

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DOS ALIMENTOS**

**DETERMINAÇÃO DE NITROSAMINAS VOLÁTEIS EM SALSICHAS
“HOT-DOG”**

Camila Braga Dutra
Farmacêutica Bioquímica Tecnóloga de
Alimentos

Prof. Dr. Felix G. Reyes Reyes
Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos para a obtenção do título de
Mestre em Ciências de Alimentos.

Campinas – SP
2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

D953d Dutra, Camila Braga
Determinação de nitrosaminas voláteis em salsichas
“hot-dog” / Camila Braga Dutra. – Campinas, SP: [s.n.],
2006.

Orientador: Felix Guillermo Reyes Reyes
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Nitrosaminas voláteis. 2. Salsichas. 3.
Microextração em fase sólida. I. Reyes Reyes, Felix
Guillermo. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(ckn/fea)

Titulo em ingles: Determination of volatile nitrosamines in hot-dog sausage

Palavras-chave em inglês (Keywords): Volatile nitrosamines, Sausages,
Solid-Phase microextraction

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Felix Guillermo Reyes Reyes

Marcelo Alexandre Prado

Sílvia de Oliveira Santos Cazenave

Flávia Pereira da Silva Airoidi Aguayo

BANCA EXAMINADORA

Felix Guillermo Reyes Reyes
FEA-UNICAMP
Presidente

Marcelo Alexandre. Prado
FEA-UNICAMP
Membro

Silvia de Oliveira Santos Cazenave
PUC-Campinas
Membro

Flávia Pereira da Silva Airoidi Aguayo
FEA-UNICAMP
Membro

Campinas – SP

Dedico e agradeço especialmente a minha família.

AGRADECIMENTOS

A *Deus*, pelas conquistas alcançadas.

A *Mãe Rainha e Vencedora Três Vezes Admirável de Schöenstatt*, por iluminar o meu caminho e guiar meus passos.

A *minha família* pelo amor, apoio e compreensão.

Aos meus pais, *Santoniro e Eloisa Helena*, pelo amor, incentivo, apoio e compreensão.

A minha irmã, *Cláudia*, pelo apoio e incentivo.

À *Faculdade de Engenharia de Alimentos*, especialmente ao *Departamento de Ciências de Alimentos*, pela oportunidade em realizar o curso.

Ao professor *Felix* pela amizade, ensinamentos e orientação durante o curso.

A professora *Susanne* pela colaboração e amizade.

Aos membros da *Banca Examinadora* pelas sugestões apresentadas.

À professora *Marta do Canto e Maria da Graça* pelo incentivo.

Às amigas *Elizete e Silvane* pela amizade, incentivo e apoio.

À *Lísia* pela amizade, carinho, companheirismo, incentivo e apoio.

À *Raquel Andrade e Marili* pela amizade e contribuição para a realização deste trabalho.

Às amigas *Regina e Juliana* pela amizade e apoio.

À *Elede* pela amizade, incentivo e apoio.

Às amigas *Mônica e Samanta* pela amizade, incentivo, apoio e companheirismo.

Às amigas *Claudia , Fabiane , Raquel, Lucielen, Luciane, Giovanna e Roberta* pela amizade, apoio e companheirismo.

Aos amigos *Cedenir, Roger, Rodrigo, Cristiano e Fabiane* pela amizade.

Ao grupo *“Sementes de Amor”*, em especial a *Carluza* pela amizade, incentivo e orações.

Às amigas *Marcelle e Maira* pela amizade, ainda que distante.

Aos *amigos distantes e aos novos amigos* pela amizade, apoio e incentivo.

Aos *colegas do curso* pela amizade.

Aos *colegas do Laboratório de Toxicologia, Gustavo, Silvia Helena, Patrícia e Flávia* pela amizade e incentivo.

Ao *peçoal do Laboratório do IQ, Eduardo, Larissa, Jonas, Mônica* pela amizade.

Ao *CNPQ* pela bolsa de estudo concedida.

A todas as pessoas que não foram mencionadas e que de alguma forma auxiliaram para a realização desse trabalho.

Muito obrigada.

Camila

*De tudo ficam três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando...
A certeza de que precisamos continuar...
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...*

*Portanto, devemos:
Fazer da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro...*

Fernando Pessoa

ÍNDICE

RESUMO GERAL.....	xiii
SUMMARY.....	xiv
INTRODUÇÃO GERAL.....	1

CAPÍTULO 1

NITROSAMINAS VOLÁTEIS EM ALIMENTOS - REVISÃO.....	5
RESUMO.....	5
SUMMARY.....	5
INTRODUÇÃO.....	5
ASPECTOS QUÍMICOS E FÍSICO QUÍMICOS DAS NITROSAMINAS.....	6
ASPECTOS TOXICOLÓGICOS.....	8
ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	9
OCORRÊNCIA EM ALIMENTOS.....	10
CARNES E DERIVADOS.....	11
LEITE E LATICÍNIOS.....	16
PEIXES E FRUTOS DO MAR.....	17
VEGETAIS.....	21
OUTROS ALIMENTOS.....	22
LEGISLAÇÃO.....	24
RECOMENDAÇÕES.....	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25

CAPÍTULO 2

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA PARA A DETERMINAÇÃO DE NITROSAMINAS VOLÁTEIS EM SALSICHAS “HOT-DOG”.....	31
RESUMO.....	31

ABSTRACT.....	32
INTRODUÇÃO.....	32
MATERIAL E MÉTODOS.....	34
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
REFERÊNCIAS	54
CONCLUSÕES GERAIS.....	58

TABELAS

CAPÍTULO 1. Nitrosaminas voláteis em alimentos – Revisão.

Tabela 1. Teores de nitrosaminas em produtos cárneos.....	15
Tabela 2. Teores de nitrosaminas em leite e derivados.....	17
Tabela 3. Teores de nitrosaminas em peixes e frutos do mar.....	19
Tabela 4. Teores de NDMA em vegetais.....	21
Tabela 5. Teores de nitrosaminas em diversos alimentos.....	23
Tabela 6. Limite máximo permitido de nitrosaminas em alimentos.....	24

CAPÍTULO 2. Otimização e validação de microextração em fase sólida para a determinação de nitrosaminas voláteis em salsichas “hot-dog”.

Tabela 1. Codificação dos fatores.....	39
Tabela 2. Planejamento composto central 2^2	39
Tabela 3. Parâmetros de adequabilidade do sistema cromatográfico.....	43
Tabela 4. Figuras de mérito do sistema GC-TEA.....	44
Tabela 5. Condições ótimas de extração por HS-SPME-GC-TEA para cada nitrosamina.....	47
Tabela 6. Parâmetros de validação para determinação de nitrosaminas em salsichas por HS-SPME-GC-TEA.....	50

FIGURAS

CAPÍTULO 1. Nitrosaminas voláteis em alimentos - Revisão.

Figura 1. Reação geral de nitrosação.....	7
Figura 2. Formação de agentes nitrosantes.....	7
Figura 3. Formação de NDMA em produtos cárneos.....	12
Figura 4. Formação de N-nitrosopirrolidina (NPIR) a partir de N-nitrosoprolina (NPRO).....	13

CAPÍTULO 2. Otimização e validação de microextração em fase sólida para a determinação de nitrosaminas voláteis em salsichas “hot-dog”.

Figura 1. Cromatograma de uma solução padrão contendo 0,050 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NDMA, NDEA, NPIP NPIR e NPBA (padrão interno).....	42
Figura 2. Comparação da fibra PDMS-DVB e PDMS-DVB-CAR na extração de nitrosaminas de salsicha “hot-dog”. Condições: 250 ng de NDMA, NDEA, NPIP e NPIR. PDMS-DVB (t_{eq} : 10 min; T: 45 °C e t_{ex} : 25 min) e PDMS-DVB-CAR (t_{eq} : 10 min; adição de sal: 36 % p/v NaCl; T: 45 °C e t_{ex} : 45 min).....	45
Figura 3. Superfície de resposta para NDMA obtida no planejamento completo composto 2^2 . Área de NDMA x tempo de extração x temperatura.....	48
Figura 4. Superfície de resposta para NDEA obtida no planejamento completo composto 2^2 . Área de NDEA x tempo de extração x temperatura.....	48
Figura 5. Superfície de resposta para NPIP obtida no planejamento completo composto 2^2 . Área de NPIP x tempo de extração x temperatura.....	49

Figura 6.	Superfície de resposta para NPIR obtida no planejamento completo composto 2^2 . Área de NPIR x tempo de extração x temperatura.....	49
Figura 7.	Curvas de adição de padrão (n=3) para a NDMA, NDEA, NPIP e NPIR.....	51
Figura 8.	Cromatograma obtido por GC-TEA de uma amostra de salsicha “hot-dog” fortificada com $120 \mu\text{g Kg}^{-1}$ de cada uma das nitrosaminas e extraídas por SPME. Condições cromatográficas descritas anteriormente.....	52

ANEXOS

Anexo 1.	Estruturas das N-nitrosaminas voláteis estudadas e suas propriedades físicas e químicas.....	60
Anexo 2.	Estabilidade da solução $0,050 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NDMA, NDEA, NPIP e NPIR.....	61
Anexo 3.	Foto do sistema empregado para a microextração em fase sólida. Do lado esquerdo aparece o banho de recirculação de água (1) acoplado num pequeno reator encamisado (2) e do lado direito o frasco dentro do banho do reator com a fibra inserida e sob uma placa de agitação magnética.....	61

RESUMO GERAL

Nitrito e nitrato são os principais ingredientes usados no processo de cura conferindo aroma e cor avermelhada característicos dos produtos curados como, por exemplo, a salsicha e atuando como antioxidantes e antimicrobianos, impedindo o crescimento de *Clostridium botulinum*. O efeito tóxico mais relevante da presença de nitrato e nitrito é a formação de nitrosaminas as quais são compostos N-nitroso que podem ser formados da reação de agentes nitrosantes com aminas secundárias ou terciárias. A maior exposição a estes compostos acontece através dos alimentos, onde o modo de preparo e processamento tem grande influencia na quantidade de nitrosaminas presente no alimento, sendo que a formação de nitrosaminas durante o processamento pode ser reduzida por incorporação de inibidores, tais como, ácido ascórbico ou α -tocoferol. As nitrosaminas voláteis são as que mais ocorrem em alimentos, e são potentes carcinógenos em animais de laboratório induzindo tumores em vários órgãos. O propósito do presente estudo foi otimizar e validar o método de amostragem "headspace" por microextração em fase sólida (SPME, do inglês Solid Phase Microextraction) usando cromatografia gasosa acoplada a um detector de quimioluminescência (TEA, do inglês Thermal Energy Analyser) para a determinação de nitrosaminas voláteis em salsichas "hot-dog". As amostras foram adquiridas no comércio da cidade de Campinas, São Paulo. Nas amostras analisadas não foram encontradas nitrosaminas voláteis em níveis detectáveis. Diferentes modos de preparo, como cozimento em água e fritura, não contribuíram para a formação de nitrosaminas. Os resultados indicam a ausência de nitrosaminas nas amostras analisadas devido, possivelmente, aos baixos teores de nitrito disponível para a reação com as aminas presentes na carne e/ou pela ação efetiva do ascorbato de sódio atuando como inibidor da formação de nitrosaminas.

Palavras-chaves: nitrosaminas voláteis; salsicha "hot-dog"; microextração em fase sólida.

SUMMARY

During the curing process, nitrite and nitrate are the principal ingredients used for curing. They confer aroma and colored color characteristic of the cured meat as sausage, and act as antioxidants and antimicrobial, controlling the growth of *Clostridium botulinum*. The most important toxic effect of the presence of nitrate and nitrite is the formation of nitrosamines. These are N-nitroso compounds that can be formed by the reaction of the nitrosating agents with secondary or tertiary amines. The major exposure to these compounds happens through foodstuffs, where the procedures of preparation and processing have great influence in the present amount of nitrosamines in the food. The formation of nitrosamines during the processing can be reduced by incorporation of inhibitors, such as, ascorbic acid or α -tocopherol. The volatile nitrosamines are the ones that occur in foods more frequently, and are strong carcinogens in laboratory animals inducing tumors in a variety of organs. The purpose of the present study was to optimize and to validate a simple method using headspace sampling by solid-phase microextraction gas chromatography with thermal energy analyzer detector (HS-SPME-GC-TEA) for the determination of volatile nitrosamines in hot-dog sausages. The samples were purchased from local markets (Campinas, São Paulo). In the analyzed samples volatile nitrosamines have not been found in detectable levels. Different cooking procedures, as boiled in water and frying, did not contribute to the formation of nitrosamines. The results indicate the absence of nitrosamines in the samples analyzed possibly because of low content of available nitrite for the reaction with the amines found in the meat and because of the action of sodium ascorbate acting as inhibitor for the formation of nitrosamines.

Keywords: volatile nitrosamines; hot-dog sausage; solid-phase microextraction.

INTRODUÇÃO GERAL

Carnes curadas são aquelas cujas características originais da carne fresca foram alteradas, principalmente através da adição de sal, açúcar, temperos, nitrito e nitrato. O processo de cura da carne visa conservação e atribui características organolépticas como cor, sabor e aroma (JUDGE et al., 1989; ROÇA, 2005).

Dentre a grande variedade de carnes curadas encontradas no mercado temos a salsicha. Segundo o Instituto ACNielsen, o mercado nacional movimentou, no ano de 2004, 156.576 toneladas de salsichas (IPCE, 2005).

A presença de nitrito e nitrato tem o potencial de induzir diversos efeitos adversos à saúde, tais como metemoglobinemia e a formação de compostos carcinogênicos (WHO, 1978; MEAH et al., 1993). Diante do exposto a Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (ANVISA) estabeleceu como limite máximo para a presença, em produtos cárneos, de sais de sódio e potássio para nitrito e nitrato, $0,015\text{g } 100\text{g}^{-1}$ e $0,03\text{g } 100\text{g}^{-1}$, respectivamente (quantidade residual máxima expressa como nitrito de sódio).

O nitrito reage com aminas secundárias e terciárias formando nitrosaminas (WALKER, 1990). Estas são potentes carcinogênicos que podem induzir tumores em várias espécies animais (IARC, 1978; TRICKER & PREUSSMANN, 1991; GANGOLLI et al., 1994). O IARC (International Agency for Research on Cancer) considera suficientes as evidências de que nitrosodimetilamina (NDMA), nitrosodietilamina (NDEA), nitrosopiperidina (NPPI) e nitrosopirrolidina (NPIR) são carcinógenos para humanos (IARC, 1978).

A maior exposição a nitrosaminas acontece através da alimentação, onde o preparo e processamento dos alimentos influenciam na quantidade de substância ingerida (LIJINSKI, 1999).

A formação de nitrosaminas em carnes curadas depende entre muitos fatores do método de cozimento, concentração de nitrito residual e/ou adicionado, presença de catalisadores e inibidores (GRAY & DUGAN, 1975; HOTCHKISS & VECCHIO, 1985). Dentro da grande variedade de N-nitrosaminas existentes as que geralmente ocorrem em alimentos são as voláteis: N-nitrosodimetilamina

(NDMA); N-nitrosodietilamina (NDEA); N-nitrosodibutilamina (NDBA); N-nitrosopirrolidina (NPIR); N-nitrosopiperidina (NPIP); e N-nitrosotiazolidina (NTHZ) (DORADO et al., 2001).

Em alguns países da Europa e nos EUA, já existem limites para a presença de nitrosaminas em alimentos. No Brasil, além de não existir um monitoramento de compostos N-nitrosos em alimentos, não existe uma legislação definida.

Devido à presença freqüente da salsicha e outros produtos cárneos curados na dieta da população brasileira com conseqüente ingestão de nitrosaminas, torna-se necessária uma avaliação da presença destes compostos em alimentos industrializados.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi otimizar e validar o método de amostragem “headspace” por microextração em fase sólida (SPME, do inglês Solid Phase Microextraction) usando cromatografia gasosa acoplada a um detector de quimioluminescência (TEA, do inglês Thermal Energy Analyser) para a determinação de nitrosaminas voláteis em salsichas “hot-dog”.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/1004_98.htm. Acesso em: 3 jun. 2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 4 do dia 31 de março de 2000. Disponível em: <http://oc4j.agricultura.gov.br/agrolegis/Imagem?codArquivo=1641>. Acesso em: 25 maio 2005.
- DORADO, M.; SÁNCHEZ, A.; GONZÁLEZ, J. L. Nitrosamina en alimentos. **Alimentaria**, Madrid, v.1, p.39-42, 2001. ISSN 0300-5755.
- GANGOLLI, S. D.; VAN DEN BRANT, P. A.; FERON, V. J.; JANZOWSKI, C.; KOEMAN, J. H.; SPEIJERS, G. J. A.; SPIEGELHALDER, B.; WALKER, R.; WISHNOK, J. S. Assessment: nitrate, nitrite and N-Nitrosocompounds. **European Journal of Pharmacology, Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, Section 292, p.1-38, 1994. ISSN 0014-2999.
- GRAY, J.; DUGAN, I. Inhibition of N-nitrosamine formation in model food systems. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 40, n.5, p. 981-984, 1975. ISSN 0022-1147.

