



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

MANUELA BARRETO DO NASCIMENTO

**MEL DE CACAU (*Theobroma cacao* L.) DE DIFERENTES
VARIEDADES: COMPOSIÇÃO QUÍMICA, PROPRIEDADES
SENSORIAIS E MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO**

UFBA

SALVADOR

2024



MANUELA BARRETO DO NASCIMENTO

**MEL DE CACAU (*Theobroma cacao* L.) DE DIFERENTES
VARIEDADES: COMPOSIÇÃO QUÍMICA, PROPRIEDADES
SENSORIAIS E MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciência de Alimentos (PGAli) da Universidade
Federal da Bahia, como requisito parcial para a
obtenção do título de Doutora em Ciência de
Alimentos.

Prof. Dr. Sérgio Eduardo Soares

Orientador

Prof. Dr. Paulo Roberto Ribeiro de Mesquita

Coorientador

SALVADOR

2024

Dados internacionais de catalogação-na-publicação
(SIBI/UFBA/Biblioteca Universitária Reitor Macedo Costa)

Nascimento, Manuela Barreto do.

Mel de cacau (*Theobroma cacao* L.) de diferentes variedades: composição química, propriedades sensoriais e métodos de conservação / Manuela Barreto do Nascimento. - 2024.
285 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Eduardo Soares.

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Ribeiro de Mesquita.

Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Salvador, 2024.

1. Cacau. 2. Cacau - Análise. 3. Cacau - Composição. 4. Cacau - Avaliação sensorial. 5. Cacau - Conservação. I. Soares, Sérgio Eduardo. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD - 633.74

CDU - 633.74

MANUELA BARRETO DO NASCIMENTO

**MEL DE CACAU (*Theobroma cacao* L.) DE DIFERENTES
VARIEDADES: COMPOSIÇÃO QUÍMICA, PROPRIEDADES
SENSORIAIS E MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Ciência de Alimentos.

Aprovada em 11 de dezembro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente



SERGIO EDUARDO SOARES
Data: 09/01/2025 00:32:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. SÉRGIO EDUARDO SOARES (ORIENTADOR)
Universidade Federal da Bahia (UFBA, BA)

Documento assinado digitalmente



GLAUCIA MARIA PASTORE
Data: 03/02/2025 19:26:11-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr^a. GLÁUCIA MARIA PASTORE (EXAMINADORA)
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP, SP)

Documento assinado digitalmente



MADSON MOREIRA NASCIMENTO
Data: 10/01/2025 07:35:04-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. MADSON MOREIRA NASCIMENTO (EXAMINADOR)
Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial (SENAI/CIMATEC, BA)

Documento assinado digitalmente



MARIA EUGENIA DE OLIVEIRA MAMEDE
Data: 09/01/2025 10:26:58-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr^a. MARIA EUGÊNIA DE OLIVEIRA MAMEDE (EXAMINADORA)
Universidade Federal da Bahia (UFBA, BA)

Documento assinado digitalmente



PRISCILA EFRAIM
Data: 04/02/2025 07:36:58-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr^a. PRISCILA EFRAIM (EXAMINADORA)
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP, SP)

Dedico este trabalho,

*Aos meus pais, Manoel Carlos e Maria Aparecida, por todo
o amor e incentivo durante anos de estudo.*

Meus agradecimentos,

Agradeço a Deus por ser minha fortaleza e me guiar ao longo de toda essa jornada. Que eu possa sempre reconhecer e honrar todas as conquistas obtidas.

Aos meus pais, Manoel Carlos e Maria Aparecida, por todo o amor, orações e por sempre me incentivarem a estudar. Seus sacrifícios foram fundamentais para que eu pudesse chegar até aqui, obrigada por sempre me ensinarem o valor da dedicação e do trabalho árduo. Sem dúvidas, o principal objetivo desse trabalho foi orgulhar VOCÊS!

À minha irmã, Mayana Barreto, agradeço por todo carinho, cuidado e torcida ao longo desses anos.

Ao meu orientador, Professor Sérgio, por ter acreditado em mim desde o início, pela confiança depositada, amizade e pelas inúmeras contribuições. Obrigada por tudo!

À Paulo Mesquita, meu coorientador e coordenador do Cetab, nunca terei palavras suficientes para agradecer, pois sem você este trabalho não teria sido o mesmo. Obrigada por ter acreditado mais em mim do que eu mesma. Seu amor pela ciência é inspirador e sou sua maior fã!

Ao professor Frederico Medeiros, meu principal incentivador a fazer o doutorado, agradeço por ter aberto as portas do Cetab para mim, por todos os conselhos e incentivos diários.

À toda a minha família, pelo apoio ao longo de toda a minha trajetória acadêmica, pela preocupação e pelo incentivo incondicional. Em especial, agradeço a Monique Leal, Eliana Andrade, Fabiane Andrade e Nei Fábio Andrade.

Às minhas estrelinhas “Shalshi” e Tia Fati por serem meus exemplos de força e determinação, carregarei vocês para sempre em mim.

A todos os professores e servidores do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos (PGAli) pelos ensinamentos, amizade, contribuições e apoio.

Aos laboratórios da Universidade Federal da Bahia, especialmente o Laboratório de Pesquisa e Análise de Alimentos e Contaminantes (LAPAAC), Laboratório de Tecnologia de Cacau e Chocolate, Laboratório de Bromatologia e Laboratórios Multiusuários.

Aos alunos de Iniciação Científica, Marcos, Livia e Suzana que foram fundamentais para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos amigos que fiz na Universidade Federal da Bahia, expresso um agradecimento especial a Maria Dutra, Elaine Janaína, Joselene Nascimento, Tamires Ramos, Joelaine Santana, Vitor Rocha, Leonardo Maciel e Jaff Ribeiro. Sou muito grata por compartilharem comigo os momentos de alegrias e os de dificuldades, e por todo o apoio que sempre me ofereceram.

A toda equipe do Centro Tecnológico Agropecuário do Estado da Bahia (Cetab), aos Laboratórios de Resíduos e Contaminantes, Alimentos e Fitopatologia por todo o suporte e investimento nesta pesquisa, minha eterna gratidão! Agradeço também aos amigos e colegas de trabalho por toda ajuda e disponibilidade; esta tese é fruto da contribuição de cada um de vocês! Um agradecimento especial à Lorena Peixoto, Jossimara Neiva e Alvanice Ribeiro, que me acolheram desde o início da minha pesquisa.

À Thaís Luz por toda ajuda nas análises de minerais e inúmeros conselhos.

À Katlheen Ramos por todo o suporte no desenvolvimento das análises microbiológicas e por tanto carinho.

À professora Lígia Randomille por toda a disponibilidade e apoio nas análises sensoriais.

À Adriana Reis pelas contribuições e parceria.

Aos produtores Manoel Carlos Andrade e Juscelino Macedo pelo fornecimento dos frutos do cacau.

A banca avaliadora por ter aceitado o convite. A presença de vocês neste momento tão significativo para mim é uma honra.

À Coordenação Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida (nº do processo: 88887.504355/2020-00).

Ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação do Brasil - MCTI (nº do processo 904399/2020) pelo financiamento.

À Secretaria de Agricultura, Pecuária, Irrigação, Pesca e Aquicultura do Governo do Estado da Bahia (SEAGRI).

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para que eu concluísse mais este ciclo na minha trajetória acadêmica, meu sincero agradecimento. Todas essas páginas foram escritas com muito amor e dedicação.

"Desistir... eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério; é que tem mais chão nos meus olhos do que o cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça".

Cora Carolina

RESUMO

O mel de cacau é um líquido mucilaginoso amarelo opaco, obtido da prensagem ou decantação da polpa de cacau fresca antes da fermentação. No entanto, sua vida de prateleira é muito curta, visto que o alto teor de açúcares o torna muito suscetível à fermentação, dificultando a sua comercialização. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a composição química, propriedades sensoriais e métodos de conservação do mel de cacau de diferentes variedades de cacau (CCN51, PS1319, SJ02 e Parazinho). O perfil mineral foi analisado por espectrometria de emissão óptica por plasma induzido por micro-ondas (MIP OES). Os compostos orgânicos voláteis (COVs) foram determinados através da técnica de microextração em fase sólida por *headspace* associada a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (HS-SPME/CG-EM). Os atributos sensoriais foram avaliados por análise descritiva por ordenação (ADO) e análise afetiva. O perfil químico foi determinado por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-HRMS/MS) e a quantificação dos compostos bioativos por UHPLC-MS/MS. Os métodos de conservação testados, pasteurização térmica, pasteurização térmica com aditivo e ultrassom de alta intensidade, foram avaliados ao longo de 28 dias de armazenamento. O mel de cacau foi caracterizado como um produto ácido com altas quantidades de sólidos solúveis (11,97-17,32), açúcares totais (11,62-16,03 g/100g) e valor energético (113,58-120,53). A presença de magnésio (132,08–198,16 mg Kg⁻¹), altas quantidades de zinco (3,01–18,76 mg Kg⁻¹) e baixas quantidades de sódio (44,56–94,57 mg Kg⁻¹), fornecem razões significativas para incentivar o aumento do consumo de mel de cacau como uma fonte nutritiva. Um total de 84 COVs foram identificados, com a variedade de cacau influenciando significativamente em suas concentrações e perfis sensoriais. As variedades CCN51, PS1319 e SJ02 apresentaram a maior diversidade de COVs e atributos sensoriais. SJ02 e CCN51 mostraram maior aceitabilidade e intenção de compra, com médias de 7,21 e 7,08 e 3,71 e 3,56, respectivamente. Esses resultados indicam seu potencial como fontes promissoras de mel de cacau para a indústria alimentícia. Através da análise do perfil químico foram identificados 72 compostos com a predominância de flavonóides, alcalóides, ácidos fenólicos, aminoácidos e aminas bioativas. A variedade parazinho se destacou pelas altas concentrações de catequina (7,340 mg kg⁻¹) e teobromina (2,200 mg kg⁻¹). Ao se avaliar o tempo de conservação do mel de cacau foram identificados 119 COVs, com acetato de 2-heptil e ácido palmítico em maiores teores, sendo os ésteres a classe predominante. Todos os métodos inativaram o crescimento de microrganismos ao longo de 28 dias. Os resultados mostram que as tecnologias de pasteurização com aditivo e ultrassom são eficazes para aumentar a vida útil do mel de cacau, com o ultrassom se destacando por exigir menos tempo e não utilizar aditivos, superando os métodos térmicos analisados. Esta pesquisa trouxe dados inéditos sobre as propriedades nutricionais e sensoriais do mel de cacau, ampliando o conhecimento sobre possíveis utilizações. Este estudo se mostrou pioneiro, pois avaliou diferentes variedades de mel de cacau e suas potencialidades e aplicabilidades tecnológicas com possibilidades de expandir sua comercialização dentro e fora do Brasil.

Palavras-chave: Polpa de cacau. Minerais. Compostos voláteis. Análise sensorial descritiva. Compostos bioativos.

ABSTRACT

Cocoa honey is an opaque, yellow, mucilaginous liquid obtained by pressing or decanting fresh cocoa pulp before fermentation. However, its shelf life is very short, as its high sugar content makes it highly susceptible to fermentation, hindering its commercialization. Therefore, this study aimed to evaluate the chemical composition, sensory properties, and preservation methods of cocoa honey from different cocoa varieties (CCN51, PS1319, SJ02, and Parazinho). The mineral profile was analyzed using microwave-induced plasma optical emission spectrometry (MIP OES). Volatile organic compounds (VOCs) were determined by headspace solid-phase microextraction combined with gas chromatography coupled with mass spectrometry (HS-SPME/GC-MS). Sensory attributes were assessed using descriptive ordering analysis (RDA) and affective analysis. The chemical profile was determined using ultra-performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry (UHPLC-HRMS/MS), while the quantification of bioactive compounds was performed using UHPLC-MS/MS. The tested preservation methods—thermal pasteurization, thermal pasteurization with additives, and high-intensity ultrasound—were evaluated over 28 days of storage. Cocoa honey was characterized as an acidic product with high levels of soluble solids (11.97–17.32), total sugars (11.62–16.03 g 100g⁻¹), and energy value (113.58–120.53 kcal 100g⁻¹). The presence of magnesium (132.08–198.16 mg kg⁻¹), high levels of zinc (3.01–18.76 mg kg⁻¹), and low levels of sodium (44.56–94.57 mg kg⁻¹) provide strong reasons to encourage increased consumption of cocoa honey as a nutritional source. A total of 84 VOCs were identified, with cocoa variety significantly influencing their concentrations and sensory profiles. The CCN51, PS1319, and SJ02 varieties exhibited the greatest diversity of VOCs and sensory attributes. SJ02 and CCN51 demonstrated higher acceptability and purchase intention, with mean scores of 7.21 and 7.08 for acceptability, and 3.71 and 3.56 for purchase intention, respectively. These results indicate their potential as promising sources of cocoa honey for the food industry. Through chemical profile analysis, 72 compounds were identified, predominantly flavonoids, alkaloids, phenolic acids, amino acids, and bioactive amines. The Parazinho variety stood out for its high concentrations of catechin (7.340 mg kg⁻¹) and theobromine (2.200 mg kg⁻¹). When assessing the shelf life of cocoa honey, 119 VOCs were identified, with 2-heptyl acetate and palmitic acid being the most abundant, while esters were the predominant class. All preservation methods successfully inhibited microbial growth over the 28-day period. The findings show that pasteurization technologies with additives and ultrasound effectively extend the shelf life of cocoa honey, with ultrasound emerging as the most advantageous method due to its shorter processing time and lack of additives, outperforming the thermal methods analyzed. This research provides unprecedented data on the nutritional and sensory properties of cocoa honey, expanding knowledge about its potential applications. This pioneering study evaluated different cocoa honey varieties and their technological feasibility, highlighting opportunities for expanding commercialization both within Brazil and internationally.

Keywords: *Cocoa pulp. Minerals. Volatile compounds. Descriptive sensory analysis. Bioactive compounds.*

LISTA DE FIGURAS

<i>TESE - Mel de cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.) de diferentes variedades: composição química, propriedades sensoriais e métodos de conservação.....</i>	22
Figura 1 Árvore e frutos do cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	26
Figura 2 Valor da produção de cacau no Brasil em reais (R\$)	28
Figura 3 Variedades de cacau CCN51, PS1319, SJ02 e Parazinho	30
Figura 4 Subprodutos da cadeia produtiva do cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.)	32
Figura 5 Mel de cacau	35
Figura 6 Sistema de Espectrometria de Emissão Óptica de Plasma Induzido por Micro-Ondas (MIP OES)	37
Figura 7 Procedimento HS-SPME para a extração e dessorção de analitos no injetor de um cromatógrafo a gás	40
Figura 8 Mecanismo de ação do Ultrassom em meio líquido	50
 <i>MANUSCRITO: Potencial funcional e tecnológico de subprodutos da cadeia produtiva do cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.).....</i>	 51
Figura 1 Ciclo de crescimento da planta do cacau, processamento do cacau para fabricação de chocolate, formação de subprodutos do cacau e suas propriedades físico-químicas.....	53
Figura 2 Aplicações de subprodutos do cacau em diferentes setores, incluindo alimentos, cosméticos, ração animal e biotecnologia.....	59
Figura 3 Distribuição global de subprodutos do cacau e tendências de patentes.....	70
 <i>ARTIGO: Determination of mineral profile using MIP OES and physicochemical composition of cocoa honey from different cocoa varieties (<i>Theobroma cacao</i> L.).....</i>	 81
Figure 1 PCA (score plot) in 3D relating the mineral profile of different varieties of cocoa honey (A); Biplot relating the minerals analyzed and the different varieties of cocoa honey (B); Box-plot relating the compounds with the highest concentrations among the cocoa honey varieties (C).....	99

ARTIGO: Optimization of HS-SPME/GC-MS method for determining volatile organic compounds and sensory profile in cocoa honey from different cocoa varieties (*Theobroma cacao* L.) 108

Figure 1	Influence of the type of HS-SPME fiber coating on the extraction efficiency of VOCs cocoa honey samples considering total peak area (A) and number of detected peaks (B). Pareto chart of standardized effects of the 2 ⁴ factorial design for total chromatographic peak area (C). Response surface obtained by central composite using the quadratic model in the optimization of conditions (temperature T, °C, time t, min, and stirring speed, rpm) for extraction of the volatiles cocoa honey by HS-SPME	113
Figure 2	Principal component analysis (PCA) of the volatile components found in different varieties of cocoa honey (A). Average of 9 replicates per treatment. Numbers in red correspond to the VOC's listed in Table 1. Hierarchical cluster analysis dendrogram associated with the heat map of the VOC profiles of the four cocoa honey varieties (B). The color scale represents the variation in the relative concentration of VOCs in the samples, from low (blue) to high (red)	125
Figure 3	Principal component analysis (PCA) relating sensory attributes and cocoa honey varieties (A). PCA relating VOC classes, aroma sensory attributes, and cocoa honey varieties (B). A. Acid = aroma acid; A. Sweetened = aroma sweetened; A. Cocoa/Cocoa Pulp = aroma cocoa/cocoa pulp; A. Fruity = aroma fruity; A. Refreshing = aroma minty/refreshing; A. Floral = aroma floral; Sour t = sour taste; Sweet t = sweet taste; Cocoa = cocoa/cocoa pulp.....	128

MANUSCRITO: Perfil químico de mel de cacau (*Theobroma cacao* L.) de diferentes variedades por UHPLC-HRMS/MS e análise quimiométrica..... 144

Figura 1	Variedades de cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.)	147
Figura 2	Dendrograma da análise hierárquica de agrupamento (HCA) combinado com um mapa de calor dos compostos encontrados no mel de cacau de diferentes variedades, obtido por UHPLC-HRMS/MS.....	161

Figura 3	Gráfico de violino com box-whisker para a avaliação de diferentes variedades de mel de cacau.....	167
----------	---	-----

ARTIGO: Multivariate analysis to evaluate the storage time of cocoa honey (<i>Theobroma cacao</i> L.) processed by Pasteurization and High Intensity Ultrasound.....	178
---	------------

Figure 1	Boxplot of nonparametric measures for analysis of molds and yeasts (A) and mesophilic aerobic bacteria (B) in cocoa honey samples after conservation methods. Control (C); Pasteurization (P); Pasteurization with additive (PA); Ultrasound (US).....	196
----------	--	-----

Figure 2	Total relative composition of the main classes of VOCs identified in different conservation methods and storage periods. Control (A); Ultrasound (B); Pasteurization (C); Pasteurization with additive (D).....	199
----------	---	-----

Figure 3	Principal component analysis (PCA) of the main classes of VOCs in different conservation methods and storage periods. C = Control; US = Ultrasound; P = Pasteurization; PA = Pasteurization with additive.....	201
----------	--	-----

Figure 4	Hierarchical cluster analysis dendrogram associated with the heat map of the main VOC classes across different preservation methods and storage periods. The color scale represents the variation in the relative concentration of VOCs in the samples, ranging from low (blue) to high (red).....	202
----------	--	-----

FiguraS1	Principal component analysis (PCA) of physicochemical and colorimetric data across different conservation methods and storage periods. C = Control; US = Ultrasound; P = Pasteurization; PA = Pasteurization with additive.....	214
----------	---	-----

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO: Potencial funcional e tecnológico de subprodutos da cadeia produtiva do cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.).....		51
Table1	Compostos bioativos encontrados em subprodutos da cadeia produtiva do cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	58
Table 2	Perfil mineral de diferentes subprodutos do cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	62
Table 3	Patentes que utilizam subprodutos da cadeia produtiva do cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	68
 ARTIGO: Determination of mineral profile using MIP OES and physicochemical composition of cocoa honey from different cocoa varieties (<i>Theobroma cacao</i> L.).....		81
Table 1	Yield, physicochemical and microbiological analyses of cocoa honey from diferente cocoa varieties (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	90
Table 2	Colorimetric analysis of cocoa honey from diferente cocoa varieties (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	92
Table 3	Calibration curve, correlation coefficient (R^2), precision, LOD, and LOQ (in mg Kg^{-1}), for the elements determined by MIP OES in cocoa honey samples from different cocoa varieties (<i>Theobroma cacao</i> L.)	94
Table 4	Recovery percentages for the three mineral concentration levels determined by MIP OES (Mean $\pm$ SD, n = 3)	94
Table 5	Composition of mineral elements (mg Kg^{-1} , mean $\pm$ SD) of cocoa honey from diferente cocoa varieties (<i>Theobroma cacao</i> L.)	96
Table 6	RDI of macro and microelements for adults and their quantity in each variety of cocoa honey, considering the intake of 200 mL	100
 ARTIGO: Optimization of HS-SPME/GC-MS method for determining volatile organic compounds and sensory profile in cocoa honey from different cocoa varieties (<i>Theobroma cacao</i> L.)		108
Table 1	Mean relative composition (%) of VOCs identified in cocoa honey from different cocoa varieties (<i>Theobroma cacao</i> L.)	117

Table 2	Sum of orders (order totals) of sensory attributes for each variety of cocoa honey	126
Table 3	Acceptance test and purchase intention averages for different varieties of cocoa honey	129
Table S1	Variables levels employed for screening of 2 ⁴ full factorial optimization of HS-SPME method of cocoa honey	141
Table S2	Variables levels employed for central composite design from optimization of HS-SPME method of cocoa honey	141
Table S3	Experiments carried out to confirm HS-SPME optimal conditions estimated by response surface methodology at extrapolation conditions (n=3)	142
Table S4	Descriptive terms and reference materials	142

MANUSCRITO: Perfil químico de mel de cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.) de diferentes variedades por UHPLC-HRMS/MS e análise quimiométrica.....			144
Tabela 1	Análise UHPLC-HRMS/MS para a composição química do mel de cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.).....		151
Tabela 2	Concentração de compostos bioativos (média ± desvio padrão, mg kg ⁻¹) em diferentes variedades de mel de cacau.....		166
TabelaS1	Os parâmetros instrumentais dos compostos-alvo selecionados em mel de cacau por UHPLC-MS/MS.....		177
TabelaS2	Parâmetros de validação do procedimento analítico.....		177
TabelaS3	Recuperações relativas (média ± RSD) para os analitos alvo. As amostras de mel de cacau foram enriquecidas em 100, 400 e 600 ng mL ⁻¹		177

ARTIGO: Multivariate Analysis to evaluate the storage time of cocoa honey (<i>Theobroma cacao</i> L.) processed by Pasteurization and High Intensity Ultrasound.....			178
Table 1	Physicochemical characterization of cocoa honey (<i>Theobroma cacao</i> L.) after conservation methods and different storage periods.....		190
Table 2	Colorimetric analysis of cocoa honey in different conservation methods and storage periods.....		193

Table 3	Medians and interquartile range of colony counts of aerobic mesophilic bacteria and molds and yeasts in cocoa honey (<i>Theobroma cacao</i> L.), under different conservation methods and storage periods.....	195
Table 1S	Mean relative composition (%) of VOC's identified in cocoa honey of the CCN51 cocoa variety (<i>Theobroma cacao</i> L.) by HS-SPME-GC-MS (n=3).....	215

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	<i>Amino Acid</i>
AAS	Espectrofotometria de Absorção Atômica
ADO	Análise Descritiva por Ordenação
ADQ	Análise Descritiva Quantitativa
AIPC	Associação Nacional das Indústrias Processadoras de Cacau do Brasil
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BGB	<i>Brilliant Green Bile Broth</i>
CAR/PDMS	<i>Carboxeno/Polidimetilsiloxano</i>
CEPLAC	Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira
CFU	<i>Colony-Forming Unit</i>
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COVs	Compostos Orgânicos Voláteis
DVB/CAR/PDMS	<i>Polidimetilsiloxano/Carboxeno/Divinilbenzeno</i>
EAA	<i>Essential Amino Acid</i>
EFSA	Autoridade Europeia de Segurança Alimentar
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GHz	Gigahertz
HCA	<i>Hierarchical Cluster Analysis</i>
HS-SPME	Microextração em Fase Sólida por <i>Headspace</i>
HRMS	Espectrometria de Massas de Alta Resolução
IAL	Instituto Adolf Lutz
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICCO	<i>International Cocoa Organization</i>
ICP-MS	Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado
ICP OES	Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Indutivamente Acoplado
IDR	Ingestão Diária Recomendada
IQR	<i>Interquartile Range</i>
kHz	Kilohertz

LC-MS	<i>Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry</i>
LOD	<i>Limit of Detection</i>
LOQ	<i>Limit of Quantification</i>
MIP OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Induzido por Micro-ondas
NEAA	Non-Essential Amino Acid
PA	<i>Poliacrilato</i>
PEG	Polietilenoglicol
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>
PDMS/DVB	<i>Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno</i>
QDA	<i>Quantitative Descriptive Analysis</i>
Q-TOF	<i>Quadrupole Time-of-Flight</i>
RDA	<i>Ranking Descriptive Analysis</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RDI	<i>Recommended Daily Intake</i>
RV	<i>Rappaport–Vassiliadis</i>
TSS	<i>Total Soluble Solids</i>
UHPLC	<i>Ultra-Performance Liquid Chromatography</i>
UHT	<i>Ultra-High Temperature</i>
US	Ultrassom
VOC	<i>Volatile Organic Compound</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
XLD	<i>Xylose Lysine Decarboxylase</i>

SUMÁRIO

TESE - Mel de cacau (*Theobroma cacao* L.) de diferentes variedades: composição química, propriedades sensoriais e métodos de conservação

1 INTRODUÇÃO	22
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo geral	25
2.2 Objetivos específicos	25
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	26
3.1 Histórico do cacau	26
3.2 Produção de cacau	27
3.3 Variedades de cacau	29
3.4 Subprodutos do cacau	31
3.4 Mel de cacau	34
3.5 Composição mineral	36
3.6 Compostos voláteis.....	38
3.7 Compostos bioativos	41
3.8 Análise sensorial	43
3.9 Métodos de conservação.....	46
4 RESULTADOS	51
4.1 Manuscrito: Potencial funcional e tecnológico de subprodutos da cadeia produtiva do cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.)	51
4.2 Artigo: Determination of mineral profile using MIP OES and physicochemical composition of cocoa honey from different cocoa varieties (<i>Theobroma cacao</i> L.)	81
4.3 Artigo: Optimization of HS-SPME/GC-MS method for determining volatile organic compounds and sensory profile in cocoa honey from different cocoa varieties (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	108
4.4 Manuscrito: Perfil químico de mel de cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.) de diferentes variedades por UHPLC-HRMS/MS e análise quimiométrica	144
4.5 Artigo: Multivariate Analysis to evaluate the storage time of cocoa honey (<i>Theobroma cacao</i> L.) processed by Pasteurization and High Intensity Ultrasound.....	178
5 CONCLUSÃO GERAL	238
REFERÊNCIAS	239
PRODUÇÃO TÉCNICO CIENTÍFICA (2020-2024)	250

APÊNDICE	253
-----------------------	------------

APÊNDICE A – Mel de Cacau, o Néctar dos Deuses: Características Químicas, Sensoriais e Métodos de Conservação.	253
--	------------

1. INTRODUÇÃO

O cacauieiro (*Theobroma cacao* L.) é uma árvore frutífera perene da família *Malvaceae* e necessita de um clima tropical para se desenvolver adequadamente. Os três tipos mais populares de cacau são *Criollo*, *Forastero* e Trinitário. Embora sua origem seja no continente americano, os maiores produtores do mundo estão nos países da África Ocidental, como Costa do Marfim, Gana, Camarões e Nigéria (Serra; Sodré, 2021; Vásquez *et al.*, 2019).

O Brasil, atualmente, é o 6º produtor mundial de cacau e a Bahia conta com a maior produção nacional (ICCO, 2023; IBGE, 2024). A Bahia tem um grande potencial para aumentar ainda mais sua capacidade, utiliza um sistema de produção que se baseia em plantas híbridas, conhecidas por sua resistência a pragas e alta produtividade e apresenta clima tropical favorável. Além disso, abriga as principais multinacionais de chocolate do mundo, como Barry Callebaut, Cargill e Olam, que processam a maior parte do cacau produzido no país na cidade de Ilhéus (Coelho, 2024; Serra; Sodré, 2021).

O fruto do cacauieiro é um componente essencial na produção de chocolate, enquanto as cascas, a polpa do cacau e o mel de cacau são considerados subprodutos (Indiarto *et al.*, 2021; Guirlanda *et al.*, 2023). Nesse contexto, o mel de cacau é caracterizado como um líquido mucilaginoso e amarelo opaco, obtido da polpa do cacau *in natura* por decantação natural, prensagem natural ou mecânica, antes da fermentação. Contudo, a maior parte desse mel não é aproveitada durante o processamento do cacau, devido ao seu alto teor de açúcar e água, que o torna altamente suscetível à fermentação e resulta em um prazo de validade curto a temperatura ambiente. Atualmente, o mel de cacau é comercializado principalmente congelado, especialmente na América Central e do Sul (Guirlanda *et al.*, 2021). No entanto, o mel de cacau ainda é pouco abordado na literatura científica.

O mel de cacau contém antioxidantes e vitamina C, além disso, possui em sua composição pectina e minerais essenciais, como zinco, magnésio, sódio, ferro, manganês e cálcio (FAPESP, 2022; Silva *et al.*, 2014). Dentre as principais aplicações do mel de cacau estão a produção de geleias, sucos, drinks e licores, frequentemente elaborados de forma artesanal. Também é utilizado na fabricação de bebidas alcoólicas, como vinho, e em bebidas funcionais, como kombucha (Guirlanda *et al.*, 2021; Koelher *et al.*, 2022; Yuliana *et al.*, 2023). Leite *et al.* (2019) utilizaram o mel de cacau como substrato para a produção de bebidas fermentadas. Além disso, algumas patentes destacam sua inclusão

na fabricação de cerveja artesanal (Rodrigues, 2019), aguardente (Scampini, 2020) e como adoçante natural na produção de chocolates e sorvetes (Lannes *et al.*, 2013).

Os compostos orgânicos voláteis (COVs) são fundamentais para o desenvolvimento do aroma do mel de cacau. Entre os métodos utilizados para analisar COVs, a microextração em fase sólida por *headspace* associada à cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (HS-SPME/CG-EM) se destaca como uma técnica eficiente e versátil (Fang *et al.*, 2023). Dado que os COVs podem impactar a qualidade sensorial do mel de cacau, é fundamental examinar não apenas os compostos em si, mas também sua relação com a percepção e aceitação do consumidor.

A qualidade sensorial de um produto alimentício é fundamental para garantir a fidelidade do consumidor em um mercado cada vez mais exigente e diversificado. Portanto, é essencial avaliar suas propriedades de cor, sabor, aroma e consistência. Para isso, são utilizados métodos sensoriais, que podem ser discriminativos, descritivos ou afetivos. Nesse contexto, a análise descritiva por ordenação (ADO) foi aplicada para avaliar a intensidade de cada atributo sensorial em ordem crescente. Essa técnica oferece vantagens como redução de tempo e custos (Dutcosky, 2019; Richter *et al.*, 2010).

Além disso, é essencial investigar os macronutrientes e micronutrientes do mel de cacau para avaliar seus benefícios à saúde. Nesse contexto, entre as várias técnicas instrumentais disponíveis para a determinação mineral, a espectrometria de emissão óptica por plasma induzido por micro-ondas (MIP OES) tem se destacado. Isso se deve à sua capacidade de analisar múltiplos elementos, com custo e manutenção relativamente baixos, alta velocidade de análise e excelente poder de detecção (Balaram, 2020).

De acordo com Cinar *et al.* (2021) as amêndoas de cacau proporcionam diversos benefícios à saúde, graças às suas propriedades antioxidantes, antiproliferativas, anti-inflamatórias e anticancerígenas, além de ser rico em compostos bioativos, como compostos fenólicos, metilxantinas e aminoácidos (Balcázar-Zumaeta *et al.*, 2024). Assim, é fundamental investigar os principais compostos químicos não voláteis para entender o perfil do mel de cacau em diferentes variedades. Nesse sentido, a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-HRMS/MS) se destaca por sua elevada sensibilidade, permitindo a detecção de centenas a milhares de metabólitos (Bozza *et al.*, 2024).

Nesse contexto, o mel de cacau tem grande potencial para se destacar tanto no mercado nacional quanto internacional. A adoção de métodos de conservação adequados é crucial para prolongar sua vida útil e ampliar suas oportunidades de comercialização

(Guirlanda *et al.*, 2023). Dessa maneira, tecnologias térmicas e não térmicas ou a sua combinação, são amplamente usadas na conservação de frutas e suco de frutas. A pasteurização é um método de conservação tradicional usada para inativar microrganismos e enzimas dos alimentos. Entretanto, de acordo com Nonglait *et al.* (2022) alguns estudos têm demonstrado que tratamentos térmicos podem alterar a estrutura dos nutrientes e reduzir o conteúdo de compostos bioativos.

Assim, uma alternativa promissora para substituir os métodos térmicos é o uso do ultrassom (US). Essa técnica é sustentável e ecologicamente correta, pois não utiliza aditivos. O ultrassom emite ondas sonoras com frequências superiores à capacidade auditiva humana (>20 kHz) e, conforme diversos estudos, é capaz de inativar microrganismos, além de preservar ou até aumentar os compostos bioativos em alimentos (Nabi *et al.*, 2024; Roobab *et al.*, 2023).

Embora o mel de cacau seja um produto relativamente novo e ainda pouco estudado e aproveitado, ele pode apresentar grande potencial nutricional. Cada variedade de cacau, por sua vez, possui características genéticas únicas, que podem impactar diretamente sua composição química e sensorial. Compreender essas variações e como elas afetam a qualidade do mel de cacau é essencial para otimizar o aproveitamento desse produto. Assim, os resultados deste estudo podem contribuir para o aprimoramento das práticas de produção e conservação do mel de cacau, além de ampliar seu consumo e gerar novas oportunidades econômicas para os produtores de cacau.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- ✓ Avaliar a composição química, as propriedades sensoriais e os métodos de conservação de mel de cacau de diferentes variedades de *Theobroma cacao* L.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Realizar uma revisão de literatura sobre o mel de cacau e os subprodutos da cadeia produtiva do cacau;
- ✓ Obter mel de cacau a partir de diferentes variedades e avaliar suas características físicas, químicas e microbiológicas;
- ✓ Investigar o perfil de minerais presentes em diferentes variedades de mel de cacau por espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES);
- ✓ Desenvolver um método de extração e análise por HS-SPME/CG-EM para determinação de compostos orgânicos voláteis em mel de cacau;
- ✓ Analisar o perfil sensorial de amostras de mel de cacau utilizando a Análise Descritiva por Ordenação (ADO) e avaliar a aceitação e a intenção de compra;
- ✓ Caracterizar o perfil de químico por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-HRMS/MS);
- ✓ Estudar os efeitos da pasteurização térmica, da pasteurização térmica com aditivo e do ultrassom de alta intensidade nas propriedades físico-químicas, microbiológicas e aromáticas do mel de cacau durante 28 dias de armazenamento a 4°C;
- ✓ Elaborar uma cartilha destacando as principais características de cada variedade de mel de cacau e distribuí-la aos produtores de cacau.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Histórico do cacau

Theobroma cacao L., árvore responsável pela produção do cacau (Figura 1), pertence à ordem Malvales, à família Malvaceae e ao gênero *Theobroma*. Seu nome originado do grego, em que "Theos" significa "deus" e "Bromos" "alimento", traduz-se como "alimento dos deuses (Afoakwa, 2016).

Figura 1 – Árvore e frutos do cacau (*Theobroma cacao* L.).



Fonte: Autoria própria, 2024.

Diversas hipóteses são levantadas para a origem e dispersão do cacau no mundo, uma delas é de que ele é originário da região das bacias Amazonas e Orinoco. As sementes do cacaueiro eram consumidas pela civilização maia em, aproximadamente, 600 a.C. Os povos olmeca, maia e asteca valorizavam o cacau como uma bebida aromatizada com pimenta, baunilha, mel e urucum. Para os maias, as sementes de cacau eram tão valiosas que serviam como uma importante unidade monetária. Assim, nessa época, o cacau não era acessível a toda a sociedade, estando reservado apenas para aqueles com poder e influência (Dias, 2001; Veja; Kwik-Urbe, 2012).

De acordo com Queiroga *et al.* (2021), o cacau já era cultivado pelos índios muito antes da chegada dos europeus na América, mas foi Cristóvão Colombo o responsável

pelo conhecimento e manejo do cacau no mundo. Em 1824, com o aumento da popularidade do cacau, os portugueses levaram algumas mudas de cacau *Forastero* do Brasil para São Tomé e Príncipe, em 1850 outras mudas foram enviadas para Guiné Equatorial.

Finalmente, na metade da década de 1900, as mudas se espalharam para a Costa do Marfim, Gana e Nigéria, que se tornaram os maiores produtores de cacau do mundo. No Brasil, a Bahia dominou o cenário do cacau por muitos séculos, mas o que poucos sabem é que a primeira muda plantada no território baiano para cultivo, no século XVII, foi trazida do Pará (ICCO, 2023; Queiroga *et al.*, 2021).

O cultivo comercial de cacau no município de Ilhéus, na Bahia, teve início em 1820, com pioneiros, em sua maioria, suíços e alemães. Nas primeiras décadas do século XX, o cacau se consolidou como o principal produto de exportação da Bahia. Vários fazendeiros de origem humilde, que possuíam extensas plantações de cacau, ascenderam como os novos ricos da sociedade baiana. No entanto, em 1990, a produção enfrentou a "vassoura de bruxa," que, combinada com a queda dos preços do produto no mercado internacional, resultou em uma grave crise no setor (Carradore, 2019).

Adicionalmente, o cacau possui uma rica história de uso não apenas como alimento, mas também como medicamento. No século XVI, os europeus utilizavam o cacau e o chocolate (em forma líquida), tanto isoladamente quanto misturados com ervas e plantas, para administrar medicamentos no tratamento de diversas condições, como problemas digestivos, dores de cabeça, inflamações e insônia (Kwik-Urbe, 2005).

3.2 Produção de cacau

O cacau é cultivado basicamente na África Ocidental, América do Sul e Sul da Ásia (Anoraga *et al.*, 2024), predominantemente em regiões de clima tropical, entre os Trópicos de Câncer e Capricórnio (10–20° ao norte e ao sul da linha do Equador). As temperaturas ideais variam entre 10 e 32°C, umidade em torno de 70 a 90% e a precipitação deve ser de, no mínimo, 1000 a 1500 mm, distribuída uniformemente ao longo do ano (Vásquez *et al.*, 2019; Veja; Kwik-Urbe, 2012).

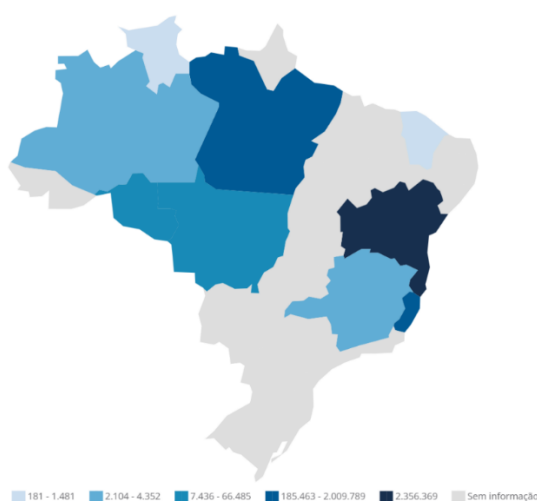
A planta pode crescer até 10 metros de altura e, geralmente, começa a produzir frutos aos 3 anos. O rendimento máximo é alcançado entre 8 e 9 anos. Os frutos medem entre 15 e 25 cm de comprimento e têm diâmetro de 8 a 13 cm. Quando maduros, cada fruto pode conter de 20 a 40 grãos (Meza-Sepúlveda *et al.*, 2024; Vásquez *et al.*, 2019).

Atualmente, o cacau é considerado uma das commodities agrícolas mais significativas globalmente, sendo a única planta com uso comercial na produção do chocolate, um dos produtos mais populares no mundo (Anoraga *et al.*, 2024).

Em 2024, a produção mundial de cacau atingiu cerca de 4,5 milhões de toneladas, com os maiores volumes vindos de países africanos, correspondendo a 71,2% da produção mundial. A Costa do Marfim e Gana destacam-se como os principais produtores mundiais, com 1,8 milhão e 580 mil toneladas, respectivamente. O Brasil ocupa a 6ª posição com volume de 296 mil toneladas, ficando atrás de países como Costa do Marfim, Gana, Equador, Camarões e Nigéria (IBGE, 2024; ICCO, 2024).

De acordo com dados atuais do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística a Bahia lidera o mercado nacional com produção de 139 mil toneladas e faturamento de R\$ 2,3 bilhões em 2023, 16% a mais quando comparado a 2022. As cidades baianas com destaque em produção são Ilhéus, localizada no Sul da Bahia, e Wenceslau Guimarães, localizada no Baixo Sul da Bahia. Além disso, o estado do Pará ocupa a 2ª posição com faturamento, aproximado, de R\$ 2 bilhões. Espírito Santo, Rondônia, Roraima e Amazônia também fazem parte dos estados que compõem a produção de cacau do país (Figura 2) (IBGE, 2024). Esses estados também desempenham um papel crucial na produção de cacau no Brasil, destacando a diversidade geográfica da cultura do cacau no país.

Figura 2 – Estados brasileiros produtores e valor da produção de cacau no Brasil em mil reais (R\$).



Fonte: IBGE, 2024.

Recentemente, as mudanças climáticas e a presença de pragas estão diminuindo de forma significativa as áreas adequadas para o cultivo de cacau, uma cultura comercial

vital que sustenta a vida de milhões de pequenos agricultores nos trópicos úmidos (Olwig *et al.*, 2024).

Além disso, o déficit global de cacau está gerando grande volatilidade no mercado internacional. A África, como principal fornecedora desta commodity, contribui para esse cenário alarmante, mantendo o mercado em alerta para um possível desabastecimento. Essa fragilidade resultou em uma queda de 30% a 35% na produção, que representa de 70% a 75% de todo o fornecimento mundial de cacau (Mercado do Cacau, 2024).

Segundo a Associação Nacional das Indústrias Processadoras de Cacau do Brasil, o primeiro semestre de 2024 registrou uma queda de 37,4% no volume de amêndoas nacionais recebidas pela indústria processadora de cacau. Foram recebidas 58,3 mil toneladas nesses primeiros seis meses, em comparação com 93,3 mil toneladas em 2023 (AIPC, 2024).

Diante da baixa oferta o preço do cacau na bolsa de valores de Nova York aumentou, com o maior valor registrado em abril de 2024, ultrapassando 11 mil dólares a tonelada. Adicionalmente, esse valor vem oscilando e está em média de 7 mil dólares a tonelada. No entanto, essa incerteza na produção vem causando preocupações nas indústrias processadoras de cacau, principalmente na indústria de chocolate, e estima-se que essa variação perdure por mais um tempo (Mercado do Cacau, 2024).

3.3 Variedades de cacau

Historicamente, os tipos de cacau são divididos em dois grupos: *Criollo* (*Theobroma cacao* var. *cacao*) e *Forastero* (*Theobroma cacao* var. *sphaerocarpum*). O cacau *Criollo* se destaca por sua coloração clara, sabor suave de nozes e é apreciado pelos amantes de chocolate devido a sua qualidade superior. Porém, além de ser suscetível a doenças e ter baixos rendimentos, atualmente, essa variedade é produzida em quantidade reduzida, menos de 5%. Assim, a maior parte da produção de cacau no mundo é do tipo *Forastero*, aproximadamente 80%, que, por sua vez, apresenta grãos de cor marrom escuro e um sabor mais intenso, ligeiramente amargo (Bermúdez *et al.*, 2022; Serra; Sodré, 2021; Veja; Kwik-Urbe, 2012).

Um terceiro tipo, chamado de “Trinitário,” é um híbrido resultante do cruzamento entre o cacau *Criollo* e *Forastero*, corresponde a cerca de 15% da produção mundial. Em 1989, devido à incidência da doença fúngica conhecida como vassoura de bruxa, iniciou-se o desenvolvimento de híbridos de cacau para mitigar as perdas nas lavouras. A demanda por híbridos com características aprimoradas, como resistência a doenças e alta

produtividade, cresceu entre os produtores, resultando na seleção de vários genótipos para restaurar a produtividade do cultivo de cacau. Assim, o cacau trinitário apresenta variedades resistentes à vassoura de bruxa, maiores rendimentos, além de possuir aroma e sabor suave (Moretti *et al.*, 2023; Veja; Kwik-Urbe, 2012).

De acordo com Hegmann *et al.* (2020), mais de 1000 variedades de cacau foram descritas. A Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira incentiva para plantio comercial as variedades de cacau Trinitário: FA13, SJ02, CCN51, PS1319, CEPEC 2002, CCN10, Vencedora 20, PS5785, VT05, RLF1938, VT10, CSG70, FL89, SL06, BN34 e FL76, dentre outros (Macêdo *et al.*, 2021).

O clone denominado Colección Castro Naranjal 51 (CCN51) é originário do Equador, amplamente cultivado desde os anos 1960 devido às suas características agronômicas superiores, incluindo alta produtividade, robustez e resistência a doenças (Figura 3). Principalmente utilizado na produção de cacau a granel de sabor suave, o CCN51 é valorizado por sua contribuição significativa para a indústria cacaueira (Stagnati, 2020). Meza-Sepúlveda *et al.* (2024), ao comparar fisicamente os clones CCN51, FEAR5 e FSV41, descreveram que CCN51 apresentou maior massa total do fruto (863,06 g), comprimento de 26,82 cm e maior número de grãos por fruto (49).

Figura 3 – Variedades de cacau CCN51, PS1319, SJ02 e Parazinho.



Fonte: Autoria própria, 2024.

PS1319 e SJ02 são variedades de cacau desenvolvidas com o auxílio da CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira) na Bahia, Brasil (Figura 2). Ambas se destacam pela alta produtividade e resistência à vassoura de bruxa (*Moniliophthora perniciosa*) (Mandarino; Gomes, 2009). A variedade PS1319 gera frutos leves e de tamanho reduzido, porém com um rendimento de polpa satisfatório. Essas características

fazem do PS1319 uma escolha promissora para os produtores de cacau que buscam maximizar a eficiência e a rentabilidade de suas plantações (Alexandre *et al.*, 2015). No entanto, a variedade SJ02 apresenta sensibilidade a temperaturas mais baixas ($\leq 15^{\circ}\text{C}$) durante o processo de germinação. Isso sugere que o SJ02 pode ser menos adaptado a condições de baixas temperaturas em comparação com outros genótipos estudados como CCN51 e PS1319 (Lavanhole *et al.*, 2019; Serra; Sodré, 2021).

O Cacau Parazinho é uma variedade de cacau *Forastero* que se espalhou pela bacia amazônica, desenvolvendo-se de forma natural no Pará e foi introduzido na Bahia em 1746 (Figura 2). O grupo *Forastero*, em geral, é conhecido por sua resistência a doenças e por produzir grãos que são mais amargos devido a um maior teor de compostos fenólicos e menos aromáticos do que os dos grupos *Criollo* e Trinitário. Frutos imaturos do Parazinho geralmente possuem a casca verde e os maduros, amarela, porém, apresenta frutos pequenos e com pouca polpa (Castelli, 2021; Dias *et al.*, 2003; Serra; Sodré, 2021).

3.4 Subprodutos do cacau

O cacau é uma cultura familiar e mais de 50 milhões de agricultores dependem desta cultura para a sua subsistência. Apesar do crescimento do cacau, a cadeia de processamento (colheita, fermentação, torrefação e moagem) permaneceu inalterada durante 150 anos gerando resíduos, mais de 48 milhões de toneladas anualmente. Os grãos de cacau são a matéria-prima fundamental na produção de chocolate, no entanto, apenas 20% são utilizados pela indústria de chocolate, o restante é descartado ou utilizado na ração animal e na compostagem, mas que podem ser transformados em subprodutos com valor agregado (Meza-Sepúlveda *et al.*, 2024; Quiceno Suárez *et al.*, 2024; Vásquez *et al.*, 2019).

Os subprodutos do cacau consistem na casca da vagem de cacau, casca de cacau, polpa e mel de cacau (Figura 4). Sendo assim, a gestão eficiente dos resíduos é fundamental para prevenir o desperdício alimentar e promover práticas de economia sustentável (Anoraga *et al.*, 2024).

Figura 4 – Subprodutos da cadeia produtiva do cacau (*Theobroma cacao* L.).



Fonte: Adaptado do Google imagens, 2024.

A casca do fruto do cacau é o resíduo mais abundante, representando 70-80% do total do fruto. São gerados, em média, para cada 1.000 Kg de grão, 10.000 Kg de casca residual. A casca é considerada um material lignocelulósico composto principalmente por celulose, hemicelulose, lignina, pectinas, óleos e ceras. Esses resíduos lignocelulósicos podem ser utilizados na produção de biomateriais, fertilizantes e energia renovável, xilitol como substituto do açúcar, como composto de fragrância e em aplicações de cuidados com a pele, além de fornecer compostos bioativos que podem resultar em produtos lucrativos, gerando uma renda adicional para os agricultores e promovendo o desenvolvimento econômico (Anoraga *et al.*, 2024; Campos-Vega *et al.*, 2018; Meza-Sepúlveda *et al.*, 2024).

A casca da amêndoa, geralmente, é obtida após a etapa de torrefação para o processamento do chocolate e compõe 1-3% do peso total do fruto. Sua composição química e nutracêutica tem valorizado esse subproduto, diversos estudos indicam que a casca do cacau é uma fonte de carboidratos, compostos bioativos, proteínas e fibra alimentar. Esses componentes extraídos são utilizados como substitutos em ingredientes e formulações para alimentação humana e animal, contribuindo para o desenvolvimento de novos produtos e como fonte de bioenergia (Figuerola *et al.*, 2020; Sánchez *et al.*, 2023; Thompson; Rough, 2021).

A polpa do cacau é a parte branca e mucilaginosa que cobre as sementes de cacau *in natura*, corresponde a 10% do fruto e é utilizada em diversas preparações alimentícias, como a produção de bebidas, álcool, geleias, doces e preparações de frutas, contribuindo de maneira sustentável para a cadeia produtiva do cacau (Figuerola *et al.*, 2020; Firdaus *et al.*, 2022). Além disso, é fundamental na fermentação do cacau por sua alta concentração de açúcar, que atua como substrato para as reações microbianas (Mota-Gutierrez *et al.*, 2021).

O mel de cacau é um subproduto do processamento dos frutos do cacaueiro que ainda é pouco explorado comercialmente. É um líquido mucilaginoso obtido da polpa do cacau através de prensagem natural ou mecânica ou decantação natural e compõe em torno de 5-6% do fruto. Ainda se faz necessário o desenvolvimento de métodos de conservação para sua maior inserção no mercado, a fim de aproveitá-lo. Isso não apenas agregaria valor ao produto, mas também ampliaria a variedade de opções disponíveis para os consumidores, representando um potencial fonte de renda para os produtores (Donatti *et al.*, 2021; Guirlanda *et al.*, 2021).

Recentemente, Mishra *et al.* (2024) publicaram na revista *Nature Foods* um estudo sobre o desenvolvimento de um chocolate que utiliza os subprodutos do cacau, recebendo grande destaque na mídia. Foi elaborado um gel a partir da casca do cacau, combinado com a polpa e o mel de cacau, com o objetivo de substituir o açúcar e incorporado à massa do chocolate. Os autores concluíram que esse chocolate apresenta um sabor doce em comparação ao tradicional, além de oferecer um valor nutricional superior, com maior teor de fibras e menor quantidade de ácidos graxos saturados.

Além disso, a pesquisa de Silveira *et al.* (2024) mostra que a remoção da polpa do cacau em até 60% não altera as propriedades sensoriais do chocolate. Indicando que é possível extrair a polpa ou o mel de cacau a partir da mesma, agregar valor a estes subprodutos e ainda assim produzir chocolate de qualidade. Haruna *et al.* (2024) também apresentou benefícios da remoção parcial da polpa em grãos de cacau de Gana.

Nessa perspectiva, as aplicações dos subprodutos do cacau não apenas favorecem a sustentabilidade ambiental e econômica das plantações, mas também diminuem a dependência dos produtores em relação às flutuações do mercado externo. Ao explorar todo o potencial do cacau e seus subprodutos, é possível agregar valor à cadeia produtiva e promover o desenvolvimento sustentável nas regiões produtoras (Indiarto *et al.*, 2021; Mishra *et al.*, 2024).

3.4 Mel de cacau

A polpa de cacau, ao ser prensada, gera um subproduto conhecido como mel de cacau (Figura 5), um líquido mucilaginoso que contém pectina, ácidos orgânicos e minerais. Esse subproduto pode ser uma fonte significativa de renda, devido ao seu potencial comercial e industrial (Guirlanda *et al.*, 2021; Indiartho *et al.*, 2021).

Sua composição é semelhante à da polpa de cacau, apresentando um pH ácido (variando de 2,76 a 3,78) e baixas concentrações de proteínas (1,20%), lipídeos (0,25%), fibras (0,23%) e cinzas (0,2%). No entanto, possui altas quantidades de açúcares redutores (8,63 g/100 g) e vitamina C (10,90 mg.100mL⁻¹) (Leite *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2014).

Em relação à presença de compostos bioativos, a literatura apresenta poucos estudos publicados. O trabalho de Guirlanda *et al.* (2023) determinou os compostos fenólicos totais, encontrando uma concentração de 424,3 mg GAE/g pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu. Silva *et al.* (2014) identificou 7,19 µg/mL de flavonoides totais e 6,34 g de extrato/g na análise de DPPH. Esses achados sugerem que o mel de cacau pode oferecer benefícios à saúde dos consumidores, no entanto, mais estudos são necessários para confirmar essas informações.

O mel de cacau fresco é rapidamente fermentado devido ao seu alto teor de açúcares redutores, como frutose e glicose, além da elevada umidade e formas de extração, o que limita sua vida útil. Atualmente, o mel de cacau é comercializado predominantemente na forma congelada, pois desafios logísticos dificultam sua ampla distribuição e exportação para aplicações em doces, geleias, bebidas, confeitados e alimentos nutracêuticos, entre outros (Guirlanda *et al.*, 2023).

Figura 5 – Mel de cacau.



Fonte: *Autoria própria, 2024.*

O mel de cacau recebe esse nome devido ao seu sabor doce, que se assemelha ao mel de abelha, embora não seja produzido pela apicultura (Guirlanda *et al.*, 2021). Entretanto, não há registro de quando o mel de cacau passou a ser conhecido por essa denominação.

As principais aplicações do mel de cacau incluem a produção de bebidas alcoólicas, como vinho (Koelher *et al.*, 2022) e bebidas funcionais do tipo kombucha (Yuliana *et al.*, 2023), além de sucos, geleias e licores, frequentemente elaborados de forma artesanal (Guirlanda *et al.*, 2021). Além disso, Leite *et al.* (2019) utilizaram o mel de cacau como substrato para a produção de bebidas fermentadas. Algumas patentes também incorporaram o mel de cacau na fabricação de aguardente (Scampini, 2020), de cerveja artesanal (Rodrigues, 2019) e como substituto do açúcar na produção de chocolates e sorvetes (Lannes *et al.*, 2013).

Além de sua aplicação na área de alimentos, o mel de cacau apresenta um grande potencial na indústria de cosméticos. Com o apoio do Programa de Pesquisa Inovativa em Pequenas Empresas (PIPE) da FAPESP, a startup Cacaos Biocosmetics desenvolveu um creme facial e uma loção corporal hidratante, visando criar cosméticos com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas à base de mel de cacau. Os resultados mostraram que ambos os produtos não causaram irritação na pele (FAPESP, 2022).

É fundamental enfatizar que métodos de conservação, com a finalidade de estender a vida de prateleira do mel de cacau e aumentar sua comercialização, estão começando a ser desenvolvidos. Oliveira *et al.* (2019) desenvolveram uma patente para uma bebida pasteurizada com sabor de mel de cacau. Guirlanda *et al.* (2023) estudaram a combinação da atomização usando isolado de proteína de soro de leite, no qual resultou no desenvolvimento de um pó de mel de cacau de fluxo livre, com tamanho de partícula adequado e benefícios significativos para a extensão da vida útil, abrindo novas oportunidades para a comercialização do mel de cacau como ingrediente na indústria alimentícia.

Portanto, o reconhecimento do mel de cacau como um ingrediente valioso é parte de um movimento para utilizar de forma sustentável todos os componentes da planta do cacau, contribuindo para na diversificação da renda dos pequenos produtores e promovendo práticas de produção mais responsáveis (Mishra *et al.*, 2024).

3.5 Composição mineral

O organismo humano precisa de cerca de vinte elementos diferentes para funcionar adequadamente, que são obtidos através de uma alimentação equilibrada, pois não são produzidos naturalmente pelo corpo humano. Esses elementos participam de vários processos metabólicos e fisiológicos, sendo essenciais para o crescimento, desenvolvimento, funcionamento e reconstrução de órgãos e tecidos. Vale destacar que o consumo excessivo ou deficiência no organismo pode provocar danos irreversíveis à saúde (Morris; Mohiuddin, 2021).

Esses elementos são classificados como essenciais, ou seja, tem relação direta com o funcionamento adequado do corpo humano (Fe, Zn, Mn, Cu, Mo, Co, Ca, Na, K, P, Mg, entre outros) e não essenciais que são nocivos ao organismo e é prejudicial à saúde mesmo em pequenas quantidades (Al, As, Pb, Hg, Cd, Cr, entre outros). Os essenciais são divididos em micronutrientes (Cu, Fe, Mn, Mo, Zn), no qual o corpo necessita de quantidades inferiores a 100 mg/dia e macronutrientes (K, Mg, P, Na, Ca) quantidades superiores a 100 mg/dia (Brasil, 2005; Farag *et al.*, 2023; Morris; Mohiuddin, 2021).

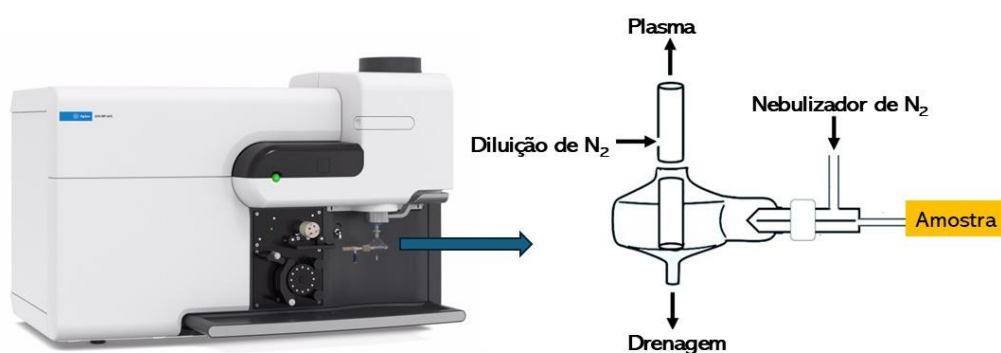
A presença desses elementos ocorre naturalmente nos alimentos, pois muitos são essenciais para o crescimento das plantas. Assim, a quantificação desses elementos, sejam eles essenciais ou não, pode fornecer indicações sobre a qualidade e a segurança dos alimentos (Fioroto *et al.*, 2024). Além disso, a quantidade que atende as necessidades

nutricionais de um indivíduo saudável diariamente, indicada na IDR (ingestão diária recomendada) é um fator importante e, portanto, é essencial realizar estudos detalhados sobre o perfil desses elementos nos alimentos (Brasil, 2005).

Tendo em vista a necessidade do controle de qualidade dos alimentos, diversas técnicas analíticas têm sido empregadas para quantificar esses elementos, entre elas: espectrofotometria de absorção atômica (AAS), a espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por microondas (MIP OES), a espectrometria de emissão óptica por plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (Balaram, 2020).

Nesse sentido, o MIP OES se destaca por ser uma técnica multielementar, no qual utiliza gás nitrogênio (N_2) extraído do ar para geração do plasma na temperatura de 5000 K, o que diminui o custo operacional. Além disso, apresenta sensibilidade maior que o AAS. Neste equipamento (Figura 6), a amostra é introduzida através de mangueiras e uma bomba peristáltica que leva a solução contendo os elementos de interesse para o nebulizador, cuja função é transformar a solução em aerossol com o uso do gás nitrogênio. Em seguida, o aerossol finamente disperso chega ao plasma de nitrogênio, onde ocorre diversos processos químicos e, então, os elementos são quantificados (Balaram, 2020; Rocha *et al.*, 2020).

Figura 6 – Sistema de espectrofotometria de emissão óptica de plasma induzido por micro-ondas (MIP OES).



Fonte: Adaptado de Fontoura *et al.* (2022)

Existem poucos dados na literatura sobre o perfil desses macros e micronutrientes no mel de cacau. Leite *et al.* (2019) caracterizou o mel de cacau, sem variedade especificada, com relação ao teor de elementos, descrevendo a presença de Ba (0,38

mg.100 mL⁻¹), Fe (1,35 mg.100 mL⁻¹), Mn (0,30 mg.100 mL⁻¹), Al (0,15 mg.100 mL⁻¹), Cu (0,07 mg.100 mL⁻¹), Na (0,48 mg.100 mL⁻¹), Se (0,19 mg.100 mL⁻¹), Zn (0,40 mg.100 mL⁻¹), empregando ICP-MS. Já Nunes et al. (2020) quantificou macro e micronutrientes em polpa de cacau por ICP OES, com destaque para os teores de: Ca (13,343 mg/Kg), Fe (3.388 mg/Kg), K (1459.842 mg/Kg), Mg (237.230 mg/Kg), Na (98.966 mg/Kg) e Zn (1.535 mg/Kg). Portanto, é fundamental realizar mais estudos e aplicar novas técnicas para investigar os macronutrientes e micronutrientes do mel de cacau proveniente de diferentes variedades de cacau, a fim de preencher essa lacuna.

3.6 Compostos voláteis

Os compostos orgânicos voláteis (COVs) são moléculas orgânicas com elevada pressão de vapor. Sua detecção, identificação e quantificação estão se tornando cada vez mais necessárias em diversas áreas, como no controle de qualidade de alimentos e bebidas e na qualidade do ar e da água. O sabor, a aparência, o aroma e a textura são indicadores utilizados para avaliar alterações na segurança e qualidade dos alimentos. Nesse sentido, os COVs atuam como indicadores-chave, representando uma classe de substâncias químicas que evaporam à temperatura ambiente (com pressão de vapor ≥ 10 Pa a 20 °C) (Feng *et al.*, 2024; Hirschauer *et al.*, 2025; Li; Pal; Kannan, 2021).

Uma técnica amplamente utilizada para detectar e identificar os COVs é a cromatografia gasosa (CG) acoplada à espectrometria de massas (EM). A cromatografia gasosa separa os compostos de uma mistura com base em sua afinidade diferencial por uma fase estacionária em um tubo capilar, pelo qual a mistura gasosa flui. A espectrometria de massas, por sua vez, detecta e identifica, com base na razão massa/carga (m/z) dos fragmentos gerados, cada composto à medida que sai do tubo. Embora essa abordagem seja altamente precisa e confiável, demanda pouca ou nenhuma preparação de amostra, sua principal limitação reside no fato de que a CG-EM é um sistema relativamente caro (Hirschauer *et al.*, 2025).

A análise cromatográfica inicia-se com a injeção da amostra no injetor (vaporizador) em temperatura alta, que, em sua forma básica, consiste em um bloco metálico conectado à coluna contendo a fase estacionária, no qual utiliza gás inerte como fase móvel. O sistema inclui também um pequeno tubo de quartzo ou vidro (*liner*) que promove um aquecimento mais uniforme. Na parte superior, há um anel de vedação e um

septo, por onde a amostra é injetada com o auxílio de uma seringa ou fibra e na parte inferior, o *liner* se conecta à coluna (Collins, 2006; Nascimento *et al.*, 2018).

Componentes que interagem mais fortemente com as substâncias da fase estacionária tendem a permanecer mais tempo na coluna, resultando em separação com base em diferentes tempos de eluição (Feng *et al.*, 2024; Lin *et al.*, 2023). A CG possui um excelente poder de resolução, tornando possível, a análise de dezenas de substâncias de uma única amostra (Collins, 2006).

A espectrometria de massas (EM) é uma técnica analítica que permite identificar e quantificar compostos químicos com base em suas massas moleculares e se divide basicamente em três componentes: fonte de ionização, analisador e detector. À medida que os compostos saem da coluna, eles são ionizados na fonte de ionização e convertidos em íons, que podem ser positivos ou negativos. Os íons são direcionados para a região do analisador do espectrômetro de massas, onde são separados com base na razão massa-carga (m/z) e enviados ao detector. O detector monitora a corrente dos íons, amplifica o sinal e, em seguida, transmite as informações para o sistema de dados, que registra os espectros de massa, mostrando os valores de (m/z) dos íons em função de sua intensidade. Esse espectro permite a identificação e quantificação dos compostos presentes na amostra (Gaffney; Marley, 2018; Nascimento *et al.*, 2018; Lanças, 2019).

3.6.1 Microextração em fase sólida em *headspace* (HS-SPME)

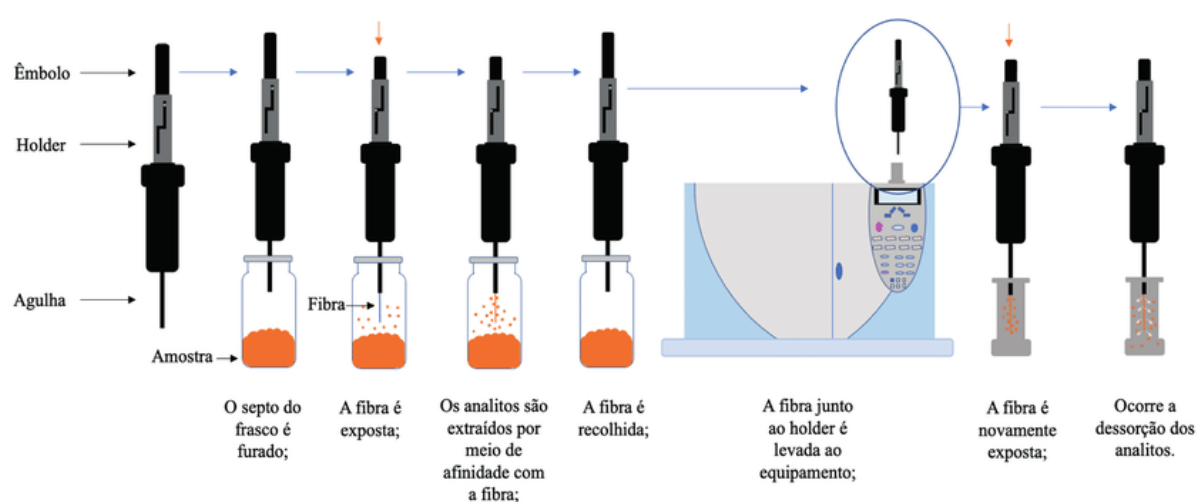
Dentre as técnicas para a extração dos compostos voláteis destaca-se a microextração em fase sólida no modo *headspace* (HS-SPME). Nos últimos anos, essa técnica tem se destacado como uma abordagem promissora para a preparação de amostras, devido à sua simplicidade, alta sensibilidade, baixa invasividade e por não utilizar solventes orgânicos (Fang *et al.*, 2023).

Segundo Keerthana *et al.* (2024) é uma técnica versátil que extrai analitos voláteis da fase de vapor equilibrada acima da amostra, evitando o contato direto com a matriz. Essa flexibilidade permite uma maior proteção com o revestimento da fibra contra danos físicos, garantindo assim, uma maior durabilidade. Nesse contexto, é uma das técnicas de preparo de amostras mais promissoras e sustentáveis na análise de alimentos (Jalili; Barkhordari; Ghiasvand, 2020; Souza-Silva; Gionfriddo; Pawliszyn, 2015).

Nessa técnica, a amostra a ser analisada é colocada em um frasco de vidro, conhecido como vial, tampado com septo feito, geralmente, de silicone (Figura 7). A fibra

responsável pela extração é protegida dentro de uma agulha, que está acoplada a um dispositivo chamado holder. Ela é exposta através do movimento de um êmbolo. Durante o estágio de pré-concentração, a fibra SPME é exposta ao espaço confinado da amostra (*headspace*) para enriquecer-se com compostos polares e não polares, conforme os materiais de revestimento da fibra. Em seguida, a fibra é introduzida no injetor do cromatógrafo onde ocorre a dessorção dos analitos (Keerthana *et al.*, 2024; Nascimento *et al.*, 2018).

Figura 7 – Procedimento HS-SPME para a extração e dessorção de analitos no injetor de um cromatógrafo a gás.



Fonte: García *et al.* (2021)

A implementação de métodos analíticos em conjunto com a HS-SPME exige a otimização dos parâmetros que influenciam a eficiência da extração como o modo de extração, método de agitação, força iônica, tempo de extração, temperatura da amostra e condições de dessorção. Dentro desses parâmetros, a escolha adequada do revestimento da fibra é uma das etapas mais críticas no desenvolvimento do método. A adequação do revestimento para um analito específico é determinada pela polaridade do material e sua seletividade em relação aos analitos de interesse, em comparação com outros componentes da matriz (Souza-Silva; Gionfriddo; Pawliszyn, 2015). Portanto, a escolha da fibra apropriada depende do tipo de amostra, garantindo uma extração eficiente dos COVs.

Atualmente as fibras mais utilizadas são de polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB), carboxeno/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS), polidimetilsiloxano/carboxeno/divinilbenzeno DVB/CAR/PDMS, poliacrilato (PA) e

polietilenoglicol (PEG) (Keerthana *et al.*, 2024). As fibras mistas, por possuírem características polares e apolares simultaneamente, são amplamente utilizadas em análises que visam aumentar a variedade de analitos a serem determinados (Nascimento *et al.*, 2018).

Dessa forma, os estudos sobre compostos voláteis em cacau e seus subprodutos têm usado a técnica por HS-SPME e fibras de fase mista. No estudo de Hegmann *et al.* (2020) foram identificados 56 compostos voláteis em polpa de cacau de diferentes variedades por HS-SPME usando a fibra PDMS/DVB. Rojas *et al.* (2022), otimizou as condições de extração para HS-SPME do licor de cacau considerando os fatores de tipo de fibra, temperatura e tempo de extração. De acordo com o delineamento a melhor condição de extração foi com a fibra DVB/CAR/PDMS, os compostos identificados incluíram aldeídos, cetonas, álcoois, pirazinas, ésteres, terpenos, ácidos e lactonas. Além disso, Becerra *et al.* (2024) utilizaram a fibra DVB/CAR/PDMS para analisar os COVs de grãos de cacau e chocolates, resultando na identificação de 63 compostos.

