de aminoácidos foram retratados inicialmente em leveduras de queijo e em algumas estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* (DICKINSON; SALGADO; HEWLINS, 2003; YVON; RIJNEN, 2001). Foi descrito então que o processo de formação dos voláteis nestes organismos envolve inicialmente uma transaminação seguida de uma descarboxilação. Tanto em *S. cerevisiae* como nas leveduras a descarboxilação pode ocorrer tanto por uma cetoácido descarboxilase liberando aldeídos como por um complexo α -cetoácido desidrogenase liberando um ácido carboxílico (DICKINSON; SALGADO; HEWLINS, 2003; LIU; KAKIHARA; KATO, 2004).

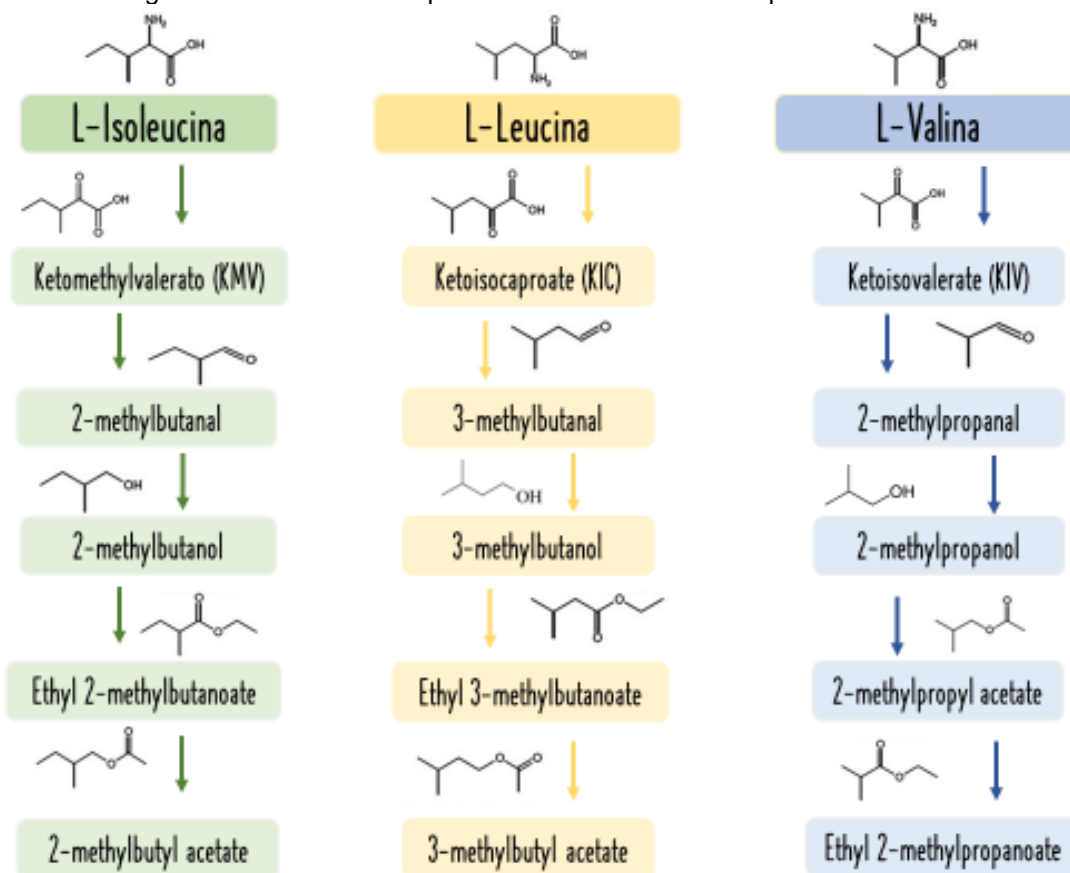
GONDA et al., (2010) constataram que as etapas iniciais da formação destes compostos em frutos de melão, seguem a mesma rota bioquímica que ocorre nos organismos anteriormente mencionados. A maior parte dos VOCs derivados de aminoácidos são produtos catabólicos de cinco aminoácidos essenciais. Dois aromáticos que são a L- fenilalanina e a L-metionina, e três de cadeia ramificada que são L-valina, L-leucina e L-isoleucina. No caso dos aminoácidos de cadeia ramificada a transaminação ocorre por mediação das BCATs enquanto os aminoácidos aromáticos têm seu processo

de transaminação mediado por *aromatic aminotransferases* (ArATs) (GONDA et al., 2016).

Após o processo de transaminação e descarboxilação a rota de degradação de aminoácidos segue para os dois últimos passos na formação voláteis em melões que envolvem a atividade das enzimas álcool desidrogenases que convertem os aldeídos formados na etapa anterior em um álcool e das enzimas álcool acil transferases que transformam os álcoois resultantes das etapas anteriores em ésteres (CHEN et al., 2016; GONDA et al., 2016).

Os VOCs derivados dos aminoácidos de cadeia ramificada L-valina, L-leucina e L-isoleucina são apresentados na figura 3.

Figura 3 - Da esquerda para a direita, os aminoácidos de cadeia ramificada L-isoleucina, L-leucina e L-valina seguindo à direita seus respectivos cetoácidos e os compostos aromáticos deles derivados.



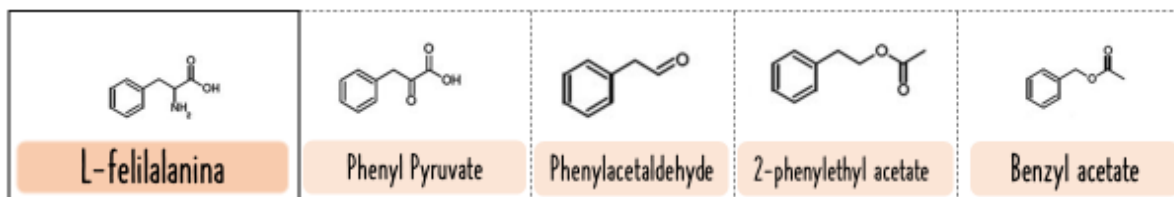
Fonte: Adaptado de GONDA et al., (2010).

Entender o padrão de expressão dos genes que codificam as enzimas envolvidas na rota de degradação de aminoácidos é de extrema importância para trazer à luz o processo de formação de VOCs extremamente expressivos em frutos de melão. GONDA et al., (2010) analisaram expressão do gene *CmBCAT1* em frutos maduros das cultivares climáticas Védrañtais e Noy Yizre'el; e das cultivares não-climáticas Tam Dew, Rochet e Piel De Sapo. Na cultivar Dulce, que é climática, além da análise de expressão em frutos maduros, também foram analisados os padrões de expressão de frutos com 12D.A.P e com 25D.A.P. Foi verificado no estudo anteriormente mencionado que a expressão do *CmBCAT1* possui um papel fundamental na formação de voláteis em praticamente todas as cultivares testadas.

2.3.3 Aromatic Amino Transferases (ArATs)

Assim como as BCATs, as ArATs atuam transferindo um grupo amina e formando um cetoácido. Enquanto as BCATs atuam em aminoácidos de cadeia ramificada, as ArATs atuam em aminoácidos aromáticos. No contexto da formação de compostos voláteis, elas atuam especialmente na transferência do grupo amina da L-fenilalanina ao *phenyl pyruvate* dando sequência à formação de *phenylacetaldehyde*, *2-phenylethyl acetate* e ao *benzyl acetate*, que são compostos voláteis expressivos em frutos de melão (GONDA et al., 2010; JORDÁN; SHAW; GOODNER, 2001; PANG et al., 2012). Os compostos advindos da degradação da fenilalanina são apresentados na figura 4.

Figura 4 - À esquerda o aminoácido aromático L-fenilalanina seguindo à direita seu respectivo cetoácido e os compostos aromáticos dele derivados.



Fonte: Adaptado de GONDA et al., (2010).

Gonda et al., (2010) identificaram que em frutos de melão climáticos e não climáticos há a expressão do gene *CmArAT1* e que este gene está intrinsecamente

relacionado à formação de voláteis nestes frutos, embora a expressão seja significativamente maior em melões climatéricos.

2.3.4 Piruvato Descarboxilases (PDCs)

PDCs são enzimas que catalisam a descarboxilação de um piruvato formando um acetaldeído e CO₂. São conhecidas por sua atuação em leveduras e bactérias no contexto de fermentação etanólica (OHTA et al., 1991) e extensivamente estudadas em plantas no contexto de estresse por hipoxia (TADEGE; DUPUIS; KUHLEMEIER, 1999).

Em condições normais no nível de oxigênio a atuação de enzimas relacionadas à produção de etanol é considerada baixa em tecidos vegetais (BUCHER et al., 1995). Contudo, uma exceção foi notada em tecidos de frutos de tomates, peras e uvas no início da maturação mesmo em condições normais nos níveis de oxigênio (CHERVIN; TRUETT; SPEIRS, 1999; LONGHURST et al., 1994; SARNO-MANCHADO; VERRIÈS; TESNIÈRE, 1997).

Por atuar em tecidos de frutos durante a maturação produzindo compostos voláteis, as PDCs foram hipotetizadas como participantes na formação de compostos orgânicos voláteis que podem contribuir para atributos de qualidade em frutos maduros (SCHAFFER et al., 2007; SUGIMOTO; JONES; BEAUDRY, 2011).

Wang et al., (2019) comprovaram que uma PDC denominada PDC1 está diretamente envolvida na formação de voláteis como *propanal* e *pentanal* em melões do grupo *Reticulatus*, que é um grupo de melões climatéricos. Os compostos advindos da atuação desta enzima além de contribuírem no aroma de frutos de melão, também servem de substrato para a formação de *propyl acetate* e *pentyl acetate*, seus respectivos ésteres que contribuem significativamente para o aroma específico do melão.

No trabalho anteriormente citado, o gene responsável pela codificação de PDC1, o *CmPDC1*, também foi descrito e sua expressão monitorada ao longo da maturação dos melões do grupo *Reticulatus* usados no trabalho. Contudo, não há relatos do monitoramento de expressão deste gene em nenhuma cultivar de melão não-climatérico ou em melões Gaúcho.

2.3.5 Alcool Desidrogenases (ADHs)

A formação dos aldeídos vindos das rotas de degradação de aminoácidos e ácidos graxos ocorrem por vias bioquímicas diferentes. No entanto, a formação de um álcool respectivo a cada aldeído formado nas vias anteriormente mencionadas, bem como a esterificação destes álcoois são processos mediados pelas mesmas enzimas que são as ADHs e as AATs respectivamente (GONDA et al., 2016; SHALIT et al., 2001).

As ADHs representam uma das classes de enzimas mais abundante entre os seres vivos. Elas participam ativamente na biossíntese de aromas voláteis em frutos convertendo aldeídos em álcoois e promovendo assim substratos para a formação de ésteres . A atividade das ADHs em melões está fortemente relacionada ao seu padrão de amadurecimento, sendo mais expressivas em frutos climatéricos (MANRÍQUEZ et al., 2006)

As ADHs são classificadas em duas super famílias, uma é chamada de ADHs de cadeia média (*medium-chain*) que são enzimas conhecidas por sua atividade na fermentação anaeróbica (STROMMER, 2011) bem como na redução de vários hidroxí cinnamaldeídos; a outra classe é denominada ADHs de cadeia curta (*Short-chain*) cujas enzimas estão envolvidas em uma grande variedade de metabolismos tanto primários como secundários (TONFACK et al., 2011). As ADHs de cadeia média também já foram associadas com a produção de diversos voláteis em tomates (LONGHURST et al., 1994), mangas (SINGH et al., 2010), melões (MANRÍQUEZ et al., 2006) dentre outros.

Em melões climatéricos do grupo makuwa foram identificados 13 genes relacionados à codificação de ADHs, *CmADH1-12* e um *CmFDH1* (JIN et al., 2016). No quesito produção de aromas e atuação em diferentes substratos a ADH1 se mostra uma das mais significativas em frutos de melão. O gene responsável por codificar essa enzima, *CmADH1*, foi testado em melões climatéricos (*Cucumis melo* grupo *Cantalupensis*, cultivar Védraçais) e em melões transgênicos onde a cascata de etileno durante a maturação foi inibida comprovando que a expressão desse gene é maior em frutos onde há um aumento na concentração de etileno durante o amadurecimento (MANRÍQUEZ et al., 2006).

Não há relatos de que este gene tenha sido monitorado em frutos de melão Amarelo ou em frutos de melão Gaúcho, por serem dois tipos de melão altamente expressivos em produção no Brasil, especialmente o Amarelo.

2.3.6 Alcool Acil Transferases (AATs)

Em alguns grupos de melões, ésteres são os compostos voláteis mais expressivos produzidos pelos frutos e são provavelmente eles que conferem o *flavor* único nestes melões quando maduros (GALAZ *et al.*, 2013; ALLWOOD *et al.*, 2014).

A formação de ésteres é considerada uma etapa fortemente ligada ao pico de etileno dos frutos, característica esta que faz com que frutos climatéricos apresentem uma expressão maior destes compostos se comparado a frutos não climatéricos (DEFILIPPI; KADER; DANDEKAR, 2005). Em melões climatéricos expostos a 1-metilciclopropano, famoso inibidor da cascata de etileno, observou-se um grande declínio na produção de ésteres voláteis quando comparados aos frutos controle (BAUCHOT *et al.*, 1998).

O processo de esterificação é catalisado pela enzima álcool acil transferase (AAT) que é responsável por transferir uma molécula de acil-CoA a um álcool (HARADA *et al.*, 1985). Esta classe de enzimas é capaz de ligar diferentes moléculas de álcool e acil-CoAs compondo assim uma vasta gama de ésteres nos frutos (GALAZ *et al.*, 2013).

Dentre as várias AATs produzidas em frutos de melão, a chamada AAT1 é considerada a mais ativa produzindo diversos acil ésteres tanto de cadeias longas quanto de cadeias curtas tendo grande preferência pela formação de *E-2-hexenyl acetate* and *hexyl hexanoate* (GALAZ *et al.*, 2013).

As AATs são codificadas por uma família de genes de pelo menos quatro membros (*CmAAT1-4*) que já foram descritas em melões climatéricos (GALAZ *et al.*, 2013), no entanto, em variedades do grupo inodorus, seu papel ainda não foi precisamente descrito ou seu padrão de expressão monitorado.

3 OBJETIVO

1.1 Avaliar o perfil de compostos voláteis ao longo da maturação de melões não climatéricos, variedade Eldorado e de melões climatéricos, variedade Gaúcho. Considerando frutos aos 15, 25, 35 e 45 D.A.P (Dias Após a Polinização).

1.2 Analisar o padrão de expressão de genes relacionados à formação de aroma em frutos de 35 D.A.P e em 45 D.A.P nas cultivares de melão Eldorado e Gaúcho trazendo uma correlação entre estes genes e os voláteis relacionados à sua atuação.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

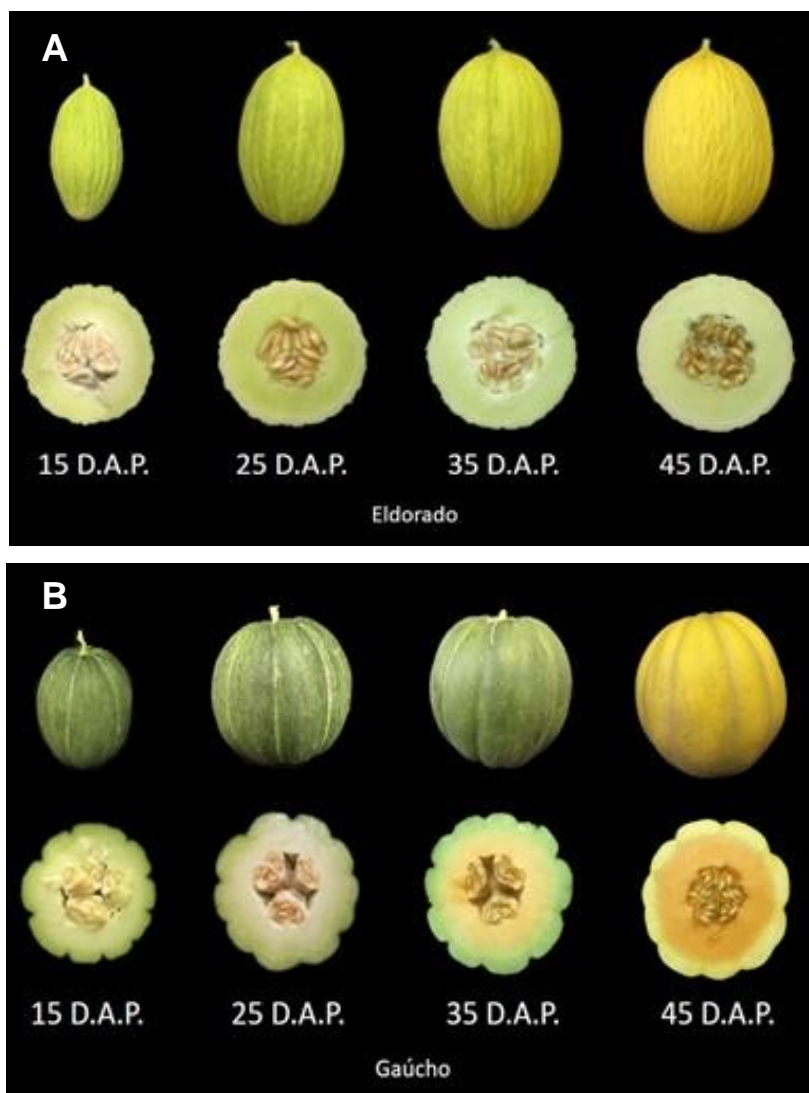
4.1 MATERIAL VEGETAL

Para as análises moleculares foram utilizados melões do tipo climatérico da cultivar Gaúcho e não-climatérico da cultivar Eldorado ('Amarelo'). Os frutos foram cultivados em casa de vegetação na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) no período de novembro de 2018 a fevereiro de 2019. Trinta plantas de cada cultivar foram semeadas e conduzidas verticalmente. Os ramos secundários foram podados até o sexto/sétimo nó, permitiu-se então o crescimento de pelo menos dois ramos laterais, e novamente foi realizada a desbrota até os 12^o - 15^o nós.

As flores nestes ramos foram polinizadas manualmente, de forma cruzada e devidamente etiquetadas com a data exata da polinização. Foi permitido o desenvolvimento de dois frutos por planta. Os frutos foram então colhidos em dois estádios de maturação de acordo com o dia após a polinização (D.A.P). Os frutos 35 D.A.P. foram caracterizados por serem completamente expandidos e em estágio de mudança de coloração, enquanto os frutos 45 D.A.P. estão em maturação plena. Os estádios usados neste trabalho são apresentados na figura 5.

Para as análises dos compostos voláteis foram utilizados frutos cultivados em casa de vegetação no Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC), em Kentville, Nova Scotia, Canadá. As variedades utilizadas foram as mesmas usadas para as análises moleculares. Os frutos também foram colhidos nos mesmos estádios considerando D.A.P.

Figura 5 - (A) Frutos de melão cultivares Eldorado e (B) frutos de melão Gaúcho em diferentes estádios de maturação considerando os dias após a polinização (D.A.P.).



Após colhidos os frutos, o mesocarpo foi imediatamente cortado em pequenos pedaços, congelado em nitrogênio líquido e acondicionado à -80°C .

4.2 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL

O RNA total foi extraído do mesocarpo de três frutos para cada estágio de maturação (triplicata biológica). O método utilizado para a extração foi o do perclorato de sódio, descrito para melão por Campos *et al.*, (2017).

A integridade do RNA extraído foi verificada mensurando as razões de absorvância A260/A280 e A260/A230 as quais caracterizam a pureza da amostra, o equipamento utilizado foi o Nanovue™. As amostras consideradas puras foram as que apresentaram ambas as razões de absorvância próximas aos valores de 2,0. Além disso, as amostras foram analisadas em eletroforese em gel de agarose a 1%, com tampão TAE (Tris-Acetato EDTA), cujas qualidades consideradas ideais foram as que apresentaram nitidez nas bandas 18S e 28S, sem sinais de degradação.

4.3 TRATAMENTO COM DNase E SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR (cDNA)

Depois de extraído o RNA total, as amostras foram tratadas com o kit TURBO™ DNase (Invitrogen) com o objetivo de remover resíduos de DNA genômico provenientes da extração. Logo após, as amostras foram convertidas em cDNA utilizando o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) com 2 µg de RNA Total como *template*.

O cDNA foi então utilizado para reação da polimerase em cadeia (PCR) utilizando o primer do gene cytosolic ribosomal protein S15 (*CmRPS15*) para verificação da integridade da amostra após a conversão.

4.4 ANÁLISE DE EXPRESSÃO RELATIVA RT-qPCR

Para a análise de expressão relativa foram desenhados primers referentes a cada um dos genes de interesse. Além disso, foram sintetizados primers para os genes referência *CmRPS15* (Cytosolic ribosomalproteinS15) e *CmRPL* (Ribosomal protein) descritos por Kong *et al.*, (2016). Todos os primers foram submetidos a testes de

temperatura através de reações de PCR convencional (Taq DNA Polymerase Recombinant, Invitrogen[®]) para identificação da melhor condição para amplificação dos fragmentos. A condição ideal de temperatura de *annealing* de cada primer foi identificada através da intensidade dos fragmentos após submetidos a eletroforese em gel de agarose 2,0% e tampão TBE (Tris-Borato EDTA) 1X. Os oligonucleotídeos utilizados neste estudo estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Primers utilizados nas análises de RT - qPCR

Nome	ID MELONOMICS	Sequencia dos oligonucleotídeos (5'-3')	Tamanho do fragmento amplificado (bp)
<i>CmRPS15</i> F	MELO3C006471	GAAGCTGCGTAAAGCGAAAC	132
<i>CmRPS15</i> R		GGTCTTTCCATTGTAAACTCCAA	
<i>CmRPL</i> F	MELO3C023039	CGACAATACTGGAGCCAAGAA	100
<i>CmRPL</i> R		CATCACCATATCTCCCACACAA	
<i>CmADH1</i> F	MELO3C023685	GGGGTGTTGCTGTTCTTGTG	129
<i>CmADH1</i> R		GAATGTCCGGTTCGGGGTTTG	
<i>CmAAT1</i> F	MELO3C024771	CCACAGGGGCCAGAATTACA	104
<i>CmAAT1</i> R		TGGAGGAGGCAAGCATAGACTT	
<i>CmBCAT1</i> F	MELO3C010776	ATGATGAGAGCTGTGATTTTGAC	126
<i>CmBCAT1</i> R		TCCCATAACGGCTCATTG	
<i>CmArAT1</i> F	MELO3C025613	AATGCTTGCTCGTCCTGGTG	121
<i>CmArAT1</i> R		GCCTTGCTGAGGGAGTAGAT	
<i>CmPDC1</i> F	MELO3C009145	CAGTGAAGCAGCAGCACA	130
<i>CmPDC1</i> R		GCCAAGGCATAGCCACAAG	
<i>CmLOX9</i> F	MELO3C014482	CAGATCCATCTTGTGAAC	230
<i>CmLOX9</i> R		AGTTGGTAGAGTCATTCC	
<i>CmLOX18</i> F	MELO3C024348	TGGAGACTATCACAATCG	195
<i>CmLOX18</i> R		CTTCCCATCACCTCTAA	

As reações de RT-qPCR foram feitas utilizando o reagente Brilliant III Ultra-Fast SYBR QPCR MM (Agilent). A reação seguiu os parâmetros de reagentes apresentados na tabela 2.

Table 2 - Reagentes utilizados na reação de qPCR, e suas respectivas concentrações.

Reagente	Concentração	Volume (μL)
Água	-	6,0
SYBR Mix	2 X	10,0
<i>Primer Foward</i>	10 mM	1,0
<i>Primer Reverse</i>	10 mM	1,0
Amostra	30 ng. μL^{-1}	2,0
Total		20,0

O termociclador utilizado neste estudo foi o AriaMx Real-Time PCR System (Agilent) com as condições de amplificação dos fragmentos de interesse de acordo com a tabela 3.

Tabela 3 - Configurações do termociclador para a amplificação dos fragmentos referentes aos genes estudados.

Gene	Temp. inicial (10 minutos)	Desnaturação (15 segundos)	40 Ciclos	
			Anelamento (20 segundos)	Extensão (20 segundos)
<i>CmRPS15</i>	95°C	95°C	61,8°C	72°C
<i>CmRPL</i>	95°C	95°C	63,1°C	72°C
<i>CmADH1</i>	95°C	95°C	60,4°C	72°C
<i>CmAAT1</i>	95°C	95°C	61,8°C	72°C
<i>CmBCAT1</i>	95°C	95°C	61,8°C	72°C
<i>CmArAT1</i>	95°C	95°C	60,4°C	72°C
<i>CmPDC1</i>	95°C	95°C	60,2°C	72°C
<i>CmLOX9</i>	95°C	95°C	56,9°C	72°C
<i>CmLOX18</i>	95°C	95°C	56,9°C	72°C

Após os 40 ciclos seguiu-se a curva de melting que foi padronizada para todas as amostras com uma configuração de 95°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos, 95°C por 30 segundos e um aumento gradativo de 0,5°C a cada 5 segundos

Os resultados dos diferentes estádios de maturação foram convertidos em expressão relativa confrontando com a expressão no estádio 35 D.A.P (calibrador) e normalizando com os genes de referência. A Equação utilizada para o cálculo de expressão relativa será feita pelo método de Livak $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde $\Delta Ct = Ct$ (gene alvo) – Ct (gene *housekeeping*) e $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (gene alvo) – ΔCt (amostra calibradora).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA EXPRESSÃO DOS GENES

Os valores de expressão obtidos pela equação de Livak e Schmittgen (2001) para os genes testados foram submetidos à uma ANOVA, comparando os dois estádios das duas cultivares. Os valores considerados significativos foram os de $p < 0,05$.

