

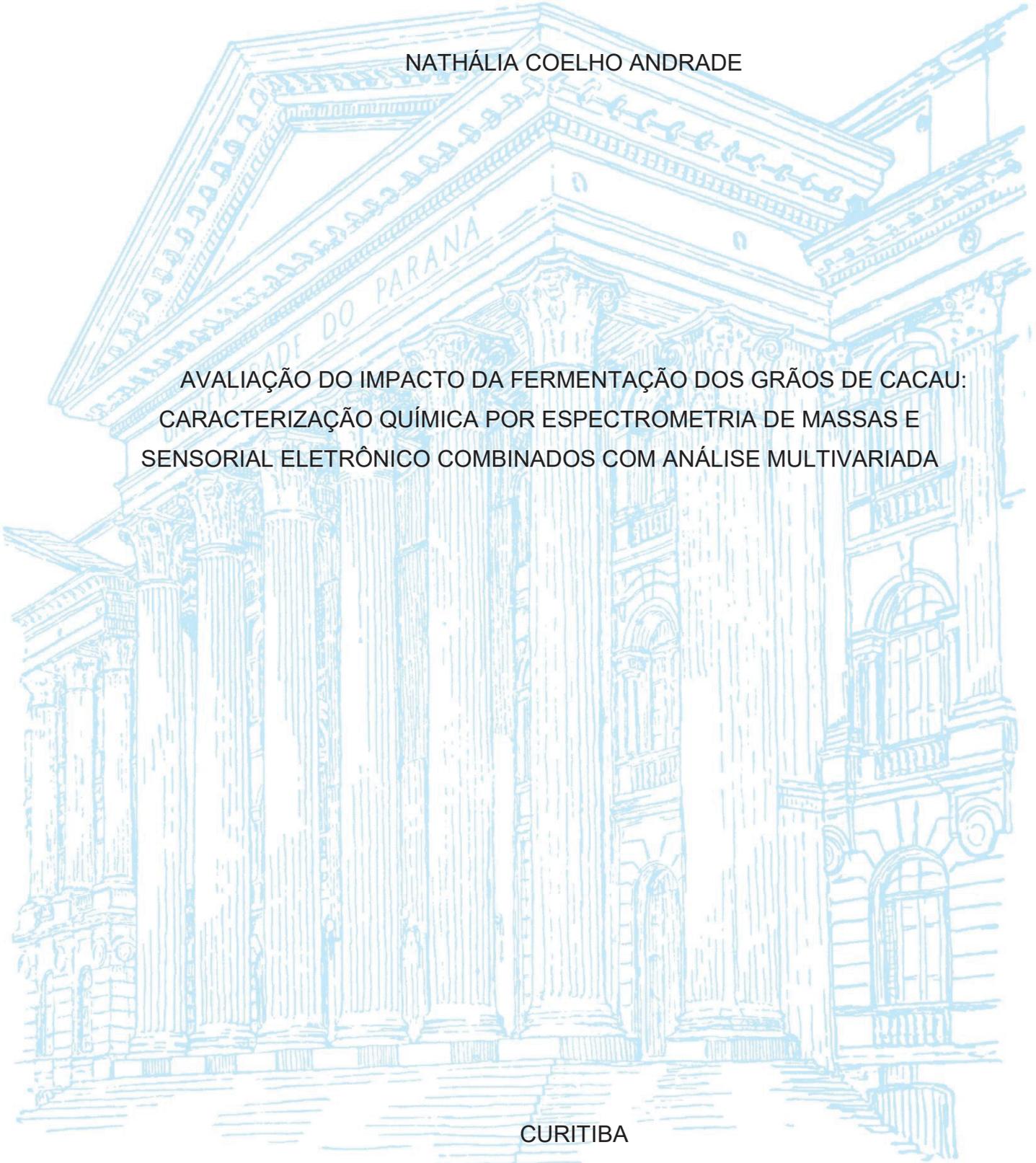
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NATHÁLIA COELHO ANDRADE

AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA FERMENTAÇÃO DOS GRÃOS DE CACAU:  
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS E  
SENSORIAL ELETRÔNICO COMBINADOS COM ANÁLISE MULTIVARIADA

CURITIBA

2024



NATHÁLIA COELHO ANDRADE

AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA FERMENTAÇÃO DOS GRÃOS DE CACAU:  
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS E  
SENSORIAL ELETRÔNICO COMBINADOS COM ANÁLISE MULTIVARIADA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Francinete Ramos Campos

Coorientador: Prof. Dr. Frederico Luis Felipe Soares

CURITIBA

2024

Andrade, Nathália Coelho

Avaliação do impacto da fermentação dos grãos de cacau [recurso eletrônico]:  
caracterização química por espectrometria de massas e sensorial eletrônico  
combinados com análise multivariada / Nathália Coelho Andrade – Curitiba, 2024.  
1 recurso online : PDF

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2024.

Orientador: Profa. Dra. Francinete Ramos Campos  
Coorientador: Prof. Dr. Frederico Luis Felipe Soares

1. Cacau. 2. Fermentação. 3. Espectrometria de massas. 4. Análise multivariada.  
I. Campos, Francinete Ramos. II. Soares, Frederico Luis Felipe. III. Universidade  
Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 664.024

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **NATHÁLIA COELHO ANDRADE** intitulada: **AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA FERMENTAÇÃO DOS GRÃOS DE CACAU: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS E SENSORIAL ELETRÔNICO COMBINADOS COM ANÁLISE MULTIVARIADA.**, sob orientação da Profa. Dra. FRANCINETE RAMOS CAMPOS, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 05 de Agosto de 2024.

Assinatura Eletrônica

06/08/2024 15:53:52.0

FRANCINETE RAMOS CAMPOS

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

07/08/2024 07:16:00.0

RICARDO WAGNER

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

09/08/2024 12:20:56.0

RAFAEL BORGES DA SILVA VALADARES

Avaliador Externo (INSTITUTO TECNOLÓGICO VALE)

## **AGRADECIMENTOS**

A minha mãe Gizéli, minha inspiração, por me abrir caminhos que até hoje estou percorrendo. Obrigada pelas palavras de suporte, pelo ombro cedido e por me instigar desde cedo a buscar os porquês.

Ao meu companheiro Jocinei, parceiro de vida, de trabalho e maior incentivador durante essa trajetória cheia de desvios que é a pós-graduação. Obrigada por acreditar em mim e me segurar em tantos momentos para que eu chegasse até aqui.

Aos meus familiares, por respeitarem os momentos de ausência. Em especial ao meu pai, meus irmãos e à Mari.

A minha orientadora, Professora Dra. Francinete Ramos Campos, por desde o primeiro contato acreditar neste projeto e me guiar. Obrigada pelas partilhas, pelos cafés e por me receber tão bem no grupo.

Ao meu co-orientador, Professor Dr. Frederico Luis Felipe Soares, pelas reflexões, discussões e por trazer um olhar essencial ao estudo.

Ao grupo de pesquisa no qual faço parte, LABICEM, pela receptividade e trocas.

Ao Instituto SENAI de Tecnologia Ambiental, pelo uso da estrutura analítica e pelas horas cedidas para a realização deste projeto. Aos meus colegas de trabalho, em especial à Camila, agradeço pelas conversas, pela amizade e desabafos.

A banca examinadora, pelo aceite em contribuir com esse estudo e trazer suas percepções.

O mundo era para mim um segredo que eu desejava decifrar. Entre as mais antigas sensações de que posso me lembrar estão a curiosidade, a pesquisa dedicada para aprender as leis ocultas da natureza e uma felicidade equivalente ao júbilo quando elas se revelavam a mim (Mary Shelley).

## RESUMO

O Brasil é o sexto maior produtor de cacau no mundo e o mercado econômico do cacau é responsável por toneladas de matérias primas para a produção de chocolate. Porém, até o cacau se transformar em chocolate, ele passa por alguns processos que desenvolvem e potencializam suas características sensoriais. Um desses processos é a fermentação, que ocorre de maneira espontânea a partir dos micro-organismos presentes no ambiente como leveduras, bactérias lácticas e acéticas que promovem o desenvolvimento dos perfis sensoriais de sabor e aroma dos grãos de cacau, variando para cada região. Desta forma, faz-se necessário o entendimento das mudanças químicas e sensoriais durante o processo fermentativo, possibilitando o desenvolvimento de novas tecnologias capazes de gerar um produto de qualidade superior e notas finas, além de auxiliar em discussões para futuros estudos sobre o *terroir* do cacau brasileiro. Esse trabalho teve como objetivo a caracterização química dos metabólitos voláteis presentes em grãos de cacau a cada dia do processo fermentativo por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (GC-MS/MS). Além de serem avaliadas as transformações sensoriais por e-Nose e e-Tongue, equipamentos de sensorial eletrônico. Os dados obtidos foram pré-processados e realizada a análise de componentes principais (PCA), onde foram verificados os marcadores de cada dia da fermentação. Essa é a primeira vez que se utilizam as técnicas de sensorial eletrônico visando a compreensão das transformações sensoriais do processo fermentativo do cacau. Os resultados do sensorial eletrônico demonstraram que as transformações em termos de gosto são mais intensas no penúltimo dia de fermentação, enquanto que para o aroma estas transformações se iniciam no segundo dia. Para os metabólitos voláteis, foi possível verificar que o início da fermentação é marcado pela presença de álcoois simples e, no decorrer da fermentação começam as oxidações, gerando compostos como aldeídos, cetonas e ésteres, e para o final, ácidos orgânicos, álcoois superiores e pirazinas foram detectados. Os resultados das diferentes técnicas analíticas, ao mesmo tempo que corroboram entre si, trazem informações complementares. Isso demonstra a importância da combinação destas técnicas para a compreensão das transformações sensoriais durante a fermentação do cacau.

Palavras-chave: cacau; fermentação; sensorial eletrônico; espectrometria de massas; análise multivariada.

## ABSTRACT

Brazil is the sixth-largest producer of cocoa in the world and the cocoa economic market is responsible for tons of raw materials for chocolate production. Before cocoa becomes chocolate, it undergoes several processes that develop and enhance its sensory characteristics. One critical process is fermentation, which occurs spontaneously due to microorganisms present in the environment, such as yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. These microorganisms promote the development of the taste and aroma profiles of cocoa beans, which vary by region. Therefore, understanding the chemical and sensory changes during the fermentation process is essential for developing new technologies that can produce superior quality products with fine notes, as well as aiding discussions for future studies on the terroir of Brazilian cocoa. This study aims to assess through chemical characterization of volatile metabolites present in cocoa beans each day of fermentation process using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS/MS). Additionally, sensory transformations were evaluated using e-Nose and e-Tongue, electronic sensory equipment. The data obtained were pre-processed, and principal component analysis (PCA) was performed to identify markers for each day of fermentation. This is the first time electronic sensory techniques have been used to understand the sensory transformations during cocoa fermentation. The results from the electronic sensory analysis demonstrated that taste transformations are more intense on the day before the last day of fermentation, while aroma transformations begin on the second day. Regarding volatile metabolites, the beginning of fermentation is marked by the presence of simple alcohols and as fermentation progresses, oxidations occur, producing compounds like aldehyde, ketone and ester. Towards the end of fermentation, organic acids, higher alcohols, and pyrazines are detected. The results from several analytical techniques, while corroborating each other, provide complementary information. This demonstrates the importance of combining these techniques to understand the sensory transformations during cocoa fermentation.

Keywords: cocoa; fermentation; electronic sensory; mass spectrometry; multivariate analysis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> – CACAUEIRO, ÁRVORE DO CACAU COM FRUTOS ( <i>Theobroma cacao</i> L.).....	21
<b>FIGURA 2</b> – PROCESSO PRODUTIVO DO CHOCOLATE.....	23
<b>FIGURA 3</b> – (a) MICRO-ORGANISMOS ATUANTES DURANTE A FERMENTAÇÃO (b) COMPOSTOS PRODUZIDOS E CONSUMIDOS DURANTE A FERMENTAÇÃO.....	25
<b>FIGURA 4</b> – REPRESENTAÇÃO DA CROMATOGRAFIA A GÁS. ....	29
<b>FIGURA 5</b> – COMPONENTES DE UM ESPECTRÔMETRO DE MASSAS.....	31
<b>FIGURA 6</b> – EQUIPAMENTO ANALÍTICO E-TONGUE. ....	33
<b>FIGURA 7</b> – REPRESENTAÇÃO DOS COMPONENTES DO EQUIPAMENTO E- TONGUE.....	34
<b>FIGURA 8</b> – EQUIPAMENTO ANALÍTICO E-NOSE.....	35
<b>FIGURA 9</b> – REPRESENTAÇÃO DOS COMPONENTES DO EQUIPAMENTO E- NOSE.....	36
<b>FIGURA 10</b> – INTERDISCIPLINARIDADE DE QUIMIOMETRIA ENTRE AS TRÊS ÁREAS.....	37
<b>FIGURA 11</b> – METODOLOGIA DE PREPARO APLICADA PARA AS AMOSTRAS DE PÓ DE CACAU FERMENTADO. ....	40
<b>FIGURA 12</b> – PCA DE AMOSTRAS DE CACAU FERMENTADO. DADOS E- TONGUE COM (a) <i>SCORES</i> (b) <i>LOADINGS</i> . ....	48
<b>FIGURA 13</b> – PCA DOS DADOS DE E-NOSE COM COLUNA MXT-5 (a) TEMPOS DE FERMENTAÇÃO DO CACAU (b) TEMPO DE RETENÇÃO DOS PICOS RESPONSÁVEIS PELOS AGRUPAMENTOS.....	54
<b>FIGURA 14</b> – PCA DOS DADOS E-NOSE COM COLUNA MXT-1701 (a) TEMPOS DE FERMENTAÇÃO DO CACAU (b) TEMPO DE RETENÇÃO DOS PICOS RESPONSÁVEIS PELOS AGRUPAMENTOS.....	56
<b>FIGURA 15</b> – PCA DADOS E-NOSE COM COLUNA MXT-5 RETIRANDO OS MARCADORES INICIAIS (a) TEMPOS DE FERMENTAÇÃO DO CACAU (b) TEMPO DE RETENÇÃO DOS PICOS RESPONSÁVEIS PELOS AGRUPAMENTOS.....	58

**FIGURA 16** – PCA DOS DADOS DE GC-SPME-MS. (a) TEMPOS DE FERMENTAÇÃO DO CACAU (b) TEMPO DE RETENÇÃO DOS PICOS RESPONSÁVEIS PELOS AGRUPAMENTOS.....63

## LISTA DE QUADROS

<b>QUADRO 1</b> – IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS DE AMOSTRAS DE CACAU FERMENTADO E SEUS RESPECTIVOS AROMAS POR E-NOSE..	51
<b>QUADRO 2</b> – IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS POR GC-MS E SEUS RESPECTIVOS AROMAS POR BANCO DE DADOS DO E-NOSE DE AMOSTRAS DE CACAU FERMENTADO. ....	52
<b>QUADRO 3</b> – IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS POR E-NOSE E GC-MS DE AMOSTRAS DE CACAU FERMENTADO. COMPARATIVO ENTRE OS MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO. ....	53
<b>QUADRO 4</b> – MARCADORES DA CARACTERIZAÇÃO POR E-NOSE DO PROCESSO FERMENTATIVO DO CACAU EM CADA DIA DE FERMENTAÇÃO.....	60
<b>QUADRO 5</b> – COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR GC-MS COMO MARCADORES DURANTE O PROCESSO FERMENTATIVO DO CACAU.....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AAB	Bactérias do ácido acético
Ag	Prata
AgCl	Cloreto de prata
CI	Ionização química
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DI	Imersão direta
ECD	Detector de captura de elétrons
EI	Impacto de elétrons
EIC	Cromatograma de íon extraído
e-Nose	Nariz eletrônico
e-Tongue	Língua eletrônica
FID	Detector por ionização de chama
GC-MS/MS	Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas <i>in Tandem</i>
H <sub>2</sub>	Gás hidrogênio
H <sub>2</sub> O	Água
HS	<i>Headspace</i>
ISO	International Organization of Standardization
IST	Ambiental Instituto Senai de Tecnologia Ambiental
ITV	Instituto Tecnológico da Vale
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LAB	Bactérias lácticas
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
mL	mililitro
MS	Espectrometria de Massas
MS/MS	Espectrometria de massas <i>in Tandem</i>
N <sub>2</sub>	Gás nitrogênio
NIR	Infravermelho próximo
NIST	National Institute of Standard and Technology
PC	Componentes Principais
PCA	Análises de Componentes Principais
IS	Padrão interno
RI	Índice de Kovats

RT	Tempo de retenção
SPME	Microextração em fase sólida
SVOC	Compostos orgânicos semivoláteis
TIC	Cromatograma de íon total
UFPR	Universidade Federal do Paraná
VOC	Compostos orgânicos voláteis

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	percentagem
µg/L	micrograma por litro
µL	microlitro
µm	micrometros
d4	substituição de 4 hidrogênios por 4 deutérios
eV	elétrons Volt
g	grama
h	horas
kg	quilograma
kPa	quilo Pascal
m	metro
m/m	relação massa-massa
min	minutos
mL	mililitro
mL/min	mililitros por minuto
mm	milímetros
ms	milissegundo
°C	graus Celsius
°C/min	graus Celsius por minuto
°C/s	graus Celsius por segundo
rpm	rotações por minuto
s	segundos

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1 OBJETIVOS .....	19
1.1.1 Objetivo geral .....	19
1.1.2 Objetivos específicos.....	19
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>20</b>
2.1 O CACAU .....	20
2.1.1 Processo fermentativo e torrefação.....	23
2.2 MÉTODOS ANALÍTICOS .....	29
2.2.1 Cromatografia a Gás .....	29
2.2.1.1 Microextração em fase sólida .....	30
2.2.2 Espectrometria de Massas .....	31
2.2.3 Língua eletrônica.....	33
2.2.4 Nariz eletrônico .....	35
2.3 QUIMIOMETRIA.....	37
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
3.1 AMOSTRAS DE CACAU.....	40
3.2 ANÁLISE POR SPME-HS VIA GC-MS/MS .....	41
3.3 ANÁLISE POR E-TONGUE.....	42
3.4 ANÁLISE POR E-NOSE E GC-MS .....	43
3.5 ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS .....	44
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>47</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO SENSORIAL ELETRÔNICO POR E-TONGUE.....	47
4.2 CARACTERIZAÇÃO DO SENSORIAL ELETRÔNICO POR E-NOSE E GC-MS	50
4.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA POR GC-SPME-MS .....	62
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>70</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>71</b>
<b>APÊNDICE 1 – COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR GC-SPME-MS NO TEMPO 0H DE FERMENTAÇÃO</b> .....	<b>77</b>
<b>APÊNDICE 2 – COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR GC-SPME-MS NO TEMPO 24H DE FERMENTAÇÃO</b> .....	<b>79</b>
<b>APÊNDICE 3 – COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR GC-SPME-MS NO TEMPO 48H DE FERMENTAÇÃO</b> .....	<b>81</b>

<b>APÊNDICE 4 – COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR GC-SPME-MS NO TEMPO 72H DE FERMENTAÇÃO .....</b>	<b>83</b>
<b>APÊNDICE 5 – COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR GC-SPME-MS NO TEMPO 96H DE FERMENTAÇÃO .....</b>	<b>85</b>
<b>APÊNDICE 6 – COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR GC-SPME-MS NO TEMPO 120H DE FERMENTAÇÃO .....</b>	<b>87</b>
<b>APÊNDICE 7 – COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR GC-SPME-MS NO TEMPO 144H DE FERMENTAÇÃO .....</b>	<b>89</b>
<b>APÊNDICE 8 – COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR GC-SPME-MS NOS PÓS DE CACAU SECOS.....</b>	<b>91</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o sexto maior produtor de cacau do mundo e seus plantios são encontrados em áreas setentrionais do país, como o Norte e Nordeste. Já no Sudeste, a maior parte da produção se encontra no Norte do Espírito Santo e no Norte de Minas Gerais (Brainer, 2021). O cacau tem uma grande importância para a atividade econômica do país, principalmente nas regiões Norte e Nordeste, com receita nacional de exportação de US\$ 305 milhões em 2019 (Brainer, 2021). A relevância é ainda maior quando percebemos a crescente importância do tema bioeconomia tanto na academia quanto na política nos últimos anos. Apesar de exportar bastante, há a necessidade de importar também, pois o consumo da população é acima do produzido – cerca de US\$ 320 milhões, também em 2019 (Brainer, 2021).

O mercado econômico do cacau move o mundo todo e não se restringe apenas a insumo para alimentos: a indústria farmacêutica tem desenvolvido produtos com cacau, seja na forma de manteiga ou até mesmo extraindo seus bioativos. Na alimentação, o cacau é encontrado de diversas formas: em pó, *nibs*, em chocolates, cafés, etc. O consumo dos produtos de cacau tem direcionado diversos estudos que mostram uma contribuição positiva à saúde, devido aos compostos antioxidantes, anticarcinogênicos e antiaterogênicos encontrados no fruto (Wollgast; Anklam, 2000; Andújar *et al.*, 2012). Entretanto, “os benefícios do cacau à saúde dependem da produção sustentável e intensificação dos grãos de cacau de alta qualidade” (Kongor, pág. 45, 2016).

A qualidade dos grãos de cacau leva em consideração vários componentes como, por exemplo, os elementos voláteis de sabor, composição nutricional, conteúdo de polifenóis e a qualidade da fermentação (Kongor, 2016). O processo de fermentação dos grãos de cacau é diferente de país para país e é realizado de acordo com os meios locais, diferenciando os métodos de fermentação, duração da fermentação e outras práticas operacionais nas fazendas (seleção de grãos, mistura periódica, etc.) que impacta diretamente na qualidade do produto final (Papalexandratou *et al.*, 2011).

O processo de fermentação é o responsável pelas alterações bioquímicas do cacau, afetando sabor e aroma do produto final e, conseqüentemente, afetando a qualidade do chocolate a ser produzido. Apesar de encontrarmos alguns estudos acerca da composição química e a identificação de alguns micro-organismos

envolvidos durante o processo de fermentação, ainda não se encontram dados suficientes associando tais compostos ao sabor e aroma do chocolate e como eles variam durante a fermentação. Além disso, se encontram poucos trabalhos que realizaram os testes sensoriais com o sensorial eletrônico e os que utilizaram, buscavam classificar os grãos de cacau por região produtiva e não com o intuito de compreender as alterações sensoriais durante o processo fermentativo. Este trabalho tem por intuito preencher estas duas lacunas: Primeiramente, identificar os compostos associados ao sabor e aroma do produto final e, posteriormente relacionar a transformação dos compostos durante o processo de fermentação com a qualidade final do cacau fermentado. Para isso, foi utilizada a técnica de Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS/MS) e sensorial eletrônico (e-Tongue e e-Nose), correlacionando com ferramentas estatísticas para compreender as variações das propriedades químicas e sensoriais.

De maneira inédita, foram avaliados seis dias de fermentação dos grãos de cacau para compreender como o sabor e o aroma foram se alterando durante este processo fermentativo. As variações e a caracterização dos metabólitos voláteis foram realizadas por análises de sensorial eletrônico aliadas com análises multivariadas. As análises de caracterização química e tratamento estatístico foram realizadas nas dependências do Instituto Senai de Tecnologia Ambiental (IST Ambiental) e da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Cabe salientar que, as amostras foram as mesmas utilizadas no estudo metagenômico do Instituto Tecnológico da Vale (ITV), e estas foram disponibilizadas para este estudo.

Diante do apresentado, é possível verificar que as técnicas analíticas de sensorial eletrônico são recentes em estudos do cacau e, não relatadas ainda em literatura no que diz respeito a avaliação das transformações sensoriais durante a fermentação dos grãos de cacau. Por isso, essas técnicas devem ser mais exploradas a fim de trazer respostas quanto as mudanças que ocorrem durante o processo fermentativo, possibilitando ajustes e melhorias para que, ao final, se obtenham produtos de cacau com qualidade superior e notas finas e, dessa forma, valorizar ainda mais estes produtos de elevada relevância para a bioeconomia amazônica, onde se localiza os principais produtores de cacau.

O estudo proposto faz parte de uma colaboração com o IST Ambiental, o ITV e UFPR, aos quais buscam entender, de forma inédita, as variações e a caracterização dos compostos químicos durante o processo fermentativo dos grãos do cacau.

Estudos metagenômicos já foram realizados pelo ITV, onde foram identificados os micro-organismos envolvidos neste processo. Estes estudos são primordiais para que se possa desenvolver tecnologias e prover informações capazes de gerar um produto de maior valor agregado, além de auxiliar em discussões para futuros estudos sobre o *terroir* do cacau brasileiro.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Analisar compostos químicos durante o processo fermentativo do cacau por cromatografia a gás acoplada a espectrômetros de massas e sensorial eletrônico utilizando ferramentas estatísticas para compreender as variações das propriedades químicas e sensoriais.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o perfil de compostos voláteis via GC-SPME-MS do processo fermentativo do cacau, de forma a compreender os marcadores de cada dia de fermentação com a utilização de ferramentas estatísticas;
- Caracterizar o perfil sensorial eletrônico de aromas via e-Nose e GC-MS do processo fermentativo do cacau, de forma a compreender os marcadores de cada dia de fermentação com a utilização de ferramentas estatísticas;
- Caracterizar o perfil sensorial eletrônico de gosto via e-Tongue do processo fermentativo do cacau, de forma a compreender os marcadores de cada dia de fermentação com a utilização de ferramentas estatísticas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O CACAU

O cacau (*Theobroma cacao* L.) está presente na alimentação da população mundial em diversas formas: chocolates, achocolatados, *nibs*, puro, manteiga, entre outras. Dados da produção mundial de cacau de 2023 mostram que Brasil é o sexto maior produtor de cacau com 5,45% da produção mundial, ficando atrás de Nigéria (5,65%), Camarões (5,85%), Equador (9%), Gana (14%) e, no topo, Costa do Marfim com 44% (Walzburiech, s.d.). No Brasil, a produção de cacau é concentrada no Norte e Nordeste do país, nos estados do Pará, Amazonas e Bahia (Mendonça, 2019; Christ, 2020), devido ao clima tropical propício para o cultivo de cacau. Dentre estes três estados produtores, dois deles se encontram inseridos no bioma amazônico, o que gera ainda mais importância para a cadeia da bioeconomia dos produtos do cacau.

A maior dificuldade para o Brasil em produzir o cacau é controlar os fungos que se desenvolvem no cacau, como o fungo conhecido por desencadear a doença denominada vassoura de bruxa (*Moniliophthora perniciosa*). A doença se propagou pela Bahia em 1989, até então o maior estado em produção do cacau, afetando a economia nacional com redução de 300 mil toneladas de produção, gerando desempregos nas fazendas, além de impactos ambientais, uma vez que o cacau auxilia na proteção do bioma por crescer nas sombras da mata Atlântica (Arantes, 2021; Miguel *et al.*, 2017). O Brasil, na época, ocupava a posição de segundo maior produtor mundial de cacau, mas com a propagação da doença caiu para quinto e, atualmente, sétimo lugar (Arantes, 2021). Em consequência destas dificuldades, a produtividade do cacau na região Nordeste caiu e foi ultrapassada por outras regiões. Atualmente, a produção no Nordeste é cerca de duas vezes menor que a produção do Sudeste e três vezes menor que a do Centro-Oeste e Norte (Brainer, 2021). De acordo com Brainer (2021), apesar do Nordeste ocupar 69,7% da área cultivável, é o Norte quem lidera a produção nacional do cacau com 53,2%.

