



**INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CENTRO DE CIÊNCIA E QUALIDADE DE ALIMENTOS**

CAROLINE ABBALLE

**EFEITO DO PROCESSAMENTO NOS NÍVEIS DE HIDROCARBONETOS
POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EM AMÊNDOAS DE CACAU E PRODUTOS
DERIVADOS**

**CAMPINAS
2019**

CAROLINE ABBALLE

**EFEITO DO PROCESSAMENTO NOS NÍVEIS DE HIDROCARBONETOS
POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EM AMÊNDOAS DE CACAU E PRODUTOS
DERIVADOS**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Tecnologia de Alimentos para obtenção do
título de Mestre em Ciência e Tecnologia de
Alimentos.*

Aluna: Caroline Abballe

Orientadora: Silvia Amelia Verdiani Tfouni

Coorientadora: Priscilla Efraim

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pela aluna Caroline Abballe, orientada pela Prof^ª. Dr^ª. Silvia Amelia Verdiani Tfouni e coorientada pela Prof^ª. Dr^ª Priscilla Efraim.

CAMPINAS

2019

Agência(s): Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Processos 2017/21451-1 (auxílio à pesquisa) e 2018/23045-3 (bolsa TT3), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)-Código de Financiamento 001, PIBIC/CNPq (bolsa IC).

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO ITAL

A122e Abballe, Caroline.

Efeito do processamento nos níveis de hidrocarboneto policíclicos aromáticos em amêndoas de cacau e produtos derivados. Caroline Abballe / Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. - Campinas, SP: ITAL, 2019.

61 f.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Sílvia Amélia Verdiani Tfouni.

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Priscilla Efraim.

1. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. 2. Cacau. 3. Manteiga de cacau. 4. *Liquor* de cacau. 5. Cacau em pó. I. Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL). Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA). II. Abballe, Caroline. III. Título.

Título em inglês: Effect of processing on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in cocoa beans and derivative products

Key-words: polycyclic aromatic hydrocarbons, cocoa, cocoa butter, cocoa powder

Titulação: Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Banca Examinadora: Prof^ª. Dr^ª. Sílvia Amélia Verdiani Tfouni, Prof^ª. Dr^ª. Priscilla Efraim, Dr. Mateus Petrarca, Dr. Valdecir Luccas, Dr. Marcelo Morgano.

Data da Defesa: 28/08/2019

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida por Caroline Abballe, aprovada pela Comissão Julgadora em 28 de agosto de 2019.

Prof^a. Dr^a. Silvia A. V. Tfouni
CCQA/ITAL - (Presidente)

Prof^a. Dr^a. Priscilla Efraim
UNICAMP/DDTA - (Coorientadora)

Dr. Mateus Petrarca
UNICAMP(titular)

Dr. Valdecir Luccas
Cereal Chocotec/ITAL(titular)

Dr. Marcelo Morgano
CCQA/ITAL (suplente)

AGRADECIMENTOS

À Silvia Tfouni pela orientação, confiança, paciência, incentivo e por todo carinho e aprendizado nesses anos;

à Priscilla Efraim pela coorientação, dedicação, gentileza, profissionalismo e por todo o apoio neste período;

aos colaboradores do laboratório da UNICAMP, sempre atenciosos;

à Rosa Alves e a aluna Alessandra Barros por disponibilizar o laboratório do CETEA e realizar as embalagens para acondicionar as amostras de cacau;

à Isabel Berto pelo auxílio e orientação nas interpretações dos resultados;

à Fernanda Gomes e Beatriz Dezembro, por toda a disponibilidade e ajuda no laboratório;

ao Marcelo Morgano e Raquel Milani pela infraestrutura e orientação nas etapas de análise do projeto;

à Ana Rauen pelo espaço da planta piloto para que pudéssemos homogeneizar as amostras;

à minha família, por todo o apoio e incentivo aos meus sonhos e conquistas realizadas;

aos amigos formados no mestrado pela amizade e companheirismo;

ao Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) pelo aprendizado e colaboração profissional;

agradeço também a FAPESP pela concessão ao projeto e a bolsa;

Por fim, gostaria agradecer a Deus, porque sem ele não teria forças para seguir em frente em todos os momentos dessa etapa.

RESUMO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são um grupo de compostos considerados contaminantes ambientais e de alimentos. Os HPAs são formados durante a queima incompleta de matéria orgânica e treze desses compostos são considerados potencialmente carcinogênicos e genotóxicos pelo Comitê Conjunto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA). Um dos alimentos onde os HPAs podem estar presentes é o cacau e seus produtos derivados. A contaminação pode ocorrer devido à presença de fumaça proveniente da queima de madeira ou de outras fontes na etapa de secagem das amêndoas e às altas temperaturas envolvidas na torrefação das mesmas. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a ocorrência de treze HPAs em amêndoas de cacau e nos produtos obtidos nas diferentes etapas do processo de fabricação, de modo a identificar os possíveis pontos de contaminação ou redução/eliminação desses compostos. Desta forma, foram coletadas amêndoas de cacau fermentadas e secas com e sem fumaça na região da Bahia. As mesmas foram torradas em diferentes tempos (0 a 120 minutos) e temperaturas (120, 135 e 150°C). O método analítico para determinação dos HPAs envolveu extração líquido-líquido, limpeza em cartuchos de fase sólida (C18) e determinação por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (HPLC-FLD). Foi observada uma contaminação inicial tanto na amêndoa seca sem fumaça como com fumaça, de 1,78 µg/kg e 66,24 µg/kg para o somatório dos HPAs, respectivamente. Foi observada uma redução nos níveis de HPAs com o aumento do tempo e da temperatura de torração. Os maiores níveis destes compostos foram detectados nas amostras provenientes de amêndoas secas com fumaça, possivelmente por uso inadequado dos secadores rotativos. Foi verificada uma tendência de migração dos HPAs para a manteiga de cacau. Os dados obtidos podem contribuir para o estabelecimento de práticas de mitigação da contaminação por HPAs.

Palavras-chave: Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos; cacau; manteiga de cacau; *liquor* de cacau; cacau em pó.

ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a group of compounds considered as environmental and food contaminants. PAHs are formed during incomplete combustion of organic matter and 13 of them are considered by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) as potentially carcinogenic and genotoxic. One of the foods that might be contaminated by PAHs is cocoa and its byproducts. The contamination may occur due to the use of smoke on the drying step of the process and due to the high temperatures used for toasting the cocoa beans. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the occurrence of 13 PAHs in cocoa beans and its byproducts and identify possible sources of contamination and reduction/elimination. Cocoa beans samples dried with and without smoke were collected from Bahia region. Beans were toasted in different times (0 to 120 minutes) and temperatures (120, 135 e 150°C). Analytical method for PAHs determination involved liquid-liquid extraction, cleanup with solid phase extraction (C18) and determination by high performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FLD). Cocoa beans dried without and with smoke were already initially contaminated (time 0) with the sum of PAHs varying from 1.78 µg/kg to 66.24 µg/kg, respectively. When higher temperatures and roasting time were applied a reduction in PAHs levels was observed. The highest levels of these compounds were detected on the byproducts from cocoa beans samples dried with smoke, possibly due to the inadequate use of the dryers. A tendency for PAHs to migrate to cocoa butter was observed. Data obtained may enable the recommendation of practices that can lead to the reduction of contamination by PAHs.

Key words:

Polycyclic aromatic hydrocarbons; cocoa; cocoa butter; cocoa liquor; cocoa powder.

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
SUMÁRIO	vii
INTRODUÇÃO	1
Referências Bibliográficas	2
OBJETIVO GERAL	5
Objetivos específicos	5
CAPÍTULO 1.....	5
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
CAPÍTULO 2 -	38
Resumo	38
Introdução	39
Material e Método	41
Resultado	44
Conclusão	52
Referência Bibliografica	53
ANEXO 1	59

INTRODUÇÃO

O cacau é um fruto nobre e tradicional na agricultura brasileira. Sua produção envolve milhares de propriedades no país, localizadas em sua grande parte no sul da Bahia (IBGE, 2019). O Brasil sempre esteve entre os seis maiores produtores de amêndoa de cacau no mundo e se encontra atualmente em quinto lugar na posição em relação à produção e em relação ao consumo mundial de chocolate. Seu cultivo, comercialização e industrialização têm um papel econômico, social e ecológico importante para o país (ICCO, 2019; IBGE, 2019).

Os principais produtos derivados do cacau são o *liquor* de cacau, o cacau em pó e a manteiga de cacau, que são utilizados na fabricação de chocolate e como ingredientes para confeitos, produtos de confeitaria e panificação (BECKETT *et al.*, 2017). O chocolate é um dos alimentos mais apreciados mundialmente devido ao sabor e, em parte, ao seu poder energético e, mais recentemente, às propriedades funcionais. A principal delas é a redução de riscos de contração de doenças cardiovasculares devido à presença de flavonoides em sua composição (MATTIA *et al.*, 2017; KRUGER *et al.*, 2014).

Durante o processamento do cacau algumas etapas, como a secagem e a torração, podem envolver o uso de altas temperaturas, o que pode levar à formação de contaminantes como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (ZYZELEWICZ *et al.*, 2017; WANDAN *et al.*, 2011; AIKPOKPODION *et al.*, 2013).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos orgânicos contendo dois ou mais anéis aromáticos condensados e são formados a partir da queima incompleta de material orgânico. Com estas características há possibilidade de um variado número de anéis e posições, o que leva à existência de mais de 100 HPAs reconhecidos pela International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), sendo que alguns deles são considerados potencialmente carcinogênicos e genotóxicos. A contaminação de alimentos por HPAs deve-se principalmente à poluição do ar e da água, à sua presença em solos terrestres e marinhos e a certos tipos de processamentos como defumação, torrefação e secagem direta com madeira (WHO, 1998; EFSA, 2008). Desta forma, recomenda-se estratégias por

parte das indústrias e dos consumidores, a fim de minimizar a exposição humana aos HPAs (WHO, 2005).

O presente estudo teve como objetivo avaliar amêndoas de cacau assim como os produtos obtidos de seu processamento, incluindo o *liquor* de cacau, manteiga de cacau e cacau em pó, quanto à presença de treze HPAs considerados carcinogênicos e genotóxicos pelo Comitê Conjunto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA) (WHO, 2005). Através dos resultados gerados pretende-se contribuir com a identificação das etapas do processamento que possam estar envolvidas na formação desses compostos, permitindo recomendar ações para eliminação e/ou redução dos níveis destes compostos nos produtos derivados do cacau.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIKPOKPODION, P. E.; ODUWOLE, O. O.; ADEMOLA, S. M. Evaluation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Cocoa Beans obtained from Selected Cocoa Producing States in Nigeria. **Journal of Scientific Research & Reports**, v. 2, n. 2, p. 612–625, 2013.

BECKETT, S.T.; FOWLER, M.S.; ZIEGLER, G.R. **Beckett's: Industrial Chocolate Manufacture and Use**. 5 ed. London: Wiley-Blackweel, 2017.

EFSA - European Food Safety Authority. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on polycyclic aromatic hydrocarbons in food. **EFSA Journal**, v. 724, p. 1–114, 2008.

IARC - International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures. **IARC Monographs On The Evaluation Of Carcinogenic Risks To Humans**, v. 92, p. 1–868, 2010.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. **LSPA - levantamento sistemático da produção agrícola. Estatística da Produção agrícola**. Rio de Janeiro: p.1-93, janeiro de 2019.

ICCO - International Cocoa Organization. **Produção Mundial de cacau**. Disponível em: <<http://www.icco.org/>>. Acesso em 28 de janeiro de 2019.

KRUGER, M. J.; DAVIES, N.; MYBURGH, K. H.; LECOUR, S. Proanthocyanidins, anthocyanins and cardiovascular diseases. **Food Research International journal**, v. 59, p. 41–52, 2014.

MATTIA, C.D. D.; SACCHETTI, G.; MASTROCOLA, D.; SERAFINI, M. From Cocoa to Chocolate: The Impact of Processing on *In Vitro* Antioxidant Activity and the Effects of Chocolate on Antioxidant Markers *In Vivo*. **Front immunology journal**, v. 8, 2017.

WANDAN, E. N.; ELLEINGAND, E. F.; NDOUBA, A. M. A screening for benzo[a]pyrene in cocoa beans subjected to different drying methods during on farm processing. **International Journal of Engineering Science and Technology (IJEST)**, v.3, n. 5, p. 3621–3630, 2011.

WHO/IPCS - World Health Organization/International Programme on Chemical Safety. Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. **Environmental Health Criteria**, Geneva, n.202, 1998.

WHO/FAO - World Health Organization / Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Summary and conclusions sixty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)**. Rome, p. 1-17, 2005.

ŻYŻELEWICZ, D.; ORACZ, J.; KRYSIAK, W.; BUDRYN, G.; NEBESNY, E. Effects of various roasting conditions on acrylamide, acrolein, and polycyclic aromatic hydrocarbons content in cocoa bean and the derived chocolates. **Drying Technology**, v. 35, n. 3, p. 363–374, 2017.

OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo principal identificar as possíveis etapas de contaminação ou de redução/eliminação dos níveis de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos durante o processamento de cacau.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar um método analítico para análise de treze HPAs em amêndoas de cacau, cacau em pó, *liquor* de cacau e manteiga de cacau;
- Avaliar o binômio tempo e temperatura de torração das amêndoas de cacau na formação dos HPAs;
- Avaliar a transferência para os produtos derivados (*liquor* de cacau, cacau em pó, e manteiga de cacau) obtidos no processo.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Cacau

O maior produtor mundial de cacau é a Costa do Marfim, produzindo, de acordo com a Organização Internacional do Cacau (ICCO, 2019), 1,9 milhões de toneladas de cacau por ano, seguido de Gana, com 850 mil toneladas por ano. O Brasil permanece uma das potências mundiais da produção de cacau. De acordo com o IBGE estima em 2019 uma produção anual de 250 mil toneladas de cacau, com um rendimento médio de 431 quilos de cacau por hectare. A Bahia é o principal produtor brasileiro, participando com 47,8 % do total colhido no país (119 mil toneladas de cacau no ano), sendo seguida pelo Pará, com uma participação 45,1% (produção de 112 mil toneladas por ano) (IBGE, 2019).

O cacauzeiro (*Theobroma cacao* L) é uma árvore tipicamente de clima tropical adaptada às temperaturas médias de 25°C. Ele cresce em zonas de vegetação densa, solos férteis e bem drenados. A planta alcança normalmente de 4 a 8 metros de altura com copa variando de 4 a 6 metros de diâmetro. Cultivado em seu habitat natural, as árvores de grande porte promovem o sombreamento necessário para o seu crescimento e protegem os solos dos efeitos das chuvas de erosão e lixiviação (FERRÃO, 2002). O cacauzeiro começa a produzir frutos a partir do segundo ano de plantio, podendo ser colhidos o ano todo (LIMA, 2010).

As flores do cacauzeiro aparecem em ramos e troncos ao longo do ano, embora com intensidades diferentes, em boas condições de vegetação chega a produzir mais de 10.000 flores por ano (LIMA, 2010). A fecundação das flores, é geralmente entomófila pela polinização através de insetos e anemófila pela polinização através do vento, porém pode ocorrer a auto-fecundação ou a polinização cruzada. Após a fecundação, o ovário se desenvolve, o pedúnculo engrossa e endurece, gerando assim o fruto que vai crescendo progressivamente (FERRÃO, 2002).

De acordo com os grupos genéticos, os frutos variam em relação à forma, dimensões, aspectos exteriores, coloração externa e casca. São reconhecidos três grupos genéticos, como apresentados na Figura 1: *Criollo*, *Forastero* e *Trinitário*.

Criollo: apresentam frutos com superfície rugosa, sabor suave, formato alongado e com coloração vermelha quando maduros. As sementes são ovais e encontram-se relativamente soltas na polpa. Os cotilédones sem células pigmentadas são de coloração branca. Este grupo é considerado de boa qualidade, sendo desta forma destinado a produção de chocolates finos, porém não tem uma produtividade alta em comparação aos outros grupos. As principais regiões onde podem ser encontrados são América Central e na América do Sul (Venezuela e Colômbia) (BECKETT *et al.*, 2017; AFOAKWA, 2016).

Forastero: apresentam frutos com superfície lisa, sabor amargo, formato arredondado e coloração amarelada quando maduros. As sementes são achatadas e seus cotilédones têm células pigmentadas com coloração violeta-intenso. Geralmente, este grupo tem alta produtividade e também é responsável pela maior parte da produção de chocolate. Entretanto, a qualidade é inferior à do grupo *Criollo*. O grupo *Forastero* é predominante no Brasil, na África e em outros países da América Latina (BECKETT *et al.*, 2017; AFOAKWA, 2016).

Trinitário: constituem em frutos oriundos do cruzamento do *Criollo* com o *Forastero*, apresentando características intermediárias entre os grupos originários, gerando desta forma produtos de melhor qualidade (BECKETT *et al.*, 2017; AFOAKWA, 2016).



Figura 1: Grupos genéticos principais do cacau.

Fonte: BARRY CALLEBAUT, 2018.

O fruto é composto por casca, polpa e semente. A casca é dura e pode ser rugosa ou não, e é responsável por 75 % do peso do cacau (LIMA, 2010). A polpa apresenta um conjunto de células esponjosas mucilaginosas contendo água,

açúcares (frutose, glicose e sacarose), pentosanas, ácido cítrico e pectina, e são empregadas na produção de geleias, bebidas e gelatinas. A semente é formada por um embrião, dois cotilédones protegidos por uma testa, e encontra-se envolvida pela polpa (FERRÃO, 2002).