3.7 Compostos bioativos

O interesse pelo cacau e seus derivados têm aumentado, especialmente em razão da alta concentração de compostos bioativos, que podem ter efeitos benéficos para a saúde humana (Lima *et al.*, 2024). Os compostos bioativos podem ser divididos em compostos fenólicos, metilxantinas, aminoácidos, aminas bioativas e glicosídeos (Balcázar-Zumaeta *et al.*, 2024; Cortez *et al.*, 2024). Além do cacau, são encontrados em diversos alimentos como frutas, vegetais, chá e vinho (Núñez; Saurina; Núñez, 2024).

Entre as classes de compostos fenólicos presentes nas sementes de cacau destacam-se os taninos e flavonoides. Os flavonoides incluem flavonóis, flavonas, flavononas e antocianinas. Dentre estes, os flavanóis são os mais frequentemente encontrados, especialmente a catequina, epicatequina e procianidinas. A epicatequina é considerada o principal flavonol do cacau, representando cerca de 35% do conteúdo total de fenólicos (Efraim; Alves; Jardim, 2011; Santander Muñoz *et al.*, 2020).

Além disso, o cacau possui outros polifenóis em menores quantidades, como luteolina, apigenina, naringenina, quercetina e isoquercitrina, além de metilxantinas, principalmente teobromina e cafeína que são conhecidas como alcalóides (Martín; Ramos, 2017). A teobromina é o principal alcalóide presente nas sementes de cacau, que contém entre 1% e 4% do seu peso desse composto, está relacionada à estimulação cardíaca, à redução do peso corporal e ao aumento da sensibilidade à insulina. A cafeína,

por sua vez, pode elevar a pressão arterial e ativa o sistema nervoso central (Akoa *et al.*, 2021; Cortez *et al.*, 2024).

Metilxantinas como teobromina e cafeína, junto com compostos polifenólicos como epicatequina, catequina, quercetina, ácido protocatecuico e procianidina B2, têm sido amplamente investigados por seus efeitos benéficos no estresse oxidativo, obesidade, resistência à insulina, saúde cardiovascular, atividade antioxidante, efeitos citotóxicos e propriedades anti-inflamatórias. Embora a ingestão de compostos bioativos do cacau traga benefícios à saúde, as altas concentrações de polifenóis e metilxantinas nos grãos de cacau crus podem impactar negativamente o sabor, resultando em adstringência e amargor (Cinar *et al.*, 2021; Goya *et al.*, 2022).

Ademais, os aminoácidos livres são importantes para a saúde humana e os aminoácidos essenciais são fundamentais para a síntese de proteínas, a reparação de tecidos e a absorção de nutrientes. Certos aminoácidos têm efeitos específicos que promovem a saúde. Estudos indicam que a suplementação dietética de triptofano pode trazer benefícios contra a doença de Alzheimer em camundongos (Maitre *et al.*, 2020). Deus *et al.* (2021) avaliaram os aminoácidos e aminas bioativas no cacau durante diferentes períodos de fermentação e encontraram altos níveis de serotonina e triptamina, além de fenilalanina, lisina, histidina, leucina, alanina, treonina e feniletilamina.

O processo analítico para determinar os compostos bioativos utiliza três etapas: extração, separação e caracterização e/ou quantificação. Para a separação é comumente utilizado a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) que pode ser acoplada a outros métodos como ultravioleta (UV) e espectrometria de massa (EM) (Núñez; Saurina; Núñez, 2024).

Assim, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) é uma técnica que se destaca pela sua alta sensibilidade e seletividade, permitindo a detecção de centenas de milhares de metabólitos. A introdução da espectrometria de massas de alta resolução (HRMS), em particular, possibilita a discriminação de analitos com excelente resolução e precisão de massa. Além do que, a ampla gama de adsorventes com diferentes polaridades a torna uma das técnicas de separação mais versáteis. Analisadores de massa, como o quadrupolo *Time-of-Flight* (Q-TOF), o Q-Orbitrap e o *Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance* (FT-ICR), são todos capazes de fornecer dados de alta resolução (Bozza *et al.*, 2024; Evans *et al.*, 2014).

Existem diversos estudos abordando os teores de compostos fenólicos em cacau e seus derivados por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta

resolução. Akoa *et al.* (2021) identificou compostos fenólicos e metilxantinas por UHPLC-DAD-ESI-MS em grãos de cacau e chocolate amargo de três híbridos destacando a presença de epicatequina, teobromina, ácidos ferúlico e clorogênico e seus derivados, procianidina C1, cafeína e ácido salicílico. No estudo de Pagliari *et al.* (2022), as metilxantinas da casca do cacau foram identificadas por UHPLC-UV-QTOF-MS/MS. Para determinar os compostos bioativos no licor de cacau, Herrera-Rocha *et al.* (2024) usou o LC-QTOF-MS. No entanto, há uma escassez de informações sobre esses compostos na polpa de cacau e no mel de cacau e são necessárias novas pesquisas para suprir essa necessidade na literatura científica.

3.8 Análise sensorial

A análise sensorial é uma abordagem científica que avalia as características de um produto através da utilização dos cinco sentidos do avaliador: visão, audição, paladar, olfato e tato. Este método é interdisciplinar, integrando áreas como psicologia, física, química, fisiologia e estatística, para medir e analisar alimentos de forma qualitativa e quantitativa (Lawless; Heymann, 2010). O termo análise sensorial se transformou em um campo de estudo, a partir do século XVII, quando Jean Anthelme Brillat-Savarin publicou seu primeiro livro, "Filosofia do Gosto", em 1825. Nessa obra, ele lançou as bases para a análise dos alimentos e de como são percebidos (Chong, 2012).

Nesses estudos, painelistas humanos atuam como instrumentos para avaliar as qualidades dos produtos alimentícios. Além disso, os resultados de estudos sensoriais de alimentos oferecem informações valiosas sobre a qualidade e suas características, que podem ser aplicadas em diversas áreas, como no controle de qualidade, desenvolvimento de novos produtos e perfil de sabor e gosto (Yu; Low; Zhou, 2018).

As características sensoriais dos alimentos são um dos principais fatores que influenciam sua aceitação. As pessoas tendem a escolher alimentos saborosos, embora a importância do sabor possa variar de uma pessoa para outra (Laaksonen *et al.*, 2016). É de fundamental importância abordar que o reconhecimento das características sensoriais como: aparência, sabor, aroma, textura, cor e brilho, determina a aceitação ou rejeição do alimento (Martinez-Velasco; Filomena-Ambrosio; Garzón-Castro, 2024).

Dentro dessa perspectiva, as análises sensoriais e de sabor de um produto alimentício, assim como a realização de experimentos nessa área, exigem um planejamento cuidadoso, que inclui a definição das técnicas analíticas e a interpretação dos resultados e observações obtidas (Granato; Calado; Jarvis, 2014). A análise de sabor

baseia-se, em grande parte, na medição de compostos voláteis e não voláteis presentes nos produtos alimentares, os quais podem influenciar direta ou indiretamente os perfis de sabor e aroma (Yu; Low; Zhou, 2018). Desse modo, a associação dos atributos de aroma com as técnicas de determinação dos compostos voláteis, por exemplo, torna-se imprescindível.

Nesse contexto, a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa é uma técnica analítica capaz de separar, detectar e identificar diversas substâncias em uma determinada amostra. Essa metodologia é empregada na pesquisa de sabores para identificar os compostos que influenciam o aroma em diferentes produtos alimentícios (Martinez-Velasco; Filomena-Ambrosio; Garzón-Castro, 2024).

3.8.1 Métodos sensoriais

Os métodos sensoriais podem ser divididos em testes discriminativos (triangular, duo – trio, comparação pareada, comparação múltipla e ordenação), testes descritivos (perfil de sabor, perfil de textura e análise descritiva quantitativa) e testes afetivos (preferência, aceitação por escala hedônica, aceitação por escala ideal e intenção de compra) (IAL, 2008).

Os métodos sensoriais descritivos são técnicas que consistem na detecção e descrição dos componentes qualitativos e quantitativos de um alimento. A análise descritiva quantitativa (ADQ) é uma das técnicas mais tradicionais, embora exija um treinamento extenso dos avaliadores e um custo elevado para garantir resultados consistentes e confiáveis. Além disso, uma das principais dificuldades é o uso da escala não estruturada e a repetibilidade das pontuações atribuídas à amostra, visto que a ausência de uma estrutura definida pode resultar em alta variabilidade nas respostas, fazendo com que diferentes avaliadores, ou até o mesmo avaliador em momentos distintos, atribuam pontuações diferentes à mesma amostra (Richter *et al.*, 2010; Stone; Sidel, 1998).

A metodologia de análise descritiva por ordenação (ADO) foi criada por Richter *et al.* (2010) como uma alternativa à análise descritiva convencional. O método de ADO tem sido citado como útil para estudar propriedades sensoriais de alimentos por ser menos demorado e permitir, além das descrições dos atributos, a classificação entre as amostras para cada atributo sensorial avaliado de acordo com sua ordem de intensidade.

Sousa *et al.* (2016) avaliaram o perfil sensorial de méis monoflorais produzidos por diferentes espécies de abelhas sem ferrão no semiárido brasileiro utilizando 19 provadores, sem experiência prévia em análise sensorial, e revelaram que a ADO é uma técnica viável para estabelecer diferenças entre amostras de mel. Carnelocce *et al.* (2012) realizaram uma avaliação da caracterização sensorial de biscoitos salgados com a participação de 30 julgadores, os autores concluíram que a eficiência da equipe e a configuração das amostras apresentaram resultados semelhantes tanto no procedimento de ordenação quanto na utilização de escala. Assim, esses achados indicam que a ADO é uma metodologia eficaz para discriminar amostras de alimentos.

Entretanto, os métodos afetivos são utilizados para avaliar a preferência e a aceitação de produtos. Normalmente, é necessário 60 julgadores para essas avaliações. Esses avaliadores não são treinados, mas são escolhidos para representar uma população-alvo. Assim, no teste de aceitação por escala hedônica, o indivíduo indica seu grau de satisfação ou insatisfação em relação a um produto, seja de forma geral ou em relação a um atributo específico. As escalas mais comuns são de 7 e 9 pontos, que incluem descrições que vão de “gostei muitíssimo” a “desgostei muitíssimo”. As amostras são apresentadas ao avaliador de forma codificada com números de três dígitos e aleatórias (Dutcosky, 2019; Santos, 2019).

No teste da escala de atitude ou intenção o avaliador expressa sua vontade de consumir ou comprar um produto que lhe é oferecido. As escalas mais comumente utilizadas são as verbais de cinco (5) e sete (7) pontos. Os termos da escala de atitude ou intenção podem variar de “provavelmente compraria” a “provavelmente não compraria”, com o ponto intermediário sendo “talvez compraria, talvez não compraria”. Recomenda-se que o número de provadores seja em torno de 60 (Nora, 2021).

Diversos estudos utilizam os métodos afetivos para avaliar a aceitação dos alimentos. Para avaliar a influência da massa de cacau subfermentada na produção de chocolate na aceitação dos consumidores, Andrade *et al.* (2021) utilizaram a escala hedônica de 9 pontos e a escala de 5 pontos para intenção de compra e contou com a participação de 75 provadores. Laaksonen *et al.* (2016) determinou as propriedades sensoriais e características do consumidor que contribuem para o gosto por frutas vermelhas por meio de 88 provadores usando a escala hedônica de 9 pontos. No trabalho de García-Díez *et al.* (2022) a análise sensorial usando a escala hedônica de 9 pontos foi realizada por 100 painelistas para avaliar a aceitação de uma mistura de cacau e alfarroba como um alimento funcional.

3.9 Métodos de conservação

A produção de alimentos precisa envolver processos seguros que garantam a segurança do produto final para o consumo. Essa abordagem é fundamental para prevenir doenças transmitidas por alimentos e prolongar a vida útil dos produtos, minimizando a presença de microrganismos que causam deterioração. Portanto, selecionar o método de conservação apropriado para cada tipo de produto representa um grande desafio (Priyadarshini; Priyadarshini, 2018).

A indústria de alimentos, utiliza tanto tecnologias térmicas quanto não térmicas, bem como a combinação de tecnologias. Entre essas, a pasteurização e a esterilização térmica destacam-se como métodos amplamente empregados para a preservação de sucos de frutas (Dolas; Saravanan; Kaur, 2019). Entretanto, tecnologias não térmicas, como o processamento de alta pressão, processamento por campo elétrico pulsado e processamento por ultrassom podem ser utilizadas para processar alimentos de forma minimamente invasiva em baixas temperaturas, preservando melhor suas propriedades nutricionais e vem se tornando cada vez mais comercialmente disponível para a indústria (Putnik *et al.*, 2019).

3.9.1 Pasteurização

O processamento térmico por pasteurização foi desenvolvido por Louis Pasteur, um cientista e biólogo francês, em 1863, e se tornou um método tradicional, usado para a conservação e para extensão da vida útil de alimentos e bebidas através da inativação de microrganismos e enzimas. Essa técnica assegura a conservação e segurança de produtos como leite e seus derivados, ovos e sucos de frutas (Dolas; Saravanan; Kaur, 2019; Putnik *et al.*, 2019; Singh; Pandey; Manik, 2024).

A pasteurização pode ser classificada em lenta, rápida e muito rápida. A pasteurização lenta (LTLT - *Low Temperature Long Time*) é realizada a temperaturas entre 62 e 63 °C por um período prolongado de 30 a 35 minutos. A pasteurização rápida (HTST - *High Temperature Short Time*) utiliza temperaturas mais altas, entre 72 e 75 °C, por um intervalo curto de 15 a 20 segundos. Já a pasteurização muito rápida (UHT - *Ultra High Temperature*) aplica temperaturas muito elevadas, variando de 130 a 150 °C, por um tempo extremamente curto, entre 2 e 4 segundos. Entretanto, a intensidades do tratamento por pasteurização, assim como o tempo e a temperatura do processo, levam à degradação de nutrientes sensíveis ao calor, componentes bioativos e ao

comprometimento do sabor fresco (Barbosa *et al.*, 2018; Knorr *et al.*, 2011). Enquanto a esterilização térmica consiste no aquecimento de alimentos a temperaturas entre 110°C e 125°C, com o objetivo de garantir a eliminação de bactérias formadoras de esporos (Bhunja *et al.*, 2024).

A pasteurização pode ser combinada com aditivos para melhorar a estabilidade do produto durante o armazenamento, aumentando a vida útil e preservando a cor, sabor, textura e valor nutricional dos alimentos. Os aditivos também podem contribuir para a criação de um ambiente menos favorável à proliferação de microrganismos, aumentando assim a segurança do produto. Os conservantes mais utilizados em alimentos incluem propionatos, ácido sórbico e seus sais, ácido benzoico e seus sais, dentre outros (Torrezan, 2021).

Diversos autores aplicaram a pasteurização térmica na preservação de frutas e sucos de frutas. Gao *et al.* (2021) empregou a pasteurização (65 °C por 30 min) em suco de Ougan. Marszałek *et al.* (2017) usou a pasteurização (90°C por 15 min) em purê de morango armazenados a 6°C durante 12 semanas. Sucos de maçã, laranja e abacaxi foram pasteurizados a 70 °C por 30 min e avaliados nos dias 0, 7, 14 e 21 de armazenamento refrigerado a 4°C (Alim *et al.*, 2023). Além disso, a polpa de cacau congelada pasteurizada recebeu recentemente a aprovação da Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) quanto à sua segurança, visando sua comercialização na Comunidade Europeia (CE) (EFSA, 2019).

Essa busca por métodos eficazes de preservação reflete uma crescente demanda por produtos alimentícios sem aditivos, com prazos de validade prolongados, sabores frescos, alta qualidade nutricional e segurança microbiológica. Esse cenário tem impulsionado o desenvolvimento de novas tecnologias de processamento (Atuonwu *et al.*, 2018).

De acordo com Nonglail *et al.* (2022) alguns estudos têm demonstrado que tratamentos térmicos podem alterar a estrutura dos nutrientes e reduzir o conteúdo de compostos bioativos. Assim, há um crescente interesse em aplicar métodos de conservação de alimentos que sejam verdes e sustentáveis, visando promover a segurança alimentar e preservar suas características naturais. Portanto, é fundamental investigar novas tecnologias não térmicas que ajudem a preservar os nutrientes e as características funcionais dos alimentos.

3.9.1 Ultrassom (US)

Entre as tecnologias não térmicas, o ultrassom (US) se expandiu de maneira significativa na última década, encontrando aplicação na indústria de alimentos e bebidas por seus efeitos multifuncionais desejados. Além disso, é reconhecido como uma técnica promissora para atender aos requisitos de segurança da FDA (*Food and Drug Administration*) para frutas e produtos vegetais. A descoberta do ultrassom remonta a 1880, quando Pierre Curie conduziu estudos sobre o efeito piezoelétrico (Dolas; Saravanan; Kaur, 2019; Shankar; Pagel, 2011).

O processamento por ultrassom pode ser empregado tanto isoladamente quanto em combinação com outros métodos, proporcionando uma melhoria significativa na qualidade dos alimentos. Entre as diversas aplicações do ultrassom no setor alimentício, destacam-se o congelamento, descongelamento, secagem, homogeneização, filtração, emulsificação, extração e aumento da vida útil dos produtos (Chavan *et al.*, 2022). Ao longo dos anos, além da área de alimentos, o ultrassom tem sido utilizado em várias áreas, incluindo a detecção de imperfeições em construções, a síntese de produtos químicos, comunicação com animais e aplicações na medicina, tanto para diagnóstico quanto para tratamento de doenças (Lepaus *et al.*, 2023).

É considerada uma tecnologia emergente formada por ondas sonoras cuja frequência está além do limite da audição humana, entre 20 kHz e 100 kHz. Essa tecnologia é acessível, simples, confiável, ecológica e altamente eficaz na preservação de alimentos, sem necessidade de aditivos, melhorando seus atributos de qualidade, incluindo a redução da perda de sabor quando comparada ao tratamento térmico (Awad *et al.*, 2012; Dolas; Saravanan; Kaur, 2019). Além disso, essa tecnologia pode diminuir o tempo de processamento em comparação com os métodos térmicos, apresenta baixos custos operacionais devido ao seu baixo consumo de energia e ajuda a reduzir o uso de água, o que, por sua vez, diminui o descarte de águas residuais (Lepaus *et al.*, 2023).

A aplicação do ultrassom na indústria alimentícia é classificada em duas abordagens: baixa e alta energia, dependendo da potência sonora (W), da intensidade sonora (W/m^2) ou da densidade de energia sonora (Ws/m^3) empregadas. Frequências de ultrassom superiores a 100 kHz e intensidades abaixo de $1 W/cm^2$ são recomendadas para aplicações de baixa energia, pois normalmente não alteram as propriedades físicas ou químicas do material por onde se propagam. Em contrapartida, as aplicações de alta energia (ultrassom de alta potência) utilizam frequências entre 20 e 100 kHz, com

intensidades mais elevadas, na faixa de 10 a 1000 W/cm², capazes de alterar as propriedades físico-químicas ou a estrutura do material, sendo utilizada na inativação de microrganismos e enzimas (Chavan *et al.*, 2022; Lepaus *et al.*, 2023).

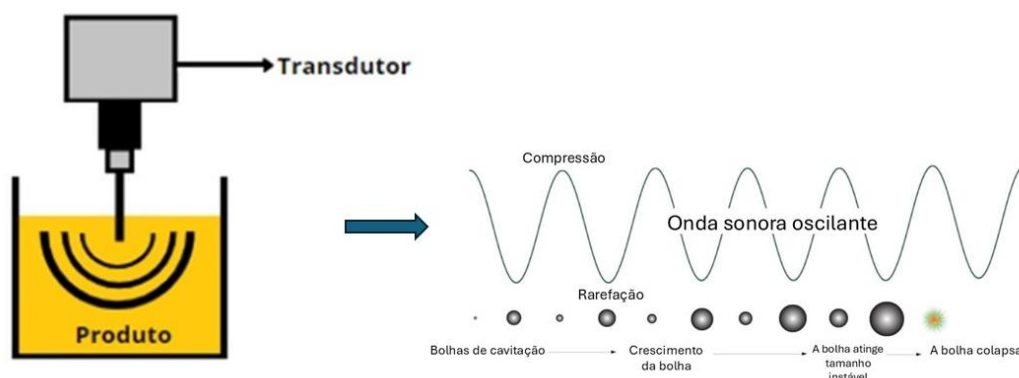
As técnicas de ultrassom podem ser combinadas com tratamentos de pressão e temperatura para aumentar a eficiência dos processos. A ultrassonicação aplica ultrassom em baixas temperaturas a produtos sensíveis ao calor, enquanto a sonicação combina ultrassom e calor, inativando microrganismos de forma mais eficaz do que o calor isoladamente. A manosonicação envolve ultrassom com pressão, oferecendo maior eficiência de inativação. Já a manotermosonicação combina calor, ultrassom e pressão, maximizando a implosão da cavitação e aumentando a inativação (Chavan *et al.*, 2022; Ravikumar, 2017).

O sistema de ultrassom é composto por três elementos principais: gerador, transdutor e emissor. O gerador converte o sinal elétrico em uma frequência específica, o transdutor transforma esse sinal elétrico de alta frequência em vibrações mecânicas, e o emissor irradia essas vibrações mecânicas (Mehta *et al.*, 2022).

No setor alimentício, a aplicação de ultrassom em meio líquido é o procedimento mais simples e amplamente utilizado. Quando o ultrassom é aplicado a um líquido, o fenômeno que gera os efeitos desejados é a cavitação. Esse processo ocorre quando microbolhas no líquido aumentam de tamanho devido aos ciclos de alta e baixa pressão das ondas ultrassônicas, contraindo-se durante a compressão e expandindo-se durante as rarefações, tornando-se instáveis e estourando (Figura 8), liberando assim uma quantidade significativa de energia (Leong *et al.*, 2011).

De acordo com São José *et al.* (2014), a cavitação acústica gerada provoca a destruição da estrutura da parede celular, o aumento da permeabilidade da membrana celular, o afinamento da membrana, além de gerar altas temperaturas e pressões locais, a energia liberada gera radicais livres que se convertem em peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O estresse oxidativo resultante pode danificar o DNA das células, levando à inativação dos microrganismos.

Figura 8 – Mecanismo de ação do ultrassom em meio líquido.



Fonte: Adaptado de Leong *et al.* (2011)

De modo geral, o tratamento com ultrassom pode ser um método eficaz e sustentável para eliminar bactérias patogênicas, preservando as características físico-químicas do mel de cacau. Até onde sabemos, ainda não há artigos científicos que investiguem seus efeitos no perfil de qualidade do mel de cacau. No entanto, o ultrassom já é amplamente utilizado na conservação de sucos de frutas, ajudando a preservar suas propriedades funcionais e sensoriais (Roobab *et al.*, 2023).

Bhat e Goh *et al.* (2017) constataram que o tratamento por ultrassom do suco de morango elevou o conteúdo total de compostos fenólicos em 83%, o ácido ascórbico em 13% e a capacidade antioxidante total em 1 a 2% após 30 minutos de processamento. Hasheminya e Dehghannya (2022) ao estudar suco de cenoura preta tratado com US com 50% de amplitude durante 4, 8 e 12 minutos, notou aumento no conteúdo fenólico, no ácido ascórbico e nas propriedades antioxidantes. A ruptura celular provocada pela cavitação contribui para a liberação de compostos bioativos. Além disso, a cavitação elimina o oxigênio dissolvido no suco, ajudando a prevenir a oxidação. Essas descobertas indicam que o tratamento por ultrassom é uma tecnologia promissora para prolongar a vida útil dos sucos, preservando seu conteúdo bioativo (Roobab *et al.*, 2023). No entanto, para a sua utilização em escala industrial ainda é uma técnica que enfrenta desafios devidos aos custos de aquisição e manutenção.

4. RESULTADOS

Como resultados da presente tese foram produzidos três (3) artigos publicados (DOI: <https://doi.org/10.1007/s12161-024-02640-7>; <https://doi.org/10.3390/molecules29133194>; <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.143057>) e outros (2) manuscritos, um submetido e outro em processo de submissão. Além de uma cartilha técnica (ISBN 9786501202990).

4.1

Manuscrito: Potencial funcional e tecnológico de subprodutos da cadeia produtiva do cacau (Theobroma cacao L.)

POTENCIAL FUNCIONAL E TECNOLÓGICO DE SUBPRODUTOS DA CADEIA PRODUTIVA DO CACAU (*Theobroma cacao* L.)

Periódico submetido:	<i>Current Opinion in Food Science – ISSN 2214-8000</i>
Maior percentil (Scopus):	97%

Resumo

O cacau é uma das culturas mais cultivadas globalmente e serve como ingrediente principal na produção de chocolate, que gera quantidades substanciais de subprodutos. Esta revisão tem como objetivo investigar o potencial funcional e tecnológico de subprodutos da cadeia produtiva do cacau. Subprodutos como casca do fruto, casca do grão de cacau, polpa e mel podem ser utilizados como matéria-prima para o desenvolvimento de produtos inovadores e de valor agregado devido à sua notável composição de nutrientes e compostos bioativos. A valorização dos subprodutos do cacau pode aumentar a renda dos pequenos agricultores e aumentar o interesse da indústria alimentícia em incorporar esses substratos como ingredientes alternativos. Assim, transformar subprodutos do cacau em matérias-primas cria oportunidades de crescimento econômico, reduz o impacto ambiental e promove a inovação na indústria de alimentos.

Palavras-chave: Desenvolvimento sustentável; casca de cacau; polpa de cacau; mel de cacau; casca de grão de cacau.

1. Introdução

O cacau (*Theobroma cacao* L.), um membro da família Malvaceae, é conhecido como o "alimento dos deuses" [1]. É cultivado em mais de sessenta países, cobrindo cerca de 11,54 milhões de hectares [2]. De acordo com a Organização Internacional do Cacau [3], a produção global é de aproximadamente 4,5 milhões de toneladas de grãos de cacau, com os países africanos liderando com 71,2%. Costa do Marfim e Gana são os maiores produtores. A produção anual do Brasil é de aproximadamente 296 mil toneladas, posicionando-o como o sexto maior produtor global, com os estados da Bahia e Pará respondendo pela maior parte da produção [4].

O cacau possui inúmeros benefícios para a saúde devido às suas propriedades antioxidantes, antiproliferativas, anti-inflamatórias e anticancerígenas, bem como vários fitoquímicos, incluindo polifenóis [5]. O fruto compreende a casca, a amêndoa e a polpa,

que constituem aproximadamente 70%, 20% e 10% de todo o fruto, respectivamente. O cacau é um importante produto global e o principal ingrediente na produção de chocolate, enquanto a casca do cacau, a polpa, o mel e a casca do grão são considerados subprodutos (Fig. 1) [6,7].

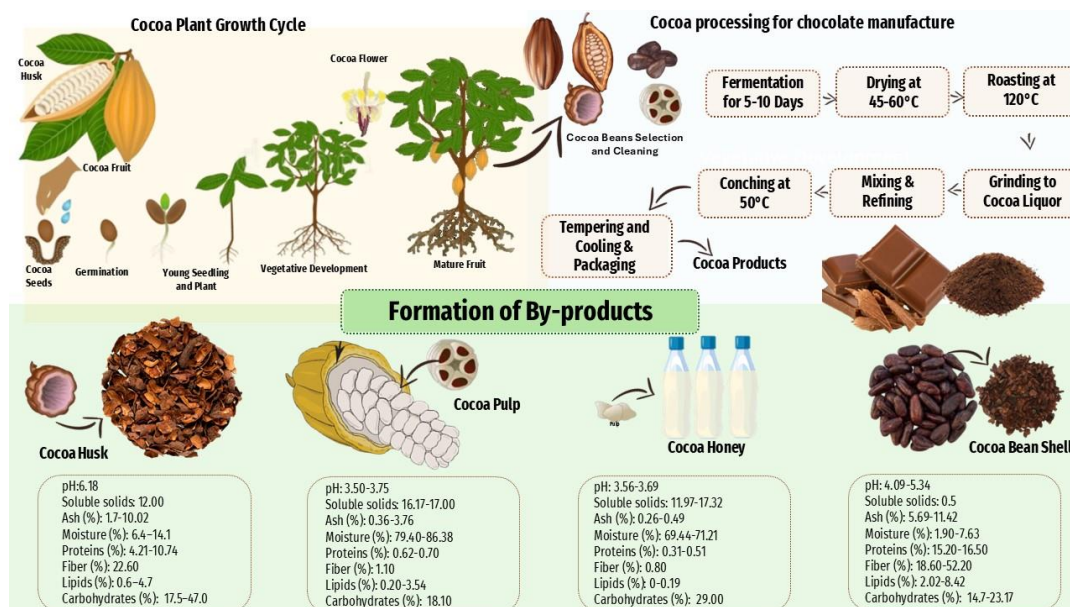


Figura 1. Ciclo de crescimento da planta do cacau, processamento do cacau para fabricação de chocolate, formação de subprodutos do cacau e suas propriedades físico-químicas.

A indústria alimentícia gera cerca de 700.000 t de resíduos anualmente durante o processamento do cacau, a grande maioria dos quais é descartada na própria fazenda, levando a desafios ambientais e socioeconômicos significativos [8,9]. No entanto, com o tratamento adequado, esses resíduos podem ser transformados em matérias-primas de alto valor para o desenvolvimento de novos produtos e utilizados como fontes de nutrientes essenciais e compostos bioativos [1].

As cascas do fruto do cacau são o principal subproduto da indústria do cacau. Estima-se que cada tonelada de grãos de cacau secos gere aproximadamente 10 t de cascas [10]. As cascas de cacau têm uma composição rica em lignina e polissacarídeos não amiláceos, como celulose, hemicelulose e pectina. Seu uso possui valor comercial significativo, servindo como matéria-prima barata para a extração de vários componentes e como potencial fonte de biocombustível [1,11].

Durante a fermentação, os açúcares da polpa do cacau são metabolizados e desempenham um papel crucial no processo. A polpa normalmente contém 76% de açúcares, incluindo glicose, frutose e sacarose, bem como oligossacarídeos, como celooligosacarídeos, com seu potencial prebiótico recentemente demonstrado por ensaios de

digestibilidade *in vitro* [12]. O mel de cacau, um líquido mucilaginoso obtido pela prensagem de sementes com polpa de cacau fresca, é caracterizado como um produto ácido com altos níveis de sólidos solúveis, açúcares e um valor energético notável (113,58–120,53 kcal / 100 mL) [7, 13]. Além disso, seu alto teor de zinco, juntamente com a presença de magnésio e potássio e baixos níveis de sódio, pode tornar seu uso como alimento nutritivo ou ingrediente natural para o desenvolvimento de bebidas de alto teor calórico.

A casca do grão de cacau, um subproduto gerado durante os processos de pré-torrefação e torrefação do cacau, tem atraído um interesse significativo devido ao seu alto teor de fibras, minerais, catequina, teobromina e epicatequina, bem como ao seu baixo custo [5]. Também pode ser usado na produção de alimentos nutracêuticos ou funcionais e demonstrou potencial na sensibilização de células cancerígenas humanas [14].

A necessidade de um novo artigo de revisão sobre os subprodutos da cadeia produtiva do cacau se baseia na evolução substancial da pesquisa científica nessas áreas, bem como na escassez de estudos que abordem o mel de cacau ao lado de outros subprodutos da cadeia produtiva. Além disso, o campo avançou a tal ponto que as revisões anteriores não refletem mais adequadamente as descobertas e tendências mais recentes. Portanto, uma nova revisão é crucial para consolidar e atualizar o conhecimento existente, servindo de base para futuras pesquisas e inovações.

Portanto, a valorização desses subprodutos pode ajudar a mitigar questões ambientais e aumentar a sustentabilidade da cadeia produtiva do cacau. Eles podem ser usados como ingredientes no processamento de alimentos, bem como nas indústrias farmacêutica e cosmética [14]. Esta revisão tem como objetivo destacar o potencial funcional e tecnológico dos subprodutos da cadeia produtiva do cacau (*Theobroma cacao* L.), incluindo a casca do fruto, a polpa do cacau, o mel de cacau e a casca do grão de cacau.

2. As aplicações potenciais dos subprodutos do cacau

2.1 Casca do fruto

A casca do fruto é o principal subproduto da cadeia de processamento do cacau, compreendendo aproximadamente 67–76% (m/m). Consiste em três camadas distintas: epicarpo, mesocarpo e endocarpo, e é composto principalmente de polissacarídeos como celulose, hemicelulose, lignina e pectina [15]. Este subproduto representa um desafio

significativo para a indústria do cacau, pois é normalmente descartado ou, em alguns casos, parcialmente usado como fertilizante para solos agrícolas [16]. Embora alguns estudos tenham relatado métodos ecologicamente corretos para a reutilização da casca do cacau [17, 18], quantidades excessivas dessa biomassa e práticas de manejo inadequadas podem promover o crescimento de fungos indesejáveis em culturas agrícolas ou causar alterações químicas e microbiológicas na composição do solo devido aos altos níveis de matéria orgânica [19].

A casca do cacau contém compostos bioativos, notadamente catequina (27,66–31,29 mg g⁻¹) e epicatequina (89,97 mg g⁻¹) (Tabela 1), sugerindo novas aplicações potenciais no setor de saúde [20]. Devido ao seu alto teor de óxido de potássio, a casca do cacau também se mostra promissora para a produção de biodiesel, pois esse composto pode atuar como catalisador. Este subproduto foi calcinado com sucesso para produzir um material heterogêneo com óxido de potássio como componente principal [21]. Uma taxa de conversão de biodiesel de aproximadamente 96% foi alcançada sob condições de reação de 20 minutos, 7% em peso de carga do catalisador, uma razão molar de 1:15 e uma velocidade de rotação de 6000 rpm. A produção de biodiesel aprimorada por homogeneizador usando casca de cacau residual como catalisador demonstrou uma eficiência de tempo de reação 65-87% maior do que a relatada em outros estudos, apresentando um novo método para produção de biodiesel à temperatura ambiente usando uma matéria-prima barata.

Uma tendência tecnológica na utilização de resíduos agroindustriais é a síntese de biochar para aplicações ambientais. Nesse contexto, o biochar derivado da casca do cacau, produzido por pirólise assistida por micro-ondas a 720 W por 15 minutos, demonstrou ser um adsorvente eficaz para íons Cd²⁺ em soluções aquosas [22] e exibiu propriedades físico-químicas e morfológicas favoráveis, incluindo uma estrutura porosa bem estruturada e uma área superficial moderada. Essa abordagem sustentável destaca o potencial de conversão de resíduos da cadeia produtiva do cacau em um material eficiente com potenciais aplicações na purificação de água.

A extração de polissacarídeos de cascas de cacau foi relatada recentemente, atingindo um rendimento máximo de aproximadamente 20% após 5 horas, resultando em um extrato em pó bruto marrom-avermelhado [23]. Esses polissacarídeos extraídos exibiram propriedades promissoras, particularmente na hidratação, e foram confirmados como seguros para uso cosmético por meio de ensaios de citotoxicidade. Embora suas atividades antioxidantes e antiglicação fossem inferiores às das referências padrão, o

extrato demonstrou potencial suficiente para ser formulado e clinicamente testado como ingrediente cosmético. As avaliações clínicas confirmaram que essas formulações eram seguras e eficazes na manutenção da hidratação da pele e na redução da perda de água transepidérmica. Essas descobertas sugerem que os polissacarídeos extraídos de resíduos de casca de cacau podem ser usados como ingredientes alternativos e seguros em produtos cosméticos [23]. Além disso, a pectina pode ser obtida usando o método de extração de água subcrítica (SWE), alcançando um rendimento de 6,58% em condições de 120 °C, 10 minutos e uma proporção sólido-líquido de 1:15 g/mL [16]. A pectina extraída por meio dessa tecnologia emergente apresentou maior grau de esterificação, teor de metoxila e índice de ácido anidrouônico, além de propriedades térmicas e químicas interessantes. Este método ecológico mostra um grande potencial para a produção de pectina de alta qualidade para a indústria alimentícia, embora sejam necessárias mais pesquisas sobre escalabilidade e dinâmica de sistemas.

Em relação à sua aplicação no campo biotecnológico, a casca do cacau foi utilizada como substrato em um novo processo para produzir compostos orgânicos oxigenados de baixo peso molecular por meio de tratamentos sequenciais e fermentação [24]. Neste estudo, os surfactantes demonstraram aumentar a hidrólise enzimática, enquanto a suplementação de L-cisteína melhorou a fermentação com *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. O processo ótimo, envolvendo despectinação, deslignificação e adição de surfactante, alcançou as maiores concentrações de biobutanol (20,4 g L⁻¹) e acetona-butanol-etanol (54,4 g L⁻¹) usando células imobilizadas e L-cisteína, o que aumentou a viabilidade celular e a atividade enzimática. Anteriormente, uma abordagem de biorrefinaria foi aplicada para extração de pectina, xilooligossacarídeos (XOS) e produção de bioetanol usando casca de cacau como substrato por meio de pré-tratamento hidrotérmico assistido por ácido cítrico [25]. Em condições ideais de 120 °C, 10 minutos e 2% de ácido cítrico, foi alcançado um rendimento de aproximadamente 19,5% de pectina. A fração líquida continha 50,4 mg/g de XOs e 69,7 mg/g de açúcares fermentescíveis. A hidrólise enzimática da fração sólida resultou em 60% de conversão de glucano. Além disso, hidrolisados hidrotérmicos e enzimáticos de casca de cacau foram utilizados para a produção de bioetanol por *Candida tropicalis* e *Saccharomyces cerevisiae*, produzindo 30,9 g kg⁻¹ e 45,2 g kg⁻¹ de bioetanol, respectivamente. Este método de pré-tratamento rápido e ecologicamente correto oferece um processo promissor para extração de pectina, XOS e produção de bioetanol de segunda geração, com potencial significativo para aplicação nos setores de alimentos e bioenergia. Esses

estudos demonstram abordagens eficientes e econômicas para converter a casca do cacau em bioprodutos valiosos.

2.2 Polpa de cacau

A polpa do cacau é uma camada branca, fibrosa, mucilaginosa, úmida, doce e adstringente que envolve as sementes da fruta. Em seu estado natural, consiste principalmente em água (80%), 10-15% de açúcares (glicose, sacarose e frutose), pectina, proteínas, ácido cítrico e sais inorgânicos. Seu pH varia de 3,3 a 4,0 devido à presença de ácido cítrico [26]. Com maior teor de fibra solúvel (16,06–16,11 g/100 g de peso seco), essa mucilagem de cacau apresenta potencial como produto de interesse no mercado de alimentos devido aos seus benefícios à saúde [1].

A polpa do cacau é um componente chave da fruta usada para obter produtos como mel de cacau e grãos de cacau, que são vendidos em todo o mundo, resultantes da fermentação através da hidrólise da mucilagem [27]. Essa polpa, que representa 10% do peso total do cacau, também é utilizada em diversas aplicações alimentícias, incluindo a produção de subprodutos como bebidas, sucos, álcool, geleias, chocolate, doces, preparados de frutas e extração de mel de cacau (Fig. 2), contribuindo de forma sustentável para a cadeia produtiva do cacau [28, 29].

Tabela 1. Compostos bioativos encontrados em subprodutos da cadeia produtiva do cacau (*Theobroma cacao* L.).

Compostos bioativos	Casca do fruto	Polpa de cacau	Mel de cacau	Casca do grão de cacau
Ácido clorogênico	-	-	-	0,001824 (g/100g) [9]
Ácido gálico	-	-	-	2,02x10 ⁻⁶ (mg/100 g) [32]
Ácido cafeico	-	-	-	1,57x10 ⁻⁴ (mg/100g) [32]
Cafeína	-	-	-	0,04 – 0,42 (g/100g) [8]
Teobromina	-	0,00065 (%) [26]	-	16,43 (mg g ⁻¹) [33]
Catequina	27,66-31.29 (mg g ⁻¹) [20]	-	-	0,18-4,50 (mg g ⁻¹) [1]
Epicatequina	89,97 (mg g ⁻¹) [20]	-	-	108,4 (µg g ⁻¹) [34]
Resveratrol	-	-	-	12,1 (µg g ⁻¹) [34]
Compostos fenólicos ^a	9,29 (mg EAG g ⁻¹) [20]	-	424,3 mg GAE g ⁻¹ [31]	95,00 (mg GAE/100g) [32]
Flavonóides ^b	49,93 (CE g ⁻¹) [30]	-	-	1,65–40,72 (mg CE g ⁻¹) [1]

^aCompostos fenólicos expressos por compostos fenólicos totais; ^bFlavonóides expressos pelo ensaio de flavonóides totais.



Figura 2. Aplicações de subprodutos do cacau em diferentes setores, incluindo alimentos, cosméticos, ração animal e biotecnologia.

Tal como acontece com os grãos de cacau, a composição da polpa do cacau pode ser influenciada por sua origem botânica. Recentemente, um estudo relatou que a polpa do cacau contém 76% de açúcar, principalmente na forma de açúcares redutores (glicose, frutose), com níveis variando de 695,94 a 857,03 g kg⁻¹ em base seca, dependendo do genótipo, o que representa aproximadamente 12% do açúcar total em base úmida [12]. Além disso, este subproduto oferece valor nutricional significativo devido à sua variedade e altas concentrações de vitaminas (B, C, D e E) e minerais (Ca, Fe, K, Mg e Zn) [35]. A polpa do cacau desempenha um papel importante na fermentação do cacau devido à sua alta concentração de açúcar, servindo como substrato para reações microbianas [36, 37]. A quantidade presente nas sementes de cacau está associada a variações na composição química e na qualidade organoléptica do cacau.

Devido à sua composição nutricional favorável (por exemplo, vitaminas, minerais, carboidratos e fibras) e compostos bioativos (por exemplo, compostos fenólicos), combinados com seu sabor agradável, a polpa de cacau tem sido reconhecida como um substrato benéfico para probióticos e o desenvolvimento de bebidas funcionais. Um estudo usando suco de polpa de cacau para produzir uma bebida probiótica inoculada com *Lactobacillus casei* resultou em uma matriz microbiana viável que preservou

compostos fenólicos e atividades antioxidantes, oferecendo potenciais benefícios à saúde [38]. Além disso, a mucilagem da polpa do cacau foi incorporada como um novo ingrediente na produção fermentativa do kombuchá, com a bebida feita a partir da polpa da variedade de cacau Nacional (40 g L⁻¹ de açúcar) sendo a combinação ideal para parâmetros sensoriais como sabor, textura e doçura [39].

Expandindo a aplicação da polpa de cacau em bebidas alcoólicas, ela era usada anteriormente como coadjuvante na produção de cerveja em diferentes concentrações [35]. Os resultados mostraram que a polpa do cacau pode ser utilizada como um ingrediente interessante para aumentar a concentração de sólidos solúveis no mosto, contribuindo para a fermentação e conferindo características organolépticas distintas. A concentração de açúcares redutores melhorou a composição nutricional do mosto e influenciou a formação de subprodutos que afetaram o sabor, aroma e características sensoriais da cerveja [35]. Além de seu uso em alimentos, a polpa do cacau tem sido analisada quanto ao seu potencial energético para produzir bioetanol como aditivo à gasolina, por meio da fermentação do cacau com levedura *Saccharomyces cerevisiae* [40].

A pasteurização e o tratamento com temperatura ultra-alta (UHT) são tecnologias de preservação eficazes, pois inativam microrganismos e enzimas, causando alterações mínimas nas características sensoriais, prolongando assim a vida útil da polpa do cacau [41]. Portanto, as potenciais aplicações alimentares da polpa de cacau destacam a versatilidade deste produto para o desenvolvimento de novos alimentos funcionais, dados seus atributos nutricionais e sensoriais. A incorporação dessa mucilagem ao mercado não apenas impulsiona a economia do país, mas também fornece aos produtores de cacau uma fonte de renda adicional e alternativa.

2.3 Mel de cacau

A prensagem da polpa natural do cacau produz um subproduto conhecido como mel de cacau, um líquido mucilaginoso amarelo opaco rico em pectina e minerais com propriedades antioxidantes. Este subproduto é significativo para a economia devido ao seu considerável potencial comercial na indústria alimentícia. Devido ao seu sabor adocicado, é chamado de "mel de cacau", pois se assemelha às características sensoriais do mel de abelha [6,7].

O mel de cacau é comercializado principalmente como suco congelado na América Central e do Sul. No entanto, a vida útil do mel de cacau fresco é notavelmente curta devido ao seu alto teor de açúcar e umidade, o que o torna altamente propenso à fermentação. Essa suscetibilidade torna sua comercialização, tanto no mercado interno quanto para exportação, particularmente desafiadora [23]. Nesse contexto, há a necessidade de desenvolver tecnologias e processos eficazes para prolongar a vida útil e garantir a estabilidade microbiológica e sensorial do mel de cacau, conforme relatado por diversos estudos nos últimos anos.

Os estudos primários sobre a composição química e o potencial bioativo do mel de cacau são baseados em pesquisas preliminares. Os compostos fenólicos totais no mel de cacau foram quantificados em 424,3 mg GAE g⁻¹ usando o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu [23] (Tabela 1). Em contraste, concentrações mais baixas foram observadas no licor de cacau [42]. É importante ressaltar que os açúcares redutores presentes no mel de cacau podem interferir nesse método analítico, podendo levar a uma superestimação do teor fenólico.

Considerando as informações limitadas disponíveis sobre a caracterização química do mel de cacau, estudos recentes têm fornecido análises mais abrangentes. Assim, as propriedades físico-químicas e o conteúdo mineral do mel de cacau de diferentes variedades de cacau (CCN51, PS1319, SJ02 e Parazinho) foram descritos pela primeira vez [13]. Os resultados mostraram que esse subproduto do cacau é ácido (pH 3,56–3,69), com baixo teor de proteína ($\leq 0,51\%$), alto teor de umidade ($>69,0\%$) e níveis elevados de sólidos solúveis (11,97–17,32 °Brix), açúcares totais (11,62–16,03 g/100 g) e valor energético (113,58–120,53 kcal/100 mL). Em termos de perfil mineral, foram identificados altos teores de zinco (3,01–18,8 mg kg⁻¹) e magnésio (132–198 mg kg⁻¹), juntamente com baixas concentrações de sódio (44,56–94,57 mg kg⁻¹). Essas características destacam o mel de cacau como um substrato promissor para o desenvolvimento de alimentos e bebidas inovadores, incluindo bebidas com alto teor calórico, adoçantes alternativos e substratos de fermentação [13] (Tabela 2).

Além disso, o estudo avaliou a ingestão diária recomendada (IDR), revelando que o consumo de 200 mL de mel de cacau fornece contribuições substanciais de zinco das variedades CCN51 e PS1319 (54,28% e 27,14%, respectivamente) [13].

Tabela 2. Perfil mineral de diferentes subprodutos do cacao (*Theobroma cacao* L.).

Elementos	Casca do fruto (mg kg ⁻¹)	Polpa de cacau (mg kg ⁻¹)	Mel de cacau (mg kg ⁻¹)	Casca do grão de cacau (%)
Al	-	1,74 [35]	0,15 (%) [43]	-
Ba	-	-	0,38 (%) [43]	-
Ca	0,30 [16]	54,00 [26]	38,61-56,59 [13]	0,23–0,44 [8]
Co	-	-	<0,57 [13]	2,35–6,62 [8]
Cr	-	0,97 [35]	<0,63 [13]	0,67 – 4,86 [8]
Cu	-	0,42 [35]	0,07 (%) [43]	29,2 (mg kg ⁻¹) [32]
Fe	-	3,39 [35]	1,08- 3,46 [13]	132,0 (mg kg ⁻¹) [32]
K	3,18 [16]	1700.00 [26]	512,79-1046.60 [13]	1,96 [32]
Mn	50,10 (mg kg ⁻¹) [16]	0,38 [35]	0,30 (%) [43]	36,2 (mg kg ⁻¹) [32]
Mg	0,22 [16]	237,23 [35]	132,08-198,16 [13]	0,48–1,29 [8]
Na	3,10 [16]	98,97 [35]	44,56-94,57 [13]	16,00 -192,20 [8]
Ni	-	-	1,45-1,97 [13]	-
P	0,19 [16]	365,80 [35]	-	0,55 [32]
Sr	-	-	0,62-0,76 [13]	-
Zn	56,26 (mg kg ⁻¹) [16]	1,90 [26]	3,01-18,76 [13]	2,75–19,00 [8]

Além disso, o mel de cacau mostrou-se bem aceito nas avaliações sensoriais devido às suas características físico-químicas favoráveis, como sabor adocicado e aroma frutado. O tipo e a variedade de mel de cacau (CCN51, PS1319, SJ02 e Parazinho) demonstraram influenciar o perfil sensorial, conforme avaliado por provadores treinados e não treinados [44]. As variedades SJ02, CCN51 e PS1319 demonstraram os mais altos níveis de aceitabilidade e intenção de compra, posicionando-as como promissoras para a indústria alimentícia. Essas descobertas sugerem que consumir mel de cacau ou incorporá-lo em produtos alimentícios pode melhorar o perfil nutricional dos alimentos, tornando-se uma opção benéfica para indivíduos que praticam atividades físicas, bem como para aqueles com doenças cardíacas e hipertensão [13].

Embora os estudos sobre a caracterização química do mel de cacau ainda estejam em seus estágios iniciais, as pesquisas sobre sua aplicação no desenvolvimento de bebidas estão aumentando. O mel de cacau tem sido investigado para produzir bebidas alcoólicas, como vinhos de frutas e bebidas funcionais no estilo kombucha [45, 46]. Também tem sido utilizado na produção de sucos, geleias e licores, muitas vezes por meio de métodos artesanais [7]. Além disso, o mel de cacau foi relatado como substrato para fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae*, resultando em uma nova bebida fermentada [43] (Fig. 2).

Um estudo recente relatou o desenvolvimento de chocolate usando subprodutos do cacau [47]. Os autores se concentraram na criação de um gel a partir de cascas de cacau combinadas com polpa de cacau e mel para substituir o açúcar no chocolate. Os resultados demonstraram que este chocolate possuía uma doçura comparável às variedades tradicionais, ao mesmo tempo que oferecia maior teor de fibras e menores níveis de gordura saturada. Essa abordagem inovadora representa um avanço significativo no processamento de subprodutos do cacau, promovendo a sustentabilidade ambiental e gerando novas oportunidades na indústria do cacau.

Além disso, a remoção de até 60% da polpa do cacau não afeta as propriedades sensoriais do chocolate, sugerindo que é viável extrair mel de cacau da polpa, aumentar o valor desse subproduto e ainda produzir chocolate de alta qualidade [48]. Devido à sua natureza altamente perecível, explorar métodos inovadores de preservação do mel de cacau é crucial para tornar esse substrato viável tanto para consumo direto quanto como matéria-prima para o desenvolvimento de novos produtos [41, 43]. Em termos de tecnologias de extensão da vida útil, a secagem por pulverização apresenta uma opção

viável para estabilizar produtos como o mel de cacau, pois envolve menor exposição ao calor em comparação com as técnicas convencionais de secagem [31].

Dentre todos os subprodutos do cacau, o mel de cacau é considerado um dos mais desafiadores devido às suas características de estabilidade química e microbiológica. No entanto, é evidente o potencial desse substrato como ingrediente para uso em bebidas destiladas e fermentadas, como adoçante e como insumo alternativo na fabricação de chocolates, entre outras aplicações. Portanto, novos estudos focados na preservação desse subproduto são essenciais e cruciais para sua utilização efetiva em escala industrial.

2.4 Casca do grão de cacau

Durante o processamento do chocolate, o grão de cacau passa por estágios de torrefação e descascamento, resultando em um subproduto conhecido como casca ou tegumento do grão de cacau [49, 50].

As cascas de grãos de cacau (CBS) foram por muito tempo consideradas resíduos e subvalorizadas, no entanto, essa perspectiva mudou [9]. A composição química e nutracêutica da CBS aumentou seu valor, com numerosos estudos demonstrando que a CBS é uma fonte de carboidratos, compostos bioativos, proteínas e fibras alimentares. Esses componentes extraídos são utilizados como substitutos de ingredientes e em formulações para alimentação humana e animal, contribuindo para o desenvolvimento de novos produtos. Além disso, a CBS é utilizado como fonte de bioenergia [34].

A CBS é responsável por aproximadamente 1-3% do peso total dos grãos de cacau, destacando que o processamento extensivo dos grãos resulta na geração de quantidades substanciais de cascas. A composição nutricional da CBS sustenta seu valor. Tem um pH de 4,09, acidez titulável de 11,4%, teor de sólidos solúveis de 0,5 °Brix e níveis relativamente baixos de cinzas (5,69%), umidade (7,63%) e lipídios (8,42%). Além disso, a CBS contém quantidades consideráveis de açúcares totais (61,80%), fibras totais (52,2%) e proteínas (16,50%) [32, 51, 52].

Conforme detalhado na Tabela 1, este subproduto contém vários compostos bioativos, incluindo cafeína (0,04-0,42 g/100g), teobromina (16,43 mg g⁻¹), catequina (1,31 mg g⁻¹), epicatequina (108,4 µg g⁻¹) e resveratrol (12,1 µg g⁻¹). Isso reflete uma variabilidade significativa na composição das cascas dos grãos de cacau. No entanto, vários fatores podem afetar a concentração desses compostos, como variedade de cacau,

origem geográfica, genótipo da planta, período de colheita e sistema de solvente utilizado para extração.

A composição das cascas dos grãos de cacau (CBS) é comparável à dos grãos de cacau, com diferenças notáveis no teor de lipídios (maior nos grãos) e no teor de fibras (predominante nas cascas) [8]. Em particular, o perfil químico e nutricional da CBS, especialmente seus compostos bioativos e teor de fibras, chamou a atenção devido aos seus benefícios associados à saúde. Isso inclui a redução dos riscos cardiovasculares, diminuindo os níveis de colesterol e triacilglicerol, mitigando os efeitos do diabetes, retardando a absorção de glicose e fornecendo propriedades antioxidantes que neutralizam os radicais livres, reduzem o estresse oxidativo e melhoram a função cognitiva [32, 53].

A aplicação de cascas de grãos de cacau é altamente diversificada. O pó da casca do grão de cacau e o extrato derivado desse subproduto são incorporados à formulação de vários alimentos funcionais, incluindo produtos de panificação, geleias, bebidas e salsichas (Fig. 2) [54]. Além de ser uma fonte de fibras, carboidratos, proteínas e compostos bioativos, as cascas dos grãos de cacau são notáveis por seu conteúdo mineral, incluindo fósforo, potássio, cálcio, manganês, cobre, ferro, magnésio, zinco, cobalto, sódio e cromo [8, 32], conforme descrito na Tabela 2. A composição mineral desse subproduto agrega valor, pois pode ser utilizado para enriquecimento ou fortificação em formulações de alimentos humanos e animais.

Muitos pesquisadores estão desenvolvendo técnicas para obter produtos funcionais enriquecidos com compostos encontrados nas cascas dos grãos de cacau. Os oligossacarídeos extraídos das cascas dos grãos de cacau podem ser incorporados aos chocolates. As formulações enriquecidas receberam as maiores classificações gerais de aceitação e intenção de compra do consumidor [55]. O pó de casca de cacau tem sido usado como substituto parcial da farinha de trigo em bolo de chocolate. Os autores demonstraram que a substituição de 75% da farinha de trigo por pó de CBS resultou em boa aceitação sensorial e melhorou as propriedades nutricionais do bolo de chocolate [32].

Avaliou-se o efeito da infusão da casca do cacau no processo de fermentação e na qualidade microbiológica do kombuchá. Os resultados mostraram uma diminuição significativa do pH ao longo da fermentação, indicando a acidificação da bebida devido à produção de ácidos orgânicos. Os autores recomendam o uso de cascas de grãos de cacau na produção de kombucha para reduzir o desperdício na indústria alimentícia e

como um substrato valioso para acelerar a fermentação, aumentando a presença de bactérias do ácido lático em comparação com o chá preto [56].

Foram desenvolvidas formulações de biscoitos usando polifenóis liofilizados e spray-dried extraídos de cascas de grãos de cacau, juntamente com partículas de isolado de proteína de soro de leite. Os resultados indicaram que ambos os métodos estabilizaram os compostos fenólicos, e os biscoitos exibiram maiores níveis de compostos antioxidantes e proteínas devido ao enriquecimento com pó de casca de cacau e proteína de soro de leite [53].

A lignina é um polímero natural encontrado nas cascas dos grãos de cacau [57]. A pesquisa destacou várias aplicações da lignina, agregando valor às indústrias alimentícia, de embalagens, de construção, ambiental e farmacêutica [58]. Nesse contexto, a extração assistida por micro-ondas e solventes eutéticos foram usados para extrair lignina de cascas de grãos de cacau, demonstrando um método novo e sustentável que permite o desenvolvimento de novos produtos com alto teor de lignina [59].

As cascas de grãos de cacau são uma alternativa potencial para o enriquecimento de rações [60]. Cascas de grãos de cacau foram incorporadas à ração de ovelhas para avaliar a influência dessa mudança na dieta na composição de queijos preparados com leite de ovelha. Os resultados mostraram um aumento no teor de gordura e na composição de ácidos graxos dos derivados de ruminantes, e a intensidade do odor, aroma e sabor dos queijos exibiu sensações de produtos defumados e torrados, demonstrando a influência da dieta animal na qualidade dos produtos de ruminantes [50].

3. Situação atual da inovação em subprodutos do cacau

O reaproveitamento de resíduos de subprodutos do cacau para o desenvolvimento de novos produtos de alto valor agregado é reconhecido como uma importante ação sustentável. Embora o chocolate, o principal produto do cacau, seja consumido globalmente, o potencial de reutilização de subprodutos do cacau tem recebido atenção limitada. Os principais subprodutos do cacau incluem casca de cacau, polpa de cacau, casca de grão de cacau e mel de cacau. Reconhecendo seu potencial de conversão em derivados valiosos, inúmeros avanços tecnológicos foram introduzidos nas últimas décadas, levando a uma atividade significativa de patentes. Dessa forma, foram realizadas extensas buscas nas principais bases de dados de patentes, como o Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), Google Patents, Espacenet Patent Search, Patentscope

(OMPI) e Lens e Derwent Innovation. Os resultados da pesquisa revelaram trinta e três documentos registrados nos últimos cinco anos protegendo o desenvolvimento e/ou uso de casca do fruto (12 patentes), polpa de cacau (5), mel de cacau (7), casca de grão de cacau (6), uma combinação de casca do fruto e casca do grão (1), casca, polpa e mel de cacau (1) e polpa e mel de cacau (1) (Tabela 3).

Tabela 3. Patentes que utilizam subprodutos da cadeia produtiva do cacau (*Theobroma cacao* L.).

Subprodutos	Data de publicação	País de invenção	Número da patente	Aplicação
Casca do fruto	2019	Índia	IN201941029712	Uma composição de chocolate disperso em hidrogel híbrido com baixo teor de gordura e resistente ao calor.
	2022	EUA	US20220039446A1	Uso de pó de casca de vagem de cacau como agente gelificante, espessante ou volumoso, e como substituto de sólidos de ovo em um produto comestível.
	2020	Brasil	BR1020180758667A2	Substrato para produção de ácido cítrico.
	2020	EUA	US20200253267	Invólucro de cacau para artigos para fumar.
	2021	Brasil	BR102020007453-9A2	Produção de carvão ativado a partir de resíduos de cacau usando vapor de água como agente ativador.
	2020	EUA	US20220256881	Pó de casca de vagem de cacau como aditivo potencial em composições alimentícias, farmacêuticas e cosméticas.
	2020	Brasil	BR1020180758675A2	Substrato para produção de ácido elágico.
	2022	Brasil	BR102020025630-0A2	Produção de ingredientes ricos em fibras e aplicação em alimentos.
	2022	Bélgica	BR112022 0186860A2	Composições alimentares que compreendem a casca da vagem de cacau.
	2023	Brasil	BR112023004733-1A2	Composição de produtos de confeitaria, agente de volume e produto alimentício.
	2024	Brasil	BR1020220223491A2	Aplicação de biocomposto a partir de casca de cacau e sua aplicação no tratamento de água e efluentes aquosos.
	2024	China	CN117751219	Material de embalagem de papel de cânhamo para alimentos.
	2021	Brasil	BR102019025711-3A2	Desenvolvimento de um processo inovador para polpa de cacau em pó.
Polpa de cacau	2019	EUA	US20200037630	Utilização potencial como ingrediente em géneros alimentícios.
	2022	EUA	US2022279807A1	Pó produzido com a tecnologia de secador por pulverização.
	2024	Brasil	BR102023001584-0A2	Processo de conversão de polpa de fruta em cristais de frutas doces.
	2024	Brasil	BR1020220227284A2	Processo de secagem da camada de espuma da polpa de cacau para obtenção do produto em pó.
	2020	Brasil	BR102019008742A2	Produção de cerveja artesanal usando mel de cacau como coadjuvante.
	2020	Brasil	BR1020180160613B1	Novo processo de produção de aguardente por meio da preparação, fermentação e destilação do mel de cacau.
	2020	Brasil	BR102019008531A2	Produção de mel de cacau em pó.

Mel de cacau	2020	Brasil	BR102019008474A2	Processo de produção de uma bebida obtida a partir do mel de cacau.
	2021	Brasil	WO2021123181A1	Melhor qualidade do grão de cacau por meio da tecnologia de fermentação aprimorada.
	2023	Brasil	BR102022009094A2	Formulações cosméticas de mel de cacau para uso no cabelo e na pele.
	2023	Bélgica	BR1120230132401A2	Aplicação no processo de fabricação de chocolate.
Casca do grão de cacau	2021	Brasil	BR102020003432-4A2	Processo de obtenção de nanocelulose a partir de cascas de grãos de cacau.
	2021	Brasil	BR102019006077-8A2	Processo de produção de um inibidor de corrosão em pó obtido a partir de cascas de grãos de cacau.
	2022	China	CN114469530	Toalha higiênica antibacteriana nano-prata.
	2023	Suíça	EP3701800 (B1)	A produção de casca de cacau em pó compreende a seleção e separação das cascas de cacau dos nibs, a lavagem das cascas de cacau com um agente quelante e a secagem das cascas de cacau.
	2024	China	CN116478555B	Pigmento natural marrom cacau com um valor de cor de 20-120 e seu método de preparação.
	2024	EUA	US20240298696A1	Material de cacau reconstituído para geração de aerossol.
Casca de cacau, polpa de cacau e mel de cacau	2020	Brasil	BR102019009487A2	Processo de produção de essências naturais, perfumes e colônias obtidas a partir do endocarpo da fruta, polpa ou mel de cacau.
Polpa de cacau e mel de cacau	2021	Brasil	BR102019020655-1A2	Processo de produção de aguardente a partir de cacau.
Casca de grão de cacau e casca do fruto	2023	China	CN116478556	Método para extrair o pigmento marrom da casca do cacau das cascas do grão de cacau.

De acordo com a (Fig. 3), 57,6% das patentes depositadas para subprodutos de cacau são brasileiras e 18,1% são americanas, indicando que o Brasil desempenha um papel significativo na inovação e desenvolvimento desses subprodutos, destacando-se como um dos principais centros de pesquisa neste campo. Com base na análise do número total de patentes, aproximadamente 52% foram depositadas por instituições privadas, 33% por instituições públicas e 15% de forma independente. Isso sugere que a maior parte da inovação neste setor vem do setor privado, embora instituições públicas e pesquisadores independentes também façam contribuições significativas. Além disso, houve um aumento constante no número de patentes depositadas ao longo dos anos, com um aumento notável em 2020, sinalizando um pico de inovação a partir desse período.

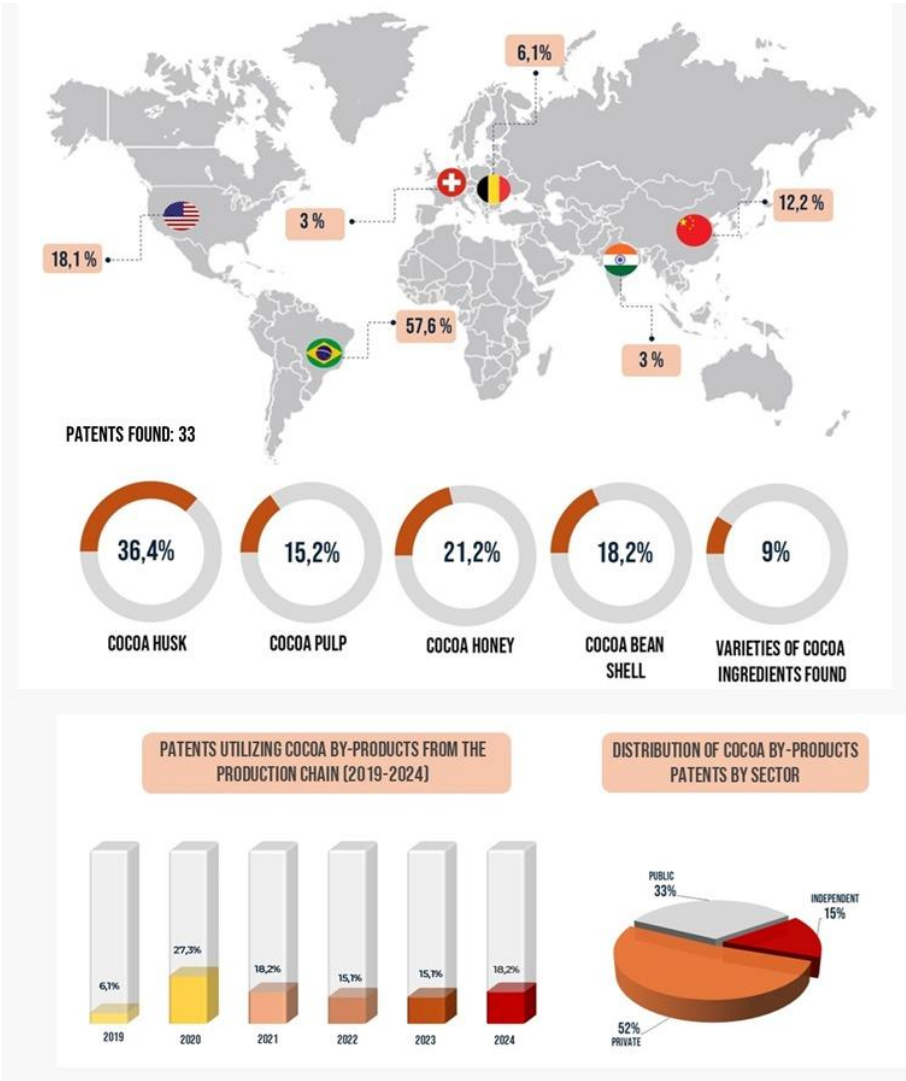


Figura 3. Distribuição global de subprodutos do cacau e tendências de patentes.

A maioria das patentes que abordam cascas de cacau se concentra em aplicações alimentícias, com exemplos notáveis como a patente americana US20220039446A1, publicada em 2022, que reivindica um método para fabricação de pó de casca de vagem de cacau para uso em produtos alimentícios como bolos, biscoitos e chocolate ao leite. Da mesma forma, a patente brasileira BR112023004733-1A2, publicada em 2023, descreve o desenvolvimento de uma composição de confeitaria com redução de açúcar e/ou vegana usando ingredientes à base de casca de cacau como agentes de volume. Outro uso inovador desse subproduto é descrito na patente brasileira BR102020007453-9A2 (2021), que detalha a produção de carvão ativado a partir de resíduos de casca de cacau. Esse carvão ativado é utilizado para adsorver compostos tóxicos em hidrolisados lignocelulósicos, servindo como meio de cultura em processos biotecnológicos.

Em relação à polpa de cacau, as patentes se concentram exclusivamente em aplicações alimentícias. Por exemplo, a patente US20200037630, registrada pela Nestlé em 2019 em vários países, descreve o uso de polpa de cacau seca ou seu extrato na produção de chocolate. O mel de cacau, por outro lado, demonstra potencial tanto na indústria alimentícia quanto na de cosméticos. A patente brasileira BR10202200909-4A2 (2023) prevê o desenvolvimento de formulações cosméticas para cabelos e pele incorporando mel de cacau ou seu extrato. Além disso, as patentes destacam a produção de bebidas destiladas e fermentadas, incluindo uma formulação de conhaque (BR102018016061-3B1) e cerveja (BR10201900874-2A2) que usam mel de cacau como ingrediente principal.

As diversas aplicações de produtos recém-desenvolvidos derivados de resíduos de subprodutos do cacau são bem ilustradas pela reutilização de cascas de grãos de cacau. Por exemplo, cascas de cacau têm sido usadas para produzir um pigmento de cacau marrom natural com intensidade de cor personalizável, variando de 20 a 120. A patente chinesa CN116478555B (2024) descreve um método para extrair pigmento de cascas de cacau por meio de uma série de etapas de extração e purificação, produzindo um produto estável, de alta pureza e baixa impureza, adequado para uso como corante alimentar. Outra invenção notável envolve a reutilização da casca do grão de cacau para criar um material gerador de aerossóis projetado para a entrega controlada de compostos ativos em produtos como fumar ou dispositivos "aquecer-não-queimar". A US20240298696A1 de patentes dos EUA (2024) descreve um novo produto para fumar no qual as fibras da casca do grão de cacau são combinadas com fibras de construção de teias. Quando aquecido, este material produz um aerossol suave e de sabor neutro, livre da aspereza tipicamente associada aos materiais tradicionais para fumar.

Da mesma forma, a patente suíça EP3701800(B1) (2023) descreve um método que usa resíduos de casca de cacau para criar um aditivo valioso que ajuda a prevenir a proliferação de gordura durante a produção de chocolate. Quando adicionado em quantidades que variam de 5% a 40% em peso, este aditivo reduz a ocorrência de fat bloom - uma camada esbranquiçada ou acinzentada que se forma no chocolate devido à migração e recristalização da gordura.

Esses exemplos destacam o potencial significativo dos subprodutos da produção de cacau para a inovação tecnológica na indústria e na academia. As patentes abrangem diversos campos, contribuindo para o desenvolvimento de novos produtos de mercado e agregando valor a substratos que muitas vezes são subutilizados em aplicações industriais.

