

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA
DE ALIMENTOS

Parecer

Este exemplar corresponde ao redação
final da tese defendida por Castro
Fernando Mendoza Campos e aprovada
pela Comissão Julgadora em 01.09.86,
Campinas, 01 de Setembro de 1986.

[Assinatura]

Presidente da Banca

USO DO DETECTOR TERMOIÔNICO NITROGÊNIO-FÓSFORO
ESPECÍFICO (DNP) NA ANÁLISE DE N-NITROSAMINAS

10/86

NESTOR FERNANDO MENDOZA CAMPOS
Químico - Farmacêutico

Dr. Felix Guilherme Reyes Reyes
Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universi-
dade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em
Ciências de Alimentos.

ÍNDICE GERAL

INDICE DE TABELAS	IV
INDICE DE FIGURAS	V
RESUMO	VI
SUMMARY	VII
I - INTRODUÇÃO	01
II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	05
1. Histórico	05
2. Análise de nitrosaminas	08
2.1. Extração	09
2.2. Purificação dos extratos	11
2.3. Detecção	13
2.3.1. Métodos Indiretos	13
2.3.2. Métodos Diretos	17
III - MATERIAIS E MÉTODOS	22
1. Material	22
1.1. Matéria-prima	22
1.2. Reagentes	22
1.3. Aparelhos	23
2. Métodos	24
2.1. Determinação das nitrosaminas por cromatogra- fia gasosa	24
2.1.1. Parâmetros operacionais do cromatógra- fo	24
2.1.2. Estabilização do detector	24
2.1.3. Características da resposta do detec- tor termoiônico DNP	25

2.1.3.1. Linearidade da resposta.....	25
2.1.3.2. Reprodutibilidade da respos- ta	25
2.1.3.3. Limite de detecção	25
2.1.4. Curvas de calibração	26
2.2. Análise de nitrosaminas em bacon e linguiça..	26
2.2.1. Preparo da coluna de celite	27
2.2.2. Preparo das amostras	27
2.2.3. Eluição das nitrosaminas da coluna de celite	29
2.2.4. Concentração do eluado da coluna de celite	29
2.2.5. Purificação dos extratos	30
2.2.5.1. Preparo das colunas de puri- dicação	30
2.2.5.2. Eluição e concentração das nitrosaminas obtidas das co- lunas de sílica gel e alumi- na	30
2.2.6. Identificação das nitrosaminas	31
2.2.7. Confirmação da identidade das nitro- saminas por fotodecomposição	31
2.2.8. Cálculo da concentração das nitrosami- nas	32
2.2.9. Recuperação de nitrosaminas em bacon e linguiça	32
2.2.10. Reprodutibilidade da determinação de nitrosaminas em bacon e linguiça	33.

2.3. Determinação das nitrosaminas por cromatografia em camada delgada	33
2.3.1. Aplicação das amostras e desenvolvimento do cromatograma	33
2.3.2. Revelação e identificação das nitrosaminas	34
2.3.3. Revelação com reagente de Griess	34
2.3.4. Revelação com ninidrina	34

IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Característica da resposta do detector termoiônico DNP	35
1.1. Linearidade da resposta	35
1.2. Reprodutibilidade da resposta e limite de detecção	35
2. Purificação do eluado da coluna de celite utilizando a coluna de alumina e de sílica	38
3. Identificação e confirmação da identidade das nitrosaminas	46
4. Curvas de calibração e cálculo de concentração das nitrosaminas	46
5. Recuperação de nitrosaminas em bacon e linguiça ...	50
6. Reprodutibilidade da determinação de nitrosaminas..	52
7. Identificação das nitrosaminas por cromatografia em camada delgada	54
7.1. Separação e detecção	54
8. Conteúdo de nitrosaminas em bacon	56

V - CONCLUSÕES

60

VI - BIBLIOGRAFIA

61

INDICE DE TABELAS

1 - Principais nitrosaminas em alimentos	7
2 - Recuperação de nitrosodietilamina (NDEA) e nitrosodipropilamina (NDPA) em amostras de bacon e linguiça	51
3 - Reprodutibilidade da determinação de nitrosodimetilamina (NDMA) e nitrosopirrolidina (NPIR) usando como padrão interno nitrosodietilamina (NDEA) e nitrosodipropilamina (NDPA)	53
4 - Valores de Rf de nitrosaminas separadas em cromatofolhas de sílica gel	55
5 - Limite de detecção de nitrosaminas por cromatografia em camada delgada	57
6 - Conteúdo de nitrosodimetilamina e nitrosopirrolidina em diferentes amostras de bacon	58

INDICE DE FIGURAS

1	- Formação de nitrosaminas	02
2	- Etapas a efetuar na análise de nitrosaminas voláteis em alimentos	10
3	- Aparelho para destilação a pressão reduzida	12
4	- Métodos preferencialmente utilizados para extração de nitrosaminas voláteis em diversos alimentos	14
5	- Sistema de cromatografia em fase gasosa com detector TEA.	20
6	- Linearidade da resposta de detector termoiônico DNP	36
7	- Reprodutibilidade de resposta do detector termoiônico DNP	37
8	- Cromatograma de extrato de bacon obtido da coluna de <u>ce</u> lite	39
9	- Cromatograma de extrato de linguiça obtido da coluna de celite	40
10	- Distribuição das nitrosaminas em diversas frações do eluado de uma coluna de alumina	43
11	- Distribuição das nitrosaminas em diversas frações de eluado de uma coluna de sílica gel	44
12	- Cromatograma típico de um extrato de bacon purificado por coluna de sílica gel	45
13	- Efeito da irradiação de nitrosaminas com luz ultra-violeta	47
14	- Degradação de nitrosaminas, em meio diclorometano, por irradiação com luz ultra-violeta	48
15	- Curvas de calibração para nitrosodimetilamina e nitroso <u>pirrolidina</u>	49

RESUMO

No presente trabalho foi desenvolvido um procedimento analítico para a identificação e quantificação de N-nitrosaminas voláteis em bacon e linguiça, utilizando-se cromatografia gasosa acoplada a um detector termoiônico sem chama nitrogênio-fósforo específico (CG-DNP). Características de resposta deste detector, tais como: linearidade, reprodutibilidade e limite de detecção, foram determinadas para nitrosodimetilamina (NDMA), nitrosodietilamina (NDEA), nitrosodipropilamina (NDPA) e nitrosopirrolidina (NPIR).

As nitrosaminas foram extraídas por diclorometano a partir de amostras de bacon e linguiça, colocadas em coluna de celite. Os extratos obtidos desta coluna, em ambos tipos de amostras, foram de pureza insuficiente para o detector DNP sendo, portanto, necessária a sua purificação prévia à injeção no cromatógrafo. Com esta finalidade, colunas de sílica gel e alumina foram testadas, sendo que a efetividade da primeira coluna foi superior à de alumina.

Com o propósito de diferenciar nitrosocompostos de outros compostos presentes nas amostras, foi estudada a velocidade de decomposição fotoquímica, das nitrosaminas, por irradiação com luz ultravioleta. Isso também permitiu a confirmação destes nitrosocompostos. Cromatografia gasosa - DNP foi utilizada no estudo da fotodecomposição. Um método alternativo utilizado para a identificação dos mesmos compostos foi cromatografia em camada delgada.

A recuperação e reprodutibilidade do método na quantificação de NDMA e NPIR foram determinadas utilizando-se como padrões internos NDEA e NDPA. Os teores de NDMA e NPIR determinados em quatro amostras de bacon variaram na faixa de 19 a 51 µg/kg (ppb), teores estes frequentemente encontrados neste tipo de amostra.

SUMMARY

The information presented in this thesis covers research findings on the development of an analytical procedure for the analysis of volatile nitrosamines in bacon and sausage, using gas chromatography equipped with a Nitrogen Phosphorous Thermionic Detector (GC-NPD). Characteristics of the detector such as: reproducibility, linearity and limit of detection were determined for N-nitrosodimethylamine (NDMA), N-nitrosodiethylamine (NDEA), N-nitrosodipropylamine (NDPA) and N-nitrosopyrrolidine (NPYR).

The nitrosamines from bacon and sausage were extracted from a celite column using dichloromethane. Since the extracts from this column were not sufficiently pure for the NPD detector, they were purified using silica gel or alumina columns. The effectivity of the silica gel column was superior to that of the alumina column.

In order to differentiate Nitrosocompounds from other compounds present in the samples the velocity of photodecomposition of the nitrosamines using UV light was studied. This also allowed us to confirm the identity of these nitrosocompounds. GC-NPD was used in this study. Thin layer chromatography was used as an alternative method for the identification of the nitrosamines.

NDEA and NPYR were used as internal standards in the evaluation of the recovery and reproducibility of the method for the quantitation of the NDMA and NPYR. The concentrations of NDMA and NPYR determined in four samples of bacon were within those values frequently found for this type of samples, and varied from 19 to 51 $\mu\text{g/kg}$ (ppb).

I. INTRODUÇÃO

Nitrosaminas (NAs) são compostos orgânicos de fórmula estrutural $R_1R_2N-N=O$ onde R_1 e R_2 podem ser grupos alquilas, arilas ou partes de um anel. Estes compostos são o resultado da nitrosação preferencialmente em meio ácido, e principalmente de aminas secundárias pela ação dos agentes nitrosantes cloreto de nitrosila, anidrido nitroso e íon nitrônio, entre outros (Figura 1).

Pelo fato das reações de nitrosação poderem ocorrer no ar, solo, água e alimentos, as NAs se apresentam como um contaminante amplamente distribuído no meio ambiente.

As características toxicológicas das NAs estão associadas a efeitos teratogênicos, mutagênicos e principalmente carcinogênicos (tumores hepático, renal e esofágico). Tais efeitos têm sido observados numa ampla variedade de espécies que vão desde roedores até pássaros e peixes.

Uma alta atividade carcinogênica associada a uma estrutura química simples é propriedade comum dos compostos N-nitroso. Entre aproximadamente 300 compostos N-nitroso testados, a maior parte apresentou ação carcinogênica. Vários destes compostos produzem câncer mesmo quando administrados em dose única, sendo capazes também de induzir tumores na prole, quando administrados em fêmeas grávidas.

No homem, a quantidade de NAs que é ingerida, inalada ou absorvida através da pele é estimada entre 1 e 6 μg por dia, a qual provém de alguns ambientes industriais (borracharia e curtumes), fumo de cigarro, cosméticos, pesticidas, interiores de carros e alimentos. Uma outra fonte de exposição, estimada em 7 μg por dia, provém da formação de NAs in vivo, a nível do trato

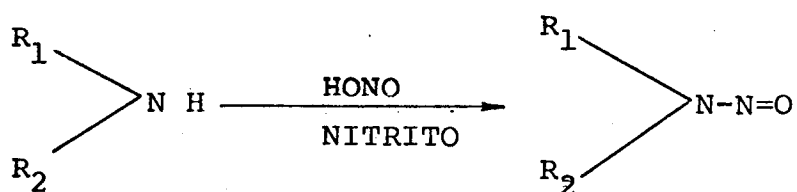
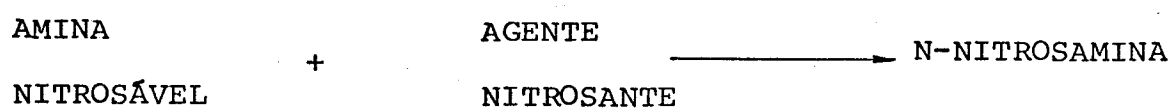


FIGURA 1 - Formação de Nitrosaminas.

gastrointestinal, por ingestão de precursores. Estes valores são, provavelmente, menores que os valores reais, já que não se tem conhecimento suficiente a respeito da exposição às NAS não voláteis.

A presença de NAS nos alimentos para consumo humano constitui um assunto de grande interesse na área da toxicologia de alimentos. A grande maioria dos trabalhos relativos à presença de NAS em alimentos têm sido desenvolvidos nos EUA, Europa e Japão. Até o presente, não existem dados disponíveis sobre o conteúdo de N-nitrosaminas em alimentos da América Latina. Isto ocorre devido à completa falta de condições analíticas para a determinação desses compostos em laboratórios destas regiões da América. Acreditamos que os dados obtidos sobre N-nitrosaminas voláteis, estabelecidos para países desenvolvidos como EUA e República Federal da Alemanha, não podem ser diretamente extrapolados à realidade brasileira. O Brasil é um país em desenvolvimento, apresentando portanto condições que podem contribuir para a existência de diferentes N-nitrosaminas em teores variáveis. Por exemplo, o uso de aditivos alimentares, tais como nitrito de sódio, não é controlado cuidadosamente no Brasil como o é em países mais desenvolvidos.

O objetivo geral do presente trabalho foi estabelecer um procedimento analítico para a identificação e quantificação de N-nitrosaminas voláteis baseado na utilização do detector termoiônico DNP.

Os objetivos específicos foram:

- 1- Estabelecer os parâmetros operacionais do cromatógrafo para a melhor separação e definição dos picos correspondentes às NAS padrões utilizadas neste estudo.

- 2- Estudar as características de resposta do detector termoiônico DNP às diferentes NAs.
- 3- Estabelecer um procedimento de extração e purificação de NAs, a partir de amostras de bacon e linguiça, para a obtenção de extratos de pureza adequada ao uso do detector termoiônico DNP na detecção das mesmas.
- 4- Estudar a fotodecomposição das NAs em meio diclorometano, visando a sua utilização na identificação desses nitrosocompostos.
- 5- Determinar a reprodutibilidade da determinação e a recuperação de NAs pelo método em estudo.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. HISTÓRICO

O estudo da química das NAs iniciou-se em 1863 com a síntese da nitrosodietilamina (NDEA). Os estudos relativos à cinética da reação em meio aquoso, do ácido nitroso e diversas aminas, foram porém iniciados somente a partir de 1929 (TAYLOR e PRICE, 1929).

Nitrosodimetilamina (NDMA), o membro mais simples da família das NAs, tem sido utilizada como solvente industrial e como intermediária na síntese de 1,1 dimetilhidrazina. Além disso, tem sido sugerido o uso de outras NAs como repelentes de insetos, inseticidas, fungicidas e nematicidas (CROSBY e SAWYER, 1976).

Os aspectos toxicológicos dos compostos N-nitroso foram estudados por Freund em 1937, descrevendo a NDMA como uma "substância tóxica volátil a qual, depois de inalada, exercia uma ação característica no fígado" (hipertrofia regenerativa difusa e proliferação de células hepáticas). Em 1954, Barnes e Magge redescobriram este efeito e demonstraram, dois anos depois, que NDMA não só era altamente hepatotóxica, mas também altamente carcinogênica em animais de laboratório (WEISBURGER e RAINERI, 1975). Este fato, junto ao reconhecimento, em 1948, do risco apresentado por N-nitroso-N-metil uretano, levou a que as NAs fossem consideradas como um perigo industrial (SHANK, 1975).

Os primeiros indícios de que NAs poderiam estar presentes nos alimentos surgiram no período 1957-1962, na Noruega, quando foram detectadas alterações no fígado de ruminantes e mar-
tas que tinham consumido ração preparada com peixe ou farinha de

peixe preservada com nitrito de sódio (WOGAN E TANNENBAUM, 1975). Em 1964, Ender e Col. detectaram a presença de NDMA nessa ração animal e sugeriram que a dimetilamina, presente naturalmente na ração, reagira com nitrito para formar NDMA (ENDER e Col., 1964). Desde então, NAS tornaram-se objeto de grande interesse toxicológico, sendo reconhecidas como um perigo ambiental.

Grande número de trabalhos tem sido publicados a respeito das NAS abordando os seguintes aspectos: 1. Métodos de análise (HOTCHKISS e col., 1981; SCANLAN, 1984; SCANLAN e REYES, 1985). 2. Presença de NAS no ambiente, incluindo os alimentos (HAVERY e col., 1978; Nitrite Safety Council, 1980; SEN e col., 1985). 3. Mecanismos de formação de NAS (BHARUCHA e col., 1979; YAMADA e col., 1984; SKRYPEC e col., 1985), inclusive formação in vivo nas condições do estômago (OSHIMA e BARTSCH, 1981; HART e WALTERS, 1983; WAGNER e TANNENBAUM, 1985). 4. Mecanismos para evitar a formação de NAS (FIDDLER e col., 1978; ROBACH e col., 1980; THEILER e col., 1984).

Vários tipos de estruturas contendo nitrogênio podem ser nitrosadas. Dentre estas se incluem aminas, ureias, uretanos e guanidinas que se encontram presentes em praticamente todos os alimentos (LIJINSKY e EPSTEIN, 1970; MAGA, 1978). A presença de nitrito em alguns alimentos é o resultado da redução de nitratos por plantas e enzimas microbianas (WOLFF e WASSERMAN, 1972) e da adição de nitrito como aditivo no processamento de carnes curadas (CASSENS e col., 1979; FLORES, 1982; GRAY e col., 1982). As principais NAS encontradas em alguns alimentos e suas respectivas faixas de concentração estão indicadas na Tabela 1.

Dentre as carnes curadas, o bacon é o alimento que tem recebido maior atenção, já que nitrosopirrolidina (NPIR) e também nitrosodimetilamina (NDMA) e nitrosohidroxipirrolidina (NHPIR) encontram-se

TABELA 1 - Principais nitrosaminas em alimentos

Nitrosamina	Concentração µg/kg de alimento (ppb)
NPIR, NTHZ e NDMA no bacon frito	1 - 50
NDMA, NDEA, NMOR, NPIP, NTHZ e NPRO esporadicamente nas carnes curadas.	1 - 25
NHPIR no bacon frito	1 - 3
NDMA esporadicamente em queijo	1 - 13
NDMA esporadicamente em peixe	1 - 25
NDMA em farinha de peixe	45 - 1700
NDMA em leite em pó desengordurado	0,1 - 6
NDMA em cerveja	0,1 - 15

NPIR: nitrosopirrolidina, NTHZ: nitrosotiazolidina,
 NDMA: nitrosodimetilamina, NDEA: nitrosodietilamina,
 NMOR: nitrosomorfolina, NPIP: nitrosopiperidina,
 NPRO: nitrosoprolina, NHPIR: nitrosohidroxipirrolidina

Fonte: Reyes e Scanlan, 1984.

normalmente presentes neste produto (SCANLAN, 1983; FIDDLER e col., 1984). Outro composto que também tem sido detectado no bacon é N-nitrosotiazolidina (NTHZ) (KIMOTO e col., 1982), a qual é formada durante o processo de defumação (PENSABENE e FIDDLER, 1983, 1985).

A presença de dimetil e trimetil amina em peixes (MILLER e col., 1973; RITSKES, 1975), tornam possível a formação de NDMA em peixes preservados com nitrito e peixes defumados (HOWARD e col., 1970). A formação de NDMA ocorre também durante a cocção de peixe (KEY e col., 1982) e durante a etapa de secagem para obtenção da farinha de peixe (SEN e col., 1972) por ação de óxidos de nitrogênio presentes no fluxo de gases quentes (SCANLAN, 1983).