Características gerais das sementes

As sementes de cacau são compostas por metabólitos primários como carboidratos, lipídeos e proteínas, como também por metabólitos secundários como os compostos fenólicos e reservas de nitrogênio sob forma de purina alcaloides, (teobromina e cafeína). Alguns destes compostos estão apresentados na Tabela 1 (FERRÃO, 2002).

Tabela 1: Composição química da semente de cacau não fermentada (em porcentagem sobre o peso seco das amêndoas).

Componente	Cotilédones	Polpa	Testa
Água	35	84,5	9,4
Celulose (fibras)	3,2	-	13,8
Amido	4,5	-	46
Pentoses	4,9	2,7	-
Sacarose	-	0,7	-
Hexose	1,1	10	-
Matéria gordurosa	31,3	-	3,8
Proteínas	8,4	0,6	18
Teobromina	2,4	-	-
Cafeína	0,8	-	-
Polifenóis	5,2	-	0,8
Material residual inorgânico	3,2	1,5	8,2

Fonte: AQUARONI *et al.*, 2001.

Os metabólitos primários são encontrados em maior porcentagem na semente de cacau. Os lipídeos são compostos por glicerídeos, contendo ácidos graxos saturados (ácido palmítico e esteárico) e não saturado (ácido oléico) (AQUARONI *et al.*, 2001). As proteínas presentes em maior quantidade são a globulina, prolamina e glutelina, sendo a albumina a fração principal de proteína bruta (VOIGT; BIEHL; WAZIR, 1993).

Os metabólicos secundários como os alcaloides teobromina e cafeína pertencem a família das purinas, são conhecidos como estimulantes do sistema nervoso central, cardiovasculares, gastrointestinais e respiratórios. Porém a

teobromina tem efeito menos estimulante que a cafeína, pois ela ativa a produção de serotonina que é conhecida como relaxante (PINILLA; ASTIBIA; FRANCO, 2015). Uma vez que o grau de volatilização desses compostos é alto, ocorre uma perda de 20 a 30% durante a etapa de fermentação e aquecimento das amêndoas de cacau, o que propicia diminuição do amargor das amêndoas (LIMA *et al.*, 2011).

Os polifenóis apresentam função antioxidante, podendo limitar várias doenças degenerativas associadas a oxidação, além de possuir propriedades “antienvelhecimento”, e também protegem os neurônios de danos induzidos por neurotoxinas (MANACH *et al.*, 2004; NEHLIG, 2012; MALEYKI; JALIL; ISMAIL, 2008). Os principais compostos fenólicos encontrados na semente de cacau são os flavonóis, que incluem as catequinas, antocianinas e leucocianidinas (AQUARONI *et al.*, 2001). Estes compostos são armazenados nos cotilédones da semente de cacau, mas podem sofrer difusão para o exterior do cotilédone, e conseqüentemente migrarem para a testa, gerando um material mais enriquecido e com grande interesse para indústria (HERNÁNDEZ *et al.*, 2017; OKIYAMA; NAVARRO; RODRIGUES, 2017).

Tanto a planta como as sementes de cacau dependem de diversos fatores, como origem genética, processamento (fermentação e secagem), condições ambientais e culturais que podem interferir na composição química, aroma e coloração das amêndoas de cacau, as quais estão relacionadas à qualidade dos produtos derivados e ao desempenho tecnológico (SALTINI; AKKERMAN; FROCH, 2013; EFRAIM *et al.*, 2010).

Qualidade das amêndoas de cacau

A Instrução Normativa do MAPA nº 38, de 3 de junho de 2008 estabelece um Regulamento Técnico com objetivo de definir o padrão oficial de classificação da amêndoa de cacau, considerando seus requisitos de identidade e qualidade, a amostragem, o modo de apresentação e a marcação ou rotulagem, nos aspectos referentes à classificação do produto. A prova de corte consiste em um teste para avaliar a qualidade das amêndoas após a etapa de fermentação e secagem. Este método avalia cor, textura, injúrias, infestações por pragas durante a estocagem e contaminação por fumaça ou fungos. A classificação dos lotes é realizada por tipos

de acordo com o percentual de defeitos (odores estranhos, mofos entre outros) (BRASIL, 2008).

Para as indústrias processadoras de cacau, a qualidade da amêndoa de cacau está relacionada com alguns parâmetros como teor de umidade, teor de lipídeos, acidez e teor de impurezas. Para garantir uma boa conservação das sementes e não favorecer o crescimento de fungos, o teor de umidade máximo deve ser de 8%, (BRASIL, 2008). Já o teor de lipídeos nas amêndoas está relacionado com características de cor, aroma e estabilidade do chocolate (SATO, 2001). A acidez é um parâmetro importante para a amêndoa, pois indica a concentração de ácidos livres totais presentes, que podem interferir nas etapas do processo e levar a um efeito adverso no sabor do produto acabado (EFRAIM *et al.*, 2010; HUANG; BARRINGER, 2010). O teor de impurezas deve ser o mais baixo possível para garantir a qualidade dos produtos e a segurança dos processos nas indústrias (BRASIL, 2008; FERRÃO, 2002).

Processamento primário do cacau

Colheita e abertura dos frutos

A colheita dos frutos maduros de cacau é feita manualmente com o uso de facões, separando a casca e o material interno. O material interno, constituído de sementes e polpa, é levado ao processo de cura, responsável pela obtenção de uma cor marrom, sabor e aroma típicos de chocolate. Este processo ocorre em duas etapas distintas sempre visando separar as sementes da polpa para obter a amêndoa seca de boa qualidade (OETTERER; REGITANO-D'ARCE; SPOTO, 2006). A casca resultante do processo é utilizada como adubo, alimento para animais (CARVALHO *et al.*, 2010), obtenção de álcool e biogás (MANCINI *et al.*, 2016) e também produção de enzimas (YUSOF *et al.*, 2016).

Fermentação

A fermentação é a primeira etapa do processo de cura. Durante a fermentação as sementes com polpa são empilhadas em caixas de madeiras ou cochos e cobertas com folhas de bananeira para reduzir a perda de umidade das

sementes na parte superior (em torno de 50% a 60%), este processo dura de 3 a 8 dias, conforme a variedade de cacau (BECKETT *et al.*, 2017).

Na massa fermentativa há inicialmente um crescimento de leveduras (fermentação anaeróbica) que são provenientes da contaminação das mãos dos operários, por contato com a caixa de fermentação, utensílios e por insetos. Essa fase inicial envolve a transformação dos açúcares presentes na polpa em álcool etílico. Após 48 horas de fermentação e o arejamento da massa fermentativa, ocorre a fermentação aeróbica onde bactérias acéticas convertem o álcool etílico em ácido acético (ILLEGHEMS; WECKX; VUYST, 2015). Esse processo, juntamente com outras reações bioquímicas ocorrendo paralelamente, levam à morte do gérmen e acabam com sua capacidade germinativa. A partir desse ponto, a semente passa a ser chamada de amêndoa de cacau (PELÁEZL; GUERRA; DAVID, 2016). Após a morte do gérmen, a fermentação interna tem início, levando à reações químicas e enzimáticas dentro da amêndoa, que irão alterar sua coloração, sabor e aroma (FERRÃO, 2002).

De forma geral, para uma boa fermentação é necessário uma boa homogeneização e aeração da massa fermentativa na fase aeróbica, pois se não houver uma boa aeração pode haver a promoção do crescimento de bactérias lácteas, que são tolerantes a elevados pH, alta temperatura e baixa concentração de oxigênio. Estas bactérias podem desenvolver precursores indesejáveis de sabor (LIMA *et al.*, 2011).

Secagem

A segunda etapa do processo de cura é a secagem, etapa onde as amêndoas têm sua umidade reduzida de em torno de 60% para 8%, impedindo assim o crescimento de microrganismos indesejáveis e possibilitando sua armazenagem. Nesta etapa, além da eliminação da água ocorrem reações químicas provenientes das enzimas que atuam no interior das amêndoas que irão reduzir a acidez (AQUARONI *et al.*, 2001; BECKETT *et al.*, 2017).

A secagem pode ser realizada de forma natural, ao sol, ou artificial em secadores rotativos ou fornos. Na secagem natural as amêndoas são colocadas em barcaças dotadas de um teto móvel ou não, espalhadas sobre o lastro e expostas ao sol (FERRÃO, 2002). Este processo é o mais utilizado no Brasil e leva de 7 a 14

dias, o que permite a migração dos compostos voláteis (ácido acético entre outros) e da umidade dos cotilédones para a superfície da amêndoa, de maneira a serem eliminados. Após a volatilização do ácido acético formado durante a fermentação o pH das amêndoas de cacau atinge 5,0 a 6,0, aumentando desta forma a possibilidade de um crescimento microbiológico, sendo necessário portanto um controle do tempo e velocidade de secagem (AFOAKWA, 2016).

Na secagem artificial, são utilizados secadores rotativos que são aquecidos pela queima de lenha, ou fornos que utilizam o ar quente forçado (FERRÃO, 2002). A combustão da madeira utilizada nos secadores rotativos gera fumaça, cujo contato com as amêndoas deve ser evitado, pois pode propiciar sabor desagradável para a amêndoa de cacau, o que representa um problema na qualidade sensorial ou uma possível contaminação (AFOAKWA, 2016). Em comparação com a secagem natural, a secagem artificial é mais rápida; entretanto, os secadores podem atingir temperaturas acima de 65°C, dificultando a eliminação do ácido acético do cotilédone para a superfície, resultando em uma maior acidez (OETTERER; REGITANO-D'ARCE; SPOTO, 2006).

Estocagem

Após as etapas de fermentação e secagem, as amêndoas são acondicionadas em sacos de juta e transportadas até as fazendas e armazenadas por um período de 1 a 12 meses. Neste período é necessário o controle da temperatura e da umidade do ambiente, uma vez que as amêndoas são higroscópicas e o ganho de umidade pode levar ao desenvolvimento de microrganismos e alterações na qualidade. Sendo assim, é fundamental garantir que as amêndoas estejam com, em média, 8% de umidade antes de serem armazenadas. Também deve haver controle de infestações de insetos e pragas (OETTERER; REGITANO-D'ARCE; SPOTO, 2006; BECKETT *et al.*, 2017).

Processamento secundário do cacau

Limpeza

Inicialmente as indústrias recebem as amêndoas de cacau e direcionam para a operação de limpeza, onde são utilizados equipamentos e técnicas combinadas, como peneiras, seletores magnéticos, sistema de vibração e aspiração que removem as impurezas como restos de areia, pedras, madeiras, metais ou outras matérias estranhas (OETTERER; REGITANO-D'ARCE; SPOTO, 2006). Esta etapa é fundamental para evitar danos nos equipamentos que serão usados posteriormente. Em seguida, as amêndoas inteiras sem impurezas podem prosseguir para etapa de torração ou serem quebradas em pequenos fragmentos, chamados de *nibs* (AFOAKWA, 2016).

Torração

A torração da amêndoa é uma etapa fundamental tanto para o desenvolvimento do aroma típico do chocolate, quanto para a redução dos teores de ácidos voláteis e umidade (AQUARONI et al., 2001). Este processo consiste em um tratamento térmico utilizando ar aquecido em temperaturas variando de 100°C a 200°C por um período de 15 minutos a 2 horas, dependendo do tipo de cacau utilizado, do tipo do torrador e do produto que se pretende obter (OETTERER; REGITANO-D'ARCE; SPOTO, 2006).

Na primeira fase da torração, empregam-se temperaturas em torno de 100°C, para criar uma condição adequada para a eliminação de água, ácido acético e outros compostos indesejáveis formados durante a fermentação das amêndoas de cacau ou dos *nibs*, evitando a desidratação intensa da superfície dos cotilédones. Alguns fatores que influenciam na torração são a origem e o tipo da amêndoa, o período de colheita, o tamanho da amêndoa ou dos *nibs* e tratamentos anteriores à torração. Posteriormente, ocorre a reação de Maillard que envolve a condensação de grupos carbonilas de açúcares redutores com grupos amina provenientes de aminoácidos livres, seguida da degradação dos produtos originados, formando diversos compostos oxigenados. Com a interação dos compostos oxigenados há formação de compostos voláteis como carbonilas, pirazinas, hidrocarbonetos, furanos, cetonas, fenóis e outros compostos heterocíclicos. As reações químicas envolvidas na torração dependem de alguns fatores como tempo e temperatura, umidade, teores de açúcares redutores e aminoácidos (AFOAKWA, 2016; BECKETT et al., 2017; SALTINI; AKKERMAN; FROCH, 2013).

Quebra e separação

Nesta operação, as amêndoas inteiras ou os *nibs* torrados são quebrados em moinhos de martelos, pinos ou disco e devem ser separados testa, embrião e cotilédone por uma combinação de insuflação de ar e peneiras (separação por densidade e tamanho), o que permite o descarte da testa e do embrião, e a continuidade do processo com o cotilédone (AQUARONI *et al.*, 2001).

Liquor ou massa de cacau

Os *nibs* pré-moídos são refinados em moinhos de esferas ou cilindros até a granulometria de 20 a 40 μm . O calor proveniente dessa etapa promove a fusão da gordura, produzindo uma mistura semi-líquida, que após o resfriamento, solidifica e dá origem ao *liquor* ou massa de cacau. Esta é matéria-prima para produção da manteiga de cacau, do cacau em pó e do chocolate (BECKETT *et al.*, 2017).

Produtos do cacau

Manteiga de cacau: Obtida pela prensagem hidráulica da massa de cacau que resulta na separação em dois produtos: a manteiga de cacau e a torta de cacau. A manteiga de cacau obtida é então centrifugada ou filtrada para eliminar os resquícios sólidos do cacau, e desodorizada com objetivo de eliminar compostos indesejáveis. É empregada na produção de chocolates (AFOAKWA, 2016).

Cacau em pó: a moagem da torta proveniente da prensagem da massa de cacau leva à formação do cacau em pó, que pode conter de 10 a 20% de manteiga de cacau. Este produto é aplicado em bebidas achocolatadas e também como um ingrediente para produtos de panificação e confeitaria (BECKETT *et al.*, 2017).

Chocolate: é uma mistura de ingredientes em pó (açúcar, leite e derivados) e ingredientes líquidos e semi-líquidos (manteiga de cacau e pasta de cacau). As etapas básicas envolvidas em sua produção são: mistura dos ingredientes, refino, conchagem, temperagem/resfriamento, moldagem/desmoldagem e embalagem. Após a mistura dos ingredientes, a massa é refinada em moinhos que reduzem o

tamanho das partículas e auxiliam na homogeneização dos ingredientes. Na conchagem, a massa refinada é agitada e cisalhada em temperaturas de 45 a 90°C, eliminando os compostos voláteis indesejáveis e favorecendo a reação de Maillard onde a cor e o sabor do chocolate são intensificados. A temperagem inicia-se com o aquecimento do chocolate a temperaturas próximas de 40°C, seguido do resfriamento controlado em temperaturas entre 26 e 29°C a uma taxa controlada de 2°C/min induzindo desta maneira à cristalização parcial da manteiga de cacau, garantindo uma quantidade pequena de cristais e obtendo características como o brilho e dureza. Nessa etapa deve-se tomar cuidado em relação a cristalização, se essa não for adequada o produto pode apresentar alterações na textura. A seguir a moldagem dará forma aos diversos tipos de chocolate (BECKETT *et al.*, 2017).

Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)

Em 1775, Percivall Pott observou uma epidemia de câncer de escroto causada por fuligem em jovens que trabalhavam como limpadores de chaminés (HAWES; CLARKE W; COLLINS, 1775). Anos depois, uma pesquisa relacionou a formação de tumores em coelhos com o contato cutâneo a materiais contendo misturas com HPAs (YAMAGIWA; ICHIKAWA, 1915). Em 1988, o hidrocarboneto policíclico aromático benzo(a)pireno foi avaliado em uma mistura de alcatrão de carvão e provou-se um elevado potencial carcinogênico (CULP *et al.*, 1988). Consequentemente, alguns hidrocarbonetos policíclicos aromáticos foram avaliados pela Organização Mundial de Saúde e pelo Programa Internacional de Segurança Química (WHO, 1998). Em 2002 foram avaliados pela Comissão Europeia Direção Geral da Saúde e da Proteção do Consumidor (DG SANCO) e em 2005 pelo Comitê Conjunto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA) (EC, 2002; WHO, 2005).

Há mais de décadas os HPAs são estudados em diversas matrizes, como ar, água, alimentos e solos (GUILLEN; SOPELANA; PARTEARROYO, 1997; BUTLER *et al.*, 1993; PAM; KUM; LEMIEUX, 1993; KOCHBACH *et al.*, 2005). Algumas pesquisas têm sido publicadas em relação à formação, características físico-químicas e avaliação de ações para redução e controle da contaminação de alimentos por esses compostos (ZHOU *et al.*, 2014; WANG H. *et al.*, 2015; SINGH; VARSHNEY; AGARWAL, 2015).

Propriedades físico-químicas




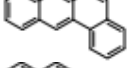
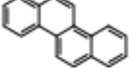
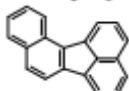
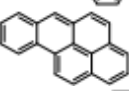
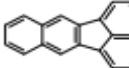
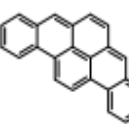
Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são formados por carbono e hidrogeno com anéis aromáticos conjugados. A anelação pode ser linear (anéis estão em linha reta) ou angular (anéis estão em um ângulo de 120° entre eles), a quantidade de anéis aromáticos intervém na solubilidade e na volatilidade do composto. Desta forma, as moléculas que possuem maior quantidade de anéis, e conseqüentemente maior massa molar (MM), são mais lipofílicas (baixa solubilidade em água) e menos voláteis (EFSA, 2008; BLUMER, 1976).