4.6 ANÁLISE DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS (SPME-GC-MS TOF)

Para a análise dos voláteis foram usados frutos em quatro estádios de maturação. Aos 15, 25, 35 e 45 D.A.P (figura 5), frutos aos 15 D.A.P são verdes pequenos; aos 25 D.A.P são verdes grandes, aos 35 D.A.P são frutos completamente expandidos e aos 45 D.A.P são frutos em maturação completa. As amostras para esta análise foram coletadas de quatro frutos diferentes em cada estádio de melões Eldorado e de melões Gaúcho.

Para cada fase de desenvolvimento do fruto, 20g de amostra anteriormente armazenada a -80°C foi triturada juntamente com uma solução salina de NaCl por um minuto na velocidade 4 utilizando o triturador Kinematica, modelo MB 800 (Kinematica AG, Luzern, Switzerland). Dez gramas da amostra homogeneizada foi alocado em um *headspace vial* juntamente com 5 μL de uma solução padrão interno (9,8 mg L⁻¹ de Etyl acetate-d8; 10,0 mg L⁻¹ benzaldehyde-d6; 10,2 mg L⁻¹ 2-fenyl-d5-ethanol; 8,2 mg L⁻¹ 2-hexanone-d5). As amostras foram homogeneizadas à solução padrão usando um misturador (MultiPurpose Sampler - Gerstel, Linthicum, MD, USA).

Os compostos voláteis foram extraídos por microextração em fase sólida (SPME) e analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Os *vials* foram incubados a 50°C por 300s e então uma fibra SPME de

divinilbenzene/Carboxen/polidimethylsiloxano (Supelco Analytical, Bellefonte, PA, USA) foi exposta ao *headspace* dos tubos por 900s com a amostra em agitação (agitando por 60 segundos e estática por 1 segundo).

A fibra foi dessorvida a 250 °C por 15 minutos. O injetor foi operado em uma temperatura de 250°C em *split mode* de 1:20 por 1 min. Gás Helio foi utilizado como gás de arraste em uma taxa de fluxo de 1,4mL/min. No Sistema MPS foi instalado uma *unit-mass resolution* Pegasus 4D TOFMS (LECO, St Joseph, MI, USA).

As análises foram feitas em um sistema GC-MS consistindo de um cromatógrafo (Agilent 7890 GC gas chromatograph) acoplado a um forno e um modulador térmico *quad-jet dual stage*. Foi utilizado nitrogênio líquido para o resfriamento das linhas de jato. Para a primeira dimensão (1D) foi utilizada a coluna Stabilwax® (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), a segunda dimensão (2D) foi utilizada a Rxi®-5Sil MS (0,30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). O programa de forno foi de temperatura inicial de 50°C, com rampa de aquecimento de 10,3°C/min até 220°C. O período de modulação (PM) foi de 1,1s com um pulso aquecido de 0,33 s em cada jato.

A linha de transferência foi mantida a 250°C. O TOF-MS foi operado em modo de ionização por elétrons (EI) a 70 eV, com a aquisição de um alcance de massa de 35–300 uma, uma faixa de aquisição de 200 Hz, e um detector de voltagem de 1500V com a voltagem otimizada de 200V. A fonte de ions foi aquecida até 250 °C. A calibração e ajuste diário da massa foram feitos utilizando perfluorotributilamina (PFTBA). Um atraso de 100s foi aplicado.

A identificação dos picos dos compostos químicos foi determinada com base na taxa de retenção e sua correspondência ao espectro de massa disponível na biblioteca do Instituto internacional de padrões e tecnologia (NIST- *National Institute of Standards and Technology*) e algumas identificações foram confirmadas com padrões conhecidos sempre que houve possibilidade.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA EXPRESSÃO DOS VOCs

Na comparação do padrão dos voláteis relacionados aos genes estudados foi usada uma correlação de Pearson com os resultados da qPCR obtidos pelo cálculo de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak e Schmittgen, 2001) e os resultados obtidos pela SPME-GC-MS TOF em frutos de 35 e 45 D.A.P. Os valores considerados significativos foram aqueles que apresentaram o valor de $R \geq 0,8$ e $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 PERFIL DE VOLÁTEIS EM MELÕES ELDORADO E GAÚCHO

Os voláteis analisados neste trabalho foram identificados pela técnica de SPME-GC-MS TOF e seus valores são apresentados em uma abundância relativa que leva em consideração a área detectada destes compostos, os quais são normalizados com a área de voláteis de referência.

Foram detectados 110 metabolitos para melão Eldorado considerando os quatro estádios de desenvolvimento. Destes, o grupo químico mais expressivo foi o dos aldeídos composto por 23 elementos; seguido por 13 hidrocarbonetos; 12 cetonas; 10 álcoois; 3 furanos; 16 ésteres, 6 de cadeia ramificada e 10 de cadeia linear; 5 compostos sulfurados; 1 composto nitrogenado; 2 compostos oxigenados; 3 furanos e 25 compostos desconhecidos. O número de compostos por grupo químico detalhados nos diferentes estádios de maturação em melões Eldorado é apresentado na tabela 4. Os compostos mais representativos em abundancia foram os aldeídos *hexanal*, *pentanal* e *heptanal*.

A abundância total de voláteis apresentou uma característica de decréscimo ao longo da maturação. A quantidade total detectada em frutos maduros foi duas vezes menor quando comparados a frutos aos 35 D.A.P e 2,3 vezes menos quando comparados a melões aos 15 D.A.P.

Em melões Gaúcho foram identificados 153 compostos voláteis nos quatro estádios de desenvolvimento estudados; 24 aldeídos; 16 álcoois; 37 ésteres, estes 16 de cadeia ramificada e 21 de cadeia linear; 12 cetonas; 4 compostos nitrogenados, incluindo um álcool; 15 hidrocarbonetos; 1 ácido carboxílico; 3 furanos; 1 isoprenoide; 8 compostos sulfurados incluído 4 ésteres sulfurados; e 28 compostos desconhecidos. O número de compostos por grupo químico detalhados nos diferentes estádios de matuação são apresentados na tabela 5.

A abundância dos compostos identificada em melões gaúcho diferiram em relação aos diferentes estádios de maturação. No estádio de 15 D.A.P os compostos mais abundantes foram *hexanal*, *Isobutyl acetate* e *pentanal*. Aos 25 D.A.P *hexanal*, *pentanal*

e *heptanal* foram os de maior abundância correspondendo a 16,8, 8,7 e 5,1 por cento do total de voláteis em abundância. Aos 35 D.A.P os voláteis mais expressivos são o *2-methylbutyl acetate*, *butyl acetate* e o *Isobutyl acetate*. A abundância total de voláteis teve um crescimento acentuado em melões completamente maduros, a qual foi 8 vezes maior no estágio 45 D.A.P, quando comparado com melões aos 35 D.A.P e 19 vezes maior do que em melões verdes na fase de desenvolvimento de 15 D.A.P.

Tabela 4 - Quantidades de VOCs (por grupos químicos) encontrados em melões Eldorado utilizando a técnica de GC-MS TOF. *Compostos que se apresentaram em classes menos conhecidas.

Grupos Químicos	Eldorado			
	15 D.A.P	25 D.A.P	35 D.A.P	45 D.A.P
Aldeído	22	22	22	22
Alcool	9	9	9	6
Ester - Cadeia linear	2	2	3	7
Ester - Cadeia ramificada	2	1	2	6
Cetona	11	11	11	12
Hidrocarboneto	12	12	12	11
Compostos desconhecidos	9	15	8	15
Composto sulfuroso	3	3	3	5
Furan	3	3	3	3
Compostos oxigenados	2	1	1	2
Composto nitrogenado	-	-	1	
Total	75	79	75	89

Tabela 5 - Quantidades de VOCs (por grupos químicos) encontrados em melões Gaúcho utilizando a técnica de GC-MS TOF.

Grupos Químicos	Gaúcho			
	15 D.A.P	25 D.A.P	35 D.A.P	45 D.A.P
Aldeído	22	22	23	21
Alcool	14	12	15	14
Ester - Cadeia linear	14	5	19	21
Ester - Cadeia ramificada	12	2	16	16
Cetona	11	11	12	11
Hidrocarboneto	13	11	11	10
Composto desconhecido	12	9	11	13
Composto sulfurado	5	3	8	8
Furano	3	3	3	1
Composto oxigenado	2	2	2	3
Composto nitrogenado	1	-	2	4
Terpenoides	1	1	1	1
Isoprenoides	1	1	1	1
Ácido	-	1		1
Total	111	83	124	125

As áreas relativas de cada volátil detectados nos quatro diferentes estádios de desenvolvimento dos dois melões aqui estudados estão descritas no apêndice A.

5.3 GENES RELACIONADOS À BIOSSÍNTESE DE VOCs

Vários genes são conhecidos por atuarem na biossíntese de VOCs em diversos frutos. Nas próximas sessões serão explorados o padrão de expressão destes genes em melões Gaúcho e Eldorado bem como as interações entre estes e os metabólitos a eles relacionados.

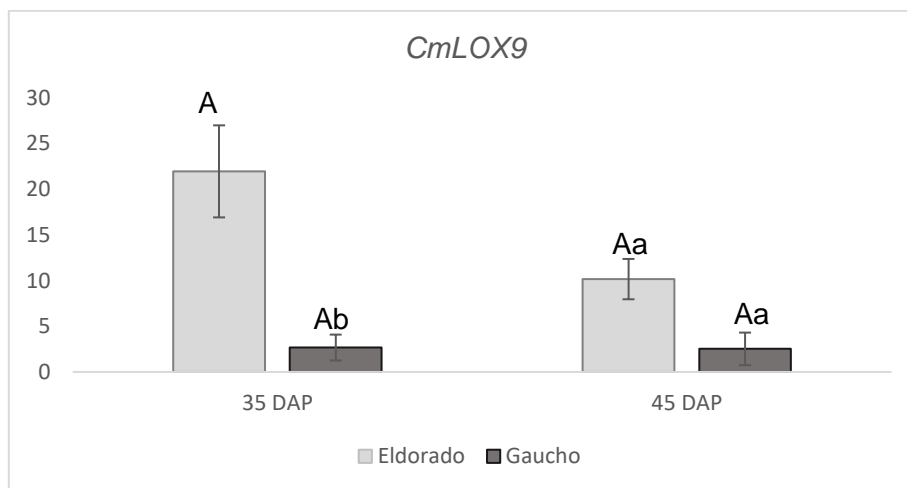
5.3.1 *CmLOX9*

CmLOX9 apresentou um padrão de decréscimo de expressão para melões eldorado na evolução da maturação, embora diferenças estatísticas não tenham sido

detectadas nos diferentes estádios desta variedade o valor de expressão de frutos aos 35 D.A.P foi 2,2 vezes maior do que em frutos aos 45 D.A.P.

Para melões Gaúcho o gene apresentou uma constância de expressão nos dois períodos de maturação possuindo uma variação mínima de um estágio a outro. Os frutos de melão gaúcho, no entanto, apresentaram em ambos os estádios uma menor expressão quando comparados a frutos de Eldorado, esta diferença se fez significativa aos 35 D.A.P onde a expressão em Eldorado foi 8,2 vezes maior do que em frutos de melão Gaúcho apresentando superioridade nos dados estatísticos entre ambas as variedades neste estágio. Aos 45 D.A.P, mesmo que a expressão em melões Eldorado tenha sido 4 vezes maior do que em melões Gaúcho, não houve diferença estatística relevante entre as duas variedades neste estágio.

Figura 6 - Perfil de expressão relativa de CmLOX9 em melões Eldorado e Gaúcho em diferentes estádios de maturação. Os dados apresentados foram obtidos através dos resultados da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de Livak e Schmittgen (2001). Os valores são a média \pm erro padrão da média. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre estádios do mesmo grupo e letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os diferentes grupos no mesmo estágio de maturação ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

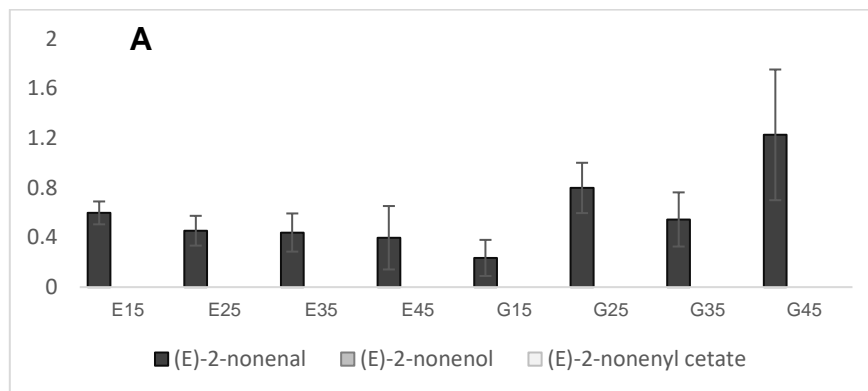


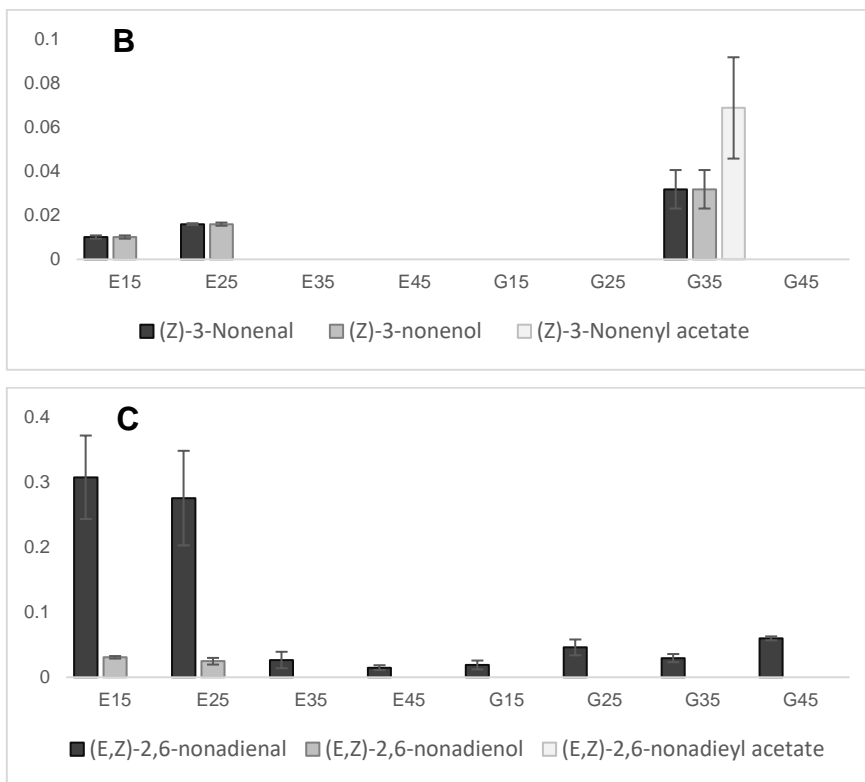
Como mostrado na figura 7A, o aldeído (*E*)-2-nonenal foi o único metabólito relacionado a esta via específica que foi detectado nos melões aqui estudados. Ele foi detectado em todos os estádios em ambos Eldorado e Gaúcho. Em melões Eldorado, este metabólito demonstrou um comportamento relativamente estável ao longo da

maturação. Em melões Gaúcho, o padrão foi de ascensão conforme a maturação evoluiu. Não houve uma correlação significativa deste VOC com o gene *CmLOX9* em nenhuma das duas variedades.

Na figura 7B são apresentados o (*Z*)-3-nonenal juntamente com o álcool e éster relacionado a seu metabolismo. O (*Z*)-3-nonenal, foi detectado nos estádios iniciais em melões Eldorado e apenas aos 35 D.A.P em melões Gaúcho. O (*Z*)-3-nonenol foi identificado em melões Eldorado nos mesmos estádios em que foi detectado seu precursor, ambos mantiveram um padrão similar nestes dois estádios. O éster relacionado a esta via, (*Z*)-3-nonenyl acetate esteve presente apenas em melões Gaúcho no estágio de 35 D.A.P. Por não haver detecção dos compostos nos estádios que foram utilizados para avaliar a expressão gênica, não é possível avaliar se há correlação destes metabólitos com o *CmLOX9*.

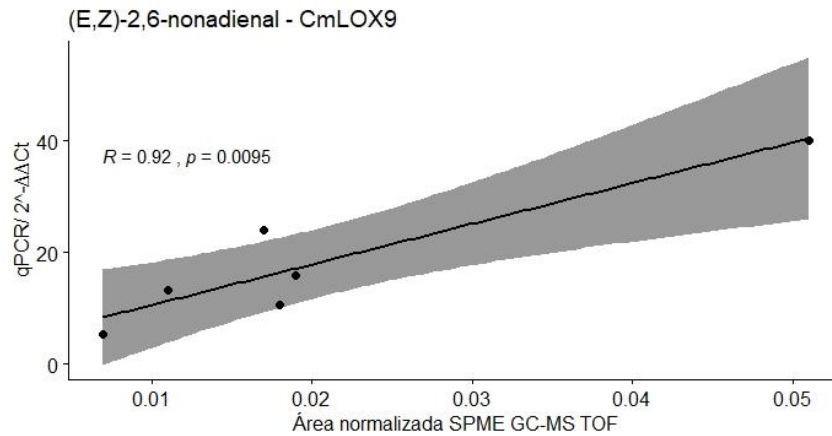
Figura 7 - VOCs advindos do catabolismo dos ácidos linoleico e α -linolênico (VINCENTI et al., 2019) e (SILVA et al., 2012). No eixo y, está representada o valor da área normalizada dos voláteis detectados por GC-MS TOF. No eixo x, a representação das variedades estudadas (E para Eldorado e G para Gaúcho) e seus respectivos estádios (15, 25, 35, 45 D.A.P) A: (E)-2-nonenal e seus respectivos álcool e éster. B: (Z)-3-nonenal e seus respectivos álcool e éster. C: (E,Z)-2,6-nonadienal e seus respectivos álcool e éster.





O *(E,Z)-2,6-nonadienal* é mostrado na figura 7C. Este composto foi detectado nos dois genótipos de melão estudados e em todos os estádios de maturação. Em melões Eldorado, este aldeído apresentou um comportamento de decréscimo na área detectada ao longo da maturação, apresentando uma correlação significativa ($R=0,92$ e $p=0,0095$) com o gene *CmLOX9* (figura 8).

Figura 8 - Gráfico de correlação de Pearson, utilizando os frutos nos estádios 35 e 45 D.A.P. A correlação foi feita entre a expressão do gene CmLOX9 em melões Eldorado, com os resultados obtidos através dos resultados da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e a área normalizada do VOC (E,Z)-2,6-nonadienal obtidos pela técnica de SPME-GC-MS TOF.

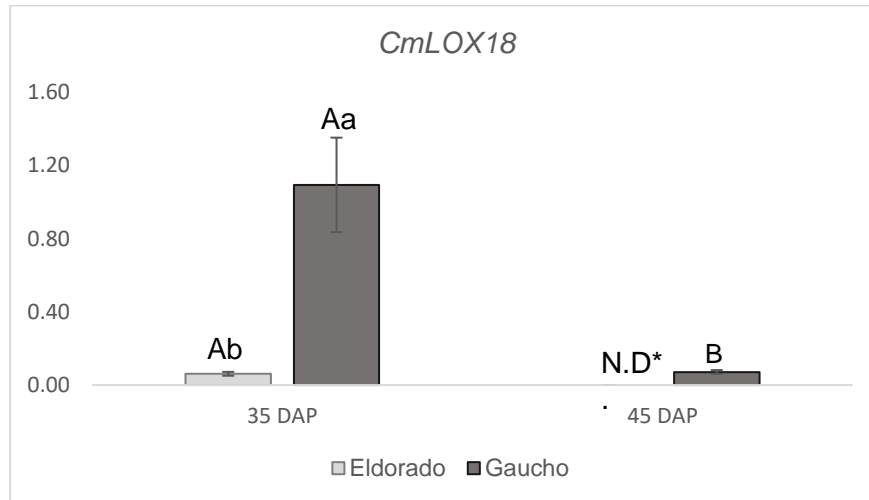


5.3.2 CmLOX18

CmLOX18 apresentou um padrão de decréscimo em expressão nos dois genótipos estudados. Em frutos de melão gaúcho de 35 D.A.P a expressão desse gene foi 18,2 vezes menor do que em melões Eldorado no mesmo estágio. Levando em conta os diferentes estádios de melões Gaúcho, a expressão deste gene decaiu 15,6 vezes na maturação completa. Podendo inferir que este gene tem uma atuação maior na formação de voláteis nos estádios mais jovens.

Em melões eldorado aos 45 D.A.P não foi possível detectar amplificação do fragmento referente a este gene com a técnica utilizada (Figura 10).

Figura 9 - Perfil de expressão relativa de CmLOX18 em melões Eldorado e Gaúcho em diferentes estádios de maturação. Os dados apresentados foram obtidos através dos resultados da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de Livak e Schmittgen (2001). Os valores são a média \pm erro padrão da média. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre estádios do mesmo grupo e letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os diferentes grupos no mesmo estádio de maturação ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey. *N.D = não detectado.



O *hexanal*, mostrado na figura 10A juntamente com seus voláteis derivados, foi identificado nas duas variedades de melão estudadas e em todos os estádios de maturação. Em melões Eldorado apresentou um padrão de decréscimo ao longo da maturação. Em melões Gaúcho, sua área detectada foi crescente entre os estádios 15 e 25 D.A.P, decaindo no estádio de 35 D.A.P novamente ascendendo aos 45 D.A.P. O padrão apresentado por este metabólito nos dois últimos estádios de melões Gaúcho foram o oposto do apresentado pelo gene *CmLOX18*.

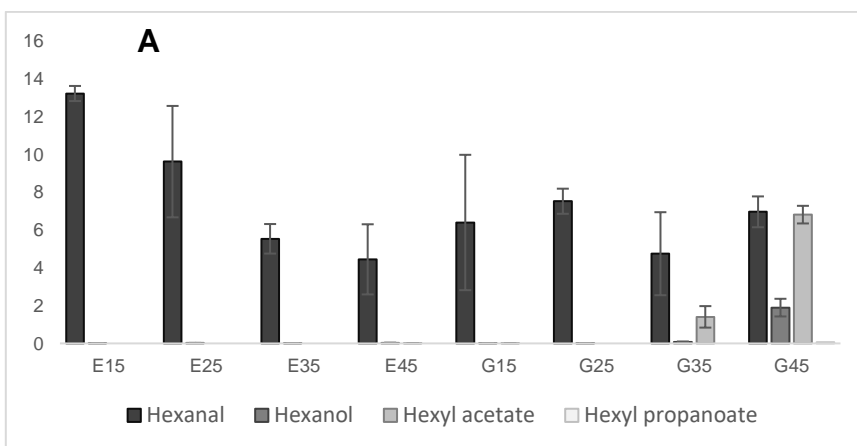
O *hexanol* esteve presente em todos os estádios tanto em melões Eldorado como em melões Gaúcho, contudo em quantidades bem menores do que seu precursor *hexanal*. O ester *hexyl acetate* foi detectado em melões Eldorado apenas em frutos completamente maduros. Em melões Gaúcho nos estádios de 15, 35 e 45 D.A.P com um padrão crescente conforme o avanço da maturação, também apresentando o padrão oposto ao observado pelo gene. O *hexyl propanoate* foi detectado somente em melões gaúcho e apenas aos 45 D.A.P.

