

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Parecer

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Doroti Quicini Kanashiro Toyohara e aprovada pela Comissão Julgadora em 27.07.89. Campinas, 27 de julho de 1989.

F. Reyes
Presidente da Banca

DETERMINAÇÃO DE NITRATO, NITRITO E N-NITROSAMINAS EM LINGUIÇAS

DOROTI QUIOMI KANASHIRO TOYOHARA
ENGENHEIRA DE ALIMENTOS

DR. FELIX GUILLERMO REYES REYES
ORIENTADOR

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências de Alimentos.

1989

Aos meus pais, Luzia e Seiti,

Ao Roberto e Rafael

com amor

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Felix G. Reyes Reyes, pela sua dedicação, orientação e amizade.
- Ao Prof. Pedro E. Felício, pela colaboração e sugestões durante a etapa final deste trabalho, assim como ao Prof. Antonio F. Midio, pelas oportunas sugestões no texto.
- Aos Profs. R.A. Scanlan e L.M. Libbey, assim como ao J.F. Barbour, pela valiosa contribuição na determinação das N-nitrosaminas.
- À Profa. Maria Amélia C. Moraes, pela orientação na análise sensorial e à Profa. Maria Lucia Setina, pelo auxílio na análise na análise estatística.
- À Rosana M. Manzo, Ana Lourdes N. Gandara e Rosana N. Cavaletti, pelo auxílio técnico na parte experimental.
- À Merck S.A. Indústrias Químicas, pelos reagentes fornecidos, para a realização de parte do presente trabalho.
- À minha família, pelo incentivo e apoio, em especial à Lucia e Rubens, pelo carinho com que sempre me acolheram.

- Aos amigos Filomena, Magali, Mônica, Nestor, Rosana e Silvana, pelo apoio constante, carinho e amizade. À Magali, pelas sugestões na revisão do texto.
- A todos que, com boa vontade e franqueza participaram da equipe de provadores durante os testes sensoriais.
- Ao CNPq, Capes e UNICAMP, pelas bolsas concedidas.
- À Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação, ABIA, pela gentileza das cópias desta tese.
- Ao Marcos Antonio de Castro, pelo dedicado trabalho de datilografia.

ÍNDICE GERAL

PÁGINA

RESUMO

SUMMARY

I- INTRODUÇÃO.....1

II- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....3

1- Nitrato e nitrito.....3

1.1. Histórico.....3

1.2. Ocorrência em alimentos.....5

1.3. Exposição ao nitrato e nitrito.....10

1.4. Efeitos tóxicos do nitrato e nitrito.....15

1.5. Reações do nitrato e nitrito no processo
de cura.....18

2- N-nitrosaminas.....21

2.1. Formação das N-nitrosaminas.....21

2.2. Ocorrência de N-nitrosaminas.....23

2.3. Efeitos tóxicos das N-nitrosaminas.....26

2.4. Aspectos analíticos das N-nitrosaminas
em alimentos.....28

III- MATERIAL.....32

1- Amostras.....32

2- Reagentes.....33

3- Equipamentos.....34

IV- MÉTODOS.....	35
1- Determinação de umidade e gordura.....	35
2- Dosagens de nitrato e nitrito.....	35
3- Concentração do nitrato e nitrito nas linguí- cas, durante as etapas de processamento e ar- mazenamento.....	35
3.1. Processamento das linguícas.....	36
3.2. Armazenamento.....	39
4- Avaliação do desenvolvimento de microorga- nismos psicrófilos e mesófilos durante as etapas de processamento e armazenamento das linguícas.....	39
5- Avaliação sensorial da cor e da preferência nas amostras de linguícas.....	39
6- N-nitrosaminas.....	42
6.1. Extração das N-nitrosaminas.....	42
6.1.1. Preparo da coluna de celite.....	44
6.1.2. Preparo das amostras.....	44
6.1.3. Eluição das N-nitrosaminas da coluna de celite.....	45
6.1.4. Concentração do eluato.....	45
6.2. Determinação das N-nitrosaminas.....	46
6.2.1. Parâmetros operacionais do cromatógrafo.....	46
6.2.2. Confirmação da identidade das N-nitrosaminas.....	47
6.2.3. Parâmetros operacionais do espectrometro de massa.....	48

V- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
1- Determinação de gordura e umidade.....	48
2- Teores de nitrato e nitrito presentes em linguiças comercializadas.....	50
3- Avaliação da concentração de nitrato e nitrito em linguiças durante as etapas de processamento e armazenamento.....	54
4- Avaliação da contagem microbiana das linguiças durante a etapa de armazena- mento.....	59
5- Avaliação sensorial da cor e da prefe- rência.....	64
6- N-nitrosaminas.....	67
6.1. Presença de N-nitrosaminas em lin- guiças.....	67
6.2. Confirmação da identidade das N- nitrosaminas.....	74
VI- CONCLUSÕES.....	81
VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

Resumo:

O presente trabalho teve por objetivo determinar, em vários tipos de linguças comerciais de diferentes procedências, o teor residual de nitrato e de nitrito, assim como, identificar e quantificar o conteúdo de N-nitrosaminas voláteis.

Para fins de comparação com as amostras de linguças comerciais, foram processadas na Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (FEA/UNICAMP), linguças do tipo frescal e cozida, com a adição de 200 mg/kg nitrito de sódio (NaNO_2), na presença ou não de 500 mg/kg de ascorbato de sódio. Nestas amostras foi realizada a dosagem de nitrato e de nitrito durante as etapas de processamento e estocagem, assim como a identificação e quantificação das N-nitrosaminas voláteis. Com o propósito de verificar a eficácia do nitrito foi realizada uma avaliação microbiológica (mesófilos e psicrófilos), tendo sido também realizada uma avaliação sensorial de cor e de preferência nas amostras.

A determinação do nitrato e nitrito nas linguças comerciais de origem conhecida e de fabricantes não identificados indicaram que 3% e 31% das amostras, respectivamente, apresentaram teores residuais da soma de nitrato e nitrito acima do limite estabelecido pela legislação em vigor.

Para as linguças processadas na FEA/UNICAMP, durante as etapas de processamento e estocagem, verificou-se uma perda do teor residual de nitrito da ordem de 13% e 73% para linguça frescal e cozida, respectivamente, sendo a mesma maior na

presença de ascorbato de sódio. Não foi verificada variação aparente no teor de nitrato residual. Em relação à contagem total de mesófilos e psicrófilos, as amostras apresentaram conservação satisfatória por um período de até 12 e 30 dias de armazenamento ($4 \pm 2^{\circ}\text{C}$), respectivamente, para as linguças do tipo frescal e cozida. Os resultados da avaliação sensorial realizados após 7 e 19 dias de estocagem, indicaram que as linguças contendo nitrito e nitrito mais ascorbato apresentaram diferença significativa (ao nível de 1%) da amostra controle, tendo sido verificada maior média para aquelas amostras contendo nitrito mais ascorbato.

A identificação e quantificação das N-nitrosaminas foram realizadas, na "Oregon State University, Oregon, USA", por cromatografia gasosa acoplada ao detector TEA ("Thermal Energy Analyzer"). A confirmação destas substâncias foi feita por espectrometria de massa (MS). Os resultados indicaram que todas as amostras de linguça comercial estudadas apresentaram quantidades detectáveis de N-nitrosodimetilamina (NDMA), e de N-nitrosopirrolidina (NPIR), assim como a maioria dessas amostras também apresentou N-nitrosomorfolina (NMORF). Os níveis encontrados de NDMA ($97,5 \pm 59,1 \mu\text{g/kg}$) e de NPIR ($43,1 \pm 37,9 \mu\text{g/kg}$) foram, aproximadamente, 10 vezes maiores do que aqueles relatados recentemente na literatura. O conteúdo de NMORF encontrado foi de $8,5 \pm 7,4 \mu\text{g/kg}$. Em contrapartida, das amostras processadas na FEA/UNICAMP, somente duas apresentaram quantidades detectáveis de NDMA (1,1 e $3,0 \mu\text{g/kg}$) e uma de NPIR ($6,2 \mu\text{g/kg}$), níveis estes comparáveis com aqueles relatados na literatura recente.

SUMMARY

The objective of the present work was to determine in various types of commercial sausages from various sources the residual contents of nitrites and nitrates and to identify and quantify the volatile N-nitrosamines. For comparison with commercial sausages samples of fresh and cooked sausages were processed in the Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (FEA/UNICAMP) with the addition of 200 mg/kg sodium nitrite (NaNO_2) in the presence or not of sodium ascorbate (500 mg/kg). In these samples, the determination of nitrate and nitrite was performed during the processing and storage and the identification and quantification of volatile N-nitrosamines were determined during storage. To verify the efficiency of nitrite as a preserving agent, microbiological analyses (mesophylus and psycrophylus) were performed. In addition, sensorial evaluations of color and preference on the samples were also performed.

Determination of nitrite and nitrate in commercial sausages indicated that 3% of the samples where the processors were identified and 31% of the samples from unidentified processor had residual amounts where the sum of nitrite and nitrate was above the stablished limits.

During processing and storage ($4 \pm 2^\circ\text{C}$), sausages prepared in FEA/UNICAMP, showed a loss of residual nitrite of approximately 13% and 73% in fresh and cooked sausages, respectively. This loss was higher in the presence of sodium ascorbate. No apparent change in residual nitrate content was

observed. In relation to the total count of mesophylus and psycrophylus, the samples showed satisfactory preservation for a period up to 12 and 30 days for fresh and cooked sausages, respectively.

Results of sensorial evaluation performed after 7 and 19 days of storage, indicated that the sausages containing nitrite and nitrite plus ascorbate showed a significant difference ($P < 0.01$) from the control sample. Samples containing nitrite plus ascorbate had higher average scores for colour and preference than those not containing ascorbate.

The identification and quantification of N-nitrosamines were performed, at the Oregon State University, Oregon, USA, by gas chromatography coupled to a TEA detector (Thermal Energy Analyzer detector). The confirmation of these substances was performed by mass spectrometry (MS). The results indicated that all the commercial sausages studied presented detectable quantities of N-nitrosodimethylamine (NDMA) and N-nitrosopyrrolidine (NPYR). In addition, most of the samples also showed N-nitrosomorpholine (NMOR). The levels of NDMA (97.5 ± 59.1 $\mu\text{g/kg}$) and NPYR (43.1 ± 37.9 $\mu\text{g/kg}$) found were approximately 10 times higher than those recently reported in the literature. The content of NMOR was 8.5 ± 7.4 $\mu\text{g/kg}$. On the other hand, of the 8 samples processed in FEA/UNICAMP only 2 of them presented detectable quantities of NDMA (1.1 and 3.0 $\mu\text{g/kg}$) and one of NPYR (6.2 $\mu\text{g/kg}$). These levels are comparable with those recently reported in the literature.

I- INTRODUÇÃO:

Nitratos e nitritos são compostos existentes naturalmente em alimentos ou adicionados durante o processamento dos mesmos como, por exemplo, em carnes curadas. Sabe-se que nitrito, em determinadas condições, pode combinar-se com aminas secundárias e terciárias formando N-nitrosaminas. Estes compostos N-nitrosos são considerados potentes carcinógenos em todos os animais de experimentação testados. Embora não exista evidência direta da incidência de câncer em humanos como resultado da exposição a tais compostos, presume-se que a ação carcinogênica atinja também o homem.

Outro efeito tóxico relacionado com a ingestão de nitratos e nitritos reside na metemoglobinemia que pode ser provocada, principalmente, em crianças. O nitrito, presente no organismo infantil, age sobre a hemoglobina, oxidando o ferro, do estado ferroso ao férrico, impedindo assim a função normal da hemoglobina no transporte do oxigênio.

As fontes de nitrato e nitrito são diversas, podendo ocorrer naturalmente em plantas ou, em determinadas áreas geográficas, estar presentes na água e no solo. As plantas necessitam de nitrogênio para seu crescimento e este é absorvido na forma de nitrato contido no solo e também nos fertilizantes. Quando estes são aplicados inadequadamente, pode ocorrer um excesso de nitrato na planta.

Nitrato e nitrito são adicionados em carnes para agir como conservantes, além do que conferem sabor, aroma e cor avermelhada, "desejável" ao produto. A característica de conservação desses compostos tem sido relacionada com a sua propriedade antioxidante de substâncias lípidicas e com a inibição do desenvolvimento de esporos, principalmente, de *Clostridium botulinum*, cujas toxinas produzem botulismo.

No Brasil, onde o nitrato e nitrito são amplamente utilizados no preparo de linguiças e outras carnes curadas, pouco se conhece sobre o teor residual dessas substâncias no produto consumido. Além disso, a falta de dados disponíveis sobre a possível formação de N-nitrosaminas em tais alimentos torna esta área de estudos de grande interesse, face aos resultados apresentados em países desenvolvidos.

O objetivo principal do presente trabalho foi verificar o teor residual de nitrato e de nitrito, assim como a presença de N-nitrosaminas voláteis, em amostras de linguiças comercializadas na região de Campinas - SP., e em amostras processadas no laboratório de carnes da Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP. Foi também estudada a concentração de nitrato e nitrito durante o processamento e estocagem (30 dias a $4^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$), assim como o efeito desses compostos no crescimento microbiano (mesófilos e psicrófilos) e nas características sensoriais (cor e preferência) de linguiças.

II- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

1. NITRATO E NITRITO:

1.1. Histórico:

O processo de salga foi um dos primeiros métodos utilizados para a conservação de produtos cárneos e, provavelmente, foi por meio desta prática que se caracterizou o uso de nitrato e nitrito como fixadores de cor nesses alimentos. Estes compostos estavam presentes, como contaminantes, no sal usado para salga (Mac DOUGALL e col., 1975; BINKERD e KOLARI, 1975).

Segundo SEBRANECK (1979) o estudo da cura em produtos cárneos foi iniciado por Polenske e Lehman, os quais concluíram que a cor vermelha que aparecia na carne salgada era produzida pelo nitrito. Segundo esses autores, o nitrito era formado pela redução bacteriana do nitrato presente no sal. O nitrito, então, reagiria com os pigmentos da carne sobre a influência do calor. Mas foi Hoagland, que descreveu o primeiro esquema da cura da carne, o qual inclui a redução de nitrito a óxido nítrico (NO) e a modificação dos pigmentos durante o cozimento (CAST, 1978).

Estas informações levaram a extensivas pesquisas realizadas pela U.S. Department of Agriculture - USDA, por volta de 1920, autorizando já em 1925, o uso de nitrito como agente de cura em carnes. A regulamentação permitia o uso de

nitrato, de nitrito, ou a combinação de ambos com um nível máximo residual de 200 mg de nitrito/kg, calculado como nitrito de sódio, no produto final. Em 1975 um Grupo de Peritos em nitratos, nitritos e N-nitrosaminas, criado pelo USDA, recomendou que o nível de nitrito permitido em bacon fosse reduzido e que um nível máximo de ascorbato (ou eritorbato) fosse requerido como inibidor de N-nitrosaminas (GRAY e RANDALL, 1979). Essa recomendação foi adotada em 1978, quando a regulamentação para "bacon" foi alterada de maneira a permitir a adição de nitrito de sódio (120 mg/kg) ou nitrato de potássio (148 mg/kg) acompanhado da adição de ascorbato ou eritorbato de sódio (550 mg/kg). Ao mesmo tempo o uso de nitrato em "bacon" foi proibido, e exigida uma monitoração do nível de N-nitrosaminas no local de produção (IFT, 1987).

A regulamentação para produtos tipo "bacon" foi novamente alterada pelo USDA, em 1986 para dar aos produtores três alternativas do uso desses sais. São elas: 1) utilizar a regulamentação de 1978; 2) a adição de 100 mg/kg de nitrito de sódio com a demonstração de um adequado controle de qualidade; 3) a adição de 40 a 80 mg/kg de nitrito de sódio em combinação com o meio de cultura de ácido láctico, sistema este denominado "Wiscosin Process". Por orientação do USDA, o nitrato é somente utilizado em certos produtos fermentados ou de cura longa (IFT, 1987).

No Brasil, em carnes curadas, a adição de nitrato de potássio ou de sódio, associados ou não a nitrito de sódio ou de potássio, é permitida pela legislação, com uma tolerância

de 500 mg/kg, sendo que no produto a ser consumido não poderá remanescer mais de 200 mg/kg de nitrito, expresso em nitrito de sódio (BRASIL, 1976). A nova legislação estabelece que esse valor deva ser expresso em íon nitrito (BRASIL, 1988).

Na Tabela I estão apresentados níveis de nitrato e nitrito permitidos em produtos cárneos pela legislação de alguns países.

1.2. Ocorrência em Alimentos:

A presença de nitrato e nitrito tem sido observada em vegetais como espinafre, alface e beterraba e em produtos cárneos, nos quais o nitrito é usado como aditivo intencional.

Quanto aos vegetais, a possibilidade desses compostos estarem presentes em concentrações elevadas se deve ao acúmulo de compostos nitrogenados no solo, do qual a planta absorve nitrato como fonte de nitrogênio para o seu crescimento (ASHTON, 1970)

KEENEY (1970) resumiu os fatores que afetam o conteúdo de nitrato na planta. Segundo o autor, aqueles relacionados com a planta são a espécie, variedade, parte da planta e estágio de maturação. Os fatores relacionados com o ambiente incluem temperatura, luminosidade, deficiência em certos nutrientes como P, K e Ca, e uso excessivo de nitrogênio no solo.

TABELA I. Níveis de nitrato e nitrito permitidos em produtos cárneos, segundo a legislação de diversos países.

Produto	Aditivo	Órgão ou País (Data)	Recomendação	Referência
"bacon"	Nitrato e nitrito	USDA (1978)	Adição de 120 mg/kg nitrito, eliminação de nitrato, adição de ascorbato (500 mg/kg)	IFT, 1987.
"bacon"	Tocoferol	USDA (1985)	Adição de 500 mg/kg de	IFT, 1987.
"bacon"	Nitrito de sódio	USDA (1986)	Adição de 100 mg/kg ou 40 mg/kg em algumas circunstâncias ^(a)	IFT, 1987.
linguiça fermentada	Nitrito	FRG (1980)	Adição de 125 mg/kg ^(b)	Lestner, 1981
linguiça fermentada cura longa	Nitrato de potássio	FRG (1980)	Adição de 300 mg/kg ^(c)	Lestner, 1981
Carne curada empacotada e esterilizada	Nitrato + nitrito de sódio	UK (1982)	150 mg/kg ^(d)	HAFF, 1987.
Produto de carne curada fermentada e ou acidificada	Nitrato + nitrito de sódio	UK (1982)	400 mg/kg ^(d)	HAFF, 1987.
"Bacon" e Presunto	Nitrato + nitrito de sódio	UK (1982)	500 mg/kg ^(e)	HAFF, 1987.
Carne curada e subproduto	Nitrito	CANADA (1975)	Adição de 200 mg/kg (nitrito de sódio), eliminação de nitrato ^(f)	Gray e Randall 1979.
"Bacon"	Nitrito de sódio ou de potássio	CANADA (1975)	Adição de 150 mg/kg	Gray e Randall 1979.
Carne Curada	Nitrato e nitrito	BRASIL (1976g) (1988h)	500 mg/kg (nitrato de sódio ou de potássio associado ou não a nitrito de sódio) ou 200 mg/kg de nitrito de sódio.	Brasil 1976 e 1988.

continua...

- (a) Adição de 100 mg/kg de NaNO_2 no produto, desde que exista na indústria um controle de qualidade durante o processamento ou 40 a 80 mg/kg de NaNO_2 em combinação com cultura de ácido láctico.
- (b) No produto a ser consumido, a concentração residual de nitrito + nitrito (expressos em nitrito de sódio), não deverá ser maior do que 100 mg/kg.
- (c) No produto a ser consumido, a concentração residual de nitrato + nitrito (expressos em nitrato de potássio), não deverá ser maior do que 100 mg/kg.
- (d) No produto a ser consumido, não poderá remanescer mais de 50 mg/kg de nitrito de sódio (expressos como NaNO_2).
- (e) No produto a ser consumido, não poderá remanescer mais do 200 mg/kg de nitrito de sódio.
- (f) A adição de 200 mg/kg de nitrato de sódio ou de potássio é unicamente permitida em produtos secos, semisecos ou de cura longa.
- (g) No produto a ser consumido, não poderá remanescer mais do que 200 mg/kg de nitrito (expressos como NaNO_2).
- (h) no produto a ser consumido, não poderá remanescer mais do que 200 mg/kg de nitrito (expressos como íon nitrito).

Estudos realizados para verificar o teor de nitrato em vegetais foram relatados por WALKER (1975). Segundo o autor, o espinafre apresentou níveis de 1000 a 3000 mg/kg de nitrato e o alface, também rico em nitrato, apresentou concentrações de até 6000 mg/kg. As frutas, segundo o autor, contém um menor teor de nitrato, geralmente em torno de 10 mg/kg, com algumas exceções, como banana, morango e tomate, nos quais a quantidade de nitrato varia de 25 a 140 mg/kg.

No Brasil, LARA e col. em 1980, determinaram o conteúdo de nitrato em alimentos infantis, sendo que os produtos que continham espinafre, cenoura ou beterraba apresentaram teores mais elevados de nitrato. Os mesmos autores verificaram, em amostras de espinafres plantados no Brasil, um teor de nitrato similar àqueles encontrados em outros países.

ARAÚJO (1988) determinou os teores de nitrato e nitrito em alimentos destinados à população infantil. A autora verificou que, em alimentos industrializados, o teor médio de nitrato era de 22,4 mg/kg para alimentos tipo sobremesa (a base de frutas) e de 50,5 mg/kg para alimentos do tipo salgado (a base de hortaliças, cereais e carnes), enquanto que aqueles não industrializados ou considerados caseiros, do tipo salgado, apresentaram um teor médio de 234,7 mg/kg de nitrato. O teor de nitrito para os alimentos avaliados, tanto industrializados quanto os caseiros, variou entre quantidades não detectáveis à 1,6 mg/kg.

Segundo PHILLIPS (1971) o espinafre fresco normalmente contém pouco nitrito, mas quando estocado à temperatura ambiente, mostra uma perda de nitrato e um aumento de nitrito. A refrigeração, segundo o autor, é capaz de retardar a produção de nitrito, sem contudo, preveni-la.

LARA e col. (1978) determinaram a soma do conteúdo de nitrato e nitrito em amostras de salsicha e de presunto adquiridas nos supermercados da cidade de São Paulo. Os autores encontraram valores que variavam entre 13 e 291 mg/kg de nitrito.

GRANER e col. (1983) encontraram em cinco tipos de salames analisados, teores de 4,0 a 20,0 mg de NO_2 /kg.

OLIVEIRA e col. (1982) verificaram um valor mínimo de 0,15 e máximo de 1,0 mg de NO_2 /kg em charque e uma média de 7,50 mg/kg em "Jerked Beef", ambos fabricados no Brasil.

ASHTON (1970) relatou que os vegetais concentram um baixo teor de nitrito, que pode variar entre quantidades não detectáveis até 99 mg/kg, enquanto que carnes curadas como presunto, carne enlatada e "bacon" embalado à vácuo, apresentaram valores de 7 a 480 mg/kg. O autor também relatou que a presença de nitrato em carnes processadas variava entre quantidades não detectáveis à 1706 mg/kg.

1.3. Exposição Humana ao Nitrato e Nitrito:

Poucas tentativas tem sido feitas para verificar a ingestão diária de nitrato e nitrito pelo homem. A falta de estudos metabólicos adequados tem dificultado a obtenção de dados sobre sua absorção.

