



INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS
Centro de Ciência e Tecnologia em Alimentos

VITOR HUGO BURGON

**CACAU E CHOCOLATES “*BEAN TO BAR*”: CONTAMINANTES
INORGÂNICOS E OCRATOXINA A**

CAMPINAS - SP

2023

VITOR HUGO BURGON

**CACAU E CHOCOLATES “*Bean to Bar*”:
CONTAMINANTES INORGÂNICOS E OCRATOXINA A**

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

Aluno: Vitor Hugo Burgon

Orientador: Dr. Marcelo Antônio Morgano

Co-orientadora: Dra. Beatriz Thie Iamanaka

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pelo
aluno Vitor Hugo Burgon e orientada pelo Prof. Dr. Marcelo Antônio Morgano

CAMPINAS – SP

2023

Agência(s): CAPES e FAPESP

Nº do proc.: Código de financiamento 001 e Processos FAPESP 2020/16170-6 e 2022/02658-2.

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Bibliotecária Lucilene Paulina da Silva CRB/8 - 8507
Biblioteca Central do ITAL - Instituto de Tecnologia de Alimentos

B957c Burgon, Vitor Hugo.

Cacau e chocolates "Bean to Bar": contaminantes inorgânicos e Ocratoxina A. / Vitor Hugo Burgon. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, SP: Ital, 2023.

125 f.

Orientador: Dr. Marcelo Antônio Morgano

1. Contaminantes inorgânicos. 2. Ocratoxina A. 3. Chocolate artesanal. 4. Segurança de alimentos. 5. ICP-MS. I. Instituto de Tecnologia de Alimentos (Ital). Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA). II. Burgon, Vitor Hugo. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Cocoa beans and "Bean to Bar" chocolates: Inorganic contaminants and Ochratoxin A

Palavras-chave em inglês: Inorganic contaminants, Ochratoxin A, Artisanal chocolate, food safety, ICP OES, ICP-MS, HPLC-FLD.

Titulação: Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Banca Examinadora: Marcelo Antônio Morgano, Beatriz Thie Iamanaka, Valdecir Luccas, Raquel Fernanda Milani e José Luan da Paixão Teixeira

Data da Defesa: 28/04/2023

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida por Vitor Hugo Burgon, aprovada pela Comissão Julgadora em 28/04/2023.

Prof. Dr. Marcelo Antônio Morgano
CCQA/ITAL - Presidente

Profa. Dra. Beatriz Thie Iamanaka
CCQA/ITAL - Co-orientadora

Profa. Dra. Valdecir Luccas
ITAL - Titular

Dra. Raquel Fernanda Milani
ITAL - Titular

Prof. Dr. José Luan da Paixão Teixeira
ITAL - Suplente

A ata de defesa de dissertação de mestrado com as respectivas assinaturas dos membros da banca encontra-se arquivada junto à documentação do aluno.

DEDICATÓRIA

**Dedico esta dissertação aos
meus amados pais Luis e Cirlene
e à Vitoria minha irmã**

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente, por me dar forças para superar todas as dificuldades, paciência e proteção em todos os momentos.

Aos meus familiares, pais, irmãos, tios, primos e avós por me incentivar dar amor e apoiar durante todo o percurso.

Ao Prof. Dr. Marcelo A. Morgano por me instruir e orientar em todos os aspectos e ser um bom companheiro, ser muito atencioso, humilde, educado, paciente, dedicado, confiante, claro em se expressar, pelos conselhos e por passar um pouco de seu enorme conhecimento. Em especial quero agradecer por ser um “espelho” como pessoa, pesquisador e profissional.

À Dra. Raquel F. Milani por me instruir em todas as análises de contaminantes inorgânicos e operação dos instrumentos analíticos, por sua educação, humildade, paciência, confiança, clareza em se expressar, dedicação, conselhos, seu bom humor e sempre querer o meu bem. Em especial quero agradecer por ser uma boa pessoa para mim e todas as pessoas ao seu redor.

À Profa. Dra. Beatriz T. Iamanaka por me coorientar e me instruir durante as análises de cromatografia, ser educada, humilde, atenciosa, dedicada, pacificadora, compreensiva, rigorosa e organizada.

Aos colaboradores e estudantes de pós-graduação e iniciação científica do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL): Adri, Ana Oliveira, Ana Rebellato, Adriana, Caio, Giovana, Isabel e Manuela.

Ao Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos do ITAL pela disponibilização de suas instalações e equipamentos necessários para realização da pesquisa.

A CAPES e FAPESP, o presente trabalho foi desenvolvido com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 - e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Códigos de Financiamento 2020/16170-6 e 2022/02658-2.

Aos membros das bancas de qualificação e de defesa pela disponibilidade, observações e críticas construtivas.

Muito obrigado!

RESUMO

O interesse e a valorização por chocolates “*Bean to Bar*” (da amêndoa à barra) tem crescido, com apelo por ser mais natural, proveniente de produção artesanal e sustentável. Sua produção ocorre em menor escala que a industrial, com a utilização de equipamentos adaptados, com a escolha cuidadosa do cacau, que possui origem controlada e apresentando maior valor agregado. Estes produtos prezam pela qualidade do produto e pelas questões socioambientais. Contudo, alguns estudos em chocolates com produção tradicional mostram a contaminação deste produto com contaminantes inorgânicos e micotoxinas. As principais fontes de contaminação por contaminantes inorgânicos, como arsênio, chumbo e cádmio estão relacionadas à sua presença no meio ambiente, sendo fortemente associada à região onde o cacau é cultivado, enquanto a ocratoxina A pode ser formada na etapa de secagem e armazenamento do cacau. Para proteger a saúde pública e garantir a oferta de produtos seguros ao consumidor é de extrema importância um estudo que mapeie os níveis de contaminantes inorgânicos e ocratoxina A em amêndoas de cacau e avalie a ocorrência destes contaminantes em chocolates. Desta forma este estudo teve como objetivo estudar e validar métodos analíticos para avaliar a ocorrência de elementos-traço arsênio, cobalto, cádmio, chumbo, cobre, mercúrio e selênio e a ocratoxina A em amêndoas de cacau e em chocolate “*Bean to Bar*” do Brasil (Amazônia, Amapá, Bahia, Espírito Santo, Pará e Roraima) utilizando as técnicas analíticas de espectrometria de emissão ótica com fonte de plasma com acoplamento indutivo (ICP OES), espectrometria de massas com fonte de plasma com acoplamento indutivo (ICP-MS) e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (HPLC-FLD) e calcular a estimativa de ingestão e/ ou exposição destes elementos traços e da ocratoxina A. Os limites de detecção e de quantificação para As, Cd, Cu e Pb em amêndoas de cacau variaram de 0,021 a 0,171 e 0,033 a 0,272 mg kg⁻¹, respectivamente. Para As, Co, Cd, Cu, Hg, Pb e Se em chocolates “*Bean to Bar*” os valores variaram de 0,001 a 0,019 e 0,002 a 0,029 mg kg⁻¹, respectivamente. Para ocratoxina A em amêndoas de cacau e chocolates “*Bean to Bar*” os limites de detecção ou quantificação foram iguais de 0,04 e 0,1 µg kg⁻¹, respectivamente. Foram analisadas 23 amostras de amêndoas de cacau e 65 de chocolates “*Bean to Bar*” para a determinação dos elementos-

traço. Para a ocratoxina A foram analisadas 43 amostras de amêndoas de cacau sendo 22 coletadas durante o pré-processamento (fermentação e secagem) em duas fazendas localizadas em Arataca-BA (n=14) e Mocajuba-PA (n=8) e 62 de chocolates “*Bean to Bar*”. O As e o Hg não foram detectados em nenhuma das amostras analisadas. As concentrações médias dos elementos traço nos chocolates “*Bean to Bar*” variaram de <LOD a 0,145 para Cd; 3,90 a 10,109 para Cu; <LOD a 0,47 para Co; <LOD a 0,02 para Pb e para Se, de <LOD a 0,088 mg kg⁻¹; enquanto nas amêndoas de cacau variaram de <LOD a 0,68 para Cd; 16,6 a 22,38 para Cu e para Pb de <LOD a 0,04 mg kg⁻¹. O teor de Cd ultrapassou o limite máximo tolerado de 0,30 mg kg⁻¹ para pasta de cacau, estipulado pela legislação brasileira para as amêndoas de cacau e para chocolates. O cálculo da estimativa de exposição ao Cd, considerando o consumo de 15,75 g por dia de chocolate “*Bean to Bar*”, para crianças atingiu até 94% da PTMI. A concentração de ocratoxina A em amêndoas de cacau variou entre <LOD e 0,76 µg kg⁻¹ e em chocolates “*Bean to Bar*” variou entre <LOD e 0,09 µg kg⁻¹; e em nenhuma amostra ultrapassou o limite máximo tolerado estabelecido pela legislação brasileira. A estimativa de ingestão não atingiu a PTWI. Foi observado que os maiores teores dos elementos-traço e de ocratoxina A estiveram concentrados nas amêndoas pré-processadas e em chocolates com maior percentual de sólidos de cacau.

Palavras-chave: Contaminantes inorgânicos, ocratoxina A, chocolate artesanal, segurança de alimentos, ICP OES, ICP-MS, HPLC-FLD.

ABSTRACT

The interest and appreciation for “*Bean to Bar*” chocolates (from the bean to the bar) has grown, with appeal for being more natural, artisanal, and sustainable. Its production occurs on a smaller scale than industrial production, with the use of adapted equipment and careful selection of cocoa, which has controlled origin and higher added value. These products value quality and socio-environmental issues. However, some studies on traditionally produced chocolates show contamination with inorganic contaminants and mycotoxins. The main sources of contamination by inorganic contaminants such as arsenic, lead, and cadmium are related to their presence in the environment, strongly associated with the region where cocoa is grown, while ochratoxin A can be formed during the drying and storage stage of cocoa. To protect public health and ensure the supply of safe products to consumers, it is extremely important to study the levels of inorganic contaminants and ochratoxin A in cocoa beans and evaluate the occurrence of these contaminants in chocolates. Thus, this study aimed to study and validate analytical methods to evaluate the occurrence of trace elements arsenic, cobalt, cadmium, lead, copper, mercury, and selenium and ochratoxin A in cocoa beans and “*Bean to Bar*” chocolate from Brazil (Amazon, Amapá, Bahia, Espírito Santo, Pará, and Roraima) using analytical techniques such as optical emission spectrometry with inductively coupled plasma source (ICP OES), mass spectrometry with inductively coupled plasma source (ICP-MS), and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FLD) and calculate the estimate of ingestion and/or exposure to these trace elements and ochratoxin A. The detection and quantification limits for As, Cd, Cu, and Pb in cocoa beans ranged from 0.021 to 0.171 and 0.033 to 0.272 mg kg⁻¹, respectively. For As, Co, Cd, Cu, Hg, Pb, and Se in “*Bean to Bar*” chocolates, the values ranged from 0.001 to 0.019 and 0.002 to 0.029 mg kg⁻¹, respectively. For ochratoxin A in cocoa beans and “*Bean to Bar*” chocolates, the detection or quantification limits were equal to 0.04 and 0.1 µg kg⁻¹, respectively. Twenty-three samples of cocoa beans and 65 “*Bean to Bar*” chocolates were analyzed for the determination of trace elements. For ochratoxin A, 43 samples of cocoa beans were analyzed, 22 of which were collected during the pre-processing (fermentation and drying) on two farms located in Arataca-BA (n=14) and Mocajuba-

PA (n=8), and 62 “*Bean to Bar*” chocolates. As and Hg were not detected in any of the analyzed samples. The average concentrations of trace elements in “*Bean to Bar*” chocolates ranged from <LOD to 0.145 for Cd; 3.90 to 10.109 for Cu; <LOD to 0.47 for Co; <LOD to 0.02 for Pb, and for Se, from <LOD to 0.088 mg kg⁻¹, while in cocoa beans they ranged from <LOD to 0.68 for Cd; 16.6 to 22.38 for Cu and for Pb, from <LOD to 0.04 mg kg⁻¹. The Cd content exceeded the maximum tolerated limit of 0.30 mg kg⁻¹ for cocoa paste, established by Brazilian legislation for cocoa beans and chocolates. The calculation of Cd exposure considering a daily consumption of 15.75 g of “*Bean to Bar*” chocolate for children reached up to 94% of the Provisional Tolerable Monthly Intake (PTMI). The concentration of ochratoxin A in cocoa beans ranged from <LOD to 0.76 µg kg⁻¹, and in “*Bean to Bar*” chocolates it ranged from <LOD to 0.09 µg kg⁻¹, with none of the samples exceeding the maximum tolerated limit established by Brazilian regulation. The estimated intake did not reach the Provisional Tolerable Weekly Intake (PTWI). It was observed that higher levels of trace elements and ochratoxin A were concentrated in pre-processed cocoa beans and chocolates with a higher percentage of cocoa solids.

Keywords: Inorganic contaminants, Ochratoxin A, Artisanal chocolate, food safety, ICP OES, ICP-MS, HPLC-FLD.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	ix
SUMÁRIO.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xvii
LISTA DE TABELAS.....	xviii
INTRODUÇÃO.....	1
REFERÊNCIAS	3
OBJETIVOS.....	5
OBJETIVO PRINCIPAL	5
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
CAPÍTULO	6
1. CACAU E CHOCOLATE	6
1.1 Produção e mercado	6
1.2 Origem.....	8
1.3 Características botânicas, variedade e cultivo	10
1.4 Pré-Processamento	14
1.5 Processamento convencional das amêndoas.....	16
1.6 Processamento convencional do chocolate	18
1.7 Processamento do chocolate “ <i>Bean to Bar</i> ”	20
2. CONTAMINANTES INORGÂNICOS E OCRATOXINA A	24
2.1 Arsênio (As).....	27
2.2 Cádmiio (Cd)	29
2.3 Chumbo (Pb)	30
2.4 Cobre (Cu).....	31
2.2 Cobalto (Co)	32

2.3 Mercúrio (Hg).....	33
2.4 Selênio (Se).....	34
2.5 Ocratoxina A (OTA)	35
2.6 Contaminantes inorgânicos e ocratoxina A em cacau e derivados	36
3. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE CONTAMINANTES INORGÂNICOS E OCRATOXINA A.....	40
3.1 Espectrometria de emissão com fonte de plasma com acoplamento indutivo (ICP OES).....	44
3.2 Espectrometria de massas com fonte de plasma com acoplamento indutivo (ICP-MS).....	46
3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	48
4. REFERÊNCIAS	49
CAPÍTULO 2: CACAU E CHOCOLATES “ <i>Bean to Bar</i> ”: AVALIAÇÃO DE ELEMENTOS-TRAÇO EM AMOSTRAS COMERCIALIZADAS NO BRASIL	64
Resumo	64
1. Introdução.....	65
2. Material e métodos	66
2.1 Amostras	66
2.2 Reagentes e equipamentos	67
2.3 Controle Analítico	68
2.4 Procedimento analítico para o preparo das amostras de chocolates e amêndoas de cacau	68
2.5 Cálculo da estimativa de ingestão dos contaminantes e avaliação da exposição pelo consumo de chocolates “ <i>Bean to Bar</i> ”	69
3. Resultados e discussões	70
3.1 Validação do método analítico para determinação de elementos traço em amêndoas de cacau e chocolates	70
3.2 Resultados obtidos para os elementos traço em amostras de amêndoas de cacau e chocolates “ <i>Bean to Bar</i> ”	72

3.3 Contaminantes inorgânicos em amêndoas de cacau e chocolates.....	79
3.4 Avaliação da estimativa de exposição e ingestão para Cd, Co, Cu, Pb e Se pelo consumo de chocolates “ <i>Bean to Bar</i> ”.....	81
4. Conclusão.....	82
5. Referências	83
CAPÍTULO 3: OCORRÊNCIA DE OCRATOXINA A EM CACAU E CHOCOLATE “<i>BEAN TO BAR</i>”	86
Resumo	86
1. Introdução.....	87
2. Material e métodos	88
2.1 Extração de OTA em cacau e chocolate (<i>Clean up</i>)	90
2.2 Condições cromatográficas para determinação de OTA.....	91
2.3 Validação do método: determinação da tendência/recuperação, limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) e precisão	91
2.4 Cálculo de estimativas de ingestão de ocratoxina A pelo consumo chocolates “ <i>Bean to Bar</i> ”	92
3. Resultados e discussões	92
3.1 Resultados para validação do método para Ocratoxina A	92
3.2 Determinação de ocratoxina A em amêndoas de cacau e chocolate nas amostras obtidas durante o processamento.....	94
3.3 Determinação de ocratoxina A em amêndoas de cacau e chocolate obtidas no <i>e-commerce</i>	95
3.4 Avaliação da estimativa de exposição a ocratoxina A pelo consumo de chocolate “ <i>Bean to Bar</i> ”	98
4. Conclusões.....	99
5. Referências	100
CONCLUSÃO Geral	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABICAB: Associação Brasileira da Indústria de Chocolates, Amendoim e Balas.

ALAD: Ácido delta aminolevulínico desidratase, do inglês *Delta Aminolevulinic Acid Dehydratase*

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

AOAC: AOAC Internacional, do inglês *AOAC International*

ATP: Adenosina Trifosfato

ATSDR: Agência para o registro de doenças e substâncias tóxicas, do inglês *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*.

BA: Bahia.

BAA: Bacteria Ácido Acética.

BAL: Bacteria Ácido Lática

BMDL: Limite inferior da dose de referência, do inglês *Benchmark dose lower confidence limit*.

CAC: Comissão do *Codex Alimentarius*, do inglês *Codex Alimentarius Commission*.

CAT: Catalase

CBR: Substituto não-laurico de manteiga de cacau, do inglês *Cocoa butter non-lauric replacer*.

CBS: Substituto laurico de manteiga de cacau, do inglês *Cocoa butter lauric based substitute*.

CCD: Cromatografia de Camada Delgada

CDC: Centros de controle e prevenção de doença, do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*.

CEPLAC: Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira.

CG: Cromatografia Gasosa.

CI: Contaminante Inorgânico

CIC: Centro de Inovação do Cacau.

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CRM: Material de Referência Certificado, do inglês *Certified Reference Material*.

COVID-19: Doença do Coronavírus – 2019, do inglês *Coronavirus Disease 2019*

DMA: Ácido dimetilarsínico

DNA: Ácido Desoxirribonucleico, do inglês *Desoxyribonucleic Acid*.

EFSA: Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar, do inglês *The European Food Safety Authority*.

EU: União Europeia, do inglês *European Union*.

FAO/WHO: Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization*.

GPX: Glutathione Peroxidase

GSH: Glutathione

HPLC-FLD: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

ICCO: Organização Internacional do Cacau, do inglês *International Cocoa Organization*.

ICP OES: Espectrometria de emissão ótica com plasma acoplado indutivamente, do inglês *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*.

ICP-MS: Espectrometria de Massas com Fonte de Plasma com Acoplamento Indutivo, do inglês *Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*.

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia.

JECFA: Comitê Misto FAO/OMS de Especialistas em Aditivos Alimentares, do inglês *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*.

LMT: Limite Máximo Tolerável.

LOD: Limite de detecção.

LOQ: Limite de quantificação.

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

MDIC: Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços.

MERCOSUL: Mercado Comum do Sul.

MMA: Acido Monometilarsônico

OTA: Ocratoxina A

PBS: Tampão fosfato-salino, do inglês *Phosphate-Buffered Saline*.

Pi: Fosfato inorgânico, do inglês *Inorganic Phosphate*.

PIB: Produto Interno Bruto.

PTFE: Politetrafluoroetileno.

PTMI: Ingestão Mensal Tolerável Provisória, do inglês *Provisional Tolerable Monthly Intake*.

PTMTDI: Ingestão Diária Máxima Tolerável Provisória, do inglês *Provisional Maximum Tolerable Daily Intake*

PTWI: Ingestão Semanal Tolerável Provisória, do inglês *Provisional Tolerable Weekly Intake*

QuEChERS: Método de extração em fase sólida, acrônimo formado por Rápido, Fácil, Barato, Eficaz, Robusto e Seguro, do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*.

RDC: Resolução de Diretoria Colegiada.

RfD: Dose Referencial, do inglês *Reference Dose*

ROS: Espécies Reativas do Oxigênio, do inglês *Reactive Oxygen Species*.

SAF: Sistema Agroflorestal.

SOD: Superóxido Dismutase

SPE: Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*.

SUFRAMA: Superintendência da Zona Franca de Manaus.

SWASV: Voltametria de redissolução anódica usando onda quadrada, do inglês *Square Wave Anodic Stripping Voltammetry*

THQ: do inglês, *Target Hazard Quotient*.

UL ou UI: Limite superior tolerável de ingestão, do inglês *Tolerable Upper Intake Level*

US-EPA: Agência de proteção ambiental dos Estados Unidos, do inglês *United States Environmental Protection Agency*.

WHO: Organização Mundial da Saúde, do inglês *World Health Organization*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção de cacau no Brasil e mundial	7
Figura 2. Linha do tempo do cacau e chocolate	10
Figura 3. Tipos de raízes no cacauzeiro	11
Figura 4. Meia seção longitudinal de um fruto de cacau inteiro mostrando as sementes umedecidas.....	12
Figura 5. Melanger, máquina utilizada na etapa de refino do chocolate " <i>Bean to bar</i> "	22
Figura 6. Fluxograma do processamento do chocolate convencional e do chocolate " <i>Bean to Bar</i> "	24
Figura 7. Fatores que afetam a ocorrência de micotoxinas na cadeia de alimentos e rações. *Contaminação por micotoxinas no campo, **Contaminação de micotoxinas no armazenamento, ***Contaminação de micotoxinas em produtos de origem animal	26
Figura 8. Representação esquemática do equipamento de ICP OES.....	44
Figura 9. Representação esquemática do equipamento de ICP MS.....	46
Figura 10. Representação esquemática do equipamento de HPLC.....	49
Figura 11. Gráfico de barras das concentrações de Cd, Co, Cu, Pb e Se em amêndoas de cacau e chocolate do Brasil	77
Figura 12. Cromatogramas obtido após a injeção de 10,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de padrão de ocratoxina A (verde), e 4,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em amostras de amêndoas (laranja) e em chocolates " <i>Bean-to-bar</i> " (vermelho).....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação da exatidão (n=3) do método de digestão ácida assistido por microondas utilizando materiais de referência certificados*; coeficiente de correlação (r), limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) e precisão (coeficiente de variação, n=7).	71
Tabela 2. Média e intervalo de concentração de Cd, Co, Cu, Pb e Se para chocolates <i>Bean to bar</i> (n=65) e convencional (n=6).	73
Tabela 3. Média e intervalo de concentração de Cd, Co, Cu, Pb e Se em amostras de chocolates <i>Bean-to-bar</i> (n=65) para cada região de origem das amêndoas.	75
Tabela 4. Média e intervalo de concentração de Cd, Cu e Pb em amêndoas de cacau (n=23) do Brasil e número de amostras (N) com teores superiores ao limite máximo tolerável (LMT).	78
Tabela 5. Amostras de amêndoas de cacau (n=43) distribuídas por região e municípios de origem	89
Tabela 6. Amostras de chocolates “ <i>Bean to Bar</i> ” (n=62) distribuídas por região e por porcentagem de sólidos de cacau.	90
Tabela 7. Resultados dos ensaios de recuperação (n=3); limite de detecção (LOD) e precisão (CV = coeficiente de variação) do método para ocratoxina A ($\mu\text{g kg}^{-1}$) em cacau e chocolate.	93
Tabela 8. Média e intervalo de concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de OTA em amêndoas de cacau de municípios das regiões da Amazônia (AM), Bahia (BA), Espírito Santo (ES) e Pará (PA).	96
Tabela 9. Média e intervalo de concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de OTA em amêndoas de cacau (n=43) e chocolate (n=62) das regiões da Amazônia, Bahia, Espírito Santo e Pará. .	97
Tabela 10. Ocratoxina A em amostras de chocolates “ <i>Bean to Bar</i> ” branco, ao leite, meio amargo e amargo.	98
Tabela 11. Resultados obtidos a partir do cálculo da estimativa de ingestão de ocratoxina A em chocolates “ <i>Bean to Bar</i> ” considerando o maior nível encontrado nas amostras estudadas (1100 ng kg^{-1}) e o consumo de 110,25 g (semanal) de chocolate por adultos (60 kg) e crianças (15 kg).	99

INTRODUÇÃO

O chocolate é feito a partir do processamento do cacau sendo considerado um fruto de clima tropical que foi descoberto por civilizações antigas (astecas, maias e olmecas), possui propriedades benéficas à saúde e sabor agradável, podendo ser incorporado em receitas ou consumido em barras. Seu consumo vem crescendo com o passar dos anos e tem sido estudado cada vez mais as suas propriedades, visando a obtenção de um produto com alta qualidade e seguro (DA SILVA, 2020; PEROTTI *et al.*, 2020; ZIMMERMANN; ELLINGER, 2020).

No continente Africano está o maior produtor de cacau do mundo, a Costa do Marfim, seguido de Gana, e juntos produzem mais de 80% de todo cacau produzido no mundo. Outros países pertencentes ao continente africano também são grandes produtores, como Camarões e Nigéria. Na América do Sul os países que se destacam são Brasil e Equador (ICCO, 2020). O Brasil permanece uma das potências mundiais da produção de cacau. De acordo com o IBGE, em 2020 foi alcançada uma produção de 280 mil toneladas de cacau (IBGE, 2020).

No Brasil em 2020, apesar da pandemia gerada pelo COVID-19 ter afetado diversos setores da economia, foi mantido o consumo médio de chocolate de 3,8 kg per capta, com diminuição de 11,8% apenas se comparado a 2019 (ABICAB, 2020; GANDRA, 2020).

O consumo de chocolate pode trazer benefícios a saúde pelo fato de que na composição química das amêndoas de cacau podem ser encontrados compostos antioxidantes bioativos benéficos a saúde das classes das metilxantinas, fenilpropanoides, esteroides, flavonoides, açúcares e glicosídeos. A teobromina é um composto antioxidante comumente encontrado nas sementes de cacau e é conhecida por diversos benefícios a saúde, como antitumoral, proteger o coração, anti-inflamatória e não possuir efeitos colaterais que a cafeína contém, além de apresentar melhora na memória. Outros compostos antioxidantes relevantes são as proantocianidinas, naringinas, taxifolinas, quercetinas, rutinas e ácidos protocatecuico, cafeico e ferúlico. (MARTÍNEZ-PINILLA; OÑATIBIA-ASTIBIA; FRANCO, 2015; ZIMMERMANN; ELLINGER, 2020).

Em 2005, surgiu nos Estados Unidos a tendência “*Bean to Bar*” (da amêndoa à barra) cuja principal ideia é fabricar e comercializar chocolates mais naturais, de forma “artesanal”, utilizando um processo de produção com controle integral do cacau, que vai desde a lavoura até a barra de chocolate. Neste processo a origem do cacau é conhecida e há o controle de todas as etapas de produção do chocolate desde a colheita, fermentação e secagem permitindo obter um alimento com elevada qualidade nutricional, saboroso e aromático. Na produção de chocolates “*Bean to Bar*”, as principais etapas de processo envolvem: a seleção de amêndoas de cacau, que são torradas de forma cuidadosa para não mascarar as características do cacau; a quebra das amêndoas, separando as cascas da semente obtendo-se os *nibs*, que são moídos até a formação do liquor do chocolate, seguido da adição de açúcar orgânico. Este processo utiliza apenas o cacau (sólido) e a manteiga de cacau (gordura natural da amêndoa de cacau) e o açúcar, proporcionando um chocolate de alta qualidade e com sabor e aroma característico da amêndoa de cacau. Os chocolates obtidos por este processo são mais puros, sem emulsificantes, conservantes e aromatizantes, contendo somente o cacau, a manteiga de cacau e o açúcar orgânico. Os chocolates “*Bean to Bar*” vem se espalhando pelo mundo, inclusive no Brasil, com a tendência de produção de alimentos ambientalmente sustentáveis (GALLO; ANTOLIN-LOPEZ; MONTIEL, 2018; RECANATI; MARVEGGIO; DOTELLI, 2018; VIOTTO; SUTIL; ZANETTE, 2018). Em 2015, o mercado de chocolates “*Bean to Bar*” dos EUA foi estimado em mais de US\$ 100 milhões/ano (VREELAND, 2015).

A legislação brasileira, através da RDC nº 723, aprovou o Regulamento técnico para chocolate e produtos de cacau, definindo a quantidade mínima de sólidos totais de cacau (*Theobroma cacao* L.) de 25% (g/100 g) para o produto ser denominado como chocolate e de 20% (g/100 g) como o teor mínimo para sólidos totais de manteiga de cacau para ser denominado de chocolate branco. Manteiga e o pó são os produtos obtidos do liquor de cacau e o cacau solúvel é o produto obtido a partir do cacau em pó adicionado de outros ingredientes. O chocolate é definido como o produto obtido a partir da mistura de derivados de cacau, massa, pasta ou liquor de cacau, cacau em pó ou manteiga de cacau, com outros ingredientes, podendo apresentar recheio, cobertura, formato e consistência variados. E o chocolate branco é definido como o produto obtido a partir da mistura

da manteiga de cacau com outros ingredientes, podendo apresentar recheio, cobertura, formato e consistência variados (BRASIL, 2022).

Para oferecer aos consumidores um produto seguro e de qualidade as autoridades no Brasil e na União Europeia através da Instrução Normativa (IN) nº 160/2022 e do Regulamento (EU) nº 488/2014, determinaram limites máximos de contaminantes inorgânicos em pasta de cacau, chocolate e produtos à base de cacau com menos e mais de 40% de cacau (BRASIL, 2022; EU, 2014). Para ocratoxina A os limites em cacau e chocolate também foram regulamentados na Instrução Normativa (IN) nº 160/2022 (BRASIL, 2022).

REFERÊNCIAS

ABICAB. Associação Brasileira da Indústria de Chocolates, Amendoim e Balas. Chocolate mantém penetração em 73% dos lares brasileiros na pandemia. 2020. Disponível em: <http://www.abicab.org.br//noticias/chocolate-mantem-penetracao-em-73-dos-lares-brasileiros-na-pandemia/>. Acesso em: 10 jan. 2021.

BRASIL. Instrução Normativa – IN nº 160, de 1º de julho de 2022.

BRASIL. Resolução - RDC n723, de 1º de julho de 2022.

EU. European Union. Commission Regulation (EU) No 488/2014. **Official Journal of the European Union**, ed. 138 (75), 2014.

GALLO, P. J.; ANTOLIN-LOPEZ, R.; MONTIEL, I. Associative Sustainable Business Models: Cases in the bean-to-bar chocolate industry. **Journal of Cleaner Production**, v. 174, p. 905–916, fev. 2018.

GANDRA, A. Indústria de chocolate mantém otimismo, apesar da pandemia. 7 jul. 2020. **Agência Brasil**. Disponível em: <https://agenciabrasil.ebc.com.br/economia/noticia/2020-07/industria-de-chocolate-mantem-otimismo-apesar-da-pandemia>. Acesso em: 10 jan. 2021.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Sistema IBGE de Recuperação Automática** - SIDRA. 2020. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil>. Acesso em: 9 jan. 2021.

- ICCO. International Cocoa Organization - Production of cocoa beans. 2020. Disponível em: <https://www.icco.org/wp-content/uploads/Production-QBCS-XLVI-No-4.pdf>. Acesso em: 22 dez. 2020.
- MARTÍNEZ-PINILLA, E.; OÑATIBIA-ASTIBIA, A.; FRANCO, R.I. The relevance of theobromine for the beneficial effects of cocoa consumption. **Frontiers in Pharmacology**, 6, 30, 2015.
- PEROTTI, P.; CORDERO, C.; BORTOLINI, C.; RUBIOLO, P.; BICCHI, C.; LIBERTO, E. Cocoa smoky off-flavor: Chemical characterization and objective evaluation for quality control. **Food Chemistry**, 309, 125-561, 2020.
- RECANATI, F.; MARVEGGIO, D.; DOTELLI, G. From beans to bar: A life cycle assessment towards sustainable chocolate supply chain. **Science of The Total Environment**, 613, 1013–1023, 2018.
- DA SILVA, Luiz Ferreira. **Cacau: Sul da Bahia**. Ibicaraí / Bahia: Simplíssimo, 2020.
- VIOTTO, M. H.; SUTIL, B.; ZANETTE, M. C. Legitimidad como una barrera: Un análisis del proceso de legitimación del cacao y del chocolate premium brasileños. **Revista de Administração de Empresas**, 58(3), 267–278, 2018.
- VREELAND, C. A dynamic Bean to bar market creates the ‘New American Chocolate’. 2015. **confectionerynews.com**. Disponível em: <https://www.confectionerynews.com/Article/2015/10/02/Bean-to-bar-chocolate-rises-in-US-Can-multinationals-join-in>. Acesso em: 5 abr. 2020.
- ZIMMERMANN, B. F.; ELLINGER, S. Cocoa, Chocolate, and Human Health. **Nutrients**, 12(3), 698, 2020.

OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

O presente trabalho teve como objeto avaliar a ocorrência de elementos-traço, arsênio, cádmio, chumbo, cobalto, cobre, mercúrio e selênio utilizando as técnicas de espectrometria de emissão ótica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES); espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) e da micotoxina, a ocratoxina A, utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (HPLC-FLD) em amêndoas de cacau destinadas a fabricação de chocolate do tipo “*Bean to Bar*”.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar métodos analíticos empregando as técnicas ICP OES, ICP-MS e HPLC-FLD para detecção e quantificação de elementos-traço e de ocratoxina A em amêndoas de cacau e chocolates “*Bean to Bar*”, respectivamente.
- Avaliar a ocorrência dos elementos-traço As, Cd, Co, Cu, Hg, Pb, Hg, Se e da micotoxina ocratoxina A em amêndoas de cacau para a produção de chocolates “*Bean to Bar*” procedentes das principais regiões do Brasil (AM, BA, PA e ES) e em chocolates “*Bean to Bar*” das regiões AM, AP, BA, ES, FA, MA, PA e RO, adquiridos no comércio eletrônico.
- Avaliar a exposição da população brasileira aos contaminantes (elementos-traço e ocratoxina A) pelo consumo de chocolate “*Bean to Bar*”, considerando os grupos populacionais adultos e crianças.
- Ampliar a base de dados existentes sobre os níveis de ocorrência dos elementos-traço As, Cd, Co, Cu, Hg, Pb, Se e da micotoxina ocratoxina A em amêndoas de cacau e chocolates obtidos por processos artesanais “*Bean to Bar*”.

CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. CACAU E CHOCOLATE

1.1 Produção e mercado

A produção mundial de cacau entre 2021 e 2022 foi estimada em 5,2 milhões de toneladas e os países que mais produziram foram Costa do Marfim, Gana e Camarões: 2,2 milhões; 1 milhão e 290 mil toneladas, respectivamente (ICCO, 2022). O Brasil permanece uma das potências mundiais da produção de cacau e, de acordo com o dados do IBGE, em 2022 foram colhidos 288 mil toneladas de cacau em área de 599 mil hectares. A Bahia e o Pará representam mais 90 % da produção no país (IBGE, 2022). O Pará é o principal produtor brasileiro (144 mil tons), seguido pela Bahia (126 mil tons), Espírito Santo (11 mil tons), Rondônia (4,9 mil tons), Amazônia (869 tons), Mato Grosso (471 tons) e Roraima (8 tons). Segundo a Associação Nacional das Indústrias Processadoras de Cacau (AIPC), em 2022 as indústrias processadoras das amêndoas de cacau do Brasil receberam 205 mil tons, sendo importadas 11 mil tons e exportadas 567 tons (AIPC, 2022).

Na década de 90 o Brasil teve um declínio na produção de cacau passando de 426 mil toneladas entre 1985 e 1987 para 197 mil toneladas entre 2019 e 2020 (Figura 1). Este cenário se deu pela proliferação da vassoura de bruxa (*Moniliophthora perniciosa*) que impactou na produção de diversas plantações na Bahia (MAPA, 2019). Com o declínio da produção, medidas como clonagem de espécies de cacau, produção de cacau fino e orgânico e projetos como “Fazenda de Chocolate e a agroindústria” surgiram com a finalidade de reverter o cenário causado pela vassoura de bruxa no sul da Bahia em 1980 (CARVALHO; SOARES NETO; PINHEIRO, 2020). Mesmo com a produção de amêndoas de cacau aumentando novamente o país importou 36 mil toneladas de derivados e 16 mil toneladas de chocolates em 2022 (AIPC, 2022).



Figura 1. Produção de cacau no Brasil e mundial

Fonte: Adaptado de AIPC (2022)

Durante o período entre 2011 a 2021, o Brasil exportou uma média 549 toneladas de cacau bruto ou torrado por ano e gerou uma média de U\$ 2,2 milhões, exceto em 2015, quando exportou um número expressivo de 6,83 mil toneladas, gerando U\$ 21 milhões. Em 2022, o cacau exportado foi destinado principalmente aos países Japão (68%), Suíça (14%), França (10%), Bélgica (3,5%), Holanda (2%), Porto Rico (1,8%), Estados Unidos (0,27%) e Emirados Árabes (0,0014%) (MDIC, 2022).

Ainda segundo MDIC (2021) os produtos derivados do processamento convencional das amêndoas de cacau como cacau em pó, manteiga ou pasta de cacau geraram, em média, US\$ 286,2 milhões no período de 2011 a 2021. Os países que o Brasil exporta são Argentina (52%), Estados Unidos (22%), Chile (11%) e Holanda (6,8%).

A produção de chocolate no Brasil em 2021 foi de 693 mil toneladas, sendo exportadas 35 mil toneladas (US\$ 130,4 milhões) e importadas 21 mil toneladas (US\$ 142,4 milhões) (ABICAB, 2022). Os alemães são os que tem o maior consumo per capita mundial de chocolate, cerca de 11 kg por habitante ao ano, seguidos da Suíça (9,7 kg/ano). Em 2018, o consumo médio per capita europeu alcançou 5 kg, considerado bem expressivo se comparado ao consumo médio per capita mundial que é 0,9 kg ao ano (CBIEU, 2020). Ainda segundo CBIEU (2020), os países europeus são os maiores produtores mundial de chocolate, gerando US\$ 73 bilhões em 2019 por sete empresas multinacionais (Mars, Ferrero, Mondelez, Meiji, Hershey, Nestlé e Lindt & Sprüngli).

No Brasil o consumo de chocolate per capita é estimada em 2,5 kg por ano, tendo o maior consumo na grande São Paulo com 5,75 kg por ano (15,75 g diária) e o Nordeste tem o menor consumo com 1,27 kg por ano, totalizando um consumo aparente de 749 mil toneladas em 2019 no Brasil (MDIC, 2018; ABICAB, 2019).

1.2 Origem

A origem do cacau (Figura 2) advém da região Amazônica, onde foi encontrado entre as florestas tropicais pluviais, na união dos rios Caquetá, Putumayo e Napo (LANDAU; SILVA; MOURA, 2020). Tratava-se de um fruto divino, assim considerado pelos maias e astecas, antigas civilizações da América Central, como alimento dos Deuses, do grego Theo (Deus) e broma (alimento), recebendo o nome de *Theobroma cacao*, L. O cacau foi denominado segundo a literatura botânica primeiramente como *Cacao fructus* por Charles de L' Écluse, posteriormente nomeado como *Theobroma fructus* por Carolus Linneu e em 1753 foi denominado como *Theobroma cacao*, permanecendo até os dias atuais (GILLER, 2017).

Ainda segundo GILLER, (2017) o cacau foi denominado pelos astecas como *cacahuatl* (cacaueiro) e foi consumido inicialmente como uma bebida de oferenda aos deuses, triturado e adicionado de açúcar, água, especiarias como cravo, baunilha, canela, urucum, flores, pimenta e grãos de milho, nozes, entre outros. A mistura era fervida e consumida na forma de uma bebida espumosa, recebendo o nome de “*tchocolat*”.

A partir do século XVI, a Espanha obteve o total controle sobre a produção e exportação do cacau, explorando as propriedades sensoriais, construíram os primeiros objetos capazes de fabricar a bebida, feitos de porcelana ou de outros tipos de metais, sendo consumido de outras formas posteriormente, com variados tipos de consistências, texturas, aromas e sabores, quando incorporados em outros alimentos como bolos, pudins, bolos, biscoitos, gelados e cremes (BRAGA, 2017). Devido às formulações secretas, a Espanha deteve o monopólio do cacau por cerca de um século, entre os séculos XVI e XVII. Em 1650, o mercado de chocolate expandiu-se para a Grã-Bretanha, passando a ser vendido em estabelecimentos específicos denominados como “*English Chocolate Houses*” (GAILLER, 2017).

A primeira fábrica de chocolate foi construída na França em 1659, o então rei Luiz XV prestigiou um cidadão francês (David Chaillou) como sendo o único fabricante e vendedor de chocolate na França. A França foi os pioneira na criação de processos e máquinas na fabricação do chocolate e, até 1856 possuíam 33 fábricas de chocolate (GAILLER, 2017).

O chocolate passou mais de um século sendo feito de forma artesanal e consumido como bebida. A primeira prensa hidráulica utilizada para extração da manteiga de cacau foi desenvolvida pelo americano James Baker e o irlandês John Hannon em 1772, que também fundaram a *Baker's Chocolate*. A partir de 1810, o chocolate se industrializou com o desenvolvimento da primeira prensa hidráulica e, em 1819, houve a criação da primeira barra sólida de chocolate pelo suíço Francois-Louis Caille GAILLER (2017).

O chocolate ao leite foi inventado a partir do leite produzido nas fazendas de Henri Nestlé foi comprado e adicionado ao chocolate por Daniel Peter, por volta de 1825 e em 1929, foi fundada a empresa Nestlé (AMAYA; PABÓN, 2017).

Em 1997 o chocolate “*Bean to Bar*” começou a ser comercializado nos Estados Unidos pela empresa *Scharffen Berger* cujo fundadores Robert Steinberg e John Scharffenberger também criaram o termo “*Bean to Bar*” para este gênero de chocolate. A especificação da origem das amêndoas utilizadas para a fabricação do chocolate “*Bean to Bar*” foi um diferencial em comparação com os chocolates processados de forma convencional e, Scharffenberger vendia as barras de chocolate “*Bean to Bar*” enunciando na embalagem que a origem das amêndoas de cacau era única de Madagascar, diferentemente dos chocolates convencionais

que muitas vezes utilizam misturas de amêndoas de diferentes espécies de cacau, o que despertou o questionamento dos consumidores a respeito do gosto genérico dos chocolates convencionais (GILLER, 2017).

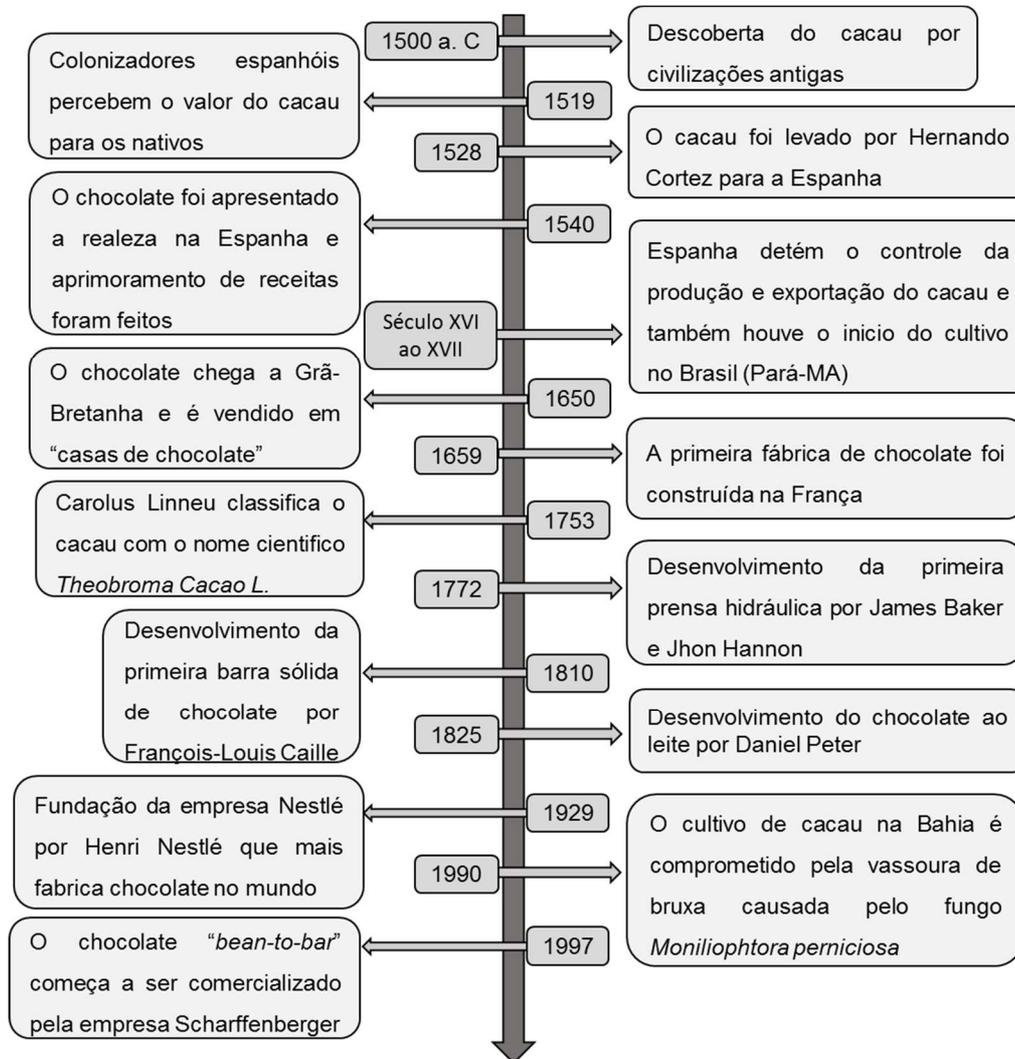


Figura 2. Linha do tempo do cacau e chocolate

Fonte: Autor

1.3 Características botânicas, variedade e cultivo

O cacauieiro (*Theobroma cacao* L.) é uma árvore tipicamente de clima tropical adaptada às temperaturas médias de 25°C, que 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 (BAILEY; MEINHARDT, 2016; WOOD; LASS, 2008).

O cacaueteiro é originário do continente Sul-Americano, pertencente a classe *Magnoliopsida*, ordem *Malvales*, família *Malvaceae*, gênero *Theobroma* e a espécie *Cacao*. A planta possui um sistema radicular com uma raiz pivotante, chegando até 2 metros de profundidade dependendo dos aspectos geológicos do solo e as raízes secundárias em sua maioria estão próximas ao solo, cerca de 30 cm de profundidade, sendo responsáveis pela nutrição da planta (Figura 3). O caule chega até 1,0 e 1,5 m de altura e fica ereto em 2 anos após a germinação, desenvolvendo os primeiros ramos, os quais dividem-se em laterais e secundários (WOOD; LASS, 2008).

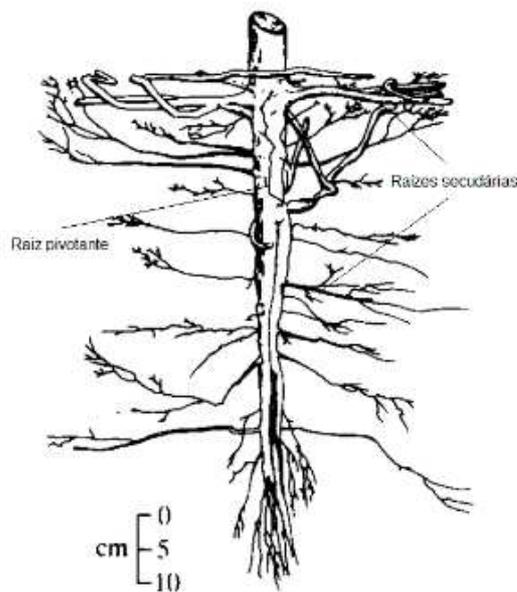


Figura 3. Tipos de raízes no cacaueteiro

Fonte: adaptado de WOOD & LASS (2008)

As folhas do cacaueteiro são alongadas, pontiagudas, sem pelos e sua cor varia conforme a idade e a quantidade de antocianinas da planta, entre verde rosado ao violeta e verde-claro ao verde-escuro quando está mais velha. As flores nascem em duas épocas na Amazônia: em períodos mais secos e no final de temporadas de chuva, surgindo em almofadas florais no tronco, podendo produzir mais de 100.000 flores quando adulto, contudo, a transformação em fruto ocorre em apenas 0,1% das flores. Os frutos amadurecem em média 160 dias após a polinização apresentando coloração amarela até laranja dependendo da variedade e verde quando não estão maduros, podendo ter um rendimento médio de cacau comercial de 20 frutos para cada kg e são compostos por três partes endocarpo

(sementes), mesocarpo (polpa) e epicarpo (casca), estas estruturas unidas são denominadas como pericarpo. As sementes são recobertas pela polpa que possui coloração branca e viscosa, varia em formatos ovóides até elipsóides com tamanho médio de 2 a 3 cm (Figura 4) (WOOD & LASS, 2008; SOUZA et al., 2018).

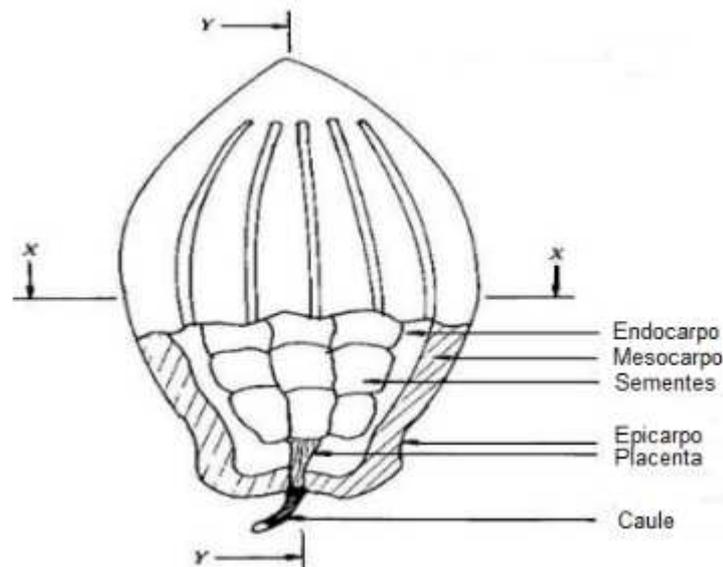


Figura 4. Meia seção longitudinal de um fruto de cacau inteiro mostrando as sementes umedecidas. De "X" a "X" é a seção transversal lateral e de "Y" a "Y" é a seção longitudinal.

Fonte: Adaptado de (JOSUÉ et al., 2019)

Inicialmente o cacauero foi classificado em duas espécies: i) *Theobroma cacao* subsp. *Cacao* (cacau crioulo), originário da América Central e América do Sul, classificado em três formas: *pentagonum* (cacau lagarto ou jacaré); *leiocarpo* (cumacaco); e *lancanodense* (cacau espontâneo da floresta Lacandona, México) e ii) *Theobroma cacao* subsp. *sphaerocarpum* (cacau forasteiro ou amelonado), que nasce espontaneamente na Amazônia média e nas Guianas. Em estudos genéticos a espécie *T. cacao* L. foi estruturada em 10 grupos: *Contamana*, *Criollo*, *Curaray*, *Guiana*, *Iquitos*, *Marañon*, *Nacional*, *Nanay* e *Purús* (LACHENAUD; MOTAMAYOR, 2017).

O cacau trinitário é uma espécie que surgiu a partir do cruzamento das espécies crioulo e forasteiro (hibridação), surgiu pela primeira vez em Trinidad e se expandiu para a América Central e América do Sul. (BEKELE et al., 2020; JOHNSON et al., 2009). Dentre os cacaos híbridos o CCN 51 é o mais popular, foi desenvolvido para combater a vassoura de bruxa e apresentou bons rendimentos,

menor tempo para a colheita e capacidade de resistência a pragas. Trata-se do cruzamento entre o cacau “canelo” (originário do Vale dos Canelos, Equador) e o cacau resultante entre cruzamento de dois cacaus, o ICS 95 (cruzamento entre cacau crioulo e amelonado) e o IMC 67 (forastero, coletado na Amazônia alta, Peru) (JAIMEZ *et al.*, 2022).

O cacauéiro é cultivado em climas tropicais, distribuído entre os países na região da linha do equador como Costa do Marfim, Gana, Camarões, Nigéria, Brasil, Equador, Indonésia, Papua, Nova Guiné, entre outros (MODA; BOTEON; RIBEIRO, 2019). O sistema de cultivo por exposição ao sol é utilizado em regiões de clima seco, podendo ser combinado com um sistema de irrigação automático (LEITE *et al.*, 2012). Em outro sistema de cultivo denominado agroflorestais (SAF's) ou “cabruca”, o cacauéiro é plantado com espaçamento de 3x3 metros entre árvores de maior porte para a diminuição da exposição ao sol e podas são feitas periodicamente. Apesar do sistema “cabruca” diminuir o rendimento na etapa de colheita, os produtos gerados por espécies florestais, alimentares e frutíferas são aproveitados comercialmente, como frutas, flores, cascas, óleos, sementes, cascas, cipós, entre outros. Além destes sistemas de cultivo, o sistema extrativista é utilizado por comunidades locais, onde os frutos são basicamente colhidos em cacauéiros nativos de florestas (MACHADO, 2019; SAMBUICHI, 2006; SENAR, 2018).

O cacauéiro é exigente quanto a temperatura e a quantidade de chuvas, gerando frutos em boa quantidade na faixa de 9 a 28°C e cerca de 1.500 mm de precipitação de chuva ao ano. O solo é outro fator importante para o desenvolvimento correto, sendo necessário para plantações de cacau solos com profundidade maior que 1 m, com boa drenagem - lençol freático a mais de 1 m de profundidade e a textura deve ser argilo-arenosa (SENAR, 2018).

As doenças encontradas em cacau são na maioria das vezes causadas por proliferação de fungos, porém, algas, bactérias, nematoides, plantas parasitas, estramenopilos e vírus também podem causar danos, contudo são incomuns. A vassoura de bruxa e vagem congelada ou monilíase são as mais perigosas doenças para o cacauéiro, causadas pelos fungos *Moniliophthora roreri* e *M. perniciosa* (BAILEY; MEINHARDT, 2016). Outras doenças também são encontradas no cacau e cacauéiro, como a antracnose (*Colletotrichum*

gloeosporioides), podridão parda (*Phytophthora spp*), mal do facão (*Ceratocystis cacaofunesta*), além disso os insetos também causam prejuízos aos produtores, como as tripes (*Selenothrips rubrocinctus*), monalonion (*Monalonion annulipes*), broca dos frutos (*Conotrachelus humeropictus*) e microácaros (*Aceria Reyesi* Nalepa, 1973 (Acari: Eriophyidae)) (MAPA, 2020).

1.4 Pré-Processamento

O pré-processamento é realizado no local de plantio e em locais próximos nas seguintes etapas: colheita, quebra dos frutos, fermentação, secagem e armazenamento (SENAR, 2018).

O início do pré-processamento das sementes de cacau se dá pela **colheita** dos frutos amadurecidos, feito com instrumentos apropriados e utilizados pelos trabalhadores manualmente. (SENAR, 2018).

A **quebra dos frutos** ocorre após a colheita no local de plantio, feita sob o chão forrado com folhas de bananeira. A quebra dos frutos e extração das sementes é normalmente manual, por meio de facões e com um corte transversal é retirada toda a polpa que envolve as sementes, estas, por sua vez, postas sob folhas de bananeiras. As cascas dos frutos são deixadas no solo onde há a plantação dos cacauzeiros e servem como matéria orgânica para a nutrição do solo. Contudo, estudos recentes demonstram que a casca do cacau pode também ser utilizada como adsorvente para a remoção de contaminantes químicos em meios aquosos (MAPA, 2020)

A **fermentação** das sementes é a etapa tida como mais importante do pré-processamento, ocorrendo a inativação da germinação da semente com o desenvolvimento dos precursores de aromas e sabores característicos do cacau, imprescindível aos produtos derivados de cacau. Pode ser realizada em áreas adjacentes em meio a plantação de cacau, em valas forradas com folhas de bananeira ou as sementes são transportadas por meio de burros de carga até as casas de fermentação e dispostas em cochos artesanais de madeira, com larguras entre 0,60 e 1,20 metros, altura entre 0,60 e 1 metro e comprimento variável de acordo com o volume de produção. Os cochos têm divisões móveis para revolver a massa. O revolvimento é feito aproximadamente 4 vezes, com intervalos de 1 e

2 dias e o tempo de fermentação pode variar entre 5 dias (períodos de seca) e 6 dias (períodos chuvosos). Os cochos ficam cobertos por folhas de bananeiras durante todo o processo de fermentação para que não haja perda de temperatura e ressecamento da massa (MAPA, 2020). A fermentação pode ser classificada em duas etapas, fermentação láctica e acética. Na fermentação láctica há a proliferação de bactérias ácido lácticas (BAL) e leveduras que fermentam a glicose, a frutose e o ácido cítrico contidos na polpa de cacau, produzindo álcoois, compostos aromáticos, aldeídos, ácidos orgânicos, ésteres, ácido láctico, ácido acético, manitol e piruvato. A fermentação acética proporcionada pelas bactérias ácido acéticas (BAA), oxida o etanol em ácido acético, o qual penetra no interior da semente de cacau e impede sua germinação (DE VUYST; LEROY, 2020; THOMPSON *et al.*, 2013)

A **secagem** controla a umidade das amêndoas, diminuindo a proliferação de microrganismos aeróbios com cerca de 42% de umidade reduzida após a secagem, passando de aproximadamente 50% para 8% (THOMPSON *et al.*, 2013). As formas de secagem podem ser naturais (secagem ao sol, realizada distribuindo as amêndoas sobre esteiras de madeira elevadas, lonas de plástico ou em pisos de concreto, com necessidade de telhados móveis para o caso de chuvas, levando entre 7 e 22 dias ou artificiais (secagem solar com energia solar gerada por dispositivos, como secador de convecção natural ou forçada e secador solar híbrido que aquecem o ar a temperatura constante para secar as amêndoas em ambiente fechado; secagem em forno elétrico ou a lenha, utilizando forno com câmara contendo bandejas e ventiladores em seu interior; secagem por micro-ondas utilizando energia eletromagnética de 915 ou 2.450 MHz em ambiente fechado e secagem por congelamento pelo método de liofilização que remove a umidade com poucas modificações no sabor dos alimentos) (DZELAGHA; NGWA; NDE BUP, 2020).

O **armazenamento** das amêndoas se dá em aproximadamente 3 a 12 meses dependendo da eficiência da secagem em galpões nas fazendas, em cais de países importadores e exportadores e em fabricas que processam as amêndoas. A umidade relativa do ambiente de armazenamento é em torno de 65 a 70%, dentro destes valores as amêndoas manterão a umidade inicial de 6% a 8% e resistirão a

possíveis crescimentos microbiológicos e infestações de pragas e insetos (THOMPSON *et al.*, 2012).

Após a finalização do pré-processamento das amêndoas pode ser realizada a classificação visual, em amêndoas do tipo 1, tipo 2 e tipo 3. Dentre os aspectos da qualidade das amêndoas, a cor pode indicar a eficiência da etapa de fermentação: as amêndoas que apresentam cor marrom indicam boa fermentação, as que apresentam cores violeta, aparência de ardósia, mofadas ou germinadas indicam que a fermentação foi ineficiente e geram sabores e aromas indesejáveis tais como amargor, adstringência e acidez ao produto final (AMADO, 2019).

1.5 Processamento convencional das amêndoas

As amêndoas de cacau saem das fazendas com rendimento que varia entre 150 e 2500 kg / hectare, dependendo do tamanho das fazendas e da administração do manejo. Na linha de processamento do chocolate convencional as amêndoas de cacau passam pelas etapas de **limpeza**, **descascamento**, **quebra**, **alcalinização**, **torrefação**, **moagem**, **refino** e **prensagem** (MISAILIDIS; PETRIDES, 2020).

A **limpeza** das amêndoas tem a função de remover partículas indesejáveis que se acumulam durante as etapas de pós-colheita como pedaços de metais, pedras, poeira, pedaços de madeiras, entre outros. A limpeza envolve o peneiramento, o qual remove impurezas grossas e finas; remoção e partículas de alta densidade e a remoção de poeira é feita durante todas as etapas por técnicas de contrafluxo e ar (BECKETT; FOWLER; ZIEGLER, 2017)

O **descascamento** é uma importante etapa do processamento e, caso as amêndoas seguirem adiante com a casca, nas seguintes etapas o produto final não terá uma boa qualidade. Além disso a casca está exposta a fatores externos, que podem levar a contaminação, e é um material fibroso e duro, que dificulta a moagem e pode causar abrasividade ao equipamento (MISAILIDIS; PETRIDES, 2020). Resumidamente, as amêndoas são submetidas a um processo térmico para facilitar o descasque, utilizando-se secadores de leite fluidizado, secadores de ar contínuo, secadores infravermelhos ou sistemas de umidificação seguido de secagem; em seguida, as amêndoas são submetidas a rotação constante em esteira, aumentando a fragilidade da casca e facilitando a sua remoção. Ainda nesta etapa

são destruídos pelos de roedores e fragmentos de insetos não removidos na etapa de limpeza (BECKETT; FOWLER; ZIEGLER, 2017).

Na **quebra**, as amêndoas sofrem o impacto de martelos mecânicos sobre placas resistentes ao impacto. Também é utilizada a força centrífuga para a quebra e a força da rotação que determina a distribuição e o tamanho das partículas, sendo desejável o mais homogêneo possível. No joeiramento as cascas são separadas das amêndoas quebradas (*nibs*) por peneiras ou sopradores de ar com fluxo regulado com base no tamanho de partículas desejado (MISAILIDIS; PETRIDES, 2020).

A **alcalinização** é um processo amplamente empregado na produção de cacau em pó, que é utilizado na fabricação de chocolates e achocolatados em pó. Durante esse processo, o pó de cacau é tratado com diferentes tipos e quantidades de álcalis, como o carbonato de potássio, em uma combinação de tempo e temperatura que varia de acordo com o efeito desejado. Como resultado, o pó de cacau alcalinizado apresenta diversas nuances de sabor e cor. Embora seja possível alcalinizar e torrar simultaneamente em tambores de torrefação, é importante destacar que isso pode aumentar significativamente o tempo de processamento (BECKETT; FOWLER; ZIEGLER, 2017).

A **torrefação** é um processo de aquecimento aplicado às amêndoas de cacau, que provoca a ocorrência de reações entre os carboidratos e proteínas contidos em sua composição, gerando compostos que agregam sabor e cor às amêndoas. Embora possa ser realizada com as amêndoas inteiras, preservando compostos voláteis no interior da casca, atualmente são mais comuns os torradores de tambor de batelada ou os torradores de ar verticais contínuos. Durante essa etapa, também ocorre a sanitização, quando a temperatura do vapor d'água chega a 110 a 140 °C no final da torrefação, que pode durar de 15 minutos a 2 horas, dependendo da avaliação microbiológica antecipada para garantir a eliminação de microrganismos patogênicos. Ao final do processo, os *nibs* de cacau apresentam umidade próxima a 3% e são resfriados para evitar uma torrefação excessiva (BECKETT; FOWLER; ZIEGLER, 2017).

A etapa de **moagem e refino** é fundamental na produção de chocolate e consiste em moer os *nibs* de cacau até obter a massa de cacau. Para isso, são utilizados diversos tipos de moinhos, como de pinos, martelos, esferas e rolos.

Geralmente, inicia-se com uma moagem mais grosseira, seguida do refinamento em moinhos de esferas e cilindros. Quando a granulometria da massa de cacau atinge 20 a 25 μm , está pronta para o processo de temperagem e, posteriormente, ser comercializada em sacos de 25 kg (HARTEL; VON ELBE; HOFBERGER, 2018).

A **prensagem** do líquido de cacau é realizada por meio de prensas hidráulicas, resultando na produção da torta e da manteiga de cacau. A massa obtida contém entre 47% e 56% de manteiga, que é extraída por meio de pressões de até 540 bar ($540 \times 10^5 \text{ N/m}^2$) em ciclos de aproximadamente 15 minutos. A torta gerada passa por uma moagem em moinhos de rolo, transformando-se em pó que é utilizado na fabricação de diversos produtos, incluindo chocolate. Já a manteiga pode ser destinada para a fabricação de produtos farmacêuticos, cosméticos e chocolates, sendo que seu valor econômico é superior ao de outras gorduras vegetais modificadas ou equivalentes, que são comumente utilizadas como substitutas da manteiga de cacau. É possível obter a manteiga de cacau por extração com solventes, porém, esse método pode gerar características indesejáveis, sendo necessários processos adicionais de purificação (BECKETT; FOWLER; ZIEGLER, 2017).

1.6 Processamento convencional do chocolate

O processo industrial do chocolate pode ser subdividido na fabricação da massa do chocolate que envolve as etapas de **mistura**, **refino** e **conchagem** e a fabricação do produto final que envolve as etapas de **temperagem**, **moldagem**, **resfriamento**, **desmoldagem** e **embalagem** (AFOAKWA, 2016).

Durante a produção de chocolate, a **mistura** dos ingredientes é uma etapa crucial para garantir a qualidade do produto final. Para isso, são utilizados misturadores encamisados ou agitadores do tipo helicoidal e de pás que misturam os ingredientes em uma ordem precisa de adição. Geralmente, o processo começa com a adição do líquido de cacau e do leite em pó (quando for chocolate ao leite). Em seguida, é adicionado açúcar cristal, já que esse ingrediente pode influenciar o tempo do processo. A manteiga de cacau ou uma parcela de gorduras alternativas a de cacau (CBA) é adicionada em seguida, e por último os aromas em pó. É importante observar a aparência da massa gerada, que deve ter uma consistência

plástica, para determinar o ponto ideal para refinamento (BECKETT; FOWLER; ZIEGLER, 2017).

O processo de **refino** é feito tradicionalmente em moinhos de rolos ou cilindros e, alternativamente, em moinhos de esferas, com o objetivo de reduzir o tamanho das partículas dos ingredientes até que a fase lipídica comece a envolvê-las (20 a 25 μm), sem causar uma textura arenosa na boca. O tempo de refino varia de acordo com o teor de gordura, temperatura e quantidade de refinamento necessários (AFOAKWA, 2016).

A **conchagem** é realizada em conchas rotativas com agitação vigorosa em um sistema fechado, com temperaturas que aumentam à medida que a quantidade de leite diminui (no caso do chocolate ao leite), variando entre 55 a 85 °C (TOKER; PALABIYIK; KONAR, 2019). O tempo de conchagem é influenciado pela umidade, temperatura e teor de líquido, podendo durar até 72 horas. Nessa etapa, a lecitina é adicionada para melhorar a interação entre as partículas sólidas e a fração lipídica do chocolate (MOHOS, 2017).

A **temperagem** é realizada em equipamentos industriais e é responsável por evitar processos como o *flat bloom*, entre outros. Nesse processo, o chocolate é aquecido a 45 °C, resfriado a 27 °C e reaquecido a 32 °C para uniformizar os cristais de gordura presentes no chocolate, garantindo aspectos como brilho, cor, textura e firmeza com alta aceitação (sendo a estrutura beta VI considerada a mais estável e oferecendo uma ótima qualidade ao produto final) (PIROUZIAN et al., 2020).

A **moldagem** do chocolate ocorre em fôrmas com capacidades entre 20 a 100 g. É necessário a temperatura e a vibração dos moldes para evitar aderência do chocolate e também a formação de bolhas de ar. Ainda no molde, o chocolate passa por um processo de **resfriamento** que utiliza temperaturas graduais até chegar entre 12 a 15 °C. Após a solidificação, o chocolate é **desmoldado** com a ajuda de martelos mecânicos que transferem impacto na parte inferior do molde já invertido e então o chocolate é liberado caindo em esteiras que o transportaram para caixas plásticas e serão **embalados** em fábricas próximas (AFOAKWA, 2016).

1.7 Processamento do chocolate “*Bean to Bar*”

O processo de fabricação do chocolate “*Bean to Bar*” envolve amêndoas provenientes de locais conhecidos pelos fabricantes, sendo, geralmente, todo o processamento realizado em um mesmo local. Para moagem e refino dos *nibs*, é utilizada uma máquina conhecida como *melanger* (Figura 5), que produz o líquido. Para garantir a qualidade do chocolate, algumas características da *melanger* são importantes: a capacidade pode variar de acordo com o modelo, geralmente entre 5 e 100 kg; a velocidade de rotação das pedras deve ser ajustável para obter a textura desejada, normalmente *melanger* com capacidade de 4,5 kg a rotação por minuto varia entre 120 a 140 rpm e o tipo de pedra utilizada na *melanger* pode variar, mas as mais comuns são as pedras de granito ou basalto. Essas pedras são conhecidas por serem duráveis e por terem porosidade adequada para permitir a moagem e refino do chocolate de forma eficiente. Além disso, as pedras devem ser mantidas em bom estado de conservação e limpeza para evitar contaminação do chocolate.