A produção de óxidos de nitrogênio explica também a formação de NAs em outros alimentos secados por aquecimento direto, onde o fluxo de gases quentes entra em contato direto com o alimento. Dentre esses alimentos incluem-se sopas desidratadas, alimentos infantis (SEN e SEAMAN, 1981a), malte e cerveja (ASBC, 1982; HAVERY e col., 1984) e leite em pó desengordurado (SEN e col., 1984) nos quais tem sido detectada a presença de NDMA, e também café solúvel, no qual tem sido detectada NPIR (SEN e SEAMAN, 1981a).

2. ANÁLISE DE NITROSAMINAS

As concentrações nas quais as NAs se encontram presentes nos alimentos são da ordem de $\mu\text{g/kg}$ de alimento (FINE e col., 1975a). Tais níveis são significativos, se considerarmos que as estimativas de uma exposição "tolerável" para o homem situam-se ao redor de 5-10 $\mu\text{g/kg}$ de alimento (Anônimo, 1984). Este fato li

mita o uso de métodos analíticos para aqueles com sensibilidade mínima de 10 µg/kg (DRESCHER e FRANK, 1978).

Um outro aspecto a considerar na seleção do método de análise é sua especificidade. Esta característica influi diretamente no tratamento ("clean up") de amostras complexas como são os alimentos, exigindo etapas para a remoção de componentes naturais que possam interferir na detecção e identificação das NAs presentes. Na Figura 2, estão apresentadas as etapas a serem efetuadas na análise por destilação de NAs voláteis.

2.1. Extração

Para propósitos de análise, as NAs são divididas em voláteis e não-voláteis. O termo NAs não-voláteis aplica-se a todo composto N-nitroso não destilável dentro de um sistema aquoso. Tais compostos incluem dialquilnitrosaminas de cadeia longa, N-nitrosourêias, N-nitrosopeptídeos e N-nitrosoderivados de bases orgânicas, das quais N-nitrososarcosina e N-nitrosoprolina são as mais conhecidas (KUBACKI, 1979). Amplas diferenças nas propriedades químicas e físicas desses compostos dificultam o estabelecimento de métodos analíticos de aplicação geral, motivo pelo qual, as NAs não-voláteis têm sido pouco estudadas em alimentos (BARTSCH e O'NEILL, 1984).

As NAs voláteis são compostos de baixo peso molecular que apresentam suficiente pressão de vapor para serem extraídas por destilação a partir de um sistema aquoso, em meio alcalino (FAZIO e col., 1973) ou neutro (CROSBY e col., 1972), já que em pH ácido as NAs tendem a se degradar (WOLFF e WASSERMAN, 1972). A destilação efetua-se a pressão atmosférica (SEN e SEAMAN, 1981b), a pres-

EXEMPLO: NDMA, NDEA, NPIR, NMOR

EXTRAÇÃO POR DESTILAÇÃO

SEPARAÇÃO POR CROMATOGRAFIA GASOSA

DETECÇÃO A NÍVEL DE 0,1 ppb

CONFIRMAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSA A NÍVEL
DE 1,0 ppb

FIGURA 2 - Etapas a serem efetuadas na análise de nitrosaminas vo
láteis em alimentos. NDMA: nitrosodimetilamina, NDEA:
nitrosodietilamina, NPIR: nitrosopirrolidina, NMOR:
nitrosomorfolina.
ppb: $\mu\text{g/kg}$ de alimento.

são reduzida (TELLING e col., 1971), ou também pode ser uma destilação rápida a pressão reduzida a partir de um sistema contendo óleo mineral (FINE e col., 1975b; HAVERY e col., 1978), sendo a destilação a pressão reduzida o método de maior recuperação. Na Figura 3, encontra-se um esquema do aparelho empregado na destilação a pressão reduzida de NAs voláteis, usando óleo mineral. Para este último procedimento, o qual foi adotado pela AOAC em 1982 (ANÔNIMO, 1982), têm sido sugeridas algumas modificações para torná-lo ainda mais rápido e seletivo (OWENS e KINAST, 1980). A extração direta com solventes, utilizando extratores contínuos tipo Soxhlet, tem demonstrado ser útil na determinação de ambos os tipos de NAs (KUSHNIR e col., 1975; HOTCHKISS e col., 1980).

2.2. Purificação dos extratos

Na análise de NAs, para a remoção de substâncias interferentes, têm sido utilizados: resinas de troca iônica (SEN e col., 1969), cromatografia em gel de Sephadex (EISENBRAND e col., 1970), e colunas cromatográficas de celite (HOWARD e col., 1970), alumina (SEN, 1970) e sílica gel (ESSIGMANN e ISSENBERG, 1972).

Os compostos retidos na coluna, dependendo do método escolhido, são eluídos com pentano (SEN, 1970), éter (BROOKS e col., 1972), ou hexano (FIDDLER e col., 1972). Também têm sido utilizados; ciclohexano (ALLISTON e col., 1972) e misturas éter: pentano (TELLING, 1972) e diclorometano: pentano (PENSABENE e col., 1982).

Avanços quanto à especificidade dos métodos de detecção têm permitido a simplificação do tratamento da amostra. Colunas de celite eluídas com pentano e/ou diclorometano, produzem ex

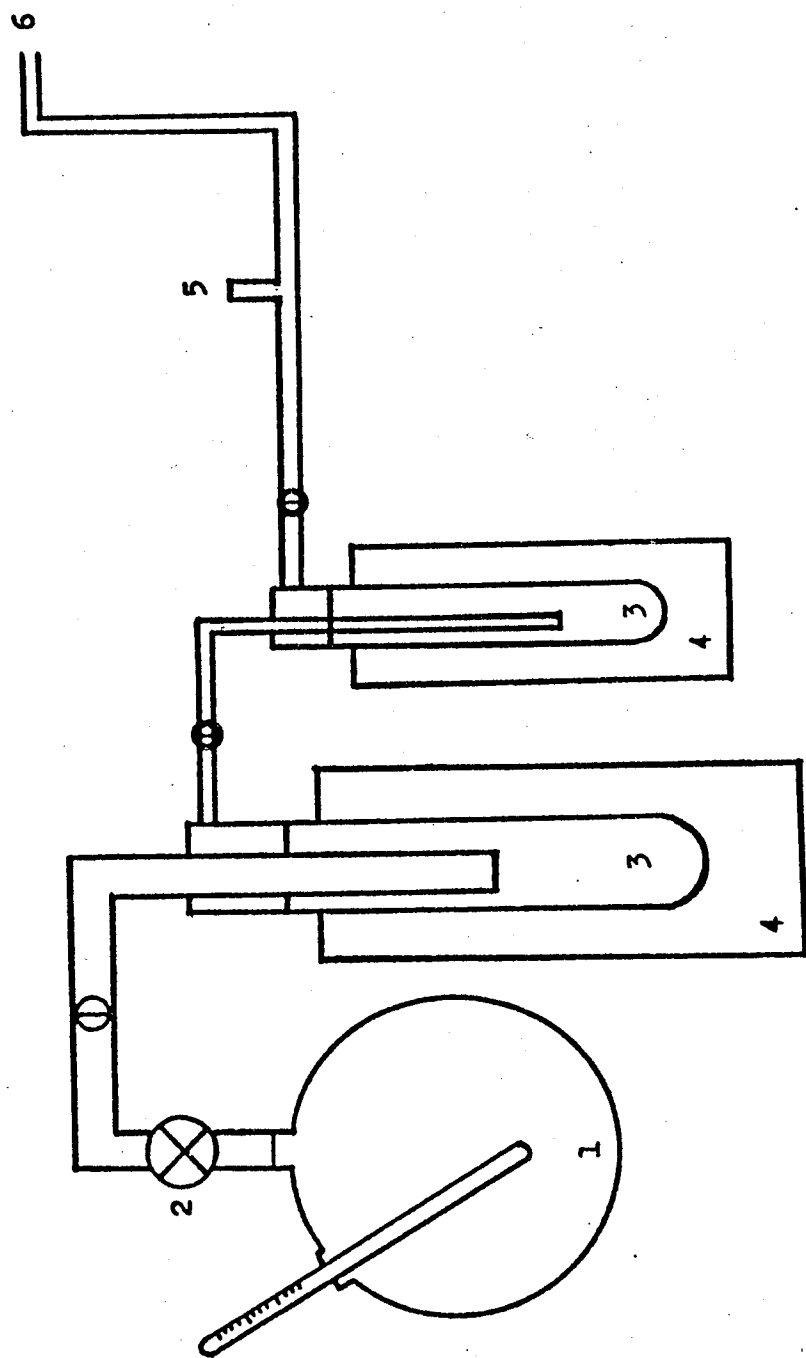


FIGURA 3 - Aparelho para destilação a pressão reduzida.

1. Balão de fundo redondo; 2. Chave de controle de vácuo; 3. Condensadores de vapor; 4. Banho de nitrogênio líquido; 5. Purga de vácuo; 6. Ligação à bomba de vácuo.

tratos a partir de amostras de bacon (PENSABENE e col., 1982), de isolados e concentrados protéicos de soja (FAZIO, 1982), de cerveja (HOTCHKISS e col., 1981; HAVERY e col., 1984) e de leite em pó desengordurado (SEN e col., 1984), com pureza suficiente para a determinação de NAS voláteis em concentrações de $\mu\text{g/kg}$ de alimento. O uso combinado de um gás de arraste (nitrogênio ou argônio) com materiais adsorventes das NAS, dispostos num determinado arranjo, tem dado bons resultados na extração e purificação de NAS voláteis em amostras de rações animais (BILLEDEAU e col., 1984) e alimentos infantis (WESTENDORF, 1985). Na Figura 4, estão resumidos os métodos de extração, preferencialmente utilizados na análise de NAS voláteis.

2.3. Detecção

2.3.1. Métodos Indiretos

Os compostos N-nitroso são degradados pela ação do ácido bromídrico (EISSENBRAND e PREUSSMANN, 1970), pela redução eletroquímica (ALLISTON e col., 1972), pelo cloreto de tionilo (LUNT e col., 1973) e pela radiação ultravioleta (DOERR e FIDDLER, 1977). São produtos principais desta reação o ácido nitroso, ou um derivado deste, e a correspondente amina secundária (CHOW, 1967; JOHNSON e WALTERS, 1971). A detecção destes produtos de decomposição constituem a base de grande parte dos métodos indiretos que têm sido utilizados na determinação de NAS em alimentos.

Existem vários métodos para se detectar o ácido nitroso (SAWICKI e col., 1963), sendo alguns deles aplicados na análise de NAS (YOUNG, 1978). Dentre esses métodos encontram-se aque-

PROCEDIMENTO	ALIMENTO
DESTILAÇÃO A PRESSÃO REDUZIDA A PARTIR DE ÓLEO MINERAL	BACON FRITO
DESTILAÇÃO A PRESSÃO REDUZIDA A PARTIR DE ÓLEO MINERAL	CEVADA MALTE
DESTILAÇÃO A PRESSÃO ATMOSFÉRICA USANDO HIDRÓXIDO DE BÁRIO	CERVEJA
DESTILAÇÃO A PRESSÃO ATMOSFÉRICA	CERVEJA
COLUNA DE CELITE	CERVEJA
COLUNA DE CELITE	BACON FRITO
COLUNA DE CELITE	LEITE EM PÓ DESENGORDURADO

FIGURA 4 - Métodos preferencialmente utilizados na extração das nitrosaminas voláteis em diversos alimentos.

les em que o ácido nitroso reage quantitativamente com o reagente de Griess (ácido sulfanílico/1-naftilamina) (VASUNDHARA e col., 1975), com o reagente NEDSA (N-1-naftilendiamina/ácido sulfanílico) (SEN e DALPE, 1972), ou com o reagente de Preussmann (cloreto de paládio/difenilamina) (PREUSSMANN e col., 1964), formando compostos coloridos. Estes compostos são utilizados na visualização de NAs por cromatografia em camada delgada (SEN e DALPE, 1972), ou para quantificação das mesmas por determinação espectrofotométrica (FAN e TANNENBAUM, 1971). Alguns dos componentes dos alimentos (ácidos graxos, tocoferóis e alguns pigmentos) produzem resultados falso-positivos, principalmente com o reagente de Preussmann, limitando a aplicação desses métodos (SEBRANEK e CASSENS, 1973). Métodos baseados na redução eletroquímicas das NAs também estão sujeitos a interferências (SNIDER e JOHNSON, 1979).

Na detecção de aminas secundárias, geralmente por cromatografia em camada delgada, têm sido utilizados: ninidrina, que forma compostos visíveis ou fluorescentes (SEN e DALPE, 1972); cloreto de dansilo, DANS-Cl, (1-dimetilamino-naftalen-5 sulfonil cloreto) que produz sulfonamidas fluorescentes (EISENBRAND e PREUSSMANN, 1970); DNP-F (2,4 dinotrofluorobenzeno), que forma compostos amarelos que podem ser separados por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), (COX, 1973); e NBD-Cl (7-cloro-4 nitrobenzo-2-oxa-1,3 diazol), que é utilizado na determinação fluorimétrica dos produtos formados (KLIMISH e STADLER, 1974). Outras substâncias que também têm sido utilizadas na determinação de aminas secundárias são: fluorescamina (4-fenilspiro furan-2(3H),1-ftalan-3,3-diona) a qual forma produtos não fluorescentes (YOUNG, 1976) e cloreto de heptafluorobutanoil, o qual forma amidas que têm sido detectadas por cromatografia gasosa, utilizando-se detector de captura de elétrons (ALLISTON e col., 1972).

A aplicação dos métodos mencionados na análise de NAs em alimentos, requer a remoção de toda amina livre previamente ao rompimento da NA, como também a prevenção de formação de amins antes da derivação, para evitar a formação de substâncias que interfiram na análise (KRULL e col., 1978; BROEKHOVEN e DAVIES, 1980).

Outros métodos indiretos que também têm sido utilizados na análise de nitrosaminas, baseiam-se na oxidação das mesmas até nitraminas ou na sua redução até hidrazinas assimétricas.

Nitraminas, obtidas por oxidação de NAs geralmente com ácido peroxitrifluoroacético, são detectadas por cromatografia gás-líquido (GLC), utilizando-se detector de captura eletrônica. Este procedimento tem sido aplicado na análise de nitrosaminas em alimentos (TELLING, 1972), na análise de nitrosoaminoácidos (ISHIBASHI e col., 1980), na confirmação da presença de NAs no ar e fumo de cigarros (CUCCO e BROWN, 1981) e nos alimentos (KIMOTO e col., 1984). O uso deste método sensível e seletivo, não é recomendável para fins quantitativos, pois as reações de oxidação são incompletas e irreproduzíveis, servindo somente como um procedimento adicional confirmatório (ALTHORPE e col., 1970).

As NAs têm sido reduzidas a hidrazinas assimétricas com Zn/HCl, seguido por derivação com diferentes aldeídos aromáticos para obtenção de aldazinas amarelas (ENDER e CEH, 1968) ou hidrazonas fluorescentes (YANG e BROWN, 1972). Estes métodos possuem sensibilidade adequada, mas carecem de seletividade, o que limita a sua aplicação.

2.3.2. Métodos Diretos

Os métodos considerados diretos estão baseados na de terminação e confirmação direta das NAs. Pertencem a esta classi ficação os métodos que usam detectores polarográficos, detectores específicos (usados em cromatografia gasosa e/ou HPLC) e espectros copia de massa.

Na determinação polarográfica, as NAs produzem hidrazini nas assimétricas, em pH 1-5, consumindo 4 elétrons por molécula. Em meio alcalino, a redução consome 2 elétrons por molécula e pro duz a correspondente amina secundária e óxido nitroso (PARRY e OSTERYOUNG, 1965). Polarografia em meio ácido tem sido aplicada na determinação de NAs em alimentos (WALTERS e col., 1970). Pirazi nas e acetopirrol, formados por degradação térmica das NAs acima de 100°C, são interferentes para este método (SCANLAN e LIBBEY, 1971). Polarografia diferencial de pulso também tem sido utilizada na análise de NAs (HASEBE e OSTERYOUNG, 1975). No entanto, esta téc nica está sujeita a interferências provenientes da redução do oxi gênio e do nitrito (CHANG e HARRINGTON, 1975). Para a análise de NAs, a detecção polarográfica possui suficiente sensibilidade, mas care ce de especificidade, sendo seu uso recomendado em amostras menos complexas como são os cosméticos (EG & G., 1980).

Cromatografia gás-líquido (GLC) tem sido a técnica mais amplamente usada na detecção e quantificação de NAs. Para aumen tar a especificidade da resposta do detector, utilizam-se detecto res mais específicos que o detector convencional de ionização de chama (FID). Os detectores N-seletivos mais usados têm sido: Detector Termoiônico (detector de chama alcalina, AFID, e detector termoiônico sem chama ou detector N-P, DNP ou FASD); Detector Ele troquímico (detector de conductância elétrica ou detector de

Coulson, CECD, e detector microelectrolítico ou detector de Hall); e Detector de Fotoemissão (detector de captura eletrônica, ECD, e o "Thermal Energy Analyser", TEA). A teoria operacional e as características de resposta destes detectores, foram revisadas por Hall, em 1978.

AFID é uma modificação do FID, onde íons alcalinos (Na_2SO_4 , KCl , RbCl , Rb_2SO_4 , CsCl e CsBr) são introduzidos na chama, variando o processo de ionização por um mecanismo não bem compreendido ainda, e aumentando em mais de 100 vezes a resposta a compostos que contêm fósforo na sua estrutura. O detector também é sensível a compostos que contêm nitrogênio, enxofre e halogênios. O tipo de sal alcalino introduzido e os parâmetros relacionados com a geometria do detector e modo operacional, alteram a seletividade do detector. Entre eles, o fluxo de hidrogênio é crítico (PALFRAMAN e col., 1973).

No detector termoiônico sem chama DNP, diferentemente do AFID, a temperatura do sal é controlada eletricamente, o que resulta em respostas seletivas somente para compostos que contêm nitrogênio e/ou fósforo aumentando, por conseguinte, a seletividade e sensibilidade do detector (DRUSHEL, 1983).

No detector CECD, quando usado no modo redutivo normal, o nitrogênio orgânico é convertido em amoníaco, a temperaturas entre 400 e 600°C na presença de um catalisador de Ni, dentro de um tubo de hidrogenação feito de quartzo. Os gases ácidos produzidos (HCl , H_2S) são removidos com SrOH ou K_2CO_3 e o amoníaco formado é absorvido por um fluxo contínuo de água deionizada, detectando-se os câmbios na condutância elétrica (RHOADES e JOHNSON, 1970).

Na análise de Nas em alimentos, os detectores CECD e AFID têm sido amplamente utilizados. Embora sua utilidade em sistemas modelo seja de grande valor, sua aplicação na análise de Nas em sistemas complexos somente deve ser considerada com propósitos de triagem.