- HOTCHKISS, J. H. Review of analytical methods for N-nitrosamines in foods: Analytical methodology for sample preparation, detection, quantitation and confirmation of N-nitrosamines in food. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 64, n. 5, p.1027-1054, 1981. ISSN 004-5756.
- IARC. International Agency for Research on Cancer. Monographs Programme on the Evaluation of Carcinogenic Risks to humans. v.17, p.83, 1978 Disponível em <http://www-cie.iarc.fr/htdocs/indexes/vol17index.html> Acesso em: 02 dez. 2004.
- IPCE. INSTITUTO DE PESQUISA CAPACITAÇÃO ESPECIALIZAÇÃO. Disponível em: www.pontocritico.com.br/noticias.htm Acesso em: 25 maio 2005.
- JUDGE, M. D.; ABERLE, E. D.; FORREST, J. C.; HEDRICK, H. B.; MERKEL, R. A. **Principles of meat science**. 2ª ed. United States: Kendall/Hunt Publishing Company, 1989. p.142-145. ISBN 0-7167-0743-8.
- LIJINSKY, W. N-nitroso compounds in the diet. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 443, p. 129-138, 1999. ISSN 1383-5718.
- MEAH, M. N.; HARRISON, N.; DAVIES, A. Nitrates and nitrite in foods and the diet. **Food Additives Contaminants**, London, v.11, n.4, p.519-532, 1994. ISSN 0265-203X.
- ROÇA, R. O. Cura de carnes. Disponível em: <http://www.fca.unesp.br/outros/tcarne/textos/Roca111.pdf>. Acesso em: 16 maio 2005.
- TRICKER, A. R.; PREUSSMANN, R. Carcinogenic N-nitrosamines in diet: occurrence, formation, mechanism and carcinogenic potential. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, Amsterdam, v.259, p.277- 289, 1991. ISSN 1383-5718.
- WALKER, R. Nitrates, nitrites and N-nitrosocompounds: a review of the occurrence in food and diet and the toxicological implications. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 7, p. 717-768, 1990. ISSN 0265-203X.
- WHO. Food Additives Series No 5. **Nitrates, nitrites, and N-nitroso compounds**. Forty-fourth Report of the Joint FAO/WHO Committee on Food Additives, Geneva, 1978.

CAPÍTULO 1

NITROSAMINAS VOLÁTEIS EM ALIMENTOS-REVISÃO

Este trabalho será submetido para publicação na Revista Higiene Alimentar.

NITROSAMINAS VOLÁTEIS EM ALIMENTOS-REVISÃO

Resumo

As nitrosaminas são compostos potencialmente carcinogênicos para o homem as quais podem ocorrer em alimentos como produto da reação entre aminas secundárias e nitrito. Neste artigo de revisão são fornecidas informações sobre os aspectos toxicológicos, epidemiológicos, presença em alimentos e legislação sobre estes compostos.

Palavras-chaves: nitrosaminas voláteis, alimentos, toxicidade

Summary

Nitrosamines are potentially carcinogenic for man. These compounds can occur in foods as the product of the reaction between secondary amines and nitrite. In this article background information is provided on aspects of toxicology, epidemiological, occurrence in foods and legislation about these compounds.

Keywords: volatile nitrosamines, food, toxicity

Introdução

Nitritos e nitratos estão presentes em uma grande variedade de alimentos industrializados, assim como naturalmente em alimentos de origem vegetal. A ingestão de nitritos e nitratos pode apresentar efeitos tóxicos relevantes em consumidores freqüentes de alimentos que contenham essas substâncias. A formação de N-nitrosaminas é um dos efeitos tóxicos considerados de maior relevância.

As N-nitrosaminas, compostos orgânicos conhecidos desde longa data, tornaram-se objeto de intensivos estudos toxicológicos a partir de 1956, quando

Magee e Barnes relataram pela primeira vez a indução de tumores no fígado de ratos alimentados com ração contaminada com N-nitrosodimetilamina (NDMA). Desde então, muitas pesquisas têm sido realizadas com animais experimentais objetivando avaliar os efeitos toxicológicos causados por N-nitrosaminas, sendo que, a maioria destes compostos mostraram-se carcinogênicos em todas as espécies testadas. Cabe ressaltar que das nitrosaminas avaliadas, as voláteis são as que apresentam maior potencial carcinogênico.

A exposição humana as nitrosaminas ocorre como consequência de alguns hábitos, tais como fumar, mascar tabaco, assim como pelo uso de cosméticos, como o xampu. Contudo a maior exposição acontece através da alimentação, sendo que o processamento e preparo dos alimentos influenciam na quantidade de nitrosaminas formadas.

O intuito deste artigo de revisão é fornecer informações sobre as características, aspectos toxicológicos, exposição, legislação e a presença de nitrosaminas voláteis em alimentos.

Aspectos Químicos e Físico Químicos das Nitrosaminas

As nitrosaminas são compostos N-nitrosos, de fórmula estrutural $R_1R_2NN=O$, onde R_1 e R_2 são grupos alquila ou arila (anexo 1). Dependendo do radical R_1 e R_2 esses compostos podem ser encontrados na forma sólida, líquida ou gasosa. De modo geral, as N-nitrosaminas são estáveis, decompondo-se apenas lentamente em soluções ácidas ou por radiação ultravioleta (MAFF, 1992).

Compostos N-nitrosos podem ser formados pela reação do nitrito com aminas secundárias ou terciárias, em meio ácido (MIRVISH, 1975). Vários estudos *in vivo* indicam que a nitrosação pode ocorrer no estômago após a ingestão de precursores pela dieta (WALKER, 1990).

A nitrosação pode ser definida como a substituição de um hidrogênio, ligado ao nitrogênio da amina, por um grupo nitroso (figura 1).

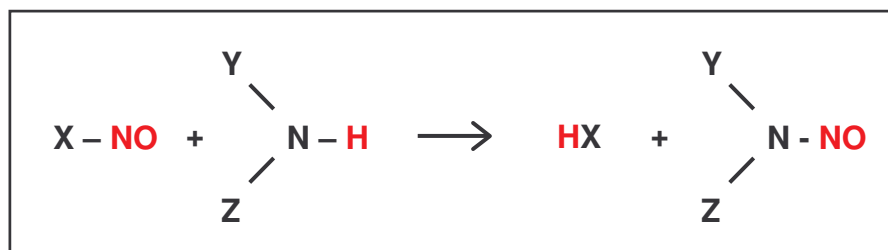


Figura 1. Reação geral de nitrosação.

Na formação de agentes nitrosantes, o doador do grupo nitroso é formado durante a reação do nitrito (NO_2^-) com prótons (H^+ ou H_3O^+) formando, entre outros, anidrido nitroso (N_2O_3), o qual é considerado o principal agente nitrosante em alimentos, assim como na formação de N-nitrosaminas *in vivo*. (figura 2).

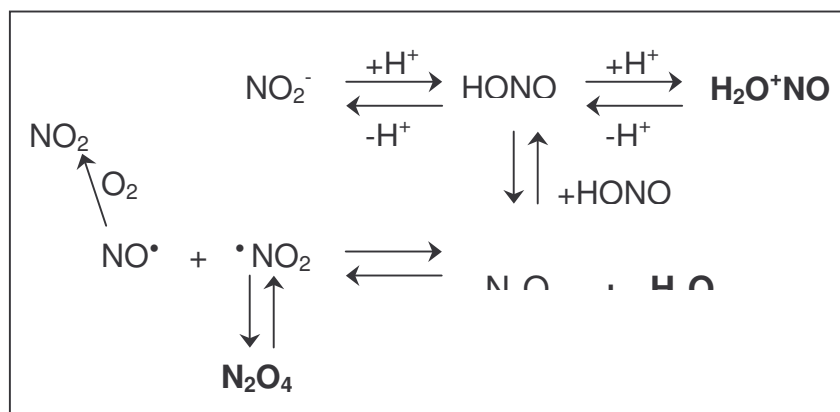


Figura 2. Formação de agentes nitrosantes.

O ambiente ácido do estômago pode ser considerado o mais importante lugar para nitrosação *in vivo* (SHUKER, 1988).

A reação de nitrosação pode ser influenciada pela presença de inibidores (compostos redox, tais como, ascorbato e vitamina E) e catalisadores (íons metálicos, compostos carbonílicos e ânions nucleofílicos, tais como: cloreto, iodeto e tiocianato)(TRICKER & PREUSSMANN, 1991).

A presença de bactérias pode promover a nitrosação *in vivo* e *in vitro*. Três hipóteses podem explicar este efeito: (i) a ação local de bactérias nitrato redutase aumenta a concentração de nitrito juntamente com a acidificação do meio de crescimento por produtos de metabolismo bacteriano (ambos promovem a catálise ácida das reações de nitrito); (ii) simulação das reações químicas de nitrosação, mediada por produtos secundários do metabolismo bacteriano ou através de efeitos físicos; (iii) catálise da reação de nitrosação por enzimas bacterianas (LEACH, 1988).

As N-nitrosaminas podem ser divididas em voláteis, e não voláteis, como a N-nitrosohidroxipirrolidina. (TRICKER & KUBACHI, 1992), sendo que, as nitrosaminas voláteis: N-nitrosodimetilamina (NDMA); N-nitrosodietilamina (NDEA); N-nitrosodibutilamina (NDBA); N-nitrosopirrolidina (NPIR); N-nitrosopiperidina (NPIP) e N-nitrosotiazolidina (NTHZ) são as que geralmente são encontradas nos alimentos (DORADO et al., 2001; JÄRGESTAD & SKOG, 2005).

Aspectos Toxicológicos

Compostos N-nitrosos são sintetizados no corpo humano, fato verificado em numerosos estudos que determinaram a N-nitrosoprolina na urina, a qual é utilizada como um marcador de síntese endógena (OSHIMA & BARTSCH, 1981; WAGNER et al., 1985; KNIGHT et al., 1992).

Vários pesquisadores têm relatado a presença das nitrosaminas voláteis, nitrosodimetilamina e nitrosodietilamina, no sangue e urina de humanos voluntários. Entretanto, a estimativa da proporção de formação *in vivo* não é exata, já que as nitrosaminas são rapidamente biotransformadas (GANGOLLI et al., 1994).

As nitrosaminas são absorvidas principalmente pelo trato gastrointestinal, podendo ser absorvidas através da pele, ainda que com menor rapidez e porcentagem (SWANN, 1975). Não são bioacumuladas e requerem ativação metabólica para exercerem sua ação mutagênica e carcinogênica. A hidroxilação é catalisada principalmente por CYP2E1 (LIN et al., 1999), mas outra isoforma do Citocromo P450, o CYP2A6, também está envolvida na hidroxilação (KAMATAKI

et al., 1999). O fígado é o principal órgão de biotransformação das nitrosaminas, mas outros tecidos humanos também as podem biotransformar (JÄRGESTAD & SKOG, 2005).

As N-nitrosaminas são mais efetivas como agente carcinogênico quando administradas aos animais de experimentação em pequenas doses repetidas do que quando em elevadas doses únicas. Esta situação é parecida com a exposição diária de humanos a traços de carcinógenos (WALTERS, 1992). Estudos *in vitro* sugerem que os compostos N-nitrosos apresentam atividade biológica similar em tecidos humanos e animais (TRICKER & PREUSSMANN, 1991).

A estrutura das nitrosaminas determina o órgão específico e a potência da sua atuação. Em muitas espécies, a carcinogenicidade de nitrosaminas alifáticas parece estar inversamente relacionada ao tamanho dos grupos substituintes, enquanto que nas nitrosaminas cíclicas, a carcinogenicidade é proporcional ao tamanho do anel (SHUKER, 1988).

De todas as nitrosaminas voláteis encontradas em alimentos, a NDEA é a que possui maior potencial carcinogênico enquanto que a NDMA e as heterocíclicas, NPIP e NPIR, apresentam potencial carcinogênico menor (JÄGERSTAD & SKOG, 2005).

Aspectos Epidemiológicos

Nas matrizes alimentares há uma complexa mistura de precursores de compostos N-nitrosos tais como aminas nitrosáveis e agentes nitrosantes, além de catalisadores e inibidores da nitrosação. Ainda, a deficiência de micronutrientes pode alterar a indução carcinogênica por parte das nitrosaminas. Esta junção de fatores é parcialmente responsável pela falha nos estudos epidemiológicos na identificação da exposição individual a compostos e alimentos com potencial carcinogênico (TRICKER & PREUSSMANN, 1991).

PEREIRA e KOIFMAN (2001) verificaram falhas na metodologia usada nos estudos entre fatores da dieta, como o consumo de compostos N-nitrosos, e tumor cerebral em adultos. Contudo os autores reconhecem que os dados

avaliados apresentam plausibilidade biológica com os conhecimentos atuais sobre o processo de carcinogênese.

Alguns estudos epidemiológicos apresentam relação entre a ingestão de nitrosaminas e o risco a diferentes tipos de câncer. Assim, FARROW et al. (1998) avaliaram a associação da ingestão de precursores de nitrosaminas, de antioxidantes, incluindo vitamina C, e de carotenóides com o risco de câncer nasofaríngeo ou de um subtipo histológico da doença. O risco de tumor nasofaríngeo não-queratinizado e indiferenciado aumentou em consumidores freqüentes de carnes curadas que contém altos níveis de nitrito. Contudo o estudo sugere que trabalhos futuros não assumam que a doença é etiologicamente homogênea. A ingestão de nitrosaminas durante a infância e por mães, no período de amamentação, também foi associada com o aumento do risco de câncer nasofaríngeo (WARD et al., 2000), sendo que o consumo excessivo de carnes curadas durante a gravidez foi associado com o risco de tumor cerebral pediátrico na prole (POGODA & PRESTON-MARTIN, 2001).

Ocorrência em Alimentos

As nitrosaminas estão presentes em alimentos conservados por adição de nitrato e/ou nitrito (carnes curadas e queijos) ou defumados, (peixes e produtos cárneos). Neste último caso, o óxido de nitrogênio está presente na fumaça e age como um agente nitrosante. O leite em pó poderá conter nitrosaminas, quando processado através da secagem por gases de combustão onde óxidos de nitrogênio estejam presentes. Os alimentos estocados podem ser contaminados através da migração de nitrosaminas formadas nas embalagens. Quando armazenados em condições inadequadas de umidade, os alimentos podem propiciar o crescimento de fungos, particularmente o *Fusarium moniliforme* (TRICKER & PREUSSMANN, 1991). Este fungo é capaz de reduzir o nitrato para formar nitrito e nitrosaminas (CHU & LI, 1994).

A presença de N-nitrosaminas tem sido relatada em vários tipos de alimentos variados tais como: carnes e derivados (MAVELLE et al., 1991; TRICKER et al., 1991; BIAUDET et al., 1994; GLÓRIA et al., 1997), leites e

produtos de laticínios (MAVELLE et al., 1991; TRICKER et al., 1991; BIAUDET et al., 1994), peixes e frutos do mar (MAVELLE et al., 1991; TRICKER et al., 1991; BIAUDET et al., 1994; VILLEGAS et al., 2000; LEE et al., 2003; YURCHENKO & MÖLDER, 2005) e outros alimentos (MAVELLE et al., 1991; TRICKER et al., 1991; BIAUDET et al., 1994; YURCHENKO & MÖLDER, 2005).

Modificações nos processos de conservação e armazenamento podem eliminar ou reduzir significativamente os níveis de N-nitrosaminas (MAVELLE et al., 1991), como a incorporação de inibidores da reação de nitrosação (ácido ascórbico ou α -tocoferol) no processo (WALKER, 1990). A quantidade de inibidores necessários para inibir a formação de nitrosaminas pode ser 1000 – 2000 vezes maior que a quantidade de nitrito presente no sistema (WALTERS, 1981). O inibidor mais efetivo da nitrosação é o ácido ascórbico. Esta vitamina reage rapidamente com nitrito para formar óxido nítrico e ácido dehidroascórbico (JANSSEN, 1997).