4. Perspectivas para o reaproveitamento de subprodutos do cacau

Espera-se que a crescente adoção de práticas sustentáveis e o alcance dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável das Nações Unidas (ONU, 2024) impulsionem a reutilização de subprodutos do cacau para produzir produtos valiosos. Espera-se que o mercado de mel de cacau cresça, impulsionado por suas aplicações potenciais em vários produtos alimentícios, incluindo bebidas, doces e formulações farmacêuticas. Considerando a crescente demanda por fontes de energia renováveis, os subprodutos do cacau, como as cascas, apresentam alternativas viáveis para a produção de biocombustíveis. Além disso, esses subprodutos são promissores como matéria-prima para a produção de etanol de segunda geração, bem como para a geração de biochar e bio-óleo por meio da pirólise de cascas de cacau. Além disso, o biocarvão derivado de subprodutos do cacau pode ser utilizado para captura de dióxido de carbono e remediação da água e do solo, adsorvendo efetivamente metais tóxicos e poluentes orgânicos.

Portanto, dado o volume substancial de subprodutos do cacau gerados e os baixos retornos financeiros frequentemente recebidos pelos pequenos agricultores, os esforços para desenvolver usos de valor agregado para esses materiais são oportunos e necessários. Transformar esses subprodutos em compostos de alto valor pode aumentar a renda dos agricultores (ODS 1 – Erradicação da Pobreza) e contribuir para a segurança alimentar por meio do desenvolvimento de produtos ricos em nutrientes (ODS 2 – Fome Zero). Além disso, essas iniciativas se alinham com as metas de energia sustentável (ODS 7 – Energia Limpa e Acessível), apoiando a produção de biocombustíveis e energia renovável. Tais esforços também impulsionam o crescimento econômico (ODS 8 – Trabalho Decente e Crescimento Econômico), fomentam a inovação industrial (ODS 9 – Indústria, Inovação e Infraestrutura) e incentivam práticas responsáveis de produção e consumo (ODS 12 – Consumo e Produção

Responsáveis). Ao promover a colaboração entre as partes interessadas (ODS 17 – Parcerias para os Objetivos), a cadeia de valor do cacau pode ser transformada de forma sustentável, abordando os desafios ambientais e socioeconômicos, ao mesmo tempo em que avança os conceitos de economia circular e biorrefinaria.

5. Observações finais

O setor de produção de cacau gera uma ampla gama de subprodutos com composições químicas distintas, que podem ser aplicados nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética. Esses subprodutos contribuem para a economia circular, transformando resíduos em produtos de valor agregado, apoiando assim as metas globais de sustentabilidade. Além disso, os subprodutos do cacau têm sido utilizados no desenvolvimento de produtos e processos inovadores, devido à variedade de compostos bioativos e nutrientes que potencializam suas funcionalidades. Nesse contexto, a exploração desses subprodutos promove novas pesquisas sobre suas propriedades e aplicações, impulsionando avanços tecnológicos e científicos.

Declaração de disponibilidade de dados

Os autores afirmam que os dados que sustentam as descobertas do estudo estão acessíveis no artigo. Se os arquivos de dados brutos forem necessários em um formato diferente, eles podem ser obtidos com o autor correspondente mediante solicitação.

Declaração de interesse conflitante

Os autores declaram que não têm interesses financeiros concorrentes conhecidos ou relacionamentos pessoais que possam ter influenciado o trabalho relatado neste artigo.

6. Agradecimentos

MB Nascimento agradece à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa (Nº88887.504355/2020-00). JCG Alencar agradece à Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia (FAPESB) pela bolsa concedida (Processo nº 084.0508.2024.0001605-73).

7. Referências

Os artigos de particular interesse, publicados no período de revisão, foram destacados como:

- de interesse especial
- de interesse em circulação

1. • Soares TF, Oliveira MBPP. **Cocoa Byproducts: Characterization of Bioactive Compounds and Health Benefits.** *Molecules* 2022, 27:1625. <https://doi.org/10.3390/molecules27051625>.
Revisão da literatura abordando os benefícios para a saúde da casca da vagem de cacau, polpa de cacau e casca de grão de cacau.
2. FAOSTAT. **Food and Agricultural Organization of the United Nation Statistics Data.** <http://www.fao.org/fao-stat/en/#data/QC>, 2021 (accessed 28 July 2024).
3. International Cocoa Organization (ICCO). **Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics, Vol. L, No. 1, Cocoa Year 2023/24.** https://www.icco.org/wp-content/uploads/Production_QBCS-L-No.-1.pdf, 2024 (accessed on 23 July 2024).
4. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Levantamento Sistemático da Produç. Agrícola. IBGE/LSPA. Tabela 6588—Série Histórica da Estimativa Anual da Área Plantada, Área Colhida, Produç. e Rendimento Médio dos Produtos Agrícolas.** <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/cacau/br>, 2024 (accessed 23 November 2024).
5. Cinar ZO, Atanassova M, Tumer TB, Caruso G, Antika G, Sharma S, Sharifi-Rad J, Pezzani R: **Cocoa and cocoa bean shells role in human health: An updated review.** *J. Food Compos Anal* 2021, 103:104115. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104115>.
6. Indiarto R, Raihani ZR, Dewi MP, Aqila ZR, Efendi MY: **A review of innovation in the by-products of cocoa bean processing.** *IJETER* 2021, 9:1162–1169. <https://doi.org/10.30534/ijeter/2021/22982021>.
7. •• Guirlanda CP, Silva GG, Takahashi JA: **Cocoa honey: Agro-industrial waste or underutilized cocoa by-product?** *Future Foods* 2021, 4:100061. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2021.100061>.
Este artigo de revisão explora o mel de cacau como uma oportunidade subexplorada ou subutilizada, apresentando uma nova perspectiva sobre como ele pode ser valorizado como um recurso valioso, em vez de ser considerado apenas um subproduto.
8. Rojo-Poveda O, Barbosa-Pereira L, Zeppa G, Stévigny C. **Cocoa Bean Shell—A By-Product with Nutritional Properties and Biofunctional Potential.** *Nutrients* 2020, 12:1123. <https://doi.org/10.3390/nu12041123>.
9. Mellinas AC, Jiménez A, Garrigós MC: **Optimization of microwave-assisted extraction of cocoa bean shell waste and evaluation of its antioxidant, physicochemical and functional properties.** *LWT* 2020, 127:109361. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109361>.
10. Vandenberghe LPS, Valladares-Diestra KK, Bittencourt GA, Mello AFM, Vásquez ZS, Oliveira PZ, Pereira, GVM, Soccol CR. **Added-value biomolecules' production from cocoa pod husks: A review.** *Bioresource Technology* 2022, 344, 126252. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126252>.

11. • Campos-Vega R, Nieto-Figueroa KH, Oomah BD: **Cocoa (*Theobroma cacao* L.) pod husk: renewable source of bioactive compounds.** *Trends Food Sci Technol* 2018, 81: 172–184. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.022>.
Este artigo tem como objetivo destacar o valor nutricional e o potencial biofuncional das cascas de cacau, propondo seu uso mais amplo e sustentável como um recurso valioso, ao invés de descartá-las como resíduos agroindustriais.
12. Moretti LK, Ramos KK, Avila PF, Goldbeck R, Vieira JB, Efraim P: **Influence of cocoa varieties on carbohydrate composition and enzymatic activity of cocoa pulp.** *Food Res Int* 2023, 173:113393. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113393>.
13. •• Nascimento MB, Souza TL, Maia DLS, Amorim LR, Ribeiro ASL, Mamede MEO, Maciel LF, Santos Júnior AF, Mesquita PRR, Soares SE: **Determination of Mineral Profile Using MIP OES and Physicochemical Composition of Cocoa Honey from Different Cocoa Varieties (*Theobroma cacao* L.).** *Food Anal Methods* 2024a, 17: 2660. <https://doi.org/10.1007/s12161-024-02640-7>.
Este artigo descreve, pela primeira vez, as características físico-químicas e de macro e micronutrientes do mel de cacau de diferentes variedades.
14. Pagliari S, Celano R, Rastrelli L, Sacco E, Arlati F, Labra M, Campone L: **Extraction of methylxanthines by pressurized hot water extraction from cocoa shell by-product as natural source of functional ingredient.** *LWT* 2022, 170: 114115. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114115>.
15. Gutiérrez-Macías P, Mirón-Mérida VA, Rodríguez-Nava CO, Barragán-Huerta BE. (2021). **Cocoa: Beyond chocolate, a promising material for potential value-added products.** *Valorization of Agri-Food Wastes and By-Products* 2021, 267–288. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-824044-1.00038-6>.
16. • Anoraga S B, Shamsudin R, Hamzah MH, Sharif S, Saputro AD. **Cocoa by-products: A comprehensive review on potential uses, waste management, and emerging green technologies for cocoa pod husk utilization.** *Heliyon* 2024, 10: e35537. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e35537>.
Fornecer um estudo sistemático dos usos potenciais dos subprodutos do cacau, com foco particular na casca da vagem de cacau como o componente mais abundante.
17. Abbey CYB, Duwiewuah AB, Quianoo A.K. **Removal of toxic metals from aqueous phase using cacao pod husk biochar in the era of green chemistry.** *Appl Water Sci* 2023, 13, 57. <https://doi.org/10.1007/s13201-022-01863-5>.
18. Tsai CH, Tsai WT, Liu SC. et al. **Thermochemical characterization of biochar from cocoa pod husk prepared at low pyrolysis temperature.** *Biomass Conv. Bioref* 2018, 8, 237–243. <https://doi.org/10.1007/s13399-017-0259-5>.
19. Doungous O, Minyaka E, Longue EAM, Nkengafac NJ. **Potentials of cocoa pod husk-based compost on *Phytophthora* pod rot disease suppression, soil fertility, and *Theobroma cacao* L. growth.** *ESPR* 2018, 25: 25327–25335. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2591-0>.

20. Mares LCA, Alcazar M, Lugo EDC, Mojica L, Velázquez D. **Phenolic Content and Antioxidant Potential of Cocoa Beans and Pod Husk From Three Endemic Varieties of South Mexico.** *Curr. Dev. Nutr.* 2024, 8: 102600. <https://doi.org/10.1016/j.cdnut.2024.102600>.
21. Tarigan JB, Perangin-angin S, Debora S, Manalu D, Sari RN, Ginting J, Sitepu EK. **Application of waste cocoa pod husks as a heterogeneous catalyst in homogenizer-intensified biodiesel production at room temperature.** *CSCEE* 2024, 10: 100966. <https://doi.org/10.1016/j.cscee.2024.100966>.
22. Correa-Abril J, Stahl U, Cabrera EV, Parra YJ, Vega MA, Taamalli S, Louis F, Rodríguez-Díaz JM. **Adsorption dynamics of Cd²⁺(aq) on microwave-synthesized pristine biochar from cocoa pod husk: Green, experimental, and DFT approaches.** *IScience* 2024, 27: 109958. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.109958>.
23. Tantapakul C, Khat-udomkiri N, Sitthichai P, Chomsak A, Thananusak N, Phukhatmuen P, Vinardell MP, Sripisut T. **Exploring the physicochemical properties of polysaccharides extracted from cocoa pod husk waste and their efficacy in skin hydration.** *IND CROP PROD* 2024, 222: 119940. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.119940>.
24. Muharja M, Darmayanti RF, Fachri BA, Palupi B, Rahmawati I, Rizkiana MF, Amini HW, Putri DKY, Setiawan FA, Asrofi M, Widjaja A, Halim A. **Biobutanol production from cocoa pod husk through a sequential green method: Depectination, delignification, enzymatic hydrolysis, and extractive fermentation.** *Bioresour. Technol. Rep.* 2023, 21: 101298. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101298>.
25. Valladares-Diestra KK, Vandenberghe LPS, Soccol CR. **A biorefinery approach for pectin extraction and second-generation bioethanol production from cocoa pod husk.** *Bioresour Technol.* 2022, 346: 126635. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126635>.
26. EFSA European Food Safety Authority: **Technical report on the notification of pulp from theobroma cacao L. as a traditional food from a third country pursuant to article 14 of regulation (EU) 2015/2283.** EFSA Support Publ EN-1724 2019. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2019.EN-1724>.
27. Mota-Gutierrez J, Ferrocino I, Giordano M, Suarez-Quiroz ML, Gonzalez-Ríos O, Cocolin L. **Influence of Taxonomic and Functional Content of Microbial Communities on the Quality of Fermented Cocoa Pulp-Bean Mass.** *Appl Environ Microbiol* 2021, 87:e00425-21. <https://doi.org/10.1128/AEM.00425-21>.
28. Figueroa KHN, García NVM, Vega RC. **Cocoa By-products. Food Wastes and By-products: Nutraceutical and Health Potential, First Edition.** Edited by Rocio Campos-Vega, B. Dave Oomah, and Haydé Azeneth Vergara-Castañeda. John Wiley & Sons Ltd 2020, (pp. 373–411). <https://doi.org/10.1002/9781119534167.ch13>.

29. Firdaus F, Desmiarti R, Praputri E, Amir A. **Production of Cocoa Pulp Syrup by Utilizing Local Sugar Sources.** *JAAST* 2022, 6: 149-161. <https://doi.org/10.55043/jaast.v6i2.70>.
30. Nguyen VT, Tran AX, Le VAT. **Microencapsulation of phenolic-enriched extract from cocoa pod husk (*Theobroma cacao* L.).** *Powder Technology* 2021, 386: 136-143. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2021.03.033>.
31. Guirlanda CP, Alvim ID, Takahashi JA. **Atomization of Cocoa Honey Using Whey Protein Isolate to Produce a Dry Formulation with Improved Shelf Life for Industrial Application.** *Foods* 2023, 12:4269. <https://doi.org/10.3390/foods12234269>.
32. • Souza FNS, Vieira SR, Campidelli MLL, Rocha RAR, Rodrigues, LMA, Santos PH, Carneiro JDS, Tavares IMC, Oliveira CP. **Impact of using cocoa bean shell powder as a substitute for wheat flour on some of chocolate cake properties.** *Food Chem.* 2022, 381: 132215. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132215>.
Este artigo avaliou as características físico-químicas da casca de cacau em pó e aplicou-o na produção de uma torta, seguido da avaliação de suas características físicas, químicas e sensoriais.
33. Hernández-Hernández C, Fernández-Cabanás VM, Rodríguez-Gutiérrez G, Bermúdez-Oria A, Morales-Sillero A: **Viability of near infrared spectroscopy for a rapid analysis of the bioactive compounds in intact cocoa bean husk.** *Food Control* 2021, 120:107526. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107526>.
34. Sánchez M, Laca A, Laca A, Díaz M. **Cocoa Bean Shell: A By-Product with High Potential for Nutritional and Biotechnological Applications.** *Antioxidants* 2023, 12:1028. <https://doi.org/10.3390/antiox12051028>.
35. • Nunes CSO, Silva MLC, Camilloto GP, Machado BAS, Hodel KVS, Koblitiz MGB, Carvalho G.BM, Uetanabaro APT. **Potential Applicability of Cocoa Pulp (*Theobroma cacao* L) as an Adjunct for Beer Production,** *The Scientific World Journal* 2020, 14: 3192585. <https://doi.org/10.1155/2020/3192585>.
Este artigo discute as propriedades físico-químicas e minerais da polpa de cacau e sua aplicação na produção de cerveja.
36. Rahardjo YP, Syamsu K., Rahardja S, Samsudin, Mangunwijaya D. **Impact of controlled fermentation on the volatile aroma of roasted cocoa.** *Braz J Food Technol.* 2022, 25: e2020270. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.27020>.
37. Kim-Ngoc VT, Cong-Hau N, Bui-Phuc T, Thang N. **Quality evaluation during fermentation of cocoa beans: effects of partial mucilage removal.** *J. Appl. Sci. Environ. Manag.* 2022, 26: 1369–1374. <https://dx.doi.org/10.4314/jasem.v26i8.8>.
38. Santos Filho AL, Veloso Freitas H, Rodrigues S, Gonçalves Abreu VK, Oliveira Lemos T, Faria Gomes W, Narain N, Pereira ALF. **Production and stability of probiotic cocoa juice with sucralose as sugar substitute during refrigerated storage.** *LWT* 2019, 99: 371-378, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.007>.

39. Rodríguez-Castro R, Guerrero R, Valero A, Franco-Rodriguez J, Posada-Izquierdo G. **Cocoa Mucilage as a Novel Ingredient in Innovative Kombucha Fermentation.** *Foods*. 2024; 13(11):1636. <https://doi.org/10.3390/foods13111636>.
40. Delgado-Noboa J, Bernal T, Soler J, Peña JA. **Kinetic modeling of batch bioethanol production from CCN-51 Cocoa Mucilage.** *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 2021, 128:169-175. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2021.08.040>.
41. Haase TB, Naumann-Gola S, Ortner E, Zorn H, Schweiggert-Weisz U: **Thermal stabilisation of cocoa fruit pulp — Effects on sensory properties, colour and microbiological stability.** *Curr Res Food Sci* 2023, 7:100549. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2023.100549>.
42. Cortez D, Flores M, Calampa L, Oliva-Cruz M, Gonas M, Meléndez-Mori JB, Chavez, SG: **From the seed to the cocoa liquor: Traceability of bioactive compounds during the postharvest process of cocoa in Amazonas-Peru.** *Microchem J* 2024, 201:110607. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.110607>.
43. Leite PB, Machado WM, Guimaraes AG, Carvalho GBMD, Magalhaes- Guedes KT, Druzian J I: **Cocoa's residual honey: physicochemical characterization and potential as a fermentative substrate by *Saccharomyces cerevisiae* AWRI726.** *Sci World J* 2019, 5698089. <https://doi.org/10.1155/2019/5698089>.
44. Nascimento MB, Amorim LR, Nonato MAS, Roselino MN, Santana LRR, Ferreira ACR , Rodrigues FM, Mesquita PRR, Soares SE. **Optimization of hs-spme/gc-ms method for determining volatile organic compounds and sensory profile in cocoa honey from different cocoa varieties (*Theobroma cacao* L.).** *Molecules* 2024b, 29: 3194. <https://doi.org/10.3390/molecules29133194>.
45. Koelher BTA, Souza SMM, Costa AM, Aguiar-Oliveira E: **Applicability of *Saccharomyces cerevisiae* strains for the production of fruit wines using cocoa honey complemented with cocoa pulp.** *Food Technol Biotech* 2022, 60(2):192–201. <https://doi.org/10.17113/ftb.60.02.22.7285>.
46. Yulianaa N, Nurainya F, Sari GW, Sumardi, Widiastuti EL: **Total microbe, physicochemical property, and antioxidative activity during fermentation of cocoa honey into kombucha functional drink.** *Appl Food Res* 2023, 3: 100297. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2023.100297>.
47. Mishra K, Green,A, Burkard J, Gubler I, Borradori R, Kohler L, Meuli J, Krähenmann U, Bergfreund J, Siegrist A, Schnyder M, Mathys A, Fischer P, Windhab EJ. **Valorization of cocoa pod side streams improves nutritional and Sustainability aspects of chocolate.** *Nature Foods* 2024, 5: 423–432. <https://doi.org/10.1038/s43016-024-00967-2>.
48. Silveira PTS, Braga AVU, Brito ADC, Tonin IP, Martins MOP, Efraim P. **Influence of variety and harvest on the sensory characteristics of chocolate made from cocoa fermented with different pulp contentes.** *LWT* 2024, 210: 116768. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116768>.

49. Yuneri DR, Syarifuddin A: **Cocoa Bean Shell By-Products as Potential Ingredients for Functional Food and Beverage - A Review.** *BIO Web Conf.* 2024, 96:1-14. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20249601006>.
50. Caccamo M, Luciano G, Rapisarda T, Marino VM, Pasta C, Natalello A, Mangione G, Valenti B, Campione A, Marino G, Pauselli M: **Cocoa by-product inclusion in dairy sheep diet: effect on sensory, volatile and antioxidant properties of cheese.** *J. dairy sci.* 2023, 107(9): 6460-6473. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-24428>.
51. Barbosa-Pereira L, Rojo-Poveda O, Ferrocino I, Giordano M, Zeppa G. **Analytical dataset on volatile compounds of cocoa bean shells from different cultivars and geographical origins.** *Data in Brief* 2019, 25, 104268. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2019.104268>.
52. Tovar AM, Valencia LF, Villa AL: **Life cycle assessment of Colombian cocoa pod husk transformation into value-added products.** *Bioresour. Technol. Rep.* 2024, 25: 101772. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2024.101772>.
53. Valencia A, Elías-Peñafiel C, Encina-Zelada CR, Anticono M, Ramos-Escudero F: **Circular bioeconomy for cocoa by-product industry: Development of whey protein-cocoa bean shell concentrate particles obtained by spray-drying and freeze-drying for commercial applications.** *FBP* 2024, 146:38–48. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2024.05.003>.
54. Belwal T, Cravotto C, Ramola S, Thakur M, Chemat F, Cravotto G. **Bioactive compounds from cocoa husk: extraction, analysis and applications in food production chain.** *Foods* 2022, 11:798. <https://doi.org/10.3390/foods11060798>.
55. Younes A, Li M, Karboune S: **Cocoa bean shells: a review into the chemical profile, the bioactivity and the biotransformation to enhance their potential applications in foods.** *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2022, 63:9111-9135. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2065659>.
56. Duarte FAO, Ramos KK, Gini C, Morasi RM, Silva NCC, Efraim P: **Microbiological characterization of kombucha and biocellulose film produced with black tea and cocoa bean shell infusion.** *Food Res. Int.* 2024, 190:114568. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114568>.
57. Haq I, Mazumder P, Kalamdhad AS: **Recent advances in removal of lignin from paper industry wastewater and its industrial applications – A review.** *Bioresour. Technol.* 2020, 312: 123636. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123636>.
58. Xia Q, Chen C, YaoY, Li1 J, Hel S, Zhoul Y, Li T, Pan X, Yao Y, Hu L: **A strong, biodegradable and recyclable lignocellulosic bioplastic.** *Nat. Sustain.* 2021, 4 627-635. <http://dx.doi.org/10.1038/s41893-021-00702-w>.
59. Mao Y, Gerrow A, Raya E, Perez ND, Edler K, Wolf B, Binner E: **Lignin recovery from cocoa bean shell using microwave-assisted extraction and deep eutectic solvents.** *Bioresour. Technol.* 2023, 372:128680. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128680>.

-
60. Rebollo-Hernanz M, Aguilera Y, Martin-Cabrejas MA, Gonzalez de Mejia E. **Phytochemicals from the cocoa shell modulate mitochondrial function, lipid and glucose metabolism in hepatocytes via activation of FGF21/ERK, AKT, and mTOR pathways.** *Antioxidants* 2022, 11:136. <https://doi.org/10.3390/antiox11010136>.

4.2

Artigo: Determination of Mineral Profile Using MIP OES and Physicochemical Composition of Cocoa Honey from Different Cocoa Varieties (Theobroma cacao L.)

**DETERMINATION OF MINERAL PROFILE USING MIP OES AND
PHYSICOCHEMICAL COMPOSITION OF COCOA HONEY FROM DIFFERENT
COCOA VARIETIES (*Theobroma cacao* L.)**

Manuela B. Nascimento^{1,2}; Thaís L. Souza²; Djalma Lucas S. Maia^{2,3}; Livia R. Amorim¹; Alvanice S. L. Ribeiro²; Maria E. O. Mamede¹; Leonardo F. Maciel¹; Aníbal F. Santos Júnior⁴; Paulo R. R. Mesquita^{2,*}; Sergio E. Soares¹

¹*Faculty of Pharmacy, Federal University of Bahia, Campus Ondina, Salvador, Bahia 40170-115, Brazil*

²*Agricultural Technological Center of the State of Bahia, Ondina, Salvador, Bahia 40170-110, Brazil*

³*Department of Human Sciences and Technologies (DCHT-XXIV), State University of Bahia, Xique-Xique, Bahia 47400-000, Brazil*

⁴*Department of Life Sciences – DCV, State University of Bahia, Salvador, Bahia 41150-000, Brazil*

Periódico publicado:	<i>Food Analytical Methods – ISSN 1936-976X</i>
Maior percentil (Scopus):	83%
Ano:	2024
Doi:	https://doi.org/10.1007/s12161-024-02640-7

***Corresponding author:** Paulo Roberto Ribeiro de Mesquita. Agricultural Technological Center of the State of Bahia, Ondina, Salvador, Bahia 40170-110, Brazil. E-mail: prrmesquita@gmail.com

ABSTRACT

The present study aims to evaluate the physicochemical composition and mineral profile of cocoa honey from different cocoa varieties (CCN51, PS1319, SJ02, and Parazinho) found in Brazilian territory. The results indicated that the validation parameters of the minerals analyzed (Al, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Sr, Zn, Ca, K, Mg, and Na) by microwave plasma atomic emission spectrometry (MIP OES) were considered acceptable. Furthermore, cocoa honey was characterized as an acidic product, with low protein content and high amounts of soluble solids, sugars, and energy value. The presence of magnesium (132.08-198.16 mg Kg⁻¹), high amounts of zinc (3.01-18.76 mg Kg⁻¹), and low amounts of sodium (44.56-94.57 mg Kg⁻¹) provide significant reasons to encourage increased consumption of cocoa honey as a nutritious source. According to multivariate analysis, there was a greater predominance of minerals in CCN51, PS1319, and SJ02 varieties. PS1319 was characterized by the presence of Al, Fe, and Ni, while other parameters (Zn, Sr, N, K, Mg, and Ca) discriminated CCN51 and SJ02 varieties. Thus, the obtained data enabled the delineation of a physicochemical and nutritional profile of cocoa honey based on cocoa variety. This characterization is crucial for enhancing cocoa honey and its potential future technological applications and incorporation into new products.

Keywords: Cocoa pulp · Method validation · Micronutrients · Macronutrients · Food composition

1. Introduction

Cocoa (*Theobroma cacao* L.) is a fruit native to Central America, typical of tropical regions, cultivated in several countries (Cinar et al. 2021). The three most popular types of cocoa are Criollo, Forastero, and Trinitario, together representing 95% of global cocoa production (Serra and Sodré 2021). In Brazil, the largest producers are the states of Pará and Bahia, with productions of 150 and 120 thousand tons, respectively (IBGE 2023). However, following the infestation caused by the fungus *Moniliophthora perniciosa*, which causes witches' broom, in 1989, several disease-resistant genotypes were developed to restore cocoa productivity (Hernandez and Granados 2021; Moretti et al. 2023).

The cocoa tree produces a fruit primarily composed of the shell, the beans, and the pulp, representing approximately 70%, 20%, and 10% of the entire fruit, respectively. Currently, the beans are commercially important, mainly to produce chocolates, while cocoa shells, pulp, and honey are considered by-products (Indiarto et al. 2021; Guirlanda et al. 2021). Thus, to create new sources of income for producers, concepts are being developed for the comprehensive valorization of this fruit, such as the utilization of cocoa honey (Haase et al. 2023).

Cocoa honey, derived from cocoa pulp after pressing the beans, is a translucent liquid with chemical and sensory characteristics akin to those of the original pulp. It earns its name from its extraction from the cocoa fruit and its sweet flavor resembling that of bee honey, despite not being a beekeeping product. Furthermore, it is abundant in reducing sugars and can

be deemed a natural source of bioactive compounds with antioxidant properties, owing to its outstanding nutritional attributes (Guirlanda et al. 2021; Santos et al. 2014).

However, what still hampers the development of cocoa honey-based products is the limited scientific data available on this byproduct in the international literature (Guirlanda et al. 2021). Cocoa honey-based products are being developed either artisanally or by cooperatives. Some of these include the production of mixed açai jelly and cocoa honey (Neto et al. 2013), diet jelly (Santos et al. 2014), fruit wine using cocoa honey (Koelher et al. 2022), and kombucha (Yuliana et al. 2023).

Additionally, it is essential to elucidate its chemical composition, especially the mineral content, as such properties are sensitive to the cultivation environment and soil type. Furthermore, the mineral composition of foods plays a crucial role in human health, and ensuring the correct intake of various macronutrients and micronutrients is fundamental for a healthy diet (Mir-Marqués et al. 2015). Aluminum, barium, copper, iron, manganese, selenium, sodium, and zinc are among the minerals already detected in cocoa honey (Leite et al. 2019).

Within this context, it is worth highlighting that essential minerals are those necessary in the human diet to maintain normal physiological functions, such as in biochemical processes, growth, development, and maintenance of the organism's balance, and are also involved in the synthesis of nutrients. As minerals cannot be synthesized by the human body itself, they must be ingested through food. Minerals can be divided into macroelements, which are needed in large quantities (e.g., Ca, Mg, K, Na), and trace elements (e.g., Fe, Cu, Zn, Mn), which are needed in smaller quantities (Nile and Park 2014; Lu et al. 2024).

Among the various instrumental techniques used for mineral determination, self-sustained microwave plasma atomic emission spectrometry (MIP OES) using nitrogen gas presents itself as a good alternative, proving suitable for routine analytical applications in food analysis with several advantages (Balaram 2020). These advantages include multi-element capability, relatively low cost and maintenance, high analysis speed, and good detection power, capable of performing rapid analysis of multiple elements in a single sample aspiration (Balaram 2020; Martínez et al. 2023). Thus, MIP OES has become an economical analytical technique compared to inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES) or inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), offering enhanced possibilities and detection power compared to atomic absorption spectroscopy (AAS).

Therefore, the main objective of this study was to evaluate the physicochemical composition and mineral profile of cocoa honey from different varieties of cocoa (*Theobroma*

cacao L.) found in Brazilian territory. To our knowledge, this is the first study to characterize cocoa honey from different cocoa varieties.

2. Material and methods

2.1 Standards and reagents

Sodium hydroxide (PA grade, NEON), hydrochloric acid (PA grade, Dinâmica Química Contemporânea LTDA), copper sulfate pentahydrate (PA grade, Synth), sodium and potassium tartrate tetrahydrate (PA grade, NEON), methylene blue (NEON), chloroform (PA grade, Synth), metanol (PA grade, Synth), anhydrous sodium sulfate (Êxodo Científica), and sucrose (PA grade, Synth) were used. Brilliant Green Bile broth, Tetratationate broth, Rappaport-Vassiliadis broth, Xylose Lysine Decarboxylase Agar, and Potato Dextrose Agar were obtained from KASVI. All solutions were prepared using distilled water obtained from a reverse osmosis device (LT 800/20, Limatec).

The following reagents were used for sample decomposition: nitric acid (65% w/w, Dinâmica Química Contemporânea LTDA) and hydrogen peroxide (35% w/w, Êxodo Científica). The standards utilized for micronutrients and macronutrients were Al, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Sr, Zn, Ca, K, Mg, and Na (SpecSol Brazil). All solutions were prepared using ultrapure water obtained from a Milli-Q® IQ 7000 system (18 MΩ cm, Millipore, Bedford, MA, USA).

2.2 Obtaining cocoa honey

Cocoa honey was obtained from ripe fruits of the varieties CCN51, PS1319, SJ02, and Parazinho harvested in the city of Presidente Tancredo Neves (Bahia, Brazil; latitude: 13° 27' 14" South; Longitude: 39° 25' 15 " Oeste), in the month of May 2021. The varieties CCN51, SJ02, and PS1319 are the result of genetic improvement in Trinitario cocoa and exhibit increased resistance to witches' broom. Conversely, there are conventional varieties, such as Parazinho, a Forastero type, which have not undergone genetic improvement and are widely cultivated in Brazil (Serra and Sodr  2021).

Cocoa honey is a by-product of cocoa obtained by collecting cocoa pulp after cold-pressing raw cocoa beans prior to fermentation. Initially, a pre-selection was conducted, discarding green, damaged fruits, and those in an advanced senescence phase. The beans were then placed in a cold manual stainless steel press to obtain cocoa honey. Finally, the cocoa

honey was stored in polyethylene bottles and kept at -18°C ($\pm 0.5^{\circ}\text{C}$) until the analysis commenced. For each variety, three batches of cocoa honey were obtained.

2.3 Cocoa honey yield analysis

The yield of the process to obtain cocoa honey from each variety was calculated from Equation 1, according to Magro et al. (2016):

$$\text{Yield}\% = \frac{mf}{mi} \times 100 \quad [1]$$

Where: mi = Mass of fresh cocoa beans (Kg); mf = cocoa honey (Kg).

2.4 Physicochemical characterization

The pH of the cocoa honey samples was measured using a digital pH meter (Q-400A Quimis). Titratable acidity was determined using the potentiometric method with 0.1M sodium hydroxide solution, and the result was expressed as a percentage of citric acid (IAL, 2008). The protein content was evaluated by the Kjeldahl method, while the ash was determined by the gravimetric method (AOAC 2005). The total soluble solids content (TSS) and moisture were determined by refractometry and lipid extraction using the Bligh & Dyer method (IAL 2008). Carbohydrates were calculated by difference. The energy value (kcal) and energy (kJ) were calculated based on the parameters established by the National Health Surveillance Agency (ANVISA) (Brazil 2005b). All analyses were conducted in triplicate.

2.4.1 Colorimetric analysis

The brightness values (L^* ; 100 = white and 0 = black), red (a^* ; + red and - green), yellow (b^* ; + yellow and - blue), chroma (C^* ; saturation or intensity of color), and the hue angle (h° ; color tone) of the cocoa honey varieties were measured in the Transmittance option using a Chroma Meter CR-5 Colorimeter (Konica Minolta Business Technologies Inc., Tokyo, Japan).

2.4.2 Sugar analysis

Reducing sugars, non-reducing sugars and total sugars were determined using the modified Lane and Eynon method (IAL 2008). For the analysis of reducing sugars, 20 g of cocoa honey were weighed, and for non-reducing sugars, 10 g were weighed. Total sugars

comprise the sum of reducing sugars and non-reducing sugars. Analyses were performed in triplicate.

2.5 Microbiological assays

After the cocoa honey pressing stage, microbiological analyses were conducted to determine coliform counts at 35°C, the presence of *Salmonella* spp., molds, and yeasts using the methodology described by Silva et al. (2021). To determine total coliforms, 1 mL of each selected dilution was inoculated into tubes containing Brilliant Green Bile Broth (BGB) and then incubated at 35°C for 24 hours. The presence or absence of total coliforms was determined by observing gas formation inside the Durham tubes.

Analysis of *Salmonella* spp. was initially carried out by performing the pre-enrichment step where the sample was incubated for 24 h at 37 °C. After this period, selective enrichment was carried out, for which 1 mL of the pre-enriched sample was removed and placed in 10 mL of Tetrastate broth (TT), incubated at 35 °C/24 h, and 0.1 mL of the sample was placed in 10 mL of Rappaport-Vassiliadis (RV) broth and incubated at 42 °C/24h. Then, plating was performed on Xylose Lysine Decarboxylase (XLD) agar. The plates were incubated at 35 °C for 24 hours and after this period, the presence of colonies was checked.

To evaluate molds and yeasts, after serial dilution, 0.1 mL of each dilution was plated onto Potato Dextrose Agar (PDA) plates, which were then incubated at 25°C for 5 days. Colonies were subsequently counted, and the results were expressed as CFU/mL. All analyses were conducted in triplicate.

2.6 Determination of minerals

2.6.1 Sample Digestion

For digestion, 0.5 g of cocoa honey samples and 2 mL of 65% nitric acid were added to a glass digestion tube. Digestion took place at 120°C for a period of 4 hours in a DK 20 digester block (Heating Digester, VELP Scientifica). Following digestion, 1.5 mL of hydrogen peroxide was added to the resulting solution, which was transferred to a polyethylene tube and diluted with ultrapure water up to 10 mL (Nunes et al. 2020). Blanks were prepared in the same manner, and all samples were analyzed in triplicate.

2.6.2 Microwave Plasma Atomic Emission Spectroscopy (MIP OES)

Analytical determinations were performed using a model 4210 microwave-induced plasma optical emission spectrometer (MIP OES) coupled with a model SPS 4 autosampler (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Sample entry was through an inert One Neb nebulizer with a double-pass glass cyclonic spray chamber system and a standard torch with axial viewing position. A model 4107 nitrogen generator (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) was utilized, drawing air from the environment via a Rotor Plus air compressor (Metalplan Airpower, Brazil). The chosen wavelengths (nm) for each analyzed element were as follows: Al (396.152), Ba (455.403), Cd (228.802), Co (345.351), Cr (425.433), Cu (324.754), Fe (373.486), Mn (257.610), Ni (352.454), Sr (407.771), Zn (213.857), Ca (396.847), K (766.491), Mg (280.271), and Na (589.592). The nebulizer gas flow was set to 0.60 L min⁻¹ for micronutrients and for macronutrients it was adjusted to 0.60 L min⁻¹ for Ca, 0.75 L min⁻¹ for K, 0.90 L min⁻¹ for Mg, and 0.95 L min⁻¹ for Na.

For the quantification of macro and microelements, analytical calibration solutions were prepared at the following concentrations: 0.1-10 mg L⁻¹ (Al, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Sr, and Zn) and 2.5-20 mg L⁻¹ (Ca, K, Mg, and Na).

2.6.3 Method validation

The method was validated based on the following performance parameters: linearity, accuracy, precision, and limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), in accordance with RDC 166/2017 of the National Health Surveillance Agency (ANVISA) (Brazil 2017).

2.6.3.1 Linearity, precision, and recuperation

Linearity was assessed using a calibration curve for the compounds at ten concentrations ranging from 0.00 to 10.00 mg L⁻¹ for micronutrients and from 0.00 to 20.00 mg L⁻¹ for macronutrients. The accuracy of the method was evaluated through addition and recovery (fortification) tests conducted on a sample of cocoa honey, with concentrations ranging from 0.5 to 7.5 mg L⁻¹ for micronutrients and 2.5 to 15.0 mg L⁻¹ for macronutrients. Method accuracy was expressed in terms of the relative standard deviation (%RSD).

2.6.3.2 Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ)

The LOD and LOQ values of each analyte were calculated considering the equivalent concentration (BEC) and the signal-to-noise ratio, as recommended by the International Union of Pure and Applied Chemistry (1978). Equations 2 to 5 used to calculate these limits were:

$$\text{Calculation of signal-to-noise ratio (SBR): } \text{SBR} = \frac{I_{\text{standard}} - I_{\text{blank}}}{I_{\text{blank}}} \quad [2]$$

$$\text{Calculation of equivalent concentration (BEC): } \text{BEC} = \frac{C_{\text{standard}}}{\text{SBR}} \quad [3]$$

$$\text{Calculation of LOD: } \text{LOD} = \frac{3 \times \text{RSD}_{\text{blank}} \times \text{BEC}}{100} \quad [4]$$

$$\text{Calculation of LOQ: } \text{LOQ} = \frac{10 \times \text{RSD}_{\text{blank}} \times \text{BEC}}{100} \quad [5]$$

Where:

I_{standard} is the emission intensity for the reference analyte;

I_{blank} is the emission intensity of the analytical blank solutions (containing all the reagents used in the decomposition, except the sample);

C_{standard} is the concentration of the reference analyte in the solution;

RSD is the relative standard deviation of the emission intensity measurements of the analytical blank solutions (Mermet and Poussel 1995).

2.7 Statistical analysis

The results were expressed as mean $\pm$ standard deviation and statistical analysis was performed using the statistical software XLStat version 7.8. Analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test was performed to determine statistically significant differences between means ($p < 0.05$).

A data set containing the mineral profile was subjected to principal component analysis (PCA) with pre-treatment using sum normalization and automatic scaling (Brereton 2003), through the MetaboAnalyst 6.0 and XLStat version 7.8 software. For the PCA analysis, data from elements that obtained values greater than the LOQ of the method were used.

3. Results and discussion

3.1 Yield, physical-chemical and microbiological analyses

The cocoa honey yield obtained from each variety can be observed in Table 1. The CCN51, SJ02, and PS1319 cultivars exhibited the highest yields (20.44, 18.04, and 17.97%, respectively) compared to Parazinho (16.40%). Varieties CCN51, SJ02, and PS1319 may have exhibited higher cocoa honey yields because they are genetically improved varieties with a larger amount of cocoa and pulp almonds, consequently resulting in greater productivity. In contrast, the Parazinho variety lacks genetic improvement, characterized by small fruit with minimal pulp (Lopes et al. 2011; Mandarino and Gomes 2009; Senar 2018). Macêdo et al. (2021) similarly demonstrated that CCN51 and SJ02 varieties have higher productivity compared to the PS1319 variety.

Regarding the pH parameter, in the studied varieties, the values ranged from 3.56 to 3.69 ($p < 0.05$), and the acidity varied from 0.68% to 0.99% ($p < 0.05$). These results are like those found by Haase et al. (2023) and Neto et al. (2016) when studying unspecified varieties of cocoa honey.

Table 1 Yield, physicochemical and microbiological analyses of cocoa honey from different cocoa varieties (*Theobroma cacao* L.).

Parameters	CCN51	PS1319	SJ02	Parazinho
Physicochemical				
Yield (%)	20.44±0.13 ^a	17.97±0.32 ^b	18.04±0.29 ^b	16.40±0.13 ^c
pH	3.59±0.02 ^a	3.59±0.02 ^a	3.69±0.03 ^b	3.56±0.07 ^a
Acidity (% citric acid)	0.99±0.06 ^a	0.68±0.01 ^b	0.77±0.02 ^c	0.92±0.01 ^a
Total soluble solids (°Brix)	17.32±0.25 ^a	11.97±0.06 ^b	16.40±0.35 ^c	16.16±0.03 ^c
Ash (%)	0.42±0.00 ^a	0.39±0.05 ^{ab}	0.49±0.08 ^a	0.26±0.02 ^b
Moisture (%)	69.44±0.43 ^a	71.21±0.86 ^a	70.83±1.47 ^a	69.94±0.25 ^a
Proteins (%)	0.51±0.05 ^a	0.31±0.00 ^b	0.37±0.04 ^c	0.34±0.03 ^{bc}
Lipids (%)	ND	ND	ND	ND
Energy value (kcal/100mL)	120.53±1.73 ^a	113.58±3.46 ^a	114.70±5.59 ^a	119.16±1.07 ^a
Energy (kJ/100mL)	506.23±7.26 ^a	477.03±14.55 ^a	481.77±23.48 ^a	500.48±4.48 ^a
Reducing sugars (g/100g)	7.55±0.00 ^a	4.82±0.02 ^b	4.59±0.00 ^c	8.52±0.05 ^d
Non-reducing sugars (g/100g)	8.48±0.11 ^a	6.79±0.27 ^b	9.64±0.13 ^c	4.90±0.11 ^d
Total sugars (g/100g)	16.03±0.10 ^a	11.62±0.26 ^b	14.23±0.13 ^c	13.43±0.13 ^d
Microbiological				
Coliforms at 35°C (NMP)	Absence	Absence	Absence	Absence

<i>Salmonella ssp. (25g)</i>	Absence	Absence	Absence	Absence
Molds and yeasts (CFU/mL)	$3 \times 10^2 \pm 1.00^a$	$7 \times 10^2 \pm 1.00^b$	$6 \times 10^2 \pm 1.00^b$	$3 \times 10^2 \pm 0.00^a$

Means followed by the same letter on the line does not differ significantly from each other (Tukey test; $p < 0.05$).
ND = not detected

Total soluble solids (TSS), also known as °Brix, showed higher concentrations in the CCN51, SJ02, and Parazinho varieties (17.32, 16.40, and 16.16 °Brix, respectively). These values correspond to those reported in the literature, with total soluble solids of 17.0 °Brix (Nunes et al. 2020). However, PS1319 presented a value of 11.97 °Brix, indicating that it is the variety with the lowest amount of sugars. TSS can be used as an indirect measure of sugar content, as its concentration increases with sugar accumulation in the fruit. According to Chitarra and Chitarra (2005), its measurement does not precisely represent the sugar content, as other substances such as pectins, proteins, vitamins, and organic acids are also present. However, sugars are the most significant component, constituting up to 90% of soluble solids.

Moisture among the varieties did not show a significant difference, ranging from 69.44% to 71.21%. A similar result was reported in the EFSA survey (2019), which found 79.4% and 78.7% in cocoa pulp and juice, respectively. This moisture content is one of the most important and evaluated parameters in the food industry, as it can directly influence the calculation of the caloric value and proximate composition of cocoa honey, as well as its levels of minerals such as calcium, iron, potassium, copper, magnesium, sodium, zinc, and manganese.

Low protein levels were found among the varieties studied (0.31 - 0.51%), which was expected, given that most fruits and vegetables are not significant sources of this nutrient as they have a lower amount of essential amino acids. Previous research found values of 0.62% for proteins in cocoa pulp (Nunes et al. 2020), which is consistent with the data in this work. In this study, the four cocoa varieties presented ash values that varied between 0.26-0.49%. Leite et al. (2019) reported an ash content of 0.59% in cocoa honey samples. Ash content is an indirect measure of the amount of minerals present in a food, and its limit can vary from 0.1% to 15.0% (Moretto 2008).

In this study, the carbohydrate content averaged 29%, with energetic value ranging from 113.58 to 120.53 kcal/100mL, and energy values from 477.03 to 506.23 kJ/100 mL, with no statistical differences between the varieties, demonstrating that all varieties can be used as energy drinks. Lower results were reported by EFSA (2019) for carbohydrates (19.5%), energetic value (83 kcal/100mL), and energy (348 kJ/100mL) in cocoa juice. Carbohydrates exist in different forms such as monosaccharides, oligosaccharides, and polysaccharides.

Sucrose, glucose, and fructose are the main sugars present in fruits, and their relative proportions vary between types. Carbohydrates play an essential role in the production of food and beverages, affecting the balance of flavors, color formation, volume, texture, fermentation, and serving as a source of energy for the human body (Prasad et al. 2018).

The high consumption of cocoa honey is not advisable for individuals with these conditions, but it can be recommended as an excellent source of energy for those who engage in physical activity. Regarding lipids, the matrix did not present a detectable lipid content using the methodology employed, so it was not considered when calculating the caloric value.

The four varieties of cocoa honey exhibited significant results ($p < 0.05$) in the analysis of reducing, non-reducing, and total sugars. High levels of reducing sugars were found in the Parazinho and CCN51 varieties (8.52 and 7.55 g/100g, respectively), while the SJ02 and CCN51 varieties showed the highest concentrations of non-reducing sugars (9.64 and 8.48 g/100g, respectively) and total sugars (14.23 and 16.03 g/100g, respectively). This characteristic of cocoa honey favors its utilization in the food industry by partially replacing the addition of commercial sugar. In cocoa pulp, Nunes et al. (2020) reported similar results, with 10.41 (g/100g) of reducing sugars and 18.00 (g/100g) of total sugars.

Regarding microbiological parameters, no *Salmonella spp.* was detected in 25g of samples, and all varieties of cocoa honey showed negative results for coliforms at 35°C. Furthermore, the concentration of molds and yeasts in the culture medium ranged from 3×10^2 CFU/mL to 7×10^2 CFU/mL, in accordance with ANVISA IN No. 161 (Brazil 2022). The pH and acidity values found are directly related to microbial growth, as these intrinsic characteristics limit the development of certain microorganisms, making the environment conducive to lactic and acetic bacteria, molds, and yeasts (Guirlanda et al. 2021).

3.2 Colorimetric Analysis

For the colorimetric analysis of cocoa honey, the parameters obtained are presented in Table 2.

Table 2 Colorimetric analysis of cocoa honey from different cocoa varieties (*Theobroma cacao* L.).

Varieties	L*	a*	b*	C*	h°
CCN51	99.579±0.55 ^a	-0.426±0.18 ^b	8.010±0.58 ^c	8.024±0.58 ^c	93.108±1.42 ^a
PS1319	94.879±0.22 ^b	0.690±0.15 ^a	11.206±1.09 ^{ab}	11.229±1.07 ^{ab}	86.403±1.06 ^b

SJ02	93.103±1.02 ^b	0.870±0.07 ^a	12.912±0.67 ^a	12.943±0.67 ^a	86.146±0.16 ^b
Parazinho	98.064±1.10 ^a	-0.069±0.15 ^b	9.110±1.18 ^{bc}	9.112±1.18 ^{bc}	90.504±0.95 ^a

Means followed by the same letter in the column do not differ from each other (Tukey test; $p < 0.05$).

According to the results obtained, it was noted that all varieties of cocoa honey are clear due to the L^* values being close to 100. However, the CCN51 and Parazinho varieties presented similar color profiles, characterized by a color tending to green with negative a^* values, while the varieties PS1319 and SJ02 showed a color tending towards yellow with higher b^* values. A similar result was found by Haase et al. (2023), who, when analyzing pasteurized and UHT-treated cocoa pulp, without specifying the variety, observed more yellowish samples. The visual appearance of foods, determined by a range of colors, is a significant sensory attribute. Consumer visual perception plays a fundamental role in food selection, with appearance and color serving as quality indicators perceived by consumers (Lawless and Heymann 2010).

The chroma (C^*) results indicated more intense color values for the PS1319 and SJ02 varieties. The combined analysis of h° values with a^* and b^* suggests that samples PS1319 and SJ02 tend to exhibit a subtly brownish color, while the CCN51 and Parazinho varieties tend to display a slightly greenish hue. Therefore, it can be concluded that each variety has a characteristic color profile, making the analysis of these parameters useful in controlling the quality of the raw material.

3.3 Validation of the method for determination of minerals

3.3.1 Linearity, precision, recovery, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ)

The results of the limits of quantification (LOQ) and detection (LOD), precision, analytical curve equation and correlation coefficient for each element are shown in Table 3.

In this study, all analyzed elements exhibited linearity proportional to the curve, with a correlation coefficient greater than 0.9900. Precision was assessed by repeatability in a set of 10 samples, and the relative standard deviation (RSD%) was analyzed. The method was considered to have good precision, as the deviation did not exceed 10% for the elements analyzed, remaining below 20%, the maximum limit established by Brazilian and European legislation (Brazil 2015; SANTE 2021).

Table 3 Calibration curve, correlation coefficient (R^2), precision, LOD, and LOQ (in mg Kg⁻¹), for the elements determined by MIP OES in cocoa honey samples from different cocoa varieties (*Theobroma cacao* L.)

Elements	Calibration curve	Correlation coefficient (R^2)	Precision (RSD%)	LOD (mg Kg ⁻¹)	LOQ (mg Kg ⁻¹)
Al	$A=27723.13 \times C(\frac{mg}{L}) - 46.67$	0.9998	7.51	0.45	1.51
Ba	$A=609133.87 \times C(\frac{mg}{L}) + 1.73$	0.9995	6.13	0.12	0.40
Cd	$A=38406.40 \times C(\frac{mg}{L}) + 257.73$	0.9985	9.66	0.21	0.69
Co	$A=23523.31 \times C(\frac{mg}{L}) + 475.96$	0.9999	9.30	0.17	0.57
Cr	$A=44602.62 \times C(\frac{mg}{L}) - 30.00$	0.9998	7.35	0.19	0.63
Cu	$A=153293.35 \times C(\frac{mg}{L}) - 12.95$	0.9998	7.13	0.19	0.63
Fe	$A=8558.33 \times C(\frac{mg}{L}) - 45.41$	0.9999	8.92	0.28	0.93
Mn	$A=49462.79 \times C(\frac{mg}{L}) + 330.54$	0.9996	5.96	0.18	0.60
Ni	$A=26031.89 \times C(\frac{mg}{L}) - 45.75$	0.9999	8.94	0.43	1.42
Sr	$A=745227.99 \times C(\frac{mg}{L}) + 6.50$	0.9988	7.82	0.20	0.65
Zn	$A=21151.32 \times C(\frac{mg}{L}) + 15.09$	0.9972	8.45	0.35	1.18
Ca	$A=421001.08 \times C(\frac{mg}{L}) + 4741.61$	0.9975	5.65	0.74	2.47
K	$A=131971.11 \times C(\frac{mg}{L}) + 1474.91$	0.9949	7.02	12.71	42.35
Mg	$A=34619.17 \times C(\frac{mg}{L}) + 4.51$	0.9965	7.15	10.74	35.80
Na	$A=229053.50 \times C(\frac{mg}{L}) + 233.76$	0.9982	5.77	7.49	24.96

LOD: detection limits; LOQ: limits of quantification

The results obtained to evaluate accuracy, through recovery tests for three concentration levels of macro and microelements, are shown in Table 4. Mineral recovery values ranged from 78% to 118% for microelements and from 80.00% to 116.00% for macroelements, indicating good agreement and confirming the efficiency of the procedure. European legislation for analytical methods establishes a recovery range of around 70% to 120% (SANTE 2021). In the study by Ozbek et al. (2019), recovery ranged from 90.0% to 115.0% for mineral analysis in different rice varieties using MIP OES.

Table 4 Recovery percentages for the three mineral concentration levels determined by MIP OES (Mean $\pm$ SD, n=3)

Elements	Recovery (%)		
	0.5 (mg L ⁻¹)	3.0 (mg L ⁻¹)	7.5 (mg L ⁻¹)
Al	100.00 $\pm$ 1.00	104.00 $\pm$ 2.00	100.00 $\pm$ 3.00
Ba	79.00 $\pm$ 5.00	81.00 $\pm$ 2.00	78.00 $\pm$ 2.00
Cd	108.00 $\pm$ 4.00	113.00 $\pm$ 1.00	99.00 $\pm$ 3.00

Co	97.00±7.00	108.20±0.20	107.00±3.00
Cr	99.00±3.00	97.00±2.00	93.00±4.00
Cu	104.00±6.00	118.00±1.00	111.00±3.00
Fe	103.00±1.00	111.00±4.00	104.00±4.00
Mn	97.00±5.00	100.00±4.00	96.50±0.40
Ni	100.00±9.00	112.00±4.00	103.00±3.00
Sr	84.00±5.00	85.00±2.00	79.00±2.00
Zn	94.10±4.30	116.00±3.00	94.00±1.00

Elements	Recovery (%)		
	2.5 (mg L ⁻¹)	7.5 (mg L ⁻¹)	15.0 (mg L ⁻¹)
Ca	86.00±6.00	81.00±5.00	100.00±2.00
K	80.0±8.00	109.00±1.00	116.00±8.00
Mg	104.00±1.00	108.00±6.00	103.00±1.00
Na	97.00±8.00	83.00±2.00	93.00±4.00

The results presented in Table 3 indicate that the LOD ranged from 0.12 to 0.45 mg Kg⁻¹, and the LOQ values ranged from 0.57 to 1.51 mg Kg⁻¹ for micronutrients. For macronutrients, the LOD ranged from 0.74 to 12.71 mg Kg⁻¹, and LOQ ranged from 2.47 to 42.35 mg Kg⁻¹. Therefore, the LOD and LOQ values demonstrate that the proposed method exhibited adequate sensitivity for detecting and quantifying the investigated macro and microelements, making it suitable for application in the cocoa honey matrix.

In a study conducted by Heredia et al. (2016), a method validated by MIP OES in corn seed samples revealed LOD ranging from 0.7 to 1.7 mg Kg⁻¹ and LOQ from 2.1 to 5.2 mg Kg⁻¹ for micronutrients (Al, Ba, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, and Zn). For macro nutrients (Ca, Mg, and Na), however, the LOD ranged from 2.9 to 4.3 mg Kg⁻¹ and LOQ from 8.7 to 12.9 mg Kg⁻¹. In a separate study by Santana et al. (2024) in craft chocolate samples using ICP OES and ICP-MS, LOD ranged from 0.003 to 1.154 mg Kg⁻¹ and LOQ from 0.009 to 10.650 mg Kg⁻¹ for microelements (As, Cd, Fe, Mn, Pb and Zn), while for macronutrients (K, Mg, Ca, P, and Na) LOD ranged from 2.098 to 4.623 mg Kg⁻¹ and LOQ from 3.365 to 15.256 mg Kg⁻¹, indicating the favorable analytical sensitivity of MIP OES.

3.4 Determination of minerals in cocoa honey

The validated MIP OES method was applied to the analysis of cocoa honey samples. The results obtained in the determination of minerals are presented in Table 5.

Table 5 Composition of mineral elements (mg Kg⁻¹, mean ± SD) of cocoa honey from different cocoa varieties (*Theobroma cacao* L.)

Elements	CCN51	PS1319	SJ02	Parazinho
Al	1.50±0.01 ^a	3.39±0.22 ^b	2.17±0.11 ^c	3.23±0.17 ^b
Ba	<0.40	<0.40	<0.40	<0.40
Ca	39.77±5.92 ^b	38.61±4.11 ^b	56.59±5.85 ^a	47.05±0.11 ^{ab}
Co	<0.57	<0.57	<0.57	<0.57
Cr	<0.63	<0.63	<0.63	<0.63
Cu	<0.63	<0.63	<0.63	<0.63
Fe	2.11±0.20 ^a	3.46±0.55 ^b	1.08±0.09 ^c	2.05±0.19 ^a
K	880.55±14.50 ^a	735.19±23.59 ^b	1046.60±23.16 ^c	512.79±7.33 ^d
Mn	<0.60	<0.60	<0.60	<0.60
Mg	198.16±11.60 ^a	132.08±11.49 ^b	186.46±12.04 ^a	140.61±6.59 ^b
Na	80.87±3.18 ^a	88.65±2.75 ^b	94.57±0.48 ^b	44.56±2.59 ^c
Ni	<1.42	1.97±0.15 ^b	1.45±0.05 ^a	<1.42
Sr	0.62±0.03 ^b	0.72±0.03 ^{ab}	0.76±0.03 ^a	<0.65
Zn	18.76±0.73 ^a	9.49±0.29 ^b	3.01±0.04 ^c	3.24±0.08 ^c

Means followed by the same letter in the line do not differ from each other (Tukey test; $p < 0.05$). Values are averages of three replicates. ND= not detected.

According to the results presented in Table 5, iron, which is one of the essential nutrients for the human body (Younas et al. 2019), exhibited values ranging from 1.08 to 3.46 mg Kg⁻¹. Similar results were observed by EFSA (2019) for cocoa pulp. Nickel (Ni) values were lower than the LOQ in the CCN51 and Parazinho varieties, and strontium (Sr) was lower only in the Parazinho variety. In the other varieties, concentrations were low (≤ 1.97 mg Kg⁻¹). The data obtained by Cinquanta et al. (2016), when evaluating the mineral composition of cocoa seeds, were higher than the values found here. Copper (Cu) and manganese (Mn) were detected at values lower than the LOQ of the method in all varieties. Therefore, these low levels may be related to several factors, such as soil composition, fertilization practices, influence of cocoa varieties, and climate variations that directly affect agricultural activities (Brito et al. 2017; Martínez-Ballesta et al. 2010).

The CCN51 and PS1319 varieties stand out with higher concentrations of zinc (Zn), at 18.76 and 9.49 mg Kg⁻¹, respectively. The zinc content reported by Nunes et al. (2020) for cocoa pulp was 1.535 mg Kg⁻¹, lower than that found in this study for all varieties. However, Leite et al. (2019) found 4 mg L⁻¹ in a cocoa honey sample without specifying the variety. These differences in observed values may be associated with the type of cocoa variety, harvest time,

environmental factors, soil, and geographical region (Febrianto and Zhu 2022). Zinc is an essential trace element, and its recommended daily intake for adults is 7 mg according to ANVISA's RDC 269 (Brazil 2005a). According to the World Health Organization (WHO 2003), the recommended daily intake for adult men is 15 mg/day and for adult women is 12 mg/day. Furthermore, the National Institutes of Health in the United States recommends a consumption of 11 mg/day for adult men and 8 mg/day for adult women (Institute of Medicine 2001).

Regarding macronutrients, the highest amount of potassium (K) was observed in the SJ02 variety (1,046.60 mg Kg⁻¹), and magnesium (Mg) in the CCN51 and SJ02 varieties (198.16 and 186.46 mg Kg⁻¹, respectively). The levels found were like those in cocoa pulp studied by Nunes et al. (2020), who found 1,459.842 mg Kg⁻¹ of K and 237.230 mg Kg⁻¹ of Mg. The primary source of potassium is the diet, with the highest potassium content found in fruits, vegetables, and meats. Current dietary guidelines recommend a potassium intake of 3.5 g/day for adults, considering the associated health benefits (WHO 2012a).

The calcium content was higher in the SJ02 variety, consistent with a similar result of 54.00 mg Kg⁻¹ reported by EFSA (2019) for cocoa pulp and higher than that found by Marchioretto et al. (2024) for chocolate produced with green banana biomass (0.25 mg Kg⁻¹).

Sodium concentrations showed low levels, ranging from 44.56 to 94.57 mg Kg⁻¹, which were lower than those found by Nunes et al. (2020) in cocoa pulp (98.966 mg Kg⁻¹). Sodium is also an essential element but is required only in small amounts. High intake of sodium is associated with increased blood pressure and the risk of cardiovascular disease. Consequently, the WHO aims to reduce the average sodium intake of the population by 30% by 2025 (WHO 2013). According to WHO (2012b), a recommended intake of 2 g/day is advised for adults. Therefore, all varieties of cocoa honey have low sodium content and can be considered a healthy food option, particularly for individuals with hypertension.

In the present study, low concentrations of aluminum (Al) were found in cocoa honey of all varieties (≤ 3.39 mg Kg⁻¹). This result is consistent with the findings of Leite et al. (2019), who reported 1.5 mg Kg⁻¹ of Al when studying cocoa honey. According to ANVISA, health harm caused by aluminum is associated with consumption exceeding the Provisional Tolerable Weekly Intake (PTWI) of 2 mg/kg of body weight. The World Health Organization (WHO) and the Joint Committee of Experts of the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) have set the provisional tolerable weekly intake (PTWI) at 1 mg of aluminum per kg of body weight per week (JECFA 2011). Considering a person weighing 60 kg, an intake

of 60 mg of Al per week is allowed, which equates to 8.57 mg per day. Therefore, the data found in this study are lower than the recommended intake, indicating that it is a safe product.

The analytes barium (Ba), cobalt (Co) and chromium (Cr) were detected at values lower than the LOQ of the method in all varieties. Cadmium (Cd) was not found in the analyzed samples, presenting values <LOD.

In this context, cocoa honey is rich in essential minerals such as Zn, Mg, and K, which can contribute to healthy eating, particularly in CCN51, PS1319, and SJ02 varieties. According to the results, cocoa honey serves as a good source of zinc, magnesium, and potassium, while containing low levels of sodium. However, it is worth noting that the concentration of micronutrients and macronutrients in plant foods is influenced by various factors such as climate, geographic conditions, environmental stress, soil quality, and cultivation practices (Brito et al. 2017; Martínez-Ballesta et al. 2010).

3.4.1 Multivariate analysis

Multivariate data analysis can provide a sophisticated approach to enhancing our comprehension of food quality. Extracting meaningful insights from these raw datasets is challenging, rendering them nearly impossible to interpret without the assistance of suitable statistical tools (Gomes et al. 2023). In this regard, principal component analysis (PCA) was conducted to examine the discrimination or grouping of the samples based on the mineral composition of the cocoa honey varieties under study (Fig. 1). The factors, encompassing the 1st, 2nd, and 3rd components of the PCA, account for 28.20%, 53.10%, and 16.6% of the data variation, respectively, resulting in a total explanation of 97.9% of the evaluated data (Fig. 1A).

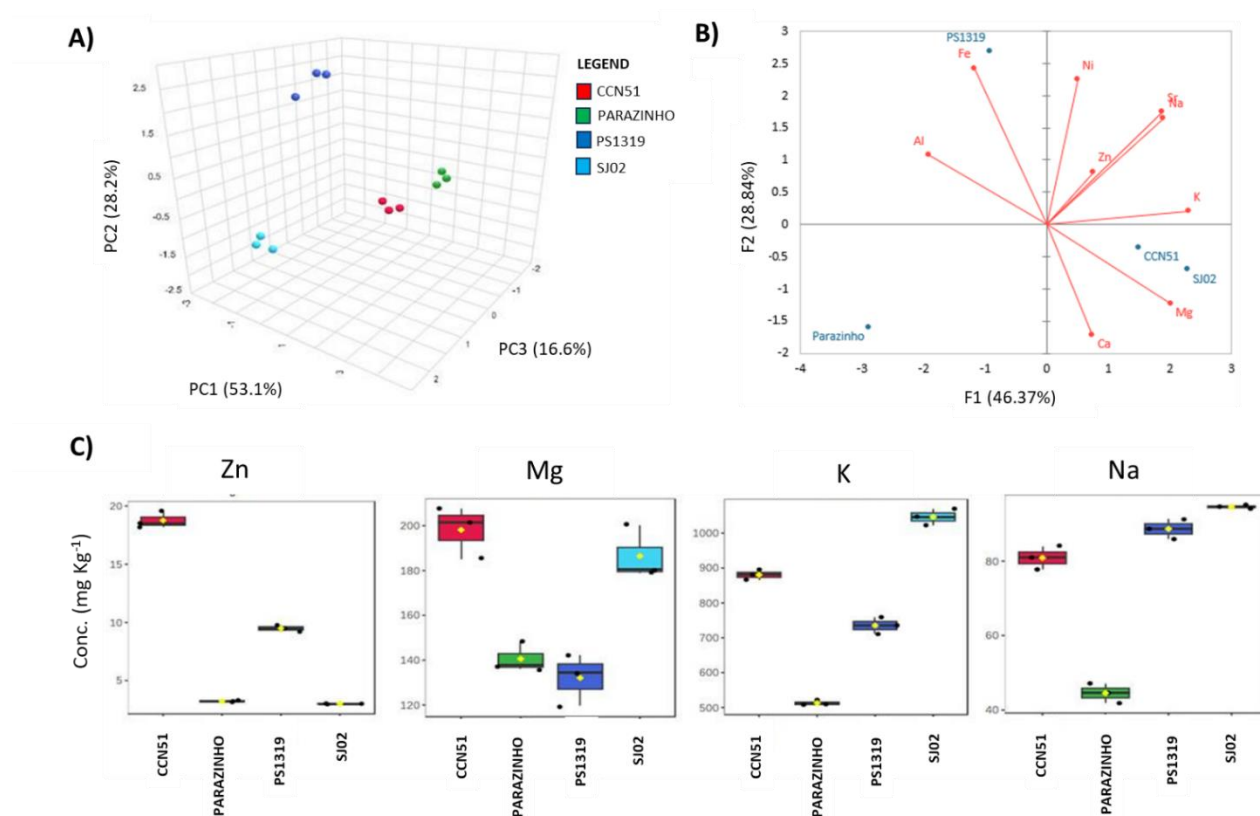


Fig 1 PCA (score plot) in 3D relating the mineral profile of different varieties of cocoa honey (A); Biplot relating the minerals analyzed and the different varieties of cocoa honey (B); Box-plot relating the compounds with the highest concentrations among the cocoa honey varieties (C).

The multivariate analysis in Fig. 1A indicates that the varieties exhibit distinct profiles concerning mineral concentrations. Fig. 1B illustrates how the variety influences the mineral concentration in cocoa honey. It is worth noting that only 9 elements exceeded the LOQ of the method, and these are the ones depicted in the biplot (Fig. 1B). The presence of Al, Fe, and Ni distinguishes the PS1319 variety, while the other parameters (Zn, Sr, Na, K, Mg, and Ca) differentiate the CCN51 and SJ02 varieties (Table 5). In the PCA analysis conducted by Febrianto and Zhu (2022), differences in the mineral composition of sub-fermented and fermented cocoa bean samples from various geographic origins were also observed.

As depicted in Fig. 1C, zinc and magnesium exhibited higher concentrations in the CCN51 variety, whereas potassium and sodium showed higher concentrations in the SJ02 variety. Thus, it is feasible to distinguish between the four varieties of cocoa honey based on their mineral profiles, which exhibit distinct compositions in each variety.

3.4.2 Recommended daily intake (RDI)

Some national and international health agencies have established daily mineral intake guidelines for adults, children, and pregnant women (Brazil 2005a; WHO 2003; WHO 2012a; WHO 2012b). Thus, the data obtained in this study were compared with the recommended daily intake (RDI) for adults, assuming the consumption of 200 mL (1 glass) of cocoa honey (Table 6).

Table 6 RDI of macro and microelements for adults and their quantity in each variety of cocoa honey, considering the intake of 200 mL.

Elements	RDI	CCN51	PS1319	SJ02	Parazinho
Ca (mg)	1000 ^a	7.80	7.72	11.31	9.41
Fe (mg)	14.0 ^a	0.42	0.69	0.22	0.41
K (g)	3.5 ^b	0.18	0.15	0.21	0.10
Mg (mg)	260 ^a	39.60	26.42	37.30	28.12
Na (g)	2.0 ^c	0.02	0.02	0.02	0.00
Zn (mg)	15.0 ^d	3.80	1.90	0.60	0.65

^aIndex recommended by ANVISA (Brazil 2005a). ^bIndex recommended by WHO (WHO, 2012a). ^cIndex recommended by WHO (WHO, 2012b). ^dIndex recommended by WHO (WHO, 2003).

The RDI percentage was calculated in milligrams and/or grams of essential elements provided by each sample divided by the recommended RDI values (Brazil 2005a; WHO 2003; WHO 2012a; WHO 2012b) and multiplied by 100. The contribution of calcium, iron and potassium is between 1% and 5% of the RDI. The percentage of magnesium is 10% to 15%, while the contribution of sodium is negligible ($\leq 1\%$). The percentage of RDI for zinc found in cocoa honey is notable in the CCN51 and PS1319 varieties (25.33% and 12.66%, respectively), considering the recommendation of the World Health Organization (WHO 2003). Furthermore, when considering the RDI of 7 mg recommended by Brazilian legislation, the CCN51 and PS1319 varieties exhibit an even higher percentage of RDI (54.28% and 27.14%, respectively) from the consumption of 200 mL of cocoa honey (Brazil 2005a).

It is noteworthy that the zinc content in cocoa honey from the CCN51 and PS1319 varieties corresponds to 25.33% and 12.66%, respectively, of the daily recommendation by the World Health Organization (WHO 2003). Moreover, considering the RDI of 7 mg as recommended by Brazilian legislation, the CCN51 and PS1319 varieties exhibit even higher percentages (54.28% and 27.14%, respectively) of the daily recommendation from the consumption of 200 mL of cocoa honey (Brazil 2005a).

Cocoa honey could serve as an appealing natural source of zinc supplementation, as it is an essential element crucial for the activity of over 300 enzymes involved in protein synthesis, reproduction, and fatty acid metabolism. It is considered vital for human health and well-being

as it plays a role in all vital processes. Zinc deficiency can complicate clinical conditions, negatively impact immune function, increase oxidative stress, and contribute to the production of inflammatory cytokines (Chasapis et al. 2012; Muthai et al. 2017). According to Wang et al. (2018), zinc consumption is associated with reduced blood pressure and improved glucose control in Chinese patients with diabetes and cardiovascular disease.

