



# HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EM CHOCOLATES COMERCIAIS COM DIFERENTES PORCENTAGENS DE SÓLIDOS DE CACAU

G.M. Guizzellini<sup>1</sup>, S.A.Silva<sup>1,2</sup>, E.A.F.S. Torres<sup>1</sup>, R.A.M. Soares-Freitas<sup>1</sup>, A.P. Almeida<sup>2</sup>, G.R. Sampaio<sup>1</sup>

1 - Departamento de Nutrição – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo – CEP: 01246-904 – São Paulo – SP – Brasil, Telefone: (11) 3061-8100 – e-mail: ([simone.alves.silva@usp.br](mailto:simone.alves.silva@usp.br)).

2 – Núcleo de Contaminantes Orgânicos – Centro de Contaminantes, Instituto Adolfo Lutz – CEP: 01246-000 – São Paulo – SP – Brasil, Telefone: (11) 3068-2921.

**RESUMO** – Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) são agentes carcinogênicos que podem ser gerados durante as etapas de processamento térmico, uma vez que altas temperaturas são utilizadas nos grãos de cacau e produtos de cacau que são utilizados na produção do chocolate. O presente estudo avaliou a presença de quatro HPAs prioritários em amostras de chocolate com 40% a 70% de cacau. O benzo[a]pireno (BaP) foi encontrado em todos os chocolates, com concentrações entre 1,58 e 4,34  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  de gordura, e a soma dos quatro HPAs variou entre 12,94 e 28,87  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  de gordura, todos abaixo dos limites estabelecidos pela Comunidade Europeia. Os resultados indicaram baixa contaminação dos HPAs nos chocolates analisados, no entanto mais amostras devem ser avaliadas para o monitoramento desses compostos em chocolates.

**ABSTRACT** – Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are carcinogenic agents that can be generated during thermal processing steps, since high temperatures are used in cocoa beans and cocoa products that are used in the production of chocolate. The present study evaluated the presence of four priority PAHs in chocolate samples with 40% to 70% cocoa. Benzo[a]pyrene (BaP) was found in all chocolates, with concentrations between 1.58 and 4.34  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  of fat, and the sum of the four PAHs varied between 12.94 and 28.87  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  of fat, all below the limits established by the European Community. The results indicated low HPA contamination in the analyzed chocolates, however more samples should be evaluated to monitor these compounds in chocolates.

**PALAVRAS-CHAVE:** contaminantes; benzo[a]pireno; cromatografia líquida.

**KEYWORDS:** contaminants; benzo[a]pyrene; liquid chromatography.

## 1. INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos orgânicos com dois ou mais anéis aromáticos fundidos. Esses hidrocarbonetos são considerados poluentes e são formados durante processos de combustão e apresentam com potencial carcinogênico e mutagênico (Zelinkova e Wenzl, 2015; Abdel-Shafy e Mansour, 2016). A formação dos HPAs ocorre por meio de três fontes: ambiental, petrogênica e pirogênica. As fontes pirogênicas são aquelas obtidas a partir de processos utilizados pela indústria de alimentos que utilizam altas temperaturas, como secagem, fermentação, torra, defumação. Além destes, outros processos realizados em ambiente domiciliar, como cozinhar, fritar, grelhar e assar (gás natural e carvão vegetal), também são responsáveis por gerar HPAs, já que utilizam fontes de calor (Rose et al., 2015; Singh e Agarwal, 2018).

Agências regulamentadoras, como a Comissão Europeia (CE), estabeleceram limites máximos para quatro HPAs prioritários em alguns grupos de alimentos. Para grãos de cacau e produtos de cacau os limites são de 5,0  $\mu\text{g/kg}$  de gordura para o benzo[a]pireno (BaP), e 30,0  $\mu\text{g/kg}$  de gordura para a soma dos quatro HPAs, BaP, benzo[a]antraceno (BaA), benzo[b]fluoranteno (BbF) e criseno (Cri). Esses quatro HPAs são considerados pela

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de  
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

Agência Internacional de Pesquisas do Câncer (IARC) como possivelmente carcinogênicos (BaA, BbF e Cri) e carcinogênico para humanos (BaP) (IARC, 2010; CE, 2011; IARC, 2012).

Produtos do cacau (*Theobromacacao* L.), como o chocolate, a manteiga de cacau, a massa de cacau e o cacau em pó são submetidos a altas temperaturas durante longos períodos de tempo durante seu processo de produção, podendo acarretar na formação exacerbada de a HPAs. Além disso, ingredientes utilizados na composição do chocolate, como o açúcar e o leite em pó, podem ser fontes de contaminação por HPAs (Żyżelewicz et al., 2017; Predan et al., 2019). Estudos internacionais indicaram concentrações elevadas de HPAs, que ultrapassavam os limites da legislação, em amostras de chocolates (bombons de chocolate, chocolate ao leite e chocolate amargo) e produtos de cacau (manteiga de cacau, cacau em pó e massa de cacau) (Kumari et al., 2012; Raters e Matissek, 2014).

