

Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

Avaliação da presença de hidrocarbonetos policíclicos
aromáticos em chocolates: Exposição ao consumo e
implicações à saúde.

Glória Maria Guizellini

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Nutrição em Saúde Pública da
Faculdade de Saúde Pública da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências.

Área de concentração: Nutrição.

Orientadora: Prof^ª. Assoc. Elizabeth
Aparecida Ferraz da Silva Torres.

São Paulo

2020

Avaliação da presença de hidrocarbonetos policíclicos
aromáticos em chocolates: Exposição ao consumo e
implicações à saúde.

Glória Maria Guizellini

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Nutrição em Saúde Pública da
Faculdade de Saúde Pública da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências.

Área de concentração: Nutrição.

Orientadora: Prof^a. Assoc. Elizabeth
Aparecida Ferraz da Silva Torres.

São Paulo

2020

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

DEDICATÓRIA

*À minha mãe Márcia, uma mulher excepcional,
seus sorrisos e palavras acalmam meu coração
e alegam os meus dias.*

*A minha irmã Victória, minha maior
incentivadora.*

A minha irmã Emanuelle, luz da minha vida.

*Ao meu pai Roberto, sempre interessado nos
meus feitos.*

*Sem o amor de vocês, tudo isso seria um
desperdício.*

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Márcia, por todo amor, dedicação, carinho, leveza e auxílio. Mamãe, mesmo sabendo que este seria o caminho mais longo e árduo da minha carreira profissional você sempre me deu suporte, como em tudo na minha vida. Te amo e nunca serei capaz de demonstrar o quanto te admiro.

À minha irmã Victória, pelo amor, cuidado, por me escutar e por ter paciência comigo em meus momentos de maior necessidade. Te amo Tata e espero que sempre possa te deixar orgulhosa.

À minha irmã Emanuelle, pelo amor e pela felicidade de tê-la me esperando todos os dias após longas horas de aulas e experimentos. Manu, você é a luz dos meus dias e o meu maior incentivo.

Ao meu pai Roberto, pelo amor e entendimento. Papai, obrigada pelos seus esforços, pois mesmo longe sei que suas filhas são o seu maior tesouro.

À minha avó Maria, pelo amor, sua escuta atenta a tudo que faço e seus jantares quentinhos. Te amo vovó, obrigada.

À querida Professora Elizabeth Torres, pela oportunidade de ser sua aluna desde a iniciação científica, permitindo que eu continuasse a me dedicar à ciência e a pesquisa no mestrado. Obrigada pela paciência, incentivo e orientação. Minha gratidão será eterna.

À Dra Geni Sampaio, por toda dedicação, carinho, aprendizado, conselhos e orientação. Obrigada Gê, devo a você meu amadurecimento como profissional e tenho por você um carinho de filha. Serei sempre muito grata.

À MSc Simone Alves, uma verdadeira mestre, dedicada, tão amável e paciente. Muito obrigada Si, você foi essencial para mim, sem suas orientações, lições e ajuda este trabalho não seria o mesmo. Serei sempre muito grata.

Aos membros da banca, Dr Eduardo Purgatto, Dra Suzana Lannes e Dra Tatiana Saldanha por aceitarem o convite e contribuírem com as correções e o aprimoramento deste trabalho. Obrigada.

À Dra Adriana Palma e toda a equipe do Instituto Adolfo Lutz, por me receberem de portas abertas e tão gentilmente me ajudar com todos os meus questionamentos sobre os HPAs. Vocês foram de extrema importância para o este trabalho. Muito obrigada.

Às queridas Dra Rosana e Dra Liania, pelo carinho, paciência e ajuda com toda e qualquer coisa, mesmo as mais simples. Obrigada Rô e Li, vocês são muito especiais.

Àos meus incríveis e queridos amigos, Ana Clara, Karina, Maiara, Marcela e Leonardo, por toda a alegria, leveza, aprendizado, suporte e cafés da tarde tão especiais e deliciosos. Vocês foram e são importantíssimos para mim.

À Faculdade de Saúde Pública e a todos aqueles que fazem desta instituição um grande agregado de pessoas e conhecimentos importantíssimos para a ciência e pesquisa no Brasil.

E a Deus, por se apresentar em todas as pessoas e coisas que me auxiliaram nesta jornada.

Agradeço imensamente.

RESUMO

GUIZELLINI, G. M. Avaliação da presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em chocolates: Exposição ao consumo e implicações à saúde. 2020. Dissertação - Faculdade de Saúde Pública da USP, São Paulo, 2020.

Introdução – Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos que apresentam ação potencialmente carcinogênica e mutogênica, que geram risco à saúde humana. Esses contaminantes são formados a partir da combustão incompleta de matéria orgânica, podendo ocorrer a formação durante o processamento dos alimentos em âmbito industrial (secagem, torra, pré-cozimento) e doméstico (fritar, assar e grelhar) pelo emprego de altas temperaturas. Para a produção do chocolate e outros produtos derivados do cacau, etapas como a secagem, torra e conchagem, são processos que utilizam altas temperaturas e essenciais para a produção de chocolates. Não existem estudos avaliando a presença e a exposição dietética por HPAs em chocolates no Brasil. **Objetivo** – Otimizar e validar a metodologia de extração e quantificação de 4 HPAs (benzo[a]antraceno (BaA), criseno (Cri), benzo[b]fluoranteno (BbF) e benzo[a]pireno (BaP)) em chocolates, quantificar sua presença em amostras de chocolates comerciais e estimar a exposição dietética aos HPAs a partir do consumo de chocolate. **Métodos** – As amostras de chocolate (ao leite, branco e amargo com porcentagens de cacau de 40%, 53%, 55%, 60% e 70%) foram obtidas no comércio da cidade de São Paulo. Foi realizada a otimização e validação da metodologia pelos parâmetros de linearidade, seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, recuperação e repetibilidade. As amostras foram submetidas a extração líquido-líquido, extração em fase sólida e quantificadas por cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de fluorescência. A estimativa de exposição dietética (DEs) para benzo[a]pireno foi avaliada para três categorias: 1) Sexo (feminino e masculino); 2) Grupos etários: adolescentes (14 a 18 anos), adultos (19 a 59 anos) e idosos (≥ 60 anos); 3) Local de residência (urbana e rural). **Resultados** – O método obteve faixa de linearidade entre 0,50 e 5,00 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ para os quatro HPAs. Com relação à seletividade, houve interferência da matriz apenas para o BaP. O método também mostrou acurácia, com recuperações médias variando entre 95,25 a 108,27 % e repetibilidade mostrando valores entre 0,14 e 7,25 %. Benzo[a]pireno foi encontrado em todos os chocolates, variando entre 1,58 a 4,34 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de gordura. As amostras de chocolate com 53-60 % cacau e chocolate 70 % cacau apresentaram as maiores taxas de contaminação para BaP; já as amostras de chocolate 40 % cacau e chocolate ao leite apresentaram menor contaminação. Quanto a exposição dietética, as mulheres (por gênero) e os adolescentes (por idade) apresentaram maiores DEs para BaP pelo consumo de chocolate, principalmente para o chocolate 70 % cacau. Os resultados apresentaram baixa contaminação por HPAs nos chocolates analisados, no entanto, o consumo aumentado por diferentes faixas etárias pode contribuir para a DEs ao BaP. **Conclusões** - A metodologia padronizada foi considerada seletiva e sensível, garantindo a eficiência do ensaio. As amostras analisadas apresentaram resultados abaixo dos limites estabelecidos pelo Regulamento da Comunidade Européia No. 835/2011 para o BaP e para

a soma dos 4 HPAs. Frente aos grupos analisados (sexo, idade e local de residência), os chocolates 70 % cacau contribuíram para a maior exposição dietética à BaP. A presença dos quatro HPAs prioritários nos chocolates analisados demonstrou a importância de programas de monitoramento da cadeia produtiva em produtos de cacau (massa de cacau, manteiga de cacau e cacau em pó) e ingredientes adicionados (açúcar e leite em pó).

Descritores: chocolate; cacau; hidrocarbonetos policíclicos aromáticos; benzo(a)pireno.

ABSTRACT

GUIZELLINI, G.M. Evaluation of the presence of polycyclic aromatic hydrocarbons in chocolates: Exposure to consumption and health implications. [Dissertation]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 2020. Portuguese.

Introduction - Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are compounds that have a potentially carcinogenic and mutagenic action, which generate risk to human health. These contaminants are formed from the incomplete combustion of organic matter, which can occur during industrial (drying, roasting, pre-cooking) and domestic (frying, roasting and grilling) processing of food by the use of high temperatures. For the production of chocolate and other products derived from cocoa, steps such as drying, roasting and conching are processes that use high temperatures and are essential for the production of chocolates. There are no studies evaluating the presence and dietary exposure to PAHs in chocolates in Brazil. **Objective** - To optimize and validate the methodology for the extraction and quantification of 4 PAHs (benzo[a]anthracene (BaA), chrysene (Chr), benzo[b]fluoranthene (BbF) and benzo[a]pyrene (BaP)) in chocolates, quantify the presence in commercial chocolate samples and estimate dietary exposure to PAHs from the consumption of chocolate. **Methods** - Chocolate samples (milk, white and dark with cocoa percentages of 40%, 53%, 55%, 60% and 70%) were obtained from commercial stores in the city of São Paulo. The methodology was optimized and validated by the parameters of linearity, selectivity, limit of detection, limit of quantification, recovery and repeatability. The samples were subjected to liquid-liquid extraction, solid-phase extraction and quantified by a High Performance Liquid Chromatograph with fluorescence detector. The dietary exposure estimate (DEs) for benzo[a]pyrene was assessed for three categories: 1) Gender (female and male); 2) Age groups: adolescents (14 to 18 years), adults (19 to 59 years) and elderly (≥ 60 years); 3) Place of residence (urban and rural). **Results** - The method obtained a linearity range between 0.50 and 5.00 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ for the four PAHs. Regarding selectivity, there was interference from the matrix only for BaP. The method also showed accuracy, with average recoveries ranging from 95.25 to 108.27% and repeatability showing values between 0.14 and 7.25%. Benzo[a]pyrene was found in all chocolates, ranging from 1.58 to 4.34 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ of fat. Chocolate samples with 53-60% cocoa and chocolate 70% cocoa showed the high contamination for BaP; the 40% cocoa and milk chocolate samples showed low contamination. As for dietary exposure, women (by gender)

and adolescents (by age) had higher DEs for BaP due to chocolate consumption, especially for 70% cocoa chocolate. The results showed low contamination by PAHs in the analyzed chocolates, however, the increased consumption by different age groups can contribute to DEs to BaP. **Conclusions** - The standardized methodology was considered selective and sensitive, ensuring the efficiency of the test. The analyzed samples showed results below the limits established by the European Community Regulation No. 835/2011 for the BaP and for the sum of the 4 PAHs. In view of the groups analyzed (gender, age and place of residence), chocolates 70% cocoa contributed to the greater dietary exposure to BaP. The presence of the four priority PAHs in the analyzed chocolates demonstrated the importance of programs to monitor the production chain in cocoa products (cocoa mass, cocoa butter and cocoa powder) and ingredients used in chocolate formulation (sugar and powdered milk).

Keywords: chocolate; cocoa; polycyclic aromatic hydrocarbons; benzo(a)pireno.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos	18
1.2	Propriedades físico-químicas dos HPAs	19
1.3	Métodos analíticos e tendências nas pesquisas de HPAs	21
1.4	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos: fontes emissoras e formação em alimentos 23	
1.5	Exposição dietética por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos.....	24
1.6	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em chocolates	25
1.7	Do cacau ao chocolate: produção e consumo no Brasil	28
1.8	Etapas de produção do chocolate.....	30
1.8.1	Fermentação	32
1.8.2	Secagem.....	32
1.8.3	Torrefação	32
1.8.4	Alcalinização.....	33
1.8.5	Descasque e moagem	33
1.8.6	Prensagem	33
1.8.7	Adição de ingredientes	34
1.8.8	Conchagem.....	34
1.8.9	Temperagem e modelagem do chocolate	35
1.9	Limites regulamentados de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em chocolates 35	
1.10	Efeitos dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos na saúde: Benzo[a]pireno: fases de biotransformação no organismo humano	36
1.11	Epidemiologia do câncer no Brasil.....	40
2	JUSTIFICATIVA	42
3	OBJETIVOS	43
3.1	OBJETIVO GERAL	43
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
1	MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1	MATERIAL	44
4.1.1	Amostras.....	44
4.2	MÉTODOS	47
4.2.1	Saponificação, extração e purificação de HPAs em chocolates.	47

4.2.2 Validação.....	47
4.2.3 Condições cromatográficas e identificação dos compostos	49
4.2.4 Extração de lipídeos totais por soxhlet	50
4.2.5 Exposição dietética diária a HPAs pelo consumo de chocolate	50
4.2.5 Análise dos resultados	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1 PRIMEIRO ARTIGO	52
5.2 SEGUNDO ARTIGO	70
6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	93
7 REFERÊNCIAS REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	94
APÊNDICES	99
APÊNDICE 1 – Lipídeos totais (g / 100g de chocolate) e concentração de HPAs ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) das amostras de chocolate ao leite, chocolate amargo/ meio amargo e branco.....	99
APÊNDICE 2 - Valores de exposição dietética diária ao BaP ($\mu\text{g.kg}^{-1}$ dia) de acordo com sexo feminino (F) e masculino (M); idades (adolescentes (14 a 18 anos), adultos (19 a 59 anos) e idosos (≥ 60 anos)) e local de residência (urbana e rural).	100
APÊNDICE 3 – Valores de exposição dietética diária a soma dos 4 HPAs ($\mu\text{g.kg}^{-1}$ dia) de acordo com sexo feminino (F) e masculino (M); idades (adolescentes (14 a 18 anos), adultos (19 a 59 anos) e idosos (≥ 60 anos)) e local de residência (urbana e rural).	101
CURRÍCULO LATTES	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química dos 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos segundo a regulamentação da Comissão Europeia (EC).	20
Figura 2 - Tipos de cacau: Criollo (A), Forastero (B) e Trinitário (C).....	28
Figura 3 - Empresas de chocolate com maior participação no mercado brasileiro em 2017.	29
Figura 4 - Etapas de processamento de cacau e produção do chocolate e pontos críticos para a formação/contaminação por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos.....	30
Figura 5 - Fase I do metabolismo do Benzo[a]pireno.	37
Figura 6 - Vias de ativação do Benzo[a]pireno.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Carcinogenicidade de 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos segundo a <i>International Agency for Research on Cancer</i>	19
Tabela 2 - Adsorventes C18 e sílica e aplicações.	22
Tabela 3 - Valores máximos de benzo[a]pireno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluorantano e criseno em grãos de cacau e produtos derivados do cacau de acordo com a Regulamentação N° 835 de 2011 da Comissão Europeia (EC).	36
Tabela 4 - Amostras de acordo com tipo de chocolate, teor de cacau, ingredientes, data de validade e lote.....	45
Tabela 5 - Faixa de trabalho e níveis de concentração do padrão de HPAs para os parâmetros de validação: seletividade, linearidade, exatidão e repetibilidade.	49
Tabela 6 - Gradiente de eluição da fase móvel para análise de HPAs.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBULOS.

ANOVA	Análise unidirecional de variância
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>Ataxia telangiectasia Rad3-related</i>
BaA	Benzo[a]antraceno
BaP	Benzo[a]pireno
BbF	Benzo[b]fluoranteno
CE	Comissão Europeia
Cri	Criseno
CG-MS	Cromatografia Gasosa com detector de massas
DCNT	Doenças Crônicas Não Transmissíveis
EROS	Espécies reativas de oxigênio
EH	Epóxido hidrolase
HPAs	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
HPLC-FL	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IPCS	<i>International Programme on Chemical Safety</i>
POF	Pesquisa de Orçamentos Familiares
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
UHPLC	<i>Ultra-high performance liquid chromatography</i>
kg	Quilograma
mg/L	Miligrama por litro
°C	grau Celsius
$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	Micrograma por quilograma
g	Gramma
$\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	Nanograma por mililitro
μm	Micrometro
mm	Milímetro

%	Porcento
M	Molar
Nm	Nanometro

APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Os resultados da dissertação estão estruturados no formato de artigos científicos, de acordo com as normas do Programa de Pós-graduação em Nutrição em Saúde Pública da FSP-USP. O trabalho contempla os seguintes manuscritos:

Parte da revisão de literatura descrita nessa dissertação está contemplada em um artigo de revisão realizada por nosso grupo e que está em avaliação no *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety through Scholar One Manuscripts* sob o título “*Occurrence and Contents of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Foods: Strategies to reduce the contamination; Analytical Techniques and Legislation*”.

PRIMEIRO ARTIGO

Título: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Commercial Chocolate Bars: Validation of an Analytical Method (Submetido ao Food Chemistry).

SEGUNDO ARTIGO

Título: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Brazilian Commercial Chocolate Varying in Cocoa Content: An Assessment of the Content and Dietary Exposure.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

São chamados de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) um grupo de centenas de poluentes ambientais formados a partir de processos pirolíticos. A presença dos HPAs no meio ambiente e em alimentos vêm sendo monitorada há alguns anos por apresentarem ação potencialmente carcinogênica e mutagênica (ZELINKOVA e WENZL, 2015; ABDEL-SHAFY e MANSOUR, 2016).

Agências regulamentadoras, como a Comissão Europeia (CE), estabeleceram limites máximos para quatro HPAs em alimentos, sendo eles: Benzo[a]pireno (BaP), Benzo[a]antraceno (BaA), Benzo[b]fluoranteno (BbF) e Criseno (Cri) (Tabela 1). Estes compostos são considerados pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) como possivelmente carcinogênicos (BaA, BbF e Cri) e carcinogênico para humanos, no caso do BaP. A IARC também monitora outros 12 HPAs (Tabela 1) por apresentarem potencial carcinogênico (IARC, 2010, 2012; EC, 2011).

Tabela 1 - Carcinogenicidade de 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos segundo a *International Agency for Research on Cancer*.

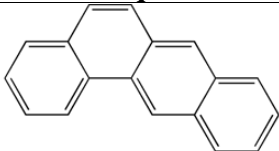
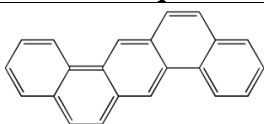
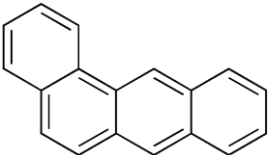
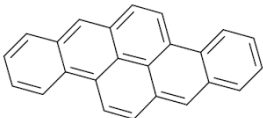
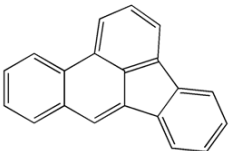
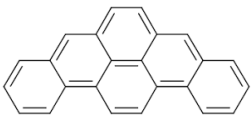
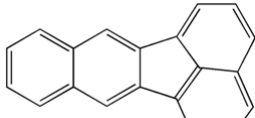
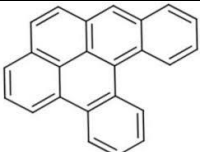
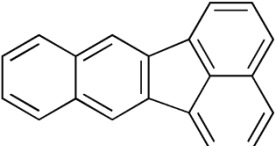
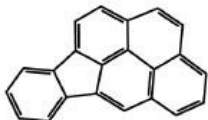
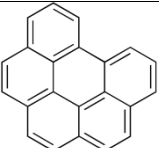
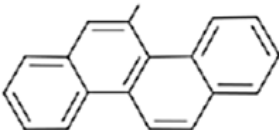
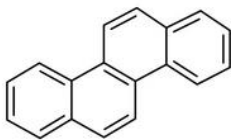
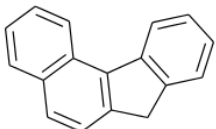
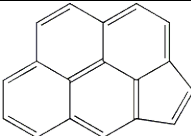
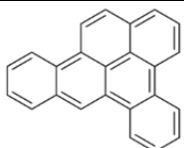
Grupo		Número de agentes total	HPAs
Grupo 1	Carcinogênico para humanos	120	Benzo[a]pireno
Grupo 2A	Provavelmente carcinogênico para humanos	82	Ciclopenta[cd]pireno Dibenzo[a,l]pireno
Grupo 2B	Possivelmente carcinogênico para humanos	311	Benzo[b]fluoranteno Benzo[k]fluoranteno Benzo[j]fluoranteno Benzo[a]antraceno Criseno 5-metilcriseno Dibenzo[a,h]antraceno Dibenzo[a,i]pireno Dibenzo[a,h]pireno Indenol[1,2,3-cd]pireno
Grupo 3	Não classificado quanto a sua carcinogenicidade para humanos	500	Benzo[ghi]perileno Dibenzo[a,e]pireno Benzo[c]fluoreno

Fonte: *International Agency for Research on Cancer* (2010), adaptado.

1.2 Propriedades físico-químicas dos HPAs

Os HPAs são compostos orgânicos formados por dois ou mais anéis aromáticos fundidos. O número de anéis benzênicos de cada HPA é utilizado para classificá-los quanto ao seu peso molecular; os HPAs leves possuem de um a quatro anéis benzênicos e os HPAs pesados possuem mais que quatro anéis benzênicos em sua estrutura química (Figura 1).

Figura 1 - Estrutura química de 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos segundo a regulamentação da Comissão Europeia (CE).

HPA	Estrutura química	HPA	Estrutura química
Benzo[a]pireno		Dibenzo[a,h]antraceno	
Benzo[a]antraceno		Dibenzo[a,h]pireno	
Benzo[b]fluoretano		Dibenzo[a,i]pireno	
Benzo[k]fluoretano		Dibenzo[a,l]pireno	
Benzo[j]fluoretano		Indenol[1,2,3-cd]pireno	
Benzo[ghi]perileno		5-metilcriseno	
Criseno		Benzo[c]fluoreno	
Ciclopenta[cd]pireno		Dibenzo[a,e]pireno	

Quanto às suas propriedades físico-químicas, os HPAs podem ser incolores, brancos ou amarelados; apresentam baixa solubilidade a água, baixa pressão de vapor e alto ponto de ebulição. De acordo com a IARC, dos 60 HPAs estudados pela agência, o Coroneno é o HPA de menor solubilidade (0,00014 mg/L) e maior ponto de ebulição (439 °C). No

entanto, muitos desses compostos ainda tem características físico-químicas não definidas (IARC, 2010; ABDEL-SHAFY e MANSOUR, 2015).

Os HPAs são conhecidos por serem compostos sensíveis a luz, ao calor e por sua alta lipofilicidade, fatores que se tornam desafios metodológicos que podem limitar o desenvolvimento de procedimentos de extração e identificação em diferentes matrizes, como veremos no tópico seguinte (IARC, 2010; ABDEL-SHAFY e MANSOUR, 2015; SUN et al., 2019).