A solubilidade determina a afinidade lipofílica dos compostos, que corresponde aos valores do logaritmo do coeficiente de partição octanol/água (Log K(o/a)), quanto maior for este valor, mais hidrofóbica é a substância. Na Tabela 2, nota-se que os valores Log K(o/a) estão acima de 1, indicando que são absorvidos pela matéria orgânica. Devido ao caráter lipofílico destes compostos, podem estar presentes em diversos tecidos biológicos e serem rapidamente distribuídos pelo organismo (WHO, 1998). A pressão de vapor diminui com o aumento da massa molar, de modo que os compostos com 2 ou 3 anéis aromáticos tendem a se concentrar na fase de vapor, já com 5 ou mais anéis aromáticos se encontram em material particulado (EFSA, 2008; EC, 2002).

À temperatura ambiente os HPAs estão na fase sólida e apresentam alto ponto de fusão e ebulição. Estes atributos interferem no comportamento destes compostos tanto no ambiente quanto no organismo de quem os ingere ou inala. No organismo, os HPAs tem um tempo de meia-vida e este difere de acordo com a massa molar de cada molécula. Os compostos com maior tempo de meia-vida são os de maior massa molar, em conseqüência o tempo de degradação é menor (ROSLUND *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2012).

Os HPAs são quimicamente inertes, e no ambiente estão sujeitos a foto-oxidação, volatilização, degradação e reações com ácido nítrico, óxidos de enxofre, ácido sulfúrico, ozônio, óxidos de nitrogênio e radicais hidroxil (WHO, 1998; HARITASH; KAUSHIK, 2009; KOHTANI *et al.*, 2005; DUTTA *et al.*, 2016; CHAPARALA; RAJ, 2016).

Tabela 2- Propriedades físico-químicas de alguns HPAs, número de anéis, massa molecular, solubilidade em água a 25°C, pressão de vapor a 25°C, coeficiente de partição octanol/água e estrutura química.

HPAs	Nº de anéis	Massa Molecular (g/mol)	Solubilidade em água a 25°C (mg/L)	Pressão de vapor a 25°C (Pa)	Coeficiente de partição octanol/água Log K _a	Estrutura química
Naftaleno	2	128,2	3,17 x 10 ¹	10,4	3,4	
Acenafteno	3	154,2	3,93	2,9 x 10 ⁻¹	3,92	
Fluoreno	3	166,2	1,98	8,0 x 10 ⁻²	4,18	
Benzo(a)antraceno	4	228,3	1,4 x 10 ⁻²	2,8 x 10 ⁻⁵	5,61	
Criseno	4	228,3	2,0 x 10 ⁻³	8,4 x 10 ⁻⁵	5,91	
Benzo(j)fluoranteno	5	252,3	2,5 x 10 ⁻³	2,0 x 10 ⁻⁶	6,12	
Benzo(a)pireno	5	252,3	3,8 x 10 ⁻³	7,3 x 10 ⁻⁷	6,50	
Benzo(k)fluoranteno	5	252,3	7,6 x 10 ⁻⁴	1,3 x 10 ⁻⁸	6,84	
Dibenzo(a,i)pireno	6	302,4	1,7 x 10 ⁻⁴	3,2 x 10 ⁻¹⁰	7,30	

FONTE: Adaptado de WHO(1998).

Formação

Os HPAs são formados durante a queima incompleta de matéria orgânica e seu mecanismo de formação envolve dois processos: pirólise e pirossíntese. A pirólise ocorre sob altas temperaturas e baixas concentrações de oxigênio, onde os compostos orgânicos são convertidos em moléculas pequenas (contendo 2 ou 3 anéis aromáticos) e radicais livres não estáveis. Durante a pirossíntese ocorre a recombinação dos radicais livres em diversas etapas, gerando moléculas maiores (contendo de 4 a 6 anéis aromáticos) e relativamente estáveis (EFSA, 2008; WHO, 2006).

Os HPAs também podem ser formados pelo processo de diagênese geológica, ou seja, em temperatura e pressão relativamente baixas, geram moléculas alquiladas, que levam à formação de petróleo, gás natural, carvão e outros combustíveis fósseis contendo HPAs (MAIR, 1964; BLUMER, 1976).

A composição dos HPAs e a quantidade produzida no processo dependem da temperatura, condições de reação e quantidade de ar (CONDE; AYALA; AFONSO; GONZÁLEZ, 2004).

Fonte

Os HPAs são provenientes de fontes naturais e fontes antropogênicas, sendo esta última o principal processo de emissão de HPAs ao ambiente (WHO, 1998; EFSA, 2008; ABDEL-SHAFY; MANSOUR, 2016).

As fontes naturais mais significativas são resultantes das queimas naturais de florestas ou emissões vulcânicas (WOLSKA *et al.*, 2012; EFSA, 2008). Também podem estar presentes naturalmente no ambiente, pela síntese através de micro-organismos, algas, plantas e animais (BORNEFF; SELENICA; KTANTE, 1968; KEUM; SEO; LI, 2013). Posteriormente à sua emissão na atmosfera, os compostos podem estar na forma úmida ou seca sobre os grupos aquáticos e terrestres (ABDEL-SHAFY; MANSOUR, 2016).

As fontes antropogênicas são provenientes da combustão incompleta de matéria orgânica como: atividades industriais (incineração de resíduos, produção de alumínio, petroquímica, pneus de borracha, fabricação de cimento, asfalto, queima de combustíveis como petróleo, carvão e gás), fumaça de cigarro, emissões de veículos motorizados, derramamento de óleo no mar, e processamento de alimentos tais como secagem e defumação direta da madeira entre outros (RACHWAL; MAGIERA; WAWER, 2015; WANG X. *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2015; POZO *et al.*, 2015).

Aspectos Toxicológicos

Em 1964, começaram os estudos dos efeitos toxicológicos dos HPAs em culturas de tecidos humanos (MORIMURA *et al.*, 1964). Com base na letalidade desses compostos, foram realizados vários trabalhos associados às características carcinogênicas e mutagênicas (WHO, 1998; ATSDR, 1995; EC, 2002; RAMESH; ARCHIBONG; NIAZ, 2010; MORDUKHOVICH *et al.*, 2016).

Prosseguindo os estudos a ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) e a EPA (Environmental Protection Agency) elaboraram uma lista

de substâncias potencialmente tóxicas para os seres humanos. Essa lista associa uma pontuação baseada na frequência, toxicidade e potencial de exposição humana de cada substância. A somatória destes fatores classificavam as mesmas, assim em 1997 foram classificados 16 HPAs em seus estudos. Na lista de 2017 (ATSDR, 2018) o grupo de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos ficou na nona colocação e o benzo(a)pireno ocupa individualmente a oitava colocação.

Segundo a Agência Internacional de Pesquisas sobre o Câncer (IARC, 2010), os HPAs são substâncias pró-carcinogênicas, necessitando de ativação metabólica para formar o carcinógeno ativo. Esta ativação metabólica pode ocorrer através de reações enzimáticas oxidativas, redutoras ou hidrolíticas, que agem principalmente sobre a região de elevada densidade eletrônica ou a nível da região angular da molécula do HPA formando epóxidos, ésteres benzílicos, radicais catiônicos e quinonas, no qual são capazes de reagir com macromoléculas celulares e dar início ao processo mutagênico (NETO *et al.*, 2000; BERNARDO; BARROS; SILVA, 2016; SHIBAMOTO; BJELDANES, 2014).

Conforme a Figura 2, o citocromo P450 (conjunto de enzimas) catalisa uma reação de oxidação formando 7,8-epóxido, que por sua vez, sofre uma hidratação mediada pela epóxido-hidrolase, originando o 7,8-diol, que após outra oxidação pelo citocromo P450, produz o diolepóxido, sendo este altamente mutagênico e carcinogênico (SHIBAMOTO; BJELDANES, 2014).

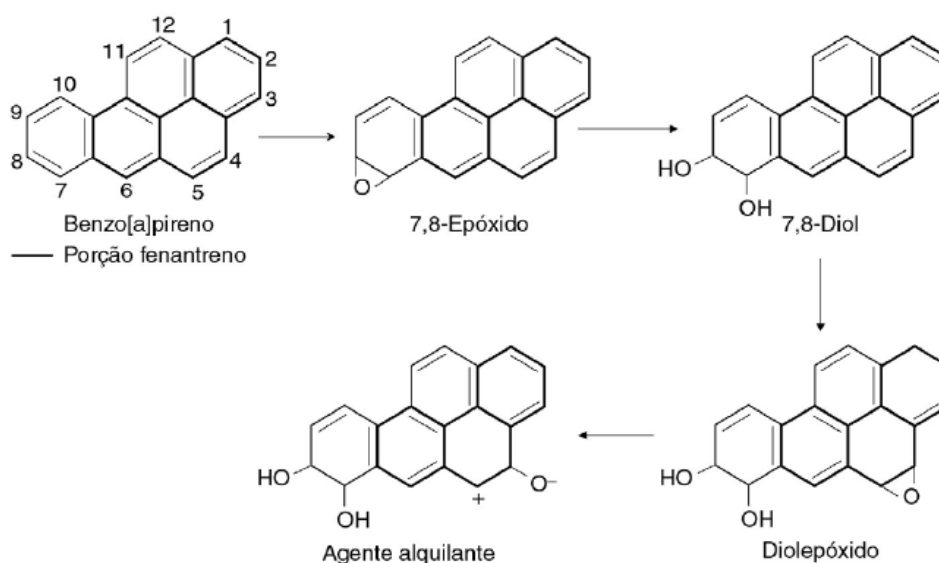


Figura 2: Mecanismo químico da formação agente alquilante a partir do benzo(a)pireno.

Fonte: SHIBAMOTO; BJELDANES, 2014.

A exposição humana aos HPAs pode ocorrer por diferentes vias, como inalação, ingestão e via cutânea. Desse modo, os órgãos mais afetados são os pulmões, pele e aparelho digestivo. Devido à sua natureza hidrofóbica, permite uma rápida passagem por membranas celulares e sua permanência no organismo, especialmente em zonas com maior conteúdo de gordura. Esta exposição pode desencadear tumores, cuja ocorrência depende da susceptibilidade genética de cada indivíduo e da frequência de exposição a esses compostos. Porém estes compostos podem ser eliminados nas fezes ou pela urina (IARC, 1993; FOTH; KAHL R.; KAHL G., 1988).

O Comitê Conjunto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA) durante sua 64ª reunião (FAO, 2005) classificou treze HPAs (benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(j)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno, dibenzo(a,e)pireno, dibenzo(a,h)pireno, dibenzo(a,i)pireno, dibenzo(a,l)pireno, indeno(1,2,3-cd)pireno e 5-metilcriseno) como potencialmente genotóxicos (ação nociva que afeta a integridade do material genético), mutagênicos e/ou carcinogênicos (capaz de causar mutação genética ou alteração da molécula de DNA que não é reparada durante a divisão celular).

Em 2010 a IARC avaliou os dados disponíveis referentes aos HPAs e classificou alguns deles de acordo com seu fator de poder aumentar o risco de câncer em humanos. O benzo(a)pireno foi classificado no grupo 1 (substâncias carcinogênicas), dibenzo(a,h)antraceno e benzo(j)fluoranteno no grupo 2A (provavelmente carcinogênico) e outros HPAs foram enquadrados no grupo 2B (possivelmente cancerígenos para humanos) (benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno e indeno(1,2,3-cd)pireno)) (IARC, 2010).

A Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA), adotou, em 9 de junho de 2008, um posicionamento sobre os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, em que o benzo(a)pireno não é considerado um marcador adequado para a ocorrência de HPAs nos alimentos e que um conjunto de quatro compostos (benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno) ou de 8 compostos (benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(ghi)perileno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno e indeno) representaria a contaminação de forma mais adequada (EFSA, 2008).

Legislação

No Brasil, a legislação vigente estabelece limites máximos apenas para o benzo(a)pireno nas seguintes categorias de alimentos: aromatizantes/aromas de fumaça (0,03 µg/kg no alimento final), águas potáveis (0,7 µg/L) (BRASIL, 2004; BRASIL, 2007) e óleo de bagaço ou caroço de oliva (2 µg/kg) (BRASIL, 2003).

Já a Comissão da Comunidade Europeia, em agosto de 2011, estabeleceu níveis máximos para benzo(a)pireno e para a soma de 4 HPAs (benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno) em diversos alimentos, entre eles amêndoas de cacau e seus derivados, com limites máximos 5,0 µg/kg (para o benzo(a)pireno) e 30,0 µg/kg (para a somatória dos 4 HPAs) (CEC, 2011).

HPAs em alimentos

Os alimentos são contaminados pelos HPAs pelas fontes naturais ou antropogênicas, através da poluição do ar, solo e água ou durante o processamento térmico de alguns alimentos (secagem, defumação, torrefação). Desta maneira a presença dos mesmos tem sido relatada em diversas categorias de alimentos incluindo produtos defumados (ZACHARA; GAŁKOWSKA; JUSZCZAK, 2017), chás (CHEN *et al.*, 2016), café (SHI Y. *et al.*, 2016), óleo vegetal (TFOUNI *et al.*, 2014), alimentos de origem marinha (SHI J. *et al.*, 2016), frutas e vegetais (PARIS *et al.*, 2018) entre outros (OZ; YUZER, 2016; MOLLE *et al.*, 2017; PAN *et al.*, 2015; PETRARCA; GODOY, 2018).

Em frutas e vegetais, a contaminação por HPAs é resultante da poluição ambiental. O material particulado se deposita na superfície do alimento, onde são acumulados na cera através de adsorção superficial. A concentração desses compostos depende da área de superfície do produto exposta e da localização da plantação. Em plantações próximas a rodovias os teores de HPAs nesses alimentos são maiores (CAMARGO; TOLEDO, 2002; PARIS *et al.*, 2018).

Em óleos vegetais os HPAs podem ser formados durante a secagem direta dos grãos. Apesar da etapa de desodorização do óleo reduzir a formação desses compostos, este efeito é insignificante, sendo fundamental o controle através da utilização de carvão ativo para remoção dos HPAs na etapa de refino (CAMARGO; TOLEDO, 2002; TFOUNI *et al.*, 2014; MOLLE *et al.*, 2017).

A presença de HPAs em produtos defumados é proveniente da fumaça gerada pela queima da madeira e é dependente de vários fatores tecnológicos, como a espécie da madeira utilizada e sua umidade, o método de fluxo de fumaça da câmara, a temperatura de combustão e oxidação. A retirada do produto do forno ou do lugar de produção de fumaça no tempo adequado, purificar a fumaça ou utilizar madeira adequada pode reduzir a formação dessas substâncias no produto (ZACHARA; GALKOWSKA; JUSZCZAK, 2017).

Em alimentos preparados em contato direto com a chama, tal como a carne elaborada como churrasco, a gordura da carne pinga sobre o fogo, sofre pirólise e então retorna à carne em forma de fumaça contaminando a carne com HPAs. A quantidade de HPAs formada depende do tempo e temperatura, do teor de gordura da carne e o tipo de combustível (carvão ou madeira) (OZ; YUZER, 2016).

Em produtos de origem marinha a presença dos HPAs se deve essencialmente à contaminação ambiental, como efluentes industriais, derramamento ou vazamento de óleo, ou de deposição de HPAs da atmosfera. Esses contaminantes são absorvidos e acumulados no organismo marinho. Por apresentarem maior capacidade de metabolizar e excretar esses compostos, geralmente os peixes apresentam menor acúmulo de HPAs nos tecidos comparados aos moluscos (SHI J. *et al.*, 2016).

No caso do café a presença dos HPAs é atribuída à etapa de torrefação dos grãos onde são aplicadas temperaturas elevadas para permitir o desenvolvimento de cor, aroma e sabor característicos do produto. Na preparação da bebida os contaminantes podem ser extraídos do pó de café em contato com a água fervendo (SHI Y. *et al.*, 2016; TFOUNI *et al.*, 2013).

No chá a contaminação por HPAs pode ocorrer durante a secagem das folhas associada à poluição ambiental. Geralmente apresentam níveis superiores desses compostos em relação ao café torrado, entretanto, a quantidade transferida para a bebida durante a infusão é menor (CHEN *et al.*, 2016; CAMARGO; TOLEDO, 2002; TFOUNI *et al.*, 2018).

HPAs em cacau

A presença de HPAs em cacau e seus produtos ou derivados pode ocorrer devido aos processos de secagem (WANDAN; ELLEINGAND; NDOUBA 2011) e de

torrefação das amêndoas (ZYZELEWICZ *et al.*, 2017), além da possibilidade de ser resultante de contaminação ambiental (AIKPOKPODION; ODUWOLE; ADEMOLA, 2013). Os dados referentes à presença de HPAs em produtos de cacau no Brasil são escassos e muito pouco se tem disponível a respeito da contribuição das etapas do processamento na sua formação. Na tabela 3 estão apresentados alguns estudos sobre a presença de HPAs em produtos derivados do cacau.

Wandan, Elleingand e Ndouba (2011) avaliaram a influência de três tipos de secagem nos níveis de benzo(a)pireno presentes em amêndoas de cacau da Costa do Marfim. Os resultados mostraram que as amostras secas com fumaça apresentaram os maiores níveis de benzo(a)pireno, chegando até 4218,64 µg/kg, sendo que o composto não foi detectado nas amostras secas ao sol. Aikpokpodion e colaboradores (2013), por sua vez, detectaram baixos níveis de HPAs em amostras de cacau seco ao sol na Nigéria. Os autores relacionaram a presença desses compostos à contaminação ambiental devido à proximidade a rodovias.