O detector de Hall é similar no seu funcionamento ao detector CECD, porém com características melhoradas em relação à geometria da célula, ponte de condutância, controle de temperatura do forno e materiais de construção, que aumentam sua seletividade, eficiência e resistência (Hall, 1974).

O detector ECD, em contraste aos anteriores, não é destrutivo. Nele, o gás transportador passa por uma câmara de ionização que contém uma fonte de radiações β (tritio ocluído numa lâmina de escândio). Um potencial entre dois eletrodos situados dentro da câmara coleta todo elétron livre que é produzido pela ionização, através de interação com as partículas β das moléculas do gás transportador. Quando um composto de alta afinidade eletrônica entra na câmara, reage com os elétrons livres, reduzindo o fluxo de corrente elétrica. Essa redução é registrada pelo aparelho (DICKES e NICHOLAS, 1978). A utilização do detector ECD na análise de Nas em alimentos requer a prévia oxidação destas a nitraminas. As reações de oxidação das Nas são incompletas e irreprodutíveis, sendo então o uso deste detector não recomendável para fins quantitativos.

O detector TEA, Figura 5, baseia seu funcionamento no rompimento seletivo da ligação N-N (8 a 50 Kcal/mol), presente nos compostos N-nitroso. Para tanto, estes compostos são injetados num catalisador pirolítico instantâneo de tungstênio-molibdênio-crômio, formando radicais nitrosilo, $\text{NO}^{\cdot}$, que são transportados

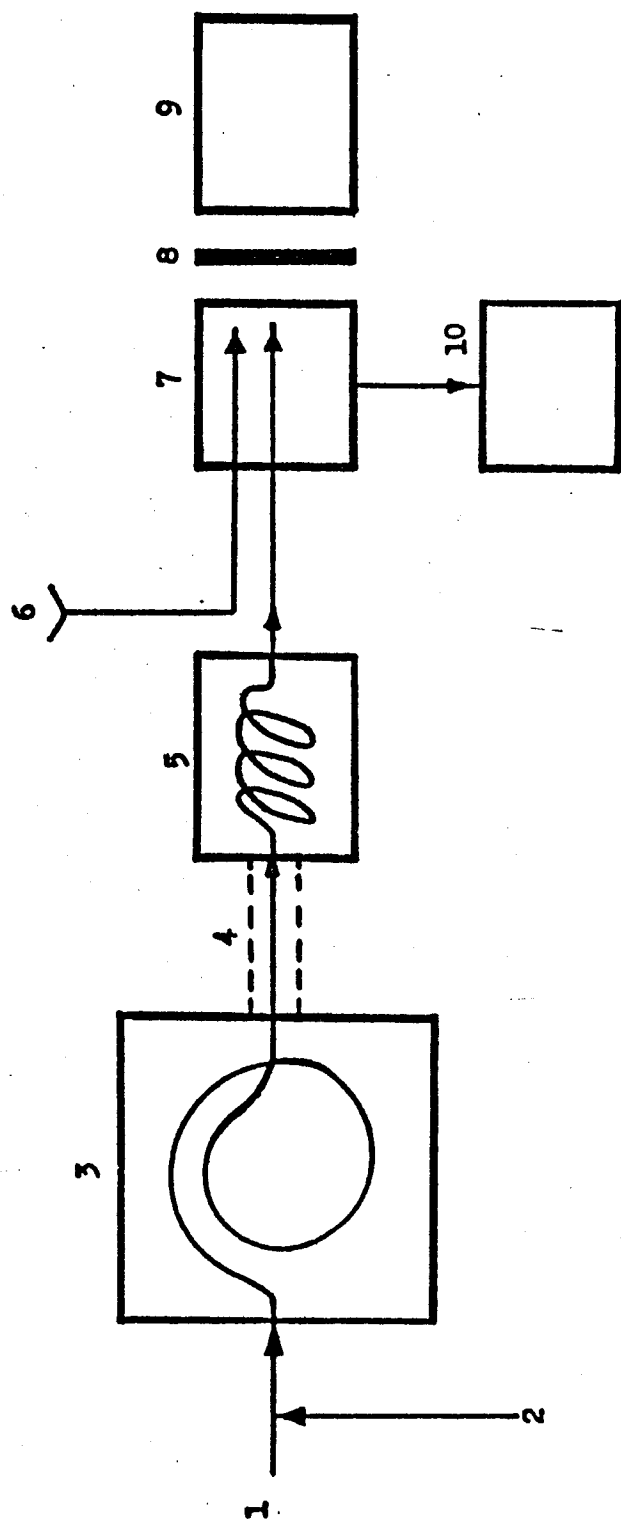


FIGURA 5 - Sistema de cromatografia em fase gasosa com detector TEA.

1. Gás transportador; 2. Injetor; 3. Cromatógrafo em Fase gasosa; 4. Tubo aquecido a 250°C; 5. Catalizador pirolítico; 6. Ozônio; 7. Câmara de reação; 8. Filtro vermelho; 9. Tubo Fotomultiplicador; 10. Bomba de vácuo.

a uma câmara de reação onde, por ação de ozônio produzido por descarga elétrica, formam dióxido de nitrogênio excitado, NO_2^* . As moléculas excitadas, ao voltarem a seu estado fundamental, emitem radiações características na região do infravermelho próximo, que são detectadas por um tubo fotomultiplicador. A resposta é proporcional à concentração de radicais nitrosilo e, portanto, proporcional à concentração do composto nitrosado (FINE e col., 1975b). O TEA possui uma armadilha fria entre o catalizador e a câmara de reação, para a remoção de todo composto menos volátil do que o radical NO^* , como também um filtro ótico para eliminar as emissões menores do que 600 nm, as quais são produzidas por compostos etilênicos e ozônio (FINE e col., 1975c).

Dos detectores referidos, o TEA é o mais seletivo uma vez que os outros detectores são mais N do que N-O seletivos. Porém, como os outros detectores, o TEA também está sujeito a interferentes, motivo pelo qual é necessário confirmar os resultados obtidos usando-se um outro método analítico. A espectrometria de massa (MS) é geralmente aplicada toda vez que são detectadas NAS pela primeira vez, ou são analisados novos tipos de amostras (GOUGH e WEBB, 1978).

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. MATERIAL

1.1. Matéria prima

Foram utilizadas neste trabalho amostras de bacon e linguiça obtidas em diversos supermercados da cidade de Campinas, SP.

1.2. Reagentes

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram reagentes Merck, Ecibra ou Mallinckrodt, com grau de pureza "para análise".

Os padrões nitrosodimetilamina (NDMA) e nitrosopirrolidina (NPIR) foram selecionados por serem os compostos N-nitroso mais frequentemente encontrados em amostras de bacon frito e possivelmente também em amostras de linguiça frita. Foram escolhidos como padrões internos a nitrosodietilamina (NDEA) e a nitrosodipropilamina (NDPA) pelo fato destas NAS não estarem normalmente presentes em carnes curadas. As NAS mencionadas foram gentilmente cedidas pelo Professor Richard Scanlan, da Oregon State University, Oregon, USA.

Os adsorventes utilizados na preparação das diferentes colunas foram: Celite 545 sem lavagem ácida, obtida da Fisher Scientific Co., Fairlawn, N.J.; Óxido de Alumínio (Alumina) 90 para cromatografia em coluna (Merck art. 1097) e Sílica Gel 60 para cromatografia em coluna (Merck art. 9385).

Para a análise das NAs por cromatografia em camada delgada foram utilizadas cromatofolhas Al de Sílica Gel 60 F254 (Merck artigo 1097).

Na análise de NAs por cromatografia gasosa foi utilizada como fase líquida estacionária Carbowax 20M,50G da Alltech Associates e como suporte, Chromosorb W 60-80 mesh, com lavagem ácida (Varian Aerograph art.82-000040-00).

1.3. Aparelhos

- Câmara cromatográfica de imersão 100 x 100 x 2mm
- Concentrador Kuderna-Danish (K-D), 250 mL
(Kontes Glass Co.nº K-850500)
- Tubo concentrador, 4 mL
(Kontes Glass Co.nº K-570050 e tampa K-850500).
- Coluna de destilação Snyder, três secções
(Kontes Glass Co.nº K-503000).
- Cromatógrafo Varian mod. 1400 equipado com detector termoiônico sem chama, DNP.
- Registrador Varian mod. A-25
- Lâmpada ultra violeta Lumiflex
- Evaporador rotativo Buchi mod. R110
- Moinho de carne Brasil-Eberle mini kit cod. 2001.000-4
- Estufa FANEM mod. 315SE
- Bomba de vácuo FANEM mod. CA.

2. MÉTODOS

2.1. DETERMINAÇÃO DAS NITROSAMINAS POR CROMATOGRAFIA GASOSA

Foram estudadas as características de resposta do detector termoiônico às diferentes nitrosaminas padrões, visando sua utilização na identificação e quantificação das NAs presentes nos extratos de bacon e linguiça.

2.1.1. Parâmetros operacionais de cromatógrafo

Os parâmetros selecionados foram:

- Coluna de vidro, 2m x 2mm diâmetro interno
- Empacotamento: 15% Carbowax 20M + 1% KOH sobre Chromosorb W "acid washed" 80-100 mesh.
- Vazão dos gases: Nitrogênio 35 mL por minuto
Ar 174 mL por minuto
Hidrogênio 4,5mL por minuto
- Temperaturas: Injetor: 200°C
Coluna : Programação de 100 a 200°C,
4°C/min
Detector: 250°C
- Amplitude de registro: 1 mV

2.1.2. Estabilização do detector

Inicialmente a corrente do detector foi ajustada para se obter um sinal de fundo, "background current", de 40 a 70% de deslocamento da pena do registrador nas condições de sensibilidade de 8×10^{-12} e amplitude de registro de 1 mV. Esta condição

foi mantida reajustando-se a corrente do detector, caso necessário, até obtenção de uma linha de base estável dentro da faixa de deslocamento mencionada anteriormente.

2.1.3. Características da resposta do detector termoiônico DNP

As características da resposta do detector termoiônico às diferentes NAs foram estudadas em relação a sua linearidade, reprodutibilidade e sensibilidade.

2.1.3.1. Linearidade da resposta

Foram preparadas soluções, em DCM, dos padrões NDMA, NDEA e NDPA em concentrações de 1; 1,5 e 2 ng/ μ L. As soluções do padrão NPIR foram preparadas em concentrações de 2; 3 e 4 ng/ μ L. Um μ L de cada uma destas soluções foi injetado no cromatógrafo.

2.1.3.2. Reprodutibilidade da resposta

Foi testada uma solução contendo 0,7; 1; 1 e 2 ng/ μ L respectivamente das NAs padrões NDMA, NDEA, NDPA e NPIR em DCM. Um μ L desta solução foi injetado repetidamente no cromatógrafo, mantendo constantes os parâmetros operacionais indicados em 2.1.1.

2.1.3.3. Limite de detecção

Inicialmente, foram preparadas diluições sucessivas a partir de soluções que continham 1 ng/ μ L das NAs padrões NDMA, NDEA, NDPA e NPIR em DCM. Um μ L de cada diluição foi injetado no cromatógrafo mantendo-o no "range" 10^{-12} e variando sua atenuação

até se obter respostas positivas às menores diluições para cada padrão. A amplitude de registro foi mantida em 1 mV. A seguir foi preparada, no mesmo solvente, uma mistura dos padrões NDMA, NDEA, NDPA e NPIR nas concentrações de 0,10; 0,10; 0,15 e 0,20 ng/ μ L, respectivamente. Um μ L desta solução foi injetada no cromatógrafo que foi mantido no "range" supra-mencionado com mesma amplitude de registro usada para os padrões testados individualmente. Para cada injeção foi variada a atenuação até que foram obtidos cromatogramas reproduzíveis.

2.1.4. Curvas de calibração

Na obtenção de curvas de calibração para NDMA e NPIR, foram preparadas soluções das NAs padrões considerando como padrões internos a NDEA e NDPA.

As curvas de calibração para NDMA foram obtidas a partir de soluções contendo 0,3; 0,5; 0,7 e 0,9 ng/ μ L. A cada uma destas soluções foram acidionadas ambos os padrões internos em concentração de 1 ng/ μ L.

No caso de NPIR, as concentrações utilizadas foram de 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0 ng/ μ L. Os padrões internos foram adicionados em concentração de 1 ng/ μ L.

2.2. Análise de nitrosaminas em bacon e linguiça

Neste estudo, tanto o preparo das amostras de bacon e linguiça quanto a extração das NAs, foram realizados segundo o método ERRC (Eastern Regional Research Center), conforme descrito por PENSABENE e col., 1982, com algumas modificações. Na identificação das NAs foi utilizada cromatografia gasosa com dectetor

térmoiônico sem chama DNP. Para confirmação da identificação das NAs utilizou-se decomposição fotoquímica por irradiação ultravioleta. Um método alternativo utilizado para a identificação das NAs foi cromatografia em camada delgada, conforme descrito por SEN e col., 1969a.

As etapas de extração, purificação, identificação e quantificação das NAs presentes no bacon e linguiça, estão apresentadas no Fluxograma 1.

2.2.1. Preparo da coluna de celite

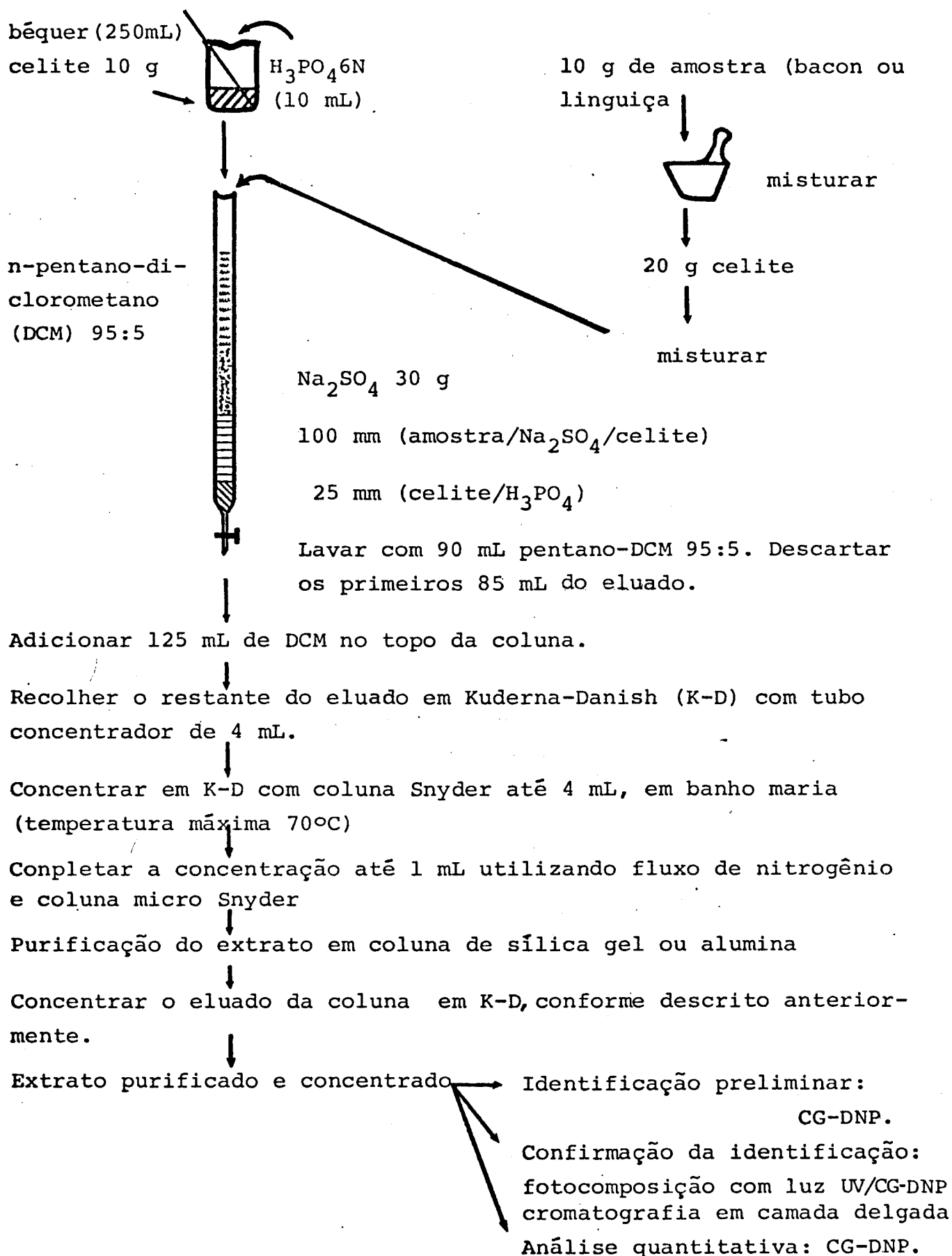
Em um bēquer com capacidade para 240 mL foram adicionados 10 g de celite e 10 mL de ácido fosfórico 6N, sendo então agitados com bastão de vidro até que a celite apresentasse consistência esponjosa e uniforme. A mistura foi transferida para uma coluna cromatográfica de 350 x 32 mm de diâmetro interno, a qual estava coberta com papel de alumínio. A camada foi comprimida com bastão de vidro até uma altura aproximada de 25 mm.

2.2.2. Preparo das amostras

As amostras de bacon e linguiça foram cortadas em pequenas fatias de aproximadamente 3mm de espessura e fritas durante três minutos de cada lado. O excesso de gordura foi embebido em papel de filtro e as fatias foram moídas, duas vezes sucessivas, utilizando-se um moinho de carne. Dez gramas da parte muscular da amostra moída, adicionados de 30 e 40 $\mu\text{g/kg}$ (ppb) dos respectivos padrões internos NDEA e NDPA, foram transferidos quantitativamente para um almofariz e homogeneizados. Em seguida, foram acrescentados 20g de celite sendo o material novamente homogeneizado até se obter uma mistura uniforme. A mistura resultante foi trans

FLUXOGRAMA 1

"Extração e quantificação de nitrosaminas voláteis pelo método de eluição com solvente utilizando coluna de celite"



ferida para uma coluna cromatográfica e comprimida até se obter uma altura de 100 mm. No topo da coluna foram colocados 30g de sulfato de sódio anidro. Almofariz e pistilo foram lavados com 10 mL do solvente pentano-diclorometano (DCM) (95:5), sendo esta fração também adicionada à coluna. Em seguida foram acrescentados mais 90 mL do mesmo solvente.

2.2.3. Eluição das nitrosaminas da coluna de celite

Os eluados de pentano: DCM (95:5) foram coletados num cilindro graduado de 100 mL a uma velocidade de 1 mL por minuto. Quando o nível do solvente na coluna atingiu o nível da camada superior de sulfato de sódio anidro, foram adicionados à coluna 125 mL de diclorometano. Os primeiros 85 mL coletados foram descartados, sendo o restante coletado em concentrador Kuderna-Danish (K-D) com tubo concentrador de 4 mL cobertos com papel de alumínio. A coleta foi mantida até que a coluna deixasse de gotejar. O concentrador foi removido da coluna e acoplado à coluna Snyder também coberta com papel de alumínio.