1.3 Métodos analíticos e tendências nas pesquisas de HPAs

As metodologias para extração e purificação de HPAs em alimentos são processos trabalhosos e desafiadores. O preparo das amostras é colocado por autores como PUCARO et al. (2016) e SUN et al. (2019), como uma das etapas mais complexas e importantes da metodologia para a identificação de HPAs em matrizes alimentares. Amostras de alimentos *in natura* e alimentos processados são constituídos por uma grande variedade de macronutrientes que podem comprometer o processo de extração (PUCARO et al., 2016; SUN et al., 2019).

A remoção dos lipídeos e outros componentes da matriz deve ser realizada por métodos de extração que não removam os analitos junto a esses componentes, afetando a sensibilidade e seletividade do método. A extração líquido-líquido (amostras líquidas), extração por Soxhlet, extração acelerada por solvente e extração assistida por micro-ondas (amostras sólidas) são procedimentos já consolidados e aplicados para diversas matrizes alimentares, inclusive aquelas que apresentam quantidades de HPAs em concentrações muito baixas (PUCARO et al., 2016; AKINPELU et al., 2019; SUN et al., 2019).

Esses processos de extração, no entanto, ainda são responsáveis por comprometer o tempo de análise e utilizar solventes em excesso. Outras metodologias, como *QuEChERS* (*Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe*), ainda que bastante custosa, reduz perdas de analito, reduz o tempo de análise e o uso de solventes, facilitando a análise de HPAs em alimentos (PUCARO et al., 2016; SUN et al., 2019).

Para obter o máximo rendimento e perda mínima dos HPAs em matrizes alimentares, o método de purificação da amostra é essencial. A extração em fase sólida (Solid Phase Extraction – SPE), é uma das técnicas mais utilizadas na área por apresentar separação e concentração dos analitos de interesse. É um procedimento bastante versátil e de fácil aplicabilidade, apesar de ainda custoso. Um dos pontos críticos para o uso desta técnica é a escolha do tipo de adsorvente mais adequando à polaridade do composto de interesse (PUCARO et al., 2016; AKINPELU et al., 2019).

Os mecanismos mais comuns utilizados são os hidrofóbicos, hidrofílicos e por troca iônica, que atuam por meio de interações de fase reversa, normal e troca de íons. Em análises de HPAs em matrizes alimentares, os adsorventes mais usados são do tipo C18 e sílica, com suas especificações apresentadas na Tabela 2. No caso de alimentos como o chocolate, o adsorvente mais utilizado é a sílica, apresentando melhor custo-benefício, sensibilidade e seletividade para o método (ZIEGENHALS et al., 2009; KUMARI et al., 2012).

Tabela 2 - Adsorventes C18 e sílica e suas aplicações.

Fase	Mecanismo	Interação	Polaridade do composto	Aplicabilidade
C-18	Hidrofóbico	Fase reversa	Polares e apolares	Drogas e metabólitos, toxinas em alimentos, fármacos.
Sílica	Hidrofílico	Fase normal	Polares	Aminas, pesticidas, ácidos graxos.

Fonte: PURCARO et al., (2016); AKINPELU et al. (2019), adaptado.

Quanto às técnicas de identificação, é importante considerar instrumentos sensíveis e seletivos, já que os HPAs são substâncias que se apresentam em quantidades muito reduzidas em alguns alimentos, além de espectros únicos. A cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (*High performance liquid chromatography - fluorescence detection* - HPLC-FL) e cromatografia gasosa com detector de massas (*gas chromatography with mass spectrometry* - CG-MS) são dois instrumentos utilizados para a identificação e quantificação de HPAs em amostras de alimentos. As colunas C18, algumas específicas para HPAs, também contribuem para o aprimoramento das técnicas de

identificação de HPA em HPLC-FL. Essas colunas ajudam na melhor separação e diferenciação entre picos comumente eluídos em outras técnicas de identificação (GIKA et al., 2016; PURCARO et al., 2016).

A redução do tempo de leitura das amostras é uma tendência na otimização na área de identificação de HPAs em matrizes alimentares. A técnica de cromatografia líquida de alta performance (*Ultra-high performance liquid chromatography* - UHPLC) reduz significativamente o tempo de análise e possibilita uma considerável economia de solventes. Sendo assim, o UHPLC é uma tendência na otimização de técnicas de análise de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PUCARO et al., 2016; SUN et al., 2019). O potencial carcinogênico dos HPAs estimulou o desenvolvimento de mais pesquisas na área e melhoria das metodologias aplicadas a esses analitos. Na busca por mais informações sobre estes contaminantes, sua formação e fontes emissoras podem ajudar no desenvolvimento de novas metodologias. Veremos a seguir então, como os HPAs são formados.

1.4 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos: fontes emissoras e formação em alimentos

Os HPAs estão distribuídos no meio ambiente, presentes no ar, água, solo e em alimentos. Sua formação ocorre durante processos de combustão e pirólise de matéria orgânica, a partir de três fontes: ambiental, petrogênica e pirogênica (ZELINKOVA e WENZL, 2015; ABDEL-SHAFY e MANSOUR, 2016).

HPAs provenientes de fontes ambientais são aqueles formados a partir da combustão natural da matéria orgânica em incêndios florestais não propositais, erupções vulcânicas, síntese de bactérias e algas. A presença de HPAs no ambiente seria extremamente reduzida se sua formação dependesse apenas de fontes ambientais, com redução significativa da exposição humana a esses contaminantes. Já as fontes petrogênicas são provenientes da queima de petróleo, carvão mineral e indústrias de beneficiamento de matérias-primas diversas. Esses processos são intencionais, realizados durante a produção de combustíveis fósseis, assim como para a obtenção de hidrocarbonetos leves utilizados na formulação de corantes, tintas, material plástico e fármacos (MAFRA, AMARAL e OLIVEIRA, 2010; ZELINKOVA e WENZL, 2015; ABDEL-SHAFY e MANSOUR, 2016).

As fontes petrogênicas são responsáveis por contribuir com a maior parcela de formação de HPAs e com sua distribuição no ar, solo e água. Esses contaminantes têm efeito acumulativo no meio ambiente, portanto, presentes também nos alimentos (frutas, legumes, cereais, leguminosas e animais utilizados para a alimentação humana). Não o bastante, a grande maioria desses alimentos são submetidos a tratamentos térmicos formadores de HPAs, sendo essas as chamadas fontes pirogênicas (MAFRA, AMARAL e OLIVEIRA, 2010; ZELINKOVA e WENZL, 2015; ABDEL-SHAFY e MANSOUR, 2016).

Fontes pirogênicas são derivadas de processos utilizados pela indústria de beneficiamento de alimentos, como secagem, fermentação, torra, defumação, que se baseiam no uso de altas temperaturas. Além destes, outros processos realizados em ambiente domiciliar, como cozinhar, fritar, assar (gás natural e carvão vegetal) e grelhar, também são responsáveis por gerar HPAs, diferente do monitoramento mais rígido que ocorre nas indústrias de alimentos (ROSE et al., 2015; SINGH e AGARWAL, 2019). Estudos como os de ABDEL-SHAFY e MANSOUR (2016) e CHENG et al. (2019) mencionam que a formação de HPAs em alimentos ocorre em temperaturas maiores ou iguais a 200°C. HWANG et al. (2019), porém verificaram a presença de HPAs pesados, como BaP, a temperaturas mais baixas (65°C e 100°C) durante a avaliação dos 4 HPAs prioritários em pimentas vermelhas submetidas a diferentes níveis de secagem.

A presença de HPAs em diversos alimentos já foi verificada, como é o caso do leite em pó (GARCIA LONDOÑO et al., 2013), açúcar refinado, açúcar cristal, açúcar demerara e açúcar mascavo (TFOUNI e TOLEDO, 2007), pães (REY-SALGUEIRO et al., 2008), café (ORECCHIO et al., 2009) e óleos vegetais (SILVA et al., 2017). Outros alimentos submetidos a condições de tratamento térmico doméstico como carne de porco, salsichas, hambúrgueres, frango, cordeiro, peixes e pescados (ROSE et al., 2015), também apresentaram quantidades significativas de HPAs.

1.5 Exposição dietética por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

A grande maioria dos alimentos é submetida a tratamentos térmicos durante o processo de produção, porém pouco se sabe sobre quanto e como esses procedimentos podem contribuir para a exposição humana aos HPAs. A avaliação de exposição alimentar

ainda é um tópico pouco explorado na literatura, já que são necessários dados antropométricos (medidas aferidas de peso e altura), valores de ingestão alimentar média diária e concentração dos HPAs no grupo de alimentos de interesse (DAS e BHUTIA, 2018).

Por meio da avaliação da exposição alimentar é possível monitorar processos de produção dependentes do calor e aperfeiçoá-los, reduzindo a formação de HPAs, principalmente BaP. A presença de BaP no ambiente associada à sua distribuição em muitos alimentos, em concentrações elevadas algumas vezes, aumentam a exposição humana a este tipo de contaminante, podendo resultar em alterações no DNA (mais detalhes disponíveis no tópico 1.3 do capítulo de introdução), impulsionando o desenvolvimento de células neoplásicas (LI et al., 2016; DAS e BHUTIA, 2018).

Apesar de escassos, alguns autores puderam estimar a exposição dietética a HPAs em alguns alimentos como fórmulas infantis (IWEGBUE et al., 2014), óleos vegetais (MOLLE et al., 2017) e peixes e produtos cárneos (BOGDANOVIC et al., 2019). Todos os autores obtiveram valores acima do recomendado para a exposição a BaP e aos 4 HPAs prioritários, em alguns alimentos (fórmulas lácteas), a exposição a BaP alcançou valores até 30% maiores do que apresentados por estudos anteriores (IWEGBUE et al., 2014).

Para muitos alimentos como o chocolate, ainda não há valores de exposição dietética aos HPAs e a BaP. Resultados como esses seriam muito importantes para o aprimoramento das técnicas de produção do chocolate e outros produtos de cacau. A seguir, serão discutidos mais pontos sobre a presença de HPAs em cacau, chocolates e outros produtos de cacau.

1.6 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em chocolates

Para a obtenção do chocolate e outros produtos derivados do cacau, há uma extensa linha de beneficiamento na qual em muitos processos são utilizadas altas temperaturas (ŻYŻELEWICZ et al., 2017). São escassos, entretanto, estudos voltados à quantificação de HPAs em chocolates, principalmente aqueles prontos para consumo e de fácil acesso pela população.

No Brasil não há estudos sobre a quantidade de HPAs em chocolates. Estudos como o de ZIEGENHALS et al., (2009) e KUMARI et al. (2013) apresentaram resultados de amostras de chocolates que ultrapassavam os limites estabelecidos pela Comissão Europeia para a soma dos 4 HPAs prioritários (benzo[a]pireno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno e criseno) e para BaP em amêndoas de cacau e produtos de cacau (os limites apresentados pela CE serão discutidos mais adiante).

No estudo apresentado por ZIEGENHALS et al. (2009), foram analisados 16 HPAs monitorados pela IARC em 40 amostras de chocolates comercializados em mercados da Alemanha. Apesar de não encontrarem valores acima do permitido para BaP ($5,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de gordura), os autores relataram uma grande variação de concentrações entre os chocolates analisados ($1,33 \mu\text{g.kg}^{-1}$ e $6,85 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de gordura). Os autores destacaram também que quantidades diferentes de produtos de cacau nas amostras (chocolates ao leite, chocolate amargo com diferentes porcentagens de cacau, chocolate branco e chocolates com porcentagem não declarada) e a origem desses chocolates (Madagascar, Equador, Brasil, Venezuela, Costa Rica, dentre outros) podem afetar as concentrações de HPAs. Isto demonstra, portanto, que a procedência do chocolate e a quantidade de produtos de cacau utilizados em sua formulação (massa de cacau, manteiga de cacau, cacau em pó) podem refletir nas concentrações de HPAs nesse produto (ZIEGENHALS et al., 2009).

Outro estudo realizado com chocolates, dessa vez produzidos na Índia, detectaram concentrações de BaP acima do limite permitido pela EC ($5,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de gordura). KUMARI et al. (2012) analisaram 25 amostras de chocolates (sem porcentagem de cacau definida), dentre as quais duas apresentaram valores de BaP de $5,97 \mu\text{g.kg}^{-1}$ e $12,76 \mu\text{g.kg}^{-1}$, sendo valores acima do limite preconizado. Outras amostras demonstraram valores relativamente elevados para BaP, como $4,10 \mu\text{g.kg}^{-1}$, porém ainda dentro do limite. Os autores relataram que medidas mais eficazes durante a produção de chocolates devem ser realizadas, com o intuito de prevenir a formação excessiva de HPAs (KUMARI et al., 2012).

Produtos utilizados para a produção de chocolate podem ser fontes de contaminação, como visto em estudo realizado por RATERS e MATISSEK (2014) em 218 amostras de chocolate e produtos do cacau obtidos de diferentes continentes, como África, Ásia e América entre os anos de 1999 e 2012. Os autores verificaram variadas concentrações de

HPAs, segundo período de obtenção e origens das amostras. Para a manteiga de cacau, uma das principais fontes de gordura do chocolate, houve um aumento nos valores de BaP ao longo dos anos (1999 - $1,00 \mu\text{g.kg}^{-1}$; 2010 - $0,78 \mu\text{g.kg}^{-1}$ e 2011/2012 - $1,27 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de gordura) (RATERS e MATISSEK, 2014). Valores aumentados de BaP em manteiga de cacau também foram verificados por MISNAWI (2012), principalmente em amostras de manteiga de cacau produzidas com amêndoas inteiras (com película) (MISNAWI, 2012).

A presença de HPAs vai além dos produtos de cacau, TFOUNI e TOLEDO (2007) destacaram que a queima da cana de açúcar realizada antes da colheita pode resultar na formação de BaP nos seus subprodutos, como no açúcar refinado ($0,015 \mu\text{g.kg}^{-1}$), açúcar cristal ($0,295 \mu\text{g.kg}^{-1}$), açúcar demerara ($0,044 \mu\text{g.kg}^{-1}$), açúcar mascavo ($0,134 \mu\text{g.kg}^{-1}$) e açúcar orgânico ($0,062 \mu\text{g.kg}^{-1}$). Os 4 HPAs prioritários também já foram identificados em 31 amostras de leite em pó, com concentrações de BaP de até $0,57 \mu\text{g.kg}^{-1}$ em uma das amostras, sendo metade do limite máximo determinado pela EC ($1,00 \mu\text{g.kg}^{-1}$), como apresentou GARCIA LONDOÑO et al. (2013). Açúcar e leite em pó são ingredientes presentes em grande quantidade nos chocolates comerciais.

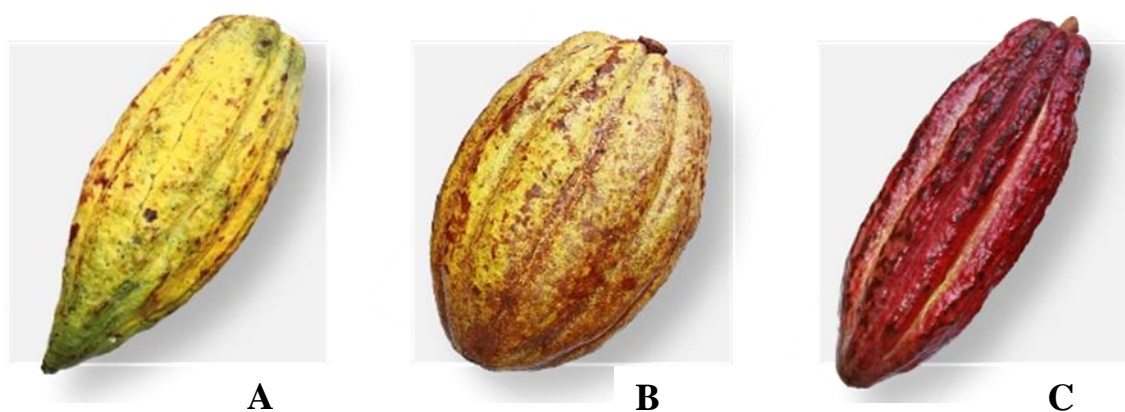
Os dados apresentados acima destacam que o local de origem do chocolate, processo de produção, quantidade de produtos de cacau e ingredientes secundários (açúcar e leite em pó) podem contribuir para o aumento da concentração de HPAs em chocolates. No Brasil, não existem estudos sobre a presença de HPAs em chocolates, mas o estudo de BELO et al. (2017) em amostras de amêndoas de cacau pós fermentação e secagem no Brasil, apresentou resultados alarmantes para a soma dos 4 HPAs. Os autores destacaram que devido aos valores encontrados ($9,06 \mu\text{g.kg}^{-1}$ a $49,96 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de gordura), se faz necessário a criação de programas de monitoramento da produção de cacau e seus produtos.

Os riscos de contaminação por HPAs em chocolates se estendem para além do uso de ingredientes, tendo o processo de produção importante participação no aumento desses contaminantes. Por isso, é necessário conhecer melhor o chocolate, seu cultivo, produção e consumo.

1.7 Do cacau ao chocolate: produção e consumo no Brasil

O chocolate é um produto do cacau (*Theobroma cacao* L.), fruto nativo da América Central e Sul. Devido a sua expansão pelo território sul americano, apresenta diversas variações de grupos genéticos, como o cacau Criollo (Figura 2 - A), de cultivo disseminado principalmente entre países andinos, como Venezuela, Equador, Colômbia e em parte do território mexicano (CEPLAC, 2010; ICCO, 2013).

Figura 2 - Tipos de cacau: Criollo (A), Forastero (B) e Trinitário (C).



Fonte: LaBarr Chocolate de Origem, 2018.

O cacau Forastero (Figura 2 - B), outra variedade de cacau, é originário da região amazônica e tem amplo cultivo nos estados do Pará e Bahia. De cultivo amplamente disseminado em países africanos como Gana, Nigéria e República dos Camarões (maiores produtores de cacau no mundo), são as amêndoas mais comumente utilizadas para a produção de chocolate (CEPLAC, 2010; ICCO, 2013; PREDAN, LAZĂR e LUNGU, 2019).

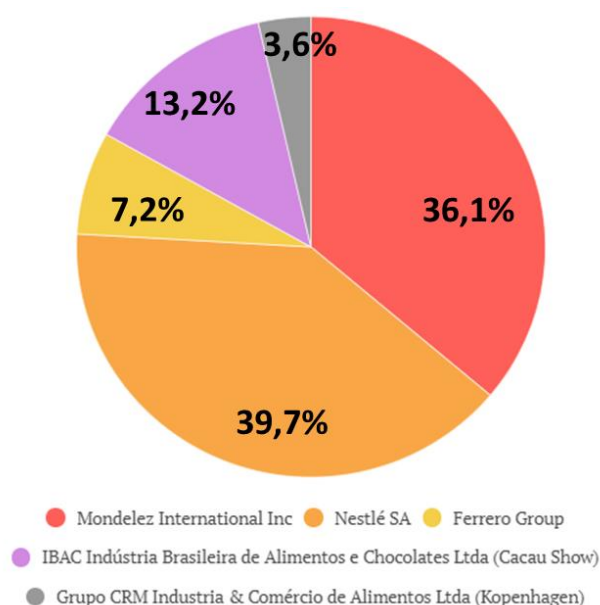
O cacau Trinitário (Figura 2 - C), híbrido natural das variedades Criollo e Forastero na ilha de Trinidad em Trinidad e Tobago, é principalmente cultivado em países africanos. Devido a sua capacidade de adaptação climática e resistência a doenças agrícolas, culturas agrícolas desta variedade de cacau também se estenderam para países da América do Sul e Caribe (CEPLAC, 2010; ICCO, 2013; PREDAN, LAZĂR e LUNGU, 2019).

No Brasil, atualmente a produção de cacau se concentra nos estados do norte e parte do nordeste (Bahia) do Brasil. O estado do Pará corresponde a maior parcela de produção

de cacau no país, responsável por 918 kg de cacau por hectare plantado em 2019. Apesar do consumo elevado de produtos de cacau no Brasil, há um declínio na produção nos últimos anos, de -1,9 % desde 2018. O reflexo das safras insuficientes para abastecer o mercado interno incentivou a importação de cacau e produtos de cacau por empresas como Nestlé, Mondelez e Cacau Show (Indústria Brasileira de Alimentos e Chocolates) (IBGE, 2017; BRASIL, 2018).

Empresas de chocolates comercializados no Brasil têm investido em produtos simples, de alta qualidade e menos genéricos para atender ao mercado interno (EUROMONITOR INTERNATIONAL, 2018). Empresas nacionais como a Cacau Show (Indústria Brasileira de Alimentos e Chocolates), que trouxe para mercado nas últimas décadas produtos com preços e combinações de sabores que agradaram o consumidor brasileiro já superaram em participação empresas internacionais de grande tradição no mercado de chocolates (Ferrero Group e Kopenhagen) (Figura 3).

Figura 3 - Empresas de chocolate com maior participação no mercado brasileiro em 2017.



Fonte: *Euromonitor International Research Reports, 2018.*

A adaptação de empresas produtoras de chocolate busca atender novas demandas de consumo de chocolate no Brasil, como apresentado pela Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008-2009. O consumo de chocolate anual chegou a aproximadamente 90 g entre a população, com maior consumo entre homens do que mulheres (86,7 g para população masculina e 84,6 g para população feminina). Em relação à situação do domicílio, a mesma pesquisa apontou que em lares urbanos o consumo de chocolate (3,9 g/dia) é maior em comparação com a população em ambiente rural (1,3 g/dia), assim como para o consumo de chocolate fora de casa em regiões urbanas (37 %) e regiões rurais (30,3 %) (POF, 2010).

A partir de resultados mais recentes apresentados pela POF 2017-2018, foi observado um crescimento de 20 % na participação relativa de chocolate na aquisição alimentar das famílias brasileiras entre as pesquisas realizadas em 2008-2009 (0,8 %) e 2017-2018 (1,0 %). Entre as regiões do Brasil, o nordeste e sul apresentaram crescimento na aquisição de chocolates de até 30 % entre as POFs dos mesmos anos. Nas demais regiões do país, a aquisição se manteve (norte – 0,5 %) ou apresentou crescimento de 10 % (sudeste – 1,3 % e centro-oeste – 0,9 %) (POF, 2019).

As etapas de processamento do cacau são cruciais para a produção de chocolates de boa qualidade e que agradem o paladar do consumidor. Essas mesmas etapas, como já relatado anteriormente, são críticas para a formação de compostos como os HPAs, pelo uso de diversos tratamentos térmicos. Veremos mais detalhes a seguir.