Algumas possuem sistema de aquecimento interno para controle gradual da temperatura, geralmente começando em torno de 45-50°C, podendo chegar até 70-80°C, de forma a evitar espessamento ou granulação; enquanto outras possuem sistema de resfriamento interno para controle da temperatura evitando sua aderência. É crucial que as pedras utilizadas sejam de alta qualidade e duráveis para suportar o desgaste e fricção, e que a máquina seja construída com materiais resistentes e de fácil limpeza, como aço inoxidável. As especificações técnicas variam de acordo com o modelo de *melanger* utilizado, mas é importante que sejam consideradas as necessidades específicas do fabricante para a produção de chocolate de qualidade (RESENBLUM, 2006).

As principais comercializadas no mercado para fabricação do chocolate “*Bean to Bar*” são originárias dos países Índia e Estados Unidos:

- *Premier Chocolate Refiner*: fabricado na Índia, tem capacidade para 2 litros e velocidade de rotação das pedras variando de 1440 a 2880 rpm. Possui controle de temperatura e pode ser utilizado para moagem de amêndoas de cacau, castanhas, nozes e outros ingredientes (PREMIER, 2023).

- *Spectra Melangers*: fabricado na Índia, possui capacidade de 2 a 100 litros e velocidade de rotação das pedras variando de 1440 a 2880 rpm. Além de moagem de amêndoas de cacau, também pode ser utilizado para fazer manteiga de amêndoas, pasta de gergelim, entre outros. Possui controle de temperatura e sistema de resfriamento interno (SPECTRA, 2023).

- *Diamond Custom Machines*: fabricado nos Estados Unidos, tem capacidade variando de 45 a 2268 kg e pode ser utilizado para moagem e refino de cacau, nozes, sementes, entre outros. Possui sistema de aquecimento interno para controle de temperatura e velocidade de rotação das pedras variando de 0 a 90 rpm (DIAMOND CUSTOM MACHINES, 2023).

- *CocoaTown*: fabricado nos Estados Unidos, tem capacidade variando de 2,5 a 65 litros e pode ser utilizado para moagem e refino de cacau, nozes, sementes, entre outros. Possui sistema de aquecimento interno para controle de temperatura e velocidade de rotação das pedras variando de 0 a 160 rpm (COCOATOWN, 2023).

Ainda, outras máquinas podem ser usadas no processamento e o binômio tempo/temperatura durante as etapas não seguem um padrão dentre os fabricantes (GILLER, 2017). Entre elas estão:

-Torrador de amêndoas: utilizado para torrar as amêndoas de cacau e desenvolver seus aromas e sabores. Há diversos tipos de torradores disponíveis no mercado, desde modelos convencionais até torradores automáticos com controle de temperatura e tempo.

- **Quebrador de amêndoas:** utilizado para quebrar as amêndoas torradas e remover as cascas. Geralmente, é composto por uma máquina que tritura as amêndoas e um sistema de peneiras para separar as cascas dos *nibs*.

- **Refinador de rolos:** utilizado para refinar ainda mais o líquido de cacau após a moagem na *melanger*. O líquido é passado entre dois rolos de aço inoxidável que se ajustam de forma precisa para garantir a uniformidade da massa.

- **Conchadeira:** utilizada para aperfeiçoar o sabor e a textura do chocolate. A massa de chocolate é submetida a um processo de agitação constante e aquecimento, onde as partículas são refinadas e a umidade e outros compostos voláteis (ex. ácido acético) formados durante a fermentação das amêndoas de

cacau são evaporados. Esse processo pode levar de algumas horas a alguns dias, dependendo da qualidade do chocolate desejada.

- **Máquina de moldagem:** utilizada para moldar as barras de chocolate em diferentes formatos e tamanhos. Há diversos modelos disponíveis, desde as máquinas manuais até as automáticas, que podem moldar centenas de barras por minuto.



Figura 5. Melanger, máquina utilizada na etapa de refino do chocolate "*Bean to bar*"

Fonte: Adaptado de (GILLER, 2017)

De acordo com Giller (2017), o processo de fabricação do chocolate "*Bean to Bar*" (Figura 6) passa por diversas etapas.

A primeira delas é a **torrefação**, que geralmente é realizada em fornos domésticos ou em secadores modificados, sendo que o tempo e a temperatura variam de acordo com a experiência do fabricante. Em seguida, as amêndoas torradas são quebradas, e as cascas são removidas através do processo de joeiramento.

A etapa seguinte é a **moagem e refino**, que é feita utilizando a *melanger*, onde os *nibs* são moídos até formar um líquido conhecido como líquido de cacau. Nesse momento, é adicionado o açúcar, geralmente do tipo demerara cristal orgânico, e o tempo de moagem pode variar até que o líquido atinja a consistência desejada, livre de qualquer percepção de areosidade no paladar. Alguns

fabricantes preferem refinar parcialmente o líquido em refinadores de rolos ou moinhos de bolas para diminuir o tempo dessa etapa.

Algumas '*melangers*' podem possuir um sistema de **conchagem** integrado, que é uma etapa adicional ao processo de moagem e refino do chocolate. A conchagem é um processo que envolve o aquecimento e o arejamento do chocolate líquido por um período prolongado, geralmente de 12 a 72 horas, dependendo do tipo de chocolate e do efeito desejado. Isso ajuda a remover o sabor amargo e indesejável do chocolate, além de melhorar sua textura e aroma. A conchagem também pode ajudar a reduzir a acidez do chocolate e a melhorar sua estabilidade, permitindo que ele dure mais tempo. '*Melangers*' com sistema de conchagem integrado permitem que o processo de moagem, refino e conchagem ocorra em uma única máquina, tornando o processo de fabricação mais eficiente e econômico.

Por fim, é realizada a **temperagem**, etapa crucial para que o chocolate fique pronto para ser embalado e comercializado. Esse processo envolve o aquecimento e resfriamento do líquido de cacau, muitas vezes utilizando superfícies frias como pedras de mármore, até que o chocolate atinja o brilho e a crocância características de um chocolate de qualidade superior. A temperatura do líquido é elevada até 45 °C, resfriado a 27 °C e reaquecido a 32 °C, dessa forma os ácidos graxo presentes na gordura de cacau se reorganizam e alcançam uma estrutura conhecida como beta VI, assim o brilho, a textura e a crocância desejáveis em uma barra de chocolate também são alcançadas. A temperatura durante todo o processo pode ser monitorada com termômetros ou feita de forma visual levando em consideração a experiência do chocolateiro.

É importante ressaltar que a temperatura, o tempo e a técnica utilizada na temperagem podem variar de acordo com o tipo de chocolate e as condições ambientais do local de produção. Além disso, o processo de "*Bean to Bar*" envolve o controle da origem do cacau e a busca pela sustentabilidade social e ambiental, garantindo a qualidade e rastreabilidade do produto final.

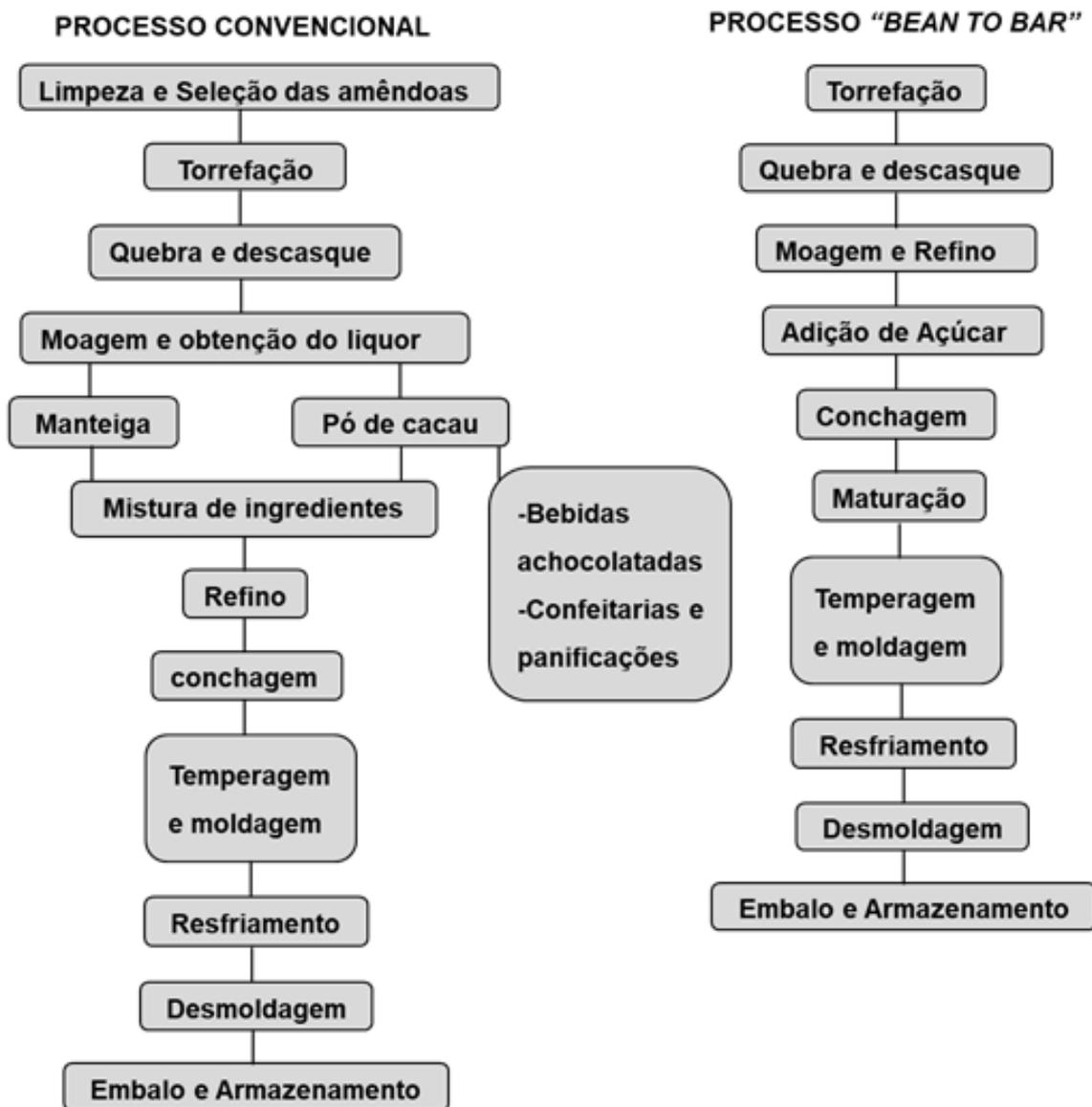


Figura 6. Fluxograma do processamento do chocolate convencional e do chocolate "Bean to Bar"

Fonte: Autor

2. CONTAMINANTES INORGÂNICOS E OCRATOXINA A

Os contaminantes inorgânicos (CI) podem afetar a saúde humana através do consumo de água ou alimentos, ou inalação de material particulado. As principais fontes de contaminação por CI são: atividades antropogênicas, uso de água de irrigação contaminada, fertilizantes usados no solo, pesticidas utilizados na agricultura, queima de biomassa, combustão de carvão e óleo, emissão de

veículos, incineração de resíduos urbanos e industriais, atividades de fundição e mineração (CAC, 2017).

Os CI também podem ser prejudiciais às plantas, animais e microrganismos, interferindo na absorção de minerais como Cu, Fe, Mo, Mn e Zn, afetando seu crescimento e desenvolvimento (ALIRZAYEVA et al., 2017). No entanto, existem métodos para melhorar a tolerância das plantas aos contaminantes inorgânicos, como a melhoria das condições do solo, modificações nas interações entre microrganismos e plantas, desenvolvimento de plantas transgênicas e uso de quelantes sintéticos (KHAN et al., 2021).

Os métodos para diminuir e eliminar os contaminantes inorgânicos no meio ambiente podem ser classificados em fitorremediação e biorremediação. Na biorremediação, microrganismos são utilizados para degradar e transformar os CI em compostos orgânicos menos tóxicos, porém, as características do solo e a quantidade de microrganismos afetam diretamente a eficácia do processo. Já na fitorremediação, plantas são utilizadas para absorver metais pesados em ambientes terrestres e aquáticos, mas é necessário que a planta tenha raízes profundas, crescimento rápido, fácil colheita e seja resistente aos contaminantes (SHARMA et al., 2021).

As micotoxinas (Figura 7) afetam a saúde por meio de alimentos agrícolas contaminados devido a práticas inadequadas antes e pós-colheita (ADEYEYE; ASHAOLU; IDOWU-ADEBAYO, 2021).

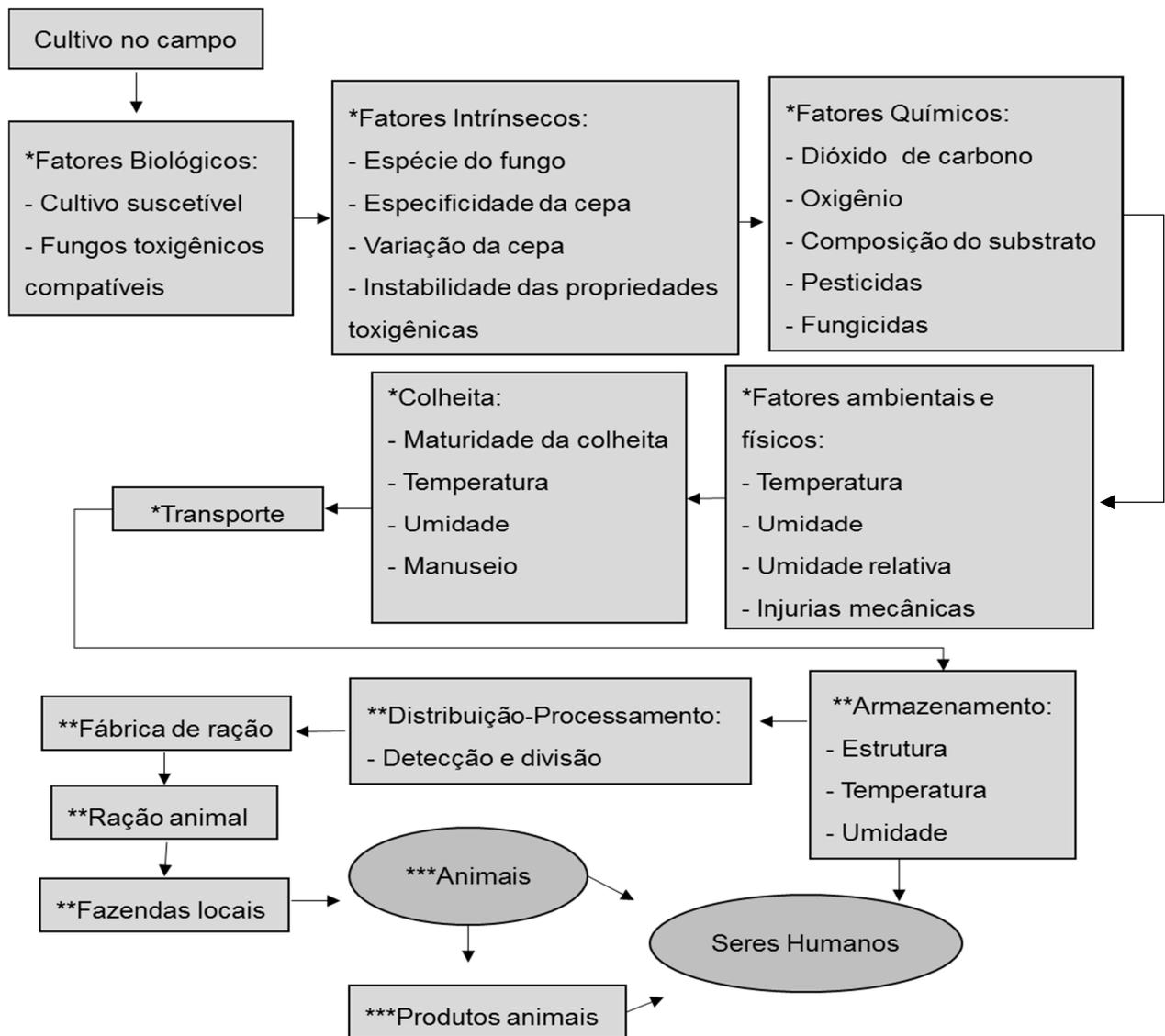


Figura 7. Fatores que afetam a ocorrência de micotoxinas na cadeia de alimentos e rações. *Contaminação por micotoxinas no campo, **Contaminação de micotoxinas no armazenamento, ***Contaminação de micotoxinas em produtos de origem animal

Fonte: Adaptado de HAQUE *et al.*, 2020

O crescimento de fungos e o desenvolvimento de micotoxinas requerem condições específicas de temperatura, umidade, atividade de água e nutrientes. Além disso, a sanidade, o método de colheita, pré-processamento, armazenamento e altura máxima de crescimento do cultivar são pontos críticos para a contaminação (DAOU *et al.*, 2021). Um dos alimentos que apresenta relatos de contaminação por micotoxinas é o amendoim, um cultivar que se desenvolve sob o solo, que é o habitat natural dos fungos (ALAM; ANCO; RUSTGI, 2020). Outros alimentos, como cacau e café, podem ser contaminados através de injúrias durante a colheita,

secagem incompleta e armazenamento sem controle de umidade (KOLAWOLE et al., 2020). A prevenção e a descontaminação de micotoxinas em alimentos podem ser realizadas antes da colheita em plantas na fase de floração, por meio da disseminação de microrganismos antagonistas ou competidores pelo mesmo habitat que os fungos toxigênicos e a utilização de plantas geneticamente modificadas para resistir a pragas que causam lesões e propiciam a entrada de esporos. Outro método para eliminação ou diminuição da presença de micotoxinas em alimentos é a utilização de microrganismos e até mesmo enzimas para biodegradação ou bioadsorção. As micotoxinas também podem estar presentes em rações de animais e gerar perdas em vários níveis da cadeia de produção de alimentos (XU et al. 2021).

2.1 Arsênio (As)

O arsênio é um elemento tóxico presente nos alimentos e tem recebido grande atenção dos pesquisadores devido à alta taxa de exposição. Em 2019, a “*Agency for Toxic Substance and Disease Registry*” (ATSDR) dos EUA considerou o elemento químico mais tóxico segundo a “*Priority List of Hazardous Substances*” (ATSDR, 2020). A “*International Agency for Research on Cancer*” (IARC) classificou o As inorgânico como uma substância carcinogênica (grupo 1A) e o As orgânico (MMA e DMA) como grupo 2B (IARC, 2012). O As é naturalmente encontrado na crosta terrestre e combina-se com cloro, oxigênio, enxofre, hidrogênio, entre outros, no meio ambiente. As formas inorgânicas, como a arsina (AsH_3), o arsenito ($As(III)$) e o arsenato ($As(V)$), são mais tóxicas do que o As orgânico, que é formado a partir da adição do grupo metil ao As (III) e As (V), a partir do aminoácido S-adenosilmetionina, e é reduzido a ácido monometilarsônico (MMA) e ácido dimetilarsínico (DMA) pela glutatona e outros tióis em organismos vivos (microrganismos, plantas e animais). O As inorgânico é comumente utilizado para a fabricação e preservação de madeiras, enquanto o As orgânico é utilizado como pesticida, normalmente em plantações de algodão (ATSDR, 2021).

A exposição ao As ocorre em ambientes como solo, água e ar. Altos níveis foram relatados em aquíferos de vários países, além de depósitos naturais de As e atividades antropogênicas relacionadas com a extração de metais preciosos, como a mineração de arsenopirita e pirita em depósitos primários de minério

(SRIVASTAVA, 2020). O As pode ser encontrado na forma de um metaloide sólido, cristalino e acinzentado, com valências químicas de -3, 0, +3 e +5, sendo que a espécie inorgânica +3 é considerada 60 vezes mais tóxica do que a +5. No solo, a concentração média encontrada é de 5 mg/kg, com variação entre 1 e 40 mg kg⁻¹. Concentrações de 20 mg kg⁻¹ foram relatadas em solos vulcânicos e em áreas em que se utilizam pesticidas ou há depósito natural, de 500 a 1000 mg kg⁻¹ (SILVA; BARRIO; MOREIRA, 2014; PALMA-LARA et al., 2020).

A água é a principal fonte de exposição de As, acumulando-se em aquíferos por meio do depósito de compostos contidos em sedimentos aluviais e quando a taxa de oxigênio na água diminui. A liberação do arsênio nos sedimentos do aquífero ocorre da dissolução de minerais de ferro com arsênio (III) em sua composição (PODGORSKI; BERG, 2020). De todo o As analisado globalmente em águas subterrâneas contendo mais de 10 microgramas/litro, a Ásia se destaca em área contaminada com 64%, seguida da América do Sul com 14%. Portanto, a utilização de águas subterrâneas contaminadas por As para irrigação de alimentos tem fortes correlações com a contaminação do solo e de alimentos produzidos neste local (MEENA et al., 2020). Sendo assim, o comitê do *Codex Alimentarius* estabeleceu um limite máximo de arsênio para água mineral natural de 0,01 mg kg⁻¹ (CAC, 2022).

Os principais efeitos do As no organismo humano são alterações no processo de divisão celular, disfunções imunológicas e inibição dos mecanismos de reparação do DNA devido à ligação ao grupo sulfidril de proteínas. Interfere na respiração celular, em enzimas celulares e diminui a capacidade antioxidante das células. A reversão dos efeitos tóxicos do arsênio no organismo é estudada e realizada por meio da quelatação com outros compostos ou da ingestão de antioxidantes (PANGHAL; SATHUA; FLORA, 2020).

A exposição ao arsênio a longo prazo causa hepatotoxicidade, cardiotoxicidade, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, dermatotoxicidade e diabetes mellitus (SRIVASTAVA, 2020). Ainda segundo SRIVASTAVA (2020), a partir dos distúrbios causados pelo arsênio no organismo humano pode ocorrer o desencadeamento de doenças e sintomas como fibrose, hepatomegalia, cirrose, arritmias cardíacas, doenças cerebrovasculares, doença do coração isquêmico, dentre outros.

Os mecanismos da carcinogenicidade do arsênio ainda não estão claros, contudo, há diferentes efeitos dependendo da dose ingerida. Em doses mais baixas, ocorre a adaptação de genes relacionados a oxidações, inflamações e acúmulo de proteínas, enquanto em doses mais altas há a formação de genes apoptóticos que influenciam positivamente o tumor (PALMA-LARA et al., 2020).

Em 2007, a ATSDR fixou Limites Mínimos de Risco (LMR) para ingestão oral em que pode haver doença gastrointestinal ($0,005 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}$) e doença dérmica ($0,0003 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}$). Em 2010, o JECFA estabeleceu, através de estudos epidemiológicos de incidência de câncer no pulmão, uma dose diária (BMDL0.5) de $3 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corpóreo para o As total (PETERSSEN, 2018; ATSDR, 2021; CAC, 2022).

2.2 Cádmio (Cd)

O cádmio é considerado um dos elementos químicos mais tóxicos do mundo, ocupando a sexta posição na "*Priority List of Hazardous Substances*" (ATSDR, 2020). O Cd foi classificado como pertencente ao grupo 1A pela IARC (2012), devido às suas fortes associações ao câncer de rim e próstata.

O Cd é encontrado na natureza em estado branco prateado, é maleável, insolúvel em água e não inflamável. É amplamente utilizado em materiais de proteção devido à sua resistência à corrosão, em reatores nucleares em forma de barras para controle do fluxo de nêutrons na fissão nuclear (GENCHI et al., 2020). Além disso, é utilizado em diversas aplicações industriais, como pigmentos, cimentos, coberturas anticorrosivas, ligas de metais e baterias. O cádmio está presente em fertilizantes agrícolas e em esgotos industriais (CAC, 2017; KLAASSEN; WATKINS III, 2012).

No organismo humano, o cádmio causa distúrbios metabólicos ao se ligar em estruturas que contêm grupos dissulfeto e tióis, resultando na diminuição da atividade de enzimas antioxidantes, como catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), a glutathione peroxidase (GPX), e de compostos antioxidantes, como vitamina E, vitamina C e glutathione reduzida (GSH), o que resulta no aumento de radicais livres (ROS) como superóxidos, hidroxilas e peróxido de hidrogênio. O resultado do estresse oxidativo é a diminuição da atividade das membranas mitocondriais, levando à interrupção da síntese de ATP e à fosforilação oxidativa,

devido ao dano e oxidação de moléculas importantes biologicamente, como fosfolipídios de membrana celular, DNA, proteínas e lipídios (AMAMOU et al., 2015; MATOVIĆ et al., 2015). Essa disfunção metabólica gerada pelo cádmio é o principal mecanismo para desencadear câncer no pulmão, rins, mama, pâncreas, sistema hematopoiético e próstata, além de causar outras doenças, como fibrose, deficiência de minerais, osteoporose, entre outras (GENCHI et al., 2020; KLAASSEN; WATKINS III, 2012).

Os alimentos são a principal fonte de exposição do cádmio à saúde humana, devido à absorção do Cd pelos cultivos em solos contaminados, além da inalação de cigarros, água e ar. O cádmio compete pelos mesmos locais de absorção de outros minerais nas raízes dos cultivos e é absorvido após estar bioacessível por meio de fatores como temperatura, potencial redox, pH, concentração, entre outros. Além disso, devido à similaridade das propriedades químicas do cádmio com minerais como o cálcio, pode haver deficiência de minerais nos cultivos (GENCHI et al., 2020; HAIDER *et al.*, 2021; REPICÍ *et al.*, 2020).

Em 2011, o JECFA estabeleceu a ingestão mensal tolerável provisória (PTMI) para Cd total como sendo $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corpóreo (p.c.) e, em 2020 foi discutida a possibilidade de modificação do limite máximo de ingestão de cádmio, porém, concluíram que os níveis de cádmio encontrados em alimentos são inferiores ao limite de ingestão já estabelecido (CAC, 2022). A ATSDR em 2012 estabeleceu limites mínimos de risco (LMR) de Cd para ingestão oral em que pode haver doença muscular ($0,0005 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}$) e doença renal ($0,0001 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}$) (ATSDR, 2021).

2.3 Chumbo (Pb)

O Pb é um metal cinza azulado e ocorre naturalmente, sendo encontrado na crosta terrestre em formas minerais como galena (PbS), anglesita (PbSO_4), cerussita (PbCO_3) e minum (Pb_3O_4). O meio ambiente é contaminado por Pb por meio de erupções vulcânicas, incêndios florestais, processos erosivos do solo/rocha e fontes antropogênicas como fundição e mineração de metais. O Pb é comumente utilizado na fabricação de tintas, plásticos, canos, louças de cerâmica, cosméticos, vidraria e combustíveis fósseis (GUPTA; CHATTERJEE; WALTHER, 2020).

O Pb, segundo a "*Agency for Toxic Substance and Disease Registry*", foi classificado como o segundo elemento químico mais tóxico devido aos seus efeitos toxicológicos no organismo humano. Sua exposição ocorre por meio do ar, ingestão de alimentos, água e contato com a pele (ATSDR, 2020). A IARC (1987, 2006) classificou o Pb como grupo 2B e compostos de chumbo inorgânicos como grupo 2A. De acordo com os "*Centers for Disease Control and Prevention*" (CDC), o Pb é mais tóxico para crianças e causa danos ao cérebro e ao sistema nervoso, retardamento no crescimento, problemas de aprendizagem, comportamento, fala e audição. O nível seguro de Pb no sangue de crianças foi atualizado em 2015 para 5 µg/dL (CDC, 2020).

Em 2011, o JECFA reavaliou o chumbo e retirou sua ingestão semanal tolerável provisória (PTWI) devido a estudos que demonstraram que o valor previamente estabelecido permitia a perda de 3 pontos no QI de crianças e causava aumento da pressão arterial em adultos expostos ao Pb. A partir desse momento, o Codex Alimentarius estabeleceu limites máximos de chumbo para diferentes categorias de alimentos (CAC, 2017). A União Europeia estabeleceu doses de referência BMDL_{0.1} de 0,5 µg kg⁻¹ por dia para crianças para efeitos no neurodesenvolvimento, BMDL₁₀ para efeitos renais em adultos de 0,63 µg kg⁻¹ e um BMDL_{0.1} para efeitos cardiovasculares de 1,5 µg kg⁻¹ de peso corporal por dia (PETERSSSEN, 2018).

2.4 Cobre (Cu)

Apesar de ser considerado um contaminante inorgânico, o Cu é essencial para o bom funcionamento do organismo humano e está presente em estruturas como ossos e músculos, sendo encontrado em grande quantidade no fígado, rins e cérebro. No entanto, concentrações superiores a 1 g por dia podem causar toxicidade, sendo que a dose letal é de 10 a 20 g. As fontes de exposição ao Cu incluem água contaminada, alimentos preparados em panelas de cobre sem revestimento, utilização de pesticidas contendo sal de Cu, além de produtos de couro e colas caseiras que contenham Cu em sua composição. Além disso, o Cu é utilizado na fabricação de diversos produtos, como arames, chapas de metal e tubos de encanamento (ATSDR, 2021; ROYER; SHARMAN, 2020).

A principal toxicose causada pelo Cu é a doença de Wilson, na qual ocorrem mutações genéticas devido ao acúmulo de Cu, principalmente no fígado, mas também no cérebro e em outros tecidos. Essas mutações resultam em sérias complicações metabólicas, podendo causar hepatite, insuficiência hepática, cirrose hepática, tremores, sintomas neurológicos, entre outros. As crianças são as mais afetadas, pois seus sistemas hepáticos ainda não estão totalmente formados (BARBER; GRENIER; BURKHEAD, 2021).

O JECFA estabeleceu uma Ingestão Diária Máxima Tolerável Provisória (PMTDI_{0.05}) de 0,5 mg/kg de peso corporal (CAC, 2022).

2.2 Cobalto (Co)

O cobalto (Co) é um elemento químico encontrado no meio ambiente nas formas 0, +2 e +3, sendo a forma Co(II) a mais estável. Preocupações surgiram em relação à sua atividade genotóxica e carcinogênica nessa forma. Testes *in vitro* com sais solúveis de Co(II), como acetato, cloreto e sulfato, demonstraram um potencial mutagênico em células de mamíferos, enquanto a maioria dos testes em bactérias foi negativa. Os mecanismos principais envolvem a geração de espécies reativas de oxigênio e a inibição dos mecanismos de reparo do DNA (EFSA, 2009).

O Co é amplamente explorado industrialmente nas formas de sais, metálicas e óxidos, em pigmentações, ligas metálicas e como catalisador. Além disso, o Co-60 radioativo é utilizado no tratamento do câncer (SCHREINER et al., 2009; KOVACHEVA-NINOVA et al., 2018).

Bioquimicamente, o Co é essencial como oligoelemento e faz parte como coenzima da vitamina B12 (cianocobalamina). Sua falta está associada à anemia perniciosa ou megaloblástica, e o excesso está relacionado a modificações genéticas e possível causador de câncer, sendo classificado como grupo 2B pela IARC (IARC, 2017; GONZÁLEZ-MONTANA, 2020).

Em um estudo encomendado pela OMS e IARC, constatou-se que a ingestão normal de Co está entre 5 e 50 µg por dia, e a quantidade no plasma sanguíneo é 0,2 µg/L, havendo toxicidade em doses maiores que 7 µg/L (KARAGAS et al., 2022). A EFSA estabeleceu como limite superior tolerável de ingestão (UL - *Tolerable upper intake level*) para Co o valor de 0,0016 mg kg⁻¹ de

peso corpóreo por dia, correspondendo a uma ingestão diária de 0,12 mg de Co para uma pessoa adulta de 70 kg (EFSA, 2012).

2.3 Mercúrio (Hg)

De acordo com a ATSDR, o mercúrio (Hg) foi classificado como a terceira substância mais tóxica do mundo. Diferente de outros metais, o mercúrio possui uma forma metálica que é líquida e vaporiza em temperatura ambiente. Ele pode existir na forma de mercúrio inorgânico quando associado a cloro, enxofre ou oxigênio, e na forma orgânica, como metilmercúrio, dimetilmercúrio, etilmercúrio, fenilmercúrio, entre outros, quando ligado a moléculas orgânicas. O mercúrio é liberado no meio ambiente por fontes naturais, como atividade vulcânica, incêndios florestais e intemperismo de rochas, além de fontes antropogênicas, como queima de combustíveis fósseis, mineração de metais valiosos, metalurgia e presença em produtos como lâmpadas fluorescentes, tintas, plásticos, termostatos, barômetros, termômetros, entre outros. Os microrganismos desempenham um papel fundamental na transformação do mercúrio inorgânico em metilmercúrio, que é a principal forma de contaminação ambiental quando ocorre acúmulo na cadeia alimentar através do solo, partes comestíveis de plantas e água (ATSDR, 2015).

Segundo a ATSDR (2015), o metilmercúrio é absorvido pelo corpo de forma mais significativa (95%), seguido pelo vapor de mercúrio quando inalado (80%) e pela ingestão de mercúrio líquido (0,01%). O mecanismo de absorção do mercúrio orgânico ocorre através do contato com a corrente sanguínea, onde é convertido em mercúrio inorgânico e acumulado no cérebro e nos rins, permanecendo no organismo por longos períodos e podendo causar danos dependendo da quantidade e do tempo de exposição. O metilmercúrio é absorvido de forma mais eficiente pelo trato gastrointestinal em comparação ao mercúrio inorgânico, resultando em uma maior biodisponibilidade no organismo. Além disso, o metilmercúrio é capaz de atravessar facilmente a barreira hematoencefálica e a barreira placentária, permitindo sua distribuição no sistema nervoso central e transferência para o feto em mulheres grávidas. O metilmercúrio possui uma afinidade maior por grupos sulfidrilas de proteínas, o que facilita sua ligação e transporte nos tecidos. Essa ligação proteica contribui para sua persistência e acúmulo em órgãos e tecidos, especialmente no cérebro.

As recomendações e regulamentações das principais autoridades governamentais como a *Environmental Protection Agency* (EPA) e *Food and Drug Administration* (FDA) para água potável é de $2 \mu\text{L mL}^{-1}$ e em rios, lagos e córregos de $0,144 \mu\text{L mL}^{-1}$ (ATSDR, 2015). O comitê do *Codex Alimentarius* (JECFA), em 2011 e a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA), em 2006 estabeleceu uma ingestão semanal provisória tolerável (PTWI) para mercúrio inorgânico de $4 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corpóreo (pc) e uma ingestão semanal tolerável (TWI) de $4 \mu\text{g kg}^{-1}$ pc, respectivamente. Para metilmercúrio, em 2006, o JECFA estabeleceu um PTWI de $1,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ pc e em 2018, a EFSA estabeleceu um TWI de $1,3 \mu\text{g kg}^{-1}$ pc (PETERSEN, 2018).