Em estudo recente, Zyzelewicz *et al* (2017) avaliaram os seguintes parâmetros de torrefação das amêndoas de cacau na formação de 12 HPAs (5 considerados carcinogênicos): a forma da amêndoa (inteira ou *nibs*), duas temperaturas (135 e 150°C) e duas umidades relativas do ar de torrefação (0,3 e 5%). A somatória dos HPAs presentes nos *liquors* de cacau obtidos nos processos variou de 0,38 a 0,76 µg/kg, sendo que o maior nível foi obtido usando a maior temperatura, 150°C, e maior UR, 5%. Os chocolates fabricados utilizando os *liquors* obtidos apresentaram maiores níveis de HPAs que o *liquor*, entretanto os autores utilizaram para isso uma manteiga de cacau comercial que poderia estar previamente contaminada com HPAs.

Ziengenhals, Speer e Jira (2009) relataram níveis de HPAs presentes em chocolates de diferentes origens e com diferentes teores de cacau. A somatória da concentração de 16 HPAs variou de 1,33 a 6,85 µg/kg. Não foi encontrada correlação entre o nível de HPAs e o teor de cacau da amostra (declarado no rótulo). Também, Raters e Matissek (2014) avaliaram os níveis de HPAs em 218 amostras de produtos de cacau originárias de diferentes regiões: amêndoas cruas, *liquor* de cacau, manteiga de cacau, produtos à base de cacau e chocolate. Os níveis relatados de 4 HPAs variaram de 0,88 a 92,53 µg/kg. Iwegbue *et al* (2015) analisaram diferentes tipos de bebidas comercializadas na Nigéria que

apresentavam cacau em sua composição e como resultado, a somatória dos níveis de 16 HPAs variaram de 38,0 e 1406,4 µg/kg.

Tabela 3- Estudos realizados com amêndoas de cacau e seus produtos derivados com contaminação HPAs.

Amostras	HPAs	Extração	Limpeza	Método	Resultado	Referência
Amêndoas de cacau secas com fumaça e ao sol.	BaP	Soxhlet	Cromatografia em coluna (CC)	CG-MS	nd a 4218,64 µg/kg	WANDAN ELLEINGAND; NDOUBA, 2011
Amêndoas de cacau secas ao sol.	16 HPAs	Líquido-líquido (LLE)	Cromatografia em coluna (CC)	CG-MS	0,6 a 1,26 µg/kg.	AIKPOKPODION; ODUWOLE; ADEMOLA, 2013
Amêndoa de cacau e produtos derivados.	4 HPAs	Saponificação Líquido-líquido (LLE)	Coluna de extração em fase sólida (SPE)	HPLC-FLD	0,88 a 92,53 µg/kg.	RATERS; MATISSEK, 2014
Amêndoa de cacau torradas e chocolate.	12 HPAs	Saponificação Líquido-líquido (LLE)	Coluna de extração em fase sólida (SPE)	CG-MS	-Liquor: 0,38 a 0,76 µg/kg. -Chocolate 0,75 a 0,98 µg/kg.	ZYZELEWICZ <i>et al.</i> , 2017
Bebidas à base de cacau.	16 HPAs	Líquido-líquido (LLE)	Coluna de extração em fase sólida (SPE)	CG-FID	38,0 a 1406,4 µg/kg.	IWEGBUE <i>et al.</i> , 2015
Chocolates	16HPAs	Líquido-líquido (LLE)	Coluna de extração em fase sólida (SPE)	CG-MS	1,33 a 6,85 µg/kg.	ZIENGENHALS; SPEER; JIRA 2009

4 HPAs: Benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(a)pireno.

12 HPAs: Acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(a)antraceno, benzo(k)fluoranteno, benzo(b)fluoranteno, benzo(a)pireno.

16 HPAs: naftaleno, acenaftaleno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, indeno(1,2,3-cd)pireno, dibenzo(a,h)antraceno e benzo(ghi)perileno

Métodos de Análise

Na literatura, existem variados métodos analíticos para determinação de HPAs em alimentos e estes envolvem etapas de extração, limpeza e análise cromatográfica (BANSAL *et al.*, 2016).

O método de extração depende da matriz alimentar a ser analisada. Óleos vegetais devido às suas características lipofílicas são facilmente dissolvidos em solvente apolares e desta forma utiliza-se extração líquido-líquido (LLE) (TAGHVAEE *et al.*, 2015). Para alimentos com alto teor de proteínas e produtos gordurosos insolúveis aplica-se o processo de saponificação antes da extração líquido-líquido (MIN; PATRA; SHIN, 2017). Para matrizes de alimentos sólidos aplica-se técnicas automatizadas de extração, como extração líquida pressurizada (PLE) (GUATEMALAMORALES *et al.*, 2016) e extração de fluido supercrítico (SFE) (ZOUAGH *et al.*, 2004). Recentemente, a extração assistida por micro-ondas

também foi adotada para determinação de HPAs em peixes defumados (GHASEMZADEH-MOHAMMADI *et al.*, 2012), em carne defumada (KAMANKESH *et al.*, 2015) e diversos frutos do mar (ZHANG; XUE; DAI, 2010).

A etapa de limpeza das amostras é aplicada para remover possíveis interferentes presentes na matriz. Em vista disso, aplica-se métodos como cromatografia em coluna (CC) para separar os HPAs de compostos alifáticos e constituintes aromáticos polares (EPA, 1984), cromatografia de permeação em gel (GPC) eficaz na separação dos HPAs de lipídeos (DUEDAHL-OLESEN *et al.*, 2015), extração em fase sólida (SPE) capazes de isolar e purificar os extratos de diversas matrizes (STENERSON *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2016), e por fim QuEChERS um método mais rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro (KHORSHID *et al.*, 2015).

As principais técnicas analíticas empregadas para a determinação de HPAs em alimentos são a cromatografia gasosa (CG) acoplada ao detector de ionização de chama (FID) (NESTOLA; SCHMIDT, 2017) ou espectrômetro de massas (MS) (PETRARCA; GODOY, 2018) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por UV (DOST; IDELI, 2012) ou fluorescência (FLD) (ZACHARA; GAŁKOWSKA; JUSZCZAK, 2016). A maioria dos HPAs são fluorescentes, desta forma o detector por fluorescência, por ser seletivo e sensível, é um dos mais usados para analisar estes compostos (WHO, 2006; EFSA 2008; SILVA; SAMPAO; TORRES, 2016).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-SHAFY, H. I.; MANSOUR, M. S. M. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. **Egyptian Journal of Petroleum**, v.25, n.1, p.107–123, 2016.

AFOAKWA, E. O. **Chocolate Science and Technology**. 2 ed. Nova York: John Wiley & Sons, 2016.

AIKPOKPODION, P. E.; ODUWOLE, O. O.; ADEMOLA, S. M. Evaluation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Cocoa Beans obtained from Selected Cocoa Producing States in Nigeria. **Journal of Scientific Research & Reports**, v.2, n.2, p. 612–625, 2013.

AQUARONI, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. 1 ed. **Biotecnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos**. São Paulo, v.4, p.1-544, 2001.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons**. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 1995.

ATSDR- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Disponível em <<http://www.atsdr.cdc.gov>>, acessada em junho de 2018.

BARRY CALLEBAUT. **Theobroma Cacao, the Food of the Gods**. Disponível em: <<https://www.barry-callebaut.com/chocophilia/theobroma-cacao-food-gods>>. Acesso em: 13 de março 2018.

BANSAL, V.; KUMAR, P.; KWON, E. E.; KIM, K. Review of the Quantification Techniques for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Food Products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**: v.8398, 2016.

BERNARDO, D. L.; BARROS, K. A.; SILVA, R. C Carcinogenicidade de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Química Nova** v.39, n.7, p.789–794, 2016.

BECKETT, S.T.; FOWLER, M.S.; ZIEGLER, G.R. **Beckett's: Industrial Chocolate Manufacture and Use**. 5 ed. London: Wiley-Blackweel, 2017.

BLUMER, M. Polycyclic aromatic compounds in nature. **Scientific American**, v.234, p.35–45, 1976.

BORNEFF, J.; SELENICA, F.; KTNTE, H. Experimental Studies Aromatic on the Formation Hydrocarbons of Polycyclic in Plants. **Environmental Research**, v.29, p.22–29, 1968.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 281, de 06 de outubro de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, Brasil, de 08 de outubro de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. **Diário Oficial da União**, n.º 59, de 26 de março de 2004.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, Brasil, de 17 de janeiro 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 38/2008. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, Brasil, de 23 de JUNHO de 2008.

BUTLER, J. P.; POST, G. B.; LIOY, P. J.; WALDMAN, J. M.; GREENBERG, A. Assessment of Carcinogenic Risk from Personal Exposure to Benzo(a)pyrene in the Total Human Environmental Exposure Study (THEES). **Air & Waste**, v.43, n.7, p. 970-977, 1993.

CARVALHO, J. N.; PIRES, A. J. V; VELOSO, C. M.; SILVA, F. F.; REIS, R. A.; CARVALHO, G. G. P. Digestibilidade aparente da dieta com capim-elefante ensilado com diferentes aditivos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.4, p.889–897, 2010.

CAMARGO, M.C.R.; TOLEDO, M.C.F. Chá-mate e café como fontes de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) na dieta da população de Campinas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.22, n. 1, p. 49-53, 2002.

CEC – The Commission of the European Communities. Commission Regulation (EC) No 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 European Union**, L 215, p.4-8, 20 outubro de 2011.

CHAPARALA, S. V; RAJ, A. Reaction mechanism for the oxidation of zigzag site on polycyclic aromatic hydrocarbons in soot by O₂. **Combustion and Flame**, v.165, p.21–33, 2016.

CHEN, H.; GAO, G.; LIU, P.; PAN, R.; LIU, X.; LU, C. Determination of 16 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Tea by Simultaneous Dispersive Solid-Phase Extraction and Liquid-Liquid Extraction Coupled with gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v.9, n.8, p.2374–2384, 2016.

CONDE, F.J.; AYALA, J.H.; AFONSO, A.M.; GONZÁLEZ, V. Optimization of a sampling method to determine polycyclic aromatic hydrocarbons in smoke from incomplete biomass combustion. **Analytica Chimica Acta**, v.524, p. 287–294, 2004.

CULP, S.J., GAYLOR, D.W., SHELDON, W.G., GOLDSTEIN, L.S. AND BELAND, F.A. A comparison of the tumours induced by coal tar and benzo(a)pyrene in a 2-year bioassay. **Carcinogenesis**, v.19, n.1, p.117-124, 1998.

DOST, K.; IDELI, C. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils and barbecued food by HPLC/UV–Vis detection. **Food Chemistry**, v.133, p.193–199, 2012.

DUEDAHL-OLESEN, L.; AASLYNG, M.; MEINERT, L.; CHRISTENSEN, T.; JENSEN, A. H.; BINDERUP, M. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in Danish barbecued meat. **Food Control**, v.57, p.169–176, 2015.

DUTTA, T.; KWON, E.; BHATTACHARYA, S. S. Polycyclic aromatic hydrocarbons and volatile organic compounds in biochar and biochar-amended soil: a review. **Global Change Biology Bioenergy**, p.1–15, 2016.

EC - European Commission. **Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in food**. p.1-84, 2002.

EFRAIM, P.; PEZOA-GARCÍA, N. H.; JARDIM, D. C. P.; NISHIKAWA, A.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N. Influência da fermentação e secagem de amêndoas de cacau no teor de compostos fenólicos e na aceitação sensorial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, p.142–150, 2010.

EFSA - European Food Safety Authority. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on polycyclic aromatic hydrocarbons in food. **EFSA Journal**, v.724, p.1–114, 2008.

Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO). Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Sixty-fourth meeting. **Summary and Conclusions Rome**, p.8-17, 2005.

FERRÃO, J.E.M. **Cacau: tecnologia pós-colheita**. Lisboa, p.1-347, 2002.

FOTH, H.; KAHL, R.; KAHL, G.F. Pharmacokinetics of low doses of benzo(a)pyrene in the rat. **Food and chemical toxicology**, v.26, p.45-51, 1988.

GUILLEN, M.D., SOPELANA, P., AND PARTEARROYO, M.A. Food as a source of polycyclic aromatic carcinogens. **Reviews on Environmental Health**, v.12, p.133-146, 1997.

GHASEMZADEH-MOHAMMADI, V.; MOHAMMADI, A.; HASHEMI, M.; KHAKSARA, R.; HARATIANA, P. Microwave-assisted extraction and dispersive liquid – liquid microextraction followed by gas chromatography – mass spectrometry for isolation and determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish. **Journal of Chromatography A**, v.1237, p.30–36, 2012.

GUATEMALA-MORALES, G. M.; BELTRÁN-MEDINA, E. A.; MURILLO-TOVAR, M. A.; RUIZ-PALOMINO, P.; CORONA-GONZÁLEZ, R. I.; ARRIOLA-GUEVARA, E. Validation of analytical conditions for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in roasted coffee by gas chromatography – mass spectrometry. **Food Chemistry**, v.197, p.747–753, 2016.

HARITASH, A. K.; KAUSHIK, C. P. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. **Journal of Hazardous Materials journal**, v.169, p.1–15, 2009.

HAWES I., CLARKE W., COLLINS R. Chirurgical observations: relative to the cataracts, the polypus of the nose, the cancer of the scrotum, the different kinds of ruptures, and the mortification of the toes and feet. **T.J. Carnegie**, London, UK, 1775.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, C.; VIERA-ALCAIDE, I.; MORALES-SILLERO, A. M.; FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J.; RODRÍGUEZ-GUTIÉRREZ, G. Bioactive compounds in Mexican genotypes of cocoa cotyledon and husk. **Food Chemistry**, v.240, p.831–839, 2017.

HUANG, Y.; BARRINGER, S.A. Alkylpyrazines and other volatiles in cocoa liquor at pH 5 to 8, by selected ion flow tube-mass spectrometry (SIFT-MS). **Journal of Food Science**, v.75, n.1, 2010.

IARC. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans: Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. **International Agency for Research on Cancer**, v.56, p.1-599, 1993.

IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures. **IARC Monographs On The Evaluation Of Carcinogenic Risks To Humans**, v.92, p.1-868, 2010.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. **LSPA - levantamento sistemático da produção agrícola. Estatística da Produção agrícola**. Rio de Janeiro: p.1-93, janeiro de 2019.

ICCO - International Cocoa Organization. **Produção Mundial de cacau**. Disponível em: <<http://www.icco.org/>>. Acesso em 28 de janeiro de 2019.

ILLEGHEMS, K.; WECKX, S.; DE VUYST, L. Applying meta-pathway analyses through metagenomics to identify the functional properties of the major bacterial communities of a single spontaneous cocoa bean fermentation process sample. **Food Microbiology**, v.50, p.54-63, 2015.

IWEGBUE, C. M. A.; AGADAGA, H.; BASSEY, F. I.; OVERAH, L. C.; TESI, G. O.; NWAJEI, G. E. Concentrations and Profiles of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Some Commercial Brands of Tea-, Coffee-, and Cocoa-Based Food Drinks in Nigeria. **International Journal of Food Properties**, v.18, n.10, p.2124-2133, 2015.

KAMANKESH, M., MOHAMMADI, A., HOSSEINI, H.; MODAR-RES TEHRANI, Z. Rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled meat using microwave-assisted extraction and dispersive liquid-liquid microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry, **Meat Science**, 2015.

KEUM, Y. S.; SEO, J. S.; LI, Q. X. Synthesis of Bacterial Metabolites of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Benzochromenones, o-Carboxyvinyl-naphthoates, and o-Substituted Aryl - α - Oxobutenoates. **Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry**, v.35, n.20, p.2685-2693, 2013.

KHORSHID, M.; SOUAYA, E. R.; HAMZAWY, A. H.; MOHAMMED, M. N. QuEChERS Method Followed by Solid Phase Extraction Method for Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Fish. **International Journal of Analytical Chemistry**, 2015.

KOCHBACH, A., LI, Y., YTTRI K.E., CASSEE, F.R., SCHWARZE, P.E.; NAMORK, E. Physicochemical characterisation of combustion particles from vehicle exhaust and residential. **Particle and Fibre Toxicology**, v.3, n.1, p.1-10, 2006.

KOHTANI, S.; TOMOHIRO, M.; TOKUMURA, K.; NAKAGAKI, R. Photooxidation reactions of polycyclic aromatic hydrocarbons over pure and Ag-loaded BiVO₄ photocatalysts. **Journal Environmental Research**, v.58, p.265–272, 2005.

LIMA, U.A. **Matéria prima dos alimentos**. 2.ed. São Paulo: Blucher, p.238-331, 2010.

LIMA, L. J. R.; ALMEIDA, M. H.; ROB NOUT, M. J.; ZWIETERING, M. H. Theobroma cacao L., “the food of the gods”: Quality determinants of commercial cocoa beans, with particular reference to the impact of fermentation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.51, n.8, p.731–761, 2011.

LIU, Y.; GAO, Y.; YU, N.; ZHANG, C.; WANG, S.; MA, L.; ZHAO, J.; LOHMANN, R. Particulate matter, gaseous and particulate polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in an urban traffic tunnel of China: Emission from on-road vehicles and gas-particle partitioning. **Chemosphere**, v.134, p.52–59, 2015.

LI, S.; ZHANG, S.; DONG, H.; ZHAO, Q.; CAO, C. Presence of aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in near-surface sediments of an oil spill area in Bohai Sea. **Marine Pollution Bulletin**, v.100, n.1, p.169–175, 2015.

