



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA E FÍSICO QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA INDUSTRIAL

LICIA DOS REIS LUZ

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA VIA UPLC-QTOF-MS^E
APLICADA AO ESTUDO DE ECOLOGIA QUÍMICA EM AMOSTRAS DE
NÉCTAR

FORTALEZA

2016

LICIA DOS REIS LUZ

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA VIA UPLC-QTOF-MS^E
APLICADA AO ESTUDO DE ECOLOGIA QUÍMICA EM AMOSTRAS DE
NÉCTAR**

Monografia submetida à Coordenação do Curso de Química Bacharelado, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Química Industrial.

Orientador Didático-pedagógico: Prof. Dr. Luiz Gonzaga da França Lopes.

Orientador Profissional: Dr. Guilherme Julião Zocolo.

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- L994d Luz, Licia dos Reis.
Desenvolvimento de metodologia via UPLC-QTOF-MSE aplicada ao estudo de ecologia química em amostras de néctar / Licia dos Reis Luz. – 2016.
52 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Química, Fortaleza, 2016.
Orientação: Prof. Dr. Luiz Gonzaga da França Lopes.
Coorientação: Prof. Dr. Guilherme Julião Zocolo .
1. Néctar . 2. Melão . 3. Espectrometria de massas. 4. Identificação . I. Título.

CDD 540

LICIA DOS REIS LUZ

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA VIA UPLC-QTOF-MS^E
APLICADA AO ESTUDO DE ECOLOGIA QUÍMICA EM AMOSTRAS DE
NÉCTAR**

Monografia apresentada ao Curso de Química Bacharelado, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Bacharel em Química Industrial.

Aprovada em: 24/06/2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Gonzaga da França Lopes (Orientador didático)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Dr. Guilherme Julião Zocolo (Orientador profissional)
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa

Prof. Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa
Universidade Federal do Ceará - UFC

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço à Deus por estar sempre comigo, me dando forças para seguir, pois sem ele nada seria possível.

Aos meus pais, Vlândia dos Reis Luz e Jocildo de Freitas Luz por tanto amor, cuidado, dedicação e pelo exemplo deles na minha vida. Aos meus irmãos, Davi, Lívinha e Vilocas por está sempre por perto, me apoiando e contribuindo da melhor forma. Além dos tios, primos que estão sempre presentes em minha vida.

Ao meu orientador profissional, Dr. Guilherme Julião, que esteve sempre presente com todo apoio durante a realização deste trabalho, além de todo o incentivo à pesquisa.

Ao Professor Dr. Luiz Gozanga, pela orientação didático-pedagógica.

À Embrapa pela oportunidade de estágio.

A todas as pessoas do Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais, pela enorme contribuição sem a qual não seria possível a realização deste trabalho, em especial ao Paulo por estar sempre disposto a ajudar e por ter me auxiliado nas etapas do trabalho.

Ao Dr. Fernando Aragão e a doutoranda Nayanny por me concederem as amostras de néctar para as análises.

Agradeço aos meus amigos, Amanda Lemos, Davi Rabelo, Igor Alves, Luiza Sena e Thiago Kelvin por estarem sempre ao meu lado durante todo o semestre e pela ajuda mútua, já que nesse semestre, somos todos monografistas. Além dos meus amigos das turmas de 2012.1 e 2013.1 por toda ajuda, paciência, e por fazerem parte de minha formação. E, em especial, os melhores amigos que a química me deu de presente, Juliana e Caio.

A todos do Laboratório de Bioinorgânica, que contribuíram e fizeram parte da minha formação.

RESUMO

O néctar é composto basicamente de açúcares, aminoácidos e flavonóides. O mesmo desempenha diversas funções importantes nos vegetais. Através da sua composição química, aroma, cor, e entre outras características. O néctar atrai polinizadores a fim de mediar a transferência de pólen direcional, precisa e eficiente. Porém, animais não mutualistas também podem ser atraídos, no entanto, o néctar também desempenha função de proteção. No presente trabalho, foram realizadas a otimização da extração e a caracterização de substâncias atrativas e repelentes no néctar da flor do meloeiro do tipo Cantaloupe (hermafrodita e masculino) objetivando desenvolver um método que contribua para a identificação de moléculas que atuam no processo de polinização. As amostras foram coletadas durante dois dias e passadas por um pré- tratamento antes de serem analisadas. Foram injetadas em um sistema UPLC acoplado a um analisador Time-of-Flight (TOF) Waters Micromass LCT espectrometria de massa equipado com uma interface electrospray (ESI), tanto no modo de ionização positivo quanto o negativo. O tratamento de dados foi realizado através do software MassLynx, (Waters Corporation). Todas as fórmulas moleculares possíveis foram calculadas, resultando em um quadro de moléculas identificadas na composição química do néctar. Foram identificadas cerca de 16 substâncias, dentre elas, aminoácidos, flavanóides e açúcares. Através desse método, foi possível realizar a identificação de substâncias que favoreçam ou não a atração de polinizadores, deste modo pode-se prever as espécies que serão mais visitadas.

Palavras –chave: néctar, melão, espectrometria de massas, identificação

ABSTRACT

Nectar is basically composed by sugars, amino acids and flavonoids, which play several important functions on vegetables. Through its chemical composition, aroma, color, and other characteristics; the nectar attracts pollinators to mediate pollen transference that is directional, precise, and efficient. However, non-mutualistic animals can also be attracted; yet, the nectar also has a protection function. In the present work, the optimization of the extraction and characterization of the attractive and repellent substances on the muskmelon flower nectar of the Cantaloupe type were done. The goal was to develop a method that contributes to the identification of the molecules that act in the pollination process. The samples were collected over two days and were submitted to a pre-treatment before being analyzed. They were injected in an UPLC system coupled with a Time-of-Flight (TOF) Analyzer and a Waters Micromass LCT mass spectrometry equipped with an electrospray interface (ESI), which was set up on positive and negative ionization mode. It was used the *software* MassLynx (Waters Corporation) to process the data. All possible molecular formulas were calculated, resulting in a board of identified molecules on the chemical composition of the nectar. Sixteen substances were identified, among them, amino acids, flavonoids and sugars. Through the method, it was possible to do the identification of substances that favor or not, the attraction of the pollinators, that way it was possible to predict the species that will be preferred by them.

Keywords: nectar, melon, mass spectrometry, identification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Apis em flor de melão.....	18
Figura 2-	Principais tipos de melão comercializados no Brasil.....	19
Figura 3-	Esquema de um equipamento de HPLC.....	21
Figura 4-	Componentes de um espectrômetro de massa.....	23
Figura 5-	Esquema experimental completo de um sistema de espectrometria de massas.....	25
Figura 6-	Cromatogramas da amostra de néctar coletada da flor do meloeiro do tipo Cantaloupe Hermafrodita.....	29
Figura 7-	Cromatogramas da amostra de néctar coletada da flor do meloeiro do tipo Cantaloupe Masculino.....	30
Figura 8-	Espectro MS/MS do composto 3.....	37
Figura 9-	Espectro MS/MS do composto 7.....	38
Figura 10-	Espectro MS/MS do composto 9.....	39
Figura 11-	Espectro MS do composto 10.....	39
Figura 12-	Espectro MS/MS do composto 12.....	40
Figura 13-	Espectro MS/MS do composto 14.....	41
Figura 14-	Espectro MS/MS do composto 15.....	41
Figura 15-	Espectro MS/MS do composto 16.....	42
Figura 16-	Espectro MS/MS do composto 17.....	43
Figura 17-	Espectro MS/MS do composto 18.....	43
Figura 18-	Espectro MS do composto 20.....	44
Figura 19-	Espectro MS/MS do composto 5'.....	45
Figura 20-	Espectro MS/MS do composto 12'.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Algumas moléculas atrativas encontradas no néctar	14
Tabela 2-	Exemplos de moléculas repelentes encontradas no néctar	15
Tabela 3-	Representação da composição nutritiva do melão em 100g de polpa	17
Tabela 4-	Fonte de íons utilizadas na espectroscopia de massa	24
Tabela 5-	Quantidade de néctar coletado	26
Tabela 6-	Caracterização e determinação de compostos em néctar da flor do meloeiro do tipo cantaloupe hermafrodita usando modo ES ⁺	32
Tabela 7 -	Caracterização e determinação de compostos em néctar da flor do meloeiro do tipo cantaloupe hermafrodita usando modo ES ⁻	33
Tabela 8-	Caracterização e determinação de compostos em néctar da flor do meloeiro do tipo cantaloupe masculino usando modo ES ⁺	34
Tabela 9-	Caracterização e determinação de compostos em néctar da flor do meloeiro do tipo cantaloupe masculino usando modo ES ⁻	35
Tabela 10-	Lista de compostos determinados nas amostras usando modo ES ⁺	36
Tabela 11-	Lista de compostos determinados nas amostras usando modo ES ⁻	36

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1	Néctar: importância e propriedades.....	12
2.2	Néctar: origem.....	12
2.3	Néctar: atração.....	13
2.4	Néctar: proteção.....	16
2.5	Melão: origem, características e importância.....	16
2.6	Meloeiro: polinização.....	17
2.7	Meloeiro: classificação.....	18
2.8	Técnicas Utilizadas.....	20
2.8.1	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	20
2.8.2	Espectrometria de Massas.....	22
3.0	OBJETIVOS.....	26
3.1	Objetivos Gerais.....	26
3.2	Objetivos específicos.....	26
4.0	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1.1	Preparo das amostras.....	26
4.1.2	Tratamentos das amostras.....	27
4.2	Experimentos em UPCL-QTOF-MS (/MS).....	27
4.3	Identificação Estrutural.....	27
5.0	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5.1	Análise em UPLC-QTOF-MS (/MS).....	29
5.2	Identificação Molecular.....	31
6.0	CONCLUSÃO.....	47
	REFERÊNCIAS.....	

1. INTRODUÇÃO

O melão (*Cucumis melo L.*) é uma das oleráceas de grande popularidade no mundo. O maior produtor mundial é a China, com 33,47% da produção do mundo, além de ser o país que apresenta a maior superfície cultivada, seguida pela Turquia, Irã, Estados Unidos e Espanha. O Brasil ocupa a 19ª colocação na produção mundial, mas nos últimos anos, devido ao aumento das exportações e do consumo interno, há uma grande tendência de crescimento dessa cultura (Costa, 2007 Cultivo do Melão). Na América do Sul, em 2007, o Brasil ocupou o primeiro lugar em produtividade e produção, seguido da Venezuela, Argentina e Chile (FAO,2009). A produção nacional de melão, em 2007, foi de 495.323 toneladas. A região Nordeste foi responsável por cerca de 96% desta produção, destacando-se os Estados do Rio Grande do Norte, Ceará, Bahia e Pernambuco. (IBGE,2009). Atualmente, no Brasil, planta-se principalmente melão do tipo “amarelo”, mas a tendência é o aumento da produção do grupo *Cantalupensis*. Os outros tipos de melão como o “Pele de Sapo”, “Gália” e “Charentais” são produzidos para atender o mercado externo, principalmente o europeu.

O crescente consumo do melão está associado com seus potenciais nutricionais. Possui propriedades anti-inflamatórias (Vouldoukis et al, 2004; Ismail et al, 2010), anti-bacterianas (Khan e Omoloso, 1998), benefícios anti –diabéticos (Jayasooriya et al, 2000; Kenny et al, 2013), além de ser bastante utilizada na medicina popular em várias culturas. (Subratty et al., 2005.; Semiz e Sen 2007; Wu e Ng, 2008; Mahomoodally 2013). (Bianchi, Guerrero et al. 2016).

A produção de néctar é de imensa importância, pois através do nectários as abelhas são atraídas a planta para que ocorra a polinização. (Domingos Almeida et al.2006). O néctar é composto basicamente por água, açúcar e aminoácidos. É responsável por atrair polinizadores e defensores, mas também micro-organismos não mutualistas. (Heil, 2011). A interação de flores e polinizadores dependem das características do néctar como a composição de açúcar; as proporções de sacarose-hexose; concentração, volume e tempo de secreção. (Baker e Baker, 1983; Freeman et al, 1984;. Baker e Baker, 1990; Stiles e Freeman, 1993; Galetto et al, 1998;. Perret et al, 2001;.. Pacini et al, 2003;. Wolff et al, 2003, 2006). A composição do néctar não apresenta apenas substâncias atrativas, mas também repelentes. O néctar não tem apenas

função de atração,mas também de proteção através de proteínas e metabolitos secundarios (Heil 2011).

Com o propósito de identificar substâncias atrativas e repelentes encontradas no néctar, o presente trabalho tem como objetivo caracterizar e identificar essas substâncias no néctar da flor de melão. Essa identificação foi realizada através da técnica de Espectrometria de Massa e Cromatografia Liquida de Ultra- Performance (UPLC-qTOF-MS/MS).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Néctar: importância e propriedades

O néctar é uma secreção aquosa que contém açúcares como hexoses, glucose, frutose e sacarose, proteínas, aminoácidos. É derivado a partir de uma solução de floema, que é um tecido das plantas fornecedor de água para flores e alguns órgãos. Dependendo da necessidade calórica das espécies de polinizadores a composição do néctar produzido pode variar (Brandenburg, Dell'Olivo et al. 2009).

Essa substância é aproveitada por animais como fonte de nutrientes o que os leva a procurar por plantas nectaríferas para sua alimentação. Plantas essas que possuem nectários, glândulas de néctar, em suas flores com finalidade de promover polinização direcional, precisa e eficiente. (Heil 2011). Mas, isso não ocorre em todas as espécies de polinizadores, em alguns casos o néctar não é suficiente nem recompensador. (De la Barrera and Nobel 2004).

Os vegetais também secretam o néctar extrafloral que é composto por carboidratos, proteínas, aminoácidos, porém não está relacionado com a polinização, mas sim como uma forma de defesa induzida contra não mutualistas (Heil 2011).