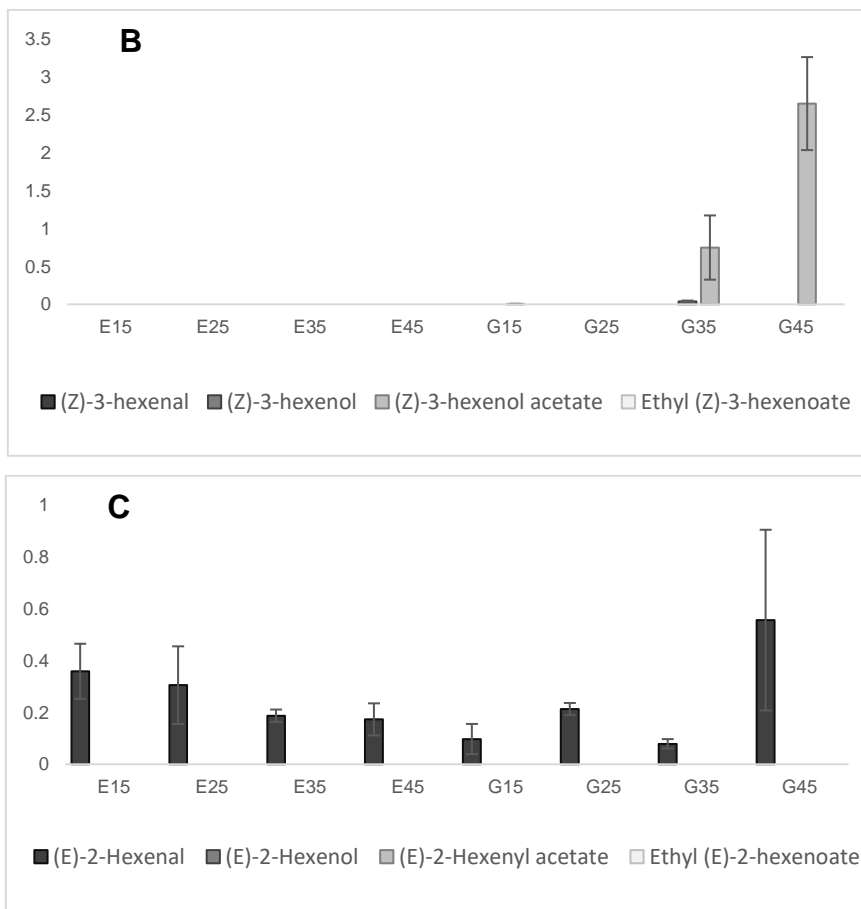
Nenhum dos metabólitos desta via apresentou algum tipo de correlação com a expressão do gene *CmLOX18*, contudo, o *hexanol* apresentou uma correlação negativa relativamente alta com o gene ($R=0,79$ e $p=0,062$).

A figura 10B mostra o (*Z*)-3-hexenal e seus respectivos álcool e ésteres. O aldeído (*Z*)-3-hexenal não foi observado em nenhuma das duas variedades, o (*Z*)-3-hexenol só foi notado em melões Gaúcho e apenas no estágio de 45 D.A.P. O éster (*Z*)-3-hexenol acetate foi identificado em melões Gaúcho aos 15, 35 e 45 D.A.P com um padrão crescente entre os dois últimos estádios, o oposto do padrão observado para o gene *CmLOX18*. Não houve detecção deste metabólito em melões Eldorado. O Ethyl (*Z*)-3-hexenoate. Não foi observado em nenhum dos dois tipos de melão. Não houve correlação entre nenhum dos voláteis desta via e o padrão de expressão do *CmLOX18*.

O aldeído (*E*)-2-Hexenal é mostrado na figura 10C, juntamente com os voláteis advindos de sua degradação. Este aldeído foi notado em ambas as variedades de melão estudadas nos quatro estádios de maturação. Não houve detecção do álcool (*E*)-2-Hexenol em nenhum dos dois genótipos. Nenhum dos dois ésteres relacionados a esta via foram detectados nos melões estudados.

Figura 10 - VOCs advindos do catabolismo de 13-peróxidos (VINCENTI et al., 2019) e (SILVA et al., 2012). No eixo y, está representado o valor da área normalizada dos voláteis detectados por GC-MS TOF. No eixo x, a representação das variedades estudadas (E para Eldorado e G para Gaúcho) e seus respectivos estádios (15, 25, 35, 45 D.A.P) A: voláteis advindos da degradação do ácido linolêico e α -linolênico pela ação da 13-HPL gerando 13-hidroperóxido que por sua vez dá origem ao hexenal (A), (*Z*)-3-hexenal (B) e (*E*)-2-hexenol (C) e seus respectivos álcoois e ésteres.





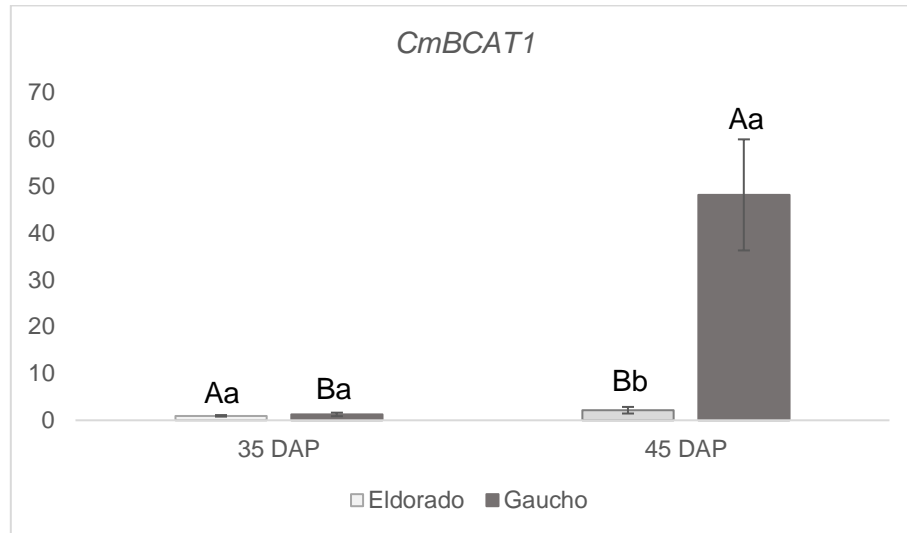
5.3.3 *CmBCAT1*

Conforme a figura 11, os níveis de expressão obtidos para o gene *CmBCAT1* em frutos de melão Gaúcho aos 35 D.A.P foram 38,5 vezes menor quando comparados à expressão em frutos no estágio de maturação completa.

Em melões Eldorado a expressão foi duas vezes maior em melões de 45 D.A.P quando comparados a melões de 35 D.A.P apresentando uma diferença estatística significativa entre eles.

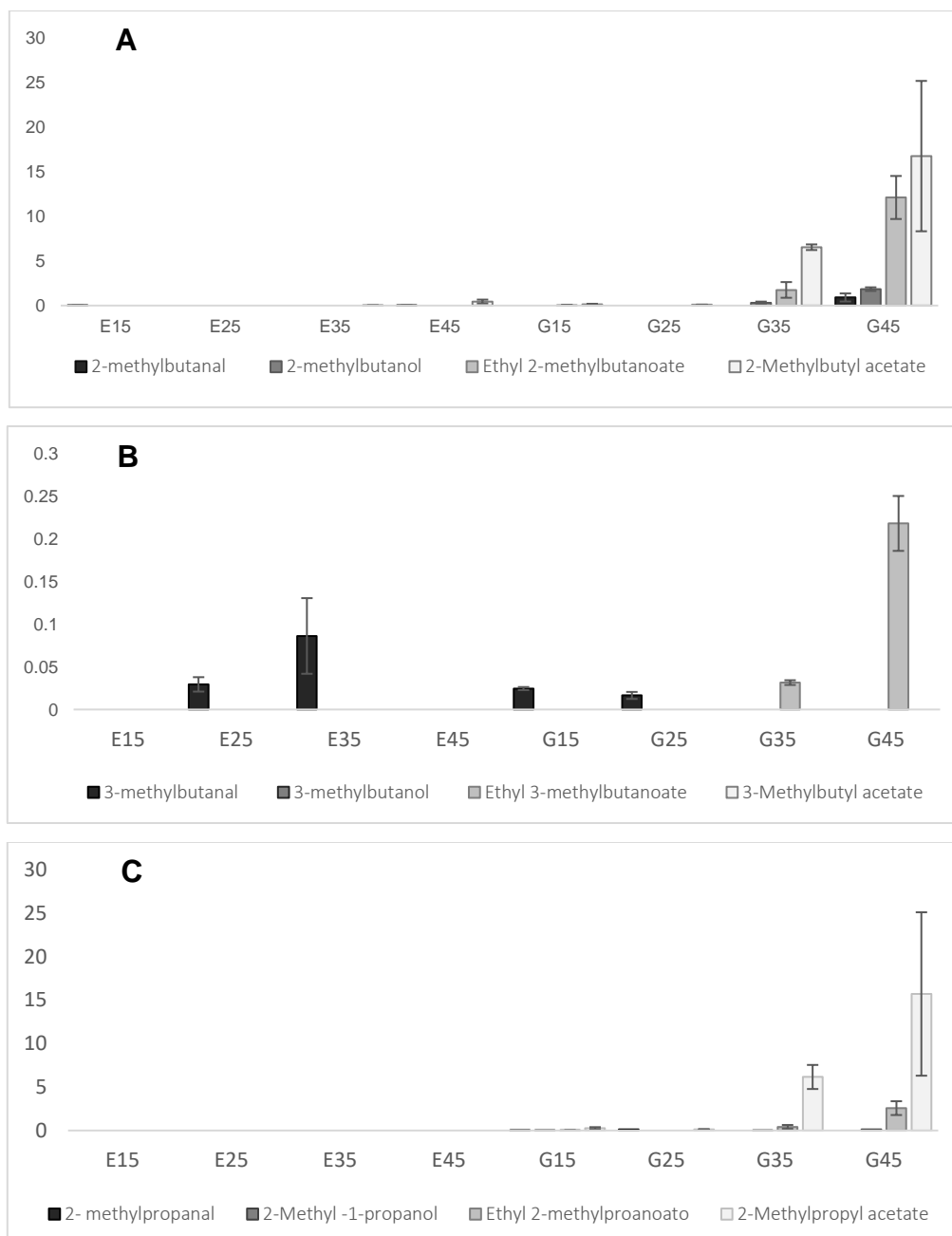
Quando comparadas as duas variedades aos 35 D.A.P a expressão do *CmBCAT1* foi semelhante, não apresentando variância estatística significativa, já quando comparadas as duas variedades aos 45 D.A.P a expressão em frutos da variedade climatérica foi notavelmente maior, diferindo estatisticamente uma da outra.

Figura 11 - Perfil de expressão relativa de *CmBCAT1* em melões Eldorado e Gaúcho em diferentes estádios de maturação. Os dados apresentados foram obtidos através dos resultados da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de Livak e Schmittgen (2001). Os valores são a média \pm erro padrão da média. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre estádios do mesmo grupo e letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os diferentes grupos no mesmo estágio de maturação ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.



Na figura 12, são apresentados os voláteis advindos da degradação dos aminoácidos de cadeia ramificada L-isoleucina, L-leucina e L-valina. Os voláteis resultantes da degradação de L-isoleucina foram pouco ou não detectados em melões Eldorado nos diferentes estádios. O mesmo padrão foi observado para melões Gaúcho aos 15 e 25 D.A.P, no entanto, conforme a maturação evoluiu nesta variedade os voláteis se mostraram um pouco mais expressivos, sendo possível observar a presença do *2-methylbutanol*, e dos ésteres *ethyl 2-methylbutanoate* e *2-methylbutyl acetate* nos estádios de 35 e 45 D.A.P e de todos os quatro voláteis relacionados a este aminoácido aos 45 D.A.P.

Figura 12 - VOCs advindos da degradação de aminoácidos ramificados (GONDA et al., 2010). No eixo y, está representada o valor da área normalizada dos voláteis detectados por GC-MS TOF. No eixo x, a representação das variedades estudadas (E para Eldorado e G para Gaúcho) e seus respectivos estádios (15, 25, 35, 45 D.A.P) A: voláteis advindos da degradação de L-isoleucina: *2-methylbutanal* e seus respectivos álcool e ésteres. B: voláteis advindos da degradação de L-leucina: *3-methylbutanal* e seus respectivos álcool e ésteres. C: voláteis advindos da degradação de L-valina: *2-methylpropanal* e seus respectivos álcool e ésteres.



Todos os metabólitos relacionados a este aminoácido apresentaram um padrão que se assemelha ao padrão de expressão do gene *CmBCAT1*. Contudo, em melões

Gaúcho apenas o *2-methylbutanol* e *ethyl 2-methylbutanoate*, apresentaram uma correlação positiva significativa, $R=0,91$, $0,97$ e $p=0,0017$, $0,0013$ respectivamente, com os dados de expressão deste gene (figura 13). Em melões Eldorado, o único metabólito presente nos estádios 35 e 45 D.A.P foi o *2-methylbutyl acetato* e este apresentou uma correlação positiva ($R=0,92$ e $p=0,01$) com a expressão do gene para esta variedade (figura 14).

Figura 13 - Gráfico de correlação de Pearson, utilizando os frutos nos estádios 35 e 45 D.A.P. , entre a expressão do gene *CmBCAT1* em melões Gaúcho, com os resultados obtidos através dos resultados da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e a área normalizada dos VOCs advindos da degradação de L-isoleucina. A: *2-methylbutanol*. B: *ethyl 2-methylbutanoate*, obtidos pela técnica de SPME GC-MS TOF.

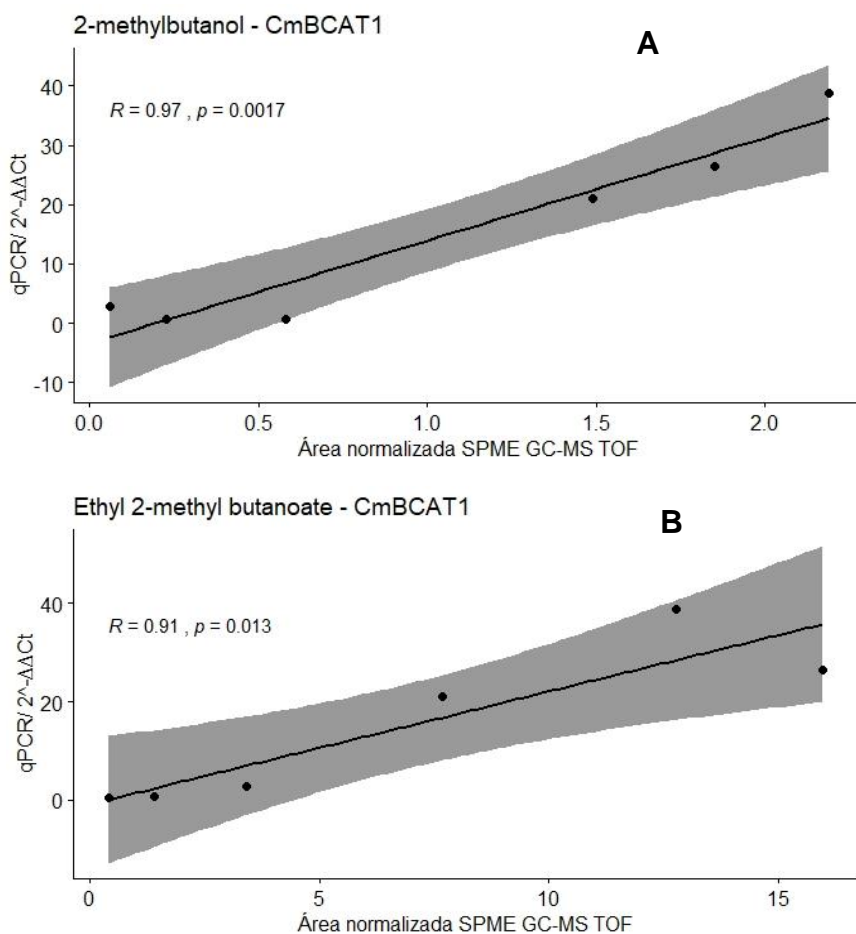
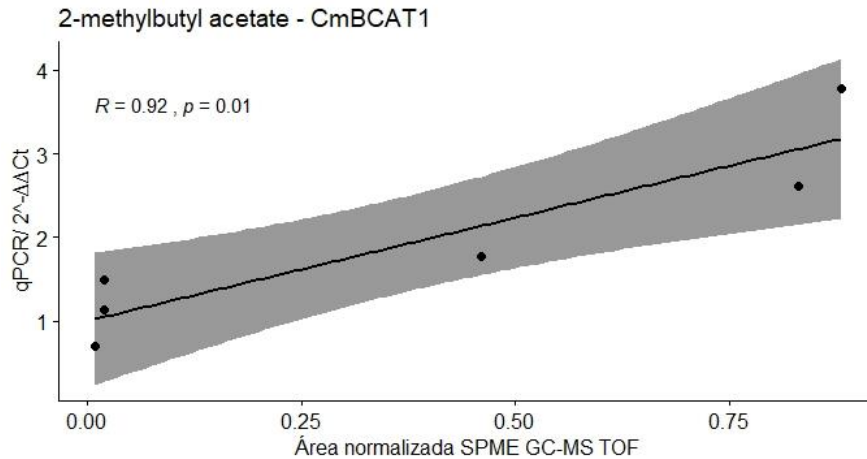


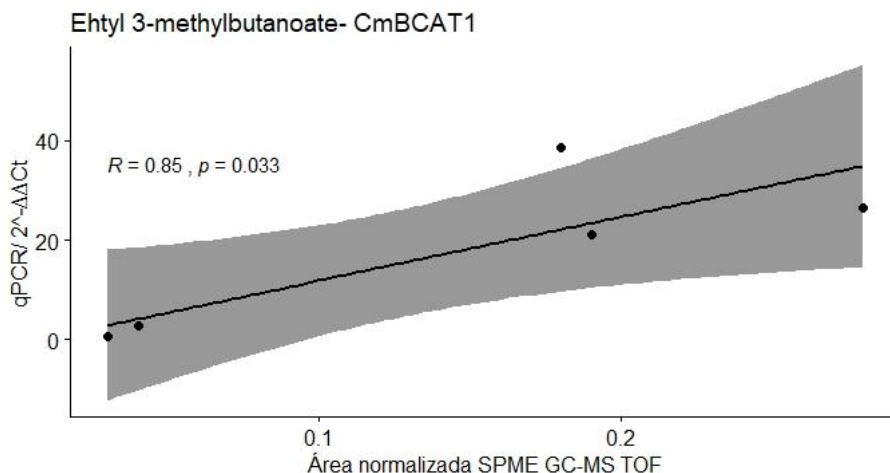
Figura 14 - Gráfico de correlação de Pearson, utilizando os frutos nos estádios 35 e 45 D.A.P., entre a expressão do gene *CmBCAT1* em melões Eldorado, com os resultados obtidos através dos resultados da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e a área normalizada dos VOC advindo da degradação de L-isoleucina. Na figura, o composto *2-methylbutyl acetate* obtido pela técnica de SPME GC-MS TOF.



Quanto aos voláteis advindos do aminoácido L-leucina (figura 12B), foi possível detectar a presença do aldeído *3-methylbutanal* em melões Eldorado aos 25 e 35 D.A.P e em melões Gaúcho aos 15 e 25 D.A.P os outros estádios não houve detecções deste volátil em nenhuma das duas variedades estudadas. Além do *3-methyl butanal* só foi possível verificar o composto *ethyl 3-methylbutanoate* e apenas nos estádios de 35 e 45 D.A.P em melões Gaúcho. Este composto está significativamente relacionado à expressão do gene *CmBCAT1* nesta variedade ($R=0,85$ e $p=0,033$), conforme mostrado na figura 15.

Os metabólitos originados do catabolismo de L-leucina, apresentaram um padrão levemente diferente dos demais, a começar por sua área detectada ser bem menor do que as dos voláteis vindos dos outros dois aminoácidos. O padrão dos voláteis em melões Gaúcho foram um pouco mais parecidos ao dos outros dois aminoácidos, contudo, em melões Eldorado a presença do volátil *3-methylbutanal*, que foi o único volátil detectado nesta variedade, ocorreu em fruto de 35 D.A.P e não houve nenhuma em frutos de 45 D.A.P. Opondo-se ao padrão de expressão do *CmBCAT1* nesta mesma variedade que foi duas vezes maior em melões de 45 D.A.P.

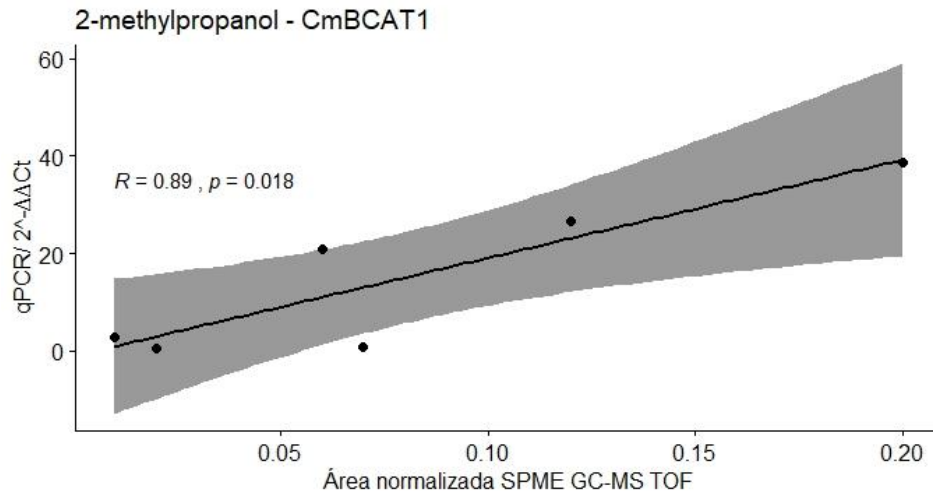
Figura 15 - Gráfico de correlação de Pearson, utilizando os frutos nos estádios 35 e 45 D.A.P, entre a expressão do gene *CmBCAT1* em melões Gaúcho, com os resultados obtidos através dos resultados da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e a área normalizada do metabólito *ethyl 3-methylbutanoate* advindo da degradação de L-leucina, obtido pela técnica de SPME GC-MS TOF.



Os compostos decorrentes da degradação de L-valina mostraram um comportamento semelhante aos de L-isoleucina, com pouca ou nenhuma detecção em melões Eldorado e em melões gaúcho nos dois primeiros estádios estudados, sendo possível constatar suas presenças apenas em melões gaúcho aos 35 e 45 D.A.P, sendo mais expressiva a presença do éster *2-methylpropyl acetato*. Em melões Eldorado, não foi possível analisar a correlação dos metabólitos desta via com a expressão do gene *CmBCAT*, por não ter sido possível detectar a presença destes voláteis nos mesmos estádios de maturação que foram analisados os dados do gene (figura 12C).

Em melões gaúcho, o padrão da presença destes voláteis é equivalente ao da expressão do gene *CmBCAT1*, contudo, apenas o *2-methylpropyl propanol* apresentou uma correlação significativa com os números de expressão do gene ($R=0,89$ e $p=0,018$), conforme mostrado na figura 16.

Figura 16 - Gráfico de correlação de Pearson, utilizando os frutos nos estádios 35 e 45 D.A.P, entre a expressão do gene *CmBCAT1* em melões Gaúcho, com os resultados obtidos através dos resultados da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e a área normalizada do metabólito *2-methylpropanol* advindo da degradação de L-valina obtido pela técnica de SPME GC-MS TOF.

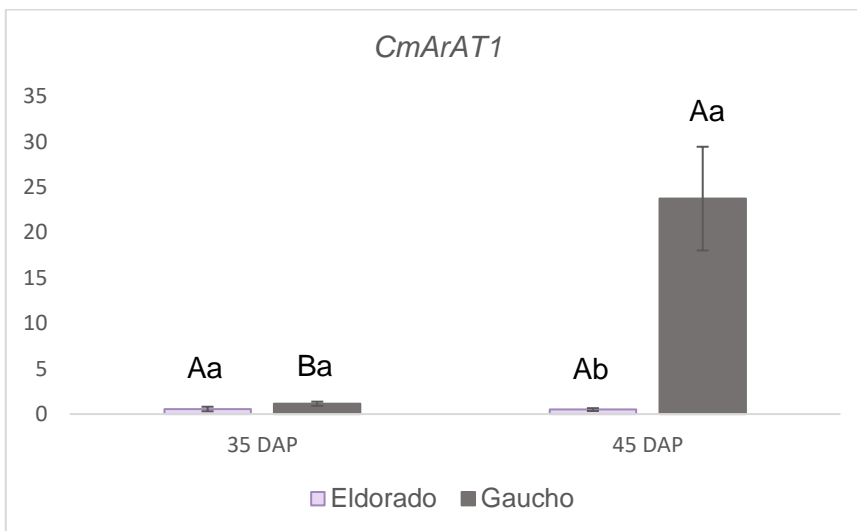


5.3.4 *CmArAT1*

O resultado da expressão do *CmArAT1* obtidos neste estudo foi consideravelmente maior em melões Gaúcho no estágio de plena maturação, apresentando um valor de expressão 48,5 vezes maior do que em frutos de melão Eldorado.

Em melões Eldorado as expressões deste gene em frutos aos 35 e aos 45 D.A.P apresentaram um padrão constante não sendo detectadas diferenças estatísticas relevantes entre eles. Considerando as duas variedades aos 35 D.A.P os valores de expressão em melões Eldorado foram 2 vezes menores do que em melões Gaúcho, mas não houve variação estatística significativa entre eles. Ou comparando os dois genótipos dez dias antes do fruto estar completamente maduro (figura 17). Mostrando que este gene tem uma atuação significativa em melões climatéricos completamente maduros.