2.4 Selênio (Se)

O selênio (Se) é um mineral encontrado naturalmente em rochas e no solo, geralmente associado a sulfetos e minerais como prata, cobre, chumbo e níquel. Em sua forma pura, ele é encontrado como cristais hexagonais de cor cinza metálico a preto. A presença de selênio nos alimentos pode ser dividida em selênio inorgânico, como selênio quelato (por exemplo, com sódio), selenito e selenato, e selênio orgânico, quando está ligado a aminoácidos sulfurados, como a selenometionina e a selenocisteína. As principais fontes de selênio que contribuem para o acúmulo no meio ambiente são naturais e antropogênicas. Fontes naturais incluem erupções vulcânicas e intemperismo do solo, enquanto fontes antropogênicas incluem mineração, uso de combustíveis fósseis e fertilizantes contendo selênio. Dessa forma, o selênio pode ser encontrado no ar, no solo e na água, e conseqüentemente pode ser acumulado na cadeia alimentar (ATSDR, 2022).

No corpo humano, o selênio faz parte da estrutura de enzimas antioxidantes intracelulares que protegem contra espécies reativas de oxigênio, também conhecidas como radicais livres. Para que o selênio cumpra corretamente seu papel no corpo, é importante controlar a dose de ingestão, pois o excesso em curto prazo pode causar náuseas, vômitos e diarreia. Em longo prazo, pode haver o desenvolvimento da selenose, que é caracterizada por sintomas como cirrose hepática, anemia, fragilidade capilar e unhas. Por outro lado, a deficiência de

selênio pode levar ao mau funcionamento da tireoide, fraqueza muscular, anemia, ansiedade, depressão, entre outros sintomas (TÓTH e CSAPÓ, 2018).

Segundo a EFSA, o *Limite Superior Tolerável de Ingestão* (UL) de selênio para homens e mulheres (incluindo mulheres grávidas e lactantes) é de 255 µg/dia e para crianças os ULs são derivados do UL para adultos: 60 µg/dia (1 a 3 anos), 90 µg/dia (4 a 6 anos), 130 µg/dia (7 a 10 anos), 200 µg/dia (11 a 14 anos) e 250 µg/dia (15 a 17 anos) (EFSA, 2023).

2.5 Ocratoxina A (OTA)

Quimicamente, a ocratoxina A (OTA) consiste numa dihidroisocumarina ligada através de 7 grupos carboxílicos por uma ponte amida à L-fenilalanina, e é diferenciada de outros dois tipos de ocratoxina (B e C) por uma molécula de cloro. Os fungos que produzem micotoxinas são dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. As espécies produtoras de OTA em cacau descritas na literatura são *A. westerdijkiae*, *A. ochraceus*, *A. melleus*, *A. carbonarius* e *A. niger*, sendo as etapas de pós-colheita dos frutos (fermentação, secagem e armazenamento) as que tem grande influência na ocorrência de ocratoxina A. No entanto, a higiene dos frutos obtidos na colheita e as mudanças climáticas devido ao aquecimento global podem influenciar no aumento da presença de fungos micotoxigênicos (IAMANAKA; OLIVEIRA; TANIWAKI, 2010; KEDJEBO *et al.*, 2015; TANIWAKI; PITT; MAGAN, 2018).

A fermentação e a secagem em períodos prolongados favorecem o crescimento de fungos ocratoxigênicos (*A. carbonarius* e *A. niger*) e o controle da umidade durante o período de armazenamento (dois a três meses), em torno de 6-7%, mantém o padrão de qualidade. Deste modo, a concentração de ocratoxina A é diminuída e controlada durante o processamento do chocolate, sendo diminuindo em cerca de 17% durante a etapa de torrefação e em 90% durante o peneiramento na separação da casca e *nibs* (TANIWAKI *et al.*, 2019).

A ocratoxina A foi considerada pelo IARC (1993) como sendo um possível carcinógeno para humanos (grupo 2B) (HOELTZ *et al.*, 2012) e os principais alimentos onde pode ocorrer incluem os produtos de origem animal (ração para os animais), cereais, leguminosas, café, cacau, figos, uvas, vinho, nozes e produtos de coco. Ao entrar em contato com o organismo humano, a ocratoxina A pode

provocar diversos tipos de doenças como nefropatia, câncer, imunotoxicidade e neurotoxicidade. O JECFA estabeleceu para ocratoxina A uma PTWI de 0,0001 ng kg⁻¹ ou 0,1 µg kg⁻¹ pc (CAC, 2022) e a União Europeia a PTWI de 0,12 µg kg⁻¹ pc (120 ng kg⁻¹ pc) (EU, 2006).

2.6 Contaminantes inorgânicos e ocratoxina A em cacau e derivados

Foram reportados estudos e ocorrência dos contaminantes inorgânicos As, Cd, Cu, Pb e ocratoxina A em amêndoas de cacau e chocolates convencionais, em amostras de solo, de plantas e de derivados do processamento da amêndoa de cacau. Considerando isso, as autoridades nacionais e internacionais determinam LMT em amêndoas de cacau e chocolate, água de irrigação, solo e fertilizantes.

A Agência de Proteção Ambiental dos EUA (US-EPA) estabeleceu um nível crítico para Cd (0,43 mg kg⁻¹) em solo destinado a agricultura. A União Europeia em 2019 determinou um limite máximo de As (40 mg kg⁻¹), Cd (1,5 mg kg⁻¹) e Pb (120 mg kg⁻¹) em fertilizantes orgânicos. A resolução n° 420 do CONAMA estabeleceu diretrizes de eliminação e valores de orientação para manutenção da qualidade do solo, na ocorrência de substâncias químicas, incluindo As (15 mg kg⁻¹), Cd (1,3 mg kg⁻¹), Pb (72 mg kg⁻¹) e Cu (60 mg kg⁻¹) (BRASIL, 2009; BRASIL, 2021b). A FAO estabeleceu um LMT para As (0,1 mg L⁻¹), Cd (0,01 mg L⁻¹) e Pb (5,0 mg L⁻¹) em água de irrigação (AYERS; WESTCOT, 1985; EPA, 2002; EU, 2019).

No Brasil, a resolução do CONAMA n° 357 estabelece limites máximos de As total (0,069 mg L⁻¹), Cd total (0,04 mg L⁻¹), Cu dissolvido (7,8 µg L⁻¹), Hg total (1,8 µg L⁻¹), Pb total (0,210 mg L⁻¹) e Se total (0,29 mg L⁻¹) em água doce destinada a irrigação (BRASIL, 2005). Em 2021, o Ministério da Saúde publicou a Portaria n° 888 que estabelece Valores Máximos Permitidos (VMP) para As (0,01 mg L⁻¹), Cd (0,003 mg L⁻¹), Cu (2 mg L⁻¹), Hg total (0,001 mg L⁻¹), Pb (0,01 mg L⁻¹) e Se (0,04 mg L⁻¹) e em águas destinadas ao consumo humano.

A União Europeia estipulou níveis máximos de Cd em derivados do cacau: chocolate ao leite com menos de 30% de sólidos de cacau (0,10 mg kg⁻¹); chocolate com menos de 50% e chocolate ao leite com mais de 30% de sólidos de cacau (0,30 mg kg⁻¹); chocolate com mais de 50% de sólidos de cacau seco (0,80 mg kg⁻¹) e cacau em pó ou bebidas achocolatadas (0,60 mg kg⁻¹) (EU, 2014).

O comitê do *Codex Alimentarius* fixou limites máximos de Cd em 2019 para chocolates e produtos à base chocolate contendo teores de cacau entre 50% e 70% ($0,8 \text{ mg kg}^{-1}$) e com mais de 70% ($0,9 \text{ mg kg}^{-1}$). E no mesmo ano, este comitê recomendou LM para Cd em chocolates com teores inferiores a 30% ($0,3 \text{ mg kg}^{-1}$) entre 30% e 50% ($0,5$ a $0,7 \text{ mg kg}^{-1}$) e 100% ($1,3$ a $1,5 \text{ mg kg}^{-1}$) de cacau. Em 2021, o comitê recomendou novos níveis máximos (MLs) para Cd em chocolates contendo até 30% de sólidos de cacau ($0,3 \text{ mg kg}^{-1}$) e para chocolates contendo entre 30% e 50% ($0,7 \text{ mg kg}^{-1}$) (CAC, 2022).

Em 2022, a ANVISA estabeleceu através da Instrução Normativa (IN) nº 160 LMT's para contaminantes inorgânicos em chocolates e produtos à base de cacau com mais de 40%: As ($0,40 \text{ mg kg}^{-1}$); Cd ($0,30 \text{ mg kg}^{-1}$); e Pb ($0,40 \text{ mg kg}^{-1}$), com menos de 40% de cacau: As ($0,20 \text{ mg kg}^{-1}$); Cd ($0,20 \text{ mg kg}^{-1}$); e Pb ($0,20 \text{ mg kg}^{-1}$) e pasta de cacau: As ($0,50 \text{ mg kg}^{-1}$); Cd ($0,30 \text{ mg kg}^{-1}$); e Pb ($0,50 \text{ mg kg}^{-1}$), e para o Cu foi estabelecido LMT em amêndoas de cacau ($40,0 \text{ mg kg}^{-1}$) (BRASIL, 2022).

RAMTAHAL et al. (2016) estudaram a relação entre a presença de Cd em tecidos de plantas de cacau e em solos de Trinidad e Tobago. Observaram maiores concentrações em folhas ($0,54$ - $5,21 \text{ mg kg}^{-1}$), seguido de cascas dos frutos ($0,53$ - $4,49 \text{ mg kg}^{-1}$), cascas de amêndoa ($0,44$ - $4,41 \text{ mg kg}^{-1}$), nibs ($0,35$ - $3,82 \text{ mg kg}^{-1}$) e solo ($0,3$ - $1,7 \text{ mg kg}^{-1}$).

CHAVEZ et al. (2015) estudaram a relação entre a concentração de Cd em sementes de cacau e no solo em 19 fazendas de cultivo de cacau no Equador. Os autores observaram que o Cd se acumula em maior quantidade na superfície do solo (média de $1,54 \text{ mg kg}^{-1}$) do que em solos mais profundos (média de $0,85 \text{ mg kg}^{-1}$), sendo atribuída essa contaminação a atividades antropogênicas. Nas sementes, foi encontrada a maior média de Cd ($0,94 \text{ mg kg}^{-1}$) em comparação com as cascas ($0,09 \text{ mg kg}^{-1}$) e folhas ($0,10 \text{ mg kg}^{-1}$).

BUTACIU et al. (2016) utilizaram o método de vaporização eletrotérmica acoplada a espectrometria de emissão óptica com micro tocha em plasma capacitivo para estudo de Cd em alimentos e para a digestão das amostras foi usado a digestão ácida (HNO_3 - H_2O_2) assistida por micro-ondas.

Teores de Cd e Pb foram reportados em 20 amostras do Equador, Venezuela, Malásia, Brasil, Costa do Marfim e Gana, incluindo amêndoas de cacau e derivados do processamento de chocolate, encontrando uma concentração

máxima de 1,83 mg kg⁻¹ de Cd em amostras de cacau em pó da Venezuela, excedendo o limite máximo permitido em vários países (MOUNICOU et al., 2003).

Em um estudo realizado por RANKIN et al. (2005) em 6 fazendas da Nigéria, foi constatada alta concentração de Pb em derivados do processamento de chocolate (média de 230 e 70 µg kg⁻¹), atribuída à emissão de gasolina com chumbo durante exposições ao ar livre (fermentação e secagem ao sol), enquanto nas sementes foi encontrada uma concentração baixa (média de 0,5 µg kg⁻¹).

DURAN, TUZEN, SOYLAK (2009) avaliaram os teores de Cd, Pb, Cu, Ni, Fe, Mn e Cr em amostras de 17 marcas de goma de mascar e balas à base de cacau, açúcar e frutas, e constataram teores de Cd e Pb nos produtos à base de cacau, com médias de 1,347 e 0,681 µg kg⁻¹, respectivamente.

YANUS et al. (2014) avaliaram a presença de elementos-traço (Pb, Cd, Cr, Mn, Co, As, Bi, Mo) em amostras de chocolates de vários países, com diferentes teores de cacau. Eles observaram uma correlação linear entre o nível de elementos-traço no chocolate e o conteúdo de sólidos de cacau. Em outras palavras, quanto maior o teor de cacau no chocolate, maior é o teor dos elementos-traço.

VILLA, PEIXOTO, CADORE (2014) constataram a presença de Cd e Pb em 30 amostras de chocolate, com diferentes teores de cacau em sua composição. Eles concluíram que chocolates com maior teor de cacau apresentaram maiores níveis de Cd (107,6 ± 4,5 µg kg⁻¹) e Pb (129,7 ± 6,9 µg kg⁻¹) em comparação com o chocolate branco ou com baixos teores de cacau.

KRUSZEWSKI; OBIEDZIŃSKI; KOWALSKA (2018) estudaram a distribuição de Ni, Cd e Pb em amêndoas de cacau importadas do Equador e da República Dominicana, bem como nos produtos derivados em cada etapa de 3 linhas distintas de processamento na Polônia. Foi constatado uma redução nos teores de metais dependendo do processamento, com uma diminuição de 0 a 100% para o Pb e de 10,5 a 33% para o Cd. As etapas determinantes para a diminuição da concentração dos metais foram o joeiramento e a conchagem. Além disso, foi relatado um alto teor de Cd em chocolates (0,43 mg kg⁻¹).

LO DICO et al. (2018) reportaram teores médios de As (0,303 mg kg⁻¹), Cd (1,228 mg kg⁻¹) e Pb (0,094 mg kg⁻¹) em 105 amostras de chocolate, com diferentes teores de sólidos de cacau e cacau em pó adquiridos em mercados da Itália.

GRAMLICH et al. (2018) avaliaram a presença de Cd em 102 amostras de solo e 97 amostras de folhas e frutos de cacau em 55 fazendas produtoras de cacau localizadas em Honduras. Os níveis de Cd encontrados foram de 0,1–1,1 mg kg⁻¹ no solo, 0,03–7,1 mg kg⁻¹ nas sementes, 0,04–10,2 mg kg⁻¹ na casca do fruto e 0,1–28,0 mg kg⁻¹ nas folhas. Os valores baixos de Cd total no solo indicaram uma alta absorção pelo cultivar.

OLIVEIRA et al. (2021) avaliaram amostras de amêndoas de cacau das principais regiões produtoras do Brasil e Equador, encontrando teores de Cd (<0,0015–1,6 mg kg⁻¹) e Pb (<0,022–2,5 mg kg⁻¹). Esses resultados foram associados aos altos teores desses contaminantes no solo do noroeste da América do Sul e à atividade extrativista de petróleo.

BRAVO et al. (2021) constataram a presença de Cd em amostras de solo em fazendas produtoras de cacau na Colômbia. Foram encontradas médias altas nas cidades Santander (1,9 mg kg⁻¹), Boyacá (1,82 mg kg⁻¹) e Córdoba (1,63 mg kg⁻¹), além de uma alta concentração na cidade de Arauca (10 mg kg⁻¹).

SILVA et al. (2021), estudaram amostras de chocolate comum comercializadas no Brasil, adquiridas em diferentes regiões do país. Os valores encontrados para o cobre (Cu) nas amostras de chocolate variaram de 4,30 a 138 µg g⁻¹, enquanto os valores encontrados para o chumbo (Pb) variaram de 0,83 a 27,9 µg kg⁻¹.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da IN n° 160, estabeleceu limites máximos toleráveis (LMT) de ocratoxina A em amêndoas de cacau de 10 µg kg⁻¹, e para produtos de cacau e chocolate, o limite é de 5 µg kg⁻¹ (BRASIL, 2022).

A contaminação potencial e o desenvolvimento de fungos filamentosos têm início durante a colheita, devido a lesões nos frutos, assim como durante o armazenamento prolongado e a etapa de fermentação. Alguns fungos filamentosos presentes nas amêndoas podem produzir micotoxinas durante a secagem, tornando essa fase um dos pontos críticos para a segurança microbiológica das amêndoas de cacau (EFRAIM et al., 2010; COPETTI et al., 2009).

TURCOTTE, SCOTT e TAGUE (2013) relataram a ocorrência de Ocratoxina A em 85 amostras de produtos de cacau, incluindo cacau natural (média de 1,17 µg kg⁻¹), cacau alcalino (média de 1,06 µg kg⁻¹), chocolate torrado (média de 0,49

$\mu\text{g kg}^{-1}$), chocolate amargo (média de $0,39 \mu\text{g kg}^{-1}$), chocolate ao leite (média de $0,19 \mu\text{g kg}^{-1}$), líquido de cacau (média de $0,43 \mu\text{g kg}^{-1}$) e manteiga de cacau (níveis abaixo do limite de quantificação de $0,16 \mu\text{g kg}^{-1}$).

KAMELÉ et al. (2019) investigaram a presença de ocratoxina A em cacau da Costa do Marfim nas etapas de pós-colheita e constataram que os menores níveis de ocratoxina A são encontrados em grãos inteiros, enquanto grãos quebrados ou com defeitos podem apresentar níveis mais elevados de contaminação.

KABAK (2019) examinou a ocorrência de ocratoxina A em 130 amostras de vários tipos de chocolates da Turquia e observou que o contaminante estava presente em 46% dos chocolates amargos, 23% dos chocolates ao leite e 17% das bolachas de chocolate, com teores médios variando de $0,18$ a $0,75 \mu\text{g kg}^{-1}$ de ocratoxina A.

Copetti et al. (2010) analisaram a OTA em 222 amostras de amêndoas de cacau ao longo das etapas do processamento pós-colheita, e as maiores concentrações foram encontradas em uma amostra da etapa de secagem ($5,54 \mu\text{g kg}^{-1}$) e uma do armazenamento ($4,64 \mu\text{g kg}^{-1}$). Em outro estudo realizado por Copetti et al. (2012), a ocratoxina A variou de $0,03$ a $0,39 \mu\text{g kg}^{-1}$ em diversos produtos derivados de amêndoas de cacau, como cacau em pó, manteiga de cacau, chocolates convencionais branco, ao leite e preto.

3. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE CONTAMINANTES INORGÂNICOS E OCRATOXINA A

Para a determinação de contaminantes inorgânicos em alimentos, é comum realizar a digestão da amostra por decomposição via úmida assistida por radiação micro-ondas, combustão ou fusão. A escolha do método mais eficaz é influenciada pelo conhecimento da matriz da amostra. A decomposição via úmida pode ser feita em sistema aberto ou fechado, utilizando aquecimento por radiação micro-ondas ou métodos convencionais de alta temperatura. No sistema aberto, a decomposição da matéria orgânica é realizada com o uso de ácidos, como ácido nítrico, sulfúrico, clorídrico, peróxido de hidrogênio ou misturas destes. A escolha do ácido leva em consideração o seu ponto de ebulição, por exemplo, o ácido nítrico possui ponto de ebulição de $86 \text{ }^{\circ}\text{C}$, com máximo de $120 \text{ }^{\circ}\text{C}$, o que é suficiente para decompor a

matéria orgânica de amostras com matrizes complexas. A mistura de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio permite atingir temperaturas de até 170 °C. No sistema fechado de decomposição via úmida, ocorre uma maior eficiência devido ao aumento do ponto de ebulição por meio de pressão maior que a atmosférica. Essa abordagem apresenta a vantagem de reduzir a contaminação da amostra pelo ambiente do laboratório. A decomposição via úmida assistida por micro-ondas utiliza radiações não ionizantes com frequência de até 2450 MHz e potência de até 1500 W, resultando em um aquecimento da amostra de até 240 °C. Os equipamentos que emitem radiação por micro-ondas são compostos por um ou dois magnétons. As amostras são colocadas em frascos ou copos abertos ou fechados, feitos de materiais como politetrafluoretileno (PTFE), vidro, quartzo fundido, polietileno, entre outros (KRUG e ROCHA, 2019).

Ainda segundo KRUG e ROCHA (2019), a determinação de contaminantes inorgânicos em alimentos também pode ser realizada por métodos de decomposição por combustão e fusão, além da decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas mencionada anteriormente.

A decomposição por combustão envolve o uso de altas temperaturas ou a ação de radicais de oxigênio ou oxigênio excitado em plasmas a temperaturas relativamente baixas para decompor matrizes orgânicas. Nesses processos, ocorre a conversão de espécies químicas em substâncias mais simples, como dióxido de carbono e água, a partir de substâncias combustíveis e oxidantes, gerando produção de calor. Um exemplo de equipamento comumente utilizado é o forno tipo mufla, no qual a amostra é calcinada até a formação de cinzas contendo os minerais de interesse. Aditivos, como ácido nítrico e nitrato, podem ser utilizados para acelerar as reações, prevenir a volatilização de componentes das cinzas e reações indesejadas entre os componentes da cinza e o material do cadinho. As temperaturas na combustão podem variar de 100 °C a 1000 °C, dependendo do elemento de interesse e do tipo de amostra.

Já na decomposição por fusão, a amostra é moída e misturada com um eletrólito ácido ou básico (fundente) em um cadinho de níquel ou platina, e aquecida até que se dissolva na solução. Em seguida, a amostra é resfriada em temperatura ambiente, permitindo que o líquido solidifique, e o material resultante é solubilizado em água ou ácido diluído.

CHAVEZ *et al.* (2015) determinaram Cd em folhas, cascas e grãos de cacau utilizando a digestão com ácido nítrico a 140°C por 180 min e a quantificação dos contaminantes usando um espectrômetro de emissão com fonte de plasma com acoplamento indutivo (ICP OES). BUTACIU *et al.* (2016) utilizaram o método de vaporização eletrotérmica acoplada a espectrometria de emissão óptica com micro tocha em plasma capacitivo para estudo de Cd em alimentos e para a digestão das amostras foi usado a digestão ácida (HNO₃ – H₂O₂) assistida por micro-ondas.

YANUS *et al.*, (2014) estudaram 8 elementos-traço incluindo As, Cd e Pb, em amostras de chocolates com diferentes proporções de cacau utilizando a técnica de espectrometria de massas hífenada a plasma com acoplamento indutivo (ICP-MS). As amostras (100 mg) foram inicialmente digeridas em um banho de água quente, usando uma mistura 1:2 de H₂O₂ 30% e HNO₃ concentrado (v/v) e uma solução de índio foi usada como padrão interno.

A técnica de absorção atômica com chama foi usada por ALAGIĆ; HUREMOVIC (2015) para estudo de Mn, Cu, Zn, Cd, Cr, Fe, and Pb em chocolates e produtos de cacau, após digestão ácida das amostras com ácido nítrico em temperatura de 80 °C. Também tem sido utilizada a técnica de absorção atômica com forno de grafite para estudos de Cd em produtos de cacau (PERSULESSY, 2009; YAPO *et al.*, 2014).

Entre os métodos analíticos oficiais reportados para a digestão de amostras de alimentos da AOAC (LATIMER, 2012), o método 999.11 utiliza para a mineralização das amostras, a calcinação em forno mufla, a 450°C, para a determinação de Pb, Cd, Cu, Fe e Zn. Este procedimento é simples, tem baixo custo e utiliza mínima quantidade de reagentes químicos, contribuindo com os princípios da química verde, porém sua utilização é limitada para a determinação de elementos voláteis como o arsênio.

Os métodos comumente utilizados para a extração de OTA em alimentos empregam diferentes solventes orgânicos, como metanol e acetonitrila, extração em fase sólida (SPE) com solventes seletivos, com a utilização de colunas de imunoafinidade (IAC) (FABIANI *et al.*, 2010; QUINTELA *et al.*, 2011). Outro método de SPE seletivo utiliza polímeros molecularmente impressos (MIP's), baseado em polímeros formados por unidades monoméricas via ligações não-covalentes na

presença de uma molécula modelo (PICHON e COMBES, 2016). Outra forma de extração é o SPE não-seletivo, baseado em interações hidrofóbicas e troca aniônica com o emprego de sorventes sólidos em uma coluna, como o sorvente C18 e balanço lipofílico-hidrofílico (RODRIGUEZ-CABO *et al.*, 2016; CAMPONE *et al.*, 2018).

Os principais métodos descritos na literatura para determinação e quantificação de ocratoxina A em cacau e chocolates são baseados na cromatografia, como a cromatografia de camada delgada (CCD) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com fase reversa ou normal usando detector de fluorescência (COPETTI *et al.*, 2010; CUBERO-LEON *et al.*, 2017; MISHRA *et al.*, 2016; SKARKOVA *et al.*, 2013; TWARUŽEK *et al.*, 2020). Também pode ser usada a técnica de cromatografia gasosa (CG) acoplada aos detectores de fluorescência ou de massas (LEITE, *et al.*, 2020).

Um método interessante de extração proposto por ANASTASSIADES *et al.* (2003), denominado QuEChERS vem sendo utilizado com modificações para determinação de micotoxinas e diversos compostos orgânicos em solo, água e alimentos. HACKBART *et al.* (2012) modificaram o método adicionando sais e um processo de limpeza (clean up) para analisar ocratoxina A e citrinina em arroz. (PRESTES *et al.*, 2009).

TURCOTTE, SCOTT e TAGUE (2013) utilizou a técnica de extração com solventes metanol, água e NaCl para extração de ocratoxina A e aflatoxinas em amostras de amêndoas de cacau e chocolates. O extrato foi limpo em coluna de imunoafinidade, a determinação das micotoxinas foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de fase reversa e a detecção das aflatoxinas por um reator fotoquímico pós-coluna e da ocratoxina A por fluorescência, obtendo limites de detecção e de quantificação baixos.

KEMELÉ (2019) analisou amostras de cacau durante as etapas do pré-processamento (fermentação, secagem e armazenamento) utilizando a extração com metanol e água mais bicarbonato de sódio, a limpeza do extrato foi feita com uma coluna de imunoafinidade (Ochraprep e RBiopharm) e para a determinação foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) sendo utilizado uma fase móvel com acetonitrila, água e ácido acético. KABAK (2019) determinou a presença de ocratoxina A em amostras de chocolates utilizando a extração com metanol e

água com cloreto de sódio e limpeza do extrato com coluna e imunoafinidade, a determinação da OTA foi realizada por cromatografia líquida de alta performance (CLAE) com detector de fluorescência.

3.1 Espectrometria de emissão com fonte de plasma com acoplamento indutivo (ICP OES)

A técnica que utiliza o instrumento espectrômetro de emissão com fonte de plasma com acoplamento indutivo (ICP OES) para determinação e quantificação de elementos-traço necessita do preparo da amostra, como a decomposição por via úmida ou via seca, podendo ser realizada em sistema fechado ou não. Além desta técnica, a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF-AAS) é bastante empregada para quantificação de contaminantes inorgânicos e minerais essenciais em alimentos. Nesta técnica, os elétrons ou íon do analito de interesse são excitados e absorvem energia térmica do plasma de argônio cuja temperatura chega até 10.000K promovendo um nível eletrônico energético superior e ao retornar para um nível de menor energia, a energia absorvida é emitida em forma de luz e a partir dos comprimentos de ondas os analitos são detectados e quantificados na amostra.

As principais partes constituintes que integram um instrumento ICP OES (Figura 8) são: o nebulizador e câmara de nebulização, a tocha, espectrômetro (detector).

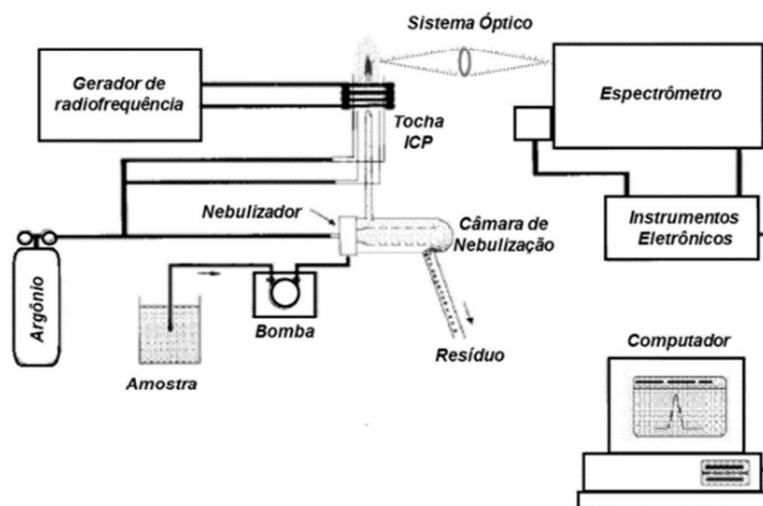


Figura 8. Representação esquemática do equipamento de ICP OES

Fonte: Adaptado de Boss & Fredeen, 2004

A técnica de ICP OES utiliza, na maioria dos casos, amostras líquidas na forma de um aerossol formado em um nebulizador. O nebulizador é um componente do sistema de introdução de amostra onde é produzida uma população de átomos, íons e/ou moléculas. Existem diferentes tipos de nebulizadores, sendo um dos mais usados, o pneumático concêntrico, no qual a amostra é introduzida por um capilar em uma região de baixa pressão criada pelo fluxo de gás que passa ao final do capilar. Após a formação do aerossol, na câmara de nebulização ocorre a separação das menores gotículas que são direcionadas para a tocha, enquanto as maiores são descartadas. A câmara de nebulização pode ser simples ou de duplo passo. As menores gotículas da amostra atingem o plasma de argônio onde predomina uma mistura gasosa condutora de eletricidade, constituído por um gás (argônio) altamente ionizado que contém íons e elétrons, além de átomos e moléculas neutras.

A tocha, constituída de quartzo, é formada por 3 tubos concêntricos. O tubo interno, o injetor, com diâmetro interno variando de 0,8 a 2,0 mm, recebe o fluxo de amostra que passou pelo nebulizador. Os demais tubos recebem o gás argônio em diferentes vazões, geralmente entre 11 e 17 L/min, e estes tubos têm a função de resfriar as paredes internas do tubo central da tocha, formando um fluxo tangencial. A tocha do plasma possui duas configurações (axial e radial). Na posição axial há maior sensibilidade e maior razão sinal/ruído em relação ao sentido radial, porém, pode ocorrer o fenômeno de autoabsorção e recombinação de íons. Na visão radial o plasma é observado lateralmente, em ângulo de 90°.

Na parte superior da tocha localiza-se a bobina de indução e, geralmente, é usada uma espiral oca de cobre, refrigerada e alimentada por um gerador de radiofrequência de 27 ou 41 MHz. O plasma de argônio é formado a partir de uma centelha, e os íons resultantes interagem com o campo magnético oscilante. A radiação isolada é então convertida em sinais elétricos utilizando um sistema de detectores. Os detectores mais utilizados são os de estado sólido, tipo CCD (*Charge Coupled Device*). Este detector utiliza pixels que permitem maior resolução nas medidas das linhas de emissão e, deste modo, levam à diminuição das interferências espectrais (Skoog et al., 2002).

3.2 Espectrometria de massas com fonte de plasma com acoplamento indutivo (ICP-MS)

A técnica que utiliza a instrumentação ICP-MS para determinação e quantificação de elementos-traço é considerada a mais sensível. A técnica baseia-se na determinação de elementos com isótopos estáveis, com massas e abundâncias conhecidas, positivamente carregados com carga +1 (m/z) através da ionização ocorrida em um plasma, normalmente de gás argônio de alta pureza (>99,999%) (THOMAS, 2013).

As partes que integram um instrumento de ICP-MS (Figura 9) são: sistema de introdução de amostra (nebulizador e câmara de nebulização), tocha (plasma), interface (bombas de vácuo, cones e lentes iônicas), quadrupolo e detector.

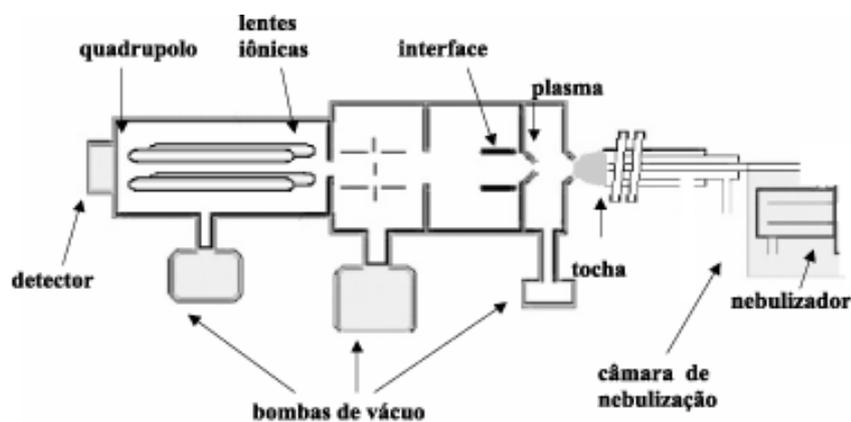


Figura 9. Representação esquemática do equipamento de ICP MS.

Fonte: Adaptado de Gervasio *et al.* 2003

Na técnica de ICP-MS, os íons são gerados em um plasma indutivo e, em seguida, introduzidos no sistema do espectrômetro de massas. Utilizando um detector de massas, como o quadrupolo, é possível separar os íons com base na razão massa/carga por meio do transporte sob a ação de campos elétricos e magnéticos, os quais modificam as trajetórias dos íons (Skoog *et al.*, 2002).

Para a determinação e quantificação do analito na amostra, é realizada a calibração do instrumento previamente, por meio do preparo de soluções-padrões e construção das curvas analíticas. Comumente, são utilizados padrões internos para correção de possíveis interferências físico-químicas. A amostra, que foi

previamente preparada no estado líquido, passa por um nebulizador para se transformar em um aerossol. Em seguida, ocorre o resfriamento na câmara de nebulização para garantir a distribuição homogênea das partículas. Todo o transporte da amostra é realizado por meio de uma bomba peristáltica até a base do plasma.

Devido às diferentes zonas de temperatura existentes no plasma, a amostra passa por etapas de secagem, vaporização, atomização e ionização, transformando-se de um aerossol líquido em partículas sólidas e, posteriormente, em um gás ionizado (íons positivos). Para permitir o transporte dos elementos ionizados entre as partes que compõe o equipamento, é necessário que o ambiente esteja sob pressão de vácuo. Para isso, são utilizadas bombas mecânicas e turbo moleculares. Na célula de interface, ocorre a extração do feixe de íons através do cone de amostragem (*sampling cone*), que possui um pequeno orifício com diâmetro inferior a 1 mm. Após a passagem pelo cone de amostragem, o feixe de íons fica sob um vácuo à aproximadamente 400 Pa. O feixe de íons é então transportado para o cone de afinamento (*skimmer cone*), o qual possui o diâmetro interno de 0,1 mm e tem a função de “afunilar” o feixe de íons e inibir o espalhamento dos íons com menor massa entre os dois cones. As lentes iônicas têm a função de extrair os íons com carga positiva, geralmente são usadas quatro lentes e em cada lente são formados campos elétricos a partir de uma voltagem específica para realizar a separação das cargas positivas dos demais interferentes produzidos pelo plasma. O ICP-MS pode conter uma célula de colisão/reação para eliminação de interferências isobáricos utilizando normalmente um gás inerte usado como gás de colisão, como o hélio. O feixe de íons ao chegar no compartimento contendo o quadrupolo, são filtrados mediante a razão massa/carga do analito de interesse, empregando-se combinações de uma corrente direta em um par de polos e uma corrente alternada de radiofrequência no par de polos oposto, deste modo apenas um íon de massa específica passa pelo quadrupolo, enquanto as demais massas são desviadas na trajetória do feixe de íons. Para a detecção do analito de interesse na maioria dos instrumentos de ICP-MS é utilizado um eletromultiplicador.