Para o Comitê da Academia Nacional de Ciência/Conselho Nacional de Investigações, dos Estados Unidos a estimativa de exposição a nitrato para diferentes grupos da população varia de 75 mg a 268 mg por dia.

Algumas avaliações foram feitas para verificar a ingestão de nitrato e nitrito através da alimentação, tomando por base vegetais e carne curada. Entre as pesquisas realizadas podemos citar:

- PHILLIPS (1968) estimou que 313 mg de nitrato são absorvidos após o consumo de uma típica refeição canadense (carne, salada, batatas, vegetais verdes, cenoura e uma sobremesa).
- FASSET (1973) relatou que, nos Estados Unidos, 300 mg de nitrato e 20 mg de nitrito são fornecidos por uma simples porção de carne curada e espinafre (100g).
- ASHTON (1970) calculou que, na Inglaterra, em torno de 405 mg de nitrato são absorvidos de produtos cárneos, vegetais e água, semanalmente.
- WHITE (1975) estimou que nos Estados Unidos, o consumo médio diário de nitrato é de 106,0 mg, 81,2% dos quais provém de

vegetais e 14,7% de carnes curadas. Segundo o autor, 2/3 do nitrito que é ingerido tem origem na saliva, e poucos menos de 1/3 provém de carnes curadas. Outras fontes não são significativas (Tabela II).

A ingestão média diária de nitrato no Reino Unido, é estimada em 61 mg/pessoa (Tabela III), dos quais 75% aproximadamente, provém dos vegetais. Com relação ao nitrito, além das carnes curadas, a água também contribui significativamente na estimativa da ingestão deste íon/pessoa (MAFF, 1987).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1978), a ingestão diária aceitável (IDA) para nitrato e para o nitrito é de 5 mg/kg e 0,4 mg/kg de peso corpóreo, respectivamente. Portanto, para um adulto de 60 kg, a ingestão de nitrato não deve ultrapassar de 300 mg/dia e, no caso do nitrito 24 mg/dia.

TANNENBAUM (1984) relatou que para se estimar a absorção de nitrito deve-se considerar a exposição e o mecanismo de distribuição, os quais são fatores importantes no esclarecimento da formação de nitrito a partir de nitrato (Figura 1). O autor afirma também que na saliva ocorre a conversão de nitrato a nitrito pela ação de bactérias normalmente presentes na cavidade bucal, sendo este fato relacionado com o conteúdo de nitrato ingerido.

TABELA II. Ingestão média diária de nitrato e nitrito estimada para os habitantes dos Estados Unidos.

Origem	Nitrato		Nitrito	
	mg	%	mg	%
Vegetais	86,1	81,2	0,20	1,6
Frutas, Suco	1,4	1,3	0,00	0,0
Leite e derivados	0,2	0,2	0,00	0,0
Pão	2,0	1,9	0,02	0,2
Água	0,7	0,7	0,00	0,0
Carnes Curadas	15,6	14,7	3,92	30,7
Saliva	30,0*		8,62	67,5
Total	106,0	100	12,76	100

*não incluído no total (nitrato).

Fonte: White, 1975.

TABELA III. Ingestão diária total estimada (mg/pessoa/dia) de nitrato (NO_3) no Reino Unido.

Grupo de Alimentos	Conc. Média de NO_3 (mg/kg)	Consumo do Alimento (kg/pessoa/dia)	Ingestão NO_3 mg/pessoa/dia
Cereais	8,8	0,23	2,0
Carnes	3,6	0,15	0,5
Peixes	55	0,02	1,1
Óleos e Gorduras	5,6	0,08	0,5
Frutas e Sucos	13,3	0,17	2,3
Vegetais (Raízes)	118	0,18	21,2
Outros Vegetais	219	0,11	24,1
Água	14	0,12	8,25
Leite	1,5	0,40	0,6
Total			61

Fonte: MAFF, 1987.

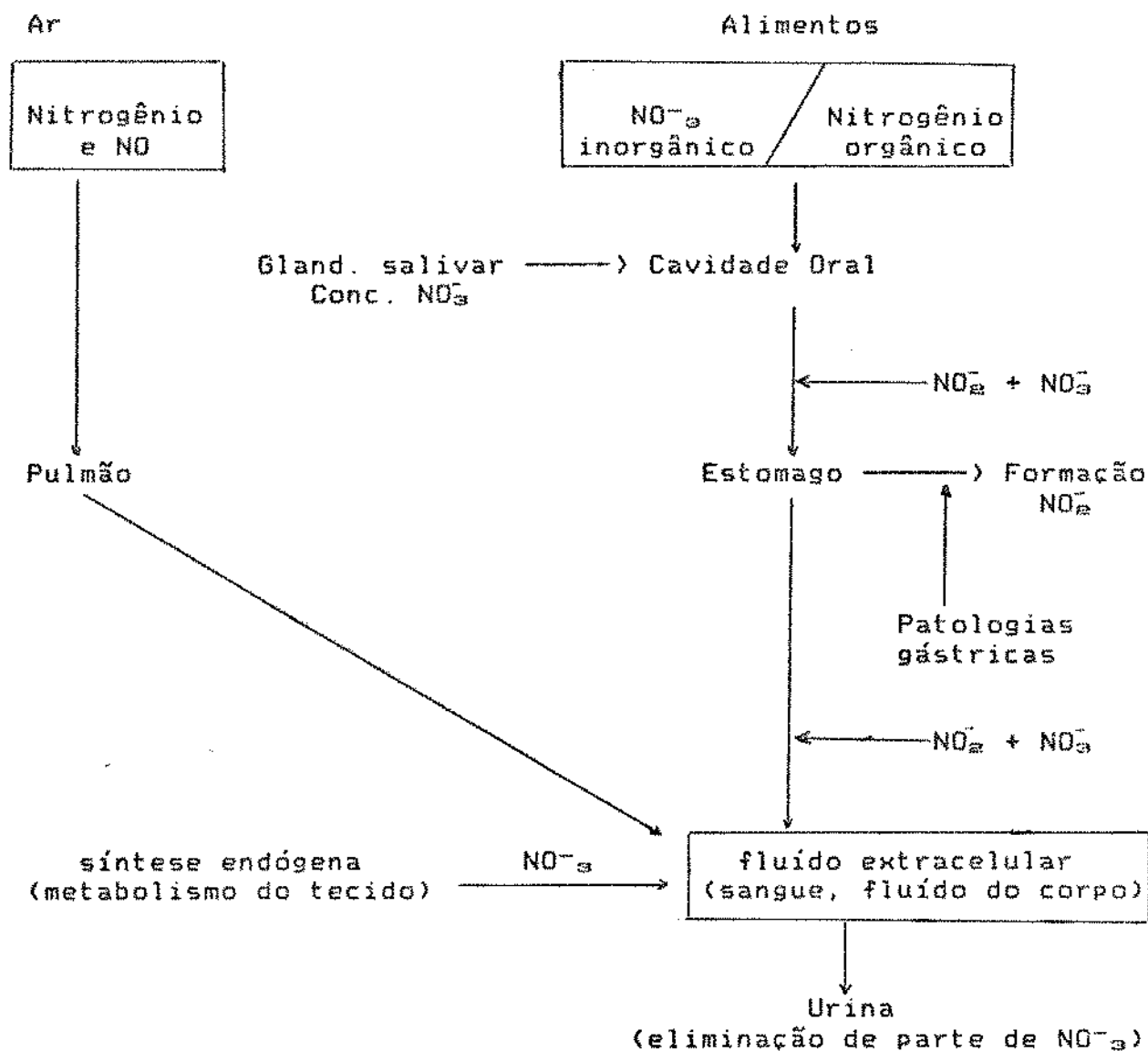


FIGURA 1: Distribuição do nitrato no organismo humano.

Fonte: TANNENBAUM, 1984.

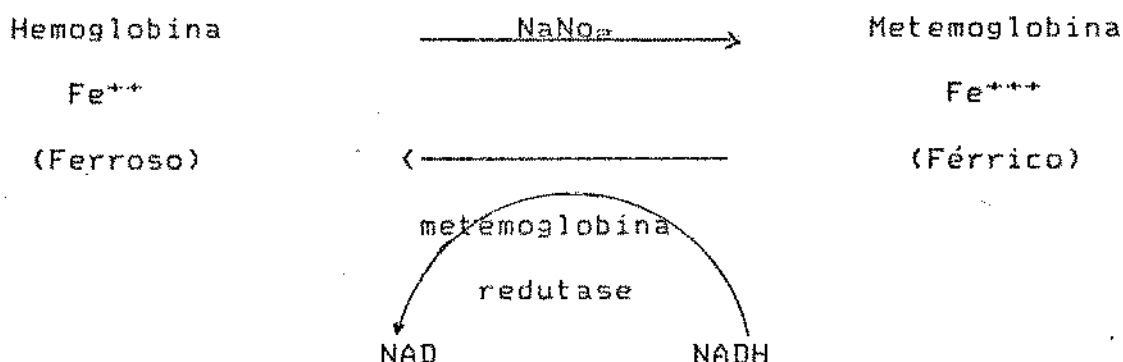
1.4. Efeitos Tóxicos do Nitrato e do Nitrito:

O mais crítico efeito tóxico de nitrato e do nitrito é a indução de metemoglobinemia causada por oxidação da hemoglobina, permitindo que íons ferrosos passem ao estado férrico e impedindo dessa maneira, o transporte de oxigênio (PHILLIPS, 1971; SWANN, 1975). Segundo FASSET (1973) é provável, que a primeira avaliação do efeito tóxico devida a presença de nitrato em alimentos tenha ocorrido em 1895, quando Mayo descreveu três episódios de intoxicação fatal em gado. Os sinais clínicos e circunstâncias eram similares, tendo os animais apresentado tremores, diurese, cianose e colapso. Verificou-se que todos esses animais tinham sido alimentados com ração a base de milho, que quando analisada, apresentou uma grande quantidade de nitrato de potássio. O alto teor desse composto foi relacionado com o adubo acumulado no solo utilizado no plantio do milho. Embora a metemoglobinemia não tenha sido claramente diagnosticada, particular atenção foi dada a cor sanguínea escura, bem como aos teores de nitrato e nitrito encontrados no sangue, na bile e em outros tecidos após análise laboratorial.

Águas de poços contaminadas com nitrato têm causado problemas, tanto para animais como para o homem, especialmente, para as crianças. As crianças, por natureza, são mais sensíveis ao nitrato e consomem relativamente mais água do que os adultos, visto ser seu peso corpóreo menor.

Além disso, o pH do estômago de crianças é mais favorável ao desenvolvimento de bactérias que agem reduzindo o nitrato a nitrito, o que não ocorre normalmente no adulto (SWANN, 1975; MILLER, 1980).

WILTON e col. (1971) relataram que nos E.U.A. e Europa, no período de 1945 a 1971, 2.000 casos de metemoglobinemia infantil, foram associados ao consumo de água contendo alto teores de nitrato. Normalmente, o nível de metemoglobina em mamíferos é mantido em torno de 1 a 2% do total de hemoglobina, devido à enzima metemoglobina redutase, presente nas células vermelhas (SWANN, 1975).



Segundo o autor, um pequeno teor de metemoglobina no sangue (menos de 10%) não chega a produzir sintomas tóxicos, enquanto que níveis mais elevados (até 50%) após administração aguda de nitritos, produzem sintomas tóxicos, embora não ocorram mortes. Quando a administração de nitrito cessa, a metemoglobina sofre a ação da metemoglobina redutase, sendo rapidamente reduzida para hemoglobina totalmente ativa. Em casos graves, ou seja, acima de 50% de metemoglobina, ocorrem mortes. Os sinais e sintomas provocados pela administração de

doses baixas de nitrito são rubor da face e extremidades, desconforto gastrointestinal e cefaléias. Em caso de doses elevadas, ocorre cianose, náuseas, vômitos, dor abdominal e colapso.

Segundo TANNENBAUM (1984) a saliva contém uma mistura de nitrato e nitrito que passa através do esôfago para o estômago. No estômago, sob condições normais, o nitrito reage com os componentes dos alimentos e do suco gástrico, sendo quase que totalmente eliminado. Entretanto, em condições de forte gastrite, quantidades maiores de nitrito são formadas pelas bactérias presentes no estômago, e conseqüentemente a quantidade de nitrito absorvida poderá ser suficiente para produzir metemoglobina.

SWANN (1975) relacionou alguns casos de metemoglobinemia com a ingestão de nitrito. O autor menciona vários casos de intoxicações atingindo crianças que consumiram espinafre e sopa de cenoura com alto teor de nitrato, além de outras afetadas pelo consumo de mortadela e peixe contendo excesso de nitrito.

FASSET (1973) relatou que a ingestão acidental de 8g ou mais de NaNO_2 ou KNO_2 é fatal para adultos. Os sintomas aparecem como forte dor abdominal, cor escura do sangue e da urina, fraqueza e prostração súbita. Severa gastroenterite foi observada na autópsia desses pacientes.

Para o nitrito, a dose letal para seres humanos não é conhecida, mas estima-se que aproximadamente 1 g é suficiente para matar um homem adulto (FASSET, 1973).

Outro problema de toxicidade apresentado pelo nitrito é a possibilidade de reagir com aminas secundárias alifáticas e/ou aromáticas levando assim à formação de compostos carcinogênicos N-nitrosos.

1.5. Reações do Nitrato e Nitrito no Processo de Cura:

A principal reação do nitrito nas carnes é com a mioglobina produzindo nitrosomioglobina (CASSENS e col., 1979). Oximioglobina (O-Mb) de cor vermelho brilhante e nitrosomioglobina (NO-Mb) de cor vermelho escuro, são exemplos de complexos ferrosos. O ferro do grupo heme, quando no estado ferroso, mantém a carne na cor vermelha, enquanto no estado férrico, passa à cor marron (HUNT, 1981 e MORENO, 1979).

Quando o nitrito, composto fortemente oxidante, é adicionado no processo de cura, inicialmente produz metamioglobina (MetMb). Entretanto, compostos redutores endógenos e/ou adicionados, como ascorbato de sódio, reduzem esta forma oxidada à mioglobina, a qual pode ser estabilizado pelo íon nitrosila para formar nitrosomioglobina, que apresenta cor vermelha, e que com o aquecimento passa a nitrosoemocromo. Durante esse processo a globina é desnaturada produzindo a cor rosada estável das carnes curadas (FORREST e col., 1975). O esquema destas reações é apresentado na Fig. 2.

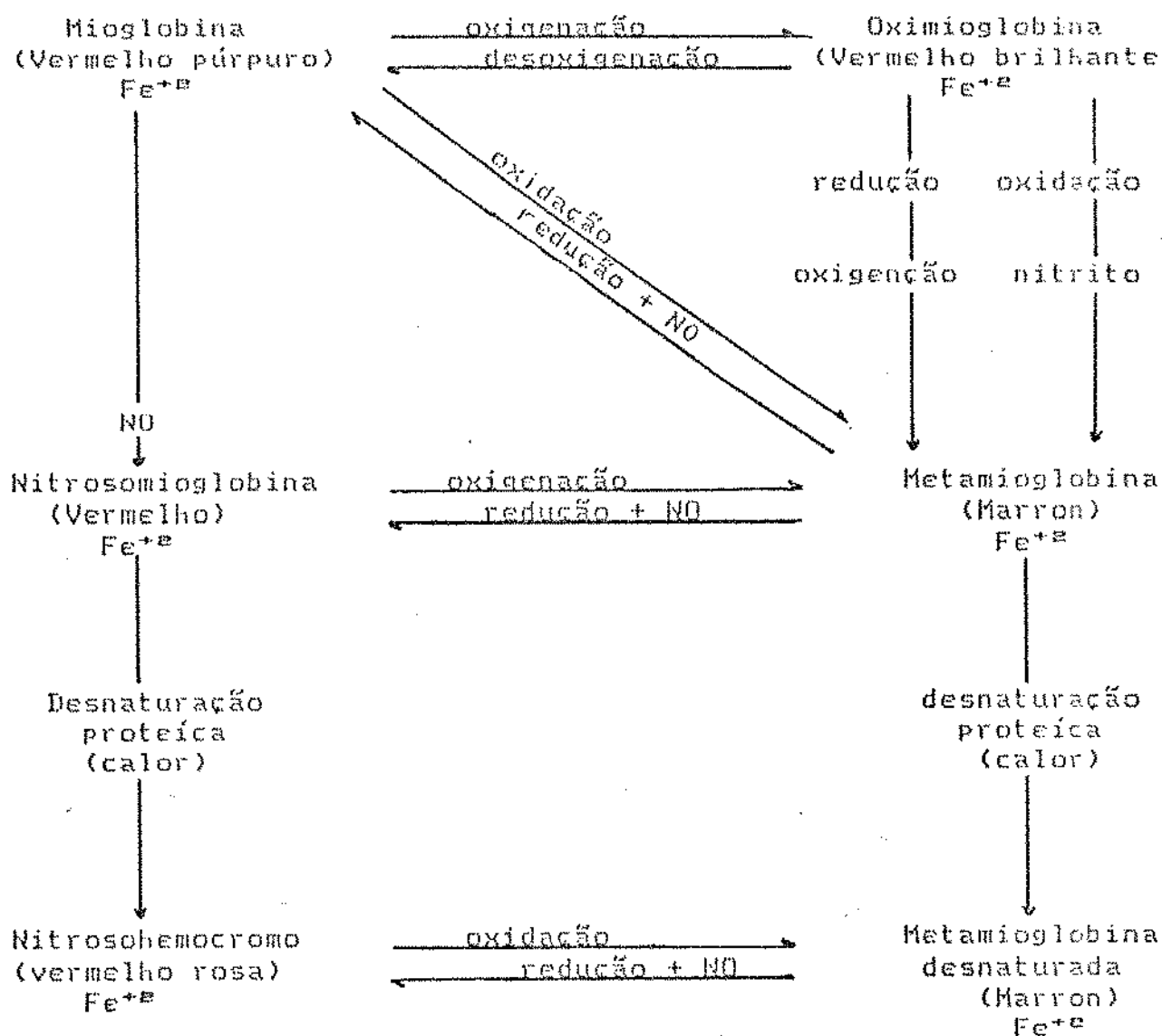


FIGURA 2: Fluxograma das reações da mioglobina durante a cura da carne.

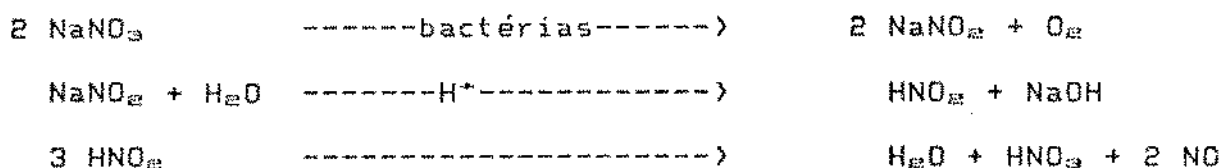
Fonte: FORREST e col., 1975.

Segundo LEE e CASSENS (1976) a mioglobina quando aquecida libera a porção globina, permitindo desta forma que as duas posições coordenadas da molécula fiquem livres para serem ocupadas por óxido nítrico na presença de nitrito, sugerindo que este fato contribua para a mudança do "flavor" em carne curada aquecida.

Segundo vários autores paralelamente à reação de nitrito com mioglobina, ocorrem outras reações causando uma redução do teor deste sal em produtos curados, dentre as quais podemos destacar: 1) conversão à nitrato; 2) volatilização como nitrogênio; 3) interação com grupos sulfidrilas; 4) reação com lipídeos; 5) reação com proteínas (FOX, 1966; FOX e NICHOLAS, 1974; KUBBERDD e col., 1974; CASSENS e col., 1979; GRAY e RANDALL, 1979; Mac DONALD e col., 1980). Esta última é considerada por WOOLFORD e col. (1976) responsável pela principal perda de nitrito durante a cura da carne.

Diversos estudos indicam que agentes redutores, como ascorbato e eritorbato de sódio, causam redução do teor de nitrito adicionado em carnes curadas (GRAY e DUGAN, 1975(b); Mac DOUGALL e col., 1975; WOOLFORD e CASSENS, 1977).

Em alguns processos de cura adiciona-se nitrato, sendo que este composto requer uma redução química antes de reagir com o pigmento da carne (HUNT, 1981). As reações de interconversão entre nitrato e nitrito estão apresentadas a seguir:



2. N-NITROSAMINAS:

2.1. Formação de N-nitrosaminas:

Em geral, compostos N-nitrosos são aqueles que possuem o grupo funcional $-N=O$ e podem ser formados a partir de aminas secundárias, aminas terciárias, uréia, amidas e outros compostos contendo nitrogênio. Dos vários compostos N-nitrosos, as N-nitrosaminas tem sido objeto de um maior número de estudos.

A formação de N-nitrosaminas em alimentos ocorre através de uma reação química envolvendo um agente nitrosante (ex. nitrito) e uma amina nitrosável, reação esta que, depende de fatores tais como: concentração do agente nitrosante, concentração e tipo da substância nitrosável, presença de catalisadores e de inibidores e, parâmetros como pH, tempo e temperatura de reação (FOREMAN e GOODHEAD, 1975; HILDRUM e SCANLAN, 1977; SCANLAN, 1983). MIRVISH (1970) estudou a cinética de nitrosação e mostrou que a velocidade de formação de N-nitrosamina é diretamente proporcional ao quadrado da concentração de nitrito. Portanto, segundo este autor, a concentração de nitrito residual é um dos principais fatores que controlam a formação de N-nitrosaminas. GRAY (1977),

ROBACH e col. (1980) mostraram que um aumento do nível de nitrito em "bacon" ocasiona um incremento na velocidade de formação de nitrosopirrolidina (NPIR).

Há evidências de que nitrato pode ser reduzido a nitrito na cavidade bucal e no trato gastrintestinal, possibilitando a formação "in vivo" de compostos N-nitrosos (WAGNER e TANNENBAUM, 1985). OHSHIMA e BARTSCH (1981) após administração de nitrato e de prolina a seres humanos, demonstraram que nitrosoprolina era excretado na urina desses indivíduos. Quando os mesmos consumiam ácido ascórbico (vitamina C) e α -tocoferol (vitamina E), a formação de nitrosoprolina era inibida.

As aminas secundárias, tais como: dimetilamina, dietilamina, prolina, di-n-propilamina, piridina, morfolina, espermidina e piperidina, são precursoras da formação de N-nitrosaminas e estão normalmente presentes nos alimentos (FAN e TANNENBAUM, 1973; PATTERSON e MOTTRAM, 1974; SINGER e LIJINSKY, 1976; GRAY, 1976; MAGA, 1978). A dimetilamina também pode ser formada por desmetilação de trimetilamina (TMA), uma amina terciária que também pode ser precursora de dimetilnitrosamina (PATTERSON e MOTTRAM, 1974).

Segundo HUXEL e col. (1974) possivelmente, a prolina, amino ácido presente nos alimentos e abundante especialmente no tecido conectivo, ao ser ingerida pode ser convertida em nitrosoprolina por ação do nitrito presente no estômago, e então descarboxilada, possivelmente por bactérias do intestino delgado, resultando em N-nitrosopirrolidina

(NPIR), composto este, altamente carcinogênico. BILLS e col. (1973) identificaram, além da prolina, outras aminas tais como pirrolidina, espermidina e putrescina, como precursoras da NPIR.