O cacau é a árvore que gera o cacau, e seu fruto é apresentado na FIGURA 1. As sementes, também conhecidas como os grãos do cacau, são as responsáveis pelas variedades de produtos, e se localizam dentro do fruto, envoltos em uma polpa mucilaginosa. Lima e colaboradores (2011) relatam que essa polpa é rica em açúcares fermentáveis e representam cerca de 9 a 13% m/m, alta acidez, o

que confere a presença de ácidos orgânicos, mas principalmente o ácido cítrico, e teor de proteína na faixa de 0,4 a 0,6% m/m. O cacau cru tem um sabor adstringente desagradável, o que sugere que todo o sabor e aroma que se conhece deve ser gerado (Ordoñez-Araque *et al.*, 2020) em seu processo produtivo.

**FIGURA 1** – CACAUEIRO, ÁRVORE DO CACAU COM FRUTOS (*Theobroma cacao* L.).



FONTE: Melo (2017).

O consumo do cacau é de interesse da população não somente devido ao seu sabor característico, mas também porque há diversos estudos acerca dos benefícios à saúde humana, como cardioprotetor, anti-inflamatório, anticancerígeno, antiviral, antibacteriano e antineurodegenerativo (Cádiz-Gurrea *et al.*, 2020). Estes benefícios estão relacionados com as propriedades antioxidantes dos fitoquímicos presentes no fruto do cacau. Nas sementes, os compostos fenólicos representam cerca de 10% do total de constituintes e, são compostos, principalmente, por proantocianidinas (58%), flavonóis ou flavan-3-óis (37%) e antocianinas (4%) (Cádiz-Gurrea *et al.*, 2020). Entretanto, apesar destes compostos serem encontrados nas sementes, podem ocorrer alterações nas porcentagens de composição devido ao processo de fermentação e torrefação. Os compostos fenólicos também podem sofrer influência,

assim como toda a constituição do cacau, por diferenças geográficas, climáticas e área de plantação. De acordo com Ali e colaboradores (2013), além dos compostos fenólicos, também podem ser encontrados no cacau flavonóides e polifenóis naturais, atuando como antioxidantes no organismo.

Para que o cacau chegue até o consumidor final, há um longo caminho que deve ser percorrido. O fruto do cacauzeiro aparece, em média, cinco anos após o plantio. O cacau é composto por semente (ou grãos/amêndoas), polpa e casca. A maturação ocorre quando o fruto apresenta coloração avermelhada e a colheita é feita manualmente pelos fazendeiros (Wagner, 2020). Feita a colheita, o cacau é aberto e são separadas as partes da semente, polpa e casca e cada uma é destinada para um fim específico. As sementes são levadas para fermentação a fim de reduzir a mucilagem – rica em água e substâncias químicas, reduzindo o seu amargor e desenvolvendo os precursores de aroma (Jacarelli<sup>1</sup>, 2016 *apud* Wagner, 2020; Oliveira Júnior *et al.*, 2020). A fermentação ocorre com a presença de micro-organismos como leveduras, bactérias lácticas (LAB) e bactérias do ácido acético (AAB), além de espécies de *Bacillus sp.*, outras bactérias e fungos filamentosos também podem crescer e influenciar na qualidade do processo (Visintin *et al.*, 2017). Alguns micro-organismos podem ser específicos de cada região produtora do cacau, afetando diretamente em características sensoriais como o *terroir*.

Após a fermentação, as sementes passam pelo processo de secagem que visa retirar a água remanescente, impedindo a proliferação de fungos fitopatógenos. Além disso, o processo de secagem tem grande importância para a formação do sabor e aroma, devido às enzimas presentes e atuantes na estabilização das características do produto final (Wagner, 2020; Oliveira Júnior, 2020). A umidade média após o processo de secagem é em torno de 7% (Oetterer; Regitano-D'Arce; Spoto; 2006). Feita a secagem, as sementes são destinadas à torrefação, onde elas são descascadas e encaminhadas para o forno. A temperatura e o tempo de torra também são fatores que irão influenciar no sabor e aroma produzido. No processo de torrefação, o cacau vira uma massa, também chamada de liquor, caracterizada por apresentar cremosidade e cor escura. Esta massa é a matéria prima para a fabricação do chocolate (Wagner, 2020; Costa, 2008). Do liquor de cacau se obtém a manteiga

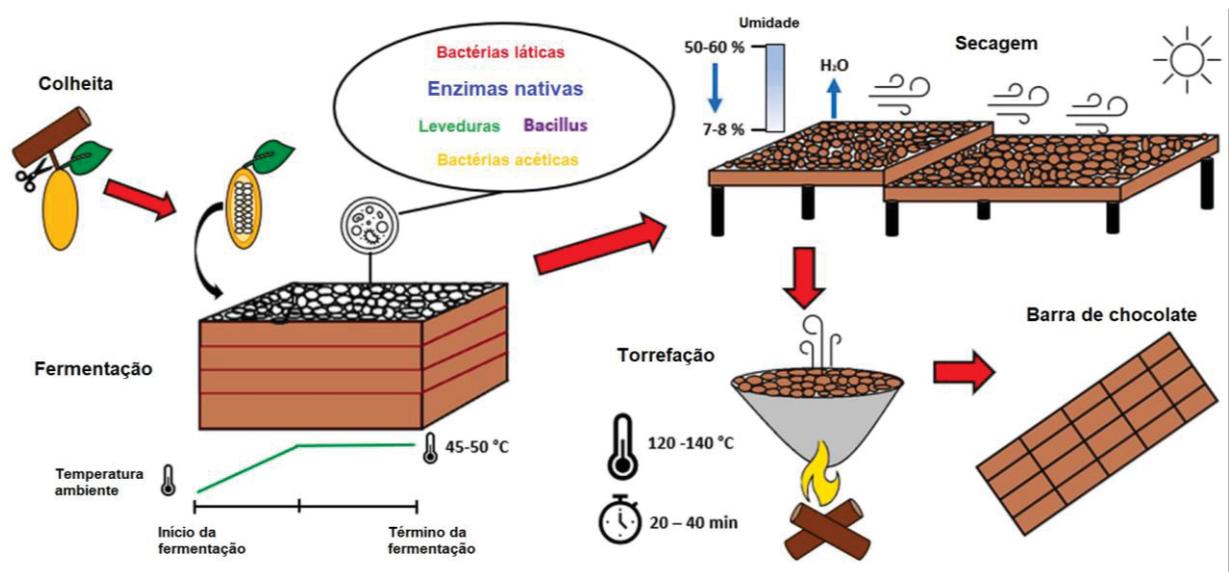
---

<sup>1</sup> JACARELLI, Brenda. **Gastronomia e alta cozinha**. v. I. Rosário, Argentina: Editora GABA, 2016.

de cacau, muito utilizada também na indústria alimentícia e de cosméticos, e ao final, resta o cacau em pó.

Apesar dos séculos de produção, a transformação dos grãos de cacau em chocolate ainda depende de prática de pós-colheita complexas, caras e difíceis de reproduzir (Herrera-Rocha *et al.*, 2023). A FIGURA 2, apresenta um esquema do processo de produção do chocolate pós-colheita.

FIGURA 2 – PROCESSO PRODUTIVO DO CHOCOLATE.



FONTE: Adaptado de Herrera-Rocha *et al.* (2023).

Além disso, a fermentação dos grãos de cacau, secagem e torrefação são feitas utilizando técnicas rudimentares e protocolos sem padronização e, como resultado, a bioquímica do processo produtivo permanece sem clareza. Com isso, para melhorar a indústria do cacau é necessário ter controle de estabilidade tanto do processo, quanto do produto para que, por fim, sejam produzidos chocolates de qualidade definida, por processos confiáveis, eficientes e econômicos (Herrera-Rocha *et al.*, 2024).

### 2.1.1 Processo fermentativo e torrefação

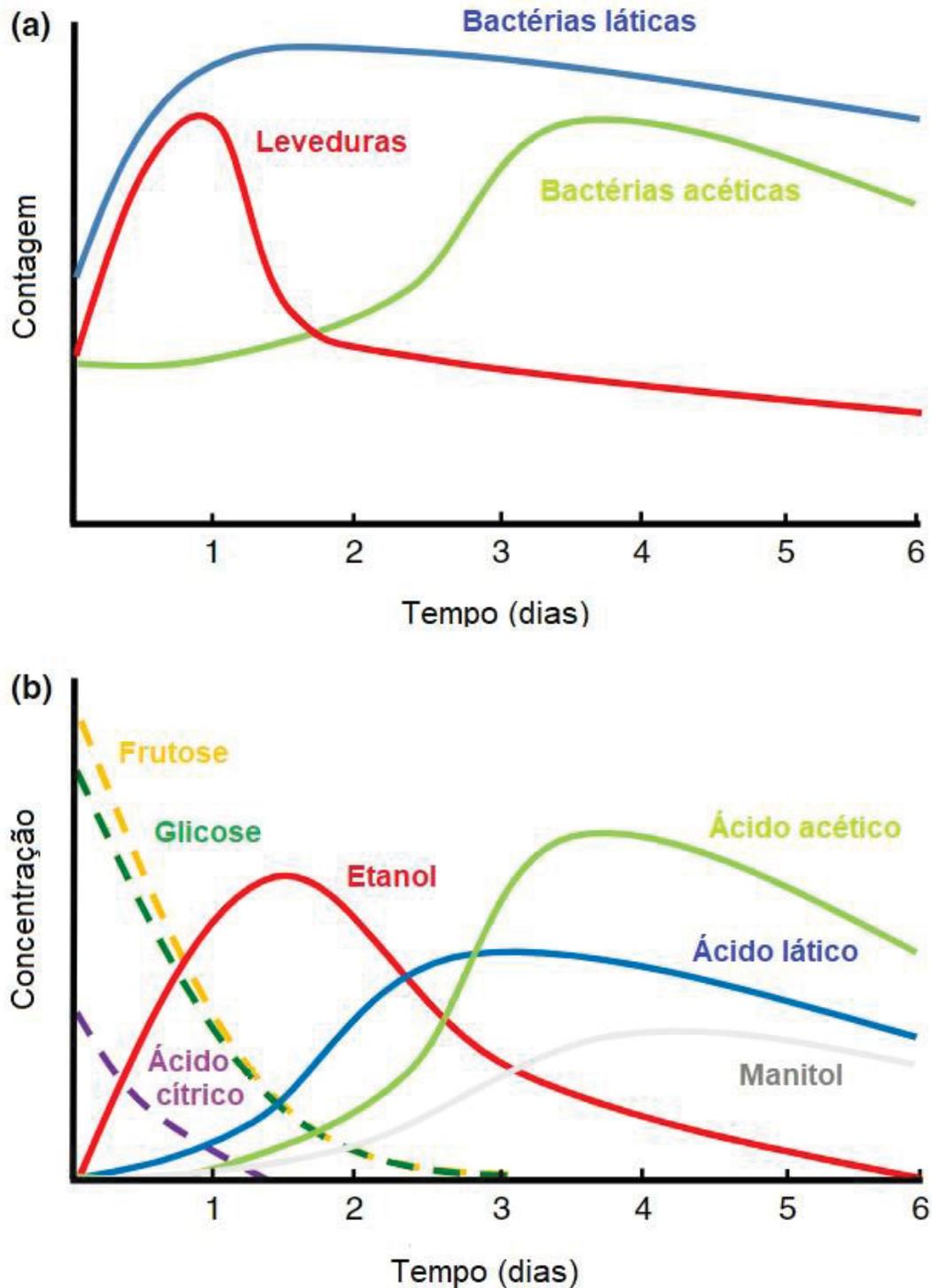
Antes de falar sobre o processo fermentativo é importante ressaltar que os compostos precursores de sabores e aroma do cacau são formados durante as etapas

de fermentação e torrefação. Ademais, são influenciados pelo tipo de cacau (genótipo), composição do grão, condições do solo, idade das árvores de cacau, tratamento pós-colheita e o processamento do cacau após o processo fermentativo, como armazenamento e transporte (Bastos *et al.*, 2019; Afoakwa *et al.*, 2008).

Pela fermentação se tratar de um processo espontâneo e não padronizado, não há muito controle sobre os micro-organismos atuantes – o que pode variar de acordo com as fazendas e as regiões de cultivo, ferramentas, mãos dos trabalhadores, caixas onde ocorrem a fermentação e até mesmo os insetos da região (Papalexandratou *et al.*, 2011; Crafacck *et al.*, 2014). Esse processo depende principalmente das interações micro-organismos e a polpa que resultará em reações bioquímicas juntamente com as enzimas e metabólitos endógenos dos grãos, ocasionando o desenvolvimento de compostos bioativos e sabor (Herrera-Rocha *et al.*, 2023; Konagano *et al.*, 2022).

O processo fermentativo começa ao separar os grãos da casca, logo após a colheita dos frutos, e ocorre naturalmente, geralmente em caixas de madeira com folhas de plantas e estopa, e deixadas de cinco a sete dias, dependendo da variedade do cacau e das tradições locais (Chagas Junior *et al.*, 2022). A polpa mucilaginosa é rica em nutrientes: em torno de 85% de água, 10-15% de açúcares (glicose, frutose e sucrose, a depender da maturação do fruto), 2-3% de pentoses, 1-3% de ácido cítrico e 1,5% de pectina, proteínas, aminoácidos, vitaminas e minerais, o que cria um ambiente propício para o desenvolvimento dos micro-organismos (Orodoñez-Araque *et al.*, 2020). Os principais micro-organismos atuantes são dos grupos de leveduras, bactérias lácticas (LAB) e bactérias do ácido acético (AAB) (FIGURA 3a). A FIGURA 3b, representa o comportamento dos micro-organismos envolvidos durante as etapas da fermentação e os seus produtos.

**FIGURA 3 – (a) MICRO-ORGANISMOS ATUANTES DURANTE A FERMENTAÇÃO (b) COMPOSTOS PRODUZIDOS E CONSUMIDOS DURANTE A FERMENTAÇÃO.**



FONTE: Adaptado de Vuyst; Weckex (2016).

Nas primeiras 48h da fermentação, chamada de fase anaeróbica, as leveduras agem consumindo e convertendo os açúcares (frutose e glicose) da polpa

mucilaginosa em etanol e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (FIGURA 3b) (Chagas Junior *et al.*, 2022; Konagano *et al.*, 2022). As leveduras também estão envolvidas na degradação da pectina que se encontra na polpa do cacau e na produção de diversos precursores de aroma, como os álcoois superiores e ésteres que contribuem significativamente para o desenvolvimento do perfil de aroma do chocolate (Figuroa-Hernandez *et al.*, 2019; Crafsack *et al.*, 2013).

As LAB trabalham junto com as leveduras convertendo a glicose e frutose em ácido láctico e etanol, e a partir das 72h, a fase aeróbica se inicia com a mistura manual dos grãos de cacau e as AAB convertem o etanol em ácido acético que é posteriormente volatilizado conforme ocorre a mistura dos grãos (Chagas Junior, *et al.*, 2022; Konagano *et al.*, 2022). Essa última reação é exotérmica, ou seja, libera calor para o meio – que chega em torno de 50 °C e acaba favorecendo as reações físicas e químicas dentro das sementes, degradando os compostos pela enzima polifenoloxidase e reduzindo o amargor e adstringência, matando o embrião e formando compartimentos internos nas sementes (Chagas Junior *et al.*, 2022; Figuroa-Fernández *et al.*, 2019; Orodoñez-Araque *et al.*, 2020). Ao final da fermentação pode ocorrer a presença de bactérias aeróbicas formadoras de esporos e fungos filamentosos, que são responsáveis por sabores desagradáveis, mas fermentações prolongadas também podem acarretar no aumento de *Bacillus* e fungos filamentosos, gerando tais sabores desagradáveis (Orodoñez-Araque *et al.*, 2020).

Atualmente, há um método padrão (ISO 2451:2017) para definir o tempo de fermentação, onde são retiradas 100 amostras de grãos de cacau e avaliadas as texturas internas e mudança da cor violeta para marrom (Herrera-Rocha *et al.*, 2023). É importante garantir que a fermentação ocorra dentro de um tempo adequado e, para dizer que o processo realmente finalizou, os grãos devem estar na faixa de 80-90 % totalmente marrons (Herrera-Rocha *et al.*, 2021).

Com a finalização do processo fermentativo, os grãos são secos em ambiente aberto para seguir para a torrefação. A torrefação do cacau é uma etapa essencial para desenvolver ainda mais o sabor de chocolate a partir dos precursores formados durante a fermentação e secagem (Afoakwa *et al.*, 2008), além de volatilizar os ácidos remanescentes, diminuindo a acidez. Um ponto importante de ser ressaltado no processo de torrefação são as reações de Maillard que ocorrem com o acréscimo de temperatura, fundamentais para o desenvolvimento do sabor do cacau. As aplicações das temperaturas durante a torrefação são variáveis de acordo com os tipos de

chocolate a se obter no final, sejam eles ao leite, amargos ou com porcentagens de cada.

Na literatura se encontram alguns dados de análises durante o processo fermentativo do cacau no que diz respeito aos micro-organismos envolvidos em cada dia de fermentação, e também trabalhos que relatam sobre a composição química dos metabólitos voláteis em cada dia de fermentação. Em relação ao sensorial eletrônico, não há dados em literatura que avalie o processo fermentativo e as suas mudanças de gosto e aroma. A seguir serão discutidos alguns estudos que buscaram caracterizar e compreender as alterações durante o processo fermentativo, em concordância com o proposto neste trabalho.

O estudo desenvolvido por Fonseca (2023), relata as alterações de micro-organismos durante o processo fermentativo. Nos primeiros dias de fermentação, 0h a 48h, foram identificados os fungos *Saccharomyces* e *Candida* como mais abundantes, enquanto que nos dias finais da fermentação, 72h a 144h, as bactérias *Microvirga*, *Lactobacillus* e *Limosilactobacillus* foram as mais abundantes. Os fungos do gênero *Saccharomyces* são fundamentais na produção de compostos aromáticos como aldeídos, ésteres e cetonas (Bastos *et al.*, 2018; Batista *et al.*, 2015; Chagas Junior *et al.*, 2021), além de serem um dos responsáveis pela degradação dos açúcares fermentáveis, presentes na polpa, em etanol (Batista *et al.*, 2015; Figueroa-Hernández *et al.*, 2019), conforme apresentado na FIGURA 3a. Esse estudo é importante para o desenvolvimento e correlação desse trabalho, pois os grãos de cacau utilizados para a caracterização microbiana são os mesmos que foram utilizados para as caracterizações dos compostos voláteis e do sensorial eletrônico apresentados nos próximos capítulos.

Os trabalhos que abordam o processo fermentativo do cacau em termos de metabólitos voláteis monitorados foram desenvolvidos por Hamdouche *et al.*, (2019), Rodriguez-Campos *et al.*, (2012), Aculey *et al.*, (2010) e Bastos *et al.*, (2019). O estudo de Hamdouche e colaboradores (2019) buscou avaliar o impacto da homogeneização dos grãos de cacau durante o processo fermentativo e, para isso, foram analisados os grãos remexidos e não remexidos. A amostragem ocorreu com 2, 4, 5, 6 e 7 dias de fermentação e foram identificados 26 compostos voláteis nas amostras. No estudo de Rodriguez-Campos e colaboradores (2012), por sua vez, foram avaliados os metabólitos voláteis durante o processo fermentativo e também a temperatura de secagem dos grãos, para averiguar quais as melhores condições no processamento

dos grãos de cacau. A amostragem desse estudo ocorreu a cada dois dias de fermentação (2, 4, 6 e 8 dias) e foram identificados 58 compostos nas amostras. O estudo de Aculey e colaboradores (2010) buscou compreender as alterações dos metabólitos durante o processo fermentativo com uma combinação de técnicas analíticas como Infravermelho próximo (NIR), fluorescência molecular, colorimetria e GC-MS, além de verificar a influência da fermentação em diferentes locais e processos de secagem na qualidade do produto final. A amostragem ocorreu a cada dia de fermentação e teve duração de seis dias. Durante as análises dos resultados vários compostos voláteis foram identificados em cada amostra. Por fim, o estudo desenvolvido por Bastos e colaboradores (2019) investigou as variações dos metabólitos voláteis na fermentação e também avaliou os chocolates produzidos deste processo de fermentação com painéis humanos. A amostragem ocorreu a cada dia de fermentação e teve duração de sete dias, identificando em torno de 40 compostos voláteis. Todos os trabalhos mencionados anteriormente identificaram, através das caracterizações de metabólitos voláteis, compostos dos grupos de álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, ácidos, pirazinas e outros (Hamdouche *et al.*, 2019; Rodriguez-Campos *et al.*, 2012; Aculey *et al.*, 2010; Bastos *et al.*, 2019).

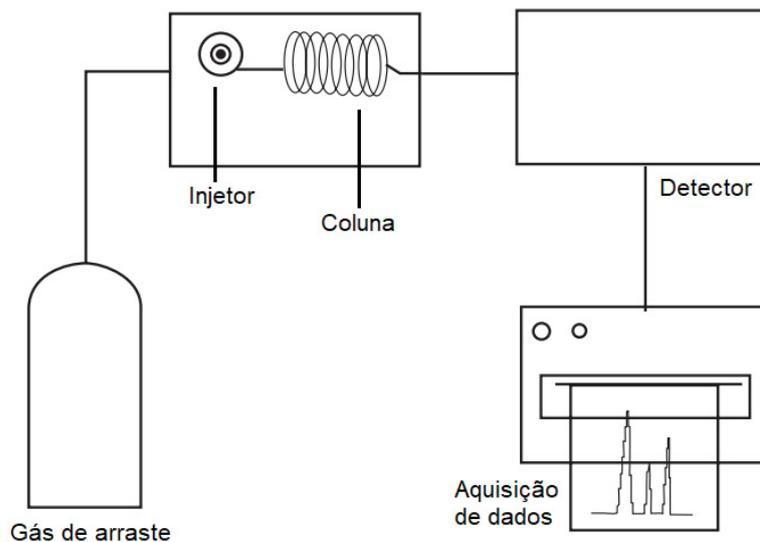
Dentre os trabalhos que utilizaram os equipamentos sensoriais, como o e-Nose e a e-Tongue para caracterizar o perfil em termos de aroma e sabor, nenhum trouxe uma abordagem que avaliasse o processo fermentativo e a transformação do sensorial ao longo dos dias. Os trabalhos que caracterizam o cacau por e-Nose ou e-Tongue, em sua grande maioria, buscam através dos aromas ou dos gostos classificá-lo de acordo com a sua região produtiva (Barbosa-Pereira *et al.*, 2019; Rottiers *et al.*, 2019; Tran *et al.*, 2015; Teye *et al.*, 2014). Portanto, é possível notar que os equipamentos de sensorial eletrônico não são explorados para compreender as variações sensoriais que ocorrem durante o processo fermentativo do cacau ou até mesmo produtivo do chocolate.

## 2.2 MÉTODOS ANALÍTICOS

### 2.2.1 Cromatografia a Gás

A cromatografia a gás (GC) é uma técnica analítica utilizada para a determinação de compostos orgânicos voláteis (VOCs), semivoláteis (SVOCs) e compostos que não sofrem decomposição térmica. A GC recebe este nome, pois a fase móvel é um gás – que também pode ser chamado de gás de arraste. O gás deve ser inerte à fase estacionária e de alta pureza. Já a fase estacionária pode ser líquida ou sólida, apesar de a sólida apresentar pouca aplicação (Degani, 1998). Na FIGURA 4 são apresentadas as partes de um GC.

**FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO DA CROMATOGRAFIA A GÁS.**



FONTE: Adaptado de Degani *et al.* (1998).

As amostras podem ser injetadas de maneira manual ou através de um amostrador automático, geralmente localizado acima do injetor. O injetor é a entrada do cromatógrafo, responsável pela volatilização das amostras e introdução das moléculas na coluna cromatográfica com o auxílio do gás de arraste. A coluna é onde ocorrem as interações das moléculas com a fase estacionária e, devido a estas interações, é possível separar os diferentes analitos da amostra. Cada molécula irá interagir de determinada forma com a fase estacionária, e em determinado tempo, para assim possibilitar a sua separação. Quando se fala em GC, as moléculas se

separam de acordo com o ponto de ebulição que, por sua vez, é dependente da massa molecular e também pela constante dielétrica, relacionada à polaridade das moléculas (Penteado *et al.*, 2008). A coluna se localiza em um compartimento chamado de forno, responsável pela taxa de aquecimento de um método. Geralmente, é feita uma rampa de temperatura baixa até uma temperatura alta para que os analitos sejam separados. Após os analitos percorrerem a coluna e, enfim, ocorrer a separação, o sistema de detecção é o responsável pelos sinais analíticos dos compostos. Para GC geralmente os sistemas de detecção utilizados são Detector por Ionização de Chama (FID), Detector de Captura de Elétrons (ECD) e o analisador por Espectrometria de Massas (MS), cada um com sua particularidade para a detecção de acordo com as classes de compostos analisadas.

#### 2.2.1.1 Microextração em fase sólida

A microextração em fase sólida, *solid phase microextraction* (SPME), consiste em uma técnica rápida de preparo de amostras, onde ocorrem microextrações dos analitos desejados para posterior injeção em equipamento, geralmente compatível com GC. É composta por um bastão de fibra de sílica fundida de cerca de 100 mm de diâmetro, com 10 mm de uma extremidade recoberta com um filme fino de um polímero ou de um sólido adsorvente (Valente, 2000). A SPME pode ser classificada em três tipos, de acordo com o modo de extração: Imersão direta, DI (*Direct Immersion*) que consiste em deixar a fibra imersa na amostra, normalmente usadas para extração de compostos de baixa volatilidade e matrizes com baixo teor de interferentes; HS (*Headspace*), na qual a fibra fica sobre a amostra, extraíndo compostos de alta volatilidade e compatível com matrizes de elevado teor de interferentes; e Proteção com membrana (*membrane-protection*), por sua vez, a fibra fica imersa na amostra mas sem contato direto, possibilitando a extração de compostos de baixa volatilidade em amostras com elevado teor de interferentes não voláteis (Rosendo *et al.*, 2023). Após a microextração, a fibra é levada pela seringa do amostrador até o injetor do GC, onde ela é novamente exposta para que os analitos desorbam com a temperatura elevada, e o gás de arraste os direcionam para a coluna.