1.8 Etapas de produção do chocolate

Para a obtenção do chocolate, as amêndoas de cacau são submetidas a diversos processos, sendo eles: fermentação, secagem, torra, alcalinização, moagem, prensagem, adição de ingredientes, conchagem e finalmente temperagem, seguida da embalagem do produto final. Essas etapas estão mais detalhadas a seguir e resumidas pela Figura 4.

Figura 4 - Etapas de processamento de cacau e da produção do chocolate e pontos críticos para a formação/contaminação por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos.



Fonte: PREDAN et al. (2019), adaptado.

1.8.1 Fermentação

Após a colheita dos frutos do cacau, sua polpa e grãos são retirados para a etapa de fermentação. A fermentação é crucial para promover o desenvolvimento do sabor e aroma característicos do chocolate pela ação de microrganismos e produtos da fermentação (NAIR, 2010; PREDAN et al., 2019).

Durante a fermentação ocorre a degradação da polpa do cacau pela ação de bactérias e leveduras em um ambiente úmido e de temperatura adequada (50 °C). Em aproximadamente dois dias, são gerados produtos da fermentação como álcool etílico, ácido acético e ácido láctico. São necessários 4 a 6 dias para o completo processo de fermentação, sendo que ciclos insuficientes de fermentação afetam negativamente o sabor do chocolate, conferindo adstringência e amargor ao produto final (NAIR, 2010; PREDAN et al., 2019).

1.8.2 Secagem

O processo de secagem é realizado na sequência da fermentação, para cessá-la e impedir a ação de fungos. Esta etapa é responsável pela perda de até 93 % da umidade dos grãos de cacau, sendo a secagem ao sol a técnica mais utilizada, na qual são necessárias grandes áreas a céu aberto e cerca de 12 a 20 dias para a realização do processo completo. Já para a secagem artificial (em estufa), opção em algumas áreas de cultivo, o procedimento ocorre em menor tempo e a temperatura constante de máximo 60 °C (NAIR, 2010; PREDAN et al., 2019).

Ambas as técnicas, tradicional ou artificial, ocorrem em longos períodos de tempo, afetando a composição de polifenóis gerados durante a fermentação, reduzindo em até 50 % a quantidade de epicatequina presente no cacau (NAIR, 2010; GIACOMETTI et al., 2015; PREDAN et al., 2019).

1.8.3 Torrefação

As temperaturas empregadas na torra do cacau podem variar de 95 °C a 160 °C, essenciais para evitar a presença de sabores indesejáveis do ácido acético, obtido durante o processo de fermentação. Porém, amêndoas torradas em temperaturas acima de 160 °C por

longos períodos também desenvolvem sabor inadequado pela presença de fumaça durante o procedimento (ICCO, 2013; GIACOMETTI et al., 2015; PREDAN et al., 2019).

Após a fermentação e a secagem, que são responsáveis pela formação dos primeiros traços de sabor e qualidade do futuro chocolate, a torra dos grãos, agora amêndoas de cacau, tem como objetivo realçar a cor e desenvolver os sabores das amêndoas. A redução de compostos como aminoácidos e carboidratos pela torrefação, também colabora para a produção de chocolates de alta qualidade, assim como as altas temperaturas desta etapa colaboram para a e conservação das amêndoas de cacau pela redução de micro-organismos que podem prejudicar a conservação das mesmas (BEG et al., 2017).

1.8.4 Alcalinização

Também com o objetivo de aprimorar o sabor e desenvolver cor intensa ao chocolate, a alcalinização do cacau com carbonato de potássio ou carbonato de sódio pode ser executada antes ou após torrefação das amêndoas. Este processo é empregado para melhorar a solubilidade do cacau em pó, porém afeta diretamente a presença de polifenóis do cacau, causando redução de catequina e epicatequina (NAIR, 2010; GIACOMETTI et al., 2015; BEG et al., 2017).

1.8.5 Descasque e moagem

Após a torra, as amêndoas de cacau são selecionadas e descascadas, para a separação das amêndoas das cascas que as envolvem e também do nibs de cacau. As amêndoas selecionadas são destinadas para a produção de chocolate e ingredientes, como massa de cacau, liquor de cacau, manteiga de cacau, enquanto as cascas são destinadas a produção de combustíveis, material para compostagem e complemento para ração animal. É durante a moagem que também pode haver mistura de amêndoas de cacau da variedade Forastero, Criolo e Trinitário (NAIR, 2010; BEG et al., 2017).

1.8.6 Prensagem

A prensagem do licor de cacau para a obtenção da manteiga expõe o produto a uma prensagem em temperaturas entre 95 °C e 150 °C. O tempo do procedimento é dependente

da porcentagem de gordura que se pretende obter na manteiga de cacau (NAIR, 2010; BEG et al., 2017).

Outro método de extração de manteiga de cacau é executado com o uso de solventes. Porém, este procedimento pode causar alterações no sabor, cor e aroma da manteiga, sendo necessários outros processos para a neutralização e desodorização. A manteiga de cacau prensada é filtrada, refinada e temperada para que possa ser moldada e utilizada na produção do chocolate (NAIR, 2010; BEG et al., 2017).

1.8.7 Adição de ingredientes

A adição de licor de cacau, manteiga de cacau, leite e outros ingredientes para a produção de chocolate dependerá do tipo de produto que se pretende produzir. Para a produção de chocolate ao leite é adicionado leite em pó ao licor de cacau, além de variadas quantidades de açúcar e de manteiga de cacau ou gorduras substitutas (óleo de palma) ou equivalentes (manteiga de semente de manga e a manteiga de illipé) à mesma (NAIR, 2010; BEG et al., 2017; JAHURUL et al., 2017; LI e LIU, 2019).

Ao chocolate branco não é adicionado licor de cacau, apenas uma mistura de leite ou leite em pó, açúcar, manteiga de cacau e outras gorduras. Já os chocolates com maior teor de cacau levam em sua composição geralmente açúcar (em quantidades reduzidas), licor de cacau (em maior quantidade dependendo da característica do produto) e manteiga de cacau, além de cacau em pó (NAIR, 2010; BEG et al., 2017).

1.8.8 Conchagem

A conchagem é uma das etapas finais da produção de chocolate. Este procedimento melhora a textura do chocolate, tornando mais homogêneo por ação mecânica e do calor (60 °C a 80 °C). Esta etapa também é responsável por remover subprodutos voláteis gerados durante a torrefação das amêndoas que possam influenciar no sabor do produto final (NAIR, 2010; PREDAN, LAZĂR e LUNGU, 2019).

1.8.9 Temperagem e modelagem do chocolate

O processo de temperagem afeta as características visuais e de textura do chocolate. A temperagem confere ao chocolate uma aparência mais lisa, límpida e melhor *snap* (som obtido a partir da quebra do chocolate) por meio da cristalização da manteiga de cacau em decorrência da redução da temperatura para 28°C a 30°C. Após a temperagem, o chocolate é moldado e embalado para distribuição comercial (NAIR, 2010; OSTROWSKA-LIGEZA et al., 2018).

É possível perceber, por meio da descrição das etapas de produção do chocolate, que praticamente todas utilizam de algum tipo de tratamento térmico. O monitoramento dessas etapas se torna essencial para a redução da formação de HPAs e garantia da segurança do consumo. O Brasil não possui legislações próprias para o monitoramento de HPAs em alimentos, porém, utiliza as recomendações da Comissão Europeia, considerada a mais restrita quanto aos limites aceitáveis de contaminantes em alimentos. Vejamos com mais detalhes sobre legislações e leis para HPAs em chocolates a seguir.

1.9 Limites regulamentados de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em chocolates

No Brasil leis que limitam os valores de HPAs são escassas. Porém, o país conta com algumas portarias e resoluções, como a Portaria N° 2.914 de 2011, do Ministério da Saúde, para a monitoração do limite máximo de BaP na água (até 0,7 µg de BaP por litro de água) e a RDC N° 2 de 2007, que restringe o uso de aroma de fumaça ou *liquid smoke* em alimentos (até 0,03 µg de BaP por quilo de alimento). Como não há regulamentação sobre valores de HPAs em alimentos, o país adota resoluções instituídas pela CE (ANVISA, 2007; BRASIL, 2011; ZELINKOVA e WENZL, 2015).

A Comissão Europeia passou a estabelecer limites máximos para BaP em alimentos a partir do ano de 2005. Em 2011 foram estabelecidos valores máximos para outros 3 HPAs (benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno e criseno), os mais comuns encontrados em alimentos. Os valores estabelecidos pela CE para HPAs em alimentos, como o cacau e produtos derivados do cacau (Tabela 3), consideram a cadeia de processos que possam ocasionar na formação destes contaminantes e ingredientes utilizados (CE, 2011).

Tabela 3 - Valores máximos de benzo[a]pireno e benzo[a]pireno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluorantano e criseno em grãos de cacau e produtos derivados do cacau de acordo com a com a Regulamentação N° 835 de 2011 da Comissão Europeia (CE).

Teores máximos em µg/kg		
	Benzo[a]pireno.	Soma de benzo[a]pireno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluorantano e criseno.
Grãos de cacau e produtos derivados.	5,0 µg/kg de gordura a partir de 01/04/2013	35,0 µg/kg de gordura a partir de 1.4.2013 até 31.3.2015 30,0 µg/kg de gordura a partir de 01/04/2015.

Fonte: CE (2011), adaptado.

O monitoramento de HPAs por órgãos de saúde são necessários devido ao seu potencial carcinogênico e mutagênico. Alguns estudos já elucidaram parte dos mecanismos de ação do BaP e sua ação no organismo humano, como veremos em mais detalhes no tópico a seguir.

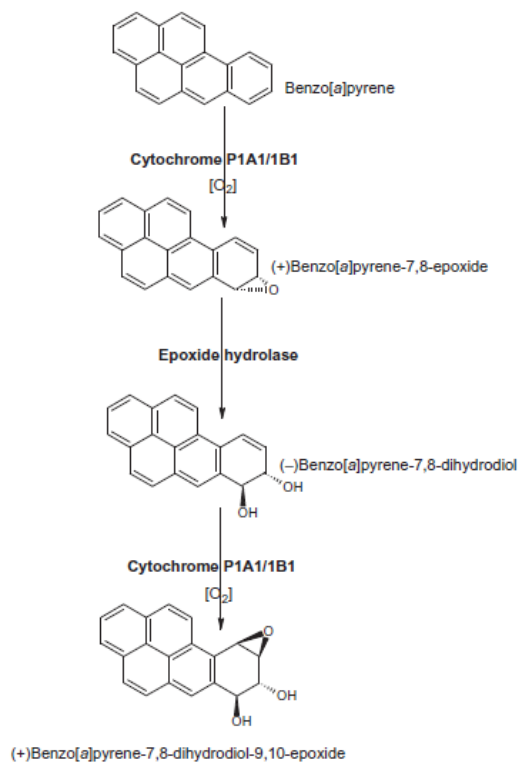
1.10 Efeitos dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos na saúde: Benzo[a]pireno: fases de biotransformação no organismo humano

A formação de HPAs em alimentos é um fato preocupante, pois os alimentos são a segunda maior fonte de exposição humana aos HPAs e, por isso, podem contribuir ativamente com outros fatores no desenvolvimento de cânceres (MALARKEY et al., 2013; SCOCCIANTI, 2016).

Diversos estudos demonstram a ação direta dos HPAs nas células de órgãos do sistema gastrointestinal. A presença de moléculas de gordura nos alimentos e, por consequência, presença de HPAs (característica hidrofóbica) associados a elas, são responsáveis pelo transporte e distribuição dos HPAs para órgãos e tecidos. Entre os HPAs com maior capacidade de absorção está o BaP, que associado a quilomícrons e outras lipoproteínas, tem acesso facilitado aos órgãos que participam ativamente do processo de digestão e metabolização de gorduras, promovendo a sua bioacumulação em órgãos como estômago, fígado e o intestino delgado (IFEGWU e ANYAKORA, 2015; KATONA e LYNCH, 2018).

Em nível celular, a metabolização de BaP depende de duas fases de biotransformação. A fase I está diretamente relacionada à conversão da polaridade das moléculas de HPAs. A descrição deste mecanismo de biotransformação ainda é pouco estudada, contudo este processo de metabolização é capaz de gerar polimorfismos associados a danos no DNA. Nesta fase, as moléculas de BaP são expostas às enzimas metabolizadoras como a Citocromo P1A1/1B1 e epóxido hidrolase (EH) (Figura 5), responsáveis por reações de conjugação fornecendo 1,2-dióis a estrutura desta molécula, aumentando a polaridade da mesma, tornando-a mais eletrofílica e, por consequência, mais reativa para a fase II (ANDERSON et al., 2005; HASCHEK et al., , 2010; IFEGWU e ANYAKORA, 2015).

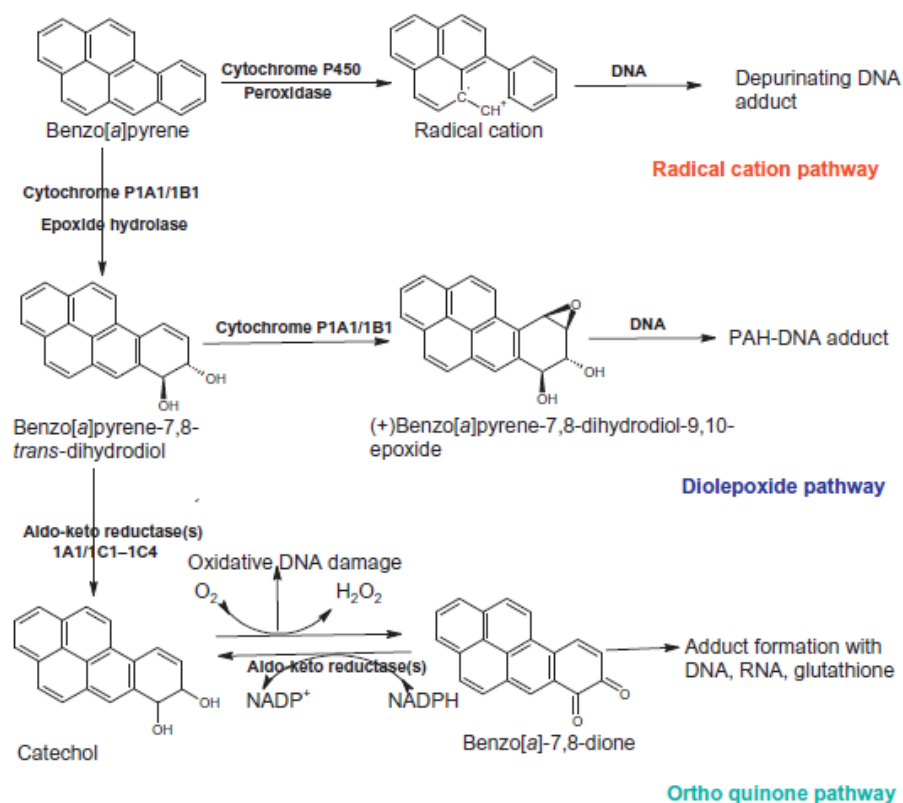
Figura 5 - Fase I do metabolismo do Benzo[a]pireno.



Fonte: IFEGWU e ANYAKORA, 2015.

A fase II de biotransformação consiste na epoxidação da molécula de BaP (adição de um grupamento epóxido) formando uma molécula de (+)Benzo[a]pireno-7,-dihidrodiol-9,10-epóxido. Esta reação é dependente da enzima citocromo P-450 para o rearranjo destes grupamentos. As reações seguintes poderão afetar o DNA pela via epóxido-diol, via das ortoquinonas, associada aos ciclos redox que formarão espécies reativas de oxigênio (EROS) (Figura 6). Estas vias afetam a integridade do DNA por meio do estresse oxidativo e pela ligação de adutos ao RNA, podendo provocar mutações celulares (HASCHEK et al., 2010; IFEGWU e ANYAKORA, 2015).

Figura 6 - Vias de ativação do Benzo[a]pireno.



Fonte: IFEGWU e ANYAKORA, 2015.

Mutações no DNA pela ação do BaP podem atingir cadeias de cromossomos, afetando processos de fusão e junção cromossômica e até uma possível quebra cromossômica, prejudicando a estabilidade do material genético. Caso os mecanismos de reparo do DNA não ocorram, durante a fase de iniciação da transcrição, o agente genotóxico afetará permanentemente o DNA da célula, causando mutações irreparáveis nas células (CHOUDHURI et al., 2018; MALARKEY et al., 2018).

Muitos mecanismos de reparo são acionados antes da formação de uma célula pré-neoplásica. Um conjunto de sensores de danos reconhecem mudanças na sequência genômica e acionam mecanismos efetores de reparo, como as quinases *ataxia telangiectasia mutated* (ATM), *ataxia telangiectasia Rad3-related* (ATR) e genes supressores como o gene tumoral p53. Estes são capazes de efetuar a regulação celular por meio de indutores de reparo do DNA, levando a processos apoptóticos (CAVALCANTI JÚNIOR et al., 2002; HARRIS et al., 2017).

O desenvolvimento de células pré-neoplásicas quando não interrompido por falha de um dos sistemas de supressão ou pelo estímulo constante e excessivo de determinado agente genotóxico, pode ser responsável por gerar células pré-neoplásicas resistentes à apoptose. Esta fase antecede o processo de progressão, em que a célula adquire capacidade de crescimento autônomo durante tempo indeterminado, capaz de induzir angiogênese e também capacidade metastática característica do câncer, tornando-o uma massa maligna capaz de reprogramar vias metabólicas para garantir sua expansão e também repelir a ação de células do sistema imunológico (CHOUDHURI et al., 2018; MALARKEY et al., 2018).

Fatores que podem pré-dispor os mais diversos tipos de cânceres são inúmeros, como tabagismo, alimentação, sedentarismo, fatores genéticos e exposição a agentes carcinogênicos. O crescente número de diagnósticos da doença só demonstra que mais medidas para sua prevenção pela redução de fatores de risco são necessárias. A seguir mais informações sobre a epidemiologia do câncer no Brasil.

1.11 Epidemiologia do câncer no Brasil

O Brasil nas últimas décadas passou por transformações em seu cenário demográfico. Com o aumento da industrialização e urbanização, além de programas de saneamento e vacinação, houve queda sutil da prevalência de doenças transmissíveis causadas pela falta de estrutura básica (água clorada, tratamento de esgoto e coleta de lixo), além de queda nas taxas de fecundidade, morbidades materno-infantil e aumento da expectativa de vida no país. Porém, apesar da reintrodução de algumas doenças infectocontagiosas nos últimos anos, as Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT), como doenças cardiovasculares, respiratórias, câncer e diabetes mellitus, passaram a contribuir maioritariamente com o número de mortes nos últimos 25 anos (SOUZA et al., 2018).

O aumento progressivo de DCNT no Brasil é um reflexo das modificações no estilo de vida da população. O consumo excessivo de álcool, tabagismo, ingestão elevada de alimentos com alto teor de gorduras saturadas e sódio, redução do consumo de fibras por meio de verduras, legumes e frutas, além do sedentarismo e excesso de peso justificam o cenário epidemiológico atual (SOUZA et al., 2018; REZENDE et al., 2019).

Mortes por câncer são a segunda maior causa de morte registrada no mundo segundo dados da Organização Mundial da Saúde em 2018, ficando atrás apenas dos óbitos causadas por doenças cardiovasculares (OPAS, 2018). Dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA) estimam que entre os anos de 2018 e 2019 sejam diagnosticados 600 mil casos da doença. Dentre os tipos de câncer de maior incidência no país, o câncer de mama (60 mil casos) e o câncer de próstata (68 mil casos) aparecem em primeiro lugar na estimativa de casos diagnosticados no biênio de 2018-2019 (DA SILVA, 2017). Dados da Organização Mundial da Saúde e IARC confirmaram as expectativas do INCA em 2018, quando foram diagnosticados cerca de 559 mil novos de casos de câncer no Brasil, além de 243 mil mortes pela doença no mesmo ano.

A dieta é um importante aliado na prevenção de diversos tipos de cânceres de causa não genética, sendo considerado o mais importante fator modulador para a redução de risco. Hábitos alimentares equilibrados evitam obesidade, fator de risco para o desenvolvimento de pelo menos 12 tipos de cânceres. Porém, mesmo com manutenção de uma dieta balanceada, fatores relacionados ao preparo de alimentos (formação de HPAs) estão associados ao aumento do risco de câncer (IARC, 2010; EU, 2011; DA SILVA, 2017).

Visto sua capacidade em afetar a estabilidade do DNA celular, a formação de HPAs em alimentos deve ser reduzida. Se faz necessário, portanto, a identificação de alimentos fontes de exposição aos HPAs para o aperfeiçoamento das técnicas de produção utilizadas durante o beneficiamento alimentos para que a formação de HPAs seja reduzida (IARC, 2010; CE, 2011; DA SILVA, 2017).

2 JUSTIFICATIVA

Os dados anteriores apresentam quatro informações importantes: 1) Os HPAs possuem potencial carcinogênico e, por consequência, geram risco à saúde humana; 2) Técnicas de identificação e quantificação desses compostos vêm sendo aperfeiçoadas para melhor monitoramento dos HPAs; 3) Alimentos submetidos ao processamento térmico, como o chocolate (alimento de grande consumo nacional) e ingredientes usados em sua formulação, são suscetíveis a formação de HPAs; 4) A carcinogenicidade dos HPAs pode contribuir como mais um fator de risco para o desenvolvimento de cânceres no Brasil, visto o cenário atual.

As informações dispostas justificam, portanto, o desenvolvimento de pesquisas que avaliem a presença e concentração de HPAs em alimentos como o chocolate por meio de metodologias sensíveis e seletivas capazes de produzir resultados confiáveis e métodos reprodutivos. Estudos como este servirão de base para a avaliação de fatores de exposição ao consumo e futuros estudos epidemiológicos na área.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, criseno e benzo[a]pireno) em chocolates comercializados na cidade de São Paulo e estimar a exposição dietética aos HPAs a partir do consumo deste produto.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar e validar a metodologia de extração e purificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em chocolate;
- Quantificar os 4 principais hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, criseno e benzo[a]pireno) por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência;
- Caracterizar os chocolates quanto ao teor de lipídeos;
- Estimar a exposição dietética aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos pelo consumo de chocolates.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Amostras

O presente estudo é de natureza experimental, uma pesquisa quantitativa exploratória realizada por meio de procedimentos laboratoriais e as amostras analisadas foram obtidas de maneira aleatória simples no comércio local da cidade de São Paulo, SP.