Thus, the presence of magnesium, a high concentration of zinc, and low sodium content provide significant grounds to encourage increased consumption of cocoa honey as a valuable nutritional source. The data obtained in this study are noteworthy and unpublished, considering that information regarding the concentration of most of the studied elements is typically unavailable on product labels in the market.

4. Conclusions

The results revealed that cocoa honey from the studied varieties exhibited distinct physicochemical compositions. The results of this work showed that cocoa honey is acidic with low protein content and high levels of total soluble solids (TSS), carbohydrates, energy value, and sugars. Colorimetric analysis indicated that PS1319 and SJ02 varieties had similar color profiles, tending to exhibit a subtly brownish color, while CCN51 and Parazinho varieties tended to display a slightly greenish hue. Additionally, cocoa honey from all varieties was found to be rich in essential minerals such as Zn, Mg, and K, and exhibited low levels of potentially toxic elements when consumed in excess, such as Al, Ba, Co, and Cr. Considering the recommended daily intake (RDI) data, the presence of magnesium, a high concentration of zinc, and low sodium levels provide a significant rationale to promote increased consumption of cocoa honey as a valuable nutritional source. The data obtained in this study are important and novel, particularly since most cocoa honey labels available on the market lack information on the concentration of the studied elements. Therefore, consuming cocoa honey or incorporating it into food products may lead to improved health outcomes or enhance the nutritional profile of foods, making it a beneficial option for individuals with heart disease, hypertension, and those engaged in physical activities.

CRediT authorship contribution statement

M. B. Nascimento: Conceptualization, Methodology, Research, Data curation, Formal analysis, Writing - original draft, Writing - review and editing. **Thaís L. Souza:** Methodology, Research, Data curation, Writing - review and editing. **Djalma Lucas S. Maia:** Methodology,

Writing - review and editing. **Lívia R. Amorim:** Methodology. **Alvanice S. L. Ribeiro:** Methodology, Writing - review and editing. **Maria E. O. Mamede:** Methodology, Writing - review and editing. **Leonardo F. Maciel:** Methodology, Writing - review and editing. **Anibal F. S. Junior:** Resources, Writing - review and editing. **Paulo R. R. Mesquita:** Supervision, Data curation, Resources, Writing - review and editing. **Sergio E. Soares:** Project administration, Supervision, Writing - review and editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on reasonable request.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Ministry of Science, Technology, and Innovation of Brazil - MCTI (Grant No. 904399/2020). M. B. Nascimento would like to thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the grant [Nº 88887.504355/2020-00], Secretariat of Agriculture, Livestock, Irrigation, Fisheries and Aquaculture of the Government of the State of Bahia (SEAGRI) for the partnership, and farmer Manoel Carlos Andrade do Nascimento and Juscelino Macedo, president of the Cooperative of Rural Producers of Presidente Tancredo Neves, for providing the in natura cocoa beans.

References

- AOAC (2005) Official Methods of Analysis of AOAC International. AOAC international, Gaithersburg, Maryland, USA.
- Balaram V (2020) Microwave plasma atomic emission spectrometry (MP-AES) and its applications – A critical review. *Microchem J* 159 105483. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105483>.
- Brazil Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2005a) Resolução RDC nº 269 de 22 de setembro de 2005. O Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína vitaminas e minerais. https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/rdc0269_22_09_2005.html. Accessed 2 January 2024.

- Brazil Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2005b) Rotulagem nutricional obrigatória manual de orientação às indústrias de alimentos 2ª versão. <https://antigo.anvisa.gov.br/documents/33916/389979/Rotulagem+Nutricional+Obrigat%C3%B3ria+Manual+de+Orienta%C3%A7%C3%A3o+%C3%A0s+Ind%C3%BAstrias+de+Alimentos/ae72b30a-07af-42e2-8b76-10ff96b64ca4>. Accessed 1 January 2024.
- Brazil Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2015) Manual de garantia da qualidade analítica. áreas de identidade e qualidade de alimentos e de insumos. https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-de-produtos-origem-vegetal/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/manual-de-garantia-da-qualidade-analitica_2015.pdf. Accessed 4 February 2024.
- Brazil Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2017) Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/doi-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412. Accessed 6 January 2024.
- Brazil Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2022) Instrução normativa - IN Nº 161, de 1º de julho de 2022. https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/IN_161_2022_.pdf/b08d70cb-add6-47e3-a5d3-fa317c2d54b2. Accessed 28 January 2024.
- Brereton RG (2003) Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical (1th ed.) Plant, Wiley, Chichester.
- Brito ALB, Oliveira AF, Nogueira ARA, Pessoa AG, Pontes LF (2017) Determination of inorganic constituents and physicochemical characterization of functional flour samples. Microchem J 132 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.01.017>.
- Chasapis CT, Spiliopoulou CA, Loutsidou AC, Stefanidou ME (2012) Zinc and human health: an update. Arch Toxicol 86(4) 521–34. <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-011-0775-1>.
- Chitarra MIF, Chitarra AB (2005) Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio. 2Ed., Lavras: UFLA, (pp 783).
- Cinar ZO, Atanassov M, Tumer TB, Caruso G, Antika G, Sharma S, Sharifi-Rad J, Pezzani R (2021) Cocoa and cocoa bean shells role in human health: An updated review. J Food Compos Anal 103 104115. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104115>.
- Cinquanta L, Cesare SD, Manoni R, Piano A, Roberti P, Salvatori G (2016) Mineral essential elements for nutrition in different chocolate products. Int J Food Sci Nutr 67(7) 773-8. <http://dx.doi.org/10.1080/09637486.2016.1199664>.
- EFSA European Food Safety Authority (2019) Technical report on the notification of pulp from *theobroma cacao* L. as a traditional food from a third country pursuant to article 14 of regulation (EU) 2015/2283. EFSA Support Publ EN-1724. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2019.EN-1724>.
- Febrianto NA, Zhu F (2022) Composition of methylxanthines, polyphenols, key odorant volatiles and minerals in 22 cocoa beans obtained from different geographic origins. LWT - Food Sci Technol 153 112395. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112395>.
- Gomes AA, Azcarate SM, Špánik I, Khvalbota L, Goicoechea HC (2023) Pattern recognition techniques in food quality and authenticity: A guide on how to process multivariate data

- in food analysis. *Trends Anal Chem* 164 117105.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117105>.
- Guirlanda CP, Silva GG, Takahashi JA (2021) Cocoa honey: Agro-industrial waste or underutilized cocoa by-product?. *Future Foods* 4 100061.
<https://doi.org/10.1016/j.fufo.2021.100061>.
- Haase TB, Naumann-Gola S, Ortner E, Zorn H, Schweiggert-Weisz U (2023) Thermal stabilisation of cocoa fruit pulp — Effects on sensory properties, colour and microbiological stability. *Curr Res Food Sci* 7 100549.
<https://doi.org/10.1016/j.crfs.2023.100549>.
- Heredia JZ, Cina M, Savio M, Gil RA, Camiña JM (2016) Ultrasound-assisted pretreatment for multielement determination in maize seed samples by microwave plasma atomic emission spectrometry (MP AES). *Microchem J* 129 78–82.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.06.002>.
- Hernandez CE, Granados L (2021) Quality differentiation of cocoa beans: implications for geographical indications. *J Sci Food Agric* 101 3993–4002.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.11077>.
- IAL Instituto Adolfo Lutz (2008) Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. (4th ed).
- IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2023) Levantamento sistemático da produção agrícola. IBGE/LSPA. Tabela 6588 - Série histórica da estimativa anual da área plantada, área colhida, produção e rendimento médio dos produtos agrícolas. <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6588>. Accessed 20 January 2024.
- Indiarto R, Raihani ZR, Dewi MP, Aqila ZR (2021) A review of innovation in cocoa bean processing by-products. *IJETER* 9 (8) 1162–1169.
<https://doi.org/10.30534/ijeter/2021/22982021>.
- Institute of Medicine. Food and Nutrition Board (2001) Dietary reference intakes for vitamin a, vitamin k, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Washington DC: National Academy Press.
<https://ods.od.nih.gov/factsheets/Zinc-HealthProfessional/#en1>. Accessed 03 May 2024.
- JECFA Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (2011) Compendium of food additive specifications.
<http://www.who.int/foodsafety/chem/jecfa/about/en/index.html>. Accessed 20 January 2024.
- Koelher BTA, Souza SMM, Costa AM, Aguiar-Oliveira E (2022) Applicability of *Saccharomyces cerevisiae* strains for the production of fruit wines using cocoa honey complemented with cocoa pulp. *Food Technol Biotech* 60(2) 192–201.
<https://doi.org/10.17113/ftb.60.02.22.7285>.
- Lawless HT, Heymann H (2010) Sensory evaluation of food. Principles and practices. Springer, London. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6488-5>.
- Leite PB, Machado WM, Guimarães AG, Carvalho GBMD, Magalhães-Guedes KT, Druzian J I (2019) Cocoa's residual honey: physicochemical characterization and potential as a

- fermentative substrate by *saccharomyces cerevisiae* AWRI726. Sci. World J 5698089. <https://doi.org/10.1155/2019/5698089>.
- Lopes UV, Monteiro WR, Pires JL, Clement D, Yamada MM, Gramacho KP (2011). Cacao breeding in Bahia. Brazil - strategies and results. Crop Breed Appl Biotechnol 1 73-81. <https://doi.org/10.1590/S1984-70332011000500011>.
- Lu M, Zhu C, Smetana S, Zhao M, Zhang H, Zhang F, Du Y (2024) Minerals in edible insects: a review of content and potential for sustainable sourcing Mingxing. Food Sci Hum Wellness 13 65-74. <https://doi.org/10.26599/FSHW.2022.9250005>.
- Macêdo M, Rosa ES, Luz EDMN, Pires, JL (2021) Avaliação de clones de cacauzeiro quanto a produtividade e incidência de vassoura de bruxa e podridão parda. Agrotrópica 33(1) 5-16. <https://doi.org/10.21757/0103-3816.2021v33n1p5-16>.
- Magro LD, Dalagnol LMG, Manfroi V, Hertz PF, Klein MP, Rodrigues RC (2016) Synergistic effects of pectinex ultra clear and lallzyme beta on yield and bioactive compounds extraction of concord grape juice. LWT - Food Sci Technol 72 157-165. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.046>.
- Mandarino EP, Gomes ARS (2009) Produtividade do cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) cultivados em blocos monoclonais, no sul da Bahia, Brasil. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC 197 5-30. <https://biblat.unam.mx/pt/revista/boletim-tecnico-ceplac/articulo/produtividade-do-cacauzeiro-theobroma-cacao-l-cultivado-em-blocos-monoclonais-no-sul-da-bahia-brasil>. Accessed 8 December 2024.
- Marchioretto C, Luccas V, Gorup LF, Gomes RAB, Simionatto E, Oliveira KMP, Araújo RP, Altemio ADC, Porzani GB, Martelli SM, Arruda EJ (2024) Nutritional value and acceptability of chocolate with high cocoa content and green banana biomass. LWT - Food Sci Technol 191 115667. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115667>.
- Martínez-Ballesta MC, Dominguez-Perles R, Moreno DA, Muries B, Alcaraz Lopez C, Bastías E, García-Viguera C, Carvajal M (2010) Minerals in plant food: Effect of agricultural practices and role in human health. A review. Agron Sustain Dev 30 295–309. <https://doi.org/10.1051/agro/2009022>.
- Martínez S, Sánchez R, Todolí JL (2023) High temperature total consumption sample introduction system coupled to microwave plasma optical emission spectrometry (MIP OES) for the analysis of aqueous samples. Anal Chim Acta 1249 340948. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.340948>.
- Mermet JM, Poussel E (1995) ICP emission spectrometers: 1995 analytical figures of merit. Appl Spectrosc 49(10) 12-18. <https://doi.org/10.1366/0003702953965588>.
- Mir-Marqués A, Domingo A, Cervera ML, La Guardia M (2015) Mineral profile of kaki fruits (*Diospyros kaki* L.). Food Chem 172 291–297. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.076>.
- Moretti LK, Ramos KK, Ávila PF, Goldbeck R, Vieira JB, Efraim P (2023) Influence of cocoa varieties on carbohydrate composition and enzymatic activity of cocoa pulp. Food Res Int 173 113393. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113393>.
- Moretto E (2008) Introdução à ciência de alimentos. Ampliada e revisada. Florianópolis: Editora da UFSC (2th ed).

- Muthai KU, Karori MS, Muchugi A, Indieka AS, Dembele C, Mng'omba S, Jamnadass R (2017) Nutritional variation in baobab (*Adansonia digitata* L.) fruit pulp and seeds based on Africa geographical regions. *Food Sci Nutr* 5 1116–1129. <https://doi.org/10.1002/fsn3.502>.
- Neto BAM, Bonomo RCF, Fontan RCI, Ferreira ACR, Gonçalves GRF, Mello DLN (2016) Physical chemical characterization and thermophysical properties of cocoa honey. *Rev Geintec Ges Inov Tecnol* 6 (1) 2944–2953. <https://doi.org/10.7198/S2237-0722201600010016>.
- Neto BAM, Carvalho EA, Pontes KV, Barretto WS, Sacramento CK (2013) Chemical, physico-chemical and sensory characterization of mixed açai (*Euterpe oleracea*) and cocoa's honey (*Theobroma cacao*) jellies. *Rev Bras Frutic* 35 (2) 587–593. <https://doi.org/10.1590/s0100-29452013000200030>.
- Nile SH, Park SW (2014) Edible berries: bioactive components and their effect on human health. *Nutrition* 30(2) 134–144. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.04.007>.
- Nunes CSO, Da Silva MLC, Camilloto GP, Machado BAS, Hodel KVS, Koblitiz MGB, Carvalho GBM, Uetanabaro APT (2020) Potential applicability of cocoa pulp (*Theobroma cacao* L) as na adjunct for beer production. *Sci World J* 2020 3192585. <https://doi.org/10.1155/2020/3192585>.
- Ozbek N, Tinas H, Atespare E (2019) A procedure for the determination of trace metals in rice varieties using microwave induced plasma atomic emission spectrometry. *Microchem J* 144 474–478. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.10.010>.
- Prasad K, Jacó S, Siddiqui MW (2018) Chapter 2 - Fruit maturity, harvesting, and quality standards. preharvest modulation of postharvest fruit and vegetable quality (pp 41–69). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809807-3.00002-0>.
- Santana GFR, Rodrigues RS, Brandão GP, Costa VC, Carneiro MTWD (2024) Multi-element determination in craft chocolate with diferent cocoa contents using ultrasound-assisted extraction and dilute acid as sample preparation. *Food Anal Methods* 17:475–485. <https://doi.org/10.1007/s12161-024-02586->.
- SANTE (2021) Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. https://food.ec.europa.eu/system/files/2023-11/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2021-11312.pdf. Accessed 26 February 2024.
- Santos COD, Bispo EDS, Santana LRR, Carvalho RDSD (2014) Use of "cocoa honey" (*Theobroma cacao* L) for diet jelly preparation: an alternative technology. *Rev Bras Frutic* 36 (3) 640–648. <https://doi.org/10.1590/0100-2945-042/13>.
- SENAR Serviço Nacional de Aprendizagem Rural (2018) Cacau: produção, manejo e colheita. Coleção Senar 215. <https://www.cnabrazil.org.br/assets/arquivos/215-CACAU.pdf>. Accessed 3 May 2024.
- Serra WS, Sodré GA (2021) Manual do cacauicultor: perguntas e respostas. Brasil, Ilhéus, BA, CEPLAC/CEPEC. Boletim Técnico nº 221 190. https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/ceplac/publicacoes/boletins-tecnicos-bahia/boletim-tecnico-no-221-2021_compressed.pdf. Accessed 1 October 2023.

-
- Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Gomes RAR, Okazaki MM, Iamanaka BT (2021) Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. São Paulo: Blucher. (6th ed.).
- Wang Y, Jia XF, Zhang B, Wang ZH, Zhang JG, Huang FF et al (2018) Dietary zinc intake and its association with metabolic syndrome indicators among chinese adults: an analysis of the china nutritional transition cohort survey 2015. *Nutrients* 10(5) 572. <https://doi.org/10.3390/nu10050572>.
- WHO Word Health Organization (2003) Guideline: zinc in drinking-water. Genebra. https://cdn.who.int/media/docs/default-source/wash-documents/wash-chemicals/zinc.pdf?sfvrsn=9529d066_4. Accessed 3 May 2024.
- WHO Word Health Organization (2012a) Guideline: potassium intake for adults and children. Genebra. https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/77986/9789241504829_eng.pdf?sequence=1. Accessed 23 October 2023.
- WHO World Health Organization (2012b) Guideline: sodium intake for adults and children. Geneva. https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/77985/9789241504836_eng.pdf?sequence=1. Accessed 23 October 2023.
- WHO World Health Organization (2013) Global action plan for the prevention and control of non-communicable diseases 2013–2020. http://www.who.int/nmh/events/ncd_action_plan/en/. Accessed 13 January 2024.
- Younas A, Sadaqat HA, Kashif M, Ahmed N, Farooq M (2019) Combining ability and heterosis for grain iron biofortification in bread wheat. *J Sci Food Agric* 100 1570-1576. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10165>.
- Yulianaa N, Nurainya F, Sari GW, Sumardi, Widiastuti EL (2023) Total microbe, physicochemical property, and antioxidative activity during fermentation of cocoa honey into kombucha functional drink. *Applied Food Research* 3 100297. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2023.100297>.

4.3

Artigo: Optimization of HS-SPME/GC-MS Method for Determining Volatile Organic Compounds and Sensory Profile in Cocoa Honey from Different Cocoa Varieties (Theobroma cacao L.).

**OPTIMIZATION OF HS-SPME/GC-MS METHOD FOR DETERMINING
VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS AND SENSORY PROFILE IN COCOA
HONEY FROM DIFFERENT COCOA VARIETIES (*Theobroma cacao* L.)**

Manuela B. Nascimento^{1,2}; Livia R. Amorim¹; Marcos A. S. Nonato¹; Mariana N. Roselino¹;
Ligia R. R. Santana³; Adriana C. R. Ferreira⁴; Frederico M. Rodrigues²; Paulo R. R. Mesquita²;
Sergio E. Soares^{1,*}

¹*Faculty of Pharmacy, Federal University of Bahia, Campus Ondina, Salvador 40170-115, BA, Brazil;*

²*Agricultural Technological Center of the State of Bahia, Ondina, Salvador 40170-110, BA, Brazil;*

³*Department of Life Sciences, State University of Bahia, Cabula, Salvador 41195-001, BA, Brazil;*

⁴*Cocoa Innovation Center, Santa Cruz State University, Salobrinho, Ilhéus 45662-200, BA, Brazil*

Periódico publicado:	<i>Molecules</i> – ISSN 1420-3049
Maior percentil (Scopus):	83%
Ano:	2024
Doi:	https://doi.org/10.3390/molecules29133194

***Corresponding author:** Sérgio Eduardo Soares. Faculty of Pharmacy, Federal University of Bahia, Campus Ondina, Salvador 40170-115, BA, Brazil. E-mail: ssoares.ssa@gmail.com

Abstract: This study aimed to develop an analytical method using HS-SPME/GC-MS to determine the volatile organic compound (VOC) profiles and evaluate the sensory attributes of cocoa honey from four cocoa varieties (CCN51, PS1319, SJ02, and Parazinho). Using a multivariate factorial experimental design, the HS-SPME/GC-MS method was optimized to determine the VOC profiles. Twenty previously trained tasters participated in the ranking descriptive analysis, while 108 consumers participated in the acceptance and purchase intention tests. A total of 84 volatile organic compounds were identified from various chemical classes, including acids, alcohols, aldehydes, esters, ketones, monoterpenes, oxygenated monoterpenoids, sesquiterpenes, and oxygenated sesquiterpenoids. Palmitic acid was the compound found in the highest concentration in all varieties (5.13–13.10%). Multivariate analysis tools identified key compounds for differentiation and grouping of the samples. The results revealed that the variety significantly influenced both the VOCs' concentrations and sensory profiles. The CCN51, PS1319, and SJ02 varieties exhibited the highest diversity of VOCs and sensory attributes. Notably, the SJ02 and CCN51 varieties demonstrated superior acceptability and purchase intention, with means ranging from 7.21 and 7.08 to 3.71 and 3.56, respectively. These results indicate their potential as promising sources of cocoa honey for the food industry.

Keywords: cocoa honey; multivariate optimization; volatile organic compounds; sensory profile; descriptive analysis; consumer acceptance

1. Introduction

Cocoa (*Theobroma cacao* L.) is a fruit native to Central America that is cultivated in several countries. World production is led by the Ivory Coast, with approximately 61% of production, placing Brazil in sixth position with 4.4% [1]. In Brazil, although Bahia was once the pillar in cocoa production, today the state of Pará is the leader, with production of 150,000 tons in 2023 [2]. Originally, there were three varieties of cocoa cultivated, the Criollo, Forastero, and Trinitario, the latter being a hybrid of the first two varieties. Currently, advances in genetic engineering and subsequent processing of beans have led to the use of disease-resistant clones derived from these original varieties. CCN51, PS1319, and SJ02 are hybrids resulting from the genetic improvement of Trinitario cacao, while Parazinho comes from the Forastero variety, which has not undergone genetic improvement [3]. Overall, more than 1000 different cocoa varieties have been described [4].

However, the extraction of this fruit generates residues that have recently been the subject of studies aimed at new industrial applications. These residues include cocoa shell, pulp, and cocoa honey. In this context, cocoa honey is an opaque yellow, mucilaginous liquid with a bittersweet flavor, separated from the pulp surrounding the cocoa beans by simple cold extraction before fermentation starts [5]. Cocoa honey gets its name from its rheological characteristics, such as its viscosity and sweet flavor, which resemble bee honey, although it does not originate from beekeeping. The literature shows that cocoa honey is a by-product with

physicochemical characteristics similar to the original pulp, such as its reducing sugar content ($8.63 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$), low ash content (approximately 0.2%), low lipid content ($0.25 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$), and acid pH ranging from 2.76 to 3.78 [6,7].

The main uses of cocoa honey include the production of alcoholic beverages, syrups, jellies, and liqueurs, often made by cooperatives and artisanal food producers [5]. Some of these include kefir-based drinks [8], mixed açaí jelly and cocoa honey [9], and functional drink cocoa honey kombucha [10]. Additionally, some patents employed cocoa honey as a sugar substitute in edible ice cream and chocolate [11], and in the production of craft beer [12]. In addition, volatile organic compounds (VOCs) are crucial constituents for developing the aroma of cocoa honey. Among the methods used to analyze these VOCs, headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography–mass spectrometry (HS-SPME/GC-MS) stands out as an efficient and versatile technique. This method involves the adsorption of volatile and semi-volatile organic compounds from a matrix by a fused silica fiber or a fiber coated with a non-volatile polymer, without direct contact with the sample. These compounds are then injected into a gas chromatography system for analysis (GC) [13].

Since VOCs can affect the sensory quality of cocoa honey, it is important to analyze not only the compounds themselves but also their correlation with consumer perception and acceptance. The sensory quality of a food product promotes consumer loyalty in an increasingly demanding and diversified market. Therefore, it is necessary to evaluate its color, flavor, aroma, and consistency properties. Sensory methods are used to evaluate these properties, which can be of the discriminative, descriptive, subjective, or affective types [14]. In this context, ranking descriptive analysis (RDA) was applied by Richter et al. [15] for chocolate pudding and by Silva et al. [16] for chocolate formulations to rank the intensity of each sensory attribute in increasing order. RDA offers advantages such as reduced time and costs, as it requires fewer sessions and smaller quantities of the product compared to other techniques.

Although cocoa is an ancient fruit and the extraction of cocoa honey has existed for decades, there are, to our knowledge, no available data on the evaluation of volatile organic compounds or the sensory profile of the different varieties of cocoa honey explored in this work. Thus, this study aimed to develop an analytical method using HS-SPME/GC-MS to identify the volatile organic compounds present in different varieties of cocoa honey, in addition to evaluating their sensory profile through descriptive and affective analysis.

2. Results and Discussion

2.1. HS-SPME Optimization

The first parameter evaluated in this study was the fiber coating used to extract volatile organic compounds from cocoa honey samples through univariate analysis. According to Brokl et al. [17], the polarity of the fibers depends on the coating material, which determines the interaction and extraction capacity of the compounds present in the sample. This, in turn, may be reflected in different chromatographic peak areas.

Four types of fibers were used under the same conditions: sample amount (10 mL), extraction temperature (60 °C), equilibration time (15 min), extraction time (30 min), and stirring speed (100 rpm). The total peak area and the number of peaks detected in the extractions performed were considered for comparing the four types of fibers. The extractions were performed in triplicate, and the reproducibility (% RSD) showed an error of less than 20%. According to the results, the DVB/CAR/PDMS fiber extracted the largest peak area (Figure 1A) and obtained the highest number of peaks (Figure 1B).

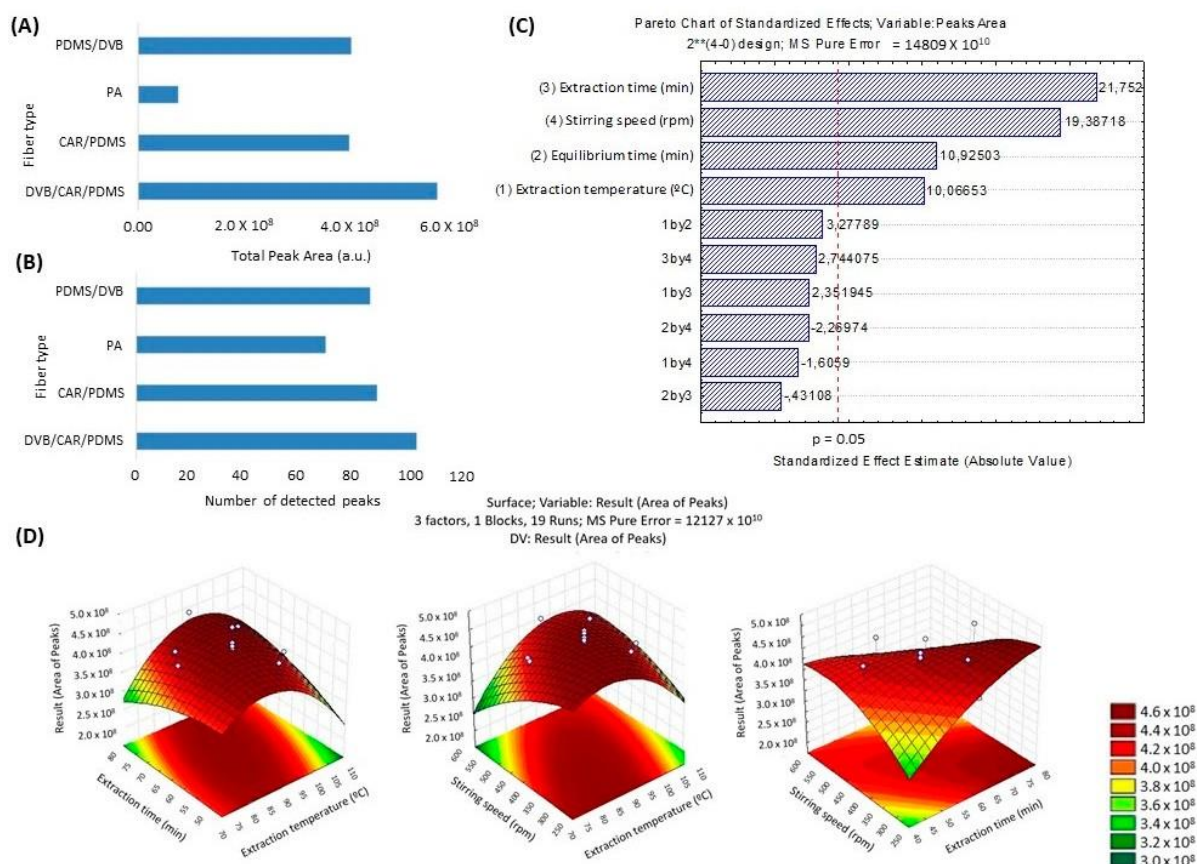


Figure 1. Influence of the type of HS-SPME fiber coating on the extraction efficiency of VOCs in cocoa honey samples considering total peak area (A) and number of detected peaks (B). Pareto chart of standardized effects of the 2^4 factorial design for total chromatographic peak area (C). Responses surface obtained by central composite using the quadratic model in the optimization of the conditions (temperature T, °C, time t, min, and stirring speed, rpm) for extraction of the volatiles in cocoa honey by HS-SPME (D).

The four fibers tested had the following order of extraction efficiency: DVB/CAR/PDMS > CAR/PDMS > PDMS/DVB > PA. It is evident that the mixed-phase fibers achieved higher extraction efficiency. A total of 103 chromatographic peaks were detected with the DVB/CAR/PDMS fiber, 89 with the CAR/PDMS fiber, 86 with the PDMS/DVB fiber, and 70 with the PA fiber. Therefore, the DVB/CAR/PDMS fiber was chosen for the optimization tests of the other parameters of the HS-SPME technique for extracting VOCs from cocoa honey. DVB/CAR/PDMS is considered one of the most efficient SPME coating types, as it combines three different materials: DVB for strong retention of aromatic compounds and polar analytes, CAR for small volatile molecules, and PDMS for non-polar compounds. This type of fiber has been previously used to evaluate volatile organic compounds in cocoa and its by-products [18,19].

A full 2^4 factorial design was performed to evaluate the influence of temperature, extraction time, equilibration time, and stirring speed, as detailed in Table S1. The Pareto chart shows that all four parameters were significant and influenced the efficiency of the HS-SPME method (Figure 1C). However, to reduce the number of experiments and not excessively increase the total extraction time, the equilibration time was fixed at 20 min.

Thus, a central composite multivariate design was used to determine the optimal values of temperature, extraction time, and stirring speed for achieving greater extraction efficiency by HS-SPME. A central composite design was constructed using the experimental levels that provided the best response as the center point, involving 19 experiments and 5 replicates at the central point (Table S2).

Figure 1D shows the response surfaces obtained through the central composite design, indicating that the optimal conditions were within the experimental domain. The empirical regression equation for the response (total area) of HS-SPME extraction, dependent on extraction temperature (A), extraction time (B), and stirring speed (C), is shown in Equation (1):

$$\text{Response} = 4.30 \times 10^8 - 5.64 \times 10^6 A + 2.43 \times 10^6 B - 1.07 \times 10^7 C - 2.52 \times 10^7 A^2 + 1.31 \times 10^7 AB + 2.09 \times 10^7 AC - 5.65 \times 10^6 B^2 - 1.52 \times 10^7 BC - 8.12 \times 10^6 C^2 \quad (1)$$

The determination coefficient (R^2) of the quadratic regression model was 0.4056, and the lack of fit was 0.0014 ($p < 0.05$), indicating that the sum of the areas can be explained but the model has low predictive accuracy. Therefore, it was necessary to experimentally validate the optimal points predicted by the model. Table S3 shows that the optimal values for temperature (85 °C), extraction time (78 min), and stirring speed (171 rpm) obtained through the central composite design for the HS-SPME method, after optimization, provided a better response compared to similar conditions for these parameters.

In the study by Rojas et al. [20], the extraction conditions for HS-SPME of cocoa liquor of the CCN51 variety were optimized using a 33 experimental design, considering the factors of fiber type, temperature, and extraction time. According to the design, the best conditions for extracting VOCs were an extraction time of 50 min, a temperature of 60 °C, and a DVB/CAR/PDMS fiber. The identified compounds included aldehydes, ketones, alcohols, pyrazines, esters, terpenes, acids, and lactones, with acetic acid, 2-propanol, and 3-ethyl-2,5-dimethyl-pyrazine being the compounds with the highest concentrations.

2.2. Characterization of Volatile Organic Compounds

The volatile profile of cocoa honey samples was evaluated to identify VOCs associated with different cocoa varieties. Table 1 shows all VOCs identified among the different varieties, their linear retention index (LRI) on the HP-5 MS capillary column, and the average relative composition ($n = 9$) of each compound in the sample from each variety. A total of 84 volatile organic compounds were identified, and 16 were confirmed using the standard. So far, this is the first study evaluating the VOC profile of cocoa honey obtained from different cocoa varieties (*Theobroma cacao* L.). A similar study identified 56 volatile organic compounds in the cocoa pulp of different varieties (CATIE-R1, CATIE- R4, CATIE-R6, ICS-95 (T1), and PMCT-58) harvested at different maturation stages in Costa Rica [4].

In this study, the samples differed in the number of volatile organic compounds detected in each variety (Table 1). In general, the SJ02 and PS1319 varieties had the highest number of volatiles (72 and 70 compounds, respectively), followed by Parazinho and CCN51 (67 and 63 compounds, respectively). Among the detected compounds, the chemical classes included volatile acids (6), alcohols (8), aldehydes (13), esters (21), ketones (5), monoterpenes (10), oxygenated monoterpenes (7), sesquiterpenes (5), oxygenated sesquiterpenes (4), and others (4) across the four varieties.

Six compounds were found in the four varieties within the group of volatile acids. Palmitic acid was present in the highest concentration across all varieties; other acids, such as dodecanoic, tetradecanoic, and pentadecanoic, were also detected. Palmitic acid is a fatty acid found in cocoa butter, cocoa, and chocolate products. These results align with findings from other studies comparing unroasted cocoa beans from different geographic origins, where palmitic acid was a major component, and dodecanoic acid, tetradecanoic acid, and pentadecanoic acid were present in lower concentrations [21]. Although cocoa pulp contains low amounts of fat, unsaturated fatty acids are likely present in cocoa pulp [22].

These results may explain the presence of these fatty acids in the cocoa honey samples, as cocoa honey is a by-product of cocoa, obtained by pressing its pulp.

The variety PS1319 was characterized by the highest amounts of alcohols (28.72%), with higher contents of 2-pentanol and 2-heptanol. In contrast, the samples of the varieties Parazinho (25.74%), CCN51 (24.79%), and SJ02 (20.75%) contained lower levels of these compounds. According to other studies, 2-pentanol is widely identified in cocoa pulp [23]. The 2-heptanol is an aromatic compound that imparts a citrus flavor (similar to lemongrass), a fresh aroma, and sweet and floral notes when found in foods [24]. Also noteworthy in this work is the presence of 2-nonanol in the varieties CCN51, PS1319, and SJ02. In the work of

Valdeci et al. [18], 2-nonanol was produced during the fermentation of cocoa beans. According to Chetschik et al. [25], it is a desirable compound commonly found in high-quality cocoa. A high alcohol content is desirable in cocoa products because it imparts sweet and floral notes.

Table 1. Mean relative composition (%) of VOCs identified in cocoa honey from different cocoa varieties (*Theobroma cacao* L.).

Group	Compound	Odor description	tR (min)	LRI ^a _{EXP}	LRI ^b _{LIT}	CCN51	PS1319	SJ02	Parazinho
<i>Acids</i>									
1	octanoic acid	Sweet, cheese, oily, fatty ^{25,26}	38.971	1183	1185	0.20	0.01	0.02	0.09
2	nonanoic acid*	Green, fatty ²⁵	42.820	1271	1272	0.42	0.03	0.09	0.22
3	dodecanoic acid*	Rancid, fatty, metal ²⁵	52.850	1562	1562	0.56	0.83	0.62	0.70
4	tetradecanoic acid*		58.444	1758	1759	0.42	0.27	0.38	0.64
5	pentadecanoic acid*		61.002	1855	1857	2.73	0.14	0.20	0.27
6	palmitic acid*		63.814	1961	1960	13.10	5.13	8.27	7.72
<i>Alcohols</i>									
7	2-pentanol	Fruity ²⁷	5.050	687	685	2.23	2.43	3.52	4.12
8	2-heptanol	Citrus, fresh, lemon-grasslike ²⁴ , sweet, citrusy ^{25,26,31}	20.987	901	901	0.93	2.06	0.37	0.05
9	1-heptanol*		27.384	980	975	-	-	0.03	-
10	2-ethyl-1-hexanol		30.912	1031	1030	-	-	0.01	-
11	2-nonanol	Fruity ^{4,29}	34.677	1099	1098	0.50	2.26	0.11	0.00
12	1-dodecanol*		50.001	1470	1469	0.13	0.09	0.12	0.33
13	1-tetradecanol		56.075	1672	1672	0.12	0.08	0.07	0.18
14	1-hexadecanol*		61.485	1874	1879	0.29	0.15	0.14	0.41

15	(Z)-9-octadecen-1-ol		67.671	2054	2060	2.54	0.74	1.27	1.91
<i>Aldehydes</i>									
16	furfural	Bread, almond, sweet ²⁷	12.882	832	835	0.22	0.16	0.30	0.15
17	benzaldehyde*	Bitter ^{26,24} , candy, almond, burnt sugar ²⁶	25.925	964	961	0.70	0.27	0.38	0.42
18	octanal*	Citrus-like ³⁰	29.290	1000	1000	0.25	0.20	0.26	0.04
19	benzeneacetaldehyde		31.370	1040	1049	0.43	-	-	0.17
20	(E)-2-octenal*		32.322	1057	1062	0.62	0.31	0.33	0.27
21	decanal		39.977	1202	1202	0.39	0.24	0.43	0.23
22	2,5-dimethylbenzaldehyde		40.300	1210	1208	0.85	-	0.63	0.27
23	(E)-2-decenal		42.353	1260	1263	1.71	0.86	1.45	0.97
24	(E)-cinnamaldehyde		42.723	1269	1266	0.14	0.08	0.14	0.16
25	(E,E)-2,4-decadienal	Tallow, fatty ³⁰	44.505	1313	1314	1.28	1.01	0.49	0.55
26	2-undecenal	Tallowy, sweet ³⁰	46.256	1361	1363	1.24	0.65	1.00	0.31
27	(E)-2-dodecenal		49.756	1463	1462	0.14	0.13	0.13	0.03
28	tetradecanal		54.256	1608	1608	0.07	0.05	0.06	0.05
<i>Esters</i>									
29	1-methylbutyl acetate	Fruity ⁴	14.810	852	843	11.92	15.66	23.87	14.18

30	pentyl propanate		24.939	952	952	0.11	0.08	0.08	0.06
31	(Z)-3-hexen-1-ol acetate		28.241	989	988	0.03	-	0.05	0.01
32	hexyl ethanoate		30.097	1016	1016	0.02	0.01	0.01	0.04
33	2-heptyl acetate	Fruity ²⁹	31.688	1046	1047	5.95	10.89	3.78	1.24
34	2,3-butanediyl diacetate	Floral ⁴	33.437	1077	1065	0.07	0.11	0.07	0.16
35	1,3-butylene diacetate		35.729	1120	1124	2.32	3.29	-	6.26
36	benzyl ethanoate	Floral, jasmine ^{26,28} fresh ²⁶	38.044	1166	1170	0.27	0.14	0.09	0.19
37	gardenol	Sweet, fruity ³¹	39.581	1194	1186	1.19	2.16	2.72	6.87
38	neryl acetate		40.979	1227	1221	0.18	0.34	0.32	0.19
39	3-phenyl-1-propyl acetate		46.512	1368	1373	-	0.14	0.17	0.43
40	decyl acetate		48.626	1429	1418	-	0.10	0.02	-
41	(E)-cinnamyl acetate		49.067	1442	1452	-	0.10	-	0.10
42	hexyl benzoate		53.573	1585	1580	0.95	1.63	0.35	0.16
43	methyl jasmonate		55.351	1647	1644	0.66	0.30	0.30	0.52
44	methyl (3-oxo-2-[(2Z)-2-pentenyl]cyclopentyl)acetate		56.221	1677	1684	0.44	0.18	0.21	0.43
45	benzyl benzoate		58.590	1763	1763	0.31	0.08	0.05	-
46	2-ethylhexyl salicylate*		59.673	1803	1807	0.40	0.59	0.55	0.70
47	isopropyl myristate		60.116	1820	1823	-	0.04	-	0.04
48	methyl palmitate		62.652	1918	1921	0.02	0.03	0.04	0.04

49	propyl palmitate		68.400	2068	2065	0.07	0.07	0.08	-
<i>Ketones</i>									
50	2-heptanone*	Fruity ²⁸ , cheese-like ²⁴ , flowery ²⁵ , pear, grape, brandy ²⁶	19.334	889	889	0.69	0.97	0.37	0.48
51	acetophenone	Sweet, almond, flowery ²⁸ , must-like ^{24,25} , almond	32.560	1062	1062	0.15	0.38	0.64	2.00
52	2-nonanone	Flowery, fruit, musty ²⁶	34.142	1089	1090	0.96	1.75	0.49	0.30
53	geranyl acetone*		49.333	1450	1452	0.21	0.30	0.24	0.26
54	nerylacetone		51.706	1524	1535	-	0.10	-	-
<i>Monoterpene</i>									
55	7-endo-ethenyl-bicyclo[4,2,0]-oct-1-ene		30.206	1018	1029	-	-	0.04	-
56	β-cymene		30.291	1019	1025	-	0.01	-	-
57	D-limonene*	Citrus, orange, sweet ²⁸	30.517	1024	1027	0.04	0.12	0.12	0.05
58	(Z)-ocimene	Floral ²⁹	31.350	1039	1039	-	-	0.34	-
59	3-carene		31.823	1048	1040	-	0.21	0.18	-
60	linalool*	Flowery, lavender, rose ²⁷	34.557	1096	1099	1.21	2.45	2.76	0.78
61	allo-ocimene		36.158	1129	1131	-	0.07	-	-

62	(<i>E,E</i>)-cosmene		36.170	1129	1130	0.05	-	0.15	0.07
63	(<i>Z</i>)-geraniol	Floral, rose, fruity ²⁸	42.100	1254	1254	0.78	0.70	0.74	0.49
64	piperitone		43.796	1294	1285	0.04	0.05	-	0.11
<i>Oxygenated monoterpene</i>									
65	(<i>Z</i>)-linalool oxide	Sweet, nutty ^{24,28}	32.992	1069	1068	0.48	0.22	1.04	0.94
66	(<i>E</i>)-linalool oxide	Floral ²⁴	33.831	1084	1081	0.83	0.45	1.64	0.84
67	epoxylinalol	Floral ⁴	38.528	1175	1163	-	0.03	0.02	0.16
68	α -terpineol		39.240	1188	1188	0.52	0.77	0.69	0.31
69	β -phellandrene-8-ol		40.446	1214	1215	-	-	0.03	0.02
70	(<i>E</i>)- β -damascenone		47.040	1382	1385	0.20	0.13	0.58	0.34
71	α -ferulene		50.106	1474	1484	-	0.02	0.02	-
<i>Sesquiterpene</i>									
72	elixene		48.885	1437	1445	0.03	-	0.03	0.12
73	δ -guaiene		50.469	1484	1493	-	0.03	0.03	-
74	(<i>Z, E</i>)-farnesene		50.579	1488	1486	-	0.15	0.05	0.13
75	germacrene D		51.666	1523	1529	0.13	-	-	0.13
76	phytane		59.423	1793	1795	0.11	0.07	0.05	0.15
<i>Oxygenated sesquiterpene</i>									
77	7,8-dihydro- β -ionone		48.852	1436	1433	-	0.04	0.01	-

78	γ -eudesmol	Woody ²⁷	54.947	1632	1633	0.70	0.67	0.59	0.95
79	bulnesol	Pepper-like ³²	55.569	1654	1659	0.33	0.38	0.42	0.54
80	thunbergol		66.710	2036	2047	-	0.80	-	-
<i>Others</i>									
81	2,2,6-trimethyl-6-vinyltetrahydropyran		26.926	975	971	-	0.03	0.01	-
82	2-pyridinemethanamine		31.839	1049	1054	0.12	-	-	0.03
83	benzothiazole		40.643	1219	1224	0.03	-	0.03	0.01
84	γ -decalactone	Fruity, peach ²⁸	49.822	1465	1463	-	-	-	0.08

* Identification confirmed by comparison with mass spectra and retention times of analytical standards. ^aLRI_{EXP} = linear retention index to the standard of n-alkanes (C₇ to C₃₀) obtained in an HP-5 MS capillary column. ^bLRI_{LIT} = linear retention index published in the literature. Odor description references are listed in the references section [4,24–32].

Thirteen aldehydes were detected in cocoa honey, with notable compounds including (*E*)-2-decenal, (*E,E*)-2,4-decadienal, and 2-undecenal. Depending on their concentrations in the final product, the presence of these compounds is often associated with lipid degradation and can impart either unpleasant or pleasant notes. The pleasant notes conferred by aldehydes include sweet and bitter flavors, such as almond and cherry aromas [33].

Among the 22 esters identified in the cocoa honey varieties, 1-methylbutyl acetate, 2-heptyl acetate, and gardenol stand out. Also known as 2-pentanol acetate, 1-methylbutyl acetate has a fruity odor and was found in the study by Hegmann et al. [4] in cocoa fruit pulp. The compounds 2-heptyl acetate and gardenol were identified in cocoa pulp from Colombia [23].

Five ketones were found in the four cocoa honey varieties, with the major compounds being 2-heptanone, acetophenone, and 2-nonanone. The 2-heptanone has a penetrating fruity odor and has been identified during the spontaneous fermentation of fine-flavor Trinitario cocoa beans, although is more closely associated with the cocoa bean, despite being observed in the first few hours of fermentation [30]. Furthermore, 2-heptanone and acetophenone were identified in the study by Hegmann et al. [4] when evaluating volatile organic compounds in the cocoa pulp of different varieties. Hegmann et al. [4] and Rottiers et al. [30] suggested that 2-nonanone contributed to the fruity aroma, as found in their studies of VOCs in pulp and cocoa beans, respectively.

Among the ten identified monoterpenes, linalool was the most predominant compound in the four varieties. A similar result was observed in the study by Valdeci et al. [18], where linalool had the highest compound concentration in cocoa beans during fermentation. According to Owusu et al. [34], linalool can be found in both the cocoa pulp and in the cotyledons of the bean in its glycosidic form. It has a floral aroma that is considered the main aroma component in high concentrations of “noble flavor” cocoas, such as Criollo and Arriba (a Forastero cocoa subtype). Furthermore, D-limonene was found in all four varieties in lower concentrations. Valdeci et al. [18] also identified D-limonene in cocoa beans and pulp during fermentation.

The (*Z*)-linalool and (*E*)-linalool oxides are among the seven oxygenated monoterpenes found in the four varieties of cocoa honey. The compound (*E*)-linalool oxide has a floral aroma, and (*Z*)-linalool oxide has a sweet and flowery aroma. Both were identified in the study by Hegmann et al. [4] when evaluating the cocoa pulp of different varieties, seasons of the year, and maturation stages. The result is similar to that found in the research conducted by Valdeci et al. [18] when evaluating the VOCs of cocoa beans and pulp that underwent fermentation.

Thus, the VOCs in cocoa honey predominantly showed higher levels of esters, acids, and alcohols, respectively. This result aligns with several studies related to cocoa and its derivatives [18,19,23,29]. According to the findings of this study, several authors agreed that the volatile organic compounds of cocoa and chocolate are formed during fermentation, where the cocoa cotyledon absorbs the aromatic compounds of the pulp during the fermentation process by mass transfer and in the almond roasting process by the Maillard reaction [35]. The presence of several VOCs was observed in this research, which are also present in the almond, cocoa pulp, chocolate, and cocoa honey. However, considering that the cocoa honey did not undergo the fermentation process, it is evident that a significant portion of the volatile organic compounds were present in all cocoa components, regardless of whether they undergo fermentation.

2.3. *Multivariate Analysis*

To evaluate the diverse profiles of volatile organic compounds in cocoa honey varieties, different multivariate analysis tools were applied, such as principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) coupled with the heat map. PCA is a multivariate modeling technique that can reduce the dimensionality of data and determine the principal components. Additionally, it represents the data based on their similarities and differences [36].

Figure 2A shows the biplot graph of PCA scores and loadings, containing samples and volatile organic compounds from cocoa honey of different cocoa varieties. The PCA visualization indicated that the PS1319 and Parazinho varieties exhibited distinct compound profiles, while the CCN51 and SJ02 varieties were more closely related. Compounds such as 1-dodecanol, elixene, and 2,3-butanediyl diacetate significantly contributed to the discrimination of the VOC profile in the Parazinho variety, whereas the variety PS1319 was discriminated by compounds 2-heptanone, β -cymene, and decyl acetate. For the CCN51 variety, notable compounds included octanoic acid, (*Z*)-9-octadecen-1-ol, and hexadecanoic acid, while for the SJ02 variety, 2-ethyl-1-hexanol, 7-endo-ethenyl-bicyclo [4,2,0]-oct-1-ene, and decanal stood out. In the PCA conducted by Calva-Estrada et al. [37], differences in the volatile profile were also observed in samples of North American chocolates of the Trinitario and Criollo genotypes.

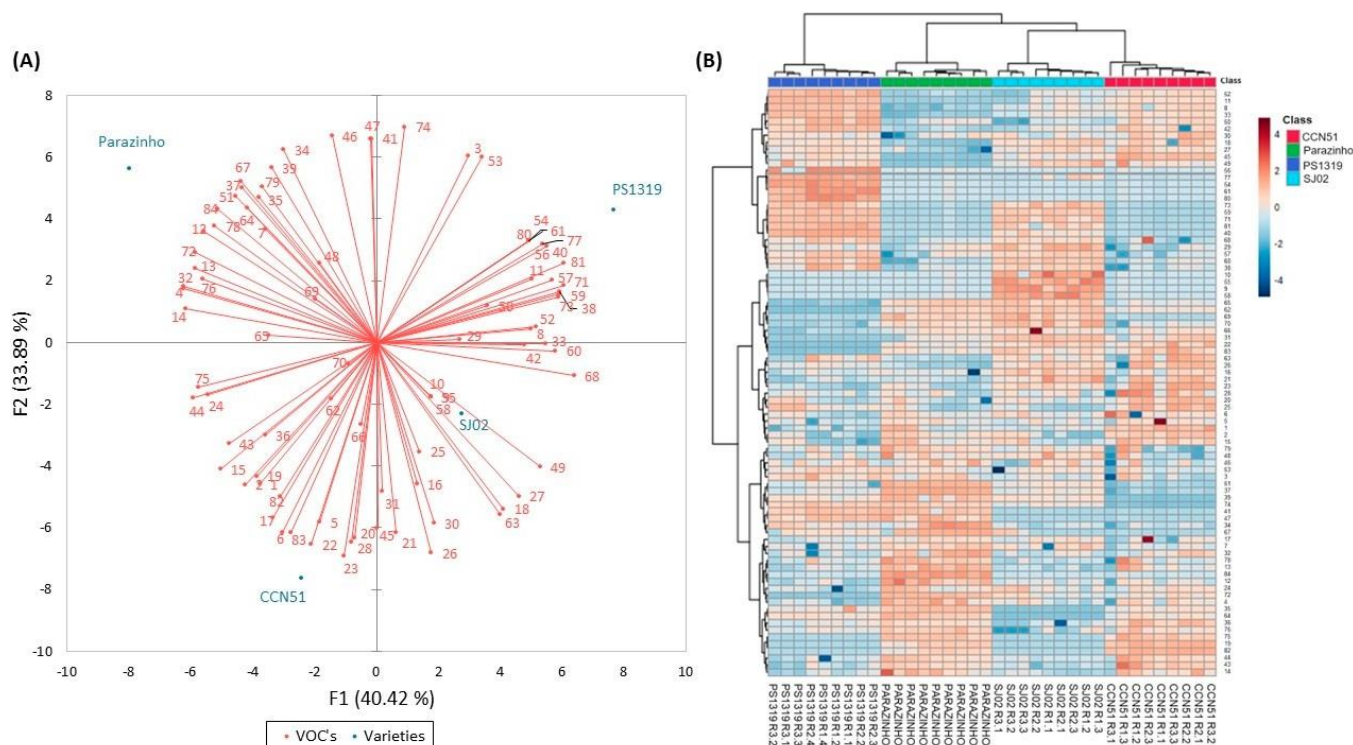


Figure 2. Principal component analysis (PCA) of the volatile components found in different varieties of cocoa honey (A). Average of 9 replicates per treatment. Numbers in red correspond to the VOC's listed in Table 1. Hierarchical cluster analysis dendrogram associated with the heat map of the VOC profiles of the four cocoa honey varieties (B). The color scale represents the variation in the relative concentration of VOCs in the samples, from low (blue) to high (red).

Figure 2B shows the dendrogram obtained through hierarchical cluster analysis (HCA) associated with the heat map. In this dendrogram, the samples were grouped based on the similarity of their VOC profiles, clearly showing the formation of four distinct clusters. The cluster comprising samples of the PS1319 variety (dark blue) exhibited a profile more distinct from the other three varieties, whereas the CCN51 and SJ02 varieties displayed greater similarities in their volatile profiles. The dark and light blue clusters (PS1319 and SJ02) consist of samples with higher concentrations of monoterpenes and esters compared to the green and red groups (Parazinho and CCN51). This correlation can also be evident in Table 1, which presents the average relative composition of the identified VOCs.

Thus, it was observed that it is possible to discriminate among the four varieties of cocoa honey based on their VOC profiles, which exhibit different compositions in each variety. Although no other works in the literature have employed a heat map to evaluate the VOC profiles in cocoa honey, this multivariate analysis technique has been applied to other matrices. Calva-Estrada et al. [37] demonstrated that the heat map enabled discrimination of chocolates based on the origin and variety of cocoa when studying the volatile compound profiles of

commercial dark chocolates from different cocoa bean varieties (CA100, CV74, CM70, TM66, and NE60) from Latin America.

2.4. Sensory Evaluation of Cocoa Honey

To conduct the ranking descriptive analysis (RDA), 20 pre-trained tasters participated. These tasters generated a list of 15 descriptive attributes: yellowish color, greenish color, acid aroma, sweet aroma, cocoa aroma/cocoa pulp, fruity aroma, mint/refreshing aroma, floral aroma, acidic flavor, sweet flavor, cocoa flavor/cocoa pulp, fruity taste, astringent taste, viscosity, and smoothness. Table 2 presents the sum of the rankings based on the intensity of each attribute obtained across the cocoa honey varieties.

Table 2. Sum of orders (order totals) of sensory attributes for each variety of cocoa honey.

Attributes	Varieties				
	CCN51	PS1319	SJ02	Parazinho	Vcritical
Appearance					
Yellow color	80 ^a	164 ^b	199 ^c	157 ^b	22
Greenish color	202 ^a	131 ^b	120 ^b	147 ^c	22
Aroma					
Acid	169 ^a	172 ^a	128 ^b	131 ^b	22
Sweetened	149 ^a	187 ^b	149 ^a	115 ^c	22
Cocoa/cocoa pulp	168 ^a	182 ^a	128 ^b	123 ^b	22
Fruity	169 ^a	172 ^a	135 ^b	124 ^b	22
Minty/refreshing	166 ^a	174 ^a	141 ^b	119 ^b	22
Floral	157 ^a	181 ^b	133 ^c	129 ^c	22
Flavor					
Sour taste	187 ^a	123 ^b	118 ^b	172 ^a	22
Sweet taste	150 ^a	174 ^b	191 ^b	86 ^c	22
Cocoa/cocoa pulp	164 ^a	156 ^a	165 ^a	115 ^b	22
Fruity	166 ^a	159 ^a	167 ^a	107 ^b	22
Astringency	168 ^a	136 ^b	125 ^b	171 ^a	22
Texture					
Viscosity	126 ^a	176 ^b	153 ^a	145 ^a	22
Softness	129 ^a	167 ^b	171 ^b	133 ^a	22

The results of the RDA revealed a significant difference ($p \leq 0.05$) between the sensory attributes of the samples from the four varieties of cocoa honey under the experimental conditions, indicating that the tasters' training was adequate. Varieties showed significant differences ($p \leq 0.05$) among themselves in the yellow color attribute, except for varieties PS1319 and Parazinho. For the green color attribute, the CCN51 and Parazinho varieties significantly differed from the other varieties, exhibiting a more intense green color, as determined by the Friedman test at a 5% probability level. A similar result was found by Nascimento et al. [38] when analyzing the color of cocoa honey from the varieties CCN51,

PS1319, SJ02, and Parazinho. In terms of aroma, the CCN51 and PS1319 varieties were considered the most acidic, differing significantly from the other two varieties. The sweet aroma was similar between the CCN51 and SJ02 varieties but significantly different between the PS1319 and Parazinho varieties. The cocoa aroma differed between the CCN51/PS1319 and SJ02/Parazinho varieties. The fruity and minty/refreshing aromas were more intense in the CCN51 and PS1319 varieties. The floral aroma presented similar results in the SJ02 and Parazinho varieties.

In terms of the acid taste attribute, the CCN51 and Parazinho varieties differed significantly from the other varieties, exhibiting a higher acidity content. This could be attributed to the acid aroma, with the CCN51 variety showing one of the highest intensities. The PS1319 and SJ02 varieties were perceived as the sweetest by the tasters. The low intensity of the sweet flavor in the CCN51 and Parazinho varieties may be overshadowed by the high intensity of the acid flavor perceived by the tasters. A similar pattern was observed by Valdeci et al. [18] in chocolates produced after spontaneous fermentation of the TSH565 cocoa clone.

The cocoa and fruity tastes differed only in the Parazinho variety, with the lowest intensity, while the astringent taste was more pronounced in the Parazinho and CCN51 varieties. This is attributed to the inherent astringency of fresh cocoa beans [39], and since cocoa honey undergoes cold pressing before fermentation, there is no reduction in astringency. Eskes et al. [40], in their evaluation of the sensory characteristics of cocoa pulp based on genetic variation, noted that the CCN51 variety was characterized as astringent and acidic. According to Boza et al. [41], CCN51 beans are recognized for their high bitterness, astringency, and acceptable taste.

Variety PS1319 differed from the others in viscosity, while softness was more prevalent in varieties SJ02 and PS1319 compared to varieties CCN51 and Parazinho. Principal component analysis (PCA) was conducted to compare sensory attributes and cocoa honey varieties (Figure 3A). The PCA factors explained 51.53% and 37.28% of the data variation in the first two principal components, respectively.

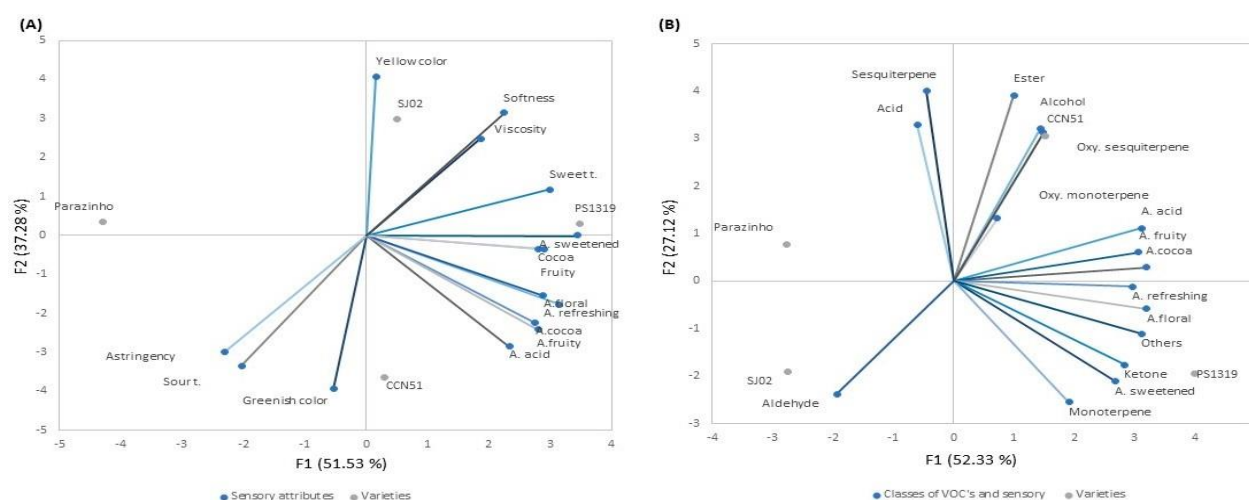


Figure 3. Principal component analysis (PCA) relating sensory attributes and cocoa honey varieties (A). PCA relating VOC classes, aroma sensory attributes, and cocoa honey varieties (B). A. Acid = aroma acid; A. Sweetened = aroma sweetened; A. Cocoa/Cocoa Pulp = aroma cocoa/cocoa pulp; A. Fruity = aroma fruity; A. Refreshing = aroma minty/refreshing; A. Floral = aroma floral; Sour t = sour taste; Sweet t = sweet taste; Cocoa = cocoa/cocoa pulp.

The PCA in Figure 3A revealed that the PS1319 and SJ02 varieties exhibited similar profiles, characterized by yellowish color, higher viscosity, softness, and sweet taste. Conversely, the CCN51 and Parazinho varieties showed similar attributes, including a greenish color, and an acidic and astringent flavor. These results are supported by Table 2, which presents the sum of the rankings obtained through the RDA conducted by trained tasters. Additionally, the PCA indicated that the type of variety influenced the sensory attributes of cocoa honey. In their studies with cocoa liquor, Sukha et al. [42] concluded that cocoa variety strongly influenced the flavor potential.

According to the average scores attributed by consumers in the acceptance test (Table 3), a significant difference ($p < 0.05$) was observed only for the attributes of flavor and overall quality among the four varieties of cocoa honey studied. Flavor is one of the most important quality attributes, influencing the acceptability of cocoa products, such as cocoa honey. All varieties showed good sensory acceptability, with hedonic scale scores ranging from, “I liked it slightly” to “I liked it moderately”. Varieties SJ02 and CCN51 obtained higher scores for the flavor attribute, without differences between them, corresponding to, “I liked it moderately”, and differing significantly ($p < 0.05$) from PS1319 and Parazinho varieties. This difference could possibly be attributed to the presence of bitterness and astringent flavors. Table 2 indicates that the Parazinho variety had the highest content of astringency and the lowest sweet taste, while the SJ02 variety was considered to have the highest sweet taste. However, regarding overall quality, both the SJ02 and CCN51 varieties also obtained the highest scores, ranging

from, “I liked it slightly” to “I liked it moderately”, but they did not differ significantly ($p > 0.05$) from each other.

Table 3. Acceptance test and purchase intention averages for different varieties of cocoa honey.

Attributes	Varieties			
	CCN51	PS1319	SJ02	Parazinho
Sensory acceptance				
Appearance	6.6 ± 1.67^a	6.63 ± 1.71^a	6.75 ± 1.61^a	6.66 ± 1.47^a
Aroma	6.41 ± 1.66^a	6.47 ± 1.84^a	6.22 ± 1.63^a	6.31 ± 1.62^a
Flavor	7.11 ± 1.59^a	6.95 ± 1.98^{ab}	7.13 ± 1.89^a	6.42 ± 1.92^b
Consistency	6.88 ± 1.77^a	7.02 ± 1.72^a	6.94 ± 1.82^a	6.52 ± 1.90^a
Overall quality	7.08 ± 1.55^{ab}	6.93 ± 1.84^{ab}	7.21 ± 1.52^a	6.53 ± 1.71^b
Purchase intention				
	3.56 ± 1.17^a	3.39 ± 1.36^{ab}	3.71 ± 1.23^a	2.99 ± 1.27^b

Means followed by the same letter on the line do not differ significantly from each other (Tukey test; $p < 0.05$).

In terms of purchase intention, the SJ02 and CCN51 varieties showed the highest results, with a score of “probably would buy”, while the Parazinho variety had the lowest purchase intention (“maybe I would buy/maybe I would not buy”). As discussed earlier, these results can be explained by Table 2, where the RDA tasters indicated that the CCN51 and SJ02 varieties had higher levels of flavor attributes and more astringency, while they attributed less sweetness to Parazinho. A similar result was obtained by Andrade et al. [19] when evaluating five samples of chocolate using doughs with different fermented cocoa contents.

2.5. Correlation of Sensory Analysis with VOCs

The principal component analysis (PCA) shown in Figure 3B correlates the sensory attributes of aroma assessed in the RDA with the VOCs and the four cocoa varieties studied. The PCA factors explained 52.33% and 27.12% of the data variability in the first two principal components (PC1 and PC2). VOCs were categorized into classes, namely, acids, alcohols, aldehydes, esters, ketones, monoterpenes, oxygenated monoterpenes, sesquiterpenes, oxygenated sesquiterpenes, and others.

Figure 3B reveals that the CCN51 variety was rich in VOCs, predominantly composed of acids, sesquiterpenes, esters, oxygenated sesquiterpenes, and oxygenated monoterpenes, exhibiting sensory attributes such as acidic, fruity, cocoa/cocoa pulp, and minty/refreshing aroma. In samples of cocoa liquor of the CCN51 variety, according to Rojas et al. [20], the main types of compounds identified were aldehydes, ketones, alcohols, pyrazines, esters, terpenes, acids, and lactones. The PS1319 variety demonstrated a predominance of ketones, monoterpenes, and other volatile organic compounds with a refreshing/minty, floral, and sweet aroma. According to Rodrigues-Campos et al. [26], some ketones are known to impart floral notes to cocoa. The SJ02 variety exhibited a predominance of aldehydes, while Parazinho stood out for the presence of acids and sesquiterpenes, lacking aroma descriptors.

The aroma composition of cocoa products is closely linked to the distinct post-harvest processing conditions, as well as the variety and origin of the cocoa itself [43]. High-quality “cocoa” is mainly produced from Criollo or Trinitario varieties, which typically feature fruity, floral, herbal, woody, and caramel notes, while common cocoa beans are sourced from Forastero variety [44]. Since CCN51, PS1319, and SJ02 are hybrids resulting from the genetic enhancement of Trinitario cacao, unlike Parazinho, which belongs to the Forastero type and has not undergone genetic improvement [3], the results obtained in the PCA (Figure 3B) indicated that the CCN51 and PS1319 varieties obtained the highest abundances of VOCs and aroma descriptors. This may be attributed to the origin of these varieties in Trinitario cocoa, renowned for its high quality.

3. Materials and Methods

3.1. Standards and Materials

Standard solutions of n-alkanes C₇–C₃₀, nonanoic acid, dodecanoic acid, tetradecanoic acid, pentadecanoic acid, palmitic acid, 1-heptanol, 1-dodecanol, 1-hexadecanol, benzaldehyde, octanal, (E)-2-octenal, 2-ethylhexyl salicylate, 2-heptanona, geranyl acetone, D-limonene, and linalool were acquired from Sigma–Aldrich (Burlington, MA, USA). All standards used in GC-MS analysis were of 95% purity. SPME fibers, divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS, 65 µm), polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB, 50/30 µm), carboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS, 75 µm), and polyacrylate (PA, 85 µm), used in this study to extract the VOCs from the samples, and the SPME holder for manual sampling, were purchased from Supelco (Bellefonte, PA, USA).

3.2. *Obtaining Cocoa Honey*

Cocoa honey was obtained from ripe fruits of the CCN51, PS1319, SJ02, and Parazinho varieties harvested in the city of Presidente Tancredo Neves (Bahia, Brazil; latitude: 13°27'14" south; Longitude: 39°25'15" west), in May 2022. Cocoa honey was collected before cocoa bean fermentation. Initially, a pre-selection was carried out, discarding unripe, damaged, and advanced senescent fruits. The almonds were placed in a manual stainless- steel cold press to obtain cocoa honey. Finally, the cocoa honey was stored in polyethylene bottles and kept at 18 °C (0.5 °C) until the beginning of the analyses. Three batches of cocoa honey were obtained for each variety.

3.3. *HS-SPME Method*

An amount of 10 mL of cocoa honey was placed in sealed 20 mL glass vials for extracting VOCs through headspace solid-phase microextraction (HS-SPME). Extraction was performed by placing the flask in an aluminum heating block (4 cm high by 14 cm in diameter) on a temperature-controlled heating plate [45]. SPME extractions were performed from the headspace of the samples, after optimization, according to the following conditions: DVB/CAR/PDMS fiber (65 µm), equilibration time of 20 min, extraction time of 78 min, extraction temperature of 85 °C, and stirring speed of 171 rpm, using a magnetic bar. After extracting and pre-concentrating VOCs, the fiber was inserted directly into the GC injector for 3 min.

3.4. *Optimization of the HS-SPME Conditions*

A mixture containing 25% of each of the four varieties of cocoa honey was used to optimize the extraction method by HS-SPME. As an initial step, a screening 24 full factorial design [46] was performed to evaluate significant variables involved in HS-SPME. Three replications were performed at the central point of the factorial design to quantify the experimental error. The variables evaluated by the screening experimental design were the extraction temperature, the extraction time, the equilibrating time, and the stirring speed. The levels employed in these experiments are listed in Table S1. The response evaluated during all experiments was the total sum of peak areas obtained in the GC-MS analysis.

Once significant variables were obtained, a central composite design, with 19 experiments and 5 replicates in central points, and response surface methodology [46] were carried out to locate the optimum values of temperature, extraction time, and stirring speed. The experimental levels involved in central composite design optimization are listed in Table S2.

The statistical experimental design and optimization calculations were performed using the Statistica 7.0 software (Statsoft, Tulsa, OK, USA).

3.5. GC-MS Analysis

The volatile organic compounds were analyzed using a gas chromatograph coupled with a mass spectrometer (GC-MS; Model QP2010 Plus, Shimadzu®, Kyoto, Japan), using a capillary column model HP-5MS (5%—phenylmethylpolysiloxane, 30.0 m x 0.25 mm I.D 0.25 μ m, Restek®, Bellefonte, PA, USA). Cocoa honey compounds were determined on three batches of samples of each variety, with each batch evaluated in triplicate (totaling nine analyses for each variety).

The sample analysis method followed the parameters: oven temperature at 30 °C (held for 2 min), heating from 0.5 °C min⁻¹ to 38 °C (for 2 min), followed by heating from 4.0 °C min⁻¹ to 90 °C (hold 2 min), heating from 4 °C min⁻¹ to 200 °C (hold 2 min), heating from 10 °C min⁻¹ to 280 °C, and heating from 30 °C min⁻¹ to 300 °C, totaling a run of 73.17 min. The injector temperature was 250 °C, splitless mode was used, and flow rate of 0.61 mL min⁻¹. Helium (99.999%) was used as a carrier gas. The MS conditions were as follows: transfer line temperature of 250 °C, ion source temperature of 250 °C, and employing electron impact ionization at 70 eV.

VOCs were identified by comparing the obtained retention times and mass spectra with those of the pure analytical standards. Mass spectra were also compared to the data system library (NIST 147 Database). The linear retention index (LRI) was determined using a homologous series of C₇–C₃₀ n-alkanes and the results were compared with values reported in the literature for similar chromatographic columns. The percentage of individual peaks was obtained by normalizing the measured peak area without correction factors.