No geral, os alimentos crus de diferentes categorias, tais como vegetais, carnes, peixes, frutas, cereais e laticínios, contêm baixos teores de N-nitrosaminas (CASSENS, 1997). A formação de N-nitrosaminas em alimentos pode ser controlada através do controle da adição de nitrito, visto que a velocidade de formação das N-nitrosaminas é diretamente proporcional ao quadrado da concentração desse íon (SHUKER, 1988).

Carnes e Derivados

Sal de nitrito é adicionado a carne com os propósitos de conservação, (especialmente como agente antimicrobiano contra *Clostridium botulinum*), assim como pelas características sensoriais desejáveis que confere aos produtos curados (cor rosa, via formação do complexo mioglobina óxido-nítrico, e o sabor tradicional desses produtos) (DENNIS & WILSON, 2003). O nitrito, contudo, é convertido em agentes nitrosantes que reagem com aminas e aminoácidos da carne para produzir nitrosaminas (SHAHIDI et al., 1994).

A presença de compostos N-nitrosos tem sido relatada em uma grande variedade de carnes conservadas pelo uso de nitrito (tabela 1). Entre as

nitrosaminas voláteis detectadas estão N-nitrosodimetilamina (NDMA), N-nitrosopirrolidina (NPIR) e N-nitrosopiperidina (NPIP). A NDMA é derivada da creatinina, um conhecido componente do músculo, obtida por meio da quebra da sarcosina, seguido por uma decarboxilação do derivado N-nitroso (figura 3).

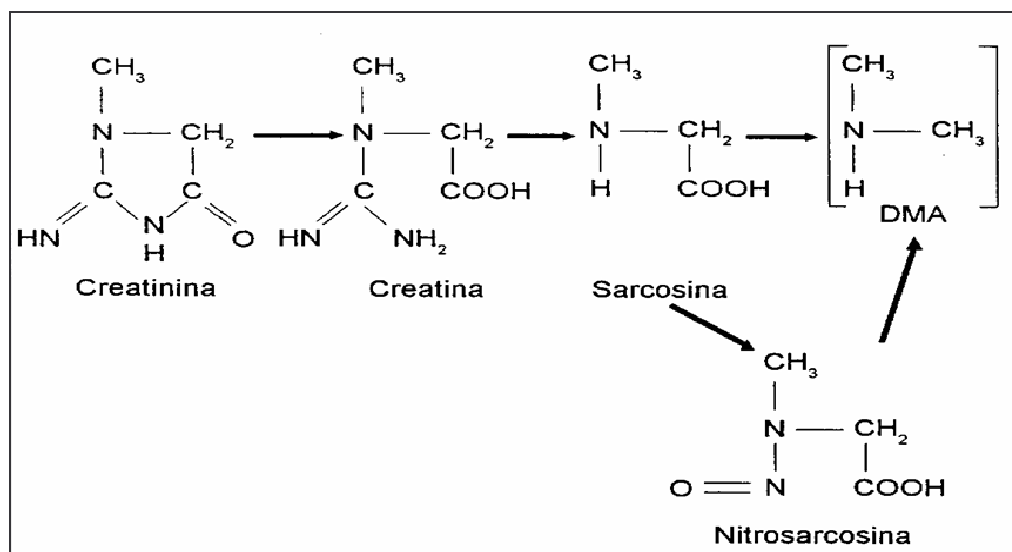


Figura 3. Formação de NDMA em produtos cárneos.

Os possíveis precursores para NPIR e NPIP incluem prolina e lisina respectivamente (WALTERS, 1992). A NPIR também pode ser formada a partir da descarboxilação da N-nitrosoprolina (NPRO), uma nitrosamina não volátil formada a partir da nitrosação do aminoácido prolina (figura 4) (JÄRGESTAD & SKOG, 2005). A presença de nitrozodiazolidina (NTHZ) no bacon é derivada da interação entre cisteína, formaldeído e nitrito (LIJINSKI, 1999).

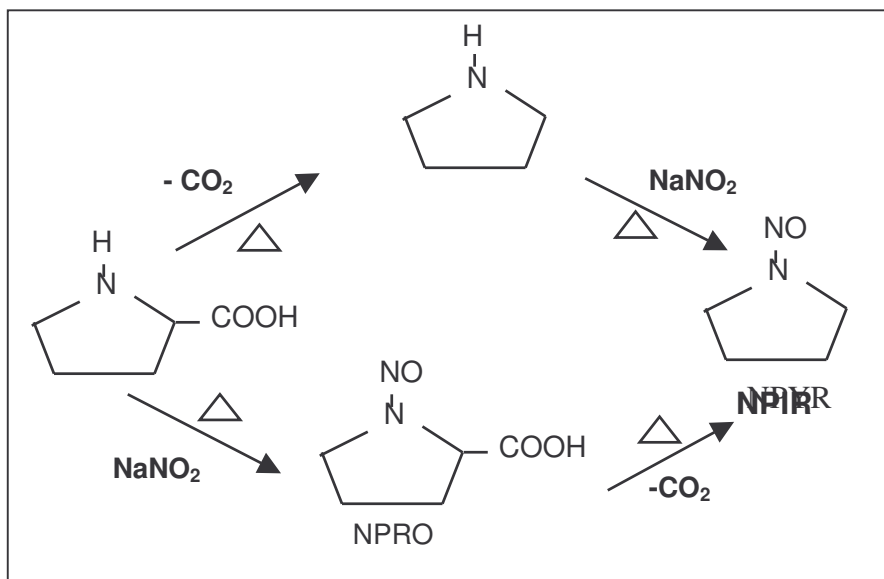


Figura 4. Formação de N-nitrosopirrolidina (NPIR) a partir de N-nitrosoprolina (NPRO).

A ocorrência de nitrosodibutilamina (NDBA) deve-se ao uso de embalagens plásticas contendo zinco dibutil ou dietilditiocarbamatos de zinco (aceleradores de vulcanização) que são considerados fontes desta contaminação em alimentos (SEN et al., 1988).

A concentração de compostos N-nitrosos, em alimentos, é dependente de fatores como: método de cozimento, temperatura e tempo de fritura, concentração de nitrito residual ou adicionado, concentração de precursores das nitrosaminas, condições e métodos de pré-processamento, conteúdo de umidade, presença de catalisadores e inibidores da nitrosação e da defumação (GRAY & DUGAN, 1975; HOTCHKISS & VECCHIO, 1985; MILLER et al., 1989).

Em temperatura ambiente, a presença nos alimentos de aminas secundárias e nitrito leva a uma reação de nitrosação lenta, que é concluída somente para aminas básicas fracas. Contudo, a velocidade da reação dobra a cada 10°C e, conseqüentemente, a formação de N-nitrosaminas terá maior

relevância em alimentos conservados com nitrito que sofrem aquecimento durante o processamento (FOREMAN & GOODHEAD, 1975).

Tabela 1. Teores de nitrosaminas em produtos cárneos.

Alimentos	Concentração (µg/Kg) Média (limites mínimos e máximos)							Referência
	NDMA	NDEA	NDBA	NPIP	NMOR	NPIR	NTHZ	
Bacon	1,01(0,5-1,6) 0,95(0-6,3)			ND		0,02(ND-0,1)		Tricker et al., 1991. Mitacek et al., 1999.
Bacon defumado	0,25(ND-1,3)	0,97(0,05-3,8)	0,17(ND-0,8)	0,11(0,05-0,27)				Mavelle et al., 1991.
Bacon frito	1,0	0,2	0,2			7,1	1,1	Glória et al., 1997.
Carne de porco	0,28(ND-4,0)							Biaudet et al., 1994.
Carne de porco salgada	0,09(0,08-0,28)	0,03(ND-0,07)						Tricker et al., 1991.
Lingüiça defumada	0,91(ND-9,3)	2,4(0,91-10,3)	0,43(ND-2,0)	0,18(ND-2,2)	0,74 (ND-7,2)	0,28(ND-3,7)		Mavelle et al., 1991.
Lingüiça frita e cozida	0,32(0,05-1,2)	1,8(0,03-5,1)	0,23(ND-1,0)	0,07(ND-0,22)				Mavelle et al., 1991.
Presunto	0,14(ND-0,72) 0,79(0-2,4) 0,31(ND-4,8) 1,01(0,5-1,6)	0,03(ND-0,07)	0,09(ND-0,23)	0,25(ND-0,97)		0,12(ND-,23)		Mavelle et al., 1991. Mitacek et al., 1999.
				ND		0,02(ND-0,1)		Biaudet et al., 1994. Tricker et al., 1991.
Presunto (defumado, seco)	0,54(ND-4,8)	1,1(ND-12)	0,29(ND-1,1)	0,24(ND-1,3)	0,48 (ND-2,0)			Mavelle et al., 1991.
Produtos de salsicharia	0,84(0,5-1,8)			0,03(ND-0,5)		ND		Tricker et al., 1991.
Salsicha	1,5(0,04-4,5)	3,0(0,02-7,9)	0,21(ND-1,0)	0,25(ND-0,9)				Mavelle et al., 1991.
Salame	0,45(ND-2,1)	4,6(1,5-12)	0,56(0,29-2,0)	0,17(ND-0,58)				Mavelle et al., 1991.

ND= não detectável

Leite e Laticínios

A presença de nitrosaminas em laticínios deve-se à adição de nitratos e nitritos durante o processo de elaboração dos produtos, principalmente de queijos, a fim de evitar o chamado estufamento tardio, causado, na sua grande maioria, pelo *Clostridium tyrobutiricum* (DUARTE & MIDIO, 1996). O nitrato de potássio ou sódio, associado, ou não, ao nitrito de sódio ou potássio, é permitido como aditivo em queijos (exceto queijos frescos). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, o limite máximo permitido é de 5 mg/100mL expresso no produto final como íon nitrito (BRASIL, 2004).

No Brasil os queijos tipo Gruyere, Emmental, Prato, Gouda, Parmesão e Provolone podem apresentar teores de nitritos residuais e, conseqüentemente, a presença de nitrosocompostos (MIDIO e MARTINS, 2000).

No processo de produção do queijo tem-se a formação de soro lácteo amplamente utilizado como ingrediente na produção de alimentos industrializados, entre outros, de bebidas lácteas e de leite em pó. O soro lácteo, ou simplesmente soro, é um subproduto do leite obtido durante a coagulação nos processos de produção de queijo ou de caseína (MORR, 1989). Entretanto, a concentração de nitratos no soro é maior do que no leite, podendo, também, ocorrer a presença de nitritos (DUARTE & MIDIO, 1996). O soro, portanto, pode constituir potencial de risco para a saúde, especialmente pelo próprio fato de que é concentrado e liofilizado o que poderia aumentar os níveis de nitrato e nitrito e também a formação de nitrosaminas, uma vez que no soro foram encontradas aminas secundárias, tais como, a dimetilamina, pirrolidina e piperidina (WEIHRAUCH & SCHWARTZ, 1974; OLIVEIRA et al., 1995).

Na tabela 2 são apresentados os níveis de nitrosaminas verificados no leite e derivados.

É provável que o fator limitante da nitrosação, em laticínios, seja a baixa quantidade de nitrito (OLIVEIRA et al., 1995).

Tabela 2. Teores de nitrosaminas em leite e derivados.

Alimentos	Concentração (µg/Kg)			Referências
	Média (limites mínimos e máximos)			
	NDMA	NDEA	NPIP	
Leite	0,03*(ND-0,11)			Biaudet et al., 1994.
Leite em pó	0,06(0,04-0,08)			Biaudet et al., 1994.
Leite e laticínios	0,07(ND-0,6)			Tricker et al., 1991.
Queijo (tipo Camembert, Edam, Saint-Paulin e fresco)	0,45	4,0	0,75	Mavelle et al., 1991.
	0,24(ND-1,1)			Tricker et al., 1991.
Queijo	0,32(ND-2,8)			Biaudet et al., 1994.

* valor em µg/L

ND=não detectável

Peixes e Frutos do Mar

Em alguns países, o nitrito é permitido para uso como aditivo em peixes defumados e curados e produtos a base de peixe, com a finalidade de conservação e fixação da cor (DENNIS & WILSON, 2003).

Acredita-se que os principais precursores de NDMA no peixe sejam a dimetilamina, dietilamina, trimetilamina e óxido de trimetilamina, todas encontradas em abundância em vários peixes, especialmente os marinhos (YURCHENKO & MÖLDER, 2005). Mesmo frutos do mar ("seafood") fresco contém óxido de trimetilamina (TMAO), que é reduzido para trimetilamina (TMA) sob secagem, e convertido para dimetilamina (DMA) por remoção do grupo metil, durante o cozimento. Estes compostos, especialmente a dimetilamina, podem sofrer nitrosação e formar N-nitrosodimetilamina (NDMA). Assim a ocorrência e concentração de NDMA, em peixes e frutos do mar ("seafood"), podem ser dependentes do grau de contaminação por nitrito durante seu processamento (LEE et al., 2003).

A concentração de amins em pescados depende de vários fatores tais como espécies, idade, ambiente, flora bacteriana e condições de estocagem. Amins estão presentes em uma ampla quantidade, tanto em peixes marinhos quanto em peixes de água doce (TRICKER e PREUSSMANN, 1991).

A tabela 3 apresenta a relação dos teores de nitrosaminas em peixes e frutos do mar.

Tabela 3. Teores de nitrosaminas em peixes e frutos do mar.

Alimentos	Concentração (µg/Kg)					Referências
	NDMA	NDEA	NDBA	NPIP	NPIR	
<i>Abramis Brama</i> defumado (cozido)	1,17	0,17	0,14	0,89	2,12	Yurchenko & Mölder, 2005.
Alaska Pollock (<i>Theragra</i> <i>chalcogramma</i>) cru (seco)	24,6					Lee et al., 2003.
Anchova crua (seca)	1,2					Lee et al., 2003.
Arenque defumado (frio)	0,58	ND	0,10	0,62	0,85	Yurchenko & Mölder, 2005.
Arenque em conserva	1,12	0,50		1,30	2,10	Yurchenko & Mölder, 2005.
Arenque salgado	1,12	0,50	0,35	1,30	2,10	Yurchenko & Mölder, 2005.
Arenque defumado (cozido)	1,20	0,11	0,12	0,98	1,84	Yurchenko & Mölder, 2005.
Bacalhau defumado cozido	1,16	0,13	0,16	1,07	2,16	Yurchenko & Mölder, 2005.
Camarão cru (seco)	6,3					Lee et al., 2003.
Camarão salgado e seco	0,5(0-2,4)					Mitacek et al., 1999.
Cavala defumada (fria)	0,54	ND	ND	0,50	0,88	Yurchenko & Mölder, 2005.
Cavala defumada (cozida)	1,10	0,13	0,10	0,84	1,40	Yurchenko & Mölder, 2005.
<i>Embiotoca lateralis</i>	1,11	0,13	2,15	1,35	0,11	Yurchenko & Mölder, 2005.
Espadilhas defumadas (cozidas)	1,09	0,14	0,12	1,17	2,23	Yurchenko & Mölder, 2005.
Espadilhas no óleo	1,76	0,40	0,15	0,37	1,8	Yurchenko & Mölder, 2005.
Espadilhas no molho de tomate	1,26	0,28	0,15	0,42	1,19	Yurchenko & Mölder, 2005.

Farinha de peixe	15-46						Villegas et al., 2000.
<i>Lota lota</i>	0,96	0,11	0,14	0,98	1,67		Yurchenko & Mölder, 2005.
Lucio (<i>Esox lucius</i>)	1,15	0,17	0,13	1,14	2,19		Yurchenko & Mölder, 2005.
Lula crua (seca)	14						Lee et al., 2003.
Merluza(<i>Merluccius bilinearis</i>)	1,02	0,15	0,12	1,17	1,87		Yurchenko & Mölder, 2005.
Moluscos e crustáceos	0,27(ND-0,60)						Biaudet et al., 1994.
Peixe fresco	3,0(0,5-8,0)			ND	ND		Tricker et al., 1991.
	0,12(ND-0,3)						Biaudet et al., 1994.
Peixe (sardinhas em óleo comestível, salmão rosa elaborado, bacalhau salgado, sardinha)	0,48(ND-3,5)		0,38				Mavelle et al., 1991.
Peixe defumado	1,43(0,6-2,6)			ND	ND		Tricker et al., 1991.
Peixe congelado	0,12(ND-0,3)						Biaudet et al., 1994.
Peixe em conserva	2,1(0,7-5,3)			ND	ND		Tricker et al., 1991.
	0,49(0,04-3,5)						Biaudet et al., 1994.
Peixe porco"Filefish" cru (seco)	3,9						Lee et al., 2003.
Peixe salgado defumado (seco)	0,46(0,05-2,6)						Biaudet et al., 1994.
Raia crua(seca)	20,2						Lee et al., 2003.
Polvo cru (seco)	5,9						Lee et al., 2003.
Salmão defumado frio	0,52	ND	ND	0,36	0,82		Yurchenko & Mölder, 2005.
Salmão defumado cozido	1,13	0,16	0,17	0,91	2,18		Yurchenko & Mölder, 2005.
Salmão salgado	0,92	0,13	0,34	0,71	0,73		Yurchenko & Mölder, 2005.
Truta defumada cozida	1,26	0,14	0,13	0,88	2,33		Yurchenko & Mölder, 2005.
Truta salgada	0,84	0,18	0,19	0,89	1,6		Yurchenko & Mölder, 2005.