O mecanismo de formação de N-nitrosopirrolidina em bacon, a partir de prolina, está apresentado na Figura 3. Esse mecanismo, segundo vários autores (HUXEL e col., 1974; PENSABENE e col., 1974 e GRAY e DUGAN, 1975a), depende da temperatura de cozimento. NAKAMURA e col. (1976) demonstraram que na faixa de temperatura de 100° a 150°C, a quantidade de NPIR formada a partir de prolina livre, via pirrolidina, foi quase similar àquela formada via N-nitrosoprolina (NPRO). Entretanto, a temperatura aproximada de 175°C, a produção de NPIR via pirrolidina foi maior do que a formada via NPRO.

2.2. Ocorrência de N-nitrosaminas:

É grande o número de revisões que têm sido publicadas a respeito dos níveis de N-nitrosaminas voláteis presentes em carnes curadas, peixes, queijos, leite em pó, malte, cerveja, e alimentos destinados à população infantil, assim como em produtos não alimentares incluindo cosméticos, borracha e cigarros (SCANLAN, 1975; SEN e SEAMAN, 1981).

Na tabela IV está apresentado um resumo sobre o conteúdo de N-nitrosaminas em alguns tipos de alimentos.

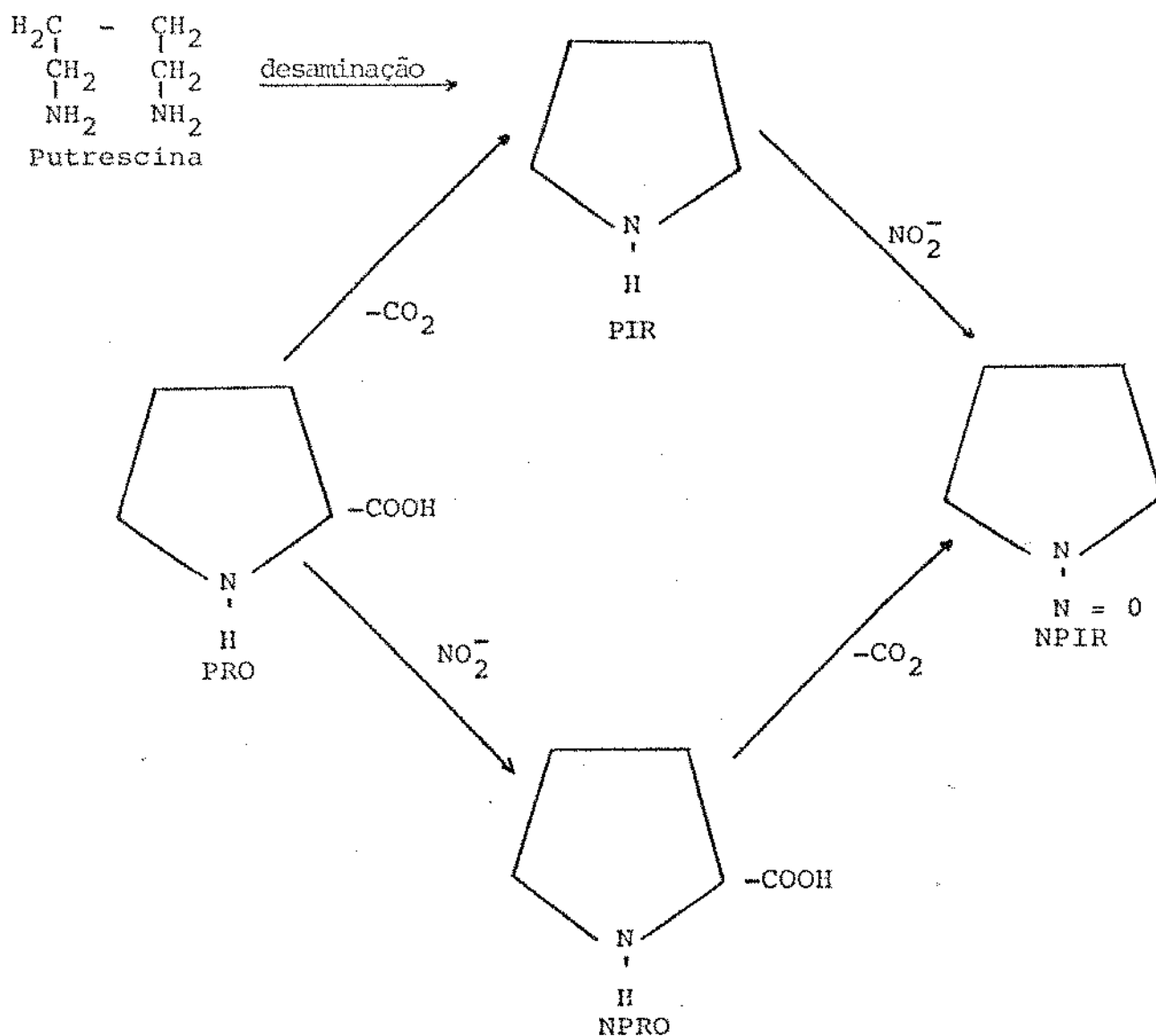


FIGURA 3: Mecanismo da possível formação de N-nitrosopirrolidina em bacon.

PRO = prolina; PIR = pirrolidina; N-NPRO = nitroso-prolina; NPIR = nitrosopirrolidina.

Fonte: HUXEL e col., 1974.

TABELA IV. Conteúdo de N-nitrosaminas em alimentos.

Produto	N-nitrosamina ^(a)	Concentração ^(b) (µg/kg)	Referência
Peixe cru, defumado e curado	NDMA	(4-26)	Fazio e col., 1971
Peixe	NDMA	(120-450)	Sen, 1972
"Bacon" frito	NPIR	63,4 (10-108)	Fazio e col., 1973
Gordura	NPIR	100 (45-207)	Fazio e col., 1973
"Bacon" frito	NPIR	(15-75)	Sen e col., 1974
"Bacon" processado (0-200 ppm NO ₂) 0-200 ppm NO ₂ .	NPIR	(2-20)	Sen e col., 1974
	NDMA	(2-5)	Sen e col., 1974
"Bacon" frito	NPIR	(7-139)	Havery e col., 1976
"Bacon" frito	NDMA	0,8 (0,3 - 2,5)	Stephany e col., 1976
	NPIR	15,6 (3,3 - 55,0)	
	NPIP	3,4 (0,8 - 8,2)	
Linguiça	NDMA	0,3 (0 - 0,7)	Stephany e col., 1976
	NPIR	0,9 (0 - 4,3)	
	NPIP	0,2 (0 - 0,4)	
"Bacon" frito	NPIR	28,9 (4,5 - 125,5)	Havery e col., 1978
"Bacon" frito	NDMA	3,4 (tr - 5,4)	Sen e col., 1979
	NDEA	1,0 (tr - 6,0)	
	NPIR	9,3 (1,7 - 21,8)	
"Bacon" frito	NDMA	(2 - 6)	Pensabene e col., 1982
"Bacon" frito	NPIR	0,1	Spiegelhalder e col. 1980
Linguiça frita	NDMA	(nd - tr)	IFT, 1980
	NPIR	(nd - 9)	
	NNORF	(nd - 6)	
"Bacon" Linguiça	NDMA	(9,9 - 10,1)	Pensabene e col., 1982 Bogovski e col., 1984
	NDMA	(1,0 - 10)	
	NPIR	nd	

- (a) NDMA - N-nitrosodimetilamina
 NPIR - N-nitrosopirrolidina
 NDEA - N-nitrosodietilamina
 NPIP - N-nitrosopiperidina
 NNORF - N-nitrosomorfolina

(b) Média, e entre parênteses, limites extremos.

É importante destacar que, devido a falta de metodologia analítica adequada para a dosagem de N-nitrosaminas não voláteis, pouco se conhece sobre a presença de tais compostos nos alimentos, embora alguns avanços analíticos tenham sido feitos durante os últimos anos (SEN e KUBACHI, 1987). Este fato faz com que se torne difícil avaliar o conteúdo total de N-nitrosaminas a que a população pode estar exposta.

2.3. Efeitos tóxicos das N-nitrosaminas:

Os efeitos tóxicos de compostos N-nitrosos têm sido estudados por diversos pesquisadores (ENDER e col., 1964; MAGEE e BARNES, 1967; HAVERY e FAZIO, 1975; SWANN, 1975; SCANLAN, 1975) que comprovaram a ação carcinogênica dessas substâncias em diversas espécies de animais de laboratórios testados.

O interesse pelos compostos N-nitrosos iniciou-se quando MAGEE e BARNES, em 1956, descreveram a indução de tumores em fígado de rato após administração de N-nitrosodimetilamina (NDMA) adicionada à ração desses animais. Este foi o primeiro alerta de que as N-nitrosaminas eram compostos carcinogênicos. Desde então, muitos pesquisadores têm estudado os efeitos biológicos de compostos N-nitrosos, sendo que a maioria dessas substâncias têm apresentado propriedade carcinogênica. Segundo os autores a suspeita de que N-nitrosaminas podem se formar em alimentos, resultou de

estudos feitos na Noruega em 1960, quando apareceram tumores em fígado de ruminantes após ingestão de ração à base de farinha de peixe, conservada com alto teor de nitrito de sódio. Quatro anos após, em 1964, ENDER e col. conseguiram isolar e identificar N-nitrosodimetilamina na farinha contaminada e sugeriram que dimetilamina presente naturalmente na ração reagiram com NO_2 para formar N-nitrosodimetilamina.

Nas 40 espécies diferentes de animais testados, inclusive o macaco, tem-se verificado os efeitos carcinogênicos das N-nitrosaminas. Os compostos N-nitrosos têm sido capazes de induzir tumores nos diferentes órgãos desses animais, incluindo o fígado, pulmão, esôfago, rins, estômago, intestino delgado, cérebro e sistema nervoso. O órgão alvo depende da estrutura química do composto N-nitroso, da dose, da via de administração e da espécie animal. Segundo SWANN (1975) o tropismo destes compostos por determinados órgãos se deve à diferença na capacidade dos vários tecidos de biotransformar o composto a uma forma mais ativa. Alguns compostos são facilmente desalquilados e se decompõem para dar intermediários ativos após a exposição. Além da propriedade carcinogênica desses compostos, foram verificadas também a propriedade teratogênica e mutagênica (SCANLAN, 1975).

É muito difícil poder comprovar, epidemiologicamente se as N-nitrosaminas quando ingeridas em pequenas quantidades, (na ordem de $\mu\text{g/kg}$) são responsáveis pela indução de câncer no

homem. Entretanto a clara relação entre a exposição às N-nitrosaminas e o aparecimento de tumores em vários órgãos de animais de laboratório, sugere uma atenção particular no que diz respeito à etiologia do câncer humano.

2.4. Aspectos analíticos das N-nitrosaminas em alimentos:

Para fins analíticos, as N-nitrosaminas são divididas em voláteis e não voláteis.

São considerados N-nitrosaminas não voláteis todo composto N-nitroso não destilável dentro de um sistema aquoso. Tais compostos incluem dialquilnitrosaminas de cadeia longa, N-nitrosopeptídeos e N-nitrosoderivados de bases orgânicas. Amplas diferenças nas propriedades químicas físicas e fisicoquímicas desses compostos dificultam o estabelecimento de métodos analíticos de aplicação geral. Todavia, três metodologias analíticas têm sido adotadas, embora apresentem algumas limitações (MAFF, 1987). São elas:

- a) formação de derivados voláteis (ex.: metilester de resíduos de ácido carboxílicos presentes nas N-nitrosaminas) e separação, identificação e quantificação por cromatografia gasosa (CG) utilizando o detector TEA ("Thermal Energy Analyzer").
- b) separação do composto N-nitroso não volátil utilizando-se cromatografia líquido de alta resolução (HPLC) e detecção utilizando-se detector TEA.

c) determinação da quantidade total do composto N-nitroso pela clivagem química da ligação N-NO e detecção por quimioluminescência do NO liberado. As limitações das metodologias analíticas são o motivo pelo qual as N-nitrosaminas não voláteis têm sido pouco estudadas em alimentos.

As N-nitrosaminas voláteis são compostos de baixo peso molecular que apresentam elevada pressão de vapor e podem ser 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 N-nitrosaminas tendem a se degradar (WOLFF e WASSERMAN, 1972). A destilação e a pressão atmosférica e a pressão reduzida tem sido largamente empregadas para a determinação das N-nitrosaminas em alimentos (SCANLAN, 1975). Ainda, a destilação rápida à pressão reduzida a partir de um sistema contendo óleo mineral tem sido também utilizada (FINE e col., 1975; HAVERY e col., 1978a) sendo esta a que permite maior recuperação.

Na Tabela V, estão apresentados os procedimentos analíticos para a determinação de N-nitrosaminas voláteis presentes em alimentos, os quais têm sido submetidos a estudos colaborativos (SCANLAN e REYES, 1985).

A cromatografia gasosa (CG) tem sido a técnica mais amplamente usada na determinação das N-nitrosaminas voláteis. Para aumentar a especificidade da resposta do detector, utilizam-se aqueles mais específicos do que o de ionização de chama (DIC). Os detectores seletivos para nitrogênio mais usados têm sido: Detector Termoiônico, Detector Eletroquímico e Detector TEA ("Thermal Energy Analyzer"). A teoria opera-

TABELA V. Técnicas de separação para N-nitrosaminas voláteis.
Investigação colaborativa.

Técnica	Amostra	Organização que conduziu o estudo
Destilação à vácuo (óleo mineral)	"Bacon" Frito	AOAC*
	Cevada	ASBC**
Destilação atmosférica (Hidróxido de bário)	Cerveja	ASBC
Destilação atmosférica	Cerveja	AOAC
Coluna de celite	Cerveja	ASBC
	Cerveja	AOAC
	"Bacon" Frito	AOAC
	Leite desengordu- rado e desidratado	AOAC

Fonte: SCANLAN & REYES (1985).

*AOAC = Association of Official Analytical Chemistry.

**ASBC = American Society of Brewing Chemists.

cional e as características de respostas destes detectores foram revisadas por HALL (1978). Dos detectores referidos, o TEA é o mais específico uma vez que os outros detectores são mais seletivos para compostos contendo nitrogênio na molécula do que para compostos contendo o grupo N-nitroso. O detector TEA baseia-se no rompimento seletivo da ligação N-N presente no grupo N-nitroso. Este rompimento se dá num pirrolizador instantâneo de W-Mb-Cr, onde o composto N-nitroso é decomposto em um radical nitrosila (NO) e em um radical orgânico. Os radicais nitrosilas são transportados para uma câmara de reação, onde por ação do ozônio produzido por uma descarga elétrica de alta voltagem, forma-se dióxido de nitrogênio excitado, NO_2^* . As moléculas excitadas, ao voltarem a seu estado fundamental, emitem radiações características na região do infravermelho próximo. A intensidade da emissão é detectada por um tubo fotomultiplicador, e a resposta é proporcional à concentração de radicais nitrosila ou do composto nitrosado presente na amostra (FINE e col., 1975).

Apesar do TEA ser um detector altamente seletivo para compostos N-nitrosos, também está sujeito a interferentes, sendo portanto, necessário a confirmação dos resultados por outra técnica analítica. A espectrometria de massa (EM) é, segundo o Sub-Comitê da Agência Internacional para Investigação do Câncer (IARC), o principal método para a confirmação da identidade das N-nitrosaminas (IARC, 1972).

MATERIAL E MÉTODOS:

III. MATERIAL:

1. Amostras:

As amostras utilizadas para a análise de nitrato e nitrito foram constituídas de diferentes tipos de linguças (toscana, calabresa, lombo, mista, paio e outras) escolhidas ao acaso e adquiridas em diferentes locais na região de Campinas, São Paulo, ou seja, supermercados, feiras livres, mercadões e outros. As amostras foram coletadas no período de abril de 1985 a setembro de 1986.

As linguças comerciais, em número total de 52 amostras, foram classificadas em:

A- linguças provenientes de fabricantes conhecidos (número total de amostras = 36).

B- linguças provenientes de fabricantes não identificados (número total de amostras = 16).

Foram também estudadas linguças processadas no laboratório de carnes da Faculdade de Engenharia de Alimentos, da UNICAMP, cuja matéria prima foi constituída de carne suína, toucinho, condimentos, nitrito de sódio, sal de cura comercial e ascorbato de sódio.

Estas amostras foram constituídas de dois tipos de linguças, a saber: frescal e cozida.

Para ambos os tipos de linguças foram preparadas quatro amostras, cada uma das quais foi processada com uma formulação diferente (ver item IV. 3.1.).

2. Reagentes:

Em todas as determinações químicas foram utilizados reagentes Merck, Ecibra, Quimibras Industria Química S.A., Burdick e Jackson Co., Mallinckrodt, todos eles com grau de pureza "para análise".

O cádmio esponjoso foi obtido a partir de uma solução de sulfato de cádmio a 20%, e placas de zinco metálico.

O sal de cura utilizado no processamento das linguças, era um preparado comercial de nitrato, nitrito e cloreto de sódio.

O adsorvente utilizado na coluna para extração das N-nitrosaminas, foi celite 545 sem lavagem ácida, obtido da Fischer Scientific Co., Fairlawn, N.J.

Para a análise das N-nitrosaminas em cromatografia gasosa, foram utilizados como fase líquida estacionária, Carbowax 20 M e como suporte Cromosorb W 60-80 mesh com lavagem ácida.

3. Equipamentos:

- Moinho de Carne Brasil-Eberle mini kit cod. 2001.000.4.
- Liquidificador Wallita, 8 velocidades.
- Estufa Fanem, mod. 315 SE.
- Espectrofotômetro Micronal B-295 II.
- Centrifugador Fanem, mod. 204-NR.
- Moedor Filizola (capacidade 200 kg/h).
- Misturadeira Keebler Engineering Co. (capacidade 40 L).
- Embutideira Hermann S.A. (capacidade 20 L).
- Seladeira Selovac CV60.
- Estufa Koch (capacidade 60 kg).
- Refrigerador
- Balança analítica Sauter, modelo 414.
- Peagômetro 125/2.
- Aquecedor com agitação.
- Cromatógrafo Varian, mod. 1400, acoplado a um detector TEA ("Thermo Energy Analyzer"), mod. 502 da Thermo Electron Corporation, Waltham, MA., USA.
- Integrador Hewlett Packard, mod. HP 3390 A.
- Espectrômetro de Massa Finnigan - MAT, mod. 1015 C.

IV. MÉTODOS:

1. Determinação de umidade e gordura nas linguças:

O método para determinação de umidade foi baseado no procedimento Nº 24.002 descrito na AOAC (1984) e a extração e a dosagem do conteúdo de gorduras totais foram baseados nos procedimentos descritos por BLIGH e DYER (1959) com as modificações introduzidas por CONTRERAS e col. (1982).

2. Dosagens de Nitrato e Nitrito:

A metodologia utilizada para dosagem de nitrato e nitrito foi baseada naquela descrita por LARA e col. (1978), com a introdução do procedimento nº 7.044, descrito na A.O.A.C. (1980).

3. Concentração do nitrato e do nitrito nas linguças, durante as etapas de processamento e armazenamento:

Foram processadas no Laboratório de Carnes da Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP, linguças contendo quantidades conhecidas de nitrito de sódio.

Verificou-se o teor residual dessa substância no produto durante as etapas de processamento e armazenamento (30 dias a temperatura de $4^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ aproximadamente), conforme descrito a seguir:

3.1. Processamento das linguças:

As etapas empregadas no processamento das linguças estão apresentadas no fluxograma da Figura 5. Para o preparo das linguças utilizou-se carne suína composta de paleta, pernil, lombo, retalho e costela, tendo sido moída em moedor com chapas de furos de 7/16 pol. O toucinho (representando 20% da massa total) também foi moído em chapa do mesmo diâmetro e misturado à carne juntamente com os condimentos (sal, pimenta do reino, pimenta vermelha, alho cebola, açúcar, noz moscada e ajinomoto[®]). A mistura foi homogeneizada durante 7 minutos a temperatura inicial de 0°C e final de 3°C . A massa homogeneizada foi então dividida em 5 porções sendo cada parte misturada aos aditivos conforme descrito a seguir:

- Formulação I: Carne, toucinho, condimentos e nitrito de sódio (200 mg/kg).

- Formulação II: Carne, toucinho, condimentos e sal de cura comercial.

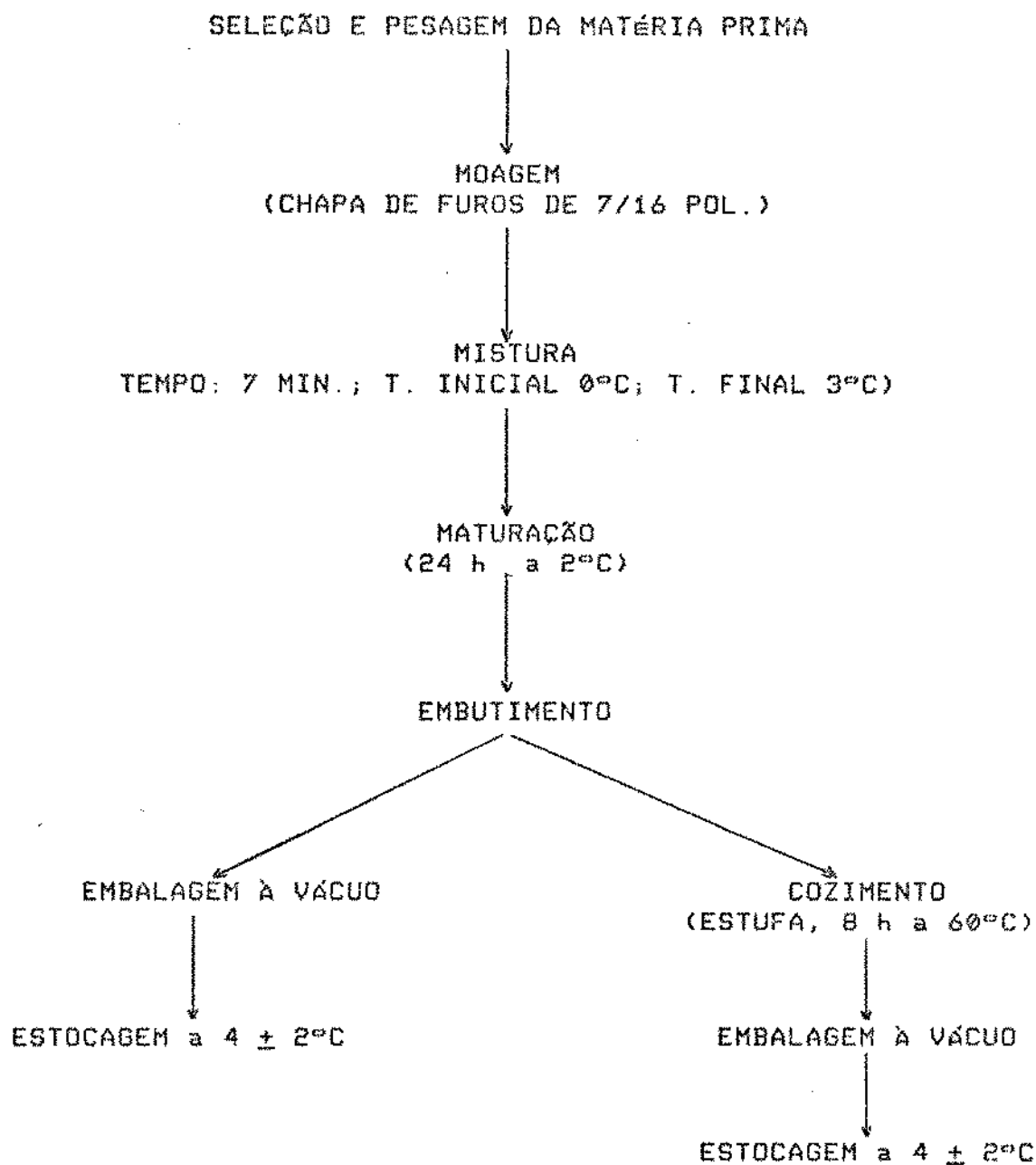


FIGURA 5: Fluxograma das etapas de processamento de linguiça.