2.2. Néctar: origem

A origem do néctar ainda não é bem conhecida, existem hipóteses que podem explicar o seu surgimento. Uma das hipóteses, floema gotejante, no qual o néctar secretado é originado como um vazamento da solução de floema resultante da fraqueza estrutural do tecido exposto à pressão hidrostática elevada. Outra suposição, excreção de açúcar, é que o néctar pode ter sido originado como um mecanismo para remover os solutos que estão em excesso fornecidos pelo floema, pois foi observado que ao invés da redução substancial do potencial de água quando há uma quantidade considerável de soluto, houve o inverso, percebeu-se um aumento no potencial de água na flor. As duas hipóteses são complementares e podem ser relevantes em diferentes estágios de desenvolvimento (De la Barrera and Nobel 2004).

2.3. Néctar: atração

Diversas funções são encontradas no néctar, uma delas é a atração. Os carboidratos e aminoácidos são as substâncias mais importantes para essa função. Essa incumbência pode gerar problema, pois não atrairia apenas os animais mutualistas, mas também micro-organismos que infectam o néctar. Os componentes mais importantes responsáveis pela atração são mono- e dissacarídeos, aminoácidos, além de substâncias voláteis como a benzilacetona. A composição do néctar não apresenta apenas substâncias atrativas, mas também repelentes que são exibidas por compostos secundários, como gelsemine que curiosamente também repele polinizadores legítimos e nectarina, proteína do néctar, que tem como função principal a proteção (Heil 2011).

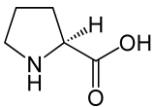
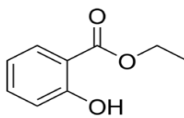
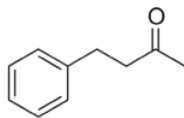
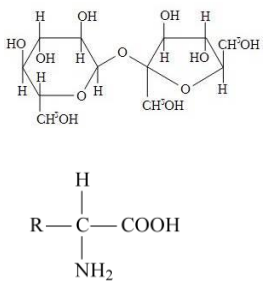
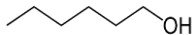
A sua composição determina o perfil de consumidores, há casos em que néctar com maior quantidade de aminoácido atrai mais animais que tenha essa preferência nutritiva como as formigas. Já néctar floral mais rico em sacarose atrai por exemplo beija-flores, borboletas e mariposas. Substâncias voláteis também tem sido relacionado com a atração de polinizadores, estudos estão sendo realizados verificando que certas espécies de néctar emitem seu próprio perfume. Esses compostos voláteis do néctar ocasionam tanto atração de polinizadores quanto proteção de “ladrões” de néctar. (Heil 2011).

O cenário ideal de polinização é transportar a máxima quantidade de pólen de uma planta para o estigma de uma mesma espécie, consumindo o mínimo de néctar possível. A limitação da disponibilidade de néctar provoca a atração de polinizadores a um número maior de flores, contribuindo para a melhoria da distribuição do pólen. Há uma espécie de pré-seleção, em que as plantas atraem polinizadores de acordo com suas características florais como o perfume, pigmentação da pétala e outras estruturas florais. A identidade do polinizador, a frequência e duração das visitas são fatores cruciais para o sucesso reprodutivo da planta. (Kessler and Baldwin 2007).

Estudos realizados por Kessler e Baldwin, mostraram que a nicotina contida no néctar ocasionava a repulsão de polinizadores, diminuindo o tempo de visitação. No entanto, eles descobriram que as plantas podem recompensar este efeito com quantidades crescente de benzilacetona (BA) que é um dos principais atrativos volátil. Com a utilização de plantas sem nicotina resultou em um aumento no tempo de visitação, mas em menos flores. Em contraposição a isso, as plantas transgênicas com emissão reduzida de benzilacetona recebeu visitas mais curtas, porém em mais flores. E

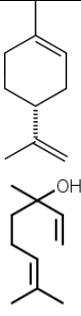
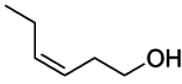
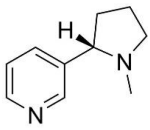
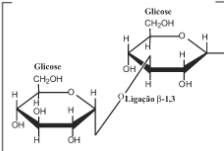
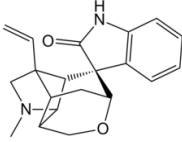
foi observado que em plantas que possuem o néctar com substâncias atrativas e repeletes produziam mais sementes do que qualquer um dos grupos experimentais manipulados. Dessa maneira, misturas complexas de compostos voláteis tanto com substâncias atrativas quanto repelentes contribuem para otimizar a polinização e reduzir as visitas de espécies indesejáveis. (Kessler and Baldwin 2007).

Tabela 1- Algumas moléculas atrativas encontradas no néctar.

Atrativa	Visitante	Moléculas	Estrutura	Referência
Polinizador	<i>Apis mellifera</i>	Prolina		Carter et al (2006)
Polinizador	Traça	Silicato de metila		Kessler; Baldwin (2007)
Polinizador, Defensor	Traça, beija-flor e formiga	Benzilacetona		Kessler; Baldwin (2007)
Defensor	Formiga	Açúcares (sacarose) e Aminoácidos (valina, prolina, leucina, fenilalanina)		González-Teuber; Heil (2009)
Defensor	Formiga, traça	1-hexanol		Kessler; Baldwin (2007)

Fonte: Autora

Tabela 2- Exemplos de moléculas repelentes encontradas no néctar

Repelente	Visitante	Molécula	Estrutura	Referência
Polinizador	Beija-flor	Limoneno Linalol		Kessler; Baldwin (2007)
Polinizador	Traça	Cis-3-Hexenol		Kessler; Baldwin (2007)
Polinizador/ Defensor	Traça, beija-flor, formiga	Nicotina		Kessler; Baldwin (2007)
Micro-organismos	Fungos, bactérias	Nectarin (H ₂ O ₂)		Thornburg et al, 2003
Micro-organismos	Fungos, bactérias	Nectarins (*quitinases, b-1,3-glucanases e peroxidase)		González-Teuber et al, 2009
Micro-organismos	Fungos, bactérias	Nectarins (b1,3glucanases; quitinases básicas e ácidas; taumatina-like e osmotina)		González-Teuber et al, 2009
Polinizador/ Pilhadores	Algumas espécies de abelhas	Alcalóides (*Gelsemine)		Adler; Irwin (2005)

Fonte: Autora

2.4.Néctar: proteção

Os néctares também contêm outros tipos de substâncias como metabólitos secundários e proteínas que foram descobertas a cerca de 80 anos atrás. Sua função principal é de proteção, por mais que a de nutrição não possa ser excluída totalmente. (Heil 2011).

O néctar é susceptível a infestação de micro-organismos cujas atividades metabólicas podem mudar a química do mesmo dramaticamente, embora que em alguns casos a presença desses micro-organismos acarretem benefícios sobre a planta. Porém, preferencialmente é melhor tornar o néctar estéril para o possível controle de sua composição química.

Estudos foram realizados e foi observado que a maioria dessas proteínas do néctar pode estar envolvida na proteção contra micro-organismos. Os metabólitos secundários podem contribuir para a proteção do néctar, inibindo o crescimento de micro-organismos (Heil 2011).

2.5.Meloeiro: origem, características e importância

O meloeiro (*Cucumis melo L.*) pertence à família das Cucurbitáceas, tem uma grande popularidade no mundo, além de ser uma olerícola bastante apreciada. É uma das frutas frescas mais exportadas pelo Brasil (Nascimento Neto et al., 2012). Essa planta pode apresentar quatro tipos de expressão sexual: andromonóica, monóica, ginomonóica e hermafrodita (COSTA & PINTO, 1977).

O centro de origem é a África, mas foi na Índia que ocorreu sua dispersão. Atualmente, cultivares de melão são encontrados em diversas regiões do mundo, provocando uma grande variabilidade genética que tem permitido a adaptação de diferentes tipos de melão em condições agronômicas diversas, de tal maneira que hoje é possível encontrar em todos os mercados do mundo melão com diferentes formato, aroma e cores. (Deulofeu,1997).

O melão é composto principalmente de elementos minerais, particularmente sódio, fósforo e potássio, além de quantidades substanciais de ácidos cítrico e málico. A porção comestível é cerca de 55% do fruto, e o valor energético é relativamente baixo,

20 a 62kcal/100g de polpa. (Franco 1992; Artés et al. 1993; Robinson e Decker-Walters, 1997).

Tabela 3: Representação da composição nutritiva do melão em 100g de polpa

Composição	Conteúdo	Composição	Conteúdo
Água	83,0%	Riboflavina	0,02 mg
Calorias	62,0 Kcal	Niacina	0,50 mg
Proteínas	0,60g	Cálcio	10,0 mg
Gorduras	0,10g	Fósforo	12,0 mg
Carboidratos	15,70g	Sódio	9,0 mg
Fibra	0,30g	Magnésio	13,1mg
Vitamina A	1540 UI	Potássio	188 mg
Vitamina C	16,0mg	Ferro	0,30 mg
Tiamina	0,03mg	Zinco	0,13 mg

Fonte: Robinson & Decker-Walters, 1997.

O melão desempenha diversas funções, como promover a diversificação das atividades agrícolas; devido suas propriedades medicinais pode ser utilizado como calmante, refrescante, diurético, laxante, alcalinizante, entre outros; atuar no cenário socioeconômico de grande relevância nas regiões produtoras, colaborando de forma expressiva para a melhoria do quadro social dos agricultores. Embora haja toda essa importância, a produtividade do melão no país ainda é bastante variável, na maioria das vezes o potencial produtivo da cultura é baixo, mostrando a necessidade de pesquisa para o melhoramento da técnica de cultivo. (Balback, s.d).

2.6.Meloeiro: polinização

Em uma mesma planta de melão é localizado tanto flores masculinas quanto femininas. A abertura ocorre de uma a duas horas após o aparecimento do sol, e esse tempo é dependente da temperatura, umidade e da luz solar. Quando o dia está nublado, ou a temperatura é baixa ou a umidade é alta, ocorre o retardamento da abertura. As flores se fecham no mesmo dia. A atividade das abelhas inicia apenas quando há abertura das flores. (SOUSA *et al*,2009).

As flores hermafroditas são incapazes de desempenhar a autopolinização. O pólen deve ser transferido da antera para o estigma através dos insetos. A abelha

melífera (*Apis mellífera L.*) é o polinizador mais eficiente, assegurando altos índices de produtividade. Com o aumento do número de visitas pelas abelhas, o número de sementes produzidas também aumenta, acarretando um maior tamanho do fruto (SOUSA *et al.*,2009).

Geralmente, a polinização por abelhas é mais eficaz na produção de frutos do que a polinização manual. É recomendado evitar a pulverização com inseticidas durante a fase de florescimento, principalmente pela manhã, e instalar cinco colmeias/ha na área, quando houver poucas abelhas no local. (HOSOKI *et al.*,1990).

Figura 1- *Apis mellífera* na flor de meloeiro



Fonte: <http://www.semabelhasemalimento.com.br/projeto-polinizadores-do-brasil/>

2.7.Meloeiro: classificação

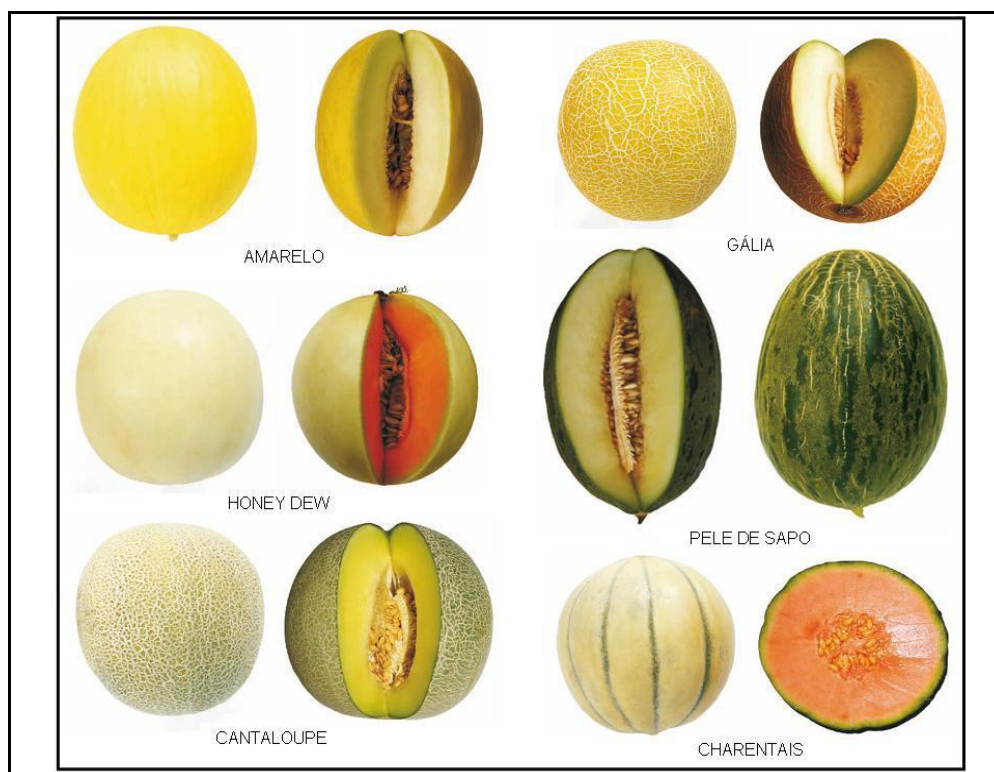
A classificação mais recente e utilizada atualmente foi sugerida por ROBINSON E DERECK-WALTERS (1997), na qual divide a espécie *Cucumis melo* em seis variedades: *cantaloupenis*, *inodorus*, *conomon*, *dudaim*, *flexuosus* e *momordica*.

