

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS ALIMENTOS**

**EFEITO DA CARNOSINA NO CONTROLE
DA FORMAÇÃO DE N-NITROSAMINAS EM
PRODUTOS CÁRNEOS CURADOS**

TESE DE DOUTORADO

Marina Bergoli Scheeren

Santa Maria, RS, Brasil

2016

**EFEITO DA CARNOSINA NO CONTROLE
DA FORMAÇÃO DE N-NITROSAMINAS
EM PRODUTOS CÁRNEOS CURADOS**

Marina Bergoli Scheeren

Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de concentração em Ciência e Tecnologia de Carnes e Derivados, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutora em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Nelcindo Nascimento Terra
Coorientadores: Prof. Dr. Ernesto Hashime Kubota
Dr. Claude Gariépy

Santa Maria, RS, Brasil

2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bergoli Scheeren, Marina
EFEITO DA CARNOSINA NO CONTROLE DA FORMAÇÃO DE N-
NITROSAMINAS EM PRODUTOS CÁRNEOS CURADOS / Marina
Bergoli Scheeren.-2016.
94 f. ; 30cm

Orientador: Nelcindo Nascimento Terra
Coorientadores: Ernesto Hashime Kubota, Claude Gariépy
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS,
2016

1. N-nitrosaminas 2. Carnosina 3. Eritorbato de sódio
4. Produtos cárneos curados I. Nascimento Terra,
Nelcindo II. Hashime Kubota, Ernesto III. Gariépy,
Claude IV. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos
alimentos**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Tese de Doutorado

**EFEITO DA CARNOSINA NO CONTROLE
DA FORMAÇÃO DE N-NITROSAMINAS
EM PRODUTOS CÁRNEOS CURADOS**

elaborada por
Marina Bergoli Scheeren

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutora em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

COMISSAO EXAMINADORA:

Dr. Nelcindo Nascimento Terra
(Presidente/Orientador)

Dr. Ernesto Hashime Kubota (Co-orientador, UFSM)

Dr^a. Mari Silvia Rodrigues de Oliveira (UFSM)

Dr. Paulo Cezar Bastianello Campagnol (UFSM)

Dr. Roger Wagner (UFSM)

Dr^a. Maristela Cortez Sawitzki (UNIPAMPA)

Santa Maria, 22 de fevereiro de 2016.

*Dedico este trabalho os meus pais,
Marilene e Darcísio,
pelo esforço, compreensão, apoio, incentivo e amor incondicional
que me deram forças para superar as dificuldades
e chegar até aqui.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela proteção, por não ter me abandonando nos momentos mais difíceis e por ter me dado uma segunda chance de vida, fazendo com que eu percebesse o quanto a vida é frágil, quem e o que realmente é importante.

Aos meus pais, Marilene e Darcísio, agradeço pelo amor incondicional e pelos exemplos que contribuíram para que eu me tornasse quem sou. Também os agradeço por terem me incentivado a alcançar o meu objetivo, me apoiando nos momentos mais difíceis mesmo tendo que suportar a dor da distância para que eu pudesse realizar este sonho.

Aos meus avós, Antônia e Anélio (em memória), e ao meu padrinho Alencar, sou grata por terem sido meus segundos pais, pelo tempo, amor e carinho que dedicaram a mim, sendo pessoas fundamentais para a formação do meu caráter.

Ao Professor Nelcindo, o meu mais sincero agradecimento pela orientação, pelo exemplo de dedicação e perseverança e pelas orações que sem dúvidas me serviram de coragem e incentivo para que eu não desistisse.

Ao Professor Ernesto, o meu muito obrigada pela co-orientação, pelas palavras de apoio e sugestões de grande valia para o trabalho. Agradeço também ao meu co-orientador canadense, Claude Gariépy, pelas importantes considerações científicas, pelo aprendizado e por não medir esforços para disponibilizar tudo que fosse necessário para que o projeto fosse realizado da melhor maneira possível considerando os imprevistos e o curto tempo.

Aos membros da comissão organizadora, agradeço pelo interesse e disponibilidade para fazer parte da banca e pelas importantes contribuições para o trabalho.

Aos colegas e amigos do PPGCTA-UFSM, em especial à Professora Neidi e ao Professor Cristiano, sou grata pela atenção que sempre tiveram comigo. À Ana e ao Felipe por estarem sempre à disposição para me ajudar a resolver os imprevistos no Brasil.

A todos os amigos canadenses, por dividirem comigo bons e maus momentos, contribuindo para que minha experiência internacional não fosse enriquecedora apenas do ponto de vista profissional, mas também cultural e, principalmente, humano. Aos colegas da Université Laval, pela amizade e parceria.

Aos colegas do CRDA pela agradável convivência, fazendo com que eu tivesse ainda mais vontade de levantar da cama para trabalhar todos os dias. Aos amigos Hassan e Dénis, pela amizade e por tornarem meus dias mais divertidos. Aos colegas de equipe Simon, Lisyanne e Claude, por todo o auxílio técnico e pelo prazer de trabalhar realmente como um time. Aos amigos estagiários, em especial à Kelly e ao Phillippe pelos momentos de descontração. Aos meus estagiários Naoufal e Mengxi, pela amizade, diversão e pelo muito que me ensinaram sobre gerar uma equipe. Aos amigos Tania, Lise e Rejean, agradeço por terem me acolhido tão bem, pela amizade e por me adotar como parte das suas famílias.

Em lugar de destaque, quero agradecer aqueles que eu considero anjos em minha vida:

- À Paula, por ser essa amiga tão dedicada, por estar sempre presente, por todas as palavras de incentivo e força e pela ajuda na finalização da tese.

- À Mariana, pela forte ligação (sigma) de amizade que teve início no vestibular e se fortaleceu nos tempos da faculdade e também por ter me dado a alegria de ter ido me visitar no Canadá.

- À Bettah, por me entender como ninguém mais entende e por ser essa pessoa verdadeira e sem preconceitos, sempre pronta pra ajudar os outros, a qual eu me identifico tanto.

- Ao Carlos, pela grande amizade e pelas altas aventuras na neve.

- Ao Alan, pela amizade verdadeira, pelo presente “super padre” e por ter compartilhado comigo momentos tão importantes da minha vida. Também ao seu irmão gêmeo, Paco, e a sua família que me acolheu tão bem, fazendo com que sua casa fosse minha casa.

Enfim, agradeço a todos aqueles que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho e para meu desenvolvimento profissional e pessoal no decorrer de todos estes anos de estudos.

Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito.

Não sou o que deveria ser,
mas Graças a Deus,
não sou o que era antes.

(Marthin Luther King)

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos
Universidade Federal de Santa Maria

EFEITO DA CARNOSINA NO CONTROLE DA FORMAÇÃO DE N-NITROSAMINAS EM PRODUTOS CÁRNEOS CURADOS

AUTORA: MARINA BERGOLI SCHEEREN
ORIENTADOR: NELCINDO NASCIMENTO TERRA
COORIENTADORES: ERNESTO HASHIME KUBOTA
CLAUDE GARIÉPY

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 22 de fevereiro de 2016.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da adição da carnosina (4,5 g/kg) no controle da formação de *N*-nitrosaminas em produtos cárneos curados, comparado com o eritorbato de sódio (0,5 g/kg) e com a combinação de ambos. Primeiramente foi desenvolvido e validado um método analítico alternativo baseado na análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas com ionização química (modo positivo) utilizando metanol como reagente para medir quantidades traço de nove *N*-nitrosaminas voláteis em diferentes tipos de produtos cárneos curados. Em seguida, a quantificação de *N*-nitrosaminas foi conduzida em dois sistemas modelo desenvolvidos neste estudo: o primeiro foi realizado em solução tampão com um pH 5,6 (pH médio da carne suína); o segundo foi conduzido em matriz cárnea e algumas propriedades tecnológicas dos produtos também foram avaliadas. A adição isolada de carnosina ou combinada com o eritorbato de sódio promoveu um aumento de cerca de 0,2 unidades os valores de pH das amostras cárneas, enquanto a adição do eritorbato de sódio sozinho não apresentou nenhuma diferença em relação ao controle (sem adição de antioxidantes). Nos tratamentos onde a carnosina foi adicionada, maiores valores de retenção de água durante o cozimento indicam com clareza o efeito do pH nestes resultados, bem como uma redução nos valores da cor objetiva (parâmetros L^* e b^*) pode estar relacionada ao aumento da retenção de água e, conseqüentemente, dos pigmentos que são hidrossolúveis. A atividade antioxidante também foi avaliada e indicou que capacidade antioxidante do eritorbato de sódio (77,78-78,75%) foi maior que a da carnosina (0,00-53,60%). No sistema modelo em solução de pH 5,6, ambos os antioxidantes foram eficientes na inibição da formação de *N*-nitrosaminas, porém, quando o processamento térmico foi aplicado, o eritorbato promoveu um efeito de inibição superior, atribuído à sua maior capacidade em reduzir N_2O_3 e NO^+ à NO na presença de oxigênio. Ao contrário, em amostras de carnes curadas cozidas armazenadas por um período de sete dias a uma temperatura de 4 °C na presença de oxigênio, o eritorbato de sódio promoveu um aumento na concentração de *N*-nitrosaminas. Este resultado pode ser atribuído ao fato de o eritorbato promover uma formação inicial maior de NO e ao mesmo tempo, dispor de uma menor concentração durante o período de armazenamento devido a sua utilização nas reações de redução da metamioglobina. Portanto, a diferença entre os resultados obtidos nos diferentes modelos experimentais pode ser explicada pela presença da mioglobina no sistema modelo conduzido em matriz cárnea. A adição da carnosina sozinha ou combinada com o eritorbato foi responsável pela redução da concentração de *N*-nitrosaminas para os níveis iniciais representados pelo controle, indicando que o dipeptídeo natural estudado teve a capacidade de proteger o excesso de formação destes compostos cancerígenos, causado pelo eritorbato.

Palavras-chave: *N*-nitrosaminas, carnosina, eritorbato de sódio, produtos cárneos curados.

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Graduate Program on Food Science and Technology
Federal University of Santa Maria

EFFECT OF CARNOSINE ON THE CONTROL OF N-NITROSAMINES FORMATION IN CURED MEAT PRODUCTS

AUTHOR: MARINA BERGOLI SCHEEREN
ADVISOR: NELCINDO NASCIMENTO TERRA
CO-ADVISORS: ERNESTO HASHIME KUBOTA
CLAUDE GARIÉPY

Place and date of doctoral exam: Santa Maria, February 22nd, 2016.

The objective of this study was to evaluate the effect of the addition of carnosine (4.5 g/kg) on the control of *N*-nitrosamines formation in cured meat products, compared with sodium erythorbate (0.5 g/kg) and the combination of both. First an alternative analytical method for measuring trace amounts of nine volatile *N*-nitrosamines in different types of cured meat products by gas chromatography-chemical ionisation/mass spectrometry (GC-CI/MS) in positive-ion mode using methanol as reagent was successfully developed and validated. Then, *N*-nitrosamines quantification was conducted in two model systems developed in this study: the first was performed in buffer solution at pH 5.6 (meat pH); the second was carried out in meat matrix and some technological properties were evaluated in the products. Carnosine added alone or in combination with sodium erythorbate promoted an increase of about 0.2 units of pH values in meat samples, while adding sodium erythorbate alone showed no differences compared to control (without addition of antioxidants). Higher values of water retention during cooking in treatments where carnosine was added, clearly indicate the effect of pH on these results, as well as a reduction in L^* and b^* color values might be related to an increase on the water retention and hence the water-soluble pigments retention. Antioxidant activities of carnosine and sodium erythorbate were evaluated and the results indicated that antioxidant capacity of sodium erythorbate (77.78 to 78.75%) was superior to that of carnosine (0.00-53.60%). In the curing solution both erythorbate and carnosine had a positive effect on the inhibition of NAs formation and the superior inhibiting effect of erythorbate was explained by its higher ability to reduce N_2O_3 and NO^+ to NO in the presence of oxygen, contributing to its superior effect when heat process was applied. On the contrary, in meat samples stored in the presence of oxygen, sodium erythorbate contributed to an increase in NAs concentration with respect to the control that is likely attributable to its higher initial NO formation and its consumption for metmyoglobin reducing reactions during storage time. Added carnosine brought this increased NAs formation by erythorbate to the level found in the control. The difference in NAs formation between the two models can be explained by the presence of myoglobin in the meat system making a demand on available erythorbate. The combined information from the two systems indicates that carnosine offers an added protection for NAs inhibition in condition of excess formation.

Keywords: *N*-nitrosamines, carnosine, sodium erythorbate, cured meat products.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1 -	Formação de diferentes pigmentos da carne a partir da mioglobina.....	22
FIGURA 2 -	Formação de <i>N</i> -nitrosaminas a partir de diferentes estruturas de aminas precursoras.....	25
FIGURA 3 -	Reação do ascorbato com ácido nitroso.....	30
FIGURA 4 -	Intermediários formados na reação entre o nitrito e ácido ascórbico em carnes curadas.....	30
FIGURA 5 -	Estutura e funções fisiológicas da carnosina.....	33

ARTIGO 1

FIGURA 1 -	Cromatogramas obtidos com GC-Cl/MS: (a) padrão 10 µg/L - modo <i>full-scan</i> (b) padrão 10 µg/L - seleção de massas dos íons (c) amostra de presunto cozido enriquecido com padrão 10 µg/L - seleção de massas dos íons, e (d) amostra de presunto cozido enriquecido - seleção de massas dos íons.....	40
FIGURA 2 -	Esquema e seleção dos parâmetros de extração e da preparação da amostra para a análise.....	42
FIGURA 3 -	Concentração (µg/kg) de <i>N</i> -nitrosaminas voláteis individuais (VNA) em presunto cozido sem evaporação do solvente e depois da evaporação do solvente com nitrogênio.....	43

ARTIGO 2

FIGURA 1 -	Esquema da organização e desenvolvimento do estudo.....	55
FIGURA 2 -	Atividade antioxidante do eritorbato de sódio e da carnosina com e sem NaCl, expressa em termos de % de inibição do radical DPPH.....	65
FIGURA 3 -	Concentração de <i>N</i> -nitrosaminas (µg/L) nos diferentes tratamentos dos sistemas modelo de produtos cárneos curados em solução.....	72
FIGURA 4 -	Concentração de <i>N</i> -nitrosaminas (µg/kg) nos diferentes tratamentos dos sistemas modelo de produtos cárneos curados em matriz cárnea.....	73

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

TABELA 1 - Valores de pKa de diferentes aminas secundárias formadoras de <i>N</i> -nitrosaminas.....	26
--	----

ARTIGO 1

TABELA 1 - Propriedades das <i>N</i> -nitrosaminas e nitroso-aminoácidos encontrados em produtos cárneos.....	37
TABELA 2 - Tempos de retenção e ions selecionados dos picos das <i>N</i> -nitrosaminas voláteis estudadas.....	40
TABELA 3 - Parâmetro de validação do método proposto para a determinação de <i>N</i> -nitrosaminas em presunto cozido.....	41
TABELA 4 - Média da concentração e desvio-padrão ($\mu\text{g}/\text{kg}$) das <i>N</i> -nitrosaminas encontradas em cinco diferentes produtos cárneos.....	43
TABELA 5 - Comparação entre os diferentes métodos recentemente empregados para a determinação de <i>N</i> -nitrosaminas voláteis e o presente método.....	45

ARTIGO 2

TABELA 1 - Concentração total dos ingredientes e uso do processamento térmico em diferentes tratamentos dos sistemas modelo de produtos cárneos curados em solução.....	56
TABELA 2 - Concentração total dos ingredientes e uso do processamento térmico em diferentes tratamentos dos sistemas modelo de produtos cárneos curados em matriz carne.....	57
TABELA 3 - Valores de pH e perdas por cozimento (%) em diferentes tratamentos dos sistemas modelo de produtos cárneos curados em matriz carne.....	66
TABELA 4 - Cor objetiva (L^* , a^* e b^*) em diferentes tratamentos dos sistemas modelo de produtos cárneos curados em matriz carne.....	67

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
1 OBJETIVOS	16
1.1 Objetivo geral.....	16
1.2 Objetivos específicos.....	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 A cura em produtos cárneos.....	17
2.1.1 A cor da carne e o papel do nitrito na alteração da cor de produtos curados.....	19
2.1.2 Ação do nitrito como antioxidante.....	22
2.2 Riscos toxicológicos do nitrito e a formação de <i>N</i> -nitrosaminas.....	24
2.3 Monitoramento e regulação da formação de <i>N</i> -nitrosaminas nos produtos cárneos.....	27
2.4 Controle da formação de <i>N</i> -nitrosaminas em produtos curados.....	29
2.4.1 O papel do ascorbato na redução das <i>N</i> -nitrosaminas.....	29
2.4.2 Alternativas naturais para o problema do nitrito em produtos cárneos.....	31
2.4.2.1 Carnosina.....	33
3 ARTIGOS CIENTÍFICOS	35
3.1 Artigo 1 - Determinação de <i>N</i> -nitrosaminas em carnes processadas por extração líquida seguida de análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas com ionização química com metanol.....	35
3.2 Artigo 2 - Efeito da carnosina na formação de <i>N</i> -nitrosaminas em sistemas modelo de carnes curadas.....	48
DISCUSSÃO	80
CONCLUSÃO	87
SUGESTÕES	88
REFERÊNCIAS	89

INTRODUÇÃO

A cura de carnes com os ingredientes apropriados permite um melhor aproveitamento desta fonte de proteínas através da produção de uma variedade de produtos cárneos com sabores distintos, mais seguros e que podem ser armazenados por um período de tempo maior. Sais de nitrito e nitrato de sódio e potássio são adicionados com cloreto de sódio como conservantes nas misturas de cura em produtos cárneos e têm como finalidade principal inibir o crescimento de microrganismos patogênicos, como o *Clostridium botulinum*, conferir aspectos sensoriais característicos (como sabor e aroma mais agradáveis e coloração vermelha ou rósea atraente) às carnes curadas, além de retardar a oxidação lipídica (TOLDRÁ, 2010; PEGG; SHAIDI, 2000).

Apesar destas vantagens de cura, vários estudos questionam os riscos toxicológicos que o consumo destes produtos representam para a saúde humana devido ao fato de a reação de aminas secundárias com espécies nitrogenadas tais como NO^+ e N_2O_3 (formadas a partir do nitrito residual) conduzir a formação de *N*-nitrosaminas, substâncias que apresentam potencial genotoxicidade (OOSTINDJER et al. 2014; BRYAN; VAN GRINSVEN, 2013; PÜSSA, 2013; ANDRÉE et al., 2010). Nos Estados Unidos, a concentração máxima permitida é de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de *N*-nitrosaminas voláteis em produtos curados (USDA, 2011), enquanto no Canadá, o nível máximo para *N*-nitrosodimetilamina, *N*-nitrosodietilamina, *N*-nitrosodipropilamina, *N*-nitrosodibutiamine, *N*-nitrosopiperidina e *N*-nitrosomorfolina é de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para *N*-nitrosopirrolidina em produtos cárneos curados (RATH; REYES, 2011). Apesar do desenvolvimento de muitas pesquisas que busquem alternativas para o problema do nitrito nos alimentos, ainda não foi encontrada nenhuma substância capaz de substituir totalmente este agente de conservação.

O ácido ascórbico (ou seus sais ascorbato, isoascorbato ou eritorbato) age simultaneamente com os sais de cura na formação e manutenção da cor específica dos produtos curados, devido à sua capacidade de reagir com nitrito e com o ácido nitroso para formar compostos nitrogenados capazes de nitrosar a metamioglobina (SKIBSTED, 2011). Além disso, a ácido ascórbico desenvolve um importante papel como inibidor da oxidação lipídica e seu emprego em produtos cárneos curados

também pode contribuir no controle da formação de *N*-nitrosaminas (SKIBSTED, 2011; TANNENBAUM; WISHNOK; LEAF, 1991).

A carnosina é um dipeptídeo natural composto de β -alanina e L-histidina encontrado no músculo esquelético de diferentes espécies animais como porco, bovino, peru, dentre outros. Este composto natural tem sido relacionado a inúmeras ações fisiológicas positivas incluindo sua importante proteção antioxidante. As propriedades bioquímicas deste dipeptídeo conduzem aos seus numerosos papéis fisiológicos positivos, tais como a prevenção da diabetes, osteoporose, neurodegeneração, perda de visão, audição e função imunológica (BOLDYREV; ALDINI; DERAIVE, 2013; QUINN; BOLDYREVT; FORTNAZUYLCL, 1992).

A maior parte dos estudos que avaliam o efeito do aumento da concentração de carnosina em carnes estão relacionadas com a sua capacidade protetora contra a oxidação lipídica ou contra a formação de metamioglobina (ALIANI et al., 2013; DAS; ANJANEYULU; BISWAS, 2006; LEE; HENDRICKS; CORNFORTH, 1999). Porém, não existem relatos científicos disponíveis demonstrando o efeito da carnosina na formação de *N*-nitrosaminas. Algumas rotas para reações fisiológicas envolvendo NO foram sugeridas mas seus mecanismos ainda não foram claramente compreendidos e ainda há muito a ser revelado (BOLDYREV; ALDINI; DERAIVE, 2013; HIPKISS, 2009). Portanto, a idéia de investigar o efeito de um dipeptídeo natural e não-tóxico, conhecido pela sua atividade antioxidante e suas inúmeras outras funções benéficas para a saúde, no controle da formação de compostos cancerígenos nos alimentos parece ser um desafio muito promissor e pode ser muito útil do ponto de vista tecnológico e de saúde pública.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito do dipeptídeo natural carnosina no controle da formação de *N*-nitrosaminas em sistemas modelo representando produtos cárneos curados, comparando com um antioxidante normalmente utilizado na indústria de carnes (eritorbato de sódio) e com o efeito sinérgico da combinação de ambos.

1.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar um método analítico alternativo simples, acessível e reprodutível para a análise quantitativa de quantidades traço de *N*-nitrosaminas em diferentes tipos de produtos cárneos curados;
- Avaliar o efeito do período de armazenamento (sete dias) na formação de *N*-nitrosaminas em diferentes produtos cárneos curados armazenados a baixas temperaturas após a abertura da embalagem (sem vácuo);
- Estudar o efeito da carnosina no controle da reação química de formação de *N*-nitrosaminas em sistema modelo, comparando a um antioxidante normalmente utilizado na indústria de carnes (eritorbato de sódio) e ao efeito sinérgico da combinação de ambos;
- Avaliar o efeito da matriz cárnea na performance da carnosina, do eritorbato de sódio e da combinação de ambos na inibição da reação química de formação de *N*-nitrosaminas após sete dias de armazenamento
- Comparar a atividade antioxidante da carnosina e do eritorbato de sódio na presença e ausência de cloreto de sódio;
- Avaliar o efeito da carnosina, do eritorbato de sódio e da combinação de ambos nas propriedades tecnológicas dos produtos cárneos curados cozidos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cura em produtos cárneos

Devido ao seu pH favorável, alto valor nutricional e à sua grande quantidade de água disponível, a carne torna-se um excelente substrato para o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e até mesmo de microrganismos capazes de causar danos à saúde do consumidor. O processamento de carnes consiste na transformação das mesmas em produtos cárneos e visa aumentar a sua vida útil, desenvolver diferentes produtos e sabores e obter um maior aproveitamento da matéria-prima. O emprego dos aditivos, do calor e do frio, bem como do uso de boas práticas de fabricação possibilitam a obtenção de produtos cárneos saudáveis e seguros (TERRA, 2005).

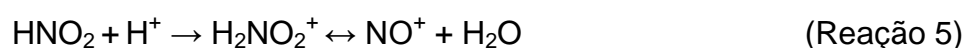
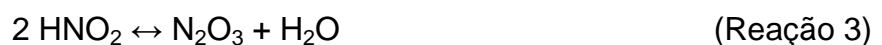
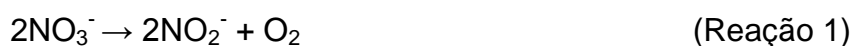
O emprego do sal na preservação de carnes remonta épocas primitivas e representa uma das primeiras tentativas satisfatórias na conservação dos alimentos. A salga e a defumação da carne são práticas antigas, realizadas em tempos de Homero (850 a.C.), onde os produtos cárneos eram processados com o objetivo de conservá-los para o consumo em períodos posteriores (SEN; BADDOO, 1997). Porém, apenas no século 19 foi descoberto que o nitrato presente como contaminante no sal apresenta um papel significativo na inibição do desenvolvimento de microrganismos (SKIBSTED, 2011; ORDÓÑEZ, 2005). A cura tem um papel fundamental na inibição do desenvolvimento de microrganismos patogênicos, como o *Clostridium botulinum*, além de retardar a oxidação lipídica e conferir a cor característica às carnes curadas (DUARTE, 2010; JUDGE et al., 1989). Outras contribuições do nitrito incluem a produção de *flavor*, melhoria na textura, prevenção do aroma e prevenção da formação de *warmed-over-flavor* (FARIA et al., 2001; BRANEN et al., 1990).

Para incorporar a mistura de cura nos produtos cárneos, são utilizadas diferentes técnicas, como a cura a seco e cura em salmoura. Qualquer que seja o método empregado, a exigência básica constitui uma boa distribuição dos ingredientes de cura por todo o produto, pois uma distribuição inadequada ou irregular ocasionará o desenvolvimento de uma cura pobre, com possibilidade de deterioração nas áreas não atingidas pela mistura de cura (PRICE; SCHWEIGERT,

1994). Além disso, a temperatura da sala de cura também é muito importante para manter a segurança dos produtos. Temperaturas que variam entre 2 °C e 4 °C retardam o crescimento de quase todas as bactérias até que se complete a penetração do sal, porém, permite ao mesmo tempo, o crescimento das bactérias reductoras de nitratos a nitritos, que são essenciais quando a cura se faz com sais de nitrato (MOHLER, 1982).