- Formulação III: Carne, toucinho, condimentos, nitrito (200 mg/kg) e ascorbato de sódio (500 mg/kg).

- Formulação IV: Carne, toucinho, condimentos, sal de cura comercial e ascorbato de sódio (500 mg/kg).

- Formulação V: Carne, toucinho e condimentos.

Os produtos foram colocados em um refrigerador mantido à temperatura de, aproximadamente, 2°C onde permaneceram durante 24 horas. É nesta etapa, denominada de maturação, que se inicia a reação do nitrito com os componentes da carne. A seguir as linguças foram embutidas em tripa natural empregando-se embutideira manual, tendo sido torcida em tamanho de 10 cm, aproximadamente. Após o embutimento as linguças foram divididas em 2 porções. Uma foi embalada à vácuo em filme impermeável ao oxigênio (linguiça tipo frescal) e a outra porção sofreu um tratamento térmico em estufa, à temperatura de 60°C durante 8 horas, após o qual também recebeu o mesmo acondicionamento de embalagem (linguiça tipo cozida).

3.2. Armazenamento:

Todas as linguigas foram estocadas em refrigerador à temperatura de, aproximadamente, $4^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 30 dias, verificando-se nesse período, o teor residual de nitrato e nitrito, assim como o crescimento microbiano (mesófilos e psicrófilos).

4. Avaliação do desenvolvimento de microorganismos psicrófilos e mesófilos durante as etapas de processamento e armazenamento das linguigas:

A avaliação da taxa de crescimento de microorganismos mesófilos e psicrófilos, foi feita de acordo com a metodologia descrita por GILLILAND e col. (1976) utilizando-se placa de petri com Agar Nutrient ("Plate Count Agar").

5. Avaliação sensorial da cor e da preferência nas amostras de linguiga:

A avaliação sensorial da cor e da preferência nas amostras de linguiga foi realizada no laboratório de Análise Sensorial da Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP. O teste foi realizado por uma equipe de 10 (dez) provadores de ambos os sexos, com idade entre 20 e 40 anos, e que participam com frequência de testes sensoriais no referido laboratório.

Os testes foram conduzidos em secções separadas, com iluminação natural, tendo sido realizados durante dois dias consecutivos, na parte da manhã e da tarde. A avaliação foi realizada em dois períodos de estocagem das linguicas (7 e 19 dias após o processamento).

O teste sensorial foi feito seguindo delineamento estatístico inteiramente casualizado, com 3 tratamentos em 2 períodos e 6 secções de provas, conforme metodologia descrito por COCHRAN e COX (1957). Os provadores receberam 3 amostras de linguica por vez, para avaliação da cor e da preferência, usando escala horizontal não estruturada de 9 cm, onde o provador assinalava seu julgamento com um traço vertical entre os extremos: "não característico" e "característico", para a cor, e "desgostei muitíssimo" e "gostei muitíssimo", para a preferência. O modelo da ficha-registro utilizada está apresentado na Figura 6. O ponto assinalado pelo provador era posteriormente medido conforme a sua posição na escala. O provador ainda na mesma ficha, tinha oportunidade de registrar qualquer comentário referente à amostra.

Os resultados da avaliação sensorial, foram analisados estatisticamente através da análise de variância e teste de Tukey (COCHRAN E COX, 1957).

NOME: _____ DATA: _____

Por favor, verifique as amostras e diga sobre a cor de cada uma em função da escala abaixo. Em seguida indique a sua preferência em relação à aparência.

COR

Nº AMOSTRA	Não Característica	Característica
_____	+	+
_____	+	+
_____	+	+

PREFERÊNCIA

Nº AMOSTRA	DESGOSTEI MUITÍSSIMO	GOSTEI MUITÍSSIMO
_____	+	+
_____	+	+
_____	+	+

COMENTÁRIOS: _____

FIGURA 6: Modelo da ficha-registro utilizada na avaliação sensorial de cor e de preferência nas amostras de linguiça.

6. Nitrosaminas:

Para a determinação das N-nitrosaminas voláteis, foram escolhidas aleatoriamente, quinze amostras das linguças comerciais, das quais onze eram provenientes de fabricantes conhecidos e quatro de fabricantes não identificados. Foram também analisadas, amostras de cada uma das formulações dos dois tipos de linguças preparadas na Faculdade de Engenharia de Alimentos, da UNICAMP (ver item III.1).

O preparo das amostras e extração das N-nitrosaminas, foram realizados segundo o método ERRC (Eastern Regional Research Center) conforme descrito por PENSABENE e col. (1982) com algumas modificações. Na identificação das nitrosaminas foi utilizada cromatografia gasosa com detector TEA. Para confirmação da identidade das N-nitrosaminas utilizou-se espectrometria de massa de acordo com a técnica descrita por HOTCHKISS e col. (1980a).

6.1. Extração das N-nitrosaminas:

As etapas de extração das N-nitrosaminas presentes nas amostras de linguças estão apresentados no esquema da Figura 4.

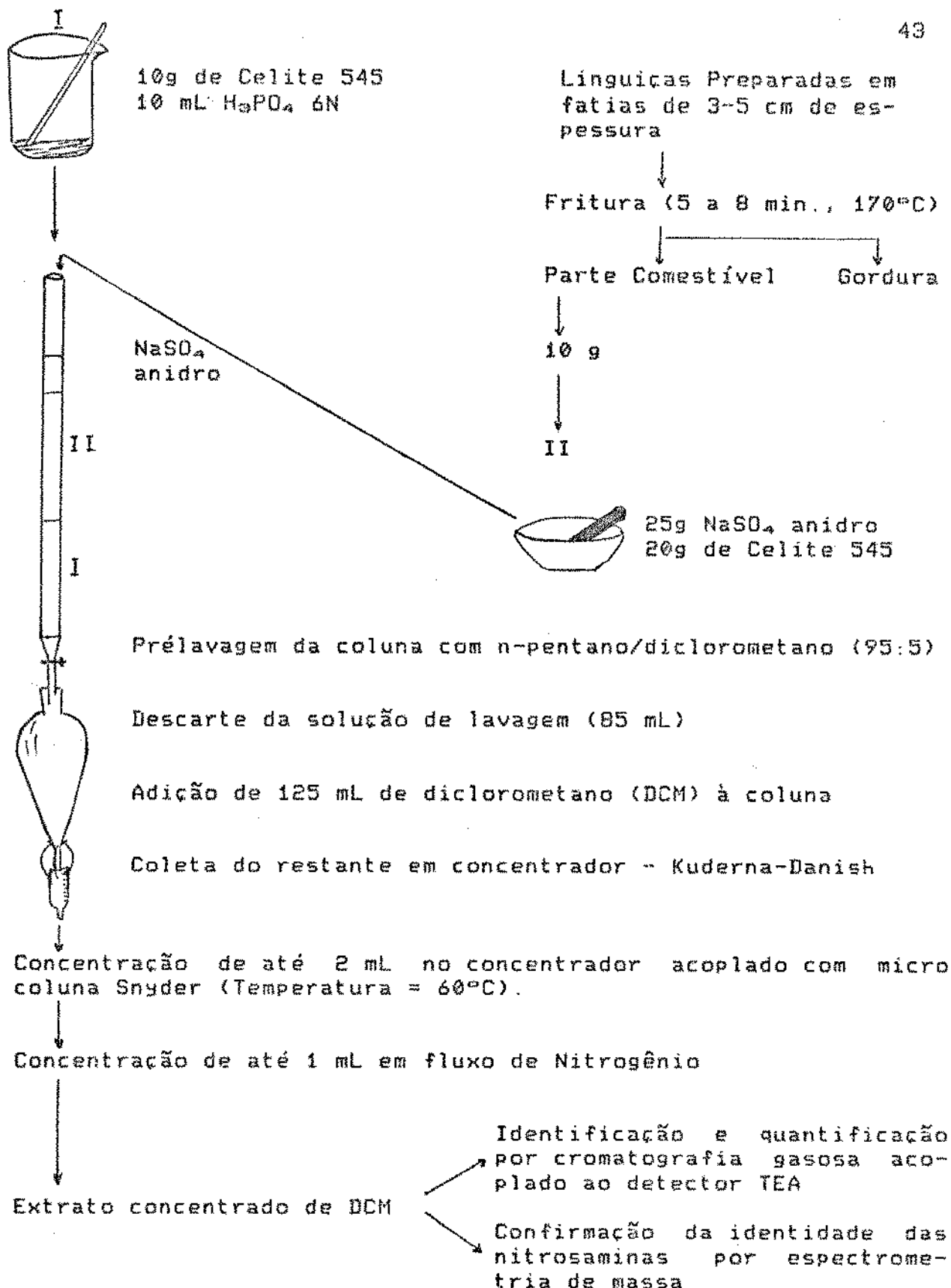


FIGURA 4: Esquema da metodologia utilizada na extração e identificação de N-Nitrosaminas em Linguiça.

6.1.1. Preparo da coluna de celite:

Em um béquer 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.

6.1.2. Preparo das amostras:

As amostras de linguças foram cortadas em fatias de, aproximadamente, 3 cm de espessura e fritas em óleo de soja durante 5 a 8 minutos, até que fosse obtida aparência de cozido. Algumas linguças foram fritas sem fatiar. O excesso de gordura foi retirado em papel de filtro e as amostras, tanto as em fatias como as inteiras, foram moídas, duas vezes sucessivas, utilizando-se um moinho de carne. Dez gramas de amostra moída foram transferidas quantitativamente para um almofariz e homogeneizadas. Em seguida foram acrescentados 20 g de celite sendo o material novamente homogeneizado até se obter uma mistura uniforme. A mistura resultante foi transferida para uma coluna cromatográfica e comprimida até se obter uma altura de 100 mm. No topo da coluna foram colocados 30 g de sulfato de sódio anidro. O almofariz e o pistilo foram lavados com 10 mL do solvente pentano-diclorometano (95:5), sendo esta fração também adicionada à coluna. Em seguida foram acrescentados mais 90 mL do mesmo solvente.

6.1.3. Eluição das N-nitrosaminas da coluna de celite:

Os eluatos de pentano:DCM (95:5) foram coletados num cilindro graduado de 100 mL a um fluxo de 1 mL por minuto. Quando o nível do solvente na coluna atingiu a 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 tipo Kuderna-Danish (K-D) com tubo concentrador de 4 mL recoberto 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 recoberta com papel alumínio.

6.1.4. Concentração do eluato:

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 2 mL utilizando-se fluxo de nitrogênio. O extrato foi transferido para ampolas de vidro de 5mm x 100mm de diâmetro interno, a qual estava protegida com papel alumínio. A transferência foi realizada utilizando-se pipetas Pasteur e funil de vidro com ponta capilar. A lavagem do tubo foi feita com diclorometano. A seguir, as ampolas foram seladas com auxílio de maçarico.

6.2. Determinação das N-nitrosaminas:

As nitrosaminas presentes nos extratos de linguicas foram identificadas e quantificadas na Oregon State University, Oregon, USA. As amostras, após serem recebidas na Universidade mencionada, foram abertas ao acaso e cada uma foi quantitativamente transferida para um tubo concentrador Kuderna-Danish de 10 mL usando-se diclorometano. Após concentração, sob corrente de nitrogênio, até volume de 1 mL, foram retirados de cada amostra alíquotas de 8 μ L e injetadas em cromatógrafo a gás acoplado a um detector TEA.

A identificação das N-nitrosaminas presentes nas linguicas foi inicialmente feita pela comparação dos tempos de retenção dos picos produzidos pela amostra com aqueles obtidos utilizando-se padrões. A quantificação foi realizada pela comparação das áreas dos picos das amostras com aquelas áreas obtidas por soluções padrões de concentração conhecida.

6.2.1. Parâmetros operacionais do cromatógrafo:

- Coluna de vidro: 3,5m X 2mm de diâmetro interno.
- Empacotamento: 20% Carbowax 20M + 2% NaOH sobre Cromosorb 80 - 100 mesh.
- Vazão do gás de arraste: He 30 mL/min.
- Temperatura Injetor: 200°C.

Coluna: 170°C.

6.2.2. Confirmação da identidade das N-nitrosaminas:

A confirmação da identidade das N-nitrosaminas foi realizada por espectrometria de massa conforme procedimento descrito por HOTCHKISS e col. (1980a). Foi necessário realizar uma purificação prévia dos extratos obtidos no item 6.1.4., tendo para isso sido preparada uma mistura, utilizando-se sete dos extratos originais escolhidos aleatoriamente. A mistura foi inicialmente purificada utilizando-se o método de destilação à vácuo descrito pelos autores mencionados.

O extrato em diclorometano obtido da destilação à vácuo, foi concentrado com auxílio de concentrador Kuderna-Danish até o volume de 1 mL, sendo em seguida colocado em uma coluna de vidro de 30 cm X 12mm de diâmetro interno empacotada com 20 g de alumina, atividade I. A coluna foi lavada com 50 mL de n-pentano até a completa eluição do diclorometano, o qual pode danificar o filamento de espectrometro de massa. As N-nitrosaminas voláteis foram removidos da coluna com 4 mL de metanol seguidos de 50 mL de n-pentano. O eluato de metanol-pentano contendo as N-nitrosaminas foi novamente concentrado em concentrador K-D até volume de 0,5 mL e a seguir sob fluxo de nitrogênio até o volume de 0,2 mL. Este material foi utilizado para confirmação da identidade das N-nitrosaminas por cromatografia gasosa e espectrometria de massa.

Na confirmação da identidade da N-nitrosodimetilamina (NDMA) utilizou-se uma coluna capilar de 60m X 0,75mm de diâmetro interno empacotada com Supelcowax 10 (Supelco, Inc., Bellefonte, PA., USA), cujas características

de retenção são semelhantes aquelas apresentadas pelo Carbowax 20 M. Para a N-nitrosopirrolidina (NPIR) e N-nitrosomorfolina (NMORF), utilizou-se coluna capilar com as mesmas dimensões descritas anteriormente, porém empacotada com Supelco SPB-1 (Supelco Inc., Bellefonte, PA., USA). Ambas as colunas foram aquecidas até 80°C por 5 minutos, e então programadas até 150°C a uma velocidade de 4°C/min.

6.2.3. Parâmetros operacionais do espectrômetro de massa:

- Corrente de Emissão = 450 uA.
- Voltagem Elétrica = 70 eV.
- Múltiplo Eletron = 2,9 Kv.
- Vazão dos Gases = 10 mL He/min. (para ambas colunas).

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

1. Determinação de gordura e umidade:

Na tentativa de caracterizar, para fins de classificação, as amostras de linguças estudadas, foram realizadas determinações de gordura e umidade nas mesmas. Os dados obtidos e apresentados na Tabela VI, indicaram teores médios de 51% e 23% para umidade e gordura, respectivamente. Esses valores se comparam favoravelmente com aqueles citados,

TABELA VI. Teores de umidade e gordura em linguigas comercializadas na região de Campinas, SP., no período de 04/85 a 04/86.

Grupo	Amostras Analisadas Nº	Umidade* %	Gordura* %
A	36	51,6±6,4 (39,5-69,2)	26,7±7,3 (5,5-38,0)
B	16	49,5±9,5 (33,1-63,4)	29,4±7,0 (17,1-40,9)

*Valores médios ± desvio padrão e, entre parenteses, valores extremos.

A - Amostras provenientes de fabricantes identificados.

B - Amostras provenientes de fabricantes não identificados.

em artigo publicado pelo IFT (1980) no qual foram relatados em linguicas, teores médios de umidade de 55% (com valores extremos de 43% - 72%) e de gordura de 25% (com valores extremos 7% - 42%).

Pelos valores obtidos do teor de gordura e umidade, não foi possível realizar uma classificação das linguicas estudadas, uma vez que esses teores apresentaram grande variabilidade, até mesmo dentro de um mesmo tipo de linguica, como por exemplo a toscana.

2. Teores de nitrato e nitrito presentes em linguicas comercializadas:

No presente estudo, os valores obtidos na determinação de nitrito e de nitrito + nitrato em linguicas comerciais foram divididos, com base na procedência das amostras, em dois grupos a saber: amostras provenientes de fabricantes conhecidos, as quais recebem o controle e fiscalização do SIF (Serviço de Inspeção Federal), Tabela VII e, amostras de origem desconhecida, ou seja, linguicas de produção caseira ou cuja procedência não foi fornecida pelo vendedor, Tabela VIII.

As Tabelas VII e VIII, indicaram que, 6% das amostras estudadas apresentaram teores residuais de nitrito acima daquele estabelecido pela legislação em vigor (BRASIL, 1976). Em relação ao teor residual de nitrato + nitrito, as Tabelas

TABELA VII. Níveis de nitrito, de nitrato e de nitrito + nitrato expressos como nitrito de sódio, presentes em linguicas comercializadas na região de Campinas, SP., no período de 04/85 a 04/86^(a).

Aditivos	Amostra Analisadas (Nº)	Amostras Analisadas %	Conteúdo ^(b) (mg/kg)
Nitrito	34	(94)	49,6±52,7 (nd-194,1)
	2	(6)	227,8±27,9 (208,0-247,5)
Nitrato	35	(97)	136,1±97,4 (22,2-365,9)
	1	(3)	1372,9
Nitrito + Nitrato	35	(97)	197,4±95,2 (35,7-369-4)
	1	(3)	1400,9

(a) Amostras provenientes de fabricantes conhecidos.

(b) Valores médios ± desvio padrão e, entre parênteses, valores extremos.

TABELA VIII. Níveis de nitrito, de nitrato e de nitrito + nitrato, expressos como nitrito de sódio, presentes em linguiças comercializadas na região de Campinas, SP., no período de 04/85 a 04/86^(a).

Aditivos	Amostras Analisadas (Nº)	Amostras Analisadas %	Conteúdo ^(b) (mg/kg)
Nitrito	15	(94)	59,2±62,6 (3,0-192,5)
	1	(6) ^(c)	485,4
Nitrato	12	(75)	152,1±151,6 (21,3-465,7)
	4	(25)	841,0±437,6 (527,3-1475,5)
Nitrito + Nitrato	11	(69)	170,9±157,1 (21,3-475,6)
	5	(31)	937,2±461,6 (598,6-1584,8)

(a) Amostras provenientes de fabricantes não identificados.

(b) Valores médios $\pm$ desvio padrão e, entre parênteses, valores extremos.

(c) A amostra apresentou teor de NaNO_2 de 785,5 mg/kg.

mencionadas indicaram que, 3% e 31% das amostras analisadas apresentaram, respectivamente, níveis residuais superiores aos estabelecidos pela legislação em vigor (BRASIL, 1988).

LARA e col. (1978) determinaram o teor de nitrito, nitrato e de nitrito + nitrato, expressos como nitrito de sódio, em 45 amostras de salsicha e 55 amostras de presunto. Os autores verificaram que somente uma amostra de salsicha apresentou teor de nitrito acima daquele estabelecido pela legislação em vigor (BRASIL, 1976).

Cabe ressaltar que, no Brasil, pela resolução Nº 9 de 1976, a legislação permitia um teor residual máximo para nitrito associado ou não a nitrato de sódio de 500 mg/kg, sendo que no produto a ser consumido não poderia remanescer mais do que 200 mg/kg de nitrito (expresso como nitrito de sódio). A resolução nº 4, de 24 de novembro de 1988, do Ministério da Saúde, está publicada na tabela de aditivos intencionais, na qual o limite de 500 mg/kg de nitrato associado ou não a nitrito foi mantido, sendo que 200 mg/kg de nitrito passou a ser expresso como íon nitrito. Esses valores contrastam com aqueles verificados em outros países, Tabela I, nos quais a tendência tem sido reduzir, sistematicamente, os níveis residuais de nitrito e de nitrato em carnes curadas, devido ao risco que essas substâncias podem representar à saúde humana (BUTHLER, 1980; DUDLEY, 1978).

3. Avaliação da concentração de nitrato e nitrito em linguiças durante as etapas de processamento e armazenamento:

O conhecimento dos teores residuais de nitrato e nitrito adicionados em produtos cárneos é importante porque, valores muito baixos podem não ser efetivos no controle da flora microbiana, enquanto que teores elevados são potencialmente prejudiciais à saúde humana.

Com o objetivo de avaliar a concentração de nitrato e de nitrito durante o processamento e armazenamento de linguiças foram processadas dois tipos desse produto, a saber: frescal e cozida (ver item III.1). Os resultados obtidos, Figuras 7 e 8, indicam uma perda de nitrito durante o processamento e armazenamento das linguiças da ordem de 11 a 66% e 11 a 73%, respectivamente, para os tipos frescal e cozida. A maior diminuição do teor de nitrito ocorreu nas amostras de linguiça tipo cozida, tendo a mesma sido mais pronunciada quando na presença de ascorbato de sódio. Resultado similar foi relatado por LEE e col. (1978). Em relação ao teor de nitrato residual, Figuras 9 e 10, não foi verificada, de uma maneira geral, variação aparente durante o processamento das linguiças, assim como no período de armazenamento das mesmas, tanto para a linguiça tipo frescal como para a do tipo cozida. Os resultados obtidos neste estudo compararam-se favoravelmente, tanto para nitrato como para nitrito, com aqueles relatados por FONSECA (1982).