Tendo em vista a facilitar a comercialização, os melões cultivados são agrupados numa classificação comercial. Na qual define um grupo de cultivares com características semelhantes, facilmente diferenciadas e identificadas das demais por meio de aspectos de cor, presença ou ausência de suturas quando maduros, cicatrizes,

reticulado ou rendilhado, casca, formato do fruto e/ou cor da polpa. (McCREIGHT *et al.*, 1993). Essa classificação está dividida em:

- Melão Pele de Sapo: possui casca verde-claro com manchas verde-escuro, é relativamente grande, de consistência firme e inodoro.
- Melão Cantaloupe: os frutos são esféricos, bastante aromáticos e a polpa tem cor salmão.
- Melão Amarelo: possui casca amarela, a polpa é branco-creme e é inodoro.
- Melão Gália: melões de origem israelense, os frutos são arredondados e a casca muda de cor dependendo do amadurecimento. São aromáticos.
- Melão Charentais: são de origem francesa, encontrados de variados tipos de casca. São aromáticos.
- Melão Honey Dew: são frutos de tamanho médio e de formato esférico. A casca varia de cor entre branco e amarelo e a polpa pode ser salmão, branca ou verde.

Figura 2- Principais tipos de melão comercializados no Brasil



Fonte: Rozana, 2007

2.8. Técnicas Utilizadas

2.8.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência é um tipo de cromatografia por eluição. É uma técnica de importância excepcional, sendo utilizada para separar, determinar e quantificar espécies em diversos tipos de materiais inorgânicos, orgânicos e biológicos. Nesse caso a fase móvel é um solvente líquido, no qual a amostra é dissolvida e introduzida na coluna cromatográfica preenchida com a fase estacionária. Um solvente é bombeado com vazão constante deslocando os componentes da mistura através da coluna que se distribuem entre as duas fases conforme suas afinidades. Quanto maior a interação do analito com a fase estacionária (FE) mais lentamente as substâncias irão passar pela coluna, em contrapartida quanto menor for a interação, mais rapidamente irão passar. Após atravessar o final da coluna, os componentes movem-se até um detector que emite algum tipo de sinal elétrico o qual é registrado, constituindo um cromatograma.

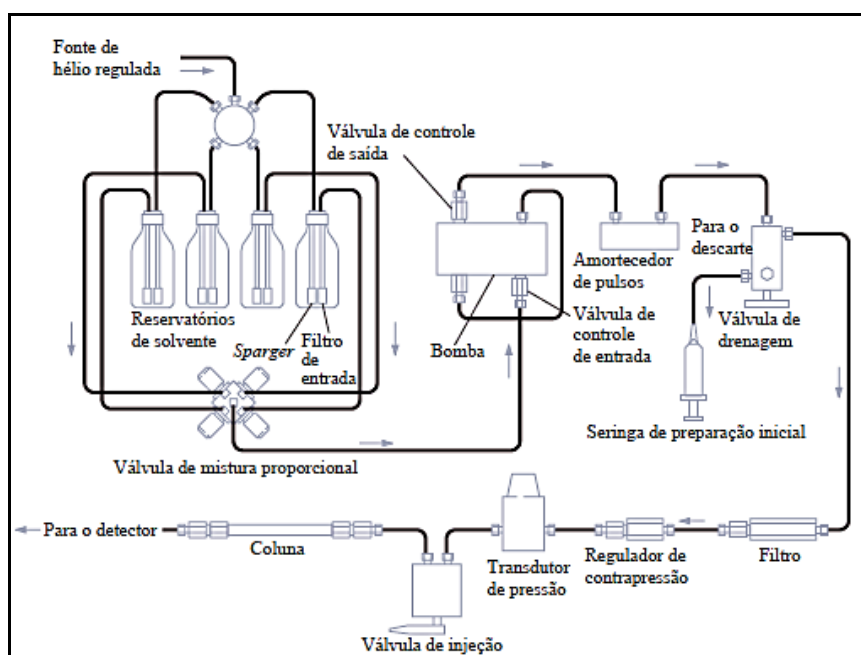
Usualmente, essa técnica é definida pelo tipo de fase estacionária ou pelo modo de separação. Divide-se em:

- Cromatografia líquido-líquido ou partição;
- Cromatografia líquido-sólido ou adsorção;
- Cromatografia de íons ou troca iônica;
- Cromatografia por exclusão;
- Cromatografia por afinidade;
- Cromatografia quiral.

Ao longo das últimas décadas o progresso na eficiência de separação por HPLC tem sido impulsionada por melhorias na fabricação de partículas a base de sílica. Em torno de 1970 a 1990, o tamanho das partículas foram diminuindo de 10 μ m para 3 μ m, contribuindo para o aumento significativo de rendimento e poder de resolução das colunas. Contudo, devido a insuficiência de sistemas de bombeamento adequado sob pressão, o uso de colunas curtas empacotadas com partículas de 3 μ m limita tanto a velocidade quanto o poder de resolução cromatográfico. Recentemente, a

comercialização de partículas a base de sílica porosa com uma distribuição de tamanho de $1,7\mu\text{m}$ permitiu um novo nível de desempenho, porém isso foi devido ao uso de tecnologia desenvolvida que permite o bombeamento e a injeção de líquidos a pressões bastante elevadas. Essa cromatografia líquida denomina-se de “ultra-performance” (UPLC) que oferece vantagens significativas na resolução, sensibilidade, velocidade para as determinações analíticas, principalmente quando combinada com espectrômetros de massa capazes de aquisições de alta velocidade. (Churchwell, Twaddle et al. 2005).

Figura 3- Esquema de um equipamento de HPLC



Fonte: Skoog Instrumental, 2002

O sistema cromatográfico (UPLC) é configurado de uma maneira especial para resistir a alto sistema de pressão. É possível realizar separações sob pressões até 100Mpa sem danificar a coluna analítica ou outros componentes do sistema. A eficiência de separação permanece mantida ou pode ser ainda melhorada. Esse sistema permite reduzir o tempo de análise até nove vezes em comparação com o sistema convencional utilizando colunas com partículas de $5\mu\text{m}$, e em até três vezes usando colunas empacotadas com partículas de $3\mu\text{m}$, sem a perda de eficiência de separação. O uso do UPLC é bastante relevante, pois emprega volumes de amostras reduzidos, em razão à dimensão das colunas cromatográficas que são menores que as de HPLC. Além

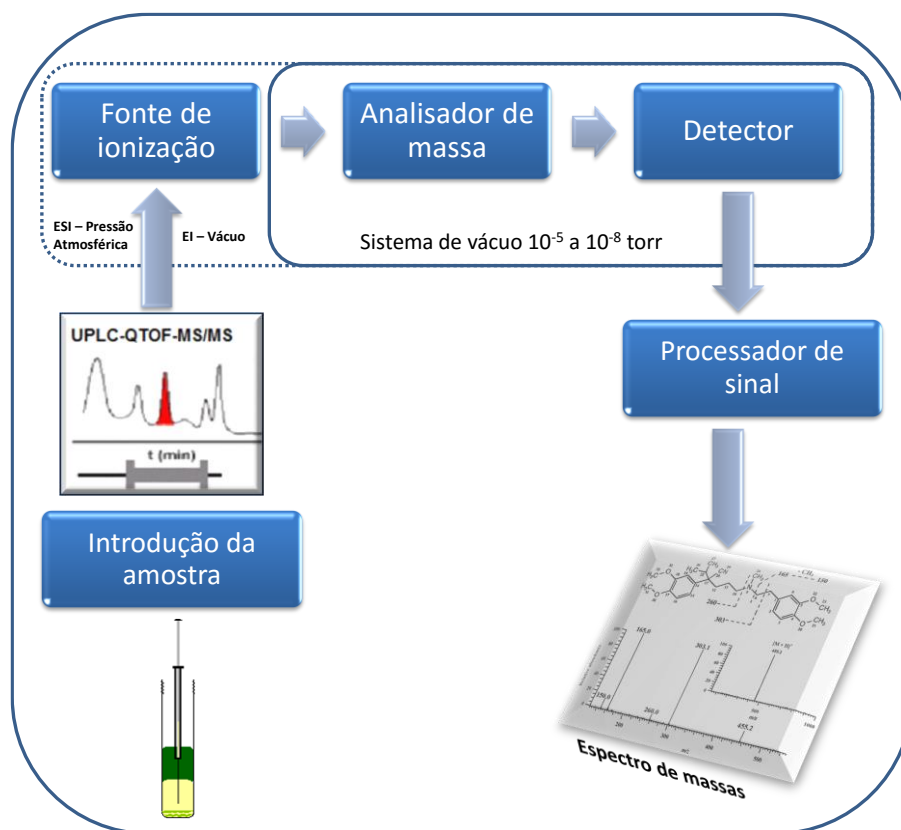
disso, outro fator é a economia do solvente que por empregar uma menor vazão para realizar a separação cromatográfica gera economia no custo total das análises. (Novakova, Matysova et al. 2006)

As primeiras aplicações práticas de UPLC foram realizadas juntamente com a detecção por espectrometria de massa em aplicações genômicas e campo de metabolômicos. Foi observado inúmeras vantagens do UPLC em relação ao HPLC na resolução de picos em conjunto com o aumento da velocidade e sensibilidade no campo nestes domínios. Isso torna a técnica bastante importante que pode desempenhar um papel significativo no futuro da cromatografia líquida. (Novakova, Matysova et al. 2006).

2.8.2. Espectrometria de Massa

Espectrometria de massa é uma técnica analítica em que as moléculas em uma amostra são convertidas em íons em fase gasosa, que são posteriormente separados no espectrômetro de massas de acordo com sua razão massa (m) sobre a carga (z), m/z . Para esse fim, um feixe de elétrons é lançado sobre a amostra de maneira que os constituintes da mesma possam ser fragmentados formando íons, os quais são desviados pela aplicação de um campo magnético. Em uma análise são envolvidos os seguintes passos: i) atomização; ii) conversão de uma fração substancial de átomos formados na atomização, em íons; iii) separação dos íons formados anteriormente baseada por razão m/z ; iv) detector que transforma a corrente de íons em sinais elétricos que em seguida vão para um sistema de computador que processa o sinal. (Skoog, Princípios de Análise Instrumental).

Figura 4- Componentes de um espectrômetro de massa



Fonte: Autora

O espectro de massa é um gráfico que indica a abundância (intensidade) relativa de cada íon que aparece como picos com m/z definidos. Além disso o espectro de massa fornece o sinal referente ao padrão isotópico da amostra, decorrente do padrão isotópico dos átomos constituintes do composto. O tamanho dos picos depende da abundância relativa natural dos isótopos. A utilização dessas informações podem presumir a presença de alguns átomos com padrões isotópicos bem característicos (Br, S, Cl, entre outros). (Wilson & Walker. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular).

O ponto inicial em uma análise por espectroscopia de massa é a ionização do analito. Dependendo do processo de formação de íons o perfil do espectro de massa de uma certa espécie molecular é variável. Na tabela abaixo lista as fontes de íons utilizadas na espectroscopia de massa. (Skoog, Princípios de Análise Instrumental).

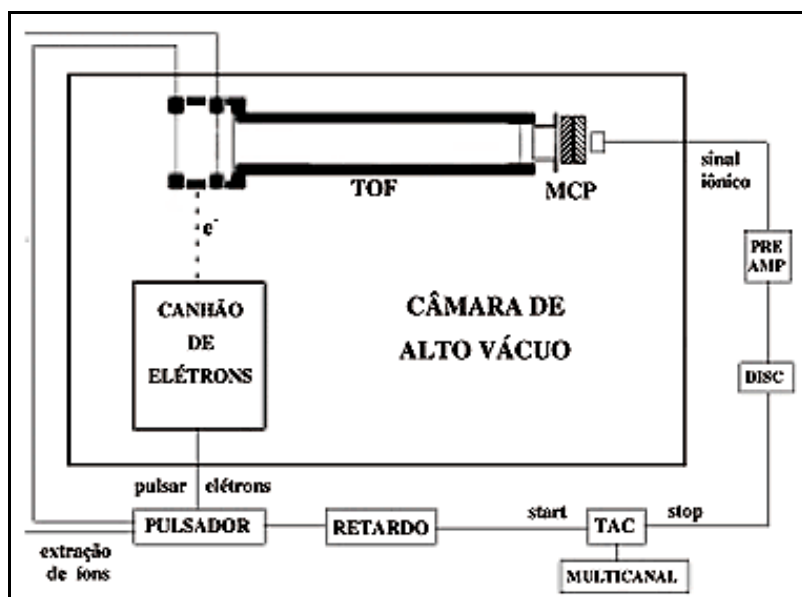
Tabela 4- Fonte de íons utilizadas na espectroscopia de massa

Tipo Básico Fonte Gasosa	Nome e Acrônimo Impacto de Elétrons (EI) Ionização química (CI) Ionização por campo (FI)	Agente Ionizante Elétrons energéticos Íons gasosos reativos Eletrodo com alto potencial
Dessorção	Dessorção por campo (FD) Ionização por eletronebulização (ESI) Dessorção/ionização com laser auxiliada por matriz (MALDI) Dessorção por plasma (PD) Bombardeio com átomos rápidos Espectrometria de massa de íons secundários (SIMS) Ionização por termonebulização (TS)	Eletrodo com alto potencial Campo elétrico elevado Feixe de laser Fragmentos de fissão de ²⁵² Cf Feixe atômico energético Feixe de íons energéticos Alta temperatura

Fonte: Skoog Instrumental

O analisador de massa é outro componente de grande importância na espectroscopia de massa. É responsável por separar os íons de acordo com sua m/z . Os analisadores são basicamente separados de acordo com a resolução que podem atingir na medida de massas. Um analisador bastante utilizado é o quadrupolo que tem capacidade de “filtrar” íons de acordo com a razão m/z conferindo alta sensibilidade, porém apresentam baixa exatidão de massa. Quando há necessidade de espectros com alta resolução e exatidão o uso de analisadores do tipo Tempo de Voo (TOF) é uma excelente alternativa. Nesse caso o tempo que um íon demora para alcançar o detector é proporcional à raiz quadrada da m/z , ou seja, quanto maior o íon, mais tempo ele leva para percorrer o comprimento do tubo. (Trufelli, 2010).

Figura 5- Esquema experimental completo de um sistema de espectrometria de massas



Fonte: Cardoso, Aldo S. et al. 2000.