No Brasil não há estudos sobre a contaminação de chocolates por HPAs. Considerando o risco que estes compostos podem trazer à saúde da população, o objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de HPAs em chocolates comerciais do tipo amargo.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Vinte barras de chocolates amargo de 9 diferentes marcas, foram obtidas no comércio da cidade de São Paulo, SP, com porcentagens de sólidos de cacau (massa, pasta e/ou licor) declaradas entre 40 e 75 % de cacau. Padrões individuais de HPAs foram adquiridos em solução (empresa Supelco), os solventes utilizados foram grau PA (etanol, éter etílico) e HPLC (n-hexano e acetonitrila), e a água ultrapurificada pelo sistema Milli-Q.

A determinação dos lipídeos foi realizada em duplicata por Soxhlet, utilizando éter etílico e 3 g de amostra, segundo metodologia sugerida por Hawthorne et al. (2000), com modificações.

As etapas de para saponificação, extração e purificação dos HPAs foram realizadas segundo Kumari et al. (2012), Raters e Matissek (2014) e Bogdanović et al. (2019). Para saponificação, 1 g de chocolate foi homogeneizado com 5 mL de hidróxido de potássio 2,0 M em etanol. A solução foi deixada durante 3 h em banho-maria a 42°C com agitação controlada e protegida da luz. Para extração líquido-líquido, foram adicionados 5 mL de água destilada e 10 mL de n-hexano, homogeneizados em vortex para separação da fase orgânica, que foi transferida para funil de separação, sendo repetido o procedimento por três ciclos de extração. A fase contendo n-hexano foi lavada 30 mL com água deionizada e filtrada em filtro de papel contendo 5 g de sulfato de sódio. O extrato foi evaporado, e o resíduo ressuspensionado em 6 mL de acetonitrila. Para a etapa de purificação, foi usado um cartucho de extração em fase sólida (SPE) de sílica (500 mg, 6 mL) pré-condicionado com 3 mL de acetonitrila, e o extrato foi adicionado, sendo recolhido o extrato, que foi evaporado até secagem total. Ao resíduo, foi adicionado 1 mL de acetonitrila, filtrado em membrana de 0,22 µm, e recolhido em vial âmbar.

As condições cromatográficas para os HPAs foram fundamentadas nos trabalhos de Camargo et al. (2011) e Silva et al. (2017), com adaptações. Foi utilizado um sistema HPLC da Shimadzu (Tóquio, Japão) equipado com bomba (LC-20 AT), injetor automático (SIL-20AC), controlador (CBM-20A), forno de coluna (CTO-20A) e detector de fluorescência (RF- 10AXL). Uma coluna C18 Shim Pack VP-ODS (C18, 250 × 4,6 mm., 5 µm, Shimadzu), protegida por coluna de proteção (Shimadzu, TYO, Japão), foram empregadas para a separação dos HPAs, com fase móvel com fluxo de 1,5 mL.min<sup>-1</sup> e gradiente (A: água, B: acetonitrila): 50% de B por 0 a 20 min., 70% B por 20,01 - 50 min., 100% B por 50,01 - 55 min e retornando às condições iniciais até 60 min. Outras condições utilizadas foram: injeção automática de 30 µL, temperatura forno de 35°C, comprimentos de onda de excitação e emissão: 270/390 nm (BaA e Cri) e 290/430 nm (BbF e BaP).

A validação dos HPAs foi realizada de acordo com os testes de linearidade, seletividade, exatidão, precisão (repetibilidade), limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), propostos pelo Instituto Nacional de Metrologia, Padronização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2020).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br

Os resultados dos lipídeos totais estão apresentados na Tabela 1. Os valores das amostras variaram entre 26,90 g/100 g até 41,84 g/100 g (Tabela 1). Dentre as gorduras presentes no chocolate a principal é a manteiga de cacau (característica do chocolate), mas outras gorduras como óleo de palma, manteiga de karité e óleo de manga podem ser usadas, com o objetivo de reduzir o custo das matérias-primas ou modificar as características sensoriais do produto final (Maldonado-Pereira et al., 2018).