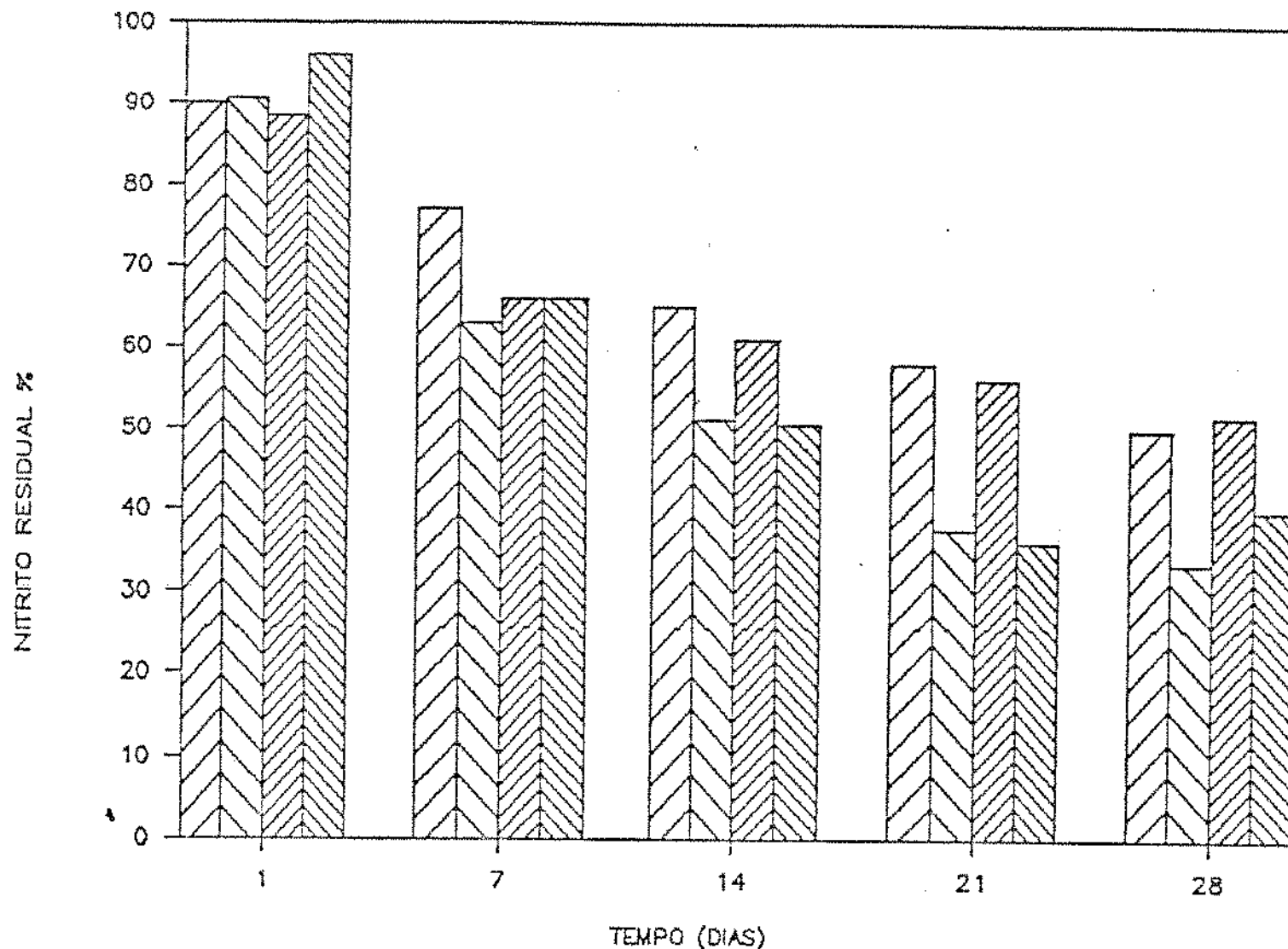


FIGURA 7: Porcentagem de nitrito residual, expressos em nitrito de sódio, em função do tempo de processamento (24h iniciais necessárias para a maturação) e de armazenamento ($4 \pm 2^{\circ}\text{C}$) de amostra de linguiça tipo frescal com adição de:

- ▨ NaNO₂ (200 mg/kg)
- ▧ NaNO₂ (200 mg/kg) e ascorbato de sódio (500mg/kg)
- ▩ Sal de cura comercial (4 g/kg)
- ▦ Sal de cura comercial (4 g/kg) e ascorbato de sódio (500 mg/kg)

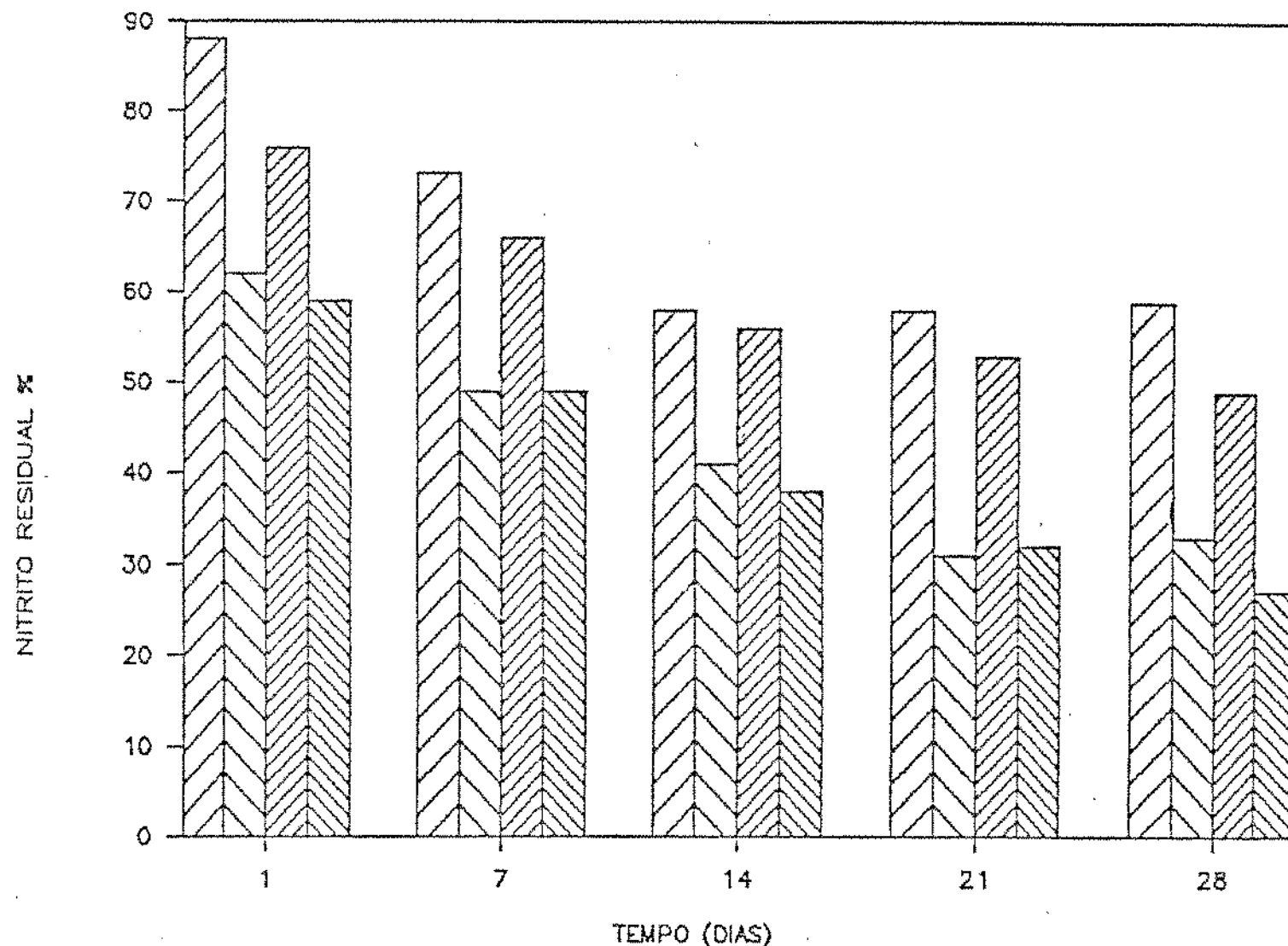


FIGURA 8: Porcentagem de nitrito residual expressos em nitrito de sódio, em função do tempo de processamento (24h iniciais necessárias para a maturação) e de armazenamento ($4 \pm 2^{\circ}\text{C}$) de amostras de linguiça tipo cozida (8 h, 60°C) com adição de:

- ▨ NaNO₂ (200 mg/kg)
- ▧ NaNO₂ (200 mg/kg) e ascorbato de sódio (500 mg/kg)
- ▩ Sal de cura comercial (4 g/kg).
- ▦ Sal de cura comercial (4 g/kg) e ascorbato de sódio (500 mg/kg).

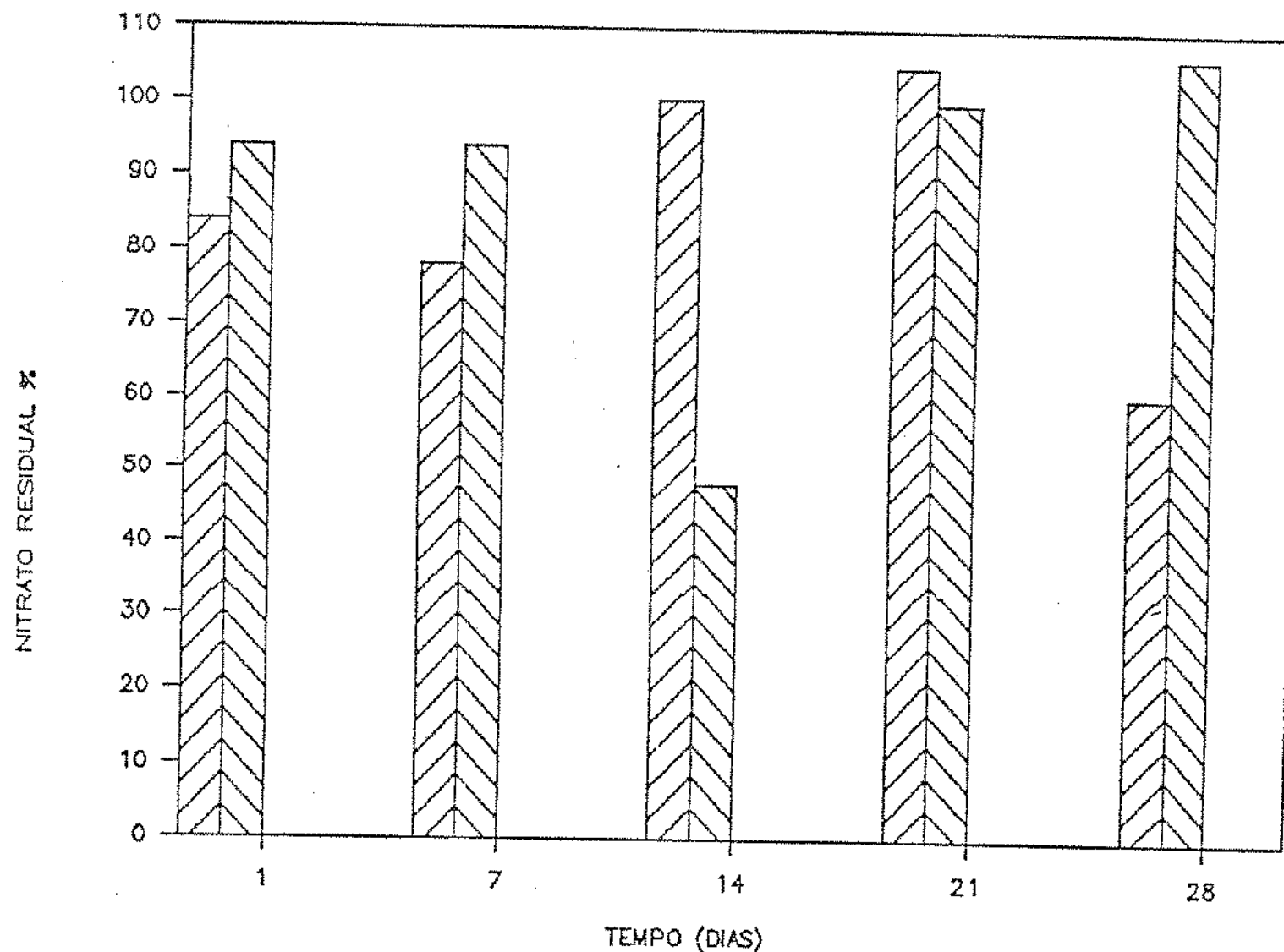


FIGURA 9: Porcentagem de nitrito, expressos em nitrato de sódio, em função do tempo de processamento (24h iniciais necessárias para a maturação) e de armazenamento ($4 \pm 2^{\circ}\text{C}$) de amostras de linguiça tipo frescal com adição de:

- ▨ sal de cura comercial (4 g/kg).
- ▩ sal de cura comercial (4 g/kg) e ascorbato de sódio (500 mg/kg)

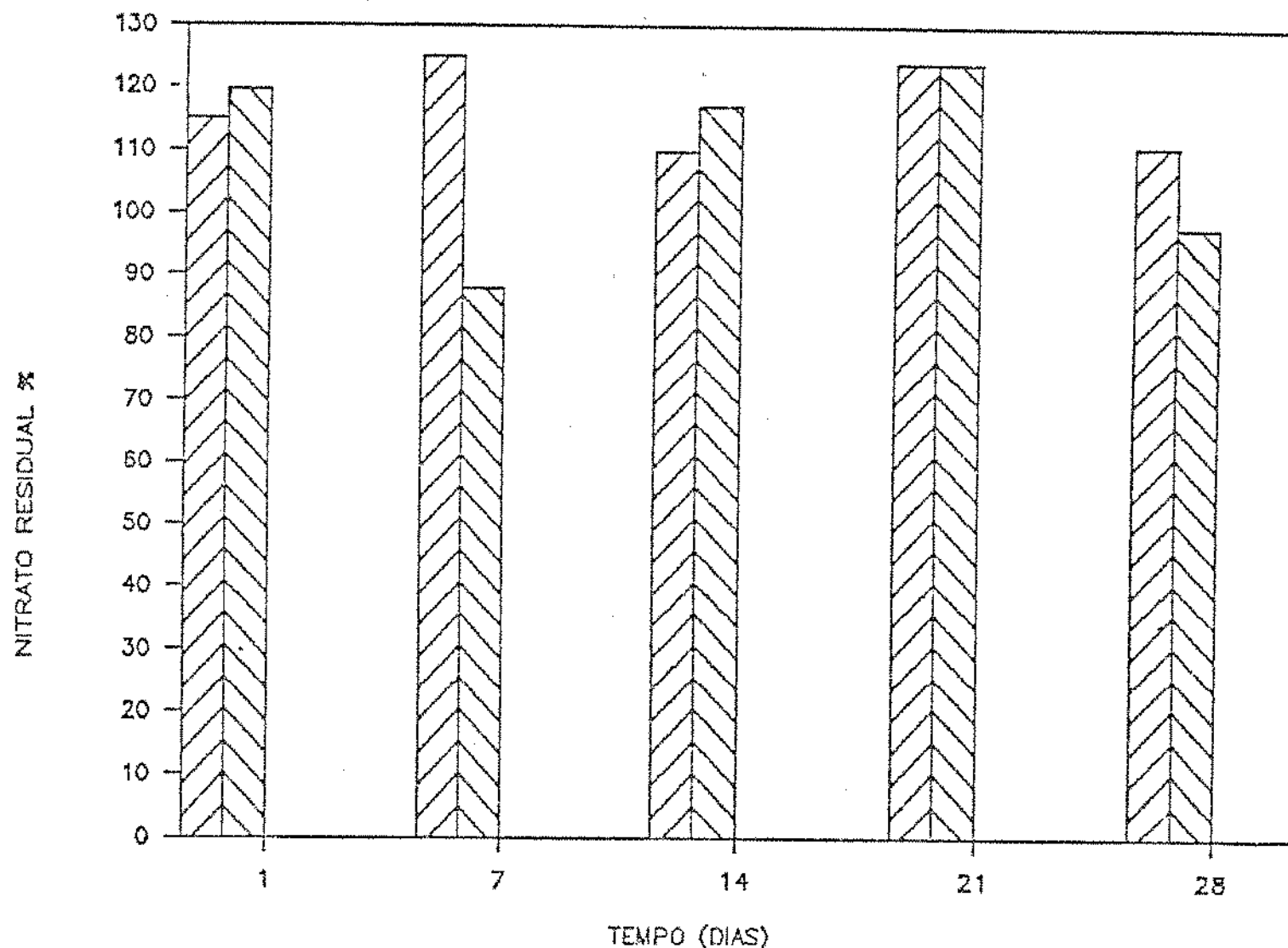


FIGURA 10: Porcentagem de nitrato, expressos em nitrato de sódio, em função do tempo de processamento (24h iniciais necessárias para a maturação) e de armazenamento ($4 \pm 2^{\circ}\text{C}$) de amostras de linguiça tipo cozida (8 h, 60°C) com adição de:

- ▨ sal de cura comercial (4 g/kg).
- ▩ sal de cura comercial (4 g/kg) e ascorbato de sódio (500 mg/kg).

4. Avaliação da contagem microbiana das linguças durante a etapa de armazenamento:

O nitrito, entre outras características, apresenta a propriedade de inibir o crescimento das bactérias presentes naturalmente nas carnes ou introduzidas durante o abate ou processamento (ROBERTS, 1975; SOFOS e BUSTA, 1980).

No presente estudo foi avaliado o efeito do nitrito, na presença ou não de ascorbato, na taxa de crescimento de mesófilos e psicrófilos. Os resultados obtidos Figuras 11 a 14, indicam que, de uma maneira geral, as linguças tratadas com nitrito de sódio ou com sal de cura, apresentaram uma taxa de crescimento microbiano menor do que aquela apresentada pela amostra controle. Esses resultados, de certa forma, assemelham-se com aqueles publicados por BUSHWAY e JEN (1984) nos quais os autores verificaram que, teores de 100 a 2500 mg/kg de nitrito afetaram o desenvolvimento microbiano (contagem total de psicotróficos à temperatura de 22°C) em carne branca de frango, quando comparado com o controle (sem nitrito). Os autores também verificaram que 50 mg/kg de nitrito teve pouco eficácia na inibição do crescimento microbiano. Todavia, BUSHWAY e JEN (1984) também observaram que, em carne escura de frango, a inibição da contagem total somente ocorria em amostras contendo níveis acima de 400 mg/kg de nitrito. Este resultado diverge daquele encontrado em nossos estudos, no qual a adição de 200 mg/kg de nitrito

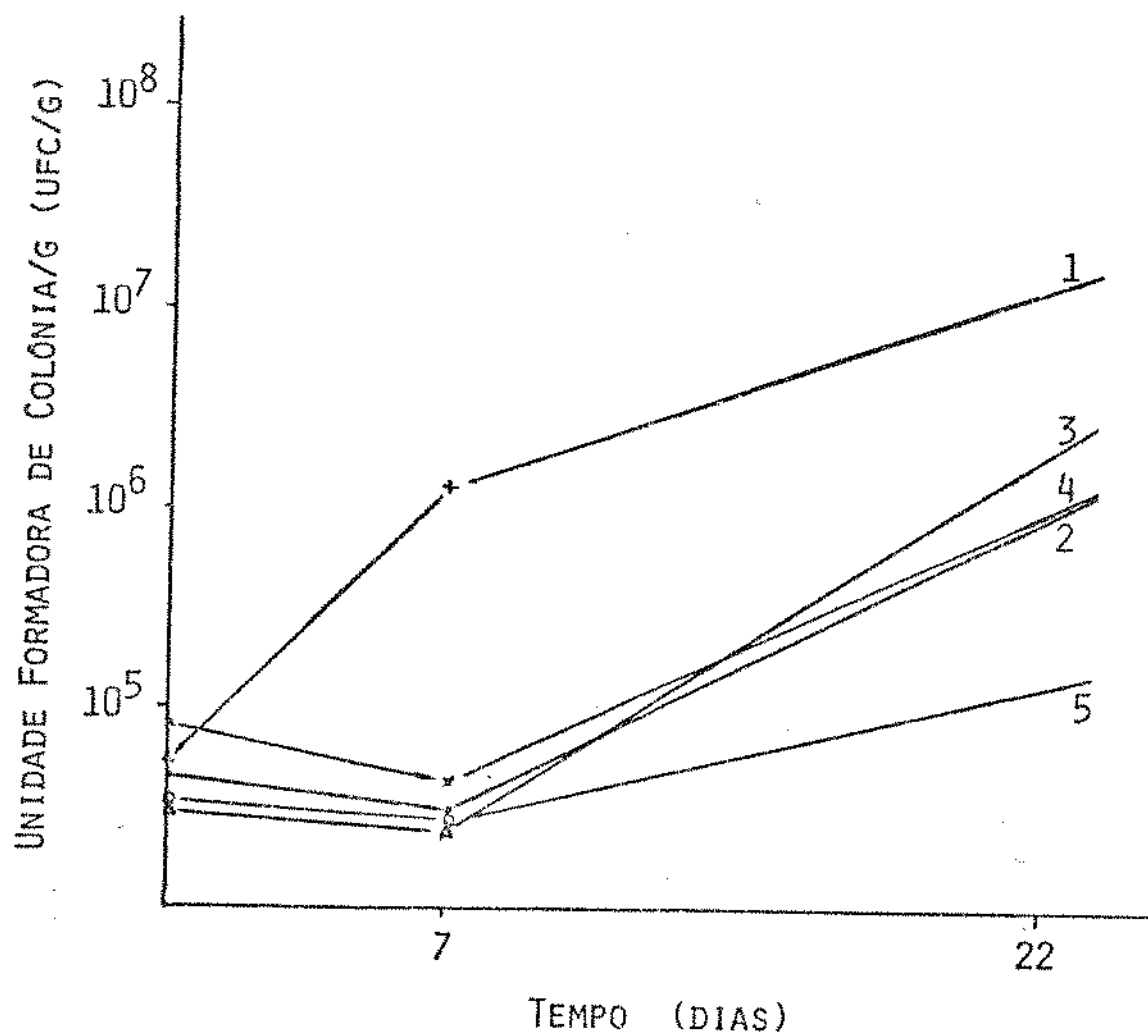


FIGURA 11: Taxa de crescimento de microrganismos (Psicrófilos) em função do tempo, em amostras de linguiça tipo frescal. 1- Controle, 2- Com adição de NaNO_2 (200 mg/kg), 3- Com adição de NaNO_2 (200 mg/kg) e ascorbato de sódio (500 mg/kg), 4- Com adição de sal de cura comercial (4 g/kg), 5- Com adição de sal de cura comercial (4 g/kg) e ascorbato de sódio (500 mg/kg).

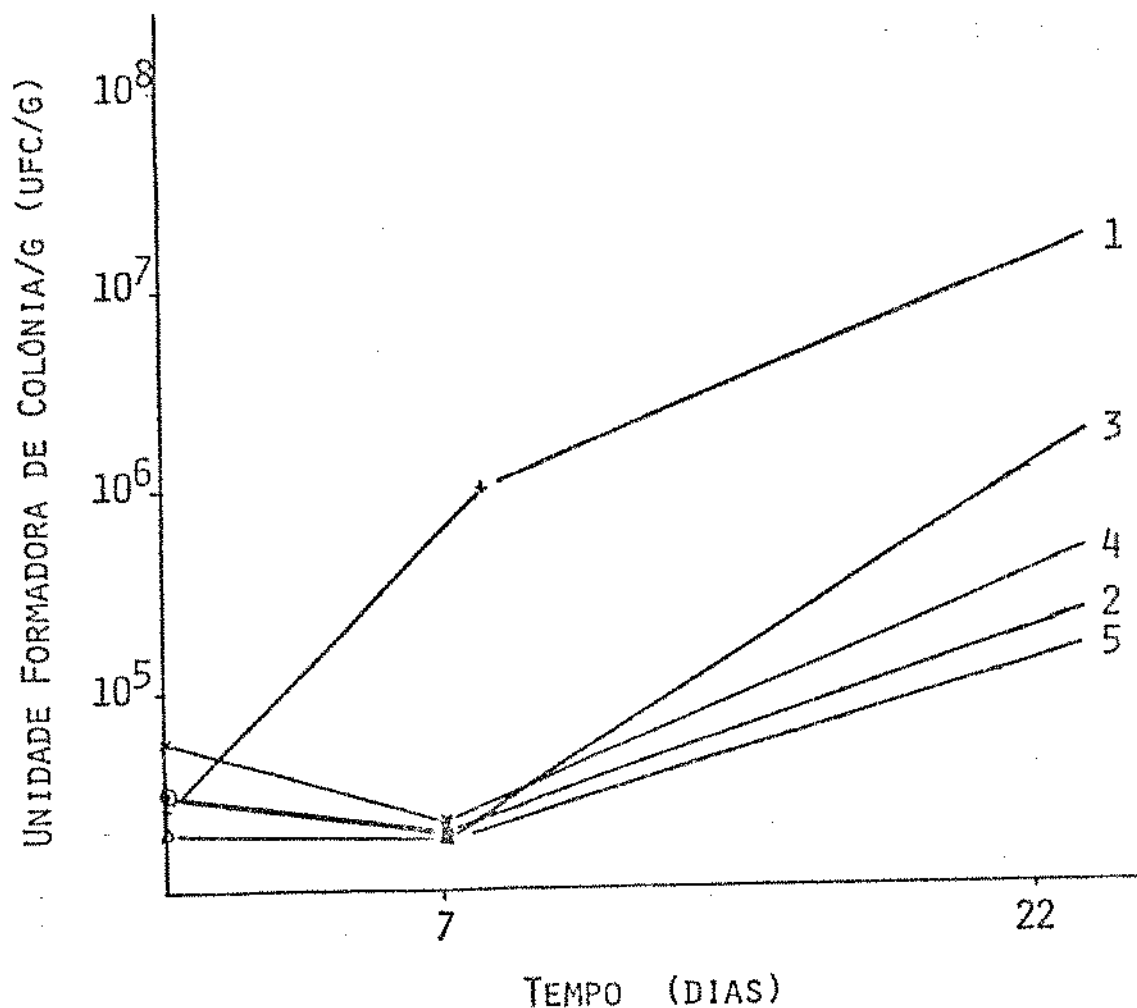


FIGURA 12: Taxa de crescimento de microrganismos (Mesófilos) em função do tempo, em amostra de linguiça tipo frescal. 1- Controle; 2- Com adição de NaNO_2 (200 mg/kg); 3- Com adição de NaNO_2 (200 mg/kg) e ascorbato de sódio (500 mg/kg); 4- Com adição de sal de cura comercial (4 g/kg); 5- Com adição de sal de cura comercial (4 g/kg) e ascorbato de sódio (500 mg/kg).