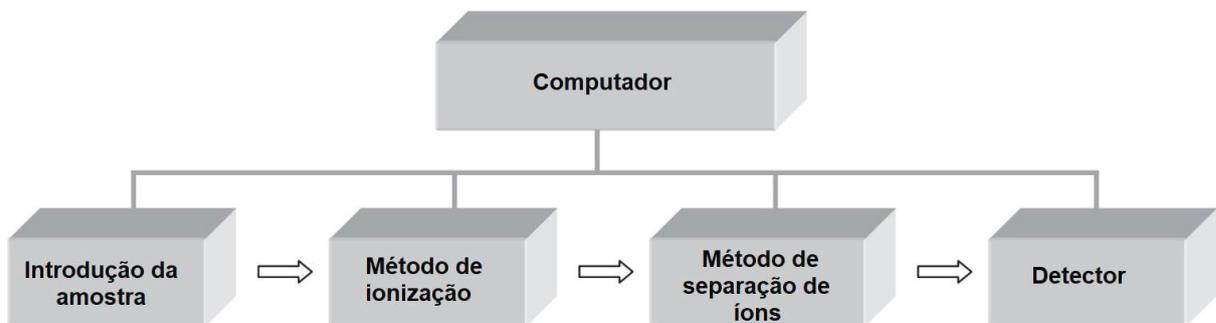
Os métodos que utilizam a SPME como preparo de amostras devem ser otimizados para garantir a melhor eficiência de extração dos analitos. De acordo com

Dognini (2018), os parâmetros que afetam a eficiência da extração ao utilizar o SPME são: temperatura, pH, força iônica, fase extratora, agitação, dessorção e tempo de extração. Assim, uma correta otimização de método garante a repetibilidade, reprodutibilidade, exatidão e sensibilidade.

### 2.2.2 Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas (MS) é uma ferramenta analítica capaz de separar e identificar compostos em uma amostra, a partir da razão massa/carga ( $m/z$ ) dos íons gerados destes compostos. Os espectrômetros de massas têm cinco componentes: (a) unidade de entrada da amostra; (b) fonte de íons ou método de ionização; (c) analisador de massa ou separador de íons; (d) detector, e (e) sistema de dados (Pavia *et al.*, 2010; Silverstein *et al.*, 2015). Na FIGURA 5 é apresentado um sistema de MS. A técnica de MS permite uma variabilidade e aplicabilidade grande na identificação de compostos, pois fornece dados estruturais, isotópicos e até mesmo conformacionais.

**FIGURA 5 – COMPONENTES DE UM ESPECTRÔMETRO DE MASSAS.**



FONTE: Adaptado de Silverstein *et al.* (2015).

A entrada da amostra para a análise de MS pode ser realizada por infusão, diretamente no espectrômetro de massas, ou através de um acoplamento por cromatografias – sejam elas líquida ou gasosa, ou até mesmo com outros equipamentos analíticos. Caso seja realizada uma infusão, todos os analitos contidos na amostra serão direcionados para dentro do espectrômetro e os sinais analitos podem ser complexos de interpretar. Entretanto, quando acoplado a uma

cromatografia, os analitos já são separados antes de entrarem no sistema, o que facilita na análise, além de aumentar a sensibilidade do método. A fonte de íons é a responsável por transformar as moléculas em partículas carregadas, gerando os íons. As fontes de íons mais comuns para GC são por Impacto de elétrons (EI) e Ionização Química (CI) (Pavia *et al.*, 2010; Silverstein *et al.*, 2015).

O analisador de massas é “onde ocorre a separação da mistura de íons que foram gerados na fonte, de acordo com suas razões massa/carga para se obter um espectro” (Silverstein *et al.*, pág. 8, 2015). Assim como há vários tipos de fonte de ionização, cada uma com sua particularidade de aplicação, também há diversos analisadores de massas, cada um com uma capacidade de resolução diferente. Neste trabalho foi utilizado o analisador de massas triplo quadrupolo, com o modo de leitura em apenas um quadrupolo, em uma análise chamada de *scan*. O analisador quadrupolar é um “analisador de resolução baixa e não oferece informações acerca da composição elementar das amostras” (Pavia *et al.*, pág. 412, 2010), porém, possui uma sensibilidade alta quando realizado os experimentos *in Tandem* (MS/MS) (Silverstein *et al.*, 2015). Este analisador consiste em quatro barras cilíndricas ou hiperbólicas paralelas no que seriam as pontas de um quadrado. O feixe de elétrons passa no meio destas barras que possuem um campo eletrostático, gerado a partir de radiofrequência e correntes contínuas, que causam oscilações aos íons. Desta oscilação, alguns íons não conseguem atravessar o analisador e, os que chegam, são direcionados para o detector (Pavia *et al.*, 2010; Silverstein *et al.*, 2015).

Os analisadores *in Tandem* (MS/MS) possibilitam aplicar um filtro de massas baseado na razão massa/carga ( $m/z$ ) do íon precursor (íon “pai”) para fragmentá-lo em uma cela de colisão, e posteriormente aplicar outro filtro de massas do íon produto (íon “filho”). Esse tipo de analisador permite obter espectros mais limpos e, além disso, obter informações estruturais das moléculas (Silverstein *et al.*, 2015). Há sistemas *in Tandem* no mercado que combinam dois analisadores de massas em série, como por exemplo, dois sistemas por quadrupolo unidos por uma cela de colisão.

Após a separação dos íons nos analisadores, estes são direcionados para o detector. O detector produz uma corrente proporcional à concentração de íons que estão chegando até ele, entretanto, esta resposta é amplificada devido à baixa representatividade do sinal elétrico que é gerado. Este sinal é transformado em um espectro de massas no sistema de dados, geralmente um computador anexado ao equipamento.

### 2.2.3 Língua eletrônica

A língua eletrônica (e-Tongue) é um instrumento analítico que determina os sabores dos produtos: é capaz de determinar o gosto globalmente, mas também especificamente dos sabores umami, salgado e azedo (Alphamos, s.d.). A FIGURA 6 apresenta o equipamento. De acordo com o *site* do equipamento, a e-Tongue pode detectar todos os compostos orgânicos e inorgânicos que caracterizam o gosto.

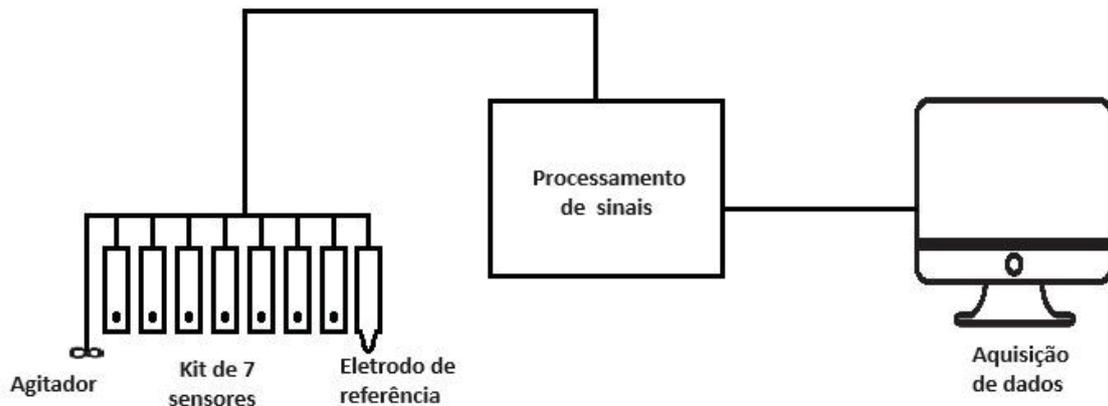
**FIGURA 6 – EQUIPAMENTO ANALÍTICO E-TONGUE.**



FONTE: Autora (2024).

Para isso, o equipamento possui sete sensores de sabores e um eletrodo de referência de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl), conforme a FIGURA 7 apresentada abaixo.

**FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO DOS COMPONENTES DO EQUIPAMENTO E-TONGUE.**



FONTE: Autora (2024).

A medição é realizada por condutividade, ou seja, são medições potenciométricas, em temperatura controlada e são mensuradas a partir da diferença de cada sensor frente ao eletrodo de referência. Os sensores utilizados neste trabalho foram AHS, CTS, NMS, ANS, SCS, PKS e CPS. O sensor que detecta acidez é AHS, amargor é SCS, ANS é doçura, CTS é salgado, NMS é umami e os sensores PKS e CPS para sabores complexos (Han, 2021). Existem outros conjuntos de sensores disponíveis, de acordo com a aplicação do equipamento.

As vantagens da utilização deste equipamento é que os resultados são repetíveis e reproduzíveis, as medições são automatizadas e de rápida leitura – em torno de três minutos por amostra – garante a segurança dos painéis humanos frente a gostos ruins ou medicamentos controlados, além de conseguir controlar as características dos produtos que são avaliados devido ao conhecimento perfil gustativo traçado (Alphamos, s.d.). Além disso, é capaz de classificar simultaneamente amostras de acordo com as intensidades dos sabores azedo, umami e salgado. O equipamento conta, ainda, com um *software* de análise multivariada para os processamentos de dados, facilitando na interpretação e avaliação do *fingerprint* em termos de sabores.

#### 2.2.4 Nariz eletrônico

Assim como a e-Tongue é utilizada para caracterizar sabores, o nariz eletrônico (e-Nose) é utilizado para a caracterização de aromas. Na FIGURA 8 é apresentado o equipamento. As possibilidades de caracterização de amostras alimentícias, por exemplo, são mais vantajosas quando se utilizam ambos equipamentos. O e-Nose é capaz de detectar aromas ou moléculas químicas que compõem cheiros (Alphamos, s.d.), além de tornar a análise precisa e de se obter um perfil aromático completo.

**FIGURA 8 – EQUIPAMENTO ANALÍTICO E-NOSE.**

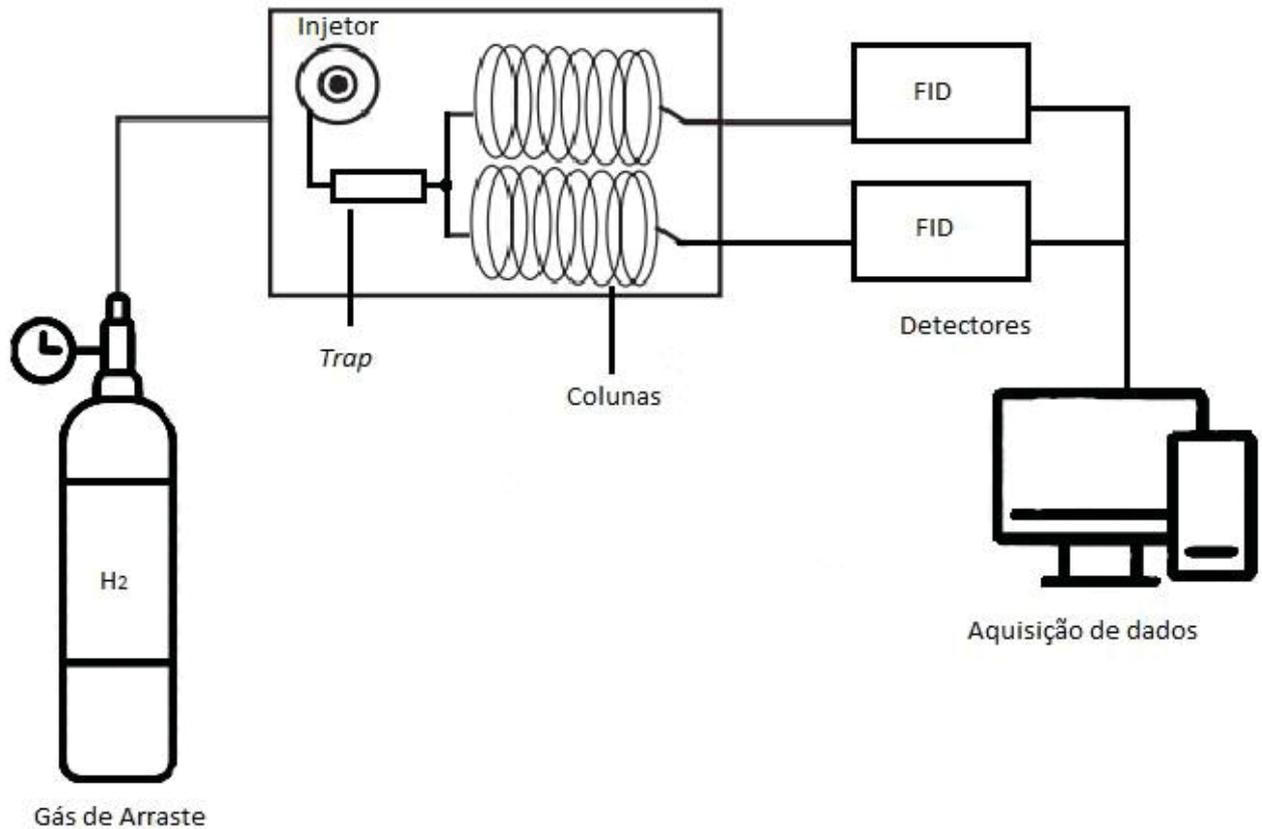


FONTE: Autora (2024).

A introdução da amostra ocorre em um injetor, que possui um concentrador antes de alcançar a coluna cromatográfica. O equipamento é um sistema de GC com

duplo canal, ou seja, com divisão de fluxo para duas colunas e dois detectores. Na FIGURA 9 são apresentados os componentes de um e-Nose.

**FIGURA 9 – REPRESENTAÇÃO DOS COMPONENTES DO EQUIPAMENTO E-NOSE.**



FONTE: Autora (2024).

Nesse caso, os detectores são FID e as colunas são mais finas que as convencionais, com diâmetro de  $0,18\ \mu\text{m}$  e seu recobrimento externo favorece a troca térmica por apresentar metal em sua composição, possibilitando rampas mais intensas de temperatura e, por isso, também é chamado de *Flash GC* (Alphamos, s.d.). A utilização das duas colunas possibilita a separação de um mesmo composto de formas diferentes, devido às diferentes interações. Ao final, é possível comparar o sinal obtido com uma biblioteca que traz informações aromáticas acerca da amostra.

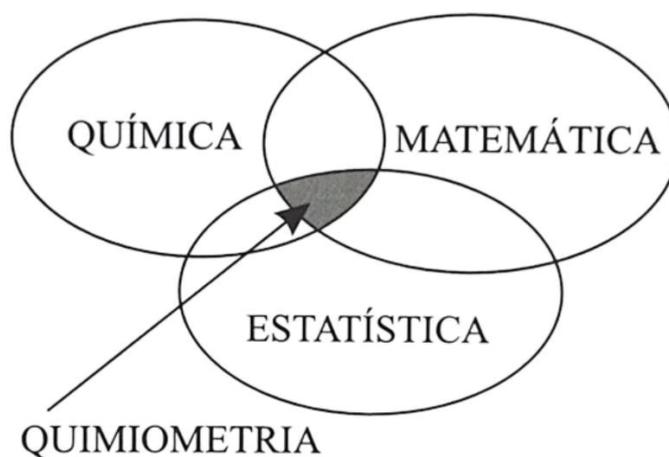
Algumas vantagens ao se utilizar o e-Nose são: as análises são confiáveis, melhoria da qualidade sensorial das produções, consistência ao longo do tempo dos resultados obtidos, padronização do aroma produzidos em diferentes fábricas, controle das características sensoriais dos produtos, investigação de reclamações de

mau cheiro após a abertura de embalagens, diminuição de perda de produção com testes acelerados de *shelf life* e, claro, a liberação mais rápida de lotes de produção (Alphamos, s.d.). É possível, ainda, realizar quantificação dos compostos que possuem odores e, assim como a e-Tongue, garante segurança para os painéis humanos – que não precisam cheirar eventuais resíduos de álcool, solventes e demais compostos tóxicos. O e-Nose, assim como a e-Tongue, também possui um *software* de análise multivariada para o processamento e tratamento dos dados, além de uma biblioteca própria para avaliação do perfil aromático.

### 2.3 QUIMIOMETRIA

A Quimiometria, de acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), é a aplicação de estatística à análise de dados químicos (de química orgânica, analítica ou de química medicinal) e o planejamento de experimentos químicos e simulações. Atualmente, a quimiometria é compreendida por sua interdisciplinaridade entre as áreas da matemática, química e estatística (FIGURA 10).

**FIGURA 10** – INTERDISCIPLINARIDADE DE QUIMIOMETRIA ENTRE AS TRÊS ÁREAS.



FONTE: Ferreira (2015).

A análise dos dados é uma etapa tão importante quanto a aquisição dos dados. É a partir da análise dos dados que conseguimos distinguir, classificar e correlacionar

os resultados obtidos, permitindo uma interpretação do sistema avaliado. Quando falamos em análises químicas, é sabido que o volume de dados é grande e, para que não haja perdas de informação, torna-se necessário o uso de ferramentas multivariadas para auxiliar na interpretação dos dados. Entretanto, para que a análise de dados seja realizada de forma quase que exclusiva sobre a variação amostral, e minimizar os efeitos técnicos dos equipamentos analíticos empregados, são realizados pré-tratamentos nos dados obtidos. Os pré-tratamentos têm como objetivo reduzir as variáveis indesejáveis e que não foram outrora removidas, mas que podem influenciar no resultado final (Ferreira, 2015) como, por exemplo, os sinais de ruído e a variação no tempo de retenção. Ao aplicar um pré-tratamento às variáveis, a denominação correta é pré-processamento e estes podem ser diferentes dependendo do tipo de análise realizada, de forma a não comprometer ou enviesar os resultados obtidos (Ferreira, 2015).

Após o pré-processamento, os dados estão organizados para seguir com o tratamento estatístico. A análise de dados nesse trabalho teve uma abordagem exploratória, ou seja, está sendo avaliada uma mesma amostra em diferentes tempos de fermentação para compreender como as alterações em sua composição podem ser explicadas a partir de seu comportamento estatístico. Esse tipo de análise é definido como análise não supervisionada, ou seja, não há uma classificação prévia ou suposição das amostras. Vale ressaltar que apesar de se ter conhecimento sobre os diferentes dias de fermentação, não se conhece de fato em quais desses dias as alterações químicas do perfil da amostra foram mais proeminentes e, portanto, detectadas pelos equipamentos. Dessa forma, necessita-se de uma análise prévia de forma exploratória para se avaliar as possíveis mudanças da amostra e, neste conceito, a ferramenta mais empregada e que também foi utilizada nesse estudo é a Análise de Componentes Principais (PCA).

Segundo Ferreira (2015), “a PCA é um método utilizado para projetar dados multivariados em um espaço de dimensão menor reduzindo, assim, a dimensionalidade do espaço original do conjunto de dados, sem que as relações entre as amostras sejam afetadas” (p. 110). É uma técnica que auxilia na interpretação dos dados, pois ao diminuir as dimensões do conjunto de dados (as variáveis), é possível observar as diferenças ou semelhanças entre as amostras que outrora não eram observadas. Além disso, possibilita encontrar quais variáveis se correlacionam entre si, facilitando a compreensão de quais fatores resultaram nas mudanças observadas

nas amostras. Ainda, uma outra vantagem desse tipo de tratamento é que se tornam evidentes as amostras que apresentam um comportamento distinto das demais (Ferreira, 2015).

Para realizar essa redução na dimensão dos dados, a PCA é formada por novas variáveis ortogonais que são chamadas de componentes principais (PCs), onde a PC1 representa a maior variação total dos dados e a PC2, ortogonal à PC1, a segunda maior variação. Essas PCs são compostas por duas partes: os *scores* e os *loadings*. O gráfico de *scores* ilustra as informações em relação ao objeto de estudo, ou seja, as amostras, e o gráfico de *loadings*, apresenta as variáveis responsáveis pelos agrupamentos dos dados e como cada variável contribui para a distribuição das amostras no gráfico de *scores* (Lubes; Goodarzi, 2017).

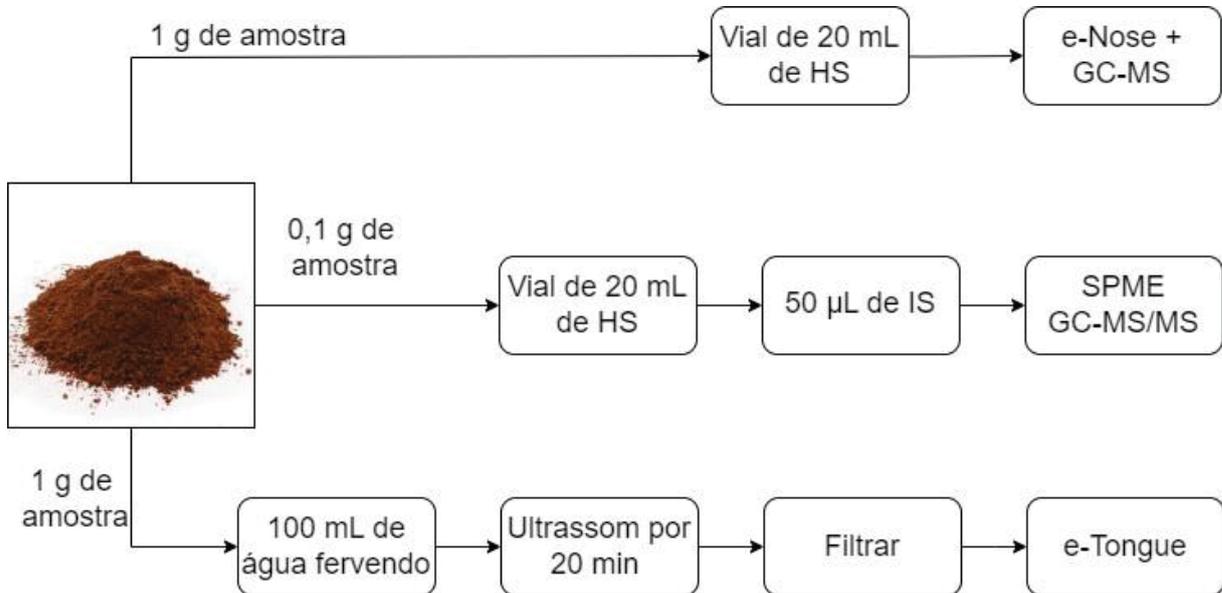
Dessa forma, a análise de uma PCA deve passar pela avaliação do gráfico de *scores* e *loadings* concomitantemente, permitindo uma interpretação acerca do comportamento das amostras de cacau fermentado que estão sendo estudadas e dos sinais analíticos que, nesse caso, serão chamados de marcadores por serem os responsáveis pela distribuição dos diferentes dias de fermentação ao longo da PCA.

Quando se fala em cacau, o tratamento por PCA geralmente está atrelado a classificação das amostras de acordo com países ou regiões de cultivo, por exemplo. A PCA, como explicado anteriormente, é uma ferramenta que possibilita o agrupamento de amostras semelhantes e que evidencia amostras diferentes e, quando se fala em classificar grãos de cacau por aroma ou por metabólitos, é uma abordagem interessante e que traz bons resultados, conforme relatado nos trabalhos de Tran *et al.* (2015) e Teye *et al.* (2014).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

Para melhor visualização das etapas realizadas na metodologia, foi elaborado um esquema em que os preparos das amostras de pó de cacau fermentado realizados para todas as técnicas analíticas estão apresentados na FIGURA 11.

**FIGURA 11 – METODOLOGIA DE PREPARO APLICADA PARA AS AMOSTRAS DE PÓ DE CACAU FERMENTADO.**



Legenda: HS – *headspace*; IS – padrão interno;

FONTE: Autora (2024).

Este tópico foi organizado da seguinte maneira: primeiro, são apresentadas as condições de amostragem dos grãos de cacau; na sequência, as condições de preparo e método por GC-SPME-MS; condições de preparo e método por e-Tongue e, por fim, condições de preparo e método por e-Nose.

### 3.1 AMOSTRAS DE CACAU

As amostras de grãos de cacau fermentados da espécie *Forastero* foram disponibilizadas pelo ITV e seguem a coleta apresentada por Konagano (2020), conforme descrito abaixo:

A fermentação ocorreu no município de Tomé Açu – Pará (2°28'41,3"S e 48°16'50,7"W), no mês de maio de 2019, com temperatura em torno de 32 °C durante o dia e 23 °C durante a noite. O processo foi realizado em dois cochos contendo cerca de 60 kg de sementes, e cobertos com folhas de bananeira.

A fermentação teve duração de 144 h, sendo realizado o acompanhamento da temperatura ao longo dos dias do processo. Foram coletadas amostras de grãos de cacau em cada dia da fermentação, nos tempos de 0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 h.

Posteriormente, os grãos de cada tempo foram secos sob o sol por 96 horas. Cerca de 100 g de cada amostra foi moída, armazenada em embalagem de polietileno estéril e acondicionada em temperatura de refrigeração (4 a 8 °C), com o auxílio de gelo. As amostras de cacau fermentado foram enviadas em forma de pó para análise em dezembro de 2022, onde foram mantidas em refrigeração e ao abrigo da luz.

### 3.2 ANÁLISE POR SPME-HS VIA GC-MS/MS

O preparo das amostras de cacau fermentado para análise por SPME foi realizado conforme proposto por Hamdouche e colaboradores (2019), com alterações na quantidade de amostra utilizada. Pela quantidade limitada de amostras, foram realizados testes a fim de visualizar as melhores intensidades dos sinais no espectro de massas com as respectivas pesagens, possibilitando maiores replicatas no estudo. Os testes foram realizados com 0,05 g, 0,10 g, 0,25 g e 0,50 g do cacau fermentado moído. Além dos testes de variação de massa, foram testados os padrões internos. Os padrões internos avaliados foram terc-butil-metil-éter e 1,4-diclorobenzeno- $d_4$ . O 1,4-diclorobenzeno- $d_4$  se mostrou o mais próximo dos picos centrais das amostras e foi o escolhido para o tratamento de dados como padrão interno.

As análises seguiram com 0,10 g de cacau fermentado moído alocados em frascos de 20 mL, sem utilização prévia. Aos frascos, foram adicionados 50  $\mu$ L de padrão interno de 1,4-diclorobenzeno- $d_4$  (4000  $\mu$ g/L, Sigma-Aldrich) solubilizado em diclorometano, e fechado com tampa e septo também sem utilização prévia. Foram preparadas triplicatas de cada dia da fermentação e as extrações foram realizadas com uma fibra de 80  $\mu$ m divinilbenzeno/ampla faixa de carbono/polidimetilsiloxano (DVB/C-WR/PDMS, Agilent) usando a técnica de SPME em *headspace* (SPME-HS). A fibra foi condicionada por uma hora, conforme manual do fabricante, a 270 °C. Já nas amostras, a fibra foi exposta ao frasco contendo amostra a 60 °C na incubação por 10 minutos e posterior dessorção no injetor a 240 °C por 3 minutos, conforme estudos na área (Barbosa-Pereira *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2021; Hamdouche *et al.*, 2019; Rodriguez-Campos, *et al.*, 2012). Além das amostras, foram lidos padrões de faixa de hidrocarbonetos C5-C15 (2000  $\mu$ g/L, Absolute Standards) e também brancos de corrida.