3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) é um método físico-químico utilizado para a separação de moléculas em uma determinada mistura, com base em diferentes interações entre a fase móvel e a fase estacionária. No caso da ocratoxina A, são utilizadas a fase móvel e a coluna cromatográfica específicas para essa análise.

A fase móvel consiste em uma mistura de solventes orgânicos, como metanol, acetonitrila, ácido acético e água, que são combinados em diferentes proporções. Essa mistura é responsável por transportar a ocratoxina A através da coluna cromatográfica durante a análise.

A coluna cromatográfica utilizada para a ocratoxina A é composta por um material sólido, geralmente sílica, preenchido no interior da coluna. O analito de interesse, que foi previamente extraído da amostra, é injetado na coluna sob alta pressão pela fase móvel. Durante o processo, a ocratoxina A interage de maneira diferente com a fase estacionária e outros componentes da mistura presentes na coluna. Essas interações resultam na liberação dos componentes em momentos distintos, formando picos cromatográficos para cada um deles, incluindo a ocratoxina A.

Além da fase móvel e da coluna cromatográfica, os componentes adicionais de um equipamento HPLC (Figura 10) incluem reservatórios para os solventes da fase móvel, degaseificador para remover bolhas da fase móvel, bombas de alta pressão para circulação da fase móvel, válvula solenoide para seleção e mistura dos solventes, válvula manual de purga para direcionar a fase móvel para descarte ou para a coluna cromatográfica, injetor de amostras (automático ou manual), coluna de guarda para proteção da coluna cromatográfica contra componentes prejudiciais presentes na amostra, detector como espectrofotômetros (UV-VIS), fluorescência, entre outros, frasco de descarte para coletar a fase móvel com os analitos, e um computador com software para controlar os componentes do equipamento. Esses componentes em conjunto permitem a separação e a detecção precisa da ocratoxina A utilizando a técnica de HPLC. (Shoykhet, Broeckhoven & Dong, 2019).

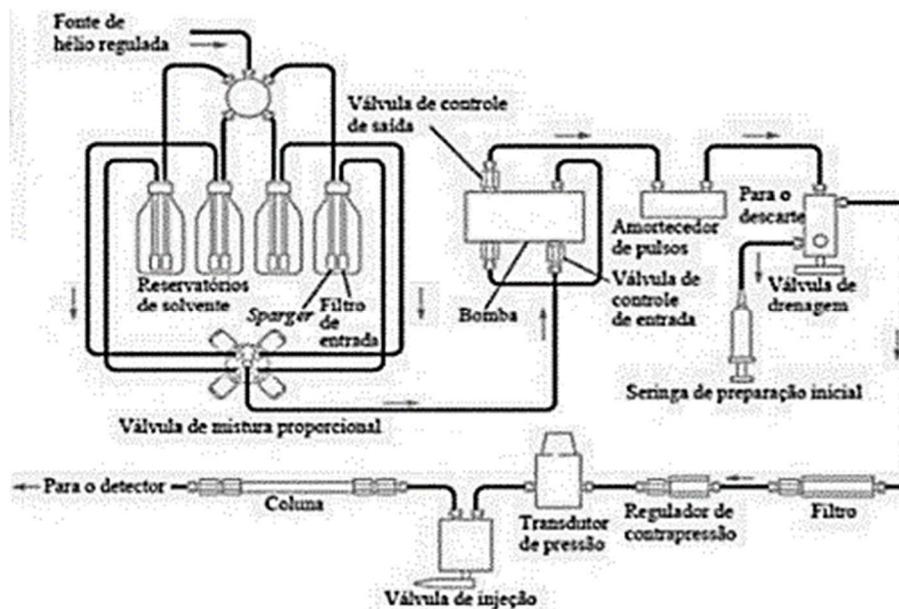


Figura 10. Representação esquemática do equipamento de HPLC

Fonte: Skoog, 2002

4. REFERÊNCIAS

- ABBAS, G.; MURTAZA, B.; BIBI, I.; SHAHID, M.; NIAZI, N. K.; KHAN, M. I.; AMJAD, M.; HUSSAIN, M.; NATASHA. Arsenic Uptake, Toxicity, Detoxification, and Speciation in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Aspects. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 15(1), 59, 2018.
- ABBB. Associação Bean to bar Brasil. 2018. Disponível em: <http://www.beantobarbrasil.com.br/>. Acesso em: 14 maio 2020.
- ABICAB. Associação Brasileira da Indústria de Chocolates, Amendoim e Balas. **Chocolates: produção, consumo aparente, exportação e importação**. 2019. Disponível em: <http://clientes.focoimg.com.br/abicab/storage/app/public/editor/165599190662b46e626dfdd.pdf>. Acesso em: 18 out. 2022.
- ADEYEYE, S. O.; ASHAOLU, T. J.; IDOWU-ADEBAYO, F. Mycotoxins: food safety, consumer health and africa's food security. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 1-17, 2021.
- AFOAKWA, E. O. **Chocolate Science and Technology**. 2 ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2016.
- AIPC. Associação Nacional das Indústrias Processadoras de Cacau. 2022. **Estatísticas**. Disponível em: <http://www.aipc.com.br/>. Acesso em: 18 out. 2022.

- ALAGIĆ, N.; HUREMOVIC, J. Determination of metal contents in various chocolate samples. **Glas. Hem. Technol. Bosne Herceg**, 45, 39–42, 2015.
- ALAM, T.; ANCO, D. J.; RUSTGI, S. Management of aflatoxins in peanut. **Clemson (SC): Clemson Cooperative Extension, Land-Grant Press by Clemson Extension**, 2020.
- ALIRZAYEVA, E.; NEUMANN, G.; HORST, W.; ALLAHVERDIYEVA, Y.; SPECHT, A.; ALIZADE, V. Multiple mechanisms of heavy metal tolerance are differentially expressed in ecotypes of *Artemisia fragrans*. **Environ Pollut**, 220, 1024-1035, 2017
- AMADO, R. J. **Como se baseia a classificação?** 2019. Disponível em: https://pctsb.org/cic/wp-content/uploads/2019/11/Nota_tecnica_1_Como_e_feita_a_classificacao_no_CIC.pdf. Acesso em: 6 mar. 2021.
- AMAMOU, F.; NEMMICHE, S.; MEZIANE, R. K.; DIDI, A.; YAZIT, S. M.; CHABANE-SARI, D. Protective effect of olive oil and colocynth oil against cadmium-induced oxidative stress in the liver of Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, 78, 177–184, 2015.
- AMAYA, L. Y. C.; PABÓN, L. C. O. Chocolate: más que un dulce Chocolate: more than sweet. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil Convicções**, 4(7), 117–127, 2017.
- ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; ŠTAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. **Journal of AOAC International**, 86(2), 412–431, 2003.
- ATSDR. Agency for Toxic Substance and Disease Registry. **Substance Priority List**. 27 jan. 2020. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html>. Acesso em: 15 mar. 2021.
- ATSDR. Agency for Toxic Substance and Disease Registry. **Toxic Substances Portal**. 2021. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html>. Acesso em: 15 mar. 2021.
- AYERS, R. S.; WESTCOT, D. W. **Water quality for agriculture**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1985.
- BAILEY, B. A.; MEINHARDT, L. W. **Cacao Diseases**, 2016.

- BARBER, R. G.; GRENIER, Z. A.; BURKHEAD, J. L. C. Toxicity Is Not Just Oxidative Damage: Zinc Systems and Insight from Wilson Disease. **Biomedicines**, 9,(3), 316, 2021.
- BECKETT, S. T; FOWLER, M. S; ZIEGLER, G. R. **Beckett's Industrial Chocolate Manufacture and Use**. West Susse, UK: Wiley Blackwell, 2017.
- BEKELE, F. L.; BIDAISEE, G. G.; SINGH, H.; SARAVANAKUMAR, D. Morphological characterisation and evaluation of cacao (*Theobroma cacao* L.) in Trinidad to facilitate utilisation of Trinitario cacao globally. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 67(3), 621–643, 2020.
- BRAGA, I. M. R. M. Drumond. Das tendas dos mercadores têxteis portuguesas: inquisição e cultura material nos séculos XVII e XVIII. **Libros de la Corte. es**, 2017.
- BRASIL. Instrução Normativa - IN n 88. Diário Oficial da União. 26 mar. 2021.
- BRASIL. Portaria GM/MS n 888. Diário Oficial da União. 4 mai. 2021.
- BRASIL. Resolução CONAMA n 357. Diário Oficial da União. 17 mar. 2005.
- BRASIL. Resolução CONAMA n 420. Diário Oficial da União. 28 dez. 2009.
- BRAVO, D.; LEON-MORENO, C.; MARTÍNEZ, C. A.; VARÓN-RAMÍREZ, V. M.; ARAUJO-CARRILLO, G. A.; VARGAS, R.; QUIROGA-MATEUS, R.; ZAMORA, A.; RODRÍGUEZ, E. A. G. The First National Survey of Cadmium in Cacao Farm Soil in Colombia. **Agronomy**, 11(4), 761, 2021.
- BOOS, C. B.; FREDEEN, K. J. **Concepts, Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry**. PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, 3rd ed., 1-120, 2004.
- BUTACIU, S.; FRENTIU, T.; SENILA, M.; DARVASI, E.; CADAR, S.; PONTA, M.; PETREUS, D.; ETZ, R.; FRENTIU, M. Determination of Cd in food using an electrothermal vaporization capacitively coupled plasma microtorch optical emission microspectrometer: Compliance with European legislation and comparison with graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Food Control**, 61, 227–234, 2016.
- CAC - Codex Alimentarius Commission. Joint FAO/WHO food standards programme codex committee on contaminants in foods. 11 Session. Rio de Janeiro, Brazil, 03-07 Abril. 2017.
- CAC - Codex Alimentarius Commission. Joint FAO/WHO food standards programme codex committee on contaminants in foods. 15 session. Virtual, 9-13 and 24 May. 2022

- CAMPONE, L.; PICCINELLI, A. L.; CELANO, R.; PAGANO, I.; RUSSO, M.; RASTRELLI, L. Rapid and automated on-line solid phase extraction HPLC–MS/MS with peak focusing for the determination of ochratoxin A in wine samples. **Food Chemistry**, 244, 128–135, 2018.
- CARVALHO, J. I. C.; SOARES NETO, H. F.; PINHEIRO, L. I. F. Da Vassoura de Bruxa à Fazenda de Chocolate: a Reconversão Produtiva no Sul da Bahia. **Desenvolvimento em Questão**, 18(53), 245–265, 2020.
- CBI-EU – Centre for the Promotion of Imports -European Union. **What is the demand for coca on the European market?** 2020. Disponível em: <https://www.cbi.eu/market-information/cocoa/trade-statistics#:~:text=The%20world's%20average%20chocolate%20consumption,of%2011%20kilogrammes%20in%202018>. Acesso em: 03 de mai de 2020
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Health Effects of Lead Exposure.** 2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/nceh/lead/prevention/health-effects.htm>. Acesso em: 28 mar. 2021.
- CHAVEZ, E.; HE, Z.L.; STOFFELLA, P.J.; MYLAVARAPU, R.S.; LI, Y.C.; MOYANO, B.; BALIGAR, V.C. Concentration of cadmium in cacao beans and its relationship with soil cadmium in southern Ecuador. **Science of The Total Environment**, 533, 205–214, 2015.
- COCOTOWN. Melanger Pro. Disponível em: <https://www.cocoatown.com/melanger-pro>. Acesso em: 05 mai. 2023.
- COPETTI, M. V.; PEREIRA, J. L.; IAMANAKA, B. T.; PITT, J. I.; TANIWAKI, M. H. Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in cocoa during farm processing. **International Journal of Food Microbiology**, 143(1–2), 67–70, 2010.
- CUBERO-LEON, E.; BOUTEN, K.; SENYUVA, H.; STROKA, J.; ADAM, M.; BAKALOVA, D.; BONI, M; CAPANNESI, C; CETINKAYA, A.; CHESSA, G.; DE SANTIS, B.; DIMITRIESKA-STOJKOVIC, E.; EVCIMEN, M.; FERRO, M.; GAMBIN, D.; GEORGESCU, M.; GRIFFIN, J.; KAYMAK, T.; TOOME, M. Determination of Ochratoxin A in Black and White Pepper, Nutmeg, Spice Mix, Cocoa, and Drinking Chocolate by High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Fluorescence Detection: Collaborative Study. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, 100(5), 1458–1468, 2017.
- SILVA, J. M. B.; BARRIO, R. J.; MOREIRA, J. C. Arsênico - saúde: uma relação que exige vigilância. **Vigilância Sanitária em Debate**, 2(1), 130-84, 2014.

- DAOU, R.; JOUBRANE, K.; MAROUN, R. G.; KHABBAZ, L.; ISMAIL, A.; EL KHOURY, A. Mycotoxins: factors influencing production and control strategies. **AIMS Agriculture and Food**, 6(1), 416-447, 2021.
- DE VUYST, L.; LEROY, F. Functional role of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa fermentation processes. **FEMS Microbiology Reviews**, 44(4), 432–453, 2020.
- DIAMOND CUSTOM MACHINES. Chocolate Refiner - Melanger. Disponível em: <https://diamondcustommachines.com/chocolate-refiner-melanger/>. Acesso em: 05 mai. 2023.
- DURAN, A.; TUZEN, M.; SOYLAK, M. Trace metal contents in chewing gums and candies marketed in Turkey. **Environmental Monitoring and Assessment**, 149(1–4), 283–289, 2009.
- DZELAGHA, B. F.; NGWA, N. M.; NDE BUP, D. A Review of Cocoa Drying Technologies and the Effect on Bean Quality Parameters. **International Journal of Food Science**, 2020, 1–11, 2020.
- EFSA. Scientific Opinion on safety and efficacy of cobalt compounds (E3) as feed additives for all animal species: Cobaltous acetate tetrahydrate, basic cobaltous carbonate monohydrate and cobaltous sulphate heptahydrate, based on a dossier submitted by TREAC EEIG. **EFSA Journal**, 10(7), 2791, 2012.
- EFSA. Scientific opinion on the tolerable upper intake level for selenium. **EFSA Journal**, 21(1), 7704, 2023.
- EPA. United States Environmental Protection Agency. **Supplemental guidance for developing soil screening levels for superfund sites**. 2002. Disponível em: <https://www.epa.gov/superfund>. Acesso em: 7 jul. 2020.
- EU. European Union. Commission Regulation (EU) No 488/2014. **Official Journal of the European Union**, 138 (75), 2014.
- EU. European Union. Regulation (EU) 2019/1009 of the European Parliament and of the Council. **Official Journal of the European Union**, ed. 170(1), 2019.
- FBM. MELANGEURS. Disponível em: <https://www.fbmbakerymachines.com/melangeurs>. Acesso em: 05 mai. 2023.
- FINNEGAN, P. M.; CHEN, W. Arsenic Toxicity: The Effects on Plant Metabolism. **Frontiers in Physiology**, 3, 2012.

- GENCHI, G.; SINICROPI, M. S.; LAURIA, G.; CAROCCI, A.; CATALANO, A. The Effects of Cadmium Toxicity. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 17(11), 3782, 2020.
- GERVASIO, A. P. G.; LAVORANTE, A. F.; MORAES, M. C. B.; GINE, M. F.; MIRANDA, C. E.; CARRILHO, E. Eletroforese capilar acoplada à espectrometria com plasma: uma ferramenta eficiente para a especiação. **Química Nova**, 26, 65-74, 2003.
- GILLER, M. **Bean-to-bar chocolate: America's craft chocolate revolution: the origins, the makers, and the mind-blowing flavors**. North Adams, MA: Storey Publishing, 2017.
- GONZÁLEZ-MONTANA, J.; ESCALERA-VALENTE, F.; ALONSO, A. J.; LOMILOS, J. M.; ROBLES, R.; ALONSO, M. E. Relationship between Vitamin B12 and Cobalt Metabolism in Domestic Ruminant: An Update. **Animals (Basel)**, 10(10), 1855, 2020.
- GRAMLICH, A.; TANDY, S.; GAUGGEL, C.; LÓPEZ, M.; PERLA, D.; GONZALEZ, V.; SCHULIN, R. Soil cadmium uptake by cocoa in Honduras. **Science of The Total Environment**, 612, 370–378, 2018.
- GUPTA, D. K.; CHATTERJEE, S.; WALTHER, C (Ed.). **Lead in Plants and the Environment**. Springer International Publishing, 2020.
- HACKBART, H. C. S.; PRIETTO, L.; PRIMEL, E. G.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Simultaneous extraction and detection of ochratoxin A and citrinin in rice. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 23(1), 103–109, 2012.
- HAIDER, F. U.; LIQUN, C.; COULTER, J. A.; CHEEMA, S. A.; WU, J.; ZHANG, R.; WENJUN, M.; FAROOQ, M. Cadmium toxicity in plants: Impacts and remediation strategies. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 211, 111887, 2021.
- HAQUE, M. A.; WANG, Y.; SHEN, Z.; LI, X.; SALEEMI, M. K.; HE, C. Mycotoxin contamination and control strategy in human, domestic animal and poultry: A review. **Microbial pathogenesis**, 142, 104095, 2020.
- HARTEL, R. W.; VON ELBE, J. H.; HOFBERGER, R. Chocolate. **Confectionery Science and Technology**. Cham, Switzerland: Springer, 2018.
- HOELTZ, M.; MONEZZI, L. P.; MANFROI, V.; NOLL, I. B.; DOTTORI, H. A. Ocratoxina A: análise da qualidade de vinhos brasileiros e importados. **Brazilian Journal of Food Technology**, 15(spe), 58–63, 2012.
- IAMANAKA, B. T.; OLIVEIRA, I. S.; TANIWAKI, M. H. Micotoxinas em alimentos. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, 7, 138–161, 2010.

- IARC **List of Classifications, Agents Classified by the IARC Monographs**. Lyon, France, 2017
- IARC Working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Arsenic, metals, fibres, and dusts. **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**, 100(PT C), 11, 2012
- IARC lead compounds: lead and inorganic lead compounds (Group 2B) and organolead compounds (Group 3) **IARC Monogr Eval Carcinog Risk Hum Suppl**, 7, 230-232, 1987.
- IARC **Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans, inorganic and organic lead compounds**, 87. Lyon , France. 2006.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA**. 2022. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil>. Acesso em: 18 out. 2022.
- ICCO - International Cocoa Organization - **Production of cocoa beans**. 2022. Disponível em: [Production_QBCS-XLVIII-No.-3.pdf](#) (icco.org). Acesso em: 18 out. 2022.
- INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. DOQ-CGCRE-008 - **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. 2018. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf. Acesso em: 22 dez. 2020.
- JAIMEZ, R. E.; BARRAGAN, L.; FERNANDEZ-NINO, M.; WESSJOHANN, L. A.; CEDENO-GARCIA, G.; CANTOS, I. S.; ARTEAGA, F. *Theobroma cacao* L. cultivar CCN 51: a comprehensive review on origin, genetics, sensory properties, production dynamics, and physiological aspects. **PeerJ**, 10, e12676, 2022.
- JOHNSON, E. S.; BEKELE, F. L.; BROWN, S. J.; SONG, Q.; ZHANG, D.; MEINHARDT, L. W.; SCHNELL, R. J. Population Structure and Genetic Diversity of the Trinitario Cacao (*Theobroma cacao* L.) from Trinidad and Tobago. **Crop Science**, 49(2), 564–572, 2009.
- JOSUÉ, D.; FTATSI, M.; BIENVENU, K.; BONAVENTURE, D. Design and development of cocoa pod breaking and beans extraction machine. *International Journal of Engineering & Technology Sciences*, 8(3), 357-366, 2019.
- KABAK, B. Aflatoxins and ochratoxin A in chocolate products in Turkey. **Food Additives & Contaminants: Part B**, 12(4), 225–230, 2019.

- KAMELÉ, K. Y.; MARTIAL-DIDIER, A. K.; DAOUDA, N.; CAROLE, A.; KABLAN, T. Improvement of the quality of the cocoa during postharvest process in Côte d'Ivoire. **J. Glob. Biosci**, 8, 6404-6423, 2019.
- KARAGAS, M. R.; WANG, A.; DORMAN, D. C.; HALL, A. L.; PI, J.; SERGI, C. M. et al. Carcinogenicity of cobalt, antimony compounds, and weapon-grade tungsten alloy. **The Lancet Oncology**, 23(5), 577-578, 2022.
- KEDJEBO, K. B. D.; GUEHI, T. S.; KOUAKOU, B.; DURAND, N.; AGUILAR, P.; FONTANA, A.; MONTET, D. Effect of post-harvest treatments on the occurrence of ochratoxin A in raw cocoa beans. **Food Additives & Contaminants: Part A**, 33(1), 157-166, 2016.
- KHAN, A. H. A.; KIYANI, A.; MIRZA, C. R.; BUTT, T. A.; BARROS, R.; ALI, B.; YOUSAF, S. Ornamental plants for the phytoremediation of heavy metals: Present Knowledge and future perspectives. **Environmental Research**, 110780, 2021.
- KLAASSEN, C. D.; WATKINS III, J. B. **Fundamentos em toxicologia de Cassaret e Doull**. 2. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.
- KOLAWOLE, O. O.; SALAWU, A. R.; OKUNADE, A. F.; AROYEUN, S. O. Ochratoxin A: A Persistent Menace in Nigerian Stored Cocoa Beans. **Current Journal of Applied Science and Technology**, 86–92, 2020.
- KOVACHEVA-NINOVA, V. K.; SAVOV, G. M.; VASSILEVA, V.; VUTOVA, K.; PETROV, E.; PETROV, D. Trends in the development of cobalt production. **Електротехника и електроника**, 53(3-4), 84-94, 2018.
- KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. **Métodos de preparo de amostra para análise elementar**. 2a ed. EDIT SBQ, São Paulo, 2019.
- KRUSZEWSKI, B.; OBIEDZIŃSKI, M. W.; KOWALSKA, J. Nickel, cadmium and lead levels in raw cocoa and processed chocolate mass materials from three different manufacturers. **Journal of Food Composition and Analysis**, 66, 127–135, 2018.
- KUMAR, V.; PANDITA, S.; SINGH SIDHU, G. P.; SHARMA, A.; KHANNA, K.; KAUR, P.; BALI, A. S.; SETIA, R. Copper bioavailability, uptake, toxicity and tolerance in plants: A comprehensive review. **Chemosphere**, 262, 127810, 2021.
- LACHENAUD, P.; MOTAMAYOR, J. C. The Criollo cacao tree (*Theobroma cacao L.*): a review. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 64(8), 1807–1820, 2017.
- LANDAU, E. C.; SILVA, G. A.; MOURA, L. Evolução da produção de cacau (*Theobroma cacao Malvaceae*). **Embrapa Milho e Sorgo-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2020.

- LATIMER, G. W. **Official methods of analysis of AOAC International**. 19. ed. Gaithersburg, MD, USA: AOAC International: AOAC International, 2012.
- LEITE, J. B. V.; FONSECA, E. V.; SODRÉ, G. A.; M. VALLE, R. R.; NASCIMENTO, M. N.; MARROCOS, P. C. L. Comportamento produtivo de cacau no semiárido do Brasil. **Agrotrópica (Itabuna)**, 24(2), 85–90, 2012.
- LEITE, M.; FREITAS, A.; SILVA, A. S.; BARBOSA, J.; RAMOS, F. Maize (*Zea mays* L.) and mycotoxins: A review on optimization and validation of analytical methods by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Trends in Food Science & Technology**, 99, 542–565, 2020.
- LO DICO, G. M.; GALVANO, F.; DUGO, G.; D'ASCENZI, C.; MACALUSO, A.; VELLA, A.; GIANGROSSO, G.; CAMMILLERI, G.; FERRANTELLI, V. Toxic metal levels in cocoa powder and chocolate by ICP-MS method after microwave-assisted digestion. **Food Chemistry**, 245, 1163–1168, 2018.
- MACHADO, G. B. Agricultura produtivista à agricultura multifuncional no sistema agrário do cacau. **Brazilian Journal of Development**, 5(9), 13868–13890, 2019.
- MAPA. Cacau do Brasil. 2019. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/brasil-quer-retomar-protagonismo-no-cenario-global-de-cacau-e-chocolate>. Acesso em: 26 jan. 2021.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento. **Cartilha de boas práticas da cultura do cacau no estado do Pará**. Belém: Mapa/CEPLAC, 2020.
- MARKETLINE. Global Chocolate Confectionery. 2015. **Marketline**. Disponível em: <https://store.marketline.com/report/ohme5568--global-chocolate-confectionery>. Acesso em: 10 jan. 2021.
- MARSCHNER, P. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3rd ed. London; Waltham, MA: Elsevier/Academic Press, 2012.
- MARTINS, C. A. S.; NOGUEIRA, N.; RIBEIRO, P.; RIGO, M.; CANDIDO, A. A dinâmica de metais-traço no solo. **Revista Brasileira de Agrociência**, 17, 383, 2011a.
- MATOVIĆ, V.; BUHA, A.; ĐUKIĆ-ĆOSIĆ, D.; BULAT, Z. Insight into the oxidative stress induced by lead and/or cadmium in blood, liver and kidneys. **Food and Chemical Toxicology**, 78, 130–140, 2015.
- MDIC - Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços. Estudo de Competitividade do Cacau e Chocolate no Brasil: Desafios na Produção e Comércio Global. 2018. Disponível em:

- http://www.unesco.org/new/fileadmin/MULTIMEDIA/FIELD/Brasilia/pdf/brz_sc_cadau_chocolate_MICS_por_2018.pdf. Acesso em: 18 maio 2020.
- MDIC - Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços. **Principais aspectos das estatísticas de comércio exterior**. 2022. Disponível em: <http://comexstat.mdic.gov.br/pt/comex-vis>. Acesso em: 18 de out. 2022
- MEENA, M. K.; SINGH, A. K.; PRASAD, L. K.; ISLAM, A.; MEENA, M. D.; DOTANIYA, M. L.; SINGH, H.; YADAV, B. L. Impact of arsenic-polluted groundwater on soil and produce quality: a food chain study. **Environmental Monitoring and Assessment**, 192(12), 785, 2020.
- MISAILIDIS, N.; PETRIDES, D. **Cocoa Processing – Cost Analysis and Optimization using SuperPro Designer**. [S. l.: s. n.], 2020. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/342338873_Cocoa_Processing_-_Cost_Analysis_and_Optimization_using_SuperPro_Designer. Acesso em: 20 de abril de 2021
- MISHRA, R. K.; CATANANTE, G.; HAYAT, A.; MARTY, J. Evaluation of extraction methods for ochratoxin A detection in cocoa beans employing HPLC. **Food Additives & Contaminants: Part A**, 33(3), 500–508, 2016.
- MODA, L. R.; BOTEON, M.; RIBEIRO, R. G. Cenário econômico do mercado de cacau e chocolate: oportunidades para a cacauicultura brasileira. **Brazilian Journal of Development**, 5(10), 21203–21225, 2019.
- MOHOS, F. Á. **Confectionery and Chocolate Engineering - Principles Applications**, 2 ed. revised. London, John Wiley & Sons, 2017. 792 p.
- MOUNICOU, S.; SZPUNAR, J.; ANDREY, D.; BLAKE, C.; LOBINSKI, R. Concentrations and bioavailability of cadmium and lead in cocoa powder and related products. **Food Additives and Contaminants**, 20(4), 343–352, 2003.
- OLIVEIRA, A. P. F.; MILANI, R. F.; EFRAIM, P.; MORGANO, M. A.; TFOUNI, S. A. V. Cd and Pb in cocoa beans: Occurrence and effects of chocolate processing. **Food Control**, 119, 107455, 2021.
- PALMA-LARA, I.; MARTÍNEZ-CASTILLO, M.; QUINTANA-PÉREZ, J. C.; ARELLANO-MENDOZA, M. G.; TAMAY-CACH, F.; VALENZUELA-LIMÓN, O.L.; GARCÍA-MONTALVO, E. A.; HERNÁNDEZ-ZAVALA, A. Arsenic exposure: A public health problem leading to several cancers. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 110, 104539, 2020.

- PANGHAL, A.; SATHUA, K. B.; FLORA, S. J. S. Gallic acid and MiADMSA reversed arsenic induced oxidative/nitrosative damage in rat red blood cells. **Heliyon**, 6(2), e03431, 2020.
- PELES, F.; SIPOS, P.; KOVÁCS, S.; GYORI, Z.; PÓCSI, I.; PUSZTAHELYI, T. Biological Control and Mitigation of Aflatoxin Contamination in Commodities. **Toxins**, 13(2), 104, 2021.
- PERSULESSY, A. E. Preparation of in - house cocoa flour RMs and Determination of its Cd content by using Gfaas. **Journal Kimia Terapan Indonesia (Indonesian Journal of Applied Chemistry)**, 11(9), 2009.
- PETERSEN, A. B. Expert advice on appropriate criteria and limits for contaminants in Ready to Use Therapeutic Foods (RUTF). **United Nations International Children's Emergency Fund & World Food Programme, (November)**, 1-34, 2018.
- PIRES, P. N.; VARGAS, E. A.; GOMES, M. B.; VIEIRA, C. B. M.; SANTOS, E. A.; BICALHO, A. A. C.; SILVA, S. C.; REZENDE, R. P.; OLIVEIRA, I. S.; LUZ, E. M. S. N.; TROVATTI UETANABARO, A. P. Aflatoxins and ochratoxin A: occurrence and contamination levels in cocoa beans from Brazil. **Food Additives & Contaminants: Part A**, 36(5), 815–824, 2019.
- PIROUZIAN, H. R.; KONAR, N.; PALABIYIK, I.; OBA, S.; TOKER, O. S. Pre-crystallization process in chocolate: Mechanism, importance and novel aspects. **Food Chemistry**, 321, 126718, 2020.
- PITTET, A.; TORNARE, D.; HUGGETT, A.; VIANI, R. Liquid Chromatographic Determination of Ochratoxin A in Pure and Adulterated Soluble Coffee Using an Immunoaffinity Column Cleanup Procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 44(11), 3564–3569, 1996.
- PODGORSKI, J.; BERG, M. Global threat of arsenic in groundwater. **Science**, 368(6493), 845–850, 2020.
- PREMIER. Chocolate Refiner. Disponível em: <https://www.premierchocolates.com/chocolate-refiner>. Acesso em: 05 mai. 2023.
- PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, 32,(6), 1620–1634, 2009.

- RAMTAHAL, G.; YEN, I. C.; BEKELE, I.; BEKELE, F.; WILSON, L.; MAHARAJ, K.; HARRYNANAN, L. Relationships between Cadmium in Tissues of Cacao Trees and Soils in Plantations of Trinidad and Tobago. **Food and Nutrition Sciences**, 7(1), 37–43, 2016.
- RANKIN, C. W.; NRIAGU, J. O.; AGGARWAL, J. K.; AROWOLO, T. A.; ADEBAYO, K.; FLEGAL, A. R. Lead Contamination in Cocoa and Cocoa Products: Isotopic Evidence of Global Contamination. **Environmental Health Perspectives**, 113(10), 1344–1348, 2005.
- REPIĆ, A.; BULAT, P.; ANTONIJEVIĆ, B.; ANTUNOVIĆ, M.; DŽUDOVIĆ, J.; BUHA, A.; BULAT, Z. The influence of smoking habits on cadmium and lead blood levels in the Serbian adult people. **Environmental Science and Pollution Research**, 27(1), 751–760, 2020.
- ROSENBLUM, M. **Chocolate: A bittersweet saga of dark and light**. Macmillan, 2006.
- ROYER, A.; SHARMAN, T. Copper Toxicity. **StatPearls** [Internet], 2020.
- SAMBUICHI, R. H. R. Estrutura e dinâmica do componente arbóreo em área de cabruca na região cacauceira do sul da Bahia, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, 20(4), 943–954, 2006.
- SCHREINER, L. J.; JOSHI, C. P.; DARKO, J.; KERR, A.; SALOMONS, G.; DHANESAR, S. The role of Cobalt-60 in modern radiation therapy: Dose delivery and image guidance. **Journal of medical physics/Association of Medical Physicists of India**, 34(3),133, 2009.
- SELMi. Micron. Disponível em: <https://www.selmi-group.it/en/micron/>. Acesso em: 05 mai. 2023.
- SENAR. Serviço Nacional de Aprendizagem Rural. **Cacau: produção, manejo e colheita**. Brasília: Senar, 2018. Disponível em: <https://www.cnabrazil.org.br/assets/arquivos/215-CACAU.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2021.
- SHARMA, P.; PANDEY, A. K.; UDAYAN, A.; KUMAR, S. Role of microbial community and metal-binding proteins in phytoremediation of heavy metals from industrial wastewater. **Bioresource Technology**, 124750, 2021
- SHOYKHET, K.; BROECKHOVEN, K.; DONG, M. W. Modern HPLC pumps: perspectives, principles, and practices. **LC GC North America**, 37(6), 374-384, 2019.