Os ingredientes clássicos da cura são cloreto de sódio (NaCl), nitratos (NO_3^-) e/ou nitritos (NO_2^-) e açúcar (sacarose ou glicose). Os nitratos e nitritos são geralmente adicionados na forma de sais de potássio e de sódio e suas concentrações utilizadas variam de 100 a 200 mg/kg, enquanto o cloreto de sódio é geralmente adicionado em concentrações de 2 g/kg ou mais (TOLDRÁ, 2010). Além destes, alguns produtos podem conter agentes coadjuvantes, tais como fosfatos, ascorbato ou eritorbato de sódio, sorbato de potássio, glutamato monossódico, proteínas vegetais hidrolisadas, lactases e temperos (JAY, 2005).

Nitrito (NO_2^-) pode ser formado por redução bacteriana ou enzimática do nitrato (NO_3^-), e por este motivo, o nitrato é normalmente utilizado em produtos cárneos específicos que necessitam de mais tempo para serem produzidos (presunto, por exemplo), enquanto o nitrito é adicionado em produtos curados que tem uma preparação mais rápida (TERRA, 2005). O ácido nitroso (HNO_2) formado a partir de nitrito nas condições de pH levemente ácidas da carne (pH 5,6) constitui uma reação de equilíbrio com seu anidrido (N_2O_3) que por sua vez, também constitui uma reação de equilíbrio com os óxidos NO e NO_2 . O ácido nitroso protonado (H_2NO_2^+) formado em condições mais ácidas constitui um equilíbrio com o íon NO^+ mas os íons metálicos (M^+) presentes (como o Fe^{3+}) também podem contribuir para a formação do íon. Em concentrações elevadas de sal, o composto NOCl também pode ser formado (SCHEEREN et al., 2015; SKIBSTED, 2011; TOLDRÁ, 2010; TERRA, 2005; PEGG; SHAIDI 2000) (reações 1 a 7):





O nitrato, por si só, não pode atuar diretamente na inibição do crescimento bacteriano e no desenvolvimento de pigmentos característicos de produtos cárneos curados. As reações de cura que ocorrem na carne devem-se aos nitritos e, principalmente, ao óxido nítrico (NO) formado a partir dele e estão estritamente ligadas ao pH e às condições redutoras do meio, donde justifica-se a necessidade de ácido ascórbico e seus sais ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$), bem como de certos açúcares e antioxidantes (TOLDRÁ, 2010; TERRA, 2005; PEGG; SHAIDI, 2000).

Além disso, a formação de compostos intermediários a partir do ácido ascórbico adicionado aos produtos e, principalmente, a formação de S-nitrosotiois a partir de grupamentos tióis presentes na carne (como a glutiona e os sítios de cisteína em algumas proteínas), desempenham um papel importante no armazenamento e transferência do NO e de outros agentes nitrosantes na carne (SKIBSTED, 2011; PEGG; SHAIDI, 2000). Por esta razão, o nitrito residual constitui uma fonte “escondida” de espécies nitrosantes armazenadas no sistema e, portanto, as reações de nitrosação podem continuar ocorrendo durante o período de armazenamento do produto, mesmo quando o ascorbato já tiver sido esgotado.

A concentração de nitrito necessária para ocorrência dos diversos nos produtos cárneos varia entre 30 e 50 mg/kg para o desenvolvimento de cor, entre 20 e 40 mg/kg para desenvolvimento de aroma, entre 80 e 150 mg/kg para o efeito conservante e entre níveis de 20 e 50 mg/kg para o efeito antioxidante (TERRA et al., 2006; LÜCKE, 2000; MÜLLER, 1991).

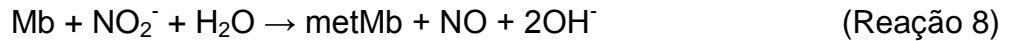
2.1.1 A cor da carne e o papel do nitrito na alteração da cor de produtos curados

A cor é o atributo mais importante da qualidade da carne no momento da compra porque é a primeira impressão que os consumidores têm de qualquer produto de carne e, muitas vezes é a base para a seleção ou rejeição do produto (HOOD; RIORDAN, 1973). A cor da carne fresca é governada em grande medida, pela concentração e natureza química das suas hemoproteínas, especialmente de mioglobina (Mb), e pela temperatura/pH do músculo pós-abate. Quanto maior for o nível de mioglobina, mais intensa será a cor da carne (LEDWARD, 1992).

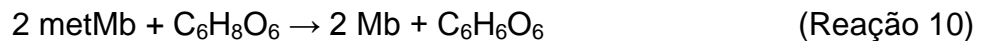
A cor vermelha brilhante de carne fresca, devido à oximioglobina (MbO_2), resulta da grande afinidade da mioglobina pelo oxigênio (O_2), e é esta cor que o consumidor associa com a carne fresca. A mioglobina reage rapidamente e reversivelmente com O_2 e, conseqüentemente, a superfície da carne moída fica com uma cor vermelha brilhante dentro minutos após a exposição ao ar. No entanto, a estabilidade da oximioglobina depende de um fornecimento contínuo de O_2 porque as enzimas envolvidas no metabolismo oxidativo utilizam rapidamente o O_2 disponível (HEDRICK et al., 1994). Com o tempo, a pequena camada de oximioglobina presente na superfície da carne propaga para baixo, mas a profundidade que o O_2 se difunde depende de vários fatores, tais como a atividade de enzimas que utilizam o oxigênio, a temperatura, o pH, e a pressão externa de O_2 . Em outras palavras, a medida que o ar se difunde para o interior, um gradiente de O_2 e de cor são estabelecidas em toda a carne (LEDWARD, 1992).

Em contraste, o tecido interior da carne é vermelho-púrpura. Esta é a cor da mioglobina (algumas vezes chamada desoximioglobina) que persiste enquanto substâncias redutoras geradas no interior das células por atividade enzimática estão disponíveis. Quando estas substâncias são esgotadas, o ferro heme é oxidado ao estado férrico (Fe^{3+}) e forma-se a metamioglobina (metMb), um pigmento marrom, que é característico da cor da carne deixada em repouso durante um período prolongado de tempo. Na carne fresca existe um ciclo dinâmico de tal modo que, na presença de O_2 , os três pigmentos (oximioglobina, mioglobina e metamioglobina) estão constantemente interconvertidos; todas as formas estão em equilíbrio um com o outro. Quando a metamioglobina é desnaturada por processamento térmico, a carne permanece com uma cor marrom, mas este pigmento desnaturado pode ser oxidado pela ação bacteriana ou oxidação fotoquímica e formar substâncias derivadas da porfirina com colorações amarelo, verde ou incolor (PEGG; SHAHIDI, 2000).

Quando os sais de cura são adicionados na carne, a reação da mioglobina pode ocorrer diretamente com o nitrito gerando metamioglobina (reação 8) o que promove a mudança da cor da carne fresca para marrom, e também com o óxido nítrico dando origem a um complexo estável de cor vermelha chamado nitrosilmioglobina (NOMb) (reação 9) (SKIBSTED, 2011):



O ascorbato ou eritorbato de sódio normalmente adicionado nos produtos curados tem um papel coadjuvante nas reações de cor devido a sua capacidade de conservar a mioglobina na forma reduzida (Reação 10) e contribuir para a formação de nitrosilmioglobina (PEGG; SHAHIDI, 2000).



Além disso, acredita-se que 3-nitrosoascorbato (uma das substâncias intermediárias formadas a partir do ascorbato) é capaz de liberar NO^\bullet (radical) e HNO no sistema. Cálculos termodinâmicos mostram que o óxido nítrico não pode reduzir a metamioglobina ou nitrosilmetamioglobina (NOMETMb), mas que HNO pode. HNO é a forma reduzida do óxido nítrico que, apesar de não ter sido considerada como um intermediário reativo na cura de carnes devido ao seu tempo de vida curto, pode ser o principal agente nitrosante da metamioglobina, operando através de uma nitrosação redutiva (reação 11) (SKIBSTED, 2011).



Após o tratamento térmico, a parte globina da nitrosilmioglobina é desnatura e se separa do ferro, gerando o nitrosilmiocromo ou simplesmente hemocromo que é o pigmento que confere a cor rósea característica das carnes curadas cozidas. Caso a mioglobina esteja na forma oxidada (metamioglobina) a aplicação do tratamento térmico e a desnaturação da proteína vai gerar um pigmento marrom (metamioglobina desnaturada) indesejável nos produtos curados (PEGG; SHAHIDI, 2000).

Em carnes curadas não é o nitrito, mas sim os pigmentos musculares que determinam a cor. O nitrito apenas fixa a cor por meio da estabilização da mioglobina através de uma ligação química reversível, do mesmo modo que o pigmento do músculo é estabilizado pela molécula de oxigênio no sistema biológico do animal vivo ou no sistema de carne post-mortem (DRYDER; BIRDSALL, 1980). A

estabilidade da cor de um produto curado está diretamente relacionada com a manutenção e concentração de nitrosohemocromo no produto final que, por sua vez, é fortemente dependente da disponibilidade de mioglobina na matéria-prima, que normalmente é o reagente limitante nas reações de cura (FARIA et al., 2001). Uma cor fraca pode ser um indício de baixa quantidade de nitrito empregada na cura e do baixo nível de nitrito residual. Nos produtos com essa alteração a cor interior é rosa pálida e também tende a perder a cor quando exposta ao oxigênio. Além disso, a descoloração também pode ser promovida por fatores como a luz e as reações de oxidação da gordura (ROÇA, 2001).

As possíveis transformações da mioglobina e os pigmentos que podem ser formados a partir dela estão sendo mostrados na Figura 1.

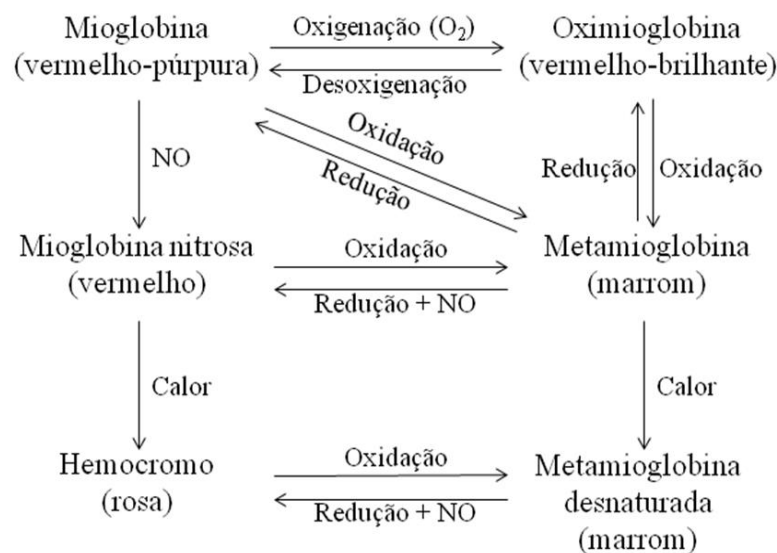


Figura 1 - Formação de diferentes pigmentos da carne a partir da mioglobina. Fonte: Terra (2005).

2.1.2 Ação do nitrito como antioxidante

As reações de oxidação de lipídios e proteínas são responsáveis por graves prejuízos na indústria alimentar devido a formação de radicais livres capazes de reagir com constituintes essenciais do alimento, ocasionando o decréscimo do seu valor nutricional, além da formação de compostos tóxicos para o organismo humano, tornando-o impróprio para o consumo (YUNES, 2010; BRUM, 2009; PADILHA, 2007; SOUZA, 2006; KAHL; HILDEBRANDT, 1986). A oxidação lipídica é uma das reações

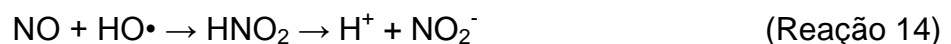
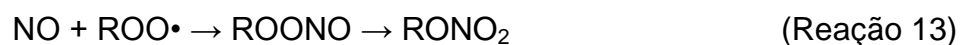
deteriorativas mais conhecidas dos produtos cárneos e é responsável uma pela modificação de características organolépticas, causando alterações na coloração da carne e produção de odores e *flavors* ofensivos, o que limita a vida de prateleira e a estabilidade comercial destes alimentos (TERRA et al., 2008). Pode ocorrer durante o processamento, armazenamento, distribuição e o preparo dos mesmos.

Os produtos curados tem características únicas de *flavours* e, em contraste com a carne fresca, não desenvolvem rancidez nem WOF (*warmed-over-flavour*, termo utilizado para aromas e sabores oxidados) mesmo depois da aplicação do tratamento térmico. Além disso, a capacidade de manter os pigmentos da mioglobina em um estado de oxidação reduzido garantindo a estabilização da cor, e a capacidade de atrasar a oxidação lipídica durante o período de armazenamento de carnes curadas evidencia a estabilidade oxidativa destes produtos (SKIBSTED, 2011; PEGG; SHAHIDI, 2000).

Existem várias hipóteses que explicam os mecanismos do nitrito como inibidor das reações de oxidação. Uma delas é a de que o nitrito age diretamente como antioxidante nos produtos cárneos curados, especialmente em valores de pH mais baixos (reação 12), atuando como quelante do ferro (Fe^{2+}) e como estabilizante de lipídios insaturados (SKIBSTED, 2011).



No entanto, o óxido nítrico (NO) também parece ser aceito como uma das espécies que neutralizam radicais livres intermediários nas reações de oxidação em produtos curados. Acredita-se que o NO pode combinar com radicais peroxila ($\text{ROO}\cdot$) (reação 13) para formar produtos não-radicaais, contribuindo para a quebra do efeito em cadeia característico das reações de oxidação. O NO também pode reagir rapidamente com outros radicais livres incluindo radicais alquila hidroxila ($\text{HO}\cdot$) (reação 14), ânion superóxido ($\text{O}\cdot_2^-$) (reação 15), alquila ($\text{R}\cdot$) e alcoxi ($\text{RO}\cdot$) (SKIBSTED, 2011).



Compostos nitrosilados ferro-porfirínicos também podem reagir com os radicais livres formados nos estágios iniciais das reações oxidativas. Desta maneira, acredita-se que o conjunto dos vários mecanismos envolvendo as diferentes espécies nitrogenada antioxidantes, e não apenas um, são responsáveis pela estabilidade oxidativa de produtos curados e podem agir em diferentes fases das reações de oxidação:

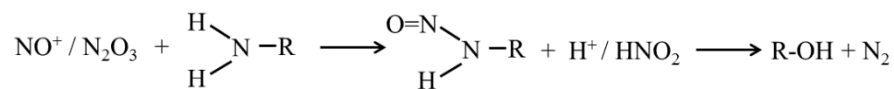
- (1) Formação de um complexo estável entre pigmentos heme e nitrito, e assim previne a liberação do ferro da molécula de porfirina;
- (2) Estabilização dos lipídios insaturados dentro das membranas dos tecidos musculares contra a oxidação;
- (3) Ação do nitrito como um metal quelante, sequestrando metais traço na carne, bem como alguns íons de ferro não-heme liberados dos pigmentos heme desnaturados;
- (4) Interação com biomoléculas presentes na carne e formação de compostos nitroso e nitrosil, os quais possuem propriedades antioxidativas, atuando como sequestradores de radicais livres.

2.2 Riscos toxicológicos do nitrito e a formação de N-nitrosaminas

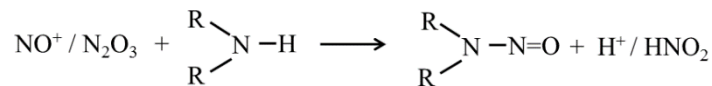
Apesar das inúmeras vantagens de cura, há controvérsias em relação à segurança dos produtos cárneos curados. Inúmeras pesquisas questionam a segurança dos nitratos e nitritos, que são amplamente empregados em alimentos. O uso destes aditivos preocupa a comunidade científica mundial em função dos riscos toxicológicos à saúde humana, que estão inteiramente ligados à presença de excessiva quantidade de nitratos e nitritos ingerida, à elevada frequência de consumo e à susceptibilidade do organismo (DUARTE, 2010). O nitrito residual presente nos alimentos e *in vivo* pode reagir com aminas (principalmente as secundárias), formando N-nitrosaminas, algumas das quais apresentam potencial atividade cancerígena e podem aumentar o risco de câncer colo-retal e de estômago (OOSTINDJER et al., 2014; BRYAN; VAN GRINSVEN, 2013; PÜSSA, 2013; ANDRÉE et al., 2010; SANTARELLI et al., 2008; REINIK et al., 2005). Aminas primárias não são consideradas precursoras de N-nitrosaminas pois são imediatamente degradadas à álcool e à nitrogênio. As aminas terciárias não são

consideradas precursoras para a formação de *N*-nitrosaminas em carnes curadas. O nitrito novamente não é a principal espécie nitrosante, mas sim as espécies nitrogenadas formadas a partir dele tais como NO^+ , N_2O_3 e NOCl (TOLDRÁ, 2010; PEGG; SHAHIDI, 2000). A representação da reação de formação de *N*-nitrosaminas a partir das precursoras é apresentada na Figura 2:

Aminas primárias



Aminas secundárias



Aminas terciárias

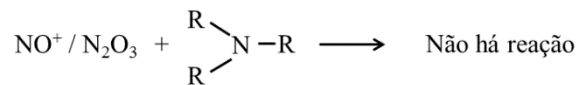
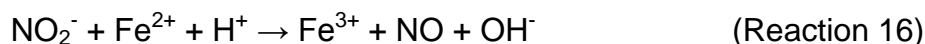


Figura 2 - Formação de *N*-nitrosaminas a partir de diferentes estruturas de aminas precursoras. Fonte: Pegg; Shahidi (2000); Honikel (2008).

De acordo com uma nota de imprensa publicada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2015, a carne vermelha foi classificada como “possivelmente cancerígena para humanos” e carnes processadas foram classificadas como “cancerígenas para humanos”. Esta publicação preocupou consumidores de carnes do mundo todo devido à confusão causada pela publicação, onde foi relatado que um consumo diário de uma porção de 50 gramas de carne processada aumenta 18% o risco de desenvolver câncer colo-retal (WHO, 2015). *N*-nitrosodietilamina parece ser a *N*-nitrosamina encontrada em produtos cárneos curados que apresenta o maior potencial cancerígeno, seguida de *N*-nitrosodimetilamina, *N*-nitrosopirrolidina e *N*-nitrosopiperidina (SCHEEREN et al., 2015; HERRMANN et al., 2014).

A química de nitrosação na formação de *N*-nitrosaminas é muito complicada e depende da temperatura, do pH, e a presença e a basicidade de aminas secundárias. Em temperaturas elevadas, ocorre a liberação do ferro (Fe^{2+}) da mioglobina e na presença de nitrito este ferro é oxidado (Fe^{3+}) (reação 16) e pode

reagir com o óxido nítrico (NO) gerando o íon NO^+ (reação 6) (FAUSTMAN et al., 2010; TOLDRÁ, 2010; HONIKEL, 2008):



A dependência do pH está relacionado com a formação de agentes nitrosantes. Quanto mais baixo o pH, mais a formação de agentes nitrosantes como $\text{H}_2\text{NO}_2^+/\text{NO}^+$, N_2O_3 e NOCl é estimulada enquanto a concentração de amina precursora não-protonadas diminui. Portanto aminas levemente básicas, como morfolina ($\text{pKa} = 8,7$) são nitrosadas mais rapidamente do que as aminas fortemente básicas, como dimetilamina ($\text{pKa} = 10,7$) (ANDRÉE et al., 2010). A Tabela 1 traz os valores de pKa de diferentes aminas secundárias formadoras de *N*-nitrosaminas voláteis já encontradas nos produtos curados.

Tabela 1 - Valores de pKa de diferentes aminas secundárias formadoras de *N*-nitrosaminas.

Amina precursora	pKa	<i>N</i>-nitrosamina formada
Dimetilamina	10.6	<i>N</i> -nitrosodimetilamina
Metiletilamina	10.5	<i>N</i> -nitrosometiletilamina
Dietilamina	10.6	<i>N</i> -nitrosodietilamina
Pirrolidina	11.4	<i>N</i> -nitrosopirrolidina
Hydroxipirrolidina	14.85	<i>N</i> -nitroso-3-hydroxipirrolidina
Dipropilamina	10.77	<i>N</i> -nitroso-dipropilamina
Morfolina	8.5	<i>N</i> -nitrosomorfolina
Piperidina	10.4	<i>N</i> -nitrosopiperidina
Dibutilamina	10.75	<i>N</i> -nitrosodibutilamina
Difenilamina	< 0	<i>N</i> -nitrosodifenilamina
Dibenzilamina	9.12	<i>N</i> -nitrosodibenzilamina
Tiazolidina	8.60	<i>N</i> -nitrosotiazolidina

Fonte: Chemicalize, 2015.

Em carnes frescas, há uma quantidade muito pequena de aminas precursoras presentes. A maior parte das aminas encontradas em carnes derivam da creatina e

creatinina ou de aminoácidos como prolina e hidroxiprolina e são formadas durante a maturação e fermentação dos produtos cárneos. Tendo em vista os diferentes processamentos empregados na indústria de carnes, a ocorrência e concentração de *N*-nitrosaminas encontradas pode variar significativamente nos mais diversos produtos cárneos. Isto ocorre devido à diferença de amins precursoras geradas durante os diversos processamentos. As *N*-nitrosaminas voláteis mais comumente encontradas nos produtos cárneos são *N*-nitrosodimetilamina, *N*-nitrosopiperidina, *N*-nitrosopirrolidina (TRICKER, 1997). *N*-nitrosodimetilamina é o composto cancerígeno mais frequentemente detectado em produtos cárneos e é formado a partir da dimetilamina gerada por decomposição de lecitina, sarcosina, creatina e creatinina. A formação de *N*-nitrosopiperidina requer piperidina, que pode resultar da hidrólise alcalina da piperina. Acredita-se que a pirrolidina (formadora da *N*-nitrosopirrolidina) pode ser formada a partir da descarboxilação da prolina em temperaturas elevadas (frituras) e também a partir de amins biogênicas como putrescina, spermina ou spermidina (ANDRÉ et al., 2010).

2.3 Monitoramento e regulação da formação de *N*-nitrosaminas nos produtos cárneos

Levando-se em consideração a ampla utilização dos aditivos de cura na produção de alimentos cárneos processados e o alto consumo destes produtos, é de fundamental importância que se tenha um controle destas substâncias no que se refere à quantidade adicionada nos alimentos. Visando controlar o nível do nitrito em produtos cárneos, o Ministério da Saúde (BRASIL, 1998), na Portaria nº 1.004, estabeleceu, um limite de 150 mg/kg de nitrito em produtos cárneos excetuando o charque. No Canadá, o nível máximo de nitrito permitido na maior parte dos produtos é de 200 mg/kg (como sais de sódio ou potássio), com exceção do *bacon* que pode conter até 150 mg/kg deste aditivo (SEM; BADDON, 1997). Nos Estados Unidos, o Departamento de Agricultura (USDA) regulamenta que o uso de nitrito, nitrato ou a combinação dos dois não deve ultrapassar 200 mg/kg no produto final, mas em alguns produtos este valor é diferenciado (PEARSON; GILLET, 1996). Em produtos estéreis enlatados, o valor máximo permitido de nitrito residual é 50 mg/kg (PRICE; SCHWEIGERT, 1994). Na União Européia, uma adição de 150 mg/kg de

nitrito é permitida em todos os produtos cárneos, além de 150 mg/kg de nitrato em produtos cárneos não cozidos (TOLDRÁ, 2010).

São poucos os países onde existe uma regulamentação específica para o teor de *N*-nitrosaminas nos alimentos. Nos Estados Unidos, um valor máximo de 10 µg/kg de *N*-nitrosaminas é permitido em produtos cárneos curados (USDA 2011). A agência de Inspeção de Alimentos no Canadá estabelece níveis máximos de 10 µg/kg para *N*-nitrosodimetilamina (NDMA), *N*-nitrosodietilamina (NDEA), *N*-nitrosodipropilamina (NDPA), *N*-nitrosodibutilamina (NDBA), *N*-nitrosopiperidina (NPIP) e *N*-nitrosomorfolina e de 15 µg/kg para *N*-nitrosopirrolidina (NPIR) em carnes curadas (CANADÁ, 2003). Nos países em desenvolvimento e, em particular, na América Latina, além de não existir um monitoramento de compostos *N*-nitrosos em alimentos, não existe uma legislação definida para esses, com exceção do Chile que permite um limite de 30 µg/kg de NDMA em produtos cárneos (RATH; REYES, 2011).