Alguns fatores devem ser considerados nessa técnica. Primeiramente, a exatidão de massas, fornecida pela diferença entre as massas teórica e obtidas experimentalmente (o erro deve ser inferior a 5ppm). Outro fator de suma importância é a resolução, que é a capacidade de um espectrômetro de massas separar dois íons distintos (IUPAC Gold Book). Os espectrômetros são divididos em baixa e alta resolução. A diferença básica entre eles é a razão entre a massa medida e a largura do sinal. No caso do de baixa resolução apresenta razão inferior a 2000, e do de alta resolução podem chegar até 1×10^6 . Além disso, a sensibilidade é outro fator de extrema importância, mensurado através da inclinação da curva de resposta de uma determinada amostra com o aumento da concentração. (Marshall et al, 1998).

Através da espectroscopia de massa é possível fornecer a composição elementar de amostras; a estrutura molecular; a estrutura e a composição de superfícies sólidas e as proporções isotópicas de átomos em amostras; a composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Otimizar um método de detecção de compostos de interesse da ecologia química em flor de meloeiro (néctar).

3.2. Objetivo Específico

Através do sistema acoplado UPLC-QTOF-MS (/MS) identificar e caracterizar moléculas em amostras de néctar encontradas em flor de meloeiro do tipo Cantaloupe.

4. MATERIAIS E MÉTODO

4.1.1 Preparo das amostras

As amostras de néctar colhido da flor de meloeiro do tipo Cantaloupe em ambos os sexos (Hermafrodita e Masculino) foram utilizadas nesse estudo de identificação de substâncias atrativas e repelentes.

Em 2015, as plantas foram cultivadas na estação experimental da Embrapa Agroindústria Tropical no município de Pacajus-CE. Com auxílio de um micro capilar de 5 μ L o néctar foi coletado ao longo de dois dias. Em seguida, o néctar retirado foi inserido em um “vial” e, posteriormente, transferido ao ultrafreezer a -80°C.

Tabela 5-Quantidade de néctar coletado

Tipo de meloeiro	Sexo	Volume (μ L)
Cantaloupe	Hermafrodita	638,8
Cantaloupe	Masculino	169,0

4.1.2 Tratamento das amostras

As amostras de néctar foram tratadas com mistura de água e metanol (1:1) até sua completa solubilização. Após isto as mesmas foram levadas a centrífuga a fim de separar o analito da proteína. Em seguida, o analito foi filtrado utilizando filtros de seringa Millex-GV. Finalmente, as amostras devidamente tratadas, foram injetadas no equipamento (UPLC-QTOF-MS).

4.2 Experimentos em UPLC-QTOF-MS (MS)

As análises foram realizadas num sistema Waters Acquity de Cromatografia Líquida de Ultra Performance (UPLC) acoplado a um analisador Tempo-de-Voo (TOF) Waters Micromass LCT espectrometria de massa equipado com uma interface electrospray (ESI). As separações serão realizadas em colunas C18 (Waters Acquity UPLC C18, 150 milímetros \times 2,1 milímetros, 1.7 μ m). Os perfis dos metabólitos nas amostras foram obtidos inicialmente por um gradiente exploratório, sendo as fases móveis: H₂O (A) e acetonitrila (B), cada uma destas contendo ácido fórmico (0,1% volume/volume). As amostras foram submetidas ao seguinte gradiente exploratório: 2 – 95%. A vazão de 500 μ L min⁻¹.

As análises de cada amostra de néctar foram realizadas em modos de ionização positivo (PI) e negativo (NI) no intervalo de 100 – 1200 Da com o tempo de aquisição de 0,1 segundo no modo centróide. As condições ESI foram definidas da seguinte forma: tensão capilar 2800 V, tensão cone 40 V, temperatura da fonte 120 °C, temperatura dessolvação 330 °C, fluxo de gás de cone de 20 L h⁻¹, o fluxo de gás dessolvatação 600 L h⁻¹, e MCP (microcanaís tensão da placa) – detector a 1900 V.

4.3 Identificação Estrutural

Para a identificação estrutural, serão consideradas as fórmulas moleculares e os valores de m/z obtidos a partir de espectros de alta resolução, observados nos picos cromatográficos de maior intensidade. A partir de cada fórmula, será determinado o erro relativo em ppm. Somente fórmulas moleculares com valores inferiores a 10 ppm de erro serão consideradas para estudos posteriores em MS/MS. As propostas estruturais das moléculas serão realizadas através dos dados de MS/MS, por meio do

estabelecimento de padrões de fragmentação racionais (BOUSLIMANI et al., 2014; KIND; FIEHN, 2007, 2010; MOCO et al., 2007; YULIANA et al., 2013).

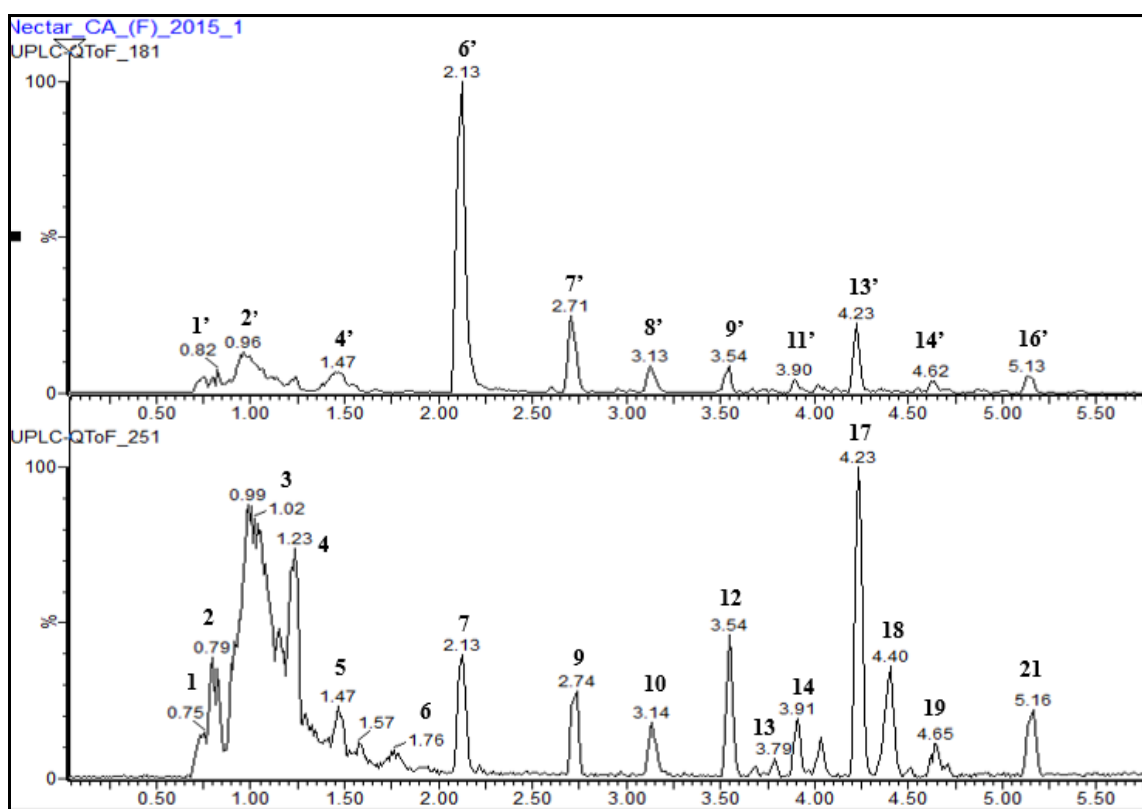
Os dados foram processados usando o software MassLynx, (Waters Corporation). A comparação de todos os picos de LC foi realizada utilizando um desvio de tolerância de tempo de retenção $\pm 0,05$ min e uma tolerância massa exata de $\pm 0,05$ Da. Para picos não identificados, todas as possíveis fórmulas moleculares foram extraídas (elementos C, H, N, O, a tolerância de 10 ppm, pelo menos, 2 átomos de carbono) com a ferramenta composição elementar do MassLynx.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise em UPLC-QTOF-MS (/MS)

As amostras foram injetadas e feitas as triplicadas das análises cromatográficas do UPLC para cada módulo de ionização do Espectrômetro de massas de alta resolução, ionização positiva (PI) e negativa (NI). Obteve-se um conjunto de cromatogramas e espectros de massa para cada uma das duas amostras de néctar. As figuras abaixo mostram um cromatograma no modo positivo e no modo negativo da amostra de néctar coletada da flor do meloeiro do tipo Cantaloupe Hermafrodita. A intensidade de separação é uma combinação da separação pela cromatografia líquida e a detecção pelo MS (/MS).

Figura 6-Cromatogramas da amostra de néctar coletada da flor do meloeiro do tipo Cantaloupe Hermafrodita. (Acima modo positivo e modo negativo abaixo)

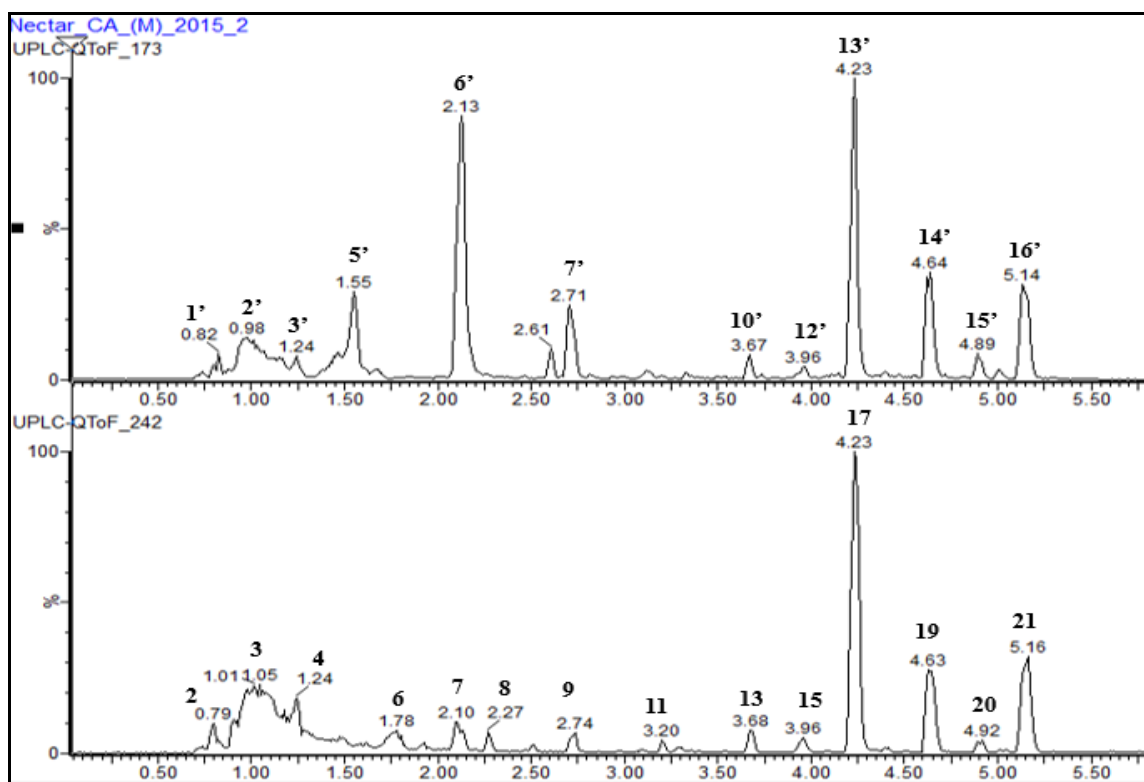


É possível observar que algumas substâncias não aparecem nos dois modos de ionização ao mesmo tempo, é o caso do tempo de retenção 4,40 minutos no cromatograma do modo negativo, trata-se, portanto, de uma molécula que não se ioniza

positivamente, dificuldade em ganhar um átomo de hidrogênio para ser detectada pelo time-of-flight na espectrometria de massas. Apesar da utilização dos dois modos de ionização serem principalmente para a confirmação dos compostos presentes nas amostras, auxiliando ainda mais na identificação dessas moléculas através da massa da ionização positiva e negativa simultaneamente, alguns casos específicos como esse também podem ocorrer.

Pode-se observar esse mesmo perfil para a amostra de néctar coletada da flor do meloeiro do tipo Cantaloupe Masculino. As figuras abaixo apresentam um cromatograma no modo positivo e no modo negativo dessa amostra.

Figura 7-Cromatogramas da amostra de néctar coletada da flor do meloeiro do tipo Cantaloupe Masculino. (Acima modo positivo e modo negativo abaixo)



5.2. Identificação Molecular

Através dos espectros de MS e MS/MS é possível obter a identificação molecular das substâncias contidas nas amostras de néctar. Na literatura existem tabelas de identificação das estruturas presentes e por meio delas pode-se utilizar como referência para a identificação de substâncias encontradas nas amostras de néctar.

O erro dado em ppm leva em consideração a massa observada no espectro de massas e a massa calculada pela ferramenta de composição elementar do software MassLynx, através da seguinte equação:

$$\frac{(\textit{Massa Observada} - \textit{Massa Calculada})}{\textit{Massa Observada}} \times 10^6$$

As tabelas abaixo apresentam as estruturas identificadas nas amostras de néctar.