2.2.4. Concentração do eluado da coluna de celite

Na capela, o concentrador K-D foi submerso em banho-maria até aproximadamente 3 mm do nível superior do tubo concentrador. A temperatura do banho foi mantida entre 55-60°C. Quando o volume do concentrado atingiu aproximadamente 4 mL, o tubo concentrador foi desacoplado do concentrador K-D e o volume reduzido até 1 mL utilizando-se fluxo de nitrogênio.

2.2.5. Purificação dos extratos

Foram testadas colunas de alumina e sílica gel 60 visando sua utilização na purificação do eluado da coluna de celite.

2.2.5.1. Preparo das colunas de purificação

O preparo da coluna de sílica gel foi feito como descrito por MAYBURY e GRANT, 1983, com as modificações indicadas a seguir: 2,5 g de sílica gel 60 foram colocadas num béquer ao qual foram adicionados aproximadamente 30 mL de éter etílico 1% em diclorometano (DCM). A mistura foi colocada numa coluna de vidro de 500 x 10 mm de diâmetro interno. O béquer foi lavado com 30 mL do mesmo solvente dividido em pequenas porções que também foram adicionadas à coluna. O solvente foi escoado e uma camada de sulfato de sódio anidro de aproximadamente 2 cm de espessura foi adicionada à coluna. O extrato concentrado de bacon ou linguiça foi transferido à coluna, lavando-se o tubo concentrador com 5 mL de éter etílico 1% em DCM.

A coluna de alumina foi preparada conforme descrito por KIMOTO e col., 1982 com algumas modificações. Para tanto, 2,5 g de alumina foram tratados conforme descrito na preparação da coluna de sílica, usando-se n-hexano como solvente.

2.2.5.2. Eluição e concentração das nitrosaminas obtidas das colunas de sílica e alumina

Inicialmente foi testada uma solução em diclorometano, contendo 1; 4; 9 e 10 ng/mL das NAs padrões NDMA, NDEA, NDPA e NPIR, respectivamente. Cinco mL desta solução foram colocados no topo da coluna de alumina ou de sílica. As NAs foram eluídas da

coluna de alumina com 100 mL de DCM-pentano (1:1 v/v) e da coluna de sílica com 100 mL de éter etílico 4% em DCM. A velocidade de fluxo nas duas colunas foi mantida entre 1 e 2 mL por minuto. Os eluados de ambas colunas foram coletados em frações de 10 mL sendo 1 μ L de cada fração injetado no cromatógrafo.

Os extratos das amostras de bacon ou linguiça, obtidos da coluna de celite, foram purificados por coluna de sílica. As NAS presentes nos extratos foram eluidas da coluna com 40 mL de éter etílico 4% em DCM, mantendo-se a mesma velocidade de fluxo utilizada no teste de eluição dos padrões.

Os eluados foram coletados no concentrador evaporativo K-D com tubo concentrador de 4 mL coberto com papel de alumínio. A redução de volume até 1 mL, dos extratos purificados foi feita como descrito em 2.2.4.

2.2.6. Identificação das nitrosaminas

A identificação da NDMA e NPIR presentes no bacon e linguiça foi feita a partir dos picos obtidos no cromatograma, com injeções de 1 a 2 μ L do extrato purificado. Os tempos de retenção destes picos foram comparados com os tempos correspondentes à retenção dos padrões e então foi feita uma co-cromatografia.

2.2.7. Confirmação da identificação das nitrosaminas por fotodecomposição

Inicialmente foi preparada uma mistura padrão contendo 3; 3,5; 4 e 9 ng/ μ L de NDMA, NDEA, NDPA e NPIR, respectivamente. A solução preparada usando DCM como solvente foi colocada em cubeta de quartzo com tampa e irradiada com luz ultravioleta (luz UV).

A cubeta foi situada a 8 cm de distância de lâmpada UV e, em dados intervalos de tempo, 1 µL da solução era retirado da cubeta e injetado no cromatógrafo.

Os extratos das amostras de bacon ou linguiça que continham NAS já identificadas em base aos tempos de retenção e por co-cromatografia, foram submetidos ao mesmo tratamento com luz UV, conforme descrito para as NAS padrões. Essas NAS correspondem, por convenção, a NAS "presumptivas", por não terem sido confirmadas por espectrometria de massa (MS), (IARC, 1978).

2.2.8. Cálculo da concentração das nitrosaminas

A concentração de NDMA ou NPIR presente no bacon ou linguiça, foi calculada a partir da seguinte equação:

$$\text{ng de nitrosamina/g de amostra (ppb)} = \frac{A_x \cdot W_p}{F_r \cdot A_p} \cdot 100$$

Onde A_x = altura (área) do pico da amostra,

W_p = concentração do padrão interno no extrato final (ng/µL)

F_r = fator de resposta (inclinação da curva de calibração)

A_p = altura (área) do pico do padrão interno

Esta equação supõe injeção de 1 µL, volume do extrato final 1 mL e quantidade de amostra tratada 10 g.

2.2.9. Recuperação de nitrosaminas em bacon e linguiça

No estudo da recuperação do método foram analisadas sete amostras idênticas de bacon e seis de linguiça, todas adicionadas com os padrões internos NDEA e NDPA, como descrito em 2.2.2. A recuperação, expressa em porcentagem, foi obtida através de comparação direta entre as quantidades adicionadas dos padrões internos e a quantidade obtida no extrato final.

2.2.10. Reprodutibilidade da determinação de nitrosaminas em bacon e linguiça

Para testar a reprodutibilidade do método na determinação de NAs em ambos os tipos de amostras, foram analisadas seis amostras idênticas de bacon e cinco de linguiça. A cada uma delas foram adicionados os padrões NDMA, NDEA, NDPA e NPIR de modo a obter, no extrato final, concentrações de 0,2; 0,3; 0,4; e 0,5 ng/ μ L, respectivamente. A relação das alturas (áreas) dos picos correspondentes a NDMA e NPIR foi calculada usando-se como padrões internos NDEA e NDPA. O desvio-padrão e o coeficiente de variação dos resultados obtidos foram utilizados na estiva da reprodutibilidade.

2.3. DETERMINAÇÃO DAS NITROSAMINAS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

2.3.1. Aplicação das amostras e desenvolvimento do cromatograma

Sobre cromatofolhas de sílica gel de 5 x 7 cm ativadas a 105°C durante 30 minutos, foram aplicados diferentes volumes dos extratos purificados de bacon e linguiça obtidos em 2.2.5.2. Na mesma cromatofolha, foram aplicados 5 μ L de solução

contendo padrões NDMA, NDEA, NDPA e NPIR. O cromatograma foi desenvolvido na forma ascendente até uma altura de 6 cm, usando-se hexano-éter-DCM (10:3:2), ou hexano-éter-DCM (4:3:2) como solventes.

2.3.2. Revelação e identificação das nitrosaminas

Dois tipos diferentes de reagentes de revelação foram utilizados para a visualização das NAs na cromatofolha: ninidrina e reagente de Griess. Na identificação, as manchas obtidas dos extratos foram comparadas com as manchas produzidas pelos padrões no mesmo cromatograma, a partir do que foi calculado o valor de R_f para cada uma das NAs.

2.3.3. Revelação com reagente de Griess

- Solução de Griess: ácido sulfanílico 1% em ácido acético 30% e naftilendiamina 0,1% em ácido acético 30%. As soluções foram mantidas em refrigerador e, imediatamente antes do uso, foram misturadas numa proporção de 1:1 (v/v).

As cromatofolhas, após secagem em corrente de ar, foram reveladas com a solução de Griess e expostas à luz ultravioleta (luz UV) durante 15 minutos.

2.3.4. Revelação com ninidrina

As cromatofolhas foram aspergidas com ácido acético 30% e expostas à luz UV durante 15 minutos. A seguir, as cromato

folhas foram submersas em câmaras cromatográfica de imersão contendo ninidrina 0,3% em metanol. Finalmente, foram aquecidas em estufa a 80°C durante 15 minutos.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. CARACTERÍSTICAS DA RESPOSTA DO DETECTOR TERMOIÔNICO DNP

1.1. Linearidade da resposta

As relações existentes entre a altura do pico e a quantidade de nitrosamina injetada no cromatógrafo, para cada um dos padrões, estão apresentadas na Figura 6. As soluções de NPIR foram mais concentradas se comparadas às soluções dos outros padrões, devido à menor altura apresentada pelo pico correspondente a esta nitrosamina. Todos os padrões apresentaram linearidade na faixa de concentrações testada. Resultados similares foram obtidos em 1980 por ROBACH e col., trabalhando com o detector TEA.

1.2. Reprodutibilidade da resposta e limite de detecção

Os cromatogramas apresentados na Figura 7, mostram a resposta típica do detector para duas injeções sucessivas de 1 µL da solução contendo a mistura dos padrões indicada em 2.1.3.2.

Sob condições constantes, o detector produziu respostas reproduzíveis. Esta característica da resposta variou com as alterações de fluxo dos gases, principalmente do hidrogênio. A variação do fluxo do hidrogênio exerceu também um efeito marcante na seletividade do detector. Desligar o detector, ainda que por algumas horas, também afetou as características da resposta, impe

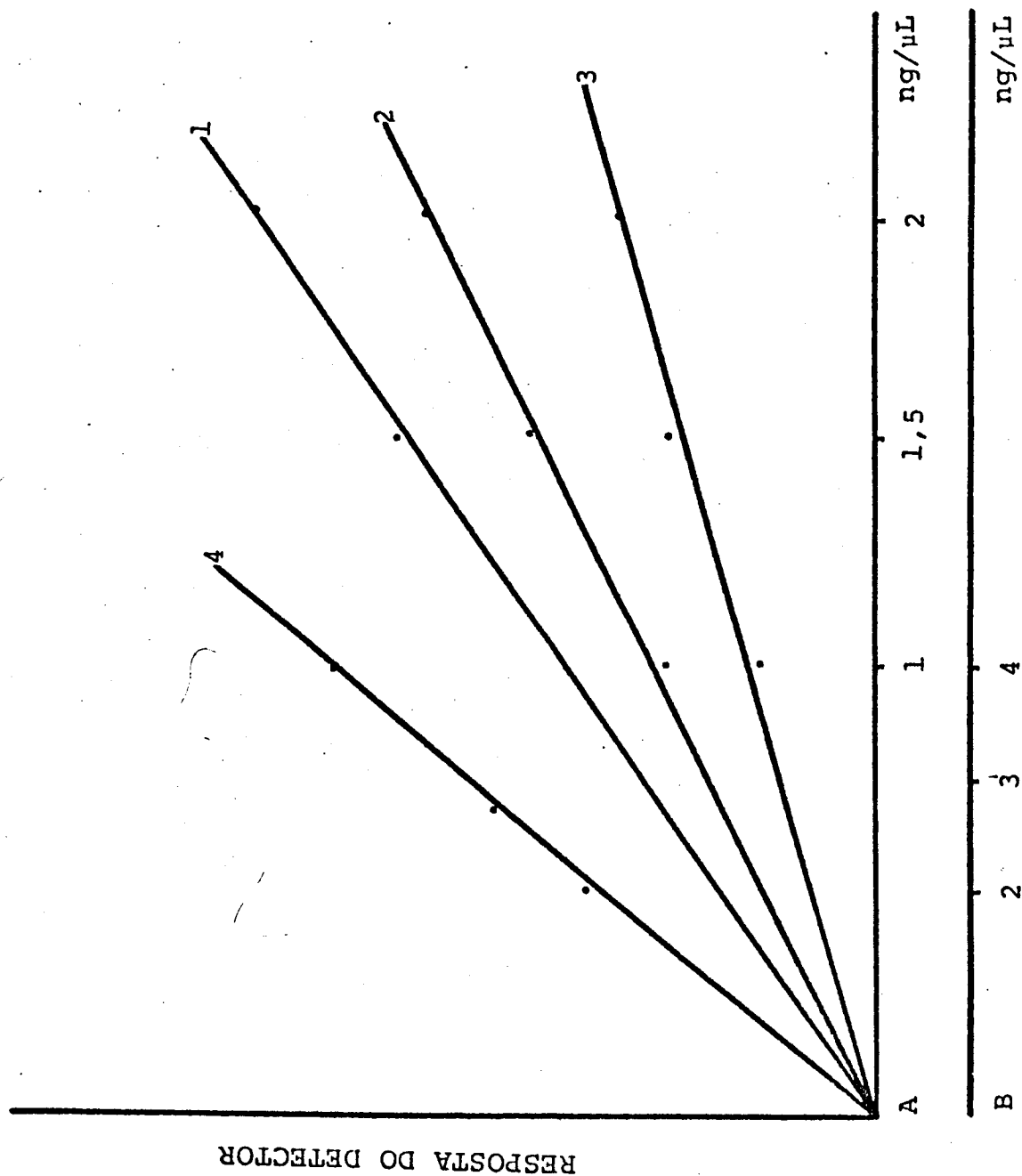


FIGURA 6 - Linearidade de resposta do detector termoiónico DNP, para nitrosaminas. Escala A: 1. nitrosodimetilamina; 2. nitrosodietilamina; 3. nitrosodipropilamina. Escala B: 4. nitrosopirrolidina.

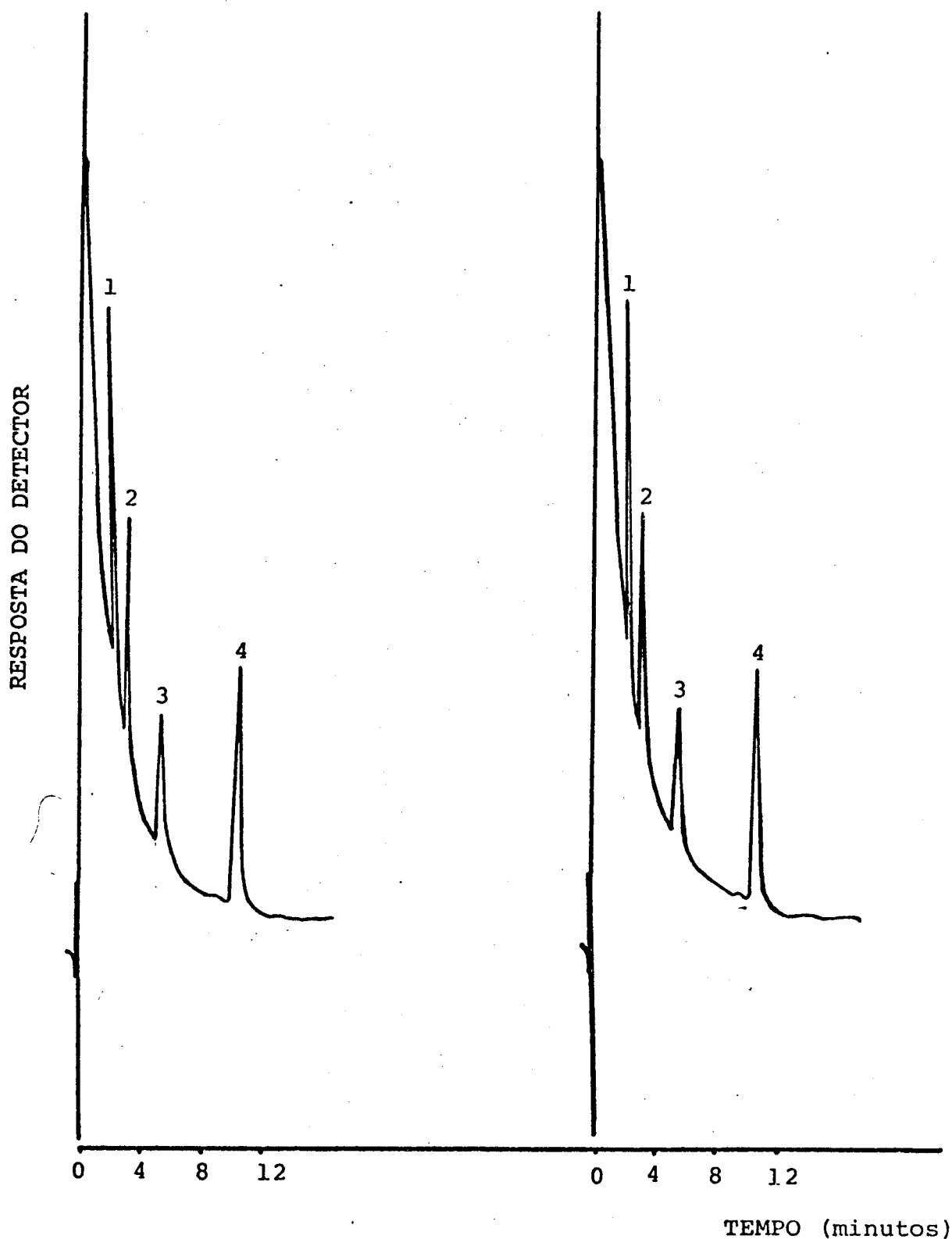


FIGURA 7 - Reprodutibilidade da resposta do detector termoiônico $\text{DNP } 10^{-12} \text{ A/mV}$, atenuação 8. Injeção repetida de $1 \mu\text{L}$ de uma solução contendo mistura de quatro nitrosaminas em diclorometano. Identificação dos picos: 1. nitrosodimetilamina ($0,7 \text{ ng}/\mu\text{L}$); 2. nitrosodietilamina ($1,0 \text{ ng}/\mu\text{L}$); 3. nitrosodipropilamina ($1,0 \text{ ng}/\mu\text{L}$); 4. nitrosopirrolidina ($3 \text{ ng}/\mu\text{L}$).

dindo a aplicação de curva-padrão na quantificação das NAs e limitando seu uso às técnicas de adição de padrões internos. Os resultados obtidos corroboram aqueles publicados por LUBKOWITZ e col. em 1977, no qual os autores verificaram a dependência deste tipo de detector em relação ao fluxo de hidrogênio.

As quantidades mínimas detectadas pelo detector DNP, após injeção de 1 μ L da solução contendo a mistura dos padrões indicada em 2.1.3.3. foi de 0,1; 0,1; 0,15 e 0,20 ng respectivamente para NDMA, NDEA, NDPA e NPIR. Segundo (HALL 1978), a sensibilidade deste detector termoiônico depende do fluxo dos gases da corrente aplicada e do tempo de uso da pérola (parte do detector que contém o elemento alcalino). É possível aumentar a sensibilidade do detector aumentando a corrente aplicada à peróla. No presente trabalho, esta prática não foi utilizada por afetar diretamente a vida útil do detector e porque os níveis de detecção alcançados foram adequados às nossas necessidades. Este limite de detecção equivale a uma concentração de 10 a 20 μ g de nitrosamina por kilograma de amostra, respectivamente para NDMA e NPIR. DRESCHER e FRANK, em 1978, recomendaram um limite de detecção menor ou igual a 10 μ g de nitrosamina por kilograma de amostra.