ND=não detectável

Vegetais

Os vegetais podem sofrer contaminação por nitrosaminas no ambiente em que foram cultivados ou armazenados, ou seja, o uso de praguicidas e herbicidas, contaminados por nitrosaminas, e a presença de determinados microrganismos, como, por exemplo, o fungo *Fusarium moniliforme* presente no milho (CHU & LI, 1994) são alguns fatores que contribuem para a contaminação. Durante o armazenamento, as reações de nitrosação dependerão do teor de nitrato nos vegetais, os quais dependem do uso de fertilizantes, época sazonal de cultivo, luminosidade, umidade relativa do ar, do horário da colheita, do sistema de cultivo, estágio de maturação, da parte e espécie da planta (VAN der BOON et al., 1990; BIAUDET et al., 1994; GUADAGNIN et al., 2005).

Na tabela 4 são apresentados os teores de NDMA em vegetais sob diferentes condições de armazenamento.

Tabela 4. Teores de NDMA em vegetais.

Alimentos	Concentração (µg/Kg)	Referências
	Média (limites mínimos e máximos)	
	NDMA	
Vegetais frescos	0,41	Mavelle et al., 1991.
	0,18(ND-1,6)	Biaudet et al., 1994.
Vegetais enlatados	0,23(ND-1,9)	Biaudet et al., 1994.
Vegetais congelados	0,03(ND-0,14)	Biaudet et al., 1994.
ND=não detectável		

Outros Alimentos

A presença de nitrosaminas também foi relatada em outros alimentos como: chocolate, sopas, cereais, produtos de cereais, óleos vegetais (tabela 5). O processamento dos alimentos e a forma em que são armazenados poderão contribuir com o nível de contaminação no alimento.

Tabela 5. Teores de nitrosaminas em diversos alimentos.

Alimentos	Concentração (µg/Kg)			Referências
	Média (limites mínimos e máximos)			
	NDMA	NDEA	NDBA	
Achocolatado em pó	0,13(ND-0,44)			Biaudet et al., 1994.
Alimentos enlatados	0,19(ND-1,9)	0,52	0,17	Mavelle et al., 1991.
	0,07(ND-0,95)			Biaudet et al., 1994.
Alimento desidratado	2,32(ND-9,2)			Biaudet et al., 1994.
Arroz	0,11(0,08-0,14)			Biaudet et al., 1994.
Azeite	0,51	0,45		Yurchenko & Mölder, 2005.
Barra de chocolate	0,19(ND-1,9)			Biaudet et al., 1994.
Cereais	0,41 (ND-9,2)			Mavelle et al., 1991.
Chocolate	0,34 (ND-9,2)			Mavelle et al., 1991.
Massa	0,06(ND-0,41)			Biaudet et al., 1994.
Molhos (maionese, mostarda)	0,07(ND-0,41)			Biaudet et al., 1994.
Óleo de amendoim	0,43	0,22		Yurchenko & Mölder, 2005.
Óleo de girassol (refinado)	0,64	0,41		Yurchenko & Mölder, 2005.
Óleo de milho	0,50	0,24		Yurchenko & Mölder, 2005.
Óleo de soja	0,24	0,18		Yurchenko & Mölder, 2005.
Ovos	0,15(0,06-0,19)			Biaudet et al., 1994.
Pão	0,1(ND-0,17)			Biaudet et al., 1994.
Pimentas	0,34(ND-1,4)			Biaudet et al., 1994.
Pizza	0,27(0,05-1,05)			Biaudet et al., 1994.
Produtos de cereais	0,189(ND-1,6)			Tricker et al., 1991.
	0,18(ND-1,4)			Biaudet et al., 1994.
Sopas	0,06(ND-0,4)			Tricker et al., 1991.
	0,14(ND-0,21)			Biaudet et al., 1994.
Sopa desidratada	1,27(ND-13,4)			Biaudet et al., 1994.

ND=não detectável

Legislação

Alguns países possuem conhecimento sobre a formação e presença de nitrosaminas nos alimentos, o que permite controlar a formação desses compostos a níveis tão baixos que seu consumo não represente elevado risco para a saúde dos consumidores (VILLEGAS et al., 2000). Todavia, são poucos os países nos quais existe regulamentação específica para N-nitrosaminas. Na tabela 6 são apresentados os limites máximos permitidos de nitrosaminas em alimentos estabelecidos em alguns países.

Tabela 6. Limite máximo permitido de nitrosaminas em alimentos.

Países	Limite permitido ($\mu\text{g/Kg}$)	Referências
EUA	10 μg de nitrosaminas voláteis totais em produto cárneo curado.	USDA, 2004.
Canadá	10 μg de NDMA, NDEA, NDPA, NDBA, NPIP e NMOR Kg^{-1} de carne curada. 15 μg de NPIR Kg^{-1} de carne curada.	CANADA, 2003.
Chile	30000 μg de NDMA Kg^{-1} de carnes curadas	CHILE, 2005.
Rússia	2 μg de nitrosaminas Kg^{-1} de alimentos frescos. 4 μg de nitrosaminas Kg^{-1} de alimentos defumados.	KOMAROVA & VELIKANOV, 2001.
Estônia	3 μg de NDMA e NDEA Kg^{-1} de peixe fresco e defumado.	YURCHENKO & MÖLDER, 2005.

No Brasil além de não existir um monitoramento das nitrosaminas presentes em alimentos, não existe uma legislação definida.

Recomendações

As nitrosaminas, sobretudo as voláteis, apresentam alto potencial carcinogênico o que representa um elevado risco para a saúde da população. São encontradas principalmente nos alimentos o que justifica o estabelecimento de níveis de segurança para o seu consumo. Países como o Brasil devem intensificar o controle dos níveis de nitrosaminas sobretudo em produtos curados, já que uma grande parcela da população é consumidora de alimentos de preços mais acessíveis e estes são pouco fiscalizados pelos órgãos competentes. Assim, estudos que identifiquem a presença de nitrosaminas em alimentos devem ser continuados, principalmente nos países em desenvolvimento, com o intuito de evitar a exposição da população a elevados níveis dessas substâncias carcinogênicas.

A adição adequada de nitrato e nitrito aos alimentos e o uso de inibidores de nitrosação são medidas preventivas a formação de nitrosaminas.

Referências Bibliográficas

- BIAUDET, H.; MAVELLE, T.; DEBRY, G. Mean daily intake of N-nitrosodimethylamine from foods and beverages in France in 1987 – 1992. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.32, n.5, p.417-421, 1994. ISSN 0278-6915.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução cns/ms n.º 04, de 24 de novembro de 1988. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/1004_98.htm Acesso em: 3 jun. 2003.
- CANADA. Canadian Food Inspection Agency. Animal Products Food of Animal Origin. Livestock and Meat Processing – Nitrosamines. Date Modified: 2003-02-07. Disponível em: <http://www.inspection.gc.ca/english/animal/meavia/mmopmmhv/chap5/5.4-7e.shtml>>. Acesso em: 05 fev. 2004.
- CASSENS, R.G. Composition and safety of cured meats in the USA. **Food Chemistry**, Oxford, v.59, n.4, p.561-566, 1997. ISSN 0308-8146.

- CHILE. Reglamento sanitario de los alimentos, n.977. Santiago, seis de agosto de 1996. Disponível em: <http://www.tecnoalimentos.cl/html2/Tit11.html#t9p3>
Acesso em: 27 jun. 2005.
- CHOW, C.K.; HONG, C.B. Dietary vitamin E and selenium and toxicity of nitrite and nitrate. **Toxicology**, Amsterdam, v.180, p.195-207, 2002. ISSN 0300-483X.
- CHU, F. S.; LI, G. Y. Simultaneous occurrence of Fumonisin B₁ other mycotoxins in moldy corn collected from the people's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, n.3, p.847-852, 1994. ISSN 0099-2240.
- DENNIS, M. J.; WILSON, L. A. Nitrates and nitrites. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**, Amsterdam, 2003. ISSN 0122-27055X.
- DORADO, M.; SÁNCHEZ, A.; GONZÁLEZ, J. L. Nitrosamina en Alimentos. **Alimentaria**, Madrid, v.1, p.39-42, marzo 2001. ISSN 0300-5755.
- DUARTE, M.; MIDIO, A. F. Nitratos e nitritos em Alimentos. **Cadernos de Nutrição**, São Paulo, v.12, p.19-30, 1996.
- FARROW, D.; VAUGHAN, T.; BERWICK, M.; LYNCH, C.; SWANSON, G.; LYON, J. Diet and nasopharyngeal cancer in a low-risk population. **International Journal of Cancer**, Hoboken, v.78, p.675-679, 1998. ISSN 0020-7136.
- FOREMANN, J. K.; GOODHEAD, K. The formation and analysis of N-nitrosamines. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.26, p.1771-1783, 1975. ISSN 0022-5142.
- GANGOLLI, S. D.; VAN DEN BRANT, P. A.; FERON, V. J.; JANZOWSKI C.; KOEMAN, J. H.; SPEIJERS, G. J. A.; SPIEGELHALDER, B.; WALKER, R.; WISHNOK, J. S. Assessment; nitrate, nitrite and N-Nitrosocompounds. **European Journal of Pharmacology, Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, Section 292, p.1-38, 1994. ISSN 0014-2999.
- GLÓRIA, M. B. A.; BARBOUR, J. F.; SCALAN, R. A. Volatile nitrosamines in fried bacon. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 45, p.1816-1818, 1997. ISSN 0021-8561.
- GUADAGNIN, S. G.; RATH, S.; REYES, F. G. R. Evaluation of the nitrate content in leaf vegetables produced through different agricultural systems. **Food Additives and Contaminants**, London, v.22, n.12, p.1203-1208. ISSN 0265-203X.
- HOTCHKISS, J. H.; VECCHIO, A. J. Nitrosamines in fried-out bacon fat and its use as a cooking oil. **Food Technology**, Chicago, v. 39, p.67-73, 1985. ISSN 0015-6639.

- JANSSEN, M. M. T. Food Additives. In: VRIES, J. Food Safety and Toxicity. Boca Raton: CRC Press, 1997. ISBN 08-49394-88-0.
- JÄRGESTAD, M.; SKOG, K. Review: Genotoxicity of heat-processed foods. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v.574, p.156-172, 2005. ISSN 0027-5107.
- KAMATAKI, T.; NUNOYA, K.; SAKAI, Y.; KUSHIDA, H.; FUJITA, K. Genetic polymorphism of CYP2A6 in relationship to cancer. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, n.428, p. 125-130, 1999. ISSN 0027-5107.
- KOMAROVA, N. V.; VELIKANOV, A. A. Determination of volatile N-nitrosamines by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Analytical Chemistry**, Moscow, v.56, n.4, p.359-363, 2001. ISSN 1061-9348.
- LEACH, S. Mechanism of endogenous formation. In: HILL, M.J. Nitrosamines: Toxicology and Microbiology. England: Ellis Horwood Ltd., 1988. 69p. ISBN 08-96298-27-3.
- LEE, S. J.; SHIN, J. H., SUNG, N. J., KIM, J. G., HOTCHKISS, J. H. Effect of cooking on the formation of N-nitrosodimethylamine in Korean dried seafood products. **Food Additives and Contaminants**, London, v.20, p.31-36, 2003. ISSN 0265-203X.
- LIJINSKY, W. N-nitroso compounds in the diet. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v.443, p.129-138, 1999. ISSN 1383-5718
- LIN, H. L.; PARSELS, L. A.; MAYBAUM, J.; HOLLENBERG, P. F. N-nitrosodimethylamine- mediated cytotoxicity in a cell line expressing P450 2E1 evidence for apoptotic cell death. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v.157, p.117–124, 1999. ISSN 0041-008X.
- MAGEE, P. N.; BARNES, J. M. The production of malignant primary hepatic tumors in the rat by feeding dimethylnitrosamine. **British Journal of Cancer**, London, v.10, p.114, 1956. ISSN 0007-0920.
- MAVELLE, T.; BOUCHIKHI, B.; DEBRY, G. The occurrence of volatile N-nitrosamines in French foodstuffs. **Food Chemistry**, Oxford, v.42, p.321-338, 1991. ISSN 0308-8146.
- MIDIO, A. F.; MARTINS, D. Z. Toxicologia de Alimentos. São Paulo: Varela, 2000. p.107. ISBN 85-85519-55-X.

- MILLER, B. J.; BILLDEAU, S. M.; MILLER, D. W. Formation of N-nitrosamines in microwaved versus skillet-fried bacon containing nitrite. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 27, p.295-299, 1989. ISSN 0278-6915.
- MORR, C.V. Whey proteins: manufacture. In: Fox, P.F. Developments in dairy chemistry – 4. New York: Elsevier Applied Science, p.245-283, 1989. ISBN 08-5334-142-7.
- OLIVEIRA, C. P.; GLÓRIA, M. B. A.; BARBOUR, J. F.; SCALAN, R. A. Nitrate, nitrite, and volatile nitrosamines in whey-containing food products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.43, n.4, p.967-969, 1995. ISSN 0021-8561.
- POGODA, J. M.; PRESTON-MARTIN, S. Maternal cured meat consumption during pregnancy and risk of paediatric brain tumor in offspring: potentially harmful levels of intake. **Public Health Nutrition**, London, v.4, n.2, p.183-189, 2001. ISSN 1368-9800.
- PEREIRA, R.; KOIFMAN, S. Associação entre fatores da dieta e tumores de cérebro em adultos: uma revisão da literatura. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.17, n.6, p.1313-1334, 2001. ISSN 0102-311X.
- SEN, N. P.; SEAMAN, S. W.; BADDON, P. A.; WEBER, D. Further studies on the formation of nitrosamines in cured pork products packaged in elastic rubber nettings. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 53, n.3, p.731-738, 1988. ISSN 0022-1147.
- SHAHIDI, F.; PEGG, R. B.; SEN, N. P. Absence of volatile N-nitrosamines in cooked nitrite-free cured muscle foods. **Meat Science**, Oxford, v.37, p.327-336, 1994. ISSN 0309-1740.
- TAKATSUKI, K.; KIKUCHI, T. Determination of N-nitrosodimethylamine in fish products using gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v.508, p.357-362, 1990. ISSN 0021-9673.
- TRICKER, A. R.; PREUSSMANN, R. Carcinogenic N-nitrosamines in diet: occurrence, formation, mechanism and carcinogenic potential. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, Amsterdam, v.259, p.277- 289, 1991. ISSN 1383-5718.
- TRICKER, A. R.; PFUNDSTEIN, B.; THEOBALD, E.; PREUSSMANN, R.; SPIEGEKHALDER, B. Mean daily intake of volatile N-nitrosamines from foods and beverages in West Germany in 1989-1990. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.29, n.11, p.729-732, 1991. ISSN 0278-6915.
- TRICKER, A. R.; KUBACKI, S. J. Review of the occurrence and formation of non-volatile N-nitroso compounds in foods. **Food Additives and Contaminants**, London, v.9, n.1, p.39-69, 1992. ISSN 0265-203X.