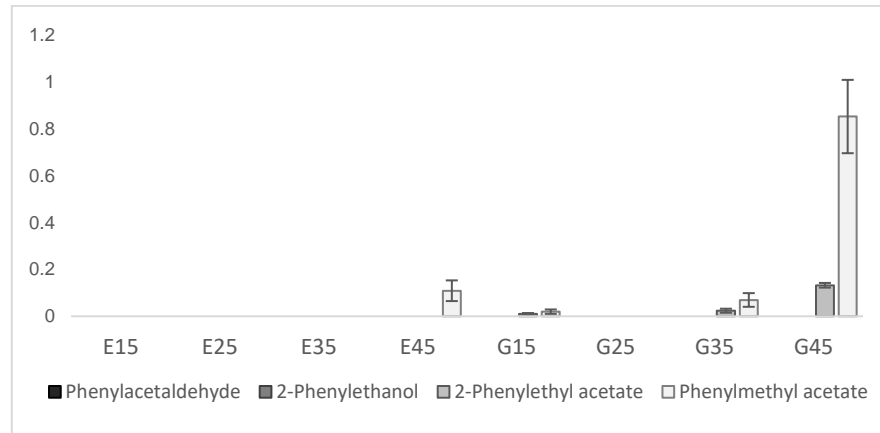
Figura 17 - Perfil de expressão relativa de *CmArAT1* em melões Eldorado e Gaúcho em diferentes estádios de maturação. Os dados apresentados foram obtidos através dos resultados da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de Livak e Schmittgen (2001). Os valores são a média \pm erro padrão da média. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre estádios do mesmo grupo e letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os diferentes grupos no mesmo estágio de maturação ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.



Os voláteis advindos da degradação de L-fenilalanina, que é um aminoácido de cadeia aromática, estão apresentados na figura 18. Os metabólitos iniciais da via metabólica, *phenylacetaldehyde* e *2-phenylethanol* não foram detectados em nenhum dos estádios e em nenhuma das duas variedades estudadas, possivelmente a concentração destes metabólitos é muito baixa para ser detectada pela técnica utilizada.

Os ésteres resultantes do catabolismo deste aminoácido foram detectados nas duas variedades. Em melões Eldorado, foi encontrada a presença de *phenylmethyl acetate* (também conhecido por *benzyl acetate*) no estágio de 45 D.A.P. Em melões Gaúcho este metabólito foi identificado aos 15, 35 e 45 D.A.P, também foi notada a presença de *2-phenylethyl acetate* nos mesmos estádios anteriormente mencionados. O *phenylmethyl acetate* foi o único metabólito advindo desta via encontrado nas duas variedades, possuindo uma quantidade consideravelmente superior em melões Gaúcho.

Figura 18 - VOCs advindos da degradação de L-fenilalanina, um aminoácido aromático (GONDA et al., 2010). Começando pelo aldeído *phenylacetaldehyde* e seguindo para seus respectivos álcool e ésteres. No eixo y, está representada o valor da área normalizada dos voláteis detectados por GC-MS TOF. No eixo x, a representação das variedades estudadas (E para Eldorado e G para Gaúcho) e seus respectivos estádios (15, 25, 35, 45 D.A.P).



O padrão de presença destes voláteis assemelha-se ao padrão encontrado para o gene *CmArAT1*, que é conhecido por atuar na formação deles em outros melões, contudo não foi possível observar uma correlação estatística relevante entre os voláteis desta via e a expressão deste gene. Fazendo necessários, estudos enzimáticos posteriores para a confirmação da atuação deste gene na formação destes voláteis nas variedades aqui estudadas.

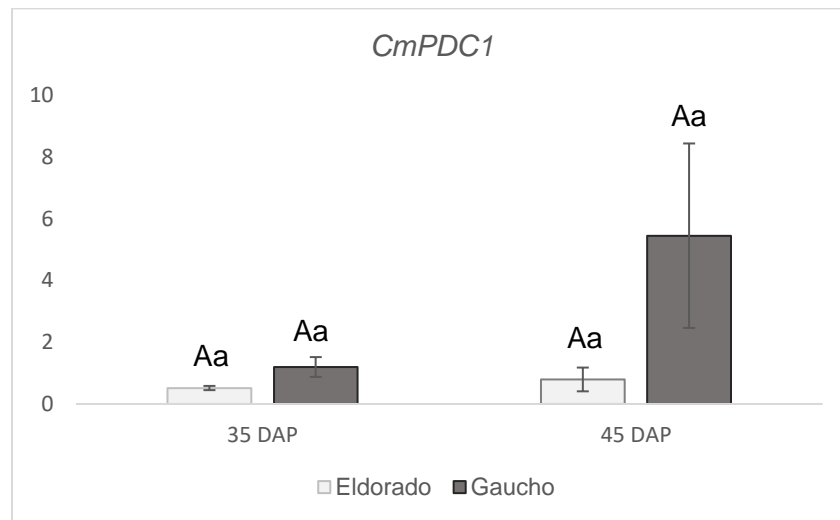
5.3.5 *CmPDC1*

O gene *CmPDC1* mostrou um leve crescimento conforme os frutos ficaram mais maduros, o aumento na regulação, embora também leve foi maior em melões Gaúcho (Figura 19).

Em melões Eldorado, o valor de expressão foi 3,7 vezes mais alto em frutos maduros comparando a frutos aos 35 D.A.P. Em melões Gaúcho, a expressão em frutos maduros foi 13,3 vezes maior do que em frutos aos 35 D.A.P, mas assim como em frutos de Eldorado, diferenças estatísticas significativas não foram encontradas entre os estádios para esta variedade.

Contudo, embora tenham sido notada diferenças nos valores numéricos da expressão, nenhuma diferença estatística foi observada entre os estádios para melões Eldorado e Gaúcho ou entre as variedades no mesmo estádio de maturação.

Figura 19 - Perfil de expressão relativa de *CmPDC1* em melões Eldorado e Gaúcho em diferentes estádios de maturação. Os dados apresentados foram obtidos através dos resultados da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de Livak e Schmittgen (2001). Os valores são a média \pm erro padrão da média. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre estádios do mesmo grupo e letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os diferentes grupos no mesmo estádio de maturação ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.



O gene *CmPDC1* codifica uma enzima conhecida por atuar na descarboxilação de vários α -cetoácidos, que por sua vez são dão origem a vários VOCs importantes em frutos de melão. Alguns destes voláteis serão explorados a seguir.

É mostrado na figura 20A o comportamento do *pyruvate* e dos voláteis resultantes de seu catabolismo. O *pyruvate* foi detectado somente no genótipo climatérico e apenas no estádio de maturação completa. O *acetaldehyde* foi detectado em melões Eldorado nos estádios verde pequeno e verde grande e em melões Gaúcho nos estádios de 35 e 45 D.A.P. O *ethanol*, foi detectado nos estádios 35 e 45 D.A.P em melões Gaúchos apresentando uma alta correlação com a expressão do gene *CmPDC1* com $R=0,9$ e $p=0,015$ (figura 21), sua presença não foi notada em melões Eldorado. O *ester ethyl acetate* foi identificado nos estádios de 35 e 45 D.A.P nos dois genótipos estudados e

aos 15 D.A.P em melões Gaúcho. O *ethyl propanoate* foi detectado em uma quantidade relativamente alta em melões Gaúcho aos 35 e 45 D.A.P, apresentando um padrão de aumento com a evolução da maturação.

A figura 20B apresenta o padrão dos metabólitos originados da degradação do α -cetoácido *2-oxohexanoate*. O α -cetoácido em questão não foi identificado em nenhum dos genótipos estudados. Seu respectivo aldeído, o *pentanal*, foi encontrado em todos os estádios em melões Eldorado, ao contrário do padrão de expressão do gene, a área deste volátil decaiu conforme os frutos amadureceram, não apresentando estatisticamente nenhuma correlação um com o outro. Em melões Gaúcho, este metabólito também foi notado em todos os estádios estudados com um padrão crescente entre os estádios 15 e 25 D.A.P, decaindo aos 35 D.A.P e novamente ascendendo até os 45 D.A.P.

O *pentanol*, foi identificado em melões Eldorado em todos os estádios, não apresentando contudo uma correlação significativa com o gene *CmPDC1* nesta variedade. Houve a presença deste volátil em todos os estádios em melões Gaúcho, exceto aos 45 D.A.P. O *pentyl acetate*, só foi identificado em melões Gaúcho e unicamente nos estádios de 35 e 45 D.A.P. O mesmo foi observado para o *ethyl 2-pentanoate*. Não houve uma correlação estatística significativa para nenhum dos voláteis advindos do *2-oxohexanoate* com o gene *CmPDC1* em nenhuma das duas variedades estudadas.

O *2-oxobutanoate* e seus respectivos voláteis são apresentados na figura 20C. Não houve detecção deste α -cetoácido em nenhum dos dois tipos de melões. O *propanal*, foi identificado em todos os estádios em ambos os melões estudados. A identificação do *propanol* não foi detectada em nenhum dos estádios e em nenhum dos dois genótipos aqui explorados. O *propyl acetate* e o *ethyl propanoate*, dois ésteres relacionados ao *2-oxobutanoate* foram detectados somente em melões Gaúcho, o primeiro nos estádios 15, 35 e 45 D.A.P e o segundo apenas aos 35 e 45 D.A.P.

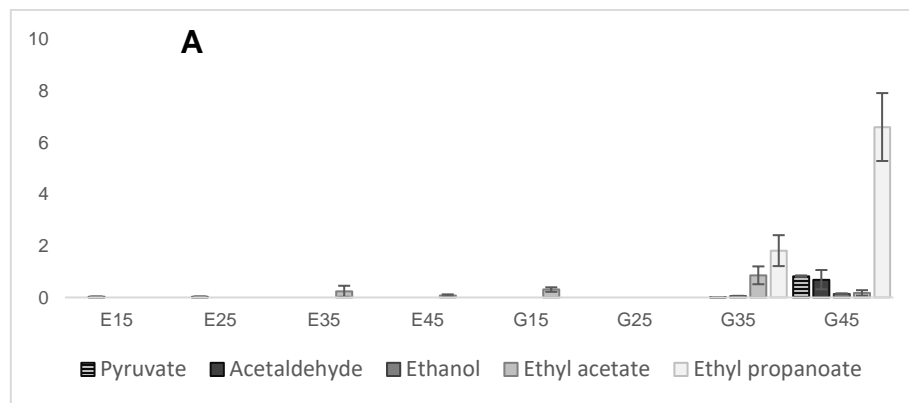
Ambos os ésteres mostraram um comportamento ascendente entre os estádios 35 e 45 D.A.P nos melões Gaúcho, mas embora o padrão dos ésteres relacionados a esta via tenha apresentado um padrão semelhante ao da expressão do gene *CmPDC1*,

nenhum dos voláteis a ela relacionados apresentou uma correlação significativa com o gene.

O *2-oxopentanoate* e seus respectivos VOCs são apresentados na figura 20D. Não foi identificada a presença deste α -cetoácido em nenhum dos dois genótipos de melão utilizados neste estudo. O *butanal*, o aldeído resultante de sua descarboxilação, esteve presente apenas no estágio de 25 D.A.P em melões Eldorado não sendo identificado em nenhum estágio em melões Gaúcho. O *butanol* só foi notado nos dois últimos estádios em melões Gaúcho e não foi detectado em melões Eldorado.

O *butyl acetate* foi identificado em melões completamente maduros da variedade Eldorado e nos estádios 15, 35 e 45 D.A.P em melões Gaúcho apresentando um comportamento de crescimento entre os dois últimos estádios. O *butyl propanoate*, foi detectado em melões Gaúcho apenas, e somente nos estádios de 35 e 45 D.A.P. Dentre os voláteis advindos da degradação do *2-oxopentanoate*, apenas o butyl acetate apresentou correlação com o gene *CmPDC1* ($R=0,95$ e $p=0,0032$), como mostrado na figura 21.

Figura 20 - VOCs relacionados à atuação do gene *CmPDC1* em melões (EL-SHARKAWY et al., 2005). Em cada uma das figuras são apresentados um álcool e seus respectivos ésteres. No eixo y, está representada o valor da área normalizada dos voláteis detectados por GC-MS TOF. No eixo x, a representação das variedades estudadas (E para Eldorado e G para Gaúcho) e seus respectivos estádios (15, 25, 35, 45 D.A.P). A: *pyruvate* e os voláteis originados de seu catabolismo. B: *2-oxohexanoate* e os voláteis originados de seu catabolismo. C: *2-oxobutanoate* e os voláteis originados de seu catabolismo. D: *2-oxopentanoate* e os voláteis originados de seu catabolismo.



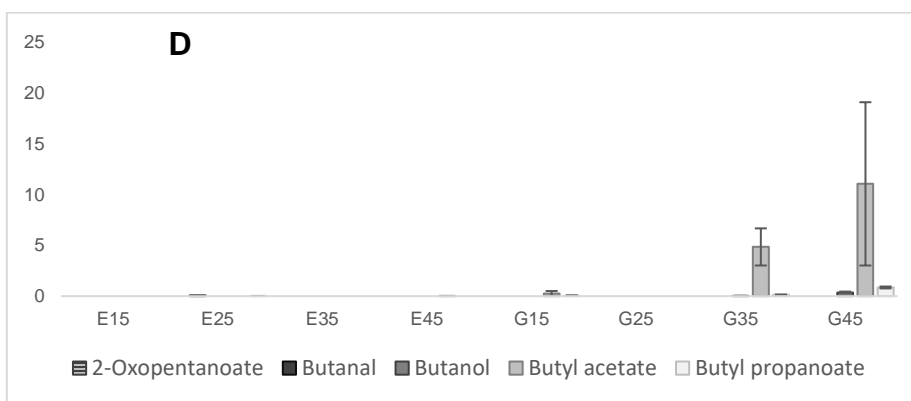
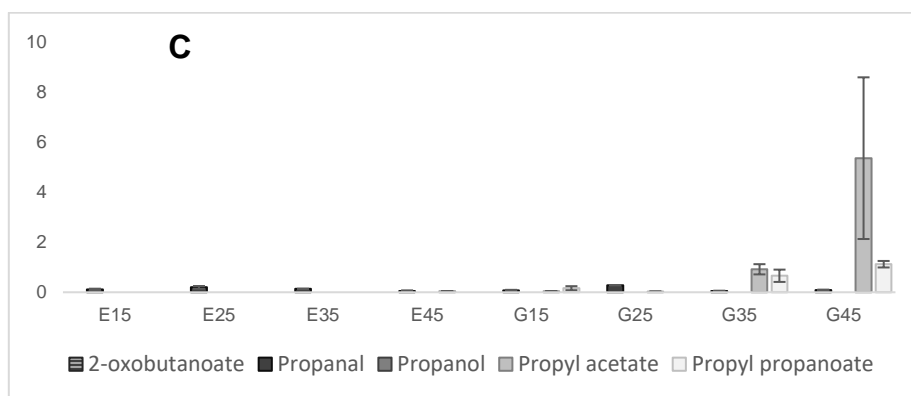
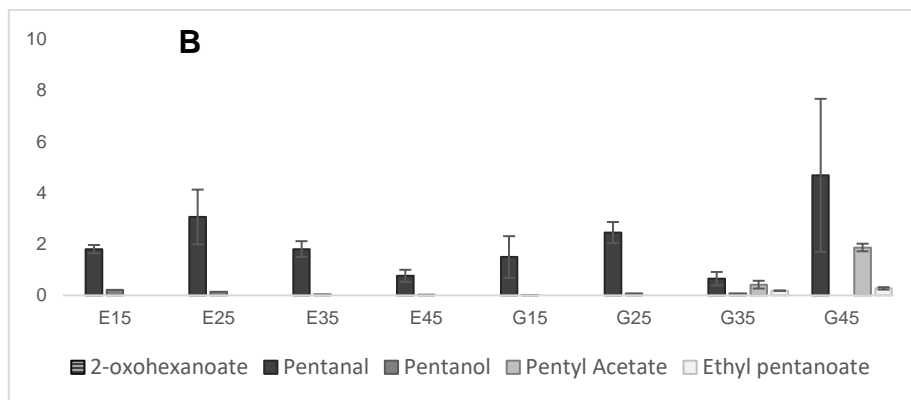
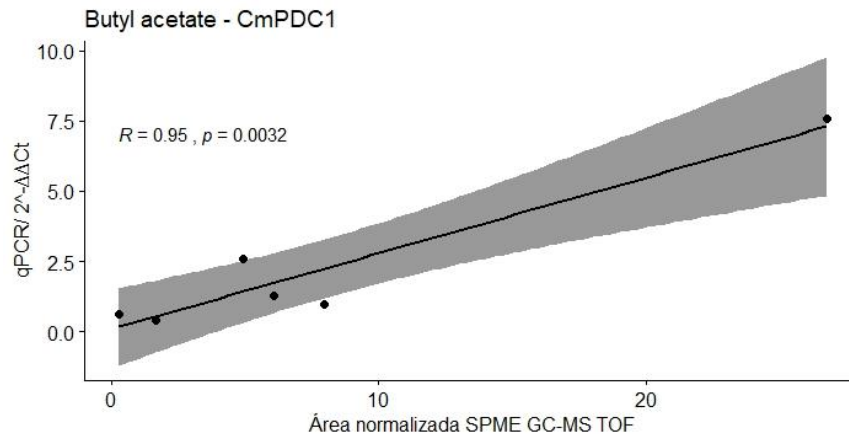


Figura 21 - Gráfico de correlação de Pearson, utilizando os frutos nos estádios 35 e 45 D.A.P, entre a expressão do gene *CmPDC1* em melões Gaúcho, com os resultados obtidos através dos resultados da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e a área normalizada do metabólito *butyl acetate* obtido pela técnica de SPME-GC-MS TOF.



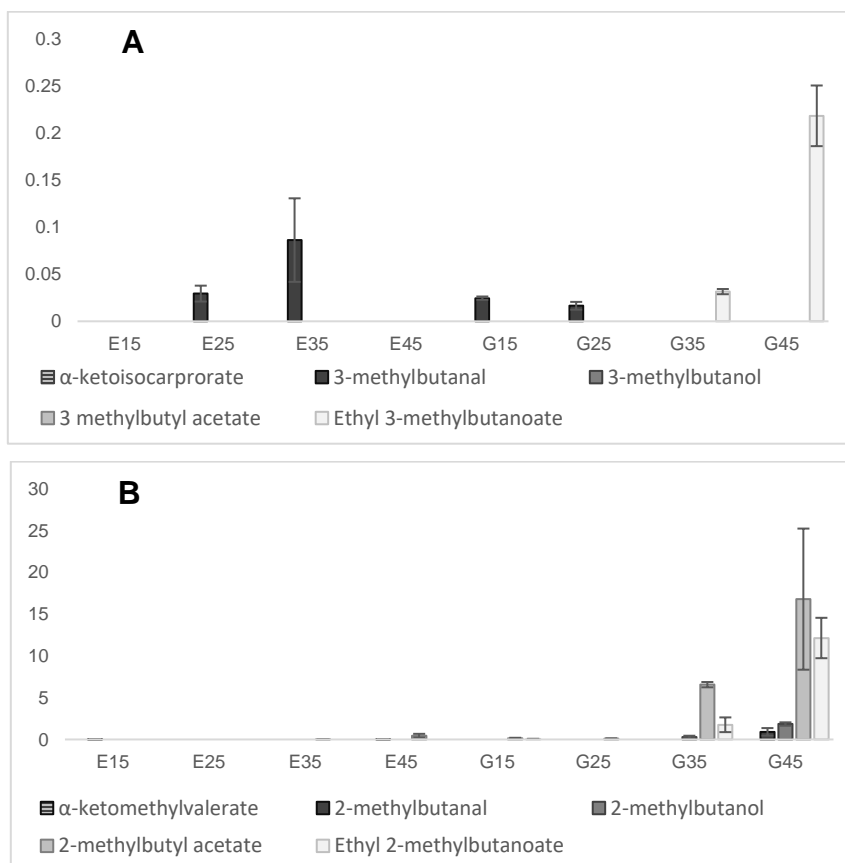
Na figura 22 são apresentados compostos conhecidos por decorrerem do catabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada e a L-fenilalanina, um aminoácido de cadeia aromática.

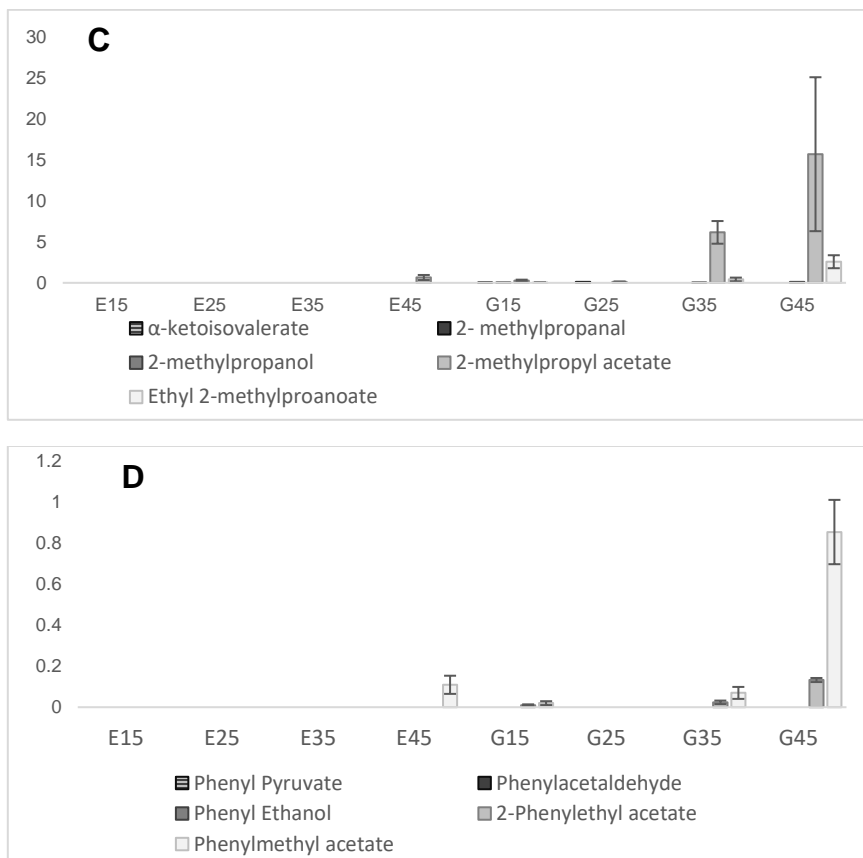
Os derivados do cetoácido, *ketoisocaproate* são mostrados na figura 22A. O *3-methylbutanal* é observado em melões Eldorado nos estádios de 25 e 35 D.A.P com um padrão de ascensão entre os dois. Em melões Gaúcho, este composto foi notado nos estádios de 15 e 25 D.A.P com um padrão de decréscimo entre um e outro. Além do aldeído *3-methylbutanal* o único composto resultante desta via detectado foi o ester *ethyl 3-methylbutanoate* e apenas em melões Gaúcho aos 35 e 45 D.A.P. Não houve correlação significativa deste composto com o gene *CmPDC1*.

A figura 22B, apresenta os voláteis derivados do *ketomethylvalerate*, o aldeído *2-methylbutanal* foi identificado aos 15 e 45 D.A.P em melões Eldorado e aos 45 D.A.P em melões Gaúcho. Se respectivo álcool, o *2-methylbutanol* foi detectado apenas na variedade Gaúcho e somente aos 35 e 45 D.A.P. O *ethyl 2-methylbutanoate*, também detectado apenas em melões gaúcho, nos estádios de 15, 35 e 45 D.A.P apresentando um padrão crescente ao longo da maturação. O *2-methylbutyl acetate* esteve presente em melões Eldorado aos 35 e 45 D.A.P; em melões Gaúcho, este éster foi detectado em

todos os estádios, em pequenas quantidades aos 15 e 25 D.A.P e aumentando significativamente nos estádios de 35 e 45 D.A.P.

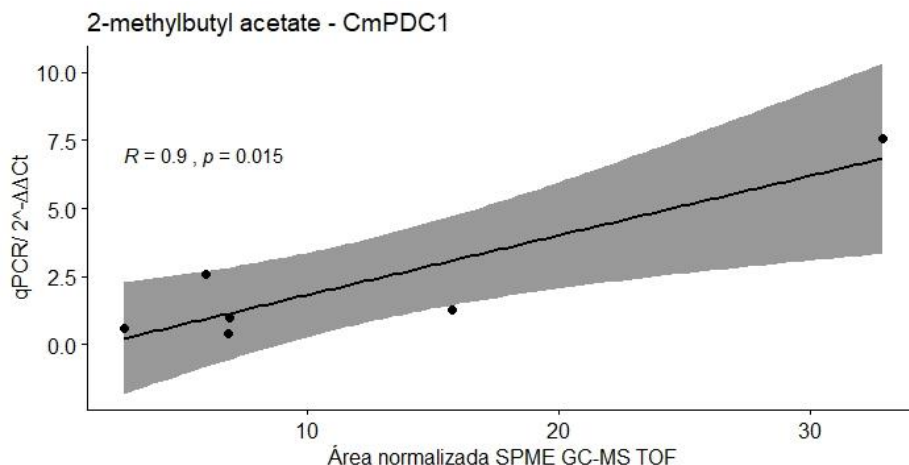
Figura 22 - VOCs relacionados à atuação do gene *CmPDC1* em melões (EL-SHARKAWY et al., 2005). Em cada uma das figuras são apresentados um álcool e seus respectivos ésteres. No eixo y, está representada o valor da área normalizada dos voláteis detectados por GC-MS TOF. No eixo x, a representação das variedades estudadas (E para Eldorado e G para Gaúcho) e seus respectivos estádios (15, 25, 35, 45 D.A.P). A: *ketoisocaproate* e os voláteis originados de seu catabolismo. B: *ketomethylvalerate* e os voláteis originados de seu catabolismo. C: *ketoisovalerate* e os voláteis originados de seu catabolismo. D: *Phenyl pyruvate*.