Já a parte instrumental foi executada em cromatógrafo a gás (G3540A, Agilent Technologies, Alemanha) acoplado a um espectrômetro de massas com analisador

triplo quadrupolo (G7000D, Agilent Technologies, Alemanha). As amostras, os padrões e os brancos de corrida foram randomizados previamente e a injeção foi feita de maneira automática, com amostrador (G6501B, Agilent Technologies, Alemanha) e temperatura do injetor de 250 °C em modo *splitless*. O gás de arraste utilizado foi Hélio e a fonte de ionização foi por impacto de elétrons (EI) com temperatura de 250 °C e 70 eV. A coluna usada foi uma HP-5 (20 m x 180 µm x 0,18 µm) com programa de forno iniciando em 30 °C por 3 min, taxa de aquecimento de 20 °C/min até 250 °C mantida por 15 min. A aquisição dos dados pelo analisador foi em modo *scan*, 45-500 *m/z*, 200 ms, *threshold* 100, ganho 10 e tempo de aquisição de 29 min. Os *softwares* tanto para aquisição de dados, controle do MS quanto para a análise dos dados foi o Agilent Mass Hunter Acquisition (Versão 10.2) e o Agilent Qualitative Analysis (Versão 10.0).

### 3.3 ANÁLISE POR E-TONGUE

Os perfis de sabores foram avaliados em e-Tongue (ASTREE Versão 5.2, Alpha MOS, Toulouse, França) e o conjunto de sensores utilizados foram AHS, CTS, NMS, ANS, SCS, PKS e CPS. Estes sensores, juntamente com o eletrodo de referência Ag/AgCl, foram condicionados e calibrados previamente em solução padrão de 0,01 mol/L de ácido clorídrico (Sigma-Aldrich), conforme instrução do fabricante. A sequência de aquisição de dados em e-Tongue foi realizada alternadamente com água ultrapura e a leitura foi com amostrador automático (Metrohm, Herisau, Suíça) de 16 posições.

O preparo das amostras para análise em e-Tongue foi realizado conforme proposto por Huang e colaboradores (2014). Cada amostra foi preparada em quadruplicata. Foi pesado 1 g de cada amostra em béqueres abertos, adicionados 100 mL de água ultrapura fervente e levado para ultrassom por 20 minutos. Após o resfriamento a temperatura ambiente, as amostras foram filtradas em papel filtro faixa preta e levadas para leitura na e-Tongue. A temperatura da sala no momento da análise estava em 22 °C e com a umidade em 57%. O tempo de aquisição de dados e tempo por análise foram de 120 s e 180 s, respectivamente. Os resultados obtidos foram convertidos em valores de sabor usando o *software* AlphaSoft (Versão 2021, Alpha MOS, Toulouse, França).

### 3.4 ANÁLISE POR E-NOSE E GC-MS

Os perfis de aromas foram obtidos em e-Nose (HERACLES II, Alpha MOS, Toulouse, França) integrado com as funcionalidades *Flash* GC duplo canal, composto por dois FIDs e utilizando duas colunas, MXT-5 e MXT-1701, ambas com 10 m x 0,18 mm e 1 µm de filme. A sequência de aquisição de dados foi realizada alternadamente com *vial* vazio como branco de corrida e a leitura foi com amostrador automático. Foram testadas as massas de cacau moído em 0,5 g, 1 g, 2 g e 3 g para a aquisição de dados em e-Nose e avaliadas de acordo com a intensidade dos compostos de forma a possibilitar maiores replicatas.

O preparo das amostras para e-Nose consistiu em pesar 1 g do pó de cacau em um *vial* de 20 mL, sem utilização prévia, e fechá-lo com uma tampa e septo, também sem utilização prévia. O preparo foi realizado em triplicata. Padrões foram lidos durante a corrida, de modo a auxiliar no tratamento de dados. O padrão consistia em faixas de hidrocarbonetos, de C6 a C16 (0,02-53,27 m/m) (Restek), e foi adicionado ao *vial* 20 µL. As amostras foram randomizadas antes de leitura no equipamento, juntamente com os brancos e padrões.

As amostras foram incubadas a 70 °C por 900 s com agitação de 500 rpm por 5 s, com 2 s de pausa, para volatilizar os compostos. O tempo de aquisição foi de 110 s e as condições utilizadas no método foram volume de injeção, 500 µL; temperatura da seringa, 80 °C; temperatura de injeção, 240 °C; gás de arraste (H<sub>2</sub>) com pressão constante, 25 kPa; tempo de injeção, 9 s. Condições do *trap*: temperatura, 40 °C; split 1:10; duração do *trapping*, 20 s; temperatura de dessorção, 250 °C. Forno: temperatura inicial, 40 °C com taxa de aquecimento de 1 °C/s até 60 °C, depois alterando para 5 °C/s até 150 °C e, por fim, 2 °C/s até 240 °C, permanecendo 22 s. Condições dos dois detectores são as mesmas: temperatura do detector, 280 °C; *gain*, 12; *offset*, 100. Os resultados obtidos foram convertidos em valores de área e tratados no *software* AlphaSoft (v. 12.46, Alpha MOS, Toulouse, França).

Foi realizado, ainda, análise via cromatógrafo a gás (7890A, Agilent Technologies) acoplado com espectrômetro de massas (5975C, Agilent Technologies) do tipo *single* quadrupolo com o mesmo preparo de amostras descrito para o e-Nose. Essa análise por GC-MS teve por objetivo auxiliar na identificação de compostos das amostras de cacau, caso fosse necessário.

As amostras foram incubadas a 70 °C por 600 s com agitação de 500 rpm por 5 s e com 2 s de pausa. A coluna utilizada foi VF-624ms com dimensões 20 m x 0,15 mm x 0,84 µm. O tempo de aquisição foi de 10 min e as condições do método foram: volume de injeção, 500 µL; temperatura da seringa, 75 °C, temperatura de injeção, 150 °C; gás de arraste Hélio com fluxo constante de 1 mL/min; modo *split* 1:50; configuração do forno: temperatura inicial, 35 °C mantida por 3 min, taxa de aquecimento de 36 °C/min até 190 °C, 20 °C/min até 225 °C. A aquisição foi realizada em modo *scan*, com *solvent delay* de 0,5 min, temperatura da fonte de 200 °C e do quadrupolo de 150 °C, com faixa de massa 50-260 *m/z*.

### 3.5 ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS

O tratamento estatístico foi aplicado em cada técnica analítica individualmente de forma a caracterizar as amostras de pó de cacau e, assim, compreender potenciais marcadores em cada dia da fermentação. Para vislumbrar os possíveis marcadores, os dados foram pré-processados. Cada técnica analítica utilizada neste trabalho demandou de um pré-processamento diferente, de acordo com a especificidade dos sinais analíticos gerados.

Realizado o pré-processamento, foi aplicada a análise de componentes principais (PCA). Ao processar os dados com PCA, além de diminuir a dimensionalidade dos dados, evidenciam-se os sinais analíticos relevantes. Assim, se torna possível averiguar quais os compostos químicos responsáveis pela distribuição dos dados em cada tempo de fermentação e, portanto, auxilia na compreensão das transformações que ocorrem ao longo do processo fermentativo.

Para a análise em e-Tongue os dados foram pré-processados com Autoescalamento, que trata todas as variáveis do conjunto de dados com a mesma importância. Para isso, subtrai-se o valor médio de uma coluna da matriz por cada elemento, seguido pela divisão do resultado pelo desvio padrão da mesma coluna (Ferreira, 2015). Tal pré-processamento é relevante para distribuir a importância de forma igualitária para todos os sensores da e-Tongue e, assim, permitir uma melhor comparação nas variações de sinal em escalas diferentes.

Para a análise em e-Nose, é importante esclarecer alguns pontos referente ao *software* do equipamento antes de discutir os resultados. A biblioteca do e-Nose (AroChemBase, AlphaMOS) contempla uma série de compostos químicos

cadastrados com suas notas sensoriais, mas também com a possibilidade de os usuários realizarem medições e contribuírem nessa base de dados. Os dados da biblioteca de notas sensoriais são organizados de acordo com áreas de aplicação, como: meio ambiente, aromas e fragrâncias, alimentos, medicina forense, herbicidas, pesticidas, petroquímicas, farmacêuticas, solventes, sulfurados, síntese e tóxicos. A base de dados, de acordo com o *software*, possui 43.821 moléculas caracterizadas. Para tratar os dados, foram selecionadas as bibliotecas de meio ambiente, aroma e fragrâncias e alimentos, devido a compatibilidade com o estudo realizado. Ao filtrar com essa base de dados, 2.155 compostos são caracterizados com notas sensoriais.

As caracterizações que o e-Nose realiza baseiam-se nos índices de Kovats. Os índices de Kovats (RI) são calculados para ambas as colunas cromatográficas, individualmente (MXT-5 e MXT-1701), com base na comparação do tempo de retenção da banda de interesse e os tempos de retenção dos hidrocarbonetos mais próximos da banda (Smith, 1985), de acordo com a Equação 1:

Equação 1 – Fórmula matemática para calcular o índice de Kovats.

$$RI = 100 \left[ n + \frac{\log(t_i - t_0) - \log(t_n - t_0)}{\log(t_{n+1} - t_0) - \log(t_n - t_0)} \right]$$

onde  $t_i$  é o tempo de retenção da banda de interesse,  $t_n$  é o tempo de retenção do hidrocarboneto anterior a banda de interesse,  $t_{n+1}$  é o tempo de retenção do próximo hidrocarboneto da série injetada,  $t_0$  é o tempo morto da eluição cromatográfica, e  $n$  é o número de carbonos do hidrocarboneto anterior a banda de interesse.

Dessa forma, a biblioteca compara o índice de Kovats calculado com os existentes no banco de dados, e a partir de determinado desvio em relação ao valor encontrado de tolerância, classifica as prováveis moléculas para a banda de interesse.

Os dados foram organizados da seguinte maneira para iniciar o tratamento estatístico do e-Nose: foi construída uma tabela contendo as áreas das bandas cromatográficas, considerando apenas os sinais que apareceram em pelo menos duas das três replicatas de uma mesma amostra (mesmo tempo de fermentação). As amostras foram randomizadas e lidos brancos e padrões de alcanos durante a batelada de análise, desta forma pode-se garantir que sinais intermitentes estejam mais relacionados com sujeiras ou contaminantes das análises do que propriamente das amostras. As áreas das bandas cromatográficas foram agrupadas considerando

um intervalo de 0,3 segundos, ou seja, bandas cromatográficas dentro da faixa submetida foram consideradas como o mesmo sinal entre as diferentes amostras. O valor de 0,3 segundos foi preconizado utilizando-se como base o desvio padrão do tempo de retenção da série de alcanos. Por fim, a matriz de dados foi pré-processado por escalamento de Pareto, que subtrai de cada elemento de uma coluna da matriz a média da respectiva coluna e divide pela raiz quadrada do desvio padrão dessa coluna (Ferreira, 2015). Em outras palavras, aglomera os sinais com intensidades próximas do ruído no centro e os sinais mais afastados são os mais significativos, ou seja, os que variam com maior intensidade frente às demais. O escalamento por Pareto também é visto como um autoescalamento menos suscetível a *outliers*, ou seja, apesar de tentar distribuir a importância das variáveis de forma igualitária, caso uma variável seja mais próxima do ruído, ela não terá tanto peso quanto uma variável com um sinal facilmente detectado.

Os dados de GC-MS/MS, assim como a e-Tongue, foram pré-processados com Autoescalamento, pois foi verificada uma separação melhor na distribuição dos *loadings* na PCA, uma vez que por escalamento por Pareto apenas 2-3 variáveis eram consideradas como mais importantes, dificultando a interpretação dos potenciais marcadores químicos. As amostras foram randomizadas antes da leitura e foi considerado como mesmo sinal um desvio de até 0,3 min no sinal analítico, utilizando-se o valor médio das replicatas das bandas cromatográficas. Além disso, a intensidade das bandas cromatográficas foi normalizada pelo sinal do padrão interno existente em cada amostra. Também como feito com o e-Nose, no GC-MS/MS foram considerados apenas os sinais que apareceram em pelo menos duas das três replicatas avaliadas. Foram lidos brancos e padrões de alcanos para garantir o desempenho do equipamento e auxiliar na definição dos parâmetros de tratamento estatístico, como por exemplo o desvio entre replicatas do tempo de retenção para definir qual a melhor opção de agrupamento de bandas.

Todos os tratamentos multivariados aplicados neste trabalho, desde o pré-processamento dos dados, agrupamento das bandas cromatográficas e PCA, foram realizados em ambiente MATLAB R2018a, com rotinas desenvolvidas pelo próprio grupo de pesquisa.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

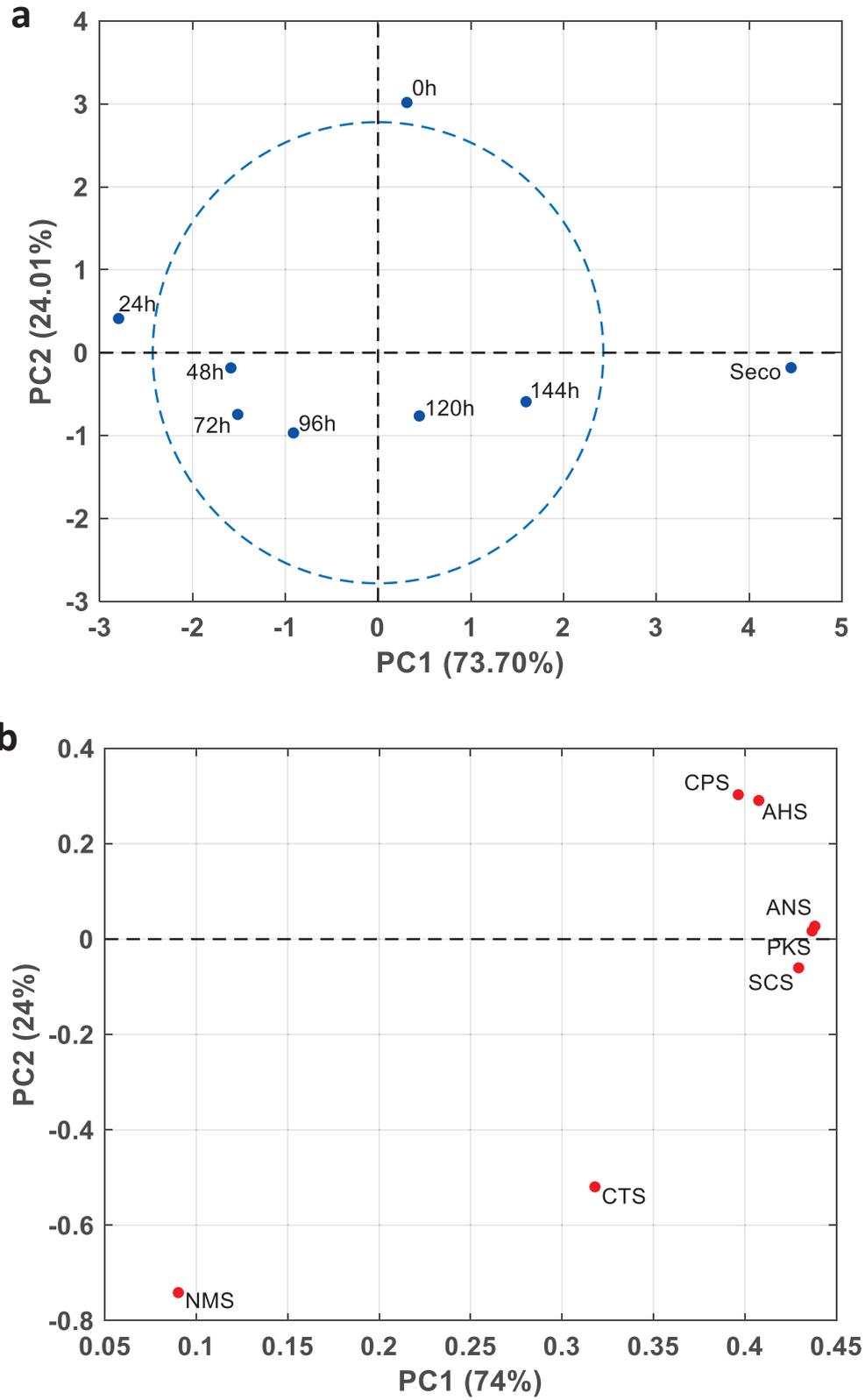
A caracterização via GC-MS/MS, e-Tongue e e-Nose foram realizadas nas dependências do IST Ambiental (Blumenau) e o tratamento estatístico na UFPR com o *software* MATLAB (R2018a).

Os resultados das análises de caracterização sensorial eletrônica e dos metabólitos voláteis foram avaliados independentemente para compreender o comportamento do perfil de compostos ao longo da fermentação obtidos pelas diferentes técnicas. A apresentação dos resultados foi dividida entre caracterização do sensorial eletrônico por e-Tongue e e-Nose e, por fim, caracterização química por GC-MS.

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DO SENSORIAL ELETRÔNICO POR E-TONGUE

A FIGURA 12a apresenta a PCA das projeções das amostras (*scores*) e é possível observar uma tendência no decorrer da fermentação até o final do processo. Na FIGURA 12b podem ser observados os *loadings* que, nesse caso, são os sensores do equipamento e são os responsáveis pela distribuição dos tempos de fermentação ao longo da PCA.

FIGURA 12 – PCA DE AMOSTRAS DE CACAU FERMENTADO. DADOS E-TONGUE COM (a) SCORES (b) LOADINGS.



FONTE: Autora (2024).

A PC1 e a PC2 explicam 74% e 24% da variância total dos dados, respectivamente. O primeiro ponto a ser observado é que o início da fermentação (0h) e o final da fermentação (144h) são diferenciadas pela PC2 (FIGURA 12a). Além disso, o ponto de 0h é mais influenciado pelos sensores CPS e AHS (sabores complexos e acidez, respectivamente) que pelos sensores PKS e ANS (sabores complexos e doçura, respectivamente). Esses quatro sensores se encontram no mesmo quadrante (FIGURA 12b), o que sugere que em 0h há, além de sabores complexos – que não são possíveis de identificar com esta técnica – acidez e doçura. Essa acidez pode ser proveniente do ácido cítrico, encontrado na polpa do cacau. O sensor de salgado, CTS, está no quadrante contrário ao 0h, permitindo uma interpretação de que a composição do sabor de 0h é doce. Essa doçura pode ser representada por açúcares simples, como a frutose, sucrose e glicose, o que justificaria o sensor ANS estar um pouco afastado. Além disso, é possível observar no lado negativo da PC2, o sensor SCS, relativo a amargor, indicando que o cacau em 0h ainda não apresenta o amargor característico de amostras de cacau (FIGURA 12b).

Em 24h o processo de transformação do sabor do cacau está acontecendo e é possível verificar os sensores que outrora estavam no mesmo quadrante, agora se encontram em quadrantes opostos. Entretanto, como a amostra de 24h ainda se localiza na parte positiva da PC2 é possível inferir uma leve influência dos sensores CPS e AHS, relacionados com a complexidade e acidez do sabor. Este resultado demonstra que, apesar da amostra com 24h de fermentação já apresenta um perfil sensorial distinto da amostra sem fermentação, ela ainda é a amostra que mais se assemelha ao grão de cacau puro, como esperado.

Um comportamento similar é mantido até o quarto dia de fermentação, 96h, onde os sensores se encontram contrários em relação a PC1, porém com uma influência contrária ainda maior do que a amostra em 24h para os sensores CPS e AHS. Este resultado nos leva a inferir que essas amostras são as menos ácidas, provavelmente devido ao consumo do ácido cítrico durante a fermentação alcoólica das bactérias nas etapas iniciais da fermentação, como apresentado na FIGURA 3b (p. 25). Com isso, é possível resumir que em 24h os sabores presentes não são doces, porém levemente ácidos. Já em 48h, 72h e 96h os sabores não são salgados, não são umami e nem amargos. A limitação dessa técnica fica evidente em situações onde

os sensores não explicam os sabores encontrados, como nos intermediários da fermentação.

Já em 120h e em 144h, em relação a PC1, todos os sensores se encontram no mesmo lado, sugerindo que as amostras no final da fermentação realmente passam por uma transformação em termos de sabor muito complexa e com a presença de diversas variações sensoriais. Analisando os últimos dois dias de fermentação em relação a PC2, verifica-se que as amostras possuem sabores umami, amargo e salgado.

Na amostra seca, com menor presença de água que as demais, é possível observar também que em relação a PC1 ela está do mesmo lado que todos os sensores, demonstrando que há vários sabores presentes. Em relação a PC2, a amostra seca é influenciada principalmente pelo sensor SCS, caracterizando amargor e pouca doçura, pois o sensor ANS se encontra no quadrante contrário. Um dos subprodutos gerados a partir do cacau e com menor manipulação são os *nibs*, que após a secagem são submetidos à torra e separados da casca. Feito isso, são moídos e estão prontos para consumo. Os *nibs* são caracterizados pela presença de antioxidantes, flavonoides, compostos fenólicos (Mudenuti *et al.*, 2021) e são lembrados pelo seu gosto bastante amargo. Dessa forma, apesar das limitações da técnica, os resultados mostram uma coerência no perfil sensorial avaliado, em termos de sabores.

#### 4.2 CARACTERIZAÇÃO DO SENSORIAL ELETRÔNICO POR E-NOSE E GC-MS

A caracterização do perfil aromático das amostras de cacau foi realizada em e-Nose e, visando uma confirmação dos dados, foi rodado também em GC-MS, por *headspace*. As amostras para análise no GC-MS foram tratadas da mesma forma que para o e-Nose, pois o intuito de utilizar estes dados foi em caráter de comprovação e já antecipando possíveis limitações da técnica de sensorial.

No QUADRO 1 são apresentados os compostos identificados pelo banco de dados do e-Nose, AroChemBase, com os filtros das bibliotecas aplicados conforme explicado anteriormente e com um desvio de até 15 unidades de índice de Kovats em cada uma das colunas.

**QUADRO 1 – IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS DE AMOSTRAS DE CACAU FERMENTADO E SEUS RESPECTIVOS AROMAS POR E-NOSE.**

Tempo de retenção (s)		Caracterização	
MXT-5	MXT-1701	Composto	Aroma
16,29	19,24	2-propanona	Frutado
18,03	19,27	2-propanol	Alcoólico
18,04	22,35	2-metóxi propanal	Maltado, tostado
20,81	27,89	2-butanona	Chocolate, manteiga
20,83	27,90	Propanoato de metila	Etéreo, rum
22,40	26,80	Acetato de etila	Ácido, manteiga, frutado
22,40	29,17	1-butamina	Amoniacal
23,77	33,12	2-metil-1-propanol	Alcoólico, amargo
26,69	29,12	Acetato de isopropila	Etéreo
26,69	35,79	n-butanol	Fermentado
30,40	37,56	Pentanal	Não disponível
31,78	39,63	2-pentanol	Frutado, verde, doce, pungente
35,90	50,93	Propilenoglicol	Caramelizado
36,02	43,76	2-metil-1-butanol	Manteiga, maltado, balsâmico
48,55	53,68	2-heptanona	Frutado, nozes

FONTE: Autora (2024)

Como os índices de Kovats no e-Nose baseiam-se exclusivamente no tempo de retenção, é corriqueiro a tentativa de confirmação dos compostos detectados ao realizar uma análise por GC-MS. Desta forma, é importante ressaltar que a análise por GC-MS foi realizada para confirmar os dados do e-Nose ou até mesmo complementá-los, caso houvesse necessidade. Para a identificação dos compostos, foi utilizado em um primeiro momento o modo Cromatograma total de íons (TIC), onde são avaliados os dados brutos do cromatograma. No QUADRO 2 são apresentados os compostos identificados a partir da base de dados do GC, NIST MS *Search*, utilizando-se do espectro de massas dos sinais cromatográficos obtidos e considerando os compostos que apresentassem pelo menos 80% de probabilidade de acerto, de acordo com a biblioteca.

**QUADRO 2 – IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS POR GC-MS E SEUS RESPECTIVOS AROMAS POR BANCO DE DADOS DO E-NOSE DE AMOSTRAS DE CACAU FERMENTADO.**

Tempo de retenção (s)	Caracterização	
	Composto	Aroma
2,280	Acetato de metila	Frutado, etéreo
3,746	2-butanona	Chocolate, manteiga
3,779	Acetato de etila	Ácido, manteiga, frutado
4,338	2-metil-1-propanol	Alcoólico, amargo
4,461	3-metil-butanal	Amêndoa, frutado
4,544	2-metil-butanal	Amêndoa, frutado
4,845	2-pentanona	Não disponível
6,191	Acetato de 3-metil-1-butanol	Não disponível

FONTE: Autora (2024).

A fim de verificar se os compostos identificados pelo e-Nose realmente estavam presentes nas amostras de cacau, foi aplicado o modo Cromatograma de íons extraídos (EIC), que permite selecionar massas de interesse e busca no cromatograma quais sinais analíticos apresentam estas massas. Aplicando o EIC para todos os compostos, foi possível verificar que nem todos anteriormente identificados pelo e-Nose, foram encontrados pela GC-MS (QUADRO 3).

**QUADRO 3 – IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS POR E-NOSE E GC-MS DE AMOSTRAS DE CACAU FERMENTADO. COMPARATIVO ENTRE OS MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO.**

<b>e-Nose</b>	<b>GC-MS</b>
2-propanona	2-propanona
2-propanol	Não identificado
2-metóxi propanal	Não identificado
2-butanona	2-butanona
Propanoato de metila	Não identificado
Acetato de etila	Acetato de etila
1-butanamina	3-metil-1-butanamina
2-metil-1-propanol	2-metil-1-propanol
Acetato de isopropila	Acetato de isopropila
n-butanol	2-butanol
Pentanal	3-metil-butanal; butanal; 2-metóxi butanal
2-pentanol	2-pentanol
1,2-propandiol	1,3-propandiol
2-metil-1-butanol	2-metil-1-butanol
2-heptanona	Furfural

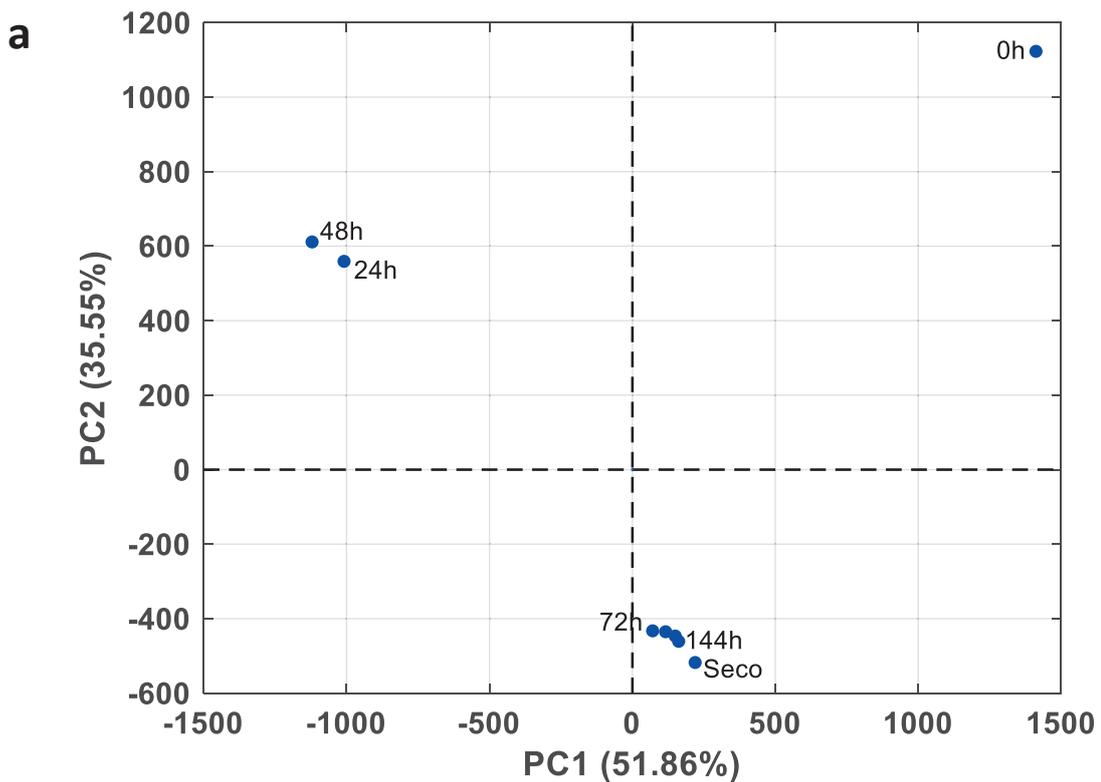
FONTE: Autora (2024).

