

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS DE ORIGEM
ANIMAL
CURSO DE MESTRADO PROFISSIONAL**

**NITRATO E NITRITO DE SÓDIO EM CARNES EM NATUREZA E EM
PRODUTOS CÁRNEOS SEM SUAS ADIÇÕES**

Autor: Alfredo Bianco Junior

PORTO ALEGRE

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS DE ORIGEM
ANIMAL
CURSO DE MESTRADO PROFISSIONAL

NITRATO E NITRITO DE SÓDIO EM CARNES EM NATUREZA E EM
PRODUTOS CÁRNEOS SEM SUAS ADIÇÕES

Autor: Alfredo Bianco Junior

**Dissertação de Mestrado apresentada
como requisito parcial para obtenção
do grau de Mestre em Alimentos de
Origem Animal.**

Orientadora: Liris Kindlein

PORTO ALEGRE

2020

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Bianco Junior, Alfredo
Nitrato e nitrito de sódio em carnes em natureza e em produtos cárneos sem suas adições / Alfredo Bianco Junior. -- 2020.
73 f.
Orientadora: Liris Kindlein.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Alimentos de Origem Animal, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Nitrato e nitrito. 2. carnes em natureza. 3. produtos rótulo limpo. 4. fiscalização. I. Kindlein, Liris, orient. II. Título.

Alfredo Bianco Junior

NITRATO E NITRITO DE SÓDIO EM CARNES EM NATUREZA E EM PRODUTOS
CÁRNEOS SEM SUAS ADIÇÕES

Aprovada em: ___/___/___

APROVADO POR:

Prof. Dr^a Liris Kindlein

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Orientadora e Presidente da Comissão

Dr. Adriano da Silva Guahyba

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Membro da Comissão

Dr^a. Carla Susana Rodrigues

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Membro da Comissão

Dr^a. Cristhiane Stecanella de Oliveira Cattani

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Alfredo e Isonia, meus irmãos e irmã pelo apoio, pelo carinho e por quem sou hoje, devo muito a eles pela minha formação pessoal.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), pública, gratuita e de qualidade, sem a qual não teria me graduado em Medicina Veterinária, e agora finalizado o Mestrado Profissional em Alimentos de Origem Animal.

A minha orientadora Professora Dra. Liris Kindlein pela oportunidade de realizar este trabalho, por ter me acolhido como seu orientado, pela amizade e todo auxílio.

Ao Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal e ao 9º Serviço de Inspeção de Produtos de Origem Animal, em especial aos colegas, o ex-Chefe, Clóvis Augusto Versalli Serafini e, a atual Chefe, Adriana de Cássia Neves.

Às equipes dos Serviços de Inspeção Federal subordinadas ao 9º Serviço de Inspeção de Produtos de Origem Animal, pela atenção e coleta das amostras de produtos de origem animal analisadas no trabalho.

À equipe da Seção Laboratorial Avançada de Santa Catarina (SLAV) do Laboratório Federal de Defesa Agropecuária do Rio Grande do Sul (LFDA-RS), em especial ao colega e Chefe Heitor Daguer, pela amizade, apoio e operacionalização dos ensaios analíticos.

A todos os meus amigos e amigas pelo apoio e amizade.

*“A ciência não é uma ilusão, mas seria uma
ilusão acreditar que poderemos encontrar
noutro lugar o que ela não nos pode dar.”*

Sigmund Freud

RESUMO

Nitrato e nitrito de sódio ou potássio são aditivos alimentares amplamente utilizados em produtos cárneos como conservador para fins de obtenção de características desejáveis e mitigação de riscos, como a esporulação e multiplicação de células vegetativas de *Clostridium botulinum*. Por outro lado, a utilização desses aditivos pode favorecer a formação de nitrosaminas e o aparecimento de quadros de intoxicação em humanos (metahemoglobinemia). Em razão dos efeitos negativos, a legislação brasileira estabelece limites máximos seguros para a utilização de nitrato e nitrito em produtos cárneos, à exceção de produtos em natureza em que não são admitidos. Apesar disso, a insegurança e resistência dos consumidores perante o uso de conservantes em alimentos, incluindo o nitrito, aumentaram em todas as partes do mundo originando movimentos como o chamado “clean label”. Neste trabalho, foram analisadas 120 amostras de carnes em natureza (bovina, suína e frango) e de produtos derivados de carne não adicionados de sais de cura para investigar a presença e determinar as concentrações de nitrato e nitrito de sódio naturais em produtos elaborados por agroindústrias brasileiras. As análises foram conduzidas através de um método por eletroforese capilar, validado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Concentrações quantificáveis de nitrato de sódio variando entre 7,80 a 25,24 mg/kg e entre 8,74 a 32,27 mg/kg foram encontradas, respectivamente, em 40% das amostras de carne suína em natureza e em 40% dos produtos formulados sem adição de sais de cura. Não foram obtidas concentrações quantificáveis de nitrato de sódio nas amostras de carnes bovina e frango em natureza, e tampouco nitrito de sódio nas carnes das três espécies avaliadas. Os resultados de análises de rotina, que demonstram a presença de nitrato de sódio em produtos não adicionados do componente, devem ser interpretados com cautela, sob risco de serem caracterizados como adulteração de forma equivocada.

Palavras-chave: carne em natureza, nitrato, nitrito, produtos “rótulos limpos”.

ABSTRACT

Sodium and potassium nitrate and nitrite are preservatives widely used in meat products to get technological effects and mitigate risks, such as sporulation and multiplication of vegetative cells of Clostridium botulinum. On the other hand, the use of these additives may favor the formation of nitrosamines and cases of intoxication in humans (methaemoglobinaemia). Due to the negative effects, Brazilian legislation set safe nitrate and nitrite limits in meat products, except in fresh meats where they are not allowed. Despite this, feelings of fear and consumer resistance to the use of preservatives in food, including nitrite, have increased worldwide, giving rise to movements such as the so-called “clean label”. In total, 120 samples of fresh meat (beef, pork and chicken) and meat products without curing salts addition were analyzed to investigate the presence and assess the baseline concentrations of sodium nitrate and nitrite in these kinds of products. These analyzes were conducted by capillary zone electrophoresis, according to a validated method by the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply. Quantifiable nitrate concentrations ranging from 7,80 to 25,24 mg/kg and 8,74 to 32,27 mg/kg were found, respectively, in 40% of fresh pork meat and in 40% of meat products samples. No quantifiable sodium nitrate concentrations were obtained in fresh beef and chicken meat samples, nor sodium nitrite concentrations in the three kinds of meats evaluated. The results of routine analyses, which demonstrate the presence of sodium nitrate in products without curing salts addition should be interpreted with caution, under the risk of being mistakenly characterized as adulteration.

Keywords: Fresh meat, nitrate, nitrite, clean label products.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1 - Concentração de nitrato em ingredientes utilizados na alimentação animal.	18
Figura 1 - Demonstração das reações de formação de nitrosaminas (M e M+ são íons metálicos de transição como Fe^{2+}/Fe^{3+} e outros).....	21
Tabela 2 - Limites máximos de nitrito em ingrediente e alimentos para animais estabelecidos no anexo I da Diretiva 2002/32/EC.	26
Figura 2 – Representação esquemática da reação de Griess.	31
Tabela 3 - Vantagens e desvantagens das técnicas utilizadas para detecção de nitrato e nitrito na rotina laboratorial.	32
Figura 3 – Representação esquemática de um sistema de eletroforese capilar.....	35
Figura 4 - Representação do fluxo eletrosmótico.	36
Tabela 4 – Número de amostras de carne em natureza coletadas por espécie animal e estabelecimento.	38
Tabela 5 – Definição do número mínimo de amostras com base na taxa de prevalência.	39
Tabela 6 - Cortes comerciais e músculos selecionados para análise de carne em natureza de acordo com a espécie.....	40
Tabela 7 - Relação de produtos, número de indústrias produtoras e produtos sem adição de nitrato e nitrito pertencentes à categoria não submetidos a tratamento térmico elaborados entre os meses de fevereiro e junho de 2020.	41
Tabela 8 - Relação e quantidade de produtos coletados para análises de nitrato e nitrito durante a investigação.	42
Tabela 9 – Condições instrumentais para determinação de nitrato e nitrito em produtos cárneos por eletroforese capilar de zona.	45
Tabela 10 - Resultados de análises de nitrato e nitrito de sódio em amostras de carne em natureza das três espécies analisadas (suína, bovina e frango).	47
Figura 5 - Porcentagem de amostras de carne em natureza positivas e negativas para nitrato de sódio por espécie animal. Limite de quantificação do método (LQ = 5 mg/kg). * P < 0,0001 por teste de Fischer.	48
Figura 6 - Eletroferogramas das análises em triplicata de 1 das amostras de carne suína em natureza, positiva para nitrato de sódio (média da amostra = 22,62 mg/kg).....	48

Tabela 11 - Resultados de análises de nitrato de sódio em amostras de carne suína em natureza obtidos por outros pesquisadores.....	53
Tabela 12 - Resultados das análises de nitrato e nitrito de sódio em produtos formulados de acordo com o tipo de carne utilizada na elaboração.....	54
Tabela 13 - Resultados das análises de nitrato e nitrito de sódio por tipo de produto cárneo.	55
Figura 7 – Gráfico demonstrando a percentagem de amostras de produtos formulados positivas e negativas para nitrato de sódio de acordo com o tipo de carne empregado na formulação. Limite de quantificação do método (LQ = 5 mg/kg). *P < 0,0001 por teste de Qui-quadrado.....	56
Figura 8 – Gráfico demonstrando a percentagem de amostras de produtos formulados positivas e negativas de nitrato de sódio por tipo de produto cárneo. Limite de quantificação do método (LQ = 5 mg/kg). *P < 0,0001 por teste de Qui-quadrado.....	56
Figura 9 - Gráficos comparativos da percentagem de amostras positivas e negativas para nitrato de sódio em carnes em natureza e produtos formulados, por tipo de carne (a - suína, b - bovina, c – frango). *P < 0,05 por teste de Fisher.	57
Figura 10 - Gráfico comparativo das concentrações de nitrato de sódio nas amostras positivas dos grupos de produtos formulados (compostos de carne bovina e de frango) e carne suína em natureza.	58
Figura 11 - Gráfico comparativo das concentrações de nitrato de sódio em amostras positivas do grupo carne em natureza e produtos formulados.	59
Figura 12 - Gráfico comparativo de amostras positivas e negativas para nitrato de sódio entre os grupos analisados (formulados e carnes em natureza). *P < 0,001 por teste de Fisher.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADI	Ingestão diária aceitável (do inglês, <i>Acceptable Daily Intake</i>)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Analytical Communities</i>
Art.	Artigo
a _w	Atividade de água (do inglês, <i>Activity Water</i>)
BGE	Eletrólito de corrida (do inglês, <i>background electrolyte</i>)
CE	Eletroforese capilar (do inglês, <i>capillary electrophoresis</i>)
DIPOA	Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal
EFSA	Autoridade Sanitária da União Européia (do inglês, <i>European Food Safety Authority</i>)
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (do inglês, <i>Food and Agriculture Organization</i>)
FDA	Agência de Fiscalização de Drogas e Alimentos (do inglês, <i>Food and Drug Administration</i>)
HPLC - UV	Cromatografia iônica de alta precisão com detecção na faixa da luz ultravioleta
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (do inglês, <i>International Agency on Research of Cancer</i>)
INS	Sistema internacional de numeração (do inglês, <i>International Numbering System</i>)
ISO	Organização Internacional para Padronização (do inglês, <i>International Standartization Organization</i>)
JECFA	Comitê Conjunto FAO/OMS de Especialistas em Aditivos Alimentares (do inglês, <i>Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i>)
LFDA	Laboratório Federal de Defesa Agropecuária
LQ	Limite de quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NMKL	Comitê Nórdico em Análises de Alimentos (do inglês, <i>Nordic Committee on Food Analysis</i>)
NOAEL	Nível sem efeitos adversos observáveis (do inglês, <i>No Observed Adverse Effect Level</i>)
SIF	Serviço de Inspeção Federal

USDA Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (do inglês, *United States Department of Agriculture*)

Var. Variedade

WHO Organização Mundial da Saúde - OMS (do inglês, *World Health Organization*)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	A cura de carnes e sua história.....	15
2.2	Ocorrência de nitrato e nitrito em água de abastecimento e alimentos em natureza.....	16
2.3	Ocorrência de nitrato e nitrito na alimentação animal.....	18
2.4	Efeitos tecnológicos do nitrito em produtos cárneos.....	19
2.5	Nitratos e nitritos e seu contexto na saúde pública	20
2.6	Legislação relacionada a produtos cárneos.....	22
2.7	Legislação relacionada a vegetais	24
2.8	Legislação relacionada à alimentação animal.....	25
2.9	Produtos cárneos caracterizados como “ <i>rótulos limpos</i> ”	27
2.10	Métodos empregados na determinação de nitrato e nitrito em produtos cárneos	30
2.11	Eletroforese capilar	33
2.11.1	Instrumentação	34
3	OBJETIVOS	37
3.1	Objetivo geral	37
3.2	Objetivos específicos.....	37
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1	Amostragem	38
4.1.1	Amostragem de carne em natureza.....	38
4.1.2	Amostragem de produtos formulados sem adição de sais de cura (“rótulo limpo”)	40
4.2	Coleta de amostras	42
4.2.1	Coleta e envio de amostras de carnes em natureza.....	42
4.2.2	Coleta e envio de amostras de produtos formulados sem adição de sais de cura (rótulo limpo)	43
4.3	Preparo da amostra.....	43
4.4	Reagentes e padrões	44
4.5	Instrumental e técnica empregados nas análises	45

4.5	Cálculo e expressão dos resultados	46
4.7	Análise estatística	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
6	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

O nitrito de sódio e de potássio e os seus precursores, respectivamente, nitrato de sódio e potássio, identificados pelos códigos INS 249 a 252 (BRASIL, 2019a), são aditivos conservantes comumente utilizados na elaboração de produtos cárneos pelas agroindústrias. O nitrito, obtido através da redução do nitrato por bactérias como *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus carnosus*, da família *Micrococaceae* (SEBRANEK & BACUS, 2007), é o responsável pela formação de cor e *flavor*, retardamento da oxidação lipídica, inibição da multiplicação de células vegetativas e esporulação do *Clostridium botulinum* (HONIKEL, 2008).

Embora o nitrato e o nitrito estejam relacionados à qualidade e segurança alimentar dos produtos cárneos, é fundamental o controle das concentrações adicionadas aos produtos pelas indústrias, em virtude do risco de formação das nitrosaminas e da ocorrência de quadros de metahemoglobinemia em humanos (CHAN *et al.*, 2011; SINDELAR & MILKOWSKI, 2012).

A insegurança dos consumidores quanto ao consumo de produtos cada vez mais industrializados e com aditivos, dentre eles o nitrato de sódio/potássio, tem ocasionado a busca por alimentos da chamada onda “rótulo limpo” (tradução livre, do inglês *clean label*), caracterizados por serem produtos mais naturais, com menor nível de processamento industrial e elaborados com ingredientes conhecidos pelos consumidores (BEDALE *et al.*, 2016).

A legislação brasileira estabelece que os limites de nitrato e nitrito de sódio e potássio em produtos cárneos formulados não devem ultrapassar, respectivamente, 300 e 150 mg/kg. Quando utilizados simultaneamente, o somatório, expresso como nitrito residual, não deve ultrapassar o menor limite, ou seja, 150 mg/kg. Para carnes resfriadas ou congeladas em natureza, não é permitida a adição de quaisquer aditivos (BRASIL, 2019a). Contudo, trabalhos conduzidos em outros países têm reportado a presença de concentrações de nitrato de sódio, mesmo que negligenciáveis, em carnes em natureza (SACCANI & TANZI, 2006; HSU *et al.*, 2009; IAMMARINO & DI TARANTO, 2012; IACUMIN *et al.*, 2019).

Resultados de análises oficiais conduzidas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em 2016 e 2017 demonstraram a presença de nitrato de sódio em três amostras de produtos cárneos (duas amostras de carnes temperadas - 10,68 mg/kg e 15 mg/kg; uma amostra de hambúrguer - 81,05 mg/kg), elaborados por

empresas distintas, sem que o aditivo estivesse presente na formulação registrada junto ao SIF/DIPOA. Em razão da caracterização destes resultados como não conformes, os técnicos do MAPA adotaram ações fiscais, como a apreensão e a suspensão das linhas de produção, em consonância com a legislação nacional.

Em contraponto, as agroindústrias vêm alegando que a presença de nitrato de sódio nos produtos analisados pelo MAPA decorre da presença natural do componente nas carnes utilizadas como matérias-primas, assim como nas especiarias utilizadas como ingredientes na elaboração.

O presente trabalho teve como objetivo investigar a presença de nitrato e nitrito de sódio em amostras de carnes em natureza das espécies suína, bovina e frangos, assim como em produtos formulados sem adição de sais de cura elaborados no Brasil, para servir de subsídio para a tomada de decisões pelas autoridades sanitárias competentes (caracterização dos resultados como conformes ou não conformes).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cura de carnes e sua história

A cura é um dos métodos de preservação de carnes e de pescado mais antigos, através do qual o sal, o nitrato e/ou nitrito e outros aditivos são adicionados paralelamente ou não aos processos de defumação, secagem e cozimento, primariamente, para fins de preservação e, secundariamente, para atribuir cor e *flavor* desejáveis aos produtos (HONIKEL, 2008; SINDELAR & MILKOWSKI, 2011; TAORMINA, 2014; HONIKEL & PEGG, 2015).

Anteriormente ao advento da refrigeração, a carne e o pescado eram conservados através do emprego de sal, com o objetivo de controlar a deterioração e prolongar a vida útil dos alimentos que serviriam como reserva durante longos períodos de escassez (HONIKEL, 2008).

Ao longo dos tempos, a percepção de contaminação do sal forneceria, intencionalmente, a base para o início da descoberta do mistério da cura. No século XIX, o nitrato de potássio (KNO_3) foi reconhecido como contaminante do sal e como o responsável pela preservação e coloração rosa-avermelhada das carnes (HONIKEL, 2008).

A identificação do nitrito como o agente responsável pela processo de cura das carnes fez com que, a partir do ano de 1923, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (da sigla em inglês USDA, *United States Department of Agriculture*) iniciasse uma série de experimentos visando determinar a quantidade mínima de nitrito de sódio necessária para promover a cura de presuntos e bacon (em termos de atributos de qualidade como, p. ex., a cor). Em 1925, o USDA finalmente aprovou o nitrito como agente de cura (BEDALE *et al.*, 2016).

A cura seca é o método mais básico de cura e consiste na cobertura de cortes cárneos com uma mistura de sal e agentes de cura (nitrato e nitrito), os quais penetram lentamente na carne. O processo pode ser acelerado através de cura úmida, por meio da qual os cortes cárneos são imersos em salmoura, contendo o sal e os agentes de cura, ou submetidos a injeções de salmoura através do uso de várias agulhas diretamente na massa muscular ou por meio dos vasos sanguíneos (HONIKEL & PEGG, 2015).

A cura pode ocorrer de forma mais acelerada, de 1 até 2 dias, quando o nitrato e/ou nitrito são misturados a cortes cárneos menores ou carne cominuída, semelhante à utilizada na elaboração de linguiças (HONIKEL & PEGG, 2015).

2.2 Ocorrência de nitrato e nitrito em água de abastecimento e alimentos em natureza

Ao contrário do que os consumidores podem imaginar, menos de 5% do nitrato e nitrito de sódio/potássio ingerido provêm de carnes processadas (MILKOWSKI, 2011). A maior parte do nitrato ingerido origina-se do consumo de vegetais e da água de abastecimento que, por conseguinte, contribuem com a maior parte do nitrito ingerido, em razão da redução do nitrato a nitrito na saliva (BEDALE *et al.*, 2016).