- USDA. US Code of Federal Regulations. Food Safety and Inspection Service, USDA § 424.22. Certain other permitted uses. 9 CFR Ch. III (1-1-03 Edition). Disponível em: <<http://www.usda.gov>> Acesso em: 02 fev. 2004.
- VAN DER BOON, J.; STEENHUIZEN, J. W.; STEINGRÖVER, E. G. Growth and nitrate concentration of lettuce as affected by total nitrogen and chloride concentration, NH_4/NO_3 ratio and temperature of the recirculating nutrient solution. **The Journal of Horticultural Science**, Ashford, v.65, p.309-321, 1990. ISSN 0022-1589.
- VILLEGAS, R.; MENDOZA, N.; LÉON, N.; MARISOL. Seguridad alimentaria, necesidad de implementar técnicas modernas de análisis de xenobióticos em alimentos. **Anales de la Universidad de Chile**, Santiago, n.11, 2000. Disponível em: http://www2.anales.uchile.cl/CDA/an_complex/0,1279,SCID%253D1583%2526SID%253D7%2526ACT%253D0%2526PRT%253D1582,00.html . Acesso em: 13 jun. 2004.
- WARD, M.H.; PAN, W.; CHENG, Y.; LI, F.; BRINTON, L.; CHEN, C.; HSU, M.; CHEN, I.; LEVINE, P.; YANG, C.; HILDESHEIM, A. Dietary exposure to nitrite and nitrosamines and risk of nasopharyngeal carcinoma in Taiwan. **International Journal of Cancer**, Hoboken, v. 86, p.603-609, 2000. ISSN 0020-7136.
- WALKER, R. Nitrates, nitrites and N-nitrosocompounds: a review of the occurrence in food and diet and the toxicological implications. **Food Additives and Contaminants**, London, v.7, p.717-768, 1990. ISSN 0265-203X.
- WALTERS, C. L. Reactions of nitrate and nitrite in foods with special reference to the determination of N-nitroso compounds. **Food Additives and Contaminants**, London, v.9, n.5, p.441-447, 1992. ISSN 0265-203X.
- WALTERS, C. L. The influence of ascorbic acid on the formation of N-nitrosamines in foods, drugs, cosmetics and tobacco. In: Counsell, J. N.; Hornig, D. Vitamina C. London: Applied Science Publishers, 1981. 199-213p. ISBN 0-85334-109-5.
- WEIHRAUCH, J. L.; SCHWARTZ, D. P. Trace constituents in whey, isolation and identification of amines. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.57, p.1083-1085, 1974. ISSN 0022-0302.
- YURCHENKO, S.; MÖLDER, U. Volatile N-nitrosamines in various fish products. **Food Chemistry**, Oxford, 2005, in press. ISSN 0308-8146.

CAPÍTULO 2

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA PARA DETERMINAÇÃO DE NITROSAMINAS VOLÁTEIS EM SALSICHAS “HOT-DOG”

Este trabalho será submetido para publicação no Journal of Agricultural and Food Chemistry.

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA PARA A DETERMINAÇÃO DE NITROSAMINAS VOLÁTEIS EM SALSICHAS “HOT-DOG”

Resumo

Apresenta-se neste trabalho um método para a determinação de nitrosaminas voláteis em salsicha “hot-dog” usando amostragem no “headspace” e microextração em fase sólida utilizando a fibra polidimetilsiloxano-divinilbenzeno-carboxen (PDMS-DVB-CAR 50/30 μm) associado à cromatografia gasosa com detector de quimiluminescência (HS-SPME-GC-TEA). A otimização do método de extração foi realizada através de planejamento experimental, tendo sido avaliada a influência do tempo e temperatura na extração de nitrosodimetilamina (NDMA), nitrosodietilamina (NDEA), nitrosopiperidina (NPIP) e nitrosopirrolidina (NPIR). A melhor condição verificada para a extração das nitrosaminas foi 45 min de extração a 45 °C. Os parâmetros analíticos considerados na validação do método foram: faixa linear, linearidade, sensibilidade, precisão (repetibilidade), exatidão (recuperação), limite de detecção e de quantificação. O método descrito mostrou-se adequado para a determinação das nitrosaminas. Nas amostras analisadas não foram detectadas nitrosaminas voláteis. A ausência de nitrosaminas ocorreu possivelmente pelos baixos teores de nitrito disponível para a reação com as aminas presentes na carne e pela ação do ascorbato de sódio, presente nas salsichas, como inibidor da formação das nitrosaminas.

Palavras-chave: nitrosaminas voláteis, HS-SPME-GC-TEA, salsicha “hot-dog”

Abstract

A method for the determination of volatile nitrosamines in hot dog sausage using headspace sampling by solid-phase microextraction with the fiber polydimethylsiloxane-divinylbenzene-carboxen (PDMS-DVB-CAR 50/30 μ m) and gas chromatography with thermal energy analyzer detection (HS-SPME-GC-TEA) is presented in this work. The optimization of the method of extraction was carried through an experimental design, which evaluated the influence of the time and temperature in the extraction of N-nitrosodimethylamine (NDMA), N-nitrosodiethylamine (NDEA), N-nitrosopiperidine (NPIP) and N-nitrosopyrrolidine (NPIR). The best condition found for the extraction of the nitrosamines was 45 min of extraction at 45 °C. The analytical parameters considered in the validation of the method were linearity, sensitivity, precision (repeatability), accuracy (recovery), limit of detection and quantification. The proposed method can be used for the determination of nitrosamines. In the analyzed samples volatile nitrosamines were not detected. The results indicate that the absence of nitrosamines possibility occurred due to the low content of nitrite available for the reaction with the amines present in the meat and to the action of sodium ascorbate as inhibitor of the nitrosamines formation.

Keywords: volatile nitrosamines, HS-SPME-GC-TEA, hot-dog sausage

INTRODUÇÃO

A maior exposição humana as nitrosaminas acontece através da alimentação, sendo que, o preparo e processamento dos alimentos influenciam na quantidade de nitrosaminas presente nos mesmos. Entre os alimentos processados estão os embutidos cárneos, como a salsicha.

Durante a década de 80 a salsicha teve sua produção duplicada e, até 1996, multiplicada por 2,8, totalizando uma produção anual de 221,588 toneladas de salsichas (1). Em 2004 de acordo com o Instituto ACNielsen, o mercado brasileiro de salsichas movimentou 156.576 toneladas (2). Isto se deve ao

aumento no consumo de cachorros-quentes vendidos não só em bares e lanchonetes, mas também em carrocinhas e em vans (3).

Durante o processo de industrialização são adicionados aditivos intencionais à formulação da salsicha, tais como: ascorbato de sódio, nitrito e nitrato (4). O ascorbato de sódio (vitamina C), ou seu equivalente, o isoascorbato de sódio, acelera o desenvolvimento da cor no produto curado (5, 6) e também pode inibir a formação de nitrosaminas (7).

O nitrito contribui para o desenvolvimento de cor e sabor característicos, e atua como antimicrobiano prevenindo a germinação de esporos de *Clostridium botulinum* e a produção da toxina botulínica (7). Contudo, ele pode ser convertido para agentes nitrosantes que devem reagir com aminas e aminoácidos na carne produzindo nitrosaminas (8).

As N-nitrosaminas podem ser divididas em voláteis e não voláteis (9), sendo que, as nitrosaminas voláteis como a: N-nitrosodimetilamina (NDMA); N-nitrosodietilamina (NDEA); N-nitrosopiperidina (NPIP) e N-nitrosopirrolidina têm sua presença relatada em salsichas (10, 11). Segundo o IARC (International Agency for Research on Cancer) há suficientes evidências de que estas nitrosaminas são carcinogênicas para humanos (12).

O procedimento recomendado pela AOAC para a separação das nitrosaminas voláteis nos alimentos é a destilação a vácuo (13) e a extração por coluna contendo celite (13). No entanto, estes métodos apresentam algumas limitações como o elevado consumo de tempo, pequena possibilidade de mecanização, perda do analito durante o processo de concentração e emprego de solventes.

Com a implantação do programa da Agência de Proteção Ambiental dos EUA, EPA – “Environmental Protection Agency”, que apresenta alternativa visando a redução de solventes tóxicos e eliminação de clorofluorcarbono (CFC) (14), percebe-se uma preocupação da comunidade científica no desenvolvimento de técnicas que utilizem pouca quantidade de solvente tóxico ou, ainda, de técnicas que dispensem o uso dos mesmos. Assim sendo, técnicas alternativas como a extração em fase-sólida (SPE) (15-20) e, mais recentemente, a microextração em

fase sólida (SPME) (20, 21) tem sido recomendados como procedimentos para o preparo de amostra de N-nitrosaminas voláteis.

A SPME é uma técnica de extração e pré-concentração rápida, simples e que dispensa o uso de solventes extratores e manipulação excessiva de amostra, descrita por ARTHUR e PAWLISZYN (22) no início da década de 90 e que tem sido extensivamente estudada e aplicada a diversas matrizes como alternativa às metodologias tradicionais (23). O analito é diretamente extraído da amostra e concentrado no revestimento da fibra (24). As N-nitrosaminas voláteis são normalmente separadas e quantificadas por cromatografia gasosa com detectores específicos. O detector de quimiluminescência (TEA, do inglês, Thermal Energy Analyser) é indicado na literatura como sendo o detector mais empregado na determinação de N-nitrosaminas voláteis, em função de sua elevada seletividade (8, 10, 11, 13, 16-18, 20, 21, 25-31). Porém, este detector, como outros, é susceptível a interferências, sendo assim recomendada a confirmação de identidade das N-nitrosaminas pelo detector de massa (32).

O objetivo do presente trabalho é o desenvolvimento, otimização e validação de método para a determinação de nitrosaminas voláteis em salsichas “hot-dog” usando a microextração em fase sólida com amostragem no “headspace” e determinação por cromatografia a gás com detector de quimiluminescência (HS-SPME-GC-TEA).

MATERIAL E MÉTODOS

Instrumentação analítica e condições cromatográficas

GC-TEA. As análises por GC-TEA foram realizadas em um equipamento Agilent Modelo 6890 (Agilent, EUA), acoplado a um detector TEA Modelo 610 (Thermo Orion, EUA) operando no modo nitrosaminas. A temperatura da interface e a temperatura de pirólise foi ajustada em 250 °C e 550 °C, respectivamente. A coluna usada foi megabore HP-INOWAX (100 % polietilenoglicol), 30 m x 530 µm, d.i.1 µm, (Agilent, EUA). Foram realizadas injeções de 2 µL no modo “splitless”. A temperatura do injetor foi de 200 °C e como gás de arraste foi usado hélio a uma

vazão de 5 mL min⁻¹. A temperatura do forno seguiu a seguinte programação: 100 °C (3min), 20 °C min⁻¹ até 150 °C. O tempo de corrida foi de 8.5 minutos.

Equipamentos empregados nas etapas de preparo de amostra

Banho de recirculação de água Modelo 9000 (PolyScience, EUA); Liquidificador Modelo 33BL79 (Waring Commercial, EUA); Chapa de agitação (Fisatom, Brasil).

Material para microextração em fase sólida (SPME)

Para a microextração em fase sólida foi usado "holder" Supelco, EUA, para a fibra. Os recobrimentos da fibra avaliados foram polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS/DVB) 65 µm (Supelco, EUA) e polidimetilsiloxano-divinilbenzeno-carboxen (PDMS-DVB-CAR) 50/30 µm (Supelco, EUA).

Reagentes e padrões

Todos os reagentes utilizados foram de grau p.a. As soluções foram preparadas com água destilada e purificada em sistema Milli-Q (Millipore, EUA). O metanol utilizado no preparo das soluções para a curva analítica foi nanograde da Mallinckrodt (México).

Os padrões analíticos adquiridos junto a Sigma-Aldrich (EUA) foram: N-Nitrosodimetilamina (99,99 %), N-nitrosodietilamina (99,99 %), N-nitrosopiperidina (99,99 %), N-nitrosopirrolidina (99,99 %), e N-nitrosopropilbutilamina (99,99 %).

Soluções

Foi preparada solução estoque padrão contendo $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada nitrosamina (NDMA, NDEA, NPIP e NPIR), as quais foram armazenadas a 4°C por 2 meses. A partir das soluções estoque, semanalmente era preparada uma solução contendo $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada uma das nitrosaminas e, a partir desta, era preparada uma solução de trabalho contendo $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$. Solução de NPBA (N-nitrosopropilbutilamina) $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ também foi preparada para ser utilizada como padrão interno.

Para a construção da curva analítica (injeção direta no GC-TEA), volumes apropriados da solução de trabalho de concentração de $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ e da solução de NPBA $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ foram diluídos para obter concentrações de 0,010; 0,020; 0,040; 0,060; 0,080 e $0,100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NDMA, NDEA, NPIP e NPIR, tendo a NPBA como padrão interno na concentração de $0,050 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Sistema cromatográfico

Os parâmetros empregados para avaliar a separação cromatográfica das N-nitrosaminas no GC-TEA foram: fator de retenção (k), resolução (R_s) e fator de separação (α). Esses parâmetros foram calculados a partir de valores extraídos dos cromatogramas, utilizando as equações de acordo com BRUCE et al.(33).

Uma vez otimizadas as condições analíticas para a separação e quantificação das nitrosaminas por GC-TEA foram construídas curvas analíticas (com seis pontos de concentração em duplicata) para todas as nitrosaminas em estudo. Os parâmetros para avaliação do sistema foram: faixa linear, linearidade, sensibilidade e precisão intra- e inter-dias.

Alíquotas de $2 \mu\text{L}$ das soluções de concentrações 0,010; 0,020; 0,040; 0,060; 0,080 e $0,100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NDMA, NDEA, NPIP e NPIR, foram injetadas no GC-TEA em duplicata, para avaliar a faixa linear e a linearidade de resposta do detector.

A sensibilidade foi calculada a partir do coeficiente angular médio das curvas analíticas obtidas para as nitrosaminas em estudo.

A precisão intra- e inter-dias foram avaliadas através de cinco análises de uma solução de NDMA, NDEA, NPIR e NPIP na concentração de $0,060 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,050 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Para avaliar a estabilidade da solução de trabalho uma solução contendo $0,050 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NDMA, NDEA, NPIP e NPIR, foi injetada em três dias diferentes (**anexo 2**). Todas as determinações foram realizadas em duplicata.

Amostras

Sete marcas diferentes de salsichas “hot-dog” foram adquiridas no comércio de Campinas, SP, no período de Setembro a Novembro de 2005.

Preparo da amostra. Para a determinação de nitrosaminas nas salsichas, as mesmas foram trituradas em liquidificador de aço inox (Modelo 33BL79, Waring Commercial, EUA) com gelo seco, 2,50 g foram pesadas em frasco de 24 mL fechado com septo de silicone-teflon (CRS, EUA) e adicionado 4,32 g de cloreto de sódio (Synth, Brasil). De forma semelhante procedeu-se para as amostras previamente fritas e cozidas.

Amostras fritas. Quatro amostras escolhidas aleatoriamente foram cortadas em rodela de aproximadamente 1 cm de espessura e fritas em panela sem óleo por, aproximadamente, 3 min, tomando-se cuidado para que ambos os lados fossem fritos. As amostras foram resfriadas à temperatura ambiente.

Amostras cozidas. Quatro amostras, inteiras, escolhidas aleatoriamente foram levadas ao cozimento, segundo as instruções do fabricante, em água fervente onde ficaram totalmente imersas até fervura. Logo após o fogo foi desligado e as salsichas permaneceram na panela fechada por 3 minutos. As amostras foram resfriadas à temperatura ambiente.

Otimização das condições de SPME-GC-TEA

A otimização das condições de operação da SPME foi feita através de um planejamento experimental conforme será descrito no item seguinte.

Para a realização dos ensaios foram utilizados frascos de capacidade de 24 mL, os quais foram fechados com septos de teflon/silicone. O volume da amostra foi fixado em 12 mL.

Os frascos fechados foram imersos em banho termostático, a amostra agitada por intermédio de uma barra magnética (1 cm x 0,5 cm) à 1200 rpm e após um tempo de equilíbrio a fibra foi exposta no “headspace” por um tempo previsto no planejamento. Após o tempo de extração, a fibra foi introduzida no injetor do cromatógrafo, para a dessorção térmica dos analitos, a uma temperatura de 240 °C, durante 8,5 min. Esta condição foi otimizada, através de testes preliminares, para uma maior eficiência na dessorção das nitrosaminas da fibra. As condições experimentais foram estabelecidas mediante planejamento experimental e as condições cromatográficas empregadas foram as mesmas descritas anteriormente. O sistema empregado para os ensaios usando a SPME está no **anexo 3**.

Planejamento experimental. Para distinguir os parâmetros que afetam a eficiência da SPME na análise, foi realizado um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} . Este planejamento foi avaliado, considerando os fatores tempo de equilíbrio, temperatura e tempo de extração, e adição de sal, de acordo com a **tabela 1**.

Tabela 1. Codificação dos fatores.

Níveis	Tempo de equilíbrio (min)	Temperatura (°C)	Tempo de extração (min)	Adição de sal (%m/v)
-1	5	30	20	18
+1	15	50	30	36

Os resultados deste planejamento forneceram subsídios para realizar um planejamento experimental do tipo fatorial completo composto 2^2 com triplicata do ponto central, utilizando como variáveis o tempo de extração e a temperatura de extração (**tabela 2**). Todos os dados foram analisados pelo programa “Statistic” v. 5.5. (Stasoft Inc., EUA).

Tabela 2. Planejamento composto central 2^2 .