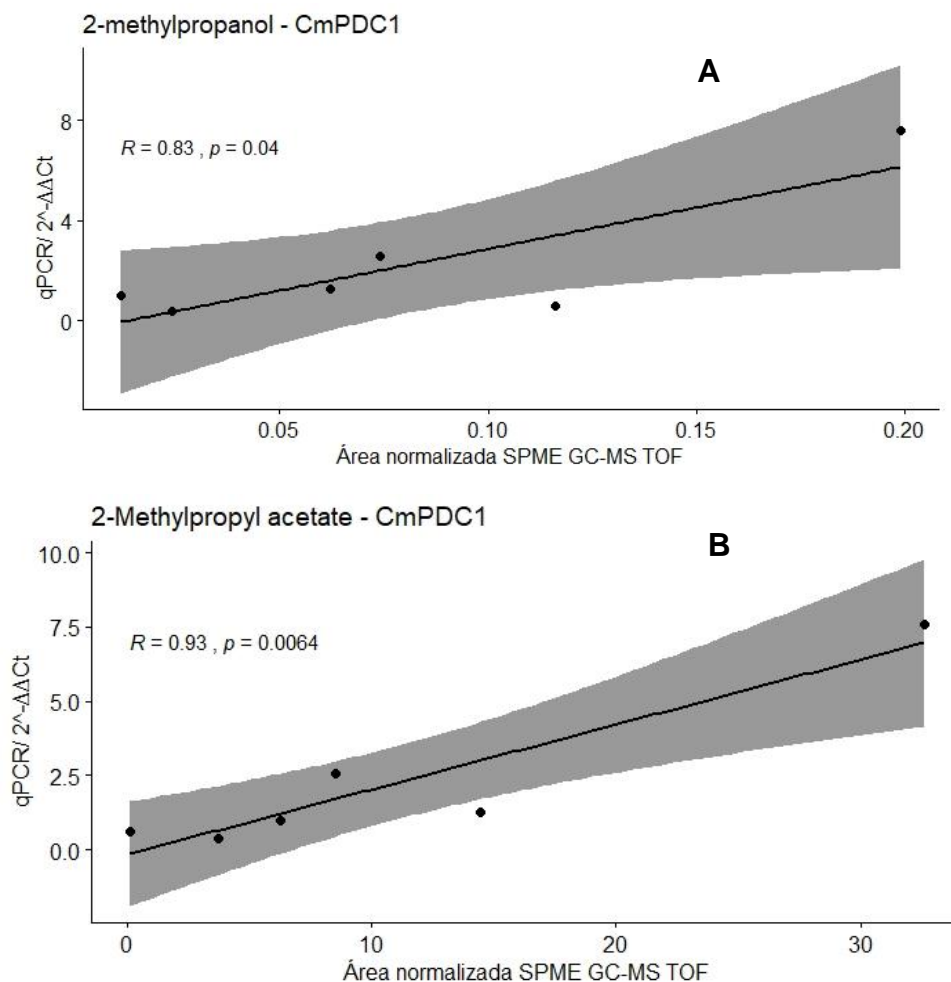
O *2-methylbutyl acetate* foi o único volátil derivado da degradação da L-isoleucina que apresentou correlação significativa com gene *CmPDC1*, com $R=0,9$ e $p=0,015$ em melões Gaúcho. Esta correlação indica que o gene *CmPDC1* provavelmente está relacionado à formação deste volátil nesta variedade de melão (figura 23).

Figura 23 - Gráfico de correlação de Pearson, utilizando os frutos nos estádios 35 e 45 D.A.P, entre a expressão do gene CmPDC1 em melões Gaúcho, com os resultados obtidos através dos resultados da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e a área normalizada do metabólito *2-methylbutyl acetate* obtido pela técnica de SPME-GC-MS TOF.



A figura 22C apresenta os compostos derivados do *ketoisovalerate*, o *2-methylpropanal* foi observado em melões Gaúcho aos 15 e 25 D.A.P e sua presença não foi notada em melões Eldorado. *2-Methylpropanol* foi detectado em melões Gaúcho aos 15, 35 e 45 D.A.P mantendo um comportamento de crescimento ao longo da maturação e apresentando uma correlação significativa com a expressão do gene *CmPDC1* ($R=0,83$ e $p=0,04$), apresentada na figura 24. O *2-Methylpropyl acetate* foi notado em melões Eldorado apenas no estágio mais maduro e em melões Gaúcho, com um padrão crescente, em todos os estádios, com uma correlação também positiva com a expressão do gene *CmPDC1* ($R=0,93$ e $p=0,0064$) nesta variedade. O *ethyl 2-methylproanoate* foi detectado em melões Gaúcho apenas, nos estádios de 15, 35 e 45 D.A.P e não apresentou uma correlação significativa com o gene destacado nesta sessão.

Figura 24 - Gráfico de correlação de Pearson, utilizando os frutos nos estádios 35 e 45 D.A.P, entre a expressão do gene CmPDC1 em melões Gaúcho, com os resultados obtidos através dos resultados da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e a área normalizada dos metabólitos 2-methylpropanol (A) e 2-methylpropyl acetate (B) obtidos pela técnica de SPME-GC-MS TOF.



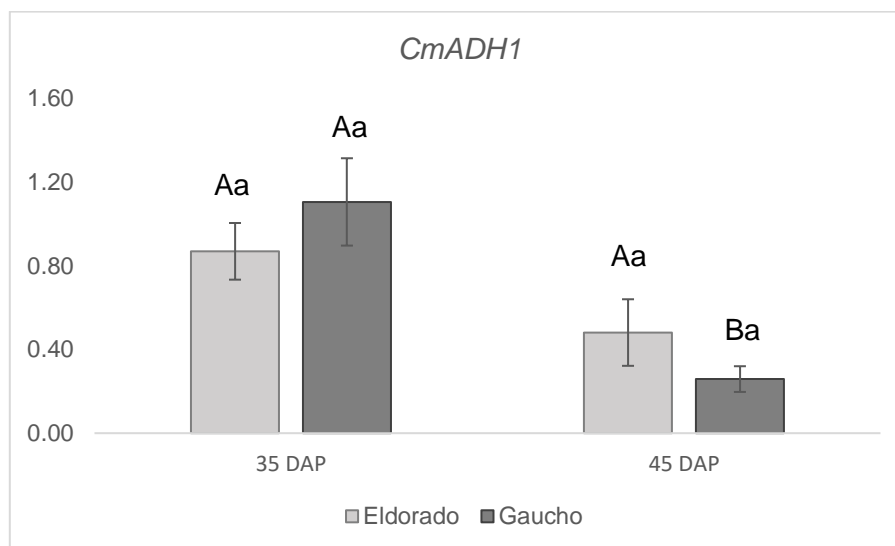
O *phenyl pyruvate*, o cetoácido originado do catabolismo do aminoácido aromático fenilalanina e seus derivados são mostrados na figura 22D. Não houve detecção do *phenyl pyruvate*, *phenylacetaldehyde*, nem do *phenyl alcohol* em nenhuma das duas variedades de melão estudadas. O *phenyl acetate*, outro ester relacionado a esta rota foi identificado em melões Eldorado, apenas aos 45 D.A.P e em melões Gaúcho aos 15, 35 e 45 D.A.P apresentando um comportamento de crescimento ao longo da maturação.

5.3.6 *CmADH1*

Na figura 25, é apresentado o padrão de expressão do gene *CmADH1*. Na figura é mostrado que a expressão deste gene foi maior em frutos de 35 D.A.P nos dois genótipos estudados, apresentando um decréscimo no valor de expressão nos frutos completamente maduros tanto de Eldorado quanto de Gaúcho. Embora o valor de expressão tenha sido 1,8 vezes menor em melões Eldorado mais maduros, não foi reconhecida uma diferença significativa entre os dois estádios nesta variedade.

Já em melões gaúcho o decréscimo de 4,3 vezes em frutos maduros foi notado significativo estatisticamente. Entre os mesmos estádios nas duas variedades não houve diferenças estatísticas significativas.

Figura 25 - Perfil de expressão relativa de *CmADH1* em melões Eldorado e Gaúcho em diferentes estádios de maturação. Os dados apresentados foram obtidos através dos resultados da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de Livak e Schmittgen (2001). Os valores são a média \pm erro padrão da média. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre estádios do mesmo grupo e letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os diferentes grupos no mesmo estádio de maturação ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.



Na figura 26 são apresentados os padrão de alguns voláteis relacionados à atividade da enzima codificada pelo gene *CmADH1*. Na figura 27A são apresentados os voláteis *acetaldehyde* (também conhecido como *ethanal*) e seu respectivo álcool, o

ethanol. Em melões Eldorado, houve a detecção somente do *acetaldehyde* e apenas nos estádios mais jovens, 15 e 25 D.A.P. O Ethanol não foi identificado em nenhum dos estádios nesta variedade. Em melões Gaúcho, foi notada a presença destes voláteis apenas nos estádios mais maduros, de 35 e 45 D.A.P, sendo no estádio de 45 D.A.P mais expressivos. Na análise de correlação de Pearson utilizada junto aos dados de expressão em melões Gaúcho nos estádios mais maduros, não foi notada uma correlação significativa entre estes dois compostos e a expressão do *CmADH1* mostrando que provavelmente estes metabólitos não estão relacionados à atividade da enzima codificada para este gene neste genótipo.

Na figura 26B são mostrados o aldeído *hexanal* e seu respectivo álcool, o *hexanol*. O *hexanal* foi detectado em quantidade expressiva em todos os estádios tanto em melões Eldorado como em Gaúcho. Em melão Eldorado ele seguiu um padrão de decréscimo conforme os frutos foram amadurecendo, assemelhando-se ao padrão notado pelo gene, contudo não foi notada uma correlação relevante entre a expressão do gene e os valores de área deste volátil. Para melões Gaúcho também não foi identificada uma correlação significativa deste aldeído com o gene *CmADH1*.

O *hexanol* também foi detectado em todos os estádios em melões Eldorado mas de forma bem menos expressiva do que seu precursor, hexanal. Uma correlação significativamente positiva ($R=0,84$ e $p= 0,036$) foi encontrada para este álcool e a atividade do gene *CmADH1* nesta variedade (figura 27).

Figura 26 - VOCs relacionados à atuação da enzima codificada pelo gene *CmADH1* em melões (MANRÍQUEZ et al., 2006). Em cada uma das figuras são apresentados um aldeído e seu respectivo álcool. No eixo y, está representada o valor da área normalizada dos voláteis detectados por GC-MS TOF. No eixo x, a representação das variedades estudadas (E para Eldorado e G para Gaúcho) e seus respectivos estádios (15, 25, 35, 45 D.A.P).

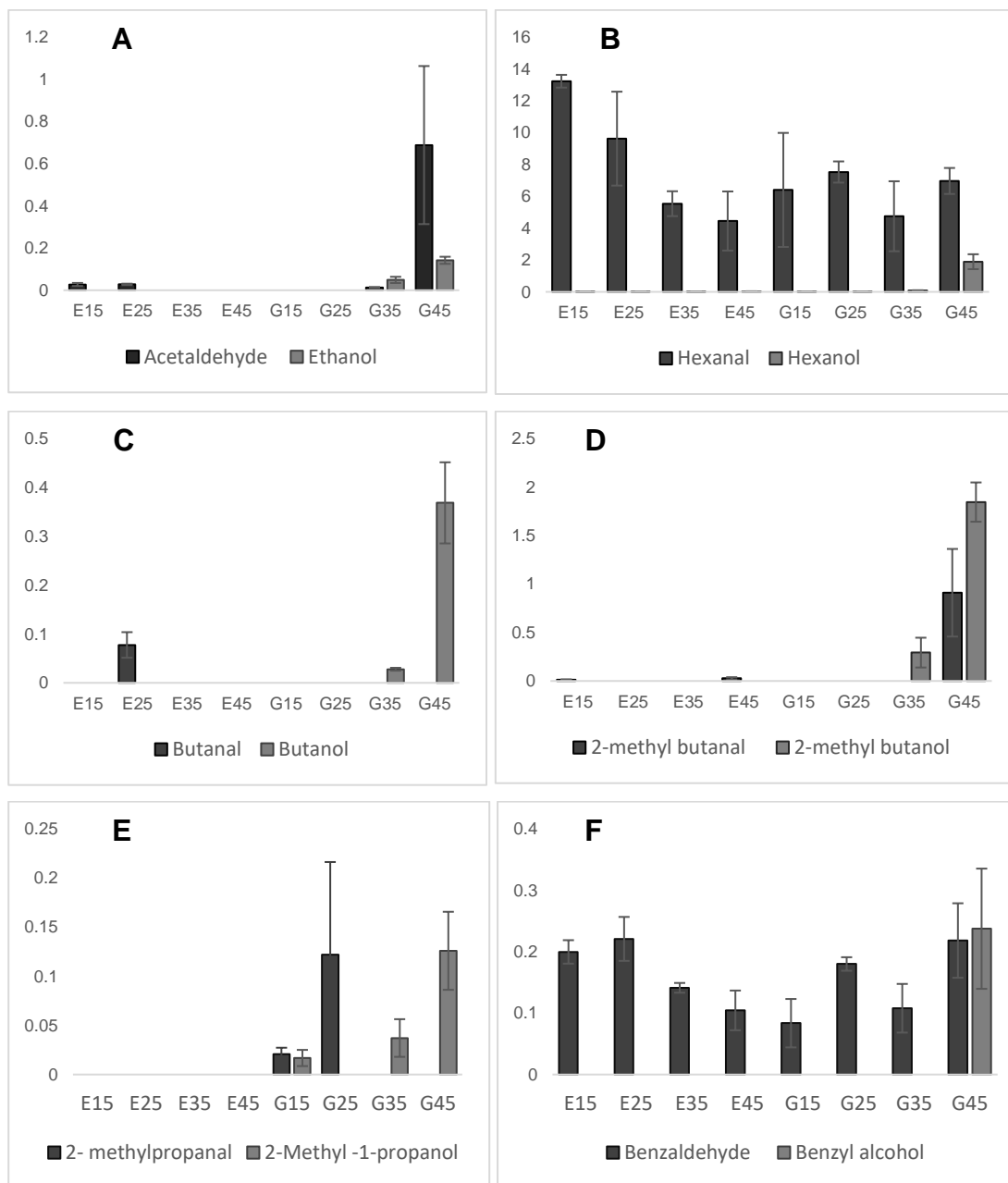
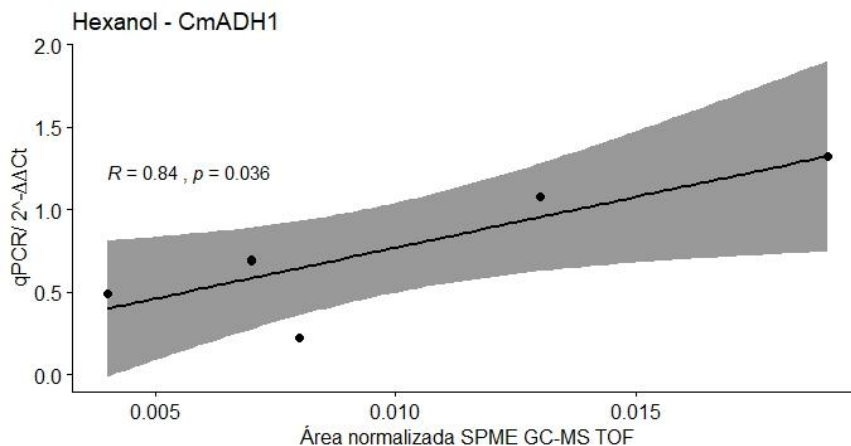


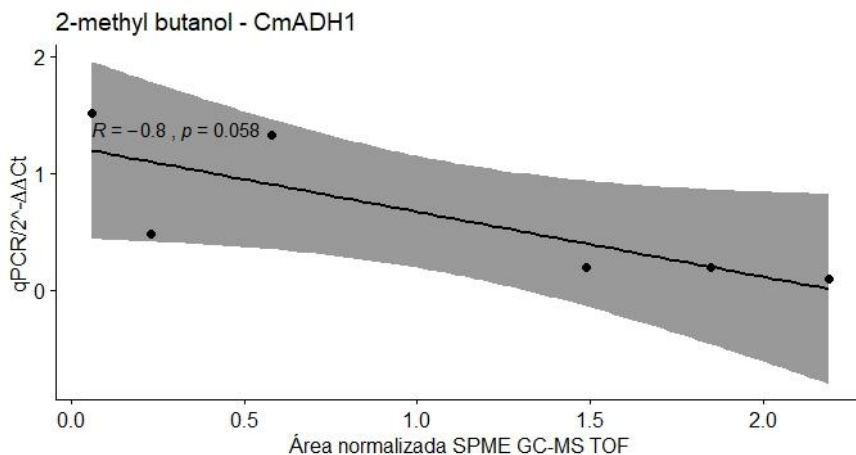
Figura 27 - Gráfico de correlação de Pearson, utilizando os frutos nos estádios 35 e 45 D.A.P, entre a expressão do gene *CmADH1* em melões Gaúcho, com os resultados obtidos através dos resultados da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e a área normalizada dos metabólito *hexanol* obtido pela técnica de SPME-GC-MS TOF.



O *butanal*, mostrado na figura 26C, só foi detectado em melões Eldorado, no estágio de 25 D.A.P e não foi notado em nenhum dos estádios em melões Gaúcho. O *butanol*, seu respectivo álcool, foi reparado nos estádios 35 e 45 D.A.P em melões gaúcho mostrando um crescimento acentuado no estágio mais maduro, não houve correlação significativa entre este composto e o gene *CmADH1*. Não foi observada sua presença em melões Eldorado.

Conforme apresentado na figura 26D, o *2-methyl butanal* só foi notado nos estágio de 15 e 45 D.A.P em melões Eldorado, e em pequenas quantidades. Em melões Gaúcho só foi observada a presença deste composto em frutos completamente maduros. O *2-methylbutanol* não foi detectado em melões Eldorado e em melões Gaúcho foi notado em um padrão crescente entre os estádios de 35 e 45 D.A.P apresentando uma correlação negativa ($R = -0,80$ e $p = 0,058$) com a expressão do gene *CmADH1*, ou seja, enquanto um diminui em expressão o outro aumenta (figura 28).

Figura 28 - Gráfico de correlação de Pearson, utilizando os frutos nos estádios 35 e 45 D.A.P, entre a expressão do gene *CmADH1*, com os resultados obtidos através dos resultados da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e a área normalizada do composto *2-methylbutanol* obtido pela técnica de GC-MS TOF.



Conforme a figura 27E, o *2-methylpropanal* não foi observado em nenhum dos estádios em melões Eldorado, e apenas nos estádios mais jovens dos melões Gaúcho. O *2-methylpropanol*, não foi detectado em melões Eldorado mas foi notado nos estádios 15, 35 e 45 D.A.P em melões Gaúcho, apresentando um padrão de crescimento ao longo da maturação nesta variedade. Não houve correlação entre a expressão do gene *CmADH1* e este metabólito neste genótipo.

Como apresentado na figura 27F, o VOC *benzaldehyde* foi detectado em todos os estádios nas variedades Eldorado e Gaúcho. Em Eldorados o padrão foi de aumento entre os estádios 15 e 25 D.A.P decaindo conforme a maturação avançou, contudo não apresentou nenhuma correlação significativa com a expressão do gene *CmADH1*. Em melões Gaúcho, houve aumento entre 15 e 25 D.A.P, decaindo aos 35 D.A.P e novamente crescendo aos 45 D.A.P. Não mostrando nenhuma correlação com a expressão do gene estudado nesta sessão.

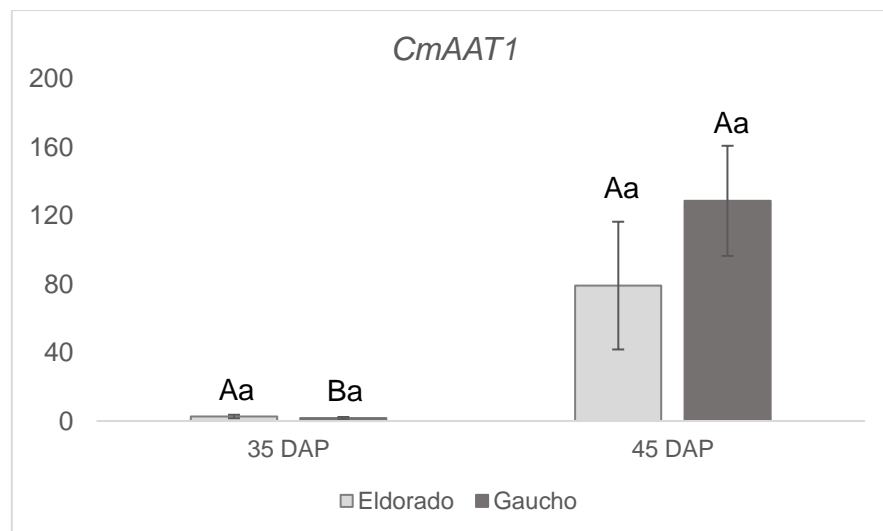
Os padrões apresentados pelos voláteis relacionados à atividade desta enzima não exibiram uma relação visível à expressão do gene *CmADH1*, com exceção do *hexanal* e *benzaldehyde*, que embora sejam semelhantes em padrão, não apresentaram uma correlação com os valores do *CmADH1*.

5.3.7 *CmAAT1*

Na figura 29, é exibido o padrão de expressão do gene *CmAAT1*. Como notado na figura, a expressão do gene *CmAAT1* foi mais alta em frutos completamente maduros em ambas as variedades estudadas. Em melões Eldorado a expressão em frutos aos 45 D.A.P foi 30 vezes maior do que em frutos de 35 D.A.P. Contudo, não houve diferença estatística significativas entre estes dois estádios. Já em melões Gaúcho diferenças estatísticas foram notadas entre os dois estádios, em frutos maduros o valor de expressão foi 78 vezes maior do que em frutos de 35 D.A.P.

Considerando os mesmos estádios nos dois genótipos, não houve uma significância entre eles. Ambos apresentaram uma característica relativamente próxima tanto aos 35 quanto aos 45 D.A.P. Mostrando, desta forma que o gene *CmAAT1* mostra um perfil semelhante nos dois melões estudados diferindo somente ao longo da maturação em melões climatéricos.