2. PURIFICAÇÃO DO ELUADO DA COLUNA DE CELITE UTILIZANDO COLUNA DE ALUMINA E DE SÍLICA

Nas Figuras 8 e 9, estão apresentados cromatogramas correspondentes aos extratos de bacon e linguiça obtidos da coluna de celite, respectivamente. Ambos os cromatogramas apresentaram picos que inteferiam na identificação das NAs. Por esse motivo, foram testadas colunas de alumina e sílica gel 60 para purifica-

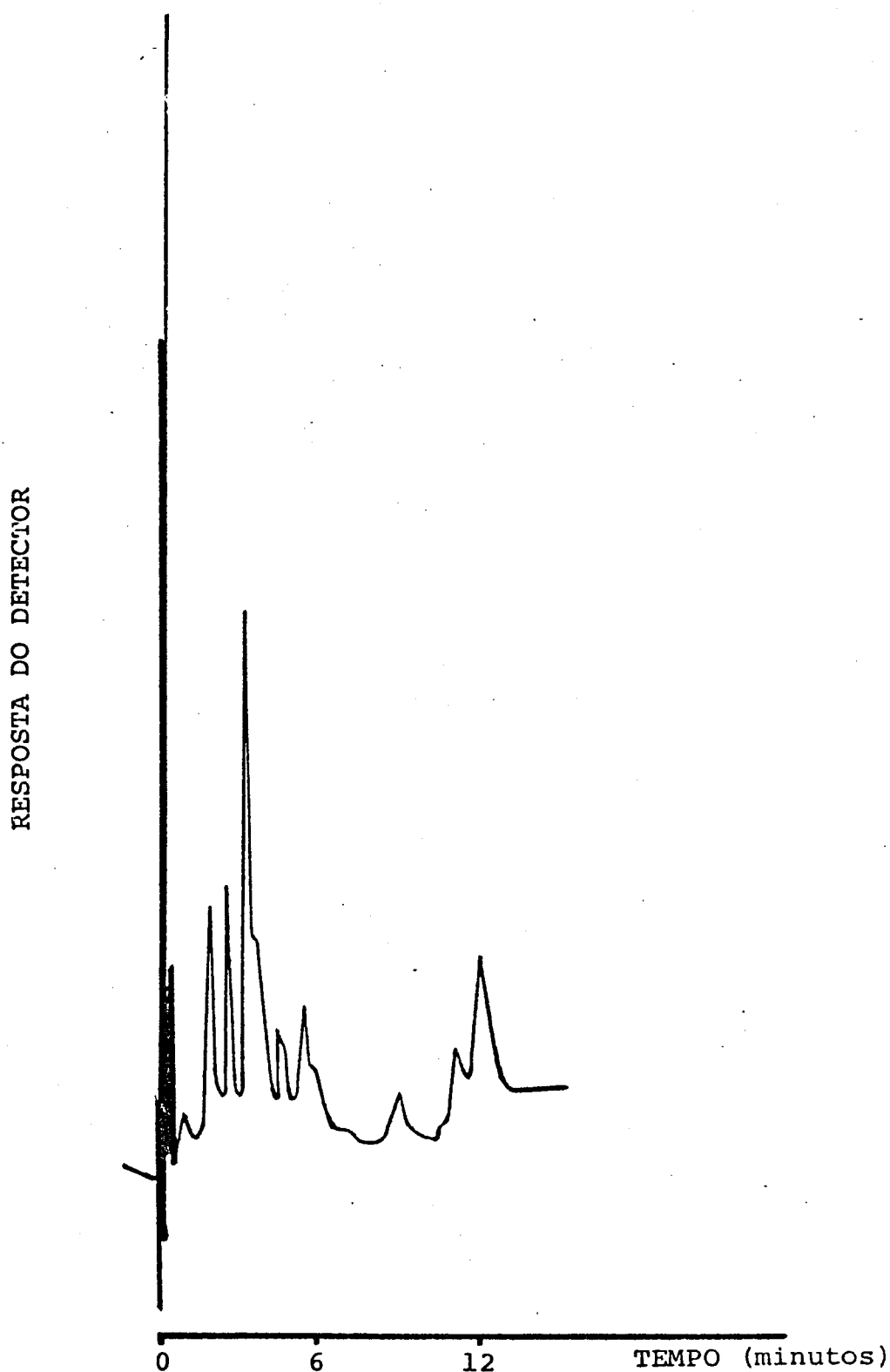


FIGURA 8 - Cromatograma de um extrato de bacon obtido por coluna de celite. Injeção: 1 μ L. Condições do cromatógrafo : 10^{-12} A/mV, atenuação 64; Temperatura do detector, 250°C; Temperatura do injetor, 200°C; Temperatura da coluna: programação de 100 a 200°C, 4°C/min.

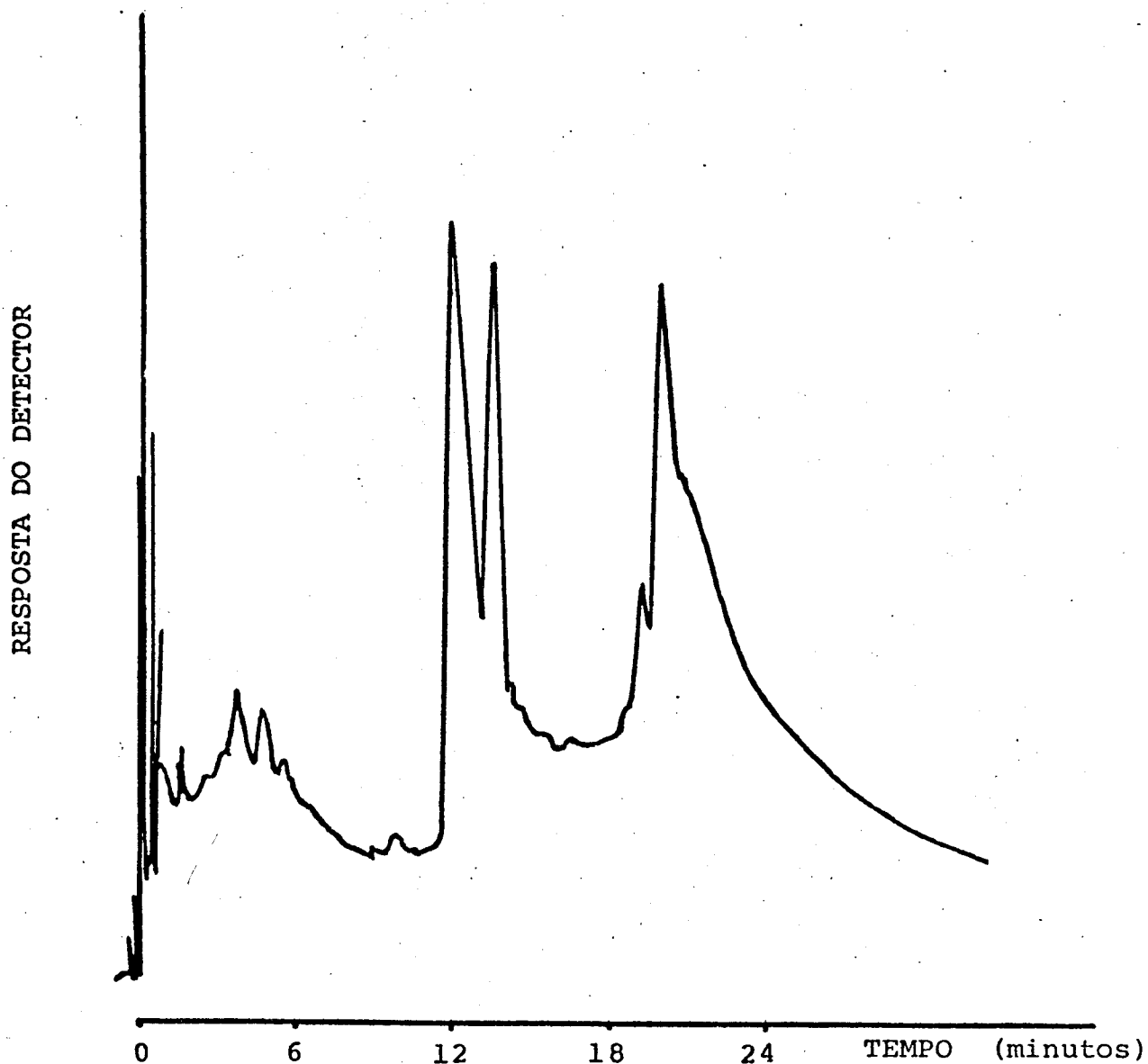


FIGURA 9 - Cromatograma de um extrato de língua obtido por coluna de celite. Injeção: 1 μ L. Condições do cromatógrafo: 10^{-12} A/mV, atenuação 64; Temperatura do detector, 250°C; Temperatura do injetor, 200°C; Temperatura da coluna: programação de 100 a 200°C, 4°C/min.

ção dos extratos. Em geral, os extratos apresentaram pigmentação amarela a qual foi retida por ambas as colunas de purificação. Essas substâncias que conferiam pigmentação amarela eram responsáveis, entre outras coisas, pela contaminação da coluna do cromatógrafo no local de injeção, sendo portanto necessária sua remoção antes da injeção do extrato no cromatógrafo. Os compostos responsáveis pelo aparecimento dos picos interferentes também foram retidos pelas colunas de purificação.

Tanto para a coluna de alumina quanto para a coluna de sílica foi determinado o volume mínimo de solvente que era necessário para eluir o máximo das NAs sem eluir da coluna os compostos acima mencionados. Os resultados obtidos utilizando a coluna de alumina estão indicados na Figura 10. Para esta coluna, a capacidade de retenção para as diferentes NAs foi bastante distinta sendo que, para eluir a NPIR, foi necessário utilizar um volume superior a 60 mL de solvente. Quando testado o extrato de linguiça, o excesso de solvente acarretava em eluição dos pigmentos amarelos e dos compostos interferentes, diminuindo assim sua efetividade na purificação dos extratos. Este fato fez com que a utilização desta coluna fosse descartada em análises posteriores.

Na Figura 11 estão apresentados os resultados obtidos utilizando-se a coluna de sílica. A capacidade de purificação desta coluna foi melhor do que aquela apresentada pela coluna de alumina. Para esta coluna foram necessários unicamente 40 mL do solvente éter 4% em DCM para eluir 100% das NAs testadas, eluindo o mínimo de impurezas retidas na coluna. Os cromatogramas obtidos dos extratos de bacon e linguiça purificados por coluna de sílica gel não apresentaram picos interferentes na região das NAs estudadas, sendo possível a identificação das mesmas através dos tempos de retenção e por co-cromatografia. Na Figura 12 está apresentado um cromatograma típico obtido para amostras de bacon.

O método ERRC utilizado como ponto de partida neste trabalho, tanto para o preparo das amostras quanto para a extração das NAs, foi desenvolvido considerando o uso do detector TEA ("Thermal Energy Analyser") na determinação destes nitrosocompostos. Este detector, diferentemente do detector termoiônico DNP (detector DNP), é altamente específico para as NAs (FINE e col., 1975a), sendo então o extrato obtido da coluna de celite de pureza suficiente para ser injetado diretamente no cromatógrafo. Em 1982, KIMOTO e col., trabalhando com o detector TEA na dosagem de NTHZ (nitrosotiazolidina) em amostras de bacon extraídas e purificadas por coluna de celite, precisou de purificação adicional do extrato, por coluna de alumina, quando realizou a confirmação da identidade da NTHZ por espectrometria de massa (MS).

MAYBURY e GRANT, em 1983, propuseram o uso do detector DNP na determinação de NAs em amostras menos complexas tais como as formulações técnicas de herbicidas. Neste caso a extração e purificação dos compostos mencionados foi feita por coluna de sílica. Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que também é possível, em amostras mais complexas, a utilização do detector DNP na determinação de NAs extraídas por DCM desde uma coluna de celite, quando purificadas previamente por coluna de sílica.

Outros métodos empregados na determinação de NAs, tais como destilação e extração direta por solvente e que utilizam detectores menos específicos, como o detector termoiônico de chama alcalina (AFID) (HAVERY e col., 1978), apresentam maior número de etapas do tratamento e purificação da amostra sendo, portanto, mais demorados e dispendiosos do que o método desenvolvido no presente trabalho.

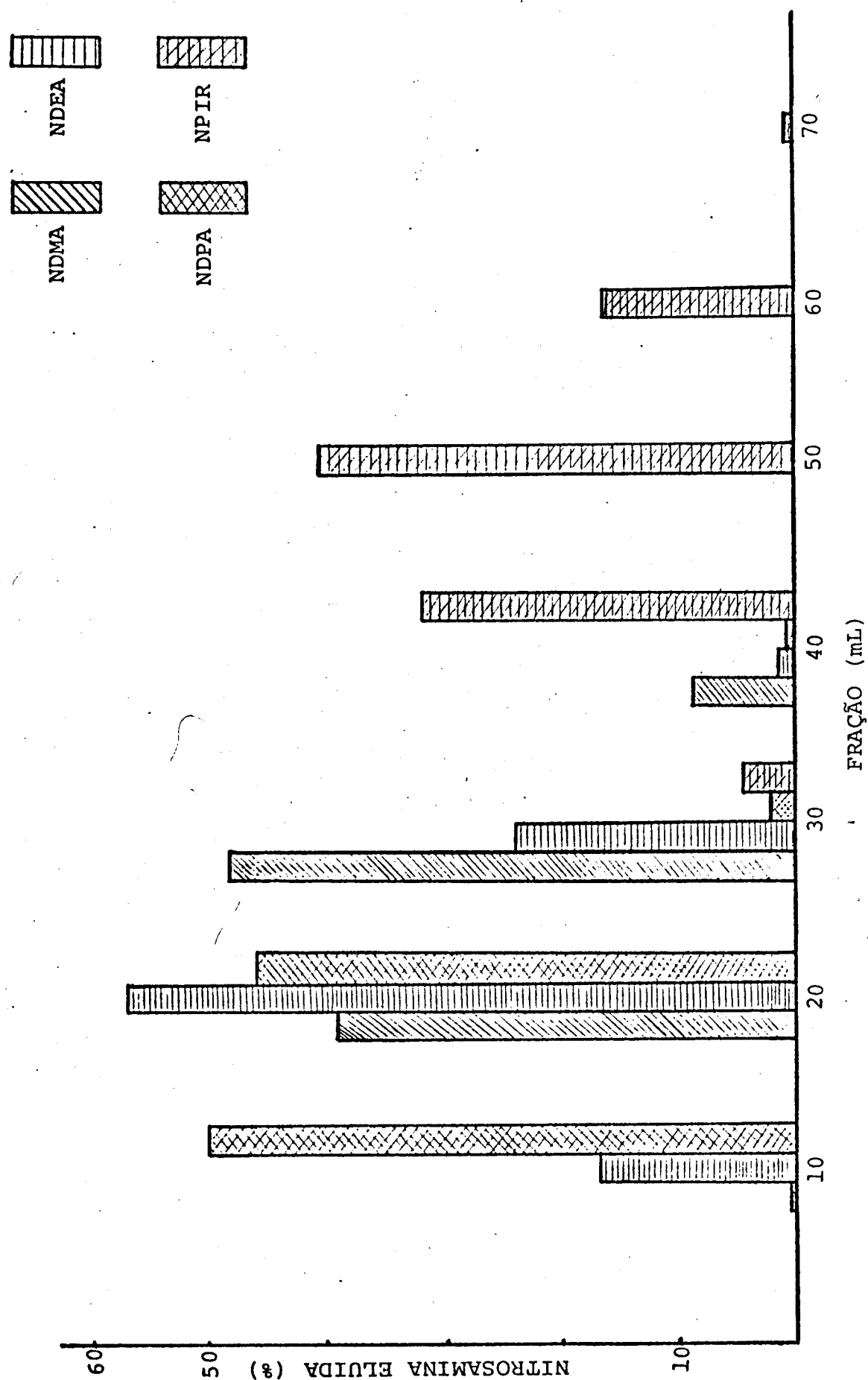


FIGURA 10- Distribuição das nitrosaminas em diversas frações do eluado de uma coluna de alumina. Solvente de eluição: diclorometano-pentano (1:1 v/v). NDMA: nitrosodimetilamina; NDEA: nitrosodietilamina; NDPA: nitrosodipropilamina; NPIR: nitrosopirrolidina.

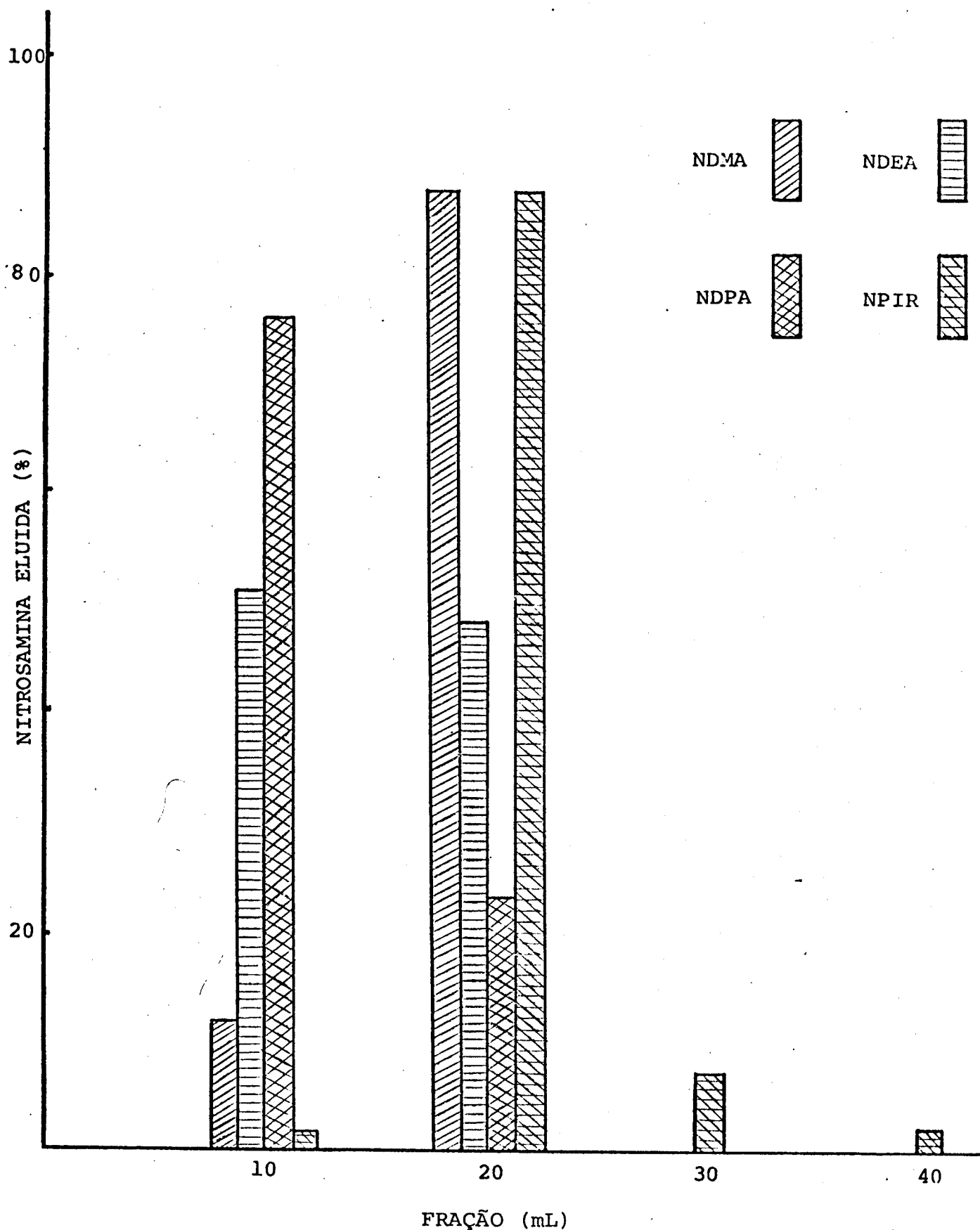


FIGURA 11 - Distribuição das nitrosaminas em diversas frações do eluado de uma coluna de sílica gel 60. Solvente de eluição: éter etílico 4% em diclorometano. NDMA: nitrosodimetilamina; NDEA: nitrosodietilamina; NDPA: nitrosodipropilamina; NPIR: nitrosopirrolidina.