Entre 80 a 95% do nitrato ingerido diariamente pelo homem é atribuído ao consumo de vegetais, especialmente os folhosos verdes que incluem a alface, o espinafre, o repolho, a beterraba vermelha e o radiche (REINIK *et al.*, 2008; HORD *et al.*, 2009). Além disso, tem sido observada uma ampla variação nas concentrações de nitrato em vegetais, de até 5000 mg/kg, em amostras de espinafre inglês (HSU *et al.*, 2009).

As concentrações de nitrito em vegetais são muito inferiores às concentrações de nitrato, sendo tipicamente na ordem de 0 e 0,04 mg/kg (ABOU-DONIA & SALAMA, 2015), enquanto as concentrações de nitrito na água de abastecimento são negligenciáveis (KELLEY & DUGGAN, 2003).

As bactérias como as do gênero *Rhizobium* retiram o nitrogênio da atmosfera terrestre e o fixam nas raízes de plantas em forma de amônia. A amônia, em seguida, é convertida em nitrito e, posteriormente, em nitrato por bactérias nitrificantes, como as *Nitrosomonas* e as *Nitrobacter*. Finalmente, o nitrato é absorvido pelas plantas e incorporado nos tecidos vegetais (REINIK *et al.*, 2008).

Devido a muitos fatores biológicos e ambientais incluindo o tipo de cultivar, composição do solo, intensidade luminosa, temperatura e umidade do ar, densidade de crescimento, duração do período de crescimento, período de colheita, tempo de estocagem, porção comestível da planta e o uso de fertilizantes, as concentrações de nitrato e nitrito em alimentos, especialmente de vegetais, demonstram-se extremamente variáveis entre diferentes países e diferentes regiões (TAMME *et al.*, 2006; REINIK *et al.*, 2008; CORREIA *et al.*, 2010).

Em uma investigação das concentrações de nitrato e nitrito de hortaliças produzidas em sistemas de cultivos orgânico e convencional, conduzida por Kreutz *et al.* (2012) na Região do Vale do Taquari, Estado do Rio Grande do Sul, os pesquisadores observaram que as hortaliças orgânicas apresentaram uma concentração de nitrato inferior às cultivadas em sistema convencional. Em cultivo convencional, a beterraba apresentou o maior teor de nitrato, 2056 mg/kg; enquanto a cenoura apresentou a menor média, 1066 mg/kg. Em cultivo orgânico, o espinafre apresentou o maior teor de nitrato, 1424 mg/kg, e a cenoura o teor mais baixo, 827 mg/kg.

Em análises de 34 amostras de vegetais, incluindo repolho, alface, espinafre, salsa e nabo, colhidos em regiões de agricultura intensiva de Portugal, foi verificado que os níveis de nitrato variaram de 54 a 2440 mg/kg, enquanto os níveis de nitrito variaram entre 1,1 a 57 mg/kg (CORREIA *et al.*, 2010).

Existem poucos trabalhos reportando concentrações de nitrato e nitrito em produtos cárneos em natureza. Não foram recuperados trabalhos de investigação de nitrato e nitrito em produtos em natureza elaborados no Brasil. Na maioria das vezes, a concentração de nitrato de sódio naturalmente existente em carnes em natureza é considerada baixa (WALTERS, 1996; REINIK *et al.*, 2008).

A musculatura esquelética, assim como outros tecidos biológicos de animais, possui nitrato originário da ingestão de forragens e da água de abastecimento. A maior parte do nitrato ingerido é excretada na urina e outras secreções, sendo o restante provavelmente transportado do sangue para os tecidos. Na presença de bactérias, como é o caso do rúmen ou em infecções do trato urinário, o nitrato é degradado a nitrito e, por conseguinte, em amônia (WALTERS, 1996).

Iammarino & Di Taranto (2012) analisaram 200 amostras de carne bovina, suína, equina e de frango em natureza, com o objetivo de avaliar a presença natural de nitrato e nitrito e estimar limites toleráveis visando a revisão da Diretiva 95/2/EC, da União Europeia. As concentrações de nitrato de sódio variaram entre 14 e 50 mg/kg nas diferentes carnes analisadas, com exceção da carne de frango, na qual não houve detecção, assim como de nitrito em nenhuma das carnes das quatro diferentes espécies analisadas na pesquisa.

2.3 Ocorrência de nitrato e nitrito na alimentação animal

As concentrações de nitrato e nitrito presentes naturalmente na alimentação animal ou, menos comumente, as concentrações adicionadas como conservante, como por exemplo o nitrito de sódio na produção de silagem, são as principais fontes de nitrito na alimentação para os animais. A água potável também pode ser uma fonte importante (EFSA, 2008).

A fonte de nitrato mais significativa e a causa para muitos dos níveis mais altos detectados em plantas forrageiras e lençóis freáticos é o nitrogênio oriundo do esterco e fertilizantes. Quando o esterco dos animais e os fertilizantes são repetidamente aplicados em áreas de terras limitadas, os nitratos tendem a se acumular no solo, penetrar no lençol freático, ser absorvidos pelas raízes das plantas e depositar-se nos tecidos vegetais. Sob muitas condições, os nitratos são degradados pelas enzimas das plantas a formas de nitrogênio que possuem baixo perigo tanto para animais quanto para o meio ambiente em geral (EFSA, 2008).

As concentrações naturais de nitrato em material vegetal fresco são, com raras exceções, geralmente muito baixas (EFSA, 2008) e, como notado pelo Comitê Científico em Nutrição Animal da União Européia (EUROPEAN COMMISSION, 2003), não tem sido reportados casos de intoxicação em animais de produção alimentados com esses alimentos.

As concentrações de nitrato em ingredientes considerados seguros na alimentação animal variam de 4 a 1760 mg/kg em farelo de soja e alfafa fresca ou feno de alfafa, com valores intermediários de 22, 44 e 880 mg/kg, respectivamente, em milho, aveia e silagem de alfafa (Tabela 1) (CROWLEY, 1985, *apud* UNDERSANDER *et al.*, 2007). A ensilagem pode reduzir os níveis de nitrato em até 30% (NICHOLSON, 2012). O nitrito não é encontrado em concentrações significativas no solo e como consequência, não se encontra disponível para as plantas.

Tabela 1 - Concentração de nitrato em ingredientes utilizados na alimentação animal.

Ingrediente	Concentração (mg/kg)
Grão de milho	22
Grão de aveia	44
Farelo de óleo de soja	4
Alfafa fresca ou feno de alfafa	1760
Silagem de alfafa	880

Fonte: Adaptado de Undersander *et al.*, 2007.

Além da diferença entre as espécies vegetais, uma variedade de fatores pode afetar as concentrações de nitrato na alimentação animal e essas incluem a concentração de fertilizante aplicada no cultivo, as condições de crescimento (concentrações de nitrato elevadas estão associadas a plantas cultivadas em condições pobres) e o estágio de maturidade (plantas mais novas apresentam maior concentração de nitrato) (NICHOLSON, 2012; DREWNOSKI *et al.*, 2019). Embora as concentrações de nitrato variem amplamente em cultivos de forragens, essas normalmente permanecem dentro de faixas seguras.

2.4 Efeitos tecnológicos do nitrito em produtos cárneos

Os benefícios da cura de carnes foram reconhecidos pela indústria de carnes no início do século 1900, resultando em uma ampla utilização dos sais de cura (SCHUDEDEBOOM, 1993; SINDELAR & MILKOWSKI, 2011).

O nitrato em si não possui efeito direto no processo de cura, sendo efetivo somente se for reduzido à nitrito. A redução do nitrato a nitrito decorre da ação dos microrganismos na presença da enzima nitrato redutase. A utilização de nitrato como agente de cura somente é relevante em produtos cárneos crus que são curados e fermentados por longos períodos à temperatura ambiente (HONIKEL, 2004).

A adição dos sais de cura promove a redução da atividade de água (a_w) das carnes causando a morte ou inibição do desenvolvimento de microrganismos, além de retardar a oxidação lipídica durante o período de estocagem dos produtos cárneos (HONIKEL, 2004; TAORMINA, 2014).

O nitrito é o responsável por suprimir o desenvolvimento e a produção da toxina do *Clostridium botulinum*. Cento e vinte (120) mg/kg de nitrito são suficientes para inibir o desenvolvimento de *Clostridium botulinum* e *Listeria monocytogenes*, bem como de bactérias deteriorantes (PEGG & BOLLES, 2014). A cor vermelho-rosada e o tão aclamado *flavor*, característicos dos produtos curados e que podem ser detectados através de análise sensorial, são efeitos secundários obtidos pelo processo da cura (HONIKEL, 2004; TAORMINA, 2014).

Através das reações da cura há a conversão da mioglobina em nitrosomioglobina, dando aos produtos a coloração vermelho-rosada. Uma vez aquecida, a nitrosomioglobina transforma-se em nitrosohemocromógeno, conferindo uma coloração rosada ao produto. Estas transformações, resultado dos processos de cura e defumação, tornam os produtos

curados populares entre os consumidores (TAORMINA, 2014). Todavia, ainda não foi esclarecido se o *flavor* característico da cura origina-se da reação direta dos agentes de cura com os constituintes da carne ou decorre do retardamento dos processos oxidativos, como a rancidez lipídica, que refletem negativamente nas características sensoriais (HONIKEL, 2004).

Na pesquisa conduzida por Hsu *et al.* (2009) foi observado que as concentrações médias de nitrato e nitrito em produtos curados prontos para o consumo como a salsicha, o presunto, o salame e o bacon variaram, respectivamente, entre 19 a 142,50 mg/kg e 15,7 a 83,9 mg/kg.

2.5 Nitratos e nitritos e seu contexto na saúde pública

A utilidade fundamental do nitrito é atribuída a sua capacidade de inibir o crescimento de uma série de microrganismos anaeróbicos e, especialmente, a esporulação do patógeno *Clostridium botulinum* (KEETON, 2017). O nitrito em combinação com o sal e fatores intrínsecos e extrínsecos agem como obstáculos controlando o crescimento de outros patógenos como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium perfringens* (LEISTNER, 2000; KEETON, 2017).

O nitrito é considerado dez vezes mais tóxico que o nitrato. A dose oral letal estabelecida para seres humanos é de 80 a 800 mg/kg de nitrato por quilo de peso corporal e de 33 a 250 mg/kg de nitrito por quilo de peso corporal (SCHUDDEBOOM, 1993).

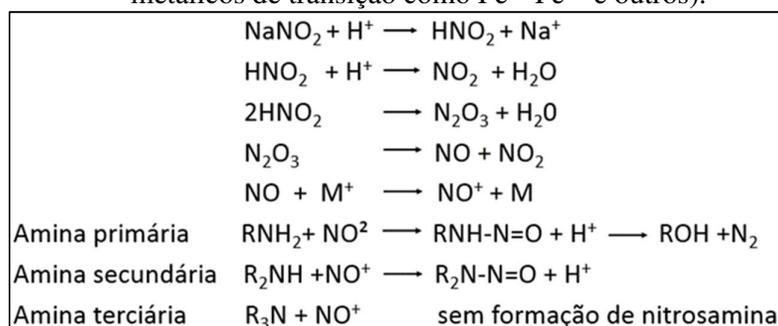
O Comitê Conjunto de Especialistas em Aditivos Alimentares da FAO/OMS estabeleceu valores de ingestão diária aceitáveis (ADI's, do inglês *acceptable daily intake*) para nitrato e nitrito de, respectivamente, 3,7 e 0,07 mg/kg de peso corporal por dia (WHO, 2002), baseado em grande parte nos padrões de água de bebida (WHO, 2011). Esses valores são análogos a um consumo exógeno de 276 mg de nitrato e 5,25 mg de nitrito por dia para um adulto de 75 kg de peso corporal (HMELJAK & CENCIČ, 2013).

A importância do nitrito como antimicrobiano tem sido ofuscada por percepções negativas à saúde do homem, em virtude da formação de compostos carcinogênicos (*N*-nitrosos) advindos da ingestão de carnes vermelhas e processadas (FERGUNSON, 2010; CHAN *et al.*, 2011; STEFANI *et al.*, 2012; TAORMINA, 2014).

Os compostos *N*-nitrosos ou as nitrosaminas, como são mais conhecidas, são formados através da reação entre o nitrito ingerido e as aminas secundárias, como os aminoácidos derivados das proteínas (Figura 1). Esta associação é favorecida sob pH

baixo (como a encontrada no estômago) e temperaturas superiores a 130°C, como as utilizadas durante a fritura de alimentos. A maioria das nitrosaminas são carcinogênicas (HONIKEL, 2008; BEDALE *et al.*, 2016).

Figura 1 - Demonstração das reações de formação de nitrosaminas (M e M+ são íons metálicos de transição como Fe²⁺/Fe³⁺ e outros).



Fonte: Honikel, 2008.

Dados de literatura citam que o consumo diário de 100 gramas de carnes vermelhas e processadas pode elevar o risco de desenvolvimento de câncer colorretal em 14%, câncer de cólon em 25% e câncer retal em 31% (CHAN *et al.*, 2011).

Além da formação das nitrosaminas, o nitrito pode gerar quadros de metahemoglobinemia em bebês, em virtude do aumento da concentração de metahemoglobina no sangue pela oxidação da hemoglobina a metahemoglobina, composto incapaz de transportar o oxigênio no sangue. Os bebês menores de 3 meses de idade são, por algumas razões, mais particularmente susceptíveis a metahemoglobinemia. Naturalmente, os glóbulos vermelhos possuem a enzima metahemoglobina redutase, responsável pela conversão da metahemoglobina a hemoglobina. Em bebês, a atividade da enzima está reduzida em 95% devido ao fato do sistema imunológico não estar completamente desenvolvido. Além disso, o pH gástrico de bebês é superior ao das crianças mais velhas e das pessoas adultas, favorecendo a proliferação da flora intestinal que pode reduzir o nitrato a nitrito (GREER & SHANNON, 2005).

Por outro lado, outros estudos epidemiológicos não têm demonstrado uma associação direta entre o consumo de carnes e o desenvolvimento de câncer (KIM *et al.*, 2013). Ao contrário do que se pensava, estudos clínicos sugerem que a ingestão do nitrito pode propiciar benefícios à saúde dos consumidores devido ao fato do óxido nítrico, obtido através da redução do nitrito, contribuir na função cardiovascular e na redução da pressão arterial (BUTLER, 2015; MORENO *et al.*, 2015).

Não obstante, recentemente, a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (do inglês *IARC, International Agency of Research on Cancer*) da Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou as carnes processadas como carcinogênicas para os humanos (Grupo 1), baseado em evidências suficientes de que o consumo destas carnes pode causar câncer colorretal. De acordo com a IARC (2015), o consumo diário de apenas 50 gramas de carne processada aumenta o risco de câncer colorretal em 18%.

2.6 Legislação relacionada a produtos cárneos

No ano de 1934, a Alemanha criou uma lei permitindo o uso de nitrito proveniente unicamente de misturas contendo sal de cozinha (NaCl) após pessoas terem consumido produtos cárneos e chegarem a óbito por intoxicação. Além disso, o teor de nitrito nas misturas não poderia exceder 0,6%, e somente nitrato poderia ser adicionado diretamente às massas de carnes (HONIKEL, 2008).

Já na década de 1950, o regulamento da carne alemão, o *Fleischverordnung*, limitou a quantidade de nitrito residual em até 100 mg/kg em produtos prontos para consumo. No caso de presuntos crus, permitia-se até 150 mg/kg de nitrito de sódio. Restrições ao uso de nitrato também foram aplicadas, sendo a sua utilização limitada a alguns produtos não submetidos a tratamento térmico em concentrações de 300 a 600 mg/kg e concentrações residuais de 100 a 600 mg/kg (HONIKEL, 2008).

Em 1971, a partir da descoberta da *N*-nitroso pirrolidina (nitrosamina), resultante da fritura de bacon (FIDDLER *et al.*, 1978; HONIKEL, 2008), e devido às crescentes preocupações e controvérsias associadas à utilização de nitrito, vários regulamentos em todo mundo foram revisados para que o banimento do uso do nitrito fosse evitado (HONIKEL, 2008; SINDELAR & MILKOWSKI, 2011; BEDALE *et al.*, 2016).

Em 1975, o regulamento norte-americano determinou a redução do limite de nitrito adicionado em produtos cárneos, de 200 mg/kg para 125 mg/kg. Além do novo limite, foi estabelecida a necessidade de adição simultânea de 550 mg/kg de ascorbato ou eritorbato de sódio (SINDELAR & MILKOWSKI, 2011). O ascorbato e o eritorbato são agentes redutores que aumentam a velocidade de redução do nitrito, reduzindo a possibilidade de formação de nitrosaminas (HONIKEL, 2008). Petições adicionais propostas à nova regra resultaram na publicação da regra final exigindo o uso de 120 mg/kg de nitrito de sódio (ou 148 mg/kg de nitrito de potássio), associados a 550 mg/kg de ascorbato de sódio ou eritorbato, além do banimento da adição de nitrato durante o

processamento do bacon. A regra também incluiu o estabelecimento de programas de monitoramento de nitrosamina e de controle regulatório (SINDELAR & MILKOWSKI, 2011).

Decorrido um ano da implementação do programa de monitoramento e com a cooperação da indústria e governo, quase todos os bacons produzidos foram considerados livres de nitrosaminas. Atualmente, o entendimento completo sobre a formação das nitrosaminas, o controle regulatório específico e a adoção de boas práticas de fabricação nas plantas industriais têm eliminado todas as preocupações relacionadas às nitrosaminas em produtos cárneos (SINDELAR & MILKOWSKI, 2011).

A Diretiva do Conselho e Parlamento Europeu 95/2/EC, que versava sobre o uso de aditivos alimentares, com exceção de corantes e adoçantes (EUROPEAN COMMISSION, 1995) substituiu as disposições contidas no regulamento alemão publicado na década de 1950. Por meio da Diretiva, permitiu-se a adição de 150 mg/kg de nitrito e 300 mg/kg de nitrato em quase todos os produtos cárneos. A quantidade residual limitava-se a 50 mg/kg de nitrito em produtos cárneos não tratados termicamente e até 100 mg/kg de nitrito em todos os outros produtos com exceção do bacon denominado *Wiltshire* e alguns outros produtos similares, nos quais permitia-se até 175 mg/kg (em razão de seu maior de período de cura). Em relação ao nitrato, os níveis residuais foram estabelecidos em 250 mg/kg em todos os produtos cárneos (HONIKEL, 2008).

A Dinamarca se opôs à Diretiva 95/2/C, excluindo o uso do nitrato de todos os produtos cárneos, exceto do bacon *Wiltshire* e de alguns presuntos crus, nos quais permitia-se a adição de até 300 mg/kg de nitrato (HONIKEL, 2008).

A Corte Europeia em Luxemburgo decidiu que a União Europeia deveria reconsiderar a Diretiva 95/2/C no dia 20 de março de 2003. A revisão ocorreu somente em 2006 quando finalmente foi publicada a Diretiva 2006/52/EC (HONIKEL, 2008). Desde então, a Comissão Europeia estabeleceu em 150 mg/kg o limite máximo de nitrato adicionado a produtos não processados termicamente, no entanto para alguns produtos permitiu-se um limite superior como para o bacon *wiltshire* (250 mg/kg). Quanto ao nitrito, sua concentração é limitada a 150 mg/kg, com algumas exceções (por exemplo, presunto *Wiltshire*, 100 mg/kg; bacon *Wiltshire*, 175 mg/kg) (EUROPEAN COMMISSION, 2011).

A legislação da Nova Zelândia limita a concentração de nitrato em produtos de cura lenta em 500 mg/kg, sendo o nitrito limitado a 125 mg/kg. Já para carne enlatada

esterilizada comercialmente, a adição de sais de nitrito está limitada a 50 mg/kg, não havendo limite definido para nitratos (AUSTRALIAN GOVERNMENT, 2017).