3.6. Multivariate Data Analysis

A data matrix containing the areas of identified peaks was subjected to principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) with pre-treatment by autoscaling [46]. As the PCA is a well-known multivariate analysis chemometric technique, which facilitates the visualization of clustering trends, using all the information contained in many variables, this tool was used to intensify the clustering trends of different varieties of honey from cocoa, based on their VOC profiles. HCA is a statistical tool for grouping samples

based on similarity, measuring distances between all possible pairs of samples in dimensional space.

3.7. *Sensory Evaluation of Cocoa Honey*

Initially, the project was approved by the Research Ethics Committee of the Faculty of Pharmacy of the Federal University of Bahia (UFBA; CAAE: 65163322.9.0000.8035).

3.7.1. Microbiological Analysis

Before carrying out the sensory evaluation, microbiological analyses were carried out for *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, and molds and yeasts, in compliance with Normative Instruction No. 161 [47] through the methodology of Silva et al. [48] and IAL [49].

3.7.2. Ranking Descriptive Analysis (RDA)

Analyses were performed at the Sensory Analysis Laboratory of the Faculty of Pharmacy at the Federal University of Bahia (UFBA). The method used for the sensory characterization was the ranking descriptive analysis (RDA), an adaptation of the quantitative descriptive analysis (QDA), which describes the main characteristics that make up the appearance, aroma, flavor, and texture of food, in addition to measuring the intensity of perceived sensations. Ranking descriptive analysis (RDA) was proposed by Richter et al. [15], where the evaluation of products is performed by ordering the intensity of the evaluated attributes.

Here, 23 previously trained tasters, aged 18 to 45, evaluated the cocoa honey samples in a single session. In the first training session, the evaluators were subjected to a basic recognition test of the four basic tastes (sweet, sour, bitter, and salty) and ten aromas. In the second session, they underwent the triangular test to identify bitter, acidic, and sweet tastes. In the third session, they were presented with the paired comparison test to identify acidic and bitter tastes. In the fourth session, they underwent the ordering test to order the sweet, bitter, and acidic tastes in increasing order of intensity, in addition to the test to order the sweet, bitter, acidic, and fruity aromas in an increasing order. In the fifth session, the network method was applied. Tasters received the four samples in pairs (A and B; C and D) and were asked to describe their similarities and differences in appearance, aroma, flavor, and texture, followed by a group discussion after the survey of attributes. In the sixth session, the tasters were presented with the RDA test form and the reference table (Table S4).

The seventh session was the final evaluation, where 40 mL of each sample was served in 50 mL white disposable cups coded with three-digit random numbers and randomized between tasters and repetitions, in individual booths illuminated by white light. Tasters were instructed to cleanse their palates by drinking water and chewing a biscuit. The four samples were ordered in ascending order of the generated attributes, obtaining the ordering totals according to Table 2. Three tasters were excluded from the data analysis due to incorrectly filling out the evaluation form. All samples were evaluated in triplicate during the session. The data collected referring to all attributes were evaluated using the Friedman test, at a 5% probability level.

3.7.3. Acceptance

One hundred and eight consumers carried out the acceptance test in a single session. The cocoa honey varieties were served in white disposable cups, coded with three-digit random numbers, containing 10 mL of the samples at 41 °C, in individual booths illuminated by white light. Consumers evaluated the appearance, aroma, flavor, consistency, and overall quality attributes, using a 9-point structured hedonic scale (1—"I disliked it extremely" to 9—"I liked it extremely"), in addition to a purchase intention scale (1—"certainly would not buy" to 5—"certainly would buy"). In addition, a questionnaire was applied to assess the consumer profile.

3.8. Statistical Analysis

For VOC data, the MetaboAnalyst 5.0 program was used. Sensory profile results were expressed as mean standard deviation and statistical analysis was performed using the statistical software XLStat version 7.8. An analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test was performed to determine statistically significant differences between means ($p < 0.05$).

4. Conclusions

The optimized HS-SPME/GC-MS method enhanced the extraction efficiency, identifying 84 VOCs in cocoa honey from 4 varieties. Sensory analysis revealed that PS1319 and SJ02 had similar profiles, with yellowish color, higher viscosity, softness, and sweet taste. The study concluded that the cocoa honey variety influenced VOC concentrations and sensory profiles. SJ02 and CCN51 showed the highest acceptability and purchase intention, highlighting their potential as promising sources for the food industry. Further research is required to identify potential quality markers among these VOCs for cocoa honey produced from different cocoa tree varieties.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: [https:// www.mdpi.com/article/10.3390/molecules29133194/s1](https://www.mdpi.com/article/10.3390/molecules29133194/s1). Table S1: Variable levels employed for screening of 24 full factorial optimization of the HS-SPME method of cocoa honey. Table S2: Variable levels employed for central composite design from optimization of the HS-SPME method of cocoa honey. Table S3: Experiments carried out to confirm HS-SPME optimal conditions estimated by response surface methodology at extrapolation conditions (n = 3). Table S4: Descriptive terms and reference materials.

Author Contributions: M.B.N., conceptualization, methodology, research, software, formal analysis, writing—original draft; L.R.A., methodology and writing; M.A.S.N., methodology; M.N.R., methodology; L.R.R.S., research, methodology, formal analysis, writing; A.C.R.F., conceptualization, writing—review; F.M.R., resources, writing—review; P.R.R.M., conceptualization, resources, methodology, research, formal analysis, software, writing—proofreading and editing, supervision; S.E.S., conceptualization, research, writing—proofreading, supervision, project management. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES; No. 88887.504355/2020-00) and by the Ministry of Science, Technology, and Innovation of Brazil—MCTI (Grant No. 904399/2020).

Institutional Review Board Statement: This study was approved by the Ethics Committee Faculty of Pharmacy of the Federal University of Bahia (UFBA; CAAE: 65163322.9.0000.8035/on 6 February 2023).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in this study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in the article and Supplementary Materials.

Acknowledgments: M.B.N. would like to thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the grant, the Agricultural Technological Center of the State of Bahia (CETAB) for the partnership, and farmer Manoel Carlos Andrade and Juscelino Macedo for providing the in natura cocoa beans.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

1. International Cocoa Organization (ICCO). Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics, Vol. L, No. 1, Cocoa Year 2023/24. 2024. Available online: https://www.icco.org/wp-content/uploads/Production_QBCS-L-No.-1.pdf (accessed on 29 May 2024).
2. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. IBGE/LSPA. Tabela 6588—Série Histórica da Estimativa Anual da Área Plantada, Área Colhida, Produção e Rendimento Médio dos Produtos Agrícolas; 2023. Available online: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6588> (accessed on 30 January 2024).
3. Serra, W.S.; Sodré, G.A. Manual do Cacaucultor: Perguntas e Respostas. Brasil. Ilhéus, BA, CEPLAC/CEPEC. Boletim Técnico, 2021, nº 221. 190p. Available online: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/ceplac/publicacoes/boletins-tecnicos-bahia/boletim-tecnico-no-221-2021_compressed.pdf (accessed on 19 May 2024).
4. Hegmann, E.; Niether, W.; Phillips, W.; Rohsius, C.; Lieberei, R. Besides variety, also season and ripening stage have a major influence on fruit pulp aroma of cacao (*Theobroma cacao* L.). J. Appl. Bot. Food Qual. 2020, 93, 266–275. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2020.093.033>.
5. Guirlanda, C.P.; Silva, G.G.; Takahashi, J.A. Cocoa honey: Agroindustrial waste or underutilized cocoa by-product? Future Foods 2021, 4, 100061. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2021.100061>.
6. Santos, C.O.; Bispo, E.S.; Santana, L.R.R.; Carvalho, R.D.S. Use of “cocoa honey” (*Theobroma cacao* L.) for diet jelly preparation: An alternative technology. Rev. Bras. Frutic. 2014, 36, 749–757. <https://doi.org/10.1590/0100-2945-042/13>
7. Freitas, R.V.S.; Silva, F.L.H.; Cavalcante, J.A.; Costa, I.I.S.; Sarmiento, D.H.A.; Braga, R.C.; Silva, F.S.; Barbosa, M.C.F.; Rodrigues, E.A. Evaluation of nutritional composition, characterization and correlation of pulp quality parameters of cocoa. Res. Soc. Dev. 2022, 11, 52511326677. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i3.26677>.
8. Puerari, C.; Magalhães, K.T.; Schwan, R.F. New cocoa pulp-based kefir beverages: Microbiological, chemical composition and sensory analysis. Food Res. Int. 2012, 48, 634–640. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.06.005>.
9. Neto, B.A.M.; Carvalho, E.A.; Pontes, K.V.; Barretto, W.S.; Sacramento, C.K. Chemical, physico-chemical and sensory characterization of mixed açai (*Euterpe oleracea*) and cocoa’s honey (*Theobroma cacao* L.) jellies. Rev. Bras. Frutic. 2013, 35, 587–593. <https://doi.org/10.1590/s0100-29452013000200030>.
10. Yulianaa, N.; Nurainya, F.; Sari, G.W.; Sumardi; Widiastuti, E.L. Total microbe, physicochemical property, and antioxidative activity during fermentation of cocoa honey into kombucha functional drink. Appl. Food Res. 2023, 3, 100297. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2023.100297>.
11. Lannes, S.C.D.S.; Silva, M.V.; Silva, E.N.; Ramos, D.D.C.; Su, F. Food Compositions of Chocolate and Edible Ice Cream Containing Cocoa Honey University of São

Paulo (USP, Sao Paulo, Brazil) and State University of Southwest Bahia (UESB, Bahia, Brazil). 2013. Available online: <https://patents.google.com/patent/BR102013005053B1> (accessed on 10 May 2024).

12. Rodrigues, L.B.O.; Dias, J.C.T.; Uetanabaro, A.P.T.; Bonomo, P. Produção de Cerveja Artesanal Utilizando Mel de Cacau Como Adjunto. 2019. Available online: <https://patents.google.com/patent/BR102019008742A2/pt?q=BR+102019008742> (accessed on 10 May 2024).

13. Mohammadi, A.; Yamini, Y.; Alizadeh, N. Dodecylsulfate-doped polypyrrole film prepared by electrochemical fiber coating technique for headspace solid-phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Chromatogr. A.* 2005, 1063, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.11.087>.

14. Dutcosky, S.D. *Análise Sensorial de Alimentos*, 5th ed.; Coleção Exatas; PUCPRESS: Curitiba, Brazil, 2019; Volume 4, pp. 40–41.

15. Richter, V.B.; Almeida, T.C.A.; Prudencio, S.H.; Benassi, M.T. Proposing a ranking descriptive sensory method. *Food Qual. Prefer.* 2010, 21, 611–620. <https://doi.org/10.1016/j.food-qual.2010.03.011>.

16. Silva, R.C.S.N.; Minim, V.P.R.; Carneiro, J.D.S.; Nascimento, M.; Lucia, S.M.D.; Minim, L.A. Quantitative sensory description using the optimized descriptive profile: Comparison with conventional and alternative methods for evaluation of chocolate. *Food Qual. Prefer.* 2013, 30, 169–179. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2013.05.011>.

17. Brokl, M.; Bishop, L.; Wright, C.G.; Liu, C.; McAdam, K.; Focant, J.F. Multivariate analysis of mainstream tobacco smoke particulate phase by headspace solid-phase microextraction coupled with comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2014, 1370, 216–229. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.10.057>.

18. Valdeci, S.B.; Thais, M.U.; Neyde, A.B.; Claudia, M.R.; Vânia, M.F.P.; Eduardo, M.D.A. Dynamics of volatile compounds in TSH 565 cocoa clone fermentation and their role on chocolate flavor in Southeast Brazil. *J. Food Sci. Technol.* 2019, 56, 2874–2887. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03736-3>.

19. Andrade, A.B.; Cruz, M.L.; Oliveira, F.A.S.; Soares, S.E.; Druzian, J.I.; Santana, L.R.; Souza, C.O.; Bispo, E.S. Influence of under-fermented cocoa mass in chocolate production: Sensory acceptance and volatile profile characterization during the processing. *LWT-Food Sci. Technol.* 2021, 149, 112048. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112048>.

20. Rojas, E.O.; Rúales, F.H.; Perdomo, D.A.; Mora, J.P.J. Evaluación del método de extracción SPME-GC-MS para el análisis compuestos orgánicos volátiles en licor de cacao de Nariño-Colombia. *Rev. ION* 2022, 35, 103–116. <https://doi.org/10.18273/revion.v35n1-2022007>.

21. Torres-Moreno, M.; Torrecasana, E.; Salas-Salvadó, J.; Blanch, C. Nutritional composition and fatty acids profile in cocoa beans and chocolates with different geographical origin and processing conditions. *Food Chem.* 2015, 166, 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.141>.

22. Haase, T.B.; Schweiggert-Weisz, U.; Ortner, E.; Zorn, H.; Naumann, S. Aroma Properties of Cocoa Fruit Pulp from Different Origins. *Molecules* 2021, 26, 7618. <https://doi.org/10.3390/molecules26247618>.

-
23. Pino, J.A.; Ceballos, L.; Quijano, C.E. Headspace Volatiles of *Theobroma cacao* L. Pulp from Colombia. *J. Essent. Oil Res.* 2010, 22, 113–115. [https://doi.org/10.1002/0002-0113\\$14.00/0](https://doi.org/10.1002/0002-0113$14.00/0).
24. Ascrizzi, R.; Flamini, G.; Tessieri, C.; Pistelli, L. From the raw seed to chocolate: Volatile profile of blanco de Criollo in different phases of the processing chain. *Microchem. J.* 2017, 133, 474–479. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.04.024>.
25. Chetschik, I.; Kneubul, M.; Chatelain, K.; Schluter, A.; Bernath, K.; Huhn, T. Investigations on the Aroma of Cocoa Pulp (*Theobroma cacao* L.) and Its Influence on the Odor of Fermented Cocoa Beans. *J. Agric. Food Chem.* 2017, 66, 2467–2472. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05008>.
26. Rodriguez-Campos, J.; Escalona-Buendía, H.B.; Orozco-Avila, I.; Lugo-Cervantes, E.; Jaramillo-Flores, M.E. Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. *Food Res. Int.* 2011, 44, 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.028>.
27. Utrilla-Vázquez, M.; Rodríguez-Campos, J.; Avendaño-Arazate, C.H.; Gschaedler, A.; Lugo-Cervantes, E. Analysis of volatile compounds of five varieties of Maya cocoa during fermentation and drying processes by Venn diagram and PCA. *Food Res. Int.* 2020, 129, 108834. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108834>.
28. Miyazawa, M.; Hashidume, S.; Takahashi, T.; Kikuchi, T. Aroma evaluation of Gamazumi (*Viburnum dilatatum*) by aroma extract dilution analysis and odour activity value. *Phytochem. Anal.* 2012, 23, 208–213. <https://doi.org/10.1002/pca.1344>.
29. Velasquez-Reyes, D.; Gschaedler, A.; Kirchmayr, M.; Avendano-Arazate, C.; Rodríguez-Campos, J.; Calva-Estrada, S.J.; Lugo-Cervantes, E. Cocoa bean turning as a method for redirecting the aroma compound profile in artisanal cocoa fermentation. *Heliyon* 2021, 7, 07694. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07694>.
30. Rottiers, H.; Sosa, D.A.T.; Winne, A.; Ruales, J.; Clippeleer, J.; Leersnyder, I.; Wever, J.; Everaert, H.; Messens, K.; Dewettinck, K. Dynamics of volatile compounds and flavor precursors during spontaneous fermentation of fine flavor Trinitario cocoa beans. *Eur. Food Res. Technol.* 2019, 245, 1595–1610. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03307-y>.
31. Aprotosoia, A.C.; Luca, S.V.; Miron, A. Flavor Chemistry of Cocoa and Cocoa Products—An Overview. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2016, 15, 73–91. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12180>.
32. Zhang, Z.; Li, G. A review of advances and new developments in the analysis of biological volatile organic compounds. *Microchem. J.* 2010, 95, 127–139. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2009.12.017>.
33. Bryant, R.J.; McClung, A.M. Volatile profiles of aromatic and non-aromatic rice cultivars using SPME/GC–MS. *Food Chem.* 2011, 124, 501–513. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.061>.
34. Owusu, M.; Petersen, M.A.; Heimdal, H. Effect of fermentation method, roasting and conching conditions on the aroma volatiles of dark chocolate. *J. Food Process. Preserv.* 2012, 36, 446–456. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2011.00602.x>.
35. Janek, K.; Niewianda, A.; Wöstemeyer, J.; Voigt, J. The cleavage specificity of the aspartic protease of cocoa beans involved in the generation of the cocoa-specific aroma precursors. *Food Chem.* 2016, 211, 320–328. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.033>.

36. Kamal-Eldin, A.; Andersson, R. A multivariate study of the correlation between tocopherol content and fatty acid composition in vegetable oils. *J Am Oil Chem Soc.* 1997, 74, 375–380. <https://doi.org/10.1007/s11746-997-0093-1>.
37. Calva-Estrada, S.J.; Utrilla-Vázquez, M.; Vallejo-Cardona, A.; Roblero-Pérez, D.B.; Lugo-Cervantes, E. Thermal properties and volatile compounds profile of commercial dark chocolates from different genotypes of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) from Latin America. *Food Res. Int.* 2020, 136, 109594. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109594>.
38. Nascimento, M.B.; Souza, T.L.; Maia, D.L.S.; Amorim, L.R.; Ribeiro, A.S.L.; Mamede, M.E.O.; Maciel, L.F.; Santos Júnior, A.F.; Mesquita, P.R.R.; Soares, S.E. Determination of Mineral Profile Using MIP OES and Physicochemical Composition of Cocoa Honey from Different Cocoa Varieties (*Theobroma cacao* L.). *Food Anal. Methods* 2024, 17, 2660. <https://doi.org/10.1007/s12161-024-02640-7>.
39. Papalexandratou, Z.; Nielsen, D.S. It's gettin' hot in here: Breeding robust yeast starter cultures for cocoa fermentation. *Trends Microbiol.* 2016, 24, 168–170. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.01.003>.
40. Eskes, A.B.; Guarda, D.; Garcia, L.; Garcia, P. Is genetic variation for sensory traits of cocoa pulp related to fine flavor cocoa traits? *INGENIC Newsl.* 2007, 11, 22–28.
41. Boza, E.J.; Motamayor, J.C.; Amores, F.; Cedeno-Amador, S.; Tondo, C.L.; Livingstone, D.S.; Schnell, R.; Gutiérrez, O. Genetic characterization of the cacao cultivar CCN 51: Its impact and significance on global cacao improvement and production. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 2014, 139, 219–229. <https://doi.org/10.21273/JASHS.139.2.219>.
42. Sukha, D.A.; Butler, D.R.; Umaharan, P.E.; Boulton, E. The use of an optimised organoleptic assessment protocol to describe and quantify different flavour attributes of cocoa liquors made from Ghana and Trinitario beans. *Eur. J. Food Sci. Technol.* 2008, 226, 405–413. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0551-2>.
43. Kongor, J.E.; Hinneh, M.; Van deWalle, D.; Afoakwa, E.O.; Boeckx, P.; Dewettinck, K. Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao* L.) bean flavour profile—A review. *Food Res. Int.* 2016, 82, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.012>.
44. ICCO. Fine or Flavour Cocoa. 2023. Available online: <https://www.icco.org/fine-or-flavor-cocoa/> (accessed on 12 April 2024).
45. Mesquita, P.R.R.; Nunes, E.C.; Santos, F.N.; Bastos, L.P.; Costa, M.A.P.C.; Rodrigues, F.M.; Andrade, J.B. Discrimination of *Eugenia uniflora* L. biotypes based on volatile compounds in leaves using HS-SPME/GC–MS and chemometric analysis. *Microchem. J.* 2017, 130, 79–87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2016.08.005>.
46. Brereton, R.G. *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*, 1st ed.; Wiley: Chichester, UK, 2003.
47. ANVISA. Instrução Normativa—IN N° 161. ANEXO I: Padrões Microbiológicos para Alimentos, Com Exceção dos Alimentos Comercialmente Estéreis. 2022. Available online: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/IN_161_2022_.pdf/b08d70cb-add6-47e3-a5d3-fa317c2d54b2 (accessed on 10 April 2024).
48. Silva, N.; Junqueira, V.C.A.; Silveira, N.F.A.; Taniwaki, M.H.; Gomes, R.A.R.G.; Okazaki, M.M. *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água*, 6th ed.; Editora Edgard Blücher Ltda: São Paulo, Brazil, 2021.

49. IAL. Instituto Adolfo Lutz. In Métodos físico-químicos para análise de alimentos. (4th ed): Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 2008.

Supplementary material

OPTIMIZATION OF HS-SPME/GC-MS METHOD FOR DETERMINING VOLATILE COMPOUNDS AND SENSORY PROFILE IN COCOA HONEY FROM DIFFERENT COCOA VARIETIES (*Theobroma cacao* L.)

Manuela B. Nascimento^{1,2}, Lívia R. Amorim¹, Marcos A. S. Nonato¹, Mariana N. Roselino¹, Ligia R. R. Santana³, Adriana C. R. Ferreira⁴, Frederico M. Rodrigues², Paulo R. R. Mesquita², Sergio E. Soares^{1,*}

¹Faculty of Pharmacy, Federal University of Bahia, Campus Ondina, 40170-115 Salvador, Bahia, Brazil.

²Agricultural Technological Center of the State of Bahia, Ondina, 40170-110 Salvador, Bahia, Brazil.

³Department of Life Sciences, State University of Bahia, Cabula, 41195-001, Salvador, Bahia, Brazil.

⁴Cocoa Innovation Center, Santa Cruz State University, Salobrinho, 45662-200 Ilhéus, Bahia, Brazil.

* Correspondence: ssoares.ssa@gmail.com; Tel. (71) 98785-3321 (Faculty of Pharmacy, Federal University of Bahia, Campus Ondina, 40170-115 Salvador, Bahia, Brazil.)

Table S1. Variables levels employed for screening of 2⁴ full factorial optimization of HS-SPME method of cocoa honey.

Variable	Coded Variable		
	(-1)	(0)	(+1)
Extraction temperature, °C	40	60	80
Extraction time, min	10	20	30
Stirring speed, rpm	100	250	400
Equilibrium time, min	0	10	20

Table S2. Variables levels employed for central composite design from optimization of HS-SPME method of cocoa honey.

Variable	Coded Variable				
	(-1,68)	(-1)	(0)	(+1)	(+1,68)
Extraction temperature, °C	73	80	90	100	107
Extraction time, min	13	50	60	70	77
Stirring speed, rpm	230	300	400	500	570

Table S3. Experiments carried out to confirm HS-SPME optimal conditions estimated by response surface methodology at extrapolation conditions ($n=3$).

Temperature extraction/ °C	Time extraction/min	Stirring speed /rpm	Response
85	78	171	4.07 x10 ⁸
85	68	161	3.93 x10 ⁸
85	88	181	2.44 x10 ⁸
95	78	171	3.25 x10 ⁸
95	88	181	3.35 x10 ⁸
75	68	161	3.74 x10 ⁸

Table S4. Descriptive terms and reference materials.

Sensory Descriptors	Definition	Reference Material
Appearance		
Yellow color	Has a light shade of yellow	Less intense: Cocoa pulp + 20 drops orange juice (SL). More intense: Cocoa pulp + 10% SL.
Greenish color	<i>A yellow tint that tends slightly to green. Similar to lime green</i>	Less: Cocoa pulp + 20 drops lime juice. More: Persian lime juice.
Aroma		
Acid	Odor relative to acetic acid.	Less: Cocoa pulp + 1% apple cider vinegar. More: Cocoa pulp + 5% apple cider vinegar.
Sweet	Odor obtained from sugar/caramel	Less: Cocoa pulp. More: Cocoa pulp + 10% sugar heated to 120°C to brown color.
Cocoa/Cocoa pulp	Odour relating to cocoa/chocolate pulp	Less: Cocoa pulp + 10% nibs of crushed cocoa. More: Cocoa pulp + 40% crushed cocoa nibs.
Fruity	Odor obtained from tangerine, lemon and other citrus fruits	Less: Cocoa pulp + 5% tangerine, orange, lemon (TLL) solution. More: Cocoa pulp + 20% TLL
Minty/Refreshing	Mint odor. Feeling of freshness of the mint.	Less: Cocoa pulp + 3% solution of aromatic herbs of mint (EM). More: Cocoa pulp + 10% EM.
Floral	Sensation that refers to the floral-fruity odor (flowers:	Less: Cocoa pulp + 5% floral solution (LRJ).

	lavender, roses, jasmine, magnolias).	More: Cocoa pulp + 30% LRJ.
Flavor		
Acidic taste	I like citric acid.	Less: Cocoa pulp + 0.05% citric acid. More: Cocoa pulp + 1.% citric acid.
Sweet taste	Flavor associated with the presence of sugars. Sweet caramel flavor.	Less: Cocoa pulp + 1.0% sugar solution. More: Cocoa pulp + 10.0% sugar solution
Cocoa/Cocoa pulp	Flavor associated with cocoa pulp/cocoa <i>nibs</i> .	Less: Cocoa pulp + 10% nibs of crushed cocoa. More: Cocoa pulp + 40% nibs of crushed cocoa.
Fruity	Flavor relative to citrus fruits (tangerine, lemon, orange)	Less: Cocoa pulp + 5% tangerine, orange, lemon (TLL) solution. More: Cocoa pulp + 20% TLL solution.
Astringency	Dry sensation in the mouth when consuming unripe fruits. Sensation resulting from the contraction of the mucous membrane of the mouth.	Less: Cocoa pulp. More: Cocoa pulp + green banana pulp.
Texture/Sensation in the mouth		
Viscosity	Resistance property to flow.	Minus: Cocoa pulp (1:1). More: Cocoa pulp.
Softness	Feeling of silkiness in the mouth. Texture with a feeling of softness	Less: Cocoa pulp + 2% polyalcohol solution (PAL). More: Cocoa pulp + 10% PAL.

4.4

MANUSCRITO: Perfil químico de mel de cacau (*Theobroma cacao* L.) de diferentes variedades por UHPLC-HRMS/MS e análise quimiométrica

**PERFIL QUÍMICO DE MEL DE CACAU (*Theobroma cacao* L.) DE DIFERENTES
VARIEDADES POR UHPLC-HRMS/MS E ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA**

<i>Periódico a ser submetido:</i>	<i>Journal of Agricultural and Food Chemistry – ISSN 1520-5118</i>
<i>Maior percentil (Scopus):</i>	94%

Resumo

O objetivo deste estudo foi identificar o perfil químico de mel de cacau de diferentes variedades por meio de cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-HRMS/MS). Um total de 72 compostos foram identificados, com ênfase em compostos bioativos como flavonóides, alcalóides, aminoácidos e amins bioativas. A análise multivariada permitiu a discriminação de variedades com base em seus perfis químicos. Notavelmente, a variedade CCN51 apresentou a maior diversidade de aminoácidos essenciais e ácidos carboxílicos. A variedade Parazinho foi caracterizada pela presença de alcaloides, flavonoides e aminoácidos essenciais. A variedade PS1319 destacou-se pelo alto teor de ácidos fenólicos e aminoácidos essenciais e não essenciais. A variedade SJ02 foi distinguida por uma abundância de ácidos fenólicos e açúcares. Cinco compostos foram quantificados por UHPLC-MS/MS, destacando-se a variedade Parazinho por apresentar as maiores concentrações de catequina e teobromina. Esses compostos são reconhecidos por seus potenciais benefícios à saúde, incluindo antioxidantes, propriedades anti-inflamatórias, cardioprotetoras e regulação do humor. Portanto, a presença desses compostos destaca o mel de cacau como uma adição valiosa a uma dieta balanceada, com potencial significativo para aumentar seu valor de mercado e gerar benefícios econômicos para a indústria do cacau.

Palavras-chave: Polpa de cacau; Compostos bioativos; Espectrometria de massa de alta resolução; Análise multivariada.

1. Introdução

O cacau (*Theobroma cacao* L.) é uma das commodities agrícolas mais importantes e suas sementes são o principal ingrediente na produção de chocolate, um alimento amplamente apreciado em todo o mundo (Anoraga et al., 2024). O cacau é amplamente cultivado na África Ocidental, América do Sul e Sul da Ásia. Em 2024, a produção total atingiu 4,5 milhões de toneladas, sendo a África (71,2%) o maior produtor, seguida pelas Américas (23,3%) e pela região da Ásia-Oceania (5,6%) (ICCO, 2024).

O Brasil ocupa a 6ª posição no mundo, com uma produção anual de 0,5 toneladas por hectare. O estado da Bahia se destaca como o maior produtor de cacau do país, com uma

tradição de cultivo que remonta ao século 19 (IBGE, 2024; ICCO, 2024; Yusof et al., 2017). A região sul da Bahia é conhecida pela produção de cacau de alta qualidade, utilizando principalmente variedades finas e aromáticas. O clima favorável e os solos férteis da região contribuem para uma forte produtividade. O cacau da Bahia é crucial para a indústria do chocolate e é altamente valorizado nos mercados nacional e internacional (Ferreira, 2017; Serra & Sodré, 2021).

O cacau e o chocolate amargo são considerados alguns dos alimentos funcionais mais promissores devido às suas altas concentrações de compostos bioativos, como flavonóides, ácidos fenólicos, alcaloides e aminoácidos (Dala-Paula et al., 2021; Gültekin-Özgüven et al., 2016; Żyżelewicz et al., 2018).

No entanto, a cadeia produtiva do cacau gera vários subprodutos valiosos que podem ser utilizados em vários setores, incluindo cascas de vagens, cascas de grãos de cacau, polpa de cacau e mel de cacau (Soares & Oliveira, 2022). Quando prensada a frio, a polpa do cacau produz um subproduto conhecido como mel de cacau, um líquido mucilaginoso, rico em açúcares, ácidos orgânicos, minerais e propriedades antioxidantes. Esse subproduto possui valor econômico significativo devido ao seu potencial comercial e industrial, encontrando aplicações em produtos como doces, geleias, bebidas alcoólicas, sucos e cosméticos (Guirlanda et al., 2021; Guirlanda et al., 2023; Indiarto et al., 2021).

Akoa et al. (2021) identificaram compostos fenólicos e alcaloides da família das metilxantinas em grãos de cacau e chocolate amargo de três híbridos usando LC-MS/MS, destacando a presença de epicatequina, teobromina, ácidos ferúlico e clorogênico e seus derivados, procianidina C1, cafeína e ácido salicílico. No estudo realizado por Pagliari et al. (2022), as metilxantinas foram identificadas em cascas de cacau por meio de LC-MS/MS. Para analisar compostos bioativos no licor de cacau, Herrera-Rocha et al. (2024) empregaram LC-MS e identificaram a presença de vários compostos, como catequina, ácido protocatecuico, fenilalanina, serotonina e isoleucina.

Em relação aos compostos voláteis, mel de cacau das variedades CCN51, PS1319, SJ02 e Parazinho foram previamente analisados por HS-SPME/GC-MS, juntamente com avaliações do perfil sensorial, destacando-se a presença de ésteres como acetato de 1-metilbutila e acetato de 2-heptila, além da classe de terpenos como linalol e D-limoneno (Nascimento et al., 2024a). Nascimento et al. (2024b) determinaram a composição mineral usando MIP OES e examinaram as propriedades físico-químicas do mel de cacau de diferentes variedades. O mel de cacau foi descrito como um produto ácido, contendo quantidades significativas de sólidos solúveis (11,97–17,32), açúcares totais (11,62–16,03 g/100g) e valor energético (113,58–120,53 kcal).

Além disso, contém níveis consideráveis de magnésio (132,08–198,16 mg/kg), zinco (3,01–18,76 mg/kg) e menores quantidades de sódio (44,56–94,57 mg/kg), tornando-se uma fonte nutricional relevante que incentiva seu consumo.

Apesar de ser uma fonte alimentar muito promissora, há informações limitadas sobre o perfil de compostos bioativos de amostras de mel de cacau, e nenhum estudo relatou a caracterização química de compostos não voláteis. Portanto, o objetivo deste trabalho foi determinar o perfil químico do mel de cacau de diferentes variedades usando cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução.

2. Material e métodos

2.1 Reagentes e materiais químicos

Padrões fenólicos, incluindo teobromina, epicatequina, cafeína, quercetina, ácido clorogênico e ácido gálico, foram todos obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) com pureza $\geq 95\%$. Acetonitrila de grau LC-MS ($\geq 99,9\%$), metanol de grau LC-MS ($\geq 99,9\%$) e ácido fórmico de grau LC-MS ($\sim 98\%$) foram todos obtidos da Supelco (Darmstadt, Alemanha). A água foi purificada por um sistema de purificação de água Milli-Q® IQ 7000 (18 M Ω cm, Millipore, Bedford, MA, EUA).

2.2 Amostragem de mel de cacau

O mel de cacau foi extraído da polpa de cacau de frutos maduros das variedades CCN51, PS1319, SJ02 e Parazinho (Fig. 1), colhidas na cidade de Presidente Tancredo Neves, Bahia, Brasil (13° 27' 14"S e 39° 25' 15"W), antes da fermentação das amêndoas de cacau.



Fig. 1. Variedades de cacau (*Theobroma cacao* L.).

A etapa inicial do processo envolveu a seleção dos frutos, com o objetivo de escolher aqueles que estavam totalmente maduras e de alta qualidade. Para produzir o mel de cacau, foi utilizado uma prensa manual a frio feita de aço inoxidável com capacidade de 50kg. Após a extração, o mel de cacau foi armazenado em garrafas de polietileno e mantido a -18°C ($\pm 0,5^{\circ}\text{C}$) até a realização das análises.

2.3 Extração de compostos

As amostras de 5 mL de mel de cacau foram diluídas em 10 mL de água ultrapura (proporção 1:2), em vórtice por 1 minuto e centrifugadas (MPW-351R, MPW Med. Instruments) por 15 min a 10.000 rpm e 4°C . Os sobrenadantes foram então filtrados através de filtros de membrana PES de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ e $0,22\text{ }\mu\text{m}$ em série antes da injeção (Xu et al., 2020).

2.4 Caracterização por UHPLC-HRMS/MS

Os compostos foram identificados por UHPLC-HRMS/MS. Em seguida, $2\text{ }\mu\text{L}$ do extrato líquido foram injetados em um sistema Agilent 1290 Infinity II Binary LC. Uma coluna C18 (InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 $4,6 \times 100\text{ mm}$, $4\text{ }\mu\text{m}$), à temperatura de 40°C , foi empregada nas separações, de acordo com a seguinte condição de gradiente de solvente: iniciando com 95% de solvente A (água ultrapura/0,1% de ácido fórmico) e 5% de solvente B (acetonitrila/0,1% de ácido fórmico) a 0 min, aumentar para 85% de A a 7 min, 100% B em 17 min, mantendo essa condição por 1 min com vazão de $0,4\text{ mL min}^{-1}$.

A análise HRMS foi realizada em um sistema Agilent 6545B Accurate-Mass Q-TOF LC-MS equipado com a tecnologia Jet Stream da Agilent (Santa Clara, EUA) para ionização por eletrospray, nos modos positivo e negativo (faixa de massa m/z 60–600). Os parâmetros Q-TOF empregados foram: taxa de aquisição de $3,0\text{ espectros s}^{-1}$, temperatura do gás de secagem de 200°C , vazão do gás de secagem de $10,0\text{ L min}^{-1}$, temperatura do gás da bainha de 400°C , vazão do gás da bainha de $10,0\text{ L min}^{-1}$, pressão do gás nebulizador de 35 psi, tensão do skimmer de 45 V, octopolo RF de 750 V, tensão do fragmentador de 100 V, tensão capilar de 3,5 kV e tensão do bico de 0,5 kV. O software Agilent MassHunter Workstation, versão 10.0, foi utilizado para processamento de espectros, aquisição de dados e análise qualitativa. A identificação do composto foi baseada em uma comparação da massa exata e do espectro MS/MS com dados do banco de dados MassHunter METLIN Metabolite PCDL (Personal Compound Database and Library). Uma mistura contendo seis padrões analíticos (1 ppm) foi

preparada e injetada para garantir a reprodutibilidade do instrumento e reforçar a anotação dos metabólitos presentes nos méis de cacau.

2.5. Quantificação de compostos bioativos alvo por UHPLC-MS/MS

A concentração de alguns compostos estratégicos, como teobromina, catequina, (*E*)-resveratrol, cafeína e ácido gálico, foi determinada usando um sistema Agilent 1260 Infinity II UHPLC acoplado a um espectrômetro de massa triplo quadrupolo (UHPLC-MS/MS) Agilent Ultivo System, equipado com um sistema de bomba quaternária, e fonte de íons de alta sensibilidade Agilent Jetstream (AJS) (Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, EUA). A separação do analito foi realizada usando uma coluna InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 de fase reversa (100 mm x 4,6 mm x 4,0 μ m). O modo de eluição gradiente foi realizado da seguinte forma: iniciando-se com 95% de solvente A (água ultrapura/0,1% de ácido fórmico) e 5% de solvente B (acetonitrila/0,1% de ácido fórmico) em 0 min, aumentando para 95% de B em 10 min, mantendo essa condição por 2 min. A temperatura da coluna foi mantida em 40 °C. A taxa de fluxo da fase móvel foi fixada em 0,8 mL min⁻¹, e um volume de 2 μ L da amostra foi injetado. A temperatura do amostrador automático foi mantida em 8 °C para evitar a degradação do analito. A fonte de íons AJS foi operada em modo positivo. Os parâmetros de ionização foram temperatura do gás seco (150 °C) e temperatura do gás da bainha (250 °C), fluxo de gás seco (4 L min⁻¹), fluxo de gás da bainha (12 L min⁻¹), pressão do nebulizador (20 psi), tensão capilar (3,5 kV), tensão do bico (0,5 kV) e fragmentador (125 V). O nitrogênio foi usado como gás de colisão na célula de colisão. A aquisição do alvo foi obtida usando duas transições dinâmicas de monitoramento de reações múltiplas (dMRM) para cada composto alvo. Os tempos de retenção (TR) e os parâmetros detalhados de aquisição de MS/MS usados para o perfil dos compostos fenólicos relatados foram fornecidos na Tabela S1.

2.6 Validação do procedimento analítico

O procedimento analítico foi validado com base nos seguintes parâmetros, conforme descrito por Thompson et al. (2002): seletividade, faixa linear e linearidade, efeito de matriz, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), precisão e veracidade (avaliada por meio de testes de pico e recuperação). Mais detalhes sobre os critérios para validação do procedimento analítico são fornecidos na seção Material Suplementar e na Tabela S2 e S3. Resumidamente, todas as curvas analíticas investigadas foram lineares na faixa de concentração

estudada, sem evidências de falta de ajuste. Em relação ao efeito de matriz, observou-se discreta supressão de sinal para catequina e cafeína ($EM=0,8$), enquanto aumento de sinal foi observado para ácido gálico ($EM=1,2$). Assim, curvas analíticas pareadas com matrizes foram utilizadas para determinar a concentração dos analitos. Os valores de LOD e LOQ variaram de 10,9 ng mL⁻¹ (cafeína) a 45,2 ng mL⁻¹ ((*E*)-resveratrol), e de 36,1 ng mL⁻¹ a 151 ng mL⁻¹ para esses mesmos compostos, respectivamente. A precisão, avaliada por meio da repetibilidade, foi inferior a 6,0 para todos os compostos, enquanto que para a precisão intermediária, os valores variaram de 12,6 % a 28,2 %. Os valores de recuperação para cada analito foram: 81,8 – 93,9% (ácido gálico), 84,8 – 121% (teobromina), 87,4 – 113% (catequina), 87,7 – 115% (cafeína) e 90,6 – 98,4% ((*E*)-resveratrol).

2.7 Análise estatística

Os dados contendo as áreas dos picos identificados foram submetidos à análise hierárquica de cluster (HCA) com pré-tratamento por autoescalamento, utilizando o MetaboAnalyst 6.0. Os experimentos foram realizados em triplicata. O OriginPro 2024 (OriginLab, Northampton, MA, EUA) foi usado para plotar gráficos. Uma análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey, foi realizada para identificar diferenças estatisticamente significativas entre as médias ($p < 0,05$).

3. Resultados e discussão

3.1 Caracterização química e análise multivariada

Os resultados, apresentados na Tabela 1, revelaram a presença de várias classes químicas, incluindo flavonóides (4), ácidos fenólicos (5), aminoácidos (14), alcaloides (2), aminas bioativas (5), glicosídeos (2), açúcares (4), ácidos carboxílicos (11), ésteres (11), terpenos (4), cetonas (3), aldeídos (3) e outros (4), totalizando 72 compostos químicos. Seis desses compostos foram confirmados usando padrões comerciais.

Tabela 1. Análise UHPLC-HRMS/MS para a composição química do mel de cacau (*Theobroma cacao* L.).

Pico	RT (min)	Tipo de íon/aduto precursor (m/z)	Molecular Fórmula (Erro em ppm)	Composto anotado	Tipo de anotação ^a	CCN51	Rolamento PS1319	SJ02	Parazinho
<i>Flavonóides</i>									
1	4,84	457,1117/[M+H] ⁺	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₀ (-2.63)	Epicatequina-3-O-(4-metilgalato)	L2	+	+	+	+
2	5,06	291,0858/[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₄ O ₆ (-1.72)	Epicatequina	L1	+	+	+	+
3	5,74	449,1090/[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁ (2.67)	Luteolina-4'-O-glicosídeo	L2	+	-	-	+
4	6,66	301,0352 / [MH] ⁻	C ₁₅ H ₁₀ O ₇ (-0.66)	Quercetina	L1	+	+	+	-
<i>Ácidos fenólicos</i>									
5	2,41	213,0752/[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₂ O ₅ (-2.35)	Ácido vaniláctico	L2	+	+	+	+

6	3,74	165,0546/[M+H] ⁺	C ₉ H ₈ O ₃ (0.00)	Ácido 2-hidroxicinâmico	L5	+	+	+	+
7	4,05	169,0141 / [MH] ⁻	C ₇ H ₆ O ₅ (-4.73)	Ácido gálico	L1	+	+	+	+
8	4,74	163,0390/[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₁₈ O ₉ (-4.29)	Ácido clorogênico	L1	+	+	+	+
9	5,60	153,0191 / [MH] ⁻	C ₇ H ₆ O ₄ (-1.31)	Ácido protocatecuico	L5	+	+	+	+
<i>Aminoácidos</i>									
10	2,35	147,1134/[M+H] ⁺	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂ (4.08)	Lisina	L5	+	+	+	+
11	2,36	156,0771/[M+H] ⁺	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂ (1.92)	Histidina	L5	+	+	+	+
12	2,36	175,1196/[M+H] ⁺	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂ (3.43)	Arginina	L5	+	+	+	+
13	2,49	133,0611/[M+H] ⁺	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃ (2.25)	Asparagina	L5	+	+	+	+

14	2,50	106,0500/[M+H] ⁺	C ₃ H ₇ NO ₃ (0.94)	Serina	L5	+	+	+	+
15	2,50	90,0551/[M+H] ⁺	C ₃ H ₇ NO ₂ (1.11)	Alanina	L5	+	+	+	+
16	2,52	134,0451/[M+H] ⁺	C ₄ H ₇ NO ₄ (2.24)	Ácido aspártico	L2	+	+	+	+
17	2,56	148,0606/[M+H] ⁺	C ₅ H ₉ NO ₄ (1.35)	Ácido glutâmico	L5	+	+	+	+
18	2,66	116,0711/[M+H] ⁺	C ₅ H ₉ NO ₂ (4.31)	Prolina	L5	+	+	+	+
19	2,95	118,0867/[M+H] ⁺	C ₅ H ₁₁ NO ₂ (3.39)	Valina	L5	+	+	+	+
20	3,38	150,0589/[M+H] ⁺	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S (4.00)	Metionina	L5	+	+	+	+
21	3,53	130,0499/[M+H] ⁺	C ₅ H ₇ NO ₃ (0.00)	Ácido piroglutâmico	L2	+	+	+	+
22	3,74	182,0816/[M+H] ⁺	C ₉ H ₁₁ NO ₃ (2.20)	Tirosina	L5	+	+	+	+

23	3,85	132,1024/[M+H] ⁺	C ₆ H ₁₃ NO ₂ (3.78)	Isoleucina	L5	+	+	+	+
<i>Alcalóides</i>									
24	2,56	179,0567/[M-H] ⁻	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂ (-3.91)	Teobromina	L1	+	+	+	+
25	4,96	195,0873/[M+H] ⁺	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂ (-2.05)	Cafeína	L1	+	+	+	+
<i>Bioactive amines</i>									
26	2,11	146,1655/[M+H] ⁺	C ₇ H ₁₉ N ₃ (2.05)	Espermidina	L2	+	+	+	+
27	2,18	203,2232/[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₂₆ N ₄ (0.98)	Espermina	L2	+	+	+	+
28	4,02	177,1026/[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O (2.26)	Serotonina	L5	+	+	+	+
29	4,65	122,0967/[M+H] ⁺	C ₈ H ₁₁ N (2.46)	Fenetilamina	L5	+	+	+	+
30	4,94	161,1079/[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₂ N ₂	Triptamina	L5	+	+	+	+

37	2,77	89,0247/[M-H] ⁻	C ₃ H ₆ O ₃ (3.37)	Ácido láctico	L5	+	+	+	+
38	3,47	313,1036/[M+H] ⁺	C ₁₄ H ₁₂ N ₆ O ₃ (-2.56)	Ácido pteróico	L2	+	+	+	+
39	3,86	117,0198/[M-H] ⁻	C ₄ H ₆ O ₄ (4.27)	Ácido succínico	L5	+	+	+	+
40	4,16	219,1226/[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₈ O ₅ (-0.46)	Ácido 2-hidroxi-decanóico	L2	+	+	+	+
41	5,79	237,1491/[M+H] ⁺	C ₁₄ H ₂₀ O ₃ (2.53)	Ácido 4-heptiloxibenzóico	L2	+	-	+	+
42	6,11	101,0604 / [MH] ⁻	C ₅ H ₁₀ O ₂ (-3.96)	Ácido valérico	L2	+	+	+	+
43	6,16	279,2308/[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₃₀ O ₂ (-3.94)	Ácido γ-linolênico	L2	-	+	+	+
44	9,16	217,1438/[M+H] ⁺	C ₁₁ H ₂₀ O ₄ (1.84)	Ácido undecanodióico	L2	-	+	-	-
45	9,32	283,2625/[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₃₄ O ₂ (-2.47)	Ácido 11-cicloheptylundecanóico	L2	-	-	+	-

46	9,53	337,2341/[M+Na] +	C ₁₈ H ₃₄ O ₄ (-2.37)	Ácido octadecanodiólico	L2	-	+	+	+
47	11,22	265,2145/[M+Na] +	C ₁₅ H ₃₀ O ₂ (2.64)	Ácido mirístico 12-metil	L2	-	+	-	-
Ésteres									
48	2,68	85,0283/[M+H] ⁺	C ₄ H ₄ O ₂ (-1.18)	2(3H)-Furanona	L2	+	+	+	+
49	5,00	195,0649/[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₀ O ₄ (-1.52)	Cafeína de metila	L2	+	+	+	+
50	5,06	175,0603/[M-H] ⁻	C ₇ H ₁₂ O ₅ (-5.14)	3-Isopropilmalato	L2	+	+	+	+
51	5,10	115,0387/[M+H] ⁺	C ₅ H ₆ O ₃ (-2.61)	2-Hidroxi-2,4-pentadienoato	L2	+	+	+	+
52	5,16	317,1756/[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₂₄ O ₄ (2.84)	Cafeína de isopulegona	L2	+	+	-	+
53	6,48	159,1387/[M+H] ⁺	C ₉ H ₁₈ O ₂ (4.40)	Heptanoato de etilo	L2	+	+	-	-

54	8,58	253,2157/[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₂₈ O ₂ (-1.97)	Hexanoato de linalilo	L2	+	+	+	+
55	9,11	251,1985	C ₁₄ H ₂₈ O ₂ (1.19)	Nonanoato de 3-metilbutilo	L2	+	+	+	-
56	9,43	197,1531/[M+H] ⁺	C ₁₂ H ₂₀ O ₂ (-2.54)	(4E)-4-hexenoato de (3 Z)-3-hexen-1-ilo	L2	+	+	+	+
57	10,69	247,1681/[M+Na] +	C ₁₄ H ₂₄ O ₂ (4.86)	Butanoato de α-terpineol	L2	+	-	-	-
58	11,06	223,0966/[M+H] ⁺	C ₁₂ H ₁₄ O ₄ (0.45)	Isobutirato de piperonilo	L2	+	+	+	+
<i>Terpenos</i>									
59	6,32	319,2272/[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₃₀ O ₃ (1.25)	Ácido grandflórico	L2	+	+	+	+
60	4,89	153,1272/[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₆ O (-1.31)	Limoneno-1,2-epóxido	L2	+	+	-	+
61	5,00	169,1224/[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₆ O ₂ (0.59)	8-Epiiridodial	L2	+	+	+	+

62	9,95	233,1529/[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₀ O ₂ (-3.00)	Germacrona-13-al	L2	+	+	+	+
<i>Cetonas</i>									
63	5,58	113,0961/[M+H] ⁺	C ₇ H ₁₄ O (0.00)	5-Metil-3-hexen-2-ona	L2	+	+	+	+
64	6,53	143,1430/[M+H] ⁺	C ₉ H ₁₈ O (0.00)	2-Nonanona	L2	+	+	+	-
65	8,43	141,1277/[M+H] ⁺	C ₉ H ₁₆ O (2.13)	8-Nonen-3-um	L2	+	+	-	-
<i>Aldeídos</i>									
66	3,52	97,0280/[M+H] ⁺	C ₅ H ₄ O ₂ (-4.12)	Furfural	L2	+	-	-	-
67	5,26	219,1724/[M+Na] +	C ₁₃ H ₂₄ O (2.28)	(4Z) -Dodecenal	L2	+	+	+	+
68	9,69	199,1688/[M+H] ⁺	C ₁₂ H ₂₂ O ₂ (-2.51)	Decanoylacetaldeído	L2	+	+	+	+

<i>Outros</i>									
69	3,42	205,1225/[M+H] ⁺	C ₁₃ H ₁₆ O ₂ (0.98)	Plastoquinona	L2	+	-	+	+
70	3,63	103,1114/[M+H] ⁺	C ₆ H ₁₄ O (-2.91)	1-hexanol	L2	+	+	+	+
71	5,95	141,0541/[M+H] ⁺	C ₇ H ₈ O ₃ (-3.54)	Álcool gentisílico	L2	+	-	+	+
72	8,95	183,1374/[M+H] ⁺	C ₁₁ H ₁₈ O ₂ (-3.28)	2-Hexil-5-metil-3(2 <i>H</i>)-furanona	L2	+	-	+	-

^aAnnotation type: (L1) Level 1, confirmed structure by reference standard; (L2) Level 2, probable structure by library spectrum match; (L5) Level 5, exact mass of interest (Schymanski et al., 2014).

A Fig. 2 apresenta o dendrograma obtido a partir da análise hierárquica de clusters (HCA) combinada com um mapa de calor, onde as amostras foram agrupadas com base em suas semelhanças, demonstrando claramente a formação de quatro clusters distintos.

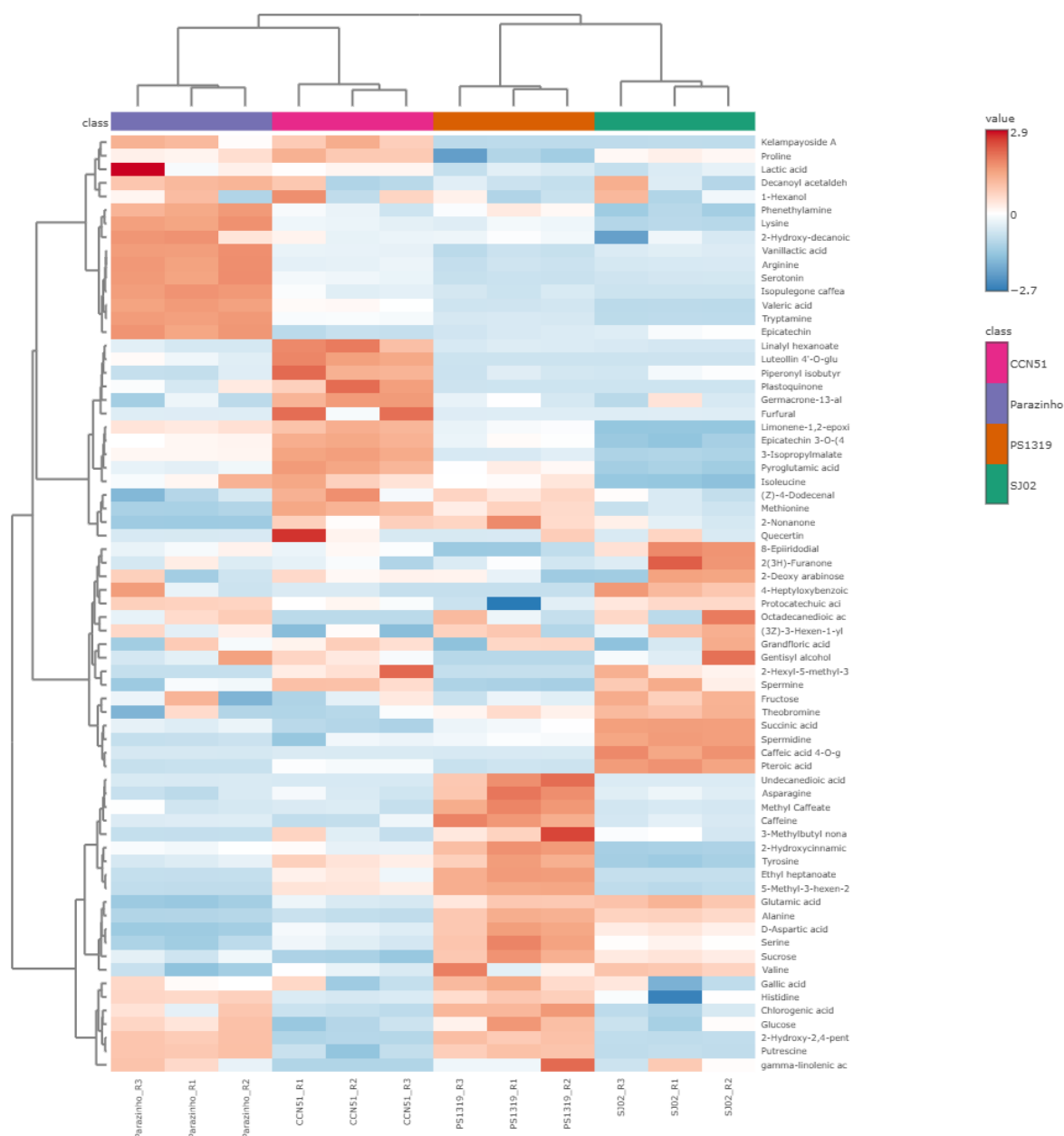


Fig. 2. Dendrograma da análise hierárquica de agrupamento (HCA) combinado com um mapa de calor dos compostos encontrados no mel de cacau de diferentes variedades, obtido por UHPLC-HRMS/MS.

O cluster correspondente à variedade Parazinho (lilás) se destaca pela presença de aminas bioativas, flavonoides e aminoácidos condicionalmente essenciais, apresentando os maiores níveis de serotonina, triptamina e epicatequina. Já o cluster relacionado à variedade CCN51 (rosa) contém uma predominância mais elevada de aminoácidos essenciais e ácidos carboxílicos, sendo reconhecido pelo seu alto teor de quercetina. A

variedade PS1319 (laranja) se caracteriza por uma abundância de alcaloides, como cafeína, além de ácidos fenólicos, como os ácidos gálico e clorogênico, além de aminoácidos essenciais e não essenciais, bem como açúcares como sacarose e glicose. Por fim, a variedade SJ02 (verde) se destaca pelos ácidos fenólicos e açúcares, incluindo a frutose.

O cacau e seus derivados são reconhecidos como uma rica fonte de compostos bioativos (Cinar et al., 2021). Esses compostos bioativos podem ser categorizados em compostos fenólicos, incluindo flavonóides e ácidos fenólicos, bem como alcaloides, aminoácidos, glicosídeos, entre outros (Balcázar-Zumaeta et al., 2024; Cortez et al., 2024; Zhou et al., 2021).

Entre os flavonóides identificados estavam epicatequina, quercetina e epicatequina 3-O-(4-metilgalato). A epicatequina é considerada o principal flavan-3-ol do cacau, representando aproximadamente 35% de seu conteúdo fenólico total. Kobi et al. (2024) relataram a presença de epicatequina e quercetina em grãos de cacau das variedades CCN51 e PS1319 cultivadas em condições de cabruca e sol pleno. Os flavonóides são conhecidos por suas propriedades cardioprotetoras, funcionando como antioxidantes e exibindo atividades antiplaquetárias e anti-inflamatórias (Cinar et al., 2021).

Alcalóides da família das metilxantinas, incluindo teobromina e cafeína, também foram identificados nas amostras de mel de cacau. A teobromina é o alcalóide predominante nos grãos de cacau, normalmente compreendendo entre 1% e 4% de seu peso. Este composto está associado à estimulação cardíaca, redução de peso e aumento da sensibilidade à insulina. Por outro lado, a cafeína é conhecida por elevar a pressão arterial e estimular o sistema nervoso central (Akoa et al., 2021; Cortez et al., 2024). De acordo com Becerra et al. (2024), os grãos de cacau geralmente contêm aproximadamente 1% a 2% (p/p) de teobromina e 0,1% a 0,8% de cafeína.

Cinco ácidos fenólicos foram detectados, incluindo ácido gálico, ácido clorogênico e ácido protocatecuico. Oracz et al. (2019) relataram a identificação de ácido gálico e ácido protocatecuico em grãos de cacau usando cromatografia líquida de ultra-desempenho acoplada a espectrometria de massa de alta resolução.

Alcalóides como teobromina e cafeína, juntamente com compostos polifenólicos como epicatequina, quercetina e ácido protocatecuico, têm sido extensivamente estudados por seus efeitos positivos no estresse oxidativo, obesidade, resistência à insulina, saúde cardiovascular, atividade antioxidante, efeitos citotóxicos e propriedades

anti-inflamatórias. Embora o consumo de compostos bioativos do cacau ofereça benefícios significativos à saúde, as altas concentrações de polifenóis e alcalóides nos grãos de cacau crus podem afetar adversamente o sabor, contribuindo para a adstringência e o amargor (Cinar et al., 2021; Goya et al., 2022).

Aminas bioativas, como serotonina e triptamina, estão presentes no cacau e no chocolate, e foram detectadas em amostras de mel de cacau. Esses compostos podem oferecer vários benefícios à saúde, incluindo proteção cardiovascular, propriedades antioxidantes e efeitos antienvelhecimento (Silva et al., 2023; Costa et al., 2022). Deus et al. (2021) observaram que os níveis de serotonina e triptamina diminuíram durante a fermentação do cacau. A serotonina, um neurotransmissor essencial sintetizado a partir do aminoácido triptofano, está associada a sentimentos de bem-estar, felicidade e desempenha um papel fundamental na regulação da qualidade do sono, memória e aprendizado. Deficiências nos níveis de serotonina podem contribuir para condições como estresse e depressão (Tahiri et al., 2024; Pinto et al., 2023). A fenetilamina, pode ser encontrada em várias plantas e usada como estimulante, alucinógeno, neurotransmissor, antidepressivo e broncodilatador (Zhao et al., 2018).

Espermidina e espermina, que pertencem ao grupo das aminas bioativas, também foram identificadas nas amostras de mel de cacau. As poliaminas estão presentes em todas as células vivas, onde desempenham papéis essenciais no desenvolvimento, crescimento e resistência ao estresse. Além disso, esses compostos exibem atividade antioxidante, ajudando a prevenir danos às membranas celulares e ao DNA. A presença de espermidina e espermina foram observadas nos grãos de cacau durante a fermentação (Brito et al., 2017; Silva et al., 2020). É importante ressaltar que, embora as aminas bioativas sejam benéficas à saúde humana em níveis baixos, suas altas concentrações podem levar a efeitos adversos, como dores de cabeça e reações alérgicas (Hazards, 2011; Oliveira et al., 2019).

Dentre os aminoácidos detectados nas amostras de mel de cacau, seis são aminoácidos essenciais: isoleucina, lisina, histidina, valina, metionina e tirosina. Seis são aminoácidos não essenciais: asparagina, serina, alanina, ácido aspártico, ácido glutâmico e ácido piroglutâmico. Dois foram considerados condicionalmente essenciais: arginina e prolina. Deus et al. (2021), ao estudarem as mudanças nos aminoácidos e aminas bioativas durante a fermentação do cacau na fazenda, concluíram que os níveis de aminoácidos aumentaram ao longo da fermentação. Becerra et al. (2024) detectaram a presença de valina e tirosina em grãos de cacau, identificados por meio de LC-MS/MS.

Os aminoácidos são formados durante a fermentação do cacau e desempenham um papel crucial no desenvolvimento de compostos aromáticos voláteis. Essas reações geram uma variedade de compostos bioativos, incluindo aminoácidos, peptídeos, açúcares redutores, ácidos e flavan-3-óis, entre outros. Esses compostos são responsáveis pelo aroma e sabor distintos do chocolate (Balcázar-Zumaeta et al., 2023; Balcázar-Zumaeta et al., 2024). Portanto, a qualidade do cacau e a percepção do sabor e aroma do chocolate são influenciadas pelo perfil de aminoácidos (Dala-Paula et al., 2021). No entanto, nenhum outro dado sobre aminoácidos no mel de cacau foi relatado na literatura até o momento.

O cacau e seus derivados podem conter glicosídeos (Pérez-Jiménez et al., 2010), e dois desses compostos, ácido cafeico 4-O-glicosídeo e kelampaiosídeo A, foram identificados em amostras de mel de cacau. No entanto, esses glicosídeos não são comumente mencionados na literatura científica sobre cacau. Por exemplo, o kelampayoside A foi identificado na raiz de *Millettia speciosa* usando UHPLC-MS/MS (Zhang et al., 2022). Os glicosídeos derivados de plantas surgiram como candidatos promissores para o tratamento do câncer devido às suas diversas atividades biológicas. Sua capacidade de inibir a angiogênese e reduzir a metástase de células cancerígenas os torna valiosos para o desenvolvimento de futuras estratégias terapêuticas contra o câncer (Prithviraj, 2024; Ghosh et al., 2023).

Dentre as classes de carboidratos, foram identificados monossacarídeos como frutose, glicose e 2-desoxi arabinose, bem como o dissacarídeo sacarose. Moretti et al. (2023), ao avaliarem a influência das variedades de cacau na composição de carboidratos da polpa do cacau, verificaram que, em média, a polpa contém 76% de açúcar, com variação significativa de 20% no teor de açúcar entre as cultivares. Além disso, foram observadas concentrações mais altas de glicose e frutose do que de sacarose na polpa do cacau. Isso ocorre porque a sacarose é o açúcar predominante no início do amadurecimento, mas à medida que a fruta amadurece, os níveis de sacarose diminuem enquanto os níveis de glicose e frutose aumentam, um processo facilitado pela ação da invertase (Paliyath et al., 2012). No estudo de Moretti et al. (2023), também foi observado que as variedades PS1319, Pará, SJ02 e CCN51 apresentaram os maiores teores de açúcares totais, incluindo glicose, frutose e sacarose.

Ácidos carboxílicos, como ácido láctico e ácido succínico, foram identificados em amostras de mel de cacau. O ácido láctico e o ácido succínico ocorrem naturalmente nos grãos de cacau e em sua polpa, desempenhando papéis importantes durante a fermentação dos grãos de cacau. Esses compostos foram descritos em grãos de cacau de várias origens (Hanifah et al., 2022; Ferreira et al., 2023).

Compostos de baixo peso molecular, como álcoois, cetonas, ésteres, terpenos e aldeídos também foram detectados. De acordo com Brito et al. (2017), variações no perfil desses compostos na literatura podem resultar de diferenças nas variedades de cacau, regiões de cultivo, condições de crescimento, estágios de maturação, processos pós-colheita e condições de armazenamento. Nesse contexto, os resultados indicam que muitos dos compostos encontrados no cacau também estão presentes no mel de cacau, o que não só agrega valor à sua produção, mas também promove seu consumo devido aos seus potenciais benefícios à saúde (Brito et al., 2017; Pereira et al., 2023; Zhang et al., 2022).

É evidente que cada variedade de cacau tem um perfil composto distinto. Esses compostos são conhecidos por seus potenciais benefícios à saúde, incluindo propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e cardioprotetoras (Cinar et al., 2021; Silva et al., 2023). Além disso, a presença de aminas bioativas contribui para efeitos positivos no humor e no bem-estar (Deus et al., 2021; Tahiri et al., 2024). Compreender o papel desses compostos pode ajudar a promover o consumo de mel de cacau e aumentar o valor desse subproduto dentro da cadeia produtiva do cacau. Além disso, esse conhecimento oferece novas perspectivas para o desenvolvimento de produtos funcionais com benefícios à saúde (Balcázar-Zumaeta et al., 2024; Zhao et al., 2018).

A análise das amostras de mel de cacau utilizando UHPLC-HRMS/MS resultou na identificação de 72 compostos (Tabela 1), com predominância de compostos bioativos como flavonoides, alcaloides, aminas bioativas, aminoácidos e glicosídeos. Esses compostos são reconhecidos por seus potenciais benefícios à saúde, incluindo propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e cardioprotetoras. É importante enfatizar que a presença de aminas bioativas, como a serotonina, contribui para os efeitos positivos do mel de cacau no humor e no bem-estar.

3.2 Determinação de compostos selecionados em méis de cacau

A concentração de compostos bioativos, como ácido gálico, teobromina, catequina, cafeína e (*E*)-resveratrol, foi determinada em quatro variedades diferentes de mel de cacau por UHPLC-MS/MS (Tabela 2).

Tabela 2. Concentração de compostos bioativos (média $\pm$ desvio padrão, mg kg⁻¹) em diferentes variedades de mel de cacau.

Compostos	CCN51	PS1319	SJ02	Parazinho
Catequina	1.480 $\pm$ 0.020 ^a	1.130 $\pm$ 0.020 ^b	2.430 $\pm$ 0.150 ^c	7.340 $\pm$ 0.120 ^d
Cafeína	<0,010	0,169 $\pm$ 0,006 ^a	ND	<0,030
Ácido gálico	0,040 $\pm$ 0,002 ^a	<0,040	<0,040	<0,040
(<i>E</i>)-Resveratrol	<0,140	<0,140	<0,140	<0,140
Teobromina	0,790 $\pm$ 0,023 ^a	1,360 $\pm$ 0,020 ^b	0,266 $\pm$ 0,033 ^c	2.200 $\pm$ 0.050 ^d

As médias seguidas da mesma letra na linha não diferem significativamente entre si (teste de Tukey; $p < 0,05$). Média calculada por seis repetições ($n=6$). ND: não detectado.

Os dados apresentados na Tabela 2 indicam que a catequina e a teobromina foram detectadas em todas as amostras, enquanto o (*E*)-resveratrol foi encontrado abaixo do limite de quantificação (LOQ) em todas as variedades. Dentre as amostras analisadas, a variedade Parazinho apresentou a maior quantidade total dos compostos bioativos identificados. De acordo com Barnaba et al. (2017), valores médios de 0,039 mg kg⁻¹ de ácido gálico foram encontrados em grãos de cacau sul-americanos usando espectrometria de massas de alta resolução, enquanto valores mais altos para catequina (100 mg kg⁻¹) foram relatados por Lima et al. (2024). Peredo et al. (2021) também observaram valores inferiores ao LOQ para (*E*)-resveratrol ao avaliar os compostos fenólicos de uvas de diferentes variedades por UHPLC.

A teobromina, seguida pela cafeína, que geralmente está presente em quantidades menores, é o principal alcalóide encontrado nos grãos de cacau. Neste estudo, esses compostos também foram detectados no mel de cacau, embora em concentrações mais baixas. Valores semelhantes foram relatados na polpa de cacau, com níveis de teobromina de 0,00065% (EFSA et al., 2019). Além disso, Vargas-Arana et al. (2022) descreveram teores de teobromina (10,21 mg kg⁻¹), cafeína (0,22 mg kg⁻¹) e catequina (2,93 mg kg⁻¹) na farinha de casca de cacau.

A Figura 3 mostra a distribuição de compostos bioativos em diferentes variedades de mel de cacau. A variedade Parazinho demonstrou a maior variabilidade, impulsionada principalmente por níveis elevados de catequina e teobromina. Além disso, uma alta densidade de dados foi observada perto da mediana. Brunetto et al. (2007) observaram

que o cacau *Forastero* apresentou maior teor de teobromina e menor concentração de cafeína em comparação com outros genótipos.

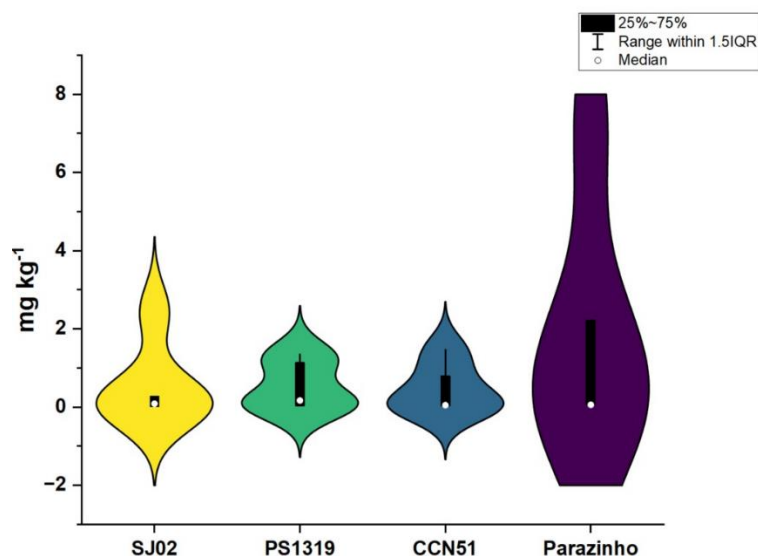


Fig. 3. Gráfico de violino com box-whisker para a avaliação de diferentes variedades de mel de cacau.