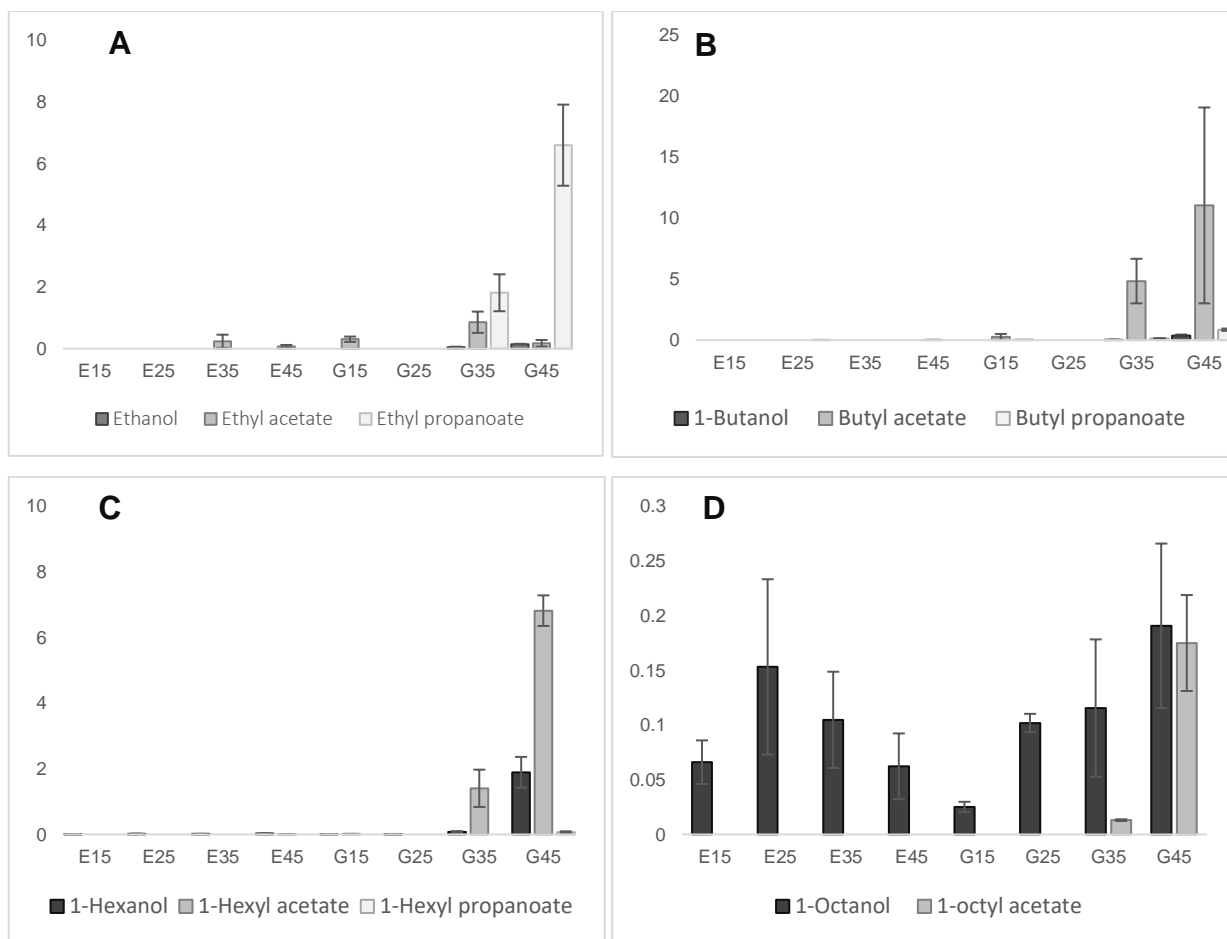
Figura 29 - Perfil de expressão relativa de *CmAAT1* em melões Eldorado e Gaúcho em diferentes estádios de maturação. Os dados apresentados foram obtidos através dos resultados da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de Livak e Schmittgen (2001). Os valores são a média \pm erro padrão da média. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre estádios do mesmo grupo e letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os diferentes grupos no mesmo estádio de maturação ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

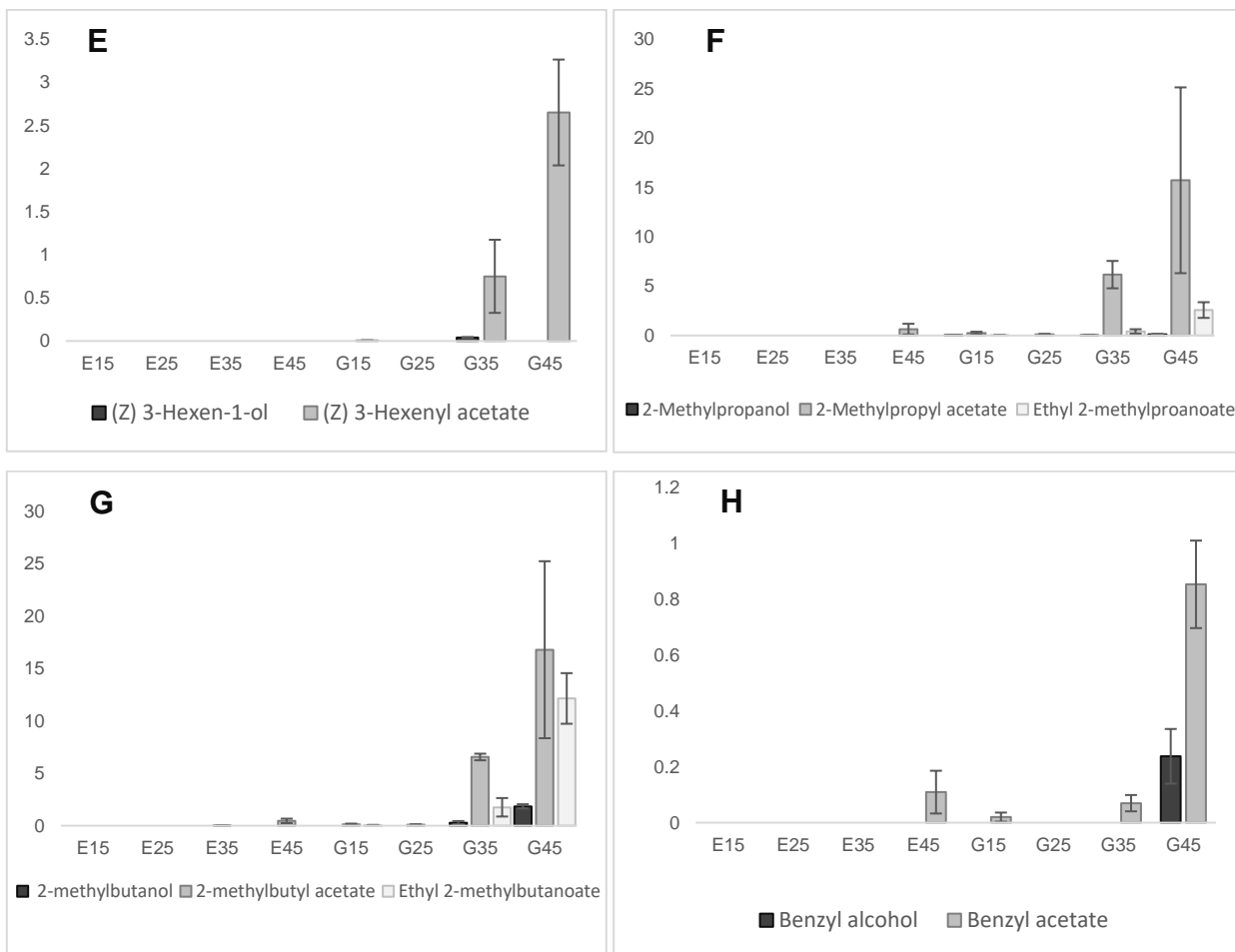


O gene *CmAAT1* codifica uma enzima considerada de ampla atuação na formação de diversos ésteres. Na figura 31 são apresentadas diversas combinações de álcoois e esterres que estão ligados à atuação da enzima codificada por este gene.

Na figura 30A, mostra como se comportam o álcool *ethanol* e seus respectivos esterres. O *ethanol* não foi detectado em melões Eldorado em nenhum dos estádios estudados. Em melões gaúcho, foi notado nos estádios mais maduros com um leve crescimento no estádio de 45 D.A.P.

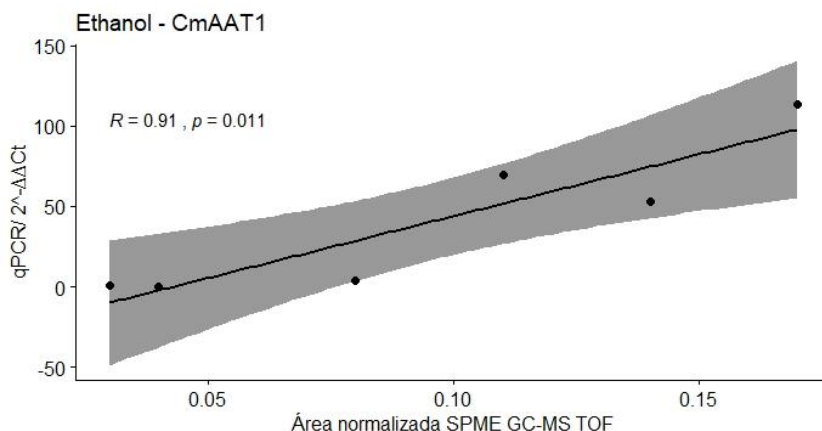
Figura 30 - VOCs relacionados à atuação da enzima codificada pelo gene *CmAAT1* em melões (EL-SHARKAWY et al., 2005). Em cada uma das figuras são apresentados um álcool e seus respectivos ésteres. No eixo y, está representada o valor da área normalizada dos voláteis detectados por GC-MS TOF. No eixo x, a representação das variedades estudadas (E para Eldorado e G para Gaúcho) e seus respectivos estádios (15, 25, 35, 45 D.A.P).





A quantidade detectada de *ethanol* apresentou uma correlação positiva com a expressão do gene *CmAAT1* ($R=0,91$, $p=0,011$) em melões Gaúcho, conforme apresentado na figura 31. Os ésteres relacionados a este álcool não apresentaram uma correlação significativa à atividade do gene.

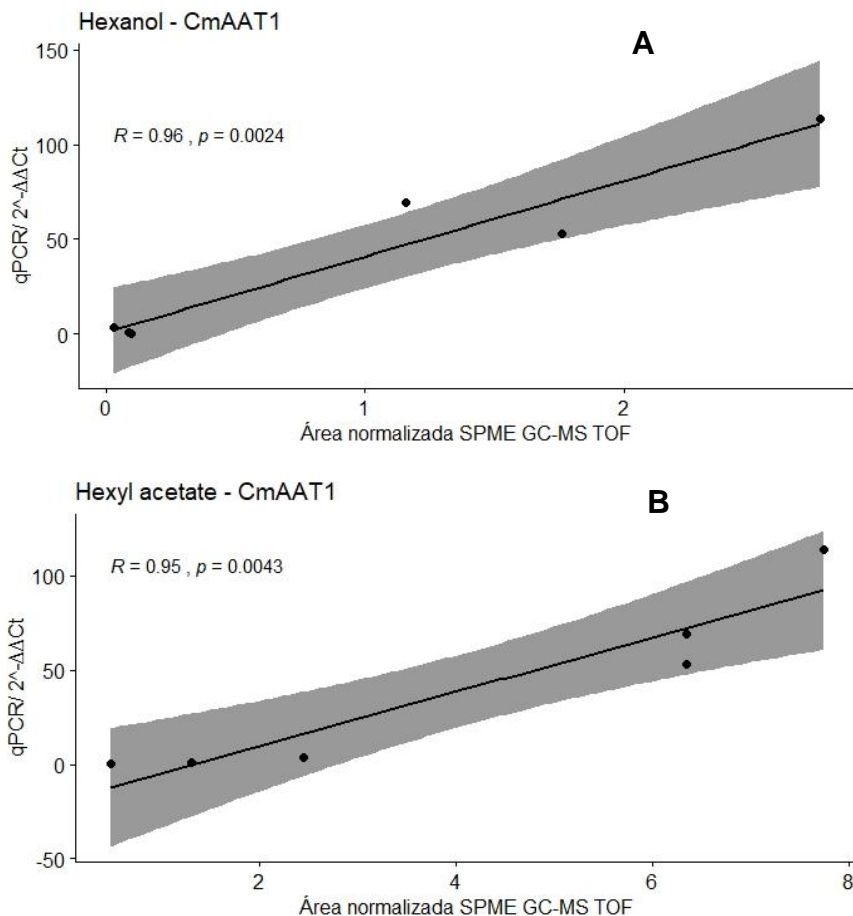
Figura 31 - Gráfico de correlação de Pearson, utilizando os frutos nos estádios 35 e 45 D.A.P, entre a expressão do gene *CmAAT1* em melões Gaúcho, com os resultados obtidos através dos resultados da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e a área normalizada do metabólito *ethanol*, obtido pela técnica de SPME GC-MS TOF.



Como mostrado na figura 30B, o butanol só foi detectado nos dois últimos estádios de melões Gaúcho, não sendo notada sua presença em nenhum dos estádios em melões Eldorado. Em melões Gaúcho, embora o butanol e seus ésteres tenham estado presentes especialmente nos estádios mais maduros, não foi possível identificar uma correlação estatisticamente relevante com nenhum destes metabólitos e a expressão do gene *CmAAT1*.

A figura 30C mostra o composto *hexanol* e seus ésteres derivados, como pode ser notado o hexanol esteve presente em todos os estádios tanto em melões Eldorado quanto em melões Gaúcho apresentando uma correlação positiva ($R=0,96$, $p=0,0024$) com o último (figura 32A). Não houve significância estatística na correlação com melões eldorado. O *hexyl acetate* foi detectado somente em melões Gaúcho e nos estádios de 15, 35 e 45 D.A.P. O padrão de abundância deste composto também apresentou uma correlação positiva ($R=0,95$, $p=0,0043$) com os dados de expressão do *CmAAT1* para melões Gaúcho (figura 32B). O *hexyl propanoate*, outro éster relacionado ao *hexanol*, só foi detectado em melões Gaúcho aos 45 D.A.P.

Figura 32 - Gráfico de correlação de Pearson, utilizando os frutos nos estádios 35 e 45 D.A.P, entre a expressão do gene *CmAAT1* em melões Gaúcho, com os resultados obtidos através dos resultados da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e a área normalizada dos metabólitos *Hexanol* (A) e *hexyl acetate* (B), obtidos pela técnica de SPME GC-MS TOF.

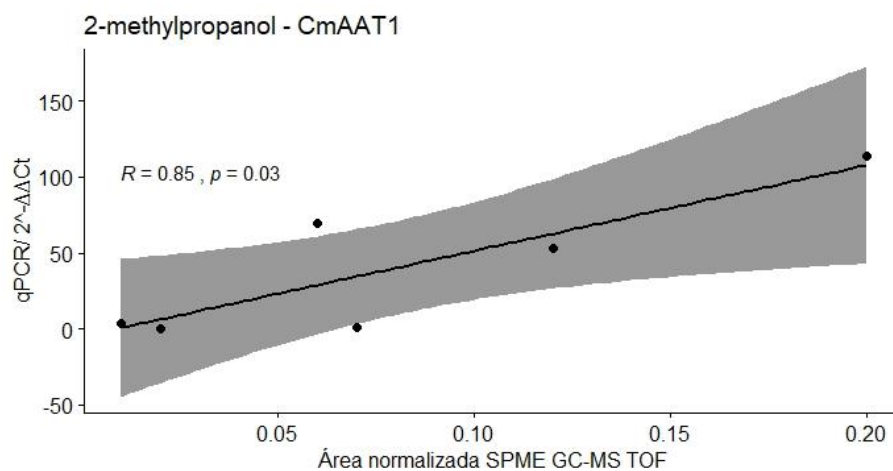


A figura 30D, mostra o comportamento do *octanol* e seu éster resultante, o *octyl acetate*. O *1-octanol* foi notado em todos os estádios das duas variedades estudadas. Em melões Eldorado, apresentou um comportamento crescente entre os estádios 15 e 25 D.A.P, logo decaindo e mantendo este padrão até os 45 D.A.P. Em melões Gaúcho, este metabólito apresentou um padrão crescente ao longo da maturação. O *octyl acetate* só foi detectado nos últimos dois estádios em melões Gaúcho. Nenhum destes compostos apresentou uma correlação significativa com a expressão do *CmAAT1* em nenhum dos genótipos testados.

O (*Z*) 3-Hexen-1-ol, mostrado na figura 30E só foi detectado em melões Gaúcho, e somente aos 35 D.A.P. O (*Z*) 3-hexenyl acetate foi notado nos estádios 15, 35 e 45 D.A.P com um comportamento de aumento entre os dois últimos. Não foi possível identificar uma correlação significativa estatisticamente para nenhum destes dois voláteis nesta variedade.

O 2-methyl propanol, teve sua presença detectada somente em melões Gaúcho, aos 15, 35 e 45 D.A.P (figura 30F). Não foi encontrado em melões Eldorado. O 2-methylbutyl acetate esteve presente em melões Eldorado apenas aos 45 D.A.P e em todos os estádios em melões Gaúcho. O ethyl 2-methylpropanoate, outro éster relacionado ao 2-methyl propanol foi detectado apenas em melões gaúcho e somente nos estádios 15, 35 e 45 D.A.P. Destes compostos, só houve uma correlação significativa com o gene *CmAAT1* o 2-mehtylpropanol ($R=0,85$, $p=0,03$) como apresentado na figura 33.

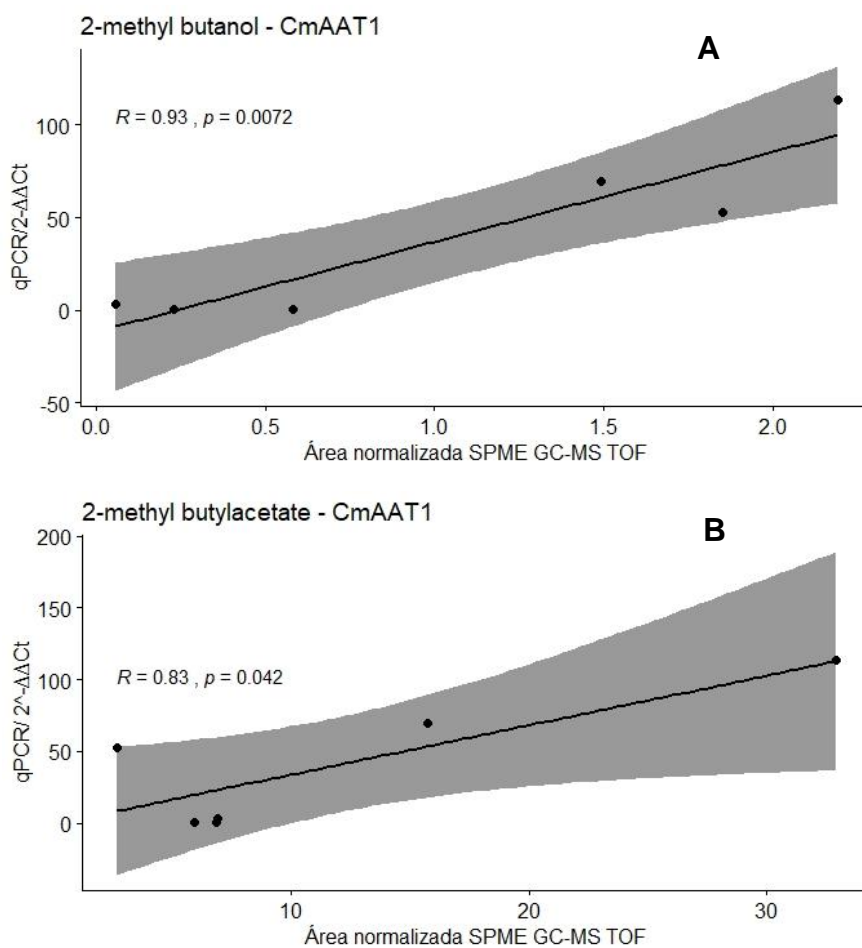
Figura 33 - Gráfico de correlação de Pearson, utilizando os frutos nos estádios 35 e 45 D.A.P, entre a expressão do gene *CmAAT1* em melões Gaúcho, com os resultados obtidos através dos resultados da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e a área normalizada do metabólito 2-methylpropanol obtido pela técnica de SPME GC-MS TOF.



O 2-methylbutanol só teve sua presença identificada em melões gaúcho, e apenas nos estádios mais maduros de 35 e 45 D.A.P. Seus respectivos ésteres 2-mehtylbutyl acetate foi notado em melões Eldorado nos estádios 35 e 45 D.A.P e em melões Gaúcho foi detectado em todos os estádios. O ethyl 2-methylbutanoate, outro éster relacionado a este álcool. Só foi notado em melões da variedade Gaúcho, em todos os estádios exceto

aos 25 D.A.P (figura 30G). Tanto o *2-methylbutanol* quanto o *2-methylbutyl acetate* foram positivamente correlacionados à expressão do gene *CmAAT1* ($R=0,93$, $p=0,0072$ e $R=0,83$, $p=0,042$ respectivamente) neste genótipo, resultado apresentado na figura 34. O *ethyl 2-methylbutanoato* não foi considerado significativo estatisticamente, mas apresentou uma correlação relativamente alta com $R=0,79$ e $p=0,61$.

Figura 34 - Gráfico de correlação de Pearson, utilizando os frutos nos estádios 35 e 45 D.A.P, a expressão do gene *CmAAT1* em melões Gaúcho, com os resultados obtidos através dos resultados da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e a área normalizada dos metabólitos *2-methylbutanol* (A) e *2-methylbutyl acetate* (B) obtidos pela técnica de SPME GC-MS TOF.



O *benzyl alcohol*, mostrado na figura 30H só foi identificado em melões Gaúcho e unicamente no estágio de 45 D.A.P. Seu éster relacionado, o *benzyl acetate* foi notado em melões Eldorado, no estágio mais maduro. Em melões Gaúcho, foi detectado aos 15,

35 e 45 D.A.P. Nenhuma correlação significativa foi encontrada para estes metabólitos em relação ao gene *CmAAT1*.

6 DISCUSSÃO

6.1 COMPOSIÇÃO DE VOLÁTEIS EM MELÕES ELDORADO E GAÚCHO

A quantidade de voláteis detectada foi maior em melões Gaúcho do que em melões Eldorado. Em melões Eldorado a maior quantidade dos voláteis detectados é composta por aldeídos, hidrocarbonetos, cetonas e álcoois. Em melões Gaúcho a maior quantidade de voláteis é composta por ésteres álcoois e aldeídos.

Estes resultados acordam com os dados encontrados em diversos estudos entre melões climatéricos e não-climatéricos que também observaram uma quantidade maior de voláteis totais em melões climatéricos, bem como uma maior quantidade de ésteres que em geral são os compostos responsáveis pelo aroma típico exalado por frutos de melão. Enquanto melões não-climatéricos apresentam em sua composição de voláteis uma maior representatividade em álcoois e aldeídos (EL-SHARKAWY et al., 2005; GONDA et al., 2016; SHALIT et al., 2001).

6.2 *CmLOX9*

O gene *CmLOX9* mostrou em nosso trabalho um padrão de decréscimo do estágio de 35 D.A.P ao estágio de 45 D.A.P de melões Eldorado, mostrando que a expressão desse gene para esta variedade diminui à medida que o processo de maturação avança. Dados semelhantes foram encontrados em análise de dados de RNA-Seq também em melão Amarelo, onde considerando 10 D.A.P e 40 D.A.P os valores de expressão do gene *CmLOX9* são maiores em frutos mais verdes do que em frutos maduros (SCHEMBERGER et al., 2020).

Já em melões Gaúcho, observamos que a expressão se manteve relativamente constante em 35 D.A.P e 45 D.A.P sendo menor que a expressão do Eldorado em ambos os estádios. Esses resultados diferem dos encontrados por Tang et al., (2015) que trabalhando 18 genes de LOX em quatro variedades distintas de melão, duas aromáticas (grupo *makuwa Makino* cultivares Yu Meiren e Cui Bao) e duas não aromáticas (grupo

conomon, cultivar Shao Gua e grupo *flexuosus Naud*, cultivar Cai Gua) observaram que a expressão deste gene foi maior nas cultivares aromáticas. Contudo, neste mesmo estudo este gene não foi considerado como um forte candidato na atuação de VOCs relacionados à qualidade de frutos subentendendo que provavelmente sua expressão, nas quatro variedades por eles estudadas, seja mais relacionada a outros processos metabólicos que ocorrem nos frutos.

Vincenti et al., (2019) apresentam a atuação das 9-LOX na formação de voláteis em plantas como o (*Z*)-3-nonenal, (*E*)-2-nonenal, (*E,Z*)-2,6-nonadienal e conseqüentemente seus respectivos álcoois e ésteres. Em nosso trabalho encontramos uma correlação positiva ($R=0.92$ e $p=0.0095$) entre o composto (*E,Z*)-2,6-nonadienal e a expressão do gene *CmLOX9* em melões Eldorado, indicando que o aumento da atividade da expressão deste gene coincide com um aumento da produção deste metabólito, inferindo assim a possibilidade deste gene estar relacionado à produção deste volátil neste genótipo.

Os demais VOCs relacionados a esta via não apresentaram correlação com o gene em nenhuma das duas variedades estudadas, indicando que provavelmente a formação destes voláteis em melões seja relacionado a outras LOX9 não precisamente à enzima codificada pelo *CmLOX9*.

6.3 *CmLOX18*

No estudo feito por Tang et al., (2015) com quatro variedades de melão diferentes em sua composição aromática, duas que apresentam grande produção de aroma e outras duas que apresentam baixa produção. A expressão do *CmLOX18* foi relativamente constante nas duas cultivares mais aromáticas (grupo *makuwa Makino* cultivares Yu Meiren e Cui Bao) e em uma das cultivares considerada não-aromática (grupo *flexuosus Naud*, cultivar Cai Gua) e foi significativamente superior na outra variedade conhecida por uma baixa quantidade de produção de aroma (grupo conomon, cultivar Shao Gua).

Em nosso estudo os resultados foram distintos dos apresentados por Tang et al., (2015), no genótipo Eldorado a expressão do gene *CmLOX18* foi expressivamente mais

baixa do que em melões aromáticos do genótipo Gaúcho aos 35 D.A.P e não foi possível detectar a expressão deste gene em frutos maduros de Eldorado. Em melões Gaúcho foi possível detectar expressão nos frutos maduros, mesmo que significativamente inferiores aos resultados obtidos aos 35 D.A.P.

Vincenti et al., (2019) mostram que enzimas do tipo 13-LOX atuam na formação de voláteis como o *hexanal*, o *(Z)-3-hexenal* e *(E)-2-hexenal* e seus respectivos álcoois e ésteres em plantas. Tang et al., (2015) indicam o gene *CmLOX18* (que é uma 13-LOX) como um gene que possivelmente atua na formação destes voláteis em melões. Em nosso estudo não identificamos nenhuma correlação significativa destes voláteis com a expressão do gene *CmLOX18* com nenhum dos voláteis anteriormente citados.