Nos Estados Unidos, de acordo com o *Food and Drug Administration* (FDA, 2019), as concentrações de nitrato e nitrito de sódio em produtos curados acabados não podem exceder, respectivamente, 500 mg/kg e 200 mg/kg. Quando utilizados em associação, a concentração de nitrito residual não deve exceder 200 mg/kg.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), vinculada ao Ministério da Saúde, determina que os limites máximos para nitrato e nitrito em produtos cárneos sejam, respectivamente, de 300 e 150 mg/kg. Quando utilizados simultaneamente, a soma de ambos, expressa como nitrito de sódio, não deve superar 150 mg/kg (BRASIL, 2019a) e, além disso, os componentes devem ser indicados na lista de ingredientes do rótulo do produto (BRASIL, 2005).

Para carne em natureza não é permitido o uso de quaisquer aditivos (BRASIL, 2019). De acordo com o Artigo 496 do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (BRASIL, 2017), a constatação de nitrato ou nitrito em carnes em natureza e/ou em produtos formulados sem a indicação desses aditivos na lista de ingredientes, é configurada como infração ao Regulamento:

Art. 496. Constituem infrações ao disposto neste Decreto, além de outras previstas:

[...]

XII- utilizar processo, substância, ingredientes ou aditivos que não atendem ao disposto na legislação específica;

[...]

XVI - elaborar produtos que não atendem ao disposto na legislação específica ou em desacordo com os processos de fabricação, de formulação e de composição registrados pelo Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal;

[...]

XXI – adulterar matéria-prima, ingrediente ou produto de origem animal;

2.7 Legislação relacionada a vegetais

Apesar dos vegetais serem a maior fonte de nitratos da dieta, alguns estudos sugerem que o consumo deles reduz a incidência de câncer em virtude da existência de componentes antioxidantes em suas composições (ascorbato, tocoferol, β -caroteno, compostos fenólicos, indol), os quais suprimiriam agentes carcinogênicos como as nitrosaminas (CHUNG *et al.*, 2003; CHOI *et al.*, 2015). Em outros estudos baseados na avaliação de dados epidemiológicos, não se observou uma associação direta entre a ingestão de frutas e vegetais e a redução da incidência de casos de câncer em populações relativamente bem nutridas, ainda que os pesquisadores entendam que a ingestão de frutas

e vegetais deva ser encorajada por outras razões, como o atendimento do balanço energético e dos requerimentos nutricionais (GEORGE *et al.*, 2009; KEY, 2011).

Tendo em vista que os dados epidemiológicos atuais demonstram resultados conflitantes em relação à ingestão de nitrato através da dieta, uma redução na ingestão de nitrato se torna uma medida preventiva altamente desejável. Para tanto, uma redução na concentração de nitrato dos vegetais pode ser obtida através da adoção das boas práticas agrícolas (SANTAMARIA, 2006).

A Comissão da União Europeia estabeleceu limites máximos de nitrato para alfaces colhidas no verão e inverno de, respectivamente, 2500 a 3000 mg/kg e 4000 a 4500 mg/kg. Para espinafres colhidos no verão e inverno foram estabelecidos limites de, respectivamente, 2500 e 3000 mg/kg, enquanto para espinafre congelado o limite máximo é de 2000 mg/kg (EUROPEAN COMMISSION, 2006).

A China sugeriu um limite máximo de 3100 mg/kg de nitrato em vegetais (SANTAMARIA, 2006) e um limite de tolerância de 4 mg/kg para nitrito (ZHOU; WANG; WANG, 2000).

Para bebês com idade inferior a 3 meses, é desejável que a concentração de nitrato em alimentos seja inferior a 100 mg/kg (GREER & SHANNON, 2005). No Brasil, a ANVISA estabelece que as concentrações de nitrato em alimentos de transição (exceto formulações à base de cereais) prontas para o consumo não devem exceder 250 mg/kg. Como alguns vegetais como o espinafre e a beterraba possuem teores frequentemente superiores a 100 mg/kg, a legislação brasileira estabelece que os alimentos que contiverem esses vegetais em sua composição devem trazer, no rótulo, a advertência em destaque e em negrito: “Contém espinafre e/ou beterraba. Não pode ser consumido por menores de 3 meses de idade” (BRASIL, 1998; DELLA BETTA *et al.*, 2014).

2.8 Legislação relacionada à alimentação animal

A Diretiva 2002/32/EC do Parlamento Europeu e do Conselho, de 7 de maio, estabelece as concentrações máximas de nitrito em farinha de peixe e demais alimentos, excluindo aqueles destinados para animais de companhia, com exceção de pássaros e peixes de aquário (Tabela 2) (EUROPEAN COMMISSION, 2002).

Tabela 2 - Limites máximos de nitrito em ingrediente e alimentos para animais estabelecidos no anexo I da Diretiva 2002/32/EC.

Substância indesejável	Produto destinado à alimentação animal	Limite máximo (mg/kg) para alimento com teor de umidade de 12 %
Nitrito	Farinha de peixe	60 (expresso como nitrito de sódio)
	Alimentos completos, com exceção de: alimentos para animais de companhia, exceto pássaros e peixes de aquário	15 (expresso como nitrito de sódio)

Fonte: EFSA, 2009.

No ano de 2009, o Painel Científico em Contaminantes da Cadeia Alimentar da EFSA (*CONTAM Panel*) realizou um estudo a pedido do Comitê Científico em Nutrição Animal, que resultou na publicação de uma opinião científica a respeito da manutenção de limites máximos para nitrito em ingredientes para alimentação animal, partindo do pressuposto que o nitrito é considerado um componente endógeno naturalmente presente em ingredientes de origem animal e vegetal destinados à alimentação animal, e ao fato das concentrações naturalmente presentes nos ingredientes comercializados não estarem implicadas em casos de intoxicação por nitrito em animais de produção. Dados esses fatos, não seria justificável a manutenção de um nível máximo de nitrito em alimentos para animais (EFSA, 2009).

A ingestão total de nitrito através da alimentação por suínos e bovinos, consideradas as espécies produtoras de alimento mais representativas e sensíveis ao nitrito, foi estimada utilizando o maior limite de exposição aceito na legislação vigente (10 mg/kg de íon nitrito, equivalente a 15 mg/kg de nitrito de sódio) e os regimes de alimentação típicos na União Europeia. Para bovinos, a concentração máxima de nitrito em forragens de países membros foi também considerada (Eslovênia, 26,2 mg/kg). No geral, a ingestão de nitrito *per se* foi de 0,37 e 0,65 mg/kg por quilo de peso corporal para ambas espécies, suína e bovina, correspondendo a margens de segurança de 9 e 5 em relação ao respectivo “nível sem efeitos adversos observáveis” (NOAEL, do inglês *no observed adverse effect level*). Ao final, o *CONTAM Panel* considerou que tais margens não representavam preocupação à saúde animal dada a consciência dos produtores sobre a intoxicação por nitrito e às boas práticas agrícolas (EFSA, 2009).

Em relação ao Brasil, não há legislação disciplinando limites de nitrato e nitrito em ingredientes para alimentação animal.

2.9 Produtos cárneos caracterizados como “rótulos limpos”

Consumidores em todo o mundo têm demonstrado desconfiança em relação aos aditivos alimentares, em virtude da divulgação de seus efeitos negativos sobre a saúde pública. Em uma pesquisa conduzida na Europa aproximadamente o mesmo número de pessoas (36% e 34%) acreditam que os aditivos alimentares e as doenças causadas pelas bactérias são, respectivamente, as questões de maior importância em segurança alimentar (INTERNATIONAL FOOD INFORMATION COUNCIL FOUNDATION, 2015). Como consequência, esses consumidores têm optado cada vez mais pela compra de produtos da chamada onda “rótulo limpo” (tradução livre, do inglês *clean label*) (BEDALE *et al.*, 2016).

A origem do movimento “rótulo limpo” pode estar relacionada à história do nitrito, no entanto outros fatores certamente influenciaram bastante, incluindo a cláusula *Delaney* na legislação norte-americana de 1958, que restringiu o uso de qualquer aditivo alimentar que demonstrasse causar câncer (WEISBURGER, 1996). Preocupações ambientais em relação à poluição e ao uso de pesticidas foram também proeminentes na era pós-guerra, contribuindo para mais preocupações a respeito dos riscos de novas tecnologias, especialmente aquelas envolvendo produtos químicos.

Em 1970, o alergista Benjamin Feingold defendeu a remoção de aditivos alimentares incluindo os conservantes para tratar ou prevenir hiperatividade (DOROSHOW, 2012). O teste de Ames foi estabelecido em 1970 como um método rápido e barato para avaliar o potencial mutagênico de produtos químicos, embora doses altas de muitos componentes que não são carcinogênicos para humanos sejam mutagênicos neste ensaio. Contudo, a simplicidade do teste durante a era da “Guerra do Câncer” pode ter conduzido ao seu uso excessivo, aumentando a suspeita de consumidores em relação aos produtos “químicos” (BEDALE *et al.*, 2016).

Michael Pollan, através de seu livro *In Defense of Food: An Eater's Manifesto*, publicado em 2008, defende o lema de não serem consumidos produtos que contenham mais de cinco ingredientes ou de ingredientes desconhecidos, que os consumidores não consigam pronunciar (POLLAN, 2008).

A Internet e o aumento de informações veiculadas através de blogues tem contribuído para a difusão de informações relacionadas a alimentos (comprovadas cientificamente ou não), gerando sentimentos de medo e insegurança entre os consumidores de alimentos. Relatórios científicos como o da IARC (2015), que

demonstram correlação entre o consumo de carnes vermelhas e processadas e efeitos carcinogênicos (BOUVARD *et al.*, 2015), tem provocado confusão, especialmente em um mundo onde qualquer pessoa pode ler, entregar e discutir informação *online* (BROSSARD & SCHEUFELE, 2013), tendendo a selecionar e compartilhar conteúdos relacionados a uma narrativa específica, ignorando as demais informações (DEL VICARIO *et al.*, 2016).

Enquanto isso, a relativa raridade de surtos de botulismo na era moderna (SHAPIRO; HATHEWAY; SWERDLOW, 1998) tem provavelmente estimulado o desinteresse quanto ao papel decisivo que o nitrito exerce na prevenção do desenvolvimento do *Clostridium botulinum*. De acordo com dados extraídos do Sistema de Informação de Agravos de Notificação, de 2007 até 2019, ocorreram 78 casos de botulismo de origem alimentar no Brasil (BRASIL, 2020).

A indústria sempre em busca de novas mensagens de *marketing* está se engajando ao movimento “rótulo limpo”, como uma forma de diferenciar seus produtos de outros. Uma combinação deste e de outros fatores, juntamente com o legado persistente do sentimento anti-nitrito, provavelmente impulsionou o ressurgimento de consumidores que estão evitando consumir alimentos com conservantes, incluindo nitrito e nitrato (BEDALE *et al.*, 2016).

Não existe uma definição legal estabelecida para produtos “rótulo limpo”. Esses produtos tendem a estar intimamente relacionados aos seguintes temas ou conceitos: natureza, quanto mais natural um ingrediente ou produto é, mais percebido como limpo ele será; simplicidade, quanto menos químicos e mais *cupboard-friendly*, mais limpo ele será; transparência, tendo relação à origem dos ingredientes e à forma como os produtos são elaborados, e por fim; processamento, quanto mais processado um alimento ou bebida for, menos limpo ele será (VIERHILE, 2016).

De acordo com Ingredion (2014), um produto caracterizado como “rótulo limpo” seria aquele considerado natural, orgânico ou livre de aditivos alimentares. O mesmo relatório sugere que rótulos posicionados no mercado como limpos seriam aqueles que utilizam ingredientes que geralmente são aceitos pelos consumidores, ou seja, aqueles que poderiam ser facilmente encontrados nos armários de cozinha (*cupboard-friendly*). A lista de ingredientes deve ser curta, simples e apresentar ingredientes minimamente processados até onde for possível, não devendo incluir nomes de substâncias químicas ou que contenham números eletrônicos (do inglês, *E number*).

Edwards (2013) define um produto “rotulo limpo” como sendo livre de aditivos químicos, por possuir uma lista de ingredientes de fácil compreensão e por ser produzido através do uso de técnicas tradicionais com processamento limitado. Um dos pontos chave é quais ingredientes podem fazer parte desse produto, ou mais importante, quais ingredientes definem um produto “rotulo limpo” pela sua ausência.

No Brasil, o Ministério da Saúde orienta que a população limite o consumo de produtos processados (vegetais em conservas, carne seca, sardinha e atum enlatados, etc.) e evite os produtos ultraprocessados (pratos prontos, biscoitos, embutidos, etc.), por estes serem considerados nutricionalmente desbalanceados. Por conta de sua forma e apresentação tendem a ser consumidos em excesso e a substituir alimentos em natureza ou minimamente processados como os cereais, frutas secas e as carnes em natureza (BRASIL, 2014).

Uma forma prática de distinguir alimentos ultraprocessados de alimentos processados é consultar a lista de ingredientes que, por lei, deve constar dos rótulos de alimentos embalados que possuem mais de um ingrediente. Um número elevado de ingredientes (frequentemente cinco ou mais), e sobretudo a presença de ingredientes com nomes pouco familiares e não usados em preparações culinárias (gordura vegetal hidrogenada, óleos interesterificados, xarope de frutose, isolados proteicos, agentes de massa, espessantes, emulsificantes, corantes, aromatizantes, realçadores de sabor e vários outros tipos de aditivos), indicam que o produto pertence à categoria de alimentos ultraprocessados (BRASIL, 2014).

Nos Estados Unidos, qualquer produto cárneo tradicionalmente curado e que não inclua a adição de alguma forma de nitrito derivada quimicamente é rotulado como não curado. A rotulagem destes produtos (curados por meio de extratos vegetais) como não curados é considerada inadequada por alguns consumidores na melhor das hipóteses e como enganoso na pior delas, no entanto tal rotulagem é exigida para a maioria dos itens curados naturalmente para atender os requisitos do USDA (SEBRANEK *et al.*, 2012; USDA, 2020).

Na Europa, a utilização de extratos vegetais de forma deliberada para a obtenção de funções tecnológicas (conservação, coloração, etc.) em produtos deve considerar a legislação concernente aos aditivos alimentares (EUROPEAN COMMISSION, 2018).

Em geral, o movimento “rotulo limpo” emerge impulsionado por fatores como preocupações modernas relacionadas à saúde humana e às tecnologias de processamento dos alimentos, risco percebido e ceticismo em relação a ingredientes, mas também por

falta de confiança nos regulamentos. Dessa forma, é fundamental que os órgãos reguladores estabeleçam uma definição para o termo “rótulo limpo”, a fim de eliminar os equívocos aos quais os consumidores podem ser submetidos (ASIOLI *et al.*, 2017).

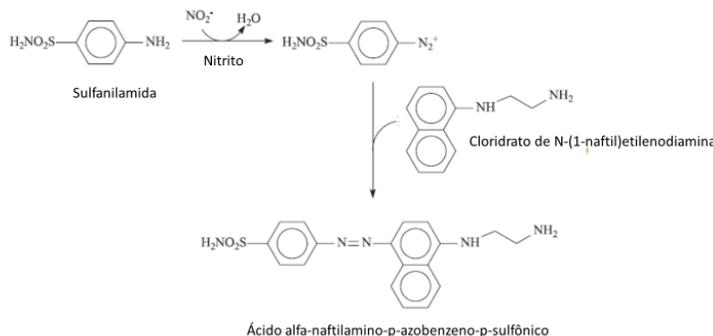
2.10 Métodos empregados na determinação de nitrato e nitrito em produtos cárneos

A determinação de nitrato e nitrito faz parte da rotina de análises de controle da qualidade de produtos cárneos e os métodos oficiais mais comumente utilizados são o ISO (do inglês, *International Standardization Organization*) e o AOAC (do inglês, *Association of Analytical Communities*). Ambos os métodos são baseados na reação de Griess, contudo no caso do método ISO, Carrez I (ferrocianeto de potássio) e Carrez II (acetato de zinco) são usados para a desproteínização (AOAC, 2005; ISO, 1975a, 1975b; DELLA BETTA *et al.*, 2016).

No Brasil, além dos métodos ISO 3091 e ISO 2918, respectivamente, para análise de nitrato e nitrito, o MAPA estabeleceu outros três métodos para a detecção de nitrato e nitrito: os métodos NMKL 165 (NMKL, do inglês, *Nordic Committee on Food Analysis*), NMKL 194 e a eletroforese capilar de zona, todos expressando os resultados obtidos em “g de NaNO_2 /100 g” com três casas decimais (BRASIL, 2019b).

A reação de Griess foi utilizada pela primeira vez no ano de 1879 por Johann Griess para a determinação de nitrato na saliva. A técnica se baseia na reação de diazotização, a mais abordada para a detecção de nitrito dentre os métodos espectrofotométricos (WANG *et al.*, 2017). Na reação original de Griess, o nitrito reage sob condições ácidas com o ácido sulfanílico para formar o cátion diazônio, que acopla à α -naftilamina produzindo um corante azo de cor vermelho-violeta facilmente solúvel em água (TSIKAS, 2007), que é determinado espectrofotometricamente a uma faixa de onda entre 500 a 600 nm para a apuração da concentração de nitrito (SINGH *et al.*, 2019). A reação é controlada pelo tempo e o produto deve ser determinado entre 10 min e 2 h, após a mistura dos reagentes (RAMOS *et al.*, 2006). A Figura 2, ilustra a reação de Griess.

Figura 2 – Representação esquemática da reação de Griess.



Fonte: Adaptado de Ramos *et al.*, 2006.

A reação de Griess tem sido continuamente modificada e automatizada para fins de aperfeiçoamento, redução de interferências (SINGH *et al.*, 2019) e segurança, tendo em vista que a α -naftilamina é considerada cancerígena (WANG *et al.*, 2017). Sulfanilamida e N-(1-naftil) etilenodiamina (NED ou NEDA), derivados dos reagentes ácido sulfanílico e α -naftilamina, surgiram como opções na reação de Griess (TSIKAS, 2007).

A reação de Griess é usada especificamente para a determinação de nitrito, no entanto o nitrato também pode ser determinado por meio desse método através de redução química ou enzimática, antes da reação de diazotização. Este método de determinação de nitrato é considerado fácil, barato e viável (SINGH *et al.*, 2019).

As estratégias de detecção de nitrato podem ser classificadas como técnicas simultâneas e sequenciais. Em técnicas simultâneas como a eletroquímica e a eletroforese capilar, nitrato e nitrito podem ser detectados simultaneamente. Já nas técnicas sequenciais, o nitrito é detectado inicialmente, sendo necessário que o nitrato seja posteriormente reduzido a nitrito através do uso da coluna de cobre/cádmio (WANG *et al.*, 2017).

Wang *et al.* (2017) revisaram várias técnicas utilizadas para a detecção de nitrato e nitrito durante os anos de 2001 e 2016, incluindo a espectrofotometria, quimioluminescência, eletroquímica, cromatografia, eletroforese capilar, espectrofluorimetria e eletroquimioluminescência. As vantagens e as desvantagens das técnicas aplicadas encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 - Vantagens e desvantagens das técnicas utilizadas para detecção de nitrato e nitrito na rotina laboratorial.

Técnicas de detecção	Vantagens	Desvantagens
Espectrofotométrica (Ensaio de Griess)	Viável economicamente e tecnicamente	Tempo de análise longo, sensibilidade baixa, além de sofrer com interferência de outros íons
Quimioluminescência	Simples, sensibilidade alta, precisão alta, custo baixo e segura.	Estabilidade e reprodutibilidade baixas
Eletroquímica	Custo baixo e portabilidade de equipamentos	Sensibilidade baixa
Cromatografia	Sensibilidade alta	Custo alto
Eletroforese	Sensibilidade alta	Custo alto
Eletroquimioluminescência	Sensibilidade considerável e instrumentação mínima.	Aperfeiçoamento baixo
Espectrofluorimétricos	Simples, custo baixo, conveniente, sensibilidade e seletividade altas e limites de detecção baixos	As sondas – diaminas aryl vicinais, utilizadas na técnica mais reportada na literatura, apresentam estabilidades baixas

Fonte: Wang *et al.* (2017).