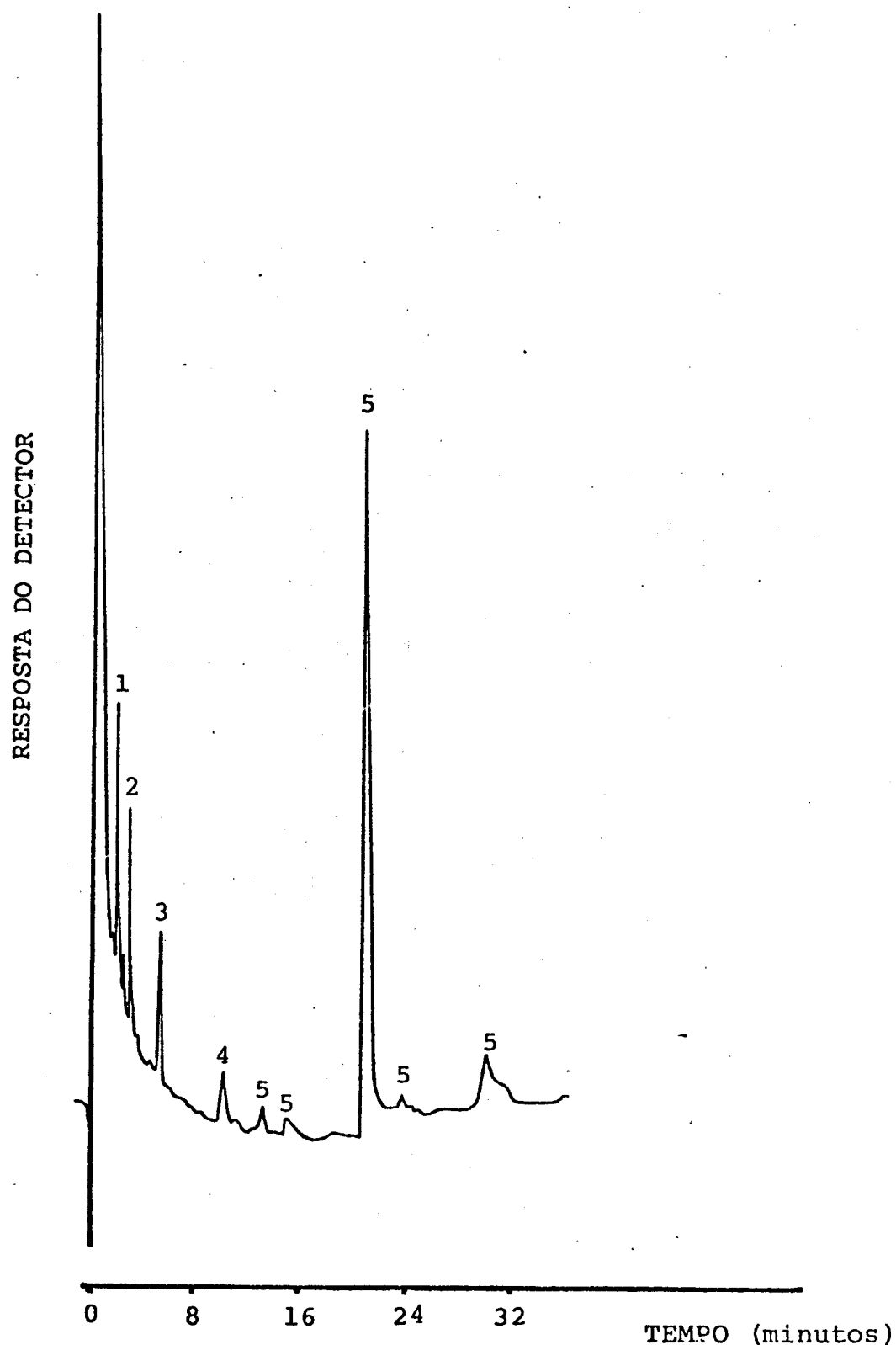


FIGURA 12 - Cromatograma de um extrato de bacon purificado por coluna de sílica gel 60. Injeção: 1 μ L. Condições do cromatógrafo: 10^{-12} A/mV, atenuação 8. Temperatura do detector; 250°C; Temperatura do injetor, 200°C; Temperatura da coluna: programação de 100 a 200°C, 4°C/min. Identificação dos picos: 1. nitrosodimetilamina; 2. nitrosodietilamina; 3. nitrosodipropilamina; 4. nitrosopirrolidina; 5. compostos não identificados.

3. IDENTIFICAÇÃO E CONFIRMAÇÃO DA IDENTIDADE DAS NITROSAMINAS

Os tempos de retenção correspondentes às NAs padrões NDMA, NDEA, NDPA e NPIR foram de 2; 3; 6 e 12 minutos respectivamente.

Na Figura 13 estão apresentados os cromatogramas obtidos a partir de soluções padrões irradiadas com luz UV durante três diferentes intervalos de tempo. A fotodecomposição das NAs tem sido utilizada na identificação destes compostos. DOERR e FIDDLER, em 1977, e HOTCHKISS e VECCHIO em 1983, irradiaram NAs até desaparecimento do pico correspondente no cromatograma obtido. CUCCO em 1981 confirmou a presença de NAs no ar e fumo de cigarro irradiando com luz UV, em meio aquoso, as nitraminas produzidas a partir das NAs presentes nas amostras estudadas. O autor determinou as curvas de degradação para dimetil e dietilnitramina, nas quais baseou a identificação das NAs. A fotodegradação das nitraminas nesse meio apresentou uma função logarítmica em relação ao tempo de irradiação.

Na Figura 14 está apresentado o logaritmo da porcentagem de nitrosamina residual em função do tempo de irradiação para cada um dos padrões testados. As inclinações calculadas foram de -0,030; -0,026; -0,030 e -0,030 respectivamente para NDMA, NDEA, NDPA e NPIR. Os valores obtidos indicam, utilizando DCM como solvente, que as quatro NAs possuem velocidades de fotodegradação semelhantes.

4. CURVAS DE CALIBRAÇÃO E CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DAS NITROSAMINAS

As curvas de calibração obtidas para NDMA e NPIR utilizando padrões internos estão indicadas na Figura 15. As incli-

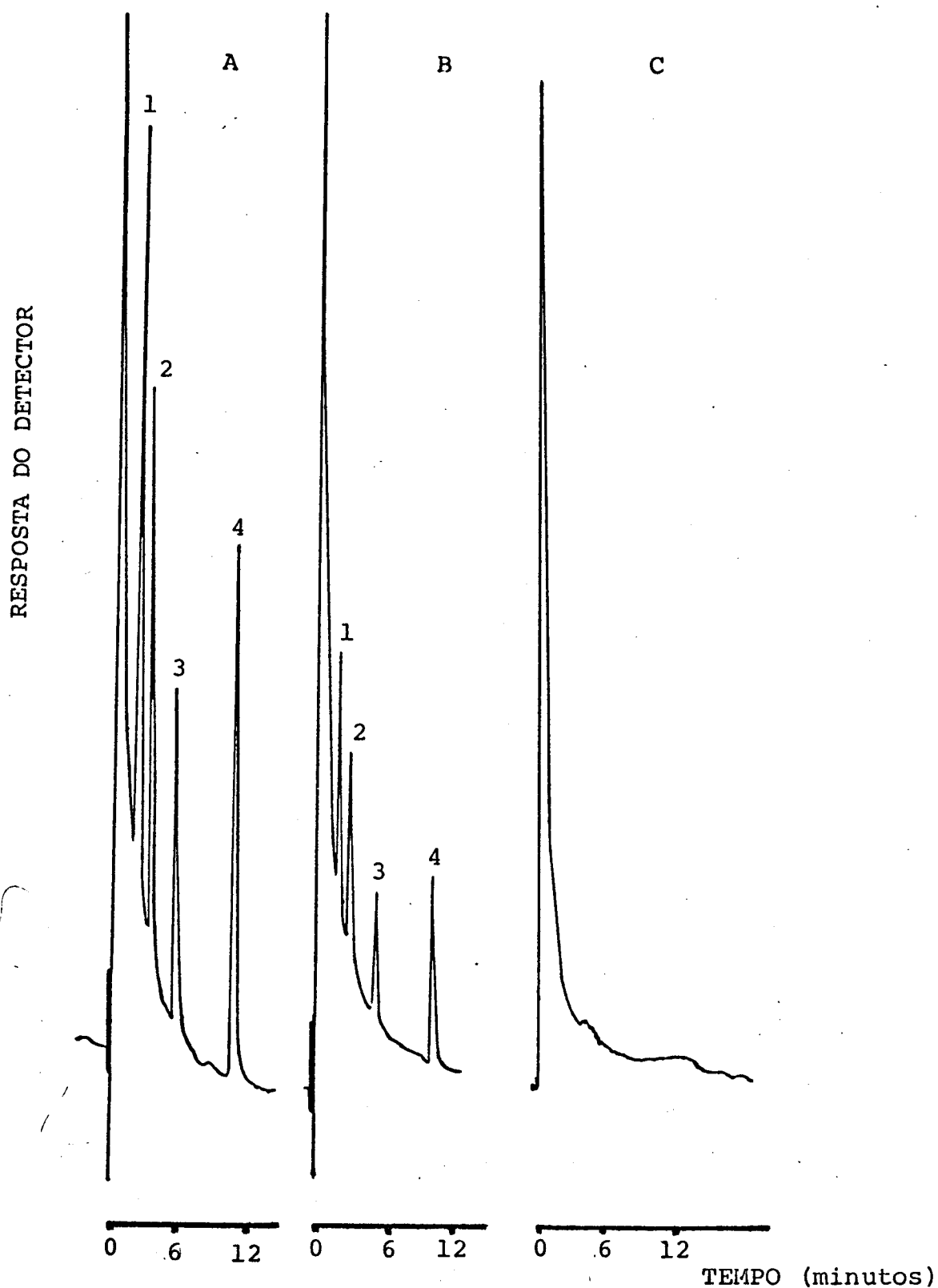


FIGURA 13 - Efeito da irradiação de nitrosaminas com luz ultra violeta. 10^{-12} A/mV, atenuação 8. Identificação dos picos: 1. nitrosodimetilamina (3,0 ng); 2. nitrosodietilamina (3,5 ng); 3. nitrosodipropilamina (4,0 ng); 4. nitrosopirrolidina (9,0 ng). Tempo de irradiação dos cromatogramas: A: tempo zero; B: 15 minutos; C: 60 minutos.

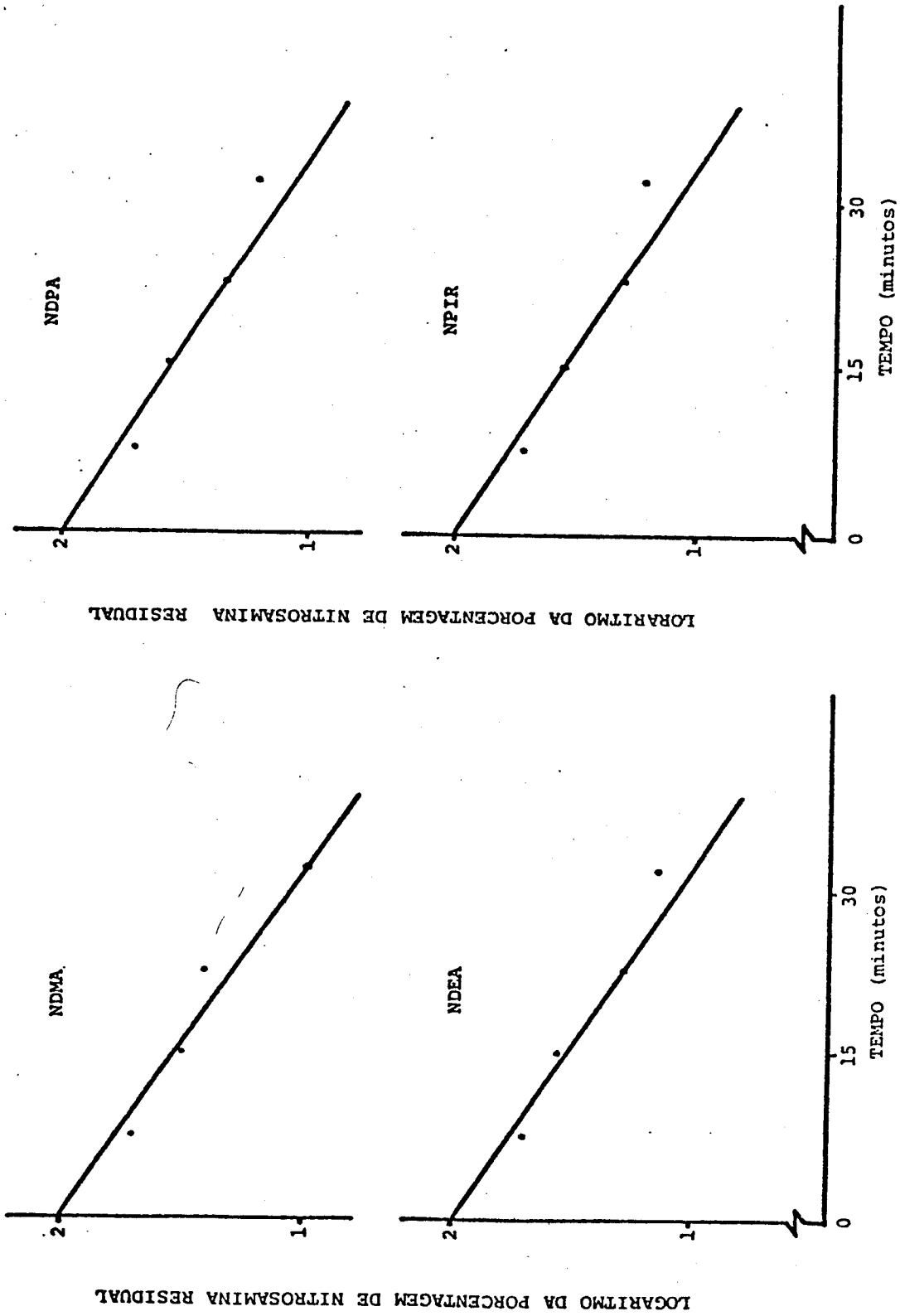


FIGURA 14 - Degradação de nitrosaminas, em meio diclorometano, por irradiação com luz ultra violeta.

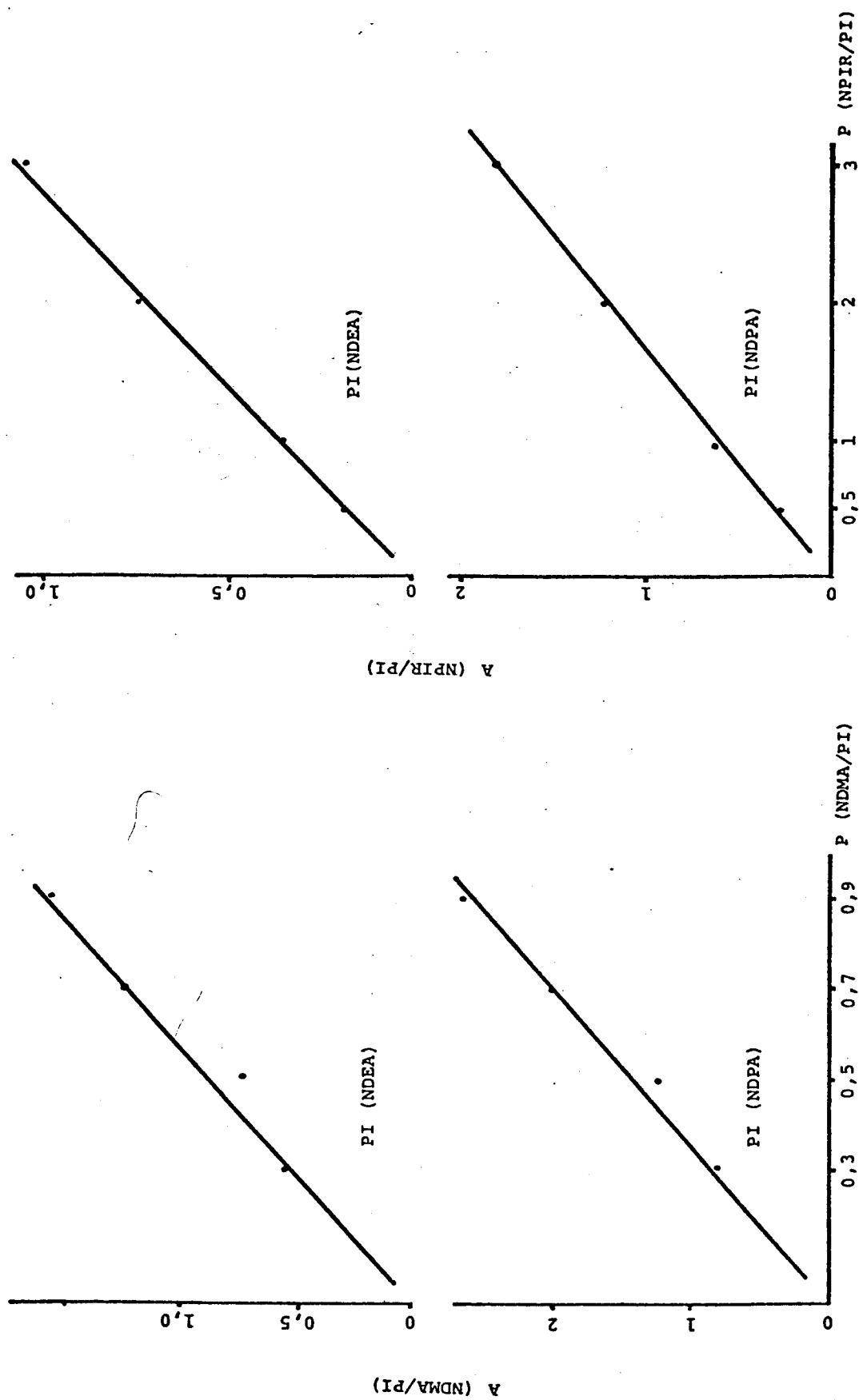


FIGURA 15 - Curvas de calibração para nitrosodimetilamina (NDMA) e nitrosopirrolidina (NPIR). Padrões internos (PI): nitrosodietilamina (NDEA) e nitrosodipropilamina (NDPA).