Tabela 6- Caracterização e determinação de compostos em néctar da flor do meloeiro do tipo Cantaloupe Hermafrodita usando modo positivo

Picos	t _r (min)	[M+H] ⁺ Observado	[M+H] ⁺ Calculado	Erro (ppm)	Fragmentos Íons (MS/MS)	Fórmula Empírica	Nome	Referências
1	0,82	399,0884	-	-	383,1161; 219,0262; 203,0517	-	Não identificado	-
2	0,96	343,1210	343,1240	-8,7	325,1102; 163,0576; 145,0465	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Sacarose	-
3	1,45	182,0804	182,0817	-7,1	165,0560; 136,0743	C ₉ H ₁₁ NO ₃	Tirosina	(Holme, P.C. et al. 2002)
4	2,13	166,0850	166,0868	-10,8	131,0493; 120,0779;	C ₆ H ₁₁ NO ₂	Fenilalanina	(Wrona, Pezo et al. 2016)
5	2,71	205,0973	205,0977	-2,0	188,0688; 170,0593; 159,0897; 146,0573; 142,0635; 132,0788; 118,0620; 115,0531	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	Triptofano	(Wrona, Pezo et al. 2016)
6	3,13	216,0870	216,0885	6,9	188,0922; 148,0596	C ₁₀ H ₉ N ₅ O	Cinetina	Método Padrão
7	3,54	611,1600	611,1602	-1,6	329,0667; 431,0959; 491,1078	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Isoorientina-2''-O-glicosídeo	-
8	3,90	595,1662	595,1663	-0,2	433,1103; 415,1023	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	Isovitexina-2''-O-glicosídeo	(Negri, G., et al. 2012)
9	4,23	595,1696	595,1663	5,5	287,0516	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	Kaempferol-3-O- neohesperidosídeo	-
10	4,62	449,1060	449,1084	-5,3	287,0540	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	Luteolina hexosídeo	(Farag, Mohsen et al. 2014)
11	5,13	433,1158	433,1135	5,3	287,0533	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	Kaempferol ramnosídeo	(Abu-Reidah, Ali-Shtayeh et al.2015)

Tabela 7- Caracterização e determinação de compostos em néctar da flor do meloeiro do tipo Cantaloupe Hermafrodita usando modo negativo

Picos	t _r (min)	[M-H] ⁻ Observado	[M-H] ⁻ Calculado	Erro (ppm)	Fragmentos Íons (MS/MS)	Fórmula Empírica	Nome	Referências
1	0,75	-	-	-	304,9118; 288,9346; 272,9551; 174,9554; 158,9779	-	Não identificado	-
2	1,24	341,1075	341,1084	-0,9	179,0553; 161,0459	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Sacarose	(Frag, Mohsen et al. 2014)
3	1,46	180,0656	180,0661	-2,8	133,0492; 163,0383	C ₉ H ₁₁ NO ₃	Tirosina	-
4	2,13	164,0712	164,0709	-1,8	147,0471	C ₉ H ₁₁ NO ₂	Fenilalanina	(Wrona, Pezo et al. 2016)
5	2,73	203,0818	203,0821	-1,5	186,0612; 116,0515	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	Triptofano	(Wrona, Pezo et al. 2016)
6	3,14	214,0734	214,0729	2,3	133,0392; 112,9859	C ₁₀ H ₉ N ₅ O	Cinetina	Método Padrão
7	3,54	609,1460	609,1456	0,7	429,0959; 309,0422; 489,1017	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Isoorientina-2''-O-glicosídeo	(Negri, G., et al. 2012)
8	3,79	-	-	-	771,1812; 729,1744; 341,1076	-	Não identificado	-
9	3,93	593,1480	593,1506	-4,4	413,0913; 293,0433; 473,1009	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	Isovitexina-2''-O-glicosídeo	(Negri, G., et al, 2012)
10	4,23	593,1490	593,1506	-2,7	429,0848; 285,0372	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	Kaempferol-3-O-neohesperidosídeo	(Truchado, Ferreres et al,2009)
11	4,40	165,0548	165,0552	-2,4	147,0457; 119,0508; 103,0552	C ₉ H ₁₀ O ₃	4- (2-hidroxietyl) ácido benzoico	-
12	4,65	447,0928	441,0927	0,2	285,0284	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	Luteolina hexosídeo	(Frag, Mohsen et al, 2014)
13	5,16	431,0977	431,0978	-0,2	285,0391	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	Kaempferol ramnosídeo	(Abu-Reidah, Ali-Shtayeh et al,2015)

Tabela 8- Caracterização e determinação de compostos em néctar da flor do meloeiro do tipo Cantaloupe Masculino usando modo positivo

Picos	t _r (min)	[M+H] ⁺ Observado	[M+H] ⁺ Calculado	Erro (ppm)	Fragmentos Íons (MS/MS)	Fórmula Empírica	Nome	Referências
1	0,82	399,0916	-	-	383,1103; 219,0258; 203,0513	-	Não identificado	-
2	0,96	343,1213	343,1240	-7,9	325,1106; 163,0580; 145,0468	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Sacarose isômero I	(Farag, Mohsen et al. 2014)
3	1,24	343,1229	343,1240	-3,2	325,1113; 163,0595; 145,0468	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Sacarose isômero II	-
4	1,54	268,1032	268,1046	-1,4	136,0580	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	Adenosina	-
5	2,13	166,0849	166,0868	-11,4	131,0488; 120,0783;	C ₆ H ₁₁ NO ₂	Fenilalanina	(Wrona, Pezo et al. 2016)
6	2,60	-	-	-	298,0956; 136,0600	-	Não identificado	-
7	2,71	205,0973	205,0977	-2,0	188,0688; 170,0593; 159,0897; 146,0573; 142,0635; 132,0788; 118,0620; 115,0531	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	Triptofano	(Wrona, Pezo et al. 2016)
8	3,66	303,0489	303,0505	-1,6	251,1001; 120,0787	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Não identificado	-
9	3,96	287,0538	287,0556	-6,3	229,1259; 213,1549; 201,1198	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	Kaempferol	(Abu-Reidah, Ali-Shtayeh et al.2015)
10	4,23	595,1666	595,1663	0,5	287,0552	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	Kaempferol-3- <i>O</i> - neohesperidosídeo	(Truchado, Ferreres et al.2009)
11	4,622	449,1068	449,1084	3,6	287,0515	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	Luteolina hexosídeo	(Farag, Mohsen et al. 2014)
12	4,90	583,3306	-	-	287,0532; 127,0378	-	Não identificado	-
13	5,14	433,1146	433,1135	2,5	287,0510	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	Kaempferol ramnosídeo	(Abu-Reidah, Ali-Shtayeh et al.2015)

Tabela 9- Caracterização e determinação de compostos em néctar da flor do meloeiro do tipo Cantaloupe Masculino usando modo negativo

Picos	t _r (min)	[M-H] ⁻ Observado	[M-H] ⁻ Calculado	Erro (ppm)	Fragmentos Íons (MS/MS)	Fórmula Empírica	Nome	Referências
1	0,79	-	-	-	264,9342; 248,9597; 180,9737; 112,9844	-	Não identificado	-
2	1,01	341,1054	341,1084	-8,8	179,0541; 161,0466	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Sacarose isômero 1	(Frag, Mohsen et al. 2014)
3	1,24	341,1085	341,1084	0,3	179,0553; 503,1586	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Sacarose isômero 2	-
4	1,79	341,0877	-	-	283,0724; 179,0474; 113,0236	-	Não identificado	-
5	2,11	164,0708	164,0712	-2,4	147,0448	C ₉ H ₁₁ NO ₂	Fenilalanina	(Wrona, Pezo et al. 2016)
6	2,28	-	-	-	341,1017; 304,0214; 203,0813	-	Não identificado	-
7	2,73	203,0814	203,0821	-3,4	186,0612; 116,0511; 181,0455	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	Triptofano	(Wrona, Pezo et al. 2016)
8	3,20	-	-	-	430,2372; 341,1127	-	Não identificado	-
9	3,96	609,1422	609,1456	-5,6	429,0817; 285,0345	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Luteolina-7- <i>O</i> -sophorisídeo	(Truchado, Ferreres et al.2009)
10	4,23	593,1519	593,1506	2,2	429,0801; 285,0354	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	Kaempferol-3- <i>O</i> -neohesperidosídeo	(Truchado, Ferreres et al.2009)
11	4,65	447,0919	441,0927	-1,8	285,0391	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	Luteolina hexosídeo	(Frag, Mohsen et al. 2014)
12	4,92	489,1046	489,1033	2,7	285,0402	C ₂₃ H ₂₁ O ₁₂	Não identificado	-
13	5,14	431,0947	431,0978	-7,2	285,0387	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	Kaempferol ramnosídeo	(Abu-Reidah, Ali-Shtayeh et al.2015)

Tabela 9- Lista de compostos determinados nas amostras usando modo ES ⁺

Picos	T _r (min)	Nome	Cantaloupe – Hermafrodita	Cantaloupe – Masculino
1'	0,82	Não identificado	+	+
2'	0,96	Sacarose I	++	+
3'	1,24	Sacarose II	-	+
4'	1,45	Tirosina	+	-
5'	1,54	Adenosina	-	++
6'	2,13	Fenilalanina	++++	+++
7'	2,71	Triptofano	+++	++
8'	3,13	Cinetina	++	-
9'	3,54	Isoorientina-2''-O-glicosídeo	++	-
10'	3,66	Não identificado	-	+
11'	3,90	Isovitexina-2''-O-glicosídeo	+	-
12'	3,96	Kaempferol	-	+
13'	4,23	Kaempferol-3-O-neohesperidosídeo	++	+ +++
14'	4,63	Luteolina hexosídeo	+	++
15'	4,90	Não identificado	-	+
16'	5,14	Kaempferol ramnosídeo	+	++

Obs:Se a razão sinal/ruído for menor que 25 (+) ; maior que 25 e menor que 70 (++) ; maior que 70 e menor que 140 (+++) e maior que 140 (++++).

Tabela 10- Lista de compostos determinados nas amostras usando modo ES ⁻

Picos	T _r (min)	Nome	Cantaloupe – Hermafrodita	Cantaloupe – Masculino
1	0,75	Não identificado	+	-
2	0,79	Não identificado	+	+
3	1,01	Sacarose I	++	++
4	1,24	Sacarose II	++	++
5	1,46	Tirosina	+	-
6	1,79	Não identificado	-	++
7	2,13	Fenilalanina	++	++
8	2,28	Não identificado	-	++
9	2,71	Triptofano	++	++
10	3,14	Cinetina	++	-
11	3,20	Não identificado	-	+
12	3,54	Isoorientina-2''-O-glicosídeo	++	-
13	3,79	Não identificado	+	-
14	3,90	Isovitexina-2''-O-glicosídeo	++	-
15	3,96	Luteolina-7-O-sophorisídeo	-	++
16	4,23	Kaempferol-3-O-neohesperidosídeo	+++ +	++++
17	4,40	4-(2-hidroxietil) ácido benzoico	++	-
18	4,63	Luteolina hexosídeo	+	++++
19	4,92	Não identificado	-	+
20	5,14	Kaempferol ramnosídeo	++	++++

Obs:Se a razão sinal/ruído for menor que 25 (+) ; maior que 25 e menor que 70 (++) ; maior que 70 e menor que 140 (+++) e maior que 140 (++++).

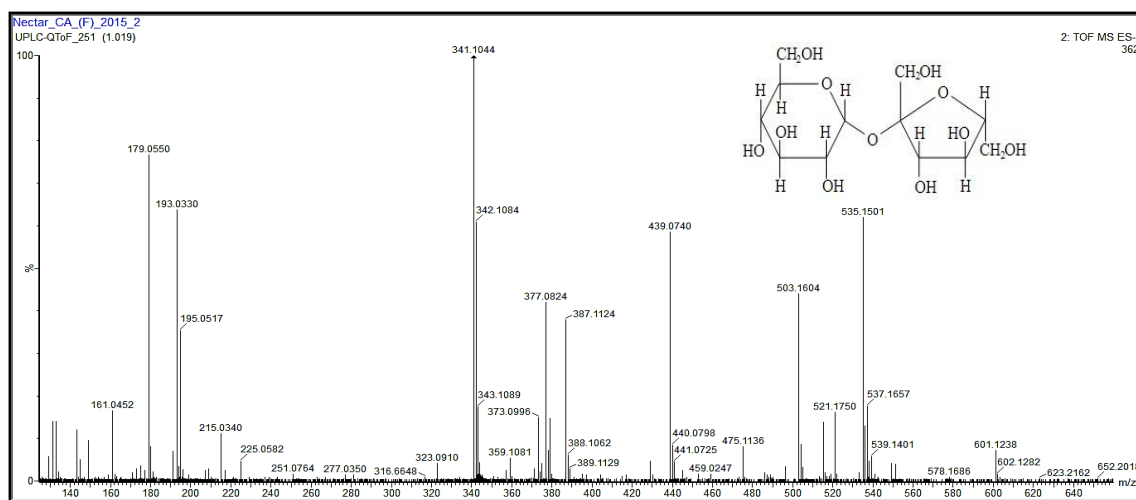
O composto 1, t_r de 0,75 minutos e o composto 2, t_r 0,79 minutos, tratam-se de moléculas não identificadas e não possuem nenhuma referência na literatura. O composto 1 possui fragmentações em $m/z = 304,9118$, $272,9551$ e $158,9779$ Da. E o composto 2 possui fragmentações em $m/z = 264,9342$, $180,9737$ e $112,9844$ Da. Essas moléculas não foram detectadas no modo positivo.

O composto 3, t_r 1,01 minutos, possui $[M-H]^-$ $341,1054$ Da (Figura 8) foi identificado como sacarose, cuja fórmula molecular é $C_{12}H_{22}O_{11}$, é descrito no artigo de Farag, Mohsen et al. (2014). O espectro de segunda ordem apresenta apresentou íon de $m/z = 179,0541$ Da que foi gerado pela perda de um grupo D-galactopiranosil ($C_6H_{11}O_5$). E o íon de $m/z = 161,0466$ foi gerado pela perda de uma glicose.

A presença de sacarose na amostra também foi confirmada pelo modo de ionização positivo, o composto 2 da tabela 8, apresentou fragmentações semelhantes, acrescentando-se o íon $m/z = 325,1106$, gerado pela perda de uma molécula de água.

Por sua vez, o composto 4, t_r de 1,24 minutos, possui $[M-H]^-$ $341,1085$ Da também foi identificado como um isômero da sacarose anteriormente identificada, já que possuem os mesmos fragmentos e o que muda entre eles é o tempo de retenção. Foram detectados fragmentos semelhantes apresentando um íon fragmento de $m/z = 179,0553$.