Os métodos recomendados pela AOAC e pela ISO para a determinação de nitrato e nitrito apresentam várias características que os tornam indesejáveis para laboratórios com demanda de análises alta. Entre as principais desvantagens estão a complexidade dos métodos; a frequência analítica baixa, como consequência dos tempos longos requeridos para análise; limitação, tendo em vista a determinação de apenas um analito por análise; geração elevada de resíduos, devido ao consumo elevado de materiais de laboratório e de reagentes, muitos desses (e. g. cádmio, ferrocianeto de potássio) considerados corrosivos ou tóxicos (DELLA BETTA, 2017).

Della Betta *et al.* (2016) desenvolveram um método de eletroforese capilar de zona capaz de quantificar nitrato e nitrito através de uma etapa de separação simples em menos de 30 segundos. Tal metodologia possui muitas vantagens em comparação com os métodos ISO e AOAC e foi reconhecida como uma metodologia alternativa a essas determinações, tendo sido incluída na versão atual de métodos oficiais no MAPA. Desde então, vem sendo aplicada na rotina de análises do MAPA (BRASIL, 2019).

2.11 Eletroforese capilar

A palavra eletroforese é originada do grego *electro*, eletricidade; *phóresis*, transporte. Assim, a técnica de eletroforese é definida como uma técnica de separação baseada na diferença de migração de compostos iônicos ou ionizáveis na presença de um campo elétrico (TAVARES, 1996; SPUDEIT *et al.*, 2012).

Ao longo dos anos, a eletroforese foi sendo aperfeiçoada para a obtenção de uma eficiência maior e uma diminuição dos efeitos térmicos provenientes da aplicação de campos elétricos (TAGLIARO *et al.*, 1998). O avanço instrumental das técnicas de eletroforese possibilitou a introdução de colunas capilares no sistema eletroforético, dando origem a chamada eletroforese capilar (CE, do inglês *Capillary Electrophoresis*) (SPUDEIT *et al.*, 2012).

O uso do capilar oferece muitas vantagens sobre outros meios utilizados na eletroforese (placas de gel, papel, etc.). Devido aos fatores geométricos (a relação entre a área superficial interna e o volume é apreciavelmente grande), um capilar possibilita a dissipação eficiente do calor gerado pela passagem da corrente elétrica (efeito Joule). Além disso, a alta resistência elétrica do capilar permite o estabelecimento de campos elétricos elevados ($100 - 1000 \text{ V cm}^{-1}$), resultando em separações de alta eficiência e tempos de análise apreciavelmente curtos (TAVARES, 1996; TAGLIARO *et al.*, 1998).

Além da capacidade de dissipar o calor (efeito Joule) com eficiência, o uso de capilares está associado a muitas vantagens. Devido às dimensões dos capilares serem pequenas, a quantidade de reagentes é na ordem de mililitros. Além disso, baseada na regra cromatográfica prática que restringe o volume da amostra de 1 até 5% do volume capilar total, os volumes de amostra introduzidos no capilar estão na ordem dos nanolitros (tão baixo quanto 0,2 nL). Como resultado, apenas 5 μL de amostra serão suficientes para análises repetitivas em alguns instrumentos comerciais (LANDERS, 2008).

Comparada com outros métodos de separação como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) e a Cromatografia Gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*), a CE vem ganhando cada vez mais atenção da comunidade científica, sendo empregada no controle de qualidade de produtos e no monitoramento de processos industriais (SPUDEIT *et al.*, 2012). Desde a sua introdução, a CE tem mostrado potencial enorme, não somente na análise de biopolímeros, na qual a técnica tem sido aplicada há muito tempo, mas também em áreas

como análise de íons inorgânicos e de drogas), onde as técnicas eletroforéticas nunca haviam sido utilizadas antes (TAGLIARO *et al.*, 1998).

Além da vasta aplicação da CE, outras características da técnica a tornam bastante viável como o tempo de execução das metodologias desenvolvidas, além da redução significativa nas quantidades de reagentes e solventes orgânicos utilizados, quando comparada à técnica de HPLC. O solvente mais utilizado em CE é a água, sempre em volumes muito pequenos (poucos mililitros), gerando quantidade mínima de resíduo e toxicidade. Por estas razões, dentre as técnicas de separação, a eletroforese capilar é a que melhor se enquadra nos parâmetros da Química Verde (SPUDEIT *et al.*, 2012).

Existem vários modos de separação em CE, dentre os quais se destacam:

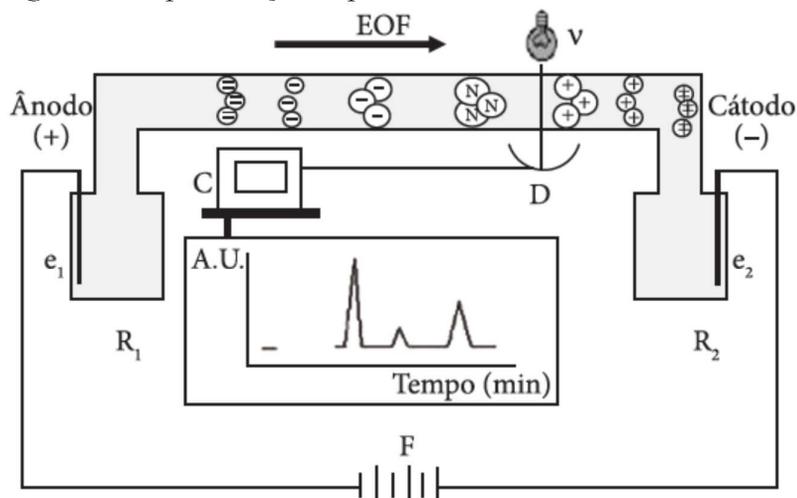
- Eletroforese capilar de zona (CZE);
- Eletroforese capilar em gel (CGE);
- Focalização isoelétrica capilar (CIEF);
- Isotacoforese capilar (CITP);
- Eletrocromatografia capilar (CEC, “capillary electrochromatography”);
- Cromatografia eletrocínética micelar (MEKC);

Dentre os modos de separação listados acima, a CZE é o modo de operação em CE mais utilizado pelos analistas. Nesse modo, a amostra é injetada dentro da coluna capilar previamente preenchida com o eletrólito de corrida, e o potencial é aplicado gerando um campo elétrico, fazendo com que os solutos migrem dentro do capilar em zonas distintas. Dessa forma, os solutos são separados de acordo com as diferentes mobilidades efetivas resultantes da composição entre as mobilidades eletroforéticas e a mobilidade eletrosmótica (SPUDEIT *et al.*, 2012).

2.11.1 Instrumentação

Uma característica fundamental na eletroforese capilar (CE) é a sua simplicidade instrumental (TAVARES, 1996; SPUDEIT *et al.*, 2012;). Uma representação esquemática de um equipamento de Eletroforese Capilar é apresentada na Figura 3.

Figura 3 – Representação esquemática de um sistema de eletroforese capilar.



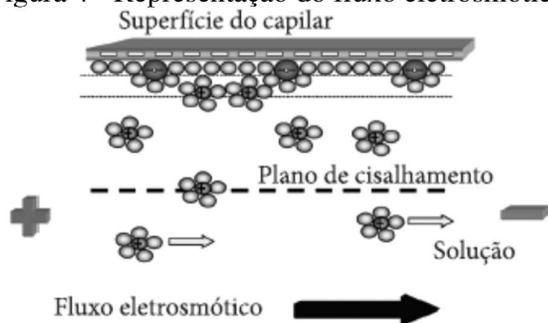
Fonte: Spudeit *et al.*, 2012.

Basicamente, um equipamento de CE consiste em um sistema de injeção, uma coluna capilar onde ocorre a separação, uma fonte de alta tensão, representada por F na Figura 3 (que opera com voltagens até 30 kV), um par de eletrodos (e1 e e2), um detector (D) e um computador (C) para obtenção e tratamento dos dados (LANDERS, 2008; TAVARES, 1996).

A fonte de alta tensão é conectada por meio dos eletrodos aos reservatórios que contém o eletrólito adequado (R1 e R2). Os capilares preenchidos com eletrólito ajudam a manter o contato elétrico, funcionando como um canal de migração. Para minimizar os efeitos gerados pelo aquecimento, os capilares devem ser mantidos à temperatura constante, mantida principalmente através da circulação de líquidos ou de ar (SPUDEIT *et al.*, 2012).

A utilização de capilares de sílica fundida na execução da técnica introduziu uma importante peculiaridade: a geração do chamado fluxo eletrosmótico (EOF, do inglês *Electroosmotic Flow*), como mostra a Figura 4.

Figura 4 - Representação do fluxo eletrosmótico.



Fonte: Spudeit *et al.*, 2012.

O fluxo eletrosmótico é consequência de uma interação entre a solução e a superfície interna do capilar. Quimicamente, a sílica fundida é caracterizada pela presença de vários tipos de grupos silanóis ($-\text{SiOH}$), os quais apresentam um caráter ácido. Em contato com o meio aquoso, alguns desses grupos são ionizados, e com isso, a superfície do capilar torna-se negativamente carregada. Quando um campo elétrico é imposto tangencialmente à superfície, forças elétricas causam um movimento unilateral de íons em direção ao eletrodo de carga oposta. Durante a migração, os íons transportam moléculas de água induzindo o fluxo da solução como um todo em direção ao cátodo (pólo negativo). Este modo é conhecido como fluxo eletrosmótico normal (SPUDEIT *et al.*, 2012; TAVARES, 1996).

Através do capilar, aplica-se uma corrente de alta tensão que faz com que os analitos se movam entre os polos positivo e negativo, chegando ao detector que conectado a um computador fornece os resultados das análises na forma de eletroferograma. É nos tubos capilares onde ocorre a separação dos analitos. Estes capilares normalmente são fabricados com sílica fundida, material este que fornece maleabilidade, possui alta constante dielétrica, baixa condutividade elétrica e alta transmitância óptica, entre 190 a 900 nm. A fonte de alta tensão é conectada através dos eletrodos a dois reservatórios que contém BGE, amostra ou outras soluções pertinentes ao método de separação proposto, podendo ser facilmente trocados. O sistema de detecção amplamente utilizado em CE é absorção na região do ultravioleta e/ou luz visível (UV-Vis) devido à facilidade de implementação deste dispositivo e aplicabilidade. O computador, através de um software, permite a seleção e controle dos parâmetros do sistema, além da aquisição e tratamento de dados (DELLA BETTA *et al.*, 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Investigar a presença de nitrato e nitrito de sódio em carnes bovina, suína e de frango em natureza e em produtos cárneos formulados sem adição dos dois componentes (caracterizados como produtos “rótulos limpos” nesse trabalho), elaborados em estabelecimentos sob Serviço de Inspeção Federal (SIF).

3.2 Objetivos específicos

- Determinar as concentrações máximas de nitrato e nitrito de sódio naturalmente presentes em carnes bovina, suína e de frangos, caso ocorram;
- Determinar as concentrações máximas de nitrato e nitrito que podem estar ocorrendo em produtos formulados atualmente elaborados pelas agroindústrias sem a adição intencional dos componentes, a fim de subsidiar o SIF quanto ao enquadramento dos resultados das análises oficiais como conformes ou não conformes;
- Determinar se há associação entre os resultados de nitrato e nitrito das amostras de carnes em natureza analisadas e de seus produtos derivados, não adicionados de sais de cura;
- Gerar dados para a atualização de legislações pelas autoridades sanitárias competentes.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostragem

4.1.1 Amostragem de carne em natureza

Foram colhidas trinta amostras de carne em natureza de cada uma das espécies estudadas (suína, bovina e frango) em estabelecimentos sob Serviço de Inspeção Federal (SIF) localizados no Estado de Santa Catarina (SC), para a identificação de nitrato e nitrito de sódio, totalizando noventa amostras.

As amostras foram obtidas após o sorteio de dez abatedouros-frigoríficos que abatiam animais de cada uma das espécies, com exceção das amostras de carne bovina, que foram coletadas nos únicos três estabelecimentos sob SIF em SC. O número de amostras de carne em natureza colhidas por estabelecimento, assim como o número total de amostras, encontra-se apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 – Número de amostras de carne em natureza coletadas por espécie animal e estabelecimento.

Tipo de Carne	Número de estabelecimentos sob SIF em SC	Nº de estabelecimentos amostrados	Porcentagem de estabelecimentos amostrados (%)	Nº de amostras por abatedouro-frigorífico	Nº total de amostras
Frango	20	10	50	3	30
Suína	19	10	52	3	30
Bovina	3	3	100	10	30
Total	42	23	67,33	--	90

Fonte: próprio autor.

A definição da amostragem foi efetuada de acordo com Cannon e Roe (1982 *apud* THURSFIELD, 2005) conforme a Tabela 5, considerando uma população infinita e uma prevalência de 10% de amostras positivas para nitrato de sódio. A prevalência mínima de 10% foi estimada a partir do trabalho conduzido por Iammarino e Di Taranto (2012),

sendo adotada no presente trabalho igualmente para as carnes das três espécies avaliadas (bovina, suína e frango).

Tabela 5 – Definição do número mínimo de amostras com base na taxa de prevalência.

Tamanho da população	Tamanho da amostra exigido a uma taxa de prevalência esperada de:											
	50%	40%	30%	25%	20%	15%	10%	5%	2%	1%	0,5%	0,1%
10	4	5	6	7	8	10	10	10	10	10	10	10
20	4	6	6	9	10	12	16	19	20	20	20	20
30	4	6	8	9	11	14	19	26	30	30	30	30
40	5	6	8	10	12	15	21	31	40	40	40	40
50	5	6	8	10	12	16	22	35	48	50	50	50
60	5	6	8	10	12	16	23	38	55	60	60	60
70	5	6	8	10	13	17	24	40	62	70	70	70
80	5	6	8	10	13	17	24	42	68	79	80	80
90	5	6	8	10	13	17	25	43	73	87	90	90
100	5	6	9	10	13	17	25	45	78	96	100	100
120	5	6	9	10	13	18	26	47	86	111	120	120
140	5	6	9	10	13	18	26	48	92	124	139	140
160	5	6	9	11	13	18	27	49	97	135	157	160
180	5	6	9	11	13	18	27	50	101	146	174	180
200	5	6	9	11	13	18	27	51	105	155	190	200
250	5	6	9	11	14	18	27	53	112	175	228	250
300	5	6	9	11	14	18	28	54	117	189	260	300
350	5	6	9	11	14	18	28	54	121	201	287	350
400	5	6	9	11	14	19	28	55	124	211	311	400
450	5	6	9	11	14	19	28	55	127	218	331	450
500	5	6	9	11	14	19	28	56	129	225	349	500
600	5	6	9	11	14	19	28	56	132	235	379	597
700	5	6	9	11	14	19	28	57	134	243	402	691
800	5	6	9	11	14	19	28	57	136	249	421	782
900	5	6	9	11	14	19	28	57	137	254	437	868
1000	5	6	9	11	14	19	29	57	138	258	450	950
1200	5	6	9	11	14	19	29	57	140	264	471	1102
1400	5	6	9	11	14	19	29	58	141	269	487	1236
1600	5	6	9	11	14	19	29	58	142	272	499	1354
1800	5	6	9	11	14	19	29	58	143	275	509	1459
2000	5	6	9	11	14	19	29	58	143	277	517	1553
3000	5	6	9	11	14	19	29	58	145	284	542	1895
4000	5	6	9	11	14	19	29	58	146	268	556	2108
5000	5	6	9	11	14	19	29	59	147	290	564	2253
6000	5	6	9	11	14	19	29	59	147	291	569	2358
7000	5	6	9	11	14	19	29	59	147	292	573	2437
8000	5	6	9	11	14	19	29	59	147	293	576	2498
9000	5	6	9	11	14	19	29	59	148	294	579	2548
10000	5	6	9	11	14	19	29	59	148	294	581	2588
∞	5	6	9	11	14	19	29	59	149	299	598	2995

Fonte: Cannon e Roe 1982 *apud* THURSFIELD, 2005.

Os cortes comerciais/músculos selecionados para as análises de nitrato e nitrito em carne suína, bovina e de frango em natureza foram, respetivamente: pernil/músculo *semimembranosus*, peixinho/músculo *supraspinatus* e peito/ músculo *pectoralis major* (Tabela 6).

Tabela 6 - Cortes comerciais e músculos selecionados para análise de carne em natureza de acordo com a espécie.

Tipo de carne	Corte comercial	Músculo coletado
Suína	Pernil	<i>Semimembranosus</i>
Bovina	Peixinho	<i>Supraspinatus</i>
Frango	Peito	<i>Pectoralis major</i>

Fonte: próprio autor.

4.1.2 Amostragem de produtos formulados sem adição de sais de cura (“rótulo limpo”)

A escolha dos produtos formulados sem adição de nitrato e nitrito investigados nesse trabalho foi baseada nos resultados de análises oficiais de amostras de produtos coletados por técnicos do MAPA nos anos de 2016 e 2017, em abatedouros-frigoríficos e unidades de beneficiamento de carne e produtos cárneos sob Serviço de Inspeção Federal em Santa Catarina, visando o atendimento do Programa de Avaliação de Conformidade de Produtos de Origem Animal (PACPOA). Os resultados obtidos em 2016 e 2017 apontaram a presença de nitrato em hambúrgueres e carnes temperadas, cujas fórmulas não previam a adição de sais de cura.

De acordo com a Norma Interna nº 2/2016 (BRASIL, 2016a), os hambúrgueres e as carnes temperadas pertencem à categoria de produtos não submetidos a tratamento térmico. Tratam-se de produtos formulados que mais preservam as características de produtos em natureza e que, apesar de serem adicionados de ingredientes e/ou aditivos, necessitam da conservação pelo frio para a manutenção da sua estabilidade microbiológica (BRASIL, 2016b). O conceito dessa categoria é equivalente ao conceito de preparados cárneos trazido pelo Regulamento da Comunidade Européia (CE) nº 853/2004, vigente na União Européia (EUROPEAN COMMISSION, 2004).

Segundo o Regulamento (CE) nº 853/2004, preparados cárneos são os produtos elaborados com carne fresca incluindo a carne que tenha sido reduzida a fragmentos, à qual foram adicionados condimentos/aditivos ou que foi submetida a um processamento insuficiente para alterar a estrutura das suas fibras musculares, e assim eliminar as características de carne fresca. Logo, os produtos da categoria não submetidos a tratamento térmico amostrados no presente trabalho podem ser considerados como aqueles que melhor representam os produtos formulados caracterizados como “rótulo limpo” no Brasil, por preservarem mais as características de produtos em natureza e por

serem elaborados sem a adição de nitrato e nitrito. Os produtos em natureza são aqueles que não foram submetidos a qualquer outro processo de conservação, além do resfriamento ou congelamento (BRASIL, 2016b).

O primeiro passo do trabalho foi a realização do levantamento de todos os produtos da categoria não submetidos a tratamento térmico não adicionados de nitrato e nitrito elaborados entre os meses de fevereiro a junho de 2020 pelas indústrias de Santa Catarina, através de consulta aos estabelecimentos produtores. Os produtos foram separados de acordo com o tipo de carne utilizado na elaboração. O levantamento retornou com os resultados demonstrados na Tabela 7.

Tabela 7 - Relação de produtos, número de indústrias produtoras e produtos sem adição de nitrato e nitrito pertencentes à categoria não submetidos a tratamento térmico elaborados entre os meses de fevereiro e junho de 2020.

Carne utilizada	Produto	Quantidade de indústrias produtoras	Quantidade de produtos
Suína	Carne temperada congelada	2	8
	Hambúrguer congelado	3	7
Bovina	Carne temperada congelada	1	3
	Almôndega congelada	2	2
Frango	Carne temperada congelada	3	21
	Hambúrguer congelado	1	3
	Frango temperado congelado	2	3
Total		10*	47

*Algumas indústrias produziam mais de um produto.

Fonte: próprio autor.