A validação para os quatro HPAs em chocolates demonstrou resultados adequados para os parâmetros avaliados. Os coeficientes de correlação alcançaram valores superiores a 0,990, e não houve interferência de matriz apenas para o BaP. As recuperações variaram de 90,9 a 108,1% e os valores de desvio padrão relativo estavam abaixo de 10% (0,14 - 7,25%), confirmando a exatidão e a precisão do método. Os resultados de LD para BaA, Cri, BbF e BaP foram de 0,54, 0,57, 0,51 e 0,11  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , respectivamente, e LQ foram 0,50  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  para BaP e 1,00  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  para os outros três HPAs, demonstrando a sensibilidade do método para o fim proposto.

Em todos os chocolates analisados foram identificados os quatro HPAs prioritários (Tabela 1). As faixas de concentração para BaP variaram entre 1,58  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  (chocolate 40% cacau) e 4,34  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  (chocolate 70% cacau), e para a soma dos quatro HPAs, entre 12,94  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  (chocolate 60% cacau) e 28,87  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  (chocolate 70% cacau), todos abaixo de 5,0  $\mu\text{g/kg}$  de gordura para o benzo[a]pireno e 30,0  $\mu\text{g/kg}$  para a soma dos quatro HPAs, valores estes que são limites máximos estabelecidos pela Comissão Européia (CE, 2011).

Criseno foi o hidrocarboneto encontrado em maior concentração dentre os avaliados com valores entre 5,84  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  (chocolate amargo sem teor de cacau declarado) e 11,63  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  (chocolate 70% cacau), resultados acima dos encontrados por Kumari et al. (2012), que obtiveram apenas uma amostra com valores de criseno superior a 2,91  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Este pode ser um resultado relevante, visto que o monitoramento de forma isolada de BaP como marcador pode não ser um indicativo da contaminação de alimentos por HPAs, indicando a necessidade de avaliação de mais componentes.

**Tabela 1** – Teores de lipídeos e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em chocolates (média, mínimo e máximo)

Amostras	Lipídeos totais (g/100 g de chocolate)	Concentração de HPAs ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de lipídeos)				
		BaA	Cri	BbF	BaP	$\Sigma$ 4 HPAs
<b>40% cacau (n=4)</b>	26,90 (10,15 – 39,38)	3,26 (<LQ – 4,51)	7,82 (5,56 – 16,02)	3,23 (<LQ – 3,56)	1,58 (<LQ – 1,87)	13,55 (8,57 – 26,38)
<b>53% cacau (n= 1)</b>	36,61 (36,59 – 36,64)	5,22 (4,25 – 6,19)	9,09 (8,04 – 10,14)	3,72 (2,74 – 4,70)	2,54 (1,95 – 3,13)	20,58 (16,99 – 24,16)
<b>55% cacau (n= 1)</b>	36,02 (36,01 – 36,03)	3,87 (3,60 – 4,14)	7,67 (7,23 – 8,10)	< LQ	1,78 (1,74 – 1,82)	16,06 (15,08 – 17,03)
<b>60% cacau (n= 1)</b>	32,39 (33,44 – 31,35)	< LQ	7,15 (6,48 – 7,82)	< LQ	<LQ	12,94 (11,13 – 14,75)
<b>70% cacau (n=4)</b>	38,07 (26,68 – 40,09)	6,81 (3,10 – 10,25)	11,63 (6,62 – 13,76)	5,47 (2,38 – 6,93)	4,34 (1,41 – 7,94)	28,87 (13,61 – 37,48)
<b>Amargo sem % de cacau declarado (n=3)</b>	41,84 (36,02 – 64,03)	3,82 (2,65 – 5,41)	5,84 (4,69 – 7,17)	2,08 (<LQ – 2,12)	2,25 (<LQ – 3,32)	10,60 (9,14 – 15,45)

LQ: 1,00  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  para benzo[a]antraceno, criseno (Cri) e benzo[b]fluoranteno (BbF); 0,50  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  para benzo[a]pireno (BaP)

As amostras de chocolate 70% de cacau apresentaram os maiores valores médios para todos os quatro HPAs analisados, indicando uma possível relação com a quantidade de produtos de cacau adicionados aos chocolates. De acordo com as pesquisas de Misnawi (2012) e Raters e Matissek (2014), produtos de cacau apresentaram concentrações significativas de BaP e para a soma dos quatro HPAs, como massa de cacau (0,32





$\mu\text{g.kg}^{-1}$  e  $3,80 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ), manteiga de cacau ( $0,96 \mu\text{g.kg}^{-1}$  e  $12,44 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) e cacau em pó ( $1,07 \mu\text{g.kg}^{-1}$  e  $8,86 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ).