A ausência de uma correlação estatisticamente significativa dos voláteis relacionados ao 13-hidroperóxido e o gene *CmLOX18* evidencia que este gene provavelmente não atua de forma expressiva na formação de voláteis em nenhuma das variedades de melão aqui estudadas.

Embora tenha apresentado um valor de correlação um pouco abaixo do padrão utilizado para significância neste trabalho, metabólito *hexanol* apresentou uma correlação negativa considerável com o gene estudado em melões Gaúcho ($R = -0,79$ e $p = 0,062$). Conforme o valor de expressão do gene diminuiu a área detectada deste volátil aumentou. É possível que a expressão do *CmLOX18* de alguma forma iniba a formação deste volátil por apresentar uma atividade supressora em outro gene que codifique uma enzima 13-LOX ou na atividade de outra 13-LOX relacionada à biossíntese deste volátil.

6.4 *CmBCAT1*

As BCATs atuam logo no início da via de degradação de aminoácidos de cadeia ramificada, o que indica que a atuação dessas enzimas tem um potencial de afetar a produção de todos os voláteis derivados destes aminoácidos (GONDA et al., 2016). No trabalho anteriormente citado, os autores concluíram que o gene *CmBCAT1* atua ativamente na biossíntese de voláteis advindos do metabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada em melões.

Em nosso estudo, identificamos que a regulação do gene *CmBCAT1* foi crescente em relação aos dois estádios em melões Gaúcho, sendo significativamente mais baixa em frutos de 35 D.A.P quando comparados com frutos maduros neste tipo de genótipo. A expressão em melões não-climatéricos, embora não tenha sido identificada uma diferença estatística entre os dois estádios, a expressão foi duas vezes maior em melões aos 45 D.A.P. Em frutos maduros, a expressão em melões climatéricos foi significativamente superior do que em frutos não-climatéricos.

Estes resultados são similares aos encontrados por Gonda et al., (2010) que em melões climatéricos da cultivar *Dulce* (climatérica) constatou que a expressão foi consideravelmente mais alta em frutos completamente maduros sendo 90 vezes mais alta se comparado a frutos em 25 D.A.P. No trabalho anteriormente citado foram testadas três cultivares climatéricas (*Dulce*, *Vedrantais*, e *Noy Yizre'el*) e três não-climatéricas (*Tam Dew*, *Rochet* e *Piel De Sapo*) em estádio de maturação completa e em todas as três variedades não climatéricas, a expressão do *CmBCAT1* foi menor do que nos genótipos climatéricos.

Este padrão de expressão reflete nos resultados dos metabólitos formados pelas enzimas codificadas por esse gene. A maior parte dos voláteis referentes à atividade deste gene foram encontrados nos frutos mais maduros de melão Gaúcho. Os dados contidos na literatura também indicam melões climatéricos tendem a ser mais expressivos nos voláteis totais e especialmente em ésteres advindos da degradação de aminoácidos de cadeia ramificada (GONDA et al., 2010; SCHWAB; DAVIDOVICH-RIKANATI; LEWINSOHN, 2008).

De acordo com os dados observados entre os voláteis e a expressão do gene *CmBCAT1* em melões Gaúcho, é possível deduzir que este gene está ativamente envolvido em todas as três vias metabólicas aqui exploradas, as vias de degradação da L-isoleucina, L-leucina e L-valina. Possuindo uma correlação positiva do gene com pelo menos 1 VOC em cada uma das vias.

Na via de catabolismo da L-isoleucina, a correlação foi observada para os voláteis *2-methylbutanol* ($R=0,97$ e $p= 0,0017$) e *ethyl 2-methylbutanoate* ($R=0,91$ e $p=0,013$). No metabolismo da L-leucina, esta correlação significativa foi notada para o VOC *Ethyl 3-*

mehtylbutanoate (R=085 e p=0,033) e na via da L-valina com o metabólito *2-methyl propanol* (R=089 e p=0,018).

Para melões Eldorado, a única via onde houve um dos voláteis positivamente correlacionado à expressão do gene foi a via de degradação da L-isoleucina, com a correlação do metabólito *2-methylbutyl acetate* (R=0,92 e p=0,01), indicando a via de degradação da L-isoleucina como uma provável fonte ativa de voláteis nesta variedade de melões.

6.5 *CmArAT1*

As ArATs atuam especialmente na degradação de L-tirosina e L-fenilalanina formando diversos compostos voláteis (GONDA et al., 2010; LEE; FACCHINI, 2011). (GONDA et al., 2010) comprovou que a expressão do gene *CmArAT1* está diretamente envolvida à biossíntese de *acetaldehyde* e seu respectivo álcool e ésteres, compostos estes advindos da degradação do aminoácido L-fenilalanina, em frutos de melão.

Em nosso trabalho, notamos que a regulação do gene *CmArAT1* foi crescente em melões climatéricos e se manteve constante nos dois estádios estudados em melões Eldorado, havendo neste último uma expressão consideravelmente menor do que no melão gaúcho no estágio de maturação completa.

Nos resultados obtidos por Gonda et al., (2010) houve um padrão equivalente, em cultivares de melão *Dulce* (climatérico) a expressão do gene foi consideravelmente maior em frutos maduros quando comparados a frutos de 25 D.A.P. Também apresentando maior valor de expressão em frutos climatéricos em maturação plena do que em frutos não-climatéricos das cultivares (*Tam Dew*, *Rochet* e *Piel De Sapo*).

Os voláteis conhecidos por resultarem do metabolismo da L-fenilalanina, os ésteres *benzyl acetate* e *2-phenylethyl acetate* apresentaram um padrão de abundância em melões Gaúcho semelhante ao padrão de expressão do gene *CmArAT1*, contudo não foi identificada nenhuma correlação destes voláteis com o gene em questão. Possibilitando o entendimento de que este gene pode não está ligado à formação destes voláteis nos melões aqui estudados.

6.6 *CmPDC1*

PDCs contribuem ativamente na formação de compostos voláteis catalisando a transformação de um cetoácido em um aldeído (SUGIMOTO; JONES; BEAUDRY, 2011; WANG et al., 2019). Por atuarem em uma das primeiras etapas na formação de voláteis, esta enzima tem o potencial de influenciar na formação de vários voláteis derivados de seus substratos.

Wang et al., (2019) identificaram sete substratos nos quais a enzima PDC1 tem o poder de atuação, que são o *pyruvate*, *2-oxobutanoate*, *2-oxopentanoate*, *2-oxohexanoate*, *ketoisocarproate*, *ketomethylvalerate*, *ketoisovalerate*. Neste estudo, foram monitorados o padrão do gene codificador da enzima PDC1 e o padrão destes voláteis, bem como de seus derivados ao longo da maturação nas variedades Eldorado e Gaúcho.

Na correlação de Pearson, realizada para identificar uma possível relação entre o padrão de expressão do gene e a abundância dos voláteis foi possível identificar uma correlação significativa de cinco VOCs com a expressão da *CmPDC1* em melões Gaúcho. Um destes metabólitos foi o *Butyl acetate* ($R=0,95$ e $p=0,0032$) apresentando uma grande probabilidade da atividade da *CmPDC1* estar envolvida na via de degradação do *2-oxobutanoate*.

Foi observada também uma correlação positiva com o *2-methylbutyl acetate* ($R=0,90$ e $p=0,015$), éster resultante do *2-methylbutanol*. Mostrando a possibilidade deste gene atuar ativamente na via de degradação do *ketomethylvalerate* (cetoácido advindo do catabolismo da L-isoleucina) na variedade de melão Gaúcho.

O *2-methylpropanol* ($R=0,83$ e $p=0,04$) apresentou uma alta correlação com os valores de expressão do gene *CmPDC1*, o éster advindo da esterificação deste álcool, o *2-methylpropyl acetate* apresentou também uma correlação positiva com a expressão do gene ($R=0,93$ e $p=0,0064$) mostrando assim a possibilidade deste gene estar relacionado ao ketoisovalerate (cetoácidos advindo do catabolismo da L-valina).

Os resultados obtidos na correlação do gene *CmPDC1* com os voláteis acima mencionados corroboram com os resultados encontrados por (WANG et al., 2019) que

encontraram uma atuação significativa da enzima codificada por este gene em melões climatéricos (grupo *reticulatus*, variedade Q30686).

6.7 *CmADH1*

CmADH1 codifica uma enzima que possui uma ampla atuação na interconversão de vários aldeídos e seus respectivos álcoois. Ela tem uma reportada afinidade por *acetaldehyde* (também conhecido por *ethanal*), catalisando a conversão deste em *ethanol*. É conhecida também a atuação desta enzima na conversão de *butanal* em butanol e de *hexanal* em *hexanol*, embora também atue, de forma menos expressiva, em outros aldeídos (CHEN et al., 2016; MANRÍQUEZ et al., 2006).

O gene *CmADH1*, em melões climatéricos e fortemente aromáticos (grupo makuwa Makino, cultivar Cai Hong) apresentou uma tendência crescente ao longo da maturação (CHEN et al., 2016), o mesmo foi observado em melões climatéricos (grupo *Cantalupensis*, variedade védrantais) onde também houve uma tendência crescente até até o estágio de maturação completa decaindo à medida que a concentração de etileno elevada pela alta respiração diminui (MANRÍQUEZ et al., 2006).

Apenas um dos voláteis acima citados apresentou correlação significativa com o gene *CmADH1* em melões Eldorado, o *hexanol* ($R=0,84$ e $p=0,036$) indicando assim a relação da atividade deste gene na biossíntese deste álcool.

Em melões Gaúcho, também apenas um volátil apresentou uma correlação significativa com o gene *CmADH1*, o álcool *2-methylbutanol*, que mostrou uma correlação negativa com a atividade do gene ($R= -0,8$ e $p= 0,058$) em melões Gaúcho, o valor de p foi um pouco maior do que o considerado relevante neste estudo, mas por conta do valor de correlação ser alto decidimos destacar esse volátil como relevante.

Esta correlação negativa indica que a redução da expressão do *CmADH1* possibilita o aumento do conteúdo do *2-methylbutanol*, provavelmente a biossíntese deste volátil é atribuída a alguma outra ADH e a expressão do gene que codifica a ADH1 possua uma ação inibitória na atividade de outras ADHs que possuem maior afinidade pelo *2-methylbutanal*.

Os padrões apresentados pelos demais VOCs relacionados à atividade desta enzima não exibiram uma relação visível à expressão do gene *CmADH1*, com exceção do *hexanal* e *benzaldehyde*, mas embora sejam semelhantes em padrão, não apresentaram uma correlação significativa com os valores do *CmADH1*. Indicando que estes voláteis provavelmente advêm da atividade de outras ADHs nas variedades estudadas.

6.8 *CmAAT1*

Em nosso trabalho os resultados encontrados para a expressão do gene *CmAAT1* foram ascensão ao longo da maturação tanto para melões Eldorado como para Gaúcho. Em melões Eldorado, contudo, embora a média dos valores de expressão tenham sido 30 vezes maior em melões maduros, não houve diferença estatística entre os dois estádios dessa variedade. Considerando os dois genótipos de melão no estágio de maturação completa observamos que a expressão do *CmAAT1* em frutos não-climatéricos foi significativamente menor se comparada à de frutos climatéricos no mesmo estágio.

Os resultados obtidos para o Gaúcho, foram semelhantes aos encontrados por El-Sharkawy et al., (2005) também em melões climatéricos (grupo. *Cantalupensis*, variedade *Védrantais*) onde a expressão deste gene foi de ascensão ao longo da maturação. Estes resultados confirmam o que é apresentado na literatura de que o acúmulo de ésteres voláteis totais ocorre em frutos maduros e que são fortemente correlacionados à produção de etileno (FLORES et al., 2002; SHALIT et al., 2001). Em melões não-climatéricos, a formação total de ésteres é bem menor que em frutos climatéricos o que faz com que eles sejam, em geral, classificados como pouco aromáticos ou não aromáticos (CHEN et al., 2016).

O gene *CmAAT1* é relacionado à esterificação de diversos álcoois como o 1-*Butanol*, *Hexanol*, *Heptanol*, *Octanol*, *(Z)-2-hexen-1-ol*, *(E)-2-hexen-1-ol*, *(Z)-3-hexen-1-ol*, *(E)-3-hexen-1-ol*, *2-Methylpropanol*, *2-Methylbutanol*, *3-Methylbutanol*, *Benzyl alcohol* dentre outros (EL-SHARKAWY et al., 2005).

Analisando o padrão destes álcoois e seus respectivos ésteres, notou-se grande semelhança com o padrão de expressão do *CmAAT1* em melões climatéricos. Uma correlação de Pearson, feita tanto para os álcoois quanto para seus respectivos ésteres mostraram que muitos dos voláteis acima mencionados como relacionados à atividade da enzima codificada pelo *CmAAT1* apresentaram uma correlação positiva com a expressão do gene em melões Gaúcho. Estes metabólitos foram o *ethanol* (R=0,91 e p=0,011); o *hexanol* (R=0,96 e p=0,0024) e seu éster *hexyl acetate* (R=0,95 e p=0,0043); o *2-methylpropanol* (R=0,85 e p=0,03); o *2-methyl butanol* (R=0,93 e p=0,0072) e seu éster *2-methylbutyl acetate* (R=0,83 e p=0,042).

Estes resultados demonstram a alta probabilidade do gene *CmAAT1* estar intimamente envolvido com a biossíntese destes voláteis na variedade de melões Gaúcho. Para melões Eldorado, não foi possível traçar nenhuma correlação significativa com nenhum dos voláteis relacionados à atuação deste gene.

7 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi trazida pela primeira vez a expressão de genes que atuam na formação VOC's em melões Gaúcho e Eldorado ('Amarelo'), o último representa a cultivar mais expressiva na produção nacional desta espécie. Foi possível traçar o padrão de sete genes relacionados à biossíntese de VOCs.

Foi possível encontrar correlação destes genes com diversos voláteis. O gene *CmLOX9* apresentou uma correlação significativamente apenas com o volátil (*E,Z*)-2,6-*nonadienal* em melões Eldorado. E nenhuma correlação significativa em melões Gaúcho. Para o gene *CmLOX18* não houve correlação considerada significativa com nenhum dos voláteis testados, contudo houve uma correlação negativa *hexanol* com um valor bem próximo ao considerado como valor de corte para significância neste trabalho, sugerindo análises futuras para avaliar a interação deste metabólito com o gene em questão.

Quanto ao *CmBCAT1* foram encontrados quatro metabólitos positivamente correlacionados em melões Gaúcho, o *2-methylbutanol*, *ethyl 2-methylbutanoate*, *2-methyl propanol* e *ethyl 3-mehtylbutanoate*; e um volátil em melões Eldorado, o *2-methylbutyl acetate*. Não houve nenhuma relação entre os o gene *CmArAT1* e os voláteis relacionados à sua atividade em nenhum dos dois genótipos aqui estudados. O gene *CmPDC1* apresentou em melões Gaúcho uma correlação positiva com cinco voláteis, o *butyl acetate*, *2-methylbutyl acetate*, *2-methylpropanol* e *2-methylpropyl acetate*

Dos metabólitos relacionados à atividade do gene *CmADH1* apenas o *hexanol* apresentou uma correlação positiva com a expressão do gene em melões Eldorado. em melões Gaúcho houve uma correlação negativa com o *2-mehtylbutanol* em melões Gaúcho, indicando que a atuação deste gene provavelmente iniba a produção deste volátil. O gene *CmAAT1* teve uma correlação positiva com os metabólitos *ethanol*, *hexanol*, *hexyl acetate*, *2-mehtylpropanol* e *2-methylbutyl acetate* em melões Gaúcho.

As correlações positivas encontradas indicam uma possibilidade dos genes estarem de fato ligados à biossíntese dos voláteis correlacionados, fazendo necessário análises enzimáticas para a comprovação do efeito das enzimas codificadas por estes genes nos referidos voláteis. As correlações negativas indicam uma interação de inibição

entre as enzimas codificadas pelos genes e a produção dos metabólitos negativamente correlacionados, sugerindo um estudo aprofundado de investigação das causas que possam causar essas interações.

Como esta é a primeira vez que um estudo com base genética e metabólica é feito em melão 'Amarelo' e Gaúcho, estas informações permitem um olhar panorâmico em como trabalham os mecanismos responsáveis por conferir o aroma nestas variedades e promovem informações valiosas para a aplicação em estudos de melhoria de atributos de qualidade, tornando estes frutos mais atrativos aos consumidores e gerando grande visibilidade ao Brasil no cenário mundial com sua produção.

REFERÊNCIAS

ANDERSEN, B. V.; BROCKHOFF, P. B.; HYLDIG, G. The importance of liking of appearance, -odour, -taste and -texture in the evaluation of overall liking. A comparison with the evaluation of sensory satisfaction. **Food Quality and Preference**, v. 71, p. 228–232, jan. 2019.

BAPAT, V. A. et al. Ripening of fleshy fruit: molecular insight and the role of ethylene. **Biotechnology advances**, v. 28, n. 1, p. 94–107, 2010.

BAUCHOT, A. D. et al. Effect of Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid Oxidase Antisense Gene on the Formation of Volatile Esters in Cantaloupe Charentais Melon (Cv. Védrandais). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 11, p. 4787–4792, nov. 1998.

BUCHER, M. et al. Aerobic fermentation in tobacco pollen. **Plant molecular biology**, v. 28, n. 4, p. 739–750, 1995.

BURGER, Y. et al. 3 Genetic Diversity of Cucumis Melo. **Horticultural reviews**, v. 36, n. 1, 2010.

CAMPOS, G. S. DE et al. High-quality total RNA isolation from melon (*Cucumis melo* L.) fruits rich in polysaccharides. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 4, p. 2201, 4 ago. 2017.

CHEN, H. et al. The Relationship between CmADHs and the Diversity of Volatile Organic Compounds of Three Aroma Types of Melon (*Cucumis melo*). **Frontiers in Physiology**, v. 7, 28 jun. 2016.

CHERVIN, C.; TRUETT, J. K.; SPEIRS, J. Alcohol dehydrogenase expression and alcohol production during pear ripening. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 124, n. 1, p. 71–75, 1999.

DE OLIVEIRA, F. et al. A cultura do melão. **Embrapa Agroindústria Tropical-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2017.

DEFILIPPI, B. G.; KADER, A. A.; DANDEKAR, A. M. Apple aroma: alcohol acyltransferase, a rate limiting step for ester biosynthesis, is regulated by ethylene. **Plant Science**, v. 168, n. 5, p. 1199–1210, maio 2005.

DICKINSON, J. R.; SALGADO, L. E. J.; HEWLINS, M. J. The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 10, p. 8028–8034, 2003.

EL-SHARKAWY, I. et al. Functional characterization of a melon alcohol acyl-transferase gene family involved in the biosynthesis of ester volatiles. Identification of the crucial role

of a threonine residue for enzyme activity. **Plant molecular biology**, v. 59, n. 2, p. 345–362, 2005.

ESPINO-DÍAZ, M. et al. Biochemistry of apple aroma: A review. **Food technology and biotechnology**, v. 54, n. 4, p. 375–394, 2016.

FEUSSNER, I.; WASTERACK, C. The lipoxygenase pathway. **Annual review of plant biology**, v. 53, n. 1, p. 275–297, 2002.

FLORES, F. et al. Role of ethylene in the biosynthetic pathway of aliphatic ester aroma volatiles in Charentais Cantaloupe melons. **Journal of experimental botany**, v. 53, n. 367, p. 201–206, 2002.

GALAZ, S. et al. Structural analysis of the alcohol acyltransferase protein family from *Cucumis melo* shows that enzyme activity depends on an essential solvent channel. **FEBS Journal**, v. 280, n. 5, p. 1344–1357, mar. 2013.

GALPAZ, N. et al. Deciphering genetic factors that determine melon fruit-quality traits using RNA-Seq-based high-resolution QTL and eQTL mapping. **The Plant Journal**, v. 94, n. 1, p. 169–191, 2018.

GAO, X. et al. Disruption of a Maize 9-Lipoxygenase Results in Increased Resistance to Fungal Pathogens and Reduced Levels of Contamination with Mycotoxin Fumonisin. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 8, p. 922–933, ago. 2007.

GONDA, I. et al. Branched-chain and aromatic amino acid catabolism into aroma volatiles in *Cucumis melo* L. fruit. **Journal of experimental botany**, v. 61, n. 4, p. 1111–1123, 2010.

GONDA, I. et al. Biosynthesis and perception of melon aroma. **Biotechnology in Flavor Production**, p. 281–305, 2016.

GUO, X. (ED.). **Advances in Gas Chromatography**. [s.l.] InTech, 2014.

HAVKIN-FRENKEL, D.; DUDAI, N. **Biotechnology in flavor production**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2016.

HUANG, F.-C.; SCHWAB, W. Cloning and characterization of a 9-lipoxygenase gene induced by pathogen attack from *Nicotiana benthamiana* for biotechnological application. **BMC Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 30, dez. 2011.

HUANG, F.-C.; STUDART-WITKOWSKI, C.; SCHWAB, W. Overexpression of hydroperoxide lyase gene in *Nicotiana benthamiana* using a viral vector system: Overexpression of HPL. **Plant Biotechnology Journal**, v. 8, n. 7, p. 783–795, set. 2010.

JIN, Y. et al. The alcohol dehydrogenase gene family in melon (*Cucumis melo* L.): bioinformatic analysis and expression patterns. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 670, 2016.

JORDÁN, M. J.; SHAW, P. E.; GOODNER, K. L. Volatile components in aqueous essence and fresh fruit of *Cucumis melo* cv. Athena (muskmelon) by GC-MS and GC-O. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 12, p. 5929–5933, 2001.

JU, L. et al. An oriental melon 9-lipoxygenase gene CmLOX09 response to stresses, hormones, and signal substances. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B**, v. 19, n. 8, p. 596–609, ago. 2018.

KIRKBRIDE, J. H. **Biosystematic monograph of the genus *Cucumis* (Cucurbitaceae): botanical identification of cucumbers and melons**. [s.l.] Parkway Publishers, Inc., 1993.

KLEE, H. J. Improving the flavor of fresh fruits: genomics, biochemistry, and biotechnology: Tansley review. **New Phytologist**, v. 187, n. 1, p. 44–56, jul. 2010.

KONG, Q. et al. Assessment of suitable reference genes for quantitative gene expression studies in melon fruits. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 1178, 2016.

LAMIKANRA, O. **Fresh-cut fruits and vegetables science, technology, and market**. Boca Raton, Fla.: CRC Press, 2002.

LEE, E.-J.; FACCHINI, P. J. Tyrosine Aminotransferase Contributes to Benzylisoquinoline Alkaloid Biosynthesis in Opium Poppy. **Plant Physiology**, v. 157, n. 3, p. 1067–1078, nov. 2011.

LIAVONCHANKA, A.; FEUSSNER, I. Lipoxygenases: Occurrence, functions and catalysis. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, n. 3, p. 348–357, fev. 2006.

LIU, L.; KAKIHARA, F.; KATO, M. Characterization of six varieties of *Cucumis melo* L. based on morphological and physiological characters, including shelf-life of fruit. **Euphytica**, v. 135, n. 3, p. 305, 2004.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.

LONGHURST, T. et al. Structure of the tomato *Adh2* gene and *Adh2* pseudogenes, and a study of *Adh2* gene expression in fruit. **Plant Molecular Biology**, v. 26, n. 4, p. 1073–1084, nov. 1994.

MANRÍQUEZ, D. et al. Two highly divergent alcohol dehydrogenases of melon exhibit fruit ripening-specific expression and distinct biochemical characteristics. **Plant molecular biology**, v. 61, n. 4–5, p. 675, 2006.

OBANDO-ULLOA, J. M. et al. Aroma volatiles associated with the senescence of climacteric or non-climacteric melon fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 52, n. 2, p. 146–155, maio 2009a.

OBANDO-ULLOA, J. M. et al. Discrimination of climacteric and non-climacteric melon fruit at harvest or at the senescence stage by quality traits. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, n. 10, p. 1743–1753, 15 ago. 2009b.

OHTA, K. et al. Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 57, n. 4, p. 893–900, 1991.

PANG, X. et al. Identification of aroma-active compounds in Jiashi muskmelon juice by GC-O-MS and OAV calculation. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 17, p. 4179–4185, 2012.

PARIS, H.; TADMOR, Y.; SCHAFFER, A. Cucurbitaceae melons, squash, cucumber. 2017.

PECH, J.-C.; BOUZAYEN, M.; LATCHÉ, A. Climacteric fruit ripening: ethylene-dependent and independent regulation of ripening pathways in melon fruit. **Plant Science**, v. 175, n. 1–2, p. 114–120, 2008.

PITRAT, M. Melon. In: **Vegetables I**. [s.l.] Springer, 2008. p. 283–315.

PITRAT, M.; HANELT, P.; HAMMER, K. **Some comments on infraspecific classification of cultivars of melon**. . In: VII EUCARPIA MEETING ON CUCURBIT GENETICS AND BREEDING 510. 2000

PORTA, H.; ROCHA-SOSA, M. Plant Lipoxygenases. Physiological and Molecular Features. **Plant Physiology**, v. 130, n. 1, p. 15–21, 1 set. 2002.