A partir dos 47 produtos formulados demonstrados na tabela 7 foram selecionados 10 produtos por conveniência para a realização das análises, todos de indústrias distintas. Dessa forma, os produtos corresponderam a 21,27% do total de produtos com mesmo perfil, ou seja, sem adição de nitrato e nitrito, compostos de carne de uma única espécie e pertencentes à categoria de produtos não submetidos a tratamento térmico.

Os dez produtos formulados foram amostrados de forma homogênea atendendo a seguinte distribuição por espécie: quatro de frango, três de bovinos e três de suínos. Para cada um dos dez produtos selecionados, foram coletadas amostras de três lotes distintos, totalizando trinta amostras (Tabela 8).

Tabela 8 - Relação e quantidade de produtos coletados para análises de nitrato e nitrito durante a investigação.

Carne empregada	Produto	Quantidade de produtos analisados (n°)	Quantidade de lotes analisados	Total de amostras (n°)	Total de amostras por espécie
Frango	Carne temperada congelada de frango sem osso	2	6	6	12
	Carne temperada congelada de frango com osso	1	3	3	
	Hambúrguer congelado de frango	1	3	3	
Bovina	Hambúrguer congelado de bovino	2	6	6	9
	Carne temperada congelada de bovino com osso	1	3	3	
Suína	Carne temperada congelada de suíno sem osso	2	6	6	9
	Carne temperada congelada de suíno com osso	1	3	3	
	Total	10	30	30	

Fonte: próprio autor.

4.2 Coleta de amostras

4.2.1 Coleta e envio de amostras de carnes em natureza

As 90 amostras de carne em natureza foram colhidas por técnicos do Serviço de Inspeção Federal (SIF) no Departamento de Inspeção Final ou na sala de espostejamento,

obedecendo a premissa de que cada amostra fosse coletada de animais de procedências diferentes ao longo de um dia de abate, em cada um dos abatedouros-frigoríficos, para abranger o maior número de animais criados sob influências de manejo e alimentação diferentes.

Posteriormente, as amostras foram congeladas a -12°C e mantidas a essa temperatura durante a estocagem e o envio ao Laboratório Oficial SLAV-SC, em São José, Estado de Santa Catarina, Brasil, acreditado na ISO 17.025, para a condução das análises.

4.2.2 Coleta e envio de amostras de produtos formulados sem adição de sais de cura (rótulo limpo)

Os técnicos do SIF acompanharam a formulação de todos os 30 lotes de produtos não adicionados de sais de cura previamente à etapa de coleta. O procedimento foi adotado para averiguar se os produtos atendiam as composições dos rótulos registrados junto à plataforma de registro de rotulagem do SIF/DIPOA.

Concluída a etapa de produção, os produtos foram coletados em suas embalagens originais e conservados à temperatura indicada no rótulo durante a estocagem e envio ao Laboratório Oficial SLAV-SC, em São José, Estado de Santa Catarina, Brasil, para a condução das análises.

4.3 Preparo da amostra

As amostras de carne em natureza das três espécies (frango, suína e bovina) e de produtos formulados (hambúrgueres, carnes e cortes temperados congelados) foram transferidas para a geladeira sob refrigeração a $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ para descongelamento, até a execução das análises.

Todas as amostras foram previamente trituradas e homogeneizadas e $2 \pm 0,1$ g foram pesadas em um tubo de polietileno com capacidade de 50 mL. A seguir, as amostras foram fortificadas com 150 μL da solução-estoque de tiocianato de potássio (10000 mg L^{-1}). Ao tubo, foram adicionados 1 mL de tetraborato de sódio (5%) e 9 mL de água ultrapura. O tubo foi agitado em um vórtex por 1 min. A extração foi realizada em banho-maria a $65 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob agitação, por 20 min. Os tubos foram centrifugados à temperatura de 4°C por dez minutos a 3488 g. Posteriormente, os volumes dos tubos foram filtrados

através de papel de filtro qualitativo (n° 1). Uma alíquota de 100 μl do volume filtrado de cada amostra foi transferida para um microtubo e a ela foram adicionados 200 μL de acetonitrila e 200 μL de água ultrapura. Após agitar, a solução foi centrifugada à temperatura de 4 °C por dez minutos a 17300 g. Por fim, foram transferidos cerca de 450 μL do sobrenadante para os *vials* e injetados no sistema de eletroforese. Todas as amostras foram preparadas em três repetições independentes (triplicata) antes da data de vencimento dos produtos. Além disso, foi preparada uma curva de calibração em solvente, de acordo com as seguintes faixas de trabalho: nitrato, 37,5 a 600 mg L^{-1} ; nitrito, 18,75 a 300 mg L^{-1} ; tiocianato, 750 mg L^{-1} e uma amostra de recuperação, fortificada nos limites regulatórios. As concentrações dos analitos da curva de calibração foram transferidas para os *vials* e injetadas no sistema de eletroforese.

4.4 Reagentes e padrões

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e água deionizada (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, E.U.A.). Padrões de nitrito de sódio, bem como tiocianato de potássio (pureza > 99%) foram adquiridos junto a Merck (Darmstadt, Alemanha). O ácido perclórico (70%) e a β -alanina (> 99%) utilizados foram da marca Sigma-Aldrich (St. Louis, CO, E.U.A.). As soluções padrões de nitrato, nitrito e tiocianato (1000 mg L^{-1}) e as soluções de ácido perclórico e β -alanina (100 mmol L^{-1}) foram preparadas e armazenadas a 4°C até o momento da análise. Outros reagentes utilizados durante o experimento foram hidróxido de sódio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e acetonitrila (Merck, Rio de Janeiro, Brasil).

4.5 Instrumental e técnica empregados nas análises

O método utilizado na presente pesquisa se baseia na extração dos analitos com água quente e tetraborato de sódio e na quantificação por padronização interna com tiocianato de potássio, conforme a Tabela 9 (BRASIL, 2019b).

Tabela 9 – Condições instrumentais para determinação de nitrato e nitrito em produtos cárneos por eletroforese capilar de zona.

Sistema de Eletroforese Capilar	Sistema automático, com detector de arranjo de diodos e controlador de temperatura, operado por software de controle e aquisição de dados
Capilar	48,5 cm (L_{tot}) x 75 μ m (r)
Comprimento de onda (λ)	210 nm
Injeção da amostra	hidrodinâmica pelo outlet (-50 mbar 3 s $^{-1}$)
Voltagem de separação	20 kV
Temperatura	20 °C
Condicionamento capilar	NaOH (20 min.) – H ₂ O (20 min.) – eletrólito (20 min.)
Pré-condicionamento	Eletrólito (40s)

Fonte: Brasil, 2019b.

Os ensaios foram conduzidos em sistema de eletroforese capilar modelo 7100 da marca Agilent Technologies (Palo Alto, E.U.A.), equipado com detector de arranjo de diodos (DAD), controlador de temperatura e programa de aquisição e tratamento de dados fornecido pelo fabricante (*HP ChemStation*®).

O capilar foi condicionado por meio de lavagens com 1 mol L $^{-1}$ NaOH (20 min.), água ultrapura (20 min.) e solução de eletrólito de corrida (20 min.), composto por β -alanina, ácido perclórico e água deionizada. Entre as corridas, o capilar foi lavado com o eletrólito por 1 minuto e, ao final do dia, lavagem com 1 mol L $^{-1}$ NaOH (10 min) e água (10 min).

A separação foi realizada através de capilar de sílica fundida com 48,5 cm de comprimento total e 75 μ m de diâmetro interno da marca *Polymicro Technologies* (Phoenix, AZ, EUA.), com modo de detecção direto em 210 nm e à temperatura de 20°C. As amostras e os padrões foram introduzidos pela extremidade mais curta do capilar (*outlet*) com pressão hidrodinâmica de 50 mbar por 4s. A tensão utilizada na separação foi - 30 kV (polaridade negativa no local de injeção).

O eletrólito de corrida (BGE) (pH 3,8) utilizado no método era composto de ácido perclórico 100 mmol L⁻¹ (1000 µL), β-alanina 100 mmol L⁻¹ (2600 µL) e água ultrapura (400 µL).

4.5 Cálculo e expressão dos resultados

A identificação de cada espécie química foi feita pelo tempo de migração e pelo espectro de absorção. A quantificação foi realizada por padronização interna com tiocianato de potássio (750 mg L⁻¹), utilizando relação funcional linear de razão das concentrações (eixo x) dos analitos *versus* razão de áreas dos picos (eixo y). O resultado das amostras através do método foi expresso em “g/100 g”, com três casas decimais (BRASIL, 2019b).

4.7 Análise estatística

Os dados foram interpretados utilizando o software estatístico *GraphPad Prism* versão 8.3, considerando o nível de significância de 95% (p<0,05). Os resultados das análises de nitrato e nitrito de sódio das amostras foram expressos por média, e valores mínimo e máximo. As comparações quantitativas entre os grupos foram realizada por teste t para amostras não pareadas quando comparados dois grupos, e ANOVA de uma via com pós-teste de *Tukey* quando comparados três grupos. Para determinar a associação entre a presença de nitrato e nitrito de sódio nas amostras com os tipos de carnes e produtos analisados foi utilizado o teste exato de Fisher ou Qui-quadrado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total, foram analisadas cento e vinte amostras, sendo noventa amostras de carnes em natureza (trinta de cada espécie - bovina, suína e frango), e trinta de produtos formulados. As cento e vinte amostras corresponderam a um total de trezentos e sessenta análises, considerando que cada amostra foi analisada em triplicata.

Os dados relativos à presença de nitrato e nitrito de sódio nas carnes em natureza, incluindo as concentrações médias detectadas nas amostras positivas, estão demonstrados na Tabela 10. Os resultados para cada amostra positiva se referem à média das concentrações detectadas nas análises realizadas em triplicata.

Tabela 10 - Resultados de análises de nitrato e nitrito de sódio em amostras de carne em natureza das três espécies analisadas (suína, bovina e frango).

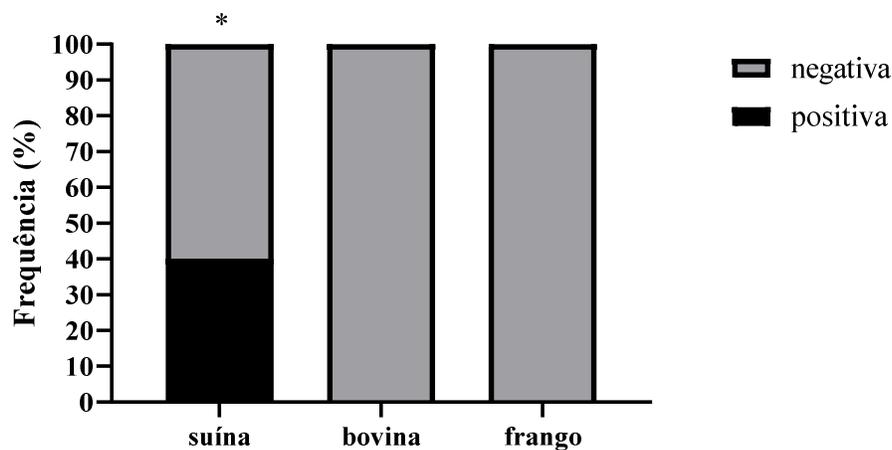
Tipo de carne	Número de amostras analisadas	Número de amostras com concentração de nitrato de sódio > limite de quantificação	Número de amostras com concentração de nitrito de sódio > limite de quantificação	Amostras positivas para nitrato de sódio (%)	Concentração média de nitrato de sódio em amostras positivas (mg/kg)	Faixa de concentração de amostras positivas (mg/kg)
Suína	30	12	0	40	15,25	7,80 - 25,24
Bovina	30	0	0	0	-	-
Frango	30	0	0	0	-	-
Total	90	12	0	13,3	15,25	7,80 - 25,24

Fonte: próprio autor.

Através dos resultados obtidos, é possível perceber a ausência de nitrito de sódio em todas as amostras das três espécies analisadas (bovina, suína e frango) e de nitrato de sódio nas carnes bovina e de frango ($C < LQ = 5$ mg/kg). Nitrato de sódio foi somente quantificado em amostras de carne suína ($C > LQ = 5$ mg/kg).

Doze das trinta amostras de carne suína em natureza analisadas demonstraram a presença de nitrato de sódio, dada as concentrações acima do limite de quantificação do método ($C > LQ = 5$ mg/kg), evidenciando dessa forma a presença natural do componente em 40% das amostras desse tipo de carne (Figura 5). Através do teste de Fischer ($P < 0,0001$), foi possível observar diferença estatística entre a concentração de nitrato da carne suína e das demais espécies.

Figura 5 - Porcentagem de amostras de carne em natureza positivas e negativas para nitrato de sódio por espécie animal. Limite de quantificação do método (LQ = 5 mg/kg). * $P < 0,0001$ por teste de Fischer.



Fonte: próprio autor.

Na Figura 6 é possível verificar os eletroferogramas correspondentes às análises em triplicata de uma das amostras de carne suína em natureza que apresentou quantificação para nitrato de sódio ($C > LQ = 5$ mg/kg).

Figura 6 - Eletroferogramas das análises em triplicata de 1 das amostras de carne suína em natureza, positiva para nitrato de sódio (média da amostra = 22,62 mg/kg).
(continua)

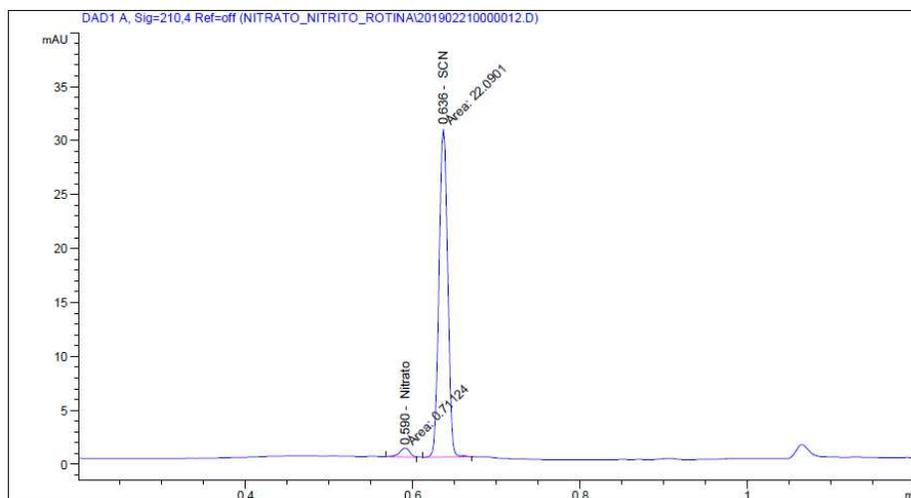
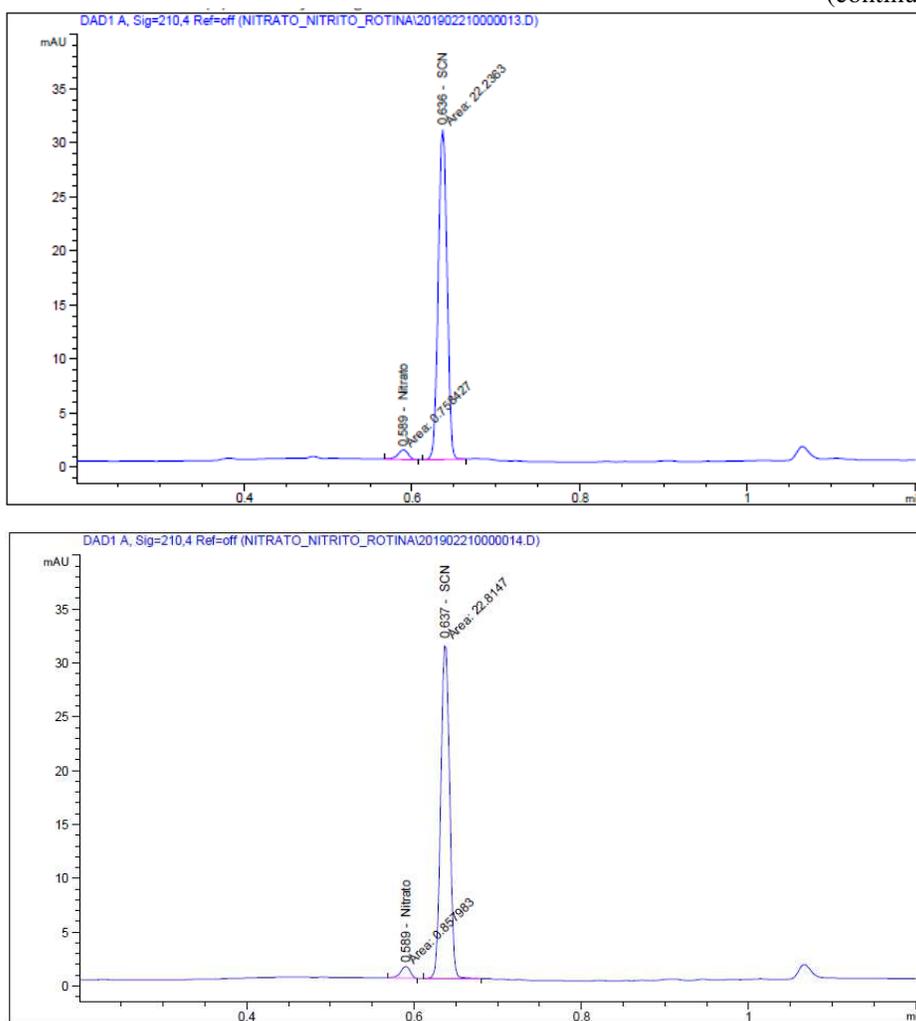


Figura 6 - Eletroferogramas das análises em triplicata de 1 das amostras de carne suína em natureza, positiva para nitrato de sódio (média da amostra = 22,62 mg/kg).
(continuação)



Fonte: próprio autor.

Eleftheriadou *et al.* (2002) analisaram as concentrações de nitrito e nitrato de cento e vinte amostras de carne suína em natureza obtidas de animais de cinco linhagens genéticas distintas, através dos métodos ISO 2918/78 e 3091/75. Adicionalmente, vinte amostras de ração e vinte amostras de água foram analisadas através do método AOAC 968.07. Foram detectadas concentrações baixas de nitrato de sódio nas amostras (10,3 a 21,5 mg/kg em carne; 12,74 a 18,36 mg/kg em ração animal e 38,36 a 89,32 mg/kg em água), além de traços de nitritos. Contudo, não foi observada correlação entre as quantidades de nitrato na ração e na água e a sua concentração na carne suína.

Em pesquisa conduzida por Sacanni *et al.* (2006), um total de cinquenta amostras de carne bovina, suína, equina e de frango foram analisadas através de cromatografia

iônica. As concentrações de nitrato de sódio variaram entre 4,93 a 13,97; 3,28 a 12,60; 5,50 a 15,61 e 3,56 a 12,19 mg/kg, respectivamente, em carnes suína, bovina, equina e de frango.

Na investigação realizada com carnes equina, suína, bovina e frango em natureza, Iammarino e Di Taranto (2012) observaram quantificação de nitrato ($C > LQ = 9,6$ mg/kg) em, respectivamente, 16, 12, 10 e 0% das amostras analisadas por cromatografia iônica. As concentrações de nitrato de sódio nas amostras positivas variaram de 14,80 a 20,55; 14 a 20,3 e 18,6 a 50 mg/kg, respectivamente, em carnes bovina, suína e equina. Os pesquisadores excluíram a possibilidade de quantificação de nitrito em todos os quatro tipos de carne, dada a ausência do componente nas amostras ($C < LQ = 4,5$ mg/kg), e de nitrato em carne de frango em natureza ($C < LQ = 9,6$ mg/kg).