LI, Z.; ROMANOFF, L.; BARTELL, S.; PITTMAN, E. N.; TRINIDAD, D. A.; MCCLEAN, M.; WEBSTER, T.F.; SJODIN, A. Excretion Profiles and Half-Lives of Ten Urinary Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolites after Dietary Exposure. **Chemical Research in Toxicology**, v.25, p. 1452-1461, 2012.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: Food Sources and Bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, n.5, p.727–47, 2004.

MANCINI, G.; PAPIRIO, S.; LENS, P. N. L.; ESPOSITO, G. Effect of *N*-methylmorpholine-*N*-oxide Pretreatment on Biogas Production from Rice Straw, Cocoa Shell, and Hazelnut Skin. **Environmental Engineering Science**, v.33, n.11, p.843–850, 2016.

MALEYKI, A.; JALIL, M.; ISMAIL, A. Polyphenols in Cocoa and Cocoa Products: Is There a Link between Antioxidant Properties and Health. **Molecules**, p.2190–2219, 2008.

MAIR, B. E. J. Terpenoids, fatty acids and alcohols as source materials for petroleum hydrocarbons. **Geochimica et Cosmochimica**, v.28, p.1303–1321, 1964.

MORDUKHOVICH, I.; BEYEA, J.; HERRING, A. H.; HATCH, M.; STELLMAN, S. D.; TEITELBAUM, S. L.; RICHARDSON, D. B.; MILLIKAN, R. C.; ENGEL, L. S.; SHANTAKUMAR, S.; STECK, S. E.; NEUGUT, A. I.; ROSSNER, P.; SANTELLA, R. M.; GAMMON, M. D. Polymorphisms in DNA repair genes, traffic-related polycyclic aromatic hydrocarbon exposure and breast cancer incidence. **International Journal of Cancer**, v.139, p.310-321, 2016.

MOLLE, D. R. D.; ABBALLE, C.; GOMES, F. M. L.; FURLANI, R. P. Z.; TFOUNI, S. A. V. Polycyclic aromatic hydrocarbons in canola, sunflower and corn oils and estimated daily intake. **Food Control**, v.81, p.96–100, 2017.

MORIMURA, Y.; KOTIN, P.; FALK, H.L. Photodynamic Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Tissue Culture. **The Journal of Cancer Research**, v.24, p.1249-1259, 1964.

MIN, S.; PATRA, J. K.; SHIN, H. Factors influencing inhibition of eight polycyclic aromatic hydrocarbons in heated meat model system. **Food Chemistry**, p.1-30, 2017.

NESTOLA, M.; SCHMIDT, T. C. Determination of mineral oil aromatic hydrocarbons in edible oils and fats by online liquid chromatography–gas chromatography–flame

ionization detection – Evaluation of automated removal strategies for biogenic olefins. **Journal of Chromatography A**, v.1505, p.69–76, 2017.

NEHLIG, A. The neuroprotective effects of cocoa flavanol and its influence on cognitive performance. **British Journal of Clinical Pharmacology**, 2012.

NETO, A.D.P.; MOREIRA, J.C.; DIAS, A.E.X.O.; ARBILLA, G.; FERREIRA, L.P.V.; OLIVEIRA, A.E.; BAREK, J. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados (NHPAs): uma revisão metodológica. **Química Nova**, v.23, n.6, p.765-773, 2000.

OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B.; SPOTO, M.H.F. **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Barueri, São Paulo: Manole, p.1-48, 2006.

OKYAMA, D. C. G.; NAVARRO, S. L. B.; RODRIGUES, C. E. C. Cocoa shell and its compounds: Applications in the food industry. **Trends in Food Science and Technology**, v.63, p.103–112, 2017.

OZ, F.; YUZER, M. O. The effects of cooking on wire and stone barbecue at different cooking levels on the formation of heterocyclic aromatic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons in beef steak. **Food Chemistry**, v.203, p.59–66, 2016.

PARIS, A; LEDAUPHIN, J.; POINOT, P.; GAILLARD, J.L. Polycyclic aromatic hydrocarbons in fruits and vegetables: Origin, analysis, and occurrence. **Environmental Pollution**, v.234, p.96–106, 2018.

PAN, E.; SUN, H.; XU, Q.; ZHANG, Q.; LIU, L.; CHEN, X.; XU, Y. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Concentrations in Drinking Water in Villages along the Huai River in China and Their Association with High Cancer Incidence in Local Population. **Hindawi Publishing Corporation**, 2015.

PELÁEZ, P. P.; GUERRA, S.; CONTRERAS, D. Scientia agropecuaria changes in physical and chemical characteristics of fermented cocoa (*Theobroma cacao*) beans with manual and semi-mechanized transfer , between fermentation boxes Cambios en la características físicas y químicas de granos de cacao. **Scientia Agropecuaria**, v.7, n.2, p.111–119, 2016.

PETRARCA, M. H.; GODOY, H. T. Gas chromatography-mass spectrometry determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in baby food using QuEChERS combined with low-density solvent dispersive liquid-liquid microextraction. **Food Chemistry**, 2018.

PHAM, T.; LUM, K.; LEMIEUX, C. Sources of PAHs in the St. Lawrence River (Canada) and their relative importance. **Chemosphere**, v.27, n.7, p. 1137-1149, 1993.

PINILLA, E.M.; ASTIBA, A.O.; FRANCO, R. The relevance of theobromine for the beneficial effects of cocoa consumption. **Journal Frontiers in Pharmacology**, v.6, n.30, p.1-5, 2015.

POZO, K.; ESTELLANO, V. H.; HARNER, T.; DIAZ-ROBLES, L.; CERECEDA-BALIC, F.; ETCHARREN, P.; POZO, K.; VIDAL, V.; GUERRERO, F.; VERGARA-FERNÁNDEZ, A. Chemosphere Assessing Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) using passive air sampling in the atmosphere of one of the most wood-smoke-polluted cities in Chile: The case study of Temuco. **Chemosphere**, v.134, p.475–481, 2015.

RAMESH, A.; ARCHIBONG, A. E.; NIAZ, M. S. Part A: Current Issues Ovarian Susceptibility to Benzo(a)Pyrene: Tissue Burden of Metabolites and DNA Adducts in F-344 Rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v.73, p.1611–1625, 2010.

RATERS, M.; MATISSEK, R. Quantitation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH4) in cocoa and chocolate samples by an HPLC-FD method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.62, n.44, p.10666–10671, 2014.

RACHWAŁ, M.; MAGIERA, T.; WAWER, M. Chemosphere Coke industry and steel metallurgy as the source of soil contamination by technogenic magnetic particles, heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons. **Chemosphere**, p.1-11, 2015.

ROSLUND, M. I.; GRÖNROOS, M.; RANTALAINEN, A.; JUMPPONEN, A.; ROMANTSCHUK, M.; PARAJULI, A.; HYÖTY, H.; LAITINEN, O.; SINKKONEN, A. Half-lives of PAHs and temporal microbiota changes in commonly used urban landscaping materials. **PeerJ**, v.6, p.1-27, 2018.

SALTINI, R.; AKKERMAN, R.; FROSCHE, S. Optimizing chocolate production through traceability: A review of the influence of farming practices on cocoa bean quality. **Food Control**, v.29, n.1, p.167–187, 2013.

SATO, K. Crystallization behavior of fats and lipids – a review. **Chemical Engineering Science**, v.56, n.7, p.2255-2265, 2001.

SHI, Y.; WU, H.; WANG, C.; GUO, X.; DU, J.; DU, L. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in coffee and tea samples by magnetic solid-phase extraction coupled with HPLC-FLD. **Food Chemistry**, v.199, p.75–80, 2016.

SHI, J.; ZHENG, G. J. S.; WONG, M. H.; LIANG, H.; LI, Y.; WU, Y.; LI, P.; LIU, W. Health risks of polycyclic aromatic hydrocarbons via fish consumption in Haimen bay (China), downstream of an e-waste recycling site (Guiyu). **Environmental Research**, v.147, p.233–240, 2016.

SILVA, S.A.; SAMPAIO, G. R.; TORRES, E. A. F. S. Optimization and validation of a method using UHPLC-fluorescence for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in cold-pressed vegetable oils. **Food Chemistry**, 2016.

SINGH, L.; VARSHNEY, J. G.; AGARWAL, T. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons' Formation and Occurrence in Processed Food. **Food Chemistry**, p.1-56, 2015.

SHIBAMOTO, T.; BJELDANE, L.F. **Introdução à toxicologia de alimentos** (tradução Cláudia Coanna). 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

STENERSON, K. K.; SHIMELIS, O.; HALPENNY, M. R.; ESPENSCHIED, K.; YE, M. M. Analysis of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in Olive Oil after Solid-Phase Extraction Using a Dual-Layer Sorbent Cartridge Followed by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p.4–10, 2015.

TAGHVAEE, Z.; PIRAVIVANAK, Z.; REZAEI, K.; FARAJI, M. Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Olive and Refined Pomace Olive Oils with Modified Low Temperature and Ultrasound-Assisted Liquid – Liquid Extraction Method Followed by the HPLC/FLD. **Food Analytical Methods**, 2015.

- TFOUNI, S. A. V; PADOVANI, G. R.; REIS, R. M.; FURLANI, R. P. Z.; CAMARGO, M. C. R. Incidence of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oil blends. **Food Control**, v.46, p.539–543, 2014.
- TFOUNI, S. A. V; SERRATE, C. S.; LEME, F. M.; CAMARGO, M. C. R.; TELES, C. R. A.; CIPOLLI, K. M. V. A. B.; FURLANI, R. P. Z. Polycyclic aromatic hydrocarbons in coffee brew: Influence of roasting and brewing procedures in two Coffea cultivars. **LWT - Food Science and Technology**, v.50, n.2, p.526–530, 2013.
- TFOUNI, S.A.V.; REIS, R.M.; KAMIKATA, K.; GOMES, F.M.L.; MORGANO, M.A.; FURLANI, R.P.Z. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in teas using QuEChERS sample preparation and HPLC-FLD. **Food Additives and Contaminants Part B**, v.11, n.2, p. 146-152, 2018.
- VOIGT, J.; BIEHL, B.; WAZIR, S. K. S. The major seed proteins of Theobroma cacao L. **Food Chemistry**, v.47, n.2, p.145–151, 1993.
- YAMAGIWA K., ICHIKAWA K. Uber die kunstliche Erzeugung von Papillom. **Verh Jap Path Ges**, v.5, p.8-142, 1915.
- YUSOF, F.; KHANAHMADI, S.; AMID, A.; MAHMUD, S. S. Cocoa pod husk, a new source of hydrolase enzymes for preparation of cross-linked enzyme aggregate. **Springer Plus**, 2016.
- WANG, H.; YAO, M.; YUE, Z.; JIA, M.; REITZ, R. D. A reduced toluene reference fuel chemical kinetic mechanism for combustion and polycyclic-aromatic hydrocarbon predictions. **Combustion and Flame**, v.162, n.6, p.2390–2404, 2015.
- WANG, X.; WANG, Y.; QIN, Y.; DING, L.; CHEN, Y.; XIE, F. Talanta Sensitive and selective determination of polycyclic aromatic hydro- carbons in mainstream cigarette smoke using a graphene-coated solid- phase microextraction fi ber prior to GC / MS. **Talanta**, v.140, p.102–108, 2015.
- WANDAN, E. N.; ELLEINGAND, E. F.; NDOUBA, A. M. A screening for benzo[a]pyrene in cocoa beans subjected to different drying methods during on farm processing. **International Journal of Engineering Science and Technology (IJEST)**, v.3, n. 5, p.3621–3630, 2011.

WHO/IPCS - World Health Organization / International Programme on Chemical Safety. Selected Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. **Environmental Health Criteria**, Geneva, v.202, 1998.

WHO/FAO - World Health Organization / Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Summary and conclusions sixty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)**. Rome, p.1-17, 2005.

WHO - World Health Organization. Evaluation of some food contaminants. **WHO Technical Report Series**, Geneva, n.930, 2006.

WOLSKA, L.; MECHLINSKA, A.; ROGOWSKA, J.; NAMIESNIK, J. Sources and Fate of PAHs and PCBs in the Marine Environment. **Critical Review in Environmental Science and Technology**, v.42, p. 1172–1189, 2012.

ZACHARA, A.; GAŁKOWSKA, D.; JUSZCZAK, L. Method Validation and Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Vegetable Oils by HPLC-FLD. **Food Analytical Methods**, p.1078–1086, 2016.

ZACHARA, A.; GAŁKOWSKA, D.; JUSZCZAK, L. Contamination of smoked meat and fish products from Polish market with polycyclic aromatic hydrocarbons. **Food Control**, v.80, p.45–51, 2017.

ZHANG, H.; XUE, M.; DAI, Z. Journal of Food Composition and Analysis Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic products by HPLC-fluorescence. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.23, n.5, p.469–474, 2010.

ZHOU, H.; WU, C.; ONWUDILI, J. A.; MENG, A.; ZHANG, Y.; WILLIAMS, P. T. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) formation from the pyrolysis of different municipal solid waste fractions. **WASTE MANAGEMENT**, 2014.

ZIEGENHALS, K.; SPEER, K.; JIRA, W. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in chocolate on the German market. **Journal fur Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, v.4, n.2, p.128–135, 2009.

ZOUGAGH, M.; REDIGOLO, H.; RÍOS, A.; VALCÁRCEL, M. Screening and confirmation of PAHs in vegetable oil samples by use of supercritical fluid extraction

in conjunction with liquid chromatography and fluorimetric detection. **Analytica Chimica Acta**, v.525, p.265–271, 2004.

ŻYŻELEWICZ, D.; ORACZ, J.; KRYSIAK, W.; BUDRYN, G.; NEBESNY, E. Effects of various roasting conditions on acrylamide, acrolein, and polycyclic aromatic hydrocarbons content in cocoa bean and the derived chocolates. **Drying Technology**, v.35, n.3, p.363–374, 2017.

CAPÍTULO 2 – EFEITO DO PROCESSAMENTO NOS NÍVEIS DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EM AMÊNDOAS DE CACAU E PRODUTOS DERIVADOS

Caroline Abballe ^a, Fernanda Moralez Leme Gomes ^a, Beatriz Dezembro Lopes ^a, Ana Paula Ferreira de Oliveira ^a, Maria Isabel Berto ^a, Priscilla Efraim^b, Sílvia Amélia Verdiani Tfouni^a

^a Instituto de Tecnologia de Alimentos, Av. Brasil, 2880, 13070-178, Campinas-SP, Brasil.

^b Universidade Estadual de Campinas, Rua Monteiro Lobato, 80, 13083-862, Campinas-SP, Brasil.

Resumo

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos formados a partir da queima incompleta de material orgânico sendo alguns deles considerados carcinogênicos e genotóxicos. A contaminação do cacau e seus produtos derivados por HPAs pode ocorrer devido à utilização de fumaça na etapa de secagem das amêndoas e às altas temperaturas envolvidas na torrefação das mesmas. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do tempo (0 a 120 minutos) e da temperatura (120, 135 e 150°C) na torração de amêndoas secas com e sem fumaça quanto à formação de 13 HPAs, assim como o comportamento desses compostos ao longo do processamento. Ao longo do processo de torra das amêndoas sem fumaça, em diferentes temperaturas, foram detectados 4 HPAs com concentrações variando de 0,32 a 0,50 µg/kg e nas amostras com fumaça foi verificada a presença de 7 compostos apresentando níveis maiores variando de 0,64 a 23,35 µg/kg. Foi observada uma redução nos níveis de HPAs com o aumento do tempo e da temperatura de torração. Os maiores níveis destes compostos foram detectados nas amostras provenientes de amêndoas secas com fumaça, possivelmente por uso inadequado dos secadores rotativos. Foi verificada uma tendência de migração dos HPAs para a manteiga de cacau. Os dados obtidos podem contribuir para o estabelecimento de práticas de mitigação da contaminação por HPAs.

Palavras-chaves: Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, amêndoa de cacau, cacau em pó, *liquor*, manteiga de cacau.

Introdução

O cacau (*Theobroma cacao L.*) é a principal matéria prima para a produção do chocolate, produto popular e apreciado mundialmente. Além do sabor característico, os alimentos contendo cacau destacam-se por possuir compostos benéficos à saúde com propriedades anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, analgésica e vasodilatadora (Giacometti *et al.*, 2016; Efraim *et al.*, 2010). Ainda, apresentam-se como fonte de elementos essenciais, como o Ca, Fe, Mg, Mn, K e Zn (Peixoto, Oliveira, & Cadore, 2012; Bertoldi, *et al.*, 2016; Cinquanta *et al.*, 2016). Nesse sentido, as características das amêndoas relacionam-se aos atributos genéticos do cacauzeiro, ao meio de cultivo e ao processamento (Schmidt *et al.*, 2015).

Estima-se que a produção mundial de 2018/2019 de amêndoas de cacau será de 4,834 mil toneladas. Atualmente, a Costa do Marfim é o maior produtor com 1,9 milhões de toneladas de amêndoas/ano, seguido por Gana que produz 850 mil toneladas/ano. O Brasil encontra-se em quinto lugar em produção, sendo que no ano de 2018 produziu 255,2 mil toneladas (IBGE, 2019; ICCO, 2019).

O pré-processamento das amêndoas de cacau é geralmente realizado no país de origem e desempenha uma função crítica na qualidade e no perfil de sabor das amêndoas. Nas fazendas produtoras realizam-se a colheita, quebra dos frutos, fermentação e secagem, etapa essa que diminui a acidez, promove processos bioquímicos e reduz a umidade a 8% (Beckett *et al.*, 2017; Schmidt *et al.*, 2015). O processo de secagem mais comum utiliza fonte natural, por exposição ao sol, em instalações com tetos móveis ou estufas, e pode durar de 7 a 14 dias. Outra opção de secagem, principalmente em locais com altos índices de chuva, refere-se ao sistema com ar quente forçado, a qual é mais rápida, com duração de 2 a 3 dias (Bertorelli, Graziani, & Rovedas, 2009; Araujo *et al.*, 2014). Contudo, esse processo resulta em menor eliminação do ácido acético e maior adstringência e amargor das amêndoas (Oetterer, Regitano-d'arce, & Spoto, 2006). Geralmente, a fonte para o aquecimento do ar na secagem das amêndoas é a queima de madeira, sendo a geração de fumaça um ponto crítico dessa prática, uma vez que o contato direto da fumaça, causada pelo falta de manutenção nos equipamentos, com as amêndoas pode promover além de sabor desagradável, a contaminação por hidrocarbonetos

policíclicos aromáticos (HPAs) (Raters & Matissek, 2014; Wandan, Elleingand & Ndouba, 2011; Lower *et al.*, 2012). Uma vez secas, as amêndoas são armazenadas e transportadas.

Nas indústrias processadoras, realizam-se as etapas de limpeza e separação da casca e *nibs*, antes ou depois do processo de torra. Se realizada antes, os cotilédones fragmentados serão torrados utilizando binômios de tempo e temperatura com variação de 100°C a 200°C por um período de 15 minutos a 2 horas, que possibilitam a ocorrência da reação de *Maillard*, perda de umidade e redução de ácidos voláteis, principalmente o ácido acético (Beckett, 2017; Afoakwa, 2015). A torração é uma importante etapa para a formação do sabor desejável (Djikeng *et al.*, 2018; Mounjouenpoua *et al.*, 2018). Contudo, assim como na etapa de secagem, parâmetros não controlados podem levar à formação de compostos carcinogênicos como os HPAs (Zyzelewicz *et al.*, 2017). Após a torração, os *nibs* de cacau passam pelas etapas de moagem e refino, após as quais é obtida uma massa ou *liquor* de cacau com granulometria em torno de 20 a 24 µm. A obtenção da manteiga de cacau e do cacau em pó (10-12% de gordura) é feita por prensagem hidráulica do *liquor* de cacau. Esses produtos são empregados como ingredientes na produção do chocolate (Beckett, 2017; Afoakwa, 2016).

Os HPAs constituem uma classe de compostos com potencial carcinogênico. A formação desses compostos se dá a partir da queima incompleta de material orgânico. Tais compostos podem ser formados durante o processamento de alimentos em processos envolvendo defumação, torrefação, secagem e alguns tipos de cozimento (WHO, 2006; EFSA, 2008). A contaminação de alimentos por HPAs deve-se principalmente à poluição do ar e da água, à sua presença em solos terrestres e marinhos e à sua formação durante o processamento dos alimentos. Desta maneira, a presença dos mesmos tem sido relatada em diversas categorias de alimentos incluindo produtos defumados (Zachara, Gałkowska, & Juszcak, 2017), chás (Chen *et al.*, 2016), café (Shi Y. *et al.*, 2016), óleo vegetal (Tfouni *et al.*, 2014), alimentos de origem marinha (Shi J. *et al.*, 2016), frutas e vegetais (Paris *et al.*, 2018) entre outros (Oz & Yuzer, 2016; Molle *et al.*, 2017; Pan *et al.*, 2015).

Atualmente, a exigência de níveis seguros de resíduos de agrotóxicos, micotoxinas, HPAs, contaminantes inorgânicos e outros em grãos de cacau é estabelecida. Para tanto se deve rastrear a origem da contaminação dos grãos em

sua cadeia produtiva (FCC, 2019). A importância dos estudos sobre a contaminação de alimentos por HPAs deve-se ao fato destes terem um elevado potencial genotóxico (ação nociva que afeta a integridade do material genético) e poderem ser mutagênicos e/ou carcinogênicos, ou seja, capazes de causar mutação genética, alteração da molécula de DNA que não é reparada durante a divisão celular, contribuindo para o desenvolvimento de tumores (WHO, 2006; EFSA, 2008).

Segundo a Agência Internacional de Pesquisas sobre o Câncer (IARC, 2010), os HPAs são classificados como substâncias pró-carcinogênicas, necessitando de ativação metabólica para formar o carcinógeno ativo. Dentre eles, destaca-se o benzo(a)pireno, que pertence ao grupo 1 (substâncias carcinogênicas) e outros HPAs que se enquadram no grupo 2B, considerados possivelmente cancerígenos para humanos (benzo(a)antraceno, criseno, benzo(j)fluoranteno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno e indeno (1,2,3 cd-pireno)).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos tempo (0 a 120 minutos) e temperatura (120, 135 e 150°C) durante a torração de amêndoas de cacau quanto à formação de 13 HPAs, assim como o comportamento desses compostos ao longo do processamento por meio da análise dos produtos derivados (*liquor*, manteiga e cacau em pó).

Materiais e métodos

Solventes e Reagentes: Os solventes e reagentes utilizados, grau HPLC, foram: hexano, N-dimetilformamida, metanol e acetonitrila (JT Baker). Foram também utilizados filtros de 0,45 µm (Agilent) para filtração dos extratos antes da injeção no cromatógrafo. A água utilizada foi obtida através de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore Co.). O hidróxido de sódio foi da marca Synth (Labsynth, Brasil).

Amostras: As amêndoas de cacau foram adquiridas junto a uma processadora de cacau localizada na região sul da Bahia, e foram coletadas após as etapas de fermentação e secagem (25 kg de amêndoas de cacau fermentadas e secas sem fumaça e 25 kg amêndoas de cacau fermentadas e secas com fumaça).

Processamento: As amêndoas de cacau com e sem fumaça foram torradas em bateladas de 2 kg cada em forno elétrico rotativo (JAF Inox, Tambaú, SP) com circulação de ar forçada por 120 minutos, sendo retiradas amostras de 100 g a cada 15 minutos. As temperaturas usadas foram 120°C, 135°C e 150°C para as amostras sem fumaça, e 120°C e 150°C para as amostras com fumaça. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, totalizando 77 amostras que foram utilizadas para estudo da cinética de formação dos HPAs. Todas as amostras foram acondicionadas em embalagens PET/metalizadas para não ter perda de umidade e contato com oxigênio. As condições de processamento que resultaram em amêndoas torradas de melhor qualidade do ponto de vista comercial (avaliada em função da acidez total e umidade) e que resultaram em maior formação de HPAs foram selecionadas para o processamento e obtenção dos produtos derivados: *liquor*, cacau em pó e manteiga de cacau, em triplicata. As amêndoas foram quebradas em moinho de facas de aço inoxidável (ICMA, Campinas, SP), depois foi realizada uma separação granulométrica com peneiras com abertura de 5,66 mm e 2,83 mm seguida pela separação da casca e gérmen dos cotilédones por diferença de tamanho e densidade em um equipamento descascador (Capco Test Equipment, Suffolk, UK). Os *nibs* foram refinados em Melanger (Spectra 10, Índia), para obtenção do *liquor*. O diâmetro máximo das partículas foi controlado com micrômetro digital de forma a permanecer entre 20 e 25 µm (Mitutoyo, Suzano, Brasil). Posteriormente, foi realizada a prensagem do *liquor* em lotes de 500 g, em prensa hidráulica (Ercitec, Bauru, SP) para separação da manteiga de cacau e do cacau em pó.

Determinação da umidade: O teor de umidade foi determinado por gravimetria, utilizando estufa com circulação de ar a temperatura de 100°C até peso constante de acordo com o AOAC 931.04 (Latimer, 2019).

Determinação da acidez total e pH: O pH e a acidez titulável foram medidos em suspensão aquosa da amostra (10 g de amostra em 90 mL de água), utilizando-se um medidor de pH digital modelo ST310 (OHAUS, Campinas, Brasil) de acordo com os procedimentos para a determinação de pH pelo método AOAC 970.21 e acidez

foi determinada por titulometria com NaOH 0,1M conforme método oficial da AOAC 942.15 (Latimer, 2019).

Determinação dos HPAs: O método analítico utilizado para avaliar a presença dos 13 HPAs (benzo(a)antraceno (BaA), benzo(b)fluoranteno (BbF), benzo(j)fluoranteno (BJF), benzo(k)fluoranteno (BkF), benzo(a)pireno (BaP), criseno (Chy), dibenzo(ah)antraceno (DahA), dibenzo(ae)pireno (DaeP), dibenzo(ah)pireno (DahP), dibenzo(ai)pireno (DaiP), dibenzo(al)pireno (DalP), indeno (1,2,3 cd-pireno) (IcdP) e 5-metilcriseno (5MChy)) foi baseado naquele empregado por Camargo, Antonioli e Vicente (2011) para análise de HPAs em óleo de soja.

Extração e Limpeza: Um grama das amostras de amêndoas de cacau, cacau em pó e *liquor* foram pesados em erlenmeyer e 10 mL de hexano foram adicionados. As amostras foram colocadas em ultrassom por 15 minutos e a seguir foram transferidas para um funil de separação. Para a manteiga de cacau foi pesado 0,5 g e transferido para um funil de separação com auxílio de 5 mL de hexano. A limpeza dos extratos foi realizada com cartuchos de extração em fase sólida (C18). Os cartuchos foram ativados com 5 mL de metanol e 5 mL de água. Em seguida, as amostras foram aplicadas e o cartucho lavado com 10 mL de dimetilformamida-água (1:1, v/v) e 10 mL de água. A água residual foi retirada por secagem sob vácuo e posteriormente os HPAs foram eluídos com 10 mL de hexano. O extrato obtido foi evaporado até secagem e diluído em 0,5 mL de acetonitrila para manteiga de cacau, e 1 mL para cacau em pó, amêndoa de cacau e *liquor*.

Análise cromatográfica: A técnica empregada para análise cromatográfica foi a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (HPLC-FDL), sendo utilizado um sistema Shimadzu com os seguintes módulos: bomba quaternária LC-20AT, desgaseificador on-line DGU-20A5, injetor automático SIL-20A, forno de coluna Modelo CTO-20A e detector de fluorescência Modelo RF-10AXL. Para a separação dos compostos foi empregada uma coluna C18 polimérica Vydac 201 TP54 (25 cm x 4,6 mm d.i., 5 µm, estabilizada a 30 °C) e um gradiente de fase móvel composto por acetonitrila-água em um fluxo de 1 mL/min, e volume de injeção de 30 µL. as análises foram realizadas em duplicata e os dados foram

adquiridos e processados com LCsolution software. Os compostos foram quantificados pelo método de padronização externa. Os resultados estão apresentados em base seca.

Análise estatística: Os dados obtidos foram processados utilizando o programa XLSTAT versão 2012.6.03 (Addinsoft, França) para análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey com 95% de confiança.

Resultados e Discussão

Efeito do binômio tempo e temperatura da torra

O método analítico para determinação de HPAs foi validado de acordo com as orientações do INMETRO (2018). As curvas de calibração se mostraram lineares para todos os compostos, com os coeficientes de correlação linear (r) variando de 0,9991 a 0,9999. Os limites de quantificação foram de 0,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 3,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e os limites de detecção variaram 0,07 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 0,21 $\mu\text{g}/\text{kg}$, entretanto, os compostos benzo(j)fluoranteno e indeno(1,2,3-cd)pireno apresentaram valores mais altos, 1,56 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 0,33 $\mu\text{g}/\text{kg}$. A exatidão variou entre 81% e 108% para a amêndoa de cacau, 80% e 104% para o *liquor*, 82% e 117% para o cacau em pó e 81% e 108% para na manteiga de cacau. A repetibilidade do método variou de 1% a 14% (amêndoa), 2% a 10% (*liquor*), 2% a 14% (cacau em pó) e 1% a 10% (manteiga de cacau). A precisão intermediária apresentou valores de 3% a 9% (amêndoa), 5% a 9% (*liquor*), 6% a 14% (cacau em pó) e 3% a 10% (manteiga de cacau).

Na Tabela 1 estão apresentados os níveis de HPAs encontrados durante o processo de torra das amêndoas de cacau. Foi observada uma contaminação inicial tanto na amêndoa seca sem fumaça como na seca com fumaça, 1,78 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 66,24 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para a soma dos HPAs, respectivamente.

A presença de HPAs no tempo zero nas amostras sem fumaça possivelmente está relacionada com a contaminação ambiental, onde o material particulado pode se depositar na superfície do alimento (Pozo *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2015). Aikpokpodion *et al.* (2013) mostraram que, embora algumas plantações estejam situadas longe das áreas urbanas, o escape de fumaça dos automóveis é uma fonte

importante da contaminação dos HPAs nas amêndoas de cacau; apesar dos níveis de BaP relatados estarem abaixo do limite máximo estabelecido pela União Europeia (CEC, 2011).

Nas amêndoas de cacau secas com presença de fumaça, outra possível fonte de contaminação é a fumaça proveniente do próprio processo de secagem. Essa contaminação inicial se deve provavelmente ao uso de um sistema de secagem artificial com secadores rotativos aquecidos pela queima de lenha. Assim a combustão da madeira leva à formação dos HPAs e conseqüentemente à sua presença nas amêndoas (WHO, 2006; EFSA, 2008). Em seus estudos, Wandan, Elleingand & Ndouba (2011) e Lower et al. (2012) também verificaram que as amêndoas de cacau processadas com secadores artificiais apresentavam maior concentração de BaP do que aquelas secas ao sol. A presença de HPAs em amêndoas secas ao sol e com fumaça também foi identificada em outros estudos (Aikpokpodion, Oduwole, & Ademola, 2013; Raters & Matissek, 2014; Wandan, Elleingand, & Ndouba, 2011).

Conforme apresentado na Tabela 1, ao longo do processo de torra das amêndoas sem fumaça, em diferentes temperaturas, foram detectados 4 dos 13 HPAs analisados (BaA, Chy, BaP e DaeP) com concentrações variando de 0,32 a 0,50 µg/kg e nas amostras com fumaça foi verificada a presença de 7 compostos (BaA, Chy, BbF, BkF, BaP e DaeP) apresentando níveis maiores variando de 0,64 a 23,35 µg/kg.

Os resultados obtidos durante a torra das amêndoas de cacau sem fumaça mostram que houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os diferentes tempos de processo para uma mesma temperatura, porém, em valores absolutos, a diferença pode ser considerada pequena (máximo de 0,07 µg/kg para o BaP a 150 °C). Ao comparar as temperaturas empregadas no processo para um mesmo tempo, verifica-se que houve diferença significativa ($p>0,05$) apenas nos tempos de 60 e 105 minutos. Estes resultados indicam que, com o aumento do tempo e da temperatura do processo de torração, não houve acréscimo nos níveis de HPAs em relação à contaminação inicial (tempo 0). Os dados obtidos no presente estudo divergem dos resultados obtidos por Zyzelewicz et al. (2017), que avaliaram a presença de 12 HPAs em amêndoas de cacau torradas em temperaturas e tempos

diferentes e observaram que o aumento da temperatura levou a um pequeno aumento na concentração de HPAs, de 0,38 a 0,69 µg/kg.

Tabela 1. Níveis (µg/kg) dos HPAs detectados nas amêndoas de cacau fermentadas e secas com e sem fumaça durante o processo de torra.

Amêndoa de cacau sem fumaça									
T (°C)	t (min)	BaA ^a	Chy ^a	5 MChy ^a	BbF ^a	BkF ^a	BaP ^a	DaeP ^a	ΣHPA ^a
120	0	0,44 ab	0,38 b	nd	nd	nd	0,48 b	0,49 a	1,78 bA
	30	0,44 b	0,32 a	nd	nd	nd	0,42 a	0,48 a	1,67 abA
	60	0,42 ab	0,34 a	nd	nd	nd	0,42 a	0,49 a	1,67 abB
	90	0,42 ab	0,33 a	nd	nd	nd	0,44 ab	0,48 a	1,67 abA
	105	0,41 a	0,32 a	nd	nd	nd	0,45 ab	0,46 a	1,64 aAB
	120	0,42 ab	0,33 a	nd	nd	nd	0,43 ab	0,45 a	1,64 aA
135	0	0,44 a	0,38 b	nd	nd	nd	0,48 b	0,49 a	1,78 bA
	30	0,41 a	0,33 a	nd	nd	nd	0,45 a	0,49 a	1,67 aA
	60	0,43 a	0,33 a	nd	nd	nd	0,44 a	0,49 a	1,68 aB
	90	0,42 a	0,33 a	nd	nd	nd	0,43 a	0,50 a	1,67 aA
	105	0,42 a	0,33 a	nd	nd	nd	0,43 a	0,50 a	1,68 aB
	120	0,41 a	0,33 a	nd	nd	nd	0,43 a	0,48 a	1,65 aA
150	0	0,44 a	0,38 b	nd	nd	nd	0,48 c	0,49 b	1,78 bA
	30	0,42 a	0,33 a	nd	nd	nd	0,44 b	0,44 a	1,64 aA
	60	0,42 a	0,33 a	nd	nd	nd	0,41 a	0,44 a	1,60 aA
	90	0,43 a	0,33 a	nd	nd	nd	0,42 ab	0,43 a	1,61 aA
	105	0,41 a	0,34 a	nd	nd	nd	0,42 ab	0,43 a	1,59 aA
	120	0,42 a	0,33 a	nd	nd	nd	0,42 ab	0,43 a	1,60 aA
Amêndoa de cacau com fumaça									
120	0	13,82 c	23,35 c	1,14 a	7,06 c	4,50 d	10,35 d	2,12 c	66,24 cA
	30	7,96 b	11,62 b	1,08 a	4,49 b	2,60 bc	5,91 bc	1,75 b	37,71 bA
	60	6,85 ab	10,61 ab	1,15 a	4,28 b	2,35 a	5,21 ab	1,70 b	33,25 abA
	90	7,95 b	11,59 b	1,07 a	4,37 b	2,83 bc	6,34 bc	1,72 b	38,46 bA
	105	8,17 b	12,3 b	1,19 a	4,68 b	2,92 c	6,51 c	1,86 b	40,48 bA
	120	5,40 a	8,39 a	0,97 a	2,83 a	1,76 ab	3,97 a	1,12 a	26,03 aA
150	0	13,82 d	23,35 d	1,14 c	7,06 c	4,50 c	10,35 c	2,12 c	62,24 dA
	30	7,58 c	11,51 c	0,97 bc	4,86 b	3,12 b	6,98 b	1,84 b	40,17 cA
	60	5,72 b	8,96 b	0,77 ab	4,21 b	2,74 a	6,53 b	1,85 b	33,00 bA
	90	5,07 b	8,11 b	0,71 a	4,22 b	2,89 b	7,04 b	1,91 b	33,31 bA
	105	5,56 b	9,37 b	0,76 a	4,53 b	3,08 b	7,26 b	1,86 b	36,11 bcA
	120	3,25 a	5,16 a	0,64 a	2,36 a	1,50 a	3,47 a	1,35 a	19,83 aB

BaA: benzo(a)antraceno, Chy: criseno, 5MChy: 5 metilcriseno, BbF: benzo(b)fluoranteno, BkF: benzo(k)fluoranteno, BaP: benzo(a)pireno, DaeP: dibenzo(a,e)pireno.

^a Média da triplicata do processo de torra. As análises foram realizadas em duplicata. (n=6).

Resultados expressos em base seca

T: temperatura, t: tempo

nd: não detectado.

Valores da mesma coluna, com letras iguais não diferem significativamente entre si (p> 0,05).

Para as amostras secas com presença de fumaça foi realizado o processo de torração empregando a menor e a maior temperatura estudadas (120°C e 150°C). Os níveis de HPAs detectados nas amêndoas com fumaça, nas duas temperaturas e nos seis tempos estudados (Tabela 1), mostram que houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tempos de processo em ambas as temperaturas de torração. Ao comparar as temperaturas empregadas no processo, verifica-se que houve diferença significativa ($p > 0,05$) em 120 minutos, com uma diminuição nos níveis de HPAs com o aumento da temperatura de torração de 120 para 150°C.

Os resultados obtidos mostram que houve uma pequena alteração nos níveis de HPAs no período entre 30 e 105 min. No entanto, foi verificada uma queda nos primeiros 30 min de torra e novamente em 120 minutos, possivelmente devido à degradação desses compostos. Ao adotar um processamento sob a maior temperatura (150°C) e maior tempo (120 min), os compostos BaA, Chy, BbF, BkF e BaP com 3 e 4 anéis aromáticos apresentaram redução dos teores de 64 a 78%; enquanto que os compostos 5MChy e D(ae)P, com 6 anéis, sofreram uma menor diminuição dos níveis (36 a 43%). Esses resultados estão de acordo com outros estudos onde foi avaliada a estabilidade dos HPAs diante do aumento da temperatura e do tempo de aquecimento. Nesses estudos foi verificado que os compostos com menor número de anéis aromáticos são degradados, enquanto os compostos com maior número de anéis e maior massa molecular têm maior dificuldade para se degradar (Chen & Chen 2001; Houessou *et al.*, 2007).

Efeito do processamento nos produtos do cacau

Para o acompanhamento das condições de torração foram realizadas análises de umidade, acidez e pH das amêndoas de cacau. Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

A escolha do binômio tempo x temperatura de torra adequado para dar sequência ao processamento e obter os produtos derivados das amêndoas de cacau (*liquor*, cacau em pó e manteiga de cacau) foi realizada em função da umidade e acidez, a fim de garantir a eliminação do ácido acético e de outros compostos indesejáveis formados durante a fermentação, obtendo assim um produto de melhor qualidade.

A acidez é um parâmetro importante para as amêndoas de cacau, pois indica a concentração de ácidos livres totais que pode interferir no sabor do produto acabado (Efraim *et al.*, 2010; Huang & Barringer, 2010). O pH nas amêndoas e produtos derivados influencia na cor, sabor e principalmente na dispersibilidade do cacau (Efraim *et al.*, 2011). Os resultados da Tabela 2 mostram que a acidez das amêndoas de cacau torradas sem fumaça variou de 11,34 a 12,75 meq NaoH/100g. Foi também observada uma diferença significativa com o aumento do tempo e da temperatura, sendo que a acidez titulável diminuiu conforme a torração, enquanto o pH aumentou. Jinap e Dimick (1991) e García-Alamilla (2017) observaram o mesmo em seus estudos, nos quais a acidez variou entre 18,79 meq NaoH/100g na temperatura de 150°C e 11,10 meq NaoH/100g em 110°C. Essas variações podem ser explicadas pelas diferenças nos estágios de maturação, na condução do processo de fermentação e na torração (Beckett *et al.*, 2017).

Tabela 2: Teor de umidade, acidez total e pH, em base seca, nas amêndoas de cacau secas com e sem fumaça durante o processo de torra.

	Tempo (min)	Amêndoa sem fumaça			Amêndoa com fumaça	
		120°C	135°C	150°C	120°C	150°C
Umidade (%) ^a	0	7,47 f	7,47 e	7,47 e	7,68 f	7,68 f
	30	3,19 e	1,92 d	1,20 d	2,63 e	1,06 e
	60	1,66 d	0,97 c	0,72 c	1,73 d	0,85 d
	90	1,25 c	0,90 b	0,62 b	1,34 c	0,76 c
	105	1,04 b	0,70 a	0,59 b	1,24 b	0,61 b
	120	0,84 a	0,65 a	0,44 a	1,10 a	0,52 a
Acidez (meq NaoH/100g) ^a	0	15,63 f	15,63 e	15,63 e	19,59 e	19,59 f
	30	12,75 e	12,09 d	11,77 d	16,31 d	15,19 e
	60	12,29 d	11,85 c	11,64 c	15,82 c	15,09 d
	90	12,12 c	11,76 c	11,58 bc	15,58 b	14,96 c
	105	11,94 b	11,66 b	11,50 b	15,47 b	14,74 b
	120	11,81 a	11,53 a	11,34 a	15,25 a	14,55 a
pH (%) ^a	0	5,20 a	5,20 a	5,20 a	5,20 a	5,20 a
	30	5,63 b	5,61 b	5,64 b	5,63 b	5,64 b
	60	5,66 c	5,64 c	5,68 bc	5,66 c	5,68 c
	90	5,69 d	5,67 d	5,69 c	5,69 d	5,69 d
	105	5,73 e	5,69 e	5,74 d	5,73 e	5,74 e
	120	5,75 f	5,71 f	5,77 e	5,75 f	5,77 f

^a Média da triplicata do processo de torra. As análises foram realizadas em duplicata. (n=6). Resultados expressos em base seca. Valores da mesma coluna, com letras iguais não diferem significativamente entre si (p> 0,05).

Como observado na Tabela 2, os valores da acidez para as amostras com fumaça foram maiores que a acidez nas amostras sem fumaça. Isso possivelmente

se deve a um menor cuidado no processo de secagem, com uso de binômios de tempo e temperatura mais altos. As amêndoas de cacau com fumaça geralmente são secas de forma artificial, em secadores mecânicos, nos quais geralmente são usadas temperaturas maiores que 65°C para acelerar o processo de secagem. Como consequência dos tempos mais curtos, há maior dificuldade de eliminação do ácido acético do cotilédone para a superfície; ou ainda, pode ser devido a alguma falha na manutenção do equipamento (Oetterer, Regitano-d'arce, & Spoto, 2006).

Os teores de umidade para as amêndoas fermentadas e secas (tempo zero) foram de 7,47% (sem fumaça) e 7,68% (com fumaça), encontrando-se abaixo do limite estabelecido pela Instrução Normativa 38/2008, de até 8% para assegurar uma boa conservação e não favorecer o crescimento de fungos (Brasil, 2008). Conforme esperado, houve diminuição nos teores de umidade ao longo do processo de torração das amêndoas, chegando ao intervalo de 0,44 a 1,10%.

Para avaliar o comportamento e os níveis de HPAs presentes nos produtos derivados do cacau foi dada sequência ao processamento utilizando temperatura de torração de 120°C por um tempo de 60 minutos. Conforme apresentado anteriormente, para amêndoas de cacau sem fumaça, essas condições resultaram em umidade e acidez apropriadas para processamento (em torno de 1,66%, e 12,29 meq NaOH/100g, respectivamente). Para uma comparação adequada dos resultados, foi dada sequência ao processo nas mesmas condições para amêndoas de cacau com fumaça. O uso de maiores tempos (105 e 120 minutos) poderia ocasionar uma desidratação intensa da superfície dos cotilédones, ou seja, uma perda sensorial e também uma menor aceitação devido ao sabor amargo e gosto de queimado; enquanto um menor tempo (30 minutos) não levaria à formação dos compostos de sabor nem à eliminação adequada do ácido acético (Afoakwa, 2015; Beckett *et al.*, 2017).

Na Tabela 3 estão apresentados os níveis de HPAs nos produtos obtidos das amêndoas com e sem fumaça torradas a 120°C por 60 minutos. Nos produtos obtidos a partir das amêndoas sem fumaça foram detectados quatro HPAs com níveis variando de não detectado a 0,75 µg/kg. O *liquor* e a manteiga apresentaram as maiores concentrações para a somatória dos HPAs (Σ HPA), 2,02 e 2,09 µg/kg, respectivamente, enquanto que na casca os HPAs não foram detectados. Sete compostos foram detectados nos subprodutos obtidos a partir das amêndoas com

fumaça, sendo que os níveis variaram entre 0,33 e 30,62 µg/kg. Nesse caso, a casca e a manteiga apresentaram as maiores concentrações para ΣHPA, 137,37 e 31,70 µg/kg, respectivamente.

O Regulamento nº835/2011 da União Europeia estabelece níveis máximos para alguns HPAs em alguns alimentos, entre eles amêndoas de cacau e seus derivados. Os limites máximos são de 5,0 µg/kg para o benzo(a)pireno e 30,0 µg/kg para a somatória dos HPA4 (BaA, Chy, BbF e BaP) (CEC, 2011). Assim, o nível detectado na casca da amostra seca com fumaça ultrapassou o limite estabelecido pela legislação tanto para o BaP como para o HPA4. Os níveis detectados nas amêndoas de cacau torradas e nos outros subprodutos estavam de acordo com os níveis estabelecidos pela legislação para os dois parâmetros.

Tabela 3: Níveis (µg/kg) dos HPAs detectados nas amêndoas de cacau torrada e nos subprodutos *liquor*, casca, cacau em pó e manteiga de cacau. Torra realizada a 120°C / 60 minutos.

	HPA	Amêndoa torrada	Liquor	Casca	Cacau em pó	Manteiga
Amêndoa sem fumaça	BaA	0,39 b	0,57 c	nd	0,37 b	0,60 c
	Chy	0,34 b	0,67 c	nd	0,34 b	0,75 d
	BaP	0,32 b	0,41 c	nd	0,32 b	0,32 b
	DaeP	0,44 c	0,37 b	nd	0,42 c	0,42 bc
	ΣHPA	1,47 A	2,02 A	nd	1,46 A	2,09 A
Amêndoa com fumaça	BaA	3,84 c	2,63 b	30,62 e	1,23 a	8,34 d
	Chy	5,01 b	4,71 b	47,21 d	2,07 a	11,10 c
	5MChy	0,38 a	1,14 b	3,34 c	0,35 a	0,56 a
	BbF	2,32 c	1,35 b	17,66 e	0,46 a	3,52 d
	BkF	1,43 b	1,20 b	12,06 d	0,40 a	3,15 c
	BaP	2,84 b	2,21 b	22,21 d	0,48 a	4,10 c
	DaeP	0,48 a	0,33 a	4,26 c	0,35 a	0,93 b
ΣHPA	16,30 B	13,56 B	137,37	4,94 B	31,70 B	

BaA: benzo(a)antraceno, Chy: criseno, 5MChy: 5 metilcriseno, BbF: benzo(b)fluoranteno, BkF: benzo(k)fluoranteno, BaP: benzo(a)pireno, DaeP: dibenzo(a,e)pireno.

^a Média da triplicata do processo de torra. As análises foram realizadas em duplicata. (n=6).

Resultados expressos em base seca

nd: não detectado.

Valores da mesma coluna com letras iguais não diferem significativamente entre si (p> 0,05).

De modo a analisar o comportamento dos HPAs durante o processamento, foi realizado um balanço de massa utilizando a massa dos produtos obtidos e as concentrações da ΣHPA apresentadas na Tabela 3. Durante o processamento das

amêndoas até a obtenção de *liquor*, foi observado que houve sobra de torta de cacau no moinho; assim como houve sobra de *liquor* na prensa durante a obtenção da manteiga e do cacau em pó. Isso se deve possivelmente ao fato do processo ter sido realizado em escala piloto, havendo uma falta de eficiência do moinho e da prensa hidráulica.

Os resultados obtidos para o balanço de massa estão apresentados na Tabela 4. Conforme foi possível verificar, na amostra sem fumaça a maior porção dos HPAs ficou retida no *liquor* (91,4%) e posteriormente foi transferida quase em proporções iguais para a manteiga (34,0%) e para o cacau em pó (37,0%); sendo que o restante ficou retido no *liquor* que sobrou na prensa (20,4%). Não foi detectada a presença de HPAs na casca. Na amostra com fumaça, por sua vez, apenas 54,9% dos HPAs ficaram retidos no *liquor*, sendo a seguir transferidos em maior proporção para a manteiga de cacau (42,8%). Após as etapas de moagem e prensagem, uma grande porção dos HPAs ficou retida na casca (31,5%) e uma porção considerável (13,6%) ficou na torta de cacau retida no moinho.

Tabela 4: Balanço de massa dos HPAs utilizando a massa dos subprodutos obtidos e as concentrações da Σ HPA.

Amêndoa	Moinho	Prensa	HPAs (%)
Sem fumaça	<i>Liquor</i> (91,4 %)	Manteiga	34,0
		Cacau em pó	37,0
		Resíduo da prensa	20,5
	Casca		0,00
	Perdas no moinho e no processo de prensagem		8,6
Com fumaça	<i>Liquor</i> (54,9 %)	Manteiga	42,8
		Cacau em pó	11,0
		Resíduo da prensa	1,1
	Casca		31,5
	Perdas no moinho e no processo de prensagem		13,6

De acordo com os dados nas Tabelas 3 e 4, verifica-se que há tendência para que os HPAs, que são moléculas apolares, migrarem para a manteiga de cacau, que é a fração lipídica das amêndoas de cacau. Nas cascas das amêndoas de cacau com fumaça foi detectado um nível significativamente maior da Σ HPA em comparação com as cascas provenientes das amêndoas secas sem fumaça,

havendo também uma maior transferência de HPAs para esse produto. Esses resultados indicam que a contaminação ocorreu possivelmente na etapa de secagem artificial, quando as amêndoas entraram em contato direto com a fumaça proveniente da combustão da madeira. Após a torração as cascas são eliminadas, não prosseguindo para as outras etapas do processamento, entretanto, as altas temperaturas utilizadas na torração podem possibilitar a migração dos HPAs da casca para os cotilédones, e conseqüentemente para os produtos derivados (Aikpokpodion, Oduwole, & Ademola, 2013, Lowor *et al.*, 2012; Ziegenhals, Speer, & Jira, 2009).

Em estudo realizado por Misnawi (2012) foi avaliada a influência de diferentes processos de secagem das amêndoas de cacau nos teores de HPAs e foram obtidos dados similares aos encontrados no presente estudo, de forma que a manteiga de cacau obtida a partir de processo de secagem ao sol apresentou níveis de HPAs menores em relação àquela obtida em secagem artificial com queima de madeira.

Conclusão

Os resultados deste estudo demonstram que não houve aumento na concentração dos HPAs com a temperatura e o tempo usados no processo, não sendo verificada a formação desses compostos no processo de torração. Entretanto, foi observada uma redução nos níveis conforme o tempo e temperatura de processo aumentaram. A presença dos HPAs se deve à contaminação inicial das amêndoas de cacau fermentadas e secas, que pode ser proveniente de contaminação ambiental ou da fumaça gerada no processo de secagem com ar quente derivado da combustão de madeira.

Os maiores níveis destes compostos foram encontrados nas amostras com fumaça, possivelmente por uso inadequado dos secadores rotativos. O contato direto da fumaça com a casca em conjunto com as temperaturas de torra empregadas podem levar à migração dos HPAs para os cotilédones e, conseqüentemente, para os produtos derivados. A retirada da casca antes da torração, como já é utilizado em algumas indústrias, seria uma proposta para eliminação e/ou redução dos níveis dos HPAs tanto nas amêndoas quanto nos

produtos derivados. Essa ação poderia auxiliar na redução da exposição da população a compostos potencialmente carcinogênicos e genotóxicos.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo apoio financeiro (Processo 2017/21451-1) e pelas bolsas TT-3 (Processos 2018/23045-3 e 2018/11623-2) (C. Abballe e A.P.F. Oliveira). Ao PIBIC/CNPq pela bolsa IC (B.D. Lopes).

Referências Bibliográficas

Afoakwa, E. O. (2015). *Cocoa production and processing technology*. 1ed. Miami: Boca Raton.

Anang, B. T., Mensah, F., & Samoah, A. (2013). Farmers' assessment of the government spraying program in Ghana. *Journal of Economics and Sustainable Development*, 4(7), 92–99.

Araujo, R., Fernandes, C., Ribeiro, D., Efraim, P., Steinmacher, D., Lieberei, R., Bastide, P., & Araujo T.G. (2014). Cocoa Quality Index A proposal. *Food Control*, 46, 49-54. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.003>.

Aikpokpodion, P. E., Oduwole, O. O., & Ademola, S. M. (2013). Evaluation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Cocoa Beans obtained from Selected Cocoa Producing States in Nigeria. *Journal of Scientific Research & Reports*, 2 (2), 612–625. <http://dx.doi.org/10.9734/JSRR/2013/5428>.

Beckett, S.T., Fowler, M.S., & Ziegler, G.R. (2017). *Beckett's: Industrial Chocolate Manufacture and Use*. 5 ed. London: Wiley-Blackweel.

Bertorelli, L. O., Grazianl De Fariñas, L. G., & Rovedas, G. L. (2009). Influencia de vários factores sobre características del grano de cacao fermentado y secado al sol. *Agronomía Tropical*, 59 (2), 119–127. ISSN 0002-192X.

Bertoldi, D., Barbero, A., Camin, F., Caligiani, A., & Larcher, R. (2016). Multielemental fingerprinting and geographic traceability of Theobroma cacao beans

and cocoa products. *Food Control*, 65, 46-53.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.01.013>.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.(2008). Instrução Normativa 38/2008. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Brasil.

Camargo, M. C. R., Antonioli, P. R., & Vicente, E. (2011). HPLC-FLD simultaneous determination of 13 polycyclic aromatic hydrocarbons: validation of analytical procedure for soybean oils. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22 (7), 1354-1361. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532011000700022>.

CEC - The Commission of the European Communities. (2011). Commission Regulation (EC) No 835/2011 of 19 August 2011. Official Journal of European Union.

Chen, Y.C., & Chen B.H. (2001). Stability of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons during Heating. *Journal of Food and Drug Analysis*, 9 (1), 33-39.

Chen, H., Gao, G., Liu, P., Pan, R., Liu, X., & Lu, C. (2016). Determination of 16 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Tea by Simultaneous Dispersive Solid-Phase Extraction and Liquid-Liquid Extraction Coupled with gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods*, 9 (8), 2374–2384. <http://dx.doi.org/10.1007/s12161-016-0427-4>

Cinquanta, L., Cesare C., Manoni R., Piano, A., Roberti, P., & Salvatori G. (2016). Mineral essential elements for nutrition in different chocolate products. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 67, 773-778. <https://doi.org/10.1080/09637486.2016.1199664>.

Djikeng, F. T., Teyomonou, W. T., Tenyang, N., Tiencheu, B., Morfor, A. M., Touko, B. A. H., Houketchang, N., Boungo, G.T., Karuna, M.S.L., Ngoufack, F.Z., & Womenl, H.M. (2018). Effect of traditional and ovenroasting on the physicochemical properties of fermented cocoa beans. *Heliyon*, 4 (17), 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00533>.

EFSA - European Food Safety Authority. (2008). Polycyclic aromatic hydrocarbons in food, scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. *The EFSA Journal*, 724, 1-114.

Efraim, P., Pezoa-garcía, N. H., Jardim, D. C. P., Nishikawa, A., Haddad, R., & Eberlin, M. N. (2010). Influência da fermentação e secagem de amêndoas de cacau no teor de compostos fenólicos e na aceitação sensorial. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30,142–150. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612010000500022>.

EFRAIM, P.; ALVES, A. B.; JARDIM, D. C. P. Polifenóis em cacau e derivados: teores, fatores de variação e efeitos na saúde (2011). *Brazilian Journal of Food Technology*, 14, 3, 1-21.

FCC - Federation of Cocoa Commerce. Education, Agricultural Practices and Cocoa Food Safety. (2019). <http://www.cocoafederation.com/education/agricultural-practices>>. Acessado em 05 de maio de 2019.

García-Alamilla, P., Lagunes-Gálvez, L., M., Barajas-Fernández, J., & García-Alamilla, R. (2017). Physicochemical Changes of Cocoa Beans during Roasting Process. *Journal of Food Quality*, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2017/2969324>.

Giacometti, J., Muhvic, D., Pavletic, A., & Đudaric, L. (2016). Cocoa polyphenols exhibit antioxidant, antiinflammatory, anticancerogenic, and antinecrotic activity in carbon tetrachlorideintoxicated mice. *Journal of Functional Foods*, 23, 177–187. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.02.036>.

Houessou, J.K., Maloug, S., Leveque, A.S., Delteil, C., Heyd, B., & Camel, V. (2007) Effect of Roasting Conditions on the Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Content in Ground Arabica Coffee and Coffee Brew. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9719-9726. <http://dx.doi.org/10.1021/jf071745s>.

Huang, Y., & Barringer, S.A. (2010). Alkylpyrazines and other volatiles in cocoa liquor at pH 5 to 8, by selected ion flow tube-mass spectrometry (SIFT-MS). *Journal of Food Science*, 75 (1), 121-127. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01455.x>.

IARC - International Agency for Research on Cancer. (2010). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures. *IARC Monographs On The Evaluation Of Carcinogenic Risks To Humans*, 92, 1–868.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. (2019). LSPA - levantamento sistemático da produção agrícola. Estatística da Produção agrícola. Rio de Janeiro, 1-93.

ICCO – International Cocoa Organization. Produção Mundial de cacau (2019). <<http://www.icco.org/>>. Acessado em 28 janeiro de 2019.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (2018). DOQ-CGCRE-008- Orientação sobre validação de métodos analíticos. Rev. 07 - Julho 2018. Rio de Janeiro (RJ): Coordenação Geral de Acreditação.

Jinap, S., & Dimickj, P.S. (1991). Effect of Roasting on Acidic Characteristics of CocoaBeans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 317-321. <http://dx.doi.org/0022-5142/91/03.50>.

Latimer, G.L. (2019). *Official Methods of Analysis of AOAC international*. (2019). 21ed. Gaithersburg, MD.

Lowor, S.T., Jacquet, M., Vrieling, T., Aculey, P., Cros, E. & Takrama, J. (2012). Post-harvest sources of polycyclic aromatic hydrocarbon contamination of Cocoa beans: A simulation. *International Journal of AgriScience*, 2(11), 1043-1052. ISSN: 2228-6322.

Liu, Y., Gao, Y., Yu, N., Zhang, C., Wang, S., M.A, L.; Zhao, J., & Lohmann, R. (2015). Particulate matter, gaseous and particulate polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in an urban traffic tunnel of China : Emission from on-road vehicles and gas-particle partitioning. *Chemosphere*, 134, 52–59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.065>.

Misnawi (2012). Effect of cocoa bean drying methods on polycyclic aromatic hydrocarbons contamination in cocoa butter. *International Food Research Journal*, 19(4), 1589-1594. ISSN: 2231 7546.

Molle, D. R. D., Abballe, C., Gomes, F. M. L., Furlani, R. P. Z., & Tfouni, S. A. V. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons in canola, sunflower and corn oils and estimated daily intake. *Food Control*, 81, 96–100. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.05.045>.

Mounjouenpoua, P., Belibib, D., Andoseha, B. K., Okoudab, A., Mouanfona, K., Ehabe E.E., & Ndjouenkeuc, R. (2018). Temperature/duration couples variation of cocoa beans roasting on the quantity and quality properties of extracted cocoa butter. *Annals of Agricultural Sciences*, 63, 1, 19-24. <https://doi.org/10.1016/j.aosas.2018.04.001>.

Oetterer, M.; Regitano-d'arce, M.A.B.; Spoto, M.H.F.(2006). *Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Barueri: São Paulo.

Oz, F., & Yuzer, M. O. (2016). The effects of cooking on wire and stone barbecue at different cooking levels on the formation of heterocyclic aromatic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons in beef steak. *Food Chemistry*, 203, 59–66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.041>.

Pan, E., Sun, H., Xu, Q., Zhang, Q., Liu, L., Chen, X., & Xu, Y. (2015). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Concentrations in Drinking Water in Villages along the Huai River in China and Their Association with High Cancer Incidence in Local Population. Hindawi Publishing Corporation, 1-10. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/762832>.

Paris, A., Ledauphin, J., Poinot, P., & Gaillard, J.L. (2018). Polycyclic aromatic hydrocarbons in fruits and vegetables: Origin, analysis, and occurrence. *Environmental Pollution*, 234, 96–106. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.028>.

Peixoto, R.R. A., Oliveira, A., & Cadore, S. (2012). Multielemental determinations in chocolate drink powder using multivariate optimization and ICP OES. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 60, 117–8122. <https://doi.org/10.1021/jf303022r>.

Pozo, K., Estellano, V. H., Harner, T., Diaz-Robles, L., Cereceda-Balic, F., Etcharren, P., Pozo, K., Vidal, V., Guerrero, F., & Vergara-Fernández (2015), A. Chemosphere Assessing Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) using passive air sampling in the atmosphere of one of the most wood-smoke-polluted cities in Chile: The case study of Temuco. *Chemosphere*, 134, 475–481. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.04.077>.

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 (44), 10666–10671.
<http://dx.doi.org/10.1021/jf5028729>.

Schmidt, F. L., Efraim, P., Biasi, L. C. K., & Ferreira, R. E. (2015). Pré-processamento de frutas e hortaliças, café, cacau e cana de açúcar. Rio de Janeiro: Rio de Janeiro.

Shi, Y., Wu, H., Wang, C., Guo, X., Du, J., & Du, L. (2016). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in coffee and tea samples by magnetic solid-phase extraction coupled with HPLC-FLD. Food Chemistry, 199, 75–80.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.137>.

Shi, J., Zheng, G. J. S., Wong, M. H., Liang, H., Li, Y., Wu, Y., Li, P., & Liu, W. (2016). Health risks of polycyclic aromatic hydrocarbons via fish consumption in Haimen bay (China), downstream of an e-waste recycling site (Guiyu). Environmental Research, 147, 233–240. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2016.01.036>.

Tfouni, S. A. V, Padovani, G. R., Reis, R. M., Furlani, R. P. Z., & Camargo, M. C. R. (2014). Incidence of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oil blends. Food Control, 46, 539–543. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.06.028>.

Wandan, E. N., Elleingand, E. F. & Ndouba, A. M. (2011). A screening for benzo[a]pyrene in cocoa beans subjected to different drying methods during on farm processing. International Journal of Engineering Science and Technology (IJEST), 3 (5), 3621–3630. ISSN: 0975-5462.

WHO - World Health Organization. (2006). Evaluation of some food contaminants. WHO technical report series, 930.

Zachara, A., Gałkowska, D., & Juszczak, L. (2017). Contamination of smoked meat and fish products from Polish market with polycyclic aromatic hydrocarbons. Food Control, 80, 45–51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.04.024>.

Ziegenhals, K., Speer, K., & Jira, W. (2009). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in chocolate on the German market. Journal fur Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 4 (2), 128–135. <http://dx.doi.org/10.1007/s00003-009-0478-1>.

Zyżelewicz, D., Oracz, J., Krysiak, W., Budryn, G., & Nebesny, E. (2017). Effects of various roasting conditions on acrylamide, acrolein, and polycyclic aromatic hydrocarbons content in cocoa bean and the derived chocolates. *Drying Technology*, 35 (3), 363–374. <http://dx.doi.org/10.1080/07373937.2016.1175470>

ANEXO 1

Tabela 1. Parâmetros de validação do método analítico para determinação de HPAs em amêndoa de cacau, cacau em pó, *liquor* e manteiga de cacau (faixa linear, coeficiente de correlação, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)).

HPA	Faixa linear (µg/L)	Coefficiente de correlação (r)	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
BaA	0,3 – 20,0	0,9998	0,08	0,30
Chy	0,3 – 20,0	0,9996	0,19	0,30
5MChy	0,3 – 20,0	0,9996	0,21	0,30
BjF	3,0 – 200,0	0,9998	1,56	3,00
BbF	0,3 – 20,0	0,9998	0,11	0,30
BkF	0,3 – 20,0	0,9999	0,08	0,30
BaP	0,3 – 20,0	0,9999	0,11	0,30
DalP	0,3 – 20,0	0,9997	0,13	0,30
DahA	0,3 – 20,0	0,9999	0,20	0,30
IcdP	3,0 – 200,0	0,9999	0,33	3,00
DaeP	0,3 – 20,0	0,9998	0,07	0,30
DaiP	0,3 – 20,0	0,9991	0,13	0,30
DahP	0,3 – 20,0	0,9996	0,17	0,30

BaA: benzo(a)antraceno, Chy: criseno, 5MChy: 5 metilcriseno, BjF: benzo(j)fluoranteno, BbF: benzo(b)fluoranteno, BkF: benzo(k)fluoranteno, BaP: benzo(a)pireno, DalP: dibenzo(a,l)pireno, DahA: dibenzo(a,h)antraceno, IcdP: indeno(1,2,3-cd)pireno, DaeP: dibenzo(a,e)pireno, DaiP: dibenzo(a,i)pireno, DahP: dibenzo(a,h)pireno

Tabela 2. Exatidão (recuperação), repetibilidade (coeficiente de variação - CV) e precisão intermediária (PI) do método analítico para determinação de HPAs em amêndoa de cacau, *liquor*, cacau em pó e manteiga de cacau.

Recuperação média (CV) (%) ^a																
HPA	Amêndoa de cacau				<i>Liquor</i>				Cacau em pó				Manteiga de cacau			
	Nível 1 (0,5 µg/L)	Nível 2 (2 µg/L)	Nível 3 (5 µg/L)	PI (%) ^b	Nível 1 (0,5 µg/L)	Nível 2 (2 µg/L)	Nível 3 (5 µg/L)	PI (%) ^b	Nível 1 (0,5 µg/L)	Nível 2 (2 µg/L)	Nível 3 (5 µg/L)	PI (%) ^b	Nível 1 (1,0 µg/L)	Nível 2 (2 µg/L)	Nível 3 (5 µg/L)	PI (%) ^b
BaA	108 (4)	100 (3)	97 (1)	9	101 (7)	89 (5)	98 (3)	5	117 (8)	95 (5)	90 (2)	6	99 (9)	90 (9)	88 (2)	8
Chy	102 (9)	99 (7)	94 (3)	9	86 (3)	95 (6)	100 (3)	5	98 (8)	95 (6)	93 (3)	6	88(10)	99 (10)	108 (5)	7
5MChy	94 (12)	84 (8)	81 (1)	9	86 (9)	90 (6)	86 (2)	8	85 (9)	92 (9)	85 (6)	11	91 (5)	79 (9)	94 (4)	8
BjF	100 (2)	92 (3)	101 (1)	3	98 (2)	103 (8)	104 (3)	7	107 (5)	93 (4)	102 (4)	5	103 (4)	107(7)	114 (1)	7
BbF	91 (8)	86 (3)	96 (3)	5	87 (5)	86 (4)	95 (4)	5	89 (8)	93 (10)	93 (5)	12	94 (7)	100 (11)	92 (1)	10
BkF	103 (9)	93 (6)	99 (4)	7	88 (6)	80 (6)	94 (5)	6	94 (8)	91 (10)	89 (4)	12	91 (6)	86 (6)	86 (2)	8
BaP	102 (8)	93 (4)	99 (3)	6	102 (7)	84 (4)	96 (4)	5	104 (11)	91 (6)	83 (2)	11	96 (4)	88(5)	93 (5)	7
DaIP	99 (8)	87 (5)	88 (1)	9	92 (10)	75 (5)	96 (6)	9	99 (10)	96 (4)	82 (2)	10	100 (9)	81(5)	96 (7)	7
DahA	88 (7)	96 (8)	102 (1)	7	87 (6)	87 (3)	101 (5)	8	107 (11)	102 (7)	97 (5)	9	95 (5)	102(4)	99 (3)	7
lcdP	98 (2)	95 (5)	98 (1)	5	104 (7)	93 (5)	95 (4)	5	103 (4)	100 (5)	93 (1)	7	102 (3)	91(6)	92 (2)	6
DaeP	101 (14)	95 (4)	101 (1)	7	98 (9)	93 (10)	93 (1)	8	87 (4)	103 (5)	105 (14)	10	104 (7)	105(3)	96 (2)	3
DaiP	107 (8)	95 (4)	101 (1)	6	112 (4)	92 (7)	92 (2)	6	107 (3)	88 (7)	92 (2)	12	107 (10)	98(4)	90 (3)	5
DahP	102 (4)	85 (3)	92(1)	4	103 (2)	84 (7)	92 (1)	5	101 (4)	87 (11)	82 (2)	14	97 (5)	88(6)	88 (3)	6

BaA: benzo(a)antraceno, Chy: criseno, 5MChy: 5 metilcriseno, BjF: benzo(j)fluoranteno, BbF: benzo(b)fluoranteno, BkF: benzo(k)fluoranteno, BaP: benzo(a)pireno, DaIP: dibenzo(a)pireno, DahA: dibenzo(ah)antraceno, lcdP: indeno(1,2,3-cd)pireno, DaeP: dibenzo(ae)pireno, DaiP: dibenzo(ai)pireno, DahP: dibenzo(ah)pireno.

^aMédia de cinco replicatas

^bMédia de 10 replicatas