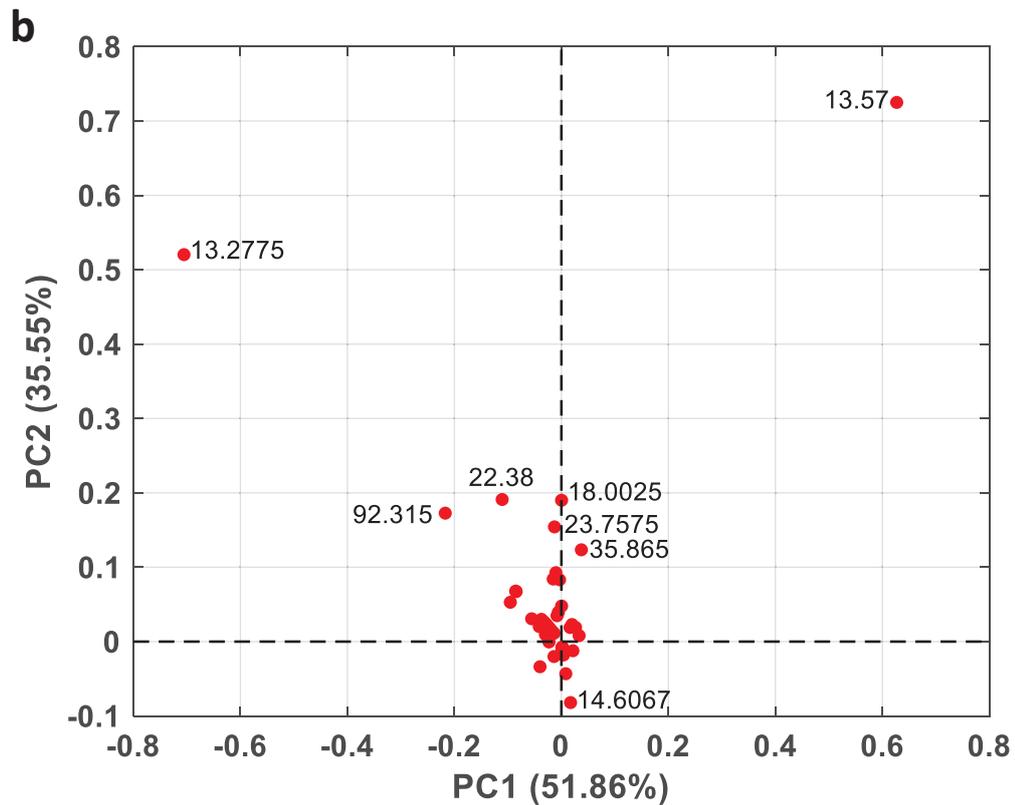
Uma possível justificativa para essa diferença de compostos identificados é que o método de injeção por *headspace* via GC-MS não há uma etapa de concentração da amostra como no e-Nose. Enquanto que, no e-Nose as amostras após serem incubadas passam por um concentrador (*trap*) e, no GC-MS as amostras seguem direto para a coluna. Além disso, outra justificativa está na faixa de massas utilizada para a análise em GC-MS:  $m/z$  50-260, o que dificulta encontrar com garantia compostos onde os íons-base são abaixo da  $m/z$  de 50, como os álcoois, aldeídos e ésteres identificados no e-Nose. Além disso, alguns compostos são isômeros dos outros ou com o índice de Kovats muito semelhante, como por exemplo, a 2-heptanona (RI: 871) e o furfural (RI: 831), e podem acabar sendo identificados de maneira equivocada. Nesse caso, os aromas de ambos compostos apresentam notas de amêndoas e nozes.

Com essa caracterização, é possível entender um pouco sobre os compostos presentes no cacau durante o processo fermentativo, mas agora serão discutidos os dados individualmente do e-Nose, de forma a possibilitar a compreensão de marcadores de cada dia de fermentação e como os aromas são transformados.

Como falado anteriormente, o e-Nose utiliza duas colunas para cada análise e, por essa razão, os dados de cada coluna serão mostrados em figuras diferentes. A FIGURA 13 (a) apresenta os resultados obtidos e tratados por PCA para a coluna MXT-5 em relação aos tempos de fermentação e em (b) são apresentados os *loadings*, que nesse caso são os tempos de retenção dos compostos responsáveis pela distribuição dos tempos de fermentação na PCA.

**FIGURA 13** – PCA DOS DADOS DE E-NOSE COM COLUNA MXT-5 (a) TEMPOS DE FERMENTAÇÃO DO CACAU (b) TEMPO DE RETENÇÃO DOS PICOS RESPONSÁVEIS PELOS AGRUPAMENTOS.



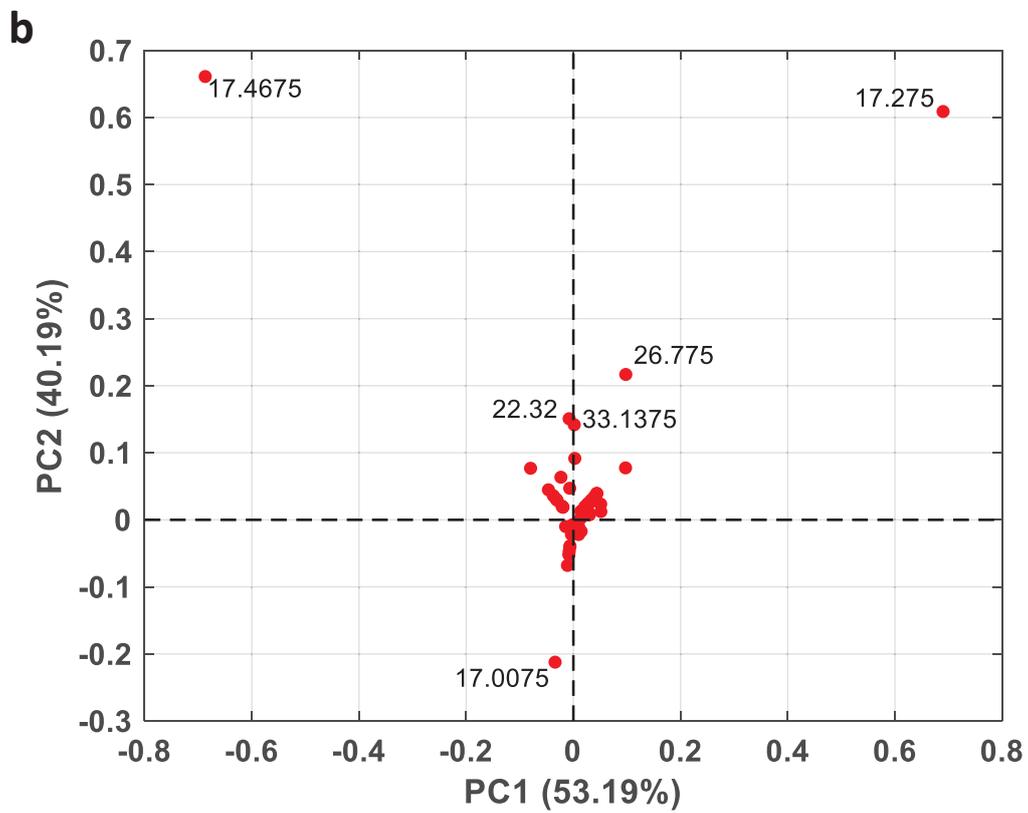
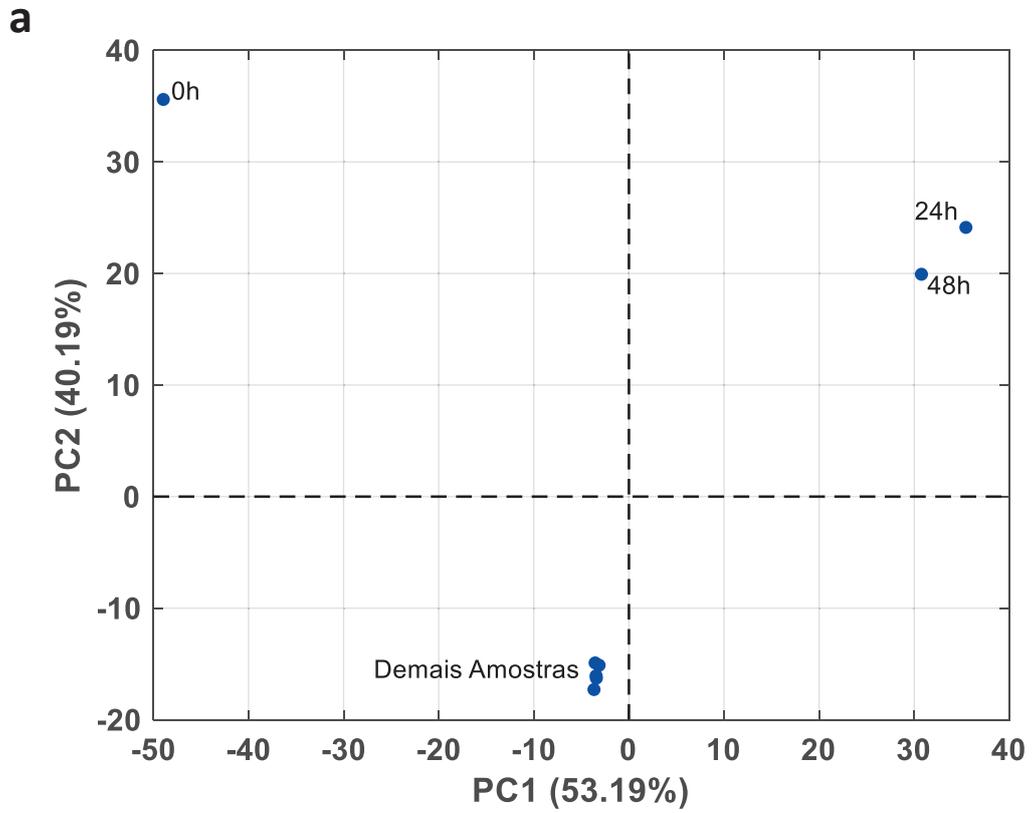


FONTE: Autora (2024).

A PC1 explica 51,86% da variância total, enquanto a PC2 explica 35,55%. Ao observar a distribuição dos tempos de fermentação na FIGURA 13a, é possível notar que três grupos de amostras na PC1, sendo o primeiro grupo referente a amostra de 0h, o segundo grupo as amostras de 24h e 48h, e o terceiro grupo com as demais. Os compostos responsáveis por essa diferenciação são os que eluíram em 13,57 s para 0h e 13,2775 s para 24h e 48h (FIGURA 13b). Ao tentar identificar estes dois compostos na biblioteca do e-Nose, a fim de entender quais características aromáticas eles trazem para as amostras, só foi possível de encontrá-los a partir do índice de Kovats para a MXT-5, não avaliando simultaneamente os dados com a MXT-1701. O composto identificado foi o formiato de metilo, muito utilizado em composições de fungicidas, fumigantes e larvicidas (Pubchem, s.d.) e, apesar de a PCA diferir os dois tempos, é a mesma substância.

Na FIGURA 14a são apresentados os resultados obtidos e tratados por PCA para a coluna MXT-1701 em relação aos tempos de fermentação e na FIGURA 14b são apresentados os *loadings*, que nesse caso também são os tempos de retenção dos compostos responsáveis pela distribuição das amostras na PCA.

**FIGURA 14** – PCA DOS DADOS E-NOSE COM COLUNA MXT-1701 (a) TEMPOS DE FERMENTAÇÃO DO CACAU (b) TEMPO DE RETENÇÃO DOS PICOS RESPONSÁVEIS PELOS AGRUPAMENTOS.

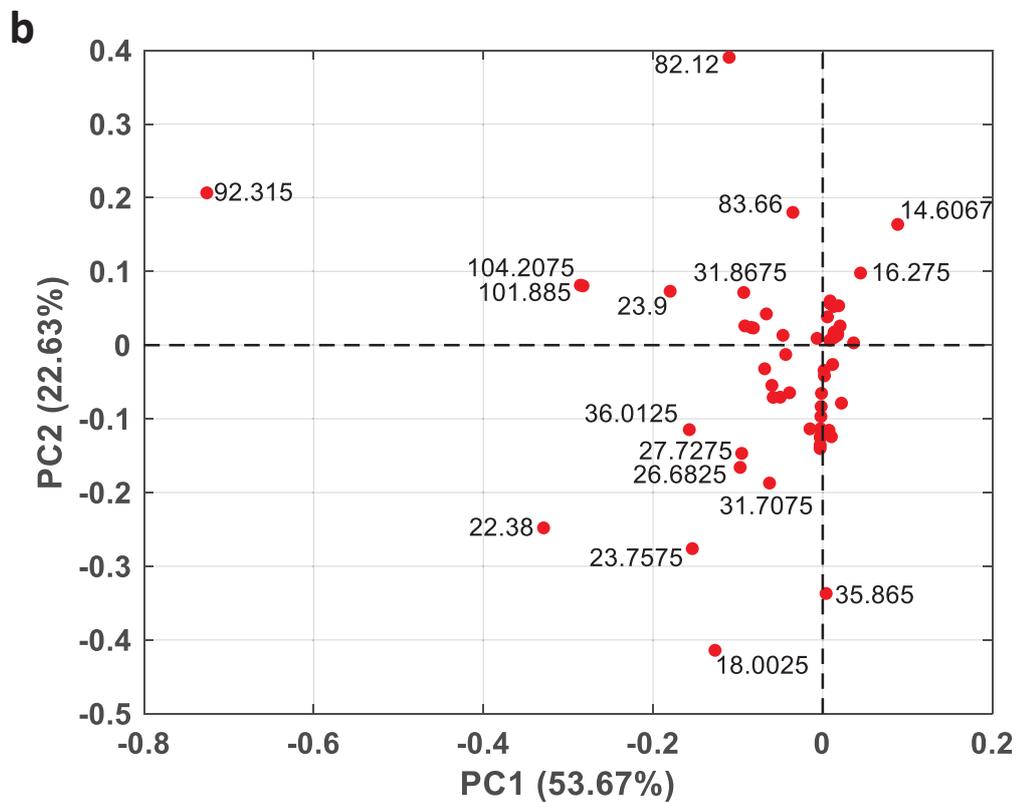
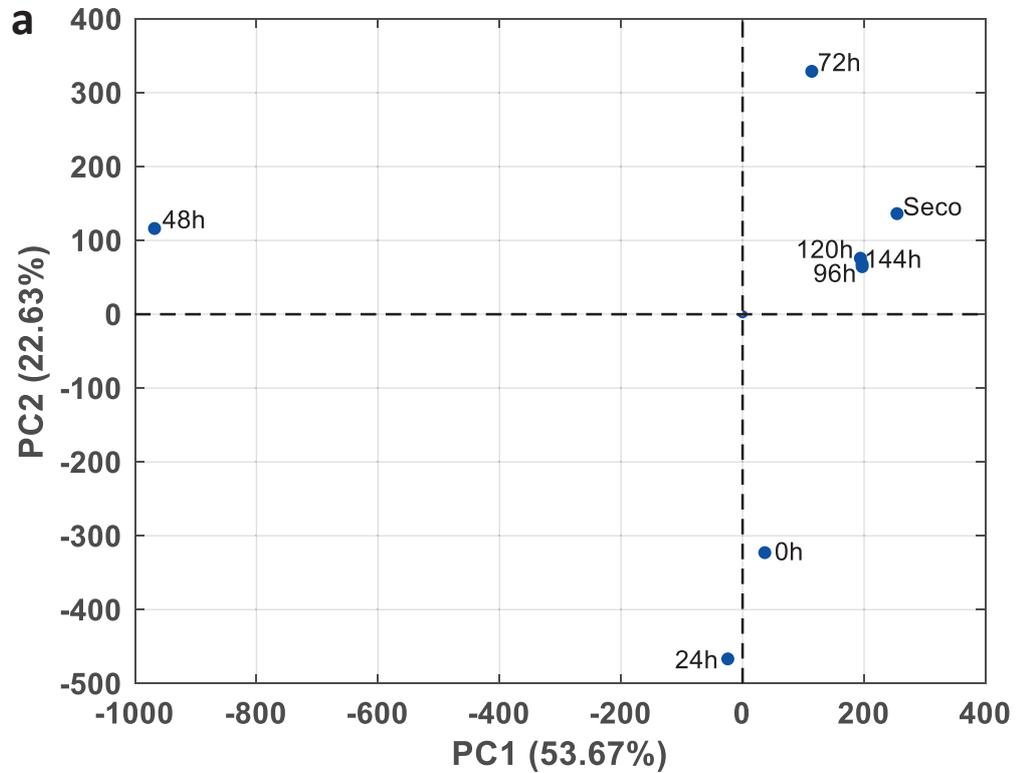


FONTE: Autora (2024).

A PC1 e a PC2 explicaram 53,19% e 40,19% da variância total, respectivamente (FIGURA 14). Observa-se um comportamento muito similar ao apresentado na FIGURA 13 para a coluna MXT-5, demonstrando coerência entre os resultados. Na FIGURA 14a é notável que a PC1 diferencia os dados do tempo 0h, 24h e 48h dos demais tempos e que os responsáveis por essa diferenciação são os compostos que eluem em 17,4675 s para 0h e 17,275 para 24h e 48h, conforme apresentado na FIGURA 14b. Estes compostos, conforme falado anteriormente, não estão disponíveis no banco de dados da coluna MXT-1701 e, por isso, foi levado em consideração os resultados apenas da MXT-5. Ambos os compostos que eluíram em 17 s, são identificados como os mesmos que eluíram em 13 s na MXT-5 e, portanto, identificado como formiato de metilo.

Os demais tempos de fermentação se aglomeraram e, da maneira que os dados estão distribuídos, não é possível compreendê-los. Por isso, foram excluídos os marcadores de 0h, 24h e 48h (13,57 s e 13,2775 s) e reanalisados os dados para melhor compreender outros marcadores dos tempos de fermentação. Como já foi observada uma limitação quanto à biblioteca da coluna MXT-1701, os dados reanalisados serão apresentados apenas da coluna MXT-5 que também retrata o comportamento dos sinais na outra coluna. A FIGURA 15 apresenta a PCA sem os marcadores nos (a) tempos de fermentação e (b) com os sinais responsáveis pela distribuição dos dados.

**FIGURA 15** – PCA DADOS E-NOSE COM COLUNA MXT-5 RETIRANDO OS MARCADORES INICIAIS (a) TEMPOS DE FERMENTAÇÃO DO CACAU (b) TEMPO DE RETENÇÃO DOS PICOS RESPONSÁVEIS PELOS AGRUPAMENTOS.



FONTE: Autora (2024).

A partir da FIGURA 15a é possível observar que com a nova distribuição dos dados, a PC1 diferencia basicamente o ponto em 48h dos demais, enquanto que com a PC2 a diferenciação ocorre para os dados de 0h e 24h no lado negativo da PC2 e 72h no lado positivo da PC2. Além disso, é possível observar que apenas considerando o perfil de aromas detectados pelo e-Nose, as amostras em 96h, 120h e 144h apresentam sinais químicos muito semelhantes entre si, e também próximo ao perfil sensorial do produto final na forma seca. Este tipo de informação, sem a comparação dos dados da e-Tongue, poderia levar a uma interpretação errônea ao se considerar que o processo de fermentação do cacau atingiu um patamar de estabilidade após 96h. Demonstrando a importância de uma análise complementar para a melhor compreensão de um espectro complexo como o sabor de um alimento.

A PC1 explica 53,67% da variância total, enquanto que a PC2 explica 22,63%. Os sinais analíticos responsáveis pela distribuição dos dados foram considerados os marcadores dos seus respectivos tempos. Assim, para 0h e 24h, que se encontram bem próximos, os marcadores são os tempos de retenção (s) 35,865, 18,0025 e 23,7575, respectivamente. Para o tempo de 48h, 92,315, 104,2075 e 101,885; para 72h, 82,12; por fim, para 96h, 120h, 144h e a amostra seca, 16,275, 14,6067, 83,66 e 31,8675 (FIGURA 15b).

Os tempos de retenção foram utilizados para a identificação destes compostos e, em um primeiro momento, foram avaliados os compostos que já haviam sido identificados previamente na etapa de caracterização por e-Nose. Para os compostos que não foram identificados desta forma, foi realizada uma busca no banco de dados do e-Nose a partir do índice de Kovats que o *software* disponibiliza para cada sinal analítico para a coluna MXT-5. A busca foi realizada com um desvio de até 15 unidades no índice e a prioridade foi para os compostos que apresentavam um desvio menor e que no banco de dados houvesse as notas aromáticas. Os compostos que ainda assim não foram identificados, seguiram para a identificação na base de dados *Flavornet*, também a partir do índice de Kovats. Os tempos de retenção 101,885 s, marcador de 48h, 82,12 s, marcador de 72h e 16,275 s um dos marcadores de 96h, 120h e 144h não foram identificados.

Os compostos identificados são apresentados no QUADRO 4, com o tempo de fermentação, tempo de retenção, índice de Kovats, nome, notas aromáticas e o banco de dados utilizado para a identificação.

**QUADRO 4 – MARCADORES DA CARACTERIZAÇÃO POR E-NOSE DO PROCESSO FERMENTATIVO DO CACAU EM CADA DIA DE FERMENTAÇÃO.**

T <sub>fermentação</sub>	RT	RI	Nome	Aromas	Fonte
0 e 24h	18,0025	516	2-Propanol	Alcoólico, etéreo	1
0 e 24h	23,757	626	2-metil-1-propanol	Alcoólico, amargo	1
0 e 24h	35,865	7410	Propilenoglicol	Caramelizado	1
48h	92,315	1542	Nerolidol	Amadeirado, floral, cera	2
48h	101,885	1598	Não identificado	-	-
48h	104,2075	1718	d-Dodecalactone	Frutado, doce	1
72h	82,12	1399	Não identificado	-	-
96h ao seco	14,6067	420	Etanal	Pungente, amargo	2
96h ao seco	16,275	469	Não identificado	-	-
96h ao seco	31,8675	665	2-metil-butanal	Amêndoa, cacau, malte, sabor forte	1
96h ao seco	83,66	1411	Vanilina	Baunilha	2

Legenda: 1 – AroChemBase; 2 – Flavornet

FONTE: Autora (2024).

Com base nos dados apresentados acima, é possível notar que no início da fermentação, nas primeiras 24h, os principais aromas detectados são os alcoólicos, com notas de aromas etéreos e amargos. Na fase anaeróbica da fermentação são produzidos alguns álcoois e ésteres que contribuem na formação de precursores aromáticos do chocolate (Chagas Junior *et al.*, 2022; Konagano *et al.*, 2022; Figueroa-Hernandez *et al.*, 2019; Crafact *et al.*, 2014), o que justifica a presença de, nesse tempo inicial de fermentação, serem encontrados aromas alcoólicos como marcadores. Também foi encontrado o composto propilenoglicol, responsável por um aroma caramelizado e pode-se interpretar até mesmo como doce, em concordância com os dados já demonstrados pela e-Tongue.

O tempo de fermentação de 48h demonstrou que, a partir desse momento, as transformações aromáticas se iniciam com a presença de compostos que são caracterizados pelos aromas frutados e doces. Um dos marcadores das 48h, o Nerolidol, também foi relatado neste mesmo tempo de fermentação por Bastos (2016) por uma caracterização via GC-MS. Já a partir das 96h é o ponto em que as

transformações aromáticas que ocorrem são todas lineares até o final da fermentação e, exatamente por isso, os tempos finais da fermentação se encontraram muito próximos uns dos outros na PCA. As notas aromáticas são mais complexas no final da fermentação, caracterizada pela presença de aromas como o de amêndoas, cacau, baunilha, amargo, pungente e maltado. Fonseca (2023) inferiu os aromas a partir dos micro-organismos identificados pelas análises de proteômica das mesmas amostras de pó de cacau utilizados nas caracterizações deste trabalho. As leveduras identificadas e que a autora destaca como precursores de notas finas em chocolates foram *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida* e *Pichia*. Os aromas relacionados a estas leveduras são os aromas frutados, doces, alcóolicos (vinho e vinagre), maltados, amargos, adstringente, ácido e rançoso. Estes aromas descritos estão em concordância com alguns dos aromas apresentados no QUADRO 4, demonstrando coerência com os resultados de proteômica.

Os resultados obtidos em e-Nose do tempo de 96h em diante corroboram com os dados de e-Tongue, que também foram observadas transformações complexas em termos de sabor e, ao final da fermentação, prevaleceram as notas de amargor e pouca doçura. Bastos (2016) também relatou em seu trabalho o 3-metil-butanal – isômero do 2-metil-butanal – nas amostras finais da fermentação. Assim, é possível compreender que as alterações em termos de sabor do cacau fermentado se iniciam a partir das 24h, mas são mais intensas a partir das 120h de fermentação, enquanto que para o aroma as alterações mais complexas se iniciam antes, a partir das 48h. Essa diferença pode ser explicada, pois os precursores de aroma, os álcoois, sofrem de forma mais rápida a degradação a outros compostos aromáticos, como os aldeídos que estão presentes ao fim da fermentação.