## 4. CONCLUSÕES

O benzo[a]pireno (BaP) foi encontrado em todos os chocolates, com concentrações entre  $1,58$  e  $4,34 \mu\text{g.kg}^{-1}$  de gordura, e a soma dos quatro HPAs variou entre  $12,94$  e  $28,87 \mu\text{g.kg}^{-1}$  de gordura, todos abaixo dos limites estabelecidos pela Comunidade Europeia, indicando baixa contaminação dos HPAs nos chocolates analisados. O hidrocarboneto encontrado em maior concentração foi o criseno. Os resultados sugerem que uma maior quantidade de produtos de cacau (massa de cacau, pó de cacau e manteiga de cacau) pode contribuir para a bioacumulação desses contaminantes no chocolate. Assim, novos estudos com maior número de amostras serão necessários, em especial para monitorar a contaminação dos chocolates pelo HPAs durante todo o processo de produção.

## 5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Acadêmico (CAPES) pelo apoio e concessão de bolsas de estudo, à parceria com o Instituto Adolfo Lutz e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2018/19005-6, FAPESP) pelo uso dos padrões.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Shafy, H.I. & Mansour, M.S.M. (2016) A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*, 25, p.107–123, 2016.
- Bogdanović, T., Pleadin, J., Petricevic, S., Listes, E., Sokolic, D., Markovic, K., Ozogul, F. & Simat, V. (2019) The occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish and meat products of Croatia and dietary exposure. *Journal of Food Composition and Analysis*, 75, 49–60.
- Camargo, M. C. R., Antonioli, P. R. & Vicente, E. (2011) Determinação simultânea por HPLC-FLD de 13 hidrocarbonetos aromáticos policíclicos: validação de um procedimento analítico para óleos de soja. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22 (7), 1354–1361.
- European Commission - CE. *Commission regulation n° 835/2011 of 19 August 2011 amending regulation (EC) no. 1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs*. Official Journal of the European Union, L215, 4–8.
- Hawthorne, S. B., Grabanski, C.B., Martin, E. & Miller, D.J. (2000) Comparisons of Soxhlet extraction, pressurized liquid extraction, super critical fluid extraction and subcritical water extraction for environmental solids: recovery, selectivity and effects on sample matrix. *Journal of Chromatography A*, 892 (1-2) 421–433.
- International Agency for Research on Cancer - IARC (2010) *Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Overall evaluation of carcinogenicity*. Polynuclear Aromatic Compounds, 35. Lyon: IARC.
- International Agency for Research on Cancer - IARC (2012) *Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Over all evaluation of carcinogenicity*. Chemical Agents and Related Occupations, v. 100F. Lyon: IARC.
- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - INMETRO (2020). DOQ-CGCRE-008: Orientação sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos. (Revisão 9). Rio de Janeiro: INMETRO.
- Kumari, R., Chatuvedi, P., Ansari, N.G., Murthy, R.C. & Patel, D.K. (2012) Optimization and validation of an extraction method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in chocolate candies. *Journal of Food Science*, 71, 34 – 40.



- Maldonado-Pereira, L et al. (2018) The role of cholesterol oxidation products in food toxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 118, 908–939.
- Misnawi. (2012) Effect of cocoa bean drying methods on polycyclic aromatic hydrocarbons contamination in cocoa butter. *International Food Research Journal*, 19 (4), 1589-1594.
- Predan, G.M.I., Lazăr, D.A. & Lungu, I.I. (2019) *Caffeinated and Cocoa Based Beverages* (8<sup>o</sup> ed.). London: Elsevier.
- Raters, M. & Matissek, R. (2014) Quantitation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH4) in cocoa and chocolate samples by an HPLC-FD method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 10666–10671.
- Rose, M., Holland, J., Dowding, A., Petch, S.R.G., White, S., Fernandes, A. & Mortimer, D. (2015) Investigation into the formation of PAHs in foods prepared in the home to determine the effects of frying, grilling, barbecuing, toasting and roasting. *Food and Chemical Toxicology*, 78, 1–9.
- Silva, S.A., Sampaio, G.R. & Torres, E.A.F.S. (2017) Optimization and validation of a method using UHPLC-fluorescence for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in cold-pressed vegetable oils. *Food Chemistry*, 221, 809–814.
- Singh, L. & Agarwal, T. (2018) Polycyclic aromatic hydrocarbons in diet: Concern for publichealth. *Trends in Food Science & Technology*, 79, 160–170.
- Zelinkova, Z. & Wenzl, T. (2015) The Occurrence of 16 EPA PAHs in Food – A Review. *Polycyclic Aromatic Compound*, 3, 248–284.
- Żyżelewicz, D., Oracz, J., Krysiak, W. Budryn, G. & Nebesnt, E. (2017) Effects of various roasting conditions on acrylamide, acrolein and polycyclic aromatic hydrocarbons content in cocoa bean and derived there from chocolates. *Drying Technology*, 35, 363 – 374.