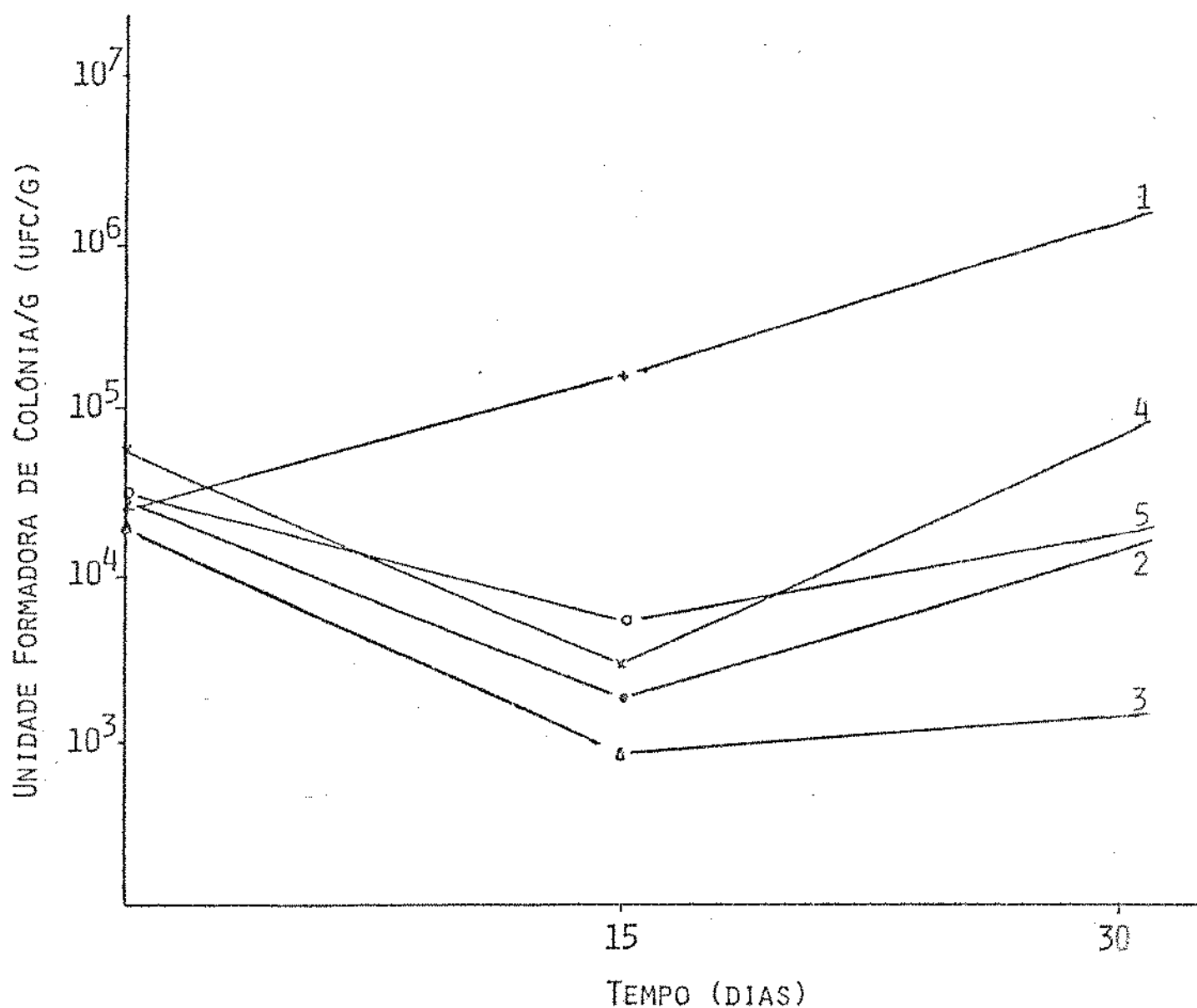


FIGURA 13: Taxa de crescimento de microrganismos (Psicrófilos) em função do tempo, em amostras de linguiça tipo cozida (8 h, 60°C). 1- Controle; 2- Com adição de NaNO₂ (200 mg/kg); 3- Com adição de NaNO₂ (200 mg/kg) e ascorbato de sódio (500 mg/kg); 4- Com adição de sal de cura comercial (4 g/kg); 5- Com adição de de sal de cura comercial (4 g/kg) e ascorbato de sódio (500 mg/kg).

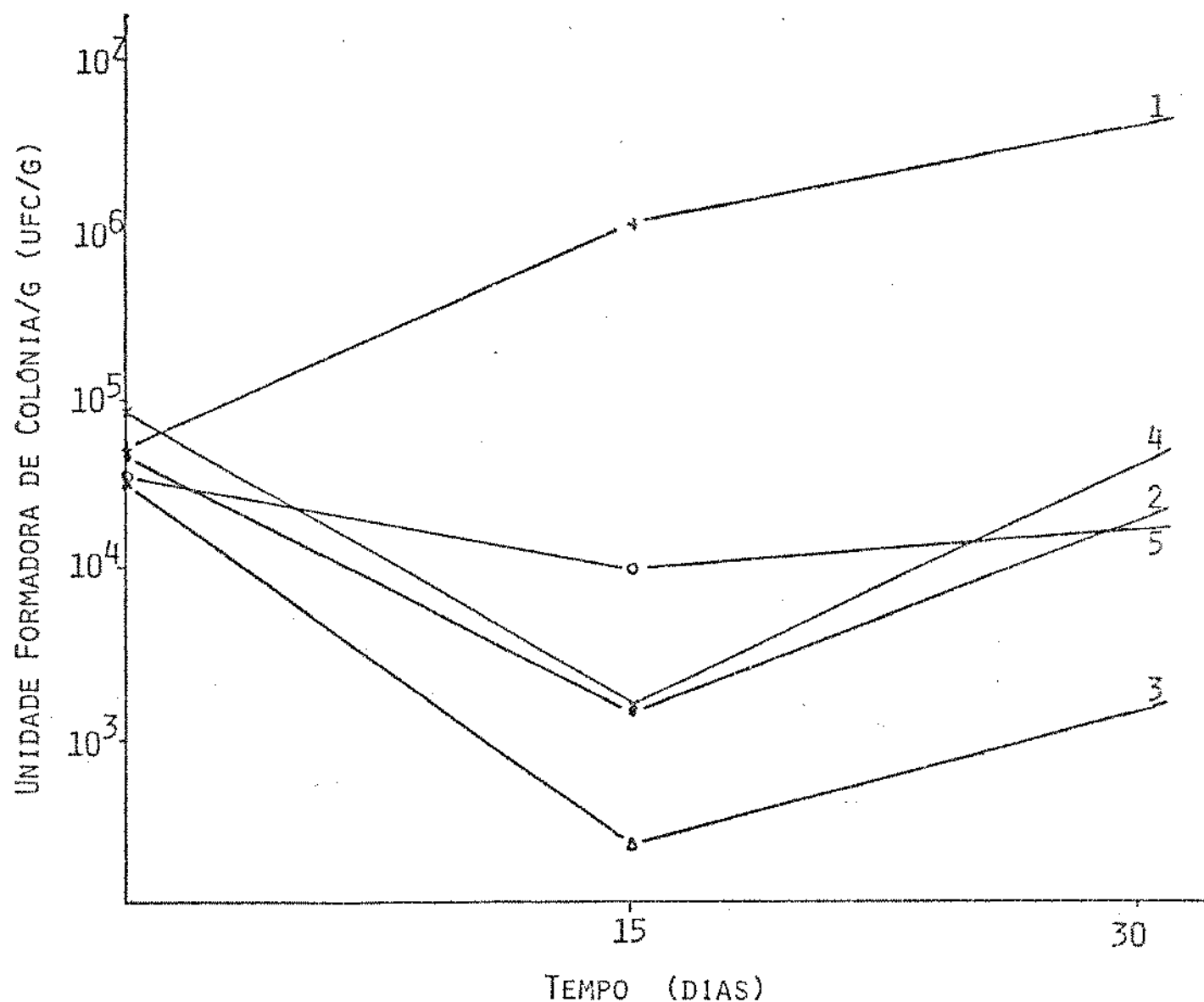


FIGURA 14: Taxa de crescimento de microrganismos (Mesófilos) em função do tempo, em amostras de linguiça tipo cozida (8 h, 60°C). 1- Controle; 2- Com adição de NaNO_2 (200 mg/kg); 3- Com adição de NaNO_2 (200 mg/kg) e ascorbato de sódio (500 mg/kg); 4- Com adição de sal de cura comercial (4 g/kg); 5- Com adição de sal de cura comercial (4 g/kg) e ascorbato de sódio (500 mg/kg).

obteve-se uma inibição da taxa de crescimento de mesófilos e psicrófilos nas amostras de linguças, tanto frescal como aquela que sofreu cozimento em estufa.

Ainda, pelas Figuras 11 a 14, pode-se observar que as linguças tratadas apresentaram contagem de mesófilos e psicrófilos semelhante à contagem inicial, por um período de até 11 e 30 dias de armazenamento ($4 \pm 2^{\circ}\text{C}$), para frescal e cozida, respectivamente. Estes resultados também divergem dos relatados por BUSHWAY e JEN (1984) os quais encontraram uma inibição de contagem total, em carne escura de frango, unicamente até o 6º dia de armazenamento (4 a 5°C).

5. Avaliação Sensorial:

Os dados obtidos na avaliação sensorial da cor e da preferência das diferentes linguças, tipo frescal e cozida, preparadas no laboratório de carnes da FEA/UNICAMP estão apresentados na Tabelas IX e X.

Para as linguças tipo frescal como para a do tipo cozida (Tabelas IX e X, respectivamente), os resultados revelaram, tanto para a cor como para a preferência, diferença significativa, ao nível de 1%, entre as amostras estudadas, a saber: linguça contendo nitrito (amostra 1), nitrito e ascorbato (amostra 2), e controle (amostra 3). Para a linguça frescal não foi verificada diferença entre as épocas estudadas, mas quando avaliada a interação, tratamento e época, verificou-se diferença significativa, ao nível de 5%,

TABELA IX. Análise de variância e significância do teste F de três amostras de linguiça, do tipo frescal, realizadas após 7 e 19 dias de armazenamento.

CV	GL	F-Cor	F-Preferência
Tratamento (T)	2	29,18**	30,91**
épocas (E)	1	2,94 n.s.	3,67 n.s.
T x E	2	4,82*	5,44**
Resíduo	30		
		$m_1 = 6,77a$	$m_1 = 6,77a$
		$m_2 = 7,11a$	$m_2 = 7,00a$
		$m_3 = 6,18b$	$m_3 = 5,86b$

**diferença significativa, ao nível de 1%, de probabilidade.

*diferença significativa, ao nível de 5%, de probabilidade.

n.s. não significativa.

m = média dos tratamentos segundo delineamento estatístico inteiramente casualizados, onde os índices 1, 2 e 3 representam as amostras contendo nitrito, nitrito mais ascorbato e controle, respectivamente.

letras iguais = não houve diferença significativa, ao nível de 1%.

letras diferentes = diferença significativa, ao nível de 1% de probabilidade.

TABELA X. Análise de variância e significância do teste F de três amostras de linguiça, do tipo cozida, realizadas após 7 e 19 dias de armazenamento.

CV	GL	F-Cor	F-Preferência
Tratamento (T)	2	10,59**	35,16**
Época (E)	1	30,69**	15,05**
T x E	2	0,94 n.s.	1,005 n.s.
Resíduo	30		
		m ₁ = 6,68a	m ₁ = 6,68a
		m ₂ = 6,73a	m ₂ = 6,87a
		m ₃ = 5,96b	m ₃ = 5,38b

**diferença significativa, ao nível de 1%, de probabilidade.

n.s. não significativa.

m = média dos tratamentos segundo delineamento estatístico inteiramente casualizados, onde os índices 1, 2 e 3 representam as amostras contendo nitrito, nitrito mais ascorbato e controle, respectivamente.

letras iguais = não houve diferença significativa, ao nível de 1%.

letras diferentes = diferença significativa, ao nível de 1%, de probabilidade.

para a cor e de 1% para a preferência. Isto foi devido ao fato da amostra contendo nitrito e ascorbato ter apresentado médias maiores na segunda época de avaliação (19 dias) em relação à primeira (7 dias), o que não ocorreu com as demais amostras. Para a linguiça tipo cozida verificou-se diferença significativa, ao nível de 1%, entre as épocas estudadas.

Baseado no teste de Tukey, verificou-se que, para ambos os tipos de linguiças, as amostras contendo nitrito (com ou sem ascorbato) diferiram significativamente da amostra controle, sendo que aquela contendo ascorbato apresentou as maiores médias. Estes resultados indicaram que a adição de ascorbato de sódio melhorou as características sensoriais de cor e de preferência das linguiças. Resultados semelhantes foram relatados por CHO e BRATZLER (1970) e WASSERMAN e TALLEY (1972).

6. N-nitrosaminas:

6.1. Presença de N-nitrosaminas em linguiças:

No presente estudo verificou-se a presença de N-nitrosaminas voláteis em linguiças comercializadas na região de Campinas, SP., por ser este produto, dentre as carnes curadas, um dos que gozam de maior consumo no Brasil. Para efeito de comparação foram estudadas linguiças processadas na FEA-UNICAMP, e armazenadas por 2 a 3 semanas. Cabe destacar

que, essas linguiças foram preparadas com a adição de 200 mg/kg de NaNO_2 ou com sal de cura contendo nitrato e nitrito, cujas amostras, imediatamente após o preparo, apresentaram teor residual de nitrito (expresso como nitrito de sódio) de, aproximadamente, 190 mg/kg e conteúdo de nitrito + nitrato (expressos como NaNO_2) de, aproximadamente, 300 mg/kg.

Na Figura 15 está apresentado um cromatograma típico das N-nitrosaminas identificadas nas linguiças comerciais. Os tempos de retenção (em min.) foram: 3,17; 13,52; e 15,39 para NDMA, NPIR e N-nitrosomorfolina (NMORF), respectivamente.

As porcentagens de recuperação do método utilizado, para as N-nitrosaminas identificadas nas amostras de linguiças, estão apresentadas na Tabela XI. Esses dados se comparam favoravelmente com aqueles publicados por STEPHANY e col. (1976) os quais relataram valores de porcentagens de recuperação entre 26 - 101% ($\bar{X}$ = 75%) e 22 - 62% ($\bar{X}$ = 42%) para NDMA e NPIR, respectivamente.

As tabelas XII e XIII reúnem os níveis de nitrosaminas encontrados, respectivamente, nas amostras adquiridas no comércio e naquelas produzidas na FEA. Pela Tabela XII verifica-se que todas as amostras comerciais estudadas apresentaram quantidades detectáveis de NDMA e NPIR cujos teores médio foram aproximadamente, 10 vezes maiores do que aqueles reportados recentemente na literatura para diferentes tipos de carnes curadas incluindo linguiças (Figura 16).

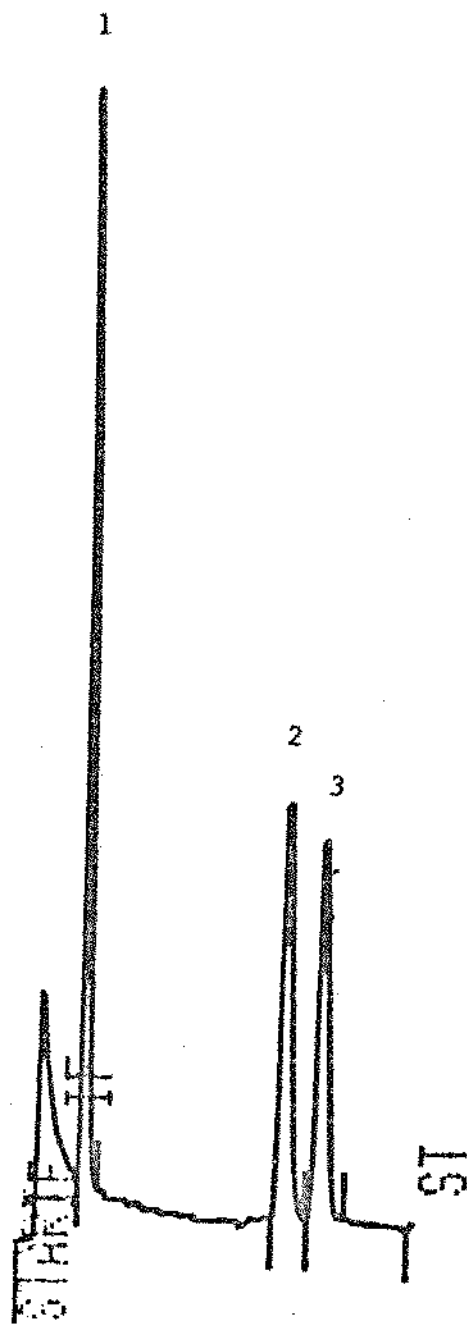


FIGURA 15: Cromatograma típico da determinação de N-nitrosaminas voláteis por cromatografia gasosa - detector TEA - ("Thermo Energy Analyzer"). 1- N-nitrosodimetilamina; 2- N-nitrosopirrolidina; 3- N-nitrosomorfolina. Condições de análise:

Coluna: 20% Carbowax 20M + 2% NaOH sobre Cromosorb 80-100 mesh.

Vazão do gás de arraste: He 30 mL/min.

Temperatura do injetor: 200°C.

Temperatura da Coluna: 170°C.

TABELA XI. Porcentagem de recuperação de N-nitrosaminas padrões adicionadas em amostras de linguiça.

Amostras	N-nitrosaminas (% de recuperação)		
	NDMA	NPIR	NMORF
1	57	59	59
2	52	59	52
3	60	59	63
4	82	92	96
5	48	56	66
Média	59,8	65,0	67,2

TABELA XII. Níveis de N-nitrosaminas ($\mu\text{g/kg}$)* em amostras de linguiças comerciais provenientes de fabricantes de origem conhecida (FOC) e de fabricantes não identificados (FNI).

Origem da Amostra	Nitrosaminas	Amostras											Média ($\mu\text{g/kg}$)	Desvio Padrão
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
FOC	NDMA	168,9	124,8	93,1	31,1	90,0	87,3	10,5	176,6	69,6	48,7	194,0	99,5	60,6
	NPIR	68,8	121,5	27,7	127,4	33,5	20,6	11,1	50,3	20,8	21,9	31,0	65,5	61,3
	NMOR	19,2	22,9	10,0	nd	nd	13,0	nd	10,6	7,0	nd	9,4	8,4	8,0
FNI	NDMA	88,8	180,6	34,5	63,6								91,9	63,2
	NPIR	13,1	69,2	11,5	18,0								28,0	27,6
	NMOR	14,4	11,5	nd	9,5								8,9	6,2

*Valores corrigidos em base a porcentagem de recuperação

nd = não detectável.

NDMA - N-nitrosodimetilamina.

NPIR - N-nitrosopirrolidina.

NMOR - N-nitrosomorfolina.

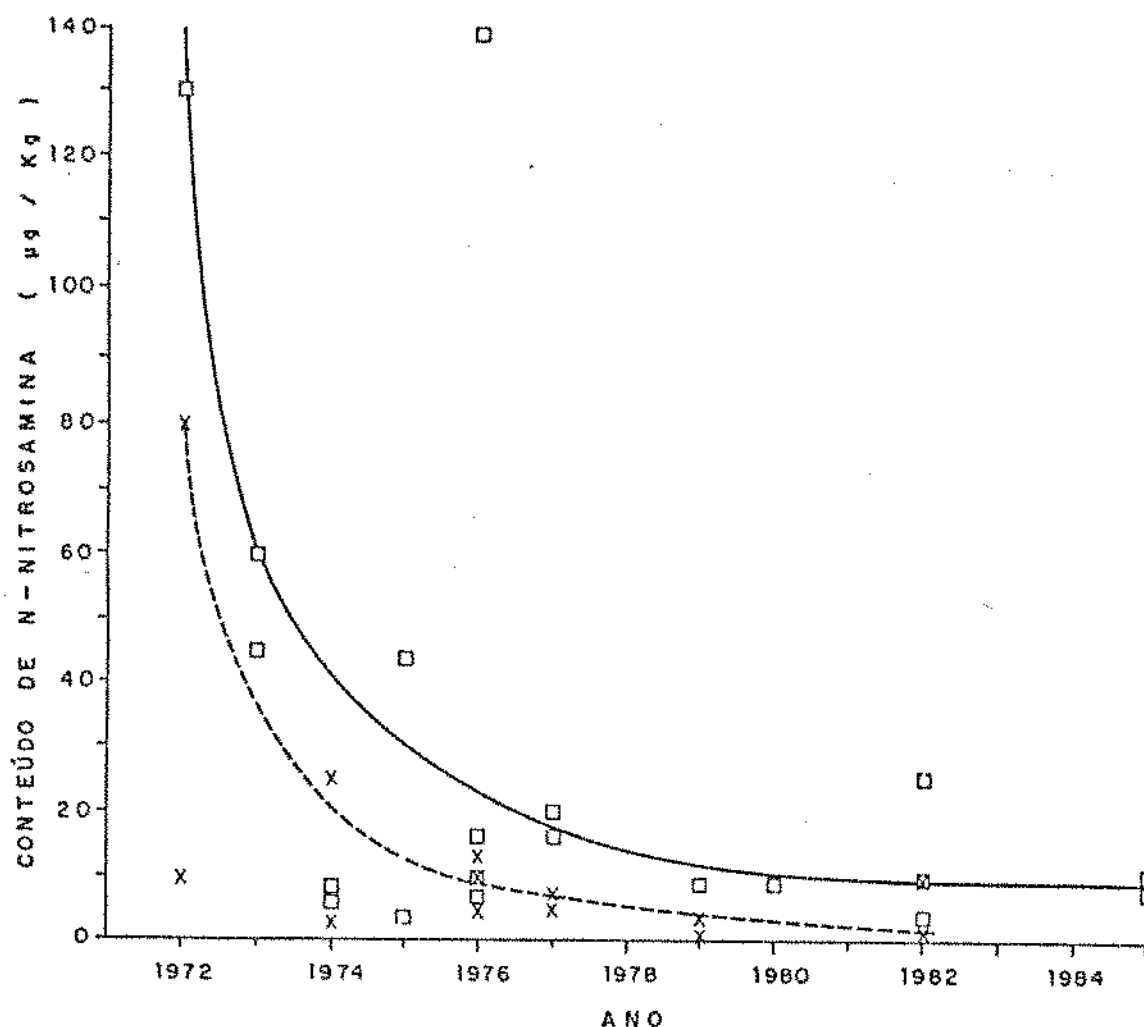


FIGURA 16: Níveis de N-nitrosopirrolidina (□) e N-nitrosodimetilamina (x) relatados na literatura científica, em diferentes tipos de carnes curadas, no período de 1972 a 1985.