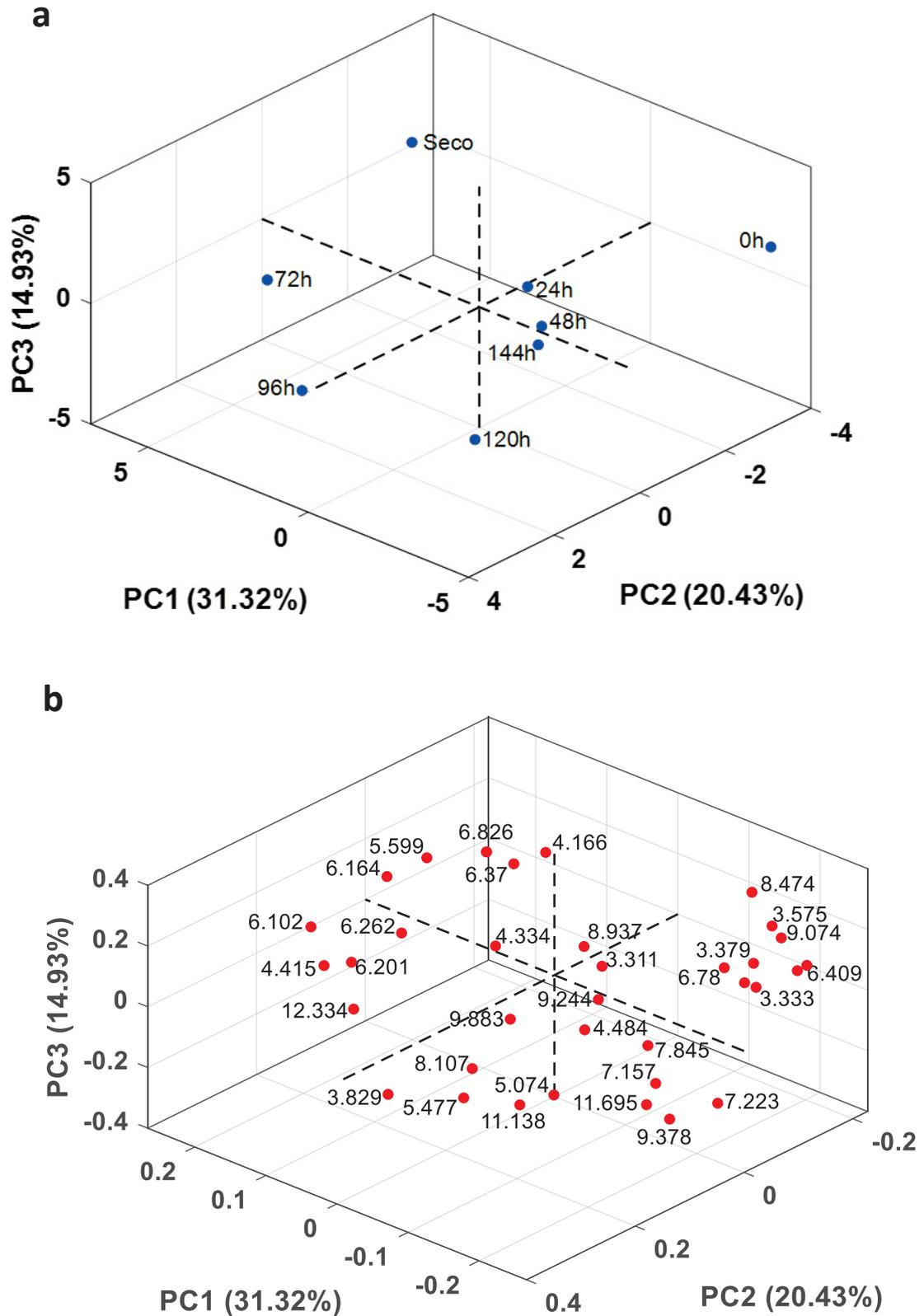
### 4.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA POR GC-SPME-MS

Com o intuito de compreender os metabólitos voláteis durante o processo fermentativo, foi realizada análise por GC-MS/MS com a técnica de injeção por SPME-HS, a fim de trazer maior sensibilidade à análise e possibilitar uma visualização dos compostos presentes durante a fermentação dos grãos de cacau. Ao utilizar a SPME, os resultados demonstraram um conjunto maior de voláteis detectados (APÊNDICE 1 a 8) totalizando 178 compostos e, destes, 60 compostos estão presentes em mais de um tempo de fermentação.

A identificação dos compostos voláteis por GC-SPME-MS foi realizada pelo programa UnkownsAnalysis (v. 10.0, Agilent Technologies) para todas as amostras de cacau fermentado. Esse programa analisa o cromatograma da amostra e, a partir do espectro de massas obtido para cada sinal cromatográfico, sugere possibilidades de compostos que possuem fragmentação similar. Essa comparação de espectros de massas é realizada a partir da NIST e, para as amostras deste estudo, foram subtraídos os sinais cromatográficos obtidos nos brancos, de forma a evitar que, eventualmente, a fibra ou a coluna interfiram nos resultados. Os compostos identificados pelo programa foram aceitos desde que tivessem uma probabilidade de acerto (*match factor*) igual ou superior a 80%.

Na FIGURA 16 são apresentados os dados obtidos da análise de GC-SPME-MS aplicando a PCA para visualizar os compostos marcadores dos tempos da fermentação, separados de acordo com os tempos de fermentação das amostras de cacau analisadas (FIGURA 16a) e o tempo de retenção dos sinais cromatográficos que diferenciou cada tempo de fermentação (FIGURA 16b).

**FIGURA 16** – PCA DOS DADOS DE GC-SPME-MS. (a) TEMPOS DE FERMENTAÇÃO DO CACAU (b) TEMPO DE RETENÇÃO DOS PICOS RESPONSÁVEIS PELOS AGRUPAMENTOS.



FONTE: Autora (2024).

A partir das figuras apresentadas (FIGURA 16a e b), é notável que foram necessárias 3 PCs para que os dados fossem suficientemente explicados estatisticamente. De acordo com a PC1, é possível distinguir os tempos de 72h e a amostra seca das amostras nos tempos de 0h e 144h. Com a PC2, é possível distinguir os tempos 0h, 24h, 48h e a amostra seca da amostra de 96h. Por fim, a PC3 diferencia os dados dos tempos 0h e da amostra seca da amostra no tempo de 120h. Desta forma pode-se inferir que o processo fermentativo se deu iniciando nos lados negativos da PC1 e PC2, mas positivo da PC3 com a amostra de 0h. Seguido pela diminuição dos valores negativos das PC1 e PC2, e positivo da PC3 para as amostras com 24 e 48h. Em seguida, as amostras de 72h e 96h apresentaram valores positivos das PC1 e PC2 e negativo para a PC3, sendo a amostra de 96h com valores ainda mais positivos para PC2 do que a amostra com 72h, mas com PC1 próximo a 0. As amostras nas etapas finais da fermentação, 120h e 144h, apresentaram-se ainda mais negativas para PC3 do que as amostras com 72h e 96h. Sendo que a amostra de 120h quase não tem influência das demais PCs (próximo a 0) e a amostra com 144h tem influência negativa da PC2 e próximo a 0 para a PC1. Por fim, a amostra seca se mostrou bastante distante das demais amostras e, portanto, com um perfil químico bem diferente das demais, apresentado um valor positivo na PC1 e PC3, mas negativo na PC2.

Os sinais analíticos que distribuem os tempos de fermentação ao longo da PCA foram considerados os marcadores de cada tempo. A identificação dos marcadores de cada tempo de fermentação foi realizada a partir dos tempos de retenção dos compostos em uma busca na NIST MS *Search*, de acordo com os espectros de massas dos sinais analíticos. Além disso, foram estipulados até 5 compostos por cada tempo de fermentação para seguir com a identificação, uma vez que o gráfico de *loadings* (FIGURA 16b) demonstra uma quantidade alta de dados devido a utilização de autoescalamamento como pré-processamento. Os tempos de retenção selecionados para a amostra de 0h foram 8,474, 3,575, 9,074, 6,409 e 3,379; para 24h os tempos de 8,937 e 3,311; para 48h o tempo de 9,244; para 72h os tempos de 6,102, 6,262, 6,201, 4,415 e 12,334; para 96h os tempos de 3,829 e 5,477; para 120h os tempos de 5,074, 11,138, 8,107 e 11,695; para 144h os tempos de 4,484, 7,845, 7,157; por fim, na amostra seca, os tempos selecionados foram 6,826, 4,166, 6,370 e 5,599.

No QUADRO 5 são apresentados os compostos identificados a partir dos tempos de retenção mencionados acima com *match factor* igual ou superior a 80%.

**QUADRO 5 – COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR GC-MS COMO MARCADORES DURANTE O PROCESSO FERMENTATIVO DO CACAU.**

Tempo de fermentação	Tempo de retenção (min)	Composto identificado	<i>Match Factor</i>	Fórmula molecular
0h	8,474	2,2-dimetil-butano	84,7%	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>
0h	3,575	3-metil-4-penten-2-ol	82,2%	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O
0h	9,074	2-fenil-2-butenal	95,2%	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O
0h	6,409	Fenilglioxal	97,8%	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>
0h	3,379	3-metil-1-butanol	94,8%	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O
24h	8,937	Acetato de 2-feniletil	95,6%	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>
24h	3,311	1-Pentanol	95,6%	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O
48h	9,244	Não identificado		
72h	6,102	Acetato de Etila	84,5%	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>
72h	6,262	Não identificado		
72h	6,201	4-Hidroxi-2-butanona	83,9%	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>
72h	4,415	2,3-Butanodiol	95,1%	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>
72h	12,334	Não identificado		
96h	3,829	Propilenoglicol	93,7%	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>
96h	5,477	Acetato de 3-metil-1-butanol	91,4%	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>
120h	5,0741	Isobutil lactato	82,7%	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>
120h	11,138	Hexadecano	94%	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub>
120h	8,1071	Não identificado		
120h	11,695	2-butil-1-octanol	92,3%	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> O
144h	4,484	3-metil-butanal	96,9%	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O
144h	7,845	Álcool fenetílico	94,4%	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O
144h	7,1571	Álcool benzílico	97,6%	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O
Seca	6,826	Trimetilpirazina	95,1%	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub>
Seca	4,166	Não identificado		
Seca	6,37	Ácido 2-etil-butanóico	83,1%	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>
Seca	5,599	Ácido 2-metil-butanóico	92,1%	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>

Fonte: Autora (2024).

Os dados apresentados acima estão similares com o mostrado no QUADRO 4 na caracterização por e-Nose dos marcadores e também na FIGURA 3b, onde é possível notar que o início da fermentação é definido pela presença de álcoois e, no decorrer, são gerados alguns produtos de oxidação destes álcoois como os aldeídos, acetatos e cetonas. No final da fermentação há a presença de álcoois superiores e os ácidos orgânicos, completando o processo de oxidação, e também a presença de pirazinas. O meio da fermentação é marcado pela presença de ésteres, além das cetonas e acetatos já mencionados, que são compostos que estão presentes no metabolismo secundário intracelular das leveduras durante a fermentação alcoólica, sendo os produtos das reações enzimáticas entre seus ácidos e álcoois correspondentes (Bastos, 2016).

Diferentemente dos marcadores demonstrados pela caracterização por e-Nose, os metabólitos considerados marcadores do processo fermentativo, quando se avalia o final da fermentação pela caracterização via GC-MS/MS com o modo de injeção por SPME, estão em maior quantidade. Além disso, esses compostos também foram suficientes para separar os tempos de 96h, 120h, 144h e das amostras secas entre si. Apesar do e-Nose possuir um *trap* que pode auxiliar na concentração dos compostos voláteis conforme discutido anteriormente, os resultados de GC-SPME-MS demonstraram que, se tratando de uma injeção com fibra, a sensibilidade da extração foi mais favorecida, o que possibilitou a extração de maiores grupos de voláteis nas etapas finais da fermentação.

Os álcoois foram identificados não só no início da fermentação, mas ao longo de todo o processo fermentativo (APÊNDICE 1 a 8) e demonstraram que a presença de leveduras resulta na produção deste grupo de compostos. Ho, Zhao e Fleet (2014), avaliaram a fermentação dos grãos de cacau com e sem a presença de leveduras e concluiu que a produção de álcoois superiores e ésteres são exclusivamente geradas a partir das leveduras, o que justifica a presença dos álcoois durante todo o processo fermentativo. As leveduras, por sua vez, foram avaliadas no trabalho de Fonseca (2023), onde foi possível notar que espécies de gênero *Saccharomyces* são as majoritárias nos tempos de 24h, 48h, 96h e 120h de fermentação, mas também marcam presença nos tempos de 72h, 144h e na amostra de cacau seca. Os compostos 3-metil-1-butanol, álcool fenetílico e álcool benzílico, marcadores do tempo de 0h e 144h, também foram relatados por Rodriguez-Campos *et al.* (2011), Bastos (2016), Hamdouche *et al.* (2019) e Schwan e Wheals (2004) em seus trabalhos, e o

2,3-butanodiol nos trabalhos de Rodriguez-Campos *et al.* (2011), Hamdouche *et al.* (2019) e de Schwan e Wheals (2004), os quais relacionaram os álcoois mencionados com produtos de cacau com qualidade elevada em termos de sabor e aroma. O 1-pentanol também foi identificado no trabalho de Rodriguez-Campos *et al.* (2011) e Bastos (2016), e o 2-butil-1-octanol apesar de não ter sido relatado em trabalhos, teve compostos similares detectados em outros trabalhos. Bastos *et al.* (2019) identificou o 2-octanol, que foi relacionado como *off-flavor*.

Os ésteres foram detectados já na amostra de cacau fermentado em 0h (APÊNDICE 1) e se encontram no decorrer de todo o processo fermentativo. Os ésteres que foram classificados como marcadores foram acetato de 2-feniletil para 24h, acetato de etila para 72h, acetato de 3-metil-1-butanol para 96h e isobutil lactato para 120h. Os ésteres acetato de 2-feniletil e acetato de 3-metil-1-butanol (ou isoamílico) foram caracterizados nos trabalhos de Bastos (2016), Hamdouche *et al.* (2019) e Rodriguez-Campos *et al.* (2011), o acetato de etila foi identificado no trabalho de Rodriguez-Campos *et al.* (2011) e Hamdouche *et al.* (2019) e o isobutil acetato não foi identificado em nenhum trabalho, mas Rodriguez-Campos *et al.* (2012) encontrou em sua caracterização metil lactato e etil lactato, que conferem notas frutadas aos grãos de cacau. O acetato de etila é produto da esterificação do ácido acético e do etanol (Hamdouche *et al.*, 2019), o que sugere que estes precursores estavam presentes nos dias anteriores de fermentação. Ésteres, em geral, são compostos que influenciam fortemente o sabor e o aroma do produto final e são caracterizados por possuir notas frutadas, além de serem o segundo grupo mais importante em termos de compostos voláteis nos grãos de cacau torrado (Jinap *et al.*, 1998; Aculey *et al.*, 2010).

Os aldeídos começam a aparecer da metade para final da fermentação (APÊNDICE 5 a 8) e, como marcador, apenas em 144h como 3-metil-butanal. Esse composto já foi relatado em alguns estudos (Hamdouche *et al.*, 2019; Rodriguez-Campos *et al.*, 2012; Aculey *et al.*, 2010; Bastos, 2016). Os isômeros 2/3-metil-butanal são bem relatados após a torrefação, devido a degradação de Strecker – onde aminoácidos são degradados a aldeídos (Shibao; Bastos, 2011) pela exposição a alta temperatura – e é uma das fontes importantes destes compostos no cacau. Entretanto, como os grãos avaliados não passaram pelo processo de torrefação, sugere-se que estes aldeídos tenham sido originários a partir dos micro-organismos, visto que bactérias lácticas podem converter isoleucina em 2-metil-butanal e leucina

em 3-metil-butanal (Aculey *et al.*, 2010). Os isômeros 2/3-metil-butanal foram descritos com características fortes de chocolate em termos de aromas ativos (Afoakwa *et al.*, 2008), o que demonstra coerência com o identificado pelo e-Nose e apresentado no QUADRO 4. O aldeído marcador do tempo de 0h, 2-fenil-2-butenal, assim como alguns álcoois, é um metabólito produzido pelo gênero *Saccharomyces* presentes na fermentação.

As cetonas, assim como os aldeídos, estão presentes da metade do processo fermentativo para o final. Elas começam a aparecer a partir das 72h de fermentação (APÊNDICE 4 a 8) e, como marcador, no tempo de 72h com a presença da 4-hidroxi-2-butanona. Apesar desse composto não ter sido relatado antes, Afoakwa *et al.* (2008) encontraram uma cetona semelhante, a 2,3-butadiona que contribui com um sensorial amanteigado. As cetonas são correlacionadas com produtos de cacau de alta qualidade por trazer notas sensoriais de frutado e floral (Bastos *et al.*, 2019).

Ácidos orgânicos aparecem como marcadores nas amostras de grãos de cacau secos como ácido 2-etil-butanóico e 2-metil-butanóico. O ácido 2-metil-butanóico foi descrito no estudo de Frauendorfer e Schieberle (2006) como odores ativos nos pós de cacau avaliados. Não foram encontrados estudos onde o ácido 2-etil-butanóico foi caracterizado. Rodriguez-Campos *et al.* (2012) identificaram o ácido butírico, ou butanóico, como um *off-flavor* em seu trabalho devido a fermentação realizada em 8 dias, sugerindo que o tempo de fermentação diminua para 6 dias a fim de evitar a formação deste composto. Essenciais para corrigir o equilíbrio dos sabores, os ácidos orgânicos apenas causam problemas ao sensorial quando estão fora da concentração ideal (Holm *et al.*, 1993).

As pirazinas são os grupos de compostos aromáticos mais importantes no cacau e a maior parte delas são formadas durante a torrefação (Aculey *et al.*, 2010). Todavia, já foram caracterizadas pirazinas durante o processo fermentativo, e sugere-se que ocorra pela atividade enzimática (Aculey *et al.*, 2010). A pirazina indicada como marcador na amostra de cacau seca, trimetilpirazina, foi relatada em diversos estudos (Aculey *et al.*, 2010; Rodriguez-Campos *et al.*, 2012; Jinap *et al.*, 1998; Frauendorfer; Schieberle, 2006) e, apesar de se saber que a tetrametilpirazina é um produto do metabolismo de *Bacillus subtilis* (Aculey *et al.*, 2010) ainda não há relatos acerca dos micro-organismos precursores da trimetilpirazina. De acordo com Rodriguez-Campos *et al.* (2012), as pirazinas conferem aos grãos de cacau aromas como caramelo, cacau, torrado, doce e achocolatado e, dessa forma, pode-se compreender por que

são atributos sensoriais importantes para se estar presente no produto final. No APÊNDICE 8 pode-se observar a presença de outras pirazinas na caracterização das amostras de cacau secas, o que demonstra que as amostras de cacau no final da fermentação estão com o sensorial marcado pela presença de compostos atrelados à qualidade.

O composto hexadecano, um dos marcadores do tempo de 120h, foi relatado no trabalho de Bastos *et al.* (2019) como um *off-flavor* por se tratar de um alceno, como é o caso também do 2,2-dimetil-butano. Como estes compostos foram no início da fermentação e em 120h, não deve ser alarmante sua presença, visto que na amostra seca já não é mais detectado – provavelmente por serem compostos voláteis. Os outros compostos identificados como marcadores não foram relatados em outros trabalhos. De forma a verificar se estes marcadores são inerentes ao processo produtivo avaliado, novas análises devem ser realizadas.

No APÊNDICE 6 são observados alguns compostos do grupo de terpenos: D-limoneno, p-Cimeno e o linalol. Os terpenos são conhecidos por conferirem notas florais e muitas vezes relacionados com cacaos do tipo fino, pelo seu impacto positivo no aroma (Bastos, 2016). Nas amostras de cacau do último dia de fermentação (APÊNDICE 7) já não são mais detectados esses compostos, e Bastos (2016) relatou o mesmo comportamento para o linalol. Caso seja de interesse manter essas notas, deve-se estudar a possibilidade de diminuir o tempo de fermentação das sementes de cacau ou alterar o processo de secagem dos grãos.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo contribuiu para avaliação do processo fermentativo em termos das mudanças sensoriais no que diz respeito a sabor e aroma por técnicas eletrônicas de forma inédita. Além disso, também foram avaliados os metabólitos voláteis com a utilização de GC-SPME-MS, entendendo as variações dos compostos durante a fermentação.

As alterações de sabor, de acordo com o analisado, se iniciam já nas primeiras 24h de fermentação, mas são mais intensas a partir das 120h. As alterações de aroma, por sua vez, são mais complexas a partir das 48h. Acredita-se que essa diferença entre as transformações observadas no sabor para o observado no aroma seja em decorrência de que os precursores de aroma, os álcoois, se oxidam de maneira mais rápida. A combinação das duas técnicas sensoriais é extremamente relevante, visto que, se avaliadas separadamente poderiam nos levar a pensar que as transformações sensoriais ocorrem nas primeiras 48h, quando isso acontece apenas para o e-Nose.

Além disso, foi possível caracterizar os compostos voláteis todos os dias do processo fermentativo, podendo ser observada como cada grupo de compostos contribui positiva ou negativamente para o sensorial do grão de cacau no último dia de fermentação e quais os compostos que caracterizam cada dia do processo fermentativo.

A caracterização avaliada pelas diferentes técnicas traz informações importantes sobre o processo fermentativo, possibilitando a tomada de decisão frente a identificação de compostos que oferecem atributos sensoriais interessantes para a produção de cacaos finos e, contribuindo assim, para discussões do *terroir* do cacau. Recomenda-se que novos trabalhos sejam realizados a fim de determinar se os marcadores encontrados para essa região de cultivo representam o perfil do cacau analisado e que novos estudos com técnicas sensoriais eletrônicas sejam realizados a fim de possibilitar uma compreensão melhor acerca do sensorial do cacau.

## REFERÊNCIAS

ACULEY, P. C. *et al.* Ghanaian Cocoa Bean Fermentation Characterized by Spectroscopic and Chromatographic Methods and Chemometrics. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 6, p. 300-307, 2010. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01710.

AFOAKWA, Emmanuel Ohene; *et al.* Flavor Formation and Character in Cocoa and Chocolate: a critical review. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, [S.L.], v. 48, n. 9, p. 840-857, set. 2008. DOI: 10.1080/10408390701719272.

ALI, Faisal; *et al.* Identification of phenolic compounds in polyphenols-rich extract of Malaysian cocoa powder using the HPLC-UV-ESI—MS/MS and probing their antioxidant properties. **Journal Of Food Science And Technology**, [S.L.], v. 52, n. 4, p. 2103-2111, out. 2013. Springer Science and Business Media LLC. DOI: 10.1007/s13197-013-1187-4.

ALPHAMOS: SMELL Analysis – HERACLES Electronic Nose. Disponível em: <<https://www.alpha-mos.com/smell-analysis-heracles-electronic-nose>>. Acesso em: 21/01/2024.

ALPHAMOS: TASTE Analysis: ASTREE Electronic Tongue. Disponível em: <<https://www.alpha-mos.com/taste-analysis-astree-electronic-tongue>>. Acesso em: 04/02/2024.

ANDÚJAR, I.; *et al.* Cocoa Polyphenols and Their Potential Benefits for Human Health. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [S.L.], v. 2012, p. 1-23, 2012. Hindawi Limited. DOI: 10.1155/2012/906252.

ARANTES, José Tadeu. **Estudo avança no entendimento da vassoura-de-bruxa, doença que derrubou a produção de cacau no Brasil**, 2021. Disponível em: <<https://agencia.fapesp.br/estudo-avanca-no-entendimento-da-vassoura-de-bruxa-doenca-que-derrubou-a-producao-de-cacau-no-brasil/36258/>>. Acesso em: 23/10/2022.

BRAINER, Maria Simone de Castro Pereira. **Produção de cacau**, 2021. ETENE - Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste, nº 149, p. 1-23.

BARBOSA-PEREIRA, Leticia; *et al.* Assessment of volatile fingerprint by HS-SPME/GC-qMS and E-nose for the classification of cocoa bean shells using chemometrics. **Food Research International**, [S.L.], v. 123, p. 684-696, 2019. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.foodres.2019.05.041.

BASTOS, Valdeci S. **Sucessão microbiana e dinâmica de substratos e metabólitos durante a fermentação espontânea de grãos de cacau (*Theobroma cacao* L.), variedade clonal TSH 565, cultivado no Sul da Bahia**, 2016, 132 f. Tese de doutorado – Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

BASTOS, V. S. *et al.* Analysis of the cocobiota and metabolites of *Moniliophthora perniciosa*-resistant *Theobroma cacao* beans during spontaneous fermentation in

southern Brazil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, p. 4963-4970, 2018.

BASTOS, Valdeci S.; *et al.* Dynamics of volatile compounds in TSH 565 cocoa clone fermentation and their role on chocolate flavor in Southeast Brazil. **Journal Of Food Science And Technology**, [S.L.], v. 56, n. 6, p. 2874-2887, 20 maio 2019. Springer Science and Business Media LLC. DOI: 10.1007/s13197-019-03736-3.

BATISTA, N. N.; *et al.* Dynamic behavior of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* and *Hanseniaspora uvarum* during spontaneous and inoculated cocoa fermentations and their effect on sensory characteristics of chocolate. **Food Science and Technology**, v. 63, p. 221-227, 2015.

CÁDIZ-GURREA, María de La Luz; *et al.* LC-MS and Spectrophotometric Approaches for Evaluation of Bioactive Compounds from Peru Cocoa By-Products for Commercial Applications. **Molecules**, [S.L.], v. 25, n. 14, p. 3177, 11 jul. 2020. MDPI AG. DOI: 10.3390/molecules25143177.

CHAGAS JUNIOR, Gilson Celso Albuquerque; FERREIRA.; LOPES, Alessandra Santos. The microbiota diversity identified during the cocoa fermentation and the benefits of the starter cultures use: An overview. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 56, p. 544-552, 2021.

CHAGAS JUNIOR, Gilson Celso Albuquerque; *et al.* Identification of Lactic Acid Bacteria on Raw Material for Cocoa Bean Fermentation in the Brazilian Amazon. **Fermentation**, [S.L.], v. 8, n. 5, p. 199, 28 abr. 2022. MDPI AG. DOI: 10.3390/fermentation8050199.

CHEN, Yi; *et al.* Characteristic fingerprints and volatile flavor compound variations in Liuyang Douchi during fermentation via HS-GC-IMS and HS-SPME-GC-MS. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 361, p. 130055, nov. 2021. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.130055.

CHRIST, Mariele Laís. **Do cacau ao chocolate: internacionalização do chocolate Tree to bar da Bahia à luz do tripé da estratégia**, 2020, 170 f. Dissertação de mestrado - Curso de Administração, Centro de Ciências Administrativas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

COSTA, Alexandre Tadeu. **O cacau é show**. São Paulo: Ed. do autor, 2008.

CRAFACK, Michael; *et al.* Impact of starter cultures and fermentation techniques on the volatile aroma and sensory profile of chocolate. **Food Research International**, [S.L.], v. 63, p. 306-316, set. 2014. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.04.032.

DEGANI, Ana Luiza G.; *et al.* Cromatografia, um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, nº 7, p. 21-25, 1998.

DOGNINI, Jocinei. **Microextração em fase sólida seguida de GC-MS para determinação de benzeno em extratos lixiviados de resíduos da indústria de petróleo**, 2018, 102 f. Tese de Doutorado – Curso de Química, Centro de Ciências

Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

FERREIRA, Márcia Miguel Castro. **Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações**, 2015. Editora da Unicamp.