O estudo foi realizado com um total de 38 chocolates de marcas nacionais e de diferentes lotes. Foram analisados chocolates ao leite, chocolates brancos e chocolates com porcentagens de cacau de 40%, 52%, 55%, 60% e 70%, como descrito na Tabela 4.

Após a aquisição das amostras, as mesmas foram encaminhadas para o Laboratório de Componentes Alimentares e Saúde, Faculdade de Saúde Pública (FSP-USP) e armazenadas em sua embalagem de origem a temperatura controlada de 20 °C até o momento das análises.

Tabela 4 - Amostras de acordo com tipo de chocolate, teor de cacau, ingredientes, data de validade e lote.

Amostra	Marca	Chocolate	Teor de cacau	Ingredientes	Data de validade	Lote
A1	Z	Ao leite	N.D.**	Açúcar, leite em pó e manteiga de cacau.	11/04/2020	91019265 A4
A2	Y	Ao leite	N.D.	Açúcar, massa de cacau e manteiga de cacau.	04/06/2020	cg15619493
A3	X	Ao leite	N.D.	Açúcar, leite integral e manteiga de cacau.	01/04/2020	9068
A4	W	Ao leite	N.D.	Açúcar, leite em pó e manteiga de cacau.	30/08/2019	8242129416
A5	V	Ao leite	N.D.	Açúcar, manteiga de cacau e massas de cacau.	07/05/2020	lbp319127M4
A6	U	Ao leite	N.D.	Açúcar, manteiga de cacau e gordura vegetal.	24/07/2020	L920512942
A7	T	Ao leite	N.D.	Açúcar, massa de cacau e manteiga de cacau.	25/07/2020	25072019
A8	S	Ao leite	N.D.	Açúcar, massa de cacau e manteiga de cacau.	19/07/2020	19072019
A9	R	Ao leite	N.D.	Açúcar, massa de cacau e manteiga de cacau.	30/05/2020	L68n28211
A10	Q	Ao leite	N.D.	Açúcar, massa de cacau e manteiga de cacau.	23/12/2020	18319057B2
A11	P	Ao leite	N.D.	Açúcar, manteiga de cacau e pasta de cacau.	24/07/2020	19206
A12	O	Ao leite	N.D.	Açúcar, manteiga de cacau e licor de cacau.	18/09/2020	12219
A13	N	Ao leite	N.D.	Açúcar, massa de cacau e leite em pó integral.	23/09/2020	9919391106
A14	N	Ao leite	N.D.	Açúcar, manteiga de cacau e licor de cacau.	13/11/2020	991946112
B1	M	Branco	N.D.	Açúcar, leite em pó e manteiga de cacau.	15/03/2020	90749265 A5
B2	Z	Branco	N.D.	Açúcar, leite em pó e manteiga de cacau.	01/08/2019	8213129416
B3	L	Branco	N.D.	Açúcar, leite em pó integral e massa de cacau.	12/04/2020	cc19819491
B4	X	Branco	N.D.	Açúcar, manteiga de cacau e leite em pó integral.	01/09/2019	8232741
B5	R	Branco	N.D.	Açúcar, manteiga de cacau e leite em pó integral.	30/05/2020	67D28211
B6	P	Branco	N.D.	Açúcar, manteiga de cacau e soro de leite desmineralizado.	06/05/2020	19127A
B7	O	Branco	N.D.	Açúcar, manteiga de cacau e leite em pó integral.	05/03/2020	12819
B8	N	Branco	N.D.	Açúcar, massa de cacau e leite em pó integral.	15/12/2020	9919511102

Tabela 5 - Continuação...

Amostra	Marca	Chocolate	Teor de cacau	Ingredientes	Data de validade	Lote
B9	N	Branco	N.D.	Açúcar, manteiga de cacau e leite em pó integral.	16/12/2020	9919511105
B10	N	Branco	N.D.	Açúcar, manteiga de cacau e leite em pó integral.	06/11/2020	9919451110
C1	Y	Amargo	40%	Açúcar, massa de cacau e gordura vegetal.	02/02/2020	cc03319492
C2	Z	Amargo	40%	Açúcar, massa de cacau e gordura vegetal.	27/03/2020	90869265 A5
C3	V	Amargo	40%	Açúcar, massa de cacau e manteiga de cacau.	17/05/2020	lbp319113 M3
C4	R	Amargo	40%	Massa de cacau, açúcar e cacau em pó.	30/05/2020	65N28132
D1	P	Amargo	52%	Pasta de cacau, açúcar e manteiga de cacau.	08/08/2020	19221
E1	X	Amargo	55%	Açúcar, massa de cacau e manteiga de cacau.	01/04/2020	9077741
F1	R	Amargo	60%	Açúcar, pasta de cacau e manteiga de cacau.	29/09/2020	19242
G1	W	Amargo	70%	Massa de cacau, manteiga de cacau e cacau em pó.	20/02/2020	9051129431
G2	V	Amargo	70%	Massa de cacau, açúcar e manteiga de cacau.	26/07/2020	lbp219207 M1
G3	X	Amargo	70%	Massa de cacau, açúcar e manteiga de cacau.	01/07/2020	9155742
G4	P	Amargo	70%	Açúcar, massa de cacau e manteiga de cacau.	30/04/2020	65M28211
F1	O	Amargo	N.D.	Açúcar, licor de cacau e gordura vegetal.	26/02/2020	12518
F2	N	Amargo	N.D.	Açúcar, massa de cacau e manteiga de cacau.	28/02/2021	9919491110
F3	N	Amargo	N.D.	Açúcar, licor de cacau e gordura vegetal.	06/02/2021	9919461110

*Primeiros três ingredientes descritos na embalagem. **Valor não declarado na embalagem.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Saponificação, extração e purificação de HPAs em chocolates.

Para a saponificação, foi adicionado a um vial de vidro (40 mL) 1 g de chocolate previamente ralado e 5 mL de hidróxido de potássio 2,0 M em etanol. A solução foi homogeneizada, permaneceu durante 3 horas em banho-maria a 42 °C em agitação controlada e protegido da luminosidade.

Para a extração líquido-líquido, com as amostras já em temperatura ambiente (22 °C), foram adicionados 5 mL de água destilada ao vial para homogeneização em vortex por 1 minuto. Em seguida, foram adicionados 10 mL de n-hexano às amostras; as mesmas foram homogeneizadas em vortex por 30 segundos, e aguardou-se a separação de fases para transportar a fase orgânica para o funil de separação de 125 mL.

O procedimento foi realizado mais duas vezes, totalizando 3 ciclos de extração líquido-líquido com n-hexano. O extrato final foi lavado com 30 mL de água destilada e a fase aquosa foi descartada. A fase hexânica foi filtrada em papel de filtro contendo sulfato de sódio anidro. A solução foi recolhida em béquer de 100 mL para completa evaporação do solvente em capela de exaustão.

As amostras foram ressuspensas em 6 mL de acetonitrila e purificadas usando cartucho de extração em fase sólida de sílica (500 mg, 6 mL) pré-condicionada com 3 mL de acetonitrila. Posteriormente, as amostras foram evaporadas sob fluxo de nitrogênio e em banho-maria a temperatura controlada de 37 °C. As mesmas foram ressuspensas em 1 mL de acetonitrila e filtrados em membrana Millipore 0,22 µm em vial âmbar para posterior quantificação.

4.2.2 Validação

O procedimento de extração dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em chocolates foi elaborado a partir de adaptações das metodologias de KUMARI et al., (2012), RATERS e MATISSEK (2014), e BOGDANOVIĆ et al., (2019). As metodologias de CAMARGO et al., (2011) e SILVA et al., (2017) foram utilizadas para a identificação e quantificação dos HPAs. Os procedimentos foram otimizados e validados de acordo com as

orientações do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) (INMETRO, 2020).

Os testes definidos para a validação do procedimento de extração e quantificação foram: seletividade, linearidade, exatidão, repetibilidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ). Todos os ensaios foram realizados em triplicatas, exceto o LQ. Os parâmetros foram detalhados a seguir e as concentrações dos ensaios estão descritas na Tabela 6.

Seletividade, linearidade e exatidão: ensaios realizados em triplicatas de cinco níveis de solução padrão dos 4 HPAs em acetonitrila (branco) e chocolate ao leite.

Repetibilidade: ensaio realizado a partir do desvio padrão relativo de três concentrações (baixo, médio e alto) de amostra de chocolate adicionadas de solução padrão dos 4HPAs.

Limite de detecção: valor calculado a partir do desvio padrão das concentrações obtidas do menor valor da curva de seletividade.

Limite de quantificação: valor calculado a partir do desvio padrão de seis injeções do nível mais baixo da curva de seletividade ($0,50 \mu\text{g.kg}^{-1}$ para BaP e $1,00 \mu\text{g.kg}^{-1}$ para BaA, Chr e BbF).

Os cálculos foram executados de acordo com as equações:

$$LD = 3 \times s$$

$$LQ = 6 \times s$$

Onde:

s: desvio-padrão.

Tabela 5 - Faixa de trabalho e níveis de concentração do padrão de HPAs para os parâmetros de validação: seletividade, linearidade, exatidão e repetibilidade.

Parâmetros de validação	Concentrações avaliadas para Cri, BaA e BbF $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$	Concentração avaliada para BaP $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$	Número de replicatas
Seletividade	1,00 - 5,00	0,50 - 5,00	15
Linearidade	1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00	0,50; 1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00	15
Exatidão	1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00	0,5; 1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00	15
Repetibilidade	1,00; 3,00; 5,00.	0,50; 3,00; 5,00.	15

4.2.3 Condições cromatográficas e identificação dos compostos

A identificação e quantificação dos padrões e amostras foi realizada em cromatógrafo de líquido de alta eficiência, equipado com bomba (LC-20 AT, Shimadzu, Tokyo, Japan), injetor automático (SIL-20AC, Shimadzu, Tokyo, Japan), controlador (CBM-20A, Shimadzu, Tokyo, Japan), forno de coluna (CTO-20A, Shimadzu, Tóquio, Japão) e detector de fluorescência (RF-10AXL, Shimadzu, Tokyo, Japan). Foi empregada uma coluna cromatográfica C18 Shim Pack VP-ODS (150 mmL. \times 4.6 mm I.D., 5 μm , (Shimadzu, Tokyo, Japan) precedida de pré-coluna (Shimadzu, Tokyo, Japan).

As condições cromatográficas utilizadas foram baseadas na metodologia de CAMARGO et al., (2011) e SILVA et al., (2017) seguindo os seguintes parâmetros: temperatura do forno de coluna a 35 °C, volume de injeção de 30 μL , fluxo de corrida de 1,5 mL/minuto, com gradiente de eluição utilizando concentrações variadas de acetonitrila (\geq 99,99 %) (Sigma-Aldrich, MA, EUA) e água ultrapura previamente filtrada (membrana HV (Durapore) em PVDF, 0,45 μm , 47 mm, lisa, Millipore, Merck) (Tabela 7).

As leituras foram realizadas por meio de detector de fluorescência em comprimentos de onda de excitação e emissão de 270 nm e 390 nm para BaA e Cri, e 290 nm e 430 nm para BbF e BaP. Por fim, o tempo final do procedimento de análise cromatográfica foi de 60 minutos.

Para a identificação dos HPAs esperados nas amostras, foram feitas comparações entre os tempos de retenção dos cromatogramas de padrões individuais usando o software LabSolutions (Shimadzu, Tokyo, Japan).

Tabela 6 - Gradiente de eluição da fase móvel para análise de HPAs.

Tempo (min.)	Concentração de fase móvel (%)	
	Acetonitrila	Água
0,01	50	50
20,00	50	50
20,01	70	30
50,00	70	30
50,01	100	0
55,00	100	0
55,01	50	50
60,00	50	50

4.2.4 Extração de lipídeos totais por soxhlet

Para o procedimento de extração de lipídeos totais dos chocolates foi utilizado o sistema para determinação de gordura TE 044 da marca Tecnal® e solvente éter etílico P.A. de acordo com a metodologia de HAWTHORNE et al. (2000) com modificações. A determinação de lipídeos foi realizada em duplicata usando 3 g de amostra previamente pesada.

O aparelho foi operado por 6 horas com temperatura fixada de 56 °C para a posterior recuperação dos lipídeos totais e solvente. Os valores de lipídeos totais das amostras foram obtidos a partir da diferença entre o peso final do reboiler para extração de lipídios totais após o procedimento e o peso inicial do mesmo (previamente tarado).

4.2.5 Exposição dietética diária a HPAs pelo consumo de chocolate

A avaliação da exposição dietética diária aos HPAs a partir do consumo de chocolate foi realizada de acordo a avaliação da exposição à substâncias químicas em alimentos

propostos pelo International Programme on Chemical Safety (IPCS) da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2009). Para estimar a exposição dietética foram utilizados os dados da Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF, 2010) e foram avaliadas três categorias: 1) Gênero (feminino e masculino); 2) Grupos etários: adolescentes (14 a 18 anos), adultos (19 a 59 anos) e idosos (≥ 60 anos); 3) Local de residência (urbana e rural).

$$\text{Exposição alimentar diária } (\mu\text{g dia}) = \frac{\sum(c \text{ chocolate } \times IR)}{P}$$

Onde:

C Chocolate : concentração de HPA no chocolate ($\mu\text{g.kg/ dia}$).

IR: consumo de alimentos (g.dia).

P: peso corporal médio (kg).

4.2.5 Análise dos resultados

Os resultados dos experimentos foram avaliados por meio de análise unidirecional de variância (ANOVA). As médias e desvio padrão foram comparados pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, com significância estabelecida em $p < 0,05$. A avaliação estatística foi realizada utilizando o sistema de software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) para Windows (versão 23.0).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRIMEIRO ARTIGO

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Commercial Chocolate Bars: Validation of an Analytical Method.

O artigo descreve as etapas de adequação e validação da metodologia de extração e quantificação dos HPAs em chocolates ao leite por HPLC-FL. O artigo foi submetido ao periódico Food Chemistry.

Abstract

Chemical analyses of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food products are carried out by chromatographic methods, but the extraction method may differ according to the food matrix. This study aimed to optimize and validate the methodology for the extraction and quantification of four priority PAHs (benzo[a]pyrene (BaP), benzo[a]anthracene, benzo[b]fluoranthene, and chrysene) in milk chocolate bars. The samples were subjected to saponification, liquid–liquid extraction, solid-phase extraction, and HPLC–fluorescence detector. The method was linear over a range of 0.50–5.00 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ for the four PAHs. With regard to selectivity, there was matrix interference for BaP. The method also showed accuracy, with mean recoveries ranging from 95.25 to 108.27% and with repeatability showing values between 0.14 and 7.25%. Therefore, the methodology was adequate and guaranteed the efficiency of the assay. The method was applied to different commercial milk chocolate bars, and the values obtained were below the limits set out in European Communities Regulation No.835/2011 for BaP and the four combined PAHs.

Keywords: chocolate; benzo[a]pyrene; solid-phase extraction; high-performance liquid chromatography; validation.

Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are formed by incomplete burning of organic matter. The sources of PAHs can be divided into three groups: pyrogenic, petrogenic, and environmental sources. Pyrogenic sources are processes in the food industry, home-cooked food, and cigarette smoke, whereas petrogenic sources are the result of petroleum product manufacturing and mineral coal, and environmental sources consist of natural forest fires and volcanic eruptions (Abdel-Shafy and Mansour, 2016).

PAHs have been studied by the International Agency for Research on Cancer (IARC), considering the risk for human health related with carcinogenic and mutagenic potentials. Benzo[a]pyrene (BaP) was classified as carcinogenic to humans, whereas benzo[a]anthracene (BaA), benzo[b]fluoranthene (BbF), and chrysene (Chr) were probable human carcinogens (IARC, 2010; IARC, 2012).

During chocolate production, the cocoa beans are fermented, dried, roasted, ground, pressed, and combined with other ingredients for the conching and tempering process that will originate commercial chocolate. This processes subject cocoa beans to temperatures of up to 160 °C and to the presence of smoke (Beg et al., 2017). These manufacturing steps are critical in the formation of PAHs (Belo et al., 2017). The addition of ingredients to chocolate can also be a source of contamination by PAHs, especially fat sources such as cocoa butter and vegetable fats. As a result of their polarity, PAHs easily accumulate in matrices with high concentrations of lipids (Akinpelu et al., 2019).

The methodologies for the extraction and quantification of PAHs in foods are still laborious and challenging. In chocolate, the high concentration of lipids can interfere with PAHs analysis. Because of the need to monitor the levels of PAHs in chocolates, the aim of this study was to optimize and validate a method for extraction and quantification by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with fluorescence detection (FD).

Material and methods

Standards, reagents, and solvents

The standards used were BaA, Chr, BbF, and BaP purchased from Supelco (Bellefonte, PA, USA). Individual PAH solutions were prepared in acetonitrile at

concentrations of 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (for BbF, Chr, and BaP) and 36 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (for BaA), and a mixture of all four PAHs at a concentration of 200 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ was stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and used as the working solution.

The reagents used were analytical-grade potassium hydroxide (KOH) P.A. (Merck, HD, Germany) and sodium sulfate (Na_2SO_4) P.A. (LabSynth, SP, Brazil).

All solvents used, such as ethanol ($\geq 99.99\%$) (Merck, HD, Germany), n-hexane ($\geq 99.99\%$) (Merck, HD, Germany), acetonitrile ($\geq 99.99\%$) (Sigma-Aldrich, MA, USA) and diethyl ether (LabSynth, SP, Brazil). Deionized water was obtained by using a Milli-Q purification system (Millipore, Bedford, MA, USA).

Solid-phase extraction (SPE) silica cartridges (500 mg, 6 mL, Discovery DSC-SI, Sigma-Aldrich, Palo Alto, CA, USA) and polytetrafluoroethylene filters (0.22 μm , 15 mm, Macherey-Nagel, DN, Germany) were used.

Samples

The samples were obtained from food stores in the city of São Paulo, Brazil. Five commercial brands of milk chocolate bar were used. After acquisition, the chocolate bars were sent to the Laboratory of Food Components and Health (FSP-USP); they were stored in their original packing at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

PAHs extraction

The extraction process was performed by optimizing the following steps: 1) saponification, 2) liquid–liquid extraction, and 3) SPE.

1) Chocolate (one gram) from the bar was triturated and homogenized. Saponification was performed by using 1 g of sample and 5 mL of 2.0 M KOH in ethanol. The vial containing the solution was left for 3 h in a water bath at $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ with controlled stirring and protection from light.

2) For liquid–liquid extraction, distilled water (5 mL) was added for further vortex homogenization for 1 min. n-Hexane (10 mL) was added to the vial, the solution was mixed in a vortex for 30 s, and the organic phase was transferred to a separating funnel. Three extraction cycles were performed, and the combined extracts were washed with 30 mL of

deionized water. The aqueous phase was discarded, and the extract was filtered through a qualitative filter with 5 g of Na₂SO₄ to remove traces of water.

3) The dry residue was suspended in 3 mL of acetonitrile and purified by using a silica SPE cartridge (500 mg, 6 mL), which had been preconditioned with 3 mL of acetonitrile. The cartridge was washed with 3 mL of acetonitrile. The extract was evaporated under nitrogen flow in a water bath at 37 °C. The residue was dissolved in 1 mL of acetonitrile, filtered through a 0.22 µm filter, and stored in an amber vial for injection.

Chromatographic conditions

The conditions were based on previous studies (Camargo, Antonioli, and Vicente, 2011; Silva, Sampaio, and Torres, 2017). The HPLC system (Shimadzu, TYO, Japan) was equipped with a pump (LC-20 AT), auto sampler (SIL-20AC), controller (CBM-20A), column oven (CTO-20A), and fluorescence detector (RF-10AXL). A C18 column (250 × 4.6 mm, 5 µm, Shim Pack VP-ODS, Shimadzu, TYO, Japan) protected by a guard column (Shimadzu, TYO, Japan) was used. The separation of PAHs was carried out with a gradient mobile phase (A: water; B: acetonitrile): 50 % B from 0 to 20 min, 70 % B from 20.01 to 50 min, 100 % B from 50.01 to 55 min, and then the initial conditions again until 60 min. Other conditions used were an oven temperature of 35 °C, automatic injection of 30 µL, flow rate of 1.5 mL.min⁻¹, fluorescence detection with excitation and emission wavelengths of 270/390 nm for BaA and Chr and of 290/430 nm for BbF and BaP. The analysis time was 60.0 min.

Identification and quantification of PAHs compounds

The four target compounds were identified by comparing the retention times in the samples with individual PAHs standards. Data acquisition and processing were performed by using LabSolution Software (Shimadzu, TYO, Japan).

Determination of total fat content

The lipids were extracted by using a conventional Soxhlet apparatus. The extraction of lipids was performed in duplicate with 3 g of sample and diethyl ether as the solvent. The equipment was operated for 6 h at 56 °C. The total lipid content in the samples was weighed, and the lipid yield was calculated gravimetrically (Hawthorne et al., 2000).

Validation of analytical parameters

The procedures were optimized and validated according to the guidelines of the National Institute of Metrology, Quality, and Technology (INMETRO) (INMETRO, 2020) and European Commission Regulation No. 836 (EC, 2011b). The parameters considered were linearity, selectivity, accuracy, precision (repeatability), limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ).

Selectivity was evaluated by adding the standards at five different concentrations in two groups: blank (PAHs in acetonitrile) and milk chocolate bars. The linearity was determined from the solvent curve (for BaA, Chr, and BbF) and the matrix curve (for BaP) by using solutions prepared at five different concentrations, with a total of 15 assays over the range 0.50–5.00 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ for BaP and 1.00–5.00 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ for BaA, Chr, and BbF. The accuracy was verified by evaluating the recovery of the milk chocolate with five different levels of PAHs in triplicate on the same day. The precision was evaluated from the relative standard deviation (RSD) determined for samples spiked in five concentrations on the same day by a single analyst.

The LOD was calculated as the analyte concentration with three replicate values corresponding to the sample standard deviation of the blank in the sample and the slope of the analytical curve. The LOQ with the standard deviation (SD) was obtained from the concentrations of six repeat experiments at the lowest levels of selectivity curve (0.50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ for BaP and 1.00 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ for BaA, Chr, and BbF).

Results and discussion

Optimization of the extraction method

The optimization of the extraction method was based on the studies of Kumari et al. (2012), Raters and Matissek (2014), and Bogdanović et al. (2019). The tests were performed by using a blank matrix spiked with a concentration of 10 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$. The objectives of the optimization were:

- 1) To reduce the sample volume for the saponification for better hydrolysis of lipids and extraction of PAHs molecules, because the hydrocarbons are strongly associated with the lipids in the samples;

2) To reduce the temperature and time used for the saponification, avoiding the degradation of the investigated analytes, for better recovery;

3) To reduce analytes losses during SPE, through an effective clean up and reduction of chemical residue generation, to make the process reliable for most laboratories.