SALADIÉ, M. et al. Comparative transcriptional profiling analysis of developing melon (*Cucumis melo* L.) fruit from climacteric and non-climacteric varieties. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 440, 2015.

SARNO-MANCHADO, P.; VERRIÈS, C.; TESNIÈRE, C. Molecular characterization and structural analysis of one alcohol dehydrogenase gene (GV-Adh1) expressed during ripening of grapevine (*Vitis vinifera* L.) berry. **Plant Science**, v. 125, n. 2, p. 177–187, 1997.

SCHAFFER, R. J. et al. A genomics approach reveals that aroma production in apple is controlled by ethylene predominantly at the final step in each biosynthetic pathway. **Plant Physiology**, v. 144, n. 4, p. 1899–1912, 2007.

SCHEMBERGER, M. O. et al. Transcriptome profiling of non-climacteric 'yellow' melon during ripening: insights on sugar metabolism. **BMC Genomics**, v. 21, n. 1, p. 262, dez. 2020.

SCHWAB, W.; DAVIDOVICH-RIKANATI, R.; LEWINSOHN, E. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. **The plant journal**, v. 54, n. 4, p. 712–732, 2008.

SHALIT, M. et al. Acetyl-CoA: alcohol acetyltransferase activity and aroma formation in ripening melon fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 2, p. 794–799, 2001.

SILVA, M. et al. Olive Oil Composition: Volatile Compounds. In: [s.l.: s.n.].

SINGH, R. K. et al. Differential expression of the mango alcohol dehydrogenase gene family during ripening. **Phytochemistry**, v. 71, n. 13, p. 1485–1494, set. 2010.

STROMMER, J. The plant ADH gene family: The plant ADH gene family. **The Plant Journal**, v. 66, n. 1, p. 128–142, abr. 2011.

SUGIMOTO, N.; JONES, A. D.; BEAUDRY, R. Changes in free amino acid content in 'Jonagold' apple fruit as related to branched-chain ester production, ripening, and senescence. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 136, n. 6, p. 429–440, 2011.

TADEGE, M.; DUPUIS, I.; KUHLEMEIER, C. Ethanol fermentation: new functions for an old pathway. **Trends in plant science**, v. 4, n. 8, p. 320–325, 1999.

TANG, Y. et al. The effect of CmLOXs on the production of volatile organic compounds in four aroma types of melon (*Cucumis melo*). **PLoS One**, v. 10, n. 11, p. e0143567, 2015.

TIJET, N. et al. Biogenesis of volatile aldehydes from fatty acid hydroperoxides: molecular cloning of a hydroperoxide lyase (CYP74C) with specificity for both the 9- and 13-hydroperoxides of linoleic and linolenic acids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 386, n. 2, p. 281–289, 2001.

TONFACK, L. B. et al. The plant SDR superfamily: involvement in primary and secondary metabolism. **Plant Biology**, v. 1, 2006.

VINCENTI, S. et al. Biocatalytic Synthesis of Natural Green Leaf Volatiles Using the Lipoxygenase Metabolic Pathway. **Catalysts**, v. 9, n. 10, p. 873, 22 out. 2019.

WANG, M. et al. PDC 1, a pyruvate/ α -ketoacid decarboxylase, is involved in acetaldehyde, propanal and pentanal biosynthesis in melon (*Cucumis melo* L.) fruit. **The Plant Journal**, v. 98, n. 1, p. 112–125, 2019.

YVON, M.; RIJNEN, L. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 4–7, p. 185–201, 2001.

ZHANG, B. et al. Expression of Genes Associated with Aroma Formation Derived from the Fatty Acid Pathway during Peach Fruit Ripening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 10, p. 6157–6165, 26 maio 2010.

ZHANG, C. et al. Melon13-lipoxygenase CmLOX18 may be involved in C6 volatiles biosynthesis in fruit. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 2816, dez. 2017.

APÊNDICE A - TABELA COM VOCS DETECTADOS EM MELÕES ELDORADO E GAÚCHO E SUAS RESPECTIVAS ÁREAS RELATIVAS.

Área relativa dos compostos											
N	Nome	Grupo Químico	15 D.A.P El Dorado	15 D.A.P Gaúcho	25 D.A.P El Dorado	25 D.A.P Gaúcho	35 D.A.P El Dorado	35 D.A.P Gaúcho	45 D.A.P El Dorado	45 D.A.P Gaúcho	p-value (ANOVA entre estádios e variedades)
1	Ethyl-2-methylbutanoate	Ester - Cadeia Ramificada	0	0.02522	0	0	0	1.674	0	59.3	0.06
2	Ethyl butanoate	Ester - Cadeia Linear	0	0.05995	0.002111	0.01522	0	2.436	0	41.93	ns
3	2-Methylbutyl acetate	Ester - Cadeia Ramificada	0.003785	0.804	0.005766	0.07218	0.00965	10.21	0.2288	41.13	ns
4	Ethyl propanoate	Ester - Cadeia Linear	0	0.06437	0	0	0	1.36	0	29.59	0.058
5	Ethyl acetate	Ester - Cadeia Linear	0	0.2294	0	0.01844	0.1791	0.6427	0.0378	27.55	ns
6	Hexyl acetate	Ester - Cadeia Linear	0.00356	0.0634	0	0	0	1.379	0.00527	26.46	ns
7	Hexanal	Aldeído	13.94	6.001	9.701	9.631	5.41	4.459	3.337	18.43	ns
8	(Z)-3-Hexenyl acetate	Ester - Cadeia Linear	0.002957	0.003172	0	0	0	0.6761	0	17.14	ns
9	Unknown 1	Desconhecido	0	0.007974	0.4651	0	0.3549	0	0.0005594	16.07	ns
10	Isobutyl acetate	Ester - Cadeia Ramificada	0.001745	1.48	0	0.1251	0.004462	4.622	0.3246	15.39	ns
11	Methyl 2-methylbutanoate	Ester - Cadeia Ramificada	0	0	0	0	0	0.2978	0.1717	11.13	ns
12	Ethyl 3-methylbutanoate	Ester - Cadeia Ramificada	0	0	0	0	0	0.01579	0	10.71	ns
13	Methyl butanoate	Ester - Cadeia Linear	0	0.1482	0	0	0	0.4857	0.004868	9.929	0.022
14	Butyl acetate	Ester - Cadeia Linear	0	0.2021	0	0	0	4.859	0.007688	9.803	ns
15	S-Methyl 3-methylbutanethioate	Composto sulfuroso	0	0	0	0	0	0.5315	0.02669	9.238	ns
16	Methyl acetate	Ester - Cadeia Linear	0	0.08093	0	0.07013	0.01066	0.4632	0.1946	7.812	ns
17	Heptanal	Aldeído	1.239	0.8172	1.283	2.935	2.147	1.321	1.303	7.696	ns
18	Ethyl hexanoate	Ester - Cadeia Linear	0	0	0	0	0	0.2722	0	7.591	0.083
19	Ethyl 2-methylpropanoate	Ester - Cadeia Ramificada	0	0.01049	0	0	0	0.3909	0	7.576	0.018
20	1-Hexanol	Álcool	0.005656	0.01182	0.01382	0.03873	0.01378	0.122	0.01802	6.844	ns
21	Pentyl acetate	Ester - Cadeia Linear	0	0.02474	0	0	0	0.4192	0	6.646	0.022
22	2-Ethyl-2-hexen-1-ol	Álcool	0.5883	0.7176	0.4154	0.5842	0.4289	0.1928	0.348	5.432	0.033
23	Unknown 2	Desconhecido	0.00629	0.005985	0.01868	0	0	0	0.01336	5.367	ns
24	n-Propyl acetate	Ester - Cadeia Linear	0	0.1224	0	0.02505	0.003771	1.646	0.01852	5.22	ns
25	Dimethyl disulfide	Composto sulfuroso	0.2699	0.1305	0.4483	0.08748	0.7252	0.5816	0.7326	4.421	ns
26	2-Methylbutanol	Álcool	0	0.03127	0	0	0	0.2193	0	4.315	0.017
27	Pentanal	Aldeído	2.25	1.374	3.164	5.012	1.754	1.041	0.57	3.514	0.089
28	1,3,5-Cycloheptatriene	Hidrocarboneto	0.03909	0.02214	0.01269	0.01705	0.005724	0.01068	0.02519	3.108	ns
29	Phenylmethyl acetate	Ester - Cadeia Ramificada	0	0.00988	0	0	0	0.0522	0.05453	3.062	ns
30	2-Methoxy ethanamine	Composto nitrogenado	0	0	0	0	0	0	0	2.962	ns
31	2-Methyl-2-butenyl acetate	Ester - Cadeia Ramificada	0	0	0	0	0	0.06522	0	2.937	ns
32	Propyl propanoate	Ester - Cadeia Linear	0	0.0809	0	0	0	0.6582	0	2.868	ns
33	Methyl thiolacetate	Composto sulfuroso	0	0	0	0	0	0.02148	0	2.295	ns
34	(Z,Z)-2,4-Hexadiene	Hidrocarboneto	0	0	0	0	0	0.00569	0	2.004	ns
35	Butyl propanoate	Ester - Cadeia Linear	0	0.02425	0.005129	0	0	0.1269	0	1.999	<0.001
36	Octanal	Aldeído	1.088	0.3781	0.9616	0.9683	0.8447	0.5202	0.1689	1.838	ns
37	Nonanal	Aldeído	0.8044	0.3569	0.8865	1.008	0.5718	0.4567	0.2598	1.706	ns
38	E)-6,10-Dimethyl-5,9-undecadien-2-one	Cetona	0	0.1908	0	0.2558	0	0.295	0.00345	1.685	ns
39	(E)-2-Octenal	Aldeído	0.7448	0.3522	0.7952	1.796	0.6817	0.4663	0.2987	1.622	ns
40	Ethyl pentanoate	Ester - Cadeia Linear	0	0	0	0	0	0.09071	0	1.569	ns
41	(Z)-3-Hexen-1-ol	Álcool	0	0	0	0	0	0.01991	0	1.559	0.004
42	1-Octanamine	Composto nitrogenado	0	0	0	0	0.004691	0	0	1.423	ns
43	n-Hexane	Hidrocarboneto	0.007941	0.3836	0.01181	0.2918	0.05835	0.2622	0.03411	1.414	ns
44	Ethanol	Álcool	0	0.001759	0	0	0.002101	0.03676	0	1.404	0.072
45	2-Methylpropyl butanoate	Ester - Cadeia Ramificada	0	0.002693	0	0	0	0.07129	0	1.392	0.081

46	Dimethyl trisulfide	Composto sulfuroso	0.1087	0.09305	0.166	0.1371	0.2365	0.1759	0.3327	1.388	ns
47	Ethyl methylthioacetate	Composto sulfuroso	0	0	0	0	0	0.09123	0	1.336	ns
48	(Z)-3-Methyl-2-pentene	Hidrocarboneto	1.138	0.4581	1.322	2.095	1.478	0.8242	0.4162	1.263	ns
49	Isobutane	Hidrocarboneto	0	0.001949	0	0	0	0	0	1.239	ns
50	Unknown 10	Desconhecido	0	0	0.005926	0	0	0	0	1.225	ns
51	(E)-2-Nonenal	Aldeído	0.6052	0.2139	0.4613	0.7989	0.4323	0.409	0.2984	1.22	0.021
52	Unknown 6	Desconhecido	0.001721	0	0.5869	0	0	0	0	1.184	<0.001
53	Carbon disulfide	Composto sulfuroso	0.02211	0.1166	0.01733	0.1494	0.03834	0.1091	0.06208	1.177	0.077
54	Unknown 4	Desconhecido	0	0	0	0	0.6337	0.00453	0	1.166	ns
55	Unknown 7	Desconhecido	0	0	0	0.5115	0	0	0.001744	1.114	0.073
56	Methyl propionate	Ester - Cadeia Linear	0	0.07534	0	0.01093	0	0.1314	0.05452	1.109	ns
57	6-Methyl-5-hepten-2-one	Cetona	0.03349	0.119	0.03231	0.2009	0.02268	0.1509	0.01436	1.063	ns
58	Cyclobutanol	Álcool	0	0.006232	0	0.00352	0	0.01906	0	1.006	ns
59	Benzaldehyde	Aldeído	0.1979	0.07867	0.2177	0.2317	0.1254	0.1026	0.07826	0.9912	ns
60	2-Ethylfuran	Furan	0.6642	0.422	0.6446	0.7567	0.4461	0.2302	0.3232	0.9806	ns
61	(E)-2-Pentenal	Aldeído	0.03425	0.0866	0.315	0.3391	0.1825	0.07295	0.1126	0.9356	ns
62	(E)-2-Methyl-2-butenal	Aldeído	0	0.02176	0	0	0	0.02432	0	0.9348	ns
63	2-Methylpropyl propionate	Ester - Cadeia Ramificada	0	0.1685	0	0	0	0.3039	0	0.9068	ns
64	(E)-2-Heptenal	Aldeído	0.7953	0.3508	0.7853	1.098	0.646	0.3854	0.3861	0.8187	0.039
65	4-Amino-1-butanol	Composto nitrogenado	0	0.01323	0	0	0	0.03611	0	0.7704	0.013
66	S-Methyl butanethioate	Composto sulfuroso	0	0.01185	0	0	0	0.07568	0.0165	0.7586	ns
67	1-Octanol	Álcool	0.1487	0.0437	0.1404	0.3514	0.09707	0.08659	0.04667	0.7482	ns
68	1-Butanol	Álcool	0	0.002744	0	0.00598	0	0.0139	0	0.723	0.059
69	Unknown 11	Desconhecido	0.4685	0	0	0	0.002718	0	0	0.699	ns
70	2-Methylpropyl butanoate	Ester - Cadeia Ramificada	0	0.03656	0	0	0	0.1234	0	0.6915	0.059
71	1-Methylbutyl propionate	Ester - Cadeia Linear	0	0	0	0	0	0	0	0.6593	ns
72	Methyl isobutanoate	Ester - Cadeia Ramificada	0	0.02845	0	0	0	0.08373	0.02357	0.6398	0.022
73	Ethylene oxide	Oxygenated Hidrocarbonetos	0	0	0	0	0	0	0	0.6294	ns
74	1-Isocyanobutane	Composto nitrogenado	0	0	0	0	0	0.0146	0	0.6011	ns
75	Unknown 17	Desconhecido	0	0	0.01759	0	0	0	0	0.5872	ns
76	s-Bulyl acetate	Ester - Cadeia Linear	0	0	0	0	0	0	0	0.5622	ns
77	1-Penten-3-one	Cetona	0.6888	0.38	0.6976	0.6065	0.4089	0.2133	0.1905	0.561	0.1
78	Unknown 14	Desconhecido	0	0.3164	0	0	0	0	0.03611	0.5469	ns
79	Butyl butanoate	Ester - Cadeia Linear	0	0.001237	0	0	0	0.02362	0	0.5273	ns
80	Unkown 18	Desconhecido	0	0.00217	0.002053	0	0.01041	0.00789	0.003123	0.524	ns
81	β -Cyclocitral	Terpenóides	0	0.08232	0	0.09738	0	0.05586	0	0.5182	ns
82	Acetone	Cetona	0.02167	0.02479	0.0184	0.06316	0.03106	0.00731	0.009765	0.5069	ns
83	5-Methyl-2-heptanone	Cetona	0.2331	0.1226	0.9217	0.3093	0.5747	0.0947	0.00261	0.4932	ns
84	1,4-Pentadiene	Hidrocarboneto	0	0.001591	0.004901	0	0.002986	0.04278	0	0.4848	ns
85	2-Phenylethyl acetate	Ester - Cadeia Ramificada	0	0.004929	0	0	0	0.0178	0	0.4607	ns
86	2-Methyl butanal	Aldeído	0.00707	0	0	0	0	0.00717	0.01369	0.4546	ns
87	2-Methylallyl acetate	Ester - Cadeia Ramificada	0	0.01553	0	0	0	0.06297	0	0.4503	0.003
88	Propyl butanoate	Ester - Cadeia Linear	0	0	0	0	0	0.3136	0	0.443	ns
89	Methyl hexanoate	Ester - Cadeia Linear	0	0	0	0	0	0.01258	0	0.4224	ns
90	(E)-2-Hexenal	Aldeído	0.2688	0.08635	0.3223	0.1596	0.1436	0.1129	0.1298	0.417	ns
91	3,4,5,6-Tetramethyl-2,5-octadiene,	Hidrocarboneto	0.0264	0.01418	0.01915	0.03867	0.0212	0	0.01708	0.4156	ns
92	2,4-Diacetoxypentane	Oxygenated Hidrocarbonetos	0	0	0	0	0	0.00764	0	0.4131	0.065
93	2-Oxopropanoic acid	Ácido	0	0	0	0.02649	0	0	0	0.4123	ns
94	3-Methyl-3-butenyl acetate	Ester - Cadeia Ramificada	0	0	0	0	0	0.0181	0.0006544	0.411	ns
95	(E)-Ethyl-3-hexenoate	Ester - Cadeia Linear	0	0	0	0	0	0.01105	0	0.4031	ns

96	3-Heptanone	Cetona	0.05174	0.04835	0.04108	0.03202	0.0317	0.01103	0.02387	0.3956	ns
97	2-Methylpropyl 2-methylpropanoate	Ester - Cadeia Ramificada	0	0.02279	0	0	0	0.05053	0	0.3936	ns
98	2-Methyl-3-pentanone	Cetona	0.5497	0.2673	0.6146	0.599	0.4571	0.2741	0.1321	0.3794	ns
99	2-Methyl-1-Propanol	Álcool	0	0.008408	0	0	0	0.02785	0	0.3754	ns
100	(E,E)-2,4-Heptadienal	Aldeido	0.2028	0.08783	0.2053	0.3445	0.1179	0.09181	0.06355	0.3733	ns
101	Decanal	Aldeido	0.289	0.1461	0.2631	0.3305	0.2168	0.1502	0.09665	0.3663	0.09
102	Unknown 5	Desconhecido	0.5426	0	0	0	0.3931	0.03805	0.4652	0.3642	ns
103	Thiopivalic acid	Composto sulfuroso	0	0.06426	0	0	0	0.1763	0	0.3226	ns
104	alpha-Ionone	Isoprenoid	0	0.04722	0	0.05512	0	0.04634	0	0.3008	ns
105	Benzene	Hidrocarboneto	0.1064	0.1023	0.1653	0.2332	0.08337	0.04761	0.05181	0.2508	ns
106	2-Heptanone	Cetona	0.05709	0.02699	0.0812	0.1027	0.05655	0.01871	0.02916	0.2227	ns
107	Octane	Hidrocarboneto	0.1146	0.04843	0.2024	0.1629	0.1265	0.05799	0.04382	0.1967	ns
108	(R,S)-5-Ethyl-6-methyl-3E-hepten-2-one	Cetona	0.2365	0.1022	0.2545	0.3806	0.175	0.1216	0.05197	0.1946	ns
109	1-Octen-3-ol	Álcool	0.3062	0.1251	0.4346	1.419	0.2588	0.1497	0.08524	0.156	ns
110	2,7-Octanedione	Cetona	0.03674	0.01447	0.05856	0.1619	0.1346	0.07731	0.04127	0.1273	ns
111	2,7-Dimethyl-1-octanol	Álcool	0.1912	0.1515	0.4421	0.1603	0	0.1477	0	0.07226	ns
112	1-Methyl-2,3-dioxabicyclo[2.2.1]heptane	Oxygenated Hidrocarbonetos	0.1799	0.4024	0	1.032	0	0	0.06847	0.05225	ns
113	(Z)-2-Decenal	Aldeido	0.08015	0.02174	0.08073	0.2951	0.05014	0.05379	0.02152	0.05097	0.091
114	1-Octen-3-one	Cetona	0.3042	0.1269	0.3215	0.3846	0.1941	0.09799	0.05661	0.04695	0.051
115	2-Methyl-4-pentenal	Aldeido	0	0.06352	0.1279	0.1621	0.1102	0.02772	0	0.04527	ns
116	Propanal	Aldeido	0.1034	0.05898	0.1467	0.2594	0.105	0.08883	0.03853	0.044	ns
117	Unknown 8	Desconhecido	0	0.01862	0.004048	1.342	0	0	0.001327	0.03521	ns
118	(E,Z)-2,6-nonadienal	Aldeido	0.2951	0.01806	0.2708	0.04621	0.0242	0.0296	0.01107	0.02987	ns
119	Unknown 3	Desconhecido	0.01936	0.001837	0.01044	0.03103	2.874	0.02905	0.007007	0.02704	ns
120	(E,E)-2,4-Nonadienal	Aldeido	0.3208	0.05685	0.3441	0.3426	0.1883	0.06521	0.06317	0.02659	ns
121	1-Nonanol	Álcool	0.11	0.02129	0.0803	0.0773	0.05447	0.03606	0.02301	0.02189	ns
122	6-Methyl-2-heptanol	Álcool	0.1184	0.000719	0.09897	0.1727	0.07808	0.05923	0	0.01779	ns
123	1-Pentanol	Álcool	0.1089	0.025	0.1334	0.4228	0.06148	0.06104	0.01927	0.01342	ns
124	2-Hexenal	Aldeido	0.06497	0	0.1035	0.3394	0.121	0	0.001816	0.01334	ns
125	1,2,3-Trimethylcyclopropane	Hidrocarboneto	0.102	0.04359	0.02678	0.135	0.03827	0.05613	0.05203	0.01176	ns
126	Cyclobut-1-enylmethanol	Álcool	0.4763	0.1884	0.1655	0.1948	0.1159	0.09338	0	0	ns
127	3-Methyl-4-penten-1-ol	Álcool	0	0	0	0.4748	0	0	0	0	ns
128	2-Ethyl-3-methylbutanal	Aldeido	0.9862	0.4487	1.033	1.357	0.816	0.7014	0.1753	0	ns
129	4,4-Dimethylpent-2-enal	Aldeido	0.06447	0.05037	0.07728	0.1285	0.08997	0.02318	0.03771	0	ns
130	2-Undecenal	Aldeido	0.07956	0.03398	0.0237	0.1998	0.04985	0.03556	0.0252	0	ns
131	2-Pentylfuran	Furan	1.261	0.3046	1.288	0.9786	0.7382	0.242	0.2358	0	ns
132	n-Butylfuran	Furan	0.2151	0.04351	0.2061	0.1795	0.1072	0.06386	0.05093	0	ns
133	(Z)-4-Tridecene	Hidrocarboneto	0.2737	0.03087	0	0.2845	0.4698	0	0.0756	0	ns
134	1,1-Dimethylethyl cyclohexane	Hidrocarboneto	0.03065	0	0.9591	0	0	0	0	0	ns
135	2,3-Dimethylhexane	Hidrocarboneto	0.08615	0.103	0.1014	0.2877	0.1926	0.1247	0.06345	0	ns
136	Pentane	Hidrocarboneto	0.02634	0.07609	0.1148	0.2015	0.1379	0.02421	0.03774	0	ns
137	Heptane	Hidrocarboneto	0.07715	0.02725	0.0964	0.0989	0.06858	0.02538	0.02895	0	ns
138	3,4-Epoxy-3-ethyl-2-butanone	Cetona	1.165	0	0.6973	0	0.7648	0.5193	0.1818	0	ns
139	1,2-Epoxyheptane	Oxygenated Hidrocarbonetos	0.03708	0.05792	0.06185	0.5015	0.03685	0.04413	0.007432	0	ns
140	Unknown 9	Desconhecido	0	0.003385	0.005813	0.4276	0	0.8873	0.002164	0	ns
141	Unknown 12	Desconhecido	0.1038	0	0.05009	1.002	0	0	0	0	ns
142	Unknown 13	Desconhecido	0.4445	0.001461	0	0.00282	0.4826	0	0.00198	0	ns
143	Unknown 15	Desconhecido	0	0	0	0	0.002246	0.4191	0.4558	0	ns
144	Unknown 16	Desconhecido	0	0.000733	0.003769	0.6077	0	0	0	0	ns
145	Unknown 19	Desconhecido	0	0	0	0	0	0.5046	0	0	ns

146	Unknown 20	Desconhecido	0	0.4845	0.001737	0.00205	0	0.0125	0	0	ns
147	Unknown 21	Desconhecido	0.003139	0	0.4795	0	0	0.00354	0	0	ns
148	Unknown 22	Desconhecido	0	0.4457	0	0	0	0	0.001517	0	ns
149	Unknown 23	Desconhecido	0	0.4397	0	0.00225	0	0	0.001509	0	ns
150	Unknown 24	Desconhecido	0.4046	0	0	0	0	0	0.0377	0	ns
151	Unknown 25	Desconhecido	0	0	0.0558	0	0	0.366	0.008224	0	ns
152	Unknown 26	Desconhecido	0	0	0.4288	0	0	0	0	0	ns
153	Unknown 27	Desconhecido	0	0	0	0	0	0.4192	0	0	ns
154	Total		44.23	28.38	42.92	57.35	38.12	60.99	18.82	527.3	