Figura 8- Espectro MS/MS do composto 3 – sacarose I



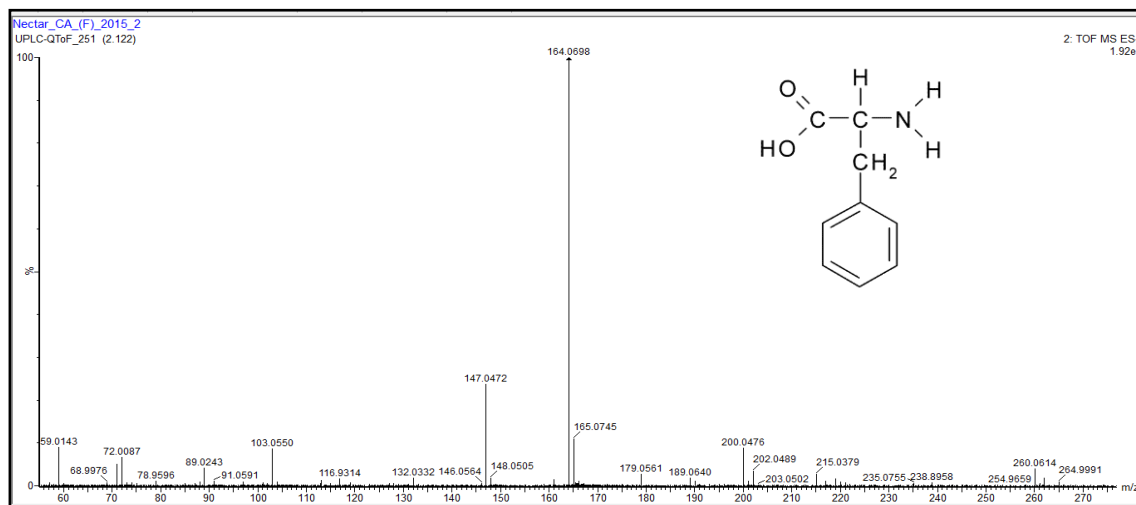
O composto 5, t_r 1,46 minutos, possui $[M-H]^-$ $180,0656$ Da foi identificado como tirosina, cuja fórmula molecular é $C_9H_{11}NO_3$. O íon de $m/z = 163,0383$ Da foi gerado pela perda de um grupo OH. A presença de tirosina na amostra foi confirmada

também em modo de ionização positivo, composto 3 da tabela 6, e foi descrito no artigo de Holme, P.C. et al. (2002), com fragmentações semelhantes. O espectro de massas não será demonstrado.

O composto 6, t_r 1,79, trata-se de uma molécula não identificada, com $[M-H]^-$ 341,0877 Da, e não citada em nenhuma referência. Essa molécula apresenta fragmentações em $m/z = 283,0724$, $179,0474$, $113,0236$ Da. O composto não foi detectado em modo positivo. O espectro de massas dessa substância não será apresentado.

O composto 7, t_r 2,13 minutos, foi identificado como o aminoácido fenilalanina, $[M-H]^-$ 164,0712 Da (Figura 9), cuja fórmula molecular é $C_9H_{11}NO_2$. O fragmento que deu origem ao pico $m/z = 147,0471$ Da foi relativo a perda de um grupo OH. Wrona *et al.* (2016), reporta a identificação desse aminoácido tanto pelo modo de ionização positivo quanto negativo. A presença de fenilalanina foi confirmada pelo modo de ionização positiva, pico 4 da tabela 6, com fragmentações semelhantes, acrescentando-se o íon $m/z = 120,0779$ Da gerado pela perda de CHO_2 .

Figura 9- Espectro MS/MS do composto 7 – fenilalanina.

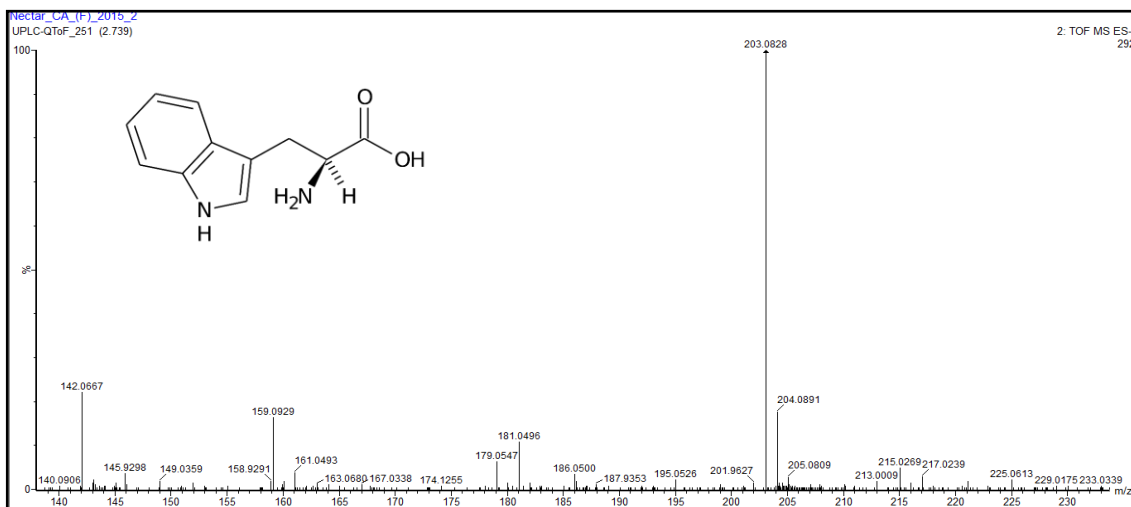


O composto 8, t_r 2,28 minutos, não foi identificado e não possui nenhuma referência na literatura a seu respeito. Possui fragmentações em $m/z = 341,1017$, $304,0214$ e $203,0813$ Da. O composto não foi detectado no modo positivo.

O composto 9, t_r 2,71 minutos, foi descrito por Wrona *et al.* (2016) e identificado como o aminoácido triptofano $[M-H]^-$ 203,0818 Da (Figura 10) e $[M+H]^+$ 205,0973 Da, cuja fórmula molecular é $C_{11}H_{12}N_2O_2$. Os fragmentos $m/z = 186,0612$ Da e $188,0688$ Da são gerados pela perda de um grupo OH. No modo de ionização

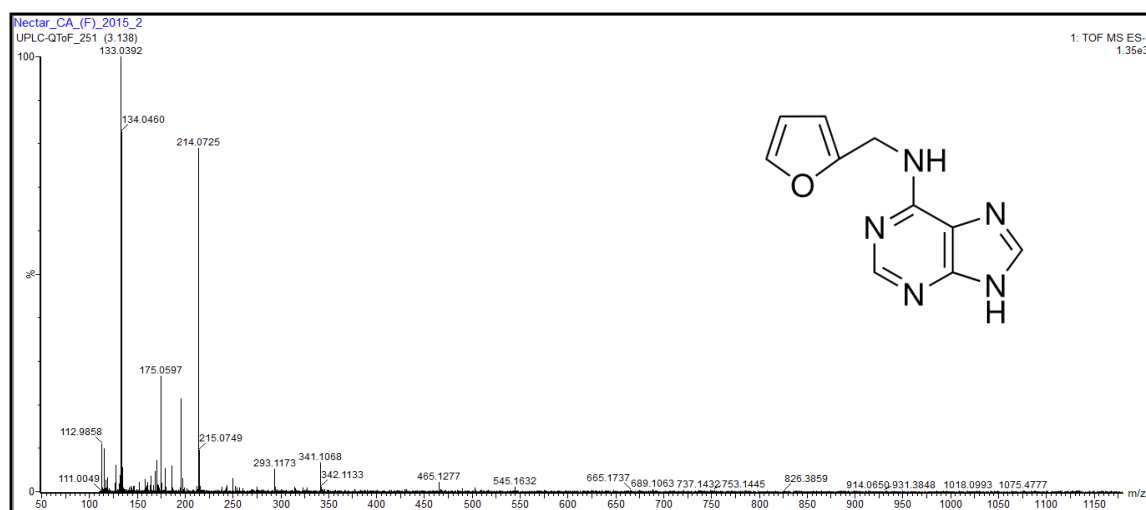
positivo, houve o surgimento de outra fragmentação com $m/z = 159,0897$ Da devido a perda de um grupo CHO_2 .

Figura 10- Espectro MS/MS do composto 9 – triptofano.



O composto 10, t_r 3,14 minutos, possui $[\text{M-H}]^-$ 214,0734 Da (Figura 11) foi identificado como o hormônio cinetina, cuja fórmula molecular é $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}_5\text{O}$, a molécula foi identificada em comparação com o padrão analítico. O espectro de segunda ordem apresentou fragmento $m/z = 133,0392$ Da representa relativo a perda de um radical 2-metilfurano ($\text{C}_5\text{H}_5\text{O}$) e o fragmento $m/z = 112,9859$, característico desse hormônio. A presença desse composto no néctar foi confirmado pelo modo de ionização positivo, pico 6 na tabela 6, porém com outros padrões de fragmentações. Em ambos os casos NI e PI os fragmentos foram compatíveis com o padrão analítico.

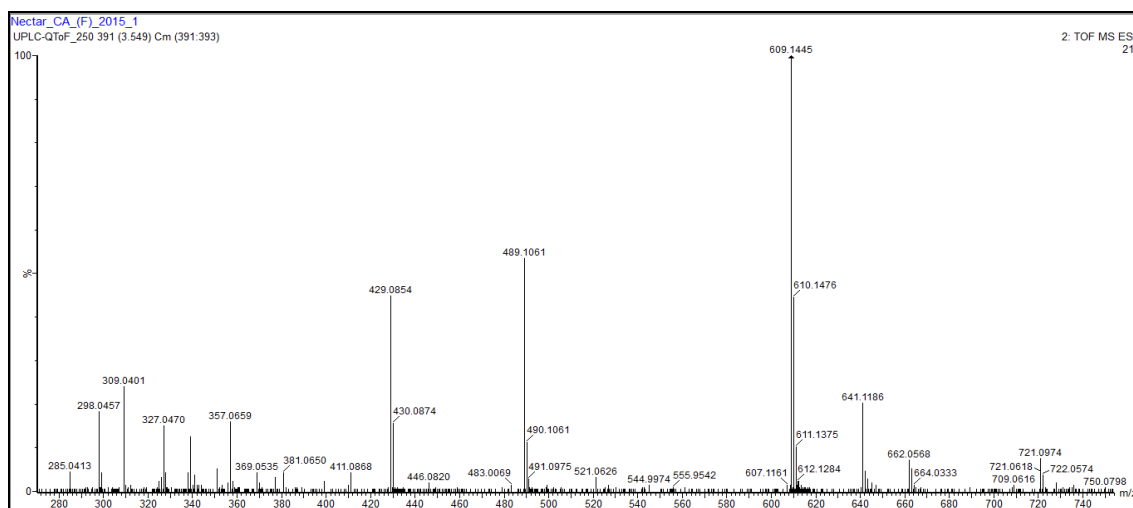
Figura 11- Espectro MS do composto 10 – cinetina.



O composto 11, t_r 3,20 minutos, não foi identificado e não possui nenhuma referência na literatura a seu respeito. Possui fragmentações em $m/z = 430,2372$, 341,1127 Da. O composto não foi detectado no modo positivo.

O composto 12, t_r 3,54 minutos, foi descrito por Negri, G., et al. (2012) e identificado como Isoorientina-2''-*O*-glicosídeo $[M-H]^-$ 609,1460 Da (Figura 12) e $[M+H]^+$ 611,1600 Da, cuja fórmula molecular é $C_{27}H_{30}O_{16}$. De acordo com os autores, o íon fragmento de $m/z = 429,0959$ Da $[(M-H)-180]^-$ indica a fragmentação da porção de açúcar (glicose) a partir da *O*-glicosídeo. A característica do íon (aglicona +41– 18) para esse tipo de flavanóide foi detectada na $m/z = 309,0422$, que corrobora com a *O*-glicosilação na posição 2''- luteolina como aglicona. A perda de 120 e 180 Da ($m/z = 489,1017$ e $429,0959$) são significativas para diglicosídeos como sophoroside (1-2 ligações entre duas moléculas de glicose).

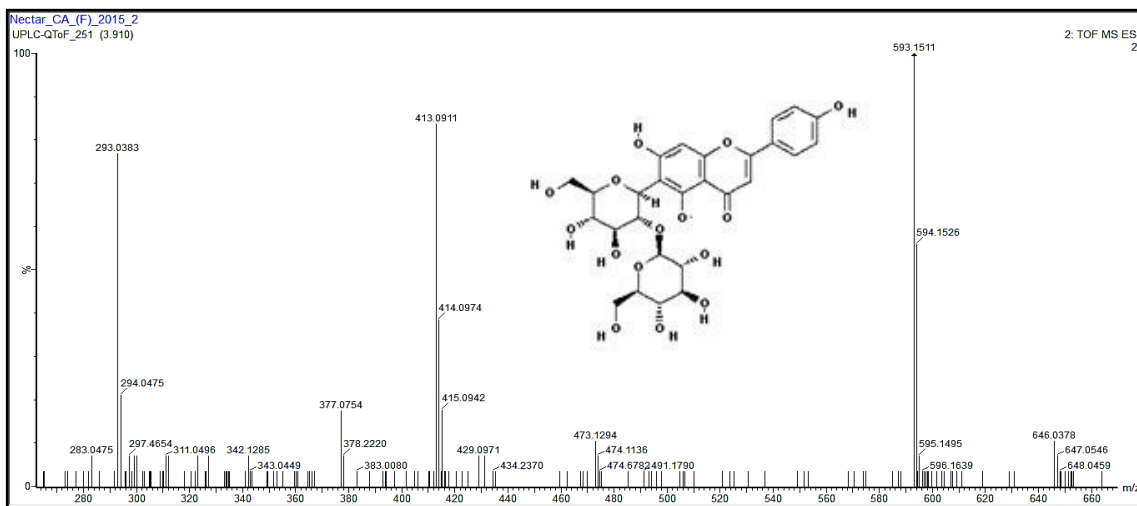
Figura 12- Espectro MS/MS do composto 12 - isoorientina-2''-*O*-glicosídeo



O composto 13, t_r 3,79 minutos, não foi identificado e não possui nenhuma referência na literatura a seu respeito. Possui fragmentações em $m/z = 711,1812$, 341,1076. Da. O composto não foi detectado no modo positivo.