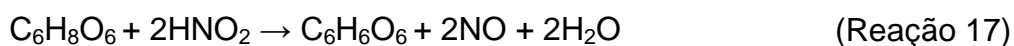
A regulamentação destes compostos tem focado principalmente na determinação de *N*-nitrosaminas voláteis provavelmente devido aos seus efeitos cancerígenos conhecidos. Uma menor atenção à análise de *N*-nitrosaminas não-voláteis também pode ser atribuída às dificuldades relacionadas aos métodos de extração e técnicas de separação inerentes a estes compostos (PEGG; SHAIDI, 2000). Os primeiros procedimentos de extração de *N*-nitrosaminas em produtos cárneos (incluindo o método oficial) empregam destilação em meio alcalino e combinação com extração líquido-líquido utilizando solventes orgânicos (normalmente diclorometano), seguido de concentração do extrato e limpeza da amostra. Estes procedimentos podem ser extremamente longos e consumir grandes quantidades de solvente orgânico. Além disso, como estes compostos nitrosos cancerígenos são normalmente encontrados em quantidades traço nos alimentos, faz-se necessário o uso de equipamentos específicos com detectores altamente sensíveis para estes compostos (SCHEEREN et al., 2015). A extração de *N*-nitrosaminas em alimentos através de métodos mais simples e rápidos e que gerem um menor volume de solventes orgânicos, além do desenvolvimento de métodos analíticos mais sensíveis, precisos e confiáveis para a determinação de quantidades traço de *N*-nitrosaminas é de grande importância e utilidade no monitoramento do nível destes compostos cancerígenos formados nos alimentos, porém ainda é um grande desafio.

2.4 Controle da formação de *N*-nitrosaminas em produtos curados

2.4.1 O papel do ascorbato na redução das *N*-nitrosaminas

Nas últimas décadas, o ácido ascórbico (ou seus sais ascorbato, isoascorbato ou eritorbato) tem sido usado simultaneamente com os sais de cura devido ao seu papel coadjuvante na formação e manutenção da cor específica dos produtos curados e à sua importante capacidade antioxidante através de vários mecanismos, incluindo captura de radicais livres, quelação de metais de transição e capacidade redutora. Além disso, este antioxidante contribui para reduzir a produção da toxina botulínica em ação conjunta com o sal (SKIBSTED, 2011; TOLDRÁ, 2010).

Mais recentemente, o emprego do ácido ascórbico em produtos cárneos curados também vem sendo associado ao controle da formação de *N*-nitrosaminas e embora todos os mecanismos ainda não tenham sido totalmente elucidados, algumas sequencias de reações já são conhecidas (SKIBSTED, 2011; TOLDRÁ, 2010; TANNENBAUM; WISHNOK; LEAF, 1991). Ascorbato ou eritorbato oxida na presença de ácido nitroso e gera óxido nítrico (reação 17):



A cinética desta reação está ligada ao pH do meio, sendo que com o aumento do pH a reatividade do ácido ascórbico/ascorbato aumenta, enquanto a reatividade do ácido nitroso/nitrito aumenta com o decréscimo do pH (Figura 3). Em condições mais ácidas, a rota da reação pode ser através das espécies $\text{H}_2\text{NO}_2^+/\text{NO}^+$. Nas condições de pH da matriz cárnea, a reação entre a forma anidra do ácido nitroso (N_2O_3) e ascorbato monohidrogenado prevalece. O ácido nitroso reage mais rápido com ascorbato do que com aminas secundárias, o que auxilia na prevenção de compostos *N*-nitrosos carcinogênicos (SKIBSTED, 2011).

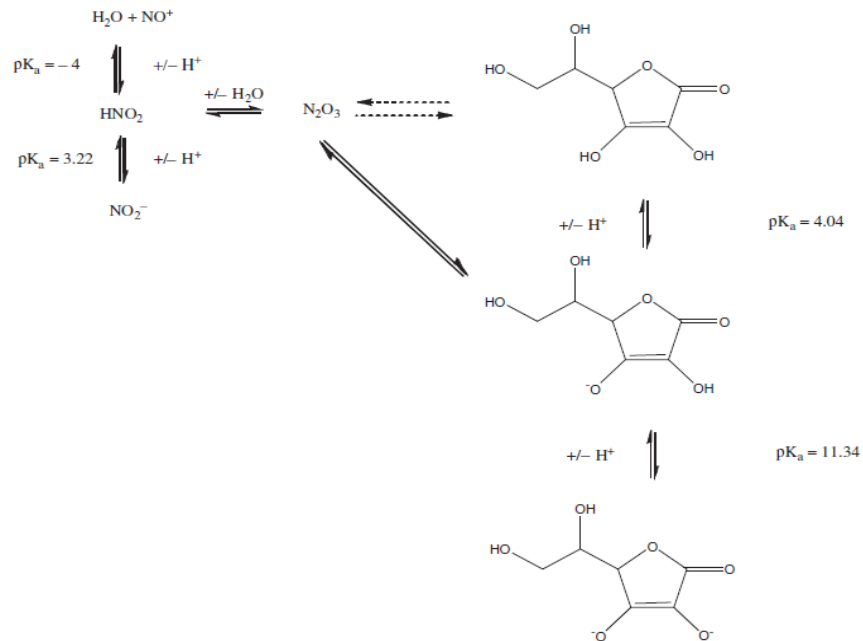


Figura 3 - Reação do ascorbato com ácido nitroso. Fonte: Skibsted, 2011.

A reação da forma anidra do ácido nitroso com o ascorbato monohidrogenado promove a formação de vários intermediários que também podem agir como agentes nitrosantes (reação 18 e Figura 4).

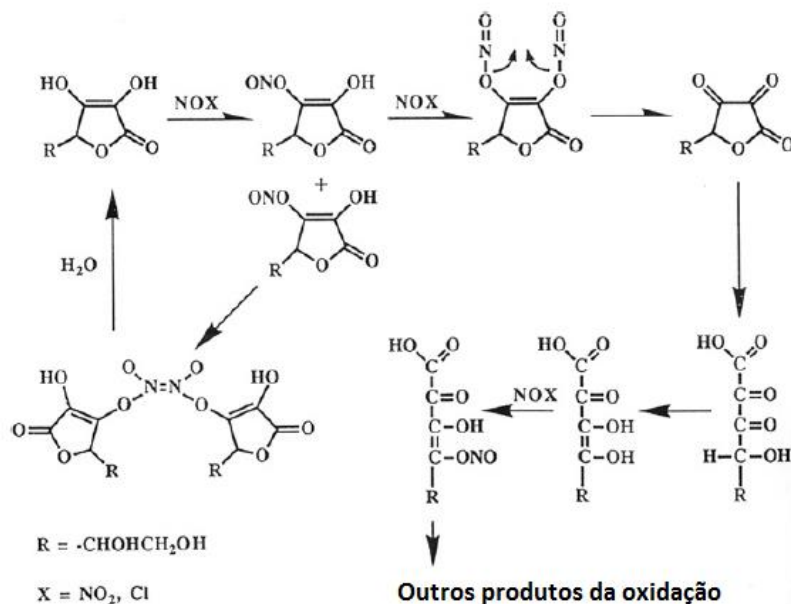
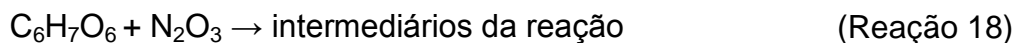


Figura 4 - Intermediários formados na reação entre o nitrito e ácido ascórbico em carnes curadas. Fonte: Skibsted, 2011.

Desta maneira, a capacidade do ascorbado em reduzir a formação de *N*-nitrosaminas pode ser atribuído à sua capacidade de reagir com HNO_2 , N_2O_3 e NO^+ , reduzindo a concentração destas espécies nitrosantes que são responsáveis pela formação capazes dos compostos cancerígenos em questão (SKIBSTED, 2011; TANNENBAUM; WISHNOK; LEAF, 1991).

2.4.2 Alternativas naturais para o problema do nitrito em produtos cárneos

O mercado de alimentos mais naturais vem crescendo mundialmente, já que os consumidores estão cada vez mais interessados em alimentos menos processados, que não contenham conservantes químicos ou contenham uma quantidade reduzida destes (SEBRANEK; BACUS, 2007; SINDELAR, 2006). Como resposta ao mercado, cada vez mais pesquisas tem sido desenvolvidas visando encontrar alternativas para reduzir ou eliminar a adição do nitrito através da sua substituição por compostos naturais capazes de agir em pelo menos uma das suas funções tecnológicas, mantendo a qualidade e a segurança dos produtos. Um exemplo são os compostos antimicrobianos de ocorrência natural presentes em especiarias, ervas ou óleos essenciais, incluindo terpenos, cumarinas, e flavonóides (KIM; MARSHAL; WEI, 1995) ou obtidos naturalmente a partir de micróbios (como a nisina) ou por fontes animais (como polipeptídeos) (GAYSINSKY; WEISS, 2007). Devido à baixa eficácia destes compostos em comparação ao nitrito, a combinação a de agentes antimicrobianos naturais pode ser necessária (NTZIMANI; GIATRAKOU; SAVVAIDIS, 2010; SOFOS, 2008).

A substituição dos sais de nitrito por extratos vegetais naturais que contenham uma alta concentração de nitrato também tem sido investigada. O emprego do extrato de aipo, cenoura, beterraba e espinafre como substitutos do nitrito em produtos cárneos curados já foi estudo (WEISS et al., 2010; SEBRANEK; BACUS, 2007; SINDELAR, 2006; FISCHER et al., 2005). Esta alternativa é empregada como uma forma de produção orgânica de carnes curadas (SEBRANEK; BACUS, 2007) e produz alimentos que exibem algumas propriedades típicas (cor, aparência e estabilidade durante o período de armazenamento) dos produtos curados com sais de nitrito e nitrato. O efeito tecnológico destes extratos naturais é atribuído a conversão do nitrato com nitrito através do uso de bactérias redutoras, já

que o nível de nitrito geralmente é baixo nestes ingredientes. Todavia, muitas vezes estes extratos naturais podem conter concentrações de nitrato maiores que o nível permitido pela legislação para a formulação dos produtos cárneos curados. Além disso, a extração adicional de resíduos e contaminantes provenientes dos vegetais não pode ser desconsiderada, aumentando as chances de uma contaminação indesejada nos produtos (OLMEDILLA-ALONSO; JIMÉNEZ-COLMENERO; SÁNCHEZ-MUNIZ, 2013; ANDRÉE et al., 2010; WEISS et al., 2010; HONIKEL, 2008).

Uma alternativa interessante e que tem sido cada vez mais estudada como forma de redução da utilização dos sais de nitrito em alimentos é através do emprego de antioxidantes naturais. Em contraste com os antioxidantes sintéticos, a quantidade de antioxidantes naturais não é rigorosamente regulamentada na maioria dos países, o que contribuiu para o aumento do emprego destes compostos nas indústrias de alimentos. Temperos e especiarias como alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*), orégano (*Origanum vulgare L.*), ou sálvia (*Salvia officinalis L.*) contém substâncias ativas na inibição da oxidação, como compostos fenólicos, derivados do ácido hidroxicinâmico, flavonóides e triterpenos. Além disso, substâncias como α -tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), licopeno e luteína têm demonstrado um efeito não apenas na redução da oxidação lipídica, mas também contém efeitos benéficos para a saúde (GRANADO-LORENCIO et al., 2010; HERNANDEZ-HERNANDEZ et al., 2009; RYAN et al., 2009; BOON et al., 2008; OBERDIECK, 2004; FERNANDEZ-LOPEZ et al., 2003; SANCHEZ-ESCALANTE et al., 2003).

Todavia, apesar do desenvolvimento de muitas pesquisas que busquem alternativas para solucionar o problema do nitrito nos alimentos, ainda não foi encontrada nenhuma substância capaz de substituir totalmente este agente de conservação. Os diferentes efeitos que a adição de nitrito tem sobre o metabolismo dos microrganismos patogênicos é a principal razão pela qual o composto é tão eficaz e uma pequena concentração é suficiente para causar uma inibição de largo espectro nos agentes patogênicos nos alimentos. Somado a isso, seu efeito no desenvolvimento da cor e *flavor* específicos de carnes curadas e ação antioxidante dificultam ainda mais a sua substituição na preservação de produtos cárneos (OLMEDILLA-ALONSO; JIMÉNEZ-COLMENERO; SÁNCHEZ-MUNIZ, 2013; ANDRÉE et al., 2010; WEISS et al., 2010; DAVIDSON; SOFOS; BRANEN, 2004).

2.4.2.1 Carnosina

Enquanto antioxidantes não intrínsecos da carne tem sido adicionados na elaboração de produtos curados, a capacidade antioxidante de peptídeos intrínsecos também tem sido investigada. A carnosina é um dipeptídeo natural, não-tóxico, composto de β -alanina e L-histidina (Figura 5) encontrado no músculo esquelético de diferentes espécies animais como porco, bovino, peru, dentre outros. Músculos anaeróbicos têm concentrações mais elevadas do carnosina comparado aos músculos aeróbicos. Descoberto em 1900 como um composto nitrogenado não proteico em carnes, este composto natural tem sido relacionado a inúmeras ações fisiológicas positivas (Figura 5), principalmente por sua importante proteção antioxidante, atribuída a sua capacidade de quelação de metais e captura de radicais livres. Outras possíveis funções bioquímicas de carnosina incluem a sua capacidade de agir como tamponante, imunoestimulante, capturador de carbonilas e inibidor das reações de glicação. As propriedades bioquímicas deste dipeptídeo conduzem aos seus numerosos papéis fisiológicos positivos, tais como a prevenção da diabetes, osteoporose, neurodegeneração, perda de visão, audição e função imunológica. Ações anti-stress, anti-inflamatórias, curativas e imunomoduladoras também foram claramente demonstradas (BOLDYREV; ALDINI; DERAIVE, 2013; QUINN; BOLDYREVT; FORTNAZUYLCL, 1992).

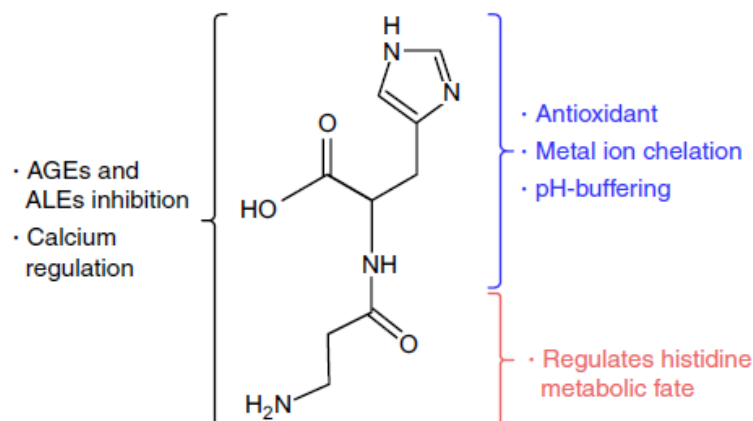


Figura 5 - Estrutura e funções fisiológicas da carnosina. Fonte: Boldyrev; Aldini; Derave (2013).

A maior parte dos estudos que avaliam o efeito do aumento da concentração de carnosina em carnes estão relacionadas com a sua capacidade protetora contra a oxidação lipídica ou contra a formação de metamioglobina (ALIANI et al., 2013; WEISS et al., 2010; DAS; ANJANEYULU; BISWAS, 2006; DJENANE et al., 2003; LEE; HENDRICKS; CORNFORTH, 1999). Entretanto, vários estudos têm demonstrado o impacto da carnosina na produção, metabolismo e atividade do óxido nítrico (NO). Algumas rotas para reações fisiológicas envolvendo NO foram sugeridas, mas seus mecanismos ainda não foram claramente compreendidos e ainda há muito a ser revelado (BOLDYREV; ALDINI; DERAIVE, 2013; HIPKISS, 2009). Ainda há uma aparente contradição na literatura, onde alguns estudos demonstram o efeito estimulante do bipeptídeo na produção de NO, enquanto outros indicam sua função inibitória na formação do NO (BOLDYREV; ALDINI; DERAIVE, 2013; HIPKISS, 2009). De acordo com Hipkiss (2009), ainda que a sua função no mecanismo das reações de nitrosação não esteja totalmente desvendada, a carnosina parece desempenhar um papel importante na geração de NO, mas também na proteção contra o excesso da produção de NO em sistemas biológicos, provavelmente devido a sua capacidade de controlar enzimas sintetizadoras de óxido nítrico.

Apesar da relação da carnosina na rota metabólica do óxido nítrico (NO) ser reconhecida, não há relatos científicos disponíveis demonstrando o efeito deste antioxidante natural na formação de *N*-nitrosaminas. Portanto, a idéia de avaliar o efeito deste peptídeo não-tóxico, que contém inúmeros efeitos benéficos para a saúde, no controle da formação de compostos cancerígenos nos alimentos parece ser um tema muito útil em termos de saúde pública. Além disso, a conhecida capacidade protetora da carnosina contra a oxidação lipídica ou contra a formação de metamioglobina, já induz a idéia da utilização deste composto natural como alternativa para redução do nitrito em produtos curados e, portanto, no controle indireto da formação de *N*-nitrosaminas. Porém, a busca por possibilidades de minimizar diretamente o problema da geração de compostos cancerígenos sem a necessidade de pôr em risco a segurança dos alimentos através da redução do nitrito, é um desafio muito promissor também do ponto de vista tecnológico e de extrema importância para a indústria de alimentos.

3 ARTIGOS CIENTÍFICOS

3.1 Artigo 1

Artigo científico publicado na revista Food Additives and Contaminants - Part A (Chemistry, Analysis, Control, Exposure And Risk), 2015.

Determination of *N*-nitrosamines in processed meats by liquid extraction combined with gas chromatography-methanol chemical ionisation/mass spectrometry.

Determination of *N*-nitrosamines in processed meats by liquid extraction combined with gas chromatography-methanol chemical ionisation/mass spectrometry

Marina Bergoli Scheeren^{a,b}, Hassan Sabik^{b*}, Claude Gariépy^b, Nelcindo Nascimento Terra^a and Joseph Arul^c

^aDepartment of Food Science and Technology, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil; ^bFood Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, Saint-Hyacinthe, QC J2S 8E3, Canada; ^cDepartment of Food Science and Nutrition, Laval University, Quebec City, QC G1V 0A6, Canada

(Received 1 May 2015; accepted 21 June 2015)

A simple, accessible and reproducible method was developed and validated as an alternative for the determination of nine volatile *N*-nitrosamines (NAs) in meat products, using a low volume of organic solvent and without requiring specific apparatus, offering the possibility of practical implementation in routine laboratories. The NAs were extracted with dichloromethane followed by a clean-up with phosphate buffer solution (pH 7.0). The extracts were analysed by gas chromatography-chemical ionisation/mass spectrometry (GC-CI/MS) in positive-ion mode using methanol as reagent. Limits of detection and quantification, recovery and reproducibility were determined for all NAs (*N*-nitrosodimethylamine, *N*-nitrosomethylethylamine, *N*-nitrosodiethylamine, *N*-nitrosopyrrolidine, *N*-nitrosodipropylamine, *N*-nitrosomorpholine, *N*-nitrosopiperidine, *N*-nitrosodibutylamine and *N*-nitrosodiphenylamine). Satisfactory sensitivity and selectivity were obtained even without concentrating the extract by solvent evaporation, avoiding the loss of the nine NAs studied. Limits of detection ranged from 0.15 to 0.37 $\mu\text{g kg}^{-1}$, whereas limits of quantification ranged from 0.50 to 1.24 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Recoveries calculated in cooked ham that had been spiked at 10 and 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ were found to be between 70% and 114% with an average relative standard deviation of 13.2%. The method was successfully used to analyse five samples of processed meat products on the day of purchase and 7 days later (after storage at 4°C). The most abundant NAs found in the analysed products were *N*-nitrosodipropylamine and *N*-nitrosopiperidine, which ranged from 1.75 to 34.75 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and from 1.50 to 4.26 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. In general, an increase in the level of NAs was observed after the storage period. The proposed method may therefore be a useful tool for food safety control once it allows assessing the profile and the dietary intake of NAs in food over time.

Keywords: *N*-nitrosamines; meat products; liquid extraction; methanol chemical ionisation; gas chromatography/mass spectrometry

Introduction

Because of its high nutritional value and the presence of a large amount of free water, meat is an ideal environment for microbial growth and spoilage. Meat processing with appropriate ingredients enables better use of this protein source through the production of a variety of meat products with distinct flavours, and improved shelf-life and safety (Terra 2005). Salt has been used to preserve meat since ancient times, but it became evident only in the 19th century that the nitrate present as a contaminant in salt had a significant role in the inhibition of microorganisms (Skibsted 2011). The conversion of nitrate to nitrite promotes the curing of meat. Nowadays, however, potassium and sodium salts of nitrite and nitrate are commonly used in curing mixtures to inhibit the growth of *Clostridium botulinum*, retard lipid oxidation, and confer to cured meats their characteristic colour, taste and aroma (Pegg & Shaidi 2000).

In spite of these advantages of curing, controversies surround the safety of cured meat products (Bryan &

van Grinsven 2013; Püssa 2013; Oostindjer et al. 2014). Numerous studies have questioned the toxicological risks that consumption of nitrates and nitrites pose to human health (Demeyer et al. 2008; Andrée et al. 2010). The main concern is the reaction of the nitrosating species such as NO^+ and N_2O_3 (formed from residual nitrite) with primary and secondary amines to form *N*-nitrosamines (NAs), which may exhibit potential genotoxicity and increase the risk of gastric and colorectal cancer (Andrée et al. 2010; Herrmann et al. 2014; Oostindjer et al. 2014). Table 1 shows the NAs and *N*-nitroso-amino acids found in meat products (Massey et al. 1991; Tricker & Preussmann 1991; Herrmann et al. 2014), their volatility (Massey et al. 1991; Andrée et al. 2010), and their toxicity (Tricker & Preussmann 1991; Bull et al. 2006; Herrmann et al. 2014; MSDS 2014). *N*-nitrosodiethylamine (NDEA) appears to be the most potent carcinogenic NA found in meat products, *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) has lower potency, and *N*-nitrosopyrrolidine (NPYR) and

*Corresponding author. Email: hassan.sabik@agr.gc.ca

Table 1. Properties of *N*-nitrosamines and nitroso-amino acids found in meat products.

Name	MW (g)	Volatility	Toxicity
<i>N</i> -nitrosodimethylamine (NDMA)	74.08	V	C, M
<i>N</i> -nitrosomethylethylamine (NMEA)	88.11	V	C
<i>N</i> -nitrosodiethylamine (NDEA)	102.14	V	C
<i>N</i> -nitrosopyrrolidine (NPYR)	100.12	V	C
<i>N</i> -nitroso-3-hydroxypyrrolidine (NHPYR)	116.14	V	C
<i>N</i> -nitrosodipropylamine (NDPA)	130.19	V	C
<i>N</i> -nitrosomorpholine (NMOR)	116.12	V	C
<i>N</i> -nitrosopiperidine (NPIP)	114.15	V	C
<i>N</i> -nitrosodibutylamine (NDBA)	158.24	V	C
<i>N</i> -nitrosodiphenylamine (NDPH)	198.22	V	M
<i>N</i> -nitrosothiazolidine (NTHZ)	118.16	V	NDA
<i>N</i> -nitroso-2-methylthiazolidine (NMTHZ)	132.03	NV	NDA
<i>N</i> -nitroso-2-hydroxymethylthiazolidine (NHMTHZ)	148.03	NV	NDA
<i>N</i> -nitrosodibenzylamine (NDBzA)	226.28	NV	M
<i>N</i> -nitrosothiazolidine-4-carboxylic acid (NTCA)	162.00	NV	NDA
<i>N</i> -nitroso-2-methyl-thiazolidine-4-carboxylic acid (NMTCA)	176.02	NV	NDA
<i>N</i> -nitroso-2-hydroxymethyl-3-thiazolidine-4-carboxylic acid (NHMTCA)	192.19	NV	NDA
<i>N</i> -nitrososarcosine (NSAR)	118.03	NV	NDA
<i>N</i> -nitrosoproline (NPRO)	144.13	NV	NC
<i>N</i> -nitrosohydroxyproline (NHPRO)	160.13	NV	NC
<i>N</i> -nitrosopipercolic acid (NPIC)	158.15	NV	NDA
<i>N</i> -nitrosooxazolidine-4-carboxylic acid (NOCA)	146.10	NV	NDA
<i>N</i> -nitroso-5-methyloxazolidine-4-carboxylic acid (NMOCA)	160.13	NV	NDA
<i>N</i> -nitroso- <i>N</i> -(1-ethylacetyl)-2-methylpropylamine (NMAMPA)	172.22	NV	C
<i>N</i> -nitroso- <i>N</i> -(1-ethylacetyl)-3-methylbutylamine (NMAMBA)	186.25	NV	NDA

Note: MW, molecular weight; V, volatile; NV, non-volatile; C, carcinogenic; NC, non-carcinogenic; M, mutagenic; NDA, no data available.

N-nitrosopiperidine (NPIP) are even less potent (Herrmann et al. 2014). *N*-nitrosoproline (NPRO) and *N*-nitrosohydroxyproline (NHPRO) have been shown to be non-carcinogenic (Herrmann et al. 2014).

Only a few countries have specific regulations for the content of NAs in food. In the United States the maximum permitted amount of volatile nitrosamines is 10 µg kg⁻¹ in cured meat products (USDA 2011). The Canadian Food Inspection Agency has established a maximum level of NAs of 10 µg kg⁻¹ for NDMA, NDEA, *N*-nitrosodipropylamine (NDPA), *N*-nitrosodibutylamine (NDBA), NPIP and *N*-nitrosomorpholine (NMOR), and 15 µg kg⁻¹ for NPYR in cured

meats (Rath & Reyes 2011). To the best of our knowledge, there is no specific regulation regarding nitroso compounds in foods in South American countries, except Chile which allows a maximum of 30 µg kg⁻¹ of NDMA in meat products (Rath & Reyes 2011).