Nesse contexto, diversos estudos têm mostrado que a concentração de compostos fenólicos nas plantas varia principalmente com base na genética do cacaueiro, bem como em outros fatores como condições ambientais de cultivo, origem geográfica e período de colheita (Batista et al., 2016; Cortez et al., 2023). Kobi et al. (2024) relataram variações no conteúdo fenólico associado à diversidade genética do cacaueiro. Portanto, os resultados do presente estudo confirmam ainda mais a diversidade de compostos bioativos presentes no mel de cacau.

4. Conclusão

Em conclusão, a análise multivariada revelou a formação de quatro grupos distintos de amostras de mel de cacau. A variedade CCN51 é caracterizada por uma maior predominância de aminoácidos essenciais e ácidos carboxílicos. A variedade Parazinho distingue-se pela presença de alcaloides, flavonóides e aminoácidos condicionalmente essenciais. A variedade PS1319 destaca-se pelos seus altos níveis de alcalóides, ácidos fenólicos e aminoácidos essenciais e não essenciais. A variedade SJ02 é notável por sua abundância de ácidos fenólicos e açúcares. Portanto, a caracterização dos compostos presentes no mel de cacau, juntamente com seus potenciais benefícios à saúde, o posiciona como um subproduto valioso com potencial significativo para aumentar sua comercialização local e internacional, gerando renda para os produtores de cacau. Além

disso, o tipo de variedade teve impacto nos dados de quantificação de compostos bioativos no mel de cacau e a variedade Parazinho destacou-se por suas maiores concentrações de catequina e teobromina.

Conflitos de interesse

Todos os autores declaram não ter conflitos de interesse em relação à pesquisa descrita, à publicação dos resultados e a questões financeiras.

Declaração de contribuição do quadril dos autores do CRediT

Manuela B. Nascimento: Conceituação, Metodologia, Investigação, Software, Análise formal, Redação - versão original. **Sergio E. Soares:** Investigação, Redação - revisão, Supervisão, Administração de projetos. **Paulo R. R. Mesquita:** Recursos, Metodologia, Investigação, Software, Redação - revisão e edição, Supervisão.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado financeiramente pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação do Brasil — MCTI (Processo nº 904399/2020). M. B. Nascimento agradece à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida [nº 88887.504355/2020-00], aos agricultores Manoel Carlos Andrade do Nascimento e Juscelino Macedo pelo fornecimento das amêndoas de cacau in natura, e à Secretaria de Agricultura, Pecuária, Irrigação, Pesca e Aquicultura do Governo do Estado da Bahia (SEAGRI) pela parceria.

Referências

- Anoraga, S. B., Rosnah S., R., Hamzah, M.H., Sharif, S., & Saputro, A.D. (2024). Cocoa by-products: A comprehensive review on potential uses, waste management, and emerging green technologies for cocoa pod husk utilization. *Heliyon*, 10, e35537, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e35537>.
- Akoa, S.P., Kouam, J.C.D., Ondobo, M.L., Ndjaga, J.M., Djocgoue, P.F., & Onomo, P.E. (2021). Identification of Methylxanthines and Phenolic Compounds by UPLC-DAD-ESI-MS OTOF and Antioxidant Capacities of Beans and Dark Chocolate Bars from Three Trinitario×Forastero Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Hybrids. *Journal of Food Research*, 10, 2. <https://doi.org/10.5539/jfr.v10n2p32>.

- Balcázar-Zumaeta, C. R., Castro-Alayo, E. M., Cayo-Colca, I. S., Idrogo-Vásquez, G., & Muñoz-Astecker, L. D. (2023). Metabolomics during the spontaneous fermentation in cocoa (*Theobroma cacao* L.): An exploraty review. *Food Research International*, 163, 112190. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112190>.
- Balcázar-Zumaeta, C.R., Fernández-Romero, E., Lopes, A.S., Ferreira, N.R., Chagas-Júnior, G.C.A., Yoplac, I., López-Trigoso, H.A., Tuesta-Occ, M.L., Maldonado-Ramirez, I., Maicelo-Quintana, J.L., Cayo-Colca, I.S., & Castro-Alayo, E.M. (2024). Amino acid profile behavior during the fermentation of Criollo cocoa beans. *Food Chemistry: X*, 22, 101486. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.101486>.
- Barnaba, C., Nardin, T., Pierotti A., Malacarne M., Larcher, R. (2017). Targeted and untargeted characterisation of free and glycosylated simple phenols in cocoa beans using high resolution-tandem massspectrometry (Q-Orbitrap). *Journal of Chromatography A*, 1480, 41–49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.12.022>.
- Batista, N. N., de Andrade, D. P., Ramos, C. L., Dias, D. R., & Schwan, R. F. (2016). Antioxidant capacity of cocoa beans and chocolate assessed by FTIR. *Food Research International*, 90, 313–319. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2016.10.028>.
- Becerra, L.D., Quintanilla-Carvajal, M.X., Escobar, S., & Pardo, R.Y.R. (2024). From controlled transformed cocoa beans to chocolate: Bioactive properties, metabolomic profile, and in vitro bioaccessibility. *Food Chemistry*, 433, 137321. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137321>.
- Brito, B.N.C., Chisté, R.C., Pena, R.S., Gloria, M.B.A., & Lopes, A.S. (2017). Bioactive amines and phenolic compounds in cocoa beans are affected by fermentation. *Food Chemistry*, 228, 484-490. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.004>.
- Brunetto, M.R., Gutiérrez, L., Delgado, Y., Gallignani, M., Zambrano, A., Gómez, A., Ramos, G., Romero, C. (2007). Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method

- with on-line sample cleanup in a switching-column system. *Food Chemistry*, 100 (2), 459-467. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.007>.
- Cinar, Z.O., Atanassova, M., Tumer, T.B., Caruso, G., Antika, G., Sharma, S., Sharifi-Rad, J., & Pezzani, R. (2021). Cocoa and cocoa bean shells role in human health: Na updated review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 103, 104115. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104115>.
- Cortez, D., Flores, M., Calampa, L., Oliva-Cruz, M., Goñas, M., Meléndez-Mori, J.B., & Chavez, S.G. (2024). From the seed to the cocoa liquor: Traceability of bioactive compounds during the postharvest process of cocoa in Amazonas-Peru. *Microchemical Journal*, 201, 110607. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.110607>.
- Cortez, D., Quispe-Sanchez, L., Mestanza, M., Oliva-Cruz, M., Yoplac, I., Torres, C., & Chavez, S. G. (2023). Changes in bioactive compounds during fermentation of cocoa (*Theobroma cacao*) harvested in Amazonas-Peru. *Current Research in Food Science*, 6, 100494. <https://doi.org/10.1016/J.CRFS.2023.100494>.
- Dala-Paula, B. M., Deus, V. L., Tavano, O. L., & Gloria, M. B. A. (2021). In vitro bioaccessibility of amino acids and bioactive amines in 70% cocoa dark chocolate: What you eat and what you get. *Food Chemistry*, 343, Article 128397. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128397>.
- Deus, V.L., Bispo, E.S., Franca, A.S., & Gloria, M.B.A. (2021). Understanding amino acids and bioactive amines changes during on-farm cocoa fermentation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 97, 103776. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103776>.
- EFSA European Food Safety Authority (2019) Technical report on the notification of pulp from *theobroma cacao* L. as a traditional food from a third country pursuant to article 14 of regulation (EU) 2015/2283. EFSA Support Publ EN-1724. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2019.EN-1724>.
- Ferreira, A.C.R. (2017). Indicação de Procedência Sul da Bahia. Manual de Controle de Qualidade do Cacau Sul da Bahia. ISBN: 978-85-93727-02-3, Ilhéus – BA. Retrieved from <https://forumdocacau.com.br/wp->

content/uploads/2019/01/Cartilha-3-Controle-de-Qualidade.pdf.

Accessed

October 24, 2024.

- Goya, L.; Kongor, J. E.; & Pascual-Teresa, S. (2022). From cocoa to chocolate: effect of processing on flavanols and methylxanthines and their mechanisms of action. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 22, 14365. <https://doi.org/10.3390/ijms232214365>.
- Guirlanda, C.P., Alvim, I.D., & Takahashi, J. A. (2023). Atomization of Cocoa Honey Using Whey Protein Isolate to Produce a Dry Formulation with Improved Shelf Life for Industrial Application. *Foods*, 12, 4269. <https://doi.org/10.3390/foods12234269>.
- Guirlanda, C.P., Silva, G.G., & Takahashi, J. A. (2021). Cocoa honey: Agroindustrial waste or underutilized cocoa by-product? *Future Foods*, 4, 100061. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2021.100061>.
- Gültekin-Özgülven, M., Berktaş, I., & Özçelik, B. (2016). Change in stability of procyanidins, antioxidant capacity and in vitro bioaccessibility during processing of cocoa powder from cocoa beans. *LWT – Food Science and Technology*, 72, 559–565. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.065>.
- Hanifah, A., Firmanto, H., Putri, S.P., & Fukusaki, E. (2022). Unique metabolite profiles of Indonesian cocoa beans from different origins and their correlation with temperature. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 134 (2), 125e132. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2022.05.001>.
- Hazards, E. P. O. B. (2011). Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal*, 9(10), 2393.
- Herrera-Rocha, F., León-Inga, A.M., Mejía, J.L.A., Rodríguez-López, C.M., Chica, M.J., Wessjohann, L.A., Barrios, A.F.G., Cala, M.P., & Fernández-Niño, M. Bioactive and flavor compounds in cocoa liquor and their traceability over the major steps of cocoa post-harvesting processes. *Food Chemistry*, v.435, 137529, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137529>.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2024). Produção de cacau. Retrieved from <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/cacau/pa>. Accessed November 9, 2024.

- ICCO. International Cocoa Organization. (2024). Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics, Vol. L, No. 1, Cocoa Year 2023/24. Retrieved from https://www.icco.org/wp-content/uploads/Production_QBCS-L-No.-1.pdf. Accessed November 9, 2024.
- Indiarto, R., Raihani, Z.R., Dewi, M.P., & Aqila, Z.R. (2021). A review of innovation in cocoa bean processing by-products. *IJETER*, 9, (8), 1162–1169. <https://doi.org/10.30534/ijeter/2021/22982021>.
- Kobi, H.B., Fernandes, R.B.A., Senna, D.S., Borges, L.L.R., Vidigal, M.C.T.R., Marrocos, P.C.L., Freitas, V.V., Souza, M.S.S., Castro, G.A.D., Fernandes, S.A., Ferraz, K.C.R., & Stringheta, P.C. (2024). Metabolic profile of fatty acids, phenolic compounds, and methylxanthines of cocoa kernels (*Theobroma cacao* L.) from different cultivars produced in cabruca and full sun farming systems. *Food Research International*, 197, 115198. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.115198>.
- Lima, G.V.S., Gonçalves, C.G., Pinto, A.S.O., Silva, E.M., Jesus Nazareno Silva de Souza, J.N.S., Rogez, H. (2024). Impact of post-harvest processing and roasting conditions on the physicochemical properties, phenolic compounds, and antioxidant capacity of cocoa beans from the Brazilian Amazon. *LWT*, 210, 116825. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116825>.
- Moretti, L.K., Ramos, K.K., Ávila, P.F., Goldbeck, R., Vieira, J.B., & Efraim, P. (2023). Influence of cocoa varieties on carbohydrate composition and enzymatic activity of cocoa pulp. *Food Research International*, 173, 113393. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113393>.
- Nascimento, M. B., Amorim, L. R., Nonato, M. A. S., Roselino, M. N., Santana, L. R. R., Ferreira, A.C.R., Rodrigues, F.M., Mesquita, P.R.R., & Soares, S.E. (2024a). Optimization of HS-SPME/GC-MS method for determining volatile organic compounds and sensory profile in cocoa honey from different cocoa varieties (*Theobroma cacao* L.). *Molecules*, 29(13), 3194. <https://doi.org/10.3390/molecules29133194>.
- Nascimento, M.B., Souza, T.L., Maia, D.L.S., Amorim, L.R., Ribeiro, A.S.L., Mamede, M.E.O., Maciel, L.F., Santos Júnior, A.F., Mesquita, P.R.R., & Soares, S.E. (2024b). Determination of mineral profile using MIP OES and physicochemical

composition of cocoa honey from different cocoa varieties (*Theobroma cacao* L.). *Food Analytical Methods*, 17, 1195-1207. <https://doi.org/10.1007/s12161-024-02640-7>.

[Oracz, J., Nebesny, E., & Żyżelewicz, D. \(2019\). Identification and quantification of free and bound phenolic compounds contained in the high-molecular weight melanoidin fractions derived from two different types of cocoa beans by UHPLC-DAD-ESI-HR-MSn. *Food Research International*, 115, 135-149. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.028>.](#)

Pagliari, S., Celano, R., Rastrelli, L., Sacco, E., Arlati, F., Labra, M., & Campone, L. (2022). Extraction of methylxanthines by pressurized hot water extraction from cocoa shell by-product as natural source of functional ingredient. *LWT*, 170, 114115. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114115>.

Paliyath, G., Tiwari, K., Sitbon, C., & Whitaker, B. D. (2012). Biochemistry of fruits. In B. K. Simpson (Ed.). *Food Biochemistry and Food Processing* (chap. 27, pp. 531–553). Chichester: Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781118308035.ch27>.

Peredo, A.V.G., Vázquez-Espinosa, M., Piñeiro, Z., Espada-Bellido, E., Ferreiro-González, M., Barbero, G.F., Palma, M. (2021). Development of a rapid and accurate UHPLC-PDA-FL method for the quantification of phenolic compounds in grapes. *Food Chemistry*, 334, 127569. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127569>.

Pérez-Jiménez, J., Neveu¹, V., Vos, F., & Scalbert, A. (2010). Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64, S112–S120. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2010.221>.

Prithviraj, T. (2024). Plant-derived glycosides in cancer treatment: diverse strategies for tumor suppression. *Natural Product Research*. <https://doi.org/10.1080/14786419.2024.2409974>.

Schymanski, E.L., Jeon, J., Gulde, E., Fenner, K., Ruff, M., Singer, H.P., & Hollender, J. (2014). Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry:

-
- Communicating Confidence. *Environmental Science Technology*, 48, 2097–2098.
<https://doi.org/doi.org/10.1021/es5002105>.
- Serra, W.S., & Sodré, G.A. (2021). Manual do cacauicultor: perguntas e respostas. Brasil, Ilhéus, BA, CEPLAC/CEPEC. Boletim Técnico nº 221 190. Retrieved from
https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/ceplac/publicacoes/boletins-tecnicos-bahia/boletim-tecnico-no-221-2021_compressed.pdf. Accessed October 1, 2024.
- Silva, G.S., Dala-Paula, B.M., Bispo, E.S., & Gloria, M.B.A. (2023). Bioaccessibility of bioactive amines in dark chocolates made with different proportions of under-fermented and fermented cocoa beans. *Food Chemistry*, 404, 134725.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134725>.
- Soares, T.F., & Oliveira, M.B.P.P. (2022). Cocoa By-Products: Characterization of Bioactive Compounds and Beneficial Health Effects. *Molecules*, 27(5), 1625.
<https://doi.org/10.3390/molecules27051625>.
- Tahiri, J., Mian, M., Aftan, F., Habbal, S., Salehi, F., Reddy, P.H., & Reddy, A.P. (2024). Serotonin in depression and Alzheimer's disease: Focus on SSRI's beneficial effects. *Ageing Research Reviews*, 101, 102537.
<https://doi.org/10.1016/j.arr.2024.102537>.
- Thompson M., Ellison, S.L.R., Wood, R. (2002). Harmonized Guidelines for Singlelaboratory Validation of Methods of Analysis. *Pure Appl. Chem*, 74 (5), 835–855.
- Vargas-Arana, G., Merino-Zegarra, C., Tang, M.,ertino, M. W., Simirgiotis, M. J. (2022). UHPLC–MS Characterization, and Antioxidant and Nutritional Analysis of Cocoa Waste Flours from the Peruvian Amazon. *Antioxidants*, 11, 595.
<https://doi.org/10.3390/antiox11030595>.
- Xu, L., Xu, Z., Wang, X., Wang, B., & Liao, X. (2020). The application of pseudotargeted metabolomics method for fruit juices discrimination. *Food Chemistry*, 316, 126278. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126278>.
- Zhang, J., Wang, J., Wang, Y., Chen, M., Shi, X., Zhou, X., & Zhang, Z. (2022). Phytochemistry and Antioxidant Activities of the Rhizome and Radix of *Milletia*

speciosa Based on UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS. *Molecules*, 27(21), 7398.
<https://doi.org/10.3390/molecules27217398>.

- Zhao, J., Wang, M., Avula, B., Ikhlas A., & Khan, I.A. (2018). Detection and quantification of phenethylamines in sports dietary supplements by NMR approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 151, 347-355.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.01.025>.
- Zhou, T., Guo, W., Ren, S., Li, Y., Wu, J., & Yang, B. (2021). Flavonoid glycosides and other bioactive compounds in Citrus reticulata ‘Chachi’ peel analysed by tandem mass spectrometry and their changes during storage. *Carbohydrate Research*, 510, 108462. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2021.108462>.
- Żyżelewicz, D., Budryn, G., Oracz, J., Antolak, H., Kręgiel, D., & Kaczmarska, M. (2018). The effect on bioactive components and characteristics of chocolate by functionalization with raw cocoa beans. *Food Research International*, 113, 234–244. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.017>.

Material Suplementar

**PERFIL QUÍMICO DE MEL DE CACAU (*Theobroma cacao* L.) DE
DIFERENTES VARIEDADES POR UHPLC-HRMS/MS E ANÁLISE
QUIMIOMÉTRICA**

1. Validação do método

A seletividade foi avaliada comparando cromatogramas obtidos de uma amostra de mel de cacau livre de analitos com aqueles da mesma amostra enriquecida com os analitos alvo em uma concentração final de 200 ng mL⁻¹. A linearidade foi determinada por meio do coeficiente de determinação (R²) e pelo teste de falta de ajuste no modelo linear por meio de ANOVA (p < 0,05). O efeito matriz (EM) foi avaliado como a razão entre as inclinações das curvas analíticas construídas a partir de amostras de mel de cacau livres de analitos e aquelas preparadas em água ultrapura (Slope_{matrix}/Slope_{water}). Valores de EM abaixo de 0,9 (indicando supressão) ou acima de 1,1 (indicando aumento de sinal) foram considerados evidências de um efeito de matriz significativo, conforme descrito por Torbati et al. (2019).

O LOD e o LOQ foram calculados usando os parâmetros da curva analítica, com as fórmulas (LOD = (Sb x 3)/a e LOQ = (Sb x 10)/a), onde "Sb" é o desvio padrão do coeficiente linear e "a" é a inclinação da curva analítica (Ribani et al., 2007).

A precisão foi avaliada por meio da repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi avaliada usando o desvio padrão relativo (RSD) de dez injeções (n = 10) de uma amostra de mel de cacau livre de analitos enriquecida com 400 ng mL⁻¹ dos analitos alvo. A precisão intermediária foi determinada a partir da DSR de dez injeções por dia durante três dias consecutivos, totalizando 30 injeções (n=30).

Devido à falta de materiais de referência padrão com concentrações certificadas de compostos fenólicos no mel de cacau, a veracidade foi avaliada por meio de testes de pico/recuperação em três níveis de concentração: 100, 400 e 600 ng mL⁻¹.

Tabela S1. Os parâmetros instrumentais dos compostos-alvo selecionados em mel de cacau por UHPLC-MS/MS.

Composto	Rt [min]	Polaridade	Precursor m/z	Íons do produto m/z	Energia de colisão (eV)
Ácido Gálico	2,480	-	169,0	125; 107	12; 20
Teobromina	4,243	+	181,0	163; 138	12; 16
Catequina	8,111	+	291,0	139; 123	15; 23
Cafeína	8,212	+	195,0	138; 110	19; 23
(E)-resveratrol	9,274	+	229,0	135; 107	12; 24

Tabela S2. Parâmetros de validação do procedimento analítico.

Compostos	Faixa linear	R ²	Regressão ($\pm$ erro padrão)	LOD	LOQ	Repeti. (n=10)*	Inter. (n=30)*	ME (Matriz de inclinação/SlopeWater)
Catequina	100 - 1000	0,9982	$y = 54,8_{(\pm 1,17)}x + 1654_{(\pm 710)}$	0,04	0,12	1,59	28,2	0,8
Cafeína	36,1 - 1000	0,9986	$y = 184,19_{(\pm 1,38)}x + 6757_{(\pm 666)}$	0,01	0,03	1,09	12,6	0,8
Ácido gálico	38,8 - 1000	0,9990	$y = 77,49x_{(\pm 0,59)} - 451_{(\pm 301)}$	0,01	0,04	1,20	15,2	1,2
(E)-resveratrol	151 - 1000	0,9955	$y = 3,7_{(\pm 0,1)}x - 4,9_{(\pm 55)}$	0,04	0,14	5,53	27,4	1,0
Teobromina	41,0 - 1000	0,9996	$y = 66,7_{(\pm 0,5)}x - 1388_{(\pm 273)}$	0,01	0,04	1,60	3,40	1,0

*Precisão expressa pela repetibilidade e precisão intermediária.

Tabela S3. Recuperações relativas (média $\pm$ RSD) para os analitos alvo. As amostras de mel de cacau foram enriquecidas em 100, 400 e 600 ng mL⁻¹.

Compostos	100 ng mL ⁻¹			400 ng mL ⁻¹			600 ng mL ⁻¹		
	Recuperação (%)			Recuperação (%)			Recuperação (%)		
Catequina	86,2	$\pm$	4,1	102	$\pm$	0,0	87,4	$\pm$	2,8
Cafeína	115	$\pm$	0,0	87,7	$\pm$	1,0	92,3	$\pm$	0,7
Ácido gálico	93,9	$\pm$	5,0	87,0	$\pm$	3,3	81,8	$\pm$	12,0
(E)-resveratrol	91,7	$\pm$	28,5	98,4	$\pm$	11,2	90,6	$\pm$	1,5
Teobromina	84,8	$\pm$	4,0	121	$\pm$	2,0	102	$\pm$	1,0

**MULTIVARIATE ANALYSIS TO EVALUATE THE STORAGE TIME OF
COCOA HONEY (*Theobroma cacao* L.) PROCESSED BY PASTEURIZATION
AND HIGH INTENSITY ULTRASOUND**

Manuela B. Nascimento^{a,b}; Bruno N. Paulino^a; Suzana B. Silva^a; Kathleen R. Deegan^{b,c}; Joseane C. G. Alencar^a; Adriana C. R. Ferreira^d; Frederico M. Rodrigues^b; Paulo R. R. Mesquita^{b,*}; Sergio E. Soares^a

^aFederal University of Bahia, Ondina Campus, School of Pharmacy, 40170-115 Salvador, Bahia, Brazil

^bAgricultural Technology Center of the State of Bahia, Secretariat of Agriculture, Livestock, Irrigation, Fisheries and Aquaculture of the Government of the State of Bahia (SEAGRI), Ondina, 40170-110 Salvador, Bahia, Brazil

^cFederal University of Bahia, Veterinary Medicine Hospital, 40170-110 Salvador, Bahia, Brazil

^dCocoa Innovation Center, Santa Cruz State University, Salobrinho, 45662-200, Ilhéus, Bahia, Brazil

<i>Periódico publicado:</i>	<i>Food Chemistry – ISSN 0308-8146</i>
<i>Maior percentil (Scopus):</i>	98%
<i>Ano:</i>	2025
<i>Doi:</i>	https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.143057

* Corresponding author: Agricultural Technology Center of the State of Bahia, Secretariat of Agriculture, Livestock, Irrigation, Fisheries and Aquaculture of the Government of the State of Bahia (SEAGRI), Ondina, 40170-110 Salvador, Bahia, Brazil. E-mail address: prmesquita@gmail.com

ABSTRACT

This study investigated the effects of thermal pasteurization, thermal pasteurization with additives, and high-intensity ultrasound techniques on the storage of cocoa honey (*Theobroma cacao* L.) over a 28-day period. Physicochemical analyses revealed significant differences among the treatments, with thermal pasteurization maintaining stability for up to 14 days, pasteurization with additives for up to 28 days, and ultrasound treatment for up to 21 days. All conservation methods effectively inhibited microbial growth throughout the 28 days. The compounds detected in the highest relative contents were 2-heptyl acetate and palmitic acid, with esters representing the predominant chemical class. The application of multivariate analysis tools provided a more efficient exploration of the VOC data, demonstrating that pasteurization with additives produced a more consistent compound profile throughout the storage period. These findings indicate that pasteurization with additives and ultrasound technology were the most effective methods for extending the shelf life of cocoa honey.

Keywords: Conservation; Thermal pasteurization; Ultrasonication; Volatile organic compounds; Chemometrics.

1. Introduction

Cocoa is derived from the *Theobroma cacao* L. tree, native to the tropical forests of the Americas. The most commercially significant varieties are Forastero, Criollo, and Trinitario. The Forastero variety is known for its robust flavors, while Criollo and Trinitario are considered finer and more aromatic. Currently, the major cocoa-producing regions are West Africa, South America, and Southeast Asia. Brazil ranks as the world's 6th largest producer, with the states of Bahia and Pará producing 139 thousand tons and 138 thousand tons, respectively, in 2023 (Moundanga et al., 2024; IBGE, 2024; Serra & Sodré, 2021).

Cocoa beans are commercially important for chocolate production, while cocoa shells, pulp, and cocoa honey are generally treated as by-products (Figueroa et al., 2020). Cocoa honey is an opaque yellow liquid obtained by pressing or decanting fresh cocoa beans. It shares characteristics with cocoa pulp, such as high acidity, with a pH ranging from 3.56 to 3.69, high total sugar content (11.62-16.03 g/100 g), moisture (69.44-71.21%), carbohydrates (29.0%), and energy value (113.58-120.53 kcal/100 mL), as well as low protein (0.38%), ash (0.26-0.49%), and no detectable lipids (Nascimento et al., 2024a).

Cocoa honey is currently marketed as frozen juice and is also used in the production of alcoholic beverages such as beer and wine, kombucha, jams, and as a sugar

substitute in chocolate and ice cream production (Guirlanda et al., 2021; Lannes et al., 2013). However, its shelf life is very short due to its high sugar content, which makes it highly susceptible to fermentation, limiting its domestic commercialization and export potential (Guirlanda et al., 2023).

In this context, to extend the shelf life of cocoa honey and enhance its commercial viability both domestically and internationally, the application of conservation methods is essential. Heat treatment is a widely employed technology for the microbiological and enzymatic inactivation of foods and beverages. Pasteurization is commonly used in fruit drinks to prolong their shelf life by inhibiting microbial growth. It is especially effective in products with a pH of 4.5 or lower, where acidic conditions naturally suppress pathogen proliferation. However, heat treatments can negatively affect the nutritional content and sensory properties of foods (Haase et al., 2023; Ramírez-Corona et al., 2024). To mitigate these effects, combining pasteurization with additives has emerged as a viable alternative, enhancing the efficacy of pasteurization. Common preservatives used in fruit juices include potassium sorbate, sodium benzoate, and potassium metabisulfite, among others (Zahan et al., 2024).

Additionally, the adoption of alternative conservation methods that maintain food quality is becoming increasingly essential. High-intensity ultrasound technology (US), which applies mechanical waves with frequencies between 20 kHz and 1 GHz, is considered an emerging non-thermal food processing technique. Most applications in the food industry utilize ultrasound frequencies ranging from 16 to 100 kHz. The equipment can operate with either direct or indirect contact with the food being treated, with probe-type systems providing direct contact and delivering more power than ultrasound baths due to the more pronounced effects of acoustic cavitation (Chávez-Martínez et al., 2020; Kumar et al., 2021).

The application of high-intensity ultrasound technology for the inactivation of bacteria and enzymes in model systems and liquid food products has been the subject of extensive investigation. Several factors can influence the inactivation of microorganisms, including temperature, energy density, frequency and amplitude of the ultrasound waves, exposure time, type of microorganism, and the volume and composition of the food being processed (Ganesan et al., 2015). Equipment capable of continuous industrial-scale processing of foods such as mayonnaise, ketchup, and fruit juice, with capacities ranging from 5 to 500 L min⁻¹, is already available (Patist & Bates, 2008). According to Soria and Villamiel (2010), ultrasound is considered an advantageous emerging technology, as it

facilitates the development of rapid processing methods with low energy consumption, while preserving the nutritional and sensory quality of various liquid foods, particularly dairy products and juices (Carrillo-Lopez et al., 2021; Lepaus et al., 2023).

Several factors can influence the physical and chemical characteristics of cocoa and, consequently, cocoa-based products (Moundanga et al., 2024). Volatile organic compounds (VOCs) play a crucial role in shaping consumer preferences, making them important targets for improvements aimed at enhancing the perception of food flavor (Klee & Tieman, 2018). Thus, multivariate analysis tools can be applied to assess the stability of VOCs over time.

Various exploratory statistical methods of multivariate analysis, such as principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA), are employed to effectively analyze and interpret chemical data. In the food industry, multivariate analysis plays a crucial role at multiple stages, from product development and production to quality assessment. Additionally, it facilitates the identification of patterns and correlations that may not be apparent through univariate analysis (Gomes et al., 2023; Svetič, Vrečer, & Korasa, 2024).

In our previous study, we evaluated the volatile organic compounds (VOCs) and sensory attributes of cocoa honey from different varieties, reporting distinct characteristics among them and providing important insights for future applications (Nascimento et al., 2024b). Recently, Haase et al. (2023) investigated the aromatic, physicochemical, microbiological, and sensory stability of heat-treated cocoa pulps during 24 weeks of storage at 4 °C and 23 °C. Their results indicated that ultra-high temperature (UHT) treatment followed by refrigerated storage was the most effective method for preserving cocoa pulp while inactivating microorganisms. However, studies focusing on the physical and chemical stability of cocoa honey remain underexplored in the literature.

Thus, the objective of the present study was to evaluate and compare, for the first time, the impact of conservation methods, including pasteurization, pasteurization with additives, and high-intensity ultrasound, on the physicochemical and microbiological properties, as well as the volatile profile, of cocoa honey over different storage periods using multivariate analysis tools.

2. Materials and methods

2.1. Standards and materials

Standard solutions of n-alkanes C₇–C₃₀, hexanal, 1-hexanol, 2-heptanone, benzaldehyde, 1-heptanol, octanal, D-limonene, trans- β -Ocimene, 1-octanol, linalool, nonanal, (*E*)-2-nonenal, 1-nonanol, decanal, undecanal, 1-dodecanol, dodecanoic acid, tetradecanoic acid, pentadecanoic acid, 1-hexadecanol, and palmític acid were acquired from Sigma–Aldrich, USA. All standards used in GC–MS analysis were a purity of $\geq$ 95.0%. Sodium hydroxide (PA grade, NEON), Potato Dextrose Agar and Plate Count Ágar were obtained from KASVI.

The SPME fiber used was of the type Divinylbenzene/Carboxen/Poly (dimethylsiloxane) (DVB/CAR/PDMS, 80 μ m) (Agilent Technologies, Califórnia, EUA, 5191-5874).

2.2 Obtaining cocoa honey

Cocoa honey was extracted from ripe fruits of the CCN51 variety, harvested in the city of Presidente Tancredo Neves (Bahia, Brazil; Latitude: 13° 27' 14" South; Longitude: 39° 25' 15" West), prior to the fermentation of the cocoa almond. The CCN51 variety, developed through the genetic improvement of Trinitário cocoa, is known for its increased resistance to witch's broom and is also regarded as an aromatic variety (Serra & Sodré, 2021).

The initial stage of the process involved sorting to identify fully ripe, high-quality fruits. To obtain cocoa honey, the raw almonds were placed in a manual stainless steel cold press. Following extraction, the cocoa honey was stored in polyethylene bottles and kept at -18°C ($\pm$ 0.5°C) until analysis commenced.

2.3 Evaluation of the efficiency of different conservation methods

In this study, 150 mL of cocoa honey was subjected to thermal pasteurization, thermal pasteurization with an additive, and ultrasonication over various storage periods (0, 1, 2, 3, 7, 14, 21, and 28 days) and stored in glass bottles sealed with hermetically sealed aluminum caps. The control sample was not exposed to any of these treatments.

2.3.1 Thermal pasteurization

The cocoa honey samples were pasteurized in glass bottles at 65°C for 30 minutes, following the parameters established by Gao et al. (2021), using a digital circulating water bath (Solab SL-154). After pasteurization, the samples were cooled in an ice bath and then stored at a controlled refrigeration temperature of 4 ± 2 °C until the analyses were conducted.

2.3.2 Thermal pasteurization with additive

The cocoa honey samples were pasteurized in glass bottles at 65°C for 30 minutes, in accordance with the parameters set by Gao et al. (2021), using a circulating water bath (Solab SL-154). After pasteurization, 1% (w/v) of potassium sorbate was added, adhering to the limit established by RDC N° 8 of Anvisa (Brazil, 2013), and the mixture was then homogenized and cooled in an ice bath. The samples were subsequently stored at a controlled refrigeration temperature of 4 ± 2 °C until analysis.

2.3.3 High-intensity ultrasound processing

The cocoa honey samples were subjected to ultrasonic treatment using a Sonics Vibra-Cell VC 505 for 10 minutes, operating at a frequency of 20 kHz and a maximum power of 500 W. The treatment utilized a 13 mm diameter probe in pulsed mode, with a pulse duration of 30 seconds and a cycle time of 1 minute (50% duty cycle), resulting in a total processing time of 20 minutes, based on the methodology adapted from Yıkmış et al. (2024). After treatment, the samples were cooled in an ice bath and stored in 250 mL glass bottles at a controlled refrigeration temperature of 4 ± 2 °C until analysis.

2.4 Physicochemical characterization

The pH of the cocoa honey samples was measured using a digital pH meter (Q-400A Quimis). Titratable acidity was assessed through the potentiometric method with a 0.1M sodium hydroxide solution, and the results were expressed as a percentage of citric acid (IAL, 2008). The total soluble solids content (TSS) and moisture were determined using refractometry.

2.4.1 Colorimetric analysis

The brightness values (L^* ; 100 = white and 0 = black), red (a^* ; + red and - green), yellow (b^* ; + yellow and - blue), chroma (C^* ; saturation or intensity of color), and the

hue angle (h° ; color tone) of the cocoa honey were measured in the Transmittance option using a Chroma Meter CR-5 Colorimeter (Konica Minolta Business Technologies Inc., Tokyo, Japan).

2.4.2 Sugar analysis

Reducing sugars, non-reducing sugars and total sugars were determined using the modified Lane and Eynon method (IAL, 2008). Analyzes were performed in triplicate.

2.5 Microbiological assays

Microbiological analyses were conducted to determine the presence of molds and yeasts, and mesophilic aerobic bacteria, following the methodology outlined by Silva et al. (2021), during storage periods of 0, 7, 14, and 28 days.

To evaluate mesophilic aerobic bacteria, 0.1 mL of each serial dilution was mixed with Plate Count Agar (PCA) and incubated at 35°C for 2 days. For the determination of molds and yeasts, 0.1 mL of each dilution was plated on Potato Dextrose Agar (PDA) and incubated at 25°C for 5 days. Colonies were then counted, and the results were expressed as CFU/mL. All analyses were conducted in triplicate.

2.6 HS-SPME method

The volatile organic compound profile was analyzed using HS-SPME-GC-MS method with a PAL RSI 85 autosampler at storage periods of 0, 1, 7, 14, 21, and 28 days. Headspace vials containing 10 mL of cocoa honey were incubated for 20 minutes at 85°C, after which an 80 μ m DVB/Car/PDMS fiber (Agilent Technologies, California, USA, 5191-5874) was exposed to the headspace for 78 minutes at the same temperature, with shaking at 171 rpm (Nascimento et al., 2024b). Subsequently, the fiber was directly inserted into the GC injector for 1 minute.

2.7 GC-MS analysis

VOCs were separated using GC-MS on a G3540A GC System gas chromatograph (Agilent Technologies, California, USA), equipped with a 5977B mass spectrometer detector (Agilent Technologies, California, USA) in splitless injection mode. Helium served as the carrier gas at a flow rate of 0.6 mL/min, and an HP-5MS column (5% phenylmethylpolysiloxane, 30.0 m x 0.25 mm I.D. x 0.25 μ m, Restek®, Bellefonte, USA)

was employed. The temperature program began at 30°C for 3 min, followed by a ramp to 50°C (1.5°C/min) for 3 min, then to 90°C (1.0°C/min) for 2 min, reaching 200°C (2.0°C/min) for 2 min, and finally up to 300°C (15.0°C/min) for 7 min, resulting in a total run time of 132 min. The injection and transfer lines were maintained at 250°C. Total ion current (70 eV) was recorded over a mass range of m/z 35 to 350 in scan mode. All analyses were conducted in triplicate.

Furthermore, compounds were identified by comparing the obtained retention times and mass spectra with those of pure analytical standards, when available. All mass spectra were also matched against the data system library (NIST 147 Database). Linear retention index (IRL) values were determined using a homologous series of C₇–C₃₀ n-alkanes, and the results were compared with values reported in the literature for similar chromatographic columns.

2.8 Multivariate data analysis and statistical analysis

The data representing the areas of the identified peaks were subjected to principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA), with pretreatment using autoscaling (Gomes et al., 2023). For the PCA and HCA analyses, along with the heat map visualization, the MetaboAnalyst 6.0 and Origin 2024b software programs were utilized.

Statistical analysis of the results from the physicochemical analyses was presented as mean $\pm$ standard deviation using XLStat version 7.8. Analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test was conducted to identify statistically significant differences between the means ($p < 0.05$).

The results of the microbiological analyses were tabulated using Excel and analyzed with R software version 4.4.1. To assess the distribution of numerical data, the Shapiro-Wilk normality test was conducted. Descriptive statistics for the numerical variables were expressed as median $\pm$ interquartile range (IQR). The Kruskal-Wallis test, followed by the Dunn-Bonferroni post-hoc test, was performed to compare the absolute counts of microorganisms among the treatments applied for the preservation of cocoa honey.

To enhance the visualization of data distribution in the boxplot graph, the microorganism counts were categorized as follows: category 1 for the interval $[0, 10^2]$, category 2 for $[10^2, 10^3]$, category 3 for $[10^3, 10^4]$, category 4 for $[10^4, 10^5]$, and category 5 for $[10^5, +\infty]$. All statistical tests were conducted using a significance level of 95%.

3 Results and discussion

3.1 Effects of conservation methods on the physicochemical characterization of cocoa honey

Table 1 presents the physicochemical characteristics of cocoa honey following treatment with various processing techniques. The pH values of the control, thermal pasteurization, and ultrasound-treated samples were statistically significant; generally, the pH decreased while acidity tended to increase over time. In the control group, the pH ranged from 3.43 to 3.77, and acidity ranged from 1.02 to 1.17% (as citric acid). These values are similar to those reported in the literature for fresh cocoa honey of the CCN51 variety, which showed a pH of 3.59 and acidity of 0.99% (as citric acid) (Nascimento et al., 2024a). For the thermal pasteurization samples, pH values ranged from 3.48 to 3.68, with acidity from 1.01 to 1.24% (as citric acid). In the ultrasound treatment, pH and acidity ranged from 3.31 to 3.59 and from 1.09 to 1.22% (as citric acid), respectively. Hinneh et al. (2018) reported an increase in acidity during the storage period of 0 to 7 days in a sample of cocoa pulp. However, in the thermal pasteurization with additives, the data indicated minimal variation in acidity and only slight fluctuations in pH (3.42 to 3.69) over the shelf life, suggesting greater stability. Similarly, Haase et al. (2023) observed variations in pH in cocoa pulp following thermal pasteurization and UHT processing.

Regarding the total soluble solids content (TSS, measured in °Brix), the results indicated that the application of thermal pasteurization methods (17.07 to 19.47 °Brix), thermal pasteurization with additives (18.00 to 19.30 °Brix), and ultrasound treatment (18.57 to 20.77 °Brix) resulted in an increase in this parameter during storage compared to the control group samples (15.20 to 19.03 °Brix). These values align with a previously reported study indicating a TSS of 17.0 °Brix for cocoa pulp without thermal processing (Nunes et al., 2020). A similar trend was observed by Kesavan-Adoração et al. (2023) after subjecting kutkura (*Meyna spinosa*) juice by thermosonication. Additionally, Khalil et al. (2023) noted that the application of ultrasound technology, as well as thermal pasteurization, significantly contributed to the increase in TSS in the carrot-orange juice blend compared to the control samples. This can be explained by the fact that sound waves can damage the tissues and cell walls of the fruit. This rupture allows water to penetrate the cells, resulting in the solubilization of a greater amount of soluble solids.

The TSS/acidity ratio is a crucial factor that influences the flavor and aroma of fruit juices and serves as one of the primary analytical measures of their quality (Hussain et al., 2023). Furthermore, the data from this study indicated that gamma irradiation processing resulted in an increase in both TSS and acidity of plum juice after the first 20 days of storage at 3 ± 1 °C. Similarly, Habibi et al. (2024) reported significant increases in TSS and acidity in blood orange juice over a 60-day storage period at various temperatures (6, 8, 10, and 12 °C).

Sugars are carbohydrates that can be classified into reducing and non-reducing categories. Reducing sugars, which include monosaccharides such as glucose and fructose, are the primary sugars utilized in alcoholic fermentation, while non-reducing sugars encompass disaccharides such as sucrose, lactose, and maltose (Chen et al., 2021; Villiers et al., 2012). In this study, a significant difference was observed among the treatments in the analysis of reducing, non-reducing, and total sugars. In the control group, the sugar levels increased, exhibiting a slight decrease on days 7, 14, and 21, before rising again on day 28. Correspondingly, acidity levels also increased on these days, suggesting the onset of a fermentation process. Sugars are critical in fermentation, serving as the primary carbon source for microorganisms such as yeast. During fermentation, these sugars are converted into ethanol and carbon dioxide. Additionally, the presence of sugars can influence the formation of secondary products, such as acetic acid and other compounds that affect the flavor and characteristics of the final product (Villiers et al., 2012). Nascimento et al. (2024a), in their study of the fresh CCN51 variety, reported similar results for reducing sugars (7.55 g/100 g), non-reducing sugars (8.48 g/100 g), and total sugars (16.03 g/100 g).

In samples treated with thermal pasteurization, total sugars remained relatively constant in the initial days, with a slight decline observed between days 21 and 28. Conversely, in the samples subjected to thermal pasteurization with additives, all sugar values tended to increase. Hinnah et al. (2018) also reported an increase in sugars during the storage period from 0 to 3 days in their study of cocoa pulp. Similarly, Habibi et al. (2024) found that reducing sugars increased after 20 days of storage in blood orange juice; however, the initial increases were less pronounced by the end of the storage period.

In the ultrasound-assisted processing, the results indicated that the reducing sugar content remained constant until the fourteenth day, with values close to 6.8 g/100 g. Between the 21st and 28th days, an increasing trend in reducing sugar content was observed, culminating in a level of approximately 8.6 g/100 g. This increase can be

attributed to events related to microbial dynamics, particularly the hydrolysis of non-reducing disaccharides such as sucrose and oligosaccharides present in the sample, leading to an increase in reducing monosaccharides. This hypothesis is supported by the results for non-reducing sugar content, which remained stable during the first three days of storage, with levels near 10.7 g/100 g. However, from that point onward, a statistically significant decline was noted, with concentrations stabilizing around 9.5 g/100 g until the final day of storage.

Cocoa pulp processing may involve heat treatments that can lead to non-enzymatic browning reactions, depending on the product. The likelihood of chemical phenomena, such as the Maillard reaction, increases with the concentration of reducing sugars present (Huang & Barringer, 2010; Moretti et al., 2023). Furthermore, it is essential to emphasize that factors such as harvest time, soil type, cocoa variety, and fruit ripeness can significantly influence the chemical composition of cocoa, including its sugar content (Afoakwa, 2014; Sulaiman et al., 2017).

Overall, the results presented in Table 1 indicate that cocoa honey samples subjected to various treatments (thermal and non-thermal) exhibited an increased shelf life compared to the control samples. Specifically, the samples subjected to thermal pasteurization remained stable for up to 14 days, while those treated with sonication maintained stability until day 21 of storage. In contrast, the samples subjected to thermal pasteurization with additives demonstrated stability throughout the entire storage period. These findings suggest that both thermal treatments and ultrasound processing effectively extended the shelf life of cocoa honey during refrigerated storage at 4 ± 2 °C, whereas the control group remained stable for only 7 days.

Consequently, the results indicate that high-intensity ultrasound technology may serve as an effective alternative to thermal pasteurization, as it extends the shelf life of cocoa honey by up to 21 days with a shorter processing time. Additionally, compared to thermal pasteurization with additives, ultrasound technology appears promising, particularly considering the growing consumer demand for foods with minimal or no chemical additives. Furthermore, considering the total processing time and the costs associated with the use of additives, high-intensity ultrasound processing may be more economical than both thermal processing with and without additives.

1 **Table 1.** Physicochemical characterization of cocoa honey (*Theobroma cacao* L.) after conservation methods and different storage periods.

T0 (Control)						
Period (day)	pH	Acidity (% citric acid)	Total soluble solids (°Brix)	Reducing sugars (g/100 g)	Non-reducing sugars (g/100 g)	Total sugars (g/100 g)
0	3.77±0.01 ^a	1.04±0.01 ^d	15.20±0.00 ^g	5.65±0.02 ^e	9.03±0.04 ^{bc}	14.68±0.03 ^d
1	3.50±0.00 ^b	1.02±0.00 ^d	15.20±0.00 ^g	6.36±0.02 ^d	8.31±0.50 ^{cd}	14.66±0.53 ^d
2	3.57±0.02 ^c	1.10±0.00 ^c	15.80±0.00 ^f	7.04±0.03 ^c	8.63±0.13 ^{bcd}	15.67±0.10 ^c
3	3.55±0.00 ^c	1.17±0.00 ^a	17.20±0.00 ^e	7.68±0.19 ^b	9.85±0.27 ^a	17.53±0.08 ^a
7	3.45±0.01 ^d	1.15±0.00 ^b	17.55±0.07 ^d	7.54±0.17 ^b	9.29±0.04 ^{ab}	16.83±0.19 ^b
14	3.44±0.00 ^d	1.11±0.00 ^c	17.90±0.17 ^c	6.97±0.06 ^c	8.00±0.43 ^d	14.98±0.37 ^{cd}
21	3.42±0.00 ^d	1.17±0.01 ^a	18.40±0.17 ^b	7.68±0.11 ^b	7.06±0.21 ^e	14.73±0.11 ^d
28	3.43±0.02 ^d	1.17±0.01 ^a	19.03±0.06 ^a	8.56±0.07 ^a	8.58±0.09 ^{bcd}	17.14±0.03 ^{ab}
T1 (Pasteurization)						
Period (day)	pH	Acidity (% citric acid)	Total soluble solids (°Brix)	Reducing sugars (g/100 g)	Non-reducing sugars (g/100 g)	Total sugars (g/100 g)
0	3.62±0.02 ^c	1.01±0.01 ^c	17.23±0.25 ^b	7.01±0.08 ^{ab}	8.33±0.17 ^{abc}	15.34±0.24 ^b
1	3.50±0.00 ^f	1.12±0.04 ^{abc}	17.07±0.12 ^b	6.70±0.44 ^b	8.97±0.35 ^a	15.66±0.77 ^{ab}
2	3.51±0.00 ^f	1.09±0.01 ^{bc}	17.20±0.00 ^b	7.30±0.05 ^{ab}	8.32±0.55 ^{abc}	15.62±0.60 ^{ab}

3	3.56±0.01 ^d	1.15±0.03 ^{abc}	17.50±0.00 ^b	7.53±0.12 ^a	7.92±0.10 ^{bc}	15.45±0.22 ^b
7	3.53±0.01 ^e	1.15±0.01 ^{abc}	17.20±0.00 ^b	7.34±0.03 ^{ab}	8.71±0.16 ^{ab}	16.05±0.19 ^{ab}
14	3.68±0.01 ^b	1.16±0.01 ^{ab}	17.03±0.12 ^b	7.71±0.14 ^a	8.84±0.03 ^a	16.55±0.17 ^a
21	3.48±0.01 ^f	1.14±0.04 ^{abc}	19.17±0.65 ^a	7.55±0.49 ^a	7.83±0.44 ^c	15.39±0.05 ^b
28	3.49±0.02 ^f	1.24±0.14 ^a	19.47±0.58 ^a	7.48±0.22 ^a	8.19±0.21 ^{abc}	15.67±0.08 ^{ab}

T2 (Pasteurization with additive)

Period (day)	pH	Acidity (% citric acid)	Total soluble solids (°Brix)	Reducing sugars (g/100 g)	Non-reducing sugars (g/100 g)	Total sugars (g/100 g)
0	3.42±0.02 ^d	1.10±0.02 ^a	18.70±0.20 ^{ab}	6.35±0.05 ^c	9.65±0.12 ^{bc}	15.99±0.12 ^c
1	3.42±0.04 ^{cd}	1.09±0.05 ^a	18.87±0.12 ^{ab}	6.72±0.02 ^b	9.48±0.02 ^c	16.20±0.01 ^c
2	3.49±0.04 ^{bc}	1.09±0.04 ^a	19.10±0.70 ^a	6.97±0.13 ^{ab}	9.93±0.13 ^{abc}	16.89±0.01 ^b
3	3.48±0.02 ^{bcd}	1.10±0.02 ^a	18.87±0.23 ^{ab}	7.16±0.05 ^a	10.09±0.03 ^{ab}	17.24±0.08 ^{ab}
7	3.47±0.02 ^{bcd}	1.11±0.02 ^a	18.00±0.00 ^b	7.06±0.09 ^a	10.28±0.09 ^a	17.34±0.05 ^a
14	3.44±0.01 ^{cd}	1.09±0.03 ^a	19.23±0.40 ^a	6.86±0.26 ^{ab}	10.27±0.25 ^a	17.13±0.04 ^{ab}
21	3.69±0.01 ^a	1.17±0.05 ^a	19.30±0.00 ^a	7.19±0.07 ^a	10.28±0.16 ^a	17.47±0.15 ^a
28	3.53±0.03 ^b	1.09±0.03 ^a	19.30±0.00 ^a	7.17±0.08 ^a	10.15±0.28 ^a	17.32±0.28 ^a

T3 (Ultrasound)

Period (day)	pH	Acidity (% citric acid)	Total soluble solids (°Brix)	Reducing sugars (g/100 g)	Non-reducing sugars (g/100 g)	Total sugars (g/100 g)
0	3.57±0.03 ^c	1.16±0.00 ^{ab}	19.79±0.12 ^{ab}	6.86±0.03 ^{cd}	10.86±0.10 ^a	17.72±0.12 ^{ab}

1	3.59±0.02 ^c	1.21±0.02 ^a	19.17±0.75 ^{ab}	6.46±0.10 ^d	10.61±0.09 ^a	17.07±0.07 ^{bc}
2	3.31±0.03 ^f	1.21±0.00 ^{ab}	18.73±0.15 ^b	6.70±0.04 ^{cd}	10.85±0.14 ^a	17.54±0.17 ^{abc}
3	3.41±0.02 ^{de}	1.09±0.02 ^{bc}	18.78±0.03 ^b	6.72±0.02 ^{cd}	10.73±0.27 ^a	17.45±0.30 ^{abc}
7	3.44±0.01 ^d	1.15±0.01 ^{abc}	18.57±0.42 ^b	6.92±0.02 ^c	9.69±0.08 ^b	16.57±0.08 ^c
14	3.40±0.01 ^{de}	1.10±0.07 ^{bc}	18.80±0.90 ^b	6.83±0.09 ^{cd}	8.35±0.79 ^d	15.17±0.79 ^d
21	3.41±0.01 ^{de}	1.17±0.07 ^{ab}	19.17±0.76 ^{ab}	8.15±0.27 ^b	8.72±0.13 ^{cd}	16.88±0.33 ^{bc}
28	3.38±0.02 ^e	1.22±0.08 ^a	20.77±0.96 ^a	8.59±0.28 ^a	9.54±0.13 ^{bc}	18.13±0.41 ^a

2 Means followed by the same letter in the column do not differ from each other (Tukey test; $p < 0.05$). The data is shown as mean $\pm$ SD ($n=3$).

3.1.1 Colorimetric Analysis

The values of L^* , a^* , b^* , C^* , and h° were determined for fresh and heat-treated cocoa honey samples of the CCN51 variety (Table 2). Overall, the results indicate that the samples are relatively light, as evidenced by L^* values approaching 100. All a^* values were negative, while b^* values were positive but low, suggesting a tendency towards a greenish hue. A similar finding was reported by Nascimento et al. (2024a) in fresh cocoa honey of the CCN51 variety.

Table 2. Colorimetric analysis of cocoa honey in different conservation methods and storage periods.

T0 (Control)					
Period (day)	L^*	a^*	b^*	C^*	h°
0	99.203±0.31 ^{abc}	-0.293±0.01 ^{ab}	6.537±0.01 ^{de}	6.547±0.01 ^{de}	92.567±0.10 ^{bcd}
1	98.770±0.15 ^{bc}	-0.290±0.00 ^{ab}	6.573±0.01 ^{de}	6.583±0.01 ^{de}	92.530±0.02 ^{bcd}
2	99.610±0.60 ^a	-0.387±0.08 ^c	6.083±0.42 ^e	6.097±0.01 ^e	93.687±0.99 ^a
3	99.143±0.13 ^{abc}	-0.393±0.01 ^c	7.233±0.01 ^{bcd}	7.243±0.01 ^{bcd}	93.127±0.01 ^{ab}
7	98.553±0.02 ^c	-0.230±0.00 ^{ab}	8.257±0.01 ^a	8.260±0.01 ^a	91.600±0.02 ^{cd}
14	99.467±0.01 ^{ab}	-0.320±0.01 ^{bc}	6.840±0.01 ^{cde}	6.850±0.01 ^{cde}	92.683±0.05 ^{abc}
21	99.593±0.13 ^a	-0.267±0.02 ^{ab}	7.437±0.14 ^{bc}	7.437±0.14 ^{bc}	91.647±0.27 ^{cd}
28	99.360±0.35 ^{ab}	-0.213±0.03 ^a	7.937±0.69 ^{ab}	7.940±0.69 ^{ab}	91.580±0.35 ^d
T1 (Pasteurization)					
Period (day)	L^*	a^*	b^*	C^*	h°
0	98.703±0.48 ^b	-0.183±0.03 ^{bc}	7.290±0.16 ^{de}	7.293±0.16 ^{de}	91.437±0.21 ^{bc}
1	98.780±0.10 ^b	-0.203±0.01 ^c	7.783±0.27 ^{bcd}	7.787±0.27 ^{bcd}	91.500±0.08 ^b
2	98.137±0.78 ^b	-0.113±0.01 ^{ab}	7.520±0.22 ^{cd}	7.520±0.22 ^{cd}	90.873±0.05 ^d
3	98.353±0.27 ^b	-0.120±0.04 ^{ab}	8.240±0.11 ^{ab}	8.240±0.11 ^{ab}	90.830±0.31 ^{de}
7	98.093±0.20 ^b	-0.047±0.04 ^a	8.337±0.19 ^a	8.337±0.19 ^a	90.317±0.27 ^e
14	98.640±0.00 ^b	-0.140±0.01 ^{bc}	7.817±0.01 ^{bc}	7.817±0.01 ^{bc}	91.017±0.05 ^{bcd}
21	98.660±0.11 ^b	-0.133±0.03 ^{bc}	7.963±0.24 ^{abc}	7.963±0.24 ^{abc}	90.953±0.20 ^{cd}
28	100.016±0.27 ^a	-0.423±0.01 ^d	6.967±0.03 ^e	6.977±0.03 ^e	93.480±0.03 ^a

T2 (Pasteurization with additive)

Period (day)	L*	a*	b*	C*	h°
0	99.760±1.07 ^a	-0.160±0.12 ^{bc}	7.933±0.44 ^{bcd}	7.933±0.44 ^{bcd}	91.197±0.96 ^{ab}
1	99.807±0.70 ^a	-0.323±0.11 ^c	7.037±0.66 ^d	7.043±0.65 ^d	92.710±1.16 ^a
2	99.617±0.22 ^a	-0.317±0.07 ^c	7.657±0.14 ^{cd}	7.667±0.14 ^{cd}	92.350±0.54 ^a
3	99.580±0.59 ^a	-0.340±0.07 ^c	7.420±0.62 ^{cd}	7.427±0.61 ^{cd}	92.653±0.78 ^a
7	99.440±0.15 ^a	-0.277±0.05 ^c	7.920±0.27 ^{bcd}	7.930±0.27 ^{bcd}	92.007±0.44 ^a
14	98.730±0.48 ^{ab}	-0.180±0.06 ^{bc}	8.420±0.27 ^{abc}	8.427±0.27 ^{abc}	91.237±0.44 ^{ab}
21	96.097±0.30 ^c	0.233±0.07 ^a	9.237±0.10 ^a	9.240±0.10 ^a	88.577±0.47 ^c
28	97.137±0.48 ^{bc}	0.023±0.09 ^{ab}	8.777±0.20 ^{ab}	8.777±0.20 ^{ab}	89.863±0.55 ^{bc}

T3 (Ultrasound)

Period (day)	L*	a*	b*	C*	h°
0	97.710±0.15 ^{ab}	-0.440±0.01 ^d	7.470±0.04 ^b	7.480±0.04 ^b	93.370±0.11 ^a
1	97.580±0.22 ^{ab}	-0.287±0.07 ^{bcd}	8.270±0.36 ^b	8.280±0.36 ^b	92.007±0.52 ^{ab}
2	97.990±0.20 ^a	-0.183±0.09 ^{bc}	8.363±0.90 ^b	8.363±0.90 ^b	91.307±0.76 ^b
3	97.540±0.07 ^{ab}	-0.413±0.01 ^{cd}	7.883±0.05 ^b	7.893±0.05 ^b	93.013±0.01 ^a
7	97.107±0.15 ^b	-0.313±0.06 ^{bcd}	7.907±0.18 ^b	7.913±0.18 ^b	92.267±0.43 ^{ab}
14	96.977±0.19 ^b	-0.163±0.12 ^b	7.207±0.70 ^b	7.210±0.71 ^b	91.253±0.88 ^b
21	97.387±0.05 ^{ab}	-0.310±0.06 ^{bcd}	7.560±0.18 ^b	7.563±0.18 ^b	92.343±0.44 ^{ab}
28	96.853±0.76 ^b	0.230±0.15 ^a	10.560±0.05 ^a	10.563±0.05 ^a	88.737±0.83 ^c

Means followed by the same letter in the column do not differ from each other (Tukey test; $p < 0.05$). The data is shown as mean $\pm$ SD ($n=3$).

No significant variations in color coordinates were observed in the samples processed solely with thermal pasteurization, with only minor changes noted over the storage period. In samples treated with pasteurization and additives, the combined analysis of the h° , a^* , and b^* coordinates indicates that the samples exhibited a slight greenish hue during the first fourteen days of storage, followed by the development of a darker color after this period.

The results indicated that the cocoa honey samples subjected to high-intensity ultrasound treatment maintained a consistent color throughout the storage period. However, analysis of the a^* , C^* , and h° coordinates revealed a notable darkening of the cocoa honey

sample by day 28. This change can be attributed to non-enzymatic reactions, such as Maillard reactions and oxidative degradation of ascorbic acid, both of which are influenced by the presence of reducing sugars and vitamin C in cocoa honey. The literature also reports a decrease in the L^* value of cocoa pulp samples that underwent heat treatment via pasteurization and UHT processing over time, indicating an overall darkening of the samples (Haase et al., 2023).

Regarding the color parameters, both pasteurization and ultrasound treatments were more effective in preserving the color stability of cocoa honey samples for up to 21 days of storage. In comparison, pasteurization with additives maintained color stability for a shorter duration, effectively preserving it for up to 14 days.

Principal component analysis (PCA) was performed on the physicochemical and colorimetric data (Tables 1 and 2) to explore potential patterns and variability among the different conservation techniques applied to the cocoa honey samples. However, the PCA plot (Fig. S1) indicated that the physicochemical and colorimetric parameters data were insufficient to distinguish between samples subjected to the various conservation methods.

3.2 Effects of conservation methods on the microbiological characterization of cocoa honey

To assess the impact of different processing methods on the microbiological stability of cocoa honey samples, quantitative analyses of molds, yeasts, and mesophilic aerobic bacteria were conducted on storage days 0, 7, 14, and 28. The results are presented as median values along with the interquartile range (Table 3).

Table 3. Medians and interquartile range of colony counts of aerobic mesophilic bacteria and molds and yeasts in cocoa honey (*Theobroma cacao* L.), under different conservation methods and storage periods.

Treatments	Molds and yeasts (CFU/mL)			
	Median±IQR			
	0 day	7 day	14 day	28 day
Control ^a	11x10 ² ±6.00	13x10 ² ±7.00	30.0x10 ⁴ ±1.05	75x10 ⁴ ±69.0
Pasteurization ^b	ND	ND	ND	ND
Pasteurization with additive ^b	ND	ND	ND	ND
Ultrasound ^b	ND	ND	ND	ND
Treatments	Mesophilic aerobes (CFU/mL)			
	Median±IQR			
	0 day	7 day	14 day	28 day
Control ^a	1.0x10 ² ±0	11x10 ² ±3.5	7.3x10 ⁴ ±0.2	99.0x10 ⁴ ±77.5
Pasteurization ^b	1.0x10 ² ±0	1.0x10 ² ±1.0	ND	1.0x10 ² ±0.05
Pasteurization with additive ^{ab}	4.0x10 ² ±1.5	1x10 ² ±1.0	1.0x10 ² ±1.0	1.0x10 ² ±1.0

Ultrasound^b

ND

ND

 $1.0 \times 10^2 \pm 0.05$ $1.0 \times 10^2 \pm 0.05$

The same letter in the treatment's column do not differ from each other (Kruskal-Wallis test, followed by post-hoc Dunn-Bonferroni test; $p < 0.05$). ND means not detected. The data is shown as mean $\pm$ SD ($n=3$).

The boxplots in Fig. 1 depict illustrate the distribution of microorganism counts across the different treatments, with molds and yeasts shown in Fig. 1A and aerobic mesophilic bacteria in Fig. 1B. All preservation methods demonstrated significant inhibitory effects on the growth of molds and yeasts compared to the control group, as confirmed by the Kruskal-Wallis test followed by the Dunn-Bonferroni post-hoc analysis (Table 3, Fig. 1A). The Kruskal-Wallis test is a non-parametric alternative to one-way ANOVA (analysis of variance). It is used to compare the medians of three or more independent groups and determine whether significant differences exist among them. In summary, the Kruskal-Wallis test identifies whether there is any significant difference among the group distributions, while the Dunn-Bonferroni post-hoc test specifies which groups exhibit significant differences.

In terms of controlling the growth of aerobic mesophilic bacteria (Table 3, Fig. 1B), significant differences were observed between the control and the treatments involving thermal pasteurization and ultrasound. However, no significant difference was detected between the control group and the thermal pasteurization treatment with additives. Additionally, for both molds and yeasts and mesophilic aerobic bacteria counts, no significant differences were found among the treatments of thermal pasteurization, thermal pasteurization with additives, and ultrasound (Table 3, Fig. 1).

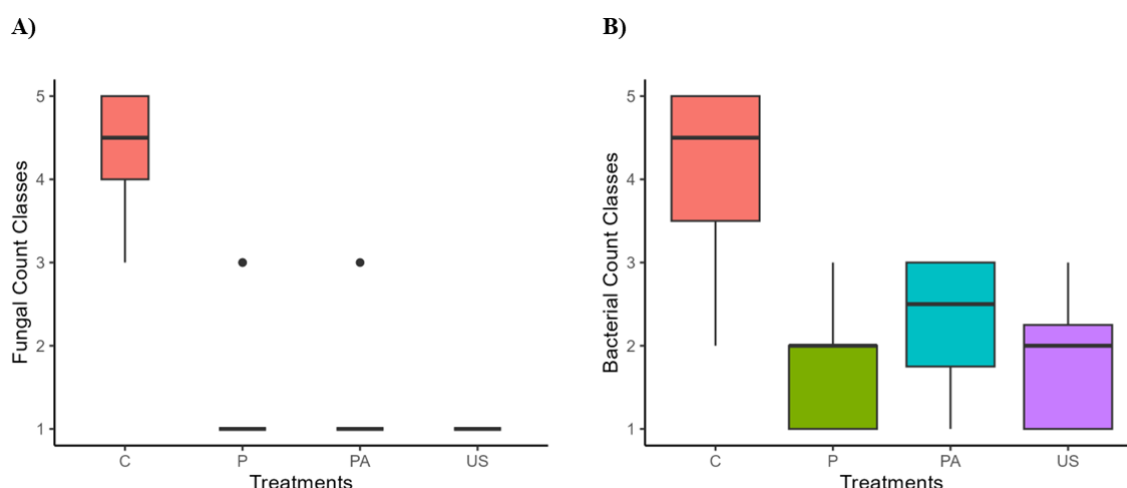


Fig 1. Boxplot of nonparametric measures for analysis of molds and yeasts (A) and mesophilic aerobic bacteria (B) in cocoa honey samples after conservation methods. Control (C); Pasteurization (P); Pasteurization with additive (PA); Ultrasound (US).

As presented in Table 3, the control group displayed mold and yeast counts near 10^2 CFU/mL during the seven days of storage. However, from the fourteenth day onward, the counts surpassed 10^4 CFU/mL. A similar trend was observed for mesophilic aerobic bacteria in the control group, with a significant rise in microbial counts beginning on day 14 and culminating in a pronounced increase by day 28. This marked microbial proliferation renders the unprocessed cocoa honey sample unsuitable for consumption.

These findings align with the results of the physicochemical analyses, indicating that cocoa honey samples in the control group experienced increased microbial activity, likely driven by fermentation and the hydrolysis of oligosaccharides and higher sugars. This process led to a reduction in pH and an increase in acidity, total soluble solids, and reducing sugar content (Table 1, T0). As a result, untreated cocoa honey provides favorable conditions for the proliferation of yeasts and other microorganisms due to its high sugar content, which serves as a primary substrate for microbial growth (Kadow, 2020).

The application of thermal pasteurization, thermal pasteurization with additives, and high-intensity ultrasound technology for processing cocoa honey samples demonstrated effectiveness in maintaining microbiological safety. Microbial counts for all treatments remained below the legally established limits ($<10^4$ CFU/mL) for the microorganisms analyzed throughout 28 days of storage (Brazil, 2022). The microbiological stability observed in samples treated with thermal and non-thermal methods can be attributed to their direct deleterious effects on microbial cells, resulting in inactivation.

Furthermore, the inhibition of microbial growth can also be attributed to the naturally low pH of cocoa pulp, which likely acted as an additional barrier to microbial proliferation (Doyle & Buchanan, 2013). Supporting this, Haase et al. (2023) recently demonstrated that pasteurization and ultra-high temperature (UHT) treatments effectively inhibited the growth of aerobic mesophilic bacteria, molds, and yeasts in cocoa pulp juice stored for 24 weeks at both 4°C and 23°C. In contrast, Firdaus et al. (2022) produced cocoa pulp syrups using various types of sugar from West Sumatra without applying heat treatment for preservation. Microbiological analyses revealed that syrups stored at 5°C were safe for consumption only within the first five days. These findings emphasize the critical role of conservation techniques in extending the shelf life of cocoa honey and mitigating potential health risks for consumers.

The conservation methods evaluated in this study demonstrated significant efficacy in controlling microbial growth and effectively extending the shelf life of cocoa honey. Throughout the storage period, no significant differences in microbial counts were observed

between the samples treated with thermal pasteurization and those processed using high-intensity ultrasound, highlighting the viability of both approaches for cocoa honey conservation. However, considering the advantages of reduced processing times and superior maintenance of physicochemical properties, ultrasound treatment emerges as the most advantageous method for preserving cocoa honey.

It is essential to emphasize the importance of detecting microorganisms, such as molds and yeasts, to ensure food safety and confirm the absence of pathogens. The analysis of mesophilic aerobic bacteria serves as a key indicator of raw material quality and provides valuable insights into the processing, handling, and storage conditions. This analysis enables a more accurate assessment of the product's shelf life (Gourama & Funciona, 2024; Sant'ana et al., 2002).

3.3 Evaluation of VOCs after applying conservation methods and different storage periods

The volatile profile of cocoa honey samples subjected to thermal pasteurization, thermal pasteurization with additives, and high-intensity ultrasound was evaluated to identify the volatile organic compounds (VOCs) associated with the storage period of 28 days. Notable differences were observed in the number of volatile compounds detected across each preservation method. A total of 119 volatile compounds were identified, with 21 confirmed using standards (Table S1). Specifically, 102 compounds were detected in the control group, 88 in the pasteurization group, 71 in the pasteurization with additive group, and 82 in the ultrasound group. The detected compounds included various chemical classes, such as acids (10), alcohols (19), aldehydes (21), esters (12), ketones (11), furans (5), monoterpenes (16), sesquiterpenes (16), and others (9). In a previous study, 63 volatile compounds were identified in unprocessed cocoa honey of the CCN51 variety (Nascimento et al., 2024b).

Fig. 2 shows the abundance of acids during the storage period for the pasteurization, pasteurization with additives, and ultrasound treatments, as well as in the control samples. Notably, the alcohol content exhibited a significant increase starting at 14 days post-pasteurization. Alcohols and acids are primarily produced during the fermentation of cocoa beans, and their concentrations typically decrease following drying and roasting processes (Calva-Estrada et al., 2020). This trend suggests that the cocoa honey samples may have experienced some degree of fermentation on days 14, 21, and 28, despite the application of preservation methods. Furthermore, the results indicate that thermal pasteurization (Fig. 2C)

was the most effective method for maintaining ester content compared to the control (Fig. 2A), proving to be more efficient than the other preservation approaches employed. A marked reduction in ester-type aroma compounds was observed during storage for samples subjected to ultrasonic processing (Fig. 2B) and thermal pasteurization with additives (Fig. 2D).

An interesting correlation is observed in the reduction of ester content, which may be attributed to the increased hydrolysis of these compounds into their respective acids and alcohols. This is evident from the rising profiles of the acid (brown) and alcohol (blue) volatile groups across all treatments. Ester hydrolysis may result from heightened microbial activity and contributes to the observed decrease in pH in the cocoa honey samples.