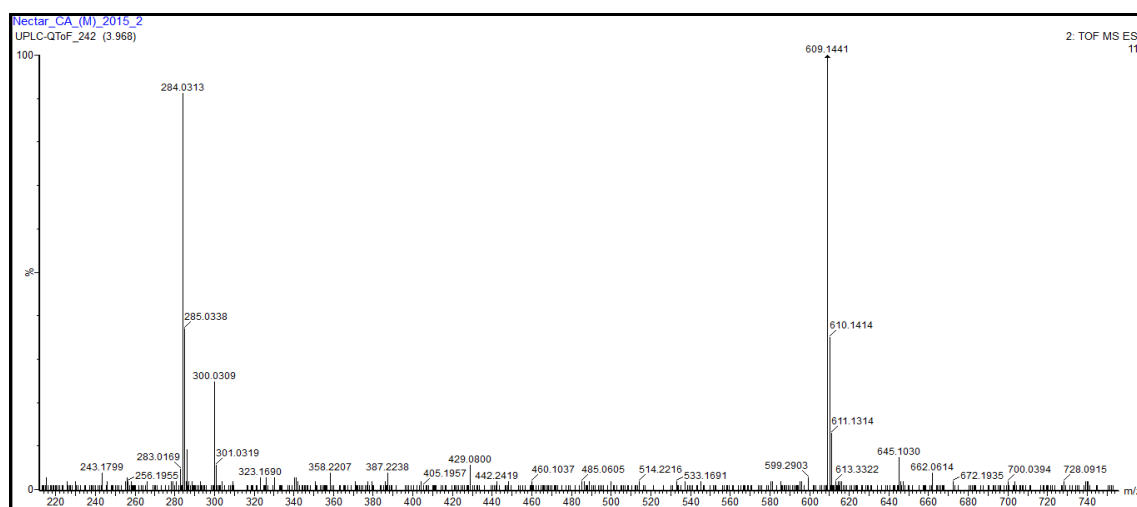
O composto 14, t_r 3,90 minutos, foi descrito por Negri, G., et al. (2012) e identificado como Isovitexina-2''-*O*-glicosídeo $[M-H]^-$ 593,1480 Da (Figura 13) e $[M+H]^+$ 595,1662, cuja fórmula molecular é $C_{27}H_{30}O_{15}$. Os fragmentos $m/z = 413,0913$ Da, 293,0433 Da e 473,1009 Da são característicos de flavonas *O*-glucosil-C-glicósido, indicando a presença de sophorosídeo, e apigenina como aglicona de acordo com Negri, G., et al. (2012).

Figura 13- Espectro MS/MS do composto 14 - isovitexina-2''-*O*-glicosídeo



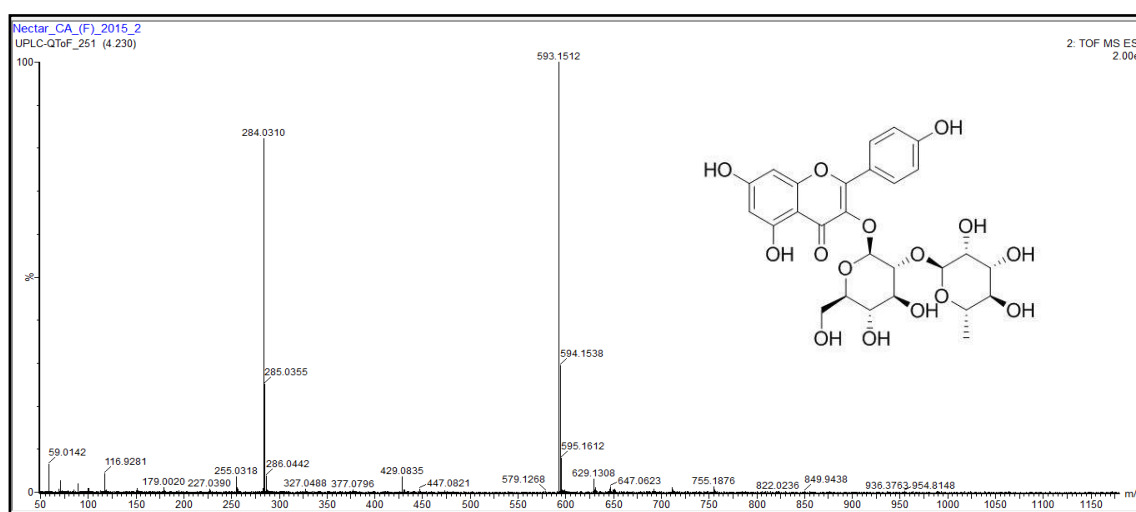
O composto 15, t_r 3,96 minutos, foi descrito por Truchado, Ferreres et al. (2009) e identificado como Luteolina-7-*O*-sophorisídeo $[M-H]^-$ 609,1422 Da (Figura 14), cuja fórmula molecular é $C_{27}H_{30}O_{16}$. Os fragmentos $m/z = 429,0817$ Da e 285,0345 Da são característicos dessa substância de acordo com Truchado, Ferreres et al. (2009).

Figura 14- Espectro MS/MS do composto 15 - luteolina-7-*O*-sophorisídeo



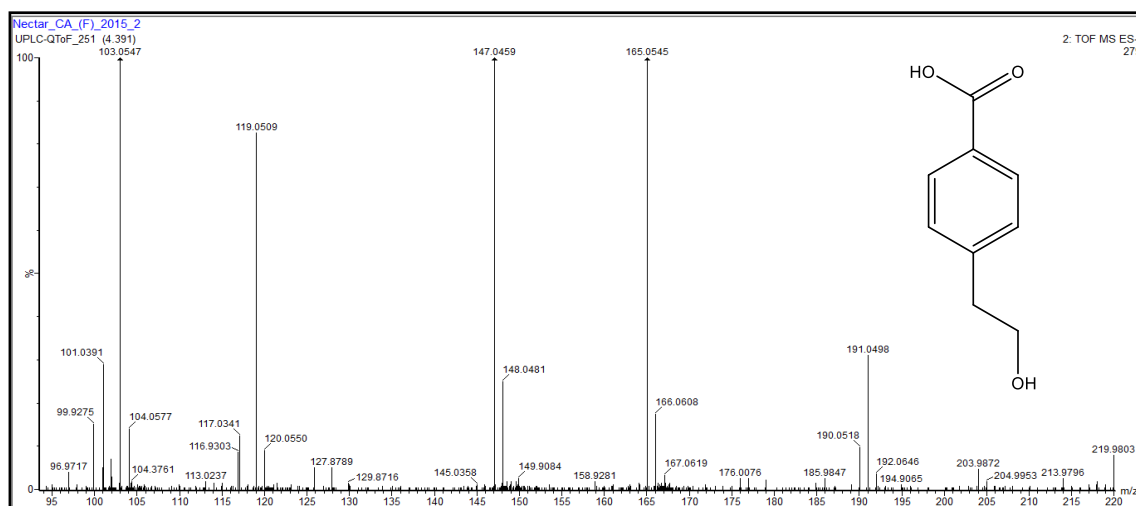
O composto 16, t_r 4,23 minutos, possui $[M-H]^-$ 593,1519 Da (Figura 15) foi descrito por Truchado, Ferreres et al. (2009) e identificado como Kaempferol-3-*O*-neohesperidosídeo, cuja fórmula molecular é $C_{27}H_{30}O_{15}$. Segundo os autores, o fragmento $m/z = 285,0354$ Da indica que o glicosídeo é um derivado do Kaempferol. O mesmo artigo ainda cita que esse composto 17 foi previamente identificado como um constituinte relevante no néctar de alecrim. A presença do Kaempferol-3-*O*-neohesperidosídeo $[M+H]^+$ 595,1666 Da no néctar foi confirmado pelo modo de ionização positivo, pico 10 na tabela 8.

Figura 15- Espectro MS/MS do composto 16 - kaempferol-3-*O*-neohesperidosídeo



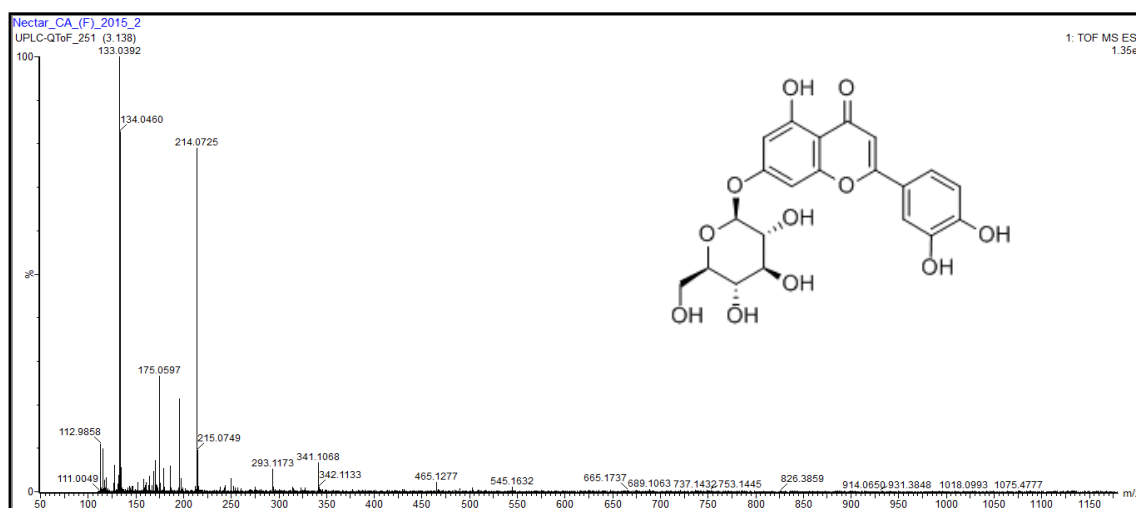
O composto 17, t_r 4,40 minutos, possui $[M-H]^-$ 165,0548 Da (Figura 16) não foi citada em nenhuma literatura, porém essa molécula possui fragmentações características, o íon $m/z = 147,0457$ Da é gerado pela perda de uma molécula de H_2O , o íon $m/z = 119,0508$ Da é gerado pela saída de um grupo CO e o íon $m/z = 103,0552$ Da pela saída de um grupo CO_2 . Através dessas fragmentações, sugere-se que o composto referido é o 4-(2-hidroxi)etil)ácido benzóico, cuja fórmula molecular é $C_9H_{10}O_3$. Esse composto não foi detectado em modo positivo.

Figura 16- Espectro MS/MS do composto 17 - 4-(2-hidroxietil)ácido benzóico



O composto 18, t_r 4,63 minutos, foi descrito por Farag, Mohsen et al. (2014) e identificado como Luteolina hexosídeo $[M-H]^-$ 447,0919 Da, cuja fórmula molecular é $C_{21}H_{20}O_{11}$. O fragmento $m/z = 285,0391$ corresponde a massa molar do Kaempferol que é característico da Luteolina hexosídeo, segundo Farag, Mohsen et. (2014). A presença desse composto $[M+H]^+$ 449,1068 Da é confirmado pelo modo de ionização positivo, pico 11 na tabela 8.

Figura 7- Espectro MS/MS do composto 18 - luteolina hexosídeo

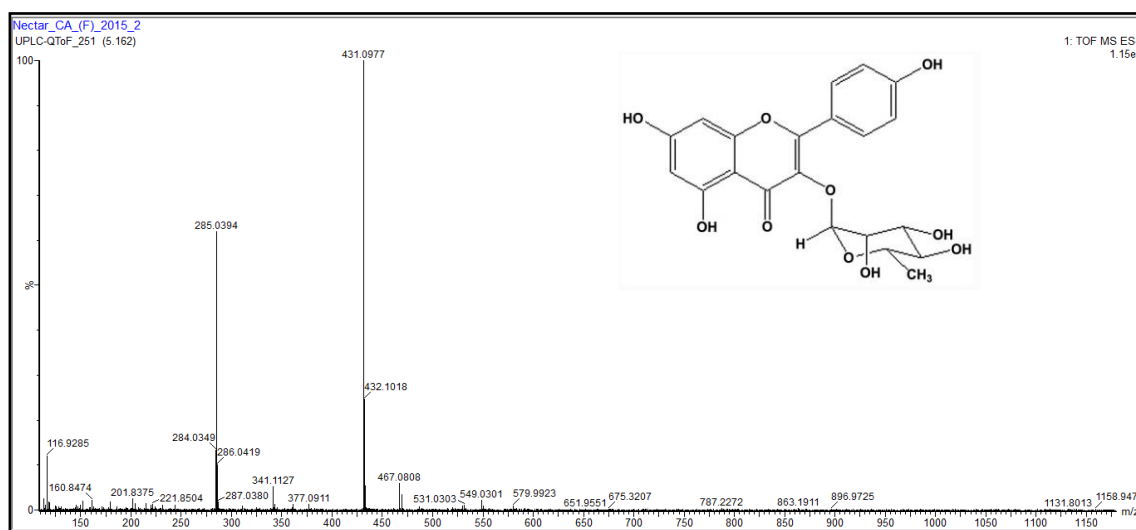


O composto 19, t_r 4,92 minutos, possui $[M-H]^-$ 489,1046 Da, não foi encontrado na literatura, porém essa molécula possui fragmentação característica do grupo de flavonóides que fragmentam com $m/z = 285,0402$ Da que corresponde a massa

do íon desprotonado do Kaempferol. Esse composto não foi detectado em modo positivo.

O composto 20, t_r 5,14 minutos, foi descrito por Abu-Reidah, Ali-Shtayeh et al. (2015) e identificado como Kaempferol ramosídeo $[M-H]^-$ 431,0977 Da (Figura 18), cuja fórmula molecular é $C_{21}H_{20}O_{10}$. O íon fragmento $m/z = 285,0394$ corresponde a molécula desprotonada do Kaempferol que é característico do Kaempferol rhaminosídeo, segundo Abu-Reidah, Ali-Shtayeh et al. (2015). A presença do Kaempferol rhaminosídeo $[M-H]^+$ 433,1146 Da foi confirmada pelo modo de ionização positivo, pico 13 na tabela 13.