NAs can be either volatile (VNAs) or non-volatile (NVNAs), but most studies of nitroso compounds in food has been mainly focused on the determination of VNAs, presumably due to their known carcinogenic effects and their regulated levels in meat products. The lesser attention to the analysis of NVNAs may be also attributable to the inherent difficulties of the extraction and concentration methodologies and separation techniques associated with these compounds (Pegg & Shaidi 2000). There are distinct differences in the analytical methods for VNAs and NVNAs: both can be determined by HPLC, but GC is used only for VNAs (Bellec et al. 1996; Cheng & Tsang 1999; Crews 2010).

The primary NAs extraction procedures from meat products (including the official method) employ distillation in alkaline medium and combination of liquid–liquid extraction using relatively low polarity organic solvents (usually dichloromethane), followed by concentration of the extract on Kuderna–Danish (K-D) and a two-step SPE method with Extrelut and Florisil as sorbents (AOAC 1990; Huang et al. 2013). These extraction procedures can be extremely long and consume large amounts of organic solvent. Furthermore, the K-D concentration step is challenging because VNAs are highly volatile. The extraction of NAs in foods by simple methods that can reduce the procedure time and generate the least amount of organic solvents is definitely needed but poses challenges, as shown by some studies (Raoul et al. 1997; Andrade et al. 2005). Determination of NAs from pork sausages using solid-phase micro-extraction (SPME) was carried out by Andrade et al. (2005). Even though it is a simple method that allows fast analysis, SPME without the use of solvents requires careful optimisation of various parameters, the equilibrium of NAs between the sample and the fibre is not always reached despite the use of lengthy extraction times, and the extraction efficiency appears to be too low for most major NAs (Sen et al. 1997; Ventanas et al. 2006). Other methods have been alternatively developed for VNAs determination in meat products, including microwave-assisted extraction (Campillo et al. 2011; Huang et al. 2013; Ramezani et al. 2014), supercritical fluid extraction (Sanches Filho et al. 2007), and superheated water extraction (Chienthavorn et al. 2014). However, these methods require the availability of specific apparatus that is limited to laboratories that can afford it.

Since these harmful *N*-nitroso compounds are commonly present in foods in trace quantities (in the range

of micrograms per kilogram), the use of equipment with specific and highly sensitive detectors is also required. A large number of studies have used thermal energy analysers (TEAs) (Massey et al. 1991; Byun et al. 2004), ultraviolet (UV) (Bellatti & Parolari 1982) or chemiluminescence (nitric oxide analyser – NOA) (Ozel et al. 2010; Kocak et al. 2012) detectors to determine NAs in a variety of food matrices. The MS systems available nowadays have relatively higher specificity in comparison with TEAs and UV detectors. Moreover, because of their limited versatility and relatively high cost, TEAs and NOAs are not available in most laboratories (Herrmann et al. 2014). A method based on acetonitrile extraction and LC-MS using atmospheric pressure chemical ionisation (APCI) and electrospray ionisation (ESI) (LC-APCI/ESI/MS/MS) to determine VNAs and NVNAs in processed meat products has been developed (Herrmann et al. 2014). The instrument has advantages of sampling, and because of its high sensitivity and large sample capacity, very low amounts of compounds can be quantified. However, although found in many analytical laboratories, the acquisition of such equipment and its maintenance are still expensive. Another recent report describes the determination of VNAs by GC-CI/MS/MS using ammonia as gas reagent for the CI (Sannino & Bolzoni 2013). The LODs ranged from 0.3 to 0.4 $\mu\text{g kg}^{-1}$, indicating the feasibility of the method for the determination of NAs. However, the extraction step involves large quantities of organic solvents and the method is a laborious procedure since it requires multiple clean-up steps and a concentration step with a K-D concentrator. Furthermore, ammonia is a toxic and expensive gas, making the method both riskier and costlier.

Although it is still a challenge, the development of new analytical methods or the improvement of the existing procedures for determination of NAs in meat products is needed and very useful for public health and also from a technological point of view. The objective of this study was to develop and validate an alternative method for simple, accessible and reproducible analysis of trace amounts of NAs in different types of processed meat during the storage period, using a low amount of organic solvent, without needing specific extraction apparatus and employing a quantification instrument which is commonly found in food analytical laboratories. In this study, nine NAs were extracted with a low volume of dichloromethane and quantified by GC-CI/ion trap/MS using methanol as reagent for positive CI.

Material and methods

Chemicals and reagents

The solvents used in this experiment were HPLC-grade dichloromethane and acetonitrile (VWR, Toronto, ON,

Canada), pesticide residue-grade methanol, ethyl acetate and HPLC-grade iso-octane (2,2,4-trimethylpentane) (Sigma Aldrich, Oakville, ON, Canada). All the solid chemicals used in this study (potassium phosphate monobasic, potassium phosphate dibasic, sodium hydroxide and sodium sulphate) were purchased from Sigma Aldrich.

A standard mix of nine VNAs (EPA 8270/Appendix IX Nitrosamines Mix) containing 2000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of NDMA, *N*-nitrosomethylethylamine (NMEA), NDEA, NPYR, NDPA, NMOR, NPIP, NDBA and *N*-nitrosodiphenylamine (NDPH) in methanol, was obtained from Sigma Aldrich. Stock solutions of 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ were prepared in methanol and stored in the dark at -40°C until use.

Method validation

Suitable working solutions containing the NAs under study with concentrations in the range of 0.25–1000 $\mu\text{g l}^{-1}$ were prepared in methanol before use for calibration curves. The selectivity, sensitivity and linearity of the method were assessed by plotting calibration graphs (seven calibration levels) using a least-square linear regression analysis. To optimise and validate the method under analytical control, the specificity, accuracy, precision (repeatability), LOD and LOQ were determined using cooked ham samples. As no reference material was available, the accuracy of the method was determined through the matrix recovery assays. Mean recovery and RSD were calculated for each of the nine NAs under study. For the determination of extraction recovery (%), cooked ham samples were spiked in triplicate with the standard mix of NAs to reach concentrations of 1, 10 and 100 $\mu\text{g l}^{-1}$ in the GC-MS extract (which correspond to 1, 10 and 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in samples, respectively) and the full extraction procedure was applied. Recovery rates between 60% and 120% were accepted (AOAC 2002). The LOD and LOQ were calculated as the amount equivalent to three and 10 times, respectively, the signal/noise ratio (S/N) at the lowest accepted spike level.

Calibration curves were prepared daily to check both sensitivity and linearity in the working concentration range in order to avoid quantification errors. To validate the current method in applicable real samples, different types of meat products were analysed in duplicate. The concentration of NAs in the samples was calculated from the calibration plots of peak area of VNAs against their theoretical NA concentration.

Samples

Five meat products were purchased from a local supermarket: cooked ham, dry ham, cooked sausage, dry sausage and bologna. These products were selected to represent the majority of different processes used in

the meat industry: cured and cooked products, dry-cured products, fermented products and emulsified products.

To simulate real consumption conditions for these products, samples were analysed on the day of purchase (taken from the original package under vacuum) and also after 7 days of storage at 4°C (in a non-vacuum polypropylene container). Each sample was homogenised to a fine powder with a food mixer in the presence of liquid nitrogen to ensure the homogeneity of the samples and the representativeness of the subsamples for the analysis. The samples were stored in plastic bags under vacuum and in absence of light at -40°C until analysis.

Extraction procedure

Sample (10 g) was placed in a 50-ml glass tube, and 5 ml of dichloromethane were added. The mixture was homogenised with a vortex mixer (Vortex Genie 2 12-812, Fisherbrand; Allied Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) for 1 min and then centrifuged for 10 min (1000 rpm; Dynac II Centrifuge; Clay Adams, Fisher Scientific). The supernatant was transferred with a Pasteur pipette (9", Fisherbrand; Fisher Scientific) to a 20-ml glass tube. Another 5 ml of dichloromethane were added, and the homogenisation and centrifugation steps were repeated. The supernatant obtained from this second extraction was transferred into a 20-ml glass tube (both supernatants were pooled together), and then 5 ml of 0.1 M phosphate buffer solution (pH 7.0) were added. The samples were vortexed and centrifuged (2000 rpm; Allegra 6R centrifuge; Beckman Coulter, Mississauga, ON, Canada) to achieve good separation of both phases, aqueous and organic. The solvent (in the lower part of the tube) was carefully removed and transferred to another glass tube. Any drop of aqueous solution remaining was dried with sodium sulphate, and then the solvent was transferred to a syringe (10-ml syringe, Luer-Lok Tip; BD, Franklin Lakes, NJ, USA) and filtered (13 mm, 0.45 µm, PTFE; Chromatographic Specialities Inc., Brockville, ON, Canada). The final extract was placed in a 2-ml amber GC vial (Chromatographic Specialities) and analysed by GC-MS.

Chromatographic analysis

The analyses were performed by GC-MS using a Varian model 3800 GC system (Varian Instruments, Palo Alto, CA, USA). Samples (1 µl) were injected with an auto-sampler (MultiPurposeSampler MPS 2; Gerstel, Baltimore, MD, USA) into a 1078/1079 split/splitless injector using a 10-µl syringe and a suitable glass liner (Split/Splitless Tapered FocusLiner, 3.4-mm inner diameter; SGE, Austin, TX, USA). The injector temperature was set at 300°C. The split mode was kept closed during

the first 2 min, and then it was turned on and held at 10:1. Separations were performed on a Factor Four VF-5ms column (5% phenyl/95% dimethylpolysiloxane, equivalent to DB-5ms; Varian, Mississauga, ON, Canada) measuring 30 m by 0.25 mm with a film thickness of 0.25 µm. The column was held at 35°C for 2 min after injection and then programmed at a rate of 12°C min⁻¹ to 100°C, followed by 2°C min⁻¹ to 115°C, and finally 20°C min⁻¹ to 280°C (held for 5.4 min). The solvent delay time was 3 min, and the total GC run time was 28.6 min. Ultra-high-purity 5.0-grade helium (Praxair Canada Inc., Mississauga, ON, Canada) was used as carrier gas with a constant flow rate of 1.2 ml min⁻¹. Detection was carried out by MS equipped with ion trap (Saturn 2000; Varian, Palo Alto) in positive mode, using methanol as reagent for CI. Chemical reaction with methanol provides less ion fragmentation (Rohrbaugh 2000) and it did not show the formation of any adduct products of VNAs in this study, which contributed for the quantification of each compound analysed using only one selected ion mass (usually the mass of [M + 1]⁺¹ ion, where M represents the molecular weight of the analyte), reducing the matrix effects and therefore increases the detector sensitivity and specificity. The CI calibration was performed before analysis to ensure the high detector sensitivity and selectivity on different days by adjustment of methanol pressure at 100 ion time until ion count values reach the range of 600–700. The temperatures of the trap and transfer line were set to 150 and 220°C, respectively. In this study, CI full-scan and CI-selected ion or storage (CI-SIS) modes were compared and no significant differences in the sensitivity were observed when the [M + 1]⁺¹ ion masses were selected for quantification, and thus full-scan (70–175 *m/z*) mode was chosen because it could also promote the possible detection of unexpected NAs. To ensure the selectivity of the method, GC-CI/MS/MS was used and the results demonstrated no fragmented ion were formed and the sensitivity was lower than when ion masses were selected from full-scan mode chromatogram. However, VNAs under study were quantified on the basis of their retention time and their selected ion mass [M + 1]⁺¹ (where M represents each molecular weight of NAs individually) for all NAs except for NDPH (Table 2), then the interference from other compounds which may elute at the same retention time of the analyte was minimised and even NPYR (retention time: 9.22 min), NDPA (retention time: 9.25 min) and NMOR (retention time: 9.4 min) could be quantified separately.

Results and discussion

Method validation

Figure 1 shows GC-CI/MS chromatograms of a standard 10 µg l⁻¹ on full-scan mode and selected ion masses as

Table 2. Retention times and the selected ion peaks for the studied volatile *N*-nitrosamines.

<i>N</i> -nitrosamine	Retention time (min)	Selected ion mass (<i>m/z</i>)
NDMA	4.11	74.9 ^a
NMEA	5.29	88.8 ^a
NDEA	6.40	102.9 ^a
NPYR	9.22	100.9 ^a
NDPA	9.25	130.9 ^a
NMOR	9.40	116.9 ^a
NPIP	10.25	114.9 ^a
NDBA	14.91	158.9 ^a
NDPH	19.75	169.8 ^b

Notes: ^aPositive ion ($[M + 1]^{+}$).^bMost abundant ion.

NDMA, *N*-nitrosodimethylamine; NMEA, *N*-nitrosomethylethylamine; NDEA, *N*-nitrosodiethylamine; NPYR, *N*-nitrosopyrrolidine; NDPA, *N*-nitrosodipropylamine; NMOR, *N*-nitrosomorpholine; NPIP, *N*-nitrosopiperidine; NDBA, *N*-nitrosodibutylamine; NDPH, *N*-nitrosodiphenylamine.

well as GC-CI/MS selected ion masses chromatograms of a cooked ham sample spiked with a $10 \mu\text{g l}^{-1}$ of a standard mix of the nine NAs studied and a cooked ham sample not spiked. The results of the validation, including the equation of the calibration curve (slope and intercept), linearity (correlation coefficient), LOD, LOQ, recoveries (accuracy) and repeatability (precision), are presented in Table 3. The chromatographic response was found to be linear with a determination coefficient (R^2) greater than or

equal to 0.968 in the tested range ($0.25\text{--}1000 \mu\text{g l}^{-1}$) for all NAs. The sensitivity of the analytical method (expressed by the slope) was higher for NMEA (84.02) and lower for NDPH (28.91). The recoveries for concentration ranges of ≥ 1 to $< 10 \mu\text{g kg}^{-1}$ and ≥ 10 to $< 100 \mu\text{g kg}^{-1}$ are 60–120% and 70–110%, respectively, accepted by AOAC (2002). On this basis, the nine VNAs at concentrations 10 and $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ were within the acceptable AOAC ranges. However, high recoveries were obtained for NMOR, NDEA, NPYR and NDBA at the lowest spiked level. These results may be attributable to the fact that the final spiked concentration ($1 \mu\text{g kg}^{-1}$) was closer to the LOQ. The lower the amount of analyte present in the extract and the closer that amount is to the LOQ, the higher the chances are of obtaining results likely to interfere with the baseline value. Nonetheless, this may not affect the confidence in the method because the LOQ values found in this study were below the NA levels allowed by regulations (10 mg kg^{-1}) (USDA 2011). Herrmann et al. (2014) developed a method to quantify NAs by LC-APCI/MS/MS after extraction with acetonitrile acidified with 1% formic acid and reported a high recovery of NPYR (166%) in unfried bacon spiked with $1 \mu\text{g kg}^{-1}$, but not of NMOR. The precision, expressed as RSD (the absolute value of the coefficient of variation and expressed in percentage) was in the range of 3.2–27.7%, which is also within an acceptable range (16–32% for

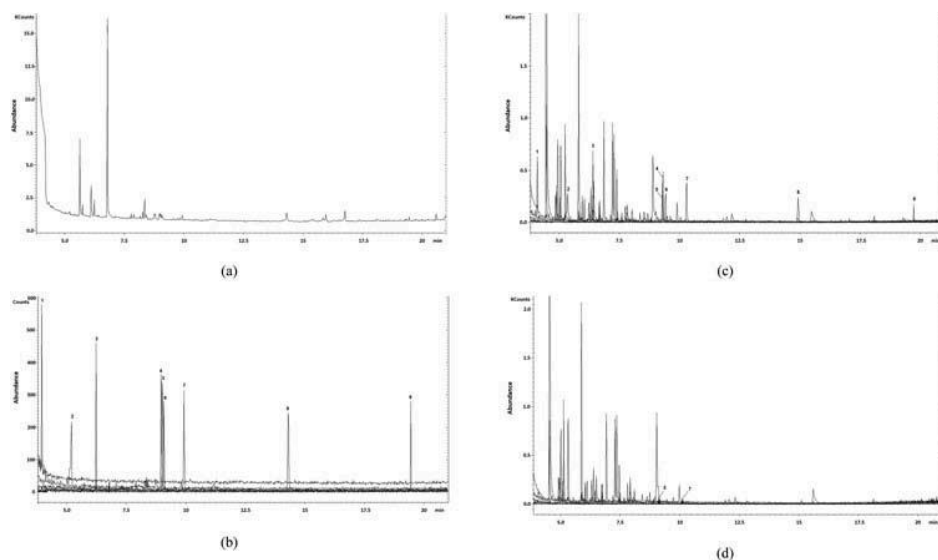


Figure 1. Gas chromatography-chemical ionisation/mass spectrometry (GC-CI/MS) chromatograms of (a) full-scan mode of standard $10 \mu\text{g l}^{-1}$, (b) selected ion masses of standard of $10 \mu\text{g l}^{-1}$, (c) selected ion masses of cooked ham sample spiked with a standard $10 \mu\text{g l}^{-1}$, and (d) selected ion masses of cooked ham sample not spiked; where: 1, *N*-nitrosodimethylamine (74.9 m/z); 2, *N*-nitrosomethylethylamine (88.8 m/z); 3, *N*-nitrosodiethylamine (102.9 m/z); 4, *N*-nitrosopyrrolidine (100.9 m/z); 5, *N*-nitrosodipropylamine (130.9 m/z); 6, *N*-nitrosomorpholine (116.9 m/z); 7, *N*-nitrosopiperidine (114.9 m/z); 8, *N*-nitrosodibutylamine (158.9 m/z); and 9, *N*-nitrosodiphenylamine (169.9 m/z).

Table 3. Validation parameters for the proposed method to determine volatile *N*-nitrosamines in cooked ham ($n = 3$).

	NDMA	NMEA	NDEA	NPYR	NDPA	NMOR	NPIP	NDBA	NDPH
Slope	82.80	84.02	56.92	65.38	67.28	48.55	67.73	68.01	28.91
Intercept	1244.7	-333.4	112.5	-180.7	-126.5	-70.5	-184.2	-152.4	-122.5
Correlation coefficient (R^2)	0.968	0.979	0.989	0.977	0.974	0.977	0.978	0.977	0.977
LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	0.24	0.24	0.19	0.26	0.15	0.18	0.26	0.18	0.37
LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	0.82	0.81	0.62	0.87	0.51	0.62	0.88	0.60	1.24
Recovery (%)	104.5 (8.4)	104.9 (3.0)	145.2 (19.9)	140.3 (3.8)	118.9 (6.4)	151.5 (12.2)	113.6 (7.3)	125.8 (0.6)	102.5 (19.8)
(RSD/%)	84.2 (20.7)	98.7 (8.6)	110.4 (27.9)	113.0 (8.1)	104.7 (11.8)	105.4 (12.2)	113.6 (7.3)	100.8 (5.7)	106.5 (9.9)
	70.5 (18.0)	79.7 (20.0)	103.5 (8.8)	89.0 (16.6)	101.0 (18.0)	98.0 (10.7)	105.2 (17.6)	90.8 (13.0)	98.6 (3.2)

Note: NDMA, *N*-nitrosodimethylamine; NMEA, *N*-nitrosomethylethylamine; NDEA, *N*-nitrosodiphenylamine; NPYR, *N*-nitrosopyrrolidine; NDPA, *N*-nitrosodipropylamine; NMOR, *N*-nitrosomorpholine; NPIP, *N*-nitrosopiperidine; NDBA, *N*-nitrosodibutylamine; NDPH, *N*-nitrosodiphenylamine; LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification; RSD, relative standard deviation.

concentrations between 1 and 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$) (AOAC 2002). Lower precision (27.9%) was found for NDEA at the fortified concentration of 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, a result that is comparable with those obtained by Herrmann et al. (2014), who reported 31% RSD for NDEA in extracts of kassler (smoked boiled pork) fortified at 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

LODs (LOD = 3 *S/N*) and LOQs (LOQ = 10 *S/N*) ranged from 0.15 to 0.37 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and from 0.50 to 1.24 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. In a study using LC-APCI/MS/MS (Herrmann et al. 2014), LODs for VNAs ranged from 0.05 to 3.3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in bacon and from 0.0 to 17.1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in salami, while LOQs ranged from 0.1 to 6.7 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in bacon and from 0.1 to 34.2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in salami. In another study, VNAs were analysed by GC-CI/MS/MS using ammonia as reagent for CI (Sannino & Bolzoni 2013), and the LOD and LOQ reported in raw mutton ranged from 0.08 to 0.11 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and from 0.24 to 0.30 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively.

Selection of extraction parameters

The extraction method used in this study was chosen by evaluating the extraction efficiencies against three different criteria: extraction solvent, sample clean-up and extract evaporation. A representation of how the extraction parameters were chosen is shown in Figure 2. The selection of these parameters was based on the recovery values of the standard that had been spiked in the cooked ham samples at the beginning of the extraction. The parameters with higher extraction efficiency were selected (highlighted in Figure 2).

Because of its extraction efficiency, dichloromethane is the official extraction solvent (AOAC 1990), although methanol (Sannino & Bolzoni 2013), acetone (Tricker et al. 1984), acetonitrile (Herrmann et al. 2014), ethyl acetate (Tricker et al. 1984), and iso-octane (AOAC 1990; EPA–U.S. Environmental Protection Agency 1996) were also used in at least one step of the extraction process or for the dilution of NA standards and extracts. The present study tested the following extraction solvents and mixtures of solvents: methanol, dichloromethane, acetonitrile, methanol/dichloromethane (50/50, v/v), dichloromethane/acetonitrile (50/50, v/v), ethyl acetate and iso-octane. Dichloromethane and acetonitrile were the most effective solvents for the extraction of VNAs in cooked ham. The extraction efficiency for NPYR, NMOR, NPIP and NDBA was similar with both of the solvents, but dichloromethane was chosen as the extraction solvent in this study because, even though acetonitrile was 1.86 times more efficient than dichloromethane for the extraction of NDPH (not considered as a carcinogen), dichloromethane was more efficient for the extraction of NDPA, NDEA, NDMA and NMEA (1.27, 2.13, 2.65

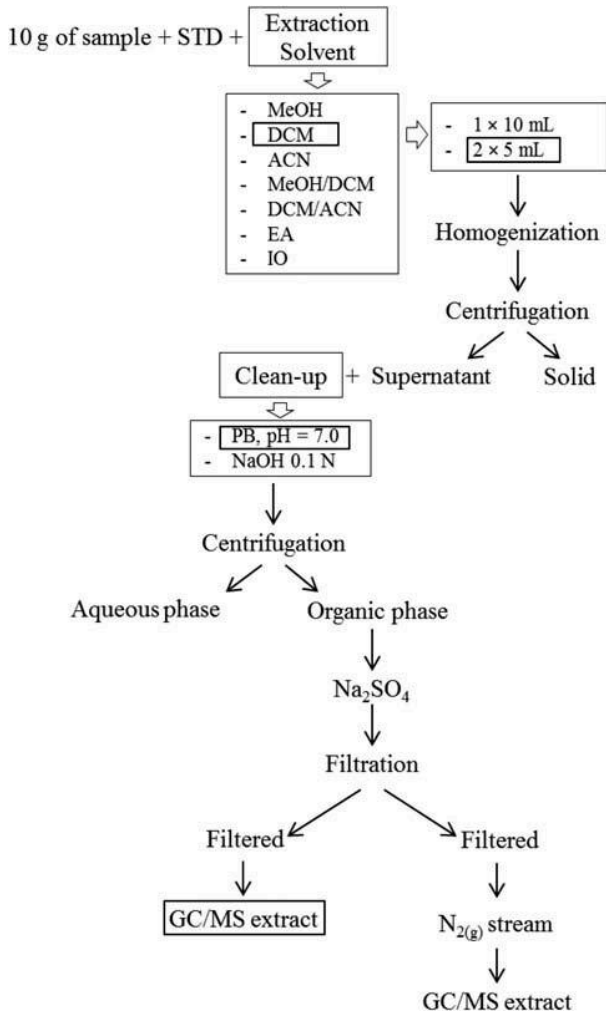


Figure 2. Schema of analytical sample preparation and selection of the extraction parameters. STD, standard; MeOH, methanol; DCM, dichloromethane; ACN, acetonitrile; MeOH/DCM, methanol/dichloromethane (50/50, v/v); DCM/ACN, dichloromethane/acetonitrile (50/50, v/v); EA, ethyl acetate; IO, iso-octane; PB, phosphate buffer 0.1 M; GC, gas chromatography; and MS, mass spectrometry.

and 6 times, respectively). These results are in accordance with the AOAC (1990) official method and with a large number of studies that used dichloromethane as extraction solvent for the determination of NAs (Massey et al. 1991; Yurchenko & Mölder 2007; Crews 2010; Ozel et al. 2010; Sannino & Bolzoni 2013).

To investigate whether other compounds present in the sample (such as lipids, peptides and amino acids) could interfere in the extraction efficiency for NAs, two cleaning solutions were tested. The first solution chosen

was 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) owing to its ability to solubilise water soluble peptides and amino acids that may be present in dichloromethane. The second solution used for the clean-up of the sample was 0.1 M NaOH owing to its basicity, which can promote the saponification and precipitation of some lipids. Unlike NaOH solution, phosphate buffer solution is not commonly used in the NAs extraction process. In the current study, the extraction efficiency for all VNAs except NDPH was higher (1.2 times) with the phosphate buffer solution, then this solution was selected. This result can be explained because of the weak acid character of these compounds, which promotes a slightly improve in their solubility in the neutral buffer solution rather than the alkaline solution. A control standard was used daily before and after analysis to evaluate any possible column or liner contamination from the sample extracts. However, the reproducibility of the control standard and the chromatographic profile were not affected after a large number of extract injections, which ensure the quality of the current GC-CI/MS analysis. As the quantification of the VNAs was performed through the selection of specific masses for each of the nine VNAs, no interference peaks from other compounds present in the sample were obtained; that fact represents an advantage of the method because no further purification steps were needed in the extraction procedure.