Given the proportion of the PAHs in the analyzed sample, two different amounts of chocolate for the saponification step (one and two grams of chocolate) and different solvents and volume proportions of KOH solution (5 mL of 2.0 M KOH in ethanol, 5 mL of 2.0 M KOH in methanol:water (9:1, v/v), and 15 mL of 2.0 M KOH in ethanol) were tested, based on the studies of Raters and Matissek (2014) and Bogdanović et al. (2019).

The test with 1 g of chocolate sample, 5 mL of 2.0 M KOH in ethanol, and 5 mL of distilled water, to facilitate the chocolate homogenization process, showed recovery results of 111.44% for Chr, 103.84% for BaA, 70.24% for BbF, and 58.56% for BaP; these were better results than those from the test with methanol:water (9:1, v/v) as the solvent, except for the values of 72.46% for BbF and 61.07% for BaP. The results of the test with 2 g of chocolate in 15 mL of 2.0 M KOH in ethanol showed low recoveries of 41.81% for Chr, 47.55% for BaA, 21.55% for BbF, and 18.99% for BaP. Because of the recovery values presented in the first test (1 g of chocolate with 5 mL of 2.0 M KOH in ethanol) and the performance during the phase separation process in the liquid–liquid extraction step with n-hexane, these conditions were chosen for use in the methodology.

By using 5 mL of 2.0 M KOH in ethanol solution, the saponification process was tested in relation to the time and temperature of the studies by Kumari et al. (2012) (12 h at room temperature of 22°C) and Raters and Matissek (2014) (30 min at 60°C). The recovery values ranged from 59.48% (BaP) to 78.24% (Chr) and from 40.75% (BaP) to 52.82% (Chr) at room temperature of 22°C and 60°C, respectively, and were considered low.

In the search for better recovery performance, another saponification test was performed with a different time and temperature (3 h at 42 °C) (Bogdanović et al., 2019). The recovery results varied from 67.82% (BaP) to 82.29% (Chr), which is better than the results of the previous tests. Thus, it was decided to perform the saponification for 3 h at 42 °C, reducing the analysis time and generally improving BaP recovery.

For SPE, it was not necessary to remove the acetonitrile used for the conditioning treatment under vacuum. The SPE phase was performed by using silica cartridges conditioned with 3 mL of acetonitrile for later extraction with 6 mL of acetonitrile (1 mL at a time). This extraction solution (6 mL) was evaporated and reconstituted with 1 mL of acetonitrile before HPLC injection. This process proved to be effective in the recovery of the analytes, with values ranging from 87.84% (BaP) to 102.16% (BbF), and was adopted for use in the methodology.

Optimization of the chromatographic conditions

The same column (C18; 250 × 4.6 mm, 5 μm) used by Camargo, Antonioli, and Vicente (2011) was considered for the optimization. The performance of the column was adequate because the peak shape of the chromatograms did not present any relevant distortions. Other factors were tested, such as the column temperature, mobile phase composition, and flow.

The mobile phase composition was based on that used by Camargo, Antonioli, and Vicente (2011) with modifications. The initial test was realized with 70% to 75% of acetonitrile in water between 0 to 20 min, and this presented a bad separation. However, when the concentration was initially reduced to 50% acetonitrile and then increased to 70% between 20 and 50 min, the results were better with the presence of well-resolved peaks during gradient intervals.

The column temperature was tested by setting the oven at 30 °C (Camargo, Antonioli and Vicente, 2011); however, the separation between Chr and BaA was not good. By increasing the temperature to 35°C, better results were obtained.

Based on the study of Silva, Sampaio and Torres (2017), consideration of the excitation and fluorescence spectra obtained during the optimization tests resulted in the selection of appropriate intervals for the excitation and emission wavelengths of the four PAHs, with 270 nm (excitation) and 390 nm (emission) intervals between 20 and 38.50 min (for Chr and BaA) and with 290 nm (excitation) and 430 nm (emission) between 38.50 and 60 min (for BbF and BaP).

Figure 1 shows a chromatogram obtained under the final conditions.

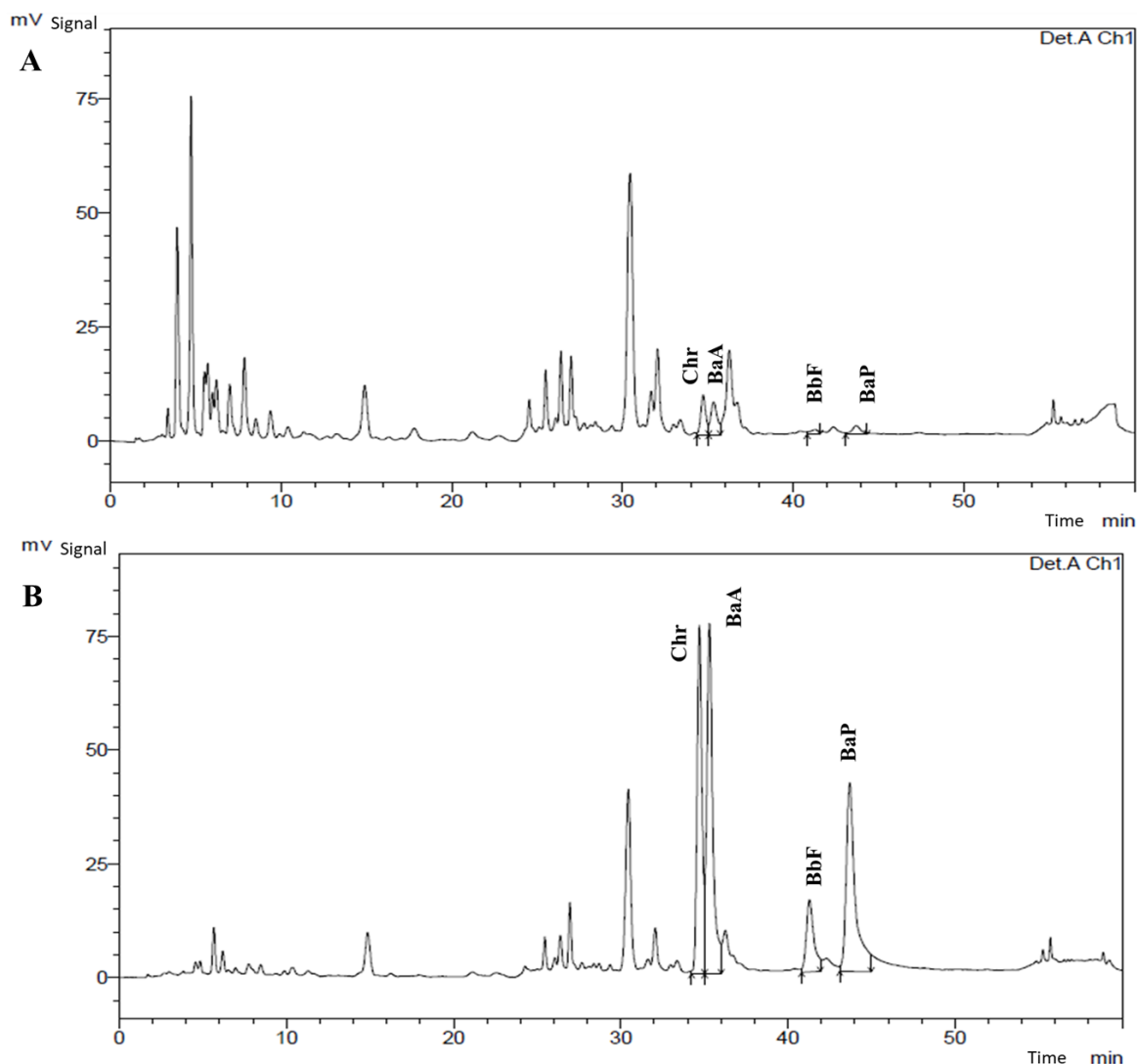


Figure 1 - Chromatograms by HPLC-FL of PAHs in milk chocolate sample (A) and milk chocolate sample spiked (B) with a solution of all four PAHs (200 ng.mL^{-1}).

Validation

A blank experiment containing solvents and reagents was included to verify contamination by the solvents and water used. The results were lower than the LOQ.

The validation was performed by using milk chocolate bar sample assessed in the study, discounting the values found for chrysene. For the linearity parameter, calibration curves were evaluated for each of the four PAHs, and the linear regression equation

obtained by the least squares method showed adequate squared correlation coefficient (r^2) values, as shown in Table 1, demonstrating results that are directly proportional to the concentration of analytes in the milk chocolate bar. The tests applied in the statistical evaluation did not detect outlier values (*Grubbs* test) and showed homogeneous behavior with no tendency between the points of the calibration curves (*Cochran's* test).

Table 1 - Results of validation method of BaA, Chr, BbF and BaP in milk chocolate bars.

PAHs	Slope	Intercept	r ²	Linear range	n	Spike level ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	Recovery (%)	RSD (%)	LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)
BaA	235486.50	-9576.43	0.9984	1.00 – 5.00	15	1.00	100.86	2.37	0.54	1.00
						2.00	98.27	2.81		
						3.00	100.66	0.63		
						4.00	100.75	0.79		
						5.00	99.53	2.43		
Chr	202319.80	-25824.53	0.9904	1.00 – 5.00	15	1.00	99.88	0.51	0.57	1.00
						2.00	101.13	1.70		
						3.00	108.12	0.77		
						4.00	95.25	1.15		
						5.00	100.30	0.84		
BbF	66741.47	-15227.87	0.9953	1.00 – 5.00	15	1.00	102.82	5.83	0.51	1.00
						2.00	98.23	3.18		
						3.00	100.72	7.25		
						4.00	98.76	0.14		
						5.00	100.70	1.53		
BaP	155580.67	46447.67	0.9986	0.50 – 5.00	15	0.50	100.30	2.48	0.11	0.50
						1.00	97.27	1.23		
						2.00	97.65	2.21		
						4.00	100.79	2.51		
						5.00	99.84	0.57		

BaA: benzo[a]anthracene, Chr: chrysene, BbF: benzo[b]fluoranthene, BaP: benzo[a]pyrene. RSD: relative standard deviation. LOD: limit of detection; LOQ: limit of quantification.

In assessing selectivity, according to the paired t-test applied for the slope, matrix interference was detected for BaA, Chr, and BbF; however, homogeneous slopes were observed between the standard and BaP sample curves, demonstrating the absence of matrix interference for this analyte. The tests applied for selectivity values did not present outliers, with 99% confidence, according to the *Grubbs* test, and homogeneity was found for all four PAHs, with a 95% confidence.

The LOD, LOQ, recovery, and repeatability results are presented in Table 1. The LOQ value for BaP was $0.50 \mu\text{g.kg}^{-1}$, which is different from that for the other PAHs, because of the low quantified values in some samples. Accuracy was determined by recovery experiments, with independent triplicates of chocolate spiked with standards, and the percentage varied between 95.25 and 108.12%; these were acceptable results according to the performance criteria for validation of INMETRO (2020). The repeatability was obtained with a chocolate sample spiked with $0.50 \mu\text{g.kg}^{-1}$ of PAHs mixture, with RSD values from 0.14 to 7.25%.

To establish the effectiveness and acceptability of the method, the results from the optimization and validation of this method were also compared to the parameters established for Regulation No. 836/2011 (EC, 2011b). The LOD and LOQ results for BaP, the most carcinogenic PAH, are lower than $\text{LOD} \leq 0.30 \mu\text{g.kg}^{-1}$ and $\text{LOQ} \leq 0.90 \mu\text{g.kg}^{-1}$, as defined by the European Commission, which establishes the efficiency of the method for this compound. The method offered recovery values very close to the Commission's maximum value of 120% for BaA (98.27–100.86%), Chr (95–108.12%), BbF (98.23–102.82%), and BaP (97.27–100.79%). The results for the relative standard deviation, for precision assessment, were below 10%, and were also adequate, with the criteria for benzo[a]pyrene, benzo[a]anthracene, benzo[b]fluoranthene, and chrysene (EC, 2011b).

Application of the method

Five different milk chocolate bars were analyzed in duplicate on the same day. Table 2 shows the mean content of the four PAHs individually and the sum of their concentrations in the samples.

Table 2 - Concentration of lipids (g.100g^{-1}) and four PAHs ($\mu\text{g.kg}^{-1}$ of fat) in milk chocolate bars.

Samples	Sample A	Sample B	Sample C	Sample D	Sample E
Lipid content* (g/100 g)	25.04 ± 4.70	35.30 ± 0.95	28.64 ± 1.13	26.79 ± 0.28	48.00 ± 1.98
BaA	<LOQ	4.18 ± 0.62 ^a	<LOQ	<LOQ	4.45 ± 0.76 ^b
Chr	9.17 ± 0.01 ^c	8.24 ± 0.80 ^{bc}	6.64 ± 0.28 ^{ab}	6.01 ± 0.15 ^a	6.21 ± 0.68 ^a
BbF	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
BaP	<LOQ	2.14 ± 0.35 ^a	<LOQ	<LOQ	2.14 ± 0.66 ^a
Sum of four PAHs	9.17 ± 0.01 ^c	14.56 ± 1.77 ^{bc}	6.64 ± 0.98 ^{ab}	6.01 ± 0.19 ^a	12.80 ± 2.10 ^{ab}

Values are means ± standard deviation (n=2). *Lipid content g 100g⁻¹ of milk chocolate. Different letters (a,b,c) in the same column indicate statistical differences between samples (p < 0.05). BaA: benzo[a]anthracene, Chr: chrysene, BbF: benzo[b]fluoranthene, BaP: benzo[a]pyrene. <LOQ: concentration below the limit of quantification.

Chrysene was the hydrocarbon most commonly found, with values ranging from 6.01 to 9.17 µg.kg⁻¹ of fat. Benzo[a]pyrene, which has proven carcinogenic potential, was detected in all of the commercial chocolate bars analyzed but was only quantified in two samples. All samples presented concentrations of BaP and the four combined PAHs that were below the maximum limit according to Regulation (EC, 2011a).

The low results for BaP and the four PAHs are in agreement with those of Belo et al. (2017), who analyzed samples of cocoa beans after fermentation and drying and found that only one of four samples of cocoa beans had high values (49.96 µg.kg⁻¹) exceeding the maximum specified in the Regulation No. 835/2011 (EC, 2011a; Belo et al., 2017). Kumari et al. (2012) verified that only 2 of 25 samples showed values between 5.97 and 12.76 µg.kg⁻¹ of fat for BaP, that is, above the permitted EC limit.

Milk chocolate bars contain varying compositions of ingredients, such as cocoa butter, cocoa mass, cocoa powder, sugar, and milk powder, all of which can be sources of contamination for PAHs (Ciecierska, 2020). The first factor in contamination can be the cocoa beans and cocoa products because the manufacturing process involves fermentation, drying, roasting, and conching, processes that employ high temperatures, inducing the formation of PAHs in cocoa butter, cocoa mass, and cocoa powder, as shown by Raters and Matissek (2014). The second most common ingredient in milk chocolate is milk powder, and this ingredient can contain PAHs, although low contamination in Brazilian samples was reported by Garcia Londoño et al. (2013). Like powdered milk, cane sugar is widely used as

an ingredient in milk chocolate and also can contain PAHs derived from the harvesting process (sugarcane burning) as shown by Tfouni and Toledo (2007).

Conclusion

Optimization of the extraction method allowed the use of a low sample mass of milk chocolate for the analysis, a reduction in the amount of solvent used in the saponification process, and a reduction of the total analysis time (saponification and SPE). The methodology presented good results for the validation parameters, such as detection and quantification limits of 0.11–0.57 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ and 0.50–1.00 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, respectively, and linearity over the ranges tested. The tests also showed good accuracy (recoveries greater than 95.25%) and precision (RSD lower than 10%). The application of the method in chocolate indicated that chrysene was the most abundant hydrocarbon in the samples and that the concentrations of BaP and the four combined PAHs were under the limits established by the European Communities Regulation.

Acknowledgments

We would like to address our thanks to the Coordination Office for Academic Staff Improvement (CAPES) for their support and for granting scholarships to the authors and the partnership of Adolfo Lutz Institute, São Paulo, Brazil, and São Paulo Research Foundation (FAPESP) Grant 2018/19005-6 for the use of the standards.

References

- Abdel-Shafy, H. I., & Mansour, M. S. M. (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*, 25(1), 107–123. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>.
- Akinpelu, A. A., Ali, M. E., Johan, M. R., Saidur, R., Qurban, M. A., & Saleh, T. A. (2019). Polycyclic aromatic hydrocarbons extraction and removal from wastewater by carbon nanotubes: a review of the current technologies, challenges and prospects. *Process Safety and Environmental Protection*, 122, 68-82. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2018.11.006>.
- Belo, R. F. C., Figueiredo, J. P., Nunes, C. M., Pissinatti, R., Souza, S. V. C. de, & Junqueira, R. G. (2017). Accelerated solvent extraction method for the quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in cocoa beans by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 1053, 87–100. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.03.017>.
- Beg, M. S., Ahmad, S., Jan, K., & Bashir, K. (2017). Status, supply chain and processing of cocoa - A review. *Trends in Food Science & Technology*, 66, 108–116. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.007>.
- Bogdanović, T., Pleadin, J., Petričević, S., Listeš, E., Sokolić, D., Marković, K., ... Šimat, V. (2019). The occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish and meat products of Croatia and dietary exposure. *Journal of Food Composition and Analysis*, 75, 49-60. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.09.017>.
- Camargo, M. C. R., Antonioli, P. R. & Vicente, E. (2011) Determinação simultânea por HPLC-FLD de 13 hidrocarbonetos aromáticos policíclicos: validação de um procedimento analítico para óleos de soja. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22(7), 1354-1361. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532011000700022>.
- Ciecierska, M. (2020). Cocoa beans of different origins and varieties and their derived products contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Food Chemistry*, 317, 126408. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126408>.
- European Communities (2011a). Amending Regulation (EC) n° 1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs. [Commission Regulation (EC) no 835/2011, of 19 August 2011]. *Official Journal of the European Union*, L215/4-L215/8.

European Communities (2011b). Amending Regulation (EC) n° 333/2007 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of lead, cadmium, mercury, inorganic tin, 3-MCPD and benzo(a)pyrene in foodstuffs. [Commission Regulation (EC) no 836/2011, of 19 August 2011]. *Official Journal of the European Union*, L215/9-L215/16.

Garcia Londoño, V.A., Garcia, L.P., Scussel V.M. & Resnik, S. (2013) Polycyclic aromatic hydrocarbons in milk powders marketed in Argentina and Brazil. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30(9), 1573-1580. <https://doi.org/10.1080/19440049.2013.810347>.

Hawthorne, S. B., Grabanski, C. B., Martin, E., & Miller, D. J. (2000). Comparisons of Soxhlet extraction, pressurized liquid extraction, supercritical fluid extraction and subcritical water extraction for environmental solids: recovery, selectivity and effects on sample matrix. *Journal of Chromatography A*, 892(1-2), 421–433. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00091-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00091-1).

International Agency for Research on Cancer – IARC. (2010). *Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Overall evaluation of carcinogenicity. Polynuclear Aromatic Compounds*. (v. 35). Lyon: IARC. Retrieved from <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol1-42/mono35.pdf>>.

International Agency for Research on Cancer – IARC. (2012). *Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Overall evaluation of carcinogenicity. Chemical Agents and Related Occupations*. (v. 100F). Lyon: IARC. Retrieved from <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100F/mono100F.pdf>>.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial – INMETRO. (2020) DOQ-CGCRE-008: *Orientação sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos*. (Revisão 9). Rio de Janeiro: INMETRO. Retrieved from <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/pesquisa_link.asp?seq_tipo_documento=5&cod_uo_numero_racao=00774&num_documento=001>.

Kumari, R., Chaturvedi, P., Ansari, N. G., Murthy, R. C., & Patel, D. K. (2012). Optimization and validation of an extraction method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in chocolate candies. *Journal of Food Science*, 77(1), T34–T40. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02488.x>.

Raters, M., & Matissek, R. (2014). Quantitation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH4) in Cocoa and Chocolate Samples by an HPLC-FD Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(44), 10666–10671. <https://doi.org/10.1021/jf5028729>.

Silva, S. A. da, Sampaio, G. R., & Torres, E. A. F. da S. (2017). Optimization and validation of a method using UHPLC-fluorescence for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in cold-pressed vegetable oils. *Food Chemistry*, 221, 809–814. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.098>.

Tfouni, S.A.V. & Toledo, M.C.F. Quantitation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH4) in cocoa and chocolate samples by an HPLC-FD method. *Food Control*, 18, 948 – 952. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.05.012>.

5.2 SEGUNDO ARTIGO

Polycyclic aromatic hydrocarbons in Brazilian commercial chocolate: An assessment of the content and dietary exposure.

O artigo descreve as concentrações de HPAs em 38 amostras de chocolates, lipídeos totais e a exposição dietética a Benzo[a]pireno de três grupos selecionados.

Abstract

For the production of chocolate, high temperatures are used in cocoa beans and in the ingredients used in chocolate. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) can be generated during these production steps, increasing human exposure to these carcinogens. The present study evaluated the presence of four polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in 38 chocolate samples, including milk chocolate, white chocolate, and chocolates with 40% until 70% cocoa. From the analyzed chocolates, the estimated Dietary Exposure (DEs) to benzo[a]pyrene (BaP) was evaluated by: gender (female and male); age (adolescents, adults and elderly) and place of residence (urban and rural). The chocolate samples 53% - 60% cocoa and chocolate 70% cocoa presented the highest contamination rates. Benzo[a]pyrene (BaP) was found in all chocolates, varying between 1.58 to 4.34 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ of fat, and the 4 PAHs ranged from 10.60 to 28.87 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ of fat, all below to limits established by the European Commission Regulation. The women's (by gender) and adolescents (by age) presented de bigger DEs to BaP by chocolate consumption. The results indicated low contamination of PAHs in chocolates analyzed; however, the consumption increased by different age groups can contribute to DEs to BaP.

Keywords: chocolate; polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs); high performance liquid chromatography (HPLC); occurrence; dietary exposure.

Introduction

Brazil is a country that presents a tradition in the cocoa (*Theobroma cacao* L.) production in the Latin America, being among the ten major producers of this commodity in the world, occupying the sixth position in the year 2018 (FAOSTAT, 2018). Small and large companies are focusing in simple, high quality and less generic products, using local cocoa beans and diversifying the chocolates according to the preferences of the consumers (Euromonitor International, 2019).