Hsu *et al.* (2009) analisaram amostras de vegetais, produtos cárneos curados e carne bovina em natureza, como medalhão e carne moída, adquiridos em supermercados de Sydney, através de HPLC - UV. As concentrações de nitrato de sódio ($C > LQ = 2,5$ mg/kg) nas amostras de medalhão e carne moída bovina ficaram dentro da faixa de produtos curados, com médias, respectivamente, de $52,7 \pm 20,4$ e $25,6 \pm 8,5$ mg/kg. Não houve quantificação de nitrito ($C < LQ = 5$ mg/kg) nas amostras de carne em natureza analisadas.

Em geral, observa-se escassez de dados sobre a transferência e as concentrações de nitrato e nitrito em tecidos corpóreos e produtos de origem animal. Devido à rápida excreção de nitrito e nitrato, a probabilidade de acumulação em tecidos animais e produtos de origem animal é considerada baixa. Além disso, a absorção oral de nitrito e nitrato é baixa tanto em ruminantes como em não ruminantes, resultando em concentrações baixas de nitrito passando, respectivamente, do rúmen e estômago para a corrente sanguínea (EFSA, 2009).

Em animais monogástricos, com exceção de ratos e camundongos, uma fonte importante de nitrito é o nitrato oriundo da dieta, que é sistematicamente absorvido, secretado na saliva e então reduzido a nitrito através da atividade da enzima nitrato redutase, devido à presença de bactérias na cavidade oral e língua (BRUNING-FANN & KANEENE, 1993; DJEKOUN-BENSOLTANE *et al.*, 2007). Tal conversão é pH dependente e, normalmente, não ocorre no estômago da maioria dos animais monogástricos em virtude da acidez relativa ($pH < 3,5$). Muito pouco nitrato sofre redução até atingir o cólon. Durante o percurso até o cólon parte do nitrato é absorvido e excretado pelos rins, além da parte excretada via fezes (WRIGHT & DAVISON, 1964).

Em contraste, o rúmen dos ruminantes, o ceco e o cólon dos equinos são adaptados para a redução do nitrato a nitrito devido à densa microbiota e o pH relativamente alto (> 5) (WRIGHT & DAVISON, 1964; SEN *et al.*, 1969; MOHINI *et al.* 2017). Como as espécies herbívoras e, em particular, os ruminantes, se alimentam de dietas que contém níveis de nitrato elevados, elas são potencialmente uma das espécies mais sensíveis à intoxicação por nitritos devido a sua capacidade inata de ruminantes para a conversão microbiana de nitrato a nitrito. No entanto, em circunstâncias normais não ocorrem problemas, pois a concentração de nitrato nas plantas é baixa e o nitrito resultante é rapidamente removido por fermentação bacteriana para anabolismo, produzindo amônia, aminoácidos e proteínas, como representado: Nitrato → Nitrito → Amônia → Aminoácidos → Proteínas (EFSA, 2009; MOHINI *et al.*, 2017).

Um aspecto importante relacionado com a ingestão crônica de nitrato e nitrito pelos ruminantes é a capacidade progressiva e relativamente rápida de adaptação do intestino e da microbiota do rúmen, favorecendo a conversão do nitrito em amônia (detoxificação), a partir de concentrações variadas. Por essa razão dinâmica, um fator de conversão reprodutível não está disponível. Em certas circunstâncias, pode haver acumulação de nitrito quando o nitrato é convertido a nitrito a uma velocidade maior do que a do nitrito é convertido à amônia. Conseqüentemente, excepcionalmente, o rúmen pode sofrer uma sobrecarga quando concentrações elevadas de nitrato (e potencialmente nitrito) são ingeridas (BRUNING-FANN & KANEENE, 1993).

Após ser absorvido e chegar à corrente sanguínea, o nitrito se distribui rapidamente no plasma ligando-se aos eritrócitos. Posteriormente à ligação à membrana do eritrócito, o nitrito é reduzido a óxido nítrico (pelas enzimas xantino oxidase e óxido nítrico sintetase) (EFSA, 2009).

Ambientalmente, a fonte de nitrato mais significativa e causa dos níveis mais altos observados em forrageiras e águas subterrâneas são os fertilizantes e o nitrato encontrado no esterco. Quando adubos e fertilizantes são aplicados repetidamente em áreas limitadas da terra, os nitratos tendem a se acumular no solo, lixiviam as águas subterrâneas e são absorvidos pelas raízes das plantas e depositados nos tecidos das plantas (EFSA, 2009).

Nos vegetais, a concentração de nitrato tende a ser maior no pecíolo, seguido da folha, caule, raiz, flores, tubérculo, fruto, e por último nas sementes (SANTAMARIA *et al.*, 1999; EFSA, 2009). Como resultado, a alimentação baseada em culturas forrageiras tende a apresentar maior concentração de nitrato comparada às dietas à base de grãos (EFSA, 2009). Como consequência frangos, e em uma menor extensão suínos, ingerem

concentrações negligenciáveis de nitrito/nitrato a partir da alimentação animal, sendo a maior ingestão advinda do consumo de água (BRUNING-FANN & KANEENE, 1993).

Na investigação conduzida por Blount *et al.* (2008) não foi observada correlação entre as concentrações de nitrato determinadas em ovos e água de bebida ofertada às aves em uma das três granjas avaliadas no experimento (granja 2), apesar dos valores encontrados terem sido relativamente 63% maiores que a concentração máxima aceita para nitrato (0,044 mg/kg) e, 34 e 73 vezes maiores que os níveis de nitrato encontrados na água ofertada às aves de postura nas demais granjas. A falta de correlação entre a ingestão de nitrato e a excreção/secreção pode ser explicada pela formação endógena e/ou do metabolismo do nitrato em aves.

A incapacidade de correlacionar a ingestão de nitrato e nitrito através da alimentação animal e a sua presença na carne se torna mais complexa em virtude da possibilidade de formação endógena de nitrato e nitrito (ELEFTHERIADOU *et al.*, 2002). Alguns estudos realizados em humanos sugerem a formação endógena de nitrato e nitrito no intestino, em virtude da nitrificação heterotrófica (TANNENBAUM *et al.*, 1978; GOMEZ *et al.*, 1980).

Nos bovinos, o rúmen pode estar exercendo diferença à medida que a microbiota ruminal utiliza o nitrato e nitrito oriundos da dieta na síntese direta de proteínas, não permitindo a absorção do componente e sua acumulação em concentrações quantificáveis no tecido muscular, o que justificaria os resultados encontrados no presente trabalho.

Os resultados das análises de nitrito de sódio evidenciando ausência do componente nas carnes avaliadas no presente trabalho foram semelhantes aos resultados obtidos por Iammarino & Di Taranto (2012).

Os resultados das análises de nitrato de sódio indicando ausência do componente em amostras de carne de frango em natureza também foram similares aos obtidos por Iammarino & Di Taranto (2012). Por outro lado, diferiram dos resultados obtidos por Sacanni *et al.* (2006), que encontraram concentração média de 6,98 mg/kg em carne de frango, embora este autor tenha utilizado método com limite de detecção de 0,1 mg/kg, muito mais sensível aos limites de quantificação empregados no presente trabalho e por Iammarino e Di Taranto (2012).

Em relação à carne bovina em natureza, os resultados obtidos neste trabalho demonstraram ausência, ao passo que em outros trabalhos houve quantificação de nitrato de sódio (Sacanni *et al.*, 2006; Hsu *et al.*, 2009; Iammarino & Di Taranto, 2012).

Quanto à carne suína em natureza, os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram a presença de nitrato de sódio em concentrações baixas (7,80 a 25,24 mg/kg) em 40% das amostras de carne suína em natureza analisadas. A concentração média de nitrato de sódio (15,25 mg/kg) foi próxima dos resultados médios obtidos por Eleftheriadou *et al.* (2002) e Iammarino & Di Taranto (2012), conforme pode ser observado na Tabela 11. A porcentagem de amostras positivas (40%) foi superior ao total de amostras positivas para nitrato de sódio (12%) detectadas por Iammarino & Di Taranto (2012). Contudo, o método empregado neste trabalho é considerado mais sensível, com baixo limite de quantificação comparado com o limite analítico reportado por tais autores (9,6 mg kg⁻¹).

Tabela 11 - Resultados de análises de nitrato de sódio em amostras de carne suína em natureza obtidos por outros pesquisadores.

Pesquisadores	Método e limite de quantificação (LQ – mg/kg)	Número de amostras de carne suína em natureza analisadas	Amostras positivas para NaNO ⁻³ (%) (C > LQ)	Faixa de concentração de NaNO ⁻³ em amostras de carne suína positivas (mg/kg)	Concentração média de NaNO ⁻³ (mg/kg)
Eleftheriadou <i>et al.</i> (2002)	Cromatografia iônica (IC/MS) – LQ não informado	120	100	10,3 - 21,5	10,5
Sacanni <i>et al.</i> (2006)	Cromatografia iônica (IC/MS) – 0,01 (obs.: limite de detecção)	26	100	4,93 – 13,97	4,5
Iammarino & Di Taranto (2012)	Cromatografia iônica – 9,6	50	12	14 - 20,3	11,6
Iacuminn <i>et al.</i> (2019)	Espectrofotometria de absorção molecular – 0,05	50	100	1 - 21	8

Fonte: próprio autor.

Os achados em carne suína podem estar relacionados a uma maior concentração de nitrato na dieta desses animais; à fisiologia particular dos suínos, que pode estar refletindo em uma maior absorção de nitrato oriunda da dieta (via ração e/ou água de bebida) ou até mesmo em decorrência da formação endógena de nitrato na espécie suína quando comparada com a carne da outra espécie monogástrica avaliada (frango). Estudos futuros serão necessários para a determinação das causas prováveis de detecção de nitrato de sódio em carne suína, tendo em vista que não era o objetivo do presente trabalho.

Os resultados das análises de nitrato e nitrito de sódio em produtos formulados (por tipo de carne) encontram-se demonstrados na Tabela 12.

Tabela 12 - Resultados das análises de nitrato e nitrito de sódio em produtos formulados de acordo com o tipo de carne utilizada na elaboração.

Tipo de Carne empregada na formulação	Nº de amostras analisadas	Nº de amostras com concentração de nitrato > limite de quantificação	Nº de amostras com concentração de nitrito > limite de quantificação	Amostras positivas para nitrato (%)	Concentração média de nitrato em amostras positivas (mg/kg)	Faixa de concentração de amostras positivas (mg/kg)
Suína	9	0	0	0	-	-
Bovina	9	9	0	100	17,50	8,74 – 32,27
Frango	12	3	0	25	16,67	13,09 – 23,71
Total	30	12	0	40	17,29	8,74 – 32,27

Fonte: próprio autor.

Não houve quantificação de nitrito de sódio ($C < LQ = 5$ mg/kg) em nenhuma das trinta amostras de produtos formulados analisados. Em contrapartida aos resultados encontrados nas carnes bovina e de frango em natureza, concentrações de nitrato de sódio ($C > LQ = 5$ mg/kg) variando entre 8,74 a 32,27 mg/kg foram observadas em 40% das amostras analisadas, nos produtos à base de carne bovina e frango.

Na Tabela 13 estão representados os resultados das análises de nitrato e nitrito de sódio por tipo de produto cárneo.

Tabela 13 - Resultados das análises de nitrato e nitrito de sódio por tipo de produto cárneo.

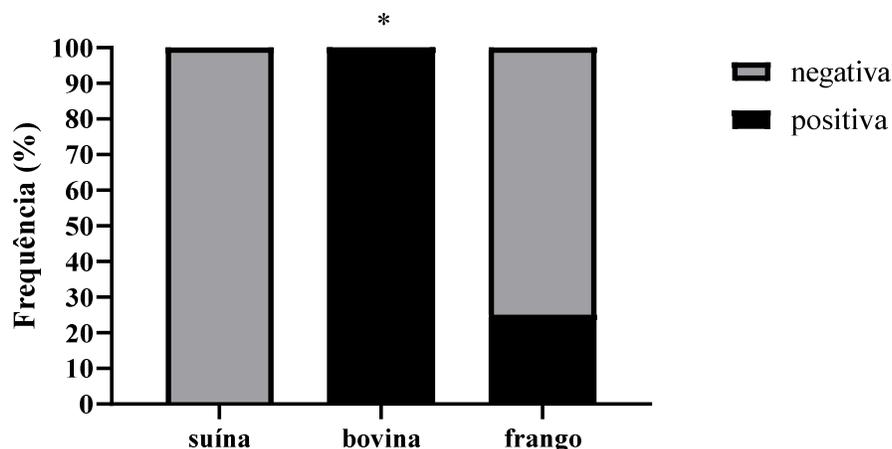
Produto cárneo	Nº de amostras analisadas	Nº de amostras com concentração de nitrato > limite de quantificação	Nº de amostras com concentração de nitrito > limite de quantificação	Amostras positivas para nitrato (%)	Concentração média de nitrato em amostras positivas (mg/kg)	Faixa de concentração de amostras positivas (mg/kg)
Carne temperada congelada de suíno sem osso	6	0	0	0	-	-
Carne temperada congelada de suíno com osso	3	0	0	0	-	-
Hambúrguer congelado de bovino	6	6	0	100	20,78	8,93 – 32,27
Carne temperada congelada de bovino com osso	3	3	0	100	10,95	8,74 – 12,98
Hambúrguer congelado de frango	3	3	0	100	16,67	13,09– 23,71
Carne temperada congelada de frango sem osso	6	0	0	0	-	-
Carne temperada congelada de frango com osso	3	0	0	0	-	-

Fonte: próprio autor.

Dos dez produtos formulados avaliados nessa investigação, quatro deles apresentaram quantificação de nitrato ($C > LQ = 5 \text{ mg/kg}$) em todos os três lotes avaliados, correspondendo a doze amostras positivas em trinta analisadas (40%). Os quatro produtos avaliados corresponderam a 100% dos produtos à base de carne bovina e 100% dos hambúrgueres analisados, como pode ser observado nos Gráficos 7 e 8. Através do teste de Qui-quadrado ($P < 0,0001$), foi observado que houve diferença

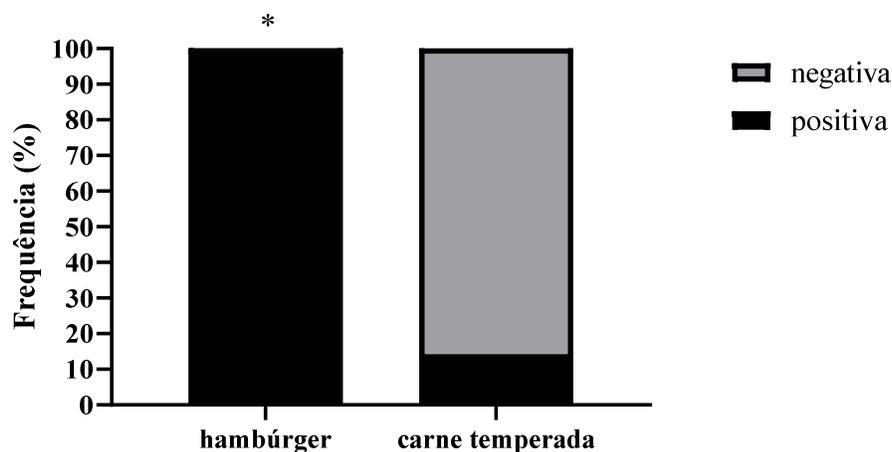
significativa entre os produtos compostos por carne de origem bovina e outras origens (suína e frango), e também entre as amostras de hambúrgueres e carnes temperadas.

Figura 7 – Gráfico demonstrando a porcentagem de amostras de produtos formulados positivas e negativas para nitrato de sódio de acordo com o tipo de carne empregado na formulação. Limite de quantificação do método (LQ = 5 mg/kg). *P < 0,0001 por teste de Qui-quadrado.



Fonte: próprio autor.

Figura 8 – Gráfico demonstrando a porcentagem de amostras de produtos formulados positivas e negativas de nitrato de sódio por tipo de produto cárneo. Limite de quantificação do método (LQ = 5 mg/kg). *P < 0,0001 por teste de Qui-quadrado.

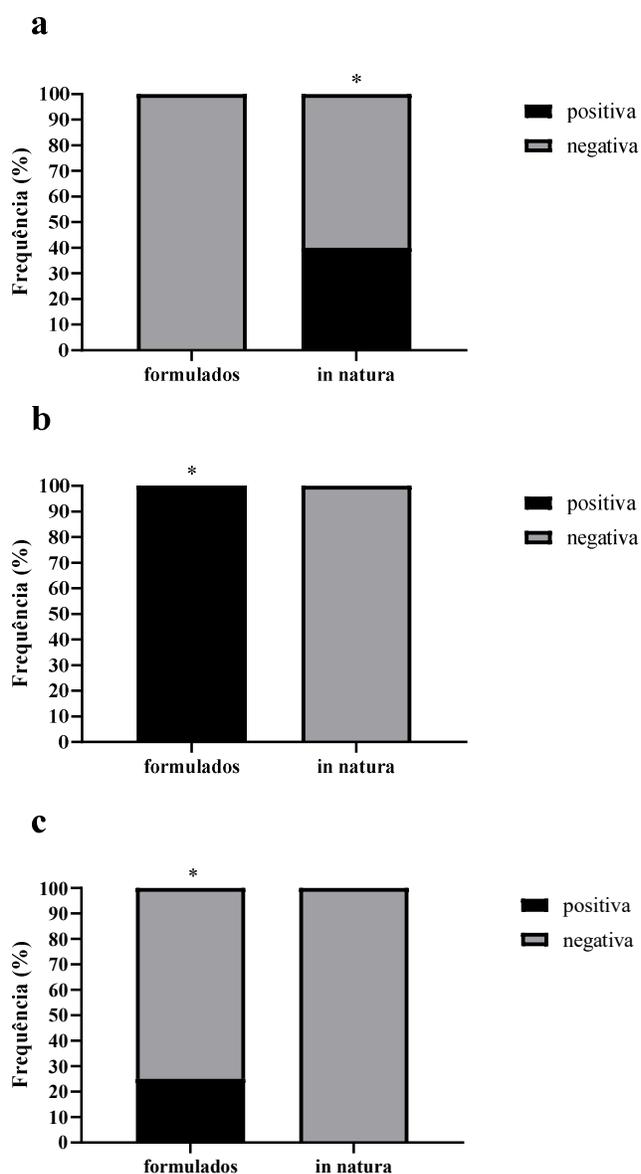


Fonte: próprio autor.

Houve diferença significativa entre os resultados de amostras positivas e negativas para nitrato de sódio, quando comparados os grupos carne em natureza e produtos

formulados, por tipo de carne (suína, bovina e de frango). Foram obtidos os valores $P < 0,0362$; $P < 0,0001$ e $P < 0,0192$, respectivamente, para os grupos carne suína, bovina e de frango, aplicando-se o teste de Fischer. O fato dos produtos formulados não terem sido elaborados com as mesmas carnes em natureza analisadas na investigação, pode explicar a ausência de associação entre os resultados (Figura 9).

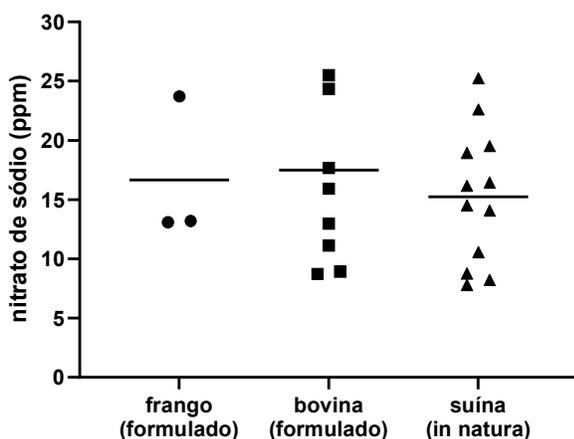
Figura 9 - Gráficos comparativos da porcentagem de amostras positivas e negativas para nitrato de sódio em carnes em natureza e produtos formulados, por tipo de carne (a - suína, b - bovina, c - frango). * $P < 0,05$ por teste de Fisher.



Fonte: próprio autor.