Many authors have used a solvent evaporation step in the extraction to concentrate the quantity of NAs in the extract (AOAC 1990; Tricker et al. 1984; Yurchenko & Mölder 2007; Ozel et al. 2010; Sannino & Bolzoni 2013; Herrmann et al. 2014). In the present study, the extract obtained after clean-up, drying over Na_2SO_4 and filtration was divided into two aliquots: one that was directly injected for chromatographic analysis, and one (5 ml) that was evaporated under nitrogen stream to 0.5 ml. Figure 3 shows that there was a loss in the amount of VNAs by concentration using nitrogen stream. Thus, the extraction process without solvent evaporation was preferred, making the method even simpler and faster compared with other methods.

Application to meat products

The optimised procedure was applied to the analysis of five different meat products; the results are shown in Table 4. In general, the amount of VNAs in the products increased during the storage period (7 days at 4°C). This result was expected once the formation of NAs can occur when residual nitrite is present in the product. An increase in NAs concentration in canned pork with storage at 5°C was also reported in the literature

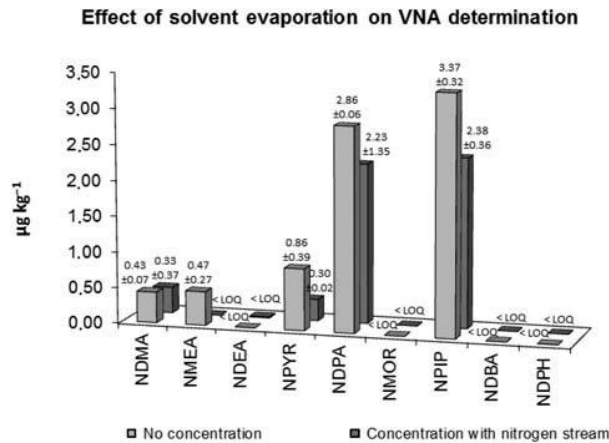


Figure 3. Concentration ($\mu\text{g kg}^{-1}$) of individual volatile *N*-nitrosamine (VNA) in cooked ham without solvent evaporation and after solvent evaporation in a nitrogen stream. NDMA, *N*-nitrosodimethylamine; NMEA, *N*-nitrosomethylethylamine; NDEA, *N*-nitrosodiethylamine; NPYR, *N*-nitrosopyrrolidine; NDPA, *N*-nitrosodipropylamine; NMOR, *N*-nitrosomorpholine; NPIP, *N*-nitrosopiperidine; NDBA, *N*-nitrosodibutylamine; NDPH, *N*-nitrosodiphenylamine; and LOQ, limit of quantification.

(Yurchenko & Mölder 2007). In the current study, the observed increases in the amounts of NDMA, NMEA, NDPA and NDBA after 7 days of storage were higher in dry sausage compared with other meat products. These differences are possibly due to the dry-curing process, in which sausage ingredients are incorporated directly (not in solution form) in the raw meat, thus allowing the nitrosating agents to be more concentrated than they are in products cured with a brine solution. In addition, dry sausages are produced by fermentation and dehydration processes, which promotes a meat product with low water activity, reduced pH and high biogenic amines content, contributing to the NAs formation reaction. Also, the comminution of meat to produce dry sausages increases the surface area, and consequently enhanced contact between the reacting species (nitrosating agents and amines present in the meat) than what is possible in ham, for example.

Comparing the cooked sausage with the dry sausage and the cooked ham with the dry ham shows that, in general, dry-cured products had higher VNA levels. In cooked products, curing ingredients are solubilised in water before they are added to or injected into the meat. Moreover, dry products undergo a dehydration process which consists in air drying. In the case of dry ham, salt and curing ingredients are deposited in the meat surface and because of the osmotic pressure difference between the external salt deposit and the meat tissue, osmotic flow is set up with efflux of water and influx solutes by diffusion. Therefore, the amount of nitrosating agents

Table 4. Mean concentration and standard deviation ($\mu\text{g kg}^{-1}$) of volatile *N*-nitrosamines found in five different meat products.

	NDMA	NMEA	NDEA	NPYR	NDPA	NMOR	NPIP	NDBA	NDPH
Day of purchase	Cooked sausage	< LOQ	< LOQ	< LOQ	3.61 ± 0.03	< LOQ	1.69 ± 0.12	1.66 ± 0.12	< LOQ
	Dry sausage	< LOQ	1.24 ± 0.02	< LOQ	1.32 ± 0.14	< LOQ	4.26 ± 0.24	0.18 ± 0.06 ^a	< LOQ
	Cooked ham	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	4.09 ± 0.53	< LOQ	< LOQ
	Dry ham	4.04 ± 0.72	0.70 ± 0.11 ^a	< LOQ	3.16 ± 0.01	< LOQ	2.04 ± 0.04	< LOQ	< LOQ
	Bologna	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.73 ± 0.15 ^a	5.64 ± 0.08	< LOQ	2.36 ± 0.37	0.28 ± 0.08 ^a
7 days after purchase (at 4°C)	Cooked sausage	0.58 ± 0.13 ^a	0.25 ± 0.04 ^a	< LOQ	< LOQ	< LOQ	1.54 ± 0.16	1.96 ± 0.27	< LOQ
	Dry sausage	5.03 ± 0.91	6.44 ± 3.31	< LOQ	2.01 ± 0.39	34.75 ± 11.55	3.79 ± 0.57	1.47 ± 0.01	< LOQ
	Cooked ham	0.43 ± 0.07 ^a	0.47 ± 0.28 ^a	< LOQ	0.86 ± 0.39 ^a	2.86 ± 0.06	3.37 ± 0.32	< LOQ	< LOQ
	Dry ham	6.55 ± 0.64	1.39 ± 0.20	< LOQ	2.66 ± 0.06	6.72 ± 1.26	1.82 ± 0.28	< LOQ	< LOQ
	Bologna	0.71 ± 0.25 ^a	< LOQ	< LOQ	0.79 ± 0.17 ^a	5.48 ± 1.11	1.50 ± 0.74	0.58 ± 0.14 ^a	< LOQ

Notes: ^aAmount between the limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ).

NDMA, *N*-nitrosodimethylamine; NMEA, *N*-nitrosomethylethylamine; NDEA, *N*-nitrosodiethylamine; NPYR, *N*-nitrosopyrrolidine; NDPA, *N*-nitrosodipropylamine; NMOR, *N*-nitrosomorpholine; NPIP, *N*-nitrosopiperidine; NDBA, *N*-nitrosodibutylamine; NDPH, *N*-nitrosodiphenylamine.

and of secondary amines are diluted in cooked products, and this may contribute to a lower final concentration of NAs in such meat products. However, cooked ham had higher concentrations of NPIP than dry ham did (4.09 ± 0.53 and $2.04 \pm 0.04 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectively), and higher levels of NDBA were found in cooked sausage than in dry sausage (1.66 ± 0.12 and $0.18 \pm 0.06 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectively). There is no clear explanation for those results.

Concentrations of VNAs found in the five meat products under study during the analysed storage period were lower than the maximum level allowed by the regulations (USDA 2011), with the exception of NDPA in dry sausage 7 days after purchase. The most abundant NA in the analysed products was NDPA (range from 1.75 to $34.75 \mu\text{g kg}^{-1}$) except in the cooked ham, where NPIP was the most abundant NA ($4.09 \pm 0.53 \mu\text{g kg}^{-1}$) followed by NDPA ($1.75 \pm 0.01 \mu\text{g kg}^{-1}$). In dry sausage, NDPA and NPIP had almost the same concentrations, 4.12 ± 0.01 and $4.26 \pm 0.24 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. Ozel et al. (2010) also reported the presence of NDPA and NPIP in sausage and salami, although at lower concentrations, ranging from 0.10 to 0.51 and from 0.10 to $0.82 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. However, other authors (Sannino & Bolzoni 2013; Herrmann et al. 2014) did not detect the presence of NDPA or NPIP in the analysed meat products.

In the current study, higher levels of NDMA ($4.04 \pm 0.72 \mu\text{g kg}^{-1}$) and NPYR ($3.16 \pm 0.01 \mu\text{g kg}^{-1}$) were found in dry ham than in the other products. In a recent study (Herrmann et al. 2014), NDMA and NPYR were the only VNAs found in smoked ham medallions (at concentrations of 2.1 and $1.3 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectively); however, only NPYR ($1.0 \mu\text{g kg}^{-1}$) was found in dry ham, and no VNAs were found in salami and pepperoni. Another study (Ozel et al. 2010) reported that NDMA and NDEA were the most abundant VNAs in sausage (0.14–1.20 and 0.10– $1.73 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectively), whereas NPIP was the most abundant in salami (0.19– $1.44 \mu\text{g kg}^{-1}$). Sannino and Bolzoni (2013) detected NDMA only in the range of 0.3– $1.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ in the various meat products that they analysed.

The NAs NDEA, NMOR and NDPH were not found in any of the analysed products, even after 7 days of storage at 4°C. These results are consistent with those of other studies in the literature (Sannino & Bolzoni 2013; Herrmann et al. 2014) that also did not detect the presence of these VNAs in many different products. A comparison between the proposed method and others used in VNAs determination (AOAC 1990; Yurchenko & Mölder 2007; Ozel et al. 2010; Sannino & Bolzoni 2013; Herrmann et al. 2014) is presented in Table 5.

Since the extraction procedure does not require many steps (such as distillation or solvent evaporation), the NAs determination method developed in this study is rendered very fast and simple that requires minimum skills of the analyst. The advantages of this procedure in addition to simplicity are: the low amount of solvent for extraction (10 ml instead of 100 ml for the official method (AOAC 1990), making the method safer for the analyst as well as the environment); and the use of a chromatographic equipment that is easily found in analytical laboratories (making the method more accessible and reproducible for other laboratories). In general, NAs quantification methods by GC-CI/MS detection produces less fragmentation than electron ionisation (EI), therefore they have better sensitivity no matter the mass analyser (ion trap or quadrupole) and the reagent (gas – such as ammonia, methane and isobutene, or liquid – such as methanol and acetonitrile) used. However, ion trap detection is ideally suited to take advantage of the headspace vapour generated by liquid reagents because lower concentrations or reactant gas are required than with quadrupole or magnetic sector instruments (Rohrbaugh 2000). Furthermore, the developed method using methanol offers a major advantage over those using ammonia: costs are reduced and the method is safer for the analyst, given the toxic characteristics of ammonia. Moreover, unlike ammonia, CI with methanol provides less ion fragmentation and do not form adducts with NAs analysed and increases the detector sensitivity and specificity.

Conclusions

A simple, accessible and reproducible method based on dichloromethane extraction and GC-CI/MS using methanol as the reagent in positive CI was successfully developed for the determination of trace amounts of nine VNAs in meat products, using a procedure that needs a low volume of organic solvent and does not require a specific apparatus or analytical equipment, contributing to the practical implementation in routine laboratories. Appropriate validation parameters such as recovery, precision, sensitivity and selectivity were obtained.

In general, an increase in the level of NAs was observed during the storage period. The most abundant NAs during the analysed storage period were NDPA and NPIP. The method proved suitable for the determination of VNAs in processed meat products and, therefore, can be a useful tool for food safety control once it assess the profile and dietary intake of NAs from foods.

Table 5. Comparison between different methods recently used for determination of volatile *N*-nitrosamines (NAs) and the current method.

Sample (g)	NAs extraction				NAs quantification				(Time, performance, cost)		Reference
	Extraction solvent	Solvent (ml)	Extract final volume (ml)	Procedure	Method	Injected volume (µl)	Amount found in meat products (µg kg ⁻¹)	Advantages	Disadvantages		
25	DCM	100	1	Steam distillation, extraction (DCM), drying (Na ₂ SO ₄), filtration, evaporation (K-D and N ₂ stream)	GC-TEA	6		Sensitive Selective	Long High volume of organic solvent	AOAC (1990)	
6	NaOH DCM	6 2 × 20	1	Extraction (NaOH), clean-up (Extrelut sorbent), elution (hexane/DCM), extraction (DCM), evaporation (water bath), clean-up (Florisil sorbent), elution (DCM/MeOH), evaporation (water bath)	GC-CI/MS	5	0.15–4.22 (NDMA) 0.18–1.17 (NDEA)	Sensitive Selective	Long High volume of organic solvent Ammonia as CI reagent gas	Yurchenko and Mölder (2007)	
6	NaOH DCM	6 2 × 20	0.1	Extraction (NaOH), clean-up (Extrelut sorbent), elution (hexane/DCM), extraction (DCM), evaporation (N ₂ stream), clean-up (Florisil sorbent), elution (DCM/MeOH), evaporation (N ₂ stream), clean-up (MeOH), evaporation (N ₂ stream)	GC×GC/ NCD	1	0.10–1.20 (NDMA) 0.10–1.73 (NDEA) 0.10–1.35 (NDPA) 0.11–7.72 (NPYR) 0.10–5.31 (NPIP) 0.15–1.68 (NDBA)	Sensitive Selective	Long High volume of organic solvent	Ozel et al. (2010)	
10	NaOH MeOH	10 20	0.5	Extraction (NaOH/MeOH), filtration, clean-up (Chem Elut), extraction (DCM), evaporation (K-D and water bath), SPE, evaporation (water bath)	GC-CI/MS	9	0.3–1.1 (NDMA)	Sensitive Selective	Long High volume of organic solvent Ammonia as CI reagent gas	Sannino and Bolzoni (2013)	
2.5	ACN (1% formic acid)	7.5	1	Extraction (acidified ACN), centrifugation (cold), evaporation (N ₂ stream), filtration (0.45 µm)	LC-APCI/MS/MS	3.5	1.3–2.0 (NDMA) 0.4–1.4 (NPYR)	Rapid Sensitive Selective	Costly equipment	Herrmann et al. (2014)	
10	DCM	10	10	Extraction (DCM), clean-up (PB, pH 7.0), centrifugation, drying (Na ₂ SO ₄), filtration (0.45 µm)	GC-CI/MS	1	0.43–6.55 (NDMA) 0.25–6.44 (NMEA) 0.73–3.16 (NPYR) 1.75–34.75 (NDPA) 1.50–4.26 (NPIP) 0.18–1.96 (NDBA)	Low volume of organic solvent Rapid Sensitive Selective	MeOH as CI reagent	Present study	

Note: DCM, dichloromethane; MeOH, methanol; ACN, acetonitrile; K-D, Kuderna-Danish concentration; SPE, solid-phase extraction; PB, phosphate buffer; GC, gas chromatography; TEA, thermal energy analysis; CI, chemical ionisation; MSD, mass selective detection; NCD, nitrogen chemiluminescence detection; MS, mass spectrometry; LC, liquid chromatography; APCI, atmospheric pressure chemical ionisation; NDMA, *N*-nitrosodimethylamine; NDEA, *N*-nitrosodiethylamine; NPYR, *N*-nitrosopyrrolidine; NDPA, *N*-nitrosodipropylamine; NPIP, *N*-nitrosopiperidine; NDBA, *N*-nitrosodibutylamine; NMEA, *N*-nitrosomethylamine; LOQ, limit of quantification.

Acknowledgements

The authors wish to thank D. Bélanger for providing technical assistance with the GC-MS equipment. The authors are also grateful to Agriculture and Agri-Food Canada (Food Research and Development Centre) for access to the infrastructure required for this study.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

The authors are grateful to the Brazilian Federal Agency for the Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES) for providing financial contributions [process number 6116-13-2]; and to Agriculture and Agri-Food Canada (Food Research and Development Centre) for providing funds required for this study.

References

- Andrade R, Reyes FGR, Rath S. 2005. A method for the determination of volatile *N*-nitrosamines in food by HS-SPME-GC-TEA. *Food Chem.* 91:173–179.
- Andrée S, Jira W, Schwind K-H, Wagner H, Schwägele F. 2010. Chemical safety of meat and meat products. *Meat Sci.* 86:38–48.
- AOAC. 1990. *N*-nitrosamines (volatile) in Fried Bacon. Mineral oil vacuum distillation – thermal energy analyzer method. No 982.22. In: Official methods of analysis of AOAC international. 15th ed. Mishawaka: AOAC International.
- AOAC. 2002. AOAC guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. Arlington: AOAC International.
- Bellatti M, Parolari G. 1982. Aliphatic secondary amines in meat and fish products and their analysis by high pressure liquid chromatography. *Meat Sci.* 7:59–65.
- Bellec G, Cauvin JM, Salaun MC, Le Calvé K, Dréano Y, Gouérou H, Ménez JF, Berthou F. 1996. Analysis of *N*-nitrosamines by high-performance liquid chromatography with post-column photohydrolysis and colorimetric detection. *J Chromatogr A.* 727:83–92.
- Bryan NS, van Grinsven H. 2013. The role of nitrate in human health. *Adv Agron.* 119:153–182.
- Bull RJ, Reckhow DA, Rotello V, Bull OM, Kim J. 2006. Use of toxicological and chemical models to prioritize DBP research. London: IWA Publishing.
- Byun MW, Ahn HJ, Kim JH, Lee JW, Yook HS, Han SB. 2004. Determination of volatile *N*-nitrosamines in irradiated fermented sausage by gas-chromatography coupled to a thermal energy analyzer. *J Chromatogr A.* 1054:403–407.
- Campillo N, Viñas P, Martínez-Castillo N, Hernández-Córdoba M. 2011. Determination of volatile nitrosamines in meat products by microwave-assisted extraction and dispersive liquid-liquid microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 1218:1815–1821.
- Cheng CF, Tsang CW. 1999. Separation of *N*-nitrosoamino acids by C_{18} reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography and compatible detection by electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 849:389–402.
- Chienthavorn O, Subprasert P, Insuan W. 2014. Nitrosamines extraction from Frankfurter sausages by using superheated water. *Sep Sci Technol.* 49:838–846.
- Crews C. 2010. The determination of *N*-nitrosamines in food. *Qual Assur Saf Crops Foods.* 2:2–12.
- Demeyer D, Honikel K, De Smet S. 2008. The World Cancer Research Fund report 2007: a challenge for the meat processing industry. *Meat Sci.* 80:953–959.
- EPA–U.S. Environmental Protection Agency. 1996. Method 8070A: nitrosamines by gas chromatography. Washington (DC): Environmental Protection Agency.
- Herrmann SS, Duedahl-Olesen L, Granby K. 2014. Simultaneous determination of volatile and non-volatile nitrosamines in processed meat products by liquid chromatography tandem mass spectrometry using atmospheric pressure chemical ionisation and electrospray ionisation. *J Chromatogr A.* 1330:20–29.
- Huang M-C, Chen H-C, Fu S-C, Ding W-H. 2013. Determination of volatile *N*-nitrosamines in meat products by microwave-assisted extraction coupled with dispersive micro solid-phase extraction and gas chromatography – chemical ionisation mass spectrometry. *Food Chem.* 138:227–233.
- Kocak D, Ozel MZ, Gogus F, Hamilton JF, Lewis AC. 2012. Determination of volatile nitrosamines in grilled lamb and vegetables using comprehensive gas chromatography – nitrogen chemiluminescence detection. *J Agric Food Chem.* 135:2215–2220.
- Massey RC, Key PE, Jones RA, Logan GL. 1991. Volatile, non-volatile and total *N*-nitroso compounds in bacon. *Food Addit Contam.* 8:585–598.
- [MSDS] Material Safety Data Sheets. 2014. [Internet; cited 2014 Aug 29]. Available from: <http://www.msds.com/>
- Oostindjer M, Alexander J, Amdam GV, Andersen G, Bryan NS, Chen D, Corpet DE, De Smet S, Dragsted LO, Haug A, et al. 2014. The role of red and processed meat in colorectal cancer development: a perspective. *Meat Sci.* 97:583–596.
- Ozel MZ, Gogus F, Yagci S, Hamilton JF, Lewis AC. 2010. Determination of volatile nitrosamines in various meat products using comprehensive gas chromatography-nitrogen chemiluminescence detection. *Food Chem Toxicol.* 48:3268–3273.
- Pegg RB, Shaidi F. 2000. Nitrite curing of meat: the *N*-nitrosamine problem and nitrite alternatives. Trumbull: Food and Nutrition Press.
- Püssa T. 2013. Toxicological issues associated with production and processing of meat. *Meat Sci.* 95:844–853.
- Ramezani H, Hosseini H, Kamankesh M, Ghasemzadeh-Mohammadi V, Mohammadi A. 2014. Rapid determination of nitrosamines in sausage and salami using microwave-assisted extraction and dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Eur Food Res Technol.* 240:441–450.
- Raoul S, Gremaud E, Baudet H, Turesky RJ. 1997. Rapid solid-phase extraction method for the detection of volatile nitrosamines in food. *J Agric Food Chem.* 45:4706–4713.
- Rath S, Reyes FGR. 2011. Nitrosamines. In: Nolle LML, Toldrá F, editors. Safety analysis of foods of animal origin. Boca Raton (FL): CRC Press.
- Rohrbaugh DK. 2000. Methanol chemical ionization quadrupole ion trap mass spectrometry of *O*-ethyl *S*-[2-(diisopropylamino)ethyl] methylphosphonothiolate (VX) and its degradation products. *J Chromatogr A.* 893:393–400.

- Sanches Filho PJ, Rios A, Valcárcel M, Melecchi MI, Caramão EB. 2007. Method of determination of nitrosamines in sausages by CO₂ supercritical fluid extraction (SFE) and micellar electrokinetic chromatography (MEKC). *J Agric Food Chem.* 55:603–607.
- Sannino A, Bolzoni L. 2013. GC/CI-MS/MS method for the identification and quantification of volatile *N*-nitrosamines in meat products. *Food Chem.* 141:3925–3930.
- Sen NP, Seaman SW, Page BD. 1997. Rapid semi-quantitative estimation of *N*-nitrosodibutylamine and *N*-nitrosodibenzylamine in smoked hams by solid-phase microextraction followed by gas chromatography-thermal energy analysis. *J Chromatogr A.* 788:131–140.
- Skibsted LH. 2011. Nitric oxide and quality and safety of muscle based foods. *Nitric Oxide.* 24:176–183.
- Terra NN. 2005. Apontamentos de tecnologia de carnes. São Leopoldo: Unisinos.
- Tricker AR, Perkins MJ, Massey RC, Bishop C, Key PE, Meweeny DJ. 1984. Incidence of some non-volatile *N*-nitroso compounds in cured meats. *Food Addit Contam.* 1:245–252.
- Tricker AR, Preussmann R. 1991. Carcinogenic *N*-nitrosamines in the diet: occurrence, formation, mechanisms and carcinogenic potential. *Mutat Res.* 259:277–289.
- [USDA] U.S. Department of Agriculture. 2011. U.S. Code of Federal Regulations, Food Safety and Inspection Service, Department of Agriculture, n. 424.22.
- Ventanas S, Martín D, Estévez M, Ruiz J. 2006. Analysis of volatile nitrosamines from a model system using SPME-DED at different temperatures and times of extraction. *Food Chem.* 99:842–850.
- Yurchenko S, Mölder U. 2007. The occurrence of volatile *N*-nitrosamines in Estonian meat products. *Food Chem.* 100:1713–1721.

3.2 Artigo 2

Artigo em fase final de revisão pelos autores para submetido à revista Food Chemistry.

Effect of carnosine on *N*-nitrosamines formation in model cured meat systems.

Effect of carnosine on *N*-nitrosamines formation in model cured meat systems

Marina Bergoli Scheeren^{a,b}, Nelcindo Nascimento Terra^a, Ernesto Hashime Kubota^a and Claude Gariépy^b

^a Department of Food Science and Technology, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

^b Food Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, Saint-Hyacinthe, QC J2S 8E3, Canada

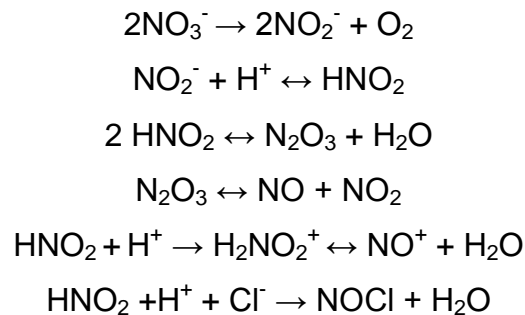
Carnosine has an impact on NO production, metabolism and activity but much remains to be revealed about the mechanisms for those physiological reactions. There is no scientific data available reporting the effect of this natural dipeptide on the *N*-nitrosamines (NAs) formation despite it might likely be an important factor for the control of NAs formation on meat products. The objective of this study was to investigate the effect of carnosine on inhibition of NAs formation and on the technological properties of cured meat products and compare with erythorbate alone or combined. Two experiments were carried out: one model system simulating meat conditions in solution (pH 5.6) and another one in meat matrix. In both experiments, a treatment containing precursor amines, nitrite and sodium chloride was considered as control. Treatments included addition of sodium erythorbate 0.05% and/or carnosine (0.45%). In the solution experiment, NAs were quantified before and after heat treatment. In the meat experiment, meat samples were cooked and stored at 4 °C in the presence of oxygen during 7 days and then pH, color, TBARS, carbonyl and NAs content were measured. The antioxidant activity of erythorbate and carnosine, with and without NaCl was also compared through their capacity to scavenge DPPH radical molecules. Sodium erythorbate presented a higher antioxidant activity than carnosine but the results for sodium erythorbate remained constant while for carnosine the antioxidant activity increased with its concentration. However, in the meat system, no differences in the level of either protein or lipid oxidation were observed among treatments and control stored in the presence of oxygen at 4 °C during 7 days, and then no effect of different antioxidants was observed. Sodium erythorbate had no effect on the final pH values on the meat samples compared to control, while addition of carnosine increased by about 0.2 pH unit. A decrease in cooking loss percentage on samples treated with carnosine was also observed. Cooked cured meat samples containing carnosine had L^* and b^* values significantly ($p < 0.05$) lower than those where the dipeptide was not added, contributing to a lighter appearance. Sodium erythorbate contributed to an increase on NAs concentration on meat samples stored during 7 days in the presence of oxygen in comparison with the control. Unlike in meat experiment, in the curing solution, erythorbate and/or carnosine with or without application of heat process significantly decreased ($p < 0.05$) NAs formation compared to the control, although the effect of sodium erythorbate alone or combined with carnosine was stronger ($p < 0.05$) than carnosine alone when heat treatment was applied.