Numerous bioactive compounds are part of the chocolate composition, such as catechin, epicatechin, procyanidins and theobromine (Allgrove and Davison, 2014). Many studies demonstrate the positive effect of chocolate consumption on the prevention of cardiovascular disease (Kwok et al., 2015; Rull et al., 2015), diabetes (Greenberg, 2015), cognitive function (Crichton, Elias and Alkerwi, 2016; Suominen et al., 2020) and anti-carcinogenic effect (Martin, Goya and Ramos, 2013; Allgrove and Davison, 2014).

Despite the benefits obtained from chocolate consumption, the concern about contaminants present in chocolate is growing, like the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). The PAHs are a group of chemical compounds that present two or more fused aromatic rings and originate from petrogenic, biogenic and pyrogenic sources (Singh, Varshney and Agarwal, 2018; Cheng et al., 2019). The International Agency for Research on Cancer (IARC) and the European Communities Regulation (EC), through evaluation of epidemiological data and studies of carcinogenicity in animals, determined maximum limits for the 4 PAHs most commonly found in food: benzo[a] pyrene (BaP), benzo[a] anthracene (BaA), benzo[b] fluoranthene (BbF) and chrysene (Chr) (IARC, 2010; IARC, 2012; EC, 2011a). The EC established limits for several food, how to the cocoa and cocoa products, with the limits to BaP of $5.0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ of fat and the sum of 4 PAHs of $30.0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ of fat (EC, 2011a).

Foods are the main source of exposure to non-smoking PAHs, being that a special attention must be given to foods widely consumed by the population and that could contain high amounts of PAHs (Singh, Varshney and Agarwal, 2018; Cheng et al., 2019). Some studies have assessed PAHs contamination sources and concentrations in cocoa beans, chocolate and cocoa products (cocoa powder, cocoa butter, cocoa liquor) (Kumari et al., 2012; Raters and Matissek, 2014; Belo et al., 2019), however, there are still few studies that

investigate the concentrations of PAHs in commercial chocolates, specially in chocolates with different cocoa concentrations.

It is notable that the production of chocolate involves, in addition to the use of various products derived from cocoa, also the use of secondary ingredients, such as powdered milk and sugar. The cocoa beans went through several production stages, such as drying and roasting, with the use of high temperatures and, therefore, the formation and contamination for PAHs (Dos Santos Fogaça et al., 2018). Its derivatives, such as cocoa powder, cocoa butter and cocoa liquor added to chocolate can be sources of PAHs and the use of varying amounts can determine more or less PAHs in chocolate, depending on the amount of cocoa and cocoa products used (Raters and Matissek, 2014; Belo et al., 2019).

In Brazil, there is a high consumption of chocolate by the population, with a consumption of 3.9 g/day of chocolate and chocolate products (POF, 2010) and are still few studies that investigate the concentrations of PAHs in chocolates and cocoa products. Studies like that of Ziegenhals, Speer and Jira (2009), Kumari et al.; (2012), Rates and Matissek (2014) and Żyżelewicz et al., (2016) detected varied concentrations of PAHs in chocolate, considering conditions such as origin of chocolate and cocoa beans, production method, time period and other variables. With the limited number of studies on the evaluating the quantity of these PAHs in chocolate and the inexistence of studies about dietary exposure by chocolate consumption, makes this study the first to evaluated the of BaP by chocolate consumption.

Moving from these considerations, study was designed to determine and evaluate the content of PAHs in commercial chocolates by the content of cocoa declared on the labeling in the composition, including since the white chocolate, milk chocolate and to dark chocolates (40% to 70% of cocoa) and to evaluate the dietary exposure to BaP by consuming this chocolates.

Materials and methods

Sample collection

A total of 38 bar chocolate samples from 11 different brands were purchased from local supermarkets from July 2019 to January 2020 in São Paulo city, Brazil. The chocolate bars were separated according to the type of chocolate and the percentage of cocoa solids (mass, paste and/or liquor) declared on the labeling, 14 samples of milk chocolate, 10 samples of white chocolate, 11 samples of dark chocolate with varied cocoa contents (40% to 70%) and

3 samples of dark chocolate undeclared cocoa percentage. Samples were stored in their original packaging at a controlled temperature of -20 °C until the analysis time performed in the Laboratory of Food Components and Health, Faculty of Public Health (FSP-USP, Brazil).

Chemical and reagents

The standards used were BaA, Chr, BbF, and BaP purchased from Supelco (Bellefonte, PA, USA). Individual PAH solutions were prepared in acetonitrile at concentrations of 40 µg.mL⁻¹ (for BbF, Chr, and BaP) and 36 µg.mL⁻¹ (for BaA), and a mixture of all four PAHs at a concentration of 200 ng.mL⁻¹ was stored at -20 °C and used as the working solution.

The reagents used were analytical-grade potassium hydroxide (KOH) P.A. (Merck, HD, Germany) and sodium sulfate (Na₂SO₄) P.A. (LabSynth, SP, Brazil).

All solvents used, such as ethanol (≥99.99%) (Merck, HD, Germany), n-hexane (≥99.99%) (Merck, HD, Germany), acetonitrile (≥99.99%) (Sigma-Aldrich, MA, USA) and diethyl ether (LabSynth, SP, Brazil). Deionized water was obtained by using a Milli-Q purification system (Millipore, Bedford, MA, USA).

Solid-phase extraction (SPE) silica cartridges (500 mg, 6 mL, Discovery DSC-SI, Sigma-Aldrich, Palo Alto, CA, USA) and polytetrafluoroethylene filters (0.22 µm, 15 mm, Macherey-Nagel, DN, Germany) were used.

The PAHs glassware were washed with detergent and water, dried and rinsed with ethanol, acetone, and n-hexane before use.

Sample extraction and SPE purification

Procedures for sample extraction and SPE purification were carried out according to our previous study (data not published).

For saponification were performed using 1 g chocolate bar homogenized for 1 min. with 5 mL of 2.0 M potassium hydroxide in ethanol (≥ 99.9%). The solution was left for 3 h in a water bath at 42 °C with controlled stirring and protected from light. For liquid-liquid extraction, 5 mL of distilled water was added for further vortex homogenization for 1 min. 10 mL n-hexane was added to the samples and vortexed for 30 seconds to obtain the hexane phase and transferred to a separatory funnel. Three extraction cycles were performed,

followed by a 30 mL wash with distilled water. The aqueous phase was discarded and the extract was filtered in a qualitative filter with 5 g of Na₂SO₄ to remove traces of water in the extract. The extract was evaporated on a laminar flow hood. Samples were resuspended in 6 mL of acetonitrile and purified using silica solid phase extraction cartridge preconditioned with 3 mL of acetonitrile. Subsequently, the samples were evaporated and the residue was dissolved in 1 mL of acetonitrile, filtered in at 0.22 µm membrane and placed in amber vial for later quantification by chromatography.

Chromatographic conditions

The conditions were based on previous studies (Camargo, Antonioli and Vicente, 2011; Silva, Sampaio and Torres, 2017), with some adaptations. The samples were analyzed by HPLC system equipped with pump (LC-20 AT, Shimadzu, Tokyo, Japan), auto sampler (SIL-20AC, Shimadzu, Tokyo, Japan), controller (CBM-20A, Shimadzu, Tokyo, Japan), column oven (CTO-20A, Shimadzu, Tokyo, Japan), and fluorescence detector (RF-10AXL, Shimadzu, Tokyo, Japan). It was used a column C18 Shim Pack VP-ODS (C18, 250 × 4.6 mm., 5 µm, Shimadzu), protected by a guard column (Shimadzu, TYO, Japan) inside an oven at 35 °C. Automatic injection of 30 µL was used and the separation of PAHs was carried out with mobile phase with flow 1.5 mL.min⁻¹ and gradient (A: water, B: acetonitrile): 50% B for 0 - 20 min., 70% B for 20.01 – 50 min., 100% B for 50.01 – 55 min, and returning to initial conditions up to 60 min. Fluorescence detector different excitation and emission wavelengths were used for the analytes: 270/390 nm for BaA and Chr, and 290/430 nm for BbF and BaP.

Validation of analytical parameters

The validation methodology for PAHs was evaluated according to the tests of linearity, selectivity, accuracy, precision (repeatability), limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), proposed by the Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2020) and by the European Communities Regulation N^o 836 (EC, 2011b), as presented in the previous study (data not published).

Determination of total fat content

The lipids were determined using the methodology suggested Hawthorne et al. (2000), with modifications. The procedure used in chocolate samples was quantitative gravimetric

measurement with conventional Soxhlet extraction, using ethyl ether solvent (PA, LabSynth, SP, Brazil). The determination of lipids was performed in duplicate using 3 g of previously weighed sample. The device was operated for 6 h at a fixed temperature of 56 °C for the subsequent recovery of total lipids and solvent. The values of total lipids in the samples were obtained from the difference between the final weight of the reboiler for extraction of total lipids after the procedure and the initial weight of the same (previously tared).

Dietary exposure estimation to PAHs

The assessment of estimated daily intake to BaP from the consumption of chocolate bars was carried out according to the principles and methods for assessing the risk of chemical substances in foods proposed by the World Health Organization in the International Programme on Chemical Safety (WHO, 2009), which was calculated according to Equation

$$EDI = \sum (C_{BaP} \times IR) / BW$$

Where C_{BaP} concentration of BaP in chocolate ($\mu\text{g.kg}^{-1}/\text{dia}$); IR: daily ingestion amount of chocolate (g.dia^{-1}); BW: is the average body weight of population (kg).

To determine the estimated daily intake, data from the Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF, 2010) were used, the data were applied considering the consumption data of three categories: 1) Gender (female and male); 2) Age groups: adolescents (14 to 18 years), adults (19 to 59 years), and elderly (≥ 60 years); 3) Place of residence (urban and rural).

Data analysis

The results of the experiments were evaluated by means of unidirectional analysis of variance (ANOVA). The means and standard deviation were compared by using the Tukey multiple comparison test, with significance established at $p < 0.05$. The statistical evaluation was performed using the software system Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) for Windows (version 23.0).

Results and discussion

Validation of analytical parameters

The method of validating PAHs in chocolate showed adequate selectivity and sensitivity. The correlation coefficients achieved the values of 0.990 to 0.998 and for BaP showed no matrix interference. The recoveries for 4 PAHs varied from 90.9% to 108.1% and

the relative standard deviation values (range: 0.14 - 7.25%) confirm the accuracy of the method. the LOD and LOD values demonstrated rigor and quality of the method. The results were presented in the Table 1.

Table 1. Parameters of validation of 4 PAHs in chocolate bars.

PAHs	Linear range	r ²	Spike level (ng. mL ⁻¹)	Recovery (%)	RSD (%)	LOD (µg kg ⁻¹)	LOQ (µg kg ⁻¹)
BaA	1.00 – 5.00	0.9984	1.00	100.86	2.37	0.54	1.00
			2.00	98.27	2.81		
			3.00	100.66	0.63		
			4.00	100.75	0.79		
			5.00	99.53	2.43		
Chr	1.00 – 5.00	0.9904	1.00	99.88	0.51	0.57	1.00
			2.00	101.13	1.70		
			3.00	108.12	0.77		
			4.00	95.25	1.15		
			5.00	100.30	0.84		
BbF	1.00 – 5.00	0.9953	1.00	102.82	5.83	0.51	1.00
			2.00	98.23	3.18		
			3.00	100.72	7.25		
			4.00	98.76	0.14		
			5.00	100.70	1.53		
BaP	0.50 – 5.00	0.9986	0.50	100.30	2.48	0.11	0.50
			1.00	97.27	1.23		
			2.00	97.65	2.21		
			3.00	100.15	0.58		
			4.00	100.79	2.51		
			5.00	99.84	0.57		

BaA: benzo [a] anthracene, Chr: chrysene, BbF: benzo [b] fluoranthene, BaP: benzo [a] pyrene. %: percentage. RSD: relative standard deviation. LOD: limit of detection. LOQ: limit of quantification.

Determination of total fat content

The total fat composition of the chocolate samples in shown in Table 2.

Table 2. Total fat composition (g/100g of chocolate) and PAH levels ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) in different types of chocolate bar.

Chocolate type		Total fat	BaA	Chr	BbF	BaP	Σ 4 PAHs
Milk chocolate (n=14)	Mean	32.10 ^a \pm 7.58	3.12 ^a \pm 1.44	7.70 ^{ab} \pm 1.97	2.63 ^a \pm 0.98	1.00 ^a \pm 0.90	14.46 ^a \pm 4.57
	Median	29.03	2.05	6.48	2.25	1.28	13.86
	Min	21.71	< LOQ	5.56	< LOQ	< LOQ	8.20
	Max	62.06	7.08	13.56	4.40	2.61	26.22
	Mean	32.26 ^a \pm 2.83	4.76 ^{ab} \pm 2.85	9.73 ^{ab} \pm 3.83	3.72 ^{ab} \pm 2.07	2.31 ^a \pm 1.89	20.53 ^{ab} \pm 10.54
White chocolate (n=10)	Median	33.05	3.34	8.64	3.20	1.56	16.75
	Min	26.47	< LOQ	6.14	< LOQ	< LOQ	11.47
	Max	36.94	11.10	19.18	9.63	6.62	46.23
	Mean	26.90 ^a \pm 8.35	2.60 ^a \pm 1.01	9.29 ^{ab} \pm 4.00	3.04 ^{ab} \pm 1.71	0.79 ^a \pm 0.83	15.73 ^a \pm 7.15
	Median	28.00	2.59	7.82	2.47	0.68	13.55
40% cocoa chocolate (n=4)	Min	10.15	< LOQ	5.56	< LOQ	< LOQ	8.57
	Max	39.38	4.51	16.02	3.56	1.87	26.38
	Mean	35.01 ^a \pm 2.15	3.96 ^a \pm 1.29	7.97 ^{ab} \pm 1.22	2.94 ^{ab} \pm 0.93	1.64 ^a \pm 0.95	16.52 ^a \pm 4.31
	Median	36.02	3.93	7.64	2.59	1.88	16.04
	Min	30.34	< LOQ	6.48	2.74	1.74	11.12
53% to 60% cocoa chocolate (n=3)	Max	36.64	6.19	10.14	4.70	3.13	24.16
	Mean	36.56 ^a \pm 4.49	6.76 ^b \pm 2.56	11.01 ^b \pm 2.72	4.89 ^b \pm 1.75	4.56 ^b \pm 2.48	27.24 ^b \pm 9.10
	Median	38.07	6.13	12.46	6.01	4.26	28.87
	Min	26.68	3.10	6.62	2.38	1.41	13.61
	Max	40.09	10.25	13.76	6.93	7.94	37.48
70% cocoa chocolate (n=4)	Mean	47.28 ^{ab} \pm 13.28	3.91 ^{ab} \pm 1.04	5.84 ^a \pm 0.84	1.79 ^a \pm 0.72	1.56 ^a \pm 1.35	13.12 ^a \pm 2.78
	Median	41.84	3.75	5.43	2.35	2.25	13.78
	Min	36.02	2.65	4.69	< LOQ	< LOQ	9.14
	Max	64.03	5.41	7.17	2.12	3.32	15.45
	Dark chocolate undeclared cocoa (n=3)	Mean	47.28 ^{ab} \pm 13.28	3.91 ^{ab} \pm 1.04	5.84 ^a \pm 0.84	1.79 ^a \pm 0.72	1.56 ^a \pm 1.35
Median		41.84	3.75	5.43	2.35	2.25	13.78
Min		36.02	2.65	4.69	< LOQ	< LOQ	9.14
Max		64.03	5.41	7.17	2.12	3.32	15.45

Values are means \pm SD values (n=2). *Lipid content g/100 g of milk chocolate. Different letters (a,b,c) in the same column indicate statistical differences between samples ($p < 0.05$). BaA: benzo [a] anthracene, Chr: chrysene, BbF: benzo [b] fluoranthene, BaP: benzo [a] pyrene. <LOQ: concentration below the limit of quantification.

The results ranged from 26.90 to 47.28 g/100 g, and the 40% cocoa chocolate (26.90^a ± 8.35) showed the lowest values of total fat, different from undeclared cocoa chocolate (47.28^{ab} ± 13.28 g/100 g), with the highest fat values.

The chocolate has in its composition several types of fats. The main one is cocoa butter (characteristic of chocolate), but other fats like palm oil, shea butter and mango kernel oil can be used, with the objectives to reduce the cost of raw materials or modify the sensory characteristics of the final product. It should be noted that depending on the type of fat used, it can have harmful effects in textural or rheological properties of chocolate (Torres-Moreno et al., 2015; Chukwujindu et al., 2019)). In addition, the fats used in the composition of chocolate can present compounds harmful to health, such as PAHs, cholesterol oxides and lipid oxidation products, contributing to exposure to these compounds (Maldonado-Pereira et al., 2018; Chukwujindu et al., 2019).

Content of PAHs in chocolate bars

The concentration of each PAH and of \sum 4 PAHs as presented in Table 2.

The range of BaP concentration obtained between the samples of chocolate analyzed was 1.00 to 4.56 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ of fat, results considered below the maximum limits established by Regulation (EC) No. 835/2011 for cocoa beans and derived products, to 5.00 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ of fat (European Commission, 2011a). Other authors also have reported similar values for BaP in dark chocolate and milk chocolate. Raters and Matissek (2014) presented values of BaP between 1.56 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ of fat to dark chocolate and 1.96 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ of fat milk chocolate. Kumari et al. (2012), reported values more similar to the mean result found in the 4 samples of 70% cocoa chocolate analyzed, with was 4.56 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ of fat, the highest concentration found among the chocolate groups. Ziegenhals, Speer and Jira (2009) reported BaP values below 0.68 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ of fat in the chocolates with cocoa content between 42 and 70%, results higher than the values of this study, since the lowest concentration was 0.79 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ of fat (sample with 40% cocoa chocolate).

The presence of low values of BaP is not a positive result, since Chrysene was the most prevalent hydrocarbon, representing almost 50% of the PAHs presented in the chocolate samples. The chrysene range between samples was 5.84 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ of fat (undeclared cocoa in dark chocolate) to 11.01 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ of fat (70% cocoa in chocolate), high

values compared to concentrations of Chr obtained in 25 chocolate samples analyzed for Kumari et al., (2013), in which only one chocolate showed value higher than 2.91 ng.g⁻¹. This is a relevant result, because the monitoring of BaP individually may not be a completely adequate parameter to indicate low concentrations of PAHs in foods.

For the sum of 4 PAHs, the range was 14.46 µg.kg⁻¹ (milk chocolate) to 27.24 µg.kg⁻¹ of fat (70% cocoa chocolate), also below of 30.0 µg kg⁻¹ of fat, maximum limit for by the EC. The values of milk chocolate (14.46 µg.kg⁻¹) showed similar values to results of milk chocolate (10.11 µg.kg⁻¹) presented by Raters and Matissek (2014); and for the sample of dark chocolate (5.25 µg.kg⁻¹) the sample with 70% cocoa in our study (27.24 µg.kg⁻¹) demonstrated more contamination level in the comparison. Through our results, it is notable that there may be a relationship between higher concentrations of PAHs with the amount of cocoa products added to the analyzed chocolates, as seen by the results of the 70% cocoa chocolate sample, which have a higher percentage of cocoa. According to the researches of Raters and Matissek, (2014) and Misnawi (2012) products of cocoa, like cocoa mass (0.32 µg.kg⁻¹ and 3.80 µg.kg⁻¹), cocoa butter (0.96 µg.kg⁻¹ and 12.44 µg.kg⁻¹) and cocoa powder (1.07 µg.kg⁻¹ and 8.86 µg.kg⁻¹) presented significant concentration of BaP and the sum of the four PAHs, respectively.

The steps of preparation of cocoa, such as drying, roasting and pressing; and the steps of chocolate production, such as conching process; also have a significant effect on the formation of PAHs in these foods. The high temperatures used in the food matrix in these stages and the smoke involved in some of these processes (roasting) contribute significantly to the concentrations of PAHs in cocoa and cocoa products, as shown by Belo et al. (2019), evaluating the concentration of PAHs in Brazilian cocoa beans to affect fermentation and drying. The presence of more cocoa products in the chocolates 53 % - 60 % cocoa (1.64 µg.kg⁻¹) and 70 % cocoa (4.56 µg.kg⁻¹), which showed higher values of BaP in our study, demonstrates a tendency to contamination for PAHs by the amount of cocoa present in its composition.

In contrast, 40% cocoa chocolate (0.79 µg.kg⁻¹) and the milk chocolate (1.00 µg.kg⁻¹), presented a slightly low quantity of BaP in comparison to the others samples. It was observed with this results that the milk chocolates analyzed (14 samples), even with less cocoa and cocoa products in the composition, presented concentrations of BaP and the sum

of the 4 PAHs higher when compared to studies that also evaluated milk chocolate (Ziegenhals, Speer and Jira, 2009; Raters and Matissek, 2014). It was observed that the milk chocolate analyzed (14 samples), even with less cocoa and cocoa products in the composition, presented concentrations of BaP and the sum of the 4 PAHs ($14.46 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) higher compared to studies that also evaluated milk chocolate (Ziegenhals, Speer and Jira, 2009; Raters and Matissek, 2014).

The most abundant ingredients in the milk chocolate samples used in our study are sugar, powder milk, cocoa paste and cocoa butter. These ingredients can also be a source of contamination, like powdered milk, because of the production chain (high temperatures for removing moisture), since the PAHs are bioavailable and absorbed by animals' organisms. The results presented by Shariatifar et al. (2019) confirm the high concentration of PAHs in milk powder compared to pasteurized and sterilized milk. Sugar can also be contaminated by these hydrocarbons, by the sugarcane burning and smoke generated during the sugarcane harvesting (Cristale et al., 2012). Tfouni and Toledo (2007), confirmed this fact when found BaP and more 4 PAHs (BaA, benzo (k) fluoranthene, dibenz (a, h) anthracene and BbF) in 57% of the sugar samples selected in the Brazilian markets, including in organic sugar.

Dietary exposure estimation to Benzo [a] pyrene

The parameters used for dietary exposure to BaP calculation take into account the amount of chocolate consumed by the Brazilian population according to gender (g/day), average weight (kg) of the female and male population by age, data provided by the Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF, 2010) and the concentration of BaP ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ of fat) in the chocolate samples analyzed in this study.

The dietary exposure estimate to BaP via chocolate intake for male and female are show in Figure 1. The day consumption of chocolate by the male and the female population was 2.7 g/day and 4.2 g/day, respectively. It was used the weight, according to the POF (2010), of adult population (19 to 59 years) for the calculation of dietary exposure to BaP.