Figura 18- Espectro MS do composto 20 - kaempferol ramosídeo



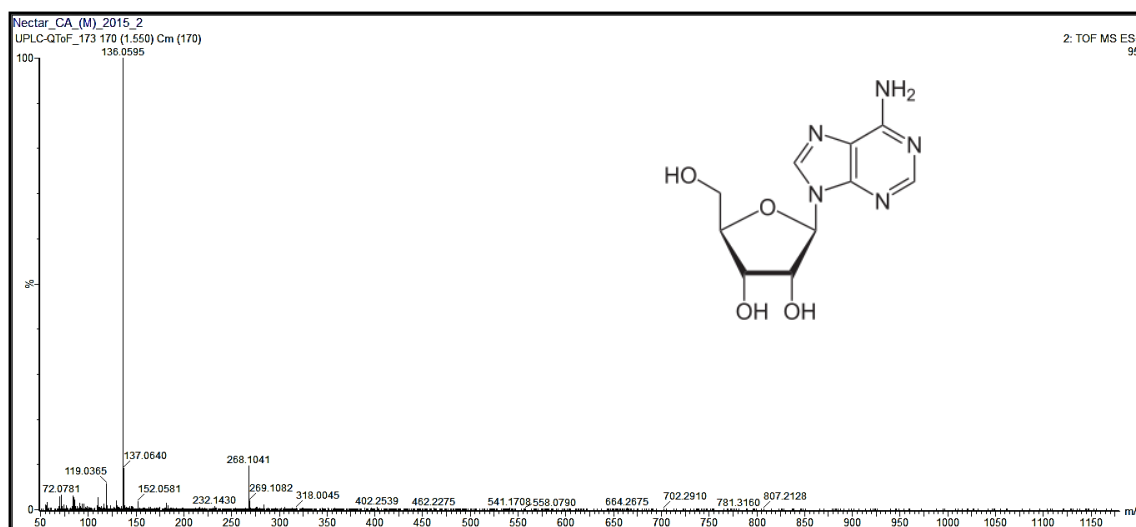
Análises em modo positivo

As descrições que seguem logo abaixo são relativas as moléculas que somente foram detectadas em modo de ionização positivo.

O composto 1', t_r 0,82 minutos, foi detectado em modo de ionização positivo, sendo que, não foi identificado em nenhuma referência. Possui fragmentações em $m/z = 383,1103$, $219,0258$ e $203,0513$ Da. O composto não foi detectado modo negativo.

O composto 5', t_r 1,54 minutos, possui $[M+H]^+$ 268,1032 Da (Figura 19) não foi encontrado na literatura. Porém, essa molécula possui fragmentação característica, o íon $m/z = 136,0580$ Da pode ser atribuída tentativamente a adenina que é uma base nitrogenada. Então sugere-se que esse composto seja adenosina que é um nucleosídeo, formado pela união de uma adenina e uma ribose. A adenosina é apenas detectada em modo positivo. A fórmula molecular da adenosina é $C_{10}H_{13}N_5O_4$.

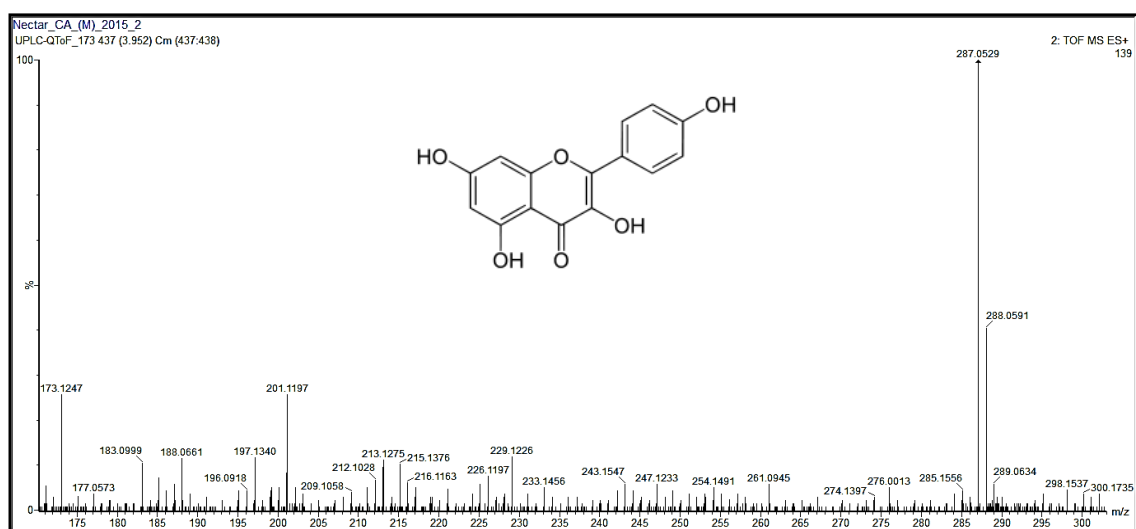
Figura 19- Espectro MS/MS do composto 5' - adenosina.



O composto 10', t_r 3,66 minutos, não foi identificado em nenhuma referência. Possui fragmentações em $m/z = 251,1001$ e $120,0787$ Da. Apenas é detectado no modo positivo.

O composto 12', t_r 3,96 minutos, foi descrito por Abu-Reidah, Ali-Shtayeh et al. (2015) e identificado como Kaempferol $[M+H]^+$ 287,0538 Da (Figura 20), cuja fórmula molecular é $C_{15}H_{10}O_6$. Os fragmentos $m/z = 229,1259$, $213,1549$ e $201,1198$ Da são característicos do Kaempferol de acordo com Abu-Reidah, Ali-Shtayeh *et al.* (2015).

Figura 20- Espectro MS/MS do composto 12' - kaempferol



O composto 15', T_r 4,90 minutos, possui [M+H]⁺ 583,3306 Da, trata-se de uma molécula não identificada, e não citada em nenhuma referência. Porém, essa molécula possui fragmentação característica do grupo de flavonóides que fragmentam com $m/z= 287,0532$ Da que corresponde ao íon protonado do Kaempferol no modo de ionização positivo. Esse composto não foi detectado em modo negativo.

6. Conclusão

A metodologia aplicada mostrou-se rápida, com alto grau de exatidão de massas garantindo assim uma identificação precisa dos metabólitos presentes no néctar.

Nas amostras foram identificados cerca de 16 compostos, dentre eles, aminoácidos, açúcares e flavanóides, muitas dessas moléculas estão sendo descritas pela primeira vez em néctar de melão.

As espécies hermafrodita e masculina possuem perfis diferenciados, sendo que, os dados obtidos nesse trabalho tornarão possível no futuro o entendimento da relação entre perfil químico e visitação de polinizadores.

O conhecimento gerado poderá auxiliar posteriormente no aumento de produtividade do melão, haja vista que, tais resultados poderão auxiliar na tomada de decisão nos processos de melhoramento genético do fruto.

REFERÊNCIAS

1. Baker HG, Baker I. 1983. **Floral nectar constituents in relation to pollinator type**. In: Jones CE, Little RJ, eds. *Handbook of experimental pollination biology*. New York, NY: Van Nostrand Reinhold, 117–141.
2. Baker HG, Baker I. 1990. **The predictive value of nectar chemistry to the recognition of pollinator types**. *Israel Journal of Botany* 39: 157–166.
3. Balback, A. **As frutas na medicina doméstica**. 12 ed. São Paulo: A. Edificação do Lar, [s.d.] 370p.il.
4. Bianchi, T. (2016). **Textural properties of different melon (*Cucumis melo* L.) fruit types: Sensory and physical-chemical evaluation**. *Scientia Horticulturae* 201: 46-56.
5. Brandenburg, A., (2009). **The sweetest thing: advances in nectar research**. *Curr Opin Plant Biol* 12(4): 486-490.
6. Churchwell, M. I., et al. (2005). **Improving LC-MS sensitivity through increases in chromatographic performance: comparisons of UPLC-ES/MS/MS to HPLC-ES/MS/MS**. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 825(2): 134-143.
7. Costa, C. P. Pinto, C.A.B.P. **Melhoramento de Hortaliças**. Piracicaba, SP: ESALQ, 1977. p. 164 -175.
8. De la Barrera, E. and P. S. Nobel (2004). **Nectar: properties, floral aspects, and speculations on origin**. *Trends Plant Sci* 9(2): 65-69.
9. Deulofeu, C. **Situación y perspectivas del melón en el mundo**. In: VALLESPÍR, A. N., coord. *Melones*. Reus: Horticultura, 1997. Cap.2, p.21-24. (Compendios de Horticultura, 10).
10. Farag, M. A., (2014). **Metabolomic fingerprints of 21 date palm fruit varieties from Egypt using UPLC/PDA/ESI-qTOF-MS and GC-MS analyzed by chemometrics**. *Food Research International* 64: 218-226.
11. Franco, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1992. 230p.

12. Freeman CE, Reid WH, Becvar JE, Scogin R. (1984). **Similarity and apparent convergence in the nectar-sugar composition of some hummingbird-pollinated flowers.** *Botanical Gazette* 145: 132–135.
13. Galetto L, Bernadello G, Sosa CA. (1998). **The relationship between floral nectar composition and visitors in *Lycium* (Solanaceae) from Argentina and Chile: what does it reflect?** *Flora* 193: 303–314.
14. Heil, M. (2011). **Nectar: generation, regulation and ecological functions.** *Trends Plant Sci* 16(4): 191-200.
15. **IUPAC Gold Book,**
16. Hosoki, T.; Ishibashi, A.; Kitamura, H.; Kai, N.; Hamada, M.; Ohta, T. (1990). **Classification of oriental melons based on morphological, ecological and physiological differences.** *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, v.58, n.4, p.959-970.
17. Jayasooriya, A.P., Sakono, M., Yukizaki, C., Kawano, M., Yamamoto, K., Fukuda, N., (2000). **Effects of *Momordica charantia* powder on serum glucose levels and various lipid parameters in rats fed with cholesterol-free and cholesterol-enriched diets.** *J. Ethnopharmacol.* 72, 331–336.
18. Khan, M.R., Omoloso, A.D., (1998). ***Momordica charantia* and *Allium sativum*: Broad spectrum antibacterial activity.** *Kor. J. Pharmacol.* 29, 155–158.
19. Kessler, D. and I. T. Baldwin (2007). **Making sense of nectar scents: the effects of nectar secondary metabolites on floral visitors of *Nicotiana attenuata*.** *Plant J* 49(5): 840-854.
20. Domingos Almeida, (2006). **Manual de Culturas Hortícolas, Vol. 2.**
21. Marshall, A. G.; Hendrickson, C. L.; Jackson, G. S. (1998). **Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer.** *Mass Spectrom. Rev.*, 17 (1).

22. McCreight, J.D.; Staub, J.E.; López Sesé, A.I.; Chung, S.M. (2004). **Isozyme variation in indian and chinese melon (*Cucumis melo* L.) germplasm collections.** *Journal of the American Society for Horticulture Science*, v.129, p.811-818.
23. Moreira, R.P.L **Desidratação osmótica de melão (*Cucumis melo* L.) em soluções de sacarose e de sorbitol.** Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2012. Tese Doutorado
24. Nascimento Neto, J. R. **Formas de aplicação e doses de nitrogênio e potássio no cultivo do meloeiro amarelo.** Ceará: UFC, 2011. 77p. Tese Doutorado.
25. Negri, G., et al. (2012). **Chemical composition of hydroethanolic extracts from *Siparuna guianensis*, medicinal plant used as anxiolytics in Amazon region.** *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 22(5):1024-1034.
26. Novakova, L., (2006). **Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis.** *Talanta* 68(3): 908-918.
27. Pacini E, Nepi M, Vesprini JL. (2003). **Nectary biodiversity: a short review.** *Plant Systematics and Evolution* 238: 7–21.
28. Pereira, T.F.C (2009). **Requerimentos de polinização do meloeiro (*Cucumis melo* L.) no município de Acaraú – CE – Brasil.** *Caatinga*, v.22, n.1, p.238-242.
29. Perret M, Chautems A, Spichiger R, Peixoto M, Savolainen V. (2001). **Nectar sugar composition in relation to pollination syndromes in *Sinningieae* (*Gesneriaceae*).** *Annals of Botany* 87: 267–273.
30. R.W. Robinson and D.S. Decker-Walters. **Cucurbits**, 1997.
31. Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. **Principles of Instrumental Analysis.** 6. ed. Stanford: Thomson, v. I, 2007.
32. Sousa, R.M.; Aguiar, O.S.; Freitas, B.M.; Silveira Neto, A.A. (2009). **Requerimentos de polinização do meloeiro (*Cucumis melo* L.) no município de Acaraú – CE – Brasil.** *Caatinga*, v.22, n.1, p.238-242.
33. Stiles FG, Freeman CE. (1993). **Patterns in floral nectar characteristics of some bird-visited plant species from Costa Rica.** *Biotropica* 25: 191–205.

34. Subratty, A.H., Gurib-Fakim, A., Mahomoodally, F., (2005). **Bitter melon: an exotic vegetable with medicinal values.** Nutr. Food Sci. 35, 143–147.
35. Truchado, P., et al. (2009). **"Liquid chromatography-tandem mass spectrometry reveals the widespread occurrence of flavonoid glycosides in honey, and their potential as floral origin markers."** J Chromatogr A **1216**(43): 7241-7248
36. Trufelli, H.; Palma, P.; Famiglioni, G.; Cappiello, et al. (2010). **"An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry."** A. Mass Spectrom. Rev, 2010, 30, 491.
37. Vouldoukis, I., Lacan, D., Kamate, C., Coste, P., Calenda, A., Mazier, D., Conti, M., Dugas, B., (2004). **Antioxidant and anti-inflammatory properties of a Cucumis melo L extract rich in superoxide dismutase activity.** J. Ethnopharmacol. 94, 67–75.
38. Wrona, M., et al. (2016). **"Ultra high performance liquid chromatography coupled to quadruple time-of-flight with MS(E) technology used for qualitative analysis of non-volatile oxidation markers in sliced packed mushrooms (Agaricus Bisporus)."** J Chromatogr A **1432**: 73-83.
39. <http://www.semabelhasemalimento.com.br/projeto-polinizadores-do-brasil/> -
Acesso dia 05.04.2016