FONTE: SEN (1972); PANALAKS e col. (1974); GOUGH e col. (1976); HAVERY e col. (1976); SEN e col. (1976); STEPHANY e col. (1976); GOUGH e col. (1977); MOTTRAM e col. (1977); HAVERY e col. (1978B); SEN e col. (1979); IFT (1980); PENSABENE e col. (1982); BOGOVSKI (1982); HAVERY e FAZIO (1985).

Vale a pena mencionar que em uma das amostras comerciais estudada foi verificada a presença de 5,78 $\mu\text{g/kg}$ N-nitrosopiperidina. Segundo SEN e col. (1973) esta N-nitrosamina tem sido encontrada esporadicamente em linguicas, e a sua formação pode ser resultado da reação entre piperina (possivelmente presente em pimenta do reino) e nitrito de sódio. Conforme REYES e SCANLAN (1984) essa N-nitrosamina tem sido relatada em carnes curadas, em níveis que variam de 1 a 3 $\mu\text{g/kg}$.

Dentre as N-nitrosaminas identificadas nas linguicas comercializadas, a NDMA e NPIR, tem sido normalmente encontradas em carnes curadas tais como linguicas, bacon, salame e presunto (Tabela IV). Entretanto, cabe destacar que a presença de NMORF em carnes curadas, e em particular linguicas, tem sido raramente relatada na literatura científica. Em artigo publicado pelo IFT (1980) foi relatada a presença de 6 $\mu\text{g/kg}$ dessa N-nitrosamina em amostras de linguica. Ainda, SEN e col. (1982) relataram níveis de 0,3 - 3,8 $\mu\text{g/kg}$ desse composto em margarina e manteiga, e FAZIO e HAVERY (1982) encontraram NMORF em isolado proteico de soja e em concentrado proteico de soja, em concentrações de 97 $\mu\text{g/kg}$ e 100 $\mu\text{g/kg}$, respectivamente. No nosso trabalho, NMORF foi identificada em 12 das 15 amostras de linguicas comerciais estudadas. O nível em que NMORF foi encontrada variou entre quantidade não detectável e 22,9 $\mu\text{g/kg}$ (média 8,5 e DP 7,36), Tabela XII. Torna-se, portanto, necessária a realização de estudos que visem elucidar a origem desta N-nitrosamina nessas linguicas.

Em contraste com as amostras comerciais estudadas, verificou-se que, das oito amostras processadas no laboratório de carnes da FEA/UNICAMP, somente duas apresentaram quantidades detectáveis de NDMA (1,1 e 3,0 µg/kg) uma de NPIR (6,2 µg/kg), enquanto que, NMORF não foi detectada em nenhuma das amostras (Tabela XIII). Ainda, nenhuma das amostras processadas com adição de 500 mg/kg de ascorbato de sódio apresentou quantidade detectável das N-nitrosaminas mencionadas, dados que se comparam favoravelmente com aqueles relatados na literatura (FIDDLER e col., 1973; MOTTRAM e col., 1975; PENSABENE e col., 1976).

7.2. Confirmação da identidade das N-nitrosaminas:

O TEA ("Thermal Energy Analyzer") é dentre os detectores atualmente disponíveis no mercado, o mais seletivo para as N-nitrosaminas. Apesar disso, este detector pode estar sujeito à interferentes, motivo pelo qual é necessário confirmar a identidade destes compostos utilizando um outro método analítico. A espectrometria de massa (EM) é reconhecida como o principal método capaz de confirmar a presença de N-nitrosaminas, sendo considerado o método disponível de maior segurança para caracterizar traços de N-nitrosaminas (HOTCHKISS e col., 1980b) mesmos em amostras complexas, como são os alimentos. (SEN e KUBACHI, 1987). Segundo LIBBEY e SCANLAN (1984) EM é altamente específica, sendo extremamente raro encontrar dois compostos diferentes que apresentem o

TABELA XIII. Teores de N-nitrosaminas em amostras de linguiças processadas no Lab. de carnes da Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP.

Aditivos	N-nitrosaminas (µg/kg)		
	NDMA	NPIR	NMUIRF
NaNO ₂	nd	nd	nd
Sal de cura	1,1	nd	nd
NaNO ₂ + Ascorbato	nd	nd	nd
Sal + Ascorbato	nd	nd	nd
NaNO ₂ *	3,0	nd	nd
Sal de cura*	nd	6,2	nd
NaNO ₂ + Ascorbato*	nd	nd	nd
Sal + Ascorbato*	nd	nd	nd

*Amostra cozida.

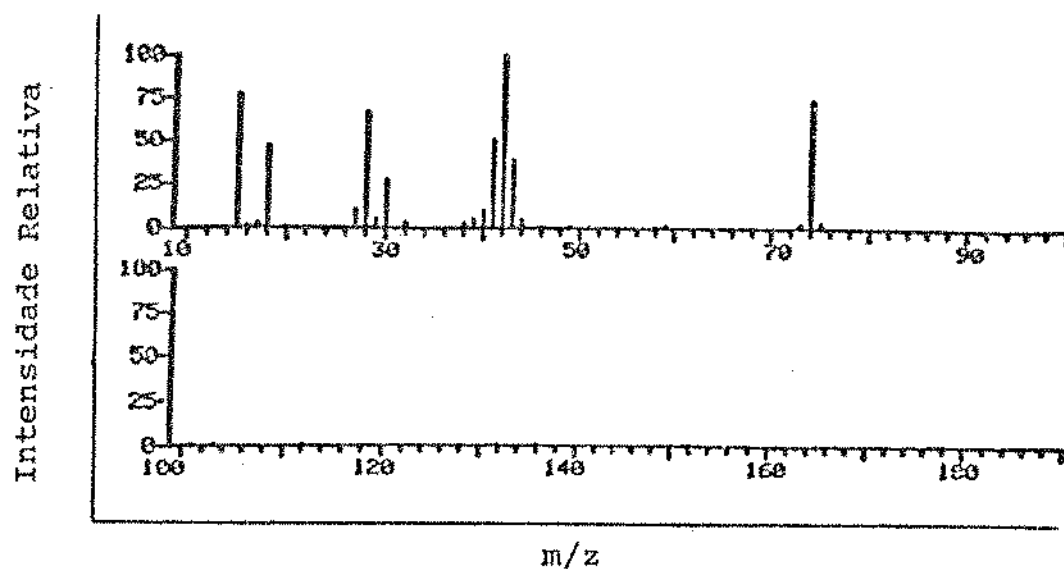
nd = não detectável.

mesmo espectro de massas. Além da especificidade, EM também é um método altamente sensível na confirmação da identidade das N-nitrosaminas em níveis de $\mu\text{g/kg}$ através do espectro completo, utilizando espectrometria de massas de baixa resolução (HOTCHKISS e col., 1980b) ou em quantidades de até 0,3 pg para NDMA utilizando espectrometria de massa de alta resolução.

Nas figuras 17, 18 e 19 estão apresentados, respectivamente, os espectros de massa de NDMA, NPIR e NMORF, as quais foram as N-nitrosaminas encontradas nas linguças comerciais estudadas. Os espectros de N-nitrosaminas padrões foram também incluídos para fins de comparação. Os espectros de massa das dialquil nitrosaminas usualmente apresenta o íon molecular (M^+) em intensidade suficiente para permitir o seu monitoramento através de EM de alta resolução tornando, portanto, desnecessário o estudo dos produtos de fragmentação. Segundo LIBBEY e SCANLAN (1984) os íons m/z 30 (NO^+) e m/z 42 ($\text{H}_2\text{C}=\text{N}^+=\text{CH}_2$) são comumente encontrados na maioria dos espectros das dialquilynitróaminas, sendo característicos para esses tipos de compostos. Esses íons estão presentes nos espectros das N-nitrosaminas identificadas nos extratos das linguças comerciais.

No caso de NDMA, o espectro de massa apresentou o íon molecular m/z 74 assim como o íon m/z 42 o qual é característico da perda de H_2NO (Figura 17).

A



B

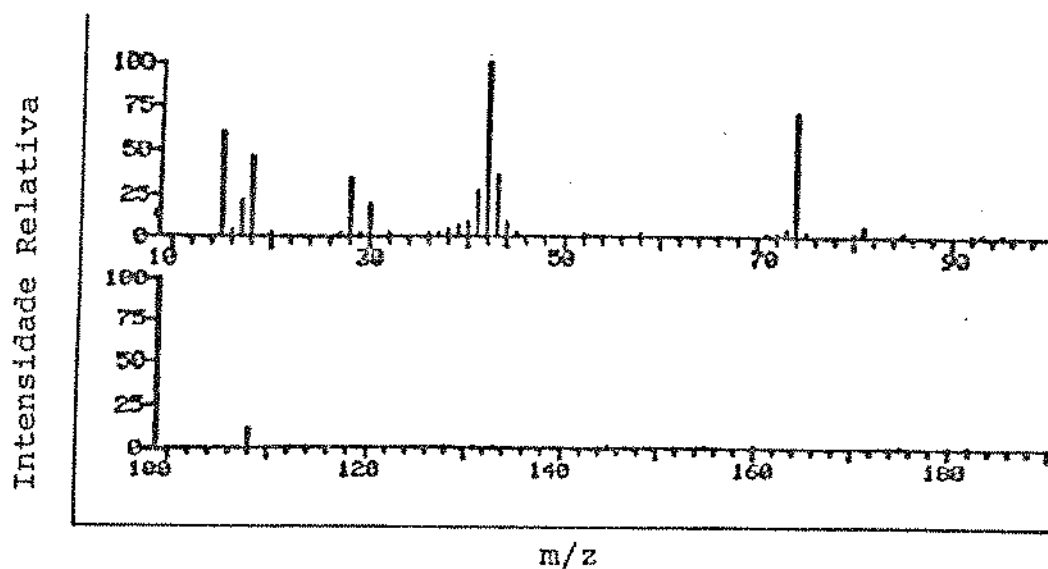


FIGURA 17: Espectro de massa de nitrosodimetilamina (NDMA). A. N-nitrosamina padrão; B. N-nitrosamina presente na língua comercial.

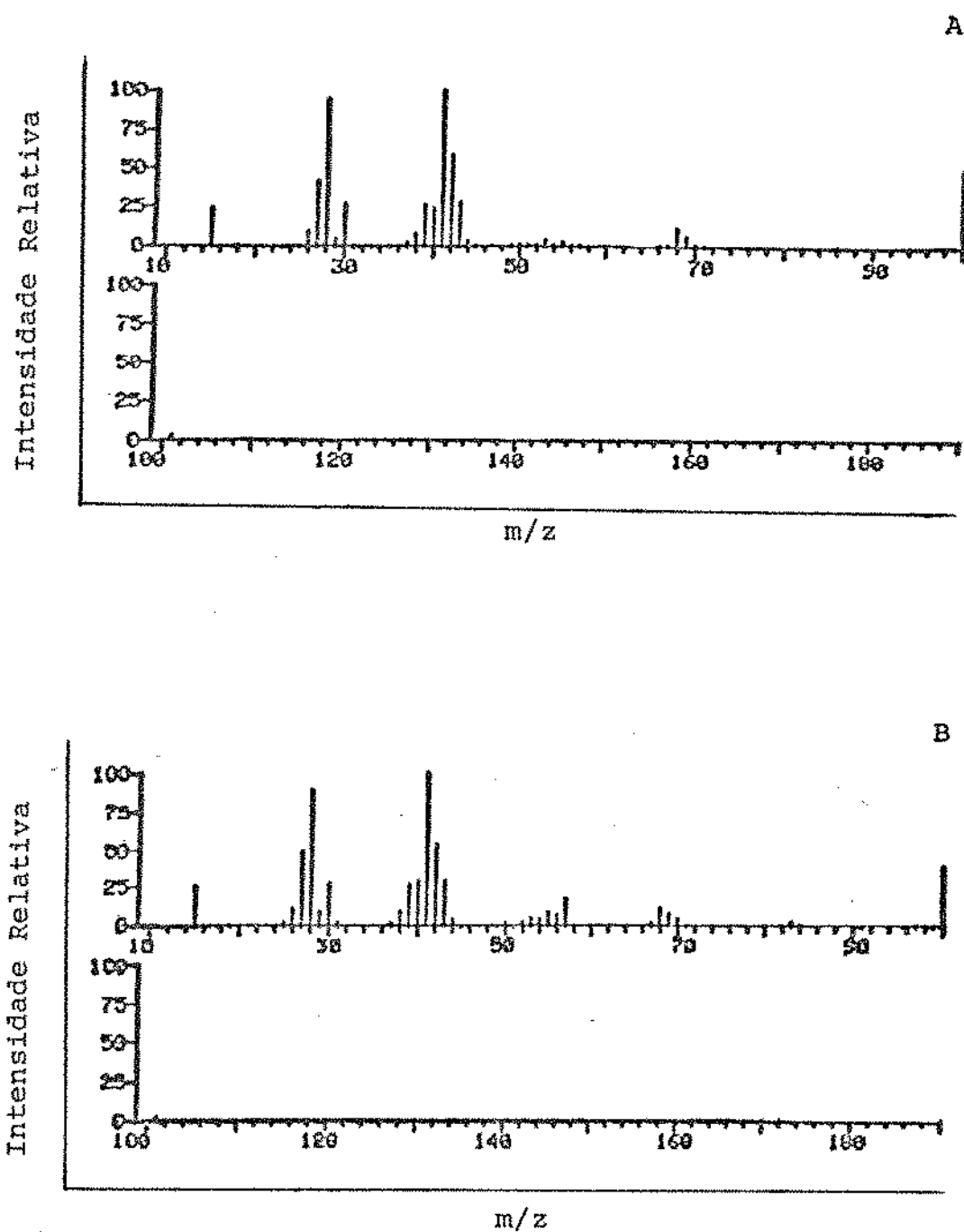


FIGURA 18: Espectro de massa de N-nitrosopirrolidina (NPIR).
A. N-nitrosamina padrão; B. N-nitrosamina presente na linguiça comercial.

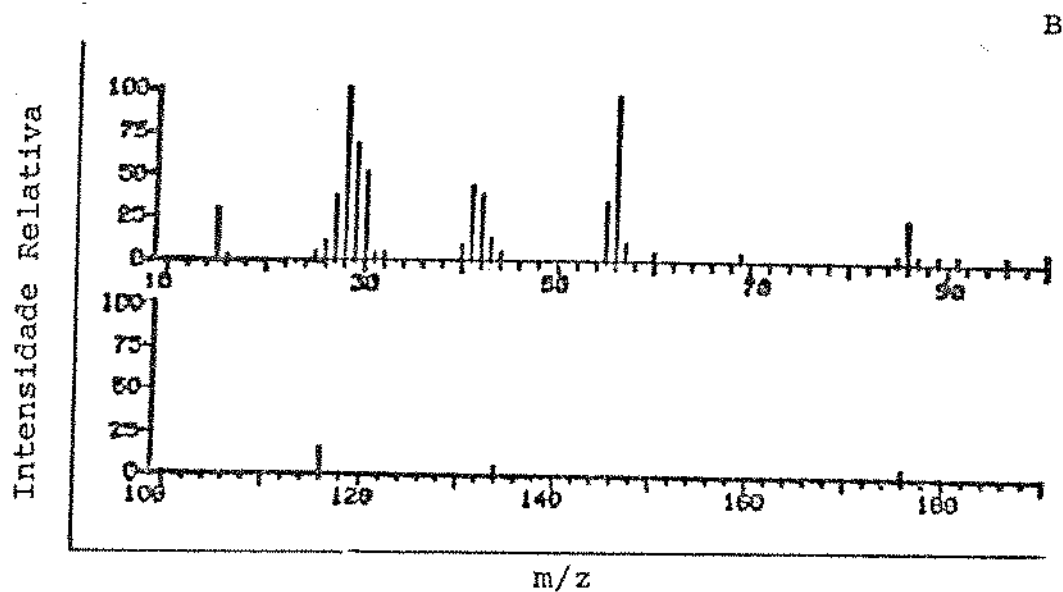
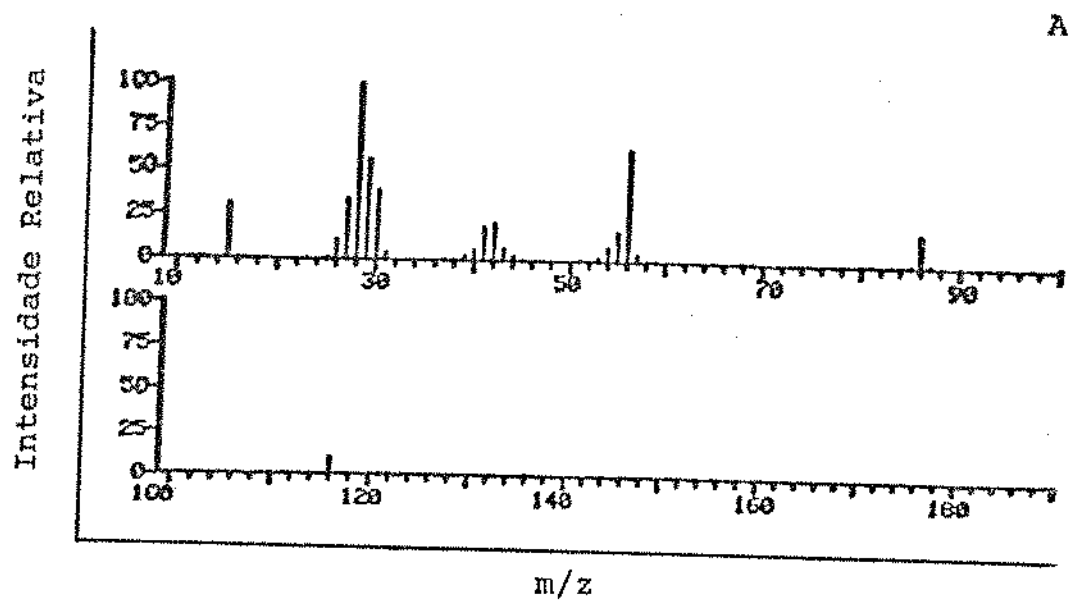


FIGURA 19: Espectro de massa de N-nitrosomorfolina (NMORF). A. N-nitrosammina padrão; B. N-nitrosammina presente na lingüica comercial.

O espectro de massa da NPIR mostrou o íon molecular m/z 100, como também o íon m/z 68 resultante da perda de H_2NO . O íon m/z 28 que aparece no espectro é, segundo LIBBEY e SCANLAN (1984) característico da molécula de NPIR (Figura 18).

No caso de NMORF o espectro de massa (Figura 19) também apresentou o íon molecular m/z 116, assim como os íons m/z 86 característicos da perda de NO , o íon m/z 56 que resulta da perda de CH_2O do íon m/z 86 e, ainda, o íon m/z 28 que resulta da perda de C_2H_4 do íon m/z 56 conforme relatado por LIBBEY E SCANLAN, 1984.

VI- CONCLUSÕES:

Em relação aos teores residuais de nitrito e de nitrato em linguiças comerciais, os resultados obtidos indicaram que para as amostras provenientes de fabricantes conhecidos e daquelas não identificadas, 3% e 31% das amostras, respectivamente, apresentaram teores de nitrato associado a nitrito acima dos limites de tolerância estabelecidos pela legislação brasileira em vigor. Esses dados mostram a necessidade de uma fiscalização mais eficiente por parte dos órgãos competentes, assim como um maior controle por parte dos produtores que utilizam os aditivos mencionados.

Durante as etapas de processamento e estocagem das linguiças ocorre perda do teor residual de nitrito, sendo a mesma maior na presença de ascorbato de sódio e nas amostras de linguiça cozida. Quanto ao teor de nitrato residual, não foi verificada variação aparente durante o processamento, assim como no período de estocagem, tanto para a linguiça tipo frescal como para a do tipo cozida.

Com relação a taxa de crescimento microbiano (contagem total de mesófilos e psicrófilos) a adição de 200 mg/kg de NaNO_2 , na presença ou não de 500 mg/kg de ascorbato de sódio, proporciona conservação satisfatória por um período de até 12 e 30 dias de armazenamento ($4 \pm 2^\circ\text{C}$) para as linguiças tipo frescal e cozida, respectivamente.

A avaliação sensorial de cor e de preferência indicou que, as linguças contendo nitrito e nitrito mais ascorbato apresentaram melhor aceitação em relação à amostra controle, sendo a mesma maior nas linguças contendo nitrito e ascorbato de sódio.

O fato de todas as amostras de linguças comerciais estudadas terem apresentado a presença de N-nitrosodimetilamina (NDMA) e N-nitrosopirrolidina (NPIR), assim como na maioria das amostras, ter sido verificada a N-nitrosomorfolina (NMORF), em níveis, em geral, maiores do que aqueles reportados recentemente na literatura, indica a necessidade de estudos adicionais, no Brasil, para se estabelecer um banco de dados a respeito do conteúdo de N-nitrosaminas em carnes curadas.

O conjunto dos resultados obtidos indicam que a adição de até 200 mg/kg de nitrito de sódio em linguças não induz a formação de níveis elevados de N-nitrosaminas voláteis, além de proporcionar características sensoriais e de conservação adequadas ao produto. Quanto ao ascorbato de sódio, os resultados indicaram que o uso deste composto poderia ser recomendado na formulação de linguça (em concentração de 500 mg/kg) para inibir a formação de N-nitrosaminas, auxiliando ainda as características sensoriais de cor e de preferência do produto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AOAC. Official Methods of Analysis. 13th Ed., Washington, D.C., 20044, 1980., 1018 p.

AOAC. Official Methods of Analysis. 14th Ed., Arlington Virginia, 22209, USA., 1984, 1141 p.

ARAÚJO, A.C.P. Determinação de nitratos e nitritos em alimentos destinados à população infantil. Tese de Mestrado - Curso de Pós-Graduação em Farmácia, Área de Análises Toxicológicas - USP, 1988.

ASHTON, M.R. "The occurrence of nitrates and nitrites in foods". Literature Survey British Food Manufacturing Industries. Research Association, Nº 7, 1970, 31 pp.

BILLS, D.D.; HILDRUM, K.I.; SCANLAN, R.A. and LIBBEY, L.M. "Potential precursors of N-nitrosopyrrolidine in bacon and other fried foods". J. Agr. Food Chem., Vol. 21, Nº 5, 1973.

BINKERD, E.F. and KOLARI, O.E. "The history and use of nitrite and nitrate in the curing of meat". Food Cosmet. Toxicol., 13: 655-661, 1975.