- SILVA, J. M. B.; BARRIO, R. J.; MOREIRA, J. C. Arsênico - saúde: uma relação que exige vigilância. **Vigilância Sanitária em Debate**, 2(1), 130-84, 2014.
- SKARKOVA, J.; OSTRY, V.; MALIR, F.; ROUBAL, T. Determination of Ochratoxin A in Food by High Performance Liquid Chromatography. **Analytical Letters**, 46(10), 1495–1504, 2013.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5ª Edição. Trad. Ignez Caracelli. Port Alegre: Bookman, 2002.
- SOUZA, P. A.; MOREIRA, L. F.; SARMENTO, D. H. A.; COSTA, F. B. Cacao—Theobroma cacao. **Exotic Fruits**. Academic Press, 69–76, 2018.
- SPECTRA. Spectra Melangers. Disponível em: <https://www.spectramelangers.com/>. Acesso em: 09 maio 2023.
- SRIVASTAVA, S. **Arsenic in Drinking Water and Food**. Singapore: Springer Singapore, 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-981-13-8587-2#about>. Acesso em 20 mai 2021.
- STROKA, J.; ANKLAM, E.; GILBERT, J. Immunoaffinity Column Cleanup with Liquid Chromatography Using Post-Column Bromination for Determination of Aflatoxins in Peanut Butter, Pistachio Paste, Fig Paste, and Paprika Powder: Collaborative Study. **Journal of AOAC international**, 83(2), 320–40, 2000.
- SULYOK, M.; STADLER, D.; STEINER, D. KRŠKA, R. Validation of an LC-MS/MS-based dilute-and-shoot approach for the quantification of > 500 mycotoxins and other secondary metabolites in food crops: challenges and solutions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 1-14, 2020
- TANIWAKI, M. H.; PITT, J. I.; COPETTI, M. V.; TEIXEIRA, A. A.; IAMANAKA, B. T. Understanding Mycotoxin Contamination Across the Food Chain in Brazil: Challenges and Opportunities. **Toxins**, 11(7), 411, 2019.
- TANIWAKI, M. H.; PITT, J. I.; MAGAN, N. Aspergillus species and mycotoxins: occurrence and importance in major food commodities. **Current Opinion in Food Science**, 23, 38–43, 2018.
- THOMAS, R. **Practical Guide to ICP-MS: A Tutorial For Beginners**. CRC Press. 3a Ed, 2013.
- THOMPSON, S. S.; MILLER, K. B.; LOPEZ, A. S.; CAMU, N. Cocoa and coffee. **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. 4. ed. Washington, DC: ASM press, 881–899, 2012.

- TOKER, O. S.; PALABIYIK, I.; KONAR, N. Chocolate quality and conching. **Trends in Food Science & Technology**, 91, 446–453, 2019.
- TÓTH, R. J.; CSAPÓ, J. The role of selenium in nutrition - A review. **Acta Univ. Sapientiae Aliment**, 11, 128-144, 2018.
- TURCOTTE, A.; SCOTT, P. M.; TAGUE, B. Analysis of cocoa products for ochratoxin A and aflatoxins. **Mycotoxin Research**, 29(3), 193–201, 2013.
- TWARUŻEK, M.; KOSICKI, R.; KWIATKOWSKA-GIŻYŃSKA, J.; GRAJEWSKI, J.; AŁTYN, I. Ochratoxin A and citrinin in green coffee and dietary supplements with green coffee extract. **Toxicon**, 188, 172–177, 2020.
- US-EPA. U.S. Environmental Protection Agency. IRIS assessments. 1989. Reports & Assessments. Disponível em: https://iris.epa.gov/ChemicalLanding/&substance_nmbr=278. Acesso em: 5 abr. 2021.
- US-EPA. U.S. Environmental Protection Agency. IRIS assessments. 1991. Reports & Assessments. Disponível em: https://iris.epa.gov/ChemicalLanding/&substance_nmbr=278. Acesso em: 5 abr. 2021.
- US-EPA. U.S. Environmental Protection Agency. IRIS assessments. 2004. Reports & Assessments. Disponível em: https://iris.epa.gov/ChemicalLanding/&substance_nmbr=278. Acesso em: 5 abr. 2021.
- VARGAS, E. A.; SANTOS, E. A.; PITTET, A.; CORRÊA, T. B. S.; ROCHA, A. P. P.; DIAZ, G. J.; GORNI, R.; KOCH, P.; LOMBAERT, G. A.; MACDONALD, S.; MALLMANN, C. A.; MEIER, P.; NAKAJIMA, M.; NEIL, R. J.; PATEL, S.; PETRACCO, M.; PRADO, G.; SABINO, M.; WEE, S. M. Determination of Ochratoxin A in Green Coffee by Immunoaffinity Column Cleanup and Liquid Chromatography: Collaborative Study. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, 88(3), 773–779, 2005.
- VENTURA-HOULE, R.; FONT, X.; HEYER, L. Groundwater arsenic contamination and their variations on episode of drought: Ter River delta in Catalonia, Spain. **Applied Water Science**, 8(5), 128, 2018.
- VICAM, Ochratest HPLC procedure for currants and raisins. **Ochratest TM Instruction Manual**. 1999. Disponível em: <https://www.vicam.com/products/ochratest-wb>. Acesso em: 19 out. 2020.
- VILLA, J. E. L.; PEIXOTO, R. R. A.; CADORE, S. Cadmium and Lead in Chocolates Commercialized in Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 62 (34), 8759–8763, 2014.

- WOOD, G. A. R.; LASS, R. A. **Cocoa**. 3 ed. John Wiley & Sons, 2008.
- WHO. World Health Organization. 51st Report of the Joint FAO/WHO. Expert Committee on Food Additives, WHO Technical [28] B. Hokin, M. Adams, J. Ashton, H. Louir, Analysis of cobalt content in Australian foods. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 2004;13:284–288. Report Series. N0. 891. 2000.
- XU, H.; WANG, L.; SUN, J.; WANG, L.; GUO, H.; YE, Y.; SUN, X. Microbial detoxification of mycotoxins in food and feed. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 1-19, 2021
- YANUS, R. L.; SELA, H.; BOROJOVICH, E. J. C.; ZAKON, Y.; SAPHIER, M.; NIKOLSKI, A.; GUTFLAIS, E.; LORBER, A.; KARPAS, Z. Trace elements in cocoa solids and chocolate: An ICPMS study. **Talanta**, 119, 1–4, 2014.
- YAPO, K. D.; OUFFOUE, S. K.; N'GUESSAN, B. R.; OKPEKON, T. A.; DADE, J.; SAY, M.; KOUAKOU, T. H. Quality control by the determination of heavy metals in new variety of cocoa (*cocoa mercedes*) in Côte d'Ivoire. **J. Soc. Ouest-Afr. Chim**, 37, 56-64, 2014.

CAPÍTULO 2: CACAU E CHOCOLATES “*BEAN TO BAR*”: AVALIAÇÃO DE ELEMENTOS-TRAÇO EM AMOSTRAS COMERCIALIZADAS NO BRASIL

Vitor H. Burgon^a, Manuela L. Nunes Silva^a, Raquel F. Milani^a, Marcelo A. Morgano^a

^aInstituto de Tecnologia de Alimentos, ITAL, C.P. 139, CEP 13070-178, Campinas/SP, Brasil

(Este capítulo será traduzido e submetido a revista FOOD CONTROL)

Resumo

O consumo de chocolate “*Bean to Bar*” tem crescido devido a sua qualidade, sabor e aroma. Na sua preparação poucas etapas e ingredientes são utilizados, porém pode ocorrer a presença de contaminantes inorgânicos em amêndoas de cacau e em chocolates. O objetivo deste estudo foi avaliar o conteúdo de elementos-traço (As, Cd, Cu, Co, Pb, Se e Hg) em amêndoas de cacau e em chocolates “*Bean to Bar*” de diferentes origens do Brasil. As amostras foram mineralizadas usando digestão ácida assistida por micro-ondas e a quantificação dos elementos traço foi realizada usando ICP OES e ICP-MS. Foi avaliado o risco da exposição aos contaminantes inorgânicos pelo consumo de chocolates. O método foi validado, obtendo-se recuperações entre 84% e 105% e precisão entre 2% e 14%. O As e o Hg não foram detectados nas amostras estudadas. Os teores dos contaminantes nos chocolates “*Bean to Bar*” variaram entre: Cd (<LOD e 0,145), Cu (3,90 e 10,109); Co (<LOD e 0,47); Pb (<LOD e 0,02) e Se (<LOD e 0,088) mg kg⁻¹; enquanto que nas amêndoas de cacau variaram de: Cd (<LOD e 0,68), Cu (16,6 e 22,38) e Pb (<LOD e 0,04) mg kg⁻¹. O teor de Cd ultrapassou o limite máximo tolerado pela legislação brasileira em 6 amostras amêndoas de cacau e 1 de chocolates. O cálculo da estimativa de exposição ao Cd pelo consumo de chocolate “*Bean to Bar*” para crianças atingiu 94% da PTMI.

Palavras-chave: Chocolate “*Bean to Bar*”, amêndoas de cacau, contaminantes inorgânicos, ICP OES, ICP-MS.

1. Introdução

Tem crescido o interesse por chocolates artesanais e o chocolate tipo “*Bean to Bar*” é tido como uma tendência entre os consumidores de alimentos saudáveis, pelo fato de envolver poucos processos em sua fabricação, preservação da manteiga de cacau e apenas adição de açúcar orgânico, leite em pó e ou amêndoas, castanhas, frutas secas, amendoins e avelãs em sua composição. Além disso, as amêndoas de cacau utilizadas têm rastreabilidade, o que agrega um alto padrão de qualidade e evita problemas socioambientais, além de valorizar pequenos produtores de amêndoas de cacau. Chocolates “*Bean to Bar*” são produzidos a partir da amêndoa de cacau, moídas em temperatura elevada em moinho de pedra elétrico (*melanger*), obtendo-se o líquido de cacau (Giller, 2017; Gallo, Antolin-Lopez & Montiel, 2018). O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de cacau, entre 2019 e 2020 ocupou o sétimo lugar no ranking e sendo responsável por aproximadamente 3,5% da produção mundial (AIPC, 2022).

Apesar dos benefícios a saúde pelo consumo de chocolates (antioxidantes, flavonoides, minerais) alguns estudos reportaram a presença de contaminantes inorgânicos (CI), como arsênio (As), cádmio (Cd), cobalto (Co), cobre (Cu), mercúrio (Hg) e chumbo (Pb). De Oliveira *et al.* (2021) utilizaram a técnica de espectrometria ótica com plasma com acoplamento indutivo (ICP OES) e digestão ácida assistido por micro-ondas para estudar a presença de Cd e Pb em 90 amostras de amêndoas de cacau e encontraram níveis entre $<0,0015$ e $1,598 \text{ mg kg}^{-1}$ e $0,022$ e $2,528 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente. Villa *et al.* (2014) avaliaram Cd e Pb em chocolates (34% a 85% de cacau), utilizando a digestão ácida assistida por micro-ondas com quantificação por espectrometria de absorção atômica por forno de grafite (GF AAS) e encontraram teores entre $<1,7$ e $0,108$ e <21 e $0,138 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. No estudo de Peixoto *et al.* (2016) foi avaliada a composição de elementos traços em chocolate branco, ao leite e amargo, utilizando a técnica de ICP-MS e os autores observaram maiores níveis de arsênio, cobalto, cobre e selênio nos chocolates amargo. Yannus *et al.* (2014) constataram teores de As, Cd, Co e Pb em amêndoas de cacau ($0,016$; $0,072$; $0,292$; $0,040 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente) e em chocolates ($0,028$; $0,141$; $0,524$; $0,230 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente).

A exposição aos contaminantes inorgânicos pode ocasionar diversos danos à saúde, afetando diferentes órgãos, como cérebro, coração, rins e intestino. Em crianças os efeitos são ainda mais severos, sendo que alguns destes estão associados à distúrbios no cérebro, comportamental e pode levar ao desenvolvimento de doenças graves como câncer, cardiovasculares e respiratórios (Al Osman *et al.* 2019).

Considerando o exposto os objetivos deste trabalho foram validar e aplicar um método para determinação dos elementos traços arsênio (As), cádmio (Cd), cobalto (Co), cobre (Cu), mercúrio (Hg), chumbo (Pb) e selênio (Se) em amêndoas de cacau das principais regiões produtoras do Brasil e em chocolates “*Bean to Bar*” com diferentes percentuais de sólido de cacau, utilizando as técnicas de espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) e de espectrometria de emissão ótica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES).

2. Material e métodos

2.1 Amostras

As amostras de amêndoas de cacau foram coletadas entre os anos de 2020 e 2022, seguindo protocolos higiênicos e cada amostra foi transferida para sacos plásticos com identificação e armazenados sob refrigeração até o momento das análises. Foram adquiridas 23 amostras de amêndoas de cacau procedentes das principais regiões produtoras do Brasil: Bahia (Arataca, Ibirapitanga, Itabuna, Itajuípe e Porto Seguro), Pará (Novo Repartimento e Mocajuba), Amazônia (Borba, Manicoré e Nova Olinda) e Espírito Santo (Linhares). Um total de 65 amostras de chocolates “*Bean to Bar*” foram adquiridas de *e-commerce* do Brasil e 6 amostras de chocolates convencionais em mercado local da cidade de Campinas-SP para comparação dos resultados. As amostras de chocolates “*Bean to Bar*” foram elaboradas a partir de amêndoas de cacau procedentes das seguintes localidades: Amapá - AP (n=2), Amazonas - AM (n=9), Espírito Santo - ES (n=8), Bahia - BA (n=38), Rondônia - RO (n=1), Mata Atlântica (n=4) e Pará - PA (n=4). As amostras de chocolates foram classificadas conforme a quantidade do percentual de sólidos de cacau e adição de leite em pó no chocolate: 0% (branco), 30% a 50% (ao leite), 50% a 70% (meio amargo) e 70% a 100% (amargo).

2.2 Reagentes e equipamentos

Para os procedimentos analíticos foram utilizados reagentes de grau analítico ou superior: HNO₃ concentrado (65%) purificado por destilação *sub-boiling* (Berghof®, Eningen, Alemanha); peróxido de hidrogênio 30% (m/v) (Merck, Darmstadt, Alemanha) e água (18,2 MΩ cm) purificada em sistema de osmose reversa (Gehaka, São Paulo, Brasil). Materiais de referência certificados (CRM): *Dark Chocolate* (ERM BD512); *Lobster Hepatopancreas* (NRCC Tort-2 e Tort-3) e *Peach leaves* (NIST SRM 1547). Soluções padrões multielementar (100 mg/L) (As, Cd, Cu, Co, Cd e Pb); Se (100 mg/L) e Hg (100 mg/L), todas da Specsol (Quimlab, Jacareí, Brasil).

Os equipamentos utilizados durante as análises foram: balança analítica (Ohaus, New Jersey, EUA) e digestor por micro-ondas (Start D, Milestone, Sorisole, Itália). Para a determinação do teor de As, Cd, Cu e Pb em amêndoas de cacau foi utilizado o espectrômetro de emissão ótica com fonte de plasma com acoplamento indutivo (ICP OES), modelo 5100 VDV (Agilent Technology, Tóquio, Japão), com fonte de radiofrequência (RF) de 27 MHz e detector multielementar simultâneo de estado sólido do tipo CCD (*Charge Coupled Device*) disponível no laboratório de Inorgânicos do ITAL. As condições experimentais do equipamento de ICP OES foram: potência de radiofrequência de 1200 W; vazão de nebulização de 0,5 L min⁻¹; vazão auxiliar (Ar) de 1,0 L min⁻¹; vazão principal (Ar) de 12 L min⁻¹; correção de fundo de 2 pontos; tempo de integração e leitura de 10 s e 3 replicatas, visão axial, câmara de nebulização de duplo passo e nebulizador *seaspray*; argônio líquido com pureza de 99,996% (Air Liquid, SP, Brasil). Os comprimentos de onda das linhas analíticas foram: As (193,696 nm), Cd (214,439 nm), Cu (324,754 nm) e Pb (220,353 nm).

A quantificação dos elementos-traço As, Cd, Co, Cu, Hg, Pb e Se em chocolates foi feita utilizando um espectrômetro de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) (iCAP RQ, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha) nas seguintes condições: potência de radiofrequência (RF) de 1550 W, vazão de argônio (Ar) de 14,0 L/min, vazão de Ar auxiliar de 0,80 L/min, vazão de hélio (He) de 5,00 mL/min, aquisição por KED (*Kinetic Energy Discrimination*), vazão do nebulizador de 0,98 L/min, câmara de nebulização do tipo ciclônica com duplo

passo (2,8 °C), tempo de permanência de 0,2 s e 0,01 (PI). Os isótopos monitorados foram: ^{75}As , ^{59}Co , ^{63}Cu , ^{80}Se , ^{111}Cd , ^{202}Hg e ^{208}Pb . Como padrão interno (Pi) foi usada uma solução ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) contendo ^{72}Ge , ^{103}Rh , ^{45}Sc , ^{209}Bi e ^{195}Pt .

2.3 Controle Analítico

Os materiais de referência certificados *Dark Chocolate* (ERM BD512); *Lobster Hepatopancreas* (NRCC Tort-2 e Tort-3), *Peach leaves* (NIST SRM 1547) e amostras de amêndoas de cacau e chocolates foram utilizados para validar os métodos propostos para as figuras de mérito tendência/recuperação, precisão, linearidade, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) (AOAC, 2016; INMETRO, 2020).

A exatidão do método foi avaliada através do uso dos materiais de referência certificados; a precisão foi avaliada através do cálculo do coeficiente de variação de 7 repetições analíticas independentes de uma mesma amostra de amêndoa de cacau e de chocolate; e os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram determinados com base na concentração do analito. O limite de detecção foi calculado como o valor da média do branco mais três vezes o desvio padrão, enquanto o limite de quantificação foi calculado como o valor da média do branco mais cinco vezes o desvio padrão.

Para o estudo dos contaminantes em amostras de amêndoas de cacau, as curvas analíticas foram preparadas a partir de soluções-padrão certificadas de 100 mg L^{-1} para As, Cd, Cu e Pb, em solução de HCl 5% (v/v) nas seguintes faixas de concentração: As $0,005$ a $1,00 \text{ mg L}^{-1}$, Cd $0,001$ a $1,00 \text{ mg L}^{-1}$, Cu $0,001$ a $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ e Pb $0,0025$ a $1,00 \text{ mg L}^{-1}$. Para as amostras de chocolates as curvas analíticas contendo As, Cd, Cu, Co, Pb, Se e Hg foram construídas a partir de soluções padrões certificados de 100 mg L^{-1} por diluição, na faixa de $0,0001$ a $0,1 \text{ mg L}^{-1}$.

2.4 Procedimento analítico para o preparo das amostras de chocolates e amêndoas de cacau

Previamente as amostras de amêndoas de cacau foram trituradas em moinho (Ika, Staufen, Alemanha) e as amostras de chocolate foram “raladas”. Em seguida, foram submetidas a uma digestão ácida em sistema fechado assistido por micro-ondas (Start D, Milestone Sorisole, Itália), conforme descrito por Mohamed

et al. (2020) e De Oliveira *et al.* (2020): foram pesados em vaso de digestão de PTFE 0,5 g das amostras, adicionados 6 mL de HNO₃ e mantido em contato por uma noite. No dia posterior, adicionaram-se 2 mL de H₂O₂ 30% (m/v) e as amostras foram digeridas aplicando-se 1000 W de potência usando a seguinte programação de tempo e temperatura: temperatura ambiente até 70 °C por 5 min; 70 °C por 2 min, aumento de 70°C até 120 °C por 3 min; 120 °C por 2 min, aumento de 120 °C a 170 °C por 10 min e manutenção por 15 min. O digerido foi resfriado à temperatura ambiente, os vasos foram abertos e o conteúdo transferido quantitativamente para tubos graduados, avolumando-se para 20 mL com água deionizada.

2.5 Cálculo da estimativa de ingestão dos contaminantes e avaliação da exposição pelo consumo de chocolates “*Bean to Bar*”

A estimativa de ingestão foi calculada para os elementos que foram quantificados nas amostras de chocolate e foram considerados os maiores teores de Cd, Cu e Pb obtidos. Foram considerados, também, a ingestão diária de 15,75g de chocolate (5,75 kg ano per capita); peso corpóreo (p.c.) de 60 kg para adultos e 15 kg para crianças (FAO/WHO, 2013; MDCl, 2018). Os cálculos da estimativa de exposição da população brasileira aos contaminantes estudados foi feito conforme a equação 1 (ATSDR, 2022).

$$Exposição (mg/kg p.c.) = \frac{Concentração \times Consumo}{Peso corpóreo} \quad (\text{Equação 1})$$

onde: concentração = maior nível encontrado do contaminante nas amostras de chocolates analisadas (em mg kg⁻¹); consumo = quantidade ingerida do alimento no período, em gramas.

Para avaliar o risco associado à exposição aos elementos inorgânicos através do consumo de chocolate “*Bean to Bar*”, os valores estimados de ingestão foram comparados aos valores disponíveis de PTMTDI (*Provisional Maximum Tolerable Daily Intake*) para Cu de 0,5 mg kg⁻¹ pc dia (WHO, 1982), de PTMI (*Provisional Tolerable Monthly Intake*) de 25 µg kg⁻¹ pc para cádmio (WHO, 2013), de UL (*Tolerable upper intake level*) para Co de 0,0016 mg kg⁻¹ pc (EFSA, 2012) e para Se de 255 µg (adultos) e 130 µg (crianças de 7-10 anos) por dia (EFSA, 2023)

e BMDL_{0,1} (*Benchmark Dose Lower Limit*) de 1,5 µg kg⁻¹ pc para adultos e 0,5 µg kg⁻¹ pc por dia para crianças para chumbo (EFSA, 2013).

3. Resultados e discussões

3.1 Validação do método analítico para determinação de elementos traço em amêndoas de cacau e chocolates

O método foi validado para as figuras de mérito tendência/recuperação, limite de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) e precisão para amêndoas de cacau e chocolates do tipo “*Bean to Bar*” e chocolates convencionais seguindo o guia do INMETRO (2020) e AOAC (2016) estão representados na Tabela 1.

A tendência/recuperação dos métodos utilizados para determinação dos elementos traço por ICP OES e ICP-MS nas amostras de amêndoas de cacau e chocolate foi verificada utilizando diferentes materiais de referência certificado (MRC) (amêndoas - *Lobster Hepatopancreas* (NRCC Tort 2); chocolates - *Dark Chocolate* (ERM BD512), *Peach leaves* (NIST SRM 1547) e *Lobster Hepatopancreas* (NRCC Tort-3)) em razão dos valores certificados disponíveis para os elementos em cada MRC. Para os elementos-traços estudados, os valores de recuperação obtidos variaram entre 88% e 98% no método para amêndoas de cacau (As, Cd, Cu e Pb) e 84% e 105% no método para chocolates (As, Cd, Cu, Pb, Co, Hg e Se).

A linearidade das curvas analíticas foi avaliada através do coeficiente de correlação sendo obtidos valores de $r \geq 0,999$. Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) para os elementos-traço estão apresentados na Tabela 1 e foram calculados como: LOD (3s) e LOQ (10s) para amêndoas de cacau e LOD (3s) e LOQ (5s) para chocolates, sendo “s”, o valor do desvio padrão para as concentrações de 7 repetições e considerando fator de diluição da amostra de 40 vezes. A precisão foi calculada pelo coeficiente de variação (CV), em porcentagem, de 7 repetições analíticas sendo encontrado valores entre 4% e 13% para amêndoas de cacau e 2 e 14% para chocolates, satisfazendo as recomendações do guia do INMETRO (2020) nas condições estudadas (7%-21%).

Tabela 1. Avaliação da exatidão (n=3) do método de digestão ácida assistido por micro-ondas utilizando materiais de referência certificados*; coeficiente de correlação (r), limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) e precisão (coeficiente de variação, n=7).

Parâmetros	Chocolate (ICP-MS)**						
	Arsênio	Cádmio	Cobre	Chumbo	Cobalto	Mercúrio	Selênio
Valor Certificado (mg kg ⁻¹)	59,5 ± 3,8	0,302 ± 0,013	14,3 ± 0,7	0,869 ± 0,018	0,07	0,292 ± 0,022	0,120 ± 0,017
Valor Obtido (mg kg ⁻¹)	60,8 ± 0,7	0,271 ± 0,008	14,0 ± 1,1	0,881 ± 0,011	0,066 ± 0,001	0,245 ± 0,028	0,126 ± 0,016
Exatidão (%)	102 ± 1	90 ± 3	98 ± 8	101 ± 1	94 ± 1	84 ± 10	105 ± 14
r	0,99960	1,0000	0,9996	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999
LOD (mg kg ⁻¹)	0,015	0,001	0,007	0,005	0,002	0,007	0,019
LOQ (mg kg ⁻¹)	0,022	0,002	0,010	0,007	0,003	0,010	0,029
CV* (%)	11	3	2	14	2	9	12
	Amêndoa de Cacau (ICP OES)***						
Valor Certificado (mg kg ⁻¹)	21,6 ± 1,8	26,7 ± 0,6	106 ± 10	0,35 ± 0,13	n.a.	n.a.	n.a.
Valor Obtido (mg kg ⁻¹)	19,0 ± 0,4	25,1 ± 0,6	105,1 ± 2	0,34 ± 0,05	n.a.	n.a.	n.a.
Exatidão (%)	88 ± 2	94 ± 2	99 ± 2	98 ± 14	n.a.	n.a.	n.a.
r	0,99960	0,99990	0,99990	0,99976	n.a.	n.a.	n.a.
LOD (mg kg ⁻¹)	0,171	0,021	0,043	0,057	n.a.	n.a.	n.a.
LOQ (mg kg ⁻¹)	0,272	0,033	0,069	0,091	n.a.	n.a.	n.a.
CV* (%)	13	5	4	7	n.a.	n.a.	n.a.

Dark Chocolate (ERM BD512) para Cd e Cu; Peach leaves (NIST SRM 1547) para Pb, Se e Co e Lobster Hepatopancreas (NRCC Tort-3) para As e Hg. *Lobster Hepatopancreas (NRCC Tort-2) para As, Cd, Cu e Pb. n.a.= não avaliado.

3.2 Resultados obtidos para os elementos traço em amostras de amêndoas de cacau e chocolates “*Bean to Bar*”

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados obtidos para os elementos traço em chocolates “*Bean to Bar*” e convencionais distribuídos pela quantidade de sólidos de cacau, ou seja, chocolate branco, ao leite, meio amargo e amargo. Os teores médios dos elementos traço presente nas amostras de chocolates “*Bean to Bar*” indicam a seguinte ordem de concentração $Cu > Co > Cd > Se > Pb$.

Em amostras de chocolates (“*Bean to Bar*” e convencionais) o As e o Hg não foram detectados. O Cu e o Co foram os elementos mais abundantes, foi possível detectar o Cu em 100% das amostras e variou entre 0,15 e 10,10 mg kg⁻¹. Em relação ao Co, foi detectado em 97% e variou entre 0,002 mg kg⁻¹ (LOD) e 0,47 mg kg⁻¹, o Cd também foi em 97%, porém, variou entre 0,001 mg kg⁻¹ (LOD) e 0,078 mg kg⁻¹. O Pb e Se obtiveram menores níveis detectados nas amostras, o Se foi detectado em 69% das amostras entre 0,02 mg kg⁻¹ (LOD) e 0,088 mg kg⁻¹ e o Pb foi detectado em 70,4% entre 0,005 mg kg⁻¹ (LOD) e 0,020 mg kg⁻¹.

Tabela 2. Média e intervalo de concentração de Cd, Co, Cu, Pb e Se para chocolates *Bean to bar* (n=65) e convencional (n=6).

Chocolate	Elementos (mg kg ⁻¹)									
	Cd	N	Co	N	Cu	N	Pb	N	Se	N
Chocolate <i>Bean to bar</i>										
Branco (n=2)	<0,001	0	0,05 (<0,002 - 0,012)	1	0,15 (0,11 - 0,20)	2	0,020 (<0,005 - 0,039)	1	<0,019	0
Ao leite (n=12)	0,025 (0,009 - 0,094)	12	0,23 (0,06 - 0,94)	12	3,90 (1,63 - 9,24)	12	0,012 (<0,005 - 0,037)	9	0,018 (<0,019 - 0,077)	4
Meio amargo (n=17)	0,041 (0,004 - 0,10)	17	0,37 (0,12 - 0,63)	17	8,22 (4,13 - 12,20)	17	0,012 (<0,005 - 0,06)	9	0,087 (<0,019 - 0,25)	14
Amargo (n=34)	0,078 (0,008 - 0,74)	34	0,47 (<0,002 - 1,88)	33	10,10 (2,96 - 19,3)	34	0,013 (<0,005 - 0,04)	26	0,088 (<LOD - 0,28)	25
Chocolate Convencional										
Branco (n=1)	<0,001	0	<0,002	0	0,15 ± 0,06	1	<0,005	0	0,06 ± 0,01	1
Ao leite (n=3)	0,052 (0,01 - 0,12)	3	0,125 (0,11 - 0,16)	3	3,56 (2,92 - 4,68)	3	0,010 (0,007 - 0,011)	3	0,04 (0,070 - 0,097)	3
Meio amargo (n=1)	0,049 ± 0,001	1	0,43 ± 0,01	1	10,7 ± 0,1	1	0,036 ± 0,004	1	0,12 ± 0,01	1
Amargo (n=1)	0,065 ± 0,002	1	0,46 ± 0,01	1	13,0 ± 0,4	1	0,043 ± 0,002	1	0,15 ± 0,01	1

LOD (Limite de detecção): Cd = 0,001 mg kg⁻¹, Co = 0,002 mg kg⁻¹, Pb = 0,005 mg kg⁻¹, Se = 0,019 mg kg⁻¹; **N**= número de amostras nas quais o elemento traço foi detectado.

Os resultados avaliados demonstraram que os chocolates *“Bean to Bar”* do tipo amargo apresentaram as maiores médias de elementos traço, com exceção do selênio (Se), que obteve média maior nos chocolates *“Bean to Bar”* meio amargo. No entanto, foi observada uma relação linear entre o aumento de sólidos de cacau e o aumento dos níveis de elementos traço na composição do chocolate, especialmente para os contaminantes inorgânicos cádmio (Cd) e chumbo (Pb).

O cádmio não foi detectado nos chocolates *“Bean to Bar”* e convencional branco, porém, foi detectado em todas as amostras de chocolates ao leite, meio amargo e amargo, com uma média variando entre 0,001 (limite de detecção) e 0,078 mg kg⁻¹. Os chocolates amargos apresentaram a maior média e concentração de cádmio, com valores de 0,078 mg kg⁻¹ e 0,74 mg kg⁻¹, respectivamente.

O cobalto (Co) foi encontrado em 96% das amostras de chocolates e em 83% das amostras convencionais, sendo que os chocolates amargos apresentaram as maiores médias, com valores de 0,46 mg kg⁻¹ e 0,47 mg kg⁻¹, respectivamente. O chocolate amargo *“Bean to Bar”* registrou o maior nível de cobalto, com concentração de 1,88 mg kg⁻¹.

O cobre (Cu) foi quantificado em todos os chocolates convencionais e *“Bean to Bar”* analisados, sendo o elemento traço mais abundante. Os chocolates amargos *“Bean to Bar”* apresentaram uma média menor de cobre (10,10 mg kg⁻¹) em comparação aos chocolates amargos convencionais (13,0 mg kg⁻¹).

O chumbo (Pb) foi detectado em 68% e 98% das amostras de chocolates convencionais e *“Bean to Bar”*, respectivamente. A maior média de Pb foi 195% maior em chocolates meio amargo convencionais (0,059 mg kg⁻¹) do que a maior encontrada em chocolates brancos *“Bean to Bar”* (0,020 mg kg⁻¹). Maiores níveis foram obtidos em amostras de amêndoas e chocolates *“Bean to Bar”* das regiões da BA e ES, respectivamente

O selênio (Se) foi encontrado em todos os chocolates convencionais e em 67% dos chocolates *“Bean to Bar”*. A maior média e concentração de selênio foram registradas nos chocolates *“Bean to Bar”* meio amargo, com valores de 0,088 mg kg⁻¹ e 0,28 mg kg⁻¹, respectivamente. Nos chocolates convencionais, a maior média de selênio foi observada nos chocolates amargos (0,15 mg kg⁻¹).

Os resultados dos elementos-traço presentes nos chocolates *“Bean to Bar”* em diferentes regiões do Brasil foram representados na Tabela 3 e na Figura 11.

Tabela 3. Média e intervalo de concentração de Cd, Co, Cu, Pb e Se em amostras de chocolates *Bean-to-bar* (n=65) para cada região de origem das amêndoas.

Região	Elementos (mg kg ⁻¹)									
	Cd	N	Co	N	Cu	N	Pb	N	Se	N
Amazonas (n=7)	0,145 (0,03 - 0,74)	6	0,170 (0,03 - 0,54)	6	7,34 (0,198 - 12,8)	7	0,014 (<0,005 - 0,03)	5	0,075 (<0,019 - 0,28)	3
Amapá (n=2)	0,054 (0,007 - 0,1)	2	0,15 (0,054 - 0,25)	2	7,17 (5,67 - 8,66)	2	0,019 (0,02 - 0,02)	2	0,044 (<0,019 - 0,19)	2
Bahia (n=35)	0,046 (0,01 - 0,18)	35	0,39 (0,03 - 0,92)	35	8,50 (1,63 - 15,7)	35	0,012 (<0,005 - 0,05)	23	0,08 (<0,019 - 0,25)	25
Espírito Santo (n=8)	0,05 (0,01 - 0,09)	5	0,49 (<0,002 - 0,94)	7	6,3 (0,01 - 11,40)	7	0,022 (<0,005 - 0,06)	7	0,055 (<0,019 - 0,23)	7
Floresta Amazônica (n=2)	0,08 (0,04 - 0,12)	2	0,77 (0,46 - 1,07)	2	12,63 (7,36 - 17,9)	2	<0,005 (<0,005 - 0,01)	1	0,009 (<0,019 - 0,02)	1
Mata Atlântica (n=4)	0,036 (0,01 - 0,06)	4	0,29 (0,15 - 0,43)	4	7,6 (3,6 - 8,42)	4	0,0038 (<0,005 - 0,008)	2	0,024 (<0,019 - 0,06)	2
Pará (n=5)	0,025 (<0,001 - 0,1)	3	0,60 (0,01 - 1,88)	4	10,14 (0,11 - 19,3)	4	0,011 (<0,005 - 0,04)	1	0,10 (<0,019 - 0,18)	3
Rondônia (n=2)	0,024 (0,016 - 0,031)	2	0,15 (<0,002 - 0,15)	2	4,46 (2,96 - 5,96)	2	0,015 (0,01 - 0,02)	2	0,11 (0,08 - 0,14)	2
Média (n=65)	0,057 (<LOD - 0,74)	59	0,38 (<LOD - 1,88)	62	7,84 (0,01 - 19,3)	63	0,012 (<LOD - 0,06)	43	0,058 (<LOD - 0,28)	45

LOD (Limite de detecção): Cd = 0,001 mg kg⁻¹, Co = 0,002 mg kg⁻¹, Pb = 0,005 mg kg⁻¹, Se = 0,019 mg kg⁻¹; **N:** número de amostras nas quais o elemento foi quantificado.

O chumbo (Pb) foi detectado em 43 amostras (66%), com uma média de $0,012 \text{ mg kg}^{-1}$, variando entre $<0,005 \text{ mg kg}^{-1}$ (LOD) e $0,022 \text{ mg kg}^{-1}$. O nível mais elevado de chumbo foi encontrado na região do Espírito Santo, enquanto a menor concentração foi observada na Floresta Amazônica ($0,0040 \text{ mg kg}^{-1}$).