A: relação de altura de picos; P: relação de pesos.

nações calculadas para NDMA foram de 1,73 e 2,94 e para NPIR, foram de 0,36 e 0,60 usando-se, para ambas NAs, os padrões internos NDEA e NDPA respectivamente. Estas inclinações foram os fatores de resposta utilizados no cálculo das NAs segundo a fórmula apresentada na secção 2.2.8.

5. RECUPERAÇÃO DE NITROSAMINAS EM BACON E LINGUIÇA

A estimação da porcentagem de recuperação do método utilizado foi calculada em base à recuperação de NDEA e NDPA. Isto foi devido à quantificação de NDMA e de NPIR ter sido feita pelo método da adição de padrão interno e também devido à inexistência desses padrões nos tipos de amostras analisadas. Na Tabela 2 estão apresentadas as concentrações obtidas de ambos padrões nos extratos das sete amostras de bacon e seis de linguiça indicadas na secção 2.2.9., com as respectivas porcentagens de recuperação.

Os valores obtidos no método original por PENSABENE e col. em 1982, utilizando o detector TEA, para a recuperação de NDEA em bacon estão na faixa de 70 - 77%, os quais comparam-se favoravelmente aos encontrados neste estudo (73%) para o mesmo tipo de amostra. Porém, em amostras de linguiça, a recuperação para a mesma nitrosamina resultou ser de 87%.

Resultados divergentes daqueles publicados por PENSABENE e col. (1982) foram obtidos neste estudo para o padrão NDPA para o qual, no trabalho mencionado, não foi obtida a sua recuperação. No entanto, nossos resultados coincidem com aqueles publicados por HAVERY e col., em 1982 e 1984. Estes autores utilizaram a coluna de celite na determinação de NAs em leite em pó desengor-

TABELA 2 - Recuperação de nitrosodietilamina (NDEA) e nitrosodipropilamina (NDPA) em amostras de bacon e linguiça.*

nº de amostras	BACON		LINGUIÇA	
	NDEA (ng/ μ L)	NDPA (ng/ μ L)	NDEA (ng/ μ L)	NDPA (ng/ μ L)
1	0,25	0,25	0,28	0,34
2	0,22	0,11	0,32	0,37
3	0,28	0,38	0,25	0,31
4	0,19	0,23	0,19	---
5	0,21	0,30	0,20	0,33
6	0,17	0,21	0,33	0,40
7	0,25	0,39		
média	0,22	0,27	0,26	0,35
recuperação** (%)	73,3	67,5	86,7	87,5

* As concentrações inicialmente adicionadas de NDEA e NDPA foram 0,3 ng/ μ L e 0,4 ng/ μ L respectivamente.

** Porcentagem de recuperação calculada em base à média dos valores obtidos para cada padrão.

durado e malte. Na primeira ocasião os autores trabalharam com uma mistura de quatorze NAs dentre as quais NDPA, a qual foi utilizada posteriormente como padrão interno na determinação de NAs em malte. A diferença entre estes tipos de amostras e o bacon está no conteúdo de gordura, que não foi separada por PENSABENE no método original ERRC. Ensaaios preliminares realizados no presente trabalho demonstraram que a coluna de celite é facilmente saturada pela gordura presente nas amostras. De fato, não foi possível aplicar este método na determinação das NAs presentes na fração gordurosa do bacon, sendo esta uma das razões pela qual a determinação foi realizada unicamente na parte magra das amostras. Esta diferença na capacidade de retenção das NAs por parte da coluna de celite devido à presença de gordura, pode explicar também a maior recuperação de NDEA e NDPA em linguiça (87%), amostra esta menos gordurosa que o bacon e da qual se obtiveram extratos mais limpos.

6. REPRODUTIBILIDADE DA DETERMINAÇÃO DE NITROSAMINAS

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados obtidos no estudo da reprodutibilidade na determinação de NDMA e NPIR em amostras de bacon e linguiça, usando-se dois padrões internos para cada nitrosamina.

Os resultados obtidos indicam que a utilização de NDEA e NDPA como padrões internos na determinação de NPIR apresentou uma variação maior em bacon (CV 24%) do que em linguiça (CV 18%). Para as amostras de linguiça, a relação de alturas para NDMA e NPIR usando-se como padrão interno NDPA, apresentou menor variação do que quando foi usada NDEA. PENSABENE e col. (1982) sugeriram

TABELA 3 - Reprodutibilidade da determinação de nitrosodimetilamina (NDMA) e nitrosopirrolidina (NPIR) usando como padrão interno nitrosodietilamina (NDEA) e nitrosodipropilamina (NDPA).

nº de amostra	BACON				LINGUIÇA			
	RELAÇÃO ALTURA DE PICOS							
	$\frac{\text{NDMA}}{\text{NDEA}}$	$\frac{\text{NDMA}}{\text{NDPA}}$	$\frac{\text{NPIR}}{\text{NDEA}}$	$\frac{\text{NPIR}}{\text{NDPA}}$	$\frac{\text{NDMA}}{\text{NDEA}}$	$\frac{\text{NDMA}}{\text{NDPA}}$	$\frac{\text{NPIR}}{\text{NDEA}}$	$\frac{\text{NPIR}}{\text{NDPA}}$
1	2.47	3.13	1.32	1.67	1.45	1.56	1.22	1.32
2	1.90	2.83	1.55	1.78	1.46	1.66	1.22	1.38
3	2.93	2.81	1.81	1.49	1.56	1.63	1.31	1.37
4	2.47	2.51	1.08	1.04	1.04	1.54	1.09	1.34
5	2.20	2.13	0.98	1.03	1.64	1.79	1.70	1.10
6	1.10	1.63	1.10	1.82				
média	2.18	2.52	1.31	1.47	1.43	1.64	1.31	1.30
desvio-padrão	0.27	0.55	0.32	0.36	0.23	0.10	0.23	0.12
coef. de variação C.V. (%)	12	22	24	24	16	6	18	9

que as variações na homogeneidade do empacotamento da coluna de celite influi na reprodutibilidade do método, tendo os autores reportado CV de até 23%.

7. IDENTIFICAÇÃO DAS NITROSAMINAS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

7.1. Separação e detecção

Os valores de Rf obtidos para NDMA, NDEA, NDPA e NPIR estão reunidos na Tabela 4. O uso da cromatografia em camada delgada mostrou-se eficaz na separação das NAS estudadas para os dois tipos de solventes testados. VASUNDHARA e col., 1975 obtiveram valores de Rf similares para NDMA e NDEA separadas em cromatoplasas de sílica gel neutra utilizando hexano-éter-DCM (4:3:2). Do mesmo modo, os valores obtidos para os dois solventes testados compararam-se favoravelmente com aqueles publicados por SEN e col. 1969, e por GUNATILAKA, 1976.

Na detecção das NAS, o revelador de ninidrina revelou manchas amarelas nos extratos não purificados o que dificultou a identificação das mesmas. Isto pode ter sido devido à presença de amins no extrato, as quais reagem com ninidrina produzindo resultados falso-positivos. Efeitos interferentes, porém de menor intensidade, também foram verificados quando as cromatofolhas foram reveladas com o reagente de Griess, possivelmente devido à reação entre as substâncias que formam o reagente e algumas impurezas presentes no extrato.

O limite de detecção das NAS, quando utilizada cromatografia em camada delgada, variou em função do revelador empregado.

TABELA 4. - Valores de Rf de nitrosaminas sobre cromatofolhas de sílica gel 60 F254. Solvente: hexano-éter-diclorometano nas proporções: A- 10:3:2; B- 4:3:2 Revelador: 0,3% ninidrina em metanol.

NITROSAMINA	VALOR DE Rf	
	A	B
Nitrosodimetilamina	0,10	0,35
Nitrosodietilamina	0,26	0,56
Nitrosodipropilamina	0,39	0,58
Nitrosopirrolina	0,08	0,41

do. No entanto, a utilização de ambos reveladores tem a vantagem de aumentar o grau de certeza na identificação desses nitrosocompostos. Isto é devido ao fato de que uma resposta positiva para ambos reagentes é somente possível se o composto, após irradiação com luz UV, produzir simultaneamente amina secundária e nitrito, o qual segundo CHOW e col., 1972, é uma característica das nitrosaminas. Na Tabela 5, estão apresentadas as quantidades mínimas de NAs que puderam ser visualmente detectadas quando foram usados os reveladores mencionados. Em geral o revelador de ninidrina, embora apresentando maior sensibilidade do que o reagente de Griess, mostrou menor especificidade de detecção. Os resultados obtidos são bastante similares àqueles apresentados por SEN e col., 1969. Estes autores concluíram que a baixa sensibilidade da cromatografia em camada delgada para a determinação de NAs voláteis, principalmente para NDMA, é devida à alta volatilidade desses compostos.

8. CONTEÚDO DE NITROSAMINAS EM BACON

Na Tabela 6 indicam-se os valores obtidos na dosagem de NDMA e NPIR em quatro amostras de bacon, calculadas em base aos padrões internos NDEA e NDPA. Também está apresentada a média dos valores obtidos com ambos os padrões, assim como os valores calculados, levando-se em consideração que a parte muscular representa 70% do bacon. Os resultados obtidos neste trabalho, compararam-se favoravelmente com aqueles apresentados na literatura (SCANLAN, 1983).

Segundo citações feitas por OWENS e KINAST, 1980, o conteúdo de gordura no bacon varia na faixa de 30 - 85% a qual,

TABELA 5 - Detecção limite visual de nitrosaminas sobre cromatofolhas de sílica gel 60 F254. Solvente: hexano-éter-diclorometano 4:3:2.

NITROSAMINA	MICROGRAMAS POR MANCHA	
	REAGENTE DE GRIESS	NINIDRINA
Nitrosodimetilamina	1,0	0,60
Nitrosodietilamina	0,7	0,20
Nitrosodipropilamina	0,5	0,30
Nitrosopirrolidina	0,2	0,05

TABELA 6 - Conteúdo de nitrosodimetilamina (NDMA) e nitrosopirrolidina (NPIR) em diferentes amostras de bacon. Padrões internos: 1. nitrosodietilamina (NDEA); 2. nitrosodipropilamina (NDPA).

NITROSAMINA	AMOSTRAS							
	A		B		C		D	
	1	2	1	2	1	2	1	2
μg de nitrosamina/kg de porção muscular do bacon.								
NDMA	62	85	59	67	66	59	ND	ND
NPIR	160	180	115	111	70	100	87	148
Média dos valores obtidos com ambos padrões								
NDMA	78,5		63		62,5		-	
NPIR	170		113		85		117,5	
Valores correspondentes a μg/kg de bacon								
NDMA	24		19		19		-	
NPIR	51		34		26		-	

ND: não detectada

para os bacon analisados neste estudo, foi em média de 70%. A respeito da distribuição das NAs no bacon, a maior parte dos trabalhos tem sido realizada na parte muscular. Poucos autores, dentre os quais GOUGH e col., 1976 e mais recentemente GRAY, 1981, determinaram as concentrações de NDMA e NPIR nas distintas frações de bacon. Esses autores concluíram que, em geral, as concentrações de NPIR, a principal nitrosamina pesquisada nesse tipo de amostras, é duas vezes maior na parte adiposa do que na parte muscular. Porém, os últimos estudos realizados por HOTCHKISS e VECCHIO, 1985, demonstraram que esta distribuição é dependente da temperatura utilizada na etapa de fritura. Temperaturas de 170°C, similar à utilizada neste trabalho, produziram, em média, uma concentração de NPIR duas vezes maior na parte magra em relação à parte gordurosa. Os níveis de NAs na porção adiposa, mesmo que menores àqueles existentes na porção muscular, não deixam de serem significativos, pelo grande conteúdo de gordura presente neste tipo de amostras. Como consequência disto, os teores apresentados na Tabela 6, correspondentes a NDMA e NPIR em bacon, estão provavelmente subestimados.

CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir o seguinte:

1. O detector termoiônico nitrogênio-fósforo específico (DNP), apresenta linearidade e reprodutibilidade de resposta adequadas para a análise de nitrosodimetilamina (NDMA), nitrosodietilamina (NDEA), nitrosodipropilamina (NDPA) e nitrosopirrolidina (NPIR), nos níveis em que esses nitrosocompostos podem ser encontrados nos alimentos.
2. O detector DNP pode ser utilizado na análise de amostras que contenham NDMA e NPIR em concentrações mínimas de 10 e 20 $\mu\text{g/Kg}$ de alimento, respectivamente.
3. O detector DNP não possui especificidade suficiente para a análise das nitrosaminas (NAs) presentes nos extratos de bacon e linguiça obtidos da coluna de celite. Dos absorventes utilizados na purificação desses extratos, a sílica gel 60 é mais eficiente do que a alumina.
4. O uso de NDEA e NDPA como padrões internos é adequado para a quantificação de NDMA e NPIR em bacon e linguiça.
5. A decomposição fotoquímica com luz ultravioleta das NAs, em meio diclorometano, pode ser utilizada para a confirmação da identidade desses nitroso compostos.
6. Nas condições utilizadas no presente trabalho, os reveladores de ninidrina e reagente de Griess não possuem sensibilidade suficiente para a detecção de NDMA e NPIR em bacon e linguiça.

BIBLIOGRAFIA

- ALLISTON, T.G.; COX, G. B.; KIRK, R.S. 1972. - The determination of steam-volatile N-nitrosamines in foddstuffs by formation of electron capturing derivatives from electrochemically derived amines. Analyst, 97: 915-920.
- ALTHORPE, J.; GODDARD, D.A.; SISSONS, D.J.; TELLING, G. 1970. - The GC determination of nitrosamines at the picograms levels by conversion to their corresponding nitramines. J.Chromatogr., 53: 371-373.
- ANÔNOMO, 1982. - "Changes in methods". J. Assoc. Off. Anal.Chem., 65: 473-475, secs. 24.CO1-24.CO7.
- ANÔNIMO, 1984. - Nitrosamines cancêrigênes ça commence avec le bi beron. Que Choisir?, 193: 17-19.
- ASBC, REPORT OF SUBCOMMITTEE, 1982. - N-nitrosamines in malt and beer. ASBC J., 40(3): 92-95.
- BARNES, J.M.; MAGGE, P.N., 1954. - Some properties of dimethyl-nitrosamine. Brit. J. Ind. Med. 11, 167-174.
- BARTSCH, H.; O'Neill, I.K., 1984. - Eighth international meeting on N-nitroso compounds. Occurrence, biological effects, and relevance to human cancer. Cancer Res., 44: 1301-1304.
- BHARUCHA, K.E.; CROSS, C.K.; RUBIN, L.J., 1979. - Mechanism of N-nitrosopyrrolidine formation in bacon. J. Agric. Food Chem., 27(1): 63-69.

BILLEDEAU, S.M.; RHOMPSON, H.C.; HANSEN, E.B.; MILLER, B.J., 1984.

- High temperature purge trap procedure for determining seven volatile N-nitrosamines in animal feed, using gas chromatography-thermal energy analyzer. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 67(3): 557-562.

BROEKHOVEN, L.W.; DAVIES, J.A., 1980. - Prevention of artifact formation during the analysis of N-nitrosamines in the rumen fluids of cows. J. Agric. Food Chem., 28: 957-969.

BROOKS, J.B.; ALLEY, C.C.; JONES, R., 1972. - Reaction of nitrosamine with fluorinated anhydrides and pyridine to form electron capturing derivatives. Anal. Chem., 44: 1881-1884.

CASSENS, R.G.; GREASER, M.L.; ITO, T.; LEE, M., 1979. - Reactions of nitrite in meat. Food Technol., July; 46-57.

CHANG, S.K.; HARRINGTON, G.W., 1975. - Determination of dimethylnitrosamine and nitrosoproline by differential pulse polarography. Anal. Chem., 47(11): 1857-1860.

CHOW, Y.L., 1967. - Photochemistry of nitroso compounds in solution. V. Photolysis of N-nitrosodialkylamines. Can. J. Chem., 45: 53-62, 1967.

CHOW, Y.L.; LAU, M.P.; PERRY, R.A.; TAM, J.N., 1972. - Photoreactions of Nitroso Compounds in solution¹. Photoreaction, Photoelimination, and Photoaddition of Nitrosamines. Can. J. Chem., 50: 1044-1050.

- COX, G.B., 1973 - Estimation of volatile N-nitrosamines by High-performance liquid chromatography. J. Chromatogr., 83: 471-481.
- CROSBY, N.T.; FOREMAN, J.K.; PALFRAMAN, J.F.; SAWYER, R., 1972. - Estimation of steam-volatile N-nitrosamines in foods at the 1 µg/kg level. Nature, 238: 342-343.
- CROSBY, N.T.; SAWYER, R., 1976. - N-nitrosamines: A review of chemical and biological properties and their estimation in foodstuffs. Adv. in Food Res., 22: 1-17.
- CUCCO, J.A.; BROWN, P.R., 1981. - Confirming the presence of N-nitrosamines in ambient air and cigarette smoke by converting to and photochemically altering their corresponding N-nitroamines. J. Chromatogr., 213: 253-263.
- DICKES, G.J.; NICHOLAS, P.V., 1978. - Gas chromatography in foods analysis. Butterworths, p. 57-58.
- DOERR, R.C.; FIDDLER, W., 1977. - Photolysis of volatile nitrosamines at the picogram level as an aid to confirmation. J. Chromatogr., 140: 284-287.
- DRESCHER, G.S.; FRANK, C.W., 1978. - Estimation of extractable N-nitroso compounds at the parts per billion level. Anal. Chem., 50(14): 2118-2121.
- DRUSHELL, H.V., 1983. - Needs of the Chromatographer-Detectors. J. Chromatogr. Sci., 21: 375-384.