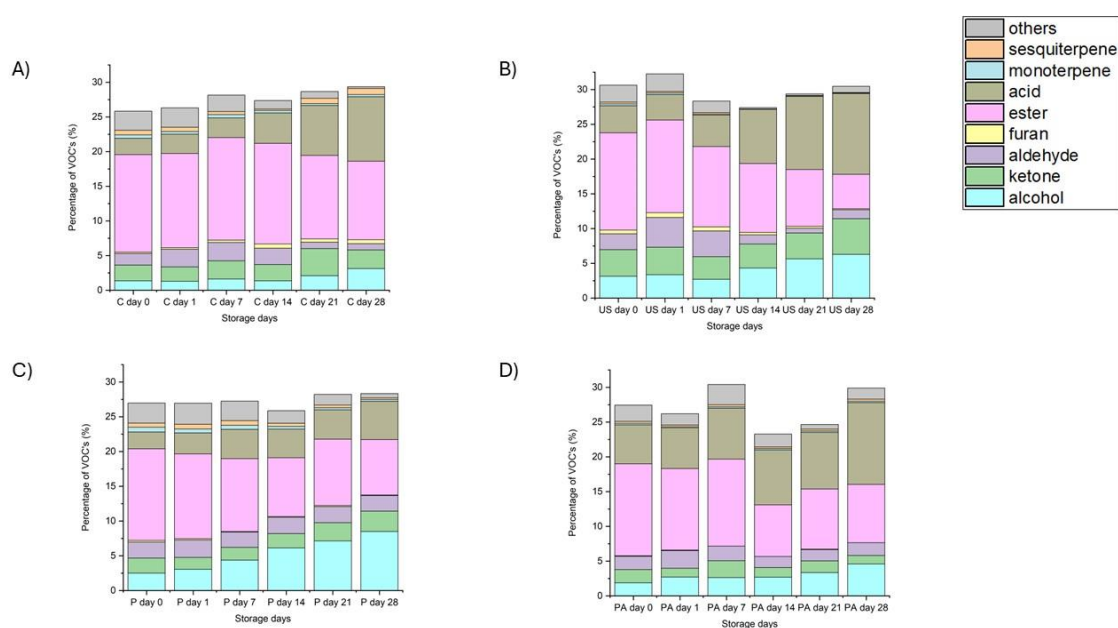


Fig 2. Total relative composition of the main classes of VOCs identified in different conservation methods and storage periods. Control (A); Ultrasound (B); Pasteurization (C); Pasteurization with additive (D).

Aldehyde levels decreased in both the control and ultrasound-treated samples after 14 days, while alcohol levels showed an upward trend. According to Zhao et al. (2018), aldehydes can be converted into alcohols through the action of alcohol dehydrogenase, and into carboxylic acids by aldehyde dehydrogenase in food substrates, particularly under the influence of microbial activity.

Another notable observation is the reduction in the levels of esters, monoterpenes, and sesquiterpenes during the storage period, particularly evident on day 28 following ultrasound treatment (Fig. 2B), when compared to the control. The decline in these compounds over time may signal a loss of quality and alterations in the flavor and aroma of the product. Thus, monitoring these parameters is crucial to ensure that the product retains its desired sensory

characteristics throughout its shelf life. In addition to the effects of storage, it is important to recognize that different processing methods also impact ester concentrations. For instance, thermal processing has been shown to influence ester levels (Wibowo et al., 2015), which explains the higher ester content in the control samples compared to those treated with preservation methods.

Ketones increased in the ultrasound and thermal pasteurization treatments, while they tended to decrease in both the control group and thermal pasteurization with additives. Ketone compounds are typically formed through the auto-oxidation of unsaturated fatty acids during the fermentation process. The primary ketone identified in this study was 2-heptanone, which imparts fruity and floral notes (Haase et al., 2023).

In the control samples furan levels increased, whereas their concentrations decreased when preservation methods were applied during storage. Furans, a class of compounds typically formed through thermal reactions and not found naturally, were present in lower percentages due to the relatively mild temperatures used in the treatments ($\leq 65^{\circ}\text{C}$). While furans can contribute pleasant flavor notes, excessive amounts may overpower the taste, leading to bitterness and disrupting the overall flavor balance. Therefore, monitoring their levels is crucial to ensure concentrations remain within desirable limits, preserving product quality and safety (Gong et al., 2021; Spada et al., 2022).

For the compounds classified as 'Others', a decreasing trend was observed across all conservation methods, as well as in the control group, as storage time increased. Based on the results for volatile compounds, this study confirms that thermal pasteurization was the most effective method for preserving the aromatic profile of cocoa honey over 28 days of storage. However, the samples subjected to thermal pasteurization with additives exhibited higher acidity, while the ultrasound method, despite also resulting in higher acidity, was less effective in preserving esters.

3.4 Application of multivariate analysis in the evaluation of VOCs

To assess the main classes of VOCs across different conservation methods and storage periods, different multivariate analysis techniques were employed, including principal component analysis (PCA) (Fig. 3) and hierarchical cluster analysis (HCA) combined with a heat map (Fig. 4).

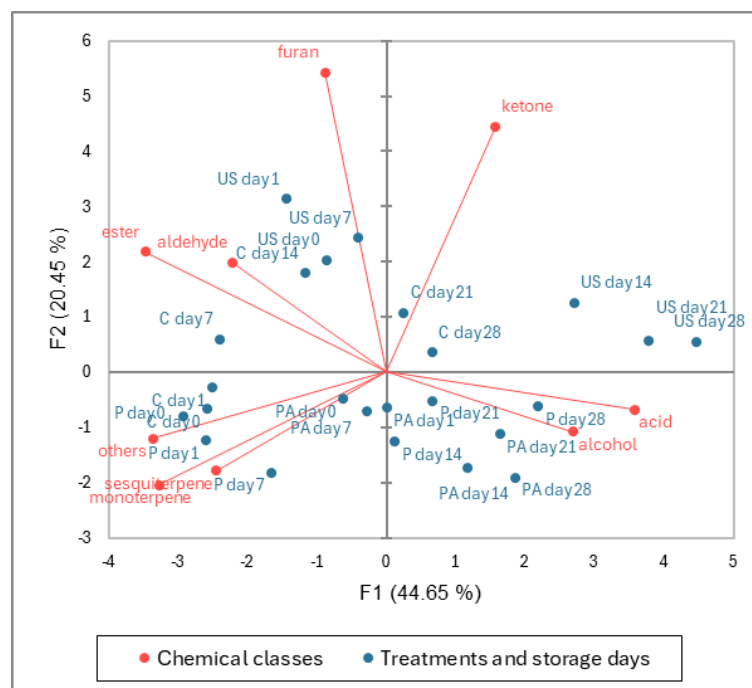


Fig 3. Principal component analysis (PCA) of the main classes of VOCs in different conservation methods and storage periods. C = Control; US = Ultrasound; P = Pasteurization; PA = Pasteurization with additive.

The PCA reveals that the different conservation methods resulted in distinct compound profiles, encompassing different classes of identified compounds. This allows for the discrimination of conservation methods based on their volatile compound profiles, which exhibit unique compositions at each storage period.

The control group was characterized by the presence of esters, other compounds, and aldehydes during the initial days of storage, with ketones becoming predominant towards the end of the storage period. In thermal pasteurization, monoterpenes, sesquiterpenes, and other compounds were dominant in the early storage phase, while alcohols and acids prevailed on days 14, 21, and 28. Thermal pasteurization with additives was distinguished by the presence of monoterpenes and sesquiterpenes at the start (0, 1, and 7 days) and by alcohols and acids from day 14 onward. Ultrasound treatment was notable for the presence of furans and aldehydes in the early days and acids from day 14 onwards. Wibowo et al. (2015) similarly used PCA to distinguish the influence of aromatic compounds on the shelf life of pasteurized orange juice.

The dendrogram generated by hierarchical cluster analysis (HCA), combined with the heat map (Fig. 4), reveals that the samples were grouped based on the similarity of their VOC profiles. This analysis clearly shows the formation of nine distinct clusters.

As shown in (Fig. 4), the control samples formed a distinct cluster on days 0, 1, and 7, characterized by a predominance of monoterpenes, sesquiterpenes, esters, and other

compounds. However, by day 14, the compound profile shifted, with an increased presence of furans, which persisted through days 21 and 28, accompanied by a rise in acid content in these samples. For thermal pasteurization, two clusters were identified: one in the early days of storage (0, 1, and 7), marked by a predominance of monoterpenes, sesquiterpenes, esters, and other compounds, and another cluster at the end of the storage period (14, 21, and 28 days), with higher alcohol content. In contrast, thermal pasteurization with additives showed only one cluster, indicating greater homogeneity of compounds throughout the 28-day storage period, with an increase in acid content only towards the end (14, 21, and 28 days).

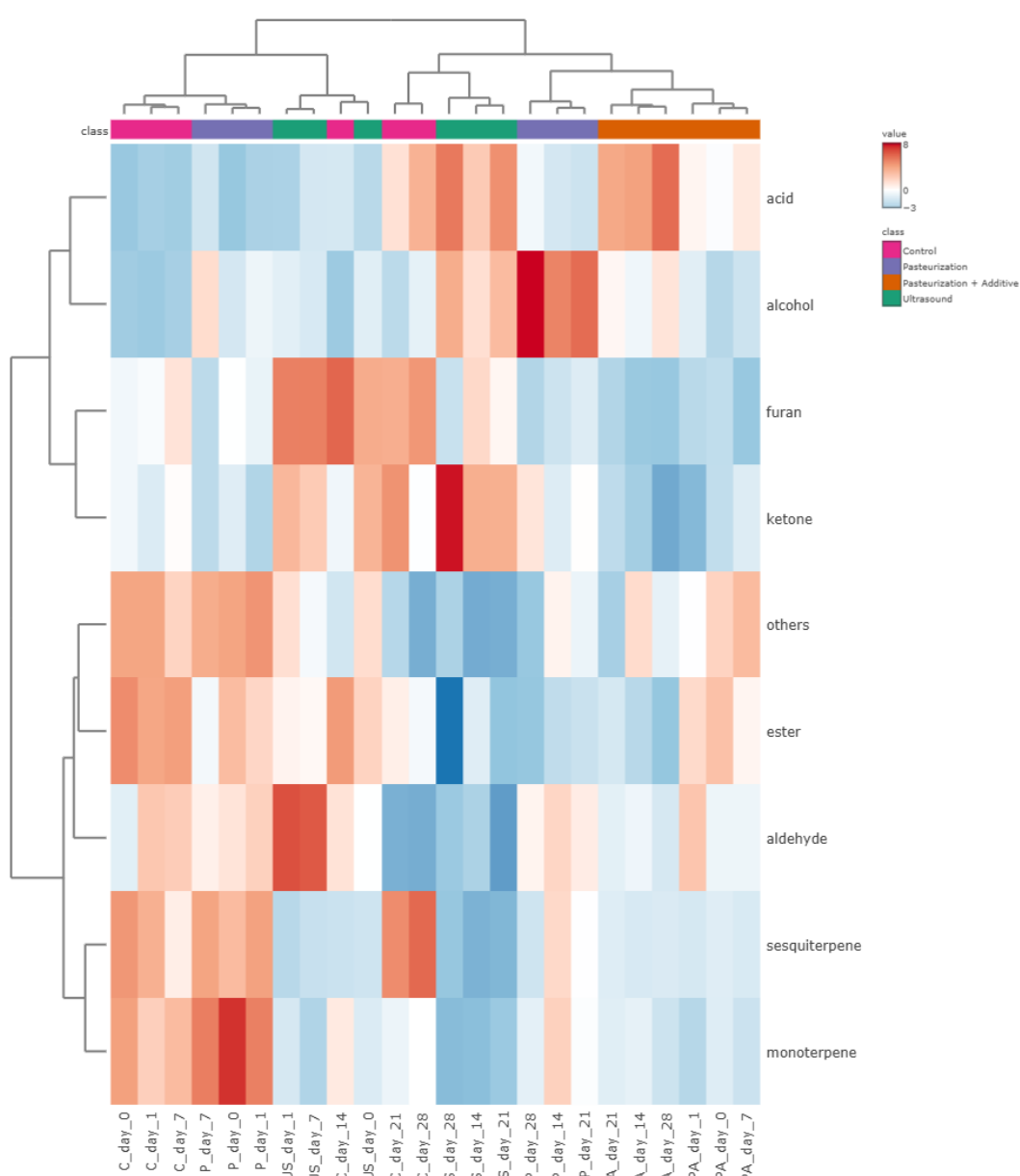


Fig 4. Hierarchical cluster analysis dendrogram associated with the heat map of the main VOC classes across different preservation methods and storage periods. The color scale represents the variation in the relative concentration of VOCs in the samples, ranging from low (blue) to high (red).

Ultrasound treatment revealed a higher concentration of aldehydes and furans in the initial days of storage; however, after 14 days, levels of alcohols, acids, and ketones increased significantly. These findings are consistent with the observations presented in (Fig. 1). Although no studies have utilized heat maps to evaluate the volatile compound profiles formed during the storage of cocoa honey, a study conducted by Donadel et al. (2019) employed heat maps to assess VOCs in apples and apple juice over a 7-day storage period, noting distinct differences between the formed clusters.

3.5 Characterization of volatile compounds

As shown in Table S1, palmitic acid is prominent among the acids, particularly in samples treated with thermal pasteurization with additives and ultrasound, where it exceeded 10 % by the end of the storage period. Although cocoa honey contains minimal fat, the presence of palmitic acid is plausible, as it is a saturated fatty acid commonly found in cocoa and its by-products, including cocoa pulp and cocoa butter. Other acids, such as tetradecanoic, palmitoleic, and pentadecanoic acids, were also identified.

A recent study reported similar findings for cocoa honey from the CCN51 variety (Nascimento et al., 2024b). In the control group, the presence of acetic acid (with a vinegar-like odor) was detected from days 7, 14, 21, and 28, with concentrations increasing from 0.09% to 0.83% over time. Acetic acid is produced during fermentation through microbial activity, leading to a drop in pH and potentially imparting an undesirable flavor to the product (Rottiers et al., 2019). This trend is also reflected in Table 1, where a decrease in pH was observed starting on day 7, indicating a decline in sample quality and rendering it unsuitable for consumption. Similarly, Haase et al. (2023) reported higher acetic acid levels in fresh cocoa pulp, with lower concentrations observed following pasteurization and UHT treatment.

The alcohol content ranged from 1.29% to 8.61%, with particular emphasis on 2-nonanol, a compound that imparts a fruity aroma. In the control samples, 2-nonanol levels increased over the storage period, while there was a tendency for these levels to decrease following thermal pasteurization, thermal pasteurization with additives, and ultrasound treatments. Hegmann et al. (2020) also identified 2-nonanol in the cocoa pulp of various varieties. Interestingly, 2-heptanol was absent in the control group but appeared after all preservation methods were applied, with levels increasing over the storage period. 2-heptanol is an important aroma marker that imparts a fresh, citrus-like aroma, similar to lemongrass (Ascrizzi et al., 2017).

In the aldehyde group, (E,E)-2,4-decadienal and 2-undecenal were detected. Their presence may be linked to lipid degradation, contributing either unpleasant or pleasant notes depending on their concentrations. (E,E)-2,4-decadienal, a product of lipid degradation, imparts a distinctive fried aroma, though it can also be described as citrus-like. While commonly found in frying oils and oil vapors, it is also present in foods like tangerine and orange juices (Parker et al., 2014; Feng et al., 2018). In this study, it was detected in all treatments except thermal pasteurization. Similarly, Haase et al. (2023) reported higher concentrations of (E,E)-2,4-decadienal in pasteurized and UHT-treated cocoa pulp. However, its overall contribution to the aroma is likely minimal due to its low levels. 2-undecenal was found across all treatments, a result consistent with the findings of Bastos et al. (2019).

High concentrations of ketones are associated with the production of high-quality cocoa, characterized by fruity and floral notes (Coria-Hinojosa et al., 2024). Among the ketone group, 2-heptanone has been identified, with Akoa et al. (2023) reporting its presence in cocoa beans from various varieties grown in Cameroon. Compared to the control, the levels of 2-nonanone decreased throughout the storage period. Both 2-heptanone and 2-nonanone were detected in pasteurized cocoa pulp (Haase et al., 2023). Additionally, 2-pentanone was present in all treatments, with notably higher levels on day 28 in the ultrasound-treated samples. Coria-Hinojosa et al. (2024) also found 2-pentanone in samples of Forastero cocoa.

A total of 12 esters were identified, representing the predominant class with an average content of 11.00%. Known for imparting fruity and floral notes, esters are considered key contributors to high-quality aroma. Their production is influenced by fermentation time and varies with yeast activity and sugar concentration (Coria-Hinojosa et al., 2024; Utrilla-Vázquez et al., 2020). In this study, the main compound detected was 2-heptyl acetate, which was present in all treatments. This compound was also found in high concentrations in Trinitario cocoa beans (Rottiers et al., 2019) and can be considered a quality marker for cocoa honey.

Among the furan compounds, 2-ethyl-5-methylfuran was detected across all treatments. While this compound has not been previously reported in studies on cocoa, 2-n-pentylfuran, also identified in this study, has been described in chocolate samples by Spada et al. (2022). Furans are volatile heterocyclic contaminants formed from various precursors such as sugars, amino acids, lipids, ascorbic acid, and carotenoids. They are generated via Maillard reactions during high-temperature processing and are commonly found in cocoa, chocolate, and coffee due to heat treatment (Spada et al., 2022; Park et al., 2023). In this study, low levels of furans

were observed after thermal pasteurization, thermal pasteurization with additives, and ultrasound treatment, especially when compared to the control throughout the storage period.

The monoterpene class showed low levels overall, with D-limonene, linalool, and α -terpineol detected across all treatments and on almost all storage days. Bastos et al. (2019) similarly reported the presence of D-limonene, linalool, and α -terpineol in samples of cocoa pulp and fresh and fermented cocoa beans. Sesquiterpenes also appeared at low concentrations, with γ -eudesmol identified in all treatments, ranging from 0 to 0.72%. Nascimento et al. (2024b) reported similarly low concentrations of monoterpenes and sesquiterpenes in CCN51 variety cocoa honey. However, as noted in studies on cocoa pulp, beans, and chocolate, these compound classes may be more prominent in those products (Pino et al., 2010; Bastos et al., 2019). Among the 'other' compound class, γ -nonalactone stood out for its higher concentration, imparting a fruity, coconut-like aroma. Haase et al. (2021) reported a similar result when analyzing cocoa pulp from different origins.

4. Conclusions

The physicochemical analysis results indicated that thermal pasteurization maintained stability for up to 14 days, thermal pasteurization with additives for up to 28 days, and ultrasound treatment for up to 21 days, effectively extending the shelf life of cocoa honey under refrigerated storage. Regarding VOCs, multivariate analysis revealed that thermal pasteurization with additives produced a more homogeneous compound profile throughout the 28-day storage period. These findings suggest that both thermal pasteurization with additives and ultrasound technology hold significant potential for prolonging the shelf life of cocoa honey. The application of chemometric tools, including PCA and HCA combined with a heat map, provided a more efficient exploration of the VOC data. These analyses revealed patterns indicating grouping trends among the cocoa honey samples based on the different conservation techniques and identified the classes of compounds responsible for these distinctions.

This study offers valuable insights for future research; however, further investigations should incorporate sensory evaluations to identify the most acceptable conservation method for potential consumers of cocoa honey. Moreover, considering the growing consumer preference for reduced additive use and environmentally friendly processing, ultrasound technology emerges as a highly promising approach for cocoa honey processing. Notably, among the

methods evaluated, ultrasound technology required less processing time compared to thermal techniques, highlighting its potential as an efficient and sustainable alternative.

CRedit authors hip contribution statement

Manuela B. Nascimento: Conceptualization, Methodology, Investigation, Software, Formal analysis, Writing - original draft. **Bruno N. Paulino:** Methodology, Resources, Writing - original draft. **Suzana B. Silva:** Methodology and Writing. **Joseane C. G. Alencar:** Methodology and Writing. **Kathleen R. Deegan:** Methodology and Software. **Adriana C. R. Ferreira:** Methodology and Writing. **Frederico M. Rodrigues:** Resources, Writing - review. **Paulo R. R. Mesquita:** Resources, Methodology, Investigation, Software, Writing - review & editing, Supervision. **Sergio E. Soares:** Investigation, Writing - review, Supervision, Project administration.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Ministry of Science, Technology, and Innovation of Brazil - MCTI (Grant No. 904399/2020). M. B. Nascimento would like to thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the grant [Nº88887.504355/2020-00], Secretariat of Agriculture, Livestock, Irrigation, Fisheries and Aquaculture of the Government of the State of Bahia (SEAGRI) for the partnership, and farmer Manoel Carlos Andrade do Nascimento for providing the in natural cocoa fruits.

Appendix A. Supplementary data

The following are the Supplementary data to this article.

References

- Afoakwa, E. O. (2014). Cocoa production and processing technology (1st ed.). Boca Raton, Fl: CRC Press.
- Akoa, S.P., Boulanger, R., Onomo, P.E., Lebrun, M., Ondobo, M. L. Lahon, M.C., Mendo, S.A.N., Niemenak, N., & Djocgoue, P.F. (2023). Sugar profile and volatile aroma composition in fermented dried beans and roasted nibs from six controlled pollinated

- Cameroonian fine-flavor cocoa (*Theobroma cacao* L.) hybrids. *Food Bioscience*, 53, 102603 <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102603>.
- Ascrizzi, R., Flamini, G., Tessieri, C., & Pistelli, L. (2017). From the raw seed to chocolate: Volatile profile of blanco de Criollo in diferente phases of the processing chain. *Microchemical Journal*, 133, 474–479. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.04.024>.
- Aprotosoia, A.C., Luca, S.V., & Miron, A. (2016). Flavor Chemistry of Cocoa and Cocoa Products—An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15, 73–91. <https://doi.org/91.10.1111/1541-4337.12180>.
- Bastos, V.S., Uekane, T.M, Bello, N.A., Rezende, C.M. Paschoalin, V.M.F., & Aguila, E.M.D. (2019). 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*, 56, 2874–2887. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03736-3>.
- Brazil. (2013). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC N° 8, de 06 de março de 2013. Retrieved from https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0008_06_03_2013.html. Accessed May 31, 2024.
- Brazil. (2022). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução normativa - IN N° 161, de 1° de julho de 2022. Retrieved from https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/IN_161_2022_.pdf/b08d70cb-add6-47e3-a5d3-fa317c2d54b2. Accessed May 28, 2024.
- Calva-Estrada, S.J., Utrilla-Vázquez, M., Vallejo-Cardona, A., Roblero-Pérez, D.B., & Lugo-Cervantes, E. (2020). Thermal properties and volatile compounds profile of commercial dark chocolates from different genotypes of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) from Latin America. *Food Research International*, 136, 109594. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109594>.
- Carrillo-Lopez, L. M., Garcia-Galicia, I. A., Tirado-Gallegos, J. M., Sanchez-Vega, R., Huerta-Jimenez, M., Ashokkumar, M., & Alarcon-Rojos, A. D. (2021). Recent advances in the application of ultrasound in dairy products: Effect on functional, physical, chemical, microbiological and sensory properties. *Ultrasonics Sonochemistry*, 73, 105467. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105467>.
- Chávez-Martínez, A., Reyes-Villagrana, R. A., Rentería-Monterrubio, A. L., Sanchez- Vega, R., Tirado-Gallegos, J. M., & Bolivar-Jacobo, N. A. (2020). Low and highintensity ultrasound in dairy products: Application and effects on pysicochemical and microbiological quality. *Foods*, 9, 1688. <https://doi.org/10.3390/foods9111688>.
- Chen, W., Li, H., Zhang, F., Xiao, W., Zhang, R., Chen, Z. & Du, Y. (2021). Handheld short-wavelength NIR spectroscopy for rapid determination of sugars and carbohydrate in fresh juice with sampling error profile analysis. *Infrared Physics & Technology* 115, 103732. <https://doi.org/10.1016/j.infrared.2021.103732>.
- Chetschik, I., Kneubul, M., Chatelain, K., Schluter, A., Bernath, K., & Huhn, T. (2017). Investigations on the Aroma of Cocoa Pulp (*Theobroma cacao* L.) and Its Influence on the Odor of Fermented Cocoa Beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, 2467–2472. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05008>.

- Coria-Hinojosa, L.M., Velásquez-Reyes, D., Alcazar-Valle, M., Kirchmayr, M.R., Calva-Estrada, S., Gschaedler, A., Mojica, L. & Lugo, E. (2024). Exploring volatile compounds and microbial dynamics: *Kluyveromyces marxianus* and *Hanseniaspora opuntiae* reduce Forastero cocoa fermentation time. *Food Research International*, 193, 114821. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114821>.
- Donadel, J.Z., Thewes, F.T., Anese, R.O., Schultz, E.E., Berghetti, M.R.P., Ludwig, V., Klein, B., Cichoski, A.J., Barin, J.S., Both, V., Brackmann, A., & Wagner, R. (2019). Key volatile compounds of ‘Fuji Kiku’ apples as affected by the storage conditions and shelf life: Correlation between volatile emission by intact fruit and juice extracted from the fruit. *Food Research International*, 125, 108625. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108625>.
- Doyle, M.P. & Buchanan, R.L. (2013). *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*. (4^a ed). American Soc. for Microbiology, Washington, DC.
- Feng, S., Suh, J.H., Gmitter, F.G., & Wang, Y. (2018). Differentiation between flavors of sweet orange (*Citrus sinensis*) and Mandarin (*Citrus reticulata*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66 (1), 203–211. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04968>.
- Figueroa, K. H. N., García, N. V. M., & Vega R.C. (2020). *Cocoa By-products. Food Wastes and By-products: Nutraceutical and Health Potential*, First Edition. Edited by Rocio Campos-Vega, B. Dave Oomah, and Haydé Azeneth Vergara-Castañeda. John Wiley & Sons Ltd. (pp. 373–411). <https://doi.org/10.1002/9781119534167.ch13>.
- Firdaus, F., Desmiarti, R., Praputri, E., & Amir, A. (2022). Production of cocoa pulp syrup by utilizing local sugar sources. *Journal of Applied Agricultural Science and Technology*. 6 (2), 149–161. <https://doi.org/10.55043/jaast.v6i2.70>.
- Ganesan, B., Martini, S., Solorio, J., & Walsh, M. K. (2015). Determining the effects of high intensity ultrasound on the reduction of microbes in milk and orange juice using response surface methodology. *International Journal of Food Science*, 10350719. <https://doi.org/10.1155/2015/350719>.
- Gao, X., Feng, T., Liu, E., Shan, P., Zhang, Z., Liao, L., & Ma, H. (2021). Ougan juice debittering using ultrasound-aided enzymatic hydrolysis: Impacts on aroma and taste. *Food Chemistry*, 345, 128767. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128767>.
- Gomes, A.A., Azcarate, S.M., Špánik, I., Khvalbota, L., & Goicoechea, H.C. (2023). Pattern recognition techniques in food quality and authenticity: A guide on how to process multivariate data in food analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 164, 117105. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117105>.
- Gong, M., Zhou, Z. L., Liu, S. P., Zhu, S. H., Li, G. Q., Zhong, F., & Mao, J. (2021). Formation pathways and precursors of furfural during Zhenjiang aromatic vinegar production. *Food Chemistry*, 354, 129503. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129503>.
- Gourama, H., Fung, D.Y.C. (2024). Yeasts and molds. *Encyclopedia of Meat Sciences (Third Edition)*, 308-321. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85125-1.00188-5>.
- Guirlanda, C.P., Alvim, I.D., & Takahashi, J. A. (2023). Atomization of Cocoa Honey Using Whey Protein Isolate to Produce a Dry Formulation with Improved Shelf Life for Industrial Application. *Foods*, 12, 4269. <https://doi.org/10.3390/foods12234269>.

- Guirlanda, C.P., Silva, G.G., & Takahashi, J. A. (2021). Cocoa honey: Agroindustrial waste or underutilized cocoa by-product? *Future Foods*, 4, 100061. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2021.100061>.
- Haase, T.B., Naumann-Gola, S., Ortner, E., Zorn, H., & Schweiggert-Weisz, U. (2023) Thermal stabilisation of cocoa fruit pulp — Effects on sensory properties, colour and microbiological stability. *Current Research in Food Science*, 7, 100549. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2023.100549>.
- Haase, T.B., Schweiggert-Weisz, U., Ortner, E., Zorn, H., & Naumann, S. (2021). Aroma Properties of Cocoa Fruit Pulp from Different Origins. *Molecules*, 26, 7618. <https://doi.org/10.3390/molecules26247618>.
- Habibi, F., Shahid, M.A., Spicer, R.L., Voiniciuc, C., Kim, J., Gmitter Jr, F.G., Brecht, J.K., & Sarkhosh A. (2024). Postharvest storage temperature strategies affect anthocyanin levels, total phenolic content, antioxidant activity, chemical attributes of juice, and physical qualities of blood orange fruit. *Food Chemistry Advances*, 4, 100722. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2024.100722>.
- Hegmann, E., Niether, W., Phillips, W., Rohsius, C., & Lieberei, R. (2020). Besides variety, also season and ripening stage have a major influence on fruit pulp aroma of cacao (*Theobroma cacao* L.). *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 93, 266–275. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2020.093.033>.
- Hinne, M., Semanhya, E., Walle, D.V., Winne, A., Tzompa-Sosa, D.A., Scalone, G.L.L., Meulenaer, B., Messens, K., Durme, J.V., Afoakwa, E.O., Cooman, L., & Dewettincka, K. (2018). Assessing the influence of pod storage on sugar and free amino acid profiles and the implications on some Maillard reaction related flavor volatiles in Forastero cocoa beans. *Food Research International*, 111, 607–620. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.064>.
- Huang, Y., & Barringer, S. A. (2010). Alkylpyrazines and Other Volatiles in Cocoa Liquors at pH 5 to 8, by Selected Ion Flow Tube-Mass Spectrometry (SIFT-MS). *Journal of Food Science*, 75 (1). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01455.x>.
- Hussain, P.R., Suradkar, P.P., Rather, S.A., & Omeera, A. (2023). Effect of radiation processing on physico-chemical quality and inhibition of yeast and mold and aerobic bacterial count in natural plum juice during refrigerated storage. *Food and Humanity*, 1, 1213–1222. <https://doi.org/10.1016/j.foohum.2023.09.012>.
- IAL. Instituto Adolfo Lutz. (2008). Métodos físico-químicos para análise de alimentos. (4th ed). Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2024). Produção de cacau. Retrieved from <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/cacau/pa>. Accessed September 14, 2024.
- Kadow, D. (2020). The biochemistry of cocoa flavor – A holistic analysis of its development along the processing chain. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 93, 300–312. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2020.093.037>.
- Kesavan, R.K., Gogoi, S., & Nayak, P.K. (2023). Influence of thermosonication and pasteurization on the quality attributes of kutkura (*Meyna spinosa*) juice. *Applied Food Research*, 3, 100268. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2023.100268>.

- Khalil, A. A., Khan, A. A., Khalid, A., Abid, Z., Proestos, C., Bhat, Z. F., Shahbaz, M. U., & Aadil, R. M. (2023). Comparing the antioxidant properties and volatile compounds of carrot-orange juice blend processed through varied chemical, pasteurization and ultrasound conditions. *Ultrasonics Sonochemistry*, 98, 106534. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2023.106534>.
- Klee, H. J., & Tieman, D. M. (2018). The genetics of fruit flavour preferences. *Nature Reviews Genetics*, 19(6), 347–356. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0002-5>.
- Kumar, K., Srivastav, S., & Sharanagat, V.S. (2021). Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: a review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, 105325. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325>.
- Lannes, S.C.D.S., Silva, M.V., Silva, E.N., Ramos, D.D.C., & Su, F. (2013). Food Compositions of Chocolate and Edible Ice Cream Containing Cocoa Honey University of São Paulo (USP, Sao Paulo, Brazil) and State University of Southwest Bahia (UESB, Bahia, Brazil). Retrieved from <https://patents.google.com/patent/BR102013005053B1>. Accessed May 10, 2024.
- Lepaus, B. M., Valiati, B. S., Machado, B. G., Domingos, M. M., Silva, M. N., Faria-Silva, L., Bernardes, P. C., Oliveira, D. da S., & de São José, J. F. B. (2023). Impact of ultrasound processing on the nutritional components of fruit and vegetable juices. *Trends in Food Science & Technology*, 138, 752–765. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.07.002>.
- Miyazawa, M., Hashidume, S., Takahashi, T., & Kikuchi, T. (2012). Aroma evaluation of Gamazumi (*Viburnum dilatatum*) by aroma extract dilution analysis and odour activity value. *Phytochemical Analysis*, 23, 208–213. <https://doi.org/10.1002/pca.1344>.
- Moretti, L.K., Ramos, K.K., Ávila, P.F., Goldbeck, R., Vieira, J.B., & Efraim, P. (2023). Influence of cocoa varieties on carbohydrate composition and enzymatic activity of cocoa pulp. *Food Research International*, 173:113393. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113393>.
- Moundanga, S.M., Petit, J., Ndangui, C.B., Scher, J., & Nzikou, J.M. (2024). Impact of cocoa variety on physical and chemical properties, reconstitutability, and flowability of cocoa powders. *Powder Technology*, 447, 120214. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2024.120214>.
- Nascimento, M. B., Amorim, L. R., Nonato, M. A. S., Roselino, M. N., Santana, L. R. R., Ferreira, A.C.R., Rodrigues, F.M., Mesquita, P.R.R., & Soares, S.E. (2024b). Optimization of HS-SPME/GC-MS method for determining volatile organic compounds and sensory profile in cocoa honey from different cocoa varieties (*Theobroma cacao* L.). *Molecules*, 29(13), 3194. <https://doi.org/10.3390/molecules29133194>.
- Nascimento, M.B., Souza, T.L., Maia, D.L.S., Amorim, L.R., Ribeiro, A.S.L., Mamede, M.E.O., Maciel, L.F., Santos Júnior, A.F., Mesquita, P.R.R., & Soares, S.E. (2024a). Determination of mineral profile using MIP OES and physicochemical composition of cocoa honey from different cocoa varieties (*Theobroma cacao* L.). *Food Analytical Methods*, 17, 1195-1207. <https://doi.org/10.1007/s12161-024-02640-7>.
- Nunes, C.S.O., Da Silva, M.L.C., Camilloto, G.P., Machado, B.A.S., Hodel, K.V.S., Koblitz, M.G.B., Carvalho, G.B.M., & Uetanabaro, P.T. (2020). Potential applicability of cocoa

- pulp (*Theobroma cacao* L.) as an adjunct for beer production. *The Scientific World Journal*, 3192585. <https://doi.org/10.1155/2020/3192585>.
- Parker, J.K., Elmore, S., & Methven, L. (2014). *Flavour Development, Analysis and Perception in Food and Beverages*. Woodhead Publishing, Cambridge, England, Waltham, Massachusetts, Kidlington, England (Woodhead Publishing series in food science, technology and nutrition, Number 273). (1^a ed). Woodhead Publishing.
- Park, H.H., Nam, D., Lee, J.Y., Song, J.H., Lee, H., Jung, M.Y., Lee, S.M., & Kim, Y.S. (2023). Effects of chlorogenic acid on the formations of furan, acrylamide, α -dicarbonyls and volatile compounds in canned coffee model systems. *LWT - Food Science and Technology*, 188, 115338. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115338>.
- Patist, A., & Bates, D. (2008). Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9, 147e154. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.07.004>.
- Pino, J.A., Ceballos, L., & Quijano, C.E. (2010). Headspace volatiles of *Theobroma cacao* L. pulp from Colombia. *Journal of Essential Oil Research*, 22 (2), 113–115. <https://doi.org/10.1080/10412905.2010.9700276>.
- Ramírez-Corona, N., García, N.A., Martínez, M.J., López-Malo, A., & Mani-López, E. (2024). Effect of combining ultrasound and UVC treatments for processing orange juice and mango nectar on their microbiological, physicochemical, and sensory characteristics. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 94, 103686. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2024.103686>.
- Rodriguez-Campos, J., Escalona-Buendía, H.B., Orozco-Avila, I., Lugo-Cervantes, E., & Jaramillo-Flores, M.E. (2011). Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. *Food Research International*, 44, 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.028>.
- Rottiers, H., Sosa, D.A.T., Winne, A., Ruales, J., Clippeleer, J., Leersnyder, I., Wever, J., Everaert, H., Messens, K., & Dewettinck, K. (2019). Dynamics of volatile compounds and flavor precursors during spontaneous fermentation of fine flavor Trinitario cocoa beans. *European Food Research and Technology*, 245, 1595–1610. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03307-y>.
- Serra, W.S., & Sodré, G.A. (2021). Manual do cacaucultor: perguntas e respostas. Brasil, Ilhéus, BA, CEPLAC/CEPEC. Boletim Técnico nº 221 190. Retrieved from https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/ceplac/publicacoes/boletins-tecnicos-bahia/boletim-tecnico-no-221-2021_compressed.pdf. Accessed October 1, 2024.
- Silva, N., Junqueira, V.C.A., Silveira, N.F.A., Taniwaki, M.H., Gomes, R.A.R., Okazaki, M.M., & Iamanaka, B.T. (2021). Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. (6th ed.). São Paulo: Blucher.
- Soria, A. C., & Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(7), 323-331. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.003>.
- Sant'ana, A.S., Conceição, C., Azeredo, D.R.P. (2002). Comparasion of SimplateR test and Petrifilm with plate count agar method for detection and enumeration of bacteria in ice

- cream. *Food Science and Technology*, 22 (1). <https://doi.org/10.1590/S0101-20612002000100011>.
- Spada, F.P., Alencar, S.M., & Purgatto, E. (2022). Comprehensive chocolate aroma characterization in beverages containing jackfruit seed flours and cocoa powder. *Future Foods*, 6, 100158. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100158>.
- Sulaiman, K. B., Yang, T.A., & Ariffin, F. (2017). Colour and antioxidant properties of cocoa beans from pods storage and fermentation using shallow box. *MATTER: International Journal of Science and Technology*, 3(2), 295–307. <https://doi.org/10.20319/mijst.2017.32.295307>.
- Svetič, S., Vrečer, F., & Korasa, K. (2024). Multivariate process analytical technology tools for fluidized bed granulation and drying analysis: A review. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 92, 105201. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.105201>.
- Utrilla-Vázquez, M., Rodríguez-Campos, J., Avendaño-Arazate, C.H., Gschaedler, A., & Lugo-Cervantes, E. (2020). Analysis of volatile compounds of five varieties of Maya cocoa during fermentation and drying processes by Venn diagram and PCA. *Food Research International*, 129, 108834. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108834>.
- Villiers, A., Alberts, P., Tredoux, A.G.J., & Nieuwoudt, H.H. (2012). Analytical techniques for wine analysis: An African perspective; a review. *Analytica Chimica Acta*, 730, 2–23. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.064>.
- Wibowo, S., Grauwet, T., Kebede, B.T., Hendrickx, M., & Loey, A.V. (2015). Study of chemical changes in pasteurised orange juice during shelf-life: A fingerprinting-kinetics evaluation of the volatile fraction. *Food Research International*, 75, 295-304. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.06.020>.
- Yıkmış, S., Altan, A.D., Türkol, M., Gezer, G.E., Ganimet, S., Abdi, G., Hussain, S., & Aadil, R.M. (2024). Effects on quality characteristics of ultrasound-treated gilaburu juice using RSM and ANFIS modeling with machine learning algorithm. *Ultrasonics Sonochemistry*, 107, 106922. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2024.106922>.
- Zahan, I., Khan, M.M., Rana, M.S., Sahabuddin, M., Rasik, M.R., & Uddin, M.B. (2024). Effect of selective preservatives on shelf-life of guava juice extracted using pectinase enzyme. *Heliyon*, 10, e37596. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e37596>.
- Zhao, L., Feng, R., Ren, F., & Mao, X. (2018). Addition of buttermilk improves the flavor and volatile compound profiles of low-fat yogurt. *LWT - Food Science and Technology*, 98, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.08.029>.

SUPPLEMENTARY MATERIAL**MULTIVARIATE ANALYSIS TO EVALUATE THE STORAGE TIME OF COCOA
HONEY (*Theobroma cacao* L.) PROCESSED BY PASTEURIZATION AND HIGH
INTENSITY ULTRASOUND**

Manuela B. Nascimento^{a,b}; Bruno N. Paulino^a; Suzana B. Silva^a; Kathleen R. Deegan^{b,c}; Joseane C. G. Alencar^a; Adriana C. R. Ferreira^d; Frederico M. Rodrigues^b; Paulo R. R. Mesquita^{b,*}; Sergio E. Soares^a

^aFederal University of Bahia, Ondina Campus, School of Pharmacy, 40170-115 Salvador, Bahia, Brazil

^bAgricultural Technology Center of the State of Bahia, Secretariat of Agriculture, Livestock, Irrigation, Fisheries and Aquaculture of the Government of the State of Bahia (SEAGRI), Ondina, 40170-110 Salvador, Bahia, Brazil

^cFederal University of Bahia, Veterinary Medicine Hospital, 40170-110 Salvador, Bahia, Brazil

^dCocoa Innovation Center, Santa Cruz State University, Salobrinho, 45662-200, Ilhéus, Bahia, Brazil

* Corresponding author: Agricultural Technology Center of the State of Bahia, Secretariat of Agriculture, Livestock, Irrigation, Fisheries and Aquaculture of the Government of the State of Bahia (SEAGRI), Ondina, 40170-110 Salvador, Bahia, Brazil. E-mail address: prmesquita@gmail.com

Fig S1. Principal component analysis (PCA) of physicochemical and colorimetric data across different conservation methods and storage periods. C = Control; US = Ultrasound; P = Pasteurization; PA = Pasteurization with additive.

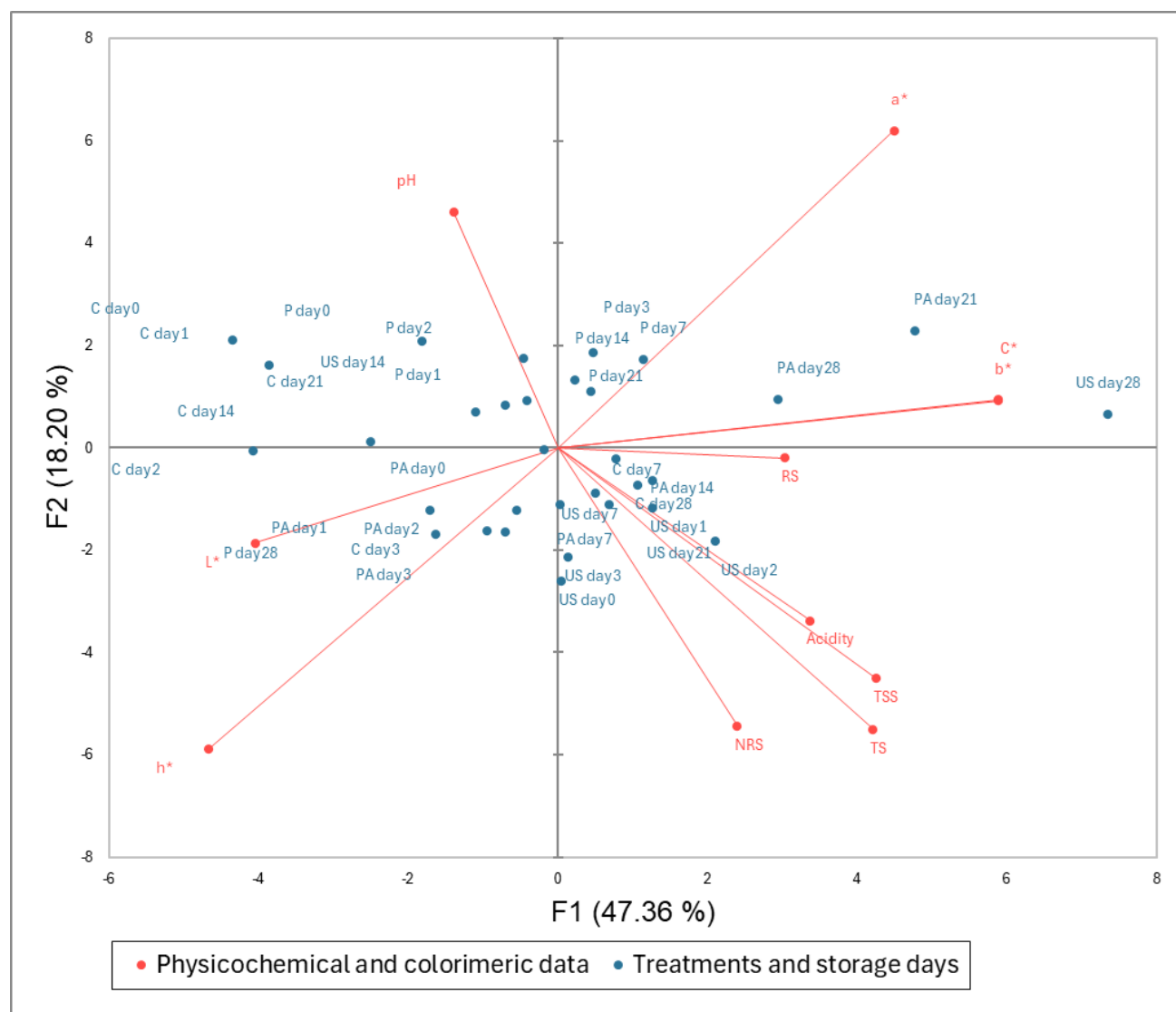


Table S1. Mean relative composition (%) of VOC's identified in cocoa honey of the CCN51 cocoa variety (*Theobroma cacao* L.) by HS-SPME-GC-MS (n=3).

Group	Compound	Odor description	T0 (Control)							
			LRI ^a _{EXP}	LRI ^b _{LIT}	0 day	1 day	7 day	14 day	21 day	28 day
Acids										
1	acetic acid	Vinegar-like ^c	-	645.0	-	-	0.09	0.31	0.61	0.83
2	octanoic acid	Green, soapy ^c	1177.6	1177.0	0.01	0.02	0.02	0.05	0.14	0.17
3	decanoic acid	Coriander-like, soapy ^c	1374.2	1374.0	-	-	-	-	-	0.17
4	dodecanoic acid*	Rancid, fatty, metal ^d	1568.4	1568.0	-	-	-	-	0.25	0.65
5	tetradecanoic acid*		1763.2	1763.0	-	-	-	-	0.43	0.68
6	pentadecanoic acid*		1853.0	1851.0	0.01	0.03	0.03	0.10	0.19	0.16
7	palmitoleic acid		1944.6	1944.0	-	-	-	0.21	0.54	0.64
8	palmitic acid*		1971.3	1972.0	2.32	2.72	2.73	3.72	5.04	6.00
Alcohols										
9	1-hexanol*		876.3	874.0	-	-	0.01	0.01	0.05	0.11
10	1-heptanol*		977.4	975.0	-	-	-	-	-	0.01
11	2-octanol		1005.1	1004.0	-	-	-	-	-	0.02
12	2-ethyl-1-hexanol		1035.2	1030.0	-	-	0.02	0.03	0.09	0.09

13	(<i>E</i>)-2-octen-1-ol		1074.1	1071.0	-	-	-	0.02	0.03	-
14	1-octanol*	Soapy, citrus-like, fatty ^c	1072.6	1072.0	-	0.03	0.04	0.01	0.11	0.12
15	2-nonanol	Fruity ^e	1099.6	1098.0	0.95	0.86	1.06	0.93	1.01	1.39
16	phenylethyl alcohol		1111.3	1114.0	-	-	-	-	-	0.07
17	1-nonanol*		1176.3	1176.0	-	0.02	0.05	0.02	0.02	0.04
18	1-decanol		1278.4	1278.0	0.03	0.04	0.07	0.02	0.12	0.16
19	2-undecanol		1299.9	1303.0	0.12	0.13	0.16	0.10	0.10	0.13
20	1-dodecanol*		1473.6	1473.0	0.26	0.21	0.20	0.22	0.14	0.23
21	farnesyl alcohol		1723.0	1722.0	-	-	-	-	0.41	0.78
<i>Aldehydes</i>										
22	hexanal*	Green ^c	807.1	807.0	-	0.08	0.11	0.14	0.02	0.06
23	benzaldehyde*	Almond-like ^c	960.0	960.0	0.02	0.03	0.03	0.02	0.02	0.03
24	(<i>E</i>)-2-heptenal	Green, flowery ^c	961.9	960.0	-	-	0.01	0.01	-	-
25	octanal*	Citrus-like, green ^c	998.4	1000.0	0.01	0.03	0.03	0.01	-	-
26	benzeneacetaldehyde		1043.8	1044.0	-	-	-	-	-	0.13
27	(<i>E</i>)-2-octenal	Fatty, grassy, green ^c	1059.1	1059.0	0.02	0.03	0.05	0.12	0.05	0.08
28	nonanal*	Citrus-like ^c	1104.1	1104.0	0.06	0.13	0.11	-	-	-

29	(<i>E</i>)-2-nonenal*	Fatty, cardboard-like ^c	1160.3	1160.0	0.03	0.03	0.04	0.08	0.08	0.11
30	decanal*		1208.8	1203.0	0.05	0.08	0.07	0.02	0.02	0.02
31	2,4-nonadien-1-al		1213.7	1213.0	-	0.11	0.11	0.01	-	-
32	2(<i>E</i>)-decanal		1265.8	1265.0	0.11	0.31	0.28	0.13	-	0.03
33	undecanal*		1306.2	1306.0	0.01	0.04	0.03	-	-	-
34	(<i>E,E</i>)-2,4-decadienal	Deep fried, fatty ^c	1313.4	1313.0	0.23	0.32	0.54	1.35	0.27	0.24
35	2-undecenal	Tallowy, sweet ^f	1366.1	1366.0	0.25	0.61	0.53	0.21	0.14	0.08
36	dodecanal		1408.9	1409.0	0.14	0.16	0.16	0.07	0.03	0.01
37	(<i>E</i>)-2-dodecenal		1467.0	1467.5	0.05	0.17	0.15	-	-	-
38	tridecanal		1511.2	1511.0	-	0.03	0.04	-	-	-
39	tetradecanal		1598.9	1606.0	0.63	0.29	0.25	0.12	0.12	0.05
40	pentadecanal		1710.5	1710.0	0.06	0.08	0.11	0.08	0.09	0.06
41	(<i>E</i>)-hexadec-2-enal		1880.6	1877.6	-	-	-	-	0.07	-
<i>Esters</i>										
42	pentyl propanate		946.2	952.0	0.17	0.13	0.18	0.18	0.13	0.08
43	2-heptyl acetate	Fruity ^g	1043.9	1047.0	9.50	9.14	10.19	10.67	8.88	8.33
44	benzyl acetate		1164.3	1170.0	0.09	0.08	0.08	0.03	0.01	-
45	2-nonyl acetate		1244.4	1236.9	1.79	1.57	1.76	1.59	0.85	0.56

46	β -phenethyl acetate		1259.8	1260.0	0.05	0.02	0.02	0.01	-	0.01
47	2-methylpropyl benzoate		1327.2	1331.2	-	-	0.01	-	-	-
48	decanol acetate		1413.3	1409.0	-	-	-	-	-	0.01
49	methyl jasmonate		1635.1	1638.0	0.68	0.75	0.67	0.53	0.36	0.41
50	benzyl benzoate		1762.5	1762.0	1.76	1.88	1.84	1.42	1.49	1.85
51	n-Hexadecanoic acid methyl ester		1923.5	1923.0	0.05	0.03	0.05	0.05	0.32	0.07
<i>Ketones</i>										
52	2-pentanone		700.0	707.8	0.50	0.28	0.46	0.48	0.37	0.08
53	2-hexanone		795.5	795.4	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.03
54	2-heptanone*	Fruity, flowery ^c	893.7.0	890.0	0.63	0.61	0.79	0.83	0.90	1.33
55	2-octanone		994.5.0	992.0	0.02	0.03	0.03	0.03	0.04	0.05
56	acetophenone	Almond-like, solvent-like ^c	1062.0	1062.0	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	-
57	2-nonanone	Flowery, fruit, musty ^h	1088.6	1089.0	0.81	0.81	0.92	0.79	0.77	0.77
58	3-nonen-2-one		1141.2	1142.0	0.02	0.02	0.03	0.03	0.04	0.07
59	2-undecanone		1294.0	1291.0	0.17	0.15	0.17	0.13	0.11	0.06

60	6,10-dimethyl-5,9-undecadien-2-one		1454.7	1456.0	0.09	0.16	0.18	0.05	0.04	0.03
61	2-pentadecanone		1699.3	1699.0	-	-	-	-	0.42	0.27
62	2-heptadecanone		1902.6	1902.0	-	-	-	-	1.21	-
<i>Furan</i> 63	2-ethyl-5-methylfuran		805.6	804.0	0.19	0.15	0.20	0.24	0.22	0.25
64	2-n-pentylfuran	Floral, fruit ^m	992.6	993.0	-	0.06	0.10	0.36	0.25	0.31
65	trans-2-(2-pentenyl)furan		1001.6	1001.0	-	-	-	-	0.01	-
66	3-methyl-2-(2-methyl-2-butenyl)-furan		1097.9	1093.0	0.01	0.01	0.03	0.02	0.01	-
<i>Monoterpenes</i>										
67	β -pinene		992.5	983.0	0.05	-	-	-	-	-
68	α -terpinene		1011.2	1012.0	0.01	-	0.01	0.01	0.01	0.01
69	p-cymene		1023.3	1023.0	0.01	-	-	-	-	-
70	D-limonene*	Citrus, orange, sweet ⁱ	1027.4	1027.0	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02
71	3-carene		1040.6	1034.0	0.04	0.02	0.05	0.04	0.03	0.03
72	β -cis-ocimene		1042.9	1043.0	0.01	-	-	-	-	-
73	γ -terpiene		1057.1	1057.0	0.02	0.01	0.01	0.02	0.04	-
74	cis-linalool oxide		1070.8	1071.0	0.03	0.01	0.01	-	-	-

75	(<i>E</i>)-furan linalool oxide		1070.8	1072.0	0.02	0.06	0.02	0.03	0.02	0.03
76	linalool*	Flowery ^c	1097.5	1097.6	0.13	0.12	0.16	0.11	0.09	0.10
77	p-mentha-1,5,8-triene		1130.1	1135.0	0.01	0.01	0.02	-	-	-
78	α -terpineol		1184.6	1185.0	0.08	0.07	0.09	0.07	0.03	0.07
79	cis-geraniol		1261.6	1259.0	0.04	0.04	0.06	0.03	0.03	0.05
80	β -damascenone		1381.2	1381.0	0.05	0.04	0.04	0.02	0.01	0.01
<i>Sesquiterpene</i>										
81	β -dihydroionol		1442.5	1449.2	0.02	0.02	0.02	-	-	0.01
82	(<i>E</i>)- β -farnesene		1456.3	1457.0	0.01	0.01	0.01	0.01	-	-
83	cis- β -Farnesene		1459.2	1458.0	-	-	-	-	0.19	0.21
84	γ -selinene		1472.5	1470.0	0.04	0.01	0.02	-	0.01	-
85	β -chamigrene		1473.0	1473.0	0.01	0.02	-	-	-	-
86	α -guaiene		1481.8	1489.0	0.01	0.03	0.02	-	-	-
87	(<i>Z,E</i>)- α -farnesene		1495.8	1495.9	-	-	-	-	0.04	0.09
88	δ -guaijene		1500.8	1502.0	0.01	-	-	0.01	0.01	0.01
89	δ -cadinene		1521.5	1521.0	0.04	0.01	0.01	0.01	0.01	-
90	D-germacrene		1522.4	1521.0	-	-	-	-	0.01	0.01
91	β -calacorene		1540.4	1532.0	0.01	-	-	-	-	-

92	α -calacorene		1541.2	1541.0	0.01	0.02	0.01	-	-	-
93	E-nerolidol		1565.0	1565.0	-	-	-	-	0.33	0.39
94	(Z)-nerolidol		1565.2	1565.0	0.04	0.06	-	-	-	-
95	γ -eudesmol	Woody ^j	1612.9	1621.0	0.46	0.43	0.35	0.20	0.18	0.16
<i>Others</i>										
96	2-methyl-3-furanthiol	Broth-like ^c	869.5	869.0	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02
97	5-ethyl-2-methyl-2-vinyltetrahydrofuran		911.6	910.9	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	-
98	p-chlorophenyl chloride		1006.3	1014.9	-	0.01	0.01	-	-	-
99	γ -nonalactone	Fruity, coconut-like ^l	1342.3	1344.0	1.68	1.68	1.42	1.03	0.64	0.03
100	γ -decalactone		1467.4	1465.0	-	-	-	-	0.05	0.06
101	(-)-cembrene A		1955.4	1960.0	0.21	0.18	0.16	0.18	0.10	0.14
102	thunbergene		1962.5	1964.0	0.84	0.91	0.76	0.20	0.15	-

T1 (Pasteurization)

Group	Compound	Odor description	LRI ^a _{EXP}	LRI ^b _{LIT}	0 day	1 day	7 day	14 day	21 day	28 day
<i>Acids</i>										
1	octanoic acid	Green, soapy ^c	1177.6	1177.0	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.03
2	pentadecanoic acid*		1852.9	1851.0	-	0.01	0.04	0.06	0.09	0.10
3	palmitic acid*		1971.3	1972.0	2.40	2.98	4.15	4.03	4.12	5.38

Alcohols

4	2-heptanol	Citrus, fresh, lemon-grasslike ⁿ	904.3	901.0	0.89	0.74	0.71	0.75	1.16	1.41
5	2-octanol		1005.1	1004.0	0.04	0.03	0.03	0.04	0.06	0.06
6	2-ethyl-1-hexanol		1035.2	1030.0	-	-	0.02	0.03	0.06	0.07
7	2-nonanol	Fruity ^e	1099.6	1098.0	0.95	0.85	0.87	0.78	0.96	0.84
8	1-nonanol*		1176.3	1176.0	-	-	-	-	0.01	0.01
9	1-decanol		1278.4	1278.0	0.01	0.01	0.04	0.06	0.02	0.04
10	2-undecanol		1299.9	1303.0	0.10	0.10	0.05	0.14	0.10	0.12
11	1-undecanol		1376.9	1374.4	-	0.01	0.02	0.05	0.06	0.10
12	1-dodecanol*		1473.5	1473.0	0.50	1.30	2.59	4.12	4.70	5.85
13	2-tetradecanol		1603.6	1611.0	-	-	-	0.05	0.04	0.04
14	galoxolide		1853.9	1850.0	0.02	0.01	-	-	-	-
15	1-hexadecanol*		1880.4	1880.0	-	-	-	0.08	-	-
16	isophytol		1949.2	1949.0	-	-	0.02	0.04	-	-

Aldehydes

17	hexanal*	Green ^c	807.1	807.0	0.07	0.10	0.07	0.11	0.18	0.17
18	benzaldehyde*	Almond-like ^c	960.0	960.0	0.03	0.03	0.03	0.04	0.04	0.05

19	(<i>E</i>)-2-heptenal	Green, flowery ^c	961.9	960.0	-	-	-	-	0.01	-
20	benzeneacetaldehyde		1043.8	1044.0	-	-	-	0.07	-	0.09
21	(<i>E</i>)-2-octenal	Fatty, grassy, green ^c	1059.1	1059.0	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03
22	nonanal*	Citrus-like ^c	1104.1	1104.0	0.19	0.19	0.16	0.13	0.18	0.16
23	(<i>E</i>)-2-nonenal*	Fatty, cardboard- like ^c	1160.3	1160.0	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.04
24	decanal*	Soapy ^c	1202.8	1203.0	0.14	0.17	0.12	0.09	0.11	0.09
25	2,4-nonadien-1-al		1213.7	1213.0	0.09	0.12	0.12	0.12	0.12	0.11
26	2(<i>E</i>)-decanal		1265.8	1265.0	0.23	0.26	0.23	0.22	0.22	0.21
27	undecanal*		1306.2	1306.0	0.15	0.23	0.14	0.12	0.12	0.11
28	2-undecenal	Tallowy, sweet ^f	1366.1	1366.0	0.49	0.54	0.48	0.48	0.45	0.43
29	dodecanal		1408.9	1409.0	0.22	0.29	0.20	0.22	0.20	0.19
30	(<i>E</i>)-2-dodecenal		1467.0	1467.5	0.12	0.15	0.13	0.13	0.12	0.12
31	tridecanal		1511.2	1511.0	0.04	0.02	0.02	0.06	0.06	0.04
32	tetradecanal		1598.9	1606.0	0.36	0.23	0.28	0.32	0.33	0.27
33	pentadecanal		1710.5	1710.0	0.11	0.12	0.14	0.17	0.10	0.14
<i>Esters</i>										
34	pentyl propanate		946.2	952.0	0.14	0.08	0.11	0.10	0.16	0.11

35	2-heptyl acetate	Fruity ^g	1043.9	1047.0	9.20	8.44	7.35	5.54	6.68	5.24
36	benzyl acetate		1164.3	1170.0	0.10	0.09	0.07	0.06	0.09	0.09
37	2-nonyl acetate		1244.4	1236.9	1.80	1.65	0.74	0.38	0.22	0.12
38	β-phenethyl acetate		1259.8	1260.0	0.08	0.05	0.04	0.08	0.07	0.05
39	2-methylpropyl benzoate		1327.2	1331.2	0.01	-	-	0.01	-	-
40	methyl jasmonate		1635.1	1638.0	0.13	0.16	0.29	0.24	0.17	0.17
41	benzyl benzoate		1762.5	1762.0	1.68	1.70	1.83	2.00	2.06	2.13
42	n-hexadecanoic acid methyl ester		1923.5	1923.0	0.04	0.04	0.03	0.04	0.07	0.07
<i>Ketones</i>										
43	2-pentanone		700.0	707.8	0.46	0.11	0.16	0.48	0.38	0.31
44	2-hexanone		795.5	795.4	0.01	0.01	0.01	0.01	0.03	0.03
45	2-heptanone*	Fruity, flowery ^c	893.7	890.0	0.62	0.58	0.57	0.64	1.01	1.06
46	2-octanone		994.5	992.0	-	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02
47	acetophenone	Almond-like, solvent-like ^c	1062.0	1062.0	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01	0.03
48	2-nonanone	Flowery, fruit, musty ^h	1088.6	1089.0	0.76	0.68	0.58	0.40	0.49	0.45
49	3-nonen-2-one		1141.2	1142.0	0.01	0.02	0.02	0.03	0.03	0.03

50	2-undecanone		1294.0	1291.0	0.16	0.14	0.07	0.05	-	0.01
51	6,10-dimethyl-5,9-undecadien-2-one		1454.8	1456.0	0.15	0.17	0.11	0.10	0.10	0.06
52	2-pentadecanone		1699.3	1699.0	-	-	0.31	0.33	0.55	0.55
53	2-heptadecanone		1902.6	1902.0	-	-	-	-	-	0.38
<i>Furan</i>										
54	2-ethyl-5-methylfuran		805.6	804.0	0.19	0.12	0.09	0.12	0.13	0.04
55	2-n-pentylfuran	Floral, fruit ^m	992.6	993.0	0.04	0.06	-	-	-	-
56	3-methyl-2-(2-methyl-2-butenyl)-furan		1097.9	1093.0	0.01	-	-	-	0.02	0.01
57	2-n-octylfuran		1294.3	1294.0	-	-	-	-	0.02	0.02
<i>Monoterpenes</i>										
58	β -pinene		992.5	983.0	-	-	-	0.03	0.04	-
59	p-cymene		1023.3	1023.0	-	-	0.01	-	-	-
60	D-limonene*	Citrus, orange, sweet ⁱ	1027.4	1027.0	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02
61	3-carene		1040.6	1034.0	0.03	0.02	0.02	0.03	0.01	0.02
62	γ -terpinene		1057.1	1057.0	0.02	-	-	-	-	-
63	β -cis-ocimene		1042.9	1043.0	0.01	-	-	-	-	-
64	cis-linalool oxide		1070.8	1071.0	0.03	0.02	0.05	-	-	-
65	(E)-furan linalool oxide		1070.8	1072.0	0.22	0.18	0.20	0.03	0.03	0.04

66	linalool*	Flowery ^c	1097.5	1097.6	0.15	0.14	0.13	0.11	0.07	0.08
67	p-mentha-1,5,8-triene		1130.1	1135.0	0.01	0.01	-	0.01	-	-
68	α -terpineol		1184.6	1185.0	0.09	0.09	0.08	0.07	0.06	0.04
69	cis-geraniol		1261.6	1259.0	0.06	0.05	0.03	0.05	0.03	0.03
70	β -damascenone		1381.2	1381.0	0.06	0.04	0.03	0.03	0.02	0.01
<i>Sesquiterpene</i>										
71	β -dihydroionol		1442.5	1449.2	0.01	0.02	0.01	0.01	-	-
72	γ -selinene		1472.5	1470.0	0.01	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02
73	α -guaiene		1481.8	1489.0	-	0.01	0.03	-	-	-
74	δ -guaijene		1500.8	1502.0	0.01	-	-	-	-	-
75	δ -cadinene		1521.5	1521.0	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	-
76	β -calacorene		1540.4	1532.0	-	-	0.02	0.01	0.02	-
77	α -calacorene		1541.2	1541.0	0.02	-	-	-	-	-
78	(Z)-nerolidol		1565.2	1565.0	0.02	0.04	-	-	-	-
79	γ -eudesmol	Woody ^j	1612.9	1621.0	0.53	0.56	0.60	0.40	0.33	0.22
80	muurolol		1641.9	1642.0	-	0.01	-	-	-	-
<i>Others</i>										
81	2-methyl-3-furanthiol	Broth-like ^c	869.5	869.0	0.01	0.01	0.01	-	-	-
82	5-ethyl-2-methyl-2-vinyltetrahydrofuran		911.6	910.9	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	-

7	2-heptanol	Citrus, fresh, lemon-grasslike ⁿ	904.3	901.0	0.58	0.73	0.97	0.82	0.93	1.00
8	2-ethyl-1-hexanol	Fruity ^e	1035.2	1030.0	-	-	0.04	0.04	0.07	-
9	2-nonanol		1099.6	1098.0	0.35	0.27	0.58	0.34	0.17	0.43
10	1-decanol		1278.4	1278.0	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	-
11	2-undecanol		1299.9	1303.0	0.07	0.10	0.07	0.05	0.08	-
12	1-dodecanol*		1473.6	1473.0	0.81	1.47	0.94	1.41	2.07	3.15
13	1-hexadecanol*		1880.4	1880.0	-	0.05	-	-	-	-
14	isophytol		1949.2	1949.0	0.05	0.05	0.04	-	-	-
Aldehydes										
15	hexanal*	Green ^c	807.1	807.0	0.05	0.08	0.09	0.05	0.10	0.14
16	benzaldehyde*	Almond-like ^c	960.0	960.0	0.01	0.01	0.01	0.01	0.03	0.01
17	octanal*	Citrus-like, green ^c	998.4	1000.0	0.04	0.05	0.05	0.03	0.05	0.05
18	benzeneacetaldehyde		1043.8	1044.0	-	-	0.08	-	-	-
19	(E)-2-octenal	Fatty, grassy, green ^c	1059.1	1059.0	-	0.02	-	-	-	-

20	(<i>E</i>)-2-nonenal*	Fatty, cardboard-like ^c	1160.3	1160.0	-	0.02	0.02	0.03	-	-
21	(<i>E</i>)-4-decenal		1198.1	1197.0	0.02	0.01	0.01	0.01	-	-
22	decenal*	Soapy ^c	1202.8	1203.0	0.09	0.08	0.09	0.07	0.05	0.05
23	2,4-nonadien-1-al		1213.7	1213.0	0.12	0.16	0.18	0.12	0.15	0.16
24	2(<i>E</i>)-decenal		1265.8	1265.0	0.27	0.28	0.32	0.25	0.27	0.29
25	undecanal*		1306.2	1306.0	0.06	0.05	0.06	0.04	0.04	0.04
26	(<i>E,E</i>)-2,4-decadienal	Deep fried, fatty ^c	1313.4	1313.0	0.11	0.12	0.13	0.09	0.08	0.12
27	2-undecenal	Tallowy, sweet ^f	1366.1	1366.0	0.54	0.64	0.57	0.51	0.48	0.57
28	dodecanal		1408.9	1409.0	0.14	0.16	0.14	0.12	0.10	0.13
29	(<i>E</i>)-2-dodecenal		1467.0	1467.5	0.11	0.12	0.12	0.11	0.10	0.05
30	tridecanal		1511.2	1511.0	0.01	0.02	0.02	-	-	-
31	tetradecanal		1598.9	1606.0	0.25	0.65	0.24	0.19	0.15	0.22
32	pentadecanal		1710.5	1710.0	0.06	0.07	-	-	-	-
<i>Esters</i>										
33	pentyl propanate		946.2	952.0	0.13	0.06	0.13	0.10	0.09	0.07
34	2-heptyl acetate	Fruity ^g	1043.9	1047.0	8.77	7.96	8.14	3.89	5.48	4.83
35	benzyl acetate		1164.3	1170.0	0.04	0.11	0.03	0.03	0.02	0.03
36	2-nonyl acetate		1244.4	1236.9	1.13	0.86	0.75	0.44	0.31	0.15

37	β-phenethyl acetate		1259.8	1260.0	0.02	0.03	0.05	0.04	0.04	-
38	benzenepropyl acetate		1371.6	1373.0	0.02	0.03	0.04	0.01	-	-
39	methyl jasmonate		1635.1	1638.0	0.03	0.01	0.03	0.01	0.02	0.05
40	benzyl benzoate		1762.5	1762.0	3.00	2.64	3.28	2.86	2.67	3.19
41	n-Hexadecanoic acid methyl ester		1923.5	1923.0	0.07	0.03	0.10	0.03	0.02	0.08
<i>Ketones</i>										
42	2-pentanone		700.0	707.8	0.36	0.30	0.56	0.21	0.25	-
43	2-hexanone		795.5	795.4	-	-	0.02	-	0.01	-
44	2-heptanone*	Fruity, flowery ^c	893.7	890.0	0.47	0.57	0.78	0.65	0.75	0.82
45	acetophenone	Almond-like, solvent-like ^c	1062.0	1062.0	-	-	0.04	-	-	-
46	2-nonanone	Flowery, fruit, musty ^h	1088.6	1089.0	0.47	0.45	0.53	0.28	0.37	0.31
47	2-undecanone		1294.0	1291.0	0.12	0.10	0.09	0.04	0.05	0.01
48	6,10-dimethyl-5,9-undecadien-2-one		1454.7	1456.0	0.13	0.14	0.14	-	0.04	0.08
49	2-pentadecanone		1699.3	1699.0	0.36	0.30	0.27	0.20	0.21	0.17
<i>Furan</i>										
50	2-ethyl-5-methylfuran		805.6	804.0	0.10	0.07	-	-	0.05	-
51	3-methyl-2-(2-methyl-2-butenyl)-furan		1097.9	1093.0	-	0.01	-	-	-	-