O selênio (Se) foi detectado em 45 amostras (69%), apresentando uma média de $0,058 \text{ mg kg}^{-1}$, variando entre $<0,009 \text{ mg kg}^{-1}$ (LOD) e $0,11 \text{ mg kg}^{-1}$. O menor nível de selênio foi encontrado na região da Mata Atlântica ($0,0038 \text{ mg kg}^{-1}$), e o maior nível foi registrado em Rondônia.

O cobre (Cu) esteve presente em 97% das amostras, com uma média de $7,84 \text{ mg kg}^{-1}$ para todas as regiões, variando entre $4,46 \text{ mg kg}^{-1}$ e $12,63 \text{ mg kg}^{-1}$. A menor média de cobre foi encontrada na região de Rondônia, enquanto a maior média foi observada na Floresta Amazônica.

O cobalto (Co) apresentou uma média de $0,38 \text{ mg kg}^{-1}$ entre as regiões, sendo que a maior média foi encontrada na Floresta Amazônica ($0,77 \text{ mg kg}^{-1}$) e a menor em Rondônia ($0,15 \text{ mg kg}^{-1}$).

No caso do cádmio (Cd), a região da Amazônia registrou a maior média ($0,145 \text{ mg kg}^{-1}$) e concentração ($0,74 \text{ mg kg}^{-1}$), enquanto a região de Rondônia apresentou a menor média ($0,024 \text{ mg kg}^{-1}$).

Os contaminantes inorgânicos Pb, Cd e Cu foram avaliados nas amostras de amêndoas de cacau e chocolates distribuídos por regiões do Brasil, como mostrado na Figura 11. Ao comparar as médias de chumbo em amêndoas de cacau e em chocolates foi observado que o chumbo apresentou uma média menor em chocolates da Bahia ($0,012 \text{ mg kg}^{-1}$) e maiores médias nas regiões da Amazônia ($0,014 \text{ mg kg}^{-1}$), Pará ($0,010 \text{ mg kg}^{-1}$) e Espírito Santo ($0,022 \text{ mg kg}^{-1}$) em comparação às amêndoas ($0,04 \text{ mg kg}^{-1}$, $0,06 \text{ mg kg}^{-1}$ (LOD) e $0,06 \text{ mg kg}^{-1}$ (LOD), respectivamente).

Os teores médios de cádmio foram mais elevados nas amêndoas de cacau do que nos chocolates para todas as amostras das regiões estudadas. As maiores médias e concentrações de cádmio foram encontradas nas amostras da região da Amazônia ($0,68 \text{ mg kg}^{-1}$ e $0,89 \text{ mg kg}^{-1}$) tanto nas amêndoas quanto nos chocolates ($0,145 \text{ mg kg}^{-1}$ e $0,74 \text{ mg kg}^{-1}$). Para o cobre, também foi obtido um maior teor nas amêndoas de cacau do que nos chocolates para todas as regiões. As maiores médias e concentrações de cobre foram encontradas nas amostras da região da

Floresta Amazônica (22,38 mg kg⁻¹ e 28,12 mg kg⁻¹) tanto nas amêndoas quanto nos chocolates, com valores de 12,63 mg kg⁻¹ e 19,3 mg kg⁻¹, respectivamente, na região do Pará.

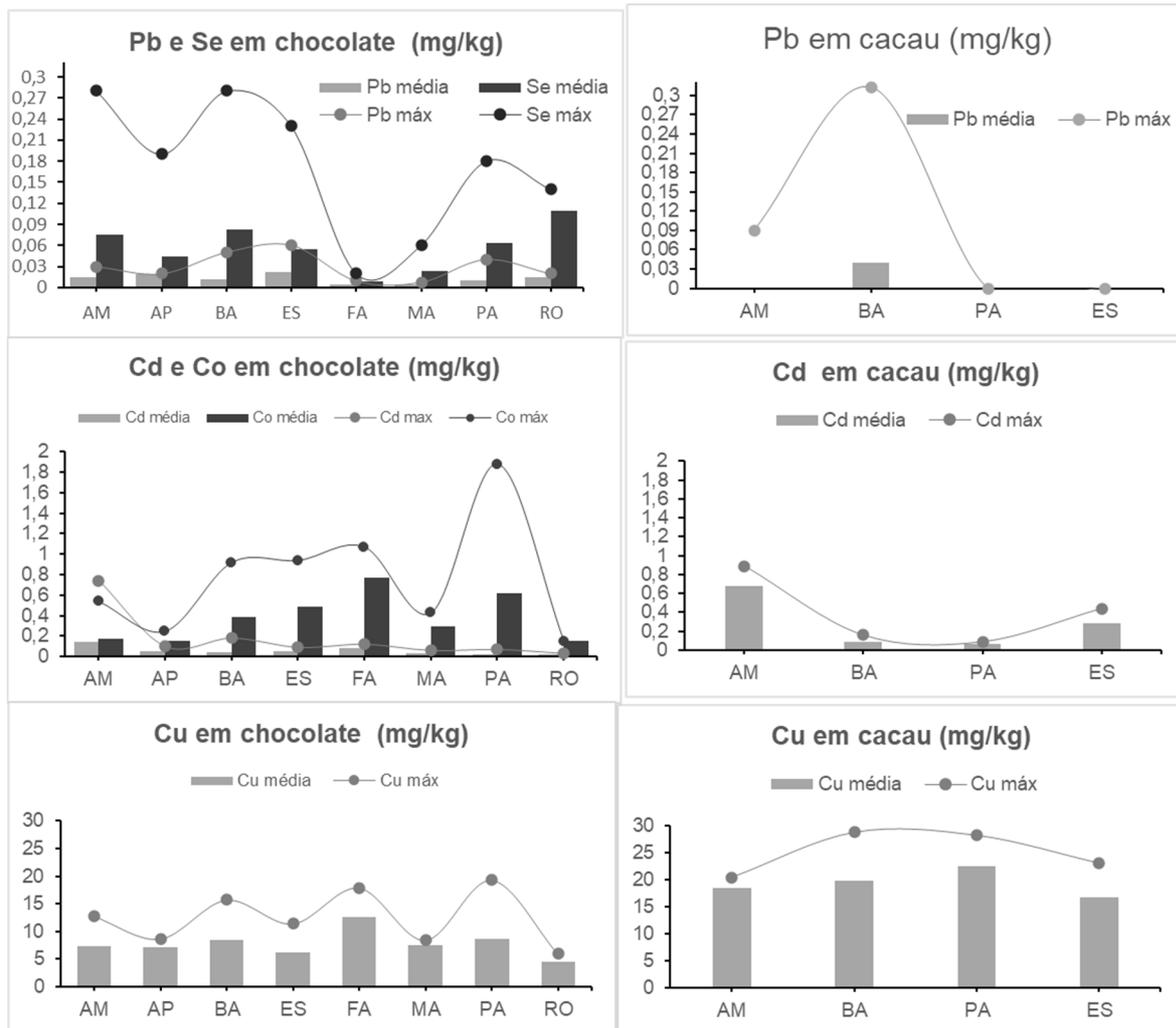


Figura 11. Gráfico de barras das concentrações de Cd, Co, Cu, Pb e Se em amêndoas de cacau e chocolate do Brasil

Na Tabela 4, são apresentados os resultados obtidos para os contaminantes inorgânicos Cd, Cu e Pb em amostras de amêndoas de cacau provenientes das regiões da Amazônia (n=8), Bahia (n=11), Pará (n=2) e Espírito Santo (n=2). Os resultados avaliados indicam que a média da concentração dos contaminantes inorgânicos nas amostras de amêndoas de cacau segue a seguinte ordem: Cu > Cd > Pb.

A maioria das amostras analisadas, para os contaminantes inorgânicos Cd, Pb e Cu, apresentou teores abaixo do limite máximo tolerado (LMT) estabelecido pela legislação brasileira (BRASIL, 2022) tanto para amêndoas de cacau quanto para chocolates. No entanto, observou-se uma exceção em relação ao Cd, em que as amostras de amêndoas de cacau provenientes da região da Amazônia apresentaram uma média de teor de 0,68 mg kg⁻¹, ultrapassando tanto o LMT de 0,3 mg kg⁻¹ estabelecido pela legislação brasileira quanto o de 0,6 mg kg⁻¹ estabelecido pela União Europeia. Além disso, foi encontrada uma concentração máxima de 0,74 mg kg⁻¹ de Cd em uma amostra de chocolate amargo com 70% de cacau proveniente da região da Amazônia, ultrapassando o LMT de 0,40 mg kg⁻¹ estabelecido para chocolates com mais de 40% (BRASIL, 2022; EU, 2014).

Tabela 4. Média e intervalo de concentração de Cd, Cu e Pb em amêndoas de cacau (n=23) do Brasil e número de amostras (N) com teores superiores ao limite máximo tolerável (LMT).

Região	Contaminantes inorgânico (mg kg ⁻¹)					
	Cd	N	Cu	N	Pb	N
Amazonas (n=8)	0,68 (0,52 - 0,89)	8	18,39 (15,2 - 24,8)	8	<0,06 (<0,06 - 0,09)	1
Bahia (n=11)	0,056 (<0,17 - 0,16)	1	19,76 (10,34 - 28,69)	11	0,04 (<0,001 - 0,313)	3
Pará (n=2)	<0,17	0	22,38 (16,62 - 28,12)	2	<0,06	0
Espírito Santo (n=2)	0,22 (<0,17 - 0,44)	2	16,6 (10,2 - 23,0)	2	<0,06	0
Média (n=23)	0,24 (<0,17 - 0,89)	11	19,28 (10,2 - 28,69)	23	0,010 (<0,06 - 0,313)	4

LOD (Limite de detecção): Cd = 0,171 mg kg⁻¹, Pb = 0,057 mg kg⁻¹; **LMT** = Limites máximos toleráveis para amêndoas e pasta de cacau: As = 0,50 mg kg⁻¹ (pasta), Cd = 0,3 mg kg⁻¹ (pasta), Pb = 0,50 mg kg⁻¹ (pasta), Cu = 40 mg kg⁻¹ (amêndoas) (Brasil, 2021)¹ e cacau em pó: Cd = 0,6 mg kg⁻¹ (EU, 2014)²; **N:** número de amostras contaminadas.

3.3 Contaminantes inorgânicos em amêndoas de cacau e chocolates

Estudos têm relatado a ocorrência dos CI's em chocolates convencionais e o cádmio e o chumbo são os mais avaliados, devido a contaminações do solo, água e ar através de fontes antropogênicas e naturais. Alguns estudos reportam que há diminuição dos níveis de Cd e Pb durante o processamento das amêndoas até obtenção do chocolate; enquanto outros trabalhos indicam que há uma forte correlação entre o aumento dos níveis de Cd e Pb com o aumento do percentual de sólidos de cacau (Bravo *et al.*, 2021; Villa *et al.*, 2014).

Salama (2018) reportou níveis de As (0,025 mg kg⁻¹), Co (2,09 mg kg⁻¹), Cu (0,039 mg kg⁻¹), Hg (0,048 mg kg⁻¹) e Pb (0,078 mg kg⁻¹) em 19 amostras de chocolates convencionais dos Emirados Árabes Unidos (EAU). Rafaella *et al.* (2016) avaliaram a composição Mineral de As, Co, Cu e Se em amostras de chocolates branco (0,001, 0,005 (LOQ), 0,17 e 0,02 mg kg⁻¹, respectivamente), ao leite (0,01, 0,087, 3,30 e 0,04 mg kg⁻¹, respectivamente) e amargo (0,01, 0,36, 12,18 e 0,07 mg kg⁻¹, respectivamente). Kruszewski *et al.*, (2018) reportaram menores níveis de Cd e Pb em chocolates entre 0,107 e 0,429 mg kg⁻¹ e entre 0,0013 (LOD) e 0,03 mg kg⁻¹, respectivamente, do que em etapas do processamento do chocolate (torrefação, quebra, moagem e conchagem) entre 0,103 e 0,658 mg kg⁻¹ e entre 0,0013 (LOD) e 0,155 mg kg⁻¹, respectivamente. Em outro estudo, Bravo *et al.*, (2021) relataram a diminuição de Cd em 40% nas amêndoas de cacau (4,17 mg kg⁻¹) até a obtenção do chocolate (1,60 mg kg⁻¹). Villa *et al.*, (2014) analisaram 30 amostras de chocolates do Brasil e encontraram as maiores médias de Cd (0,108 mg kg⁻¹) e Pb (0,138 mg kg⁻¹) em chocolate amargo contendo de 55% a 85% de cacau. Os autores observaram que existe uma correlação linear entre o aumento de sólidos de cacau e o aumento do nível de Cd e Pb.

Abt *et al.*, (2018) encontraram em 98 amostras de chocolates e 46 de cacau em pó e *nibs*, maiores médias de Cd e Pb em amostras de cacau em pó (0,70 e 0,11 mg kg⁻¹, respectivamente) do que em *nibs* (0,62 e 0,003 mg kg⁻¹, respectivamente) do que em chocolate preto (0,27 e 0,03 mg kg⁻¹, respectivamente) e ao leite (0,06 e 0,01 mg kg⁻¹, respectivamente). Rehman e Husnain (2012) reportaram níveis de Cd (0,4 mg kg⁻¹), Cu (0,003 mg kg⁻¹) e Pb (0,03 mg kg⁻¹) em 32 amostras de chocolates à base de cacau (0,05, 0,002 e 0,31

mg kg⁻¹, respectivamente), à base de açúcar (40,7, 3,2 e 209 µg kg⁻¹, respectivamente) e à base de leite (33,1, 3,1 e 88 µg kg⁻¹, respectivamente).

O Cu em amêndoas de cacau foi encontrado a média de 19,28 ± 2,34 mg kg⁻¹ e variou em concentrações entre 10,2 e 28,7 mg kg⁻¹, próximo ao encontrado por Meduar *et al.*, (2019) entre 18,8 e 30,4 mg kg⁻¹, a maior média e concentração foi encontrada na região do Pará (PA) de 22,38 ± 1,29 e 28,69 mg kg⁻¹ e a menor foi no Espírito Santo (ES) de 16,6 ± 6,0 e 10,2 mg kg⁻¹. No presente estudo nenhum valor de Cu ultrapassou o limite da legislação brasileira (BRASIL, 2022) de 40 mg kg⁻¹ para amêndoas de cacau.

O Cd encontrado em uma amostra da região do AM (0,89 mg kg⁻¹) ultrapassou os limites das legislações brasileira de 0,3 mg kg⁻¹ e do MERCOSUL (2011) de 0,6 mg kg⁻¹, sendo encontrado a maior média (0,68 mg kg⁻¹) em amêndoas de cacau da Amazônia e menor no Pará (0,060 mg kg⁻¹), variou entre 0,060 e 0,68 mg kg⁻¹. O As não foi detectado em nenhuma das amostras e o Pb foi detectado em 5 (22%) amostras entre as regiões estudadas e obteve média de 0,010 mg kg⁻¹, a maior média foi encontrada na região da BA de 0,04 mg kg⁻¹ e a concentração variou entre 0,06 (LOD) e 0,15 mg kg⁻¹.

O Cd e o Pb têm sido reportados na literatura em concentrações médias entre 0,017 e 1,78 mg kg⁻¹ e entre 0,003 e 3,78 mg kg⁻¹, respectivamente, em amêndoas de cacau de países da América do Sul, África e Ásia (de Oliveira *et al.* 2021; Romero-Estevés *et al.* 2019; Arévalo-Gardini *et al.* 2017; Bertoldi *et al.* 2016; Vitola *et al.* 2016). De Oliveira *et al.* (2021) encontraram níveis de Cd e Pb entre 0,060 e 0,142 mg kg⁻¹ e entre 0,019 e 0,985 mg kg⁻¹, respectivamente, em 90 amostras do Brasil, Equador e Costa do Marfim. Romero-Estevés *et al.* (2019) estudaram a presença de Cd e Pb em 36 amostras de amêndoas de cacau do Equador e encontraram médias entre 0,280 e 1,73 mg kg⁻¹ e entre 0,502 e 1,97 mg kg⁻¹, respectivamente. Arévalo-Gardini *et al.* (2017) encontraram teores médios para Cd e Pb em 80 amostras de cacau do Peru entre 0,170 e 1,78 mg kg⁻¹ e entre 1,00 e 3,78 mg kg⁻¹, respectivamente. Kruszewski *et al.*, (2018) determinara em 6 amêndoas de cacau da República Dominicana a presença de Cd e Pb e encontraram médias de 0,128 e 0,162 mg kg⁻¹. Bertoldi *et al.* (2016) encontraram médias entre 0,093 e 1,39 mg kg⁻¹ e entre 0,053 e 0,108 mg kg⁻¹ para Cd e Pb, respectivamente, em 61 amostras de cacau da África, Ásia, América do Sul e

Central. Vitola *et al.* (2016) analisaram 30 amostras de amêndoas de cacau provenientes da África do Sul (Camarões, Nigéria e Gana) e encontraram médias de Cd e Pb entre 0,017 e 0,050 e entre 0,320 e 0,520 mg kg⁻¹, respectivamente.

3.4 Avaliação da estimativa de exposição e ingestão para Cd, Co, Cu, Pb e Se pelo consumo de chocolates “*Bean to Bar*”

Para o cálculo da estimativa de exposição aos elementos Cd, Co, Cu, Pb e Se foram consideradas as maiores concentrações destes elementos que foram encontradas nas amostras de chocolates amargo das regiões estudadas (Amazonas, Pará, Espírito Santo e Bahia). Foram considerados também, o maior consumo médio anual de chocolate da população brasileira, da grande São Paulo, de 5,75 kg (média de 15,75 g dia e 479,16 g mês); indivíduos adultos com 60 kg de peso corporal (pc) e 15 kg para crianças (MDCI, 2018). Como o As e Hg não foi detectado em nenhuma amostra, não foram realizados os cálculos de exposição para estes elementos. Os resultados da estimativa de ingestão dos elementos foram comparados a PTMI para Cd (25 µg kg⁻¹ pc); BMDL_{0.1} para Pb (12 µg kg⁻¹ pc); PMTDI para Cu (0,5 mg kg⁻¹ pc); UL para Co de 0,0016 mg kg⁻¹ pc (EFSA, 2012); e UL para Se de 255 µg (adultos) e 130 µg (crianças de 7-10 anos) EFSA, 2023).

A partir dos cálculos realizados, o Cu foi encontrado em maior concentração no chocolate “*Bean to Bar*” amargo (19,3 mg kg⁻¹) e obteve uma estimativa ingestão de 0,005 mg kg⁻¹ de peso corpóreo para adultos e 0,02 mg kg⁻¹ de peso corpóreo para crianças atingindo 1% e 4% da PMTDI, respectivamente. A maior concentração de Pb foi encontrada no chocolate “*Bean to Bar*” meio amargo (0,06 mg kg⁻¹) e obteve 0,012 µg kg⁻¹ pc para adultos e 0,048 µg kg⁻¹ pc para crianças atingindo o PTMI em 0,1% e 0,4%, respectivamente. Em relação a amostra com o maior nível de Cd (0,74 mg kg⁻¹), a estimativa de ingestão foi de 5,91 µg kg⁻¹ pc para adultos e 23,6 µg kg⁻¹ pc para crianças e atingiu 24% do PTMI para adultos e 94% para crianças. Para o Co a partir do maior nível (1,88 mg kg⁻¹) a estimativa de ingestão foi de 0,5 mg kg⁻¹ pc para adultos e 1,97 mg kg⁻¹ para crianças, atingindo 31% da UL para adultos e 123% para crianças.

Se levarmos em consideração o consumo anual de um país com alto consumo de chocolate, como a Alemanha de 11,1 kg/ano (30,4 g/dia) (Chocosuisse, 2018), a estimativa de ingestão mensal para crianças alcançaria até 180% da PTMI para Cd e atingiria até 238% da UL para Co, indicando um possível risco à saúde para esse grupo da população.

4. Conclusão

As técnicas de ICP OES e ICP-MS foram utilizadas com sucesso para determinar a presença de vários elementos em amêndoas de cacau e chocolates “*Bean to Bar*” e convencionais. O As e o Hg estavam abaixo dos limites de detecção em todas as amostras. As concentrações médias dos elementos foram maiores nas amêndoas do que nos chocolates, especialmente nos chocolates amargos. O Co foi encontrado em 97% das amostras de chocolate, com concentração média 165% maior no chocolate “*Bean to Bar*” amargo em comparação com o convencional amargo, sendo mais elevado nas amostras da região do Pará e menor no Amapá e Rondônia. O Se foi detectado em 69% das amostras de chocolate, com níveis mais altos no chocolate meio amargo “*Bean to Bar*” e no chocolate branco convencional. Na região de Rondônia, foi obtida a maior concentração média de Se, enquanto na Floresta Amazônica foi a menor. O Cu foi o elemento mais abundante, presente em todas as amostras de amêndoas e chocolates. Houve uma diminuição de 145% nos níveis de Cu nas amostras de amêndoas de cacau em comparação com as amostras de chocolates, e um aumento de 28% no chocolate amargo “*Bean to Bar*” em relação ao chocolate amargo convencional.

As regiões da Bahia e Pará apresentaram os maiores níveis de Cu. O Pb foi o elemento menos abundante, quantificado em 22% das amostras de amêndoas de cacau e 70,4% dos chocolates. As regiões da Bahia e Espírito Santo apresentaram os maiores níveis de Pb em amêndoas e chocolates “*Bean to Bar*”, respectivamente. O Cd foi encontrado em todas as amostras de amêndoas, com maior quantidade na região da Amazônia. Em relação às legislações brasileira e europeia, seis amostras dessa região ultrapassaram o limite máximo permitido (0,3 e 0,6 mg kg⁻¹). Na região da Amazônia, uma amostra de chocolate amargo “*Bean to Bar*” ultrapassou o limite estabelecido pela legislação brasileira para chocolates

com mais de 40% de cacau. O cálculo da estimativa de ingestão para Cd e Co para as amostras de chocolates “*Bean to bar*”, considerando os maiores teores encontrados, indicam a possibilidade de risco caso ocorra um consumo elevado deste chocolate por crianças.

5. Referências

- Abt, E.; Fong Sam, J.; Gray, P.; Robin, L. P. Cadmium and lead in cocoa powder and chocolate products in the US Market. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 11(2), 92-102, 2018.
- AIPC. Associação Nacional das Indústrias Processadoras de Cacau. 2022. Estatísticas. Disponível em: <http://www.aipc.com.br/>. Acesso em: 18 out. 2022.
- Al Osman, M.; Yang, F.; Massey, I. Y. Exposure routes and health effects of heavy metals on children. *Biometals*, 32, 563-573, 2019.
- AOAC - International, Official Methods of Analysis of AOAC International, in Guidelines for Standard Method Performance Requirements (Appendix F. AOAC International, 2016.
- Arévalo-Gardini, E.; Arévalo-Hernández, C. O.; Baligar, V. C.; He, Z. L. Heavy metal accumulation in leaves and beans of cacao (*Theobroma cacao* L.) in major cacao growing regions in Peru. *Science of the Total Environment*, 605, 792-800, 2017.
- ATSDR – Agency for Toxic Substances and Diseases Registry. Public Health Assessment: guidance manual. Atlanta, EUA. 357p, 2022. Disponível em: https://www.atsdr.cdc.gov/pha-guidance/conducting_scientific_evaluations/epcs_and_exposure_calculations/estimating-site-specific-ingestion-and-dermal-exposure-doses.html#FoodIngestion. Acesso em: 25 de Fev de 2023.
- Bertoldi, D.; Barbero, A.; Camin, F.; Caligiani, A.; Larcher, R. Multielemental fingerprinting and geographic traceability of *Theobroma cacao* beans and cocoa products. *Food Control*, 65, 46-53, 2016.
- Bravo, D.; Santander, M.; Rodríguez, J.; Escobar, S.; Ramtahal, G.; Atkinson, R. ‘From soil to chocolate bar’: identifying critical steps in the journey of cadmium in a Colombian cacao plantation. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 39(5), 949-963, 2022.
- BRASIL. Instrução Normativa – IN nº 160, de 1º de julho de 2022.

- CAC - Codex Alimentarius Commission. Joint FAO/WHO food standards programme codex committee on contaminants in foods. 15 session. Virtual, 9-13 and 24 May. 2022
- Chocosuisse, 2018. Chocosuisse Statistical Bulletin. Facts & Figures. Per capita consumption of chocolate products. <https://www.chocosuisse.ch/en/services-3/facts-figures-3/> Acesso em: 23 de Fev de 2023.
- de Oliveira, A. P. F.; Milani, R. F.; Efraim, P.; Morgano, M. A.; Tfouni, S. A. V. Cd and Pb in cocoa beans: Occurrence and effects of chocolate processing. *Food Control*, 119, 107455, 2021.
- EFSA. Scientific Opinion on safety and efficacy of cobalt compounds (E3) as feed additives for all animal species: Cobaltous acetate tetrahydrate, basic cobaltous carbonate monohydrate and cobaltous sulphate heptahydrate, based on a dossier submitted by TREAC EEIG. **EFSA Journal**, 10(7), 2791, 2012.
- EFSA. European Food Safety Authority. Scientific Opinion on Lead in Food. *EFSA Journal*, 8(4), 1570, 2013.
- EFSA. Scientific opinion on the tolerable upper intake level for selenium. *EFSA Journal*, 21(1), 7704, 2023.
- Gallo, P. J.; Antolin-Lopez, R.; Montiel, I. Associative Sustainable Business Models: Cases in the bean-to-bar chocolate industry. *Journal of cleaner production*, 174, 905-916, 2018.
- Giller, M. *Bean-to-bar chocolate: America's craft chocolate revolution: the origins, the makers, and the mind-blowing flavors*. North Adams, MA: Storey Publishing, 2017.
- INMETRO. (2020). The National Institute of Metrology, Standardization and Industrial Quality, DOQ-CGCRE-008, Revision 09 (p. 28).
- Kruszewski, B.; Obiedziński, M. W.; Kowalska, J. Nickel, cadmium and lead levels in raw cocoa and processed chocolate mass materials from three different manufacturers. *Journal of Food Composition and Analysis*, 66, 127-135, 2018.
- MDCI – Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços. *Cacau e Chocolate no Brasil: Desafios na Produção e Comércio Global*. Brasília, dezembro de 2018. 128 p. <https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000366689/>. Acesso em: 21 de Fev de 2023.
- MERCOSUL. Resolução GMC n. 12/2011. Regulamento técnico MERCOSUL sobre limites máximos de contaminantes inorgânicos em alimentos, 2011.

- Medauar, C. C.; Bahia, B. L.; Santana, T. M.; Dos Reis, M. E.; Soares, M. B.; Santos, C. A.; de Souza Júnior, J. O. Nickel and copper accumulate at low concentrations in cacao beans cotyledons and do not affect the health of chocolate consumers. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 17(4), e0304-e0304, 2019.
- Peixoto, R. R. A.; Villa, J. E. I.; Silva, F. F.; Cadore, S. Nutritional evaluation of the mineral composition of chocolate bars: total contents vs. bioaccessible fractions. *J Food Process Technol*, 7(572), 2, 2016.
- Rehman, S.; Husnain, S. M. Assessment of trace metal contents in chocolate samples by Atomic Absorption Spectrometry. *Journal of Trace Element Analysis*, 1(1), 1-11, 2012.
- Romero-Estévez, D.; Yáñez-Jácome, G. S.; Simbaña-Farinango, K.; Navarrete, H. Content and the relationship between cadmium, nickel, and lead concentrations in Ecuadorian cocoa beans from nine provinces. *Food control*, 106, 106750, 2019.
- Salama, A. K. Health risk assessment of heavy metals content in cocoa and chocolate products sold in Saudi Arabia. *Toxin Reviews*, 38(4), 318-327, 2019.
- Villa, J. E.; Peixoto, R. R.; Cadore, S. Cadmium and lead in chocolates commercialized in Brazil. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(34), 8759-8763, 2014.
- Vītola, V.; Ciproviča, I. The effect of cocoa beans heavy and trace elements on safety and stability of confectionery products. *Rural Sustainability Research*, 35(330), 19-23, 2016.
- Yanus, R. L.; Sela, H.; Borojovich, E. J.; Zakon, Y.; Saphier, M.; Nikolski, A.; Karpas, Z. Trace elements in cocoa solids and chocolate: An ICPMS study. *Talanta*, 119, 1-4, 2014.
- FAO/WHO – Food Agriculture Organization/World Health Organization. 77th meeting of the Joint FAO/WHO. Expert Committee on Food Additives, Rome (Italy), 4-13 June. 2013.
- FAO/WHO – Food Agriculture Organization/World Health Organization. Twenty-sixth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Geneva. (TRS 683-JECFA 26/31), 1982.

CAPÍTULO 3: OCORRÊNCIA DE OCRATOXINA A EM CACAU E CHOCOLATE “BEAN TO BAR”

Vitor H. Burgon^a, Raquel F. Milani^a, Adriana R. P. Silva^b, Marta H. Taniwaki^a, Beatriz T. Iamanaka^a, Marcelo A. Morgano^a

^aInstituto de Tecnologia de Alimentos, ITAL, C.P. 139, CEP 13070-178, Campinas/SP, Brasil

^bUniversidade Estadual de Campinas, Unicamp, Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, C.P. 6121, CEP 13083-862, Campinas/SP, Brasil

(Este capítulo será traduzido e submetido a revista FOOD CONTROL)

Resumo

O consumo de chocolates artesanais tem crescido nas últimas décadas principalmente pelos seus benefícios a saúde, contudo, falhas durante o processamento das amêndoas de cacau para a produção de chocolates pode acarretar o crescimento de fungos ocratoxigênicos. Neste trabalho foi avaliada a ocorrência de ocratoxina A em amêndoas de cacau e em chocolate “*Bean to Bar*” do Brasil, das regiões da Amazônia, Bahia, Espírito Santo e Pará. O método adaptado *in house* para amêndoas e chocolates foi validado com valores de recuperação variando entre 84 e 95%. O limite de detecção obtido foi de 0,04 $\mu\text{g kg}^{-1}$, de quantificação de 0,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e precisão de 15 e 14%. Foram avaliadas 43 amostras de amêndoas de cacau e 62 de chocolate, sendo que a ocratoxina A foi detectada em 20% e 30% das amostras, respectivamente. O nível de ocratoxina A nas amostras variou de 0,2 a 1,18 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e esteve dentro do limite máximo estabelecido pela legislação brasileira. No melhor do conhecimento dos autores, este é o primeiro estudo de investigação da contaminação de ocratoxina A em amêndoas e chocolates “*Bean to Bar*”.

Palavras-chaves: Chocolate “*Bean to Bar*”, Cacau, Ocratoxina A, HPLC-FLD

1. Introdução

O chocolate artesanal “*Bean to Bar*” surgiu na década de 1990 nos Estados Unidos e é feito a partir de amêndoas de cacau secas e fermentadas, adicionado ou não de açúcar, leite em pó e outros tipos de alimentos como frutos, amêndoas entre outros. Para sua produção, as amêndoas têm rastreabilidade e controle durante as etapas de processamento, contudo, havendo alguma falha na produção, pode haver exposição aos fungos ocratoxigênicos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, principalmente durante a etapa de colheita, fermentação, secagem e armazenamento (Giller, 2017; Agriopoulou, Stamatelopoulou & Varzakas, 2020).

Dentre os fungos que entram em contato com as amêndoas de cacau e produz ocratoxina A (OTA) durante o processamento, as espécies *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. melleus* e *A. westerdjijkiae* já foram relatados em amêndoas de cacau assim como a presença de OTA nelas (Pires *et al.*, 2019; Copetti *et al.*, 2010). A OTA pode prevalecer durante o processamento das amêndoas e estar presente em chocolate produzidos industrialmente (Kabak, 2019; Brera *et al.*, 2011). O consumo de alimentos contaminados por OTA pode causar efeitos prejudiciais à saúde pública. A presença de OTA nos alimentos está relacionada ao câncer em humanos e foi classificada pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) no grupo 2B e em estudos com animais foi observado a incidência de tumor hepatocelular e tumores renais (Ostry *et al.*, 2017).

A legislação brasileira através da instrução normativa, IN nº 160, de 1º de julho de 2022 estabeleceu um limite máximo tolerado (LMT) para amêndoa de cacau de 10 µg kg⁻¹ e para produtos de cacau e chocolate de 5 µg kg⁻¹ (BRASIL, 2022). A comissão da Autoridade Europeia de Alimentos Seguros (EFSA) estabeleceu em 2006 uma ingestão semanal tolerável provisória (PTWI) de 120 ng kg⁻¹ por peso corpóreo (EU, 2006); e em 2001 o comitê de peritos da FAO/WHO sobre aditivos alimentares (JECFA) fixou uma PTWI para OTA de 0,0001 mg kg⁻¹ (100 ng kg⁻¹) peso corpóreo.

Nos métodos comumente utilizados para a extração de OTA em alimentos empregam-se diferentes solventes orgânicos como metanol e acetone nitrila, extração em fase sólida (SPE) com solventes seletivos com a utilização de colunas de imunoafinidade (IAC) (Fabiani *et al.*, 2010; Quintela *et al.*, 2011). Outro método de

SPE seletivo utiliza polímeros molecularmente impressos (MIP's), baseado em polímeros formados por unidades monoméricas via ligações não covalentes na presença de uma molécula modelo (Pichon e Combes, 2016). Outra forma de extração utilizada para micotoxinas é o SPE não seletivo, baseado em interações hidrofóbicas e troca aniônica com o emprego de sorventes sólidos em uma coluna como o sorvente C18 e balanço lipofílico-hidrofílico (Rodriguez-Cabo *et al.*, 2016; Campone *et al.*, 2018). A forma mais comum de detecção da OTA é feita por cromatografia líquida hifenada aos detectores de fluorescência (HPLC-FLD) (Copetti *et al.* 2010; Muñoz-Solano e González-Peñas, 2020). A detecção também pode ser feita por cromatografia gasosa hifenada a detectores com captura de elétrons (GC-ECD) com derivatização do grupo hidroxila usando anidrido trifluoroacético para aumentar a volatilidade da OTA (Amelin *et al.* 2013). Outro método, porém, menos usado para detecção de OTA é baseado em eletroforese capilar hifenado ao detector de fluorescência induzido por laser (CE-LIF) (Xiao *et al.* 2018). Turcotte, Scott e Tague (2013) utilizaram a extração em fase sólida (SPE) e HPLC-MS/MS para determinar ocratoxina A em amêndoas de cacau (média 1,17 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e seus produtos derivados incluindo chocolates encontrando valores médios de 0,36 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

A presença de OTA em amêndoas de cacau destinadas a produção do chocolate “*Bean to Bar*” e no chocolate ainda não foi relatado na literatura. Assim o presente trabalho teve como objetivo otimizar um método analítico utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência para determinar e avaliar a ocorrência de ocratoxina A em amostras de amêndoas de cacau destinadas a produção de chocolate “*Bean to Bar*” e no chocolate “*Bean to Bar*” e calcular a estimativa de ingestão de ocratoxina A pelo consumo de chocolate para adultos e crianças.