Variáveis	Níveis				
	- 1,4	- 1	0	+ 1	+ 1,4
X_1 – Tempo de Extração (min)	24	30	45	60	66
X_2 - Temperatura do Banho (°C)	24	30	45	60	66
Ensaio	X_1		X_2		
01	30		30		
02	30		60		
03	60		30		
04	60		60		
05	24		45		
06	66		45		
07	45		24		
08	45		66		
09	45		45		
10	45		45		
11	45		45		

Validação do método HS-SPME-GC-TEA

O método proposto foi validado por avaliação dos seguintes parâmetros: faixa linear, linearidade, sensibilidade, recuperação, precisão intra- e inter-ensaios, limite de detecção e limite de determinação. A exatidão do método foi avaliada mediante teste de recuperação.

Os parâmetros de validação foram avaliados da seguinte forma:

Faixa linear. Foram construídas curvas analíticas mediante fortificação de 2,5 g de amostra de salsicha (branco) com padrões de NDMA, NDEA, NPIP e NPIR no intervalo de 60 a 1000 ng, ou seja, nível de fortificação no intervalo de 24 a 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Linearidade (r). Calculadas a partir da regressão linear de três curvas analíticas obtidas conforme descrito para avaliação da faixa linear.

Sensibilidade. Calculada a partir do coeficiente angular médio das curvas analíticas obtidas para as nitrosaminas em estudo.

Recuperação. A recuperação foi avaliada a um nível de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ mediante análise das amostras fortificadas pelo método de adição de padrão.

Precisão intra-ensaio. Foi avaliada pela realização de três análises sucessivas em um mesmo dia de uma amostra fortificada a um nível de concentração de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de cada nitrosamina em estudo.

Precisão inter-ensaios. Foi avaliada pela realização de três análises em três dias diferentes de uma amostra fortificada a um nível de concentração de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de cada nitrosamina em estudo.

Limite de detecção (LOD) e limite de determinação (LOQ). Foram determinados pela razão do sinal-ruído de 3 e 10, respectivamente, medidos nas proximidades do tempo de retenção dos analitos correspondentes.

Análise de amostras por HS-SPME-GC-TEA

Ao frasco de 24 mL, com 2,50 g de amostra e 4,32 g de cloreto de sódio (Synth, Brasil) foi introduzida uma barra magnética (1 cm x 0,5 cm), adicionou-se água até um volume final de 12 mL, formando uma suspensão de salsicha em solução saturada de cloreto de sódio (36 % m/v NaCl). O frasco foi lacrado com septo de teflon/silicone e imerso em um banho termostático a 45 °C. Após um tempo de 10 min, sob agitação constante, a fibra de PDMS-DVB-CAR foi exposta no “headspace” por um tempo de 45 min. Após o tempo de extração, a fibra foi inserida no injetor do cromatógrafo à gás para a dessorção térmica dos analitos, a uma temperatura de 240 °C, durante 8,5 min, operando nas condições cromatográficas descritas anteriormente. A quantificação foi realizada pelo método de adição de padrão. Para tanto, após análise das amostras, as mesmas foram fortificadas com as nitrosaminas presentes em três níveis de concentração no intervalo de 24 a 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e as análises realizadas conforme descrito acima.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Determinação de N-Nitrosaminas por GC-TEA

O detector de quimiluminescência foi operado no modo nitrosaminas, no qual a amostra é introduzida juntamente com o gás carregador dentro de um pirolizador catalítico onde ocorre clivagem nas ligações N–NO ou N–NO₂, liberando o radical nitrosila (NO·). Os produtos originados desta reação passam através de uma câmara de resfriamento onde há remoção dos produtos indesejáveis. No vácuo, os radicais NO· são introduzidos dentro da câmara de reação contendo ozônio, onde são oxidados. Os produtos desta reação, dióxido de nitrogênio (NO₂*) são excitados e quando decaem ao estado fundamental emitem

radiações na região de 600 nm. Esta radiação é detectada por um tubo fotomultiplicador e é proporcional a quantidade de radicais nitrosila presentes na amostra.

As condições de temperatura da coluna do cromatógrafo a gás foram otimizados para permitir a separação da NDMA, NDEA, NPBA, NPIP e NPIR. A NPBA não é encontrada em salsichas e foi um potencial padrão interno. Um cromatograma característico está apresentado na **figura 1**.

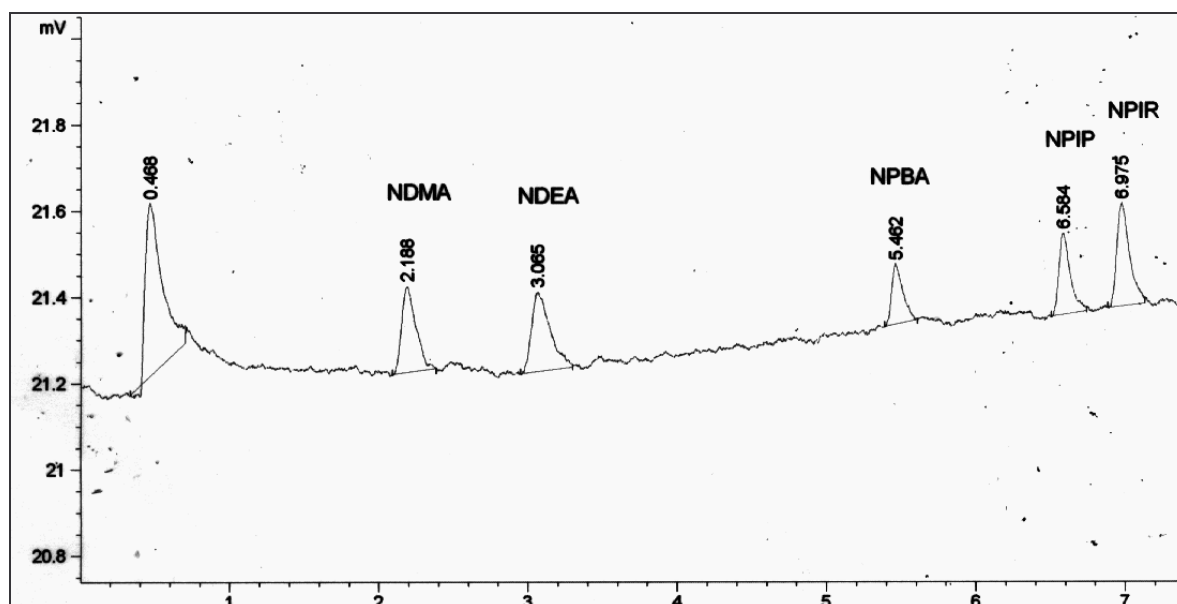


Figura 1. Cromatograma de uma solução padrão contendo $0,050 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NDMA, NDEA, NPIP NPIR e NPBA (padrão interno).

Para o desenvolvimento do método cromatográfico foram considerados os seguintes parâmetros: adequabilidade do sistema (N , R_s , α , k), faixa linear linearidade, sensibilidade e precisão intra-dia e inter-dias (**tabela 3 e 4**). Enquanto os parâmetros do sistema foram estabelecidos a partir dos cromatogramas, os demais termos foram calculados a partir das curvas analíticas para cada analito em questão.

Tabela 3. Parâmetros de adequabilidade do sistema cromatográfico.

Parâmetros de adequabilidade do sistema	NDMA	NDEA	NPBA	NPIP	NPIR
Número de pratos/m (N)	173	268	2203	3093	2781
Fator de retenção (k)	3.68	5.55	10.67	13.07	13.90
	NDEA/ NDMA	NPBA/NDEA	NPIP/NPBA	NPIR/NPIP	
Resolução (R_s)	8.26	14.20	24.79	4.59	
Fator de Separação (α)	1.50	1.22	1.92	1,06	

Quanto ao fator de retenção (k) todos os resultados se apresentaram dentro do valor ótimo recomendado pela literatura ($k > 2$) (33). Já para quantificação é recomendado uma resolução mínima de 1 entre os dois picos mais próximos, e todos os resultados se apresentaram dentro do recomendado ($R_s > 1$) (33). Estes parâmetros indicam separação adequada das nitrosaminas nas condições estabelecidas.

Inicialmente a performance do sistema de análise foi avaliada mediante determinação de nitrosaminas, por injeção direta, através de curvas analíticas.

Tabela 4. Figuras de mérito do sistema GC-TEA.

Parâmetros de validação	NDMA	NDEA	NPIP	NPIR
Faixa linear ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,010 a 0,100	0,010 a 0,100	0,010 a 0,100	0,010 a 0,100
Linearidade	0.9892	0.9943	0.9871	0.9895
Sensibilidade (u.a. $\text{mL } \mu\text{g}^{-1}$)	0.00900	0.01079	0.006182	0.006233
Precisão intra-dia (% RSD, n=5) $0,060 \mu\text{g mL}^{-1}$	4	13	4	7
Precisão inter-dias (% RSD, n=5) $0,050 \mu\text{g mL}^{-1}$	20	11	10	10

Uma vez otimizadas as condições do sistema GC-TEA, foram realizados estudos usando a microextração em fase sólida, tendo como objetivo melhorar a detectabilidade e seletividade da análise.

Microextração em fase sólida

A eficiência de extração na SPME depende de parâmetros como temperatura, tempo de equilíbrio, adição de sal e tempo de exposição da fibra. Quanto ao modo de amostragem, esta pode ser realizada no espaço confinante (“headspace”-HS) ou por imersão direta. Tendo em vista a complexidade da matriz e a volatilidade das nitrosaminas a amostragem foi realizada no HS. A dessorção do analito é realizada por dessorção térmica no injetor do GC-TEA.

Além da fibra de PDMS-DVB-CAR 50/30 μm também foi avaliada a fibra com recobrimento de PDMS/DVB 65 μm , uma vez que foi verificado por Andrade et al. (21) que esse recobrimento permite a extração de NDMA, NDEA, NPIP e NPIR de amostras de lingüiças. Para esse estudo foram empregadas as condições

descritas por Andrade et al. (21), ou seja, t_{eq} : 10 min; T : 45 °C e t_{ex} : 25 min. Os resultados obtidos com as duas fibras estão apresentados na **figura 2**.

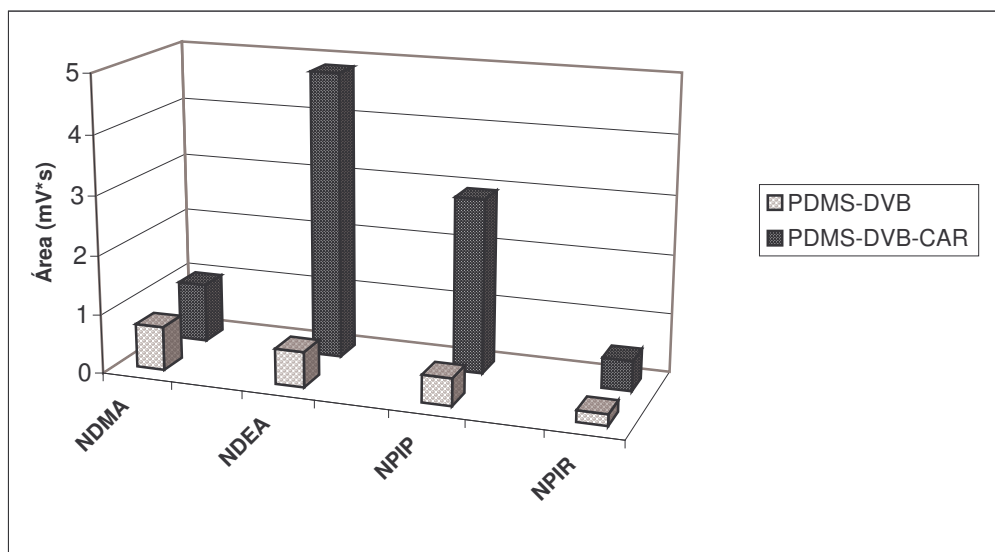


Figura 2. Comparação da fibra PDMS-DVB e PDMS-DVB-CAR na extração de nitrosaminas de salsicha “hot-dog”. Condições: 250 ng de NDMA, NDEA, NPIP e NPIR. PDMS-DVB (t_{eq} : 10 min; T : 45 °C e t_{ex} : 25 min) e PDMS-DVB-CAR (t_{eq} : 10 min; adição de sal: 36 % m/v NaCl; T : 45 °C e t_{ex} : 45 min).

A fibra PDMS-DVB-CAR apresentou melhor eficiência para a extração de todas as nitrosaminas sendo, aproximadamente, cinco vezes maior para NDEA e três vezes maior para NPIP, em comparação com a fibra PDMS-DVB. A fibra mista PDMS-DVB-CAR, devido a presença das partículas de carvão ativado tem aumentada a sua capacidade de retenção, potencializando o efeito de absorção e distribuição para o recobrimento (24).

Após a escolha da fibra, o método de extração foi otimizado através de um planejamento experimental.

Planejamento experimental

Para montar o planejamento fatorial para otimização dos principais parâmetros experimentais na SPME foi necessário realizar experimentos preliminares para a escolha das variáveis independentes, consideradas as mais importantes nas respostas obtidas pela extração por SPME.

As melhores condições experimentais estabelecidas para extração das N-nitrosaminas por HS-SPME foram avaliadas, por um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} com dois níveis (-1 e +1), a influência dos diferentes fatores que afetam o processo de extração tais como: adição de sal, tempo de equilíbrio, tempo e temperatura de extração, utilizando para tanto uma suspensão de salsicha “hot-dog” fortificada. Este planejamento resultou em 8 experimentos, tendo sido verificado que a adição de sal é importante, pois aumentou a eficiência da extração.

O resultado deste experimento demonstrou que o equilíbrio entre a fase líquida e a fase vapor, foi atingido após 5 minutos. Portanto, para eliminar variações quanto ao tempo de equilíbrio, o estudo subsequente foi realizado com um tempo de 10 minutos antes da exposição da fibra no frasco de “headspace”.

No sentido de refinar os dois fatores de maior importância na determinação de N-nitrosaminas por SPME (tempo e temperatura de extração) foi realizado um novo planejamento experimental. O planejamento foi construído como fatorial completo composto 2^2 com três pontos centrais (0) e quatro pontos axiais (-1.41 e +1.41) de acordo com a **tabela 2**. Os pontos axiais asseguram a condição de rotabilidade do planejamento. As superfícies de resposta obtidas para as quatro nitrosaminas estão apresentadas nas **figuras 3 a 5**.

Foram verificados dois perfis diferentes de superfícies de respostas para as nitrosaminas alicíclicas e cíclicas. As **figuras 3 e 4** indicam que a amostragem a 30 °C por um tempo de 60 minutos produz uma melhor recuperação de NDMA e NDEA, na matriz salsicha “hot-dog”. Porém, a NPIP e NPIR apresentaram diferente comportamento; o tempo de extração ótimo foi, aproximadamente, 60 minutos para ambas nitrosaminas e a temperatura que resultou em maior recuperação foi 60 °C (**figuras 5 e 6**). As condições ótimas de extração são

apresentadas na **tabela 5**. Considerando que em amostras de salsichas as N-nitrosaminas mais comumente encontradas são a NDMA, NDEA e NPIP foi necessário estabelecer uma condição que permitisse a extração simultânea das três nitrosaminas da amostra, considerando-se o LOQ e a adequabilidade do tempo de análise.

Embora, o tempo de extração de 60 minutos leve a uma maior eficiência de extração dos analitos e, portanto, permitiria a obtenção de um LOQ mais baixo, verificou-se posteriormente que um tempo de extração de 45 minutos é suficiente para obter um LOQ de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, o qual é o limite de quantificação recomendado pelo FDA (34). Assim, levando-se em consideração o tempo de análise e o LOQ foram estabelecidas as seguintes condições para a extração simultânea das nitrosaminas: tempo de extração: 45 min; temperatura: 45 °C; tempo de equilíbrio: 10 min e adição de sal: 36 % m/v.

Tabela 5. Condições ótimas de extração por HS-SPME-GC-TEA para cada nitrosamina.