Keywords: *N*-Nitrosamines, carnosine, erythorbate, antioxidants, cured meat products.

INTRODUCTION

Meat is an ideal medium for microbial growth and spoilage because of its favorable pH, high amount of moisture, nitrogenous compounds (such as amino acids, peptides and proteins) and minerals. Salt has been used to preserve meat since ancient times, but it became evident only in the 19th century that the nitrate present as a contaminant in salt had a significant role in the inhibition of microorganisms. Meat curing with appropriate ingredients enables better use of this

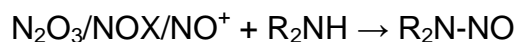
protein source through the production of a variety of meat products with distinct flavours, and improved shelf-life and safety. Potassium and sodium salts of nitrite and nitrate are commonly added with sodium chloride in curing mixtures. Nitrite can be formed by microbial or enzymatic reduction from nitrate, which is added in specific meat products. Nitrous acid formed from nitrite in an acidic environment (meat pH = 5.6) can form its anhydride (N_2O_3), which is in equilibrium with the oxides NO and NO_2 . With increasing salt concentration nitrous acid may transform into nitrosyl chloride (SCHEEREN et al., 2015; SKIBSTED, 2011; PEGG; SHAIDI, 2000; TERRA, 2005) (reactions below):



Nitrite and specially nitric oxide (NO) formed in curing reactions in meat can inhibit the growth of *Clostridium botulinum*, retard lipid oxidation, and confer to cured meats their characteristic colour, taste and aroma (TOLDRÁ, 2010).

In spite of these advantages of curing, controversies surround the safety of cured meat products. Numerous studies have shown that the reaction of secondary amines with nitrosating species such as NO^+ and N_2O_3 formed from residual nitrite lead to the formation of *N*-nitrosamines (NAs), which may exhibit potential genotoxicity and increase the risk of gastric and colorectal cancer (OOSTINDJER et al., 2014; BRYAN; VAN GRINSVEN, 2013; PÜSSA, 2013; ANDRÉE et al., 2010). The chemistry of nitrosation is complex and shows a dependency on the pH, temperature and the presence and basicity of secondary amines (PEGG; SHAIDI, 2000). The dependency on the pH is related to the formation of nitrosating agents. At low pH, the formation of nitrosating agents like protonated nitrous acid (H_2NO_2^+), nitrogen trioxide (N_2O_3) or nitrosyl halogenides (NOX) is stimulated whereas the concentration of non-protonated amine is decreased. Therefore lightly basic amines like morpholine (pKa=8.7) are nitrosated more rapidly than strongly basic amines like dimethylamine (pKa=10.7). The ion NO^+ is produced in more acidic conditions but

metal ions are also engaged to form NO^+ (ANDRÉE et al., 2010). According to Andrée et al. (2010), the most common volatile NAs formed in meat products are *N*-nitrosodimethylamine, *N*-nitrosopiperidine and *N*-nitrosopyrrolidine. The representation of the NAs reaction formation from a secondary amine is presented in the following reaction:



A press release published by the World Health Organization (WHO) in 2015 caused confusion and worries worldwide in associating meat and particularly processed meat products consumption with small increases in the risk of cancer based on information reviewed by the International Agency for Research on Cancer (IARC). In the reviewed studies, the risk generally increased with the amount of meat consumed. An analysis of data from 10 studies estimated that every 50 gram portion of processed meat eaten daily increases the risk of colorectal cancer by about 18%. According to IARC, red meat was classified as “probably carcinogenic to humans” (Group 2A) while processed meat has been classified as “carcinogenic to humans” (Group 1), sharing the same category as tobacco smoking and asbestos (WHO, 2015).

In order to reduce the risks caused by processed meat consumption, studies have been increasingly conducted to find alternatives for controlling the formation of NAs in meat products. The utilization of non-meat ingredients that, by nature, have high nitrate content has been proposed to avoid the direct addition of nitrite to meat products (OLMEDILLA-ALONSO; JIMÉNEZ-COLMENERO; SÁNCHEZ-MUNIZ, 2013; WEISS et al., 2010), in spite of potentially higher amounts of nitrate in vegetal-based extracts than the concentration of nitrate and nitrite salts normally added for curing meat products. Furthermore, an extraction of further residues and contaminants from the vegetables and as a consequence higher contamination levels of the meat product can not be excluded (ANDREE et al., 2010; HONIKEL, 2008).

In spite of numerous attempts, no adequate alternatives to totally replacement of nitrite has been found so far. The many different effects that addition of nitrite has on the metabolism of food pathogens are the key reason why the compound is so effective and only small concentrations of nitrite are sufficient to cause a broad spectrum inhibition of food pathogens. The inhibition of bacteria by nitrite has been

attributed to a variety of different mechanisms including the inhibition of oxygen uptake, oxidative phosphorylation and proton-dependent transport (WEISS et al., 2010). Nitrite was also found to inhibit a number of enzymes that are essential to the metabolism of bacteria such as aldolase. Moreover, nitrite generally causes a breakdown of the proton gradient in bacteria needed to generate ATP. Since nitrite acts on multiple sites simultaneously, it is very difficult for food pathogens or food spoilage organisms to adapt to its presence. Added to this, the antioxidative and curing flavor forming effects of nitrite is also the reason why nitrite is so difficult to replace as a preservative (OLMEDILLA-ALONSO; JIMÉNEZ-COLMENERO; SÁNCHEZ-MUNIZ, 2013; ANDRÉE et al., 2010; WEISS et al., 2010; DAVIDSON; SOFOS; BRANEN, 2004).

Another important concern in the food industry is about oxidation reactions. Lipid and protein oxidation can cause heavy losses for the meat industry due to the decreasing its nutritional and sensory value and contributing for the formation of toxic compounds for the human (TERRA et al., 2008). In the past few decades, ascorbic acid or its salts, has been used in cured meat batters also due to its important role as antioxidant by several mechanisms including free radicals scavenging, transition metals chelating and reducing activities, avoiding the lipid oxidation (TANNENBAUM; WISHNOK; LEAF, 1991), but it can also act as a coadjutants in cure. Curing of meat is most significantly recognized by the colour changes as the fresh red meat or meat batter initially turns brown (metmyoglobin). Ascorbic acid acts simultaneously with the curing salts to form and maintain the specific color of the cured meat products due to its ability to react with nitrite and nitrous acid to form NO and HNO, which are the main nitrosating agents for metmyoglobin (SKIBSTED, 2011). More recently, it was observed that ascorbate can also lower the NA content in meat products and it may be attributed to its ability to reduce HNO₂, N₂O₃ and NO⁺ to NO (SKIBSTED, 2011; TANNENBAUM; WISHNOK; LEAF, 1991).

Carnosine is a natural dipeptide composed of β-alanine and L-histidine that has been correlated to numerous examples of positive actions including important protection against oxidation. Discovered in 1900 as an abundant non-protein nitrogen-containing compound of meat, this dipeptide is found in skeletal muscle from different species like pork, beef, turkey, salmon, rabbit, chicken, among others. Primarily anaerobic muscles have higher carnosine concentrations than do aerobic muscles. It has been suggested that the antioxidant mechanism of carnosine is due

to its metal-ion chelation or free radical scavenging. The hydrophilic nature of carnosine is probably significant for its antioxidative activity because many of the lipid peroxidation catalysts and free radicals are found in the cytosol. Other possible biochemical functions of carnosine include pH-buffering, immunostimulant, carbonyl scavenger, and antiglycation. The biochemical properties of this dipeptide leads to its numerous positive physiological roles such as prevention against a variety of injuries mediated by discrete entities (oxygen free radicals, reactive nitrogen species, glycating agents, deleterious aldehydes, toxic metal ions) as well as to protect against formation of advanced glycation and lipoxidation end-products and ameliorate conditions associated with aging (BOLDYREV; ALDINI; DERAIVE, 2013). Carnosine has been shown to protect various cells against ischemia–reperfusion injury, for example in rat liver, kidney, heart, and brain. Protective activity exerted by carnosine has also been evidenced with respect to diabetes, osteoporosis, neurodegeneration, loss of vision, and hearing and immune function. Powerful anti-inflammatory and wound healing effects and anti-stress and immunomodulating actions have also been clearly demonstrated. For these reasons, the therapeutic potential of carnosine supplementation has been tested in numerous diseases in which ischemic or oxidative stress are involved (BOLDYREV; ALDINI; DERAIVE, 2013; QUINN; BOLDYREV; FORTNAZUYLCL, 1992).

In addition, several studies have also been reported on the ability of carnosine to impact on NO production, metabolism and activity. Some paths for those physiological reactions were suggested so far, but its mechanisms are still not clearly understood and much remains to be revealed. There is still an apparent contradiction in the literature, as some studies have shown a stimulating effect of carnosine towards NO production, while some others point to a direct or indirect inhibitory mechanism (BOLDYREV; ALDINI; DERAIVE, 2013; HIPKISS, 2009). Considering its physiological roles on NO regulation in the organism, carnosine might likely be an important factor for the control of NAs formation on meat products, but to the best of our knowledge, there is no scientific data available reporting the effect of this natural dipeptide on the NAs formation. Most of the researches conducted in increasing carnosine concentration in meat are related to its antioxidant capacity to protect against lipid oxidation and to reduce metmyoglobin, preserving the color of fresh meat (ALIANI et al., 2013; DAS; ANJANEYULU; BISWAS, 2006; LEE; HENDRICKS; CORNFORTH, 1999). Therefore, the idea of investigating the effect of a natural and

non-toxic dipeptide, known for its antioxidant activity and other numerous beneficial functions for health including NO regulation, on the control of carcinogenic compounds formation in food seems to be a very promising challenge and can be very useful for public health and also from a meat technological point of view. Therefore, the purpose of this study was to evaluate the effect of the addition of carnosine on the inhibition of NAs formation and on the technological properties of cured meat samples comparing with a common antioxidant used on meat industry (sodium erythorbate) alone or combined in model cured meat systems.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals and reagents

A standard mix containing 2000 µg/mL of nine volatile NAs (EPA8270/Appendix IX Nitrosamines Mix) was obtained from Sigma Aldrich (Sigma Aldrich Oakville, ON, Canada). Carnosine used as standard for carnosine quantification analysis, sodium chloride, sodium erythorbate, sodium nitrite, citric acid, sodium citrate, sodium phosphate monobasic, sodium phosphate dibasic, sodium sulphate, ammonium acetate, 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH), trichloroacetic acid (TCA), 2-thiobarbituric acid (TBA), 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TEP), guanidine, 2,4-Dinitrophenylhydrazine (DNPH), butylated hydroxytoluene (BHT), bovine serum albumin (BSA), ethyl acetate and all the precursor amines (dimethylamine - DMA, methyl-ethylamine - MEA, diethylamine - DEA, pyrrolidine - PYR, morpholine MOR and piperidine - PIP) were also purchased from Sigma Aldrich (Sigma Aldrich Oakville, ON, Canada). Carnosine (98 - 99% of purity) used for the experiments and for antioxidant activity analysis, were obtained from Honson Pharmatech Group (Toronto, ON, Canada). HPLC-grade dichloromethane HPLC-grade ethanol, residue-grade methanol, chloroform and hydrochloric acid (HCl) were obtained from VWR (VWR, Toronto, ON, Canada). Acetonitrile was obtained from Fisher Scientific (Fisher Scientific, Toronto, ON, Canada).

Organization of the study

Due to the absence of scientific information about the effect of carnosine on the control of NAs formation, the current research was developed in two steps (as shown in Figure 1): the first one aimed to evaluate the direct effect of carnosine on NAs formation using a model system with meat pH (5.6) solution system; and the second was carried out in raw meat with the objective to consider the matrix effects that could affect the performance of carnosine in the reaction. In both experiments, a treatment without antioxidant addition was considered as a control and other treatments included: addition of carnosine, addition of sodium erythorbate and addition of a combination of both.

The amount of ingredients used either in the solution or in the meat experiments was based on the concentrations normally used in the meat industry. The added amount of carnosine in both experiments (4.5 g/L or g/kg) was arbitrarily chosen considering the average amount actually found in commercial swine *Longissimus dorsi* muscle (around 3.0 g/kg) (MORA; SENTANDREU; TOLDRÁ, 2008) altogether with the large variability reported not only between species (BOLDYREV; ALDINI; DERAIVE, 2013) but also within swine breeds and animals (D'ASTOUS-PAGÉ et al., 2015; PALIN et al., 2016), showing potential for genetic improvement of the carnosine content in pigs. The precursor amines concentration in the range of mg/L or mg/kg in the solution and meat experiments, respectively, was chosen to ensure the NAs formation considering the complexity of the chemistry involved in this reaction.

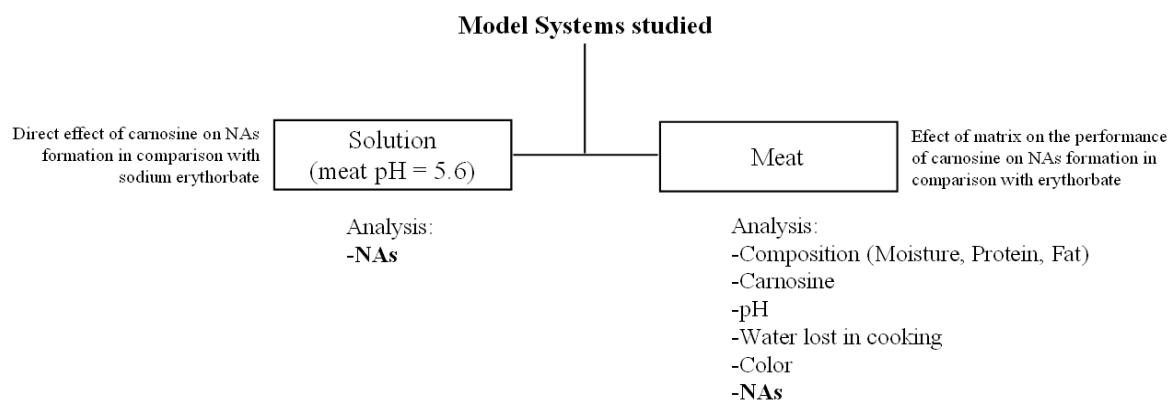


Figure 1 - Schema of the study organization and development.

N-Nitrosamines formation in model meat cured product system in solution

For this essay, two solutions were prepared. Solution 1 contained 20 mg/L of each precursor amine (DMA, MEA, DEA, PYR, MOR and PIP) diluted in deionized water. In order to create cured meat products conditions in solution, solution 2 was prepared by adding 4.5% of NaCl, and 0.5 g/L of NaNO₂ in 0.1 M citrate buffer solution, pH 5.6 as well as sodium erythorbate (ERY) and carnosine (CAR) for some treatments. There were 4 groups of treatments including: NO₂⁻ + NaCl (no addition of ERY or CAR), NO₂⁻ + NaCl + ERY (with 1 g/L ERY and no CAR), NO₂⁻ + NaCl + CAR (with no ERY and 9 g/L CAR) and NO₂⁻ + NaCl + ERY (with 1 g/L ERY and 9 g/L CAR). The pH of test solutions was adjusted after the addition of ingredients to avoid interferences in NAs formation due to differences in pH values. Both solutions (1) and (2) were mixed in equal volume (1:1, v:v) and the final concentration for each treatment is shown in Table 1.

These four essays were divided in two aliquots performed without heating and also heated (75 ± 1 °C during 15 minutes) (Microprocessor Controlled 280 Series water bath, Precision) to simulate cooked and uncooked meat products found to consumption, totalizing eight different treatments (Table 1) and the entire experiment was repeated 3 times.

Table 1 - Total concentration of ingredients and use of heat process in different treatments of model cured product system in solution.

Treatments	PA mg/L	NaCl %	NaNO₂ g/L	ERY g/L	CAR g/L	Heat Treatment
NO ₂ ⁻ + NaCl	10	2.25	0.25	--	--	--
	10	2.25	0.25	--	--	YES
NO ₂ ⁻ + NaCl + ERY	10	2.25	0.25	0.5	--	--
	10	2.25	0.25	0.5	--	YES
NO ₂ ⁻ + NaCl + CAR	10	2.25	0.25	--	4.5	--
	10	2.25	0.25	--	4.5	YES
NO ₂ ⁻ + NaCl + ERY + CAR	10	2.25	0.25	0.5	4.5	--
	10	2.25	0.25	0.5	4.5	YES

PA: precursor amines; ERY: sodium erythorbate; CAR: carnosine.

N-Nitrosamines formation in model meat cured product system in real matrix (meat)

The meat used in the current experiment was purchased in a local market (Olymel, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada). In order to eliminate any interference of a possible fat oxidation in the NAs formation, pork *Longissimus dorsi* (LD) muscle was chosen for this study due to its low fat content. All the meat experiment was conducted in 4 °C room. The fat and connective tissue were removed from LD and the muscle was chopped into small pieces with a stainless steel knife, minced (3.5 mm, grinder PM-114L, Mainca) and mixed (Double-action mixer 1000DA70, Lel and Southwest) for 5 minutes. At this point, a subsample was collected and used for analysis of moisture, protein, fat and carnosine content and the remaining meat batch was divided in three portions (one for each of the three repetitions) and each portion (around 4.00 kg) was packed individually under vacuum (Sipromac, model 550 A), frozen at -20 °C and stored at this temperature until the moment of the performance of each repetition essay. The frozen meat was placed at 4 °C 48 hours before the essay to ensure slow and complete thawing.

To guarantee the experiment homogeneity, all the ingredients were previously weighted based in a fixed amount of meat (Table 2) and the meat was premixed manually with a solution containing the precursor amines (DMA, MEA, DEA, PYR, MOR and PIP) dissolved in 50% of the total deionized added water. For this study, each precursor amine was added in a total of 20 mg/kg of meat. The remaining water (other 50%) was used to dissolve the sodium nitrite and this nitrite solution was added with the other ingredients (according to Table 2) directly in the meat and the mixture was homogenized manually for 5 minutes.

Table 2 - Total concentration of ingredients used in model cured product system in meat.

Treatments	H₂O g/kg	NaNO₂ g/kg	NaCl g/kg	ERY g/kg	CAR g/kg
NO ₂ ⁻ + NaCl	50	0.2	22.5	--	--
NO ₂ ⁻ + NaCl + ERY	50	0.2	22.5	0.5	--
NO ₂ ⁻ + NaCl + CAR	50	0.2	22.5	--	4.5
NO ₂ ⁻ + NaCl + ERY + CAR	50	0.2	22.5	0.5	4.5

ERY: sodium erythorbate; CAR: carnosine.

The mixture was covered to protect against light and kept at 4 °C during 2 hours (to ensure that the cure process would succeed) and then placed in polyethylene containers (hermetically closed). The containers were placed in a vapor cooking chamber (Sipromac, Fluke) and the cooking was carried out until the internal

temperature in the mixtures had reach 72 °C. Inside the chamber, a cold water shower rapidly cooled down the temperature inside the containers which were kept at 4 °C overnight. The meat products were then removed from the containers, weighted (for the evaluation of cooking loss) and submitted to pH and color analysis before being sealed in the presence of 90% of atmospheric air. Considering that previous study showed increase in NAs concentration after a week storage of different cured meat products (SCHEEREN et al., 2015) and with the purpose to ensure NAs formation, in the current study the meat products obtained after cooking were sealed in presence of oxygen and stored at 4 °C during 7 days. After this storage period, the final products were sealed under vacuum and kept at -20 °C until the moment of the NAs and oxidation analysis. The entire experiment was repeated 3 times in 3 different days.

Analysis

Chemical composition (moisture, protein and fat) analysis and carnosine measurements in fresh meat were performed in triplicate. Analysis of cooking loss, pH and color were conducted in triplicate in samples after cooking process. Determination of NAs and the level of oxidation of fat and proteins were carried out in duplicate in cooked samples after 7 days of storage in the presence of oxygen (90% of atmospheric air) at 4 °C.

Chemical composition

Moisture

Moisture was determined by difference on the weight of the fresh meat samples before and after drying process through liofilization (FTS Systems, Dura-Dry™), where the water present in the dried frozen sample (-40 °C) is eliminated by direct conversion from the solid to gas state due to gradual rise in temperature under vacuum conditions in the chamber.

Moisture content in the fresh meat was calculated as:

$$\text{Moisture (\%)} = 100 \times (S_{FM} - S_D) / S_{FM}$$

Where S_{FM} is the weight of the fresh meat sample and S_D is the weight of the dried sample.

Protein

Protein determination was performed according to AOAC (1995) by combustion method through the measure of total organic nitrogen contained in 50 mg of dried sample (Elementar, Vario Max Cube). Calibration of the instrument was conducted using EDTA as a theoretical % nitrogen standard. The nitrogen released at high temperature was measured by thermal conductivity and was converted to protein equivalent by using the factor 6.25.

Crude protein content in fresh meat was calculated as:

$$\begin{aligned} \text{Crude protein in dried meat (\%)} &= \% \text{ nitrogen} \times 6.25 \\ \text{Crude protein in fresh meat (\%)} &= P_D \times (100 - M)/100 \end{aligned}$$

Where P_D is the % of protein in dried meat and M is the % of moisture.

Fat

Analysis of fat content was conducted in the dried meat according to AOAC (1995). Two grams of dried meat samples were weighted as well as cups where the extract get accumulated. Organic solvent (60 mL of chloroform:methanol, 2:1, v:v) was added and high temperature solvent extraction (submersion) was conducted using a Soxhlet apparatus (Velp Scientifica, SER 148 Solvent Extractor). The solvent was recovered by condensation and the extracted soluble material remained in the cup was determined by weight after drying in an oven (125 °C during 30 minutes).

Fat content in fresh meat was calculated as:

$$\begin{aligned} \text{Fat in dried meat (\%)} &= ((C_A - C_B) \times 100)/S_D \\ \text{Crude protein in fresh meat (\%)} &= F_D \times (100 - M)/100 \end{aligned}$$

Where C_A is the weight of the cup after drying and C_B is the weight of the cup before the extraction, S_D is the weight of the dried meat sample, F_D is the % of fat in dried meat and M is the % of moisture.

Carnosine

Carnosine was quantified in fresh pork meat samples according to the method adapted from Mora; Sentandreu; Toldrá (2008). For the extraction, 6 mL of 0.01 N HCl were added to 2 g of sample and the mixture was vortexed for 15 seconds at 2625 rpm (Fisher Scientific, Digital Vortex Mixer) and then placed on an orbital shaker during 15 minutes at 60 rpm and tilt angle 20° (MBI LabEquipment, LabRoller II). After homogenization, the samples were centrifuged for 20 minutes at $12,000 \times g$ and $4^\circ C$ (Centrifuge 5810 R, Eppendorf). The supernatant fraction was filtered through glass wool, and 750 μL of acetonitrile were mixed with 250 μL of this extract to deproteinization. Mixtures were vortexed and held at $4^\circ C$ for 20 minutes before centrifugation at $10,000 \times g$ for 10 min.

Determination of carnosine was performed by high pressure liquid chromatography (HPLC) using HPLC (Varian) equipped with an autosampler (V717 Plus Autosampler), a controller (600 Controller) and photodiode array detector (2996 Photodiode Array Detector). An injection volume of 20 μL of deproteinized supernatant fluid was pumped through an Atlantis HILIC silica column (4.6×150 mm, 3 μm ; Waters Corporation, Milford, MD). Solvent A consisted of 10 mM ammonium acetate in water/acetonitrile (25:75, vol/vol) with the pH at 5.5. Solvent B consisted of 10 mM ammonium acetate in water/acetonitrile (70:30, vol/vol) also with pH 5.5. Solvent flow rate was set at 1.4 mL/min and the solvent gradient was set in 100% solvent A during 9.1 minutes and then it went to 70% solvent B in 1 minute, with a return to 0% solvent B in 2 min followed by re-equilibration at initial conditions for 10 minutes. The detection was performed in a wavelength set at 210 nm. Sample peak areas were correlated to standard curves of carnosine for quantification.

Antioxidant activity

The DPPH radical-scavenging activity of sodium erythorbate and carnosine (both in presence and absence of sodium chloride) was evaluated according to the

modified method used by Marušić; Aristoy; Toldrá (2013) and was carried out in triplicate.

Seven different concentrations ranging from 0.1 to 20 mg/L were prepared for each antioxidant in deionized water and also in a solution of deionized water containing 2.25% of sodium chloride. 100 μ L of each sample solution was mixed in a 96 well cell culture plate with flat bottom (Costar 3596) plate with 100 μ L of methanol and 25 μ L of a DPPH solution (0.02% in methanol). The mixtures were incubated for 60 minutes in the dark at room temperature, and the reduction of DPPH radicals was measured at 517 nm (spectrophotometer Eon, Biotek Instruments). A control where the sample without sodium chloride was replaced by deionized water was conducted in the same manner, as well as a control where the sample with sodium chloride was replaced by deionized water containing 2.25% of sodium chloride.