Não houve diferença estatística significativa entre as concentrações de nitrato de sódio de amostras de carne suína em natureza e produtos formulados à base de carne bovina e de frango que apresentaram quantificação para o analito ($C > LQ = 5 \text{ mg/kg}$), de acordo com o teste ANOVA ($p = 0,7538$). As médias das concentrações de nitrato de sódio por grupo foram: carne suína em natureza (15,25 mg/kg), produtos formulados à base de carne de frango (16,67 mg/kg) e produtos formulados à base de carne bovina (17,50 mg/kg) (Figura 10).

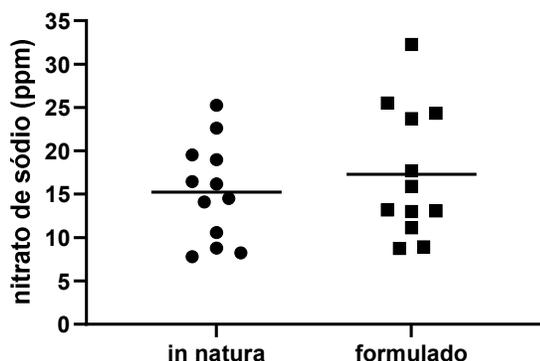
Figura 10 - Gráfico comparativo das concentrações de nitrato de sódio nas amostras positivas dos grupos de produtos formulados (compostos de carne bovina e de frango) e carne suína em natureza.



Fonte: próprio autor.

Da mesma forma acima, não houve diferença estatística entre as concentrações de nitrato de sódio das amostras positivas ($C > LQ = 5 \text{ mg/kg}$) pertencentes ao grupo produtos formulados e grupo carne em natureza, aplicando-se o teste T ($p = 0,4606$). As médias da concentração de nitrato de sódio nas amostras positivas dos grupos carne em natureza (geral) e produtos formulados (geral) foram, respectivamente, de 15,25 e 17,29 mg/kg (Figura 11).

Figura 11 - Gráfico comparativo das concentrações de nitrato de sódio em amostras positivas do grupo carne em natureza e produtos formulados.

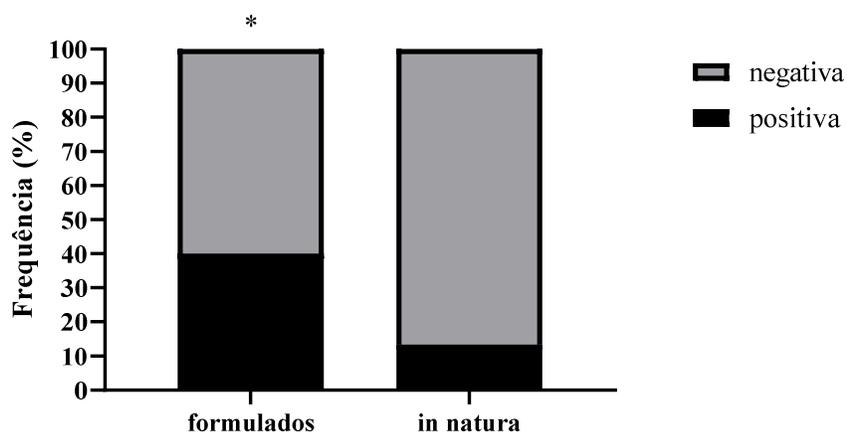


Fonte: próprio autor.

Já na avaliação das amostras positivas e negativas entre os grupos carne em natureza e produtos formulados, foi possível perceber diferença estatística significativa, aplicando-se o teste de Fischer ($p = 0,0031$). Quarenta por cento (40%) das amostras de produtos formulados foram consideradas positivas ($C > LQ = 5 \text{ mg/kg}$), enquanto nas carnes em natureza 13,33% das amostras foram consideradas positivas ($C > LQ = 5 \text{ mg/kg}$).

A probabilidade de ocorrência de concentrações quantificáveis de nitrato de sódio é maior em produtos formulados quando comparados aos produtos cárneos em natureza, como pode ser observado na Figura 12.

Figura 12 - Gráfico comparativo de amostras positivas e negativas para nitrato de sódio entre os grupos analisados (formulados e carnes em natureza). * $P < 0,001$ por teste de Fisher.



Fonte: próprio autor.

Os ingredientes de origem vegetal como a proteína de soja e a cebola podem estar determinando a presença dos traços de nitrato de sódio nos hambúrgueres bovino e de frango e na carne temperada bovina. Dos quatro produtos que apresentaram quantificação para nitrato de sódio, três (todos hambúrgueres) detinham os maiores percentuais de proteína de soja em suas composições, e inclusive muita acima dos demais produtos analisados, contribuindo com aproximadamente 4% da formulação. Em dois desses três hambúrgueres, a cebola foi o único tempero natural adicionado em percentuais de 2,66 e 4,8% da composição total. Os ingredientes utilizados na elaboração de produtos cárneos podem conter nitritos e nitratos naturalmente, contribuindo com a detecção de traços dos componentes nesses produtos, corroborando com os achados de Iacumin *et al.* (2019).

Iacumin *et al.* (2019) analisaram as concentrações de nitrato e nitrito de sódio em cinquenta amostras de presunto cru *San Danielle*, além dos ingredientes utilizados na elaboração do produto (pernil suíno, sal e *sugna*), através um método espectrofotométrico baseado na reação de Griess, para fornecer subsídios aos produtores provarem que nenhum aditivo estava sendo adicionado deliberadamente, durante a produção de presunto. No trabalho, os pesquisadores verificaram que as concentrações médias de nitrito e nitrato de sódio em amostras de sal, *sugna*, pernil suíno e produto final foram de, respectivamente, $5 \pm 0,30$ mg/kg e $8 \pm 5,2$ mg/kg; $1 \pm 0,8$ mg/kg e $6 \pm 2,9$ mg/kg; $2 \pm 0,9$ mg/kg e $8 \pm 3,4$ mg/kg; e $1 \pm 0,5$ mg/kg e $4 \pm 3,1$ mg/kg. Os valores encontrados nas cinquenta amostras do presunto cru foram inferiores aos observados na carne fresca. Isso poderia ser explicado pelo fato da carne analisada não ser a mesma utilizada nos produtos finais amostrados e em virtude dos níveis naturais dependerem de fatores variáveis, como alimentação, água e condições de manejo.

Os vegetais são ricos em nitratos (CORREIA *et al.*, 2010; KREUTZ *et al.*, 2012). As concentrações de nitrato em vegetais são dependentes de várias variáveis (SANTAMARIA, 2006). As concentrações podem variar de muito baixas (< 200 mg/kg), como as encontradas em cebola, alho, pimenta (ingredientes utilizados nos produtos analisados nesse trabalho), até muito altas (> 2500 mg/kg), como as detectadas em aipo, radiche, alface (SANTAMARIA, 2006). As concentrações de nitrato de sódio em cebola, pimenta e alho variam, respectivamente, de 13 a 34 mg/kg, 77 a 76 mg/kg e de 18 a 123 mg/kg (CHUNG *et al.*, 2003; CHUNG *et al.*, 2011; BAHADORAN *et al.*, 2016).

Entre os legumes consumidos pela população, a soja é o grão que possui os níveis mais baixos, com médias entre 103 a 106 mg/kg de nitrato de sódio (BAHADORAN *et al.*, 2016).

Além das concentrações naturalmente existentes nos ingredientes vegetais, não se pode descartar a influência de concentrações de nitrato de sódio existentes nas carnes bovina e de frango, já que as amostras de carne em natureza analisadas nessa investigação não foram as mesmas empregadas na composição dos hambúrgueres e carne temperada. Ainda, concentrações de nitrato em carnes bovina e de frango, abaixo do limite de quantificação do método empregado no presente trabalho, podem estar ocorrendo e contribuindo para o somatório dos valores de nitrato de sódio encontrados para produtos formulados à base de carnes bovina e de frango analisados.

Considerando o exposto, este autor sugere que a possibilidade de ocorrência natural de nitrato de sódio (traços) seja considerada na rotulagem de carnes em natureza e em produtos derivados não adicionados do componente, como forma de garantir a transparência e a informação aos consumidores, mediante normatização do tema pelas autoridades sanitárias competentes. Tal sugestão encontraria sustentação na expectativa de consumidores quanto à ausência desse conservante e em duas notificações encaminhadas pela Vigilância Sanitária do Estado de Santa Catarina a estabelecimentos produtores no ano de 2016, reportando rotulagem não conforme em razão de concentrações de nitrato de sódio em mortadelas sem que o conservante estivesse apresentado na lista de ingredientes. Muito embora a oxidação do nitrito a nitrato pode explicar as concentrações consideráveis de nitrato de sódio que podem ser detectadas em produtos cárneos nos quais somente nitrito foi adicionado (HONIKEL, 2008), não há como desconsiderar os resultados obtidos no presente trabalho.

Os produtos analisados nesta pesquisa não representam risco à saúde dos consumidores, considerando a ADI estabelecida para nitrato de 3,7 mg/kg de peso corporal/dia (WHO, 2002) para um adulto de 75 kg que consome cerca de 300 g de produtos cárneos por dia.

Por fim, os resultados negativos em sua grande maioria e a presença de concentrações baixas e negligenciáveis em algumas das amostras de carne suína em natureza e em produtos formulados refletem os dados citados na literatura que, em geral, indicam concentrações baixas ou até mesmo negligenciáveis de nitrato de sódio em vegetais e água de abastecimento, utilizados como ingredientes na alimentação animal e em produtos industrializados.

6 CONCLUSÃO

Por meio do presente trabalho foi possível observar a presença natural de nitrato de sódio em amostras de carne suína em natureza, assim como em produtos formulados à base de carnes bovina e de frango não adicionados de sais de cura, com concentrações variando, respectivamente, entre 7,80 a 25,24 mg/kg e 8,74 a 32,27 mg/kg.

Os resultados obtidos permitiram excluir a presença de concentrações quantificáveis de nitrito de sódio nas carnes das três espécies de açogue avaliadas (suína, bovina e frango) e em produtos formulados à base dos mesmos tipos de carne ($C < LQ = 5 \text{ mg/kg}$).

Não foi observada associação entre os resultados das análises de carne em natureza das três espécies avaliadas e produtos derivados.

Embora até o momento não haja uma definição legal para o conceito de “rótulo limpo”, produtos sem adição intencional de nitrato e nitrito de sódio/potássio e que, portanto, poderiam ser enquadrados nesse conceito (como considerado nesse trabalho), podem apresentar concentrações quantificáveis de nitrato de sódio (traços). Tal fato pode estar associado ao caráter intrínseco do nitrato de sódio em ingredientes utilizados na elaboração de produtos cárneos, como as carnes em natureza, sal, água e vegetais. À medida que aumenta a quantidade de ingredientes adicionados aos produtos cárneos, aumenta a possibilidade de “contaminação” e, por conseguinte, de quantificação de nitrato de sódio nesses produtos. Dessa forma, a presença de nitrato de sódio nos produtos cárneos necessita ser interpretada com cautela, sob risco desses produtos serem caracterizados como adulterados de forma equivocada.

REFERÊNCIAS

- ABOU-DONIA, M.; SALAMA, M. Food Additives. *In*: _____. **Mammalian Toxicology**. Chichester: John Wiley & Sons, 2015. p. 269-287. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118683484>>. Acesso em: 19 out. 2019.
- ASIOLI, D. *et al.* Making sense of the “clean label” trends: A review of consumer food choice behavior and discussion of industry implications. **Food Research International**, Burlington, v. 99 (part. 1), p. 58-71, set. 2017.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, Method 933.03. 18. ed. Washington: AOAC International, 2005.
- AUSTRALIAN GOVERNMENT. **Australia New Zealand Food Standards Code**, Schedule 15, Substances that may be used as food additives. abr. 2017. Disponível em: <<https://www.legislation.gov.au/Details/F2015L00439>>. Acesso em: 01 maio 2018.
- BAHADORAN, Z. *et al.* Nitrate and nitrite content of vegetables, fruits, grains, legumes, dairy products, meats and processed meats. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 51, p. 93-105, ago. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0889157516300795>>. Acesso em: 15 abr. 2018.
- BEDALE, W. *et al.* Dietary nitrate and nitrite: Benefits, risks, and evolving perceptions. **Meat Science**, Barking, v. 120, p. 85-92, mar. 2016.
- BLOUNT, B. C. *et al.* Perchlorate, Nitrate, Thiocyanate, and Iodide Levels in Chicken Feed, Water, and Eggs from Three Farms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 22, p. 10709 – 10705, 2008. Disponível em: <<https://pubs-acsc-org.ez45.periodicos.capes.gov.br/doi/abs/10.1021/jf8018326>>. Acesso em: 24 maio 2020.
- BOUVARD, V. *et al.* Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. **Lancet Oncology**, London, v. 16, n. 16, p. 1599-1600, dez. 2015.
- BRASIL. **Guia alimentar para a população brasileira** 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 156 p. Disponível em: <https://bvsmis.saude.gov.br/bvsmis/publicacoes/guia_alimentar_populacao_brasileira_2ed.pdf>. Acesso em: 22 out. 2019.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 34, de 13 de janeiro de 1998. Aprova o regulamento técnico referente a Alimentos de Transição para Lactentes e Crianças de Primeira Infância, constante do anexo desta Portaria. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 16 jan. 1998. Seção 1, p. 6.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 272, de 14 de março de 2019. Estabelece os aditivos alimentares autorizados

para uso em carnes e produtos cárneos. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 18 mar. 2019a. Seção 1, p. 194. Disponível em: <www.jusbrasil.com.br/diarios/232830970/dou-secao-1-18-03-2019-pg-194>. Acesso em: 28 jul. 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Gabinete do Ministro. Instrução Normativa nº 22, de 24 de novembro de 2005. Aprova o regulamento técnico para rotulagem de produto de origem animal embalado. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 25 nov. 2005. Seção 1, p. 15.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Norma Interna nº 02/DIPOA/SDA** de 28 de janeiro de 2016 - Nomenclaturas e Categorias de Produtos de Origem Animal. Brasília: Ministério da Agricultura, 2016a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Memorando-Circular nº 478/2016/DHC/CGI-DIPOA/DIPOA/SDA/GM/MAPA**. Conceitos das Categorias de Produtos de Origem Animal. Brasília: Ministério da Agricultura, 2016b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Brasília: Ministério da Agricultura, 2017. 77 p. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animais/arquivos/decreto-n-9013-2017_alt-decreto-9069-2017_pt.pdf/view>. Acesso em: 17 nov. 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal**, 2. ed. Brasília: MAPA, 2019b. 158 p. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/laboratorios/legislacoes-e-metodos/arquivos-metodos-da-area-poa-iqa/ManualdeMtodosOficiaisparaAnliseAlimentosdeOrigemAnimal2ed.pdf>>. Acesso em: 01 fev. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). **Botulismo - casos confirmados notificados no sistema de informação de agravos de notificação – Brasil**. Disponível em: <<https://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/botubr.def>>. Acesso em: 02 nov. 2020.

BROSSARD, D.; SCHEUFELE, D. A. Science, New Media, and the public. [editorial material]. **Science**, v. 339, n. 6115, p. 40–41, jan. 2013. Disponível em: <<https://science.sciencemag.org.ez45.periodicos.capes.gov.br/content/sci/339/6115/40.full.pdf>>. Acesso em: 05 ago. 2020.

BRUNING-FANN, C. S.; KANEENE, J. B. The effects of nitrate, nitrite, and N-nitroso compounds on animal health. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 35, n. 3, p. 237-253, jul. 1993. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/148471011_The_effects_of_nitrate_nitrite_and_N-nitroso_compounds_on_animal_health>. Acesso em: 04 ago. 2020.

BUTLER, A. Nitrites and nitrates in the human diet: carcinogens or beneficial hypotensive agents? **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 167, p. 105-107, jun. 2015.

CHUNG, S. Y. *et al.* Survey of nitrate and nitrite contents of vegetables grown in Korea. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 20, n. 7, p. 621-628, jul. 2003.

CHUNG, S. W. C. *et al.* Nitrate and nitrite levels in commonly consumed vegetables in Hong Kong. **Food Additives and Contaminants: Part B**, v. 4, n. 1, p. 34-41, mar. 2011. Disponível em: <<http://web-a-ebshost.ez45.periodicos.capes.gov.br/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=1&sid=7dca5fee-fd00-48f4-9472-cc1cf95b3760%40sessionmgr4008>>. Acesso em: 12 jul. 2020.

CHAN, D. S. M. *et al.* Red and Processed Meat and Colorectal Cancer Incidence: Meta-Analysis of Prospective Studies. **Plos One**, California, v. 6, n. 6, p. 1-11, jun. 2011. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0020456>. Acesso em: 05 out. 2019.

CHOI, Y. *et al.* Vegetable Intake, but Not Fruit Intake, Is Associated with a Reduction in the Risk of Cancer Incidence and Mortality in Middle-Aged Korean Men. **The Journal of Nutrition**, v. 145, n. 6, p. 1249-1255, jun. 2015. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jn/article/145/6/1249/4644429>>. Acesso em: 20 out. 2019.

CORREIA, M. *et al.* Contribution of different vegetable types to exogenous nitrate and nitrite exposure. **Food Chemistry**, Pavia, v. 120, p. 960-966, jun. 2010.

DEL VICARIO, M. *et al.* The spreading of misinformation online. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**, Washington (DC), v. 113, n. 3, p. 554-559, jan. 2016. Disponível em: <<https://www.pnas.org/content/113/3/554>>. Acesso em: 06 jul. 2018.

DELLA BETTA, F. *et al.* Development and validation of a sub-minute capillary zone electrophoresis method for determination of nitrate and nitrite in babyfoods. **Talanta**, Amsterdam, v. 122, p. 23-29, maio 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914014000083>>. Acesso em: 12 abr. 2020.

DELLA BETTA, F. *et al.* A sub-minute CZE method to determine nitrate and nitrite in meat products: An alternative for routine analysis. **Meat Science**, Barking, v. 119, p. 62-68, jan. 2016.

DELLA BETTA, F. **Desenvolvimento e validação de métodos rápidos por eletroforese capilar aplicados à análise de produtos cárneos e cerveja**. 2017. 177 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

DJEKOUN-BENSOLTANE, S. *et al.* Nitrate and nitrite concentrations in rabbit saliva: Comparison with rat saliva. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 23, n. 1, p. 132-134, Jan. 2007. Disponível em: <[http://www.periodicos-capes.gov-br/ez45.periodicos.capes.gov.br/index.php?option=com_pmetabusca&mn=88&smn=88&type=m&metalib=aHR0cHM6Ly9ybnAtcHJpbW8uaG9zdGVkLmV4bGlicmlzZ3JvdXAuY29tL3ByaW1vX2xpYnJhcnkvbGlid2ViL2FjdGlvi9zZWYyZGUZG8/dmlkPUNBUEVTX1Yx&Itemid=124](http://www.periodicos-capes.gov.br/ez45.periodicos.capes.gov.br/index.php?option=com_pmetabusca&mn=88&smn=88&type=m&metalib=aHR0cHM6Ly9ybnAtcHJpbW8uaG9zdGVkLmV4bGlicmlzZ3JvdXAuY29tL3ByaW1vX2xpYnJhcnkvbGlid2ViL2FjdGlvi9zZWYyZGUZG8/dmlkPUNBUEVTX1Yx&Itemid=124)>. Acesso em: 07 ago. 2020.

DOROSHOW, D. M. S. An Alternative History of Hyperactivity: Food Additives and the Feingold Diet. **Social History of Medicine**, v. 25, n. 4, out. 2012. Disponível em: <<https://academic-oup-com.ez45.periodicos.capes.gov.br/shm/article/25/4/884/1668243>>. Acesso em: 07 jun. 2020

DREWNOSKI, M.E. *et al.* **Nitrates in livestock feeding**. Neb Guide. Nebraska: University of Nebraska. 2019. Disponível em: <<http://extensionpublications.unl.edu/assets/pdf/g1779.pdf>>. Acesso em: 07 jun. 2020.