Nitrosaminas	Adição de sal (% m/v NaCl)	Tempo de equilíbrio (min)	Temperatura (°C)	Tempo de extração (min)
NDMA	36	10	30	60
NDEA	36	10	30	60
NPIP	36	10	60	60
NPIR	36	10	60	60

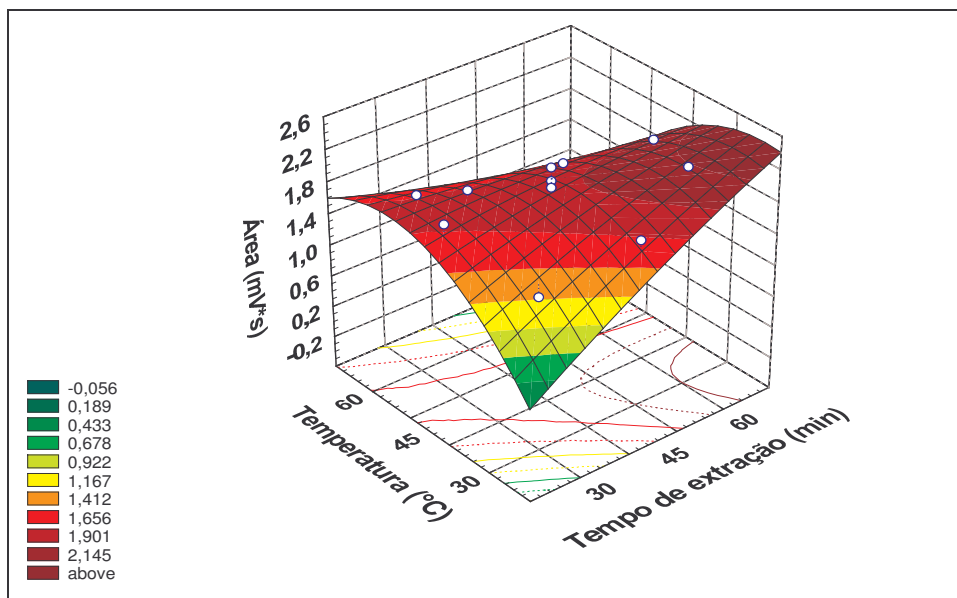


Figura 3. Superfície de resposta para NDMA obtida no planejamento completo composto 2^2 . Área de NDMA x tempo de extração x temperatura.

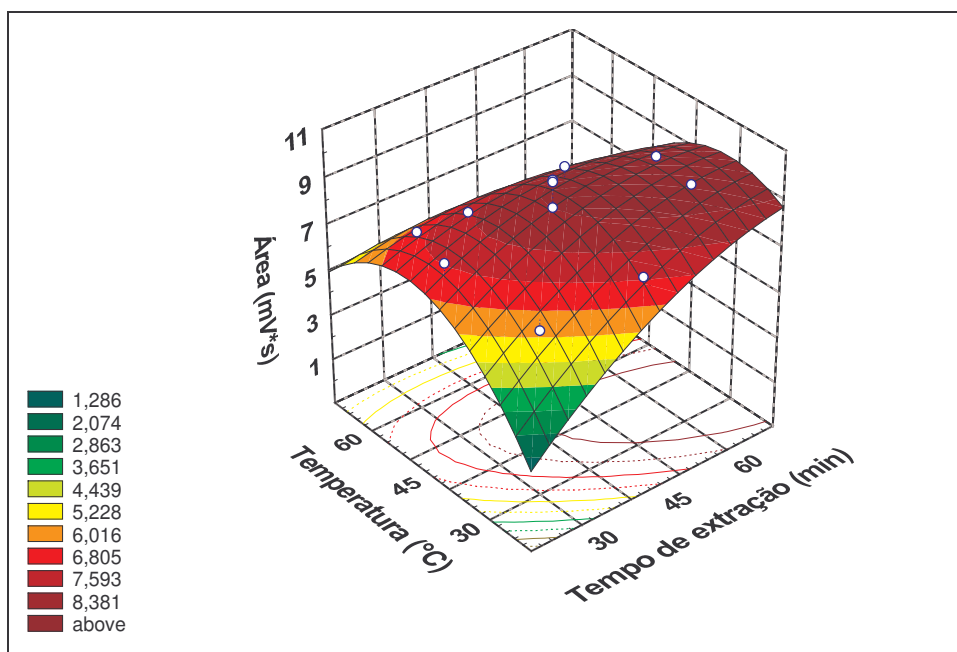


Figura 4. Superfície de resposta para NDEA obtida no planejamento completo composto 2^2 . Área de NDEA x tempo de extração x temperatura.

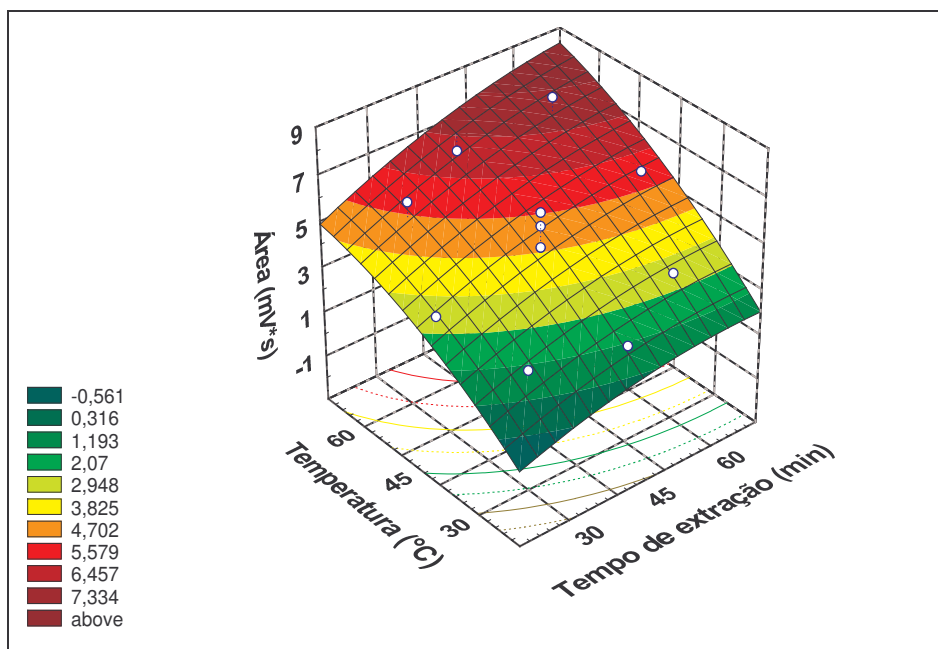


Figura 5. Superfície de resposta para NPIP obtida no planejamento completo composto 2^2 . Área de NPIP x tempo de extração x temperatura.

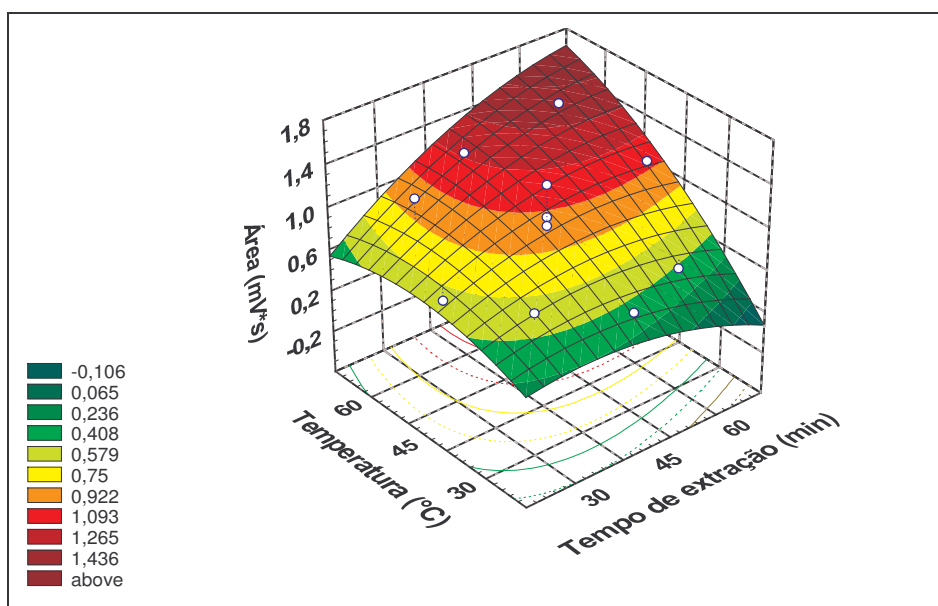


Figura 6. Superfície de resposta para NPIR obtida no planejamento completo composto 2^2 . Área de NPIR x tempo de extração x temperatura.

Parâmetros de validação

Uma vez otimizadas as condições analíticas para a extração e quantificação das N-nitrosaminas por HS-SPME-GC-TEA, o método foi validado com o objetivo de garantir a exatidão, seletividade e reprodutibilidade e dentro da faixa na qual as N-nitrosaminas foram determinadas.

O método HS-SPME-GC-TEA proposto para a determinação de nitrosaminas em salsichas foi validado por avaliação dos seguintes parâmetros: faixa linear, linearidade, sensibilidade, recuperação, precisão intra- e inter-ensaios, limite de detecção e limite de determinação, cujos parâmetros estão apresentados na **tabela 6**.

Tabela 6. Parâmetros de validação para determinação de nitrosaminas em salsichas por HS-SPME-GC-TEA.

Parâmetros de validação	NDMA	NDEA	NPIP	NPIR
Faixa linear (ng)	60,0 a 1000	60,0 a 1000	60,0 a 1000	60,0 a 1000
Linearidade ^a	0,9884	0,9925	0,9980	0,9970
Sensibilidade (u.a.ng ⁻¹)	0,01037	0,04670	0,03890	0,007076
Precisão intra-ensaio (%RSD, n=3) 250 ng	13	7	5	10
Precisão inter-ensaios (%RSD, n=3) 250 ng	12	11	9	10
Recuperação (%) ^b	103	101	97	100
Limite de detecção (µg Kg ⁻¹) ^c	3	3	3	3
Limite de determinação (µg Kg ⁻¹) ^c	10	10	10	10

^aLinearidade é expressa pelo coeficiente de correlação da curva de calibração.

^bA recuperação foi calculada através do método de adição de padrão, mediante análise de uma amostra fortificada com 100 µg kg⁻¹.

^cOs Limites de detecção e determinação foram calculados com base em uma amostra de 2,50 g.

Os resultados obtidos foram satisfatórios, as curvas analíticas foram construídas por adição de padrão, devido à interferência da matriz, apresentando desta forma linearidades adequadas (**figura 7**).

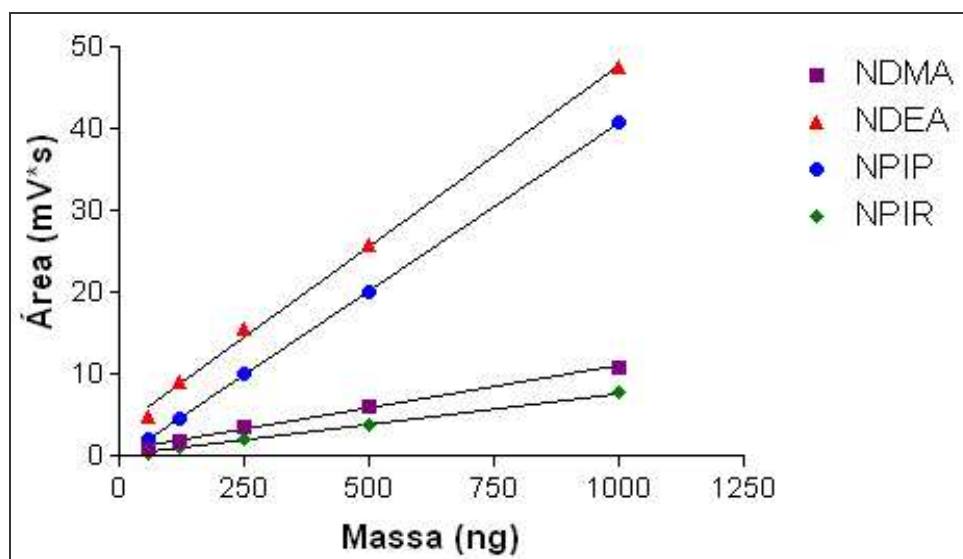


Figura 7. Curvas de adição de padrão (n=3) para a NDMA, NDEA, NPIP e NPIR.

A repetibilidade do método foi avaliada através da precisão intra-ensaio e inter-ensaio analisando-se uma amostra fortificada com $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ (n=3). O resultado foi expresso como estimativa do desvio padrão relativo (RSD), apresentando-se uma variação de no máximo 12 %, dentro da variação máxima considerada que é de 16 % (35).

A partir dos dados obtidos verifica-se que o método de extração HS-SPME-GC-TEA apresenta sensibilidade adequada para a determinação de N-nitrosaminas voláteis em salsichas “hot-dog”.

Análise de amostras por HS-SPME-GC-TEA

As amostras de salsicha “hot-dog” foram analisadas por HS-SPME-GC-TEA, utilizando a fibra PDMS-DVB-CAR (**figura 8**). Para tanto, as condições do sistema HS-SPME e GC-TEA foram ajustadas de acordo com o estabelecido anteriormente.

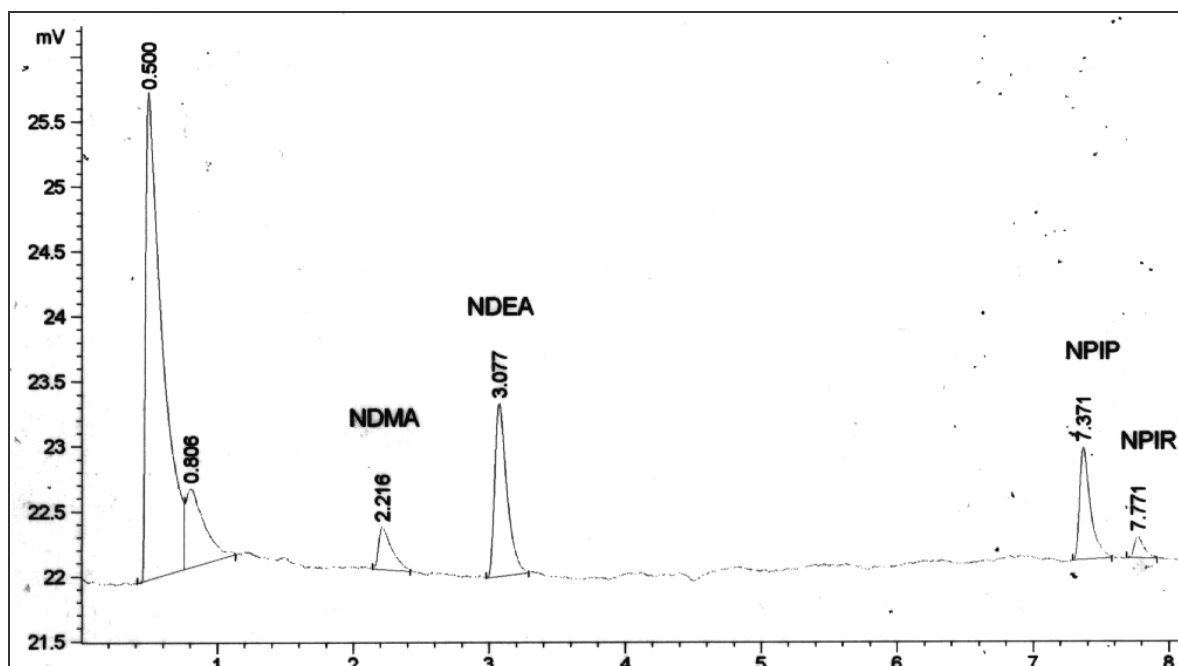


Figura 8 Cromatograma obtido por GC-TEA de uma amostra de salsicha “hot-dog” fortificada com $120 \mu\text{g Kg}^{-1}$ de cada uma das nitrosaminas e extraídas por SPME. Condições cromatográficas descritas anteriormente.

Em todas as amostras analisadas a concentração de todas as nitrosaminas nesse estudo esteve abaixo do limite de detecção do método, o qual pode ser devido a presença do ascorbato de sódio, ou neste caso, do sal eritorbato de sódio, que inibe a formação de nitrosaminas. Ainda, Maiolla et al. 2004 (36) verificaram que o teor médio de nitrito e nitrato em amostras de salsichas comercializadas na região de Campinas é de 37 mg kg^{-1} e 107 mg kg^{-1} ,

respectivamente. Esses resultados abaixo dos limites estabelecidos pela legislação em vigor (150 mg kg^{-1} para nitrito e 300 mg kg^{-1} nitrato quantidade residual máxima expressa como nitrito de sódio) (37) podem ter contribuído para a não detecção das nitrosaminas nas amostras de salsichas.

Efeito do Aquecimento. A influência do aquecimento na formação de nitrosaminas foi investigada através da análise de salsicha “hot-dog” logo após a fritura e o cozimento em água. Segundo Fazio et al. (38) outras carnes curadas, que não o bacon, apresentam alta quantidade de água, e durante a fritura pode acontecer a liberação das nitrosaminas voláteis juntamente com o vapor de água. Durante o cozimento em água pode ter ocorrido a perda de nitrosaminas para a água de cozimento.