52	2-n-octylfuran		1294.3	1294.0	-	-	-	-	0.01	-
<i>Monoterpenes</i>										
56	β -pinene		992.5	983.0	0.05	-	-	-	-	-
57	D-limonene*	Citrus, orange, sweet ⁱ	1027.4	1027.0	0.03	0.03	0.03	0.02	0.03	0.03
58	3-carene		1040.6	1034.0	0.03	-	-	-	-	-
59	trans- β -ocimene*		1052.1	1052.0	-	0.02	-	-	-	-
60	linalool*	Flowery ^c	1097.5	1097.6	0.03	-	0.11	0.09	0.11	0.06
61	α -Terpineol		1184.6	1185.0	-	0.02	0.02	0.04	0.02	0.06
62	cis-geraniol		1261.6	1259.0	0.03	0.02	-	-	-	-
63	β -damascenone		1381.2	1381.0	0.05	0.05	0.06	0.05	0.05	0.06
<i>Sesquiterpene</i>										
64	β -dihydroionol		1442.5	1449.2	-	0.01	-	-	-	0.01
65	α -guaiene		1481.8	1489.0	-	-	-	0.01	0.01	-
66	δ -cadinene		1521.5	1521.0	0.01	0.01	-	-	-	-
67	D-germacrene		1522.4	1521.0	0.01	-	-	0.01	-	-
68	γ -eudesmol	Woody ^j	1612.9	1621.0	0.27	0.22	0.29	0.21	0.24	0.29
<i>Others</i>										
69	γ -nonalactone	Fruity, coconut- like ^l	1342.3	1344.0	0.79	0.88	0.87	0.81	0.69	0.73

70	(-)-cembrene A		1955.4	1960.0	0.26	0.13	0.59	-	-	-
71	thunbergene		1962.5	1964.0	1.27	0.64	1.47	1.05	-	0.86
T3 (Ultrasound)										
Group	Compound	Odor description	LRI^a_{EXP}	LRI^b_{LIT}	0 day	1 day	7 day	14 day	21 day	28 day
<i>Acids</i>										
1	octanoic acid	Green, soapy ^c	1177.6	1177.0	0.03	0.01	-	-	-	-
2	dodecanoic acid*	Rancid, fatty, metal ^d	1568.4	1568.0	-	-	-	-	0.07	0.14
3	pentadecanoic acid*		1852.9	1851.0	0.02	0.01	0.01	0.03	0.06	0.03
4	palmitic acid*		1971.3	1972.0	3.85	3.64	4.50	7.73	10.38	11.43
<i>Alcohols</i>										
5	1-hexanol*		876.3	874.0	-	-	-	-	0.02	0.05
6	2-heptanol	Citrus, fresh, lemon-grasslike ⁿ	904.3	901.0	1.60	1.38	0.79	1.46	1.85	2.30
7	1-heptanol*		977.4	975.0	-	0.01	-	0.01	-	0.02
8	2-ethyl-1-hexanol		1035.2	1030.0	-	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01
9	1-octanol*	Soapy, citrus-like, fatty ^c	1072.6	1072.0	0.01	0.06	0.05	0.04	-	-
10	2-nonanol	Fruity ^e	1099.6	1098.0	1.20	1.03	0.79	0.60	0.89	0.68

11	phenylethyl alcohol		1111.3	1114.0	-	-	-	-	0.02	0.04
12	1-nonanol*		1176.3	1176.0	0.01	0.01	0.02	0.05	0.02	0.01
13	1-decanol		1278.4	1278.0	0.04	0.04	0.04	0.05	0.03	0.01
14	2-undecanol		1299.9	1303.0	0.10	0.10	0.07	-	-	-
15	1-undecanol		1376.9	1374.4	-	-	0.01	-	-	-
16	1-dodecanol*		1473.6	1473.0	0.16	0.73	0.92	1.89	2.33	3.17
17	galaxolide		1853.9	1850.0	0.04	-	-	-	-	-
18	1-hexadecanol*		1880.4	1880.0	-	-	-	0.21	0.49	0.04
<i>Aldehydes</i>										
19	hexanal*	Green ^c	807.1	807.0	0.22	0.49	0.48	0.16	0.06	0.10
20	benzaldehyde*	Almond-like ^c	960.0	960.0	0.02	0.03	0.04	0.04	0.03	0.07
21	(<i>E</i>)-2-heptenal	Green, flowery ^c	961.9	960.0	-	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01
22	octanal*	Citrus-like, green ^c	998.4	1000.0	0.06	0.14	0.12	0.01	0.01	0.02
23	benzeneacetaldehyde		1043.8	1044.0	0.03	0.07	0.04	0.13	0.05	0.27
24	(<i>E</i>)-2-octenal	Fatty, grassy, green ^c	1059.1	1059.0	0.08	0.09	0.07	0.04	0.04	0.04
25	nonanal*	Citrus-like ^c	1104.1	1104.0	0.14	0.33	0.31	0.05	-	0.06

26	(E)-2-nonenal*	Fatty, cardboard-like ^c	1160.3	1160.0	0.07	0.08	0.05	0.03	0.03	0.04
27	(E)-4-decenal		1198.1	1197.0	0.01	0.03	0.02	-	-	-
28	decenal*	Soapy ^c	1202.8	1203.0	0.07	0.15	0.14	0.03	0.01	0.02
29	2,4-nonadien-1-al		1213.7	1213.0	0.11	0.38	0.27	-	-	0.02
30	2(E)-decenal		1265.8	1265.0	0.26	0.63	0.46	0.14	0.06	0.18
31	undecanal*		1306.2	1306.0	0.02	0.06	0.10	0.01	-	-
32	(E,E)-2,4-decadienal	Deep fried, fatty ^c	1313.4	1313.0	0.40	0.38	0.21	0.07	0.21	-
33	2-undecenal	Tallowy, sweet ^f	1366.1	1366.0	0.42	0.69	0.79	0.31	0.13	0.35
34	dodecanal		1408.9	1409.0	0.12	0.18	0.16	0.06	0.03	0.05
35	(E)-2-dodecenal		1467.0	1467.5	0.07	0.17	0.12	0.04	-	0.04
36	tridecanal		1511.2	1511.0	0.01	0.04	0.03	-	-	-
37	tetradecanal		1598.9	1606.0	0.15	0.24	0.24	0.14	0.02	-
38	pentadecanal		1710.5	1710.0	0.04	0.07	0.07	0.05	0.02	0.04
<i>Esters</i>										
39	pentyl propanate		946.2	952.0	0.14	0.13	0.10	0.05	0.09	0.05
40	2-heptyl acetate	Fruity ^g	1043.9	1047.0	9.83	9.05	7.81	7.54	6.96	4.02
41	benzyl acetate		1164.3	1170.0	0.15	0.15	0.11	0.06	0.01	0.01

42	2-nonyl acetate		1244.4	1236.9	1.07	1.15	0.56	0.12	0.10	0.04
43	β-phenethyl acetate		1259.8	1260.0	0.09	0.09	0.05	0.02	0.01	0.03
44	3-hydroxy-2,2,4-trimethylpentyl isobutyrate		1372.0	1380.0	-	-	-	-	-	0.05
45	decanol acetate		1413.3	1409.0	-	-	-	0.01	-	-
46	methyl jasmonate		1635.1	1638.0	0.28	0.09	0.12	0.08	0.09	0.17
47	benzyl benzoate		1762.5	1762.0	2.38	2.62	2.77	2.05	0.90	0.60
48	n-Hexadecanoic acid methyl ester		1923.5	1923.0	0.06	0.06	0.04	-	-	-
<i>Ketones</i>										
49	2-pentanone		700.0	707.8	0.52	0.82	0.48	0.89	0.81	2.06
50	2-hexanone		795.5	795.4	0.04	0.04	0.03	0.05	0.04	0.07
51	2-heptanone*	Fruity, flowery ^c	893.7	890.0	1.61	1.54	1.57	1.87	2.12	2.08
52	2-octanone		994.5	992.0	0.05	0.05	0.04	0.02	0.03	0.01
53	acetophenone	Almond-like, solvent-like ^c	1062.0	1062.0	-	-	-	-	-	0.03
54	2-nonanone	Flowery, fruit, musty ^h	1088.6	1089.0	1.27	1.10	0.91	0.58	0.65	0.52
55	3-nonen-2-one		1141.2	1142.0	0.04	0.04	0.02	-	0.01	-
56	2-undecanone		1294.0	1291.0	0.16	0.16	0.05	0.01	0.01	-
57	6,10-dimethyl-5,9-undecadien-2- one		1454.8	1456.0	0.12	0.22	0.15	0.05	0.04	0.01

58	2-pentadecanone		1699.3	1699.0	-	-	-	-	-	0.37
<i>Furan</i>										
59	2-ethyl-5-methylfuran		805.6	804.0	0.41	0.46	0.43	0.33	0.28	0.13
60	2-n-pentylfuran	Floral, fruit ^m	992.6	993.0	0.10	0.21	0.14	0.03	-	-
61	3-methyl-2-(2-methyl-2-butenyl)-furan		1097.9	1093.0	0.02	-	0.01	-	0.01	-
<i>Monoterpenes</i>										
62	p-cymene		1023.3	1023.0	0.01	0.01	0.01	-	-	-
63	D-limonene*	Citrus, orange, sweet ⁱ	1027.4	1027.0	0.03	0.02	0.02	0.01	0.02	0.01
64	3-carene		1040.6	1034.0	0.04	0.04	0.03	0.01	0.02	-
65	trans- β -ocimene*		1052.1	1052.0	-	-	-	-	-	0.02
66	linalool*	Flowery ^c	1097.5	1097.6	0.06	0.09	0.06	0.03	0.05	0.02
67	1,3,8-p-menthatriene		1122.0	1118.7	0.03	-	-	-	-	-
68	α -Terpineol		1184.6	1185.0	0.05	0.05	0.03	0.01	0.02	0.02
69	cis-geraniol		1261.6	1259.0	0.02	0.03	-	-	-	-
70	β -damascenone		1381.2	1381.0	0.02	0.01	-	-	-	-
<i>Sesquiterpene</i>										
71	β -dihydroionol		1442.5	1449.2	-	0.01	-	-	-	-
72	(E)- β -farnesene		1456.3	1457.0	-	-	-	-	0.01	0.01

73	γ -selinene		1472.5	1470.0	0.01	0.03	-	-	-	-
74	α -guaiene		1481.8	1489.0	-	-	0.01	-	-	-
75	D-germacrene		1522.4	1521.0	-	-	-	-	-	0.01
76	α -calacorene		1541.2	1541.0	0.01	0.01	0.01	-	-	-
77	γ -eudesmol	Woody ^j	1612.9	1621.0	0.25	0.16	0.20	-	-	0.07
<i>Others</i>										
78	2-methyl-3-furanthiol	Broth-like ^c	869.5	869.0	0.03	0.02	0.02	-	0.03	0.01
79	5-ethyl-2-methyl-2-vinyltetrahydrofuran		911.6	910.9	0.01	0.01	-	-	-	-
80	γ -nonalactone	Fruity, coconut-like ^l	1342.3	1344.0	0.91	0.96	-	-	-	0.19
81	(-)-cembrene A		1955.4	1960.0	0.22	0.18	0.13	0.20	0.22	0.16
82	thunbergene		1962.5	1964.0	1.27	1.35	1.54	-	-	0.55

*Identification confirmed by comparison with mass spectra and retention times of analytical standards. ^aLRI_{EXP}= linear retention index to the standard of n-alkanes (C₇-C₃₀) obtained in an HP-5 MS capillary column. ^bLRI_{LIT} = linear retention index published in the literature (NIST Chemistry Web Book, accessed in www.webbook.nist.gov). ^cHaase et al. (2023); ^dRodriguez-Campos et al. (2011); ^eHegmann et al. (2020); ^fChetschik et al. (2017); ^gRottiers et al. (2019); ^hUtrilla-Vázquez et al. (2020); ⁱAprotosoie et al. (2016); ^jMiyazawa et al. (2012); ^lHaase et al. (2021); ^mSpada et al. (2022); ⁿAscrizzi et al. (2017)

5. CONCLUSÃO GERAL

O mel de cacau das variedades estudadas exibiu composições físico-químicas distintas, demonstrando ser ácido e com valores significativos de sólidos solúveis totais, carboidratos, valor energético e açúcares. Com base nos dados de ingestão diária recomendada (IDR), a presença de magnésio, a alta concentração de zinco e os baixos níveis de sódio tornam o mel de cacau uma fonte nutricional valiosa, justificando o incentivo ao seu consumo.

O método otimizado HS-SPME/CG-EM aumentou a eficiência da extração, identificando 84 COVs no mel de cacau de quatro variedades. A análise sensorial indicou que PS1319 e SJ02 apresentavam perfis semelhantes, com coloração amarelada, maior viscosidade, maciez e sabor doce. O estudo concluiu que a variedade do mel de cacau afeta as concentrações de COVs e os perfis sensoriais. SJ02 e CCN51 mostraram maior aceitabilidade e intenção de compra, destacando seu potencial para a indústria alimentícia.

Por meio da análise de UHPLC-HRMS/MS foram identificados 72 compostos, com destaque para os compostos bioativos, como flavonoides, alcaloides, aminoácidos, glicosídeos e aminas bioativas. Esses compostos são reconhecidos por seus potenciais benefícios à saúde, incluindo propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e cardioprotetoras.

Os métodos de conservação, como a pasteurização térmica, pasteurização com aditivo e ultrassom de alta intensidade, mostraram-se promissores para a preservação do mel de cacau. Diante da crescente preocupação dos consumidores com a redução de aditivos e a demanda por processos sustentáveis, a tecnologia de ultrassom possui grande potencial para aplicação no processamento de mel de cacau. Este estudo oferece insights valiosos, mas futuras pesquisas devem incluir a avaliação sensorial para identificar qual método de conservação é mais aceito pelos consumidores.

Portanto, conclui-se que este estudo forneceu dados inéditos sobre as propriedades nutricionais e sensoriais do mel de cacau, contribuindo para o conhecimento sobre os benefícios e características desse subproduto. A pesquisa tem potencial para incentivar novos trabalhos e pode levar ao desenvolvimento de tecnologias que melhorem a produção e o processamento do mel de cacau, expandindo sua comercialização local e internacionalmente. Assim, para ajudar a disseminar esses resultados aos produtores de cacau, que muitas vezes não têm acesso a artigos científicos, foi elaborada uma cartilha (APÊNDICE A) explicando o que é o mel de cacau e apresentando os resultados mais relevantes obtidos de cada variedade.

REFERÊNCIAS

- AIPC. Associação Nacional das Indústrias Processadoras de Cacau. Recebimento de cacau nacional recua 37,4% no primeiro semestre de 2024. Disponível em: <https://aipc.com.br/recebimento-de-cacau-nacional-recua-374-no-primeiro-semester-de-2024-2/>. Acesso em 14 de julho de 2024.
- AFOAKWA, E.O. Chocolate science and technology, 2nd ed.; Wiley-Blackwell Publishers: Chichester, UK, ISBN 978-1-118-91378-9, 2016.
- AKOA, S.P. *et al.* Identification of methylxanthines and phenolic compounds by uplc-dad-esi-ms otof and antioxidant capacities of beans and dark chocolate bars from three trinitario×forastero cocoa (*Theobroma cacao*L.) hybrids. **Journal of Food Research**, v. 10, n. 2, 2021. <https://doi.org/10.5539/jfr.v10n2p32>.
- ALEXANDRE, R. S. *et al.* Caracterização de frutos de clones de cacaueiros na região litorânea de São Mateus, ES. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 19, n. 8, p.785-790. 2015. <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v19n8p785-790>.
- ALIM, M.A. *et al.* Study on stability of antioxidant activity of fresh, pasteurized, and commercial fruit juice during refrigerated storage. **Food and Humanity**, v.1, 1117-1124, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.foohum.2023.09.008>.
- ANDRADE, A.B. *et al.* Influence of underfermented cocoa mass in chocolate production: Sensory acceptance and volatile profile characterization during the processing. **LWT-Food Sci. Technol**, v.149, 112048, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112048>.
- ANORAGA, S. B. *et al.* Cocoa by-products: A comprehensive review on potential uses, waste management, and emerging green technologies for cocoa pod husk utilization. **Heliyon**, v.10, e35537, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e35537>.
- ATUONWU, J.C. *et al.* Comparative assessment of innovative and conventional food preservation technologies: Process energy performance and greenhouse gas emissions. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 50, 174-187, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.09.008>.
- AWAD, T.S. *et al.* Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. **Food Research International**, v.48, n.2, 410-427, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.05.004>.
- BALARAM, V. Microwave plasma atomic emission spectrometry (MP AES) and its applications – A critical review. **Microchemical Journal**, v.159, 105483, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105483>.
- BALCÁZAR-ZUMAETA, C.R. *et al.* Amino acid profile behavior during the fermentation of Criollo cocoa beans. **Food Chemistry: X**, v. 22, n.30, 101486, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.101486>.
- BARBOSA, C.M.D. *et al.* Automation of an alternative process of milk pasteurization using on-off control action. **Revista de Engenharia e Tecnologia**, v. 10, n.1, 2018.

- BECERRA, L.D. *et al.* Modulating fine flavor cocoa attributes: Impact of seed-to-bean transformation under controlled conditions on metabolite, volatile and sensory profiles. **Food Research International**, v.196, 115109, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.115109>.
- BERMÚDEZ, S.; VOORA, V.; LARREA, C.; LUNA, E. (2022). Global market report: Cocoa prices and sustainability. IISD - International Institute for Sustainable Development. Disponível em: <https://www.iisd.org/publications/report/2022-global-market-report-cocoa>. Acesso em: 01 de novembro de 2024.
- BHAT, R.; GOH, K.M. Sonication treatment convalesce the overall quality of hand-pressed strawberry juice. **Food Chemistry**, v. 215, n. 15, 470-476, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.160>.
- BHUNIA, K. *et al.* Microwave-based sustainable in-container thermal pasteurization and sterilization technologies for foods. **Sustainable Food Technology**, v. 2, n. 4, 926-944, 2024. <https://doi.org/10.1039/d3fb00176h>.
- BOZZA, D. *et al.* Untargeted metabolomics approaches for the characterization of cereals and their derived products by means of liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. **Journal of Chromatography Open**, v.6, 100168, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.jcoa.2024.100168>.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2005). Resolução RDC nº 269 de 22 de setembro de 2005. O "Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais". Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/rdc0269_22_09_2005.html. Acesso em: 14 de maio de 2024.
- CAMPOS-VEGA, R.; NIETO-FIGUEROA, K.H.; OOMAH, B.D. Cocoa *Theobroma cacao* L. casca de vagem: fonte renovável de compostos bioativos. **Trends in Food Science & Technology**, v.81, 172–184, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.022>.
- CARNELOCCE, L. *et al.* Análise descritiva por ordenação: aplicação na caracterização sensorial de biscoitos laminados salgados. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 4, 288-299, 2012. <https://doi.org/10.1590/S1981-67232012005000022>.
- CARRADORE, C. A história do cacau. (2019). Disponível em: <https://forumdocacau.com.br/a-historia-do-cacau/>. Acesso em: 30 de setembro de 2024.
- CASTELLI, Escola de Chocolateria. (2021). Cacau. Origens e Grupos. Disponível em: <https://castelliescolachocolateria.com.br/blog/cacau--origens-e-grupos#:~:text=%2D%20Cacau%20Forastero%3A%20Abrange%20os%20tipos,introduzido%20na%20Bahia%20em%201746>. Acesso em: 30 de setembro de 2024.
- CINAR, Z.O. *et al.* Cocoa and cocoa bean shells role in human health: Na updated review. **Journal of Food Composition and Analysis**, 103, 104115, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104115>.
- CHAVAN, P. *et al.* Application of High-Intensity Ultrasound to Improve Food Processing Efficiency: A Review. **Foods**, v.11, n.1, 122, 2022. <https://doi.org/10.3390/foods11010122>.

CHONG, G.T.F. Jean-Anthelme Brillat-Savarin's 1825 treatise on the mouth and ingestion. **Singapore Dental Journal**, v.33, n.1, 31–36, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.sdj.2012.10.002>.

COELHO, R.D. Brasil de Fato mostra em documentário como vivem os trabalhadores do cacau esquecidos pela Globo em Renascer. 2024. Disponível em: <https://www.brasildefato.com.br/2024/02/01/brasil-de-fato-mostra-em-documentario-como-vivem-os-trabalhadores-do-cacau-esquecidos-pela-globo-em-renascer#:~:text=S%C3%A3o%20tr%C3%AAs%20as%20moageiras%20estrangeiras,do%20cacau%20produzido%20no%20pa%C3%ADs>. Acesso em: 23 de outubro de 2024.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Fundamentos de cromatografia. 1 ed. Editora Unicamp, 2006.

CORTEZ, D. *et al.* From the seed to the cocoa liquor: Traceability of bioactive compounds during the postharvest process of cocoa in Amazonas-Peru. **Microchemical Journal**, v.201, 110607, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.110607>.

DEUS, V.L. *et al.* Understanding amino acids and bioactive amines changes during on-farm cocoa fermentation. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 97, 103776, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103776>.

DIAS, L. A. S. *et al.* Período mínimo de colheita para avaliação de cultivares de cacau em Linhares-ES. **Sociedade de Investigações Florestais**, v.27, n.4, 495-501, 2003.

DIAS, L. A. S. Origem e dispersão de *Theobroma cacao* L.: um novo cenário. In: DIAS, L. A. S. (Ed.). Melhoramento genético do cacaueiro. Viçosa: Funape, 2001.

DOLAS, R.; SARAVANAN, C.; KAUR, B.P. Emergence and era of ultrasonic's in fruit juice preservation: A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 58, 104609, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.05.026>.

DONATTI, J.K. *et al.* Aproveitamento do subproduto “Mel de Cacau” para produção de bebida alcoólica fermentada / Use of the “Cocoa Honey” by-product for the production of fermented alcoholic Beverage. **Brazilian Journal of Development**, v.7, n.6, 57956–57970, 2021. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n6-276>.

DUTCOSKY, S.D. Análise Sensorial de Alimentos, 5th ed.; Coleção Exatas; PUCPRESS: Curitiba, Brazil, 2019.

EFRAIM, P.; ALVES, A. B.; JARDIM, D. C. P. Revisão: Polifenóis em cacau e derivados. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 3, 81-201, 2011. <https://doi.org/10.4260/BJFT2011140300023>.

EFSA. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Technical Report on the notification of pulp from *Theobroma cacao* L. as a traditional food from a third country pursuant to Article 14 of Regulation (EU) 2015/2283. EFSA Supporting Publications, v. 16, p. 1724E, 2019.

EVANS, A.M. *et al.* High resolution mass spectrometry improves data quantity and quality as compared to unit mass resolution mass spectrometry in highthroughput profiling metabolomics, **Metabolomics**, v.4, n.2, 1000132, 2014. <https://doi.org/10.4172/2153-0769>.

IAL. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Análise sensorial. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos, 1º ed digital, 2008.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2024). Produção de cacau. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/cacau/pa>. Acesso em: 14 de setembro de 2024.

ICCO. International Cocoa Organization. (2024). Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics, Vol. L, No. 1, Cocoa Year 2023/24. Disponível em: https://www.icco.org/wp-content/uploads/Production_QBCS-L-No.-1.pdf. Acesso em: 29 de setembro de 2024.

FANG, S. *et al.* Recent developments on solid phase microextraction (SPME) coatings for *in vivo* analysis. **Green Analytical Chemistry**, v. 6, 100069, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.greeac.2023.100069>.

FAPESP. Resíduo do cacau é transformado em matéria-prima para cosméticos. 2022. Disponível em: <https://agencia.fapesp.br/residuo-do-cacau-e-transformado-em-materia-prima-de-cosmeticos/38731>. Acesso em: 22 de outubro de 2024.

FARAG M. A. *et al.* Dietary macrominerals: Updated review of their role and orchestration in human nutrition throughout the life cycle with sex differences. **Current Research in Food Science**, v.6, 100450, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2023.100450>.

FENG, Y. *et al.* A mechanistic review on machine learning-supported detection and analysis of volatile organic compounds for food quality and safety. **Trends in Food Science & Technology**, 143, 104297, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.104297>.

FIGUEROA, K. H. N.; GARCÍA, N. V. M.; VEGA, R.C. Cocoa by-products. food wastes and by-products: nutraceutical and health potential, First Edition. Edited by Rocio Campos-Vega, B. Dave Oomah, and Haydé Azeneth Vergara-Castañeda. John Wiley & Sons Ltd., 373–411, 2020. <https://doi.org/10.1002/9781119534167.ch13>.

FIOROTO, A.M. *et al.* Mineral nutrients and protein composition of non-conventional food plants (*Pereskia aculeata* Miller, *Sonchus oleraceus* L. and *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 136, 106825, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2024.106825>.

FIRDAUS, F.; DESMIARTI, R.; PRAPUTRI, E.; AMIR, A. Production of cocoa pulp syrup by utilizing local sugar sources. **Journal of Applied Agricultural Science and Technology**, v.6, n.2, 149–161, 2022. <https://doi.org/10.55043/jaast.v6i2.70>.

FONTOURA, B.M. *et al.* Is MIP OES a suitable alternative to ICP OES for trace element analysis? **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.37, 966-984, 2022. <https://doi.org/10.1039/D1JA00375E>.

GAFFNEY, J.S.; MARLEY, N.A. Chapter 15 - Chemical Measurements and Instrumentation. **General Chemistry for Engineers**, 493-532, 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-810425-5.00015-1>.

GAO, X. *et al.* Ougan juice debittering using ultrasound-aided enzymatic hydrolysis: Impacts on aroma and taste. **Food Chemistry**, v. 345, 128767, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128767>.

GARCÍA-DÍEZ, E. *et al.* Exploring a cocoa–carob blend as a functional food with decreased bitterness: Characterization and sensory analysis. **LWT**, v. 165, 113708, 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113708>.

GARCÍA, Y.M. *et al.* Extração e análise de compostos orgânicos voláteis por SPME-HS e GC-MS – um breve referencial teórico. *Ciências Agrárias: o avanço da ciência no Brasil – v.1*, 67-83, 2021. Publisher: Editora Científica Digital. <https://doi.org/10.37885/210504640>.

GOYA, L.; KONGOR, J. E.; PASCUAL-TERESA, S. From cocoa to chocolate: effect of processing on flavanols and methylxanthines and their mechanisms of action. **International Journal of Molecular Sciences**, v.23, n.22, 14365, 2022.

<https://doi.org/10.3390/ijms232214365>.

GRANATO, D.; CALADO, V.M.A.; JARVIS, B. Observations on the use of statistical methods in Food Science and Technology. **Food Research International**, v. 55, 137-149, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.024>.

GUIRLANDA, C.P. *et al.* Atomization of cocoa honey using whey protein isolate to produce a dry formulation with improved shelf life for industrial application. **Foods**, v.12, n;23, 4269, 2023. <https://doi.org/10.3390/foods12234269>.

GUIRLANDA, C.P. *et al.* Cocoa honey: Agroindustrial waste or underutilized cocoa by-product? **Future Foods**, v.4, 100061, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2021.100061>.

HARUNA, L. *et al.* Effect of partial pulp removal and fermentation duration on drying behavior, nib acidification, fermentation quality, and flavor attributes of Ghanaian cocoa beans. **Journal of Agriculture and Food Research**, v.17, 101211, 2024.

<https://doi.org/10.1016/j.jafr.2024.101211>.

HASHEMINYA, S.M.; DEHGHANNYA, J. Non-thermal processing of black carrot juice using ultrasound: Intensification of bioactive compounds and microbiological quality. **Institute of Food Science & Technology**, v.57, n.9, 5848-5858, 2022.

<https://doi.org/10.1111/ijfs.15901>.

HEGMANN, E. *et al.* Besides variety, also season and ripening stage have a major influence on fruit pulp aroma of cacao (*Theobroma cacao* L.). **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v. 93, 266–275, 2020. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2020.093.033>.

HERRERA-ROCHA, F. *et al.* Bioactive and flavor compounds in cocoa liquor and their traceability over the major steps of cocoa post-harvesting processes. **Food Chemistry**, v.435, 137529, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137529>.

HIRSCHAUER, P. *et al.* Integrated interferometers as a new platform for low cost gas chromatography detection. **Talanta**, v. 281, 126659, 2025.

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2024.126659>.

JALILI, V., BARKHORDARI, A., GHIAVAND, A. A comprehensive look at solid-phase microextraction technique: A review of reviews. **Microchemical Journal**, v. 152, 104319, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104319>.

KEERTHANA, S. *et al.* Recent advances in solid phase microextraction with various geometries in environmental analysis. **RSC Advances**, v.14, n.38, 27608-27621, 2024. <https://doi.org/10.1039/d4ra03251a>.

KNORR, D. *et al.* Emerging technologies in food processing. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 2, 203–235, 2011. <https://doi.org/10.1146/annurev.food.102308.124129>.

KOELHER, B.T.A., *et al.* Applicability of *Saccharomyces cerevisiae* strains for the production of fruit wines using cocoa honey complemented with cocoa pulp. **Food Technology and Biotechnology**, v.60, n.2, 192–201, 2022. <https://doi.org/10.17113/ftb.60.02.22.7285>.

KWIK-URIBE, C. Potential Health Benefits of Cocoa Flavanols. **The Manufacturing Confectioner**, v. 85, n. 10, 43-49, 2005.

LAAKSONEN, O. *et al.* Sensory properties and consumer characteristics contributing to liking of berries. **Food Quality and Preference**, v.53, 117-126, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2016.06.004>.

LANÇAS, F.M. Espectrometria de Massas: Fundamentos, Instrumentação e Aplicações. Editora Átomo, São Paulo, 2019.

LANNES, S.C.D.S. *et al.* Composição alimentícia contendo "mel de cacau". Universidade de São Paulo (USP, São Paulo, Brasil) e Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB, Bahia, Brasil), 2013. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/BR102013005053B1>. Acesso em: 20 de outubro de 2024.

LAVANHOLE, D. F. *et al.* Ecofisiologia da germinação dos genótipos de *Theobroma cacao* L. Iheringia, Série Botânica, v. 74, e2019007, 2019. <https://doi.org/10.21826/2446-82312019v74e2019007>.

LAWLESS, H. T., & HEYMANN, H. Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices. New York, NY: Springer, 2010.

LEITE, P.B. *et al.* Cocoa's residual honey: physicochemical characterization and potential as a fermentative substrate by *Saccharomyces cerevisiae* AWRI726. **Scientific World Journal**, 5698089, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/5698089>.

LEONG, T. *et al.* The fundamentals of power ultrasound– a review. **Acoustics Australia**, v.39, n.2, 54-63, 2011.

LEPAUS, B.M. *et al.* Impact of ultrasound processing on the nutritional components of fruit and vegetable juices. **Trends in Food Science & Technology**, v.138, 752-765, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.07.002>.

LI, A.J.; PAL, V.K.; KANNAN, K. A review of environmental occurrence, toxicity, biotransformation and biomonitoring of volatile organic compounds. **Environmental Chemistry and Ecotoxicology**, v.3, 91-116, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.enceco.2021.01.001>.

- LIMA, G.V.S. *et al.* Impact of post-harvest processing and roasting conditions on the physicochemical properties, phenolic compounds, and antioxidant capacity of cocoa beans from the Brazilian Amazon. **LWT**, v. 210, 116825, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116825>.
- LIN, H. *et al.* Overview of advanced technologies for volatile organic compounds measurement in food quality and safety. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 63, n.26, 8226-8248, 2022. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2056573>.
- MACÊDO, M. *et al.* Avaliação de clones de cacau quanto a produtividade e incidência de vassoura de bruxa e podridão parda. **Agrotrópica**, v. 33, n. 1, p. 5-16, 2021. <https://doi.org/10.21757/0103-3816.2021v33n1p5-16>.
- MAITRE, M. *et al.* Tryptophan metabolites modify brain A β peptide degradation: A role in Alzheimer's disease? **Progress in Neurobiology**, v. 190, 101800, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2020.101800>.
- MANDARINO, E.P.; GOMES, A.R.S. Produtividade do cacau (*Theobroma cacao* L.) cultivados em blocos monoclonais, no sul da Bahia, Brasil. **Boletim técnico CEPLAC**, v. 30, n. 197, 5-30, 2009.
- MARSZALEK, K. *et al.* High pressure processing and thermal pasteurization of strawberry puree: quality parameters and shelf life evaluation during cold storage. **Journal of Food Science and Technology**, v.54, n.3, 832-841, 2017. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2529-4>
- MARTINEZ-VELASCO, J.D.; FILOMENA-AMBROSIO, A.; GARZÓN-CASTRO, C.L. Technological tools for the measurement of sensory characteristics in food: A review. **F1000 Research**, v. 12, 340, 2024. <https://doi.org/10.12688/f1000research.131914.2>.
- MARTÍN, M.A.; RAMOS, S. Health beneficial effects of cocoa phenolic compounds: a mini-review. **Current Opinion in Food Science**, v.14, 20-25, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.12.002>.
- MEHTA, N. S. J. *et al.* Ultrasound-Assisted extraction and the encapsulation of bioactive components for food applications. **Foods**, v.11, n.19, 2973, 2022. <https://doi.org/10.3390/foods11192973>.
- MERCADO DO CACAU. (2024). São necessárias duas safras com produção de 2 milhões de toneladas para suprir déficit global de cacau. Disponível em: <https://mercadodocacau.com.br/sao-necessarias-duas-safras-com-producao-de-2-milhoes-de-toneladas-para-suprir-deficit-global-de-cacau/>. Acesso em: 26 de setembro de 2024.
- MEZA-SEPÚLVEDA, D. C.; HERNÁNDEZ-URREA, C.; QUINTERO-SAAVEDRA, J. I. Physicochemical characterization of the pod husk of *Theobroma cacao* L. of clones CCN51, FEAR5, and FSV41 and its agroindustrial application. **Heliyon**, v.10, e28761, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e28761>.
- MISHRA, K. *et al.* Valorization of cocoa pod side streams improves nutritional and sustainability aspects of chocolate. **Nature Food**, v.5, 423–432, 2024. <https://doi.org/10.1038/s43016-024-00967-2>.

- MORETTI, L.K. *et al.* Influence of cocoa varieties on carbohydrate composition and enzymatic activity of cocoa pulp. **Food Research International**, v.173, 113393, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113393>.
- MORRIS, A.L.; MOHIUDDIN, S.S. Biochemistry, nutrients. In *Statpearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2020.
- MOTA-GUTIERREZ, J. *et al.* Influence of Taxonomic and Functional Content of Microbial Communities on the Quality of Fermented Cocoa Pulp-Bean Mass. **Applied Environmental Microbiology**, v.87, e00425-21, 2021. <https://doi.org/10.1128/AEM.00425-21>.
- NABI, B.G. *et al.* Application of ultrasound technology for the effective management of waste from fruit and vegetable. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.102, 106744, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2023.106744>.
- NASCIMENTO, R. F. *et al.* Cromatografia gasosa: aspectos teóricos e práticos. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2018.
- NONGLAIT, D.L. *et al.* Emerging non-thermal technologies for enhanced quality and safety of fruit juices. **International Journal of Food Science and Technology**, v.57, n.10, 6368-6377, 2022. <https://doi.org/10.1111/ijfs.16017>.
- NORA, F.M.D. Análise Sensorial Clássica: Fundamentos e Métodos. Canoas – RS, Mérida Publishers, 2021. <https://doi.org/10.4322/mp.978-65-994457-0-5.c3>. Disponível em: <https://meridapublishers.com/111analise/111analise.pdf>. Acesso em: 05 de outubro de 2024.
- NUNES, C.S.O. *et al.* Potential applicability of cocoa pulp (*Theobroma cacao* L.) as na adjunct for beer production. **Scientific World Journal**, 3192585, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/3192585>.
- NÚÑEZ, N.; SAURINA, J.; NÚÑEZ, O. Polyphenolic profiling of coffee beverages by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry for classification and characterization. **Microchemical Journal**, v.207, 111770, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.111770>.
- OLIVEIRA, R.S. *et al.* Bebida obtida a partir do mel do cacau e respectivo processo de fabricação da referida bebida. BR 102019008474-0 A2, 2019. Disponível em: <https://patentimages.storage.googleapis.com/c7/f4/37/cd9fbbe7391935/BR102019008474A2.pdf>. Acesso em: 21 de outubro de 2024.
- OLWIG, M.F. *et al.* Introduction: climate, cocoa and trees. In M.F. Olwig, A.S. Bosselmann and K. Owusu (eds), *Agroforestry as climate change adaptation: the case of cocoa farming in Ghana*. London, UK: Palgrave Macmillan, Cham., 2024.
- PAGLIARI, S. *et al.* Extraction of methylxanthines by pressurized hot water extraction from cocoa shell by-product as natural source of functional ingredient. **LWT**, v.170, 114115, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114115>.
- PRIYADARSHINI, A.; PRIYADARSHINI, P. 2 Chapter 2 - Market Dimensions of the Fruit Juice Industry. *Fruit Juices Extraction, Composition, Quality and Analysis*, 15-32, 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802230-6.00002-3>.

PUTNIK, P. *et al.* Comparing the effects of thermal and non-thermal technologies on pomegranate juice quality: A review. **Food Chemistry**, v. 279, 150-161, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.131>.

QUEIROGA, V.P. *et al.* Cacau (*Theobroma cacao* L.) Orgânico Sombreado Tecnologias de Plantio e Produção da Amêndoa Fina, 1st ed.; AREPB: Campina Grande, Brasil, 2021.

QUICENO SUÁREZ, A. *et al.* Subprodutos da agroindústria cacaueira: materiais de alto valor agregado a partir de sua caracterização bromatológica e química. **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín**, v. 1, 10585–10599, 2024. <https://doi.org/10.15446/rfnam.v77n1.107738>.

RAVIKUMAR, M. *et al.* Ultrasonication: an advanced technology for food preservation. **International Journal of Pure & Applied Bioscience**, v.5, n.6, 363-371, 2017. <http://dx.doi.org/10.18782/2320-7051.5481>.

RICHTER, V.B.; ALMEIDA, T.C.A.; PRUDENCIO, S.H.; BENASSI, M.T. Proposing a ranking descriptive sensory method. **Food Quality and Preference**, v.21, 611–620, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.food-qual.2010.03.011>.

ROCHA, A. A. *et al.* Aerosol dilution as a new sample introduction strategy for microwave-induced plasma optical emission spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v.1140, 41-49, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.10.008>.

RODRIGUES, L.B.O. Produção de cerveja artesanal utilizando mel de cacau como adjunto. BR102019008742A2, 2019. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/BR102019008742A2/pt?q=BR+102019008742>. Acesso em: 19 de outubro de 2024.

ROJAS, E.O. *et al.* Evaluación del método de extracción SPME-GC-MS para el análisis de compuestos orgánicos volátiles en licor de cacao de Nariño-Colombia. **Revista ION**, v.35, n.1, 103–116, 2022. <https://doi.org/10.18273/revion.v35n1-2022007>.

ROOBAB, U. *et al.* An updated overview of ultrasound-based interventions on bioactive compounds and quality of fruit juices. **Journal of Agriculture and Food Research**, v.14, 100864, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100864>.

SÁNCHEZ, M. *et al.* Ohmic heating-based extraction of biocompounds from cocoa bean shell. **Food Bioscience**, v. 54, 102886, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102886>.

SANTANDER MUÑOZ, M. *et al.* An overview of the physical and biochemical transformation of cocoa seeds to beans and to chocolate: Flavor formation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.60, n.10, 1593–1613, 2020. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1581726>.

SANTOS, C.C. Estudos interdisciplinares nas ciências exatas e da terra e engenharias. Ponta Grossa, PR: Atena Editora, v.3, 2019.

SANTOS, C.O. *et al.* Use of “cocoa honey” (*Theobroma cacao* L.) for diet jelly preparation: Na alternative technology. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.36, n.3, 640-648, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-2945-042/13>.

SÃO JOSÉ, J.F.B. *et al.* Decontamination by ultrasound application in fresh fruits and vegetables. **Food Control**, v. 45, 36–50, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.04.015>.

SCAMPINI, A.L.C. Processo de produção de aguardente pela preparação, fermentação e destilação do mel de cacau. BR102018016061-3A2, 2020. Disponível em:

[https://patents.google.com/patent/BR102018016061A2/pt?q=\(aguardente\)&oq=scampini+aguardente](https://patents.google.com/patent/BR102018016061A2/pt?q=(aguardente)&oq=scampini+aguardente). Acesso em: 20 de outubro de 2024.

SHANKAR, H.; PAUL S. Potential adverse ultrasound-related biological effects: A critical review. **Anesthesiology**, v.115, n. 5, 1109 – 1124, 2011.

<https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e31822fd1f1>.

SERRA, W.S.; SODRÉ, G.A. Manual do Cacauicultor: Perguntas e Respostas. Brasil. Ilhéus, BA, CEPLAC/CEPEC. Boletim Técnico, n. 221. 190p., 2021 Disponível em:

https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/ceplac/publicacoes/boletins-tecnicos-bahia/boletim-tecnico-no-221-2021_compressed.pdf. Acesso em: 28 de setembro de 2024.

SILVA, E. N. *et al.* Nutritional value and antioxidant capacity of “cocoa honey” (*Theobroma cacao* L.). **Food Science and Technology**, v.34, n.4, 755–759, 2014.

<http://dx.doi.org/10.1590/1678-457X.6447>.

SILVEIRA, P.T.S. *et al.* Influence of variety and harvest on the sensory characteristics of chocolate made from cocoa fermented with different pulp contents. **LWT**, v. 210, 116768, 2024.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116768>.

SINGH, P.; PANDEY, S.; MANIK, S. A comprehensive review of the dairy pasteurization process using machine learning models. **Food Control**, v. 164, 110574, 2024.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.110574>.

SOUSA, J.M.B. *et al.* Sugar profile, physicochemical and sensory aspects of monofloral honeys produced by different stingless bee species in Brazilian semi-arid region. **LWT – Food Science and Technology**, 65, 645-651, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.058>.

SOUZA-SILVA, E.A.; GIONFRIDDO, E.; PAWLISZYN, J. A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices II. Food analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v.71, 236-248, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.018>.

STAGNATI, L. *et al.* Cocoa beans and liquor fingerprinting: A real case involving SSR profiling of CCN51 and “Nacional” varieties. **Food Control**, v.118, 107392, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107392>.

STONE, H.; SIDEL, J.L. Quantitative descriptive analysis: developments, application, and the future. *Food Technology*, Chicago, v. 52, p. 48-52, 1998.

THOMPSON, S.O.; ROUGH, S.L. The densification of cocoa bean shells for bioenergy purposes. **Biomass and Bioenergy**, v. 148, 106057, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106057>.

TORREZAN, R. Conservação por aditivos. Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2021.

Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao->

[tecnologica/tematicas/tecnologia-de-alimentos/processos/tipos-de-processos/conservacao-por-aditivos](#). Acesso em: 21 de outubro de 2024.

VÁSQUEZ, Z.S. *et al.* Biotechnological approaches for cocoa waste management: a review. **Waste Management**, v. 90, 72–83, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.04.030>.

VEJA, C.; KWIK-URIBE, C. 2 - *Theobroma cacao* - An Introduction to the Plant, Its Composition, Uses, and Health Benefits. Cocoa Butter and Related Compounds, 35-62, 2012. <https://doi.org/10.1016/B978-0-9830791-2-5.50005-0>.

YULIANAA, N. *et al.* Total microbe, physicochemical property, and antioxidative activity during fermentation of cocoa honey into kombucha functional drink. **Applied Food Research**, 3, 100297, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2023.100297>.

YU, P.; LOW, M. Y.; ZHOU, W. Development of a partial least squares-artificial neural network (PLS-ANN) hybrid model for the prediction of consumer liking scores of ready-to-drink green tea beverages. **Food Research International**, v. 103, p. 68-75, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.015>.

PRODUÇÃO TÉCNICO CIENTÍFICA (2020-2024)

Artigos publicados

NASCIMENTO, M. B.; AMORIM, L. R.; NONATO, M. A. S.; ROSELINO, M. N.; SANTANA, L. R. R.; FERREIRA, A.C.R.; RODRIGUES, F.M.; MESQUITA, P.R.R.; SOARES, S.E. Optimization of HS-SPME/GC-MS method for determining volatile organic compounds and sensory profile in cocoa honey from different cocoa varieties (*Theobroma cacao* L.). **Molecules**, v.29, n.13, 3194, 2024. <https://doi.org/10.3390/molecules29133194>.

NASCIMENTO, M.B.; SOUZA, T.L.; MAIA, D.L.S.; AMORIM, L.R.; RIBEIRO, A.S.L.; MAMEDE, M.E.O.; MACIEL, L.F.; SANTOS JÚNIOR, A.F.; MESQUITA, P.R.R.; SOARES, S.E. Determination of mineral profile using MIP OES and physicochemical composition of cocoa honey from different cocoa varieties (*Theobroma cacao* L.). **Food Analytical Methods**, v.17, 1195-1207, 2024. <https://doi.org/10.1007/s12161-024-02640-7>.

NASCIMENTO, M. B.; PAULINO, B.N.; SILVA, S.B.; DEEGAN, K.R.; ALENCAR, J.C.G.; FERREIRA, A.C.R.; RODRIGUES, F.M.; MESQUITA, P.R.R.; SOARES, S.E. Multivariate analysis to evaluate the storage time of cocoa honey (*Theobroma Cacao* L.) processed by pasteurization and high intensity ultrasound. **Food Chemistry**, 473, 143057, 2025.

Trabalhos apresentados em Congressos Nacionais e Internacionais

NASCIMENTO, M.B.; SANTOS, T. C.; AMORIM, L. R.; MACIEL, L. F.; SANTOS JUNIOR, A. F.; MESQUITA, P. R. R.; SOARES, S. E. Determination of minerals by MIP OES and evaluation of the phenolic and antioxidant profile of cocoa honey from different varieties of cocoa (*Theobroma Cacao* L.) produced in the state of Bahia. In: 47^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2024, Águas de Lindóia - SP.

NASCIMENTO, M.B.; SILVA, S. B.; ALENCAR, J. C. G.; DEEGAN, K. R.; MEDEIRO, F. R.; PAULINO, B. N.; MESQUITA, P. R. R.; SOARES, S. E. Efeito dos métodos de conservação no perfil aromático de mel de cacau (*Theobroma cacao* L.) em diferentes períodos de armazenamento. In: XV Workshop de Quimiometria, 2024, Salvador.

NASCIMENTO, M. B.; AMORIM, L.; NONATO, M. A. S.; ROSELINO, M. N.; SANTANA, L. R. R.; REIS, A. C. R. F. A.; MEDEIRO, F. R.; MESQUITA, P. R. R.; SOARES, S. E. Optimization of HS-SPME/GC/MS method and chemometric analysis for volatile compounds

determination and sensory profile of cocoa honey from different cocoa varieties (*Theobroma cacao* L.). In: 15° SLACAN - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos e Nutrição: 'A Revolução da Ciência de Alimentos e Nutrição: Alimentando o Mundo de Forma Sustentável', 2023, Campinas, São Paulo.

NASCIMENTO, M. B.; SOUSA, T. L.; MAIA, D. L. S.; AMORIM, L.; RIBEIRO, A. S. L.; MAMEDE, M. E. O.; MACIEL, L. F.; MESQUITA, P. R. R.; SOARES, S. E. Physical-chemical characterization and mineral profile of cocoa honey from different varieties of cocoa (*Theobroma cacao* L.). In: 15° SLACAN - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos e Nutrição: 'A Revolução da Ciência de Alimentos e Nutrição: Alimentando o Mundo de Forma Sustentável', 2023, Campinas, São Paulo.

NASCIMENTO, M. B.; FERREIRA, T. R.; NONATO, M. A. S.; PEREIRA, M. S.; SILVA, N. L. T.; SOARES, S. E.; FERREIRA, A. C. R. Characterization of cocoa honey from different cocoa cultivars (*Theobroma cacao* L.) produced in the lower south of Bahia. In: 14° SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 2021, Online.

Tutoria de alunos de iniciação científica

Trabalho: Caracterização de méis de cacau obtidos de diferentes variedades e submetidos a pasteurização e alta pressão como métodos de conservação. 2023-2024. (Graduando em Farmácia)

Órgão de fomento: Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica - PIBIC

Orientador: Sérgio Eduardo Soares

Trabalho: Determinação de compostos fenólicos monoméricos e poliméricos em amostras de cacau produzidos no sul da Bahia. 2022-2023. (Graduando em Farmácia)

Órgão de fomento: Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica - PIBIC

Orientador: Sérgio Eduardo Soares

Trabalho: Avaliação de diferentes métodos de conservação para méis de cacau de diferentes variedades produzidos no Baixo Sul da Bahia. 2021-2023. (Graduando em Farmácia).

Órgão de fomento: Programa Institucional de Bolsas de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (PIBITI)

Orientador: Sérgio Eduardo Soares

Prêmios

"Determination of minerals by MIP OES and evaluation of the phenolic and antioxidant profile of cocoa honey from different varieties of cocoa (*Theobroma Cacao* L.) produced in the state of Bahia", 47ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2024.

Palestras

NASCIMENTO, M.B. O potencial do mel de cacau na agroindústria. 1ª Semana de Engenharia Agroindustrial. Universidade Estadual da Bahia Campus XXI, Ipiaú – BA, 2024.

Produções Técnicas na mídia

NASCIMENTO, M.B.; MESQUITA, P. R. R. Propriedades nutritivas do mel de cacau de diferentes variedades de cacau. **Programa AgroBand**, 2024. (Programa de TV)

NASCIMENTO, M.B.; MESQUITA, P. R. R. Estudo pioneiro revela propriedades do mel de cacau e potenciais usos nas indústrias de alimentos e cosméticos. **Secretaria de Agricultura, Pecuária, Irrigação, Pesca e Aquicultura**, 2024. (Site). <http://www.seagri.ba.gov.br/noticias/2024/07/17/estudo-pioneiro-revela-propriedades-do-mel-de-cacau-e-potenciais-usos-nas>.

NASCIMENTO, M.B.; MESQUITA, P. R. R.; REIS, A. C. R. F. A.; FERREIRA, T. R. Mel de cacau tem potencial para uso em Indústrias Alimentícia e Cosmética. **Jornal A Tarde**, Salvador - BA, 26 ago. 2024. (Jornal)

Outras atividades

Membro Titular da Câmara Setorial da Cadeia Produtiva do Cacau do Estado da Bahia. Secretaria da Agricultura, Pecuária, Irrigação, Pesca e Aquicultura do Esta, SEAGRI. Diário Oficial, Portaria nº 027 de 10 de junho de 2024. (2024-atual).

APÊNDICE

APÊNDICE A – Mel de Cacau, o Néctar dos Deuses: Características Químicas, Sensoriais e Métodos de Conservação.

The background of the cover is a vibrant illustration of cacao pods and leaves. The pods are shown in various stages of ripeness, with colors ranging from bright yellow to deep red. Some pods are whole, while others are split open, revealing the white, segmented cacao beans inside. Green leaves with prominent veins are interspersed among the pods. The entire illustration is rendered in a clean, stylized manner with bold outlines and flat colors.

MEL DE CACAU, O NÉCTAR DOS DEUSES: CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS, SENSORIAIS E MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO

**MANUELA BARRETO DO NASCIMENTO
SÉRGIO EDUARDO SOARES**



MANUELA BARRETO DO NASCIMENTO
SÉRGIO EDUARDO SOARES

**MEL DE CACAU, O NÉCTAR DOS DEUSES:
CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS,
SENSORIAIS E MÉTODOS DE
CONSERVAÇÃO**

1ª EDIÇÃO
Salvador
2024

Dados internacionais de catalogação-na-publicação
(SIBI/UFBA/Biblioteca Universitária Reitor Macedo Costa)

Mel de cacau o néctar dos deuses: características químicas, sensoriais e métodos de conservação /
Manuela Barreto do Nascimento, Sérgio Eduardo Soares, Paulo Roberto Ribeiro de Mesquita,
Adriana Cristina Reis Ferreira, Frederico de Medeiros Rodrigues. - Salvador: UFBA, Faculdade
de Farmácia, 2024.
32 p.: il.

Cartilha elaborada para divulgar os resultados obtidos na tese de doutorado de Manuela Barreto do
Nascimento desenvolvida no âmbito do Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia em parceria com o Centro Tecnológico Agropecuário do Estado da Bahia, o Centro de Inovação do Cacau, a Universidade do Estado da Bahia e a Secretaria da Agricultura, Pecuária, Irrigação, Pesca e Agricultura do Estado da Bahia.

ISBN 9786501202990.

1. Tecnologia de alimentos. 2. Cacau. 3. Cacau - Subprodutos. 4. Mel de cacau - Avaliação sensorial.
5. Mel de cacau - Conservação. I. Nascimento, Manuela Barreto do. II. Soares, Sérgio Eduardo. III. Mesquita, Paulo Roberto Ribeiro de. IV. Ferreira, Adriana Cristina Reis. V. Rodrigues, Frederico de Medeiros. VI. Bahia. Centro Tecnológico Agropecuário. VII. Centro de Inovação do Cacau. VIII. Universidade do Estado da Bahia. IX. Bahia. Secretaria da Agricultura, Pecuária, Irrigação, Pesca e Agricultura.

CDD - 663.9

CDU - 663.91



EQUIPE TÉCNICA

Ms. MANUELA BARRETO DO NASCIMENTO
Doutoranda e Pesquisadora

PROF. DR. SERGIO EDUARDO SOARES
Orientador e Pesquisador

**PROF. DR. PAULO ROBERTO RIBEIRO DE
MESQUITA**
Coorientador e Pesquisador

Dr^a. ADRIANA CRISTINA REIS FERREIRA
Pesquisadora

**PROF. DR. FREDERICO DE MEDEIROS
RODRIGUES**
Pesquisador

REALIZAÇÃO



Faculdade de
Farmácia
UFBA



GOVERNO DO ESTADO



SECRETARIA DA AGRICULTURA,
PECUÁRIA, IRRIGAÇÃO, PESCA
E AQUICULTURA



Centro de Inovação do Cacau



Universidade do
Estado da Bahia

APOIO



Agilent Technologies



Cooperativa de Produtores
Rurais de Presidente
Tancredo Neves

APRESENTAÇÃO

Esta cartilha foi elaborada com a finalidade de divulgar os resultados obtidos na tese de doutorado de Manuela Barreto do Nascimento, intitulada "**Mel de Cacau (*Theobroma cacao* L.) de diferentes variedades: Composição Química, Propriedades Sensoriais e Métodos de Conservação**" desenvolvida no âmbito do Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia em parceria com o Centro Tecnológico Agropecuário do Estado da Bahia, o Centro de Inovação do Cacau e a Universidade Estadual da Bahia.

Manuela cresceu na zona rural do município de Presidente Tancredo Neves, Baixo Sul da Bahia, filha de produtores de cacau, o que despertou seu interesse em utilizar sua própria matéria-prima para aprofundar os estudos sobre o cacau e seus subprodutos.

Os resultados encontrados demonstram que o mel de cacau surge como uma alternativa para a verticalização da cadeia produtiva do cacau e tem o potencial de incentivar mais estudos para o desenvolvimento de novas tecnologias no intuito de melhorar o seu processamento tempo de prateleira e expandir sua comercialização.

Ressalta-se que este estudo inédito foi realizado com a finalidade de avaliar as propriedades físico-químicas sensoriais e aromáticas do mel de cacau obtido das variedades de cacau CCN51, PS1319, SJ02 e Parazinho.

Dessa forma, esta cartilha representa uma importante conquista para todos os envolvidos, e, espera-se que ela se torne uma ferramenta compartilhada por todos!

Prof. Dr. Sérgio Eduardo Soares
Professor e Pesquisador - UFBA

AGRADECIMENTOS



Agradecemos aos produtores Manoel Carlos Andrade e Juscelino Macedo pelo fornecimento dos frutos do cacau.



ÍNDICE

Cacau.....	10
Genética.....	11
O que é mel de cacau?.....	12
Processamento do mel de cacau.....	13
Parazinho.....	14
PS1319.....	17
SJ02.....	20
CCN51.....	23
Métodos de conservação.....	26
Legislação.....	27
Metodologias utilizadas.....	28
Desfechos Finais.....	30

CACAU

O cacau é o fruto do cacaueiro, cultivado em países de clima tropical, e é o principal ingrediente na produção do chocolate. As cascas, a polpa e o mel de cacau, por sua vez, são frequentemente tratados como subprodutos.



O cultivo de cacau no Baixo Sul da Bahia é uma atividade agrícola de grande importância econômica e cultural. A região é conhecida por suas condições climáticas favoráveis e solo fértil, que permitem o cultivo de variedades de cacau de alta qualidade.

GENÉTICA

Existem três principais grupos genéticos de cacau: Criolo, Forastero e Trinitário, cruzamento do Criolo com o Forastero.

As variedades CCN51, SJ02 e PS1319 são resultado do melhoramento genético do cacau Trinitário e apresentam maior resistência à vassoura-de-bruxa. Por outro lado, existem variedades convencionais, como a Parazinho, um tipo Forastero, que não passaram por melhoramento genético e são amplamente cultivadas no Brasil.

Essas variedades foram selecionadas para este estudo devido à sua ampla disponibilidade no Baixo Sul da Bahia.

Confira a cartilha "Características de Qualidade do Cacau do Sul da Bahia" do nosso grupo de pesquisa que descreve de forma mais detalhada sobre as genéticas.



Acesse pelo seu smartphone visualizando o **QR Code** abaixo.



O QUE É MEL DE CACAU?

O mel de cacau é um líquido mucilaginoso, amarelo opaco, obtido através da prensagem dos grãos de cacau in natura antes do início da fermentação. É conhecido pelo nome "mel" de cacau devido ao seu sabor doce que se assemelha ao mel de abelha embora não seja originário da apicultura.

Ao longo do processamento da amêndoa do cacau para a produção do chocolate esse produto não era aproveitado. No entanto, atualmente, vem se destacando como um subproduto energético de elevado valor nutritivo.

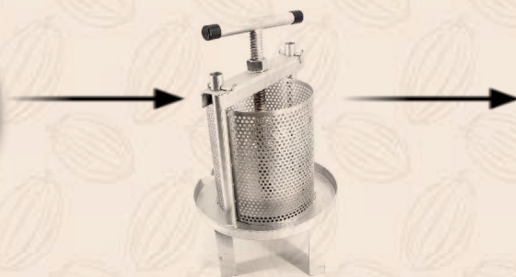


PROCESSAMENTO DO MEL DE CACAU



Presidente Tancredo Neves Bahia, Brazil;
latitude: 13° 27' 14" S; longitude: 39° 25' 15" W

Extração manual com prensa



O mel de cacau é rico em açúcares, compostos bioativos, compostos minerais, compostos aromáticos e bem aceito sensorialmente. Por isso, consumir o mel de cacau ou incorporá-lo em produtos alimentícios pode melhorar perfil nutricional dos alimentos.

PARAZINHO



PARAZINHO

Características da Variedade

Origem: Brasil

Tipo: Forastero

Cor do fruto maduro: Amarelo

Forma: Amelonado

Cor das sementes: Roxas



Características do mel de cacau



CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

Rendimento: 16,40%

pH: 3,56

Acidez (% ácido cítrico): 0,92%

Sólidos solúveis: 16,16 °Brix

Proteínas: 0,34%

Lipídeos: 0%

Carboidratos: 29,46%

Açúcares totais: 13,43g/100g

Valor energético: 119,16 Kcal/100ml

PARAZINHO

Características Químicas e Sensoriais do mel de cacau

PRINCIPAIS COMPOSTOS MINERAIS – Para consumo de 200 mL

Cálcio: 9,41mg

Ferro: 0,41mg

Potássio: 0,10g

Magnésio: 28,12mg

Sódio: 0,00g

Zinco: 0,65mg

PERFIL SENSORIAL

Sabor amargo e adstringente.

Cor esverdeada.

SUBSTÂNCIAS FUNCIONAIS

Theobromina, epicatequina, ácido clorogênico, serotonina, triptamina, fenetilamina.

Aminoácidos essenciais.

PRINCIPAIS COMPOSTOS VOLÁTEIS

Ácido palmítico: 7,72%

2-pentanol: 4,12%

Acetato de 1-metilbutila: 14,18%

Acetato de 2-heptil: 1,24%

Diacetato de 1,3-butileno: 6,26%

Gardenol: 6,87%

2-nonanona: 0,30%

Linalool: 0,78%

Óxido de (E)-linalol: 0,84%

Óxido de (Z)-linalol: 0,94%



PS1319

PS1319

Características da Variedade

Origem: Brasil

Tipo: Híbrido Trinitário

Cor do fruto maduro: avermelhada

Forma: amelonada

Cor das sementes: roxas



Características do mel de cacau



CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

Rendimento: 17,97%

pH: 3,59

Acidez (% ácido cítrico): 0,68%

Sólidos solúveis: 11,97°Brix

Proteínas: 0,31%

Lipídeos: 0%

Carboidratos: 28,09%

Açúcares totais: 11,62g/100g

Valor energético: 113,58 Kcal/100mL

PS1319

Características Químicas e Sensoriais do mel de cacau

PRINCIPAIS COMPOSTOS MINERAIS – Para consumo de 200 mL

Cálcio: 7,72mg

Ferro: 0,69mg

Potássio: 0,15g

Magnésio: 26,42mg

Sódio: 0,02g

Zinco: 1,90mg

PERFIL SENSORIAL

Aroma ácido, adocicado, de cacau, frutado, floral e refrescante.

Sabor frutado e adstringente.

Viscosidade e maciez.

Cor amarelada.

SUBSTÂNCIAS FUNCIONAIS

Theobromina, cafeína, ácido gálico, ácido clorogênico, quecertina, fenetilamina.

Aminoácidos essenciais.

PRINCIPAIS COMPOSTOS VOLÁTEIS

Ácido palmítico: 5,13%

2-pentanol: 2,43%

2-nonanol: 2,26%

Acetato de 1-metilbutila: 15,66%

Acetato de 2-heptil: 10,89%

Diacetatode 1,3-butileno: 3,29%

Gardenol: 2,16%

2-nonanona: 1,75%

Linalool: 2,45%

α -terpineol: 0,77%



SJ02

Características da Variedade

Origem:Brasil

Tipo: Híbrido Trinitário

Cor do fruto maduro: amarelo-avermelhada

Forma: amelonada

Cor das sementes: roxas



Características do mel de cacau



CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

Rendimento: 18,04%

pH: 3,69

Acidez (% ácido cítrico): 0,77%

Sólidos solúveis: 16,40°Brix

Proteínas: 0,37%

Lipídeos: 0%

Carboidratos:28,31%

Açúcares totais: 14,23g/100g

Valor energético: 114,70 Kcal/100mL

Características Químicas e Sensoriais do mel de cacau

PRINCIPAIS COMPOSTOS MINERAIS – Para consumo de 200 mL

Cálcio: 11,31mg

Ferro: 0,22 mg

Potássio: 0,21g

Magnésio: 37,30mg

Sódio: 0,02g

Zinco: 0,60mg

SUBSTÂNCIAS FUNCIONAIS

Theobromina, epicatequina, ácido gálico, quercetina.

Aminoácidos essenciais.

PERFIL SENSORIAL

Sabor adocicado, de cacau e frutado.

Textura macia.
Cor amarelada.

PRINCIPAIS COMPOSTOS VOLÁTEIS

Ácido palmítico: 5,13%

2-pentanol: 3,52%

Acetato de 1-metilbutila:
23,87%

Acetato de 2-heptil: 3,78%

Gardenol: 2,72%

2-nonanona: 0,49%

Linalool: 2,76%

Óxido de (E)-linalol: 1,64%

Óxido de (Z)-linalol: 1,04%



CCN51

CCN51

Características da Variedade

Origem: Equador

Tipo: Cruzamento ICSAS
(Híbrido Trinitário e Criollo) x
IMC67 (Forastero)

Cor do fruto maduro:
vermelho

Forma: Oblongo

Cor das sementes: roxas



Características do mel de cacau



CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

Rendimento: 20,44%

pH: 3,59

Acidez (% ácido cítrico): 0,99%

Sólidos solúveis: 17,32°Brix

Proteínas: 0,51%

Lipídeos: 0%

Carboidratos: 29,63%

Açúcares totais: 16,03g/100g

Valor energético: 120,53 Kcal/100mL

Características Químicas e Sensoriais do mel de cacau

PRINCIPAIS COMPOSTOS MINERAIS – Para consumo de 200 mL

Cálcio: 7,80 mg

Ferro: 0,42 mg

Potássio: 0,18 g

Magnésio: 39,60 mg

Sódio: 0,02 g

Zinco: 3,80 mg

PERFIL SENSORIAL

Aroma ácido, frutado, de cacau e refrescante.

Sabor frutado, amargo e adstringente.
Cor esverdeada.

SUBSTÂNCIAS FUNCIONAIS

Cafeína, ácido gálico, ácido clorogênico, quecertina, serotonina, triptamina, fenetilamina.

Aminoácidos essenciais.

PRINCIPAIS COMPOSTOS VOLÁTEIS

Ácido palmítico: 13,10%

Ácido pentadecanóico: 2,73%

2-pentanol: 2,23%

Acetato de 1-metilbutila: 11,92%

Acetato de 2-heptil: 5,95%

Diacetato de 1,3-butileno: 2,32%

Gardenol: 1,19%

2-nonanona: 0,96%

Linalool: 1,21%

Óxido de (E)-linalol: 0,83%

MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO



Como o mel de cacau é um produto rico em açúcares a fermentação pode acontecer rapidamente, se tornando um produto muito perecível, o que dificulta o transporte e o armazenamento. Normalmente é comercializado na forma congelada, demonstrando a necessidade de aumentar seu tempo de prateleira. Dessa maneira, os métodos de conservação mais eficientes testados foram:

Método	Tempo	Temperatura de armazenamento
Pasteurização	14 dias	4 °C
Ultrassom	21 dias	4 °C
Pasteurização + sorbato de potássio	28 dias	4 °C



LEGISLAÇÃO

Atualmente, não há uma legislação específica para o mel de cacau. Assim, os produtores podem se basear na Portaria Nº58, de 30 de agosto de 2016, do MAPA, que estabelece padrões de identidade e qualidade para o suco de cacau, incluindo critérios de análises físico-químicas, conforme a tabela abaixo.

Parâmetro	Limite mínimo
Sólidos solúveis (°Brix)	14,00
pH	3,40
Acidez Total expressa em ácido cítrico (g/100g)	0,75
Açúcares Totais (g/100g)	10,00

Os padrões microbiológicos para suco concentrado congelado são definidos pela Instrução Normativa nº161, de 1º de Julho de 2022, da ANVISA, conforme detalhado na tabela abaixo.

Parâmetro	Limite máximo
Salmonella/25mL	Ausência
Enterobacteriaceae/mL	10 ²
Bolores e Leveduras/mL	10 ³

METODOLOGIAS UTILIZADAS

Caracterização físico-química

As análises físico-químicas foram realizadas de acordo com o Instituto Adolf Lutz e ANVISA. A cor foi determinada através de um colorímetro digital.

Características sensoriais

O perfil sensorial foi definido através da Análise Descritiva por Ordenação (ADO).

Compostos voláteis

A identificação dos compostos aromáticos foi realizada por Microextração em Fase Sólida por Headspace associada a Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (HS-SPME/CG-EM; Agilent modelo GC-8890/MS-5977).

Compostos minerais

Os macronutrientes e micronutrientes foram determinados através da técnica de Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Induzido por Micro-ondas (MIP OES; Agilent modelo 4210).

Compostos bioativos

Os compostos não-voláteis foram determinados por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-HRMS; Agilent modelo LC 1290 II/MS-QTOF6545).

METODOLOGIAS UTILIZADAS

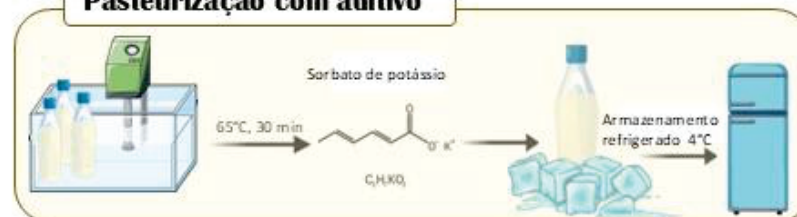
Métodos de conservação

A pasteurização térmica foi realizada em um banho-maria digital com circulação de ar, enquanto a pasteurização com aditivo seguiu o mesmo processo, mas incluindo 0,1g/100mL de sorbato de potássio. O tratamento por ultrassom foi feito em modo pulsado a 50% de frequência durante 20 minutos.

Pasteurização



Pasteurização com aditivo



Ultrassom



Foram realizadas análises físico-químicas, microbiológicas e de compostos aromáticos durante os dias 0, 1, 7, 14, 21 e 28 para avaliar o melhor método e período de armazenamento.



DESFECHOS FINAIS

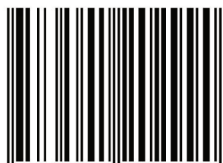
- As variedades CCN51, PS1319 e SJ02, apresentaram maiores rendimentos para a extração do mel de cacau.
- Todas as variedades podem ser consideradas energéticas.
- O consumo do mel de cacau da variedade CCN51 corresponde à metade da ingestão diária recomendada de zinco na dieta, segundo a legislação brasileira.
- As variedades CCN51 e PS1319 apresentaram uma maior abundância de compostos aromáticos com a presença de aroma frutado, floral e adocicado.
- PS1319 e SJ02 exibiram perfis sensoriais semelhantes, caracterizados por cor amarelada, maior viscosidade, maciez e sabor doce. Enquanto que CCN51 e Parazinho apresentaram atributos similares, incluindo uma cor esverdeada e um sabor ácido e adstringente.
- A pasteurização com aditivo apresentou uma maior estabilidade ao longo de 28 dias de armazenamento a 4°C.
- No entanto, a técnica de ultrassom se destaca por não usar aditivo e ter um menor tempo de processamento.

This image shows a single sheet of white paper with horizontal ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There are no margins or other markings on the paper.



ISBN: 978-65-01-20299-0

CSL



9 786501 202990