DPPH radical-scavenging activity was calculated as:

$$\text{DPPH radical-scavenging activity (\% of inhibition)} = 100 \times (\text{absorbance of Control} - \text{absorbance of sample}) / \text{absorbance of control}$$

pH and Cooking loss

pH was determined by dipping a combined glass electrode of a digital pH meter (SympHony, SB 80 PI) into the meat samples after cooking treatment. Water loss during cooking was determined by difference on the weight of the samples before and after cooking process and it was calculated as:

$$(\%) = 100 \times (S_{BC} - S_{AC}) / S_{BC}$$

Where S_{BC} is the weight of the sample before cooking and S_{AC} is the weight of the sample after cooking.

Color

Objective color measurements were taken on the different treatments of cured meat after cooking process (day 0) using a colorimeter (Minolta – Chroma Meter CR 300) with the CIE Lab scale providing visual hue and saturation values where L^*

values vary from 0 (black) to 100 (white), positive a^* values indicate red while negative a^* values indicate green and positive b^* values indicates yellow and negative b^* values indicates blue.

N-Nitrosamines

The extraction of NAs for the essays in solution was carried out through a liquid-liquid extraction with dichloromethane, where 1 mL of the buffer solution containing the formed NAs was extracted twice with 500 μ L of the organic solvent, totalizing 1 mL. Then, dichloromethane was dried with sodium sulphate and the extracts were submitted to chromatographic analysis for the quantification of NAs.

A method proposed by Scheeren et al. (2015) was employed for the NAs extraction in the cured meat treatments after 7 days of storage. Sample (10 g) was placed in a 50-mL glass tube, and 5 mL of dichloromethane were added. The mixture was homogenized with a vortex mixer (Vortex Genie 2 12-812, Fisherbrand; Allied Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) for 1 minute and then centrifuged for 10 minutes (1000 rpm; Dynac II Centrifuge; Clay Adams, Fisher Scientific). The supernatant was transferred with a Pasteur pipette (9", Fisherbrand; Fisher Scientific) to a 20-mL glass tube. Another 5 mL of dichloromethane were added, and the homogenisation and centrifugation steps were repeated. The supernatant obtained from this second extraction was transferred into a 20-mL glass tube (both supernatants were pooled together), and then 5 mL of 0.1 M phosphate buffer solution (pH 7.0) were added. The samples were vortexed and centrifuged (2000 rpm; Allegra 6R centrifuge; Beckman Coulter, Mississauga, ON, Canada) to achieve good separation of both phases, aqueous and organic. The solvent (in the lower part of the tube) was carefully removed and transferred to another glass tube. Any drop of aqueous solution remaining was dried with sodium sulphate, and then the solvent was transferred to a syringe (10-mL syringe, Luer-Lok Tip; BD, Franklin Lakes, NJ, USA) and filtered (13 mm, 0.45 μ m, PTFE; Chromatographic Specialities Inc., Brockville, ON, Canada).

The analysis was performed by gas chromatography-methanol chemical ionisation/mass spectrometry (GC-CI/MS) using a Varian model 3800 GC system (Varian Instruments, Palo Alto, CA, USA) according to the method proposed by Scheeren et al. (2015). Samples (1 μ L) were injected with an autosampler

(MultiPurposeSampler MPS 2; Gerstel, Baltimore, MD, USA) into a 1078/1079 split/splitless injector using a 10- μ L syringe and a suitable glass liner (Split/Splitless Tapered FocusLiner, 3.4-mm inner diameter; SGE, Austin, TX, USA). The injector temperature was set at 300°C. The split mode was kept closed during the first 2 minutes, and then it was turned on and held at 10:1. Separations were performed on a Factor Four VF-5ms column (5% phenyl/95% dimethylpolysiloxane, equivalent to DB-5ms; Varian, Mississauga, ON, Canada) measuring 30 m by 0.25 mm with a film thickness of 0.25 μ m. The column was held at 35 °C for 2 minutes after injection and then programmed at a rate of 12 °C/min to 100 °C, followed by 2 °C/min to 115 °C, and finally 20 °C/min to 280 °C (held for 5.4 minutes). The solvent delay time was 3 minutes, and the total GC run time was 28.6 minutes. Ultra-high-purity 5.0-grade helium (Praxair Canada Inc., Mississauga, ON, Canada) was used as carrier gas with a constant flow rate of 1.2 mL/min. Detection was carried out by MS equipped with ion trap (Saturn 2000; Varian, Palo Alto) in positive mode, using methanol as reagent for CI. The temperatures of the trap and transfer line were set to 150 and 220 °C, respectively. The NAs were identified on the basis of their retention time and their selected ion mass $[M + 1]^+$ (where M represents each molecular weight of NAs individually). Sample peak areas were correlated to standard curves of NAs for quantification.

Statistical analysis

The results of the analysis were expressed as mean \pm standard deviation. Statistical analysis was carried out using Statistical Analysis System (SAS, Release 9.3, 2002, SAS Institute Inc., Cary, NC). Differences between means were analyzed using analysis of variance (ANOVA) and multiple comparisons were corrected by Tuckey at the 5% level of significance.

RESULTS AND DISCUSSION

Chemical composition and carnosine

Results for moisture, proteins and fat were $73.17 \pm 0.10\%$, $23.46 \pm 0.32\%$ and $4.27 \pm 0.02\%$, respectively. The amount of carnosine obtained in the fresh meat was

2.94 ± 0.27 g/kg. These results are consistent with the literature for the muscle cut (pork *Longissimus dorsi* muscle) used in this study (HIPKISS, 2009; MORA; SENTANDREU; TOLDRÁ, 2008; ORDÓÑEZ, 2005).

Antioxidant activity

Both carnosine and ascorbic acid are well-known antioxidants. In the current study, antioxidant activity of carnosine was compared to sodium erythorbate in the absence and presence of NaCl by the capacity of scavenging DPPH radical. Results presented in Figure 2 showed that sodium erythorbate had higher antioxidant capacity than carnosine for each of the seven concentrations studied (0.1 to 20 mg/mL). The percentage of inhibition of DPPH free radical by carnosine however appeared to increase with its concentration in the solution with and without addition of NaCl (0.00 - 53.60% and 0.14 - 65.10%, respectively) while sodium erythorbate was constant (77.78 - 78.75% and 75.90 - 78.91%, respectively). Results presented by Marušić; Aristoy; Toldrá (2013) also showed an increase on the antioxidant capacity of carnosine with its concentration, reaching almost 60% of DPPH activity on 25 mM (around 5.6 mg/mL) and becoming constant at higher concentrations.

Unlike sodium erythorbate, the antioxidant capacity of carnosine was negatively affected ($p < 0.05$) by NaCl from a concentration of 7.5 mg/mL. Sodium erythorbate at a concentration of 0.5 mg/mL (representing 0.5 g/L used in the experiment in solution and 0.5 g/kg used on the experiment on meat), showed 76.98% of inhibition in the presence of NaCl, while carnosine at 4.5 mg/mL (representing 4.5 g/L used in the experiment in solution) had an antioxidant activity of 21.51% and 28.37% at 7.5 mg/mL (representing 7.5 g/kg used in the experiment on meat).

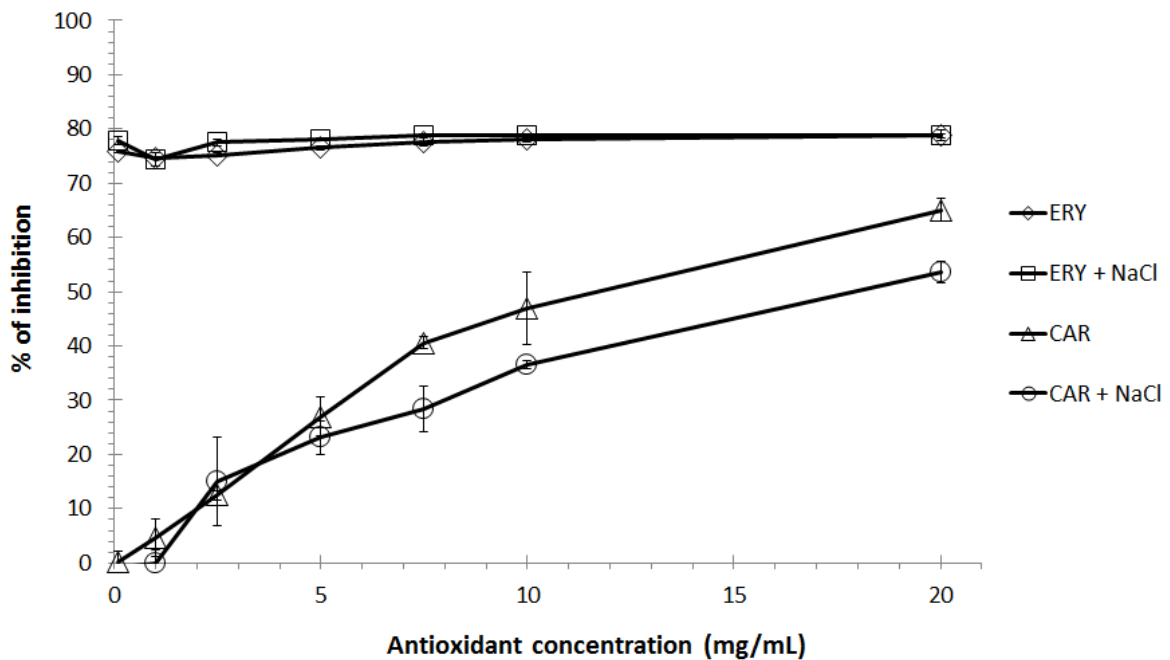


Figure 2 - Antioxidant activities of sodium erythorbate and carnosine with and without NaCl, expressed in terms of % inhibition of DPPH radical.

Sodium erythorbate and carnosine may inhibit oxidation of meats by several mechanisms including their reducing activity, free radicals scavenging and transition metals chelating activity (KOHEN et al., 1988; KOHEN; MISGAV; GINSBURG, 1991; NIKI, 1991; CHAN et al., 1994; LEE; HENDRICKS; CORNFORTH, 1998).

Antioxidant activity of ascorbic acid may depend on its concentration in a model system. In a study carried out by Lee; Hendricks (1997), the antioxidant or prooxidant activity of ascorbic acid depended on the concentration of ascorbic acid and Fe(III) in a linoleic acid micelle system. In the presence of 100 mM Fe(III), ascorbic acid showed an antioxidant activity at high concentrations while at low concentrations it showed a prooxidant activity. The high concentrations of ascorbic acid probably reduced all the added Fe(III) to Fe(II), thereby restricting the redox activity of iron.

pH and cooking loss

Results obtained for pH and water loss in cooking are presented in Table 4. The carnosine amount was calculated based on the level measured in the fresh meat and on the quantity of other ingredients added in each treatment as part of the

experiment (2.85 ± 0.26 g/kg for $\text{NO}_2^- + \text{NaCl}$, 2.85 ± 0.27 g/kg for $\text{NO}_2^- + \text{NaCl} + \text{ERY}$, 7.34 ± 0.26 g/kg for $\text{NO}_2^- + \text{NaCl} + \text{CAR}$ and 7.34 ± 0.27 g/kg for $\text{NO}_2^- + \text{NaCl} + \text{ERY} + \text{CAR}$). Due to the high water-solubility of the dipeptide, only the results before cooking were considered, because of its uncertain concentration in the water lost during the heat process.

Table 3 - pH and cooking loss (%) in different treatments of model cured product system in meat.

Treatments	pH	Cooking loss %
$\text{NO}_2^- + \text{NaCl}$	6.00 ± 0.05^b	4.09 ± 0.55^a
$\text{NO}_2^- + \text{NaCl} + \text{ERY}$	6.01 ± 0.06^b	4.23 ± 1.18^a
$\text{NO}_2^- + \text{NaCl} + \text{CAR}$	6.21 ± 0.05^a	2.01 ± 0.49^b
$\text{NO}_2^- + \text{NaCl} + \text{ERY} + \text{CAR}$	6.23 ± 0.08^a	2.28 ± 0.07^b

ERY: sodium erythorbate; CAR: carnosine.

It was found that addition of 0.5 g/kg of sodium erythorbate in pork containing 2.25% of NaCl had no effect on the final pH values (6.01 ± 0.06 for the treatment $\text{NO}_2^- + \text{NaCl} + \text{ERY}$ and 6.00 ± 0.05 in the control $\text{NO}_2^- + \text{NaCl}$), while an addition of 4.5 g/kg of carnosine had a significant increase ($p < 0.05$) by about 0.2 unit on pH values, with or without combined addition of sodium erythorbate (6.23 ± 0.08 and 6.21 ± 0.05 , respectively). A similar finding was reported by Das; Anjaneyulu; Biswas (2006) who observed that the pH values of the carnosine-treated ground buffalo meat samples without NaCl stored in refrigerated storage (4 ± 1 °C) were significantly ($p < 0.05$) higher than those of the control sample. The authors found that addition of 1.0% carnosine to ground buffalo meat increased pH by about 0.5 unit on day 0. In another study, Lee; Hendricks; Cornforth (1999) found that the treatment with 1% carnosine to ground beef increased meat pH by about 0.6 unit, but 0.1% ascorbic acid decreased meat pH by about 0.2 unit through day 1 and day 3 and the combination of carnosine and ascorbic acid counteracted the drop of meat pH seen with ascorbic acid alone. Similarly, Aliani et al. (2013) found that pH values for bison patties containing carnosine (1%) had significantly higher pH than the control samples.

In the current study, there was a clear tendency for the cooking loss percentage to decrease with an increase on carnosine amount and pH. The cooking loss of meat samples containing carnosine and the combination of carnosine and

sodium erythorbate showed the lowest loss (2.01 ± 0.49 and 2.28 ± 0.07 , respectively), significantly ($p < 0.05$) below than the sample containing sodium erythorbate (4.23 ± 1.18) and the control (4.09 ± 0.55). These results were expected due to the tendency for the water-holding capacity to increase with increasing meat pH (TOLDRÁ, 2010). Similar results were obtained by Lee; Hendricks; Cornforth (1999) who found that carnosine (1%) significantly increased cook yield of ground beef, although ascorbic acid (0.1%) also used in the reported study had no effect. In that study, the authors also found that carnosine treatment significantly increased salt-soluble protein level, while ascorbic acid, on the contrary, significantly decreased it and the combination of carnosine and ascorbic acid counteracted the effect of ascorbic acid. The authors attributed these results to either the increase in meat pH by carnosine or the combined effect of carnosine and ascorbic acid in increasing the isoelectric point of proteins, thereby increasing their solubility and hence the water-holding capacity of the meat. These results indicate that carnosine treatment improved the functional properties of muscle proteins.

Color

Results of objective color (L^* , a^* and b^*) are presented in Table 4. Cooked cured meat samples containing carnosine had L^* and b^* values significantly ($p < 0.05$) lower than those where the dipeptide was not added. Carnosine contributed this way to a purplish pink color while the treatments without carnosine had lighter appearance.

Table 4 - Objective color (L^* , a^* and b^*) in different treatments of model cured product system in meat.

Treatments	Color		
	L^*	a^*	b^*
$\text{NO}_2^- + \text{NaCl}$	72.77 ± 1.00^a	10.50 ± 0.22^{ab}	7.32 ± 0.26^a
$\text{NO}_2^- + \text{NaCl} + \text{ERY}$	72.64 ± 1.00^a	10.59 ± 0.21^a	7.48 ± 0.35^a
$\text{NO}_2^- + \text{NaCl} + \text{CAR}$	67.63 ± 0.68^b	10.11 ± 0.27^c	5.39 ± 0.23^b
$\text{NO}_2^- + \text{NaCl} + \text{ERY} + \text{CAR}$	69.10 ± 1.46^b	10.15 ± 0.25^{bc}	5.90 ± 0.23^b

ERY: sodium erythorbate; CAR: carnosine.

These results are likely related to the higher pH and higher water-holding capacity of carnosine treated samples therefore increasing the concentration of

curing meat pigments that are water-soluble. Preliminary tests carried out for the current study where the heat process was performed in meat samples containing nitrite with and without addition of NaCl showed that the presence of salt contributed for lower L* and b* values (results not presented in the Table 4) and contributed for the explanation of the results. Das; Anjaneyulu; Biswas (2006) also found that ground buffalo meat samples treated with carnosine (1%) maintained a reddish colour for a 6 - 8 days storage period. They related these results, in part, to the increased meat pH, which is associated with darker reddish colour. However, Djeanne et al. (2004) and Lee; Hendricks; Cornforth (1999) also showed a colour-stabilizing effect of carnosine without an increase in meat pH when the carnosine solution was adjusted to the initial meat pH.

Most of the researches about the effect of addition of carnosine on meat color relate its capacity to inhibit metmyoglobin formation during meat storage. Carlsen et al. (2002) related a weak ability of carnosine in reducing MbFe(III) to MbFe(II)O₂ in solution, indicating that the antioxidative activity of carnosine is not primarily attributable to its reducing properties. However, Lee; Hendricks; Cornforth (1999) related that ascorbic acid (0.1%) and/or carnosine (1%) inhibited ($p < 0.05$) metmyoglobin formation in ground beef pattie model system and carnosine was superior to ascorbic acid for maintaining redness on the bottom surface and in the bulk of the products where oxygen tension was lower while the treatment with ascorbic acid was more effective ($p < 0.05$) for maintaining redness on the top surface of ground beef patties. This suggests that the low capacity of carnosine as reducing agent found by Carlsen et al. (2002) is probably associated to the presence of oxygen in the solution system. In the same study, Lee; Hendricks; Cornforth (1999) found that after storage for 1 day the inhibition of metmyoglobin formation by the combination of both was stronger than carnosine or ascorbic acid alone and samples treated with ascorbic acid had the most bright red surface color, with highest "a" values, whereas treatment with carnosine resulted in a more purplish red color. In another study (ALIANI et al., 2013), bison patties made with 1% carnosine and made with 0.1% ascorbic acid did not differ significantly L, a and b values from the control samples. Das; Anjaneyulu; Biswas (2006) related that ground buffalo meat samples treated carnosine (1%) significantly ($p < 0.05$) inhibited metmyoglobin formation in comparison with the control. Retardation in the formation of the metmyoglobin in beef, due to the effect of carnosine, was also reported by Bekhit et al. (2004).

N-Nitrosamines

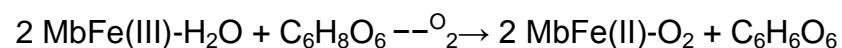
The results of NAs formation with the curing solution at pH 5.6 are presented on Figure 3. The heat process had a significant effect ($p < 0.05$) on NAs formation observed in the control ($\text{NO}_2^- + \text{NaCl}$) for all NAs studied. These results were expected considering that cooking process contributes to higher concentration of nitric oxides species capable to form NAs on meat.

The addition of sodium erythorbate (0.5 g/L) and/or carnosine (4.5 g/L) decreased significantly ($p < 0.05$) NAs formation compared to the control and this pattern was observed for all NAs with and without heating (excepting for NPYR) process applied. These results were expected considering that antioxidants can decrease the concentration of nitrogen species responsible for NAs formation by different mechanisms, including reducing nitrous acid directly to NO, reacting primarily with N_2O_3 and NOCl over the precursor amines and also forming NO by donating an electron to NO^+ (SKIBSTED, 2011; TANNENBAUM; WISHNOK; LEAF, 1991).

It was observed that the inhibitory NAs formation effect by sodium erythorbate ($\text{NO}_2^- + \text{NaCl} + \text{ERY}$), carnosine ($\text{NO}_2^- + \text{NaCl} + \text{CAR}$) and the combination of both antioxidants ($\text{NO}_2^- + \text{NaCl} + \text{ERY} + \text{CAR}$) did not vary statistically ($p > 0.05$) in absence of heating. However, when heat treatment was applied, the effect of sodium erythorbate on inhibition of NAs formation was significantly stronger ($p < 0.05$) than carnosine. There was no increase in the inhibitory effect of samples containing both erythorbate and carnosine compared to erythorbate alone. Scientific information that could help in explaining the inferior performance of carnosine on inhibition of NAs formation in heated samples are limited. This paper is the first ever published on the effect of carnosine on NAs formation. The mechanisms of carnosine to form NO are still not well understood and it makes difficult to make a comparison with erythorbate. Indications that carnosine has low capacity as reducing agent when oxygen is present (see color results section) associated to the antioxidant activity results in the present study permit to conclude that erythorbate was more effective to form NO from N_2O_3 and NO^+ than carnosine in the current solution experiment conditions (presence of oxygen) and it may possibly explain why carnosine had lower effectiveness in reducing NAs formation when heat process is applied.

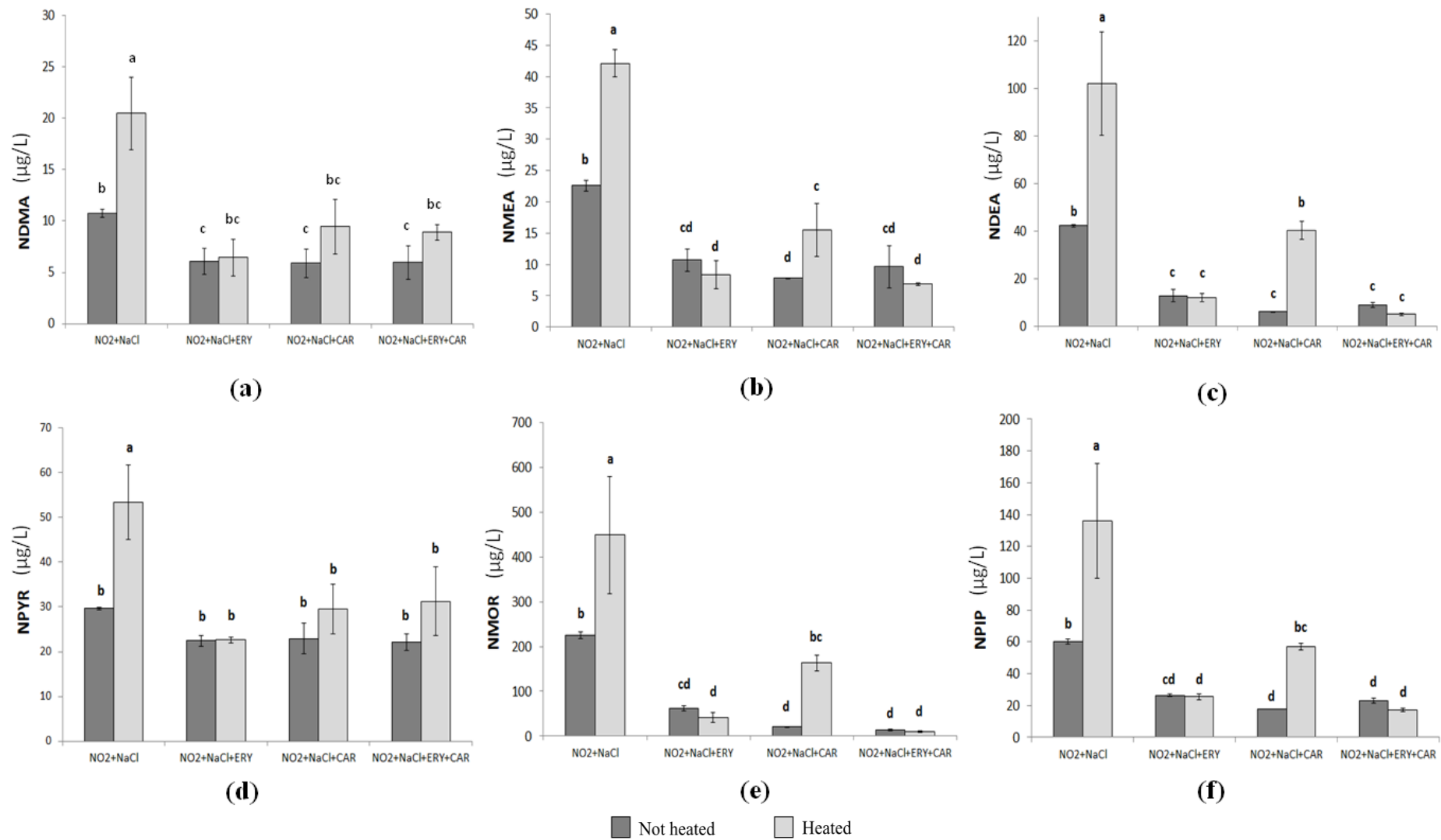
The results obtained with the meat system however differ significantly than the preceding ones obtained with the curing solution and are presented on Figure 4. In meat, carnosine was not effective in decreasing NAs formation compared to the control and did not present less effect for cooked meat products compared to erythorbate. On the contrary, sodium erythorbate contributed for an increase in NAs formation. This result disagrees with Tannenbaum; Wishnok; Leaf (1991), who reported that erythorbate is capable to decrease NAs formation in cured meat products. To understand the results found in the present study, it is important to highlight that NAs determination was carried out in cooked cured meat after 7 days of storage at 4 °C in the presence of oxygen. Residual nitrite present on meat contribute to the increase of nitrogen species able to react with secondary precursor amines (mainly NO⁺ and N₂O₃) and thus NAs concentration during the storage time increases (SCHEEREN et al., 2015; YURCHENKO; MÖLDER, 2007). Therefore, if on one side erythorbate had a superior effect than carnosine on inhibiting NAs formation in the presence of oxygen (as shown in the results of the solution experiment) because its higher ability to react with N₂O₃ and NO⁺ forming NO, on the other side, higher concentration of NO contributes for an increase on NAs formation during storage time (last reaction shown above). Moreover, according to Hipkiss (2009) carnosine appears to play roles not only in NO generation but also in protection against excess NO production by inducible nitric oxide synthetase (NOS).