Conclusão

O método de HS-SPME-GC-TEA desenvolvido para a determinação de nitrosaminas voláteis em salsichas apresenta sensibilidade e seletividade adequada para a determinação destes compostos tóxicos em alimentos, tendo em vista que o nível de ação estabelecido pelo FDA (“Food and Drug Administration” dos Estados Unidos) é de $10 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ (34). A técnica de SPME apresentou como vantagens simplicidade de manuseio, eficiência, sensibilidade e repetibilidade adequada na determinação de nitrosaminas em amostras de salsicha, além de não utilizar solventes orgânicos.

Através do método desenvolvido, realizamos a análise em amostras de salsicha “hot-dog”. A partir dos resultados concluímos que o eritorbato de sódio foi eficiente como inibidor da nitrosação e que a baixa quantidade de nitrito e nitrato, já encontradas anteriormente nas salsichas, também contribuiu para a ausência de nitrosaminas. O aquecimento durante o modo de preparo não proporcionou a formação de nitrosaminas.

Embora não tenhamos verificado a presença de nitrosaminas nas amostras analisadas se faz necessário a realização de mais estudos em outros

grupos de alimentos uma vez que o consumo regular desses compostos apresentam riscos à saúde da população.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro do FINEP/RECOPE e CNPQ, Brasil.

REFERÊNCIAS

- (1) Popkin, B.M. Urbanization, lifestyle changes and the nutrition transition. *World Dev.* **1999**, 27, 1905-1916.
- (2) IPCE. Instituto de Pesquisa Capacitação Especialização. Disponível em: www.pontocritico.com.br/noticias.htm Acesso em: 25 maio 2005.
- (3) INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Salsicha em Lata Tipo Viena, Carne Seca (Charque) e Jerked Beef. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/salsicha.asp>. Acesso em: 22 nov. 2004.
- (4) Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 4 do dia 31 de março de 2000. Disponível em: <http://oc4j.agricultura.gov.br/agrolegis/Imagem?codArquivo=1641> Acesso em: 25 maio 2005.
- (5) Fox, J. B. JR. Los pigmentos de la carne. In: *Ciencia de la carne y de los productos carnicos*; Price, J. F.; Schweigert, B. S., Editorial Acribia S.A.: Zaragoza, Espanha, 1994; pp.175.
- (6) Roça, R. O. Cura de carnes. Disponível em: <http://www.fca.unesp.br/outros/tcarne/textos/Roca111.pdf>. Acesso em: 16 maio 2005.
- (7) Janssen, M. M. T. Food Additives. In: *Food Safety and Toxicity*; VRIES, J., CRC Press: Boca Raton, 1997.
- (8) Shahidi, F., Pegg, R. B., Sen, N. P. Absence of volatile N-nitrosamines in cooked nitrite-free cured muscle foods. *Meat Sci.* **1994**, 37, 327-336.

- (9) Tricker, A. R.; Kubacki, S. J. Review of the occurrence and formation of non-volatile N-nitroso compounds in foods. *Food Addit. Contam.* **1992**, 9, 39-69.
- (10) Mavelle, T.; Bouchikhi, B.; Debry, G. The occurrence of volatile N-nitrosamines in French foodstuffs. *Food Chem.* **1991**, 42, 321-338.
- (11) Tricker, A. R.; Pfundstein, B.; Theobald, E.; Preussmann, R.; Spegekhalder, B. Mean daily intake of volatile N-nitrosamines from foods and beverages in west Germany in 1989-1990. *Food Chem. Toxicol.* **1991**, 29, 729-732.
- (12) IARC. International Agency for Research on Cancer. Monographs Programme on the Evaluation of Carcinogenic Risks to humans; França, 1978; vol.17, p.83, Disponível em: <http://www-cie.iarc.fr/htdocs/indexes/vol17index.html>. Acesso em: 02 dez. 2004.
- (13) AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, Method 984.18 (16th ed.) Gaithersburg, 1997.
- (14) EPA. Pollution Prevention Strategy Federal. U.S. Environmental Protection Agency. Regist. **1991**, 56, 7849-7864.
- (15) Takatsuki, K.; Kikuchi, T. Determination of N-nitrosodimethylamine in fish products using gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *J. Chromatogr.* **1990**, 508, 357-362.
- (16) Pensabene, J. W.; Fiddler, W.; Gates, R. A. Solid-phase extraction method for volatile N-nitrosamines in hams processed with elastic rubber netting. *J. AOAC Int.* **1992**, 75, 438-442.
- (17) Pensabene, J. W.; Fiddler, W. Gas chromatographic/thermal energy analyser method for N-nitrosodibenzylamine in hams processed with elastic rubber netting. *J. AOAC Int.* **1994**, 77, 981-984.
- (18) Raoul, S.; Gremaud, E.; Biaudet, H.; Turesky, R. J. Rapid solid-phase extraction method for the detection of volatile nitrosamines in food. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 4706-4713.
- (19) Sen, N. P.; Seaman, S. W.; Burgess, C.; Baddoo, P. A.; Weber, D. Investigation on the possible formation of N-nitroso-methylurea by nitrosation of creatinine in model systems and in cured meats at gastric pH. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 5088-5096.
- (20) Andrade, R.; Reyes, F. G. R.; Rath, S. A Method for the determination of volatile N-nitrosamines in food by HS-SPME-GC-TEA. *Food Chem.* **2005**, 91, 173-179.
- (21) Sen, N. P.; Seaman, S. W.; Page, B. D. Rapid semi-quantitative estimation of N-nitrosodibutylamine and N-nitrosodibenzylamine in smoked hams by solid-

- phase microextraction followed by gas chromatography-thermal energy analysis. J. Chromatogr. A **1997**, 788, 31-140.
- (22) Arthur, C. L.; Pawliszyn, J. Solid-phase microextraction with thermal-desorption using fused-silica optical fibers. Anal. Chem. **1990**, 62, 2145-2148.
- (23) Augusto, F.; Valente, A. L. P. Applications of solid-phase microextraction to chemical analysis of live biological samples. Trends Anal. Chem. **2002**, 21 428-438.
- (24) Kataoka, H.; Lord, H. L.; Pawliszyn, J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. J. Chromatogr. A **2000**, 880, 35-62.
- (25) Fiddler, W.; Pensabene, J. W.; Gates, R. A.; Hale, M.; Jahncke, M. N-nitrosodimethylamina formation in cooked frankfurters containing Alaska Pollock (*Theragra chalcogramma*) Mince and Surimi. J. Food Sci. **1992**, 57, 569-595.
- (26) Sen, N. P.; Seaman, S. W.; Baddoo, P. A.; Weber, D. Further studies on the formation of nitrosamines in cured pork products packaged in elastic rubber nettings. J. Food Sci. **1988**, 53, 731-738.
- (27) Song, P. J.; Hu, J. F. N-nitrosamines in chinese food. Food Chem. Toxicol. **1988**, 26, 205-208.
- (28) Oliveira, C. P.; Glória, M. B. A.; Barbour, J. F.; Scalan, R. A. Nitrate, nitrite, and volatile nitrosamines in whey-containing food products. J. Agric. Food Chem. **1995**, 43, 967-969.
- (29) Glória, M. B. A.; Barbour, J. F.; Scalan, R. A. Volatile nitrosamines in fried bacon. J. Agric. Food Chem. **1997**, 45, 1816-1818.
- (30) Jo, C.; Ahn, H. J.; Son, J. H.; Lee, J. W.; Byun, M. W. Packaging and irradiation effect on lipid oxidation, color, residual nitrite content, and nitrosamine formation in cooked pork sausage. Food Control **2003**, 14, 7-12.
- (31) Lee, S. J.; Shin, J. H.; Sung, N. J.; Kim, J. G.; Hotchkiss, J. H. Effect of cooking on the formation of N-nitrosodimethylamine in Korean dried seafood products. Food Addit. Contam. **2003**, 20, 31-36.
- (32) Yurchenko, S.; Mölder, U. Volatile N-nitrosamines in various fish products. Food Chem. **2006**, 96, 235-353.
- (33) Bruce, P.; Minkinen, P.; Riekkola, M. L. Practical method validation sufficient for in analysis method. Mikrochim. Acta **1998**, 128, 93-106.
- (34) USDA. US Code of Federal Regulations. Food Safety and Inspection Service, USDA § 424.22. Certain other permitted uses. 9 CFR Ch. III (1-1-03 Edition). Disponível em: <<http://www.usda.gov>> Acesso em: 02 fev. 2004.

- (35) European Commission Regulation 2002/657/EC, 12 August. Off. J. Eur. Comm. **2002**, L221.
- (36) Maiolla, V.; Cazenave, S. O. S.; Reyes, F. G. R. Determinação de nitrato e nitrito por sistema FIA em salsichas. XII Congresso Interno de Iniciação Científica, Setembro, **2004**; pp. 208.
- (37) Brasil. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/1004_98.htm Acesso em: 3 jun. 2003.
- (38) Fazio, T.; White, R. H.; Dusold, L. R.; Howard, J. W. Nitrosopyrrolidine in cooked bacon. J. AOAC **1985**, 56, 919.

CONCLUSÕES GERAIS

As nitrosaminas são compostos potencialmente carcinogênicos o que justifica a monitoração da sua presença em alimentos, sobretudo naqueles em que há a probabilidade da formação de nitrosaminas durante o preparo como, por exemplo, a salsicha.

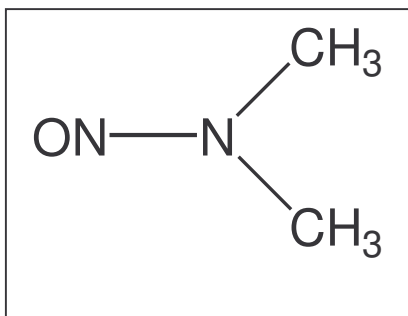
O método HS-SPME-GC-TEA foi desenvolvido para a determinação de nitrosaminas e apresentou sensibilidade e seletividade adequadas para a determinação desses compostos em salsichas. A simplicidade de manuseio, eficiência, sensibilidade e repetibilidade foram as vantagens da técnica de SPME.

Diante dos resultados encontrados através do método desenvolvido é possível concluir que as salsichas “hot-dog” avaliadas passaram por padrões corretos de fabricação já que não foi verificada a presença de nitrosaminas nas amostras analisadas. Além disso, o uso de eritorbato de sódio como acelerador da cura parece ter contribuído para a prevenção da formação de nitrosaminas mostrando ser um bom agente inibidor.

Apesar da formação de nitrosaminas ser favorecida pelas altas temperaturas, o preparo do produto segundo instruções da embalagem, não proporcionou a formação de nitrosaminas.

Embora não tenhamos encontrado nitrosaminas nas salsichas avaliadas são necessários novos estudos para determinar a presença dessas substâncias em outros grupos de alimentos, uma vez que o consumo regular desses compostos apresenta risco à saúde da população.

ANEXOS

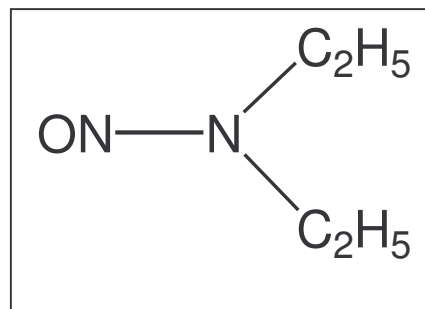


NDMA

Peso molecular: 74.08 AMU

Ponto de ebulição: 153 °C

Peso específico/densidade: 1.006 g mL⁻¹

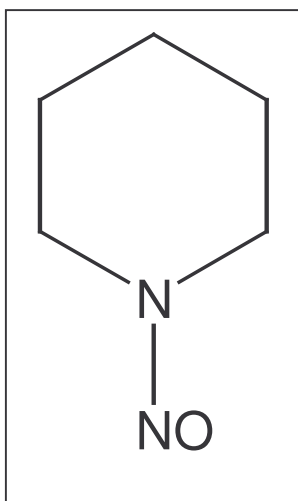


NDEA

Peso molecular: 102.1 AMU

Ponto de ebulição: 177 °C

Peso específico/densidade: 0.95 g mL⁻¹

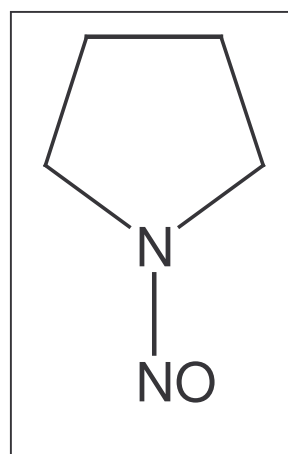


NPIP

Peso molecular: 114.1 AMU

Ponto de ebulição: 225 °C

Peso específico/densidade: 1.063 g mL⁻¹



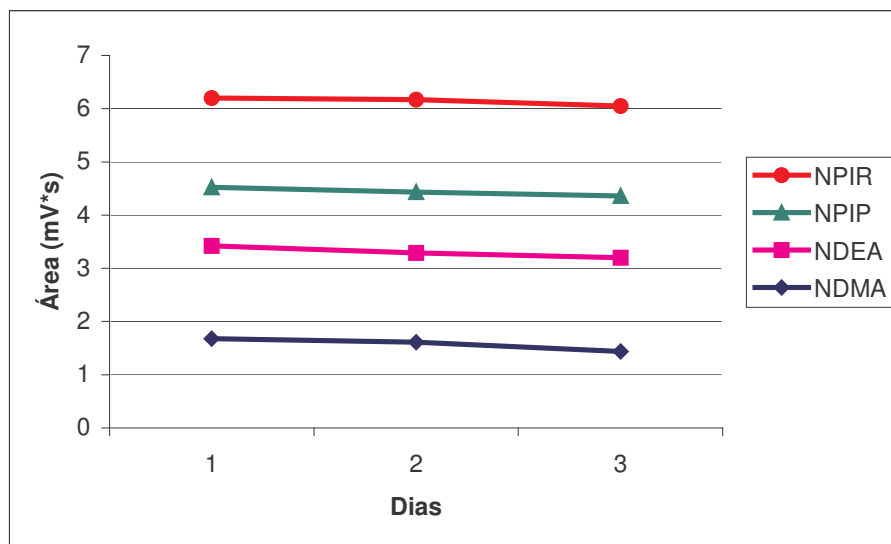
NPIR

Peso molecular: 100.12 AMU

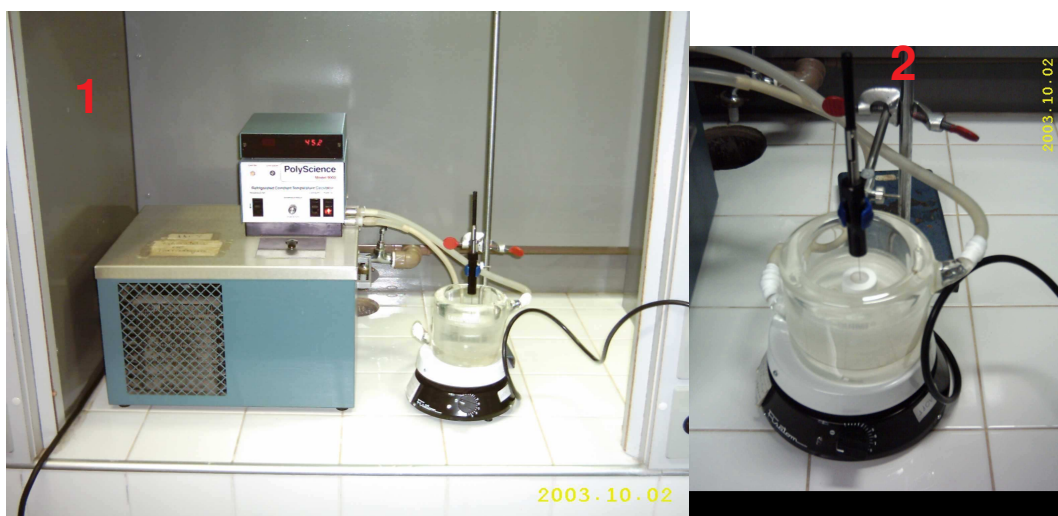
Ponto de ebulição: 216 - 218 °C

Peso específico/densidade: 1.094 g mL⁻¹

ANEXO 1. Estruturas das N-nitrosaminas voláteis estudadas e suas propriedades físicas e químicas.



Anexo 2. Estabilidade da solução $0,050 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NDMA, NDEA, NPIP e NPIR.



Anexo 3. Foto do sistema empregado para a microextração em fase sólida. Do lado esquerdo aparece o banho de recirculação de água (1) acoplado num