FIGUEROA-HERNÁNDEZ, Claudia; *et al.* The challenges and perspectives of the selection of starter cultures for fermented cocoa beans. **International Journal Of Food Microbiology**, [S.L.], v. 301, p. 41-50, 2019. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.05.002.

FRAUENDORFER, Felix; SCHIEBERLE, Peter. Identification of the key aroma compounds in cocoa powder based on molecular sensory correlations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54, p. 5521–5529, 2006. DOI: 10.1021/jf060728k. PMID: 16848541.

FONSECA, Ynara da Costa. **Diversidade funcional microbiana durante o processo de fermentação de cacau**, 2023, 79 f. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia aplicada à agropecuária, Belém.

HAN, Dong; *et al.* Characterization and comparison of flavor compounds in stewed pork with different processing methods. **Food Science and Technology**, [S.L.], v. 144, p. 111229, jun. 2021. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.lwt.2021.111229.

HAMDOUCHE, Yasmine; *et al.* Impact of turning, pod storage and fermentation time on microbial ecology and volatile composition of cocoa beans. **Food Research International**, [S.L.], v. 119, p. 477-491, maio 2019. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.foodres.2019.01.001.

HERRERA-ROCHA, Fabio; *et al.* Dissecting fine-flavor cocoa bean fermentation through metabolomics analysis to break down the current metabolic paradigm. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 21904, 9 nov. 2021. Springer Science and Business Media LLC. DOI: 10.1038/s41598-021-01427-8.

HERRERA-ROCHA, Fabio; *et al.* Omics approaches to understand cocoa processing and chocolate flavor development: a review. **Food Research International**, [S.L.], v. 165, p. 112555, mar. 2023. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.foodres.2023.112555.

HERRERA-ROCHA, Fabio; *et al.* Bioactive and flavor compounds in cocoa liquor and their traceability over the major steps of cocoa post-harvesting processes. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 435, p. 137529, mar. 2024. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.foodchem.2023.137529.

HO, V. T.; ZHAO, J.; FLEET, G. Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v.174, p.72-87, 2014. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.014

HOLM, Camala S.; ASTON, John W.; DOUGLAS, Keith. The Effects of the Organic Acids in Cocoa on the Flavour of Chocolate. **Journal of the Science of Food Agriculture**, v. 61, p. 65-71, 1993.

HUANG, Xingyi; *et al.* Rapid measurement of total polyphenols content in cocoa beans by data fusion of NIR spectroscopy and electronic tongue. **Anal. Methods**, [S.L.], v. 6, n. 14, p. 5008-5015, 2014. Royal Society of Chemistry (RSC). DOI: 10.1039/c4ay00223g.

IUPAC, **Compendium of Chemical Terminology – the Gold Book**. Disponível em: <<http://goldbook.iupac.org/CT06948.html>> Acesso em: 06/06/2024.

JINAP, S.; *et al.* Effect of roasting time and temperature on volatile component profiles during nib roasting of cocoa beans (*Theobroma cacao*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.77, p. 441-448, 1998.

KONAGANO, Evelyn Mayumi Hanawa. **Influência do fungo Cladosporioides no índice de qualidade e perfil aromático de sementes de cacau (*Theobroma cacao* L.) fermentadas**, 2020, 103 f. Dissertação de mestrado, Instituto de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Belém.

KONAGANO, Evelyn Mayumi Hanawa; *et al.* Cladosporium cladosporioides starter culture can positively influence flavour and bioactive compounds of fermented and dried cocoa beans from the Amazon biome. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 61, n. 3, p. 230-241, 2022.

KONGOR, John Edem; *et al.* Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile — A review. **Food Research International**, [S.L.], v. 82, p. 44-52, abr. 2016. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.foodres.2016.01.012.

LIMA, Lídia J. R.; *et al.* *Theobroma cacao* L., “The Food of the Gods”: Quality Determinants of Commercial Cocoa Beans, with Particular Reference to the Impact of Fermentation, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 731-761, 2011, DOI: 10.1080/10408391003799913.

LUBES, Giuseppe; GOODARZI, Mohammed. Analysis of Volatile Compounds by Advanced Analytical Techniques and Multivariate Chemometrics. **Chemical Reviews**., v. 117, p. 6399-6422., 2017 PMID: 28306239. DOI: 10.1021/acs.chemrev.6b00698

MELO, Claudio Bezerra. **Cacau**, 2017. Multimídia: Banco de imagens. EMBRAPA. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-imagens/-/midia/4096001/cacau>> Acesso em: 14/04/2024.

MENDONÇA, Marcos Vinícius; PEDROZA FILHO, Manoel Xavier. Análise do cacau orgânico de São Felix do Xingu (PA) através da cadeia global de valor. **Revista Agroecossistemas**, v. 11, p. 20-42, 2019.

MIGUEL, Maria Gabriela da Cruz Pedrozo; *et al.* Cocoa fermentation: microbial identification by MALDI-TOF MS, and sensory evaluation of produced chocolate. **Food Science and Technology**, [S.L.], v. 77, p. 362-369, abr. 2017. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.lwt.2016.11.076.

MUDENUTI, Natália Vicente de Rezende; *et al.* Phenolics and alkaloids of raw cocoa nibs and husk: the role of soluble and insoluble-bound antioxidants. **Food Bioscience**, [S.L.], v. 42, p. 101085, ago. 2021. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.fbio.2021.101085.

OETTERER, Marília; REGITANO-D'ARCE, Marisa Aparecida Bismara; SPOTO, Marta Helena Fillet. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Barueri: Manole, 2006.

OLIVEIRA JÚNIOR, Afonso Henrique de; *et al.* Perfil químico de amêndoas de cacau por espectrometria de massas com ionização por paper spray. **Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, V. 1, [S.L.], p. 338-353, 2020. Editora Científica Digital. DOI: 10.37885/201102158.

ORDOÑEZ-ARAQUE, Roberto H.; *et al.* Microorganisms during cocoa fermentation: systematic review. **Foods And Raw Materials**, [S.L.], p. 155-162, abr. 2020. Kemerovo State University. DOI: 10.21603/2308-4057-2020-1-155-162.

PAPALEXANDRATOU, Zoi; *et al.* Spontaneous organic cocoa bean box fermentations in Brazil are characterized by a restricted species diversity of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. **Food Microbiology**, [S.L.], v. 28, n. 7, p. 1326-1338, out. 2011. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.fm.2011.06.003.

PAVIA, Donald L.; *et al.* **Introdução à espectroscopia**, 4<sup>a</sup> ed. *Cengage Learning*, 2010.

PENTEADO, José Carlos P.; *et al.* Experimento didático sobre cromatografia gasosa: uma abordagem analítica e ambiental. **Química Nova na Escola**, n. 8, vol. 31, p. 2190-2193, 2008.

PUBCHEM: NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (US): NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Compound Summary**: Methyl formate. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methyl-formate>>. Acesso em: 2/05/2024.

RODRIGUEZ-CAMPOS, J.; *et al.* Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 132, n. 1, p. 277-288, 2012. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.10.078.

RODRIGUEZ-CAMPOS, J.; *et al.* Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cocoa* L.) during fermentation and drying process using principal components analysis. **Food Research International**, v. 44, p. 250-258, 2011. DOI: 10.1080/10408690490464104

ROSENDO, Luana M.; *et al.* Miniaturized Solid Phase Extraction Techniques Applied to Natural Products. **Processes**, v. 11, n. 243, 2023. DOI: 10.3390/pr11010243

ROTTIERS, H.; *et al.* Discrimination of Cocoa Liquors Based on Their Odor Fingerprint: a Fast GC Electronic Nose Suitability Study. **Food Analytical Methods**, v. 12, p. 475–488, 2019. DOI: 10.1007/s12161-018-1379-7

SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Reviews. Food Science and Nutrition*. v. 44, p. 205-221, 2004.

SHIBAO, Julianna; BASTOS, Deborah Helena Markowicz. Produtos da reação de Maillard em alimentos: implicações para a saúde. *Revista Nutrição*, Campinas, 24(6): p. 895-904, 2011. DOI: 10.1590/S1415-52732011000600010

SILVERSTEIN, Robert M.; *et al.* **Spectrometric identification of organic compounds**, 8. ed. State University of New York, College of Environmental Science & Forestry, University of Ottawa: Wiley, 2015.

SMITH, R.J.; *et al.* Comparison of mathematical methods for the calculation of Kovats indices, *Journal of Chromatography A*, v. 328, p. 11-34, ISSN 0021-9673, 1985. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)87373-8

TEYE, E.; *et al.* Discrimination of Cocoa Beans According to Geographical Origin by Electronic Tongue and Multivariate Algorithms. *Food Analytical Methods*, v.7, p. 360-365, 2014. DOI: 10.1007/s12161-013-9634-4

TRAN, P. D.; *et al.* Assessing cocoa aroma quality by multiple analytical approaches. *Food Research International*, v.77, p. 657-669, ISSN 0963-9969, 2015. DOI: 10.1016/j.foodres.2015.09.019.

VALENTE, Antonio Luiz Pires; AUGUSTO, Fabio. Microextração por fase sólida. *Química Nova*, v.23, n. 4, p. 523-530, 2000.

VUYST, L. de; WECKX, S. The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. *Journal Of Applied Microbiology*, [S.L.], v. 121, n. 1, p. 5-17, 2016. Oxford University Press (OUP). DOI: 10.1111/jam.13045.

VISINTIN, Simonetta; *et al.* Impact of *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* starter cultures on cocoa beans fermentation. *International Journal Of Food Microbiology*, [S.L.], v. 257, p. 31-40, 2017. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.004.

WAGNER, Yasmim da Fonseca. AVANÇOS TECNOLÓGICOS NO PROCESSAMENTO DO CACAU E DERIVADOS E EFEITOS NO ORGANISMO. *Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Volume 1*, [S.L.], p. 90-101, 2020. Editora Científica Digital. DOI: 10.37885/201001666.

WALZBURIECH, Daniela. **Conheça os maiores produtos de cacau do mundo**. Disponível em: <<https://sistemafaeb.org.br/conheca-os-maiores-produtores-de-cacau-do-mundo/>> Acesso em: 18/06/2024.

WOLLGAST, Jan; ANKLAM, Elke. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, [S.L.], v. 33, n. 6, p. 423-447, 2000. Elsevier BV. DOI: 10.1016/S0963-9969(00)00068-5.

## APÊNDICE 1 – COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR GC-SPME-MS NO TEMPO OH DE FERMENTAÇÃO

RT	Compound Name	Match Factor	Formula	CAS#	Component Area
2.1060	Pentanal	80.21	C5H10O	110-62-3	7386278.77
2.6046	(R)-(-)-2-Pentanol	90.83	C5H12O	31087-44-2	19243280.92
3.2277	Acetic acid	99.66	C2H4O2	64-19-7	264899683.5
3.3869	1-Butanol, 3-methyl-	94.75	C5H12O	123-51-3	53282858.71
3.3877	2-Oxetanone, 4-methylene-	87.12	C4H4O2	674-82-8	10647627.54
3.5377	4-Penten-2-ol, 3-methyl	82.20	C6H12O	1569-59-1	1314761.5
3.7185	2-Butanol, 3-methyl-	91.08	C5H12O	598-75-4	19673111.64
4.1779	Propane, 2-fluoro-	84.42	C3H7F	420-26-8	622558.5127
4.1872	Propylene Glycol	89.53	C3H8O2	57-55-6	5325733.607
4.1874	(S)-(+)-1,2-Propanediol	90.85	C3H8O2	4254-15-3	5610077.724
4.4655	Tetrachloroethylene	84.79	C2Cl4	127-18-4	1291279.145
4.6547	2,3-Butanediol	96.52	C4H10O2	513-85-9	114912117.5
4.7644	2,3-Butanediol	95.76	C4H10O2	513-85-9	42456783.11
5.1396	1-Butanamine, 3-methyl- Furan-2-carbonyl chloride, tetrahydro-	82.57	C5H13N	107-85-7	251492.4887
5.1905	1-Butanol, 3-methyl-, acetate	82.86	C5H7ClO2	52449-98-6	690601.7209
5.4735	1-Butanol, 3-methyl-, acetate	93.91	C7H14O2	123-92-2	17206055.89
5.5052	Chlorine	83.00	Cl2	7782-50-5	3000329.455
5.7597	2-Hexanol, 5-methyl-	85.06	C7H16O	627-59-8	3051024.929
6.4026	Phenylglyoxal	97.84	C8H6O2	1074-12-0	66147328.04
6.7893	Hexanoic acid, ethyl ester	80.50	C8H16O2	123-66-0	3666435.669
6.8966	<i>1,4-Dichlorobenzene-D4</i>	93.35	<i>C6D4Cl2</i>	<i>3855-82-1</i>	<i>33063526.64</i>
6.9972	Pentane, 2-methyl-	90.28	C6H14	107-83-5	334989.7419
7.0344	Dicumyl peroxide Cyclobutane, 1,3- diisopropenyl-, trans	80.59	C18H22O2	80-43-3 1000152- 89-6	452608.8161
7.0714	Benzyl alcohol	80.65	C10H16	89-6	848536.3169
7.1717	Benzyl alcohol	97.80	C7H8O	100-51-6	32444597.49
7.3161	Hexane, 2,3,4-trimethyl-	80.46	C9H20	921-47-1	1303040.279
7.3162	Heptane, 2,4-dimethyl-	80.21	C9H20	2213-23-2	1364952.926
7.3691	3-Ethyl-3-methylheptane 3-(Benzoylthio)-2- methylpropanoic acid	81.95	C10H22	17302-01-1	213267.0529
7.4297	3-(Benzoylthio)-2- methylpropanoic acid	84.92	C11H12O3S	67714-34-5	3622995.31
7.6209	Pyrazine, tetramethyl-	82.17	C8H12N2	1124-11-4	1308318.551
7.8584	Phenylethyl Alcohol Carbamic acid, methyl-, 3- methylphenyl ester	94.64	C8H10O	60-12-8	347390702.6
8.2304	Carbamic acid, methyl-, 3- methylphenyl ester	81.98	C9H11NO2	1129-41-5	1166062.7
8.2507	Octanoic acid	86.93	C8H16O2	124-07-2	809932.1438
8.2896	Benzoic acid, ethyl ester Butanedioic acid, diethyl ester	91.69	C9H10O2	93-89-0	2292941.685
8.3304	Benzoic acid, ethyl ester Butanedioic acid, diethyl ester	93.73	C8H14O4	123-25-1	10968154.33
8.4020	<i>Naphthalene-D8</i>	95.54	<i>C10D8</i>	<i>1146-65-2</i>	<i>28755425.02</i>

8.4534	Octanoic acid, ethyl ester	88.75	C10H20O2	106-32-1	13442813.44
8.4729	Butane, 2,2-dimethyl	84.70	C6H14	75-83-2	1092610.3
8.4926	Methyl salicylate	80.02	C8H8O3	119-36-8	768380.2888
8.6976	Furan, 3-phenyl-	87.04	C10H8O	13679-41-9	522093.2123
8.8442	Benzeneacetic acid, ethyl ester	81.23	C10H12O2	101-97-3	2491288.334
8.9178	Benzene, 1,3-bis(1,1-dimethylethyl)-	85.14	C14H22	1014-60-4	2450542.394
8.9349	Acetic acid, 2-phenylethyl ester	95.64	C10H12O2	103-45-7	10962429.07
9.0580	Benzoic acid, 2-hydroxy-, ethyl ester	85.78	C9H10O3	118-61-6	3884003.548
9.0727	Benzeneacetaldehyde, .alpha.-ethylidene-	95.19	C10H10O	4411-89-6	18024015.04
9.8594	Decanoic acid, ethyl ester	84.19	C12H24O2	110-38-3	5667742.773
9.8867	Octane, 2-methyl-	87.40	C9H20	3221-61-2	1819777.989
9.8868	Octane, 3,4,5,6-tetramethyl-1,2-Ethanediol,	87.45	C12H26	62185-21-1	1869976.92
9.8983	monobenzoate	89.42	C9H10O3	94-33-7	1421838.229
<i>10.519</i>	<i>Acenaphthene-d10</i>	<i>91.67</i>	<i>C12D10</i>	<i>15067-26-2</i>	<i>14148068.4</i>
11.135	1-Octanol, 2-butyl-	93.51	C12H26O	3913-02-8	2772011.343
11.714	1-Octanol, 2-butyl-	91.33	C12H26O	3913-02-8	2695394.8
11.714	1-Nonene, 4,6,8-trimethyl-	90.81	C12H24	54410-98-9	2640848.765
12.263	1-Octanol, 2-butyl-	91.79	C12H26O	3913-02-8	2233573.185
<i>12.309</i>	<i>Phenanthrene-D10</i>	<i>94.21</i>	<i>C14D10</i>	<i>1517-22-2</i>	<i>14571552.26</i>
12.787	Tridecane, 6-methyl-	87.53	C14H30	13287-21-3	1343013.006

Legenda – RT: *retention time*; CAS: *Chemical Abstracts Service*; itálico: padrões internos utilizados.

**APÊNDICE 2 – COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR GC-SPME-MS NO TEMPO  
24H DE FERMENTAÇÃO**

RT	Compound Name	Match Factor	Formula	CAS#	Component Area
2.1128	Butane, 1-(2-propenyloxy)-	94.0	C7H14O	3739-64-8	2862485.032
2.9461	Acetamide, 2-fluoro-	92.1	C2H4FNO	640-19-7	14879921.01
3.3109	1-Pentanol	95.4	C5H12O	71-41-0	55686745.81
3.3634	1-Butanol, 2-methyl- 2-Ethylhexanal ethylene	90.8	C5H12O	137-32-6 1000431-	31146897.45
4.0585	glycol acetal	89.1	C10H20O2	01-2	3375253.697
4.2821	2,3-Butanediol	92.9	C4H10O2	513-85-9	19545593.15
4.4236	Isobutylamine	82.1	C4H11N	78-81-9	1569010.752
4.4289	2,3-Butanediol	91.9	C4H10O2	513-85-9	16852632.62
5.1698	Propiolonitrile	89.3	C3HN	1070-71-9	539004.5469
5.2969	1,2-Ethanediol, monoformate	93.3	C3H6O3	628-35-3	11273957.31
5.4168	Butanoic acid, 2-methyl- Carbonic acid, 2- dimethylaminoethyl 2-	87.7	C5H10O2	116-53-0 1000331-	6785905.659
5.6432	methoxyethyl ester	86.0	C8H17NO4	46-2	348713.0363
6.4084	Phenacylidene diacetate	96.5	C12H12O5	5062-30-6	14745387.57
6.8988	<i>1,4-Dichlorobenzene-D4</i>	94.0	<i>C6D4Cl2</i>	<i>3855-82-1</i>	<i>26955195.95</i>
7.1404	Benzyl alcohol	92.4	C7H8O	100-51-6 55771-40-	3291446.405
7.3157	2,4,6-Trimethyl-1-nonene	89.8	C12H24	9	895092.0596
7.4313	Phenacylidene diacetate	96.9	C12H12O5	5062-30-6	1262247.337
7.5967	Pyrazine, tetramethyl-	91.8	C8H12N2	1124-11-4 62185-21-	1974730.405
7.6955	Octane, 3,4,5,6-tetramethyl-	83.0	C12H26	1	1215449.262
7.6983	Octane, 2-methyl- Butanoic acid, 2-methyl-, 3-	83.5	C9H20	3221-61-2 27625-35-	935912.0527
7.7290	methylbutyl ester	88.8	C10H20O2	0	872946.0204
7.8327	Phenylethyl Alcohol	94.0	C8H10O	60-12-8	155956154.5
8.0804	Benzene, 1,2-dimethoxy-	88.5	C8H10O2	91-16-7	1776577.556
8.4035	<i>Naphthalene-D8</i>	95.9	<i>C10D8</i>	<i>1146-65-2</i> 13287-21-	<i>22047195.8</i>
8.4732	Tridecane, 6-methyl-	91.4	C14H30	3	1758747.105
8.4733	Hexadecane	90.7	C16H34	544-76-3 13679-41-	1834997.882
8.6990	Furan, 3-phenyl-	80.9	C10H8O	9	489650.9161
8.9189	Phenylethyl Acetate	95.6	C10H10O2	93-92-5 1000309-	3979902.859
9.8876	Oxalic acid, allyl nonyl ester	94.6	C14H24O4	23-7	813545.0253

9.8995	1,2-Ethandiol, monobenzoate	91.8	C9H10O3	94-33-7	634856.7294
10.305	3a,7-Methano-3aH- cyclopentacyclooctene, 1,4,5,6,7,8,9,9a-octahydro- 1,1,7-trimethyl-, [3aR- (3a.alpha.,7.alpha.,9a.beta.) ]-	85.6	C15H24	469-92-1 15067-26- 2	1886870.556 21269722.8
10.520	<i>Acenaphthene-d10</i>	92.7	<i>C12D10</i>	1000309- 23-7	649428.7266
11.141	Oxalic acid, allyl nonyl ester	87.5	C14H24O4	1517-22-2	26994471.83
12.313	<i>Phenanthrene-D10</i>	88.0	<i>C14D10</i>		

Legenda – RT: *retention time*; CAS: *Chemical Abstracts Service*; itálico: padrões internos utilizados.

**APÊNDICE 3 – COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR GC-SPME-MS NO TEMPO  
48H DE FERMENTAÇÃO**

RT	Compound Name	Match Factor	Formula	CAS#	Component Area
2.1158	Propanal	93.1	C3H6O	123-38-6	1463920.93
2.5771	Acetic acid	97.0	C2H4O2	64-19-7	50478463.88
2.6057	(R)-(-)-2-Pentanol	94.8	C5H12O	31087-44-2	10242850.26
3.3041	1-Pentanol	94.8	C5H12O	71-41-0	15524567.08
3.3657	Oxalic acid, butyl cyclobutyl ester	90.3	C10H16O4	1000309-69-4	15004375.8
4.4351	2,3-Butanediol, [R- (R*,R*)]-	93.2	C4H10O2	24347-58-8	37883160.81
4.4351	2,3-Butanediol, [S- (R*,R*)]-	93.4	C4H10O2	19132-06-0	34766935.52
4.4667	Tetrachloroethylene	91.6	C2Cl4	127-18-4	1871451.643
4.5685	2,3-Butanediol, [S- (R*,R*)]-	95.7	C4H10O2	19132-06-0	25292578.63
4.5686	2,3-Butanediol	95.7	C4H10O2	513-85-9	26103813.96
4.6319	Propanoic acid, 2- hydroxy-, ethyl ester	95.3	C5H10O3	97-64-3	29829128.38
5.1809	2-Amino-1,3- propanediol	84.0	C3H9NO2	534-03-2	2681344.113
5.3511	Butanoic acid, 2- methyl-	83.4	C5H10O2	116-53-0	4940506.01
5.4574	Acetic acid, (acetyloxy)-	88.0	C4H6O4	13831-30-6	1294561.835
5.4771	1-Butanol, 3-methyl-, acetate	87.4	C7H14O2	123-92-2	8039697.939
5.5083	Methyl vinyl ketone	83.3	C4H6O	78-94-4	3467884.161
6.2833	4-Octanone, 5- hydroxy-2,7-dimethyl-	80.3	C10H20O2	6838-51-3	3586759.405
6.4063	Phenylglyoxal	97.3	C8H6O2	1074-12-0	23248632.22
6.8985	1,4-Dichlorobenzene- D4	94.1	C6D4Cl2	3855-82-1	28579725.74
7.0719	Cyclobutane, 1,2- bis(1-methylethenyl)-, trans-	80.8	C10H16	19465-02-2	1424964.735
7.1506	Benzyl alcohol	96.7	C7H8O	100-51-6	24584992.37
7.3175	Butane, 2,2-dimethyl-	84.0	C6H14	75-83-2	582609.508
7.3175	Hexane, 2,2,5,5- tetramethyl-	84.3	C10H22	1071-81-4	585807.5097
7.3674	Octane	86.6	C8H18	111-65-9	248475.2793
7.4339	Phenylglyoxylic acid, neopentyl ester	83.8	C13H16O3	1000453-45-9	1633488.158
7.4340	3-(Benzoylthio)-2- methylpropanoic acid	84.8	C11H12O3S	67714-34-5	1698580.456
7.6079	Pyrazine, tetramethyl-	89.9	C8H12N2	1124-11-4	921181.9455

7.6932	Linalool	87.1	C10H18O	78-70-6	2647288.577
7.8406	Phenylethyl Alcohol	92.9	C8H10O	60-12-8	138524204.1
8.2093	Benzoic acid 2-bromoethyl ester	84.1	C9H9BrO2	939-54-8	1931742.193
8.2901	Benzoic acid 2-bromoethyl ester	91.1	C9H9BrO2	939-54-8	1362453.253
8.3301	Butanedioic acid, diethyl ester	90.1	C8H14O4	123-25-1	1962481.262
8.4029	<i>Naphthalene-D8</i>	96.5	<i>C10D8</i>	1146-65-2	27494162.87
8.4733	Oxalic acid, allyl nonyl ester	92.0	C14H24O4	1000309-23-7	4034105.344
8.4734	Decane, 2,4-dimethyl-	90.9	C12H26	2801-84-5	3950617.19
8.6961	Furan, 3-phenyl-	80.9	C10H8O	13679-41-9	222758.5882
8.8453	Benzeneacetic acid, ethyl ester	86.7	C10H12O2	101-97-3	1277197.116
8.9205	Benzene, 1,3-bis(1,1-dimethylethyl)-	85.7	C14H22	1014-60-4	2041917.54
8.9351	Acetic acid, 2-phenylethyl ester	90.0	C10H12O2	103-45-7	3487964.339
9.0731	Benzeneacetaldehyde, .alpha.-ethylidene-	95.2	C10H10O	4411-89-6	10571369.03
9.2046	Carbonic acid, nonyl vinyl ester	92.8	C12H22O3	1000383-25-6	6627313.58
9.2046	Hexadecane	93.5	C16H34	544-76-3	6342920.127
9.8876	Hexadecane	94.2	C16H34	544-76-3	16473101.59
9.8876	1-Octanol, 2-butyl-	93.9	C12H26O	08/02/3913	16427972.8
9.8995	1,2-Ethandiol, monobenzoate	90.5	C9H10O3	94-33-7	1232726.905
10.520	<i>Acenaphthene-d10</i>	93.9	<i>C12D10</i>	15067-26-2	50513031.22
12.262	1-Octanol, 2-butyl-	91.5	C12H26O	08/02/3913	3327759.239
12.304	<i>Phenanthrene-D10</i>	94.4	<i>C14D10</i>	1517-22-2	38156861.44
12.787	1-Nonene, 4,6,8-trimethyl-	85.4	C12H24	54410-98-9	2094268.135
12.787	Octane, 2,7-dimethyl-	86.7	C10H22	1072-16-8	1202131.717

Legenda – RT: *retention time*; CAS: *Chemical Abstracts Service*; itálico: padrões internos utilizados.