BOGOVSKI, P.; ROOMA, M.; UIBU, J.; KANN, J. and TAUTS, O.
"Research on environmental N-nitroso compounds in the USSR".
In: Bartsch, H.; O'Neill, I.K.; Castegnaro, M.; Okada, M. eds.
N-nitroso compounds: Occurrence and Biological Effects (IARC
Scientific Publications Nº 41), Lyon International Agency for
Research on Cancer, pp. 259-266, 1982.

BRASIL, LEIS E DECRETOS. Resolução Nº 9 de 1976. Diário
Oficial da União. Brasília - DF., 28 de maio de 1976.

BRASIL, LEIS E DECRETOS. Resolução Nº 4 de 24 de Novembro de
1988. Diário Oficial da União, Brasília - DF., 19 de Dezembro
de 1988.

BLIGH, E.C. and DYER, W.J. "A rapid method of total lipid
extraction and purification". Can. J. Biochem. Physiol., 37:
911-917, 1959.

BUSHWAY, A.A. and JEN, K.W.C. "Residual nitrite concentration
and total plate counts in white and dark chicken patties". J.
of Food Protection, Vol. 47, Nº 2, p. 119-121, 1984.

BUTHLER, S.J. "USDA's role and plans regarding use of nitrite
in cured meats". Food Technology, p. 252, 1980.

CASSENS, R.G.; GREASER, M.L.; ITO, T.; and LEO, M. "Reactions
of nitrite in meat". Food Technology, p. 46, (July 1979).

CAST - Council for Agriculture Science and Technology.
"Nitrite in meat curing: Risk and benefits". Report N° 74,
March 6, 1978.

CHO, I.C. and BRATZLER, L.J. "Effect of sodium nitrite on
flavor of cured pork". J. of Food Science, Vol. 35, 1970.

COCHRAN, W.G. and COX, G.M. "Experimental designs". 2nd ed.,
New York, Wiley, 1957.

CONTRERAS, G.E.S.; STRONG III, F.C. and DA SILVA, W.J. "Fatty
acid and vitamin E content of Nutrimaiz-a sugary-1/opaque-1
corn cultivar". J. Agric. Food Chem., 30: 1113-1117, 1982.

CROSBY, N.T.; FOREMAN, J.K.; PALFRAMAN, J.F. and SAWYER, R.
"Estimation of steam-volatile N-nitrosamines in food at the
1 ug/kg level". Nature, 238: 342-343, 1972.

DRYDEN, F.D. and BIRDSALL, J.J. "Why nitrite does not impart
color". Food Technology, 29, July 1980.

DUDLEY, R. "Bacon processors aim at three new targets". The
National Provisioner, p. 11, September 9, 1978.

ENDER, F.; HARVE, G.N.; HELGEBOSTAD, A.; KOPPANE, N.; MADSEN,
R. and CHEH, L. "Isolation and identification of hepatotoxic
factor in herring meal produced from sodium nitrite preserved
herring". Naturwissenschaften, 24: 637-638, 1964.

FAN, T.Y. and TANNENBAUM, S.R. "Stability of N-nitroso compounds". J. of Food Science, Vol. 37, 274, 1972.

FAN, T.Y. and TANNENBAUM, S.R. "Factors influencing the rate of formation of nitrosomorpholine from morpholine and nitrite: Acceleration by thiocyanate and other anions". J. Agric. Food Chem., Vol. 21, N° 2, 237, 1973.

FASSET, D.W. "Nitrates and Nitrites". Toxicants occurring naturally in foods, Committee on Food Protection, National Research Council, Chapter 1, p. 7-25, Washington, D.C., 1973, 624 p.

FAZIO, T.; DAMICO, J.N.; HOWARD, J.W.; WHITE, R.H. and WATTS, J.O. "Gas chromatographic determination and mass spectrometric confirmation of N-nitrosodimethylamine in smoke-processed marine fish". J. Agr. Food Chem., Vol. 19, N° 2, 250, 1971.

FAZIO, T.; WHITE, R.H.; DUSOLD, L.R. and HOWARD, J.W. "Nitrosopyrrolidine in cooked bacon". J. of the Assoc. Off. Anal. Chem., Vol. 56, N° 4, p. 919, 1973.

FAZIO, T. and HAVERY, D.C. "Volatile N-nitrosamines in direct flame dried processed foods". In: Bartsch, H.; O'Neill, I.K.; Castegnaro, M.; Okada, M., eds. "N-nitroso compounds: Occurrence and biological effects" (IARC Scientific Publications N° 41), Lyon International Agency for Research on Cancer, pp. 277-286, 1982.

FIDDLER, W.; PENSABENE, J.W.; PIOTROWSKI, E.G.; DOERR, R.C. and WASSERMAN, A.E. "Use of sodium ascorbate or erythorbate to inhibit formation of N-nitrosodimethylamine in frankfurters". J. of Food Science, Vol. 38, 1084, 1973.

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

FINE, D.H.; RUFEB, F.; LIEB, D. and ROUNBEHLER, D.P. "Description of the Thermal Energy Analyzer (TEA) for trace determination of volatile and nonvolatile N-nitroso compounds" Analytical Chemistry, Vol. 47, N° 7, 1188, 1975.

FONSECA, H.R. "Relação nitrato-nitrito em carnes tratadas com sal nitrado". Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias, p. 232, Vol. 77, N° 464, 1982.

FOREMAN, J.K. and GOODHEAD, K. "The formation and analysis of N-nitrosamines". J. Sci. Food Agric., 26: 1771-1783, 1975.

FORREST, J.C.; ABERLE, E.D.; HEDRICK, H.B.; JUDGE, M.D. and MERKEL, R.A. "Principles of meat science". W.H. Freeman and Co., San Francisco, 1975, 417 pp.

FOX, J.B.Jr. "The chemistry of meat pigments". Food Processing
Vol. 14, Nº 3, p. 207, May-June 1966.

FOX, J.B.Jr. and NICHOLAS, R.A. "Nitrite in meat. Effect of
various compounds on loss of nitrite". J. Agr. Food Chem.,
Vol. 22, Nº 2, p. 302-306, 1974.

GILLILAND, S.E.; BUSTA, F.F.; BRINDA, J.J. and CAMPBELL, J.E.
"Aerobic plate count". Compendium of Methods for
Microbiological Examination of Foods, Chapter 4, p. 107, 1976.

GOUGH, T.A.; GOODHEAD, K. and WALTERS, G.L. "Distribution of
some volatile nitrosamines in cooked bacon". J. Sci. Food
Agric., 27: 181-185, 1976.

GOUGH, T.A.; McPHAIL, M.F.; WEBB, K.S.; WOOD, B.J. and
COLEMAN, R.F. "An examination of some foodstuffs for the
presence of volatile nitrosamines". J. Sci. Food Agric., 28:
345-351, 1977.

GRANER, M.; FONSECA, H. and BASSO, L.G. "Composição química de
salames nacionais". Ciênc. Tecnol. Alimentos, 3(1): 48-57,
1983.

GRAY, J.I. and DUGAN, L.R.Jr. "Formation of nitrosopyrrolidine
from proline and collagen". J. of Food Science, Vol. 40, 484,
1975a.

GRAY, J.I. and DUGAN, L.R.Jr. "Inhibition of N-nitrosamine formation in model systems". J. of Food Science, Vol. 40, 981, 1975b.

GRAY, J.I. "N-nitrosamines and their precursors in bacon: A review". J. Milk Food Technology, Vol. 39, N° 10, p. 686, 1976.

GRAY, J.I. "N-nitrosamine precursors in bacon". J. Inst. Can. Technol. Aliment., Vol. 10, N° 1, A15, 1977.

GRAY, J.I. and RANDALL, C.J. "The nitrite/N-nitrosamine problem in meats: An update". J. of Food Protection, Vol. 42, N° 2, p. 168, 1979.

HALL, R.C. "The nitrogen detector in gas-chromatography". Crit. Rev. Anal. Chem., 7: 323-380, 1978.

HAVERY, D.C.; KLINE, D.A.; MILETTA, E.M.; JOE, F.L.Jr. and FAZIO, T. "Survey of food products to volatile N-nitrosamine". J. of the Assoc. Off. Anal. Chem., Vol. 59, N° 3, p. 540, 1976.

HAVERY, D.C.; FAZIO, T. and HOWARD, J.W. "Survey of cured meat products of volatile N-nitrosamines: Comparison of two analytical methods". J. of the Assoc. Off. Anal. Chem., Vol. 61, N° 6, 1374, 1978a.

HAVERY, D.C.; FAZIO, T. and HOWARD, J.W. "Trends in levels of N-nitrosopirrolidine in fried bacon". J. of the Assoc. Off. Anal. Chem., 61: 1380, 1978b.

HAVERY, D.C. and FAZIO, T. "Human exposure to nitrosamines from feeds". Food Technology, p. 80, 1985.

HILDRUM, K.I. and SCANLAN, R.A. "Factors influencing the rate of formation of volatile N-nitrosamines during the nitrosation of spermidine". J. Agric. Food Chem., Vol. 25, Nº 2, 255, 1977.

HOTCHKISS, J.H.; LIBBEY, L.M.; BARBOUR, J.F. and SCANLAN, R.A. "Combination of a GC-TEA and GC-MS-Data system for the ug/kg estimation and confirmation of volatile N-nitrosamines in foods". IARC Scientific Publications, Nº 31, 361, 1980a.

HOTCHKISS, J.H.; LIBBEY, L.M. and SCANLAN, R.A. "Confirmation of low ug/kg amounts of volatile N-nitrosamines in foods by low resolution mass spectrometry". J. of the Assoc. Off. Anal. Chem., Vol. 63, Nº 1, 74, 1980b.

HUNT, M.C. "Nitrite and chemistry of cured color". II Curso Internacional sobre Tecnologia da Carne, CTC - Centro de Tecnologia da Carne, Instituto de Tecnologia de Alimentos - Campinas, SP., p. 241-248, 1981.

HUXEL, E.T.; SCANLAN, R.A. and LIBBEY, L.M. "Formation of N-nitrosopyrrolidine from pyrrolidine ring compounds at elevated temperatures". J. Agric. Food Chem., Vol. 22, N° 4, 698, 1974.

IARC. "Report of the Subcommittee on Analytical Methods for N-nitroso Compounds". In: Bogovski, P.; Prewssman, R.; Walker, E.A. eds. N-nitroso compounds analysis and formation (IARC Scientific Publications N° 3), Lyon - International Agency for Research on Cancer, pp. 92-94, 1972.

IFT - INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS. "Nitrite Safety Council. A survey of nitrosamines in sausage and dry-cured meat products. Food Technology, 34(7): 45, July 1980.

IFT - INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS. Scientific Status Summary. "Nitrate, nitrite and nitroso compounds in foods". Food Technology, 41(4): 127-134, 136, 1987.

KEENEY, D.R. "Nitrates in plants and waters". J. Milk Food Technol., 33: 425, 1970.

KUBBEROD, G.; CASSENS, R.G. and GREASER, M.L. "Reaction of nitrite with sulfhydryl groups of myosin". J. of Food Science, Vol. 39, 1228, 1974.

LARA, W.H.; TAKAHASHI, M.Y. and SILVEIRA, N. "Determinação de nitritos e nitratos em conservas de carne". Rev. Inst. Adolfo Lutz, 38(2): 161-166, 1978.

LARA, W.H.; TAKAHASHI, M.Y. and YABIKU, H.Y. "Níveis de nitratos em alimentos infantis". Rev. Inst. Adolfo Lutz, 40(2): 147-152, 1980.

LEE, S.H. and CASSENS, R.G. "Nitrite binding sites on myoglobin". J. of Food Science, Vol. 41, 969, 1976.

LEE, S.H.; CASSENS, R.G.; WINDER, W.C. and FENNEMA, O.R. "Factors affecting the formation of nitrate from added nitrite in model systems and cured meat products". J. of Food Science, Vol. 43, 673, 1978.

LESTNER, L. "New nitrite regulation of West Germany". Fleischwirtschaft, 61(2), 252, 1981.

LIBBEY, L.M. and SCANLAN, R.A. "Mass spectrometry of N-nitrosamines". Mass Spectrometry in Environmental Sciences. Edited by Karasek, F.W.; Hutzinger, O. and Safe, S. p. 537-549, 1984.

MacDONALD, B.; GRAY, J.I.; KAKUDA, Y. and LEE, M.L. "Role of nitrite in cured meat flavor: Chemical analysis". J. of Food Science, Vol. 45, p. 889, 1980.

MacDOUGALL, D.B.; MOTTRAM, D.S. and RHODES, D.N. "Contribution of nitrite and nitrate to the color and flavour of cured meat". J. Sci. Food Agric., 26, 1743-1754, 1975.

MAFF - MINISTRY OF AGRICULTURE FISHERIES AND FOOD. "Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds in food". Food Surveillance Paper N° 20, London, 1987.

MAGA, J.A. "Amines in Foods". CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, p. 373, 1978.

MAGEE, P.N. and BARNES, J.M. "The production of malignant primary hepatic tumors in the rat by feeding dimethylnitrosamine". Br. J. Cancer, 10, 114, 1956.

MAGEE, P.N. and BARNES, J.M. "Carcinogenic N-nitroso compounds". Adv. Cancer Res., 10, 164-246, 1967.

MAYO, N.S. "Cattle poisoning by potassium nitrate". Kans. Agric. Exp. Stn. Bull. 49, Manhattan, Kans., 1895.

MILLER, S.A. "Balancing the risks regarding the use of nitrites in meats". Food Technology, p. 254, May, 1980.

MIRVISH, S.S. "Kinetics of dimethylamine nitrosation in relation to nitrosamine carcinogenesis". J. Natl. Cancer Inst., 44, 633, 1970.

MORENO, A.G. "Sobre o emprego do nitrito de sódio em diferentes dosagens na preparação de mortadelas". Tese de Livre Docência - USP., São Paulo - SP., 1979.

MOTTRAM, D.S.; PATTERSON, R.L.S.; RHODES, D.N. and GOUGH, T.A. "Influence of ascorbic acid and pH on the formation of N-nitrosodimethylamine in cured pork containing added dimethylamine". J. Sci. Food Agric., 26, 47-53, 1975.

MOTTRAM, D.S.; PATTERSON, R.L.S.; EDWARDS, R.A. and GOUGH, T.A. "The preferential formation of volatile N-nitrosamines in the fat of fried bacon". J. Sci. Food Agric., 28, 1025-1027, 1977.

NAKAMURA, M.; BABA, M.; NAKAOKA, T.; WADA, Y.; ISHIBASHI, T. and KAWABATA, T. "Pathways of formation of N-nitrosopyrrolidine in fried bacon". J. of Food Science, Vol. 41, p. 874, 1976.

OLIVEIRA, S.A.; SCHNEIDER, I.S. and SANTOS, J.C. "Níveis de nitrito no sal marinho industrial, no charque e no "jerked beef". Boletim da Soc. Bras. de Ciênc. e Tecnol. Alim. (SBCTA), 16(4): 337-348, 1982.

OHSHIMA, H. and BARTSCH, H. "Quantitative estimation of endogenous nitrosation in humans by monitoring N-nitrosoproline excreted in the urine". Cancer Res., 41: 3658, 1981.

PANNALAKS, T.; IYENGRA, J.R.; DONALDSON, B.A.; MILES, W.F. and SEN, N.P.. "Further survey of cured meat products for volatile N-nitrosamines". J. of the Assoc. Off. Anal. Chem., Vol. 57, N° 4, p. 806-812, 1974.

PATTERSON, L.S. and MOTTRAM, D.S. "The occurrence of volatile amines in uncured and cured pork meat and their possible role in nitrosamine formation in bacon". J. Sci. Food Agric., 25, 1419-1425, 1974.

PENSABENE, J.W.; FIDDLER, W.; GATES, R.A.; FAGAN, J.C. and WASSERMAN, A.E. "Effect of frying and other cooking conditions on nitrosopyrrolidine formation in bacon". J. Food Sci., 39: 314, 1974.

PENSABENE, J.W.; FIDDLER, W.; FEINBERG, J. and WASSERMAN, A.E. "Evaluation of ascorbyl monoester for the inhibition of nitrosopyrrolidine formation in a model system". J. of Food Science, Vol. 41, p. 199, 1976.

PENSABENE, J.W.; MILLER, A.J.; GREENFIELD, E.L. and FIDDLER, W. "Rapid dry column method for determination of N-nitrosopyrrolidine in fried bacon". J. of the Assoc. Off. Anal. Chem., Vol. 65, N° 1, 151, 1982.

PHILLIPS, W.E.J. "Nitrate content of foods - Public health implications". J. Inst. Can. Technol. Aliment., Vol. 1, N° 3, 98, 1968.

PHILLIPS, W.E.J. "Naturally occurring nitrate and nitrite in foods in relation to infant methemoglobinemia". Food Cosmet. Toxicol., 9: 219, 1971.

REYES, F.G.R. and SCANLAN, R.A. "N-nitrosaminas: Formação e ocorrência em alimentos". Boletim da Soc. Bras. Ciênc. Tecnol. Alim. (SBCTA), Campinas, 18(4): 299-309, Out./Dez., 1984.

ROBACH, M.C.; DWENS, J.L.; PAQUETTE, M.W.; SOFOS, J.N. and BUSTA, F.F. "Effects of various concentrations of sodium nitrite and potassium sorbate on nitrosamine formation in commercially prepared bacon". J. of Food Science, Vol. 45, p. 1280, 1980.

ROBERTS, T.A. "The microbiological role of nitrite and nitrate". J. Sci. Food Agric., 26, 1755-1760, 1975.

SCANLAN, R.A. "N-nitrosamines in foods". CRC Critical Reviews in Food Technology, Vol. 5, Issue 4, p. 357, 1975.

SCANLAN, R.A. "Formation and occurrence of nitrosamines in food". Cancer Res., 43, 2435, May 1983.

SCANLAN, R.A. and REYES, F.G.R. "An update on analytical techniques for N-nitrosamines". Food Technology, p. 95, January, 1985.

SEBRANEK, J.G. and CASSENS, R.G. "Nitrosamines: A review". J. Milk Food Technol., Vol. 36, N° 2, p. 76, 1973.

SEBRANEK, J.G. "Advances in the Technology of nitrite use and consideration of alternatives". Food Technology, 58, July 1979.

SEN, N.P. "The evidence for the presence of dimethylnitrosamine in meat products". Food Cosmet. Toxicol., 10, 219-223, 1972.

SEN, N.P.; MILLES, W.R.; DONALDSON, B.A.; PANALAKS, T. and IYENGAR, J.R. "Formation of nitrosamines in a meat curing mixture". Nature (Lond.), 245, 104-105, 1973.

SEN, N.P.; DONALDSON, B.C.; CHARBONNEAU, C. and MILES, W.F. "Effect of additives on the formation of nitrosamines in meat curing mixtures containing species and nitrite". J. Agr. Food Chem., Vol. 22, N° 6, p. 1125, 1974.

SEN, N.P.; IYENGAR, J.R.; MILES, W.F. and PANALAKIS, T. "Nitrosamines in cured meat products". In: Walker, E.A.; Bogovski, P. e Griciute, L.; eds. Environmental N-nitroso Compounds Analysis and Formation, (IARC Scientific Publications N° 14) p. 333-342, 1976.

SEN, N.P.; DONALDSON, B.; SEAMAN, S.; COLLINS, B. and IYENGAR, J.Y. "Recent nitrosamine analyses in cooked bacon". Can. Inst. Food Sci. Technol. J., Vol. 10, N° 1, A- 13-14, 1977.

SEN, N.P.; SEAMAN, S. and MILES, W.F. "Volatile nitrosamines in various cured meat products: Effect of cooking and recent trends". J. Agric. Food Chem., Vol. 27, N° 6, p. 1354, 1979.

SEN, N.P. and SEAMAN, S. "Gas-liquid chromatographic thermal energy analyzer. Determination of N-nitrosodimethylamine in beer at low parts per billion level". J. of the Assoc. Off. Anal. Chem., Vol. 64, N° 4, p. 933, 1981.

SEN, N.P.; SEAMAN, S. and TESSIER, L. "A rapid and sensitive method for the determination of nonvolatile N-nitroso compounds in foods and human urine: Recent data concerning volatile N-nitrosamines in dried foods and malt based leverages". In: Bartsch, H.; O'Neill, I.K.; Castegnaro, M.; Okada, M. eds. N-Nitroso Compounds: Occurrence and Biological effects (IARC Scientific Publications N° 41), Lyon International Agency for Research on Cancer, pp. 185-197, 1982.

SEN, N.P. and KUBACKI, S.J. "Review of methodologies for the determination of nonvolatile N-nitroso compounds in foods". Food Additives and Contaminants, Vol. 4, N° 4, 357-383, 1987.

SINGER, G.M. and LIJINSKY, W. "Naturally occurring nitrosable compounds. I. Secondary amines in foodstuffs". J. Agric. Food Chem., Vol. 24, N° 3, 550, 1976.

SOFOS, J.N. and BUSTA, F.F. "Alternatives to the use of nitrite as antibotulinal agent". Food Technology, 244, May 1980.

SPIEGELHALDER, B.; EISENBRAND, G. and PREUSSMANN, R. "Volatile nitrosamines in food". Oncology, 37: 211, 1980.

STEPHANY, R.W.; FREUDENTHAL, J. and SCHULLER, P.L. "Quantitative and qualitative determination of some volatile nitrosamines in various meat products". In: Walker, E.A.; Bogovski, P. and Griciune, L., eds. Environmental N-nitroso Compounds Analysis and Formation, Lyon (IARC Scientific Publications N° 14), p. 343-354, 1976.

SWANN, P.F. "The toxicology of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds". J. Sci. Food Agric., 26, 1761-1770, 1975.

TANNENBAUM, S.R. "A policy perspective on safety: Nitrite and nitrate". Public Issue Report, Roche Inc. Nutley, New Jersey, USA, 1984.

WALKER, R. "Naturally occurring nitrate/nitrite in foods". J. Sci. Food Agric., 26, 1735-1742, 1975.

WALTERS, C.L.; SMITH, P.L. and REED, P.I. "Pitfalls to avoid in determining N-nitroso compounds as a group". In: O'Neill, I.K.; Von Borstel, R.C.; Miller, C.T.; Long, J. and Bartsch, H., eds. N-nitroso Compounds: Occurrence, Biological Effects and Relevance to Human Cancer (IARC Scientific Publications N° 57), Lyon, International Agency for Research on Cancer, pp. 113-119, 1984.

WAGNER, D.A. and TANNENBAUM, S.R. "In vivo formation of N-nitroso compounds". Food Technology, p. 89, January 1985.

WASSERMAN, A.E. and TALLEY, F. "The effect of sodium nitrite on the flavor of frankfurters". J. of Food Science, Vol. 37, 536, 1972.

WHITE, J.W.Jr. "Relative significance of dietary sources of nitrate and nitrite". J. Agric. Food Chem., Vol. 23, N° 5, 886, 1975.

W.H.O. "Nitrates, nitrites and N-nitroso compounds". Environmental Health Criteria 5, World Health Organization, Geneva, 1978.

WILTON, E.F.; TARDIFF, R.G. and McCARBE, L.J. "Nitrate in drinking water". J. Am. Water Works Assoc., 63: 95, 1971.

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

WOOLFORD, G., CASSENS, R.G.; GREASER, M.L. and SEBRANEK, J.G.
"The fate of nitrite: Reaction with protein". J. of Food
Science, Vol. 41: 585, 1976.

WOOLFORD, G. and CASSENS, R.G. "The fate of sodium nitrite in
bacon". J. of Food Science, Vol. 42, № 3, 586, 1977.