EDWARDS, A. **Natural and clean label trends 2013**. [Crawley], 2013. Disponível em: <<https://www.foodnavigator.com/Events/Natural-Clean-Label-Trends-2013>>. Acesso em: 21 abr. 2018.

ELEFTHERIADOU, A. *et al.* Effect of nitrate and nitrite content in water and feed on their presence in the muscle tissue of fattening pigs. **Archiv Fur Lebensmittelhygiene**, Alfeld, v. 56, n. 6, p. 130-133, nov. 2002.

EUROPEAN COMMISSION. European Parliament and Council Directive n° 95/2/EC of 20 February 1995 on food additives other than colours and sweeteners. **Official Journal of the European Communities**, l. 061, v. 38, p. 1-40, mar. 1995. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=OJ:L:1995:061:TOC>. Acesso em: 04 ago. 2020.

EUROPEAN COMMISSION. Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed. **Official Journal of European Communities**, v. 140, 30 may 2002, p. 10 – 22. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32002L0032>>. Acesso em: 04 ago. 2020.

EUROPEAN COMMISSION. **Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on Undesirable Substances in Feed (SCAN)**, 2003, 87 p. Disponível em: <https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/animal-feed_additives_rules_scan-old_report_out126_bis.pdf>. Acesso em: 07 jun. 2020.

EUROPEAN COMMISSION. Regulamento (CE) N.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004 que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal. **Official Journal of European Communities**, l. 139, p. 55 – 205, abr. 2004. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1596713905523&uri=CELEX:32004R0853>>. Acesso em: 03 nov. 2011.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation (EC) n° 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of European Communities**, l. 364, v. 49, p. 5-24, dez. 2006. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=OJ:L:2006:364:FULL&from=EN>>. Acesso em: 04 abr. 2020.

EUROPEAN COMMISSION. Regulamento (UE) n° 1129/2011 da Comissão de 11 de novembro de 2011, que altera o anexo II do Regulamento (CE) n.o 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho mediante o estabelecimento de uma lista da União

de aditivos alimentares. **Official Journal of European Communities**, l. 295, nov. 2011, 177 p. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=OJ:L:2011:295:FULL&from=PT>>. Acesso em: 04 ago. 2020.

EUROPEAN COMMISSION. Summary Report of the Standing Committee on Plants, Animals, Food and Feed Held in Brussels on 17 september 2018. **Health and Food Safety Directorate General**, n. 5591112, 2018. Disponível em: <https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/reg-com_toxic_20180917_sum.pdf>. Acesso em: 04 ago. 2020.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Nitrate in vegetables - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain. **The EFSA Journal**, v. 6, 2008, 79 p. Disponível em: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2008.689> Acesso em 07 jun. 2020.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Nitrite as undesirable substances in animal feed - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain (Question N° EFSA-Q-2005-287). **The EFSA Journal**, v. 7, n. 4, 2009, 47 p. Disponível em:< <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/toc/18314732/2009/7/4>>. Acesso em: 03 ago. 2020.

FERGUNSON, L. R. Meat and cancer. **Meat Science**, Barking, v. 84, n. 2, p. 308–313, June 2010. Disponível em: <<http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.06.032>>. Acesso em: 24 jun. 2018.

FIDDLER W. *et al.* Inhibition of formation of volatile nitrosamines in fried bacon by the use of cure-solubilized α -tocopherol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 653–656, maio 1978. Disponível em: <https://pubs-acsc-org.ez45.periodicos.capes.gov.br/doi/abs/10.1021/jf60217a046>. Acesso em: 24 jul. 2020.

GEORGE, S. M. *et al.* Fruit and vegetable intake and risk of cancer: a prospective cohort study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 89, n. 1, jan. 2009. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ajcn/article/89/1/347/4598261>>. Acesso em: 20 out. 2019.

GREER, F. R.; SHANNON, M. Infant Methemoglobinemia: The Role of Dietary Nitrate in Food and Water. **Pediatrics**, v. 116, n. 3, 784-786, set. 2005. Disponível em: <<https://pediatrics-aappublications-org.ez45.periodicos.capes.gov.br/content/pediatrics/116/3/784.full.pdf>>. Acesso em: 04 ago. 2020.

GOMEZ, R. F. *et al.* Heterotrophic nitrification by intestinal microorganisms. **Cancer**, Washington (DC), v. 45, p. 1066-1067, 1980. Acesso em: 24 maio 2020.

HONIKEL, K.O. Chemical Analysis for Specific Components - Curing Agents. *In*: DEVINE, C.; DIKEMAN, M.; JENSEN, W. **Encyclopedia of Meat Sciences**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2004. v. 1, p. 200-205. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=srgvtq14f1AC&pg=PT334&dq=Chemical+Analysis+for+Specific+Components&hl=pt-BR&sa=X&ved=2ahUKEwivnqS1yobrA>>

hV9F7kGHfA8C4EQ6AEwAHoECAQQAg#v=onpage&q=Chemical%20Analysis%20for%20Specific%20Components&f=false>. Acesso em: 13 ago. 2019.

HONIKEL, K. O. The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. **Meat Science**, Barking, v. 78, n. 1–2, p. 68–76, Jan. 2008.

HONIKEL, K.; PEGG, R. B. O. Principles of curing. *In*: TOLDRA, F. (ed.). **Handbook of fermented meat and poultry**. 2. ed. Hoboken: Wiley Blackwell, 2015. p. 19-30.

HORD, N. G. *et al.* Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. **The American Journal Clinical Nutrition**, v. 90, p. 1–10, 2009.

HSU, J. *et al.* Nitrate and nitrite quantification from cured meat and vegetables and their estimated dietary intake in Australians. **Food Chemistry**, Oxford, v. 115, p. 334-339, Nov. 2009.

HMELJAK, G. A.; CENCIC, A. Nitrate in vegetables and their impact on human health: a review. **Acta Alimentaria**, Budapeste, v. 42, p. 158-172, 2013. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/242513977_Nitrate_in_vegetables_and_their_impact_on_human_health_A_review>. Acesso em: 03 ago. 2020.

IACUMIN, L. *et al.* Natural levels of nitrites and nitrates in San Danielle dry cured ham PDO, and in meat, sugna, salt used for its production. **Food Control**, Bethesda, v. 100, p. 257-261, jul. 2019.

IAMMARINO, M.; DI TARANTO, A. Nitrite and nitrate in fresh meats: a contribution to the estimation of admissible maximum limits to introduce in directive 95/2/EU. **International Journal of Food Science and Technology**, London, v. 47, p. 1852-1858, June 2012.

INTERNATIONAL AGENCY ON RESEARCH OF CANCER (IARC). IARC Monographs evaluate consumption of red meat and processed meat. **Press release WHO**, n. 240, p. 1-2, 2015. Disponível em: <https://www.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/07/pr240_E.pdf>. Acesso em: 12 maio 2019.

INGREDION. **The clean label guide in Europe**. Chicago: Ingredion, 2014. Disponível em: <<https://emea.ingredion.com/content/dam/ingredion/pdf-downloads/emea/87%20-%20The%20Clean%20Label%20Guide%20to%20Europe%20from%20Ingredion.pdf>>. Acesso em: 12 maio 2019.

INTERNATIONAL FOOD INFORMATION COUNCIL FOUNDATION. **Food and Health Survey 2015**. Disponível em: <<https://foodinsight.org/wp-content/uploads/2015/05/2015-Food-And-Health-Survey-Executive-Summary-Final.pdf>>. Acesso em: 22 out. 2019.

INTERNATIONAL STANDARDIZATION ORGANIZATION (ISO). **Meat and meat products — Determination of nitrate content (Reference method) – ISO 3091-1975**. 1. ed. Switserland: ISO, 1975a. 7 p. Disponível em: <<http://www.eac->

quality.net/fileadmin/eac_quality/user_documents/3_pdf/CD-K-726-2010__Meat_and_meat_products_-_Nitrate_content.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2019.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **Meat and meat products - Determination of nitrite content (Reference method) – ISO 2918 - 1975**. 1. ed. Switerland: ISO, 1975b. 5 p. Disponível em: < http://www.eac-quality.net/fileadmin/eac_quality/user_documents/3_pdf/CD-K-725-2010__Meat_and_meat_products_-_Nitrite_content.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2019.

KEETON, J. T. History of Nitrite and Nitrate in Food. 2. ed. *In*: BRYAN, N. S.; LOSCALZO, J. (eds.). **Nitrite and Nitrate in Human Health and Disease. Nutrition and Health**. 2. ed. Humana Press: Cham, 2017. p. 85-96.

KELLEY, J. R.; DUGGAN, J. M. Gastric cancer epidemiology and risks factors. **Journal of Clinical Epidemiology**, Oxford, v. 56, p. 1-9, jan. 2003. Disponível em: <<https://www-sciencedirect.ez45.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0895435602005346?via%3Dihub>>. Acesso em: 30 jul. 2020.

KEY, T. J. Fruit and vegetables and cancer risk. **British Journal of Cancer**, Londres, v. 104, p. 6-11, jan. 2011. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/6606032>>. Acesso em: 19 out. 2019.

KIM, E. *et al.* Review of the association between meat consumption and risk of colorectal câncer. **Nutrition Research**, Oxford, v. 33, n. 3, p. 983-994, dez. 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0271531713001826?via%3Dihub>>. Acesso em: 06 out. 2019.

KREUTZ, D. H. *et al.* Avaliação das concentrações de nitrato e nitrito em hortaliças produzidas em cultivos convencional e orgânico na região do Vale do Taquari – RS. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 14, n. 2, p. 105-110, abr. 2012.

LANDERS, J. P. **Handbook of capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques**, 3. ed. New York: CRC Press, 2008.

LEISTNER, L. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 55, n. 1-3, p. 181-186, abr. 2000. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez45.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0168160500001616?via%3Dihub>. Acesso em: 02 nov. 2020.

MOHINI, M. *et al.* Effects of Nitrate Supplementation on Nutrition, Performance and Methane Mitigation in Ruminants- A Review. **International Journal of Livestock Research**, Noida, v. 7, n. 9, p. 19-29, set. 2017. Disponível em: <<http://ijlr.org/issue/effects-nitrate-supplementation-nutrition-performance-methane-mitigation-ruminants-review/?key=download>>. Acesso em: 07 ago. 2020.

MORENO, B. *et al.* El consumo de nitrato y su potencial efecto benéfico sobre la salud cardiovascular. **Revista Chilena de Nutrición**, Santiago, v. 42, n. 2, p. 199-205, jun. 2015.

NICHOLSON, S. S. Nitrate and nitrite accumulating plants. *In*: GUPTA, R. C. **Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles**. 2. ed. Amsterdam: Academic Press, 2012. p. 1117-1120. Disponível em: <http://eds.a.ebscohost.com/eds/results?vid=2&sid=7a8cb64d-aeab-450d-ab21-f277ea6d7b73%40sessionmgr4008&bquery=Veterinary+Toxicology%3a+Basic+and+Clinical+Principles&bdata=Jmxhbm9cHQYnImdHlwZT0wJnNlYXJjaE1vZGU9QW5kZnNpdGU9ZWRzLWxpdmUmc2NvcGU9c2l0ZQ%3d%3d>. Acesso em: 17 maio 2020.

PEGG, R. B.; BOLLES, J. A. Production Procedures. *In*: DEVINE, K.; DIKEMAN, M. **Encyclopedia of Meat Sciences**. 2. ed. Amsterdam: Academic Press, 2014. v. 1, 1500 p.

POLLAN, M. **In defense of food: an eater's manifesto**. New York: Penguin Press, 2008. 260 p.

RAMOS, L. A. *et al.* Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 5, p. 1114-1120, jan. 2006. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Carla_Schmitt_Cavalheiro/publication/26441324_Determinacao_de_nitrito_em_aguas_utilizando_extrato_de_flores/links/02e7e525f38961defe000000/Determinacao-de-nitrito-em-aguas-utilizando-extrato-de-flores.pdf. Acesso em: 10 nov. 2019.

REINIK, M. *et al.* Naturally Occurring Nitrates and nitrites in Foods. *In*: GILBERT, G.; SENYUVA, H. Z. (eds.). **Bioactive compounds in foods**, Oxford: Blackwell Publishing Ltd., 2008. p. 225-253.

SACCANI, G.; TANZI, E. Determination of nitrite, nitrate and glucose 6-phosphate in muscle tissues and cured meat by IC/MS. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 89, n. 3, p. 712-719, maio 2006.

SANTAMARIA, P. *et al.* A survey of nitrate and oxalate content in fresh vegetables. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 13, p. 1882-1888, out. 1999. Disponível em: <https://onlinelibrary-wiley.ez45.periodicos.capes.gov.br/doi/abs/10.1002/%28SICI%291097-0010%28199910%2979%3A13%3C1882%3A%3AAID-JSFA450%3E3.0.CO%3B2-D>. Acesso em: 03 ago. 2020.

SANTAMARIA, P. Nitrate in vegetables: Toxicity, content, intake and EC regulation (review). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 86, p. 10-17, nov. 2006.

SCHUDDEBOOM, L. J. **Nitrates and Nitrites in Foodstuffs**. Strasbourg: Council of Europe Press, Publishing and Documentation Service, 1993. 125 p.

SEBRANEK, J. G.; BACUS, J. N. Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues? **Meat Science**, v. 77, p. 136 – 147, mar. 2007. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez45.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0309174007001209?via%3Dihub>. Acesso em: 12 ago. 2019.

SEBRANEK, J. G. *et al.* Beyond celery and starter culture: Advances in natural/organic curing processes in the United States (Review). **Meat Science**, Barking, v. 92, p. 267-273, nov. 2012.

SEN, N. P. *et al.* Formation of N-Nitrosamines from Secondary Amines and Nitrite in Human and Animal Gastric Juice. **Food and Cosmetic Toxicology**, Great Britain, v. 7, p. 301-307, 1969.

SHAPIRO, R. L.; HATHEWAY, C.; SWERDLOW, D. L. Botulism in the United States: A clinical and epidemiologic review. [review]. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 129, n. 3, p. 221-228, ago. 1998. Disponível em: <<http://link.ez45.periodicos.capes.gov.br/>>. Acesso em: 06 jul. 2018.

SINDELAR, J. J.; MILKOWSKI, A. Sodium Nitrite in Processed Meat and Poultry Meats: A Review of Curing and Examining the Risk/Benefit of Its Use. **ANSA White Paper Series**, Champaign, n. 3, p. 1-15, nov. 2011.

SINDELAR, J. J.; MILKOWSKI, A. Human safety controversies surrounding nitrate and nitrite in the diet. **Nitric Oxide**, San Diego, v. 26, p. 259-266, mar. 2012. Disponível em: <<https://www-sciencedirect.ez45.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S1089860312000547?via%3Dihub>>. Acesso em: 15 abr. 2018.

SINGH, P. *et al.* A review on spectroscopic methods for determination of nitrite and nitrate in environmental samples. **Talanta**, Amsterdam, v. 191, p. 364-381, 2019. Disponível em: <<https://www-sciencedirect.ez45.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0039914018308397?via%3Dihub>>. Acesso: 13 nov. 2018.

SPUDEIT, D. A. *et al.* Conceitos básicos em Eletroforese Capilar. **Scientia Chromatographica**, São Carlos, v. 4, n. 4, p. 287-297, 2012. Disponível em: <<http://www.iicweb.org/scientiachromatographica.com/files/v4n4a05.pdf>>. Acesso em: 02 jul. 2018.

STEFANI, E. *et al.* Processed meat consumption and risk of cancer: a multisite case-control study in Uruguay. **British Journal of Cancer**, Londres, v. 107, p. 1584-1588, out. 2012. Disponível em: <<http://link.ez45.periodicos.capes.gov.br/>>. Acesso em: 06 out. 2019.

TAGLIARO F. *et al.* A brief introduction to capillary electrophoresis. **Forensic Science International**, Clare, v. 92, n. 2-3, p. 75-88, apr. 1998. Disponível em: <<https://www-sciencedirect.ez45.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0379073898000103?via%3Dihub>>. Acesso em: 05 ago. 2020.

TAMME, T. *et al.* Nitrates and nitrites in vegetables and vegetable-based products and their intakes by the Estonian population. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 23, p. 355-361, abr. 2006.

TANNENBAUM, S. R. *et al.* Nitrite and nitrate are formed by endogenous synthesis in the human intestine. **Science**, Washington (DC), v. 200, n. 4349, p. 1487-1489, 1978. Acesso em: 24 maio 2020.

TAORMINA, J. Meat and Poultry: Curing of Meat. *In*: BATT, C. A., TORTORELLO, M. L. (Eds.). **Encyclopedia of Food Microbiology**, 2. ed. Amsterdam: Elsevier Ltd, Academic Press, 2014. v. 2, p. 501-507. Disponível em: <<https://books.google.com.br/>>. Acesso em: 13 ago. 2019.

TAVARES, M. F. M. **Eletrforese capilar: conceitos básicos**. Campinas: Química Nova, v. 9, p. 173-181, 1996.

THURSFIELD, M. **Veterinary epidemiology**. 3.ed. Oxford: Blackwell Science, 2005. 610 p.

TSIKAS, D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the l-arginine/nitric oxide area of research. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 851, n. 1-2, p. 51-70, maio 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.ez45.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S1570023206006398?via%3Dihub>>. Acesso em: 24 nov. 2019.

UNDERSANDER, D. *et al.* Nitrate Poisoning in Cattle Sheep and Goats. Wisconsin: University of Wisconsin, 2007. Disponível em: <<https://fyi.extension.wisc.edu/forage/files/2016/09/NITRATE-revised.pdf>>. Acesso em: 07 jun. 2020.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Code of Federal Regulations**, title 21, v. 3, sec. 170.60, abr. 2019. Disponível em: <<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=172.175>>. Acesso em: 04 ago. 2020.

U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Code of Federal Regulations (Annual Edition)**, title 9, chapter 3, ago. 2020. Disponível em: <https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=58e657d97a269072a7fcd73cbb3bb08b&mc=true&tpl=/ecfrbrowse/Title09/9cfrv2_02.tpl#0>. Acesso em: 04 ago. 2020.

VIERHILE, T. **Clean label focus: what are consumers saying and what is the industry doing**. 2016. Disponível em: <<https://www.globalfoodforums.com/wp-content/uploads/2016/03/Clean-Label-Focus-What-are-Consumers-Saying-and-What-is-the-Industry-Doing-Speaker-Tom-Vierhile-Canadean.pdf>>. Acesso em: 10 nov 2018.

WALTERS, C. L. Nitrate and nitrite in foods. *In*: HILL, M. J. (ed). **Nitrates and nitrites in food and water**. 2. ed., Cambridge: Woodhead Publishing, 1996, p. 93-112.

WANG, Q. H. *et al.* Methods for the detection and determination of nitrite and nitrate: a review. **Talanta**, Amsterdam, v. 165, p. 709-720, abr. 2017.

WEISBURGER, J. H. The 37 year history of the Delaney Clause. **Experimental and Toxicologic Pathology**, Jena, v. 48, n. 2/3, p. 183-188, fev. 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Evaluation of certain food additives: fifth-ninth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee of Food Additives. **WHO Technical Report Series**. Geneva: WHO Library, 2002, 153p. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42601/WHO_TRS_913.pdf;jsessionid=973085BCB7A308310BBBE825084FFDCC?sequence=1>. Acesso em: 04 abr 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WHO guidelines for drinking-water quality**. 4. ed. Geneva: WHO Library, 2011.

WRIGHT, M. J.; DAVIDSON, K. L. Nitrate accumulation in crops and nitrate poisoning in animals. **Advances in Agronomy**, Ithaca, v. 16, p. 197-247, 1964.

ZHOU, Z. Y.; WANG, M. J.; WANG, J. S. Nitrate and nitrite contamination in vegetables in China. **Food Reviews International**, Philadelphia, v. 16, n. 1, p. 61-76, set. 2000. Disponível em: <<http://web-b-ebshost.ez45.periodicos.capes.gov.br>>. Acesso em: 07 jul. 2018.