Another important point is that myoglobin tends to oxidize to metmyoglobin within time. Ascorbic acid is more effective than carnosine on metmyoglobin reduction on meat products in the presence of oxygen (PEGG; SHAHIDI, 2000; LEE; HENDRICKS; CORNFORTH, 1999) according to the reaction shown below:



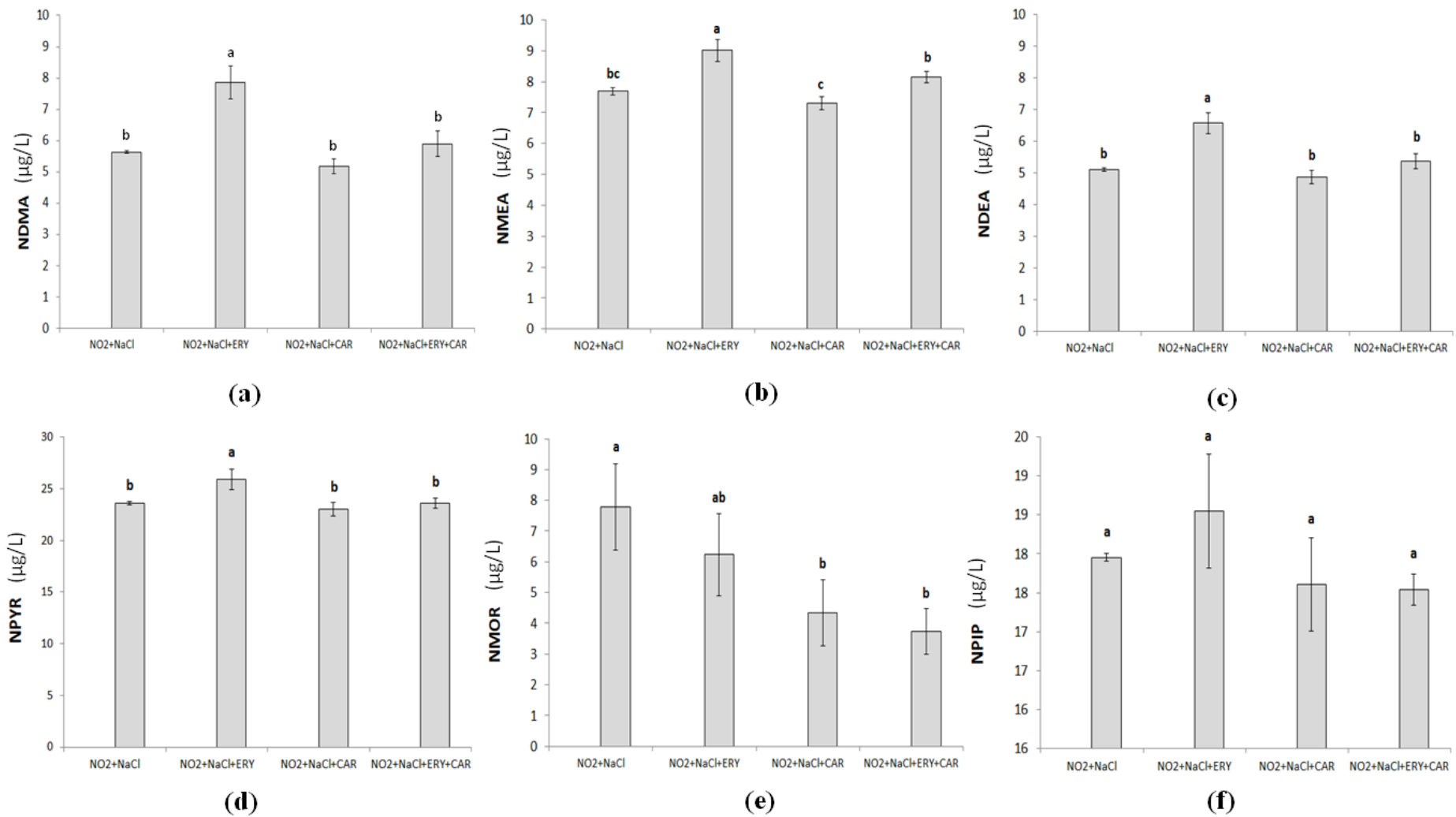
As more ascorbic acid is used for metmyoglobin reduction, as less it remains available for being used to reduce NO⁺ formed during the storage time. Therefore, the higher formation of NO initially by erythorbate associated with lower erythorbate availability to reduce NO⁺ to NO due to its consumption for metmyoglobin reducing reactions might explain the higher NAs formation on cooked meat products stored for 7 days in the presence of oxygen. These indications also can explain why, unlike in meat experiment where erythorbate contributed for an increase in NAs concentration,

in the solution where no myoglobin was present, the erythorbate had a positive effect on the inhibition of NAs formation. In general on the meat experiment, the results for the treatment with erythorbate and carnosine combined followed the same pattern than carnosine alone.



ERY: sodium erythorbate; CAR: carnosine; NDMA: *N*-nitrosodimethylamine, NMEA: *N*-nitrosomethylethylamine; NDEA: *N*-nitrosodiethylamine; NPYR: *N*-nitrosopyridine; NMOR: *N*-nitrosomorpholine; NPIP: *N*-nitrosopiperidine.

Figure 3 - *N*-Nitrosamines content ($\mu\text{g/L}$) in different treatments of model cured product system in solution.



ERY: sodium erythorbate; CAR: carnosine; NDMA: *N*-nitrosodimethylamine, NMEA: *N*-nitrosomethylethylamine; NDEA: *N*-nitrosodiethylamine; NPYR: *N*-nitrosopyridine; NMOR: *N*-nitrosomorpholine; NPIP: *N*-nitrosopiperidine.

Figure 4 - *N*-Nitrosamines content ($\mu\text{g/kg}$) in different treatments of model cured product system in meat.

CONCLUSION

Addition of 0.5 g/kg of sodium erythorbate had no effect on the final pH values compared to the control on meat, while an addition of 4.5 g/kg of carnosine increased pH values by about 0.2 unit, with or without combined addition of sodium erythorbate. A decrease in cooking loss percentage on meat samples treated with carnosine was also observed. These results represent an important impact economic for the meat industry.

In the curing solution both erythorbate and carnosine had a positive effect on the inhibition of NAs formation and the superior inhibiting effect of erythorbate was explained by its higher ability to reduce N_2O_3 and NO^+ to NO in the presence of oxygen, contributing to its superior effect when heat process was applied. On the contrary, in meat samples stored in the presence of oxygen, sodium erythorbate contributed to an increase in NAs concentration with respect to the control that is likely attributable to its higher initial NO formation and its consumption for metmyoglobin reducing reactions during storage time. Added carnosine brought this increased NAs formation by erythorbate to the level found in the control. The difference in NAs formation between the two models can be explained by the presence of myoglobin in the meat system making a demand on available erythorbate. The combined information from the two systems indicates that carnosine offers an added protection for NAs inhibition in condition of excess formation.

More investigations must be conducted with the purpose to understand better the effect of carnosine, erythorbate and the combination of both on protein and lipid oxidation and metmyoglobin reduction during shelf-life of cured meat products in the presence and absence of oxygen and thus optimize an ideal condition for inhibiting NAs formation.

Aknowledgements

The authors wish to thank Hassan Sabik and D. Bélanger for providing technical assistance with the GC-MS equipment and Claude Leblanc, Simon Cliché and Naoufal

St.-Pierre for providing technical assistance for the oxidation analysis. The authors are also grateful to Agriculture and Agri-Food Canada (Food Research and Development Centre) for access to the infrastructure required for this study.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

The authors are grateful to the Brazilian Federal Agency for the Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES) for providing financial contributions [process number 6116-13-2]; and to Prof. Joseph Arul and Agriculture and Agri-Food Canada (Food Research and Development Centre) for providing funds required for this study.

REFERENCES

- ALIANI, M. et al. The synergistic effect of ribose, carnosine, and ascorbic acid on the sensory and physico-chemical characteristics of minced bison meat. **Food Science & Nutrition**, v. 1, n. 2, p.172-183, 2013.
- ANDRÉE, S. et al. Chemical safety of meat and meat products. **Meat Science**, n. 86, p. 38-48, 2010.
- AOAC – Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the AOAC International**. Washington: AOAC, 1995.
- BEKHIT, A. E. D. et al. Pro-oxidant activity of carnosine rutin and quercetin in a beef model system and their effects on the metmyoglobin reducing activity. **European Food Research and Technology**, v. 218, n. 6, p. 507-514, 2004.
- BOLDYREV, A. A.; ALDINI, G.; DERAIVE, W. Physiology and pathophysiology of carnosine. **Physiological Reviews**, v. 93, p. 1803-1845, 2013.
- BRYAN, N. S.; VAN GRINSVEN, H. The role of nitrate in human health. **Advances in Agronomy**, v. 119, p. 153-182, 2013.
- CARLSEN, C. U. et al. Antioxidant properties of carnosine re-evaluated in a ferrylmyoglobin model system and in cooked pork patties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 7164-7168, 2002.
- CHAN, W. K. M. et al. EPR spin-trapping studies of the hydroxyl radical scavenging activity of carnosine and related dipeptides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 1407-1410, 2004.
- DAS, A. K.; ANJANEYULU, A. S. R.; BISWAS, S. Effect of carnosine preblending on the quality of ground buffalo meat. **Food Chemistry**, v. 97, p. 531-538, 2006.
- D'ASTOUS-PAGÉ, J. et al. Carnosine levels in the porcine longissimus muscle and its association with meat quality traits and carnosine-related genes expression. In: CANADIAN SOCIETY OF ANIMAL SCIENCE. **Anais...** Ottawa: 2015.
- DAVIDSON, P. M.; SOFOS, J. N.; BRANEN, A. L. **Antimicrobials in food**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2004. 720 p.
- DJENANE, D. et al. Antioxidant effect of carnosine and carnitine in fresh beef steaks stored under modified atmosphere. **Food Chemistry**, v. 85, n. 3, p. 453-459, 2004.
- FAUSTMAN, C. et al., Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control, **Meat Science**, v. 86, n. 1, p. 86-94, 2010.

- HIPKISS, A. R. Carnosine and Its Possible Roles in Nutrition and Health. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 57, p. 87-154, 2009.
- HONIKEL, K-O. The use and the control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. **Meat science**, v. 78, p. 68-76, 2008.
- KOHEN, R. et al. Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. **Proceedings of the National Academic of Sciences**, v. 85, p. 3175-3179, 1988.
- KOHEN, R.; MISGAV, R.; GINSBURG, I. The SOD like activity of copper:carnosine, copper:anserine and copper:homocarnosine complex. **Free Radical Research Communication**, v. 12-13, p. 179-185, 1991.
- LEE, B. J.; HENDRICKS, D. G. Metal-catalyzed oxidation of ascorbate, deoxyribose and linoleic acid as affected by phytic acid in a model system. **Journal of Food Science**, v. 62, p. 935-938, 1997.
- LEE, B. J.; HENDRICKS, D. G.; CORNFORTH, D. P. Antioxidant effects of carnosine and phytic acid in a model beef system. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 3, p. 394-398, 1998.
- LEE, B. J.; HENDRICKS, D. G.; CORNFORTH, D. P. A comparison of carnosine and ascorbic acid on color and lipid stability in a ground beef pattie model system. **Meat Science**, v. 51, p. 245-253, 1999.
- MARUŠIĆ, N.; ARISTOY, M-C.; TOLDRÁ, F. Nutritional pork meat compounds as affected by ham dry-curing. **Meat Science**, v. 93, p. 53-60, 2013.
- MORA, L.; SENTANDREU, M. A.; TOLDRÁ, F. Contents of creatine, creatinine and carnosine in porcine muscles of different metabolic types. **Meat Science**, v. 79, p. 709-715, 2008.
- NIKI, E. Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 54, p. 1119-1124, 1991.
- OLMEDILLA-ALONSO, B.; JIMÉNEZ-COLMENERO, F.; SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J. Development and assessment of healthy properties of meat and meat products designed as functional foods. **Meat Science**, v. 95, p. 919-930, 2013.
- OOSTINDJER, M. et al. The role of red and processed meat in colorectal cancer development: a perspective. **Meat Science**, v. 97, p. 583-596, 2014.
- ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnología de alimentos**: alimentos de origem animal. Porto Alegre:Artmed. 2005. 280 p.

PALIN, M. F. Gariépy. Porcine muscle anserine content: effects on meat quality and expression of carnosine and anserine-related genes. In: 5th EAAP International Symposium on Energy and Protein Metabolism and Nutrition. **Anais...** Sacramento: ISEP, 2016.

PEGG, R. B.; SHAIDI F. **Nitrite curing of meat**: the N-nitrosamine problem and nitrite alternatives. Trumbull: Food and Nutrition Press, 2000. 280 p.

PÜSSA T. Toxicological issues associated with production and processing of meat. **Meat Science**, v. 95, p. 844-853, 2013.

QUINN, P. J.; BOLDYREVT, A. A.; FORTNAZUYLCL, V. E. Carnosine: its properties, functions and potential therapeutic applications. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 13, p. 379-444, 1992.

RAHARJO, S.; SOFOS, J. N.; SCHMIDT, G. R. Solid-phase acid extraction improves thiobarbituric acid method to determine lipid oxidation. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 4, p. 921-924, 1993.

SCHEEREN, M. B. et al. Determination of N-nitrosamines in processed meats by liquid extraction combined with gas chromatography-methanol chemical ionisation/mass spectrometry. **Food Additives & Contaminants: Part A**, 2015. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19440049.2015.1066037>. Acesso em: 08 jan. 2016.

SKIBSTED, L. H. Nitric oxide and quality and safety of muscle based foods. **Nitric Oxide**, v. 24, p. 176-183, 2011.

TANNENBAUM, S. R.; WISHNOK, J. S.; LEAF, C. D. Inhibition of nitrosamine formation by ascorbic acid. **Americal Journal of Clinical Nutrition**, v. 53, p. 247-250, 1991.

TERRA, N. N. **Apontamentos de tecnologia de carnes**. São Leopoldo: Unisinos, 2005. 216 p.

TERRA, N. N. et al. Extrato de erva mate (*Ilex paraguariensis*) como antioxidante, em carne de peru, submetida a tratamento térmico. **Higiene Alimentar**, v. 22, n. 166/167, p. 189-193, 2008.

TOLDRÁ, F. **Handbook of meat processing**. Ames: Blackwell Publishing. 2010. 584 p.

VENTANAS, S. et al. Extensive feeding versus oleic acid and tocopherol enriched mixed diets for the production of Iberian dry-cured hams: Effect on chemical composition, oxidative status and sensory traits. **Meat Science**, v. 77, p. 246-256, 2007.

WEISS, J. et al. Advances in ingredient and processing systems for meat and meat products. **Meat Science**, v. 86, p. 196-213, 2010.

WHO – World Health Organization. **IARC Monographs evaluate consumption of red meat and processed meat.** Press release n. 240, 26 de outubro de 2015. Disponível em: <http://www.who.int>. Acesso em: 08 jan. 2016.

YURCHENKO, S.; MÖLDER, U. The occurrence of volatile N-nitrosamines in Estonian meat products. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1713-1721, 2007.

DISCUSSÃO

Neste trabalho, um método simples (preparo e extração de amostra), acessível, reprodutível e confiável (quantificação) foi desenvolvido e validado como método analítico alternativo para medir quantidades traço de *N*-nitrosaminas em diferentes tipos de produtos cárneos curados durante o tempo de armazenamento. Nove *N*-nitrosaminas voláteis (*N*-nitrosodimetilamina, *N*-nitrosometiletilamina, *N*-nitrosodietilamina, *N*-nitrosopirrolidina, *N*-nitrosodipropilamina, *N*-nitrosomorfolina, *N*-nitrosopiperidina, *N*-nitrosodibutilamina e *N*-nitrosodifenilamina) foram extraídas das amostras de produtos cárneos curados utilizando-se diclorometano como solvente de extração, seguido da limpeza da amostra com tampão fosfato pH 7,0. Os extratos orgânicos foram submetidos à análise cromatográfica (cromatografia gasosa) acoplada a espectrometria de massas com ionização química em modo positivo utilizando metanol como reagente (GC-CI/MS). O método tem como vantagens a utilização de um baixo volume de solvente orgânico no procedimento de extração sem necessidade de uma aparelhagem específica, além de empregar um instrumento analítico que é comumente encontrado em laboratórios de análises de alimentos, oferecendo a possibilidade de uma implementação prática na rotina dos mesmos. A sensibilidade e a seletividade do método analítico desenvolvido foram satisfatórias e os limites de detecção variaram de 0,15 à 0,37 µg/kg, enquanto os limites de quantificação variaram de 0,50 à 1,24 µg/kg para todas as *N*-nitrosaminas analisadas. Os valores obtidos na avaliação da recuperação da extração realizada em presuntos cozidos enriquecidos com 10 e 100 µg/kg foram entre 70% e 114%, respectivamente, com um desvio padrão relativo médio de 13,2% e estes resultados estão dentro dos limites aceitos pela AOAC (2002).

A aplicação do método desenvolvido foi bem sucedida para a determinação de *N*-nitrosaminas em cinco diferentes produtos curados, incluindo presunto cozido, presunto seco, linguiça cozida, *pepperoni* (linguiça seca) e mortadela. Estes produtos foram adquiridos em um mercado local e foram escolhidos por representar a maior parte dos diferentes processos empregados na indústria de carnes: produtos curados cozidos, produtos de cura seca, produtos fermentados e produtos emulsionados. Para

avaliar o efeito do período de armazenamento na formação dos compostos cancerígenos nitrogenados, reais condições de consumo destes produtos foram simuladas e as amostras foram analisadas no dia 0 (dia em que os produtos foram comprados) a partir da embalagem fechada (sob vácuo) e também depois de sete dias de armazenamento a uma temperatura de 4 °C em um recipiente de polipropileno (sem vácuo). Em geral, um aumento na concentração de *N*-nitrosaminas foi observado durante o período de armazenamento. Este resultado está de acordo com a literatura (YURCHENKO; MÖLDER, 2007) e já era esperado considerando que a sua reação de formação pode continuar acontecendo enquanto há nitrito residual presente no produto. As *N*-nitrosaminas mais abundantes encontradas nos produtos cárneos estudados foram *N*-nitrosodipropilamina (1,75 a 34,75 µg/kg) e *N*-nitrosopiperidina (1,50 a 4,26 µg/kg). Ozel et al. (2010) também relataram a presença destas duas *N*-nitrosaminas em salsicha e salame, porém em concentrações inferiores, enquanto em outros estudos (HERRMANN et al., 2014; SANNINO; BOLZONI, 2013) estas não foram sequer detectadas nos produtos analisados. *N*-nitrosodietilamina, *N*-nitrosomorfolina e *N*-nitrosodifenilamina não foram encontradas nos produtos cárneos analisados neste estudo, mesmo depois de sete dias de armazenamento. Estes resultados são consistentes com outros estudos (HERRMANN et al., 2014; SANNINO; BOLZONI, 2013) onde a presença destas *N*-nitrosaminas também não foi detectada.

Com o objetivo de avaliar o efeito do dipeptídeo natural carnosina no controle da reação química de formação de *N*-nitrosaminas em produtos cárneos curados e devido à ausência de informações científicas na literatura sobre este tópico, dois sistemas modelo foram utilizados neste estudo: o primeiro foi conduzido visando estudar o efeito direto do dipeptídeo sem o efeito da matriz e foi realizado em solução tampão com um pH 5,6 (pH médio da carne suína); o segundo objetivou avaliar o efeito da matriz cárnea na performance da carnosina após sete dias de armazenamento sob condições que imitam o consumo dos produtos cárneos curados cozidos após a abertura da embalagem (sem vácuo e a baixas temperaturas). Em ambos sistemas, o efeito da carnosina foi comparado ao de um antioxidante normalmente utilizado na indústria de carnes (eritorbato de sódio) e ao efeito sinérgico da combinação de ambos. No sistema modelo conduzido na matriz cárnea, o efeito da adição dos antioxidantes nas

propriedades tecnológicas dos produtos também foi avaliada e estes resultados deram assistência à explicação dos resultados encontrados na análise de *N*-nitrosaminas. A atividade antioxidante da carnosina e do eritorbato de sódio na presença e ausência de cloreto de sódio também foi avaliada com o objetivo de auxiliar a compreensão e sustentar os resultados obtidos.

Em relação à capacidade antioxidante, medida através do método de captura de radicais livres de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), carnosina mostrou-se ser um antioxidante menos efetivo que o eritorbato de sódio nas concentrações estudadas (0,1 à 20 mg/mL). Porém, a porcentagem de inibição dos radicais DPPH mostrou-se constante para o eritorbato (de 75,90 à 78,91% sem adição de cloreto de sódio e de 77,78 à 78,75% na presença do sal), enquanto um aumento da capacidade antioxidante em função de um aumento da concentração foi observada para a carnosina (de 0,14 à 65,10% e 0,00 à 53,60% na ausência e na presença de cloreto de sódio, respectivamente). Resultados apresentados por Marušić; Aristoy; Toldrá (2013) também mostraram um aumento da capacidade antioxidante da carnosina em função da concentração. Resultados do presente estudo revelam que, ao contrário do eritorbato de sódio, a atividade antioxidante da carnosina foi negativamente afetada ($p < 0,05$) na presença de cloreto de sódio a partir de uma concentração de 7,5 mg/mL. A uma concentração de 0,5 mg/mL (representando a concentração usada no presente experimento nos testes realizados em solução e na carne), o eritorbato de sódio apresentou uma atividade antioxidante de 76,98% de inibição na presença de sal, enquanto carnosina apresentou 21,51% de inibição a uma concentração de 4,5 mg/mL (representando 4,5 g/L usados no teste em solução) e 28,37% a uma concentração de 7,5 mg mL⁻¹ (representando uma concentração final de 7,5 g/kg no experimento realizado em matriz cárnea).

A adição de 0,5 g/kg de eritorbato de sódio em carne suína contendo 2,25% de cloreto de sódio não apresentou nenhum efeito nos valores de pH comparado ao controle, sem adição de antioxidantes ($6,01 \pm 0,06$ e $6,00 \pm 0,05$, respectivamente), enquanto a adição de 4,5 g/kg de carnosina isolada ou combinada com o eritorbato promoveu um aumento significativo ($p < 0,05$) de cerca de 0,2 unidades nos valores de pH ($6,23 \pm 0,08$ e $6,21 \pm 0,05$, respectivamente). Resultados similares foram

encontrados em um estudo realizado por Lee; Hendricks; Cornforth (1999) onde carne de gado moída tratada com carnosina (1,0%) obteve um valor de pH significativamente superior ($p < 0,05$) de cerca de 0,6 unidades em relação às amostras controle. Porém, neste mesmo estudo, os autores relataram um decréscimo de cerca de 0,2 unidades de pH do dia 1 ao dia 3 quando 1,0% de ácido ascórbico foi utilizado e a combinação de carnosina e ascorbato neutralizou a queda do pH da carne notada com ácido ascórbico isolado. Como esperado, uma clara tendência ao aumento da água retida após o cozimento em função do aumento do pH foi observada. A porcentagem de perda por cozimento das amostras contendo carnosina e a combinação de carnosina com eritorbato de sódio ($2,01 \pm 0,49$ e $2,28 \pm 0,07$, respectivamente), foi significativamente menor ($p < 0,05$) que a amostra controle ($4,09 \pm 0,55$) e que a amostra contendo eritorbato ($4,23 \pm 1,18$). Lee; Hendricks; Cornforth (1999) obtiveram resultados similares em carne de gado moída em que amostras tratadas com 1,0% de carnosina aumentaram significativamente ($p < 0,05$) a quantidade de água retida depois do cozimento, enquanto amostras tratadas com 0,1% de ácido ascórbico não obtiveram diferença em relação ao controle. Estes resultados indicam que um aumento na concentração da carnosina poderia afetar as propriedades tecnológicas e sensoriais dos produtos cárneos (como cor, textura e rendimento do peso do produto) devido ao acréscimo de valores de pH e da capacidade de retenção de água.

As análises da cor objetiva realizada nos diferentes tratamentos de carnes curadas logo após o processo de cozimento (dia 0) indicam que as amostras tratadas com carnosina tiveram valores de L^* e b^* significativamente inferiores ($p < 0,05$) do que os tratamentos onde o dipeptídeo não foi adicionado. Estes resultados podem estar parcialmente relacionados aos valores obtidos de pH e perda de água durante o cozimento devido à capacidade da carnosina em aumentar a capacidade de retenção de água nos produtos e, conseqüentemente, aumentar a retenção dos pigmentos que são hidrossolúveis. Testes prévios conduzidos para o presente estudo, onde amostras de carne suína contendo nitrito com e sem adição de cloreto de sódio foram submetidas ao processo de cozimento mostraram que a presença do sal contribuiu para uma diminuição dos valores de L^* e b^* . Estes resultados confirmam o efeito do aumento na retenção de água na diferença de cor observada pela adição da carnosina. Em outro

estudo, carne de búfalo moída tratada com carnosina (1,0%) manteve a cor avermelhada durante 6 a 8 dias do período de armazenamento e estes resultados também foram relacionados, em parte, ao acréscimo nos valores