The female exposure is significantly higher than male in all types of chocolate. The chocolate with higher contribution of DEs was the chocolate 70% cocoa (0.160 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}/\text{day}$ for male and 0.294 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}/\text{day}$ for female) and the chocolate with 40% cocoa presented the

lower contribution of dietary exposure to BaP for the both gender (0.058 $\mu\text{g.kg/day}$ for male and 0.170 $\mu\text{g.kg/day}$ for female).

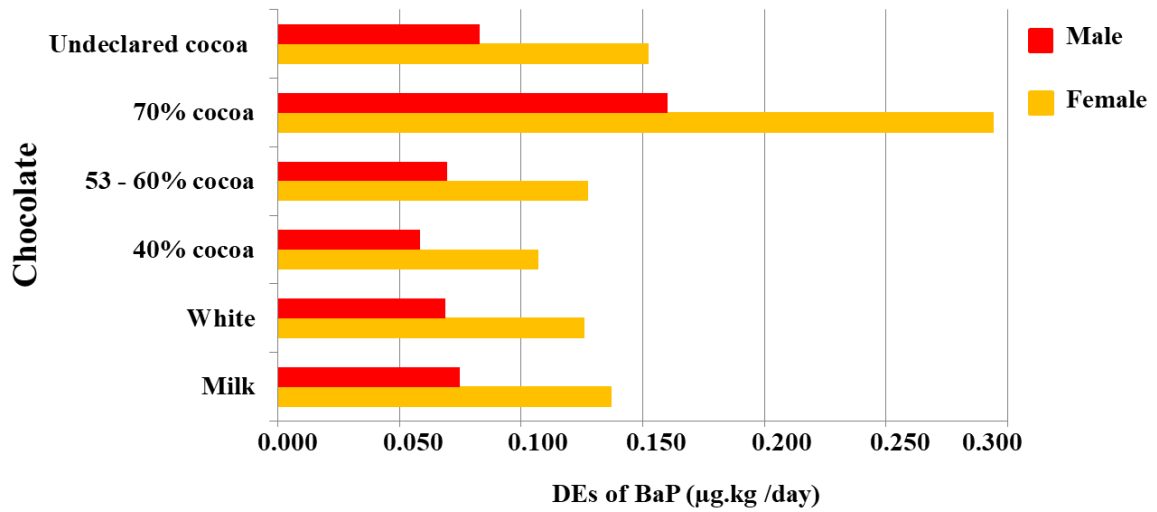


Figure 1. Dietary exposure estimation (DEs) to Benzo [a] pyrene according to the type of chocolate for male and female.

The results of DEs for adolescents (14 to 18 years), adults (19 to 59 years), and elderly (≥ 60 years) for gender (male and female) is presented in the Figure 2. The data presented by POF (2010) showed that chocolate consumption by adolescents, adults and the elderly was 6.2 g/day, 3.2 g/day and 1.4 g/day, respectively. The chocolate 70% cocoa presented the bigger contribution to adolescents group, with bigger dietary exposure estimation to BaP in relation to the others groups, especially for the female (0.448 $\mu\text{g.kg/day}$ for male and 0.505 $\mu\text{g.kg/day}$ for female), while the elderly group presented lower exposure (0.089 $\mu\text{g.kg/day}$ for male and 0.096 $\mu\text{g.kg/day}$ for female). The elderly group presented the lower DEs to BaP in relation to the others groups, with 0.045 $\mu\text{g.kg/day}$ for male and 0.50 $\mu\text{g.kg/day}$ for female to chocolate undeclared cocoa and 0.040 $\mu\text{g.kg/day}$ for male and 0.045 $\mu\text{g.kg/day}$ for female to milk chocolate.

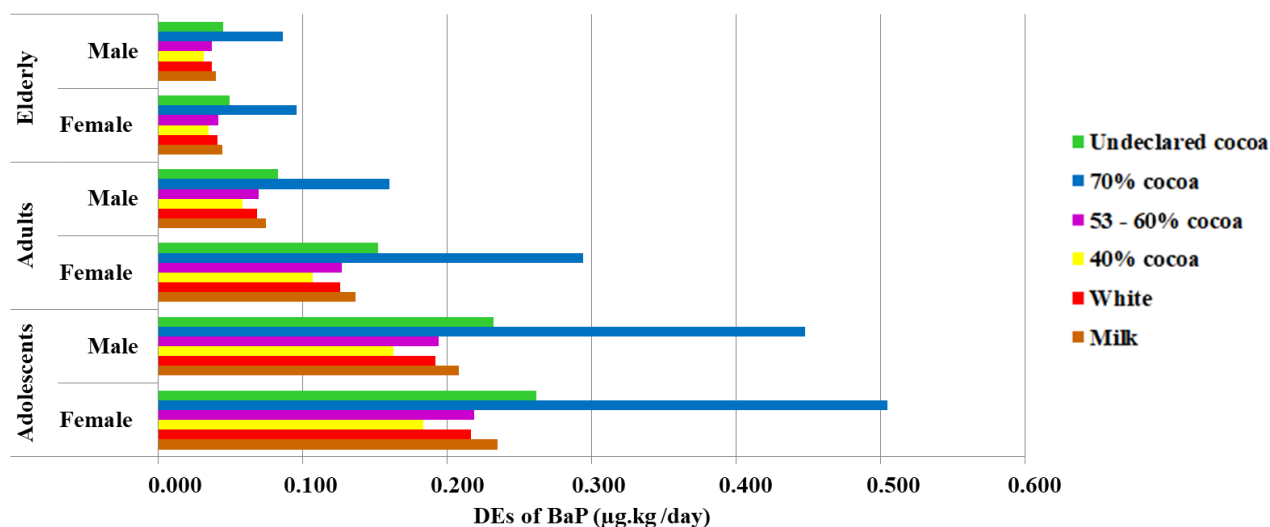


Figure 2. Dietary exposure estimation (DEs) to Benzo [a] pyrene according to the type of chocolate for age groups: adolescents (14 to 18 years), adults (19 to 59 years), and elderly (≥ 60 years).

In the all three group of ages (adolescents, adults and elderly), the women's presented the higher dietary exposure to BaP. One possible explanation for this fact is the close relationship between the changes in the endocrine eating behavior (menstrual cycle) and the higher preferences to foods sources of carbohydrates, like chocolate (Krishnan et al., 2016). The higher consumption of this food in comparison to men consumption viewed through POF data, its can be a factor to be considered when it leads to increased dietary exposure to BaP from chocolate ingestion; however, further studies in this area need to be carried out (Krishnan et al., 2016). The number of calories consumed by individuals (2 to 18 years old) of sweets can correspond to up to 365 kcal day, as shown by Reedy and Krebs-Smith (2010); this may associate the high presence of bap with the increase in adolescent dietary exposure to this hydrocarbon. In contrast, the reduced contribution to dietary exposure to BaP for the group of elderly group can be explained by the reduction of caloric intake, that is a characteristic of this population, with reduced consumption of protein sources and increased sources of carbohydrates, like chocolate (Engelheart, Brummer and Forslund, 2020). The contribution of chocolate to dietary exposure to BaP must be considered and monitored, by the fragility of elderly population.

The urban and rural population showed similar patterns of daily exposure to BaP to the other groups analyzed in this study; the results are shown in Figure 3.

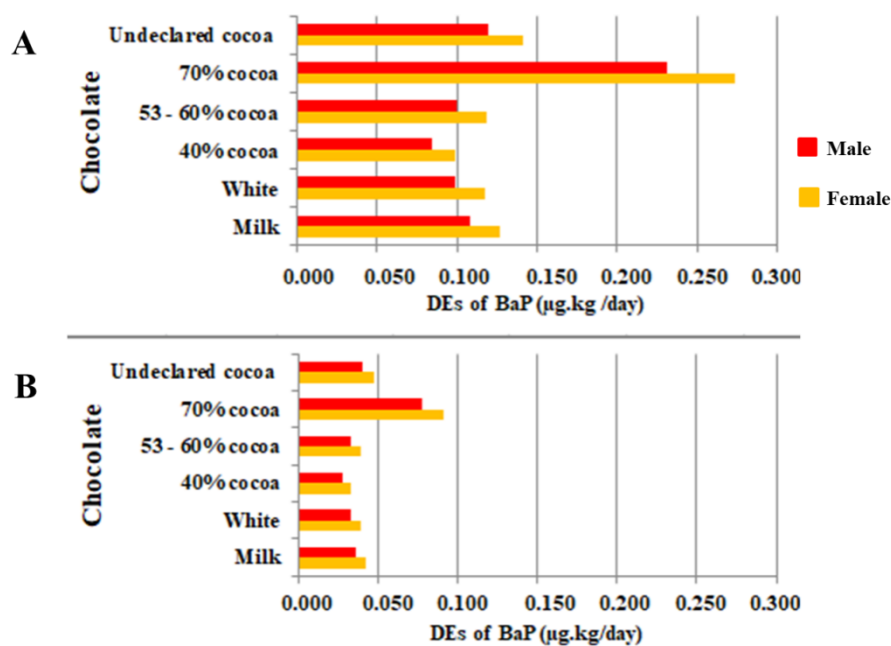


Figure 3. Dietary exposure estimation (DEs) to Benzo [a] pyrene according to the type of chocolate for the place of residence of male and female: urban (A) and rural (B).

In the urban residences, 70% cocoa chocolate (0.232 $\mu\text{g.kg/day}$ for male and 0.273 $\mu\text{g.kg/day}$ for female), undeclared cocoa (0.120 $\mu\text{g.kg/day}$ for male and 0.147 $\mu\text{g.kg/day}$ for female) and milk chocolate (0.108 $\mu\text{g.kg/day}$ for male and 0.127 $\mu\text{g.kg/day}$ for female) were also the types of chocolate with greater contribution to DEs. Although the dietary exposure was higher in urban residences, chocolates 70% cocoa (0.077 $\mu\text{g.kg/day}$ for male and 0.091 $\mu\text{g.kg/day}$ for female), chocolate undeclared cocoa (0.040 $\mu\text{g.kg/day}$ for male and 0.047 $\mu\text{g.kg/day}$ for female) and milk chocolate (0.036 $\mu\text{g.kg/day}$ for male and 0.042 $\mu\text{g.kg/day}$ for female) also presented a higher DEs in individuals living in rural residences.

The higher consumption of chocolate by the urban population is mainly because the easier access to this group of foods and the greater consumption of food out of home. Eating habits in rural homes are associated with a higher prevalence of home-cooked meals and consumption of food from local crops, and with changing eating patterns such as vegetables, roots and tubers consumption, and increased meat, milk, sugar and soft drinks consumption (Cattafesta et al., 2020). Socioeconomic issues also reduce the presence of foods such as chocolate in rural homes, contributing even less to the dietary exposure of these residents in rural areas (Cattafesta et al., 2020). Our results highlighted that the concentrations of PAHs in the samples of chocolates can be dependent on the cocoa

products and on the others, products used in the manufacture of chocolate; considering this fact, both need to be monitored for health agencies.

Others studies need to be desenvolved, investigating the main sources of contamination of PAHs in chocolates and to evaluate the production chain of this food, in order to define critical steps and to reduce the formation of PAHs.

Conclusion

The range of BaP concentration was $0.79 \mu\text{g.kg}^{-1}$ of fat (40% cocoa chocolate) to $4.564 \mu\text{g.kg}^{-1}$ of fat (70% cocoa chocolate), and for the sum of 4 PAHs, the range was $13.12 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (dark chocolate undeclared) to $27.24 \mu\text{g.kg}^{-1}$ of fat (70% cocoa chocolate). The concentrations of PAHs found in the chocolate samples of the present study did not exceed the maximum limits established by Regulation (EU) N^o. 835/2011 to BaP ($5.0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ of fat) and for the 4 PAHs ($30.00 \mu\text{g.kg}^{-1}$ of fat) analyzed. The chocolate samples that showed the highest concentration of BaP were chocolates 53% to 60% cocoa and chocolate 70% cocoa, values still below the established limits.

The chocolates analyzed in this study did not present values that suggest increased dietary exposure to BaP from their consumption. However, women (adolescents, adult and elderly) had greater dietary exposure to BaP through the consumption of chocolate, as well as for the age group, adolescents had greater exposure.

The results suggest that the greater amount of cocoa products (cocoa mass, cocoa powder and cocoa butter) and other ingredients added to the composition of chocolates, such as powdered milk and sugar, can contribute to the bioaccumulation of these contaminants in chocolate product. Thus, further studies will be necessary to monitor the contamination of chocolates by PAHs during the entire production process, since the action of high temperatures during these processes can generate these contaminants.

Acknowledgments

We would like to address our thanks to the Coordination Office for Academic Staff Improvement (CAPES) for their support and for granting scholarships to the authors and the partnership of Adolfo Lutz Institute, São Paulo, Brazil, and São Paulo Research Foundation (FAPESP) Grant 2018/19005-6 for the use of the standards.

References

- Allgrove, J. & Davison, G. Dark (2014). Chocolate/cocoa polyphenols and oxidative stress. (2014) In Watson, R.R, Preedy, V.R. & Zibadi, S. Polyphenols in human health and disease. (pp. 241 – 251) London: Elsevier.
- Belo, R. F. C. et al. (2017). Accelerated solvent extraction method for the quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in cocoa beans by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 1053, 87–100. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.03.017>
- Cattafesta, M., et al. (2020) Dietary patterns of Brazilian farmers and their relation with sociodemographic, labor, and lifestyle conditions. *Nutrition Journal*, 19, 23. <https://doi.org/10.1186/s12937-020-00542-y>
- Camargo, M. C. R., Antonioli, P. R. & Vicente, E. (2011) Determinação simultânea por HPLC-FLD de 13 hidrocarbonetos aromáticos policíclicos: validação de um procedimento analítico para óleos de soja. *Revista da Sociedade Brasileira de Química*, 22 (7), 1354-1361. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532011000700022>.
- Cheng, J. et al. (2019). Concentrations and distributions of polycyclic aromatic hydrocarbon in vegetables and animal-based foods before and after grilling: Implication for human exposure. *Science of The Total Environment*, 690, 965-972. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.074>
- Chukwujindu, M. A. et al. (2019) Evaluation of Human Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Some Edible Oils and Shea Butter in Nigeria. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 1563 – 5333. <https://doi.org/10.1080/10406638.2019.1570951>.
- Crichton, G.E., Elias, M.F. & Alkerwi, A. (2016) Chocolate intake is associated with better cognitive function: the Maine-Syracuse Longitudinal Study. *Appetite*, 100, 126 – 132. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2016.02.010>.
- Cristale, J. et al. (2012) Influence of sugarcane burning on indoor/outdoor PAH air pollution in Brazil. *Environmental Pollution*, 169, 210 – 216. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.03.045>

Dos Santos Fogaça, F. H., et al. (2018). Polycyclic aromatic hydrocarbons bioaccessibility in seafood: Culinary practices effects on dietary exposure. *Environmental Research*, 164, 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.02.013>

Engelheart, S., Brummer, R.J., & Forslund, H.B. (2020) Meal patterns in relation to energy and protein intake in older adults in home health care. *Clinical Nutritional ESPEN*, 35, 189 – 187. <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2019.10.003>

Euromonitor International. 10 Tendências Globais de Consumo 2019: De volta ao básico: Uma tendência de consumo em alimentos e bebidas no Brasil (2019).. Country report. Retrieved from <https://euromonitor.com/de-volta-ao-basico-uma-tendencia-de-consumo-em-alimentos-e-bebidas-no-brasil/>. Accessed 21 July 2020.

European Communities (2011a). Amending Regulation (EC) no 1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs. [Commission Regulation (EC) no 835/2011, of 19 August 2011]. *Official Journal of the European Union*, L215/4-L215/8.

European Communities (2011b). Amending Regulation (EC) no 333/2007 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of lead, cadmium, mercury, inorganic tin, 3-MCPD and benzo(a)pyrene in foodstuffs. [Commission Regulation (EC) no 836/2011, of 19 August 2011]. *Official Journal of the European Union*, L215/9-L215/16.

Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database (FAOSTAT). Cocoa beans and products (2018). Retrieved from http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity. Accessed 21 July 2020.

Greenberg, J. A. (2015). Chocolate intake and diabetes risk. *Clinical Nutrition*, 34(1), 129–133. <https://10.1016/j.clnu.2014.02.005>

Hawthorne, S. B. et al. (2000). Comparisons of Soxhlet extraction, pressurized liquid extraction, supercritical fluid extraction and subcritical water extraction for environmental solids: recovery, selectivity and effects on sample matrix. *Journal of Chromatography A*, 892 (1-2), 421–433. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00091-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00091-1).

International Agency for Research on Cancer – IARC. (2012). Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Overall evaluation of carcinogenicity. Chemical Agents and Related Occupations. (v. 100F). Lyon: IARC. Retrieved from < 10.1016/j.foodchem.2019.124977>

International Agency for Research on Cancer – IARC. (2010). Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Overall evaluation of carcinogenicity. Polynuclear Aromatic Compounds. (v. 35). Lyon: IARC. Retrieved from <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol1-42/mono35.pdf>>

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. (2010) Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008–2009: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, 150. Retrieved from <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv50063.pdf>.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial – INMETRO. (2020) DOQ-CGRE-008: Orientação sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos. (Revisão 8). Rio de Janeiro: INMETRO. Retrieved from <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/pesquisa_link.asp?seq_tipo_documento=5&cod_uo_numeroacao=00774&num_documento=008>.

International Programme on Chemical Safety - IPCS. (2010) Dietary exposure assessment of chemicals in food. In: Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food. WHO: Geneva, Switzerland, 6, 1- 98.

Krishnan, S. et al. (2016). Estradiol, SHBG and leptin interplay with food craving and intake across the menstrual cycle. *Physiology and Behavior*, 165, 304-312. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.08.010>

Kumari, R. et al. (2012). Optimization and validation of an extraction method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in chocolate candies. *Journal of Food Science*, 77(1), T34–T40. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02488.x>

Kwok, C. S. et al. (2015). Habitual chocolate consumption and risk of cardiovascular disease among healthy men and women. *Heart*, 101(16), 1279–1287. <http://dx.doi.org/10.1136/heartjnl-2014-307050>.

- Maldonado-Pereira, L. et al. (2018). The role of cholesterol oxidation products in food toxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 118, 908–939. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.059>
- Martin, M.A., Goya, L. & Ramos, S. (2013) Potential for preventive effects of cocoa and cocoa polyphenols in cancer. *Food and Chemical Toxicology*, 56, 336–351. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.02.020>
- Misnawi (2012) Effect of cocoa bean drying methods on polycyclic aromatic hydrocarbons contamination in cocoa butter. *International Food Research Journal*, 19, 4, 1589-1594.
- Raters, M., & Matissek, R. (2014). Quantitation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH4) in Cocoa and Chocolate Samples by an HPLC-FD Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(44), 10666–10671. <https://10.1021/jf5028729>.
- Reedy, J. E. & Krebs-Smith, S.M. (2010). Added Sugars among Children and Adolescents in the United States. *Journal of the American Dietetic Association*, 110, 10, 1477 – 1489. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2010.07.010>.
- Rull, G et al(2015). Effects of high flavanol dark chocolate on cardiovascular function and platelet aggregation. *Vascular Pharmacology*, 71, 70–78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vph.2015.02.010> .
- Shariatifar N. et al (2019). Levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in milk and milk powder samples and their likely risk assessment in Iranian population. *Journal of Food Composition and Analysis*. 103331 <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103331>
- Silva, S. A. da, Sampaio, G. R., & Torres, E. A. F. da S. (2017). Optimization and validation of a method using UHPLC-fluorescence for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in cold-pressed vegetable oils. *Food Chemistry*, 221, 809–814. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.098>.
- Singh, L., Varshney, J. G., & Agarwal, T. (2016). Polycyclic aromatic hydrocarbons' formation and occurrence in processed food. *Food Chemistry*, 199, 768–781. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.074>

Suominen, M. H. et al (2020). The short-term effect of dark chocolate flavanols on cognition in older adults: A randomized controlled trial (FlaSeCo). *Experimental Gerontology*, 110933. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2020.110933>.

Tfouni, S.A.V. & Toledo, M.C.F. (2007). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in cane sugar. *Food Control*, 18, 948- 952. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.05.012>

Torres-Moreno, M. et al. (2015). Nutritional composition and fatty acids profile in cocoa beans and chocolates with different geographical origin and processing conditions. *Food Chemistry*, 166, 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.141>

Ziegenhals, K., Speer, K., & Jira, W. (2009). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in chocolate on the German market. *Journal Für Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit*, 4(2), 128–135. <https://10.1007/s00003-009-0478-1>.

6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metodologia de extração e quantificação se mostrou adequada para a identificação dos quatro HPAs prioritários em amostras de chocolates com diferentes porcentagens de cacau, chocolate ao leite e chocolate branco. O método apresentou sensibilidade e seletividade adequadas frente às características das amostras e as concentrações baixas dos analitos nas mesmas.

Os grupos de amostras de chocolates analisados não apresentaram valores para BaP e para a soma dos 4 HPAs acima do limite máximo estabelecido pelo Regulamento da Comissão Europeia 835/2011. Dentre os grupos analisados, os chocolates 70 % cacau apresentaram os maiores valores, porém ainda abaixo do limiar preconizado. Esse resultado indica que a presença de produtos de cacau em maior quantidade na formulação desses chocolates pode contribuir para a presença de HPAs nos chocolates.

Frente aos grupos analisados (sexo, idade e local de residência), os chocolates 70 % cacau contribuíram para a maior exposição dietética ao BaP. Indivíduos do sexo feminino, adolescentes e residentes no ambiente urbano foram os grupos que mais sofreram a exposição dietética ao BaP pelo consumo de chocolate 70 % cacau.

A presença dos quatro HPAs prioritários nos chocolates analisados demonstrou a importância de programas de monitoramento da cadeia produtiva, dos demais produtos de cacau utilizados para a produção do chocolate (massa de cacau, manteiga de cacau e cacau em pó), assim como de ingredientes (açúcar e leite em pó) que também são utilizados na fabricação desse alimento.

7 REFERÊNCIAS REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

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

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIO – ANVISA. Ministério da Saúde. Resolução nº 2, de 15 de janeiro de 2007. Aprovar o Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, jan., 2007. p.1-19.

AKINPELU, A. A. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons extraction and removal from wastewater by carbon nanotubes: A review of the current technologies, challenges and prospects. **Process Safety and Environmental Protection**, Malásia, v. 122, p. 68 – 82, 2019.