- EG&G, PRINCETON APPLIED RESEARCH., 1980. - Analysis of N-nitroso-diethanolamine in cosmetic products by HPLC with a polarographic detector. Princeton NJ. Applicatoon Note, C-5.
- EISENBRAND, G.; PREUSSMANN, R., 1970. - Eine Neue methods zur Kolorimetrischen bestimmung von nitrosaminen nach spaltung der N-nitrosogruppe mit bromwasserstoff in eisessig. Arzneim. Forsch., 20: 1513-1517.
- EISENBRAND, G.; SPACZYNSKI, K.; PREUSSMANN, R., 1970. - Separation of carcinogenic nitrosamines on Sephadex LH-20. J. Chromatogr., 51: 304-306.
- ENDER, F.; HAVRE, G.; HELGEBOSTAD, A.; KOPPANG, N.; MADSEN, R.; CEH, L., 1964. - Isolation and identification of a hepatotoxic factor in herring meal produced from sodium nitrite preserved herring. Naturwissenschaften, 24: 637-638.
- ENDER, F.; CEH, L., 1968. - Occurrence of nitrosamines in foodstuffs for human and animal consumption. Food cosmet. Toxicol., 6: 569-571, 1968.
- ESSIGMANN, J.M.; ISSENBERG, P., 1972. - Gas chromatographic determination of volatile nitrosamines in foods. J. Food Sci., 37: 684-688.
- FAN, T.Y.; TANNENBAUM, S.R., 1971. - Automatic colorimetric determination of N-nitroso compounds. J. Agric. Food. Chem., 19 (6): 1267-1269.

FAZIO, T.; WHITE, R.H.; DUSOLD, L.R.; HOWARD, J.W., 1973. - Nitroso pyrrolidine in cooked bacon. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 56 (4): 919-921.

FAZIO, T., 1982. - Volatile nitrosamines in direct flame dried processed foods, in N-nitroso compounds: Occurrence and Biological effects. IARC Sci. Publ. n° 41, International Agency for Res. on Cancer, Lyon France, pp 277-286.

FIDDLER, W.; PENSABENE, J.W.; DOERR, R.C.; WASSERMAN, A., 1972. - Formation of N-nitrosodimethylamine from naturally occurring quaternary ammonium compounds and tertiary amines. Nature, 236: 307.

FIDDLER, W.; PENSABENE, J.W.; PIOTROWSKI, E.G.; PHILLIPS, J. G.; KEATING, J.; MERGENS, W.J.; NEWMARK, H.L., 1978. - Inhibition of formation of volatile nitrosamines in fried bacon by the use of cure-solubilized α -tocopherol. J. Agric. Food Chem., 26(3): 653-656.

FIDDLER, W.; PENSABENE, J.W.; GATES, R.A.; PHILLIPS, J.G., 1984. - Dry column-Thermal Energy Analyzer Method for determining N-nitrosopyrrolidine in fried bacon. Collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 67(3): 521-525.

FINE, D.H.; RUFEB, F.; LIEB, D.; ROUNBEHLER, D.P., 1975. - Description of the Thermal Energy Analyzer (TEA) for trace determination of volatile and nonvolatile N-nitroso compounds. Anal. Chem., 47(7): 1188-1191.

- FINE, D.H.; ROUNBEHLER, D.P.; OETTINGER, P.E., 1975. - A rapid method for the determination of sub-part per billion amounts of N-nitroso compounds in foodstuffs. Anal.Chim.Acta, 78: 383 - 389.
- FINE, D.H.; LIEB, D.; RUFEB, F., 1975. - Principle of operation of the thermal energy analyzer for the trace analysis of volatile and non-volatile N-nitroso compounds. J. Chromatogr., 107: 351 -357.
- FLORES, J., 1982. - Estudios y perspectivas del problema de los nitratos, nitritos y nitrosaminas en los productos cárnicos. Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment., 22: 459-464.
- FREUND, H.A., 1937. - Clinical manifestations and studies in parenchymatous hepatitis. Ann. Intern. Med. 10, 1144-1155.
- GOUGH, T.A.; GOODHEAD, K.; WALTERS, C.L., 1976. - Distribution of some volatile nitrosamines in cooked bacon. I. Sci. Food Agric. 27: 181-185.
- GOUGH, T.A.; WEBB, K.S., 1978. - Positive Interferant in the chemiluminiscent detection of nitrosamines. J.Chromatogr. , 154: 234-237.
- GRAY, J.I.; REDDY, S.K.; PRICE, J.F.; MANDAGERE, A.; WILKENS, W. F., 1982. - Inhibition of N-nitrosamines in bacon. Food Technol., June: 38-44, 1982.

- GUNATILAKA, A.L., 1976. - Thin-Layer chromatography of N-nitrosamines. J. Chromatogr., 120: 229-233.
- HALL, R.C., 1974. - A highly sensitive and selective micro-electrolitic conductivity detector for gas chromatography. J. Chromatogr. Sci., 12: 152-160.
- HALL, R.C., 1978. - The nitrogen detector in gas-chromatography. Crit. Rev. Anal. Chem., 7: 323-380.
- HART, R.J.; WALTERS, C.L., 1983. - The formation of nitrite and N-nitroso compounds in salivas in vitro and in vivo. Ed. Chem. Toxic., 21(6): 749-753.
- HASEBE, K.; OSTERYOUNG, J., 1975. - Differential pulse polarographic determination of some carcinogenic nitrosamines. Anal. Chem., 47(14):2412-2418.
- HIVERY, D.C.; FAZIO, T.; HOWARD, J.W., 1978. - Survey of cured meat products for volatile N-nitrosamines: Comparison of two analytical methods. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 61(6): 1374-1378.
- HIVERY, D.C.; HOTCHKISS, J.H.; FAZIO, T., 1982. - Rapid determination of volatile N-nitrosamines in nonfat dry milk. J. Dairy Sci., 65: 182-185.
- HIVERY, D.C.; PERFETTI, G.A.; FAZIO, T., 1984. - Rapid column method for determination of N-nitrosodimethylamine in malt. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 67(1): 20-21.

- HOTCHKISS, J.H.; BARBOUR, J.F.; SCANLAN, R.A., 1980. - Analysis of malted barley for N-nitrosodimethylamine. J. Agric. Food Chem., 28: 678-680.
- HOTCHKISS, J.H.; HAVERY, D.C.; FAZIO, T., 1981. - Rapid method for estimation of N-nitrosodimethylamine in malt beverages. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 64: 929-932.
- HOTCHKISS, J.H.; VECCHIO, A.J., 1983. - Analysis of direct contact paper and paperboard food packaging for N-nitrosomorpholine and morpholine. J. Food. Sci., 48: 240-242.
- HOTCHKISS, J.H.; VECCHIO, A.J., 1985. - Nitrosamines in fried-out bacon fat and its use as cooking oil. Food Technol. Jan, 67-73.
- HOWARD, J.W.; FAZIO, T.; WATTS, J.O., 1970. - Extraction and gas chromatographic determination of N-nitrosodimethylamine in smoked-fish: Application to smoke nitrite-treated chub. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 53(2): 269-274.
- IARC, 1978. - Environmental aspects of N-nitroso compounds, Sci. Publ. n° 19. International Agency Research on Cancer, 555.
- ISHIBASHI, T.; KAWABATA, T.; TANABE, H., 1980. - Gas chromatographic determination of N-nitrosoamino acids. J. Chromatogr., 195: 416-420.
- JOHNSON, E.M.; WALTERS, C.L., 1971. - The specificity of release of nitrite from N-nitrosamines by hydrobromic acid. Anal. Letters, 4(6): 383-386.

- KEY, P.E.; BAYLY, J.M.; MASSEY, R.C.; Mc WEENY, D.J., 1982.- Nitroso dimethylamine levels in fish cooked by natural gas and by electricity. J. Fd. Technol., 17: 703-708.
- KIMOTO, W.I.; PENSABENE, J.W.; FIDDLER, W., 1982. - Isolation and identification of N-nitrosothiazolidine in fried bacon. J. Agric. Food Chem., 30(4): 757-760.
- KIMOTO, W.I.; SILBERT, L.S.; FIDDLER, W., 1984. - Confirmation of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosopyrrolidine in foods by conversion to their nitramines with pentafluoroperoxybenzoic acid. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 67(4): 751-756.
- KLIMISCH, H.J.; STADLER, L., 1974. - Mikroquantitative bestimmung von aliphatischen aminen mit 7-chlor-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3 - diazol. J. Chromatogr., 90: 141-148.
- KRULL, I.S.; FAN, T.Y.; FINE, D.H., 1978. - Problem of artifacts in the analysis of N-nitroso compounds Anal. Chem., 50(6):698-701.
- KUBACKI, S.J., 1979. - A survey of methods for the determination of non-volatile nitrosamines in foods. Pure and App. Chem., 51: 1367-1373.
- KUSHNIR, I.; FEINBERG, J.I.; PENSABENE, J.W.; PIOTROWSKI, E. G.; FIDDLER, W.; WASSERMAN, A.E., 1975. - Isolation and identification of nitrosoproline in uncooked bacon. J. Food Sci., 40: 427-428.

- LIJINSKY, W.; EPSTEIN, S.S., 1970. - Nitrosamines as environmental carcinogens. Nature, 225: 21-23.
- LUBKOWITZ, J. A.; GLAJCH, J.L.; SEMONIAN, B.P.; ROGERS, L.B., 1977. - Study of the nitrogen response mode of the thermoionic rubidium silicate detector. J. Chromatogr., 133: 37-47.
- LUNT, T.G.; FUEGGLE, D.G.; WALTERS, C.L., 1973. - The estimation of total non-volatile nitrosamines and nitrosamides in microgram amounts. Anal. Letters , 6: 369-372.
- MAYBURY, R.B.; GRANT, R.G., 1983. - Gas-liquid chromatography and nitrogen-phosphorus detection of N-nitroso-di-n-propylamine in trifluralin products. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 66:1209-1213.
- MAGA, J.A., 1978. - Amines in foods. Crit. Rev. Food Sci. and Nutrition, 10(4): 373-403.
- MILLER, A.; SCANLAN, R.A.; LIBBEY, L.M.; PETROPAKIS, H.; ANGLEMIER, A.F., 1973. - Quantitative determination of dimethyl and trimethylamine in fish protein concentrates. J. Agric. Food Chem., 21: 451-453.
- NITRITE SAFETY COUNCIL., 1980. - A survey of nitrosamines in sausages and dry-cured meat products. Food Technol., July: 45-53.
- OSHIMA, H.; BARTSCH, H., 1981. - Quantitative estimation of endogenous nitrosation in human by monitoring N-nitrosoproline excreted in the urine. Cancer Res., 41: 3658-3662.

- OWENS, J.L.; KINAST, O.E., 1980. - An improved procedure for the determination of volatile N-nitrosamines in bacon grease by using the mineral oil distillation-thermal energy analyzer method. J. Agric. Food. Chem., 28: 1262-1264.
- PALFRAMAN, J.F.; MACNAB, J.; CROSBY, N.T., 1973. - An evaluation of the alkali flame ionisation detector and the Coulson electrolytic conductivity detector in the analysis of N-nitrosamines in foods. J. Chromatogr., 76: 307-319.
- PARRY, E.P.; OSTERYOUNG, R.A., 1965. - Evaluation of analytical pulse polarography. Anal. Chem., 37: 1634-1637.
- PENSABENE, J.W.; MILLER, A.J.; GREEBDUELD, E.L.; FIDDLER, W., 1982. - Rapid dry column method for determination of N-nitrosopyrrolidine in fried bacon. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 65(1): 151-156.
- PENSABENE, J.W.; FIDDLER, W., 1983. - Factors affecting the N-nitrosothiazolidine content of bacon. J. Food Sci., 48:1452-1454.
- PENSABENE, J.W.; FIDDLER, W., 1985. - Formation and inhibition of N-nitrosothiazolidine in bacon. Food Technol., January : 91-94.
- PREUSSMANN, R.; DAIBER, D.; HENGY, H., 1964. - A sensitive colour reaction on thin-layer chromatograms. Nature, 201: 502-503.
- REYES, F.G.; SCANLAN, R.A., 1984. - N-nitrosaminas: Formação e ocorrência em alimentos. Bol. SBCTA, 18:299-309.

- RHOADES, J.W.; JOHNSON, D.E., 1970. - Gas chromatography and selective detection of N-nitrosamines. J. chromatogr. Sci., 8: 616-617.
- RITSKES, T.M., 1975. - The gas chromatographic determination of trimethylamine and dimethylamine in fish, fishery products and other foodstuffs. J. Food Technol., 10: 221-228.
- ROBACH, M.N.; OWENS, J.L.; PAQUETTE, M.W.; SOFOS, J.N.; BUSTA, F. F., 1980. - Effects of various concentrations of sodium nitrite and potassium sorbate on nitrosamine formation in commercially prepared bacon. J. Food Sci., 45: 1280-1284.
- SAWICKI, E.; STANLEY, T.W.; PFAFF, J.; D'AMICO, A., 1963. - Comparison of fifty-two spectrophotometric methods for the Determination of Nitrite. Talanta, 10:641-655.
- SCANLAN, R.A.; LIBBEY, L.M., 1971. - N-nitrosamines not identified from heat induced D-glucose/L-alanine reactions. J. Agr. Food Chem., 19(3): 570-571.
- SCANLAN, R.A., 1983. - Formation and occurrence of nitrosamines in foods. Cancer Res., May Supp.: 2435S-2440S.
- SCANLAN, R.A., 1984. - Chemiluminescence for measurements of N-nitrosamines in food. In: "Analysis of Food Contaminants", J. Gilbert, editor, Elsevier Applied Science. Essex. p. 321.

- SCANLAN, R.A.; REYES, F.G., 1985. - An update on analytical techniques for N-nitrozamines. Food Technol., 39: 95-99.
- SEBRANEK, J.G.; CASSENS, R.G., 1973. - Nitrosamines: a review. J. Milk Food Technol., 36(2): 76-91.
- SEN, N.P.; SMITH, D.C.; SCHWINGHAMER, L.; MARLEAU, J.J., 1969. - Diethylnitrosamine and other N-nitrosamones in foods. J.Assoc. Off. Anal. Chem., 52(1): 47-52.
- SEN, N.P., 1970. - Gas-liquid chromatographic determination of dimethylnitrosamine as dimethylnitramine at picogram levels. J. Chromatogr., 51: 301-304.
- SEN, N.P.; DALPE, C., 1972. - A simple tlc technique for the semi-quantitative determination of volatile nitrosamines in alcoholic beverages. Analyst, 97: 216-220.
- SEN, N.P.; SCHWINGHAMER, L.A.; DONALDSON, B.A.; MILES, W.F., 1972 - N-nitrosodimethylamine in fish meal. J. Agric. Food Chem., 20(6): 1280-1281
- SEN, N.P.; SEAMAN, S., 1981. - Volatile N-nitrosamines in dried Foods. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 64(5): 1238-1242.
- SEN, N.P.; SEAMAN, S., 1981. - Gas-liquid chromatographic - Thermal Energy Analyzer. Determination of N-nitrosodimethylamine in beer at low parts per billion level. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 64(4): 933-938, 1981.

- SEN, N.P.; SEAMAN, S.; KARPINSKY, K., 1984. - Determination of N-nitrosodimethylamine in nonfat dry milk: Collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 67(2): 232-235.
- SEN, N.P.; SEAMAN, S.W.; BADDOO, P.A., 1985. - N-nitrosothiazolidine and non-volatile N-nitroso compounds in foods. Food Technol. January; 84-88.
- SHANK, R.C., 1975. - Toxicology of N-nitroso compounds. Toxicol. and Appl. Pharm., 31: 361-368.
- SKRPEC, D.J.; MANDAGERE, A.K.; GRAY, J.I.; BOOREN, A.M.; PEARSON, A.M.; CUPPETT, S.L., 1985. - Effect of bacon composition and processing on N-nitrosamine formation. Food Technol., January: 74-79.
- SNIDER, B.G.; JOHNSON, D.C., 1979. - A photo-electroanalyzer for determination of volatile nitrosamines. Anal. Chim. Acta., 106: 1-13.
- TAYLOR, W.J.; PRICE, L.S., 1929. - The action of nitrous acid on aminocompounds. Part III. Dimethylamine, n-propylamine, and glycine ethyl ester. J. Chem. Soc., 2052-2059.
- TELLING, G.M.; BRYCE, T.A.; ALTHORPE, J., 1971. - Use of vacuum distillation and GC-MS for determination of volatile nitrosamine in meat products. J. Agric. Food Chem., 19(5):937-940.

- TELLING, G.M., 1972. - A gas-liquid chromatographic procedure for the detection of volatile N-nitrosamines at the ten parts per billion level in foodstuffs after conversion to their corresponding nitramines. J. Chromatogr., 73: 79-87.
- THEILER, R.F.; SATO, K.; ASPELUND, T.G.; MILLER, A.F., 1984. - Inhibition of N-nitrosamine formation in a cured ground pork belly model system. J. Food Sci., 49: 341-344.
- VASUNDHARA, T.S.; JAYARAMAN, S.; PERIHAR, D.B., 1975. - The estimation of N-nitrosamines in tropical regions by reversed-phase paper and tlc. J. Chromatogr., 115: 535-541.
- WAGNER, D.A.; TANNENBAUM, S.R., 1985. - In-vivo formation of N-nitroso compounds. Food Technol., January: 89-90.
- WALTERS, C.L.; JOHNSON, E.M.; RAY, N., 1970. - Separation and detection of volatile and non-volatile N-nitrosamines. Analyst, 95: 485-489.
- WEISBURGER, J.H.; RAINERI, R., 1975. - Assessment of human exposure and response to N-nitroso compounds: A new view on the etiology of digestive tract cancers. Toxicol. and App. Pharm., 31: 369-374.
- WESTENDORF, R.G., 1985. - Determination of N-nitrosodimethylamine in infant products at part-per-billion levels. In: 1985 PITTSBURGH CONFERENCE ON ANALYTICAL CHEMISTRY AND APPLIED SPECTROSCOPY, New Orleans, LA February, 1985. Tekmar Company, P.O. Box 371856, Ohio.

WOGAN, G.N.; TANNENBAUM, S.R., 1975. - Environmental N-nitroso compounds: Implications for public health. Toxicol. and Appl. Pharm., 31: 375-383.

WOLFF, I.A.; WASSERMAN, A.E., 1972. - Nitrates, nitrites and nitrosamines. Science, 177: 15-19.

YAMADA, T.; YAMAMOTO, M.; TANIMURA, A., 1984. - Acceleration of nitrosamines formation by contaminant(s) in sodium chondroitin sulfate preparations. J. Agric. Food Chem., 32: 480-483.

YANG, K.W.; BROWN, E.V., 1972. - A sensitive analysis for nitrosamines. Anal. Letters., 5: 293-304.

YOUNG, J.C., 1976. - Detection and Determination of N-nitrosamines by tlc using fluorescamine. J. Chromatogr., 124: 17-28.

YOUNG, J.C., 1978. - Detection and determination of N-nitrosoamino acids by thin-layer chromatography using fluorescamine. J. Chromatogr., 151: 215-221.