**APÊNDICE 4 – COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR GC-SPME-MS NO TEMPO  
72H DE FERMENTAÇÃO**

RT	Compound Name	Match Factor	Formula	CAS#	Component Area
2.1213	Methylene chloride	87.3	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	75-09-2	15516261.55
2.3400	4H-1,2,4-Triazol-4-amine	86.7	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub>	584-13-4	2623182.308
3.3143	1-Pentanol	92.0	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O	71-41-0	6626723.276
3.3808	Oxalic acid, butyl cyclobutyl ester	91.4	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	1000309-69-4	6939689.849
3.3808	2-Propenal	90.8	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O	107-02-8	6568180.604
3.6068	Propylene Glycol	91.1	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	57-55-6	6796691.695
4.2141	2,3-Butanediol, [S- (R*,R*)]-	92.7	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	19132-06-0	30299425.14
4.4322	2,3-Butanediol	92.6	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	513-85-9	31603818.32
4.4632	Tetrachloroethylene	83.9	C <sub>2</sub> Cl <sub>4</sub>	127-18-4	2372651.438
4.6889	Hexane, 2,4-dimethyl-	82.1	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub>	589-43-5	955456.9007
5.2091	Butanoic acid, 3-methyl- 1-Butanol, 3-methyl-, acetate	80.8	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	503-74-2	5010103.137
5.4758	Chlorine	89.1	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	123-92-2	12148488.3
5.5050	Ethyl Acetate	82.4	Cl <sub>2</sub>	7782-50-5	2490393.901
6.0852	4-hydroxy-2-butanone	84.5	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	141-78-6	5237708.19
6.1562	Phenylglyoxal	83.9	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	590-90-9	5632851.575
6.4082	2,4-Heptadien-6-ynal, (E,E)-	97.4	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	1074-12-0	9809360.383
6.4091	Thiophosphordiamide, S- methyl ester	81.3	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O	7200-04-06	6328115.979
6.4908	1,4-Dichlorobenzene-D <sub>4</sub>	83.5	CH <sub>7</sub> N <sub>2</sub> O <sub>PS</sub>	1000306-03-4	74303.57422
6.8985	Pentane, 2-methyl-	93.9	C <sub>6</sub> D <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub>	3855-82-1	25345559.09
6.9974	D-Limonene	87.1	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	107-83-5	444135.1193
7.0743	Benzyl alcohol	84.7	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	5989-27-5	1055643.608
7.1335	2,3-Butanedione, mono(O- methyloxime)	96.9	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O	100-51-6	15982295.25
7.2548	Pentane, 2,3,3-trimethyl-	81.7	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	617-32-3	87220.19283
7.3199	Hexane, 2,3,4-trimethyl-	88.3	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub>	560-21-4	1139489.537
7.3200	Bicyclo[3.2.1]oct-2-ene, exo-4-(phenylsulfonyl)-	87.4	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub>	921-47-1	1229686.037
7.3785	Pyrazine, tetramethyl-	83.5	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> S	1000142-99-0	1774114.071
7.5960	Hexane, 3-methyl-	93.0	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub>	1124-11-4	2334991.663
7.6961	Phenylethyl Alcohol	82.1	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub>	589-34-4	1462420.875
7.8299	Benzyl 3- hydroxypropanoate	94.1	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O	60-12-8	103944424.9
8.2297	Naphthalene-D <sub>8</sub>	82.8	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	1000090-68-8	2516932.137
8.4037	Hexadecane	96.1	C <sub>10</sub> D <sub>8</sub>	1146-65-2	21776990.9
8.4733	Methyl salicylate	91.6	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub>	544-76-3	2694128.832
8.4984		93.7	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	119-36-8	3638894.407

8.5807	Heptane, 4-azido- Benzene, 1,3-bis(1,1- dimethylethyl)-	83.1	C7H15N3	27126-22-3	126735.4646
8.9182	Acetic acid, 2-phenylethyl ester	83.6	C14H22	1014-60-4	1909330.078
8.9363	Sulfurous acid, 2- ethylhexyl isohexyl ester	97.2	C10H12O2	103-45-7	11828231.97
8.9486	Tetrahydrofurfuryl propionate	86.0	C14H30O3S	1000309-19-0	530711.7842
9.1309	Benzoic acid, (4- benzyloxy-2- chlorophenyl) ester	85.2	C8H14O3	637-65-0	83956.71923
9.9001		92.6	C20H13ClO4	122842-83-5	671143.1341
<i>10.5209</i>	<i>Acenaphthene-d10</i>	<i>91.5</i>	<i>C12D10</i>	<i>15067-26-2</i>	<i>39371360.1</i>
10.5292	Hexadecane	89.9	C16H34	544-76-3	11079819.29
<i>12.3039</i>	<i>Phenanthrene-D10</i>	<i>94.8</i>	<i>C14D10</i>	<i>1517-22-2</i>	<i>60449914.99</i>
20.5298	3-Furaldehyde	86.4	C5H4O2	498-60-2	21680.54642

Legenda – RT: *retention time*; CAS: *Chemical Abstracts Service*; itálico: padrões internos utilizados.

**APÊNDICE 5 – COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR GC-SPME-MS NO TEMPO  
96H DE FERMENTAÇÃO**

RT	Compound Name	Match Factor	Formula	CAS#	Component Area
2.1661	Acetic acid	98.4	C2H4O2	64-19-7	118338900.2
2.4429	2-Pentanone	93.4	C5H10O	107-87-9	1192499.694
2.6497	(R)-(-)-2-Pentanol	82.2	C5H12O	31087-44-2	2233373.279
2.8035	Dimethyl ether	83.7	C2H6O	115-10-6	793267.3423
2.9674	Silanediol, dimethyl-	85.7	C2H8O2Si	1066-42-8	13010243.77
3.3141	1-Pentanol	93.0	C5H12O	71-41-0	24403933.75
3.3794	1-Butanol, 2-methyl-, (S)-	89.1	C5H12O	1565-80-6	12170092.61
3.5980	Cyclobutane, methyl-	83.5	C5H10	598-61-8	1206226.711
3.8436	Propylene Glycol	93.7	C3H8O2	57-55-6	12936792.62
4.2943	2,3-Butanediol, [R-(R*,R*)]-	90.4	C4H10O2	24347-58-8	29584454.58
4.4289	2,3-Butanediol	94.5	C4H10O2	513-85-9	9539296.716
4.9854	Butanal, 2,2-dimethyl-1-Butanol, 3-methyl-, acetate	81.8	C6H12O	2094-75-9	264256.4605
5.4752	Methyl vinyl ketone	91.4	C7H14O2	123-92-2	19716437.85
5.5062	2-Propanone, 1-hydroxy-	86.4	C4H6O	78-94-4	5759576.915
5.5818	1,2-Ethanediamine, N-methyl-	92.3	C3H6O2	116-09-6	3335931.243
5.7461	Ethane, (methylthio)-1-(1'-pyrrolidinyl)-2-	82.1	C3H10N2	109-81-9	1205740.502
5.8207	butanone	81.3	C3H8S	624-89-5	1614135.232
5.8670	Ethyl Acetate	83.1	1000366-	03-8	6020488.969
6.0988	Ethyl Acetate	85.8	C8H15NO	141-78-6	4916045.131
6.1740	Ethyl Acetate	83.6	C4H8O2	141-78-6	3216875.334
6.4085	Phenacylidene diacetate	97.0	C4H8O2	5062-30-6	9743804.54
6.8981	1,4-Dichlorobenzene-D4	93.2	C12H12O5	3855-82-1	30132848.81
7.0733	Cyclobutane, 1,2-bis(1-methylethenyl)-, trans-	88.4	C6D4Cl2	19465-02-2	1612209.632
7.1362	Benzyl alcohol	96.9	C10H16	100-51-6	22104819.61
7.3804	Benzenepropanenitrile, .beta.-hydroxy-	88.5	C7H8O	17190-29-3	1190436.763
7.4374	Benzoyl benzyl disulfide	82.2	C9H9NO	51840-31-4	1301270.72
7.5976	Pyrazine, tetramethyl-	92.6	C14H12OS2	1124-11-4	2056532.498
7.6949	Linalool	88.1	C8H12N2	78-70-6	2526303.724
7.8367	Phenylethyl Alcohol	94.6	C10H18O	60-12-8	243400113.7
7.8947	Sulfide, allyl methyl	82.2	C4H8S	10152-76-8	540362.3596
8.2313	Acetic acid, phenylmethyl ester	84.4	C9H10O2	140-11-4	2442357.641
8.4024	Naphthalene-D8	96.1	C10D8	1146-65-2	23566512.25
8.4737	Oxalic acid, allyl nonyl ester	93.0	1000309-	23-7	1999770.273

8.4960	Methyl salicylate	94.4	C8H8O3	119-36-8	2097318.519
8.9180	Benzene, 1,3-bis(1,1-dimethylethyl)- Acetic acid, 2-phenylethyl ester	84.4	C14H22	1014-60-4	1983803.604
8.9354	3,5-Dimethyl-4-octanone	96.8	C10H12O2	103-45-7	22978087.92
9.0713	Nonane, 3,7-dimethyl-	81.2	C10H20O	7335-17-3	279516.0678
9.2049	Oxalic acid, allyl nonyl ester	83.7	C11H24	17302-32-8	295295.8295
9.8870	Carbonic acid, nonyl vinyl ester	89.2	C14H24O4	1000309-23-7	2090014.033
9.8873	1,2-Ethandiol, monobenzoate	90.4	C12H22O3	1000383-25-6	2132370.57
9.8987		81.4	C9H10O3	94-33-7	1096866.091
<i>10.520</i>	<i>Acenaphthene-d10</i>	<i>91.7</i>	<i>C12D10</i>	<i>15067-26-2</i>	<i>17660982.56</i>
<i>12.313</i>	<i>Phenanthrene-D10</i>	<i>93.3</i>	<i>C14D10</i>	<i>1517-22-2</i>	<i>28150586.22</i>

Legenda – RT: *retention time*; CAS: *Chemical Abstracts Service*; itálico: padrões internos utilizados.

**APÊNDICE 6 – COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR GC-SPME-MS NO TEMPO  
120H DE FERMENTAÇÃO**

RT	Compound Name	Match Factor	Formula	CAS#	Component Area
2.1167	Acetone	85.5	C3H6O	67-64-1	3394487.602
2.1840	Acetic acid	99.2	C2H4O2	64-19-7	62466216.7
2.4323	Acetic acid, (dodecahydro-7-hydroxy-1,4b,8,8-tetramethyl-10-oxo-2(1H)-phenanthrenylidene)-,2-(dimethylamino)ethyl ester	89.9	C24H39NO 4	1000143-97-2	1599864.876
2.4323	2-Pentanone	90.5	C5H10O	107-87-9	2619149.716
2.6407	(R)-(-)-2-Pentanol	80.2	C5H12O	31087-44-2	2085836.007
3.3142	1-Pentanol	94.6	C5H12O	71-41-0	16231295.71
3.3812	Oxalic acid, butyl cyclobutyl ester	95.0	C10H16O4	1000309-69-4	10126102.81
3.6069	Methyl vinyl ketone	85.9	C4H6O	78-94-4	1690663.031
4.0185	Isobutylamine	85.2	C4H11N	78-81-9	910361.2262
4.2985	2,3-Butanediol	92.2	C4H10O2	513-85-9	24463268.57
4.4381	2,3-Butanediol, [S-(R*,R*)]-Isobutyl, 2-	94.2	C4H10O2	19132-06-0	8801385.605
5.0741	hydroxypropanoate	82.7	C7H14O3	585-24-0	55394560.1
5.4686	Butanoic acid, 3-methyl-	83.8	C5H10O2	503-74-2	45925462.89
5.4759	1-Pentene	81.1	C5H10	109-67-1	6695571.492
5.5081	Cyclobutane, methyl-	89.4	C5H10	598-61-8	4560625.346
5.5858	Butanoic acid, 2-methyl-	87.1	C5H10O2	116-53-0	25333263.77
5.6389	Carbonic acid, 2-dimethylaminoethyl ethyl ester	80.4	C7H15NO3	1000331-33-7	846526.3933
6.1768	Ethyl Acetate	83.8	C4H8O2	141-78-6	2498514.473
6.4068	Phenylglyoxal	97.3	C8H6O2	1074-12-0	18852119.17
6.6177	1-Propanol, 3-(methylthio)-	85.3	C4H10OS	505-10-2	1943303.661
6.8979	1,4-Dichlorobenzene-D4	93.5	C6D4Cl2	3855-82-1	29721026.36
7.0333	p-Cymene	81.2	C10H14	99-87-6	482219.6866
7.0716	D-Limonene	90.0	C10H16	5989-27-5	1481637.4
7.1371	Benzyl alcohol	97.2	C7H8O	100-51-6	27082600.55
7.3182	Hexane, 2,3,4-trimethyl-Benzenemethanol, .alpha.-methyl-, (R)-	89.4	C9H20	921-47-1	1155402.953
7.3785	Pyrazine, tetramethyl-	89.8	C8H10O	1517-69-7	3088773.566
7.6003	Linalool	85.1	C8H12N2	1124-11-4	735933.7121
7.6923	Butanoic acid, 2-methyl-, 3-methylbutyl ester	85.3	C10H18O	78-70-6	1987558.869
7.7322	Phenylethyl Alcohol	88.5	C10H20O2	27625-35-0	958755.044
7.8346		94.2	C8H10O	60-12-8	196176101

8.2312	Acetic acid, phenylmethyl ester	82.1	C9H10O2	140-11-4	2628648.846
8.4025	<i>Naphthalene-D8</i>	95.0	<i>C10D8</i>	<i>1146-65-2</i>	<i>24420045.04</i>
8.4638	2-Methoxy-5-methylphenol	82.0	C8H10O2	1195-09-1	2314410.173
8.4638	Benzene, 1,4-dimethoxy-	81.8	C8H10O2	150-78-7	1790645.205
8.4718	Oxalic acid, allyl nonyl ester	91.8	C14H24O4	1000309-23-7	1607751.884
8.4940	Methyl salicylate	93.5	C8H8O3	119-36-8	2567251.412
8.9176	Benzene, 1,3-bis(1,1-dimethylethyl)-	86.4	C14H22	1014-60-4	1960285.499
8.9355	Acetic acid, 2-phenylethyl ester	96.3	C10H12O2	103-45-7	13414957.42
9.8876	Oxalic acid, allyl nonyl ester	90.3	C14H24O4	1000309-23-7	1931247.439
9.8969	1,2-Ethanediol, monobenzoate	89.6	C9H10O3	94-33-7	1107968.192
10.520	<i>Acenaphthene-d10</i>	92.4	<i>C12D10</i>	<i>15067-26-2</i>	<i>21045440.68</i>
11.137	Hexadecane	94.0	C16H34	544-76-3	6831542.134
11.714	1-Octanol, 2-butyl-	92.3	C12H26O	3913-02-8	6294698.67
12.307	<i>Phenanthrene-D10</i>	94.6	<i>C14D10</i>	<i>1517-22-2</i>	<i>27686903.32</i>

Legenda – RT: *retention time*; CAS: *Chemical Abstracts Service*; itálico: padrões internos utilizados.

**APÊNDICE 7 – COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR GC-SPME-MS NO  
TEMPO 144H DE FERMENTAÇÃO**

RT	Compound Name	Match Factor	Formula	CAS#	Component Area
2.1247	Propanal	92.9	C3H6O	123-38-6	2703868.767
2.2475	Hydrazine, (2-methylpropyl)-	80.8	C4H12N2	42504-87-0	1685277.037
2.4394	2-Pentanone	89.3	C5H10O	107-87-9	3010871.801
3.3328	Cyclobutane, methyl-	87.5	C5H10	598-61-8	21972627.98
3.3339	1-Pentene	89.6	C5H10	109-67-1	19692486.02
3.4664	Methane, chloromethoxy-	83.6	C2H5ClO	107-30-2	73756371.13
3.4664	Butane, 1-methoxy-	81.2	C5H12O	628-28-4	73923930.46
3.7036	Acetic acid	95.8	C2H4O2	64-19-7	60486364.67
3.7457	Methyl formate	94.5	C2H4O2	107-31-3	16668189.61
4.0906	2-Butanol, 3-methyl-	90.7	C5H12O	598-75-4	25596022.86
4.2918	2-Ethylhexanal ethylene glycol acetal	82.5	C10H20O2	1000431-01-2	4500497.901
4.2918	3-Pentanol, 2,4-dimethyl-	85.1	C7H16O	600-36-2	4659365.276
4.4840	Butanal, 3-methyl	96.9	C5H10O	590-86-3	677340.8937
4.8599	2,3-Butanediol, [S-(R*,R*)]-	89.7	C4H10O2	19132-06-0	33110539.49
4.8642	4-Methyl-2,4-bis(p-hydroxyphenyl)pent-1-ene, 2TMS derivative	87.7	C24H36O2Si2	1000283-56-8	2628114.68
4.9471	2,3-Butanediol, [S-(R*,R*)]-	96.1	C4H10O2	19132-06-0	7064035.425
5.2687	Oxalic acid, butyl cyclobutyl ester	89.7	C10H16O4	1000309-69-4	3123043.577
5.4815	1-Butanol, 3-methyl-, acetate	81.8	C7H14O2	123-92-2	8375151.755
5.4815	2-Pentanol, acetate	81.0	C7H14O2	626-38-0	8407581.471
5.5124	Methyl vinyl ketone	86.0	C4H6O	78-94-4	2417044.859
5.5516	Methanamine, N-methoxy-N-nitroso-	94.1	C2H6N2O2	16339-12-1	10033629.19
5.6420	2-Heptanone	86.2	C7H14O	110-43-0	1446454.444
5.6572	Acetonitrile, trifluoro-	81.9	C2F3N	353-85-5	802406.1196
5.6665	1-Propanol, 2-methyl-	86.4	C4H10O	78-83-1	43539425.03
6.4062	Phenylglyoxal	96.8	C8H6O2	1074-12-0	42010506.41
6.8546	Butanoic acid, 3-oxo-, 1,1-dimethylethyl ester	83.1	C8H14O3	1694-31-1	369429.2001
6.8981	1,4-Dichlorobenzene-D4	93.6	C6D4Cl2	3855-82-1	30182092.67
6.9163	Propanoic acid, 2-methyl-, 3-methylbutyl ester	81.5	C9H18O2	2050-01-03	1015784.98
7.1535	Benzyl alcohol	97.6	C7H8O	100-51-6	25562861.8
7.1940	1,2-Ethanediol, 1,2-diphenyl-, (R*,R*)-(./-./-)-	88.8	C14H14O2	655-48-1	11103449.74
7.3174	Octane, 4-methyl-	83.0	C9H20	2216-34-4	1047112.534

7.3176	Hexane, 2,3,4-trimethyl- Ethanone, 2-hydroxy-1- phenyl-	87.1	C9H20	921-47-1	1049173.75
7.4306	Vinyl benzoate	93.7	C8H8O2	582-24-1	1458893.572
7.4307	2-Nonanone	89.4	C9H18O	769-78-8	1718709.04
7.6248	Pyrazine, tetramethyl- 3,3-Dimethyl-1,2- epoxybutane	81.2	C8H12N2	821-55-6	1869825.423
7.6328	Phenylethyl Alcohol	86.1	C6H12O	1124-11-4	2125672.634
7.7298	Phenol, 2-methyl-	81.0	C8H10O	2245-30-9	828947.8563
7.8635	<i>Naphthalene-D8</i>	94.0	C7H8O	60-12-8	198505258.1
8.2306	7-Chloro-1-(4- fluorophenyl)heptan-1-one	80.8	C10D8	95-48-7	2046807.597
8.4031	Benzene, 1,4-dimethoxy- Oxalic acid, allyl nonyl ester	94.9	C13H16ClFO	1146-65-2	27052795.27
8.4665	Octane, 2,2,6-trimethyl-	81.6	C8H10O2	17135-47-6	1133224.578
8.4670	Methyl salicylate	87.6	C14H24O4	150-78-7	1740014.641
8.4731	Benzene, 1,3-bis(1,1- dimethylethyl)- Acetic acid, 2-phenylethyl ester	89.4	C11H24	1000309- 23-7	2680469.994
8.4736	Sulfoxide, methyl phenethyl	80.6	C8H8O3	62016-28-8	1579954.526
8.4938	1,2-Ethandiol, monobenzoate	93.4	C14H22	119-36-8	2715060.969
8.9186	<i>Acenaphthene-d10</i>	84.9	C10H12O2	1014-60-4	2341017.165
8.9355	Decane, 2,4-dimethyl-	96.7	C9H12OS	103-45-7	17677159.45
9.6050	1-Octanol, 2-butyl-	82.3	C9H10O3	7714-32-1	3008011.484
9.8991	Hexadecane	93.9	C12D10	94-33-7	957245.5132
10.519	Oxalic acid, allyl hexadecyl ester	90.6	C12H26	15067-26-2	16077240.11
10.528	Oxalic acid, allyl nonyl ester	86.4	C12H26O	2801-84-5	1640976.45
11.136	Hexadecane	91.1	C12H26O	3913-02-8	2514801.83
11.714	Oxalic acid, allyl hexadecyl ester	86.5	C16H34	544-76-3	1996603.301
11.714	Oxalic acid, allyl nonyl ester	86.7	C21H38O4	1000309- 24-4	2373319.358
12.273	<i>Phenanthrene-D10</i>	87.9	C14H24O4	1000309- 23-7	815665.7927
12.306		94.4	C14D10	1517-22-2	15347772.48

Legenda – RT: *retention time*; CAS: *Chemical Abstracts Service*; itálico: padrões internos utilizados.

**APÊNDICE 8 – COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR GC-SPME-MS NOS PÓS  
DE CACAU SECOS**

RT	Compound Name	Match Factor	Formula	CAS#	Component Area
2.6282	(R)-(-)-2-Pentanol	89.33	C5H12O	31087-44-2	561627.4345
2.7591	Propane, 2-ethoxy-	83.34	C5H12O	625-54-7	6458921.329
2.8517	Acetamide, 2-fluoro-	80.39	C2H4FNO	640-19-7	10396447.26
3.3151	1-Butanol, 3-methyl-	84.89	C5H12O	123-51-3	2098731.462
3.6736	Methane-d, trichloro-	81.48	CDCl3	865-49-6	1435477.584
4.2349	2,3-Butanediol	90.27	C4H10O2	513-85-9	110604839.4
4.3731	1-Butanamine	87.92	C4H11N	109-73-9	10159316.04
4.4170	2,3-Butanediol	95.37	C4H10O2	513-85-9	70635579.76
5.2500	3-Pentanol, 2,4-dimethyl-	85.66	C7H16O	600-36-2	3168722.453
5.4568	Diisopropyl ether	81.34	C6H14O	108-20-3	10037677.41
5.4623	Methyl formate	89.66	C2H4O2	107-31-3	31593745.55
5.4806	Cyclobutane, methyl-	84.10	C5H10	598-61-8	2247098.095
5.5783	Propanediamide, 2-amino-	87.31	C3H7N3O2	62009-47-6	16515019.2
5.5983	Butanoic acid, 2-methyl-	86.73	C5H10O2	116-53-0	32720520.98
5.9659	Pyrazine, 2,3-dimethyl-	94.04	C6H8N2	5910-89-4	3299420.614
6.0882	CH3C(O)CH2CH2OH	82.59	C4H8O2	590-90-9	6007832.441
6.1604	Ethyl Acetate	81.91	C4H8O2	141-78-6	5827831.502
6.3705	Acetic acid, diethyl-	80.68	C6H12O2	88-09-5	7815020.307
6.4061	Phenylglyoxal	97.29	C8H6O2	1074-12-0	12902314.37
6.8255	Pyrazine, trimethyl-	94.67	C7H10N2	14667-55-1	11420472.64
6.8974	<i>1,4-Dichlorobenzene-D4</i>	93.61	<i>C6D4Cl2</i>	<i>3855-82-1</i>	<i>29379872.37</i>
6.9945	Hexane, 2,3-dimethyl-	82.13	C8H18	584-94-1	410588.0536
6.9947	Pentane, 2-methyl- E,Z-3-	82.22	C6H14	107-83-5	462589.8707
7.1429	Ethylidenecyclohexene Cyclopentene, 3-	85.02	C8H12	16631-62-2	4102090.883
7.1434	ethylidene-1-methyl-	84.97	C8H12	62338-00-5	4219589.087
7.2238	Spiro[2,4]hepta-4,6-diene	95.11	C7H8	765-46-8	8081993.429
7.3182	Decane, 2,5,6-trimethyl-	87.69	C13H28	62108-23-0	2574781.41
7.3192	Hexane, 3,3-dimethyl-	90.83	C8H18	563-16-6	2297136.307
7.3823	Ethanone, 1-(1H-pyrrol-2- yl)-	80.89	C6H7NO	1072-83-9	2764439.416
7.4291	Phenacylidene diacetate	95.44	C12H12O5	5062-30-6	7408997.881
7.5921	Pyrazine, tetramethyl-	96.53	C8H12N2	1124-11-4	286877320.3
7.6296	Phenol, 2-methoxy-	81.04	C7H8O2	90-05-1	754159.3463
7.8332	Phenylethyl Alcohol	93.06	C8H10O	60-12-8	28378765.64
8.1985	2,3,5-Trimethyl-6- ethylpyrazine	89.60	C9H14N2	17398-16-2	2714992.756
8.3420	Benzeneacetic acid, methyl ester	87.63	C9H10O2	101-41-7	664952.6118

8.4032	<i>Naphthalene-D8</i>	94.15	<i>C10D8</i>	1146-65-2	27883102.04
8.4633	2-Methoxy-5-methylphenol	80.84	C8H10O2	1195-09-1	1319817.85
8.4730	Oxalic acid, allyl nonyl ester	89.49	C14H24O4	1000309-23-7	2630760.345
8.4936	Methyl salicylate	97.25	C8H8O3	119-36-8	7609072.434
8.8460	Benzeneacetic acid, ethyl ester	83.34	C10H12O2	101-97-3	1227019.116
8.9181	Benzene, 1,3-bis(1,1-dimethylethyl)-	89.61	C14H22	1014-60-4	4226872.863
9.8870	Carbonic acid, nonyl vinyl ester	87.75	C12H22O3	1000383-25-6	1464167.39
9.8972	1,2-Ethanediol, monobenzoate	93.26	C9H10O3	94-33-7	1496557.401
10.520	<i>Acenaphthene-d10</i>	90.95	<i>C12D10</i>	15067-26-2	16888804.41
11.139	Heptane, 3,3-dimethyl-	89.15	C9H20	4032-86-4	404813.6839
11.720	Oxalic acid, allyl nonyl ester	89.84	C14H24O4	1000309-23-7	984530.785
12.266	Sulfurous acid, 2-ethylhexyl isohexyl ester	89.45	C14H30O3S	1000309-19-0	821266.1838
12.313	<i>Phenanthrene-D10</i>	89.55	<i>C14D10</i>	1517-22-2	22388540.13
12.787	Azetidine, 1,2-dimethyl-	88.20	C5H11N	51764-32-0	376375.5689

Legenda – RT: *retention time*; CAS: *Chemical Abstracts Service*; itálico: padrões internos utilizados.