ANDERSON, K.E. et al. Dietary intake of heterocyclic amines and benzo(a)pyrene: associations with pancreatic câncer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, Minneapolis, v.14, p. 2261 – 2265, 2005.

BOGDANOVIĆ, T. et al. The occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish and meat products of Croatia and dietary exposure. **Journal of Food Composition and Analysis**, Split, v. 75, p. 49-60, 2019.

BEG, M.S. et al. Status, supply chain and processing of cocoa - A review. **Trends in Food Science & Technology**, Índia, v. 66, p.108 – 116, 2017.

BELO, R.F.C. et al. Accelerated solvent extraction method for the quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in cocoa beans by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, Belo Horizonte, v.1053, p. 87–100, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeções do Agronegócio: Brasil 2017/18 a 2027/28 projeções de longo prazo / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Secretaria de Política Agrícola**, Brasília, DF, 2018. p.112.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 12 dez. 2011. p. 1- 38.

CAMARGO, M. C. R.; ANTONIOLLI, P. R.; VICENTE, E. Determinação simultânea por HPLC-FLD de 13 hidrocarbonetos aromáticos policíclicos: validação de um procedimento analítico para óleos de soja. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas – SP, v. 22, n.7, p. 1354-1361, 2011.

CAVALCANTI JÚNIOR, G.B., KLUMB, C.E.; MAIA, R.C. p53 e as hemopatias malignas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 48, 419-427, 2002.

CEPLAC - COMISSÃO EXECUTIVA DE PLANEJAMENTO DA LAVOURA CACAUEIRA. Cacau: histórico e evolução. Brasil: 2010. Disponível em: <http://www.ceplac.gov.br/radar/radar_cacau.htm>. Acesso em: 29 jan. 2020.

CHOUDHURI, S., CHANDERBHAN, R.; MATTIA, A. Carcinogenesis: mechanisms and models. In: _____. **Veterinary Toxicology**. London: Academic Press, 2018, p. 339 – 354.

CHENG, J. et al. Concentrations and distributions of polycyclic aromatic hydrocarbon in vegetables and animal-based foods before and after grilling: Implication for human exposure. **Science of The Total Environment**, Beijing, v. 690, p. 965–972, 2019.

DA SILVA, José Alencar Gomes (Cord.) **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2017.

DAS, D. N., e BHUTIA, S. K. Inevitable dietary exposure of Benzo[a]pyrene: Carcinogenic risk assessment an emerging issues and concerns. **Current Opinion in Food Science**, Odisha, v. 24, p. 16 – 25, 2018.

EUROPEAN COMMISSION. Commission regulation n° 835/2011 of 19 August 2011 amending regulation (EC) no. 1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, L215, 2011. p. 4-8.

EUROMONITOR INTERNATIONAL. Chocolate confectionery in Brazil. Country report. Brazil: 2018. Disponível em: < <https://blog.euromonitor.com/global-chocolate-industry/>>. Acesso em: 10 fev. 2020.

GARCIA LONDOÑO, V.A. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in milk powders marketed in Argentina and Brazil. **Food Additives & Contaminants: Part A**, Buenos Aires, v. 30, n.9, p. 1573-1580, 2016.

GIACOMETTI, J.;JOLIĆ, S.M.; JOSIĆ, D. Cocoa Processing and Impact on Composition. In: _____. **Processing and impact on active components in food**. London: Elsevier. 2015, p. 605-612.

GIKA, H. et al. Chromatography: High-Performance Liquid Chromatography. In: _____. **Encyclopedia of Food and Health**. London: Elsevier, 2016, p.93 – 99.

HWANG, M.J. et al. Reduction of the polycyclic aromatic hydrocarbon levels in dried red peppers (*Capsicum annuum* L.) using heat pump-assisted drying. **Food Chemistry**, Seoul, v. 297, p. 124977, 2019.

HAWTHORNE, S. B. et al. Comparisons of Soxhlet extraction, pressurized liquid extraction, supercritical fluid extraction and subcritical water extraction for environmental solids: recovery, selectivity and effects on sample matrix. **Journal of Chromatography A**, Grand Forks, v. 892, n.1-2, 421–433, 2000.

HARRIS, V.K.; SCHIFFMAN, J.D.; BODDY, A.M. Evolution of cancer defense mechanisms across species. In: _____. **Ecology and evolution of câncer**. London: Elsevier, 2017, p. 99 – 110.

HASCHEK, W.M., ROUSSEAU, C.G. e WALLIG, M.A. Gastrointestinal Tract. In: _____. **Fundamentals of toxicologic pathology**. London: Elsevier, 2010, p. 163 – 196.

SCOCCIANI, C. Carcinogens: Identification of Carcinogens. In: _____. **Encyclopedia of Food and Health**. Lyon: Elsevier, 2016. p. 658 – 662.

IARC - International Agency for Research on Cancer. **Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Overall evaluation of carcinogenicity**. Polynuclear Aromatic Compounds, v. 35. Lyon: IARC, 2010.

IARC - International Agency for Research on Cancer. **Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Overall evaluation of carcinogenicity**. Chemical Agents and Related Occupations, v. 100F. Lyon: IARC, 2012.

ICCO - INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION. About cocoa. Zurique: 2013. Disponível em: < <https://www.icco.org/about-cocoa/growing-cocoa.html>>. Acesso em: 29 jan. 2020.

IFEGWU, O.C. e ANYAKORA, C. Polycyclic aromatic hydrocarbons: part I exposure. **Advances in clinical chemistry**, Lagos, v. 72, p. 277 – 304, 2015.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008–2009: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil. **Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Rio de Janeiro: IBGE, 2010.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2017–2018: avaliação nutricional e disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil. **Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Rio de Janeiro: IBGE, 2019.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Levantamento Sistemático da produção Agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. **Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Rio de Janeiro: IBGE, v.30, n.1, p.1-181. 2017.

INMETRO - INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **DOQ-CGCRE-008: Orientação sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**. (Revisão 9). Rio de Janeiro: INMETRO, 2020.

IWEGBUE, C. M. A. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations in commercially available infant formulae in Nigeria: Estimation of dietary intakes and risk assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 72, p. 221–227, 2014.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dietary exposure assessment of chemicals in food. In _____. **Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food**. International Programme on Chemical Safety. Geneva: WHO, cap. 6, 2010, p. 1- 98,.

JAHURUL, M.H.A et al. Effect of accelerated storage on chemical compositions of mango seed fat and palm oil mid-fraction blends as cocoa butter replacers. **LWT- Food Science and Technology**, Sabah, v. 84, p. 551-554, 2017.

KATONA, B. W.; LYNCH, J.P. Mechanisms of gastrointestinal malignancies. In: _____. **Integrated GI physiology and pathophysiology**. London: Elsevier, 2018, p.1615 – 1642.

KUMARI, R et al. Optimization and validation of an extraction method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in chocolate candies. **Journal of Food Science**, Uttar Pradesh , v. 71, p. 34 – 40, 2012.

LI, G. et al. Concentration, dietary exposure and health risk estimation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in youtiao, a Chinese traditional fried food. **Food Control**, Shanghai, v. 59, p. 328–336, 2016.

LI, L.; LIU, G. Corn oil-based oleogels with different gelation mechanisms as novel cocoa butter alternatives in dark chocolate. **Journal of Food Engineering**, Guangzhou, v. 263, p. 114 – 122, 2019.

MAFRA, I.; AMARAL, J.S.; OLIVEIRA, B.P.P. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in olive oils and other vegetable oils; potential for carcinogenesis. In:_____. **Olives and olive oil in health and disease prevention**. Oxford: Academic Press, 2010, p. 489-498.

MALARKEY, D.E.; HOENERHOFF, M.J.; MARONPOT, R.R. Carcinogenesis: Manifestation and Mechanisms. In:_____. **Haschek a Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology**. London: Elsevier, 2013, p.83 – 104.

MISNAWI. Effect of cocoa bean drying methods on polycyclic aromatic hydrocarbons contamination in cocoa butter. **International Food Research Journal**, Indonesia, v. 19, n.4, p. 1589-1594, 2012.

MOLLE, D. R. D. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in canola, sunflower and corn oils and estimated daily intake. **Food Control**, Campinas – SP, v. 81, p. 96–100, 2017.

NAIR, K.P. Cocoa (*Theobroma cacao* L.). In: _____. **The agronomy and economy of important tree crops of the developing world**. London: Elsevier, 2010, p. 131 – 180.

OPAS - ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Folha informativa – Câncer. Brasil, 2018. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=1094>. Acesso em: 26 mai. 2020.

OSTROWSKA-LIGEŻA, E. et al. Thermogravimetric characterization of dark and milk chocolates at different processing stages. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Baku, v. 134, p. 623–631, 2018.

PREDAN, G.M.I.; LAZĂR, D.A.; LUNGU, I.I. Cocoa Industry - From plant cultivation to cocoa drinks production. In: _____. **Caffeinated and Cocoa Based Beverages**. London: Elsevier. 2019, p. 489 – 507.

PURCARO, G.; BARP, L.; MORET, S. Determination of hydrocarbon contamination in foods. A review. **Analytical Methods**, Undine, v.8, n.29, p. 5755–5772, 2016.

ROSE, M. et al. Investigation into the formation of PAHs in foods prepared in the home to determine the effects of frying, grilling, barbecuing, toasting and roasting. **Food and Chemical Toxicology**, London, v. 78, p. 1–9, 2015.

REY-SALGUEIRO, L. et al. Effects of toasting procedures on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in toasted bread. **Food Chemistry**, Ourense, v. 108, p.607–615, 2008.

ORECCHIO, S.; CIOTTI, V.P.; CULOTTA, L. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coffee brew samples: Analytical method by GC–MS, profile, levels and sources. **Food and Chemical Toxicology**, Palermo, v. 47 p. 819–826, 2009.

RATERS, M.; MATISSEK, R. Quantitation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH4) in Cocoa and Chocolate Samples by an HPLC-FD Method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Köln, v. 62, p. 10666–10671, 2014.

REZENDE, L.F.M. de et al. Proportion of cancer cases and deaths attributable to lifestyle risk factors in Brazil. **Cancer Epidemiology**, São Paulo, v. 50, p. 148 – 157, 2019.

SILVA, S.A.; SAMPAIO, G.R.; TORRES, E.A.F.S. Optimization and validation of a method using UHPLC-fluorescence for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in cold-pressed vegetable oils. **Food Chemistry**, São Paulo, v. 221, p. 809–814, 2017.

SINGH, L.; AGARWAL, T.. Polycyclic aromatic hydrocarbons in diet: Concern for public health. **Trends in Food Science & Technology**, Haryana, v. 79, p. 160–170, 2018.

SOUZA, M.F.M. et al. Transição da saúde e da doença no Brasil e nas Unidades Federadas durante os 30 anos do Sistema Único de Saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 23, n.6, p. 1737-1750, 2018.

SUN, Y.; WU, S.; GONG, G. Trends of research on polycyclic aromatic hydrocarbons in food: A 20-year from 1997 to 2017. **Trends in Food Science & Technology**, Shanghai, v. 83, p. 86–98, 2019.

TFOUNI, S.A.V.; TOLEDO, M.C.F. (2007) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in cane sugar. **Food Control**, Campinas – SP, v. 18, p. 948- 952, 2007.

ZELINKOVA, Z.; WENZL, T. The occurrence of 16 EPA PAHs in food – a review. **Polycyclic Aromatic Compounds**, Geel, v.35, p. 248–284, 2015.

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

ŻYŻELEWICZ, D. et al. Effects of various roasting conditions on acrylamide, acrolein and polycyclic aromatic hydrocarbons content in cocoa bean and derived there from chocolates. **Drying Technology**, Poland, v. 35, p. 363 – 374, 2017.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Lipídeos totais (g / 100g de chocolate) e concentração de HPAs ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) das amostras de chocolate ao leite, chocolate amargo/ meio amargo e branco.

Amostras	Lipídeos totais	BaA	Cri	BbF	BaP	Σ 4 PAHs
A1	33,98 ± 0,47	2,77 ± 0,30	6,68 ± 0,29	2,12 ± 0,02	0,54 ± 0,16	12,11 ± 0,73
A2	27,40 ± 0,31	2,34 ± 0,25	7,61 ± 0,30	2,27 ± 0,17	< LQ	12,66 ± 0,90
A3	35,30 ± 0,67	4,18 ± 0,44	8,24 ± 0,56	2,78 ± 0,14	2,14 ± 0,25	17,34 ± 1,11
A4	25,04 ± 3,32	2,69 ± 0,08	9,17 ± 0,01	3,40 ± 0,05	1,07 ± 0,04	16,33 ± 0,08
A5	28,64 ± 0,80	1,77 ± 0,11	6,64 ± 0,20	1,67 ± 0,28	< LQ	10,18 ± 0,70
A6	28,42 ± 0,20	2,92 ± 0,07	8,25 ± 0,04	3,46 ± 0,01	1,49 ± 0,01	16,12 ± 0,10
A7	26,79 ± 0,20	1,09 ± 0,11	6,01 ± 0,10	3,14 ± 1,63	< LQ	9,87 ± 1,32
A8	27,54 ± 0,37	1,12 ± 0,00	5,89 ± 0,01	1,59 ± 0,05	< LQ	8,38 ± 0,18
A9	38,68 ± 2,52	2,51 ± 0,11	5,66 ± 0,10	1,68 ± 0,16	< LQ	10,35 ± 0,45
A10	48,00 ± 4,06	4,45 ± 0,54	6,21 ± 0,48	2,61 ± 0,18	2,14 ± 0,47	15,41 ± 1,66
A11	37,97 ± 2,32	3,61 ± 0,16	7,00 ± 0,22	2,03 ± 0,05	0,92 ± 0,03	13,56 ± 0,41
A12	28,03 ± 2,34	5,56 ± 1,52	11,60 ± 1,96	2,94 ± 1,32	0,98 ± 0,34	21,07 ± 5,15
A13	35,75 ± 2,10	3,55 ± 0,42	7,45 ± 0,50	2,87 ± 0,34	1,81 ± 0,35	15,68 ± 1,61
A14	28,03 ± 2,34	5,17 ± 0,28	11,51 ± 0,42	4,35 ± 0,05	2,44 ± 0,17	23,47 ± 0,92
B1	30,91 ± 1,58	3,65 ± 0,05	8,70 ± 0,12	2,79 ± 0,05	1,39 ± 0,03	16,53 ± 0,15
B2	33,70 ± 0,02	2,92 ± 0,47	7,04 ± 0,53	2,01 ± 0,11	0,87 ± 0,26	12,84 ± 1,37
B3	28,98 ± 0,12	9,87 ± 0,94	18,02 ± 1,16	7,88 ± 1,75	5,81 ± 0,80	41,58 ± 4,66
B4	29,72 ± 0,31	2,89 ± 0,25	7,91 ± 0,27	2,85 ± 0,34	1,21 ± 0,20	14,86 ± 1,06
B5	27,71 ± 1,23	3,05 ± 0,07	8,65 ± 0,19	3,62 ± 0,04	1,78 ± 0,07	17,10 ± 0,28
B6	34,45 ± 0,48	4,56 ± 0,01	8,54 ± 0,23	2,97 ± 0,13	1,60 ± 0,27	17,67 ± 0,63
B7	33,46 ± 0,41	4,16 ± 0,12	8,20 ± 0,22	3,01 ± 0,00	1,63 ± 0,03	16,99 ± 0,37
B8	36,72 ± 0,21	2,57 ± 0,04	6,18 ± 0,04	2,18 ± 0,27	1,25 ± 0,05	12,18 ± 0,24
B9	33,46 ± 0,41	3,57 ± 0,00	8,26 ± 0,55	2,81 ± 0,36	1,58 ± 0,47	16,22 ± 1,38
B10	33,46 ± 0,41	10,42 ± 0,67	15,81 ± 0,70	7,10 ± 0,30	6,01 ± 0,41	39,35 ± 2,08
C1	28,86 ± 0,53	3,85 ± 0,66	9,70 ± 0,84	3,23 ± 0,33	1,49 ± 0,38	18,27 ± 2,22
C2	33,50 ± 5,89	1,79 ± 0,16	5,78 ± 0,22	1,56 ± 0,15	< LQ	9,12 ± 0,55
C3	16,04 ± 5,88	2,99 ± 0,33	15,16 ± 0,86	5,57 ± 0,04	1,58 ± 0,08	25,31 ± 1,07
C4	29,22 ± 1,98	1,80 ± 0,17	6,53 ± 0,26	1,82 ± 0,22	< LQ	10,24 ± 0,82
D1	36,02 ± 0,01	3,87 ± 0,27	7,67 ± 0,44	2,73 ± 0,30	1,78 ± 0,04	16,06 ± 0,97
E1	32,39 ± 1,05	2,81 ± 0,52	7,15 ± 0,67	2,37 ± 0,41	< LQ	12,94 ± 1,81
F1	36,61 ± 0,02	5,22 ± 0,97	9,09 ± 1,05	3,72 ± 0,98	2,54 ± 0,59	20,58 ± 3,58
G1	38,39 ± 0,28	3,44 ± 0,25	6,96 ± 0,33	2,40 ± 0,02	1,52 ± 0,11	14,32 ± 0,71
G2	37,70 ± 0,32	7,89 ± 1,10	11,83 ± 1,19	5,00 ± 0,84	4,75 ± 1,19	29,47 ± 4,33
G3	30,09 ± 3,41	6,13 ± 0,70	12,46 ± 1,06	6,01 ± 0,92	4,26 ± 0,86	28,87 ± 3,53
G4	40,05 ± 0,04	9,61 ± 0,64	12,81 ± 0,95	6,18 ± 0,20	7,72 ± 0,22	36,32 ± 1,17
F1	38,93 ± 2,91	2,98 ± 0,33	5,83 ± 0,25	< LQ	< LQ	9,78 ± 0,64
F2	63,98 ± 0,05	4,87 ± 0,54	5,03 ± 0,34	2,08 ± 0,04	3,09 ± 0,23	15,08 ± 1,07
F3	38,93 ± 2,91	3,89 ± 0,72	6,67 ± 0,50	2,42 ± 0,16	1,53 ± 0,12	14,50 ± 0,95

APÊNDICE 2 - Valores de exposição dietética diária ao BaP ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ dia) de acordo com sexo feminino (F) e masculino (M); idades (adolescentes (14 a 18 anos), adultos (19 a 59 anos) e idosos (≥ 60 anos)) e local de residência (urbana e rural).

	Sexo		Adultos		Adolescentes		Idosos		Residências rurais		Residências urbanas	
	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M
Chocolate												
Ao leite	0,939	0,512	1,61 2	1,43 0	0,93 9	0,51 2	0,30 6	0,27 6	0,29 1	0,24 6	0,87 2	0,73 9
Branco	1,135	0,619	1,94 8	1,72 8	1,13 5	0,61 9	0,37 0	0,33 4	0,35 1	0,29 8	1,05 4	0,89 4
40% cacau	0,918	0,500	1,57 6	1,39 8	0,91 8	0,50 0	0,29 9	0,27 0	0,28 4	0,24 1	0,85 2	0,72 3
53 – 60% cacau	1,087	0,592	1,86 6	1,65 5	1,08 7	0,59 2	0,35 4	0,31 9	0,33 6	0,28 5	1,00 9	0,85 6
70% cacau	1,956	1,066	3,35 8	2,97 8	1,95 6	1,06 6	0,63 8	0,57 5	0,60 5	0,51 3	1,81 6	1,54 0
Cacau não declarado	0,718	0,392	1,23 3	1,09 4	0,71 8	0,39 2	0,23 4	0,21 1	0,22 2	0,18 9	0,66 7	0,56 6

APÊNDICE 3 – Valores de exposição dietética diária a soma dos 4 HPAs ($\mu\text{g.kg}^{-1}$ dia) de acordo com sexo feminino (F) e masculino (M); idades (adolescentes (14 a 18 anos), adultos (19 a 59 anos) e idosos (≥ 60 anos)) e local de residência (urbana e rural).

	Sexo		Adultos		Adolescentes		Idosos		Residências rurais		Residências urbanas	
	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M
Chocolate												
Ao leite	0,137	0,075	0,23 5	0,20 8	0,13 7	0,07 5	0,04 5	0,04 0	0,04 2	0,03 6	0,12 7	0,10 8
Branco	0,126	0,069	0,21 6	0,19 2	0,12 6	0,06 9	0,04 1	0,03 7	0,03 9	0,03 3	0,11 7	0,09 9
40% cacau	0,107	0,058	0,18 4	0,16 3	0,10 7	0,05 8	0,03 5	0,03 1	0,03 3	0,02 8	0,09 9	0,08 4
53 – 60% cacau	0,127	0,069	0,21 9	0,19 4	0,12 7	0,06 9	0,04 2	0,03 7	0,03 9	0,03 3	0,11 8	0,10 0
70% cacau	0,294	0,160	0,50 5	0,44 8	0,29 4	0,16 0	0,09 6	0,08 6	0,09 1	0,07 7	0,27 3	0,23 2
Cacau não declarado	0,152	0,083	0,26 2	0,23 2	0,15 2	0,08 3	0,05 0	0,04 5	0,04 7	0,04 0	0,14 2	0,12 0

CURRÍCULO LATTES



Gloria Maria Guizellini

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/3333452552089945>

ID Lattes: **3333452552089945**

Última atualização do currículo em 24/08/2020

Nutricionista pelo Centro Universitário São Camilo (2014-2017). Atualmente mestranda pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo e bolsista pelo CNPq. Foi aluna de Iniciação Científica pela Faculdade de Saúde Pública, como bolsista CNPq (2016-2017). Atua na área de pesquisa em alimentos com enfoque em: Atividade antioxidante; Produtos de oxidação lipídica; e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos .
(Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome	Gloria Maria Guizellini
Nome em citações bibliográficas	GUIZELLINI, G. M.; GUIZELLINI, GLÓRIA MARIA
Lattes iD	http://lattes.cnpq.br/3333452552089945
Orcid iD	https://orcid.org/0000-0003-3365-5065

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública. Faculdade de Saúde Pública Pacaembu 01246904 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30617000
------------------------------	--

Formação acadêmica/titulação

2018	Mestrado em andamento em Nutrição em Saúde Pública. Faculdade de Saúde Pública - USP, FSP, Brasil. Título: Avaliação da presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em chocolates: Exposição ao consumo e implicações à saúde., Orientador: Profª. Dra. Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres. Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil. Palavras-chave: Chocolate; Cacau; Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos; Benzo(a)pireno. Grande área: Ciências Agrárias Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Saúde Coletiva / Subárea: Saúde Pública. Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Biologia Geral / Subárea: Contaminantes orgânicos.
-------------	---