2. Material e métodos

Através do *e-commerce* em sites de varejo foram adquiridas 105 amostras de amêndoas de cacau e chocolate “*Bean to Bar*” (Tabela 5). Dessas amostras, 43 eram de amêndoas de cacau, sendo 21 já fermentadas e secas e 22 do processamento pós-colheita das cidades de Arataca-BA (n=14) e Mocajuba-PA (n=8). Duas amostras da região da BA não foram possíveis de identificar as

idades. Amostras com 6 dias de fermentação de 2 cochos e amêndoas secas do mesmo lote das amêndoas fermentadas e amêndoas secas de outros 2 lotes de uma fazenda produtora de cacau fino de Arataca-BA. Em outra fazenda localizada em Mocajuba-PA foram coletadas amostras de 6 dias de fermentação de 1 cocho e as amêndoas secas totalizando 8 amostras. Foram coletadas entre 80 g e 2 kg de amostra de amêndoas de cacau em sacos com identificação esterilizados e mantidas sob baixas temperaturas em ambiente escuro em freezer, entre os anos de 2020 e 2022

Tabela 5. Amostras de amêndoas de cacau (n=43) distribuídas por região e municípios de origem

Região	Cidade	n
Amazonas (n=8)	Borba	2
	Manicoré	5
	Nova Olinda	1
Bahia (n=23)	Arataca	14
	Ibirapitanga	2
	Itabuna	2
	Itajuípe	1
	Porto Seguro	2
	não identificado	2
Espírito Santo (n=2)	Linhares	2
Pará (n=10)	Mocajuba	9
	Novo Repartimento	1

As amostras de chocolates artesanais do tipo “*Bean to Bar*” (n=62) foram classificadas pelo percentual de sólidos de cacau em sua composição, como: branco, ao leite (40 a 50% de cacau), meio amargo (50 a 70% de cacau) e amargo (70 a 100% de cacau). O tamanho das porções das amostras de chocolate variou entre 25g e 100g e todas as amostras foram armazenadas em baixas temperaturas em sacos identificados e esterilizados, em ambientes fechados e escuro.

Tabela 6. Amostras de chocolates “*Bean to Bar*” (n=62) distribuídas por região e por porcentagem de sólidos de cacau.

Região	Branco (0%)	Ao leite (40-50%)	Meio amargo (50-70%)	Amargo (70-100%)
Amazonas	1	2	0	5
Amapá	0	1	0	0
Bahia	0	5	11	14
Espírito Santo	0	4	1	7
Floresta Amazônica	0	0	0	1
Mata Atlântica	0	1	2	1
PA	1	0	1	2
RO	0	0	1	1

2.1 Extração de OTA em cacau e chocolate (*Clean up*)

Para a determinação de OTA em amêndoas de cacau secas e nos chocolates “*Bean to bar*” foi usado o método analítico adaptado de Copetti *et al.* (2010) empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por fluorescência. O método foi validado avaliando a tendência/recuperação, o limite de detecção (LOD), o limite de quantificação (LOQ) e a precisão de acordo com o guia do INMETRO (2020).

Dez gramas de amostra foram homogeneizados em banho-maria à 65 °C por 10 minutos e a OTA foi extraída com 200 mL de solução metanol:bicarbonato de sódio 3% (1:1 v/v). A suspensão foi agitada durante 10 minutos em homogeneizador Ultra-turrax (Polytron, Suíça) na velocidade de 10.000 rpm. A mistura foi filtrada em papel filtro qualitativo (Whatman n.4) e em filtro de fibra de vidro (Whatman). Em seguida, 20 mL do filtrado foram diluídos em 20 mL de tampão fosfato salino (PBS) com 0,01% Tween 20 e a solução foi percolada numa coluna de imunoafinidade, Ochraprep (R-Biopharm), em fluxo de 2-3 ml/min, e lavagem com 20 ml de água destilada.

Para a eluição da ocratoxina A adsorvida na coluna de imunoafinidade foram realizadas 8 adições de 500 µl (total de 4 ml) de solução de metanol:ácido acético (98:02, v/v) em um frasco âmbar. Esta solução foi evaporada sob um fluxo de nitrogênio à 40 °C e o extrato seco foi ressuspendido em 0,4 ml de fase móvel.

2.2 Condições cromatográficas para determinação de OTA

Para determinação e quantificação da OTA foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (Agilent Infinity 1260, Santa Clara, EUA) com detector de fluorescência a 333 nm de excitação e 477nm de emissão e injetor automático. A coluna cromatográfica utilizada foi C18 (Shimadzu Shimpack), com partículas de 5µm e dimensão de 250mm x 4,6 mm. A fase móvel utilizada foi solução de metanol:acetonitrila:água:ácido acético 35:30:34:01 (v/v/v/v), com vazão de 1 mL/min.

Para construção da curva analítica foi utilizado um padrão de OTA (Sigma), plotando-se a área dos picos versus a massa da ocratoxina (µg). A determinação da concentração de OTA no extrato das amostras foi realizada por interpolação da área do pico na curva analítica. O volume injetado foi de 100 µL tanto para a curva analítica quanto para os extratos das amostras.

2.3 Validação do método: determinação da tendência/recuperação, limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) e precisão

Para a avaliação da recuperação de ocratoxina A em amêndoas de cacau e chocolates foi utilizado, uma amostra de amêndoa de cacau e outra de chocolate que não foi detectada a presença de ocratoxina A. Essas amostras foram contaminadas com 3 níveis de OTA (1,74; 4,36 e 10,89 µg kg⁻¹) e foi realizada a determinação de OTA com três repetições em cada nível, os resultados foram comparados com as faixas recomendadas para tendência/recuperação pela AOAC (2012) e pelo regulamento EC 401/2006. A precisão do método foi avaliada pelo coeficiente de variação de 7 repetições analíticas para cada tipo de amostra. Para a determinação dos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram realizadas 6 extrações no mesmo dia para a amostra controle de cacau e chocolate e os limites foram calculados a partir das equações: $LOD = 0 + t.s$ e $LOQ = 10.s$, onde s = desvio padrão, $t = t_{student}$ para 99% de confiança (n-1) (INMETRO, 2020).

2.4 Cálculo de estimativas de ingestão de ocratoxina A pelo consumo chocolates “*Bean to Bar*”

Foi considerada a maior concentração de ocratoxina A encontrada nas amostras de chocolates “*Bean to Bar*” avaliadas; a ingestão diária de 15,75 g de chocolate (110,25 g por semana) e o peso corpóreo (pc) de 60 kg para adultos e 15 kg para crianças para calcular a estimativa de exposição da população brasileira ao contaminante ocratoxina A, conforme a equação 1 (FAO/WHO, 2013; MDCI, 2018). O resultado da estimativa de ingestão de ocratoxina A foi comparado a ingestão semanal tolerável de 100 ng kg⁻¹ pc (CAC,2022).

$$Exposição (ng/kg pc) = \frac{Concentração \times Consumo}{Peso corpóreo} \text{ (Equação 1)}$$

Onde: concentração = maior nível encontrado do contaminante nas amostras de amêndoas de cacau analisadas (em µg kg⁻¹): consumo = quantidade ingerida do alimento no período, em kg.

3. Resultados e discussões

3.1 Resultados para validação do método para Ocratoxina A

Os resultados para a validação do método são apresentados na Tabela 7. A recuperação do padrão de OTA em matriz de amêndoas de cacau e chocolate foram realizados em 3 níveis de fortificação (1,74; 4,36 e 10,89 µg kg⁻¹). A recuperação nos níveis 1,74, 4,36 e 10,89 µg kg⁻¹ de contaminação por OTA em amostras de amêndoas de cacau (95%, 84% e 88%, respectivamente) e no chocolate (97%, 94% e 86%, respectivamente) e o coeficiente de variação (CV) para amêndoas de cacau (15%) e chocolates (13%) apresentaram valores dentro das faixas recomendadas pela AOAC (2012) e pelo Regulamento EC 401/2006 (2006) para recuperação (entre 60% e 115% e entre 70% e 110%, respectivamente) e CV (30%) para níveis entre 1 e 10 µg kg⁻¹. Os valores obtidos estiveram dentro da faixa de recuperação para níveis entre 1 e 10 µg kg⁻¹ de 70% e 110%.

O limite de detecção (LOD) obtido foi $0,04 \mu\text{g kg}^{-1}$ tanto para amêndoa quanto para chocolates, similar aos resultados obtidos por Copetti *et al.*, 2010 e 2012 de $0,01 \mu\text{g kg}^{-1}$ para amêndoas e chocolates, respectivamente. A curva analítica obtida para a quantificação de OTA usando o método por CLAE com detecção por fluorescência obteve o coeficiente de correlação (r) maior que 0,9999. No cromatograma com os picos e tempo de retenção gerados a partir da injeção do padrão de OTA e amostras de amêndoa e chocolate contaminados com OTA (Figura 12) foi observado boa separação entre os picos do padrão de OTA e dos picos da matriz das amostras de chocolate “*Bean to Bar*” e amêndoa de cacau, dentro da faixa de tempo (entre 0 e 11 min) do cromatograma.

Tabela 7. Resultados dos ensaios de recuperação ($n=3$); limite de detecção (LOD) e precisão (CV = coeficiente de variação) do método para ocratoxina A ($\mu\text{g kg}^{-1}$) em cacau e chocolate.

Parâmetro	Amêndoas	Chocolate
Recuperação	$1,7 \mu\text{g kg}^{-1}$	97 ± 4
	$4,3 \mu\text{g kg}^{-1}$	$95 \pm 0,8$
	$10,8 \mu\text{g kg}^{-1}$	84 ± 3
r	0,9999	0,9999
LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	0,04	0,04
LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	0,1	0,1
CV (%)	15	13

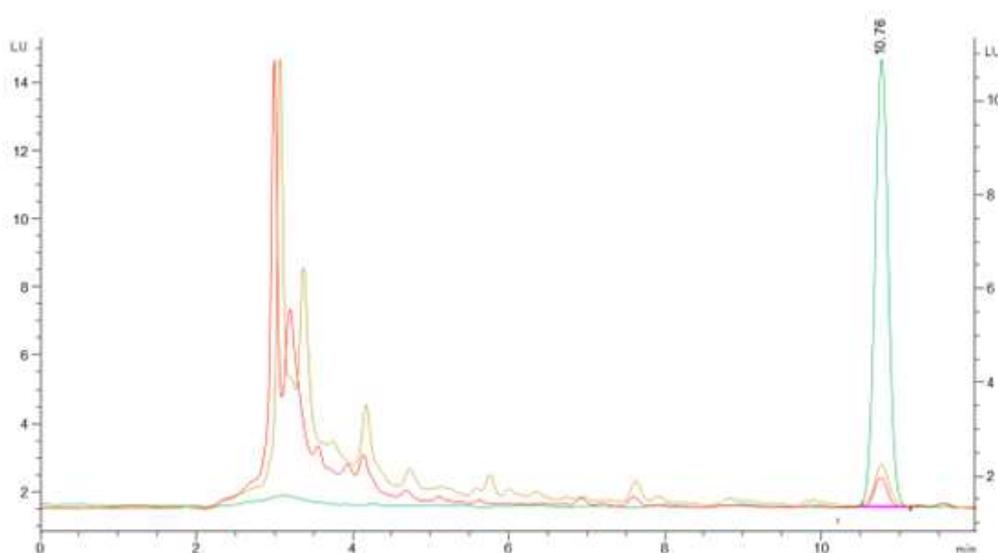


Figura 12. Cromatogramas obtido após a injeção de $10,8 \mu\text{g kg}^{-1}$ de padrão de ocratoxina A (verde), e $4,3 \mu\text{g kg}^{-1}$ em amostras de amêndoas (laranja) e em chocolates “*Bean-to-bar*” (vermelho).

3.2 Determinação de ocratoxina A em amêndoas de cacau e chocolate nas amostras obtidas durante o processamento

Foi realizado um estudo durante as etapas de processamento de amêndoas de cacau, destinada a produção de chocolate “*Bean to Bar*”, em uma fazenda produtora localizada em Arataca-BA. Este estudo foi desenvolvido durante 6 dias na etapa de fermentação até a etapa de secagem das amêndoas. A OTA foi detectada somente em uma amostra de amêndoas de cacau da etapa de secagem e obteve a concentração de $1,17 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Estudos semelhantes foram realizados por outros autores. Dano *et al.*, 2013 relataram médias menores de OTA de $0,27 \mu\text{g kg}^{-1}$ em 29 de 51 amostras da etapa de fermentação de amêndoas de cacau e $0,57 \mu\text{g kg}^{-1}$ em amêndoas de cacau secas das regiões central, oeste e sudeste da Costa do Marfim. Kedjebo *et al.*, (2016) relataram maiores médias de OTA em amostras de amêndoas de cacau de 4 ($3,63 \mu\text{g kg}^{-1}$) e 7 ($2,21 \mu\text{g kg}^{-1}$) dias de fermentação, e em amêndoas secas de três formas diferentes: com uso de peneiras ($3,01 \mu\text{g kg}^{-1}$), chão de concreto ($3,16 \mu\text{g kg}^{-1}$) e piso preto encerado ($2,58 \mu\text{g kg}^{-1}$), esse estudo ocorreu na região de Akoupé na Costa do Marfim. Champion-Martinez *et al.*, (2021) estudaram o processamento pós-colheita de amêndoas de cacau em duas fazendas no México, em uma delas, a média da OTA foi maior em sementes de cacau ($22,2 \mu\text{g kg}^{-1}$), devido a associação da presença de *A. carbonarius*, principal espécie ocratoxigênica, e ao uso de vagens danificadas. Na etapa de fermentação das amêndoas de cacau a OTA foi encontrada em menores níveis ($3,9$ e $4,4 \mu\text{g kg}^{-1}$), do que no armazenamento ($304,6$ e $11,3 \mu\text{g kg}^{-1}$), devido a presença de bactérias e leveduras que inibem o desenvolvimento de fungos ocratoxigênicos durante a fermentação, e com a diminuição da atividade de água (A_w) na etapa de secagem, restringe o desenvolvimento da microbiota competitiva mas não o suficiente para o desenvolvimento de fungos toxigênicos, que durante o armazenamento por períodos prolongados podem produzir níveis elevados de OTA.

3.3 Determinação de ocratoxina A em amêndoas de cacau e chocolate obtidas no e-commerce

Os resultados obtidos para a ocratoxina A (média e intervalo de concentração) em amostras de amêndoas de cacau procedentes de municípios do AM, BA, ES e PA são apresentados na Tabela 8. Para as amostras de amêndoas de cacau a OTA foi detectada em 13 amostras, correspondendo a 30% do total das estudadas, e estas amostras foram procedentes das regiões da BA (69%) e AM (31%).

Na região da BA foram encontrados os maiores teores de ocratoxina A em 2 amostras com concentrações de 1,17 e 1,19 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Todas as amostras de amêndoas de cacau estavam contaminadas por OTA, sendo os maiores níveis encontrados nas amostras procedentes de Arataca (média 1,16 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e os menores teores em Porto Seguro-BA (média de 0,33 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

Neste estudo, a maior concentração de OTA foi encontrada na etapa de secagem (1,17 $\mu\text{g kg}^{-1}$), considerada uma etapa crítica para o desenvolvimento de espécies toxigênicas devido à diminuição da atividade de água (A_w), o que restringe o crescimento de bactérias e leveduras que competem com fungos toxigênicos. Copetti et al. (2010) analisaram OTA em 222 amostras de amêndoas de cacau durante as etapas do processamento pós-colheita, e maiores concentrações foram encontradas em uma amostra da etapa de secagem (5,54 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e uma do armazenamento (4,64 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Champion-Martinez et al. (2021) encontraram níveis de OTA entre 1,5 e 304,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em 28 amostras de amêndoas de cacau coletadas durante as etapas de secagem e armazenamento na região de Cárdenas-Tabasco, no México. No estudo de Pires et al. (2019), foram encontrados valores médios de 0,67 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em 17 (25%) de 69 amostras de amêndoas de cacau secas provenientes da Bahia. Calderón et al. (2023) encontraram concentrações de OTA entre 2,32 e 4,77 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em 22 amostras de amêndoas de cacau do Chile. Kulahi e Kabak (2020) relataram níveis entre 0,22 e 1,08 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em 25 amostras de amêndoas de cacau da Turquia.

Os resultados da contaminação por OTA em amêndoas de cacau provenientes de 11 cidades das regiões da Amazônia, Bahia, Espírito Santo e Pará estão representados na Tabela 8. As amostras de amêndoas de cacau das cidades

das regiões do Espírito Santo (Linhares), Pará (Mocajuba e Novo Repartimento) e Amazônia (Nova Olinda) não apresentaram contaminação por OTA.

Tabela 8. Média e intervalo de concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de OTA em amêndoas de cacau de municípios das regiões da Amazônia (AM), Bahia (BA), Espírito Santo (ES) e Pará (PA).

Município	Região	Número total amostras	Número amostras positivas	Média (intervalo) ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Borba	AM	2	1	0,25 (<0,04 - 0,50)
Manicoré	AM	5	3	0,30 (<0,04 - 0,64)
Nova Olinda	AM	1	0	<0,04
Itabuna	BA	2	2	0,58 (0,23 - 0,93)
Arataca	BA	14	2	1,16 (<0,04 - 1,17)
Ibirapitanga	BA	2	2	0,76 (0,34 - 1,19)
Itajuípe	BA	1	1	0,91
Porto Seguro	BA	2	1	0,33 (<0,04 - 0,66)
Linhares	ES	2	0	<0,04
Mocajuba	PA	8	0	<0,04
Novo Repartimento	PA	1	0	<0,04

Na Tabela 9 estão apresentados os resultados obtidos para ocratoxina em amostras de amêndoas de cacau e em chocolates distribuídas por região. A OTA foi detectada em treze amostras de amêndoas e doze de chocolates, correspondendo a 30% e 18% do total de amostras estudadas, respectivamente. Em amostras da região da BA (n=32), a OTA foi detectado em 6 amostras (46%) com valor médio de $0,76 \mu\text{g kg}^{-1}$ e maior valor em amostra da cidade de Arataca ($1,17 \mu\text{g kg}^{-1}$); do ES (n=12), sendo detectada em 3 amostras (23%); do AM (n=10), sendo em 2 amostras (15%) e no PA em apenas 1 amostra.

Tabela 9. Média e intervalo de concentração ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de OTA em amêndoas de cacau (n=43) e chocolate (n=62) das regiões da Amazônia, Bahia, Espírito Santo e Pará.

Amêndoas de cacau			
Região	Número total amostras	Número amostras positivas	Média (intervalo) ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
AM	8	4	0,50 (<0,04 - 0,64)
BA	23	8	0,76 (<0,04 - 1,17)
ES	2	0	<0,04
PA	10	0	<0,04
Chocolates “Bean to Bar”			
Região	Número total amostras	Número amostras positivas	Média (intervalo) ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
AM	9	2	0,50 (<0,04 - 0,16)
AP	1	0	<0,04
BA	34	6	0,01 (<0,04 - 1,11)
ES	12	3	0,11 (<0,04 - 0,48)
PA	4	1	0,06 (<0,04 - 0,24)
RO	2	0	<0,04

A média de OTA em amostras de chocolate “*Bean to Bar*” também foi maior em amostras da região da BA ($0,50 \mu\text{g kg}^{-1}$) do que no ES ($0,36 \mu\text{g kg}^{-1}$) e AM ($0,18 \mu\text{g kg}^{-1}$). Níveis de OTA em chocolates “*Bean to Bar*” ainda não foram relatados na literatura, contudo, os teores de OTA obtidos para as amostras estudadas, estão próximas as do estudo de Copetti *et al.*, (2012), que variou de $0,03$ a $0,39 \mu\text{g kg}^{-1}$ para diversos produtos derivados de amêndoas de cacau, como amostras de cacau em pó, manteiga de cacau, chocolates convencionais branco, ao leite e preto.

Os níveis de OTA encontrados nas amostras analisadas de amêndoas de cacau e chocolate não ultrapassaram os limites máximos tolerados de OTA propostos pela Instrução Normativa – IN nº 160 de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ para amêndoas de cacau e $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ para chocolates (BRASIL, 2022).

Na Tabela 10 são apresentados os resultados obtidos de OTA nos diferentes tipos de chocolates “*Bean to Bar*” estudados: branco, ao leite, meio amargo e amargo. Os maiores níveis de OTA foram obtidos nas amostras de chocolates meio amargo e amargo, indicando que quanto maior o teor de sólidos de cacau nos chocolates maior é o teor de OTA, que pode estar relacionado às falhas de produção nas etapas de pós-colheita do cacau. Alguns estudos relataram a produção de OTA pelos fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* durante as etapas de fermentação, secagem e armazenamento (Kedjebo et al. 2015; Copetti et al. 2010 e 2012; Champion-Martinez et al. 2021). No trabalho de Copetti et al., (2012) foram obtidas maiores concentrações de OTA em chocolate em pó ($0,92 \mu\text{g kg}^{-1}$), chocolate preto ($0,87 \mu\text{g kg}^{-1}$) e manteiga de cacau ($0,60 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Tabela 10. Ocratoxina A em amostras de chocolates “*Bean to Bar*” branco, ao leite, meio amargo e amargo.

Tipo	Sólidos de cacau (%)	Número total amostras	Número amostras positivas	Média (intervalo, $\mu\text{g kg}^{-1}$)
Branco	0	2	0	<0,04
Ao leite	40-50	13	4	0,06 (<0,04 - 0,43)
Meio amargo	50-70	16	2	0,09 (<0,04 - 1,11)
Amargo	70-100	32	8	0,08 (<0,04 - 0,58)

3.4 Avaliação da estimativa de exposição a ocratoxina A pelo consumo de chocolate “*Bean to Bar*”

Os resultados calculados para a estimativa de exposição a OTA são apresentados na Tabela 11. Para o cálculo foi considerado o maior valor encontrado de ocratoxina A para uma amostra da região da Bahia ($1,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ ou 1100 ng kg^{-1}). Como ainda não estão disponíveis na literatura os dados de consumo de chocolate “*Bean to Bar*”, a estimativa de exposição e de ingestão de ocratoxina foi calculada considerando o maior consumo médio anual de chocolate amargo convencional do Brasil, da grande São Paulo que é de $5,75 \text{ kg}$ (média de $15,75 \text{ g}$ dia e $110,25 \text{ g}$ semana); indivíduos adultos com 60 kg de peso corporal e crianças com 15 kg (MDCI, 2018). O resultado da estimativa de ingestão de OTA foi

comparado à PTWI de 120 ng kg⁻¹ pc (EU, 2006); e a PTWI de 100 ng kg⁻¹ (0,1 µg kg⁻¹ pc) (CAC 2022).

Tabela 11. Resultados obtidos a partir do cálculo da estimativa de ingestão de ocratoxina A em chocolates “*Bean to Bar*” considerando o maior nível encontrado nas amostras estudadas (1100 ng kg⁻¹) e o consumo de 110,25 g (semanal) de chocolate por adultos (60 kg) e crianças (15 kg).

Agência	Origem chocolate	Ocratoxina A (ng kg ⁻¹)	Adulto (60 kg)		Crianças (15 kg)	
			Estimativa Ingestão Semanal (ng kg ⁻¹)	% PTWI	Estimativa Ingestão Semanal (ng kg ⁻¹)	% PTWI
EFSA	Bahia	1100	14,15	14	56,60	47
JECFA	Bahia	1100	14,15	12	56,60	57

PTWI (Provisory Tolerable Week Intake) = 120 ng kg⁻¹ (EFSA, 2006); 100 ng kg⁻¹ (JECFA, 2001).

A maior concentração obtida de OTA foi de 1,1 µg kg⁻¹ (1100 ng kg⁻¹) e foi encontrada em amostra de chocolate “*Bean to Bar*” meio amargo e preto, da região da Bahia. A partir do cálculo da estimativa de ingestão semanal para OTA foi possível verificar que a ingestão semanal de OTA, considerando apenas o consumo de chocolates “*Bean to Bar*”, apresenta uma contribuição para a ingestão semanal tolerável provisória para adultos de 12 - 14 % (EFSA e JECFA), enquanto para crianças de 47 - 57% (EFSA e JECFA).

4. Conclusões

O método utilizando coluna de imunoafinidade e CLAE com detecção por fluorescência para determinação de ocratoxina A em amêndoas de cacau e chocolate “*Bean to Bar*” foi validado e apresentou resultados satisfatórios para o estudo da ocratoxina A nas amostras de amêndoas de cacau e em chocolates. Os valores de recuperação obtidos variaram de 84% e 97%; limite de detecção de 0,04 µg kg⁻¹; limite de quantificação de 0,1 µg kg⁻¹ e precisão de 15% e 13%, respectivamente.

Os resultados deste estudo mostraram que as maiores concentrações de ocratoxina A foram encontrados em amostras de amêndoas de cacau e de chocolates “*Bean to Bar*” procedentes da região da Bahia. Todas as amostras analisadas tanto para amêndoas como no chocolate “*Bean to Bar*”, não ultrapassaram o limite máximo estabelecido pela legislação brasileira de 10 e 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. A estimativa de ingestão apresentou níveis seguros abaixo do PTWI. Os níveis baixos para OTA em amêndoas de cacau destinadas à produção de chocolate “*Bean to Bar*” são esperados, já que no processamento das amêndoas há um controle mais rígido durante as etapas (colheita, fermentação, secagem e armazenamento) se comparado com o processamento das amêndoas destinadas ao chocolate convencional, além de ser cuidadosamente separadas das amêndoas com sinais de injúrias e defeitos de tamanho e achatamento. No entanto, o monitoramento durante o processamento pós-colheita das amêndoas de cacau é imprescindível.

5. Referências

- Agriopoulou, S.; Stamatelopoulou, E.; Varzakas, T. Advances in occurrence, importance, and mycotoxin control strategies: Prevention and detoxification in foods. *Foods*, 9(2), 137, 2020.
- Amelin, V. G.; Karaseva, N. M.; Tretyakov, A. V. Simultaneous determination of trichothecene micotoxins, ochratoxin A, and zearalenone in grain and products of its processing, feed premixes, and meat by gas chromatography. *Journal of Analytical Chemistry*, 68(1), 61–7, 2013.
- AOAC International., Official methods of analysis of AOAC International, in Guidelines for Standard Method Performance Requirements (Appendix F). Gaithersburg: AOAC International, 2012.
- BRASIL. Instrução Normativa - IN n 160. Diário Oficial da União. 1 jul. 2022.
- Brera, C.; Debegnach, F.; De Santis, B.; lafrate, E.; Pannunzi, E.; Berdini, C.; Miraglia, M. Ochratoxin A in cocoa and chocolate products from the Italian market: Occurrence and exposure assessment. *Food Control*, 22(10), 1663-1667, 2011.
- CAC - Codex Alimentarius Commission. Joint FAO/WHO food standards programme codex committee on contaminants in foods. 15 session. Virtual, 9-13 and 24 May. 2022

- Campone, L.; Piccinelli A. L.; Celano R.; Pagano I.; Russo M.; Rastrelli L. Rapid and automated on-line solid phase extraction HPLC-MS/MS with peak focusing for the determination of ochratoxin A in wine samples. *Food Chemistry*, 244:128–35, 2018.
- Champion-Martínez, E. I.; González-Ríos, O.; Noël, D.; Meile, J. C.; Fernández, F. J.; Alter, P.; Montet, D.; Suarez-Quiroz, M. L. Occurrence and distribution of ochratoxin A-producing fungi during post-harvest process of cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Research Square*, 2021
- Copetti, M. V.; Pereira, J. L.; Iamanaka, B. T.; Pitt, J. I.; Taniwaki, M. H. Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in cocoa during farm processing. *International journal of food microbiology*, 143(1-2), 67-70, 2010.
- Copetti, M. V.; Iamanaka, B. T.; Pereira, J. L.; Lemes, D. P.; Nakano, F.; Taniwaki, M. H. Co-occurrence of ochratoxin A and aflatoxins in chocolate marketed in Brazil. *Food Control*, 26(1), 36-41, 2012.
- Comissão Europeia (CE) n.º 1881/2006 da Comissão, de 19 de dezembro de 2006, que fixa teores máximos de determinados contaminantes nos gêneros alimentícios. *Jornal Oficial da Comunidade Europeia*, L 364: 05-24, 2006.
- Dano, S. D.; Manda, P.; Dembélé, A.; Abla, A. M. J. K.; Bibaud, J. H.; Gouet, J. Z.; Sika, C. B. Z. M. Influence of fermentation and drying materials on the contamination of cocoa beans by ochratoxin A. *Toxins*, 5(12), 2310-2323, 2013.
- EFSA. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to ochratoxin A in food. *EFSA Journal*, 4(6), 365, 2006.
- Fabiani, A.; Corzani, C.; Arfelli, G. Correlation between different clean-up methods and analytical techniques performances to detect Ochratoxin A in wine. *Talanta*. 83(1), 281–5, 2010.
- European Commission (EC). Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union*, 70, 12-34, 2006.
- FAO/WHO - Food Agriculture Organization/World Health Organization. Joint FAO/WHO Expert Committee on food additives, seventy-seventh meeting, summary and conclusions. Rome (Italy): Joint FAO/WHO Food Standards Programme. (JECFA/77/SC Rev. 1), 2013.
- GILLER, M. Bean-to-bar chocolate: America's craft chocolate revolution: the origins, the makers, and the mind-blowing flavors. North Adams, MA: Storey Publishing, 2017.

- INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. DOQ-CGCRE-009 - Orientação sobre validação de métodos analíticos. 2020.
- Joint FAO/WHO Expert Committee of Food Additives (JECFA). In “Safety evaluations of specific mycotoxin”, prepared by the fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 6-15 February, Geneva, 2001.
- Kedjebo, K. B. D.; Guehi, T. S.; Kouakou, B.; Durand, N.; Aguilar, P.; Fontana, A.; Montet, D. Effect of post-harvest treatments on the occurrence of ochratoxin A in raw cocoa beans. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 33(1), 157-166, 2016.
- Kulahi, A.; Kabak, B. A preliminary assessment of dietary exposure of ochratoxin A in Central Anatolia Region, Turkey. *Mycotoxin research*, 36, 327-337, 2020.
- Li, X.; Ma, W.; Ma, Z.; Zhang, Q.; Li, H. Recent progress in determination of ochratoxin a in foods by chromatographic and mass spectrometry methods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(20), 5444-5461, 2022.
- MDCI – Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços. Cacau e Chocolate no Brasil: Desafios na Produção e Comércio Global. Brasília, dezembro de. 128 p, 2018. <https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000366689/> (Acesso em 24/01/23).
- Muñoz-Solano, B.; González-Peñas, E. Mycotoxin determination in animal feed: An LC-FLD method for simultaneous quantification of aflatoxins, ochratoxins and zearalanone in this matrix. *Toxins*, 12(6), 374, 2020.
- Ostry, V.; Malir, F.; Toman, J.; Grosse. Micotoxins as human carcinogens-the *IARC Monographs* classification. *Mycotoxins Res*, 33, 65-73, 2017.
- Pichon, V.; Combes A. Selective tools for the solid-phase extraction of Ochratoxin A from various complex samples: Immunosorbents, oligosorbents, and molecularly imprinted polymers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(25), 6983–99, 2016.
- Pires, P. N.; Vargas, E. A.; Gomes, M. B.; Vieira, C. B. M.; Santos, E. A. D.; Bicalho, A. A. C.; Trovatti, U. A. P. Aflatoxins and ochratoxin A: occurrence and contamination levels in cocoa beans from Brazil. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 36(5), 815-824, 2019.
- Quintela, S.; Villarán, M. C.; Armentia, I. L.; Elejalde, E. Occurrence of ochratoxin A in Rioja alavesa wines. *Food Chemistry*, 126(1):302–5, 2011.

- Rodriguez-Cabo, T.; Rodriguez I.; Ramil M.; Cela, R. Liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry selective determination of ochratoxin A in wine. *Food Chemistry*. 199, 401–8, 2016.
- Turcotte, A.; Scott, P. M.; Tague, B. Analysis of cocoa products for ochratoxin A and aflatoxins, *Mycotoxin Res*, 29, 193-201, 2013.
- Xiao, M. W.; Bai, X. L.; Liu, Y. M.; Yang L.; Liao, X. Simultaneous determination of trace Aflatoxin B1 and Ochratoxin A by aptamer-based microchip capillary electrophoresis in food samples. *Journal of Chromatography A* 1569 :222–8, 2018.

CONCLUSÃO GERAL

Os métodos para determinação dos elementos traço As, Cd, Cu e Pb em amêndoas por ICP OES; As, Cd, Co, Cu, Hg, Pb e Se em chocolates “*Bean to Bar*” por ICP-MS e ocratoxina A em amêndoas de cacau e em chocolates “*Bean to Bar*” por HPLC-FLD com detecção por fluorescência, mostraram-se eficazes, apresentando valores satisfatórios na validação para recuperação (entre 84% e 105%) e coeficiente de variação (<14% para elementos traço e <15% para OTA).

Não foram encontrados níveis elevados de As, Hg e Pb em amostras de amêndoas de cacau e chocolates “*Bean to Bar*”. Para Cd foram encontrados teores que ultrapassaram os limites máximos das legislações brasileiras e europeia (0,3 e 0,6 mg kg⁻¹, respectivamente) para amêndoas e para chocolates (0,4 mg kg⁻¹), principalmente nas amostras procedentes da região da Amazônia. Os teores dos elementos traço e de ocratoxina A são mais elevados em amêndoas, indicando que ocorre uma diminuição durante o processamento até a obtenção do chocolate. Considerando as amostras de chocolate “*Bean to Bar*” com maiores teores de cádmio (0,74 mg kg⁻¹) e de Co (1,88 mg kg⁻¹) encontrados neste estudo, o consumo superior a 15,75 g diário pode atingir 94% da PTMI para Cd e 123% para Co, para crianças. Estes resultados indicam que um consumo elevado de chocolate por crianças pode representar um risco.

Durante o pré-processamento das amêndoas de cacau destinadas à produção de chocolates “*Bean to Bar*”, a ocratoxina A pode ser produzida tanto durante a etapa de secagem quanto de armazenamento. No entanto, é importante destacar que os níveis encontrados foram considerados seguros para o consumo. Ainda assim, é recomendado manter um controle rotineiro dos parâmetros que influenciam o crescimento dos microrganismos produtores dessa toxina.

Devido à escassez de dados disponíveis sobre os contaminantes presentes nas amêndoas de cacau, é fundamental que os fabricantes de chocolate “*Bean to Bar*” façam a escolha criteriosa da origem das amêndoas. Dessa forma, poderão

atender às exigências de níveis seguros de contaminantes, visando garantir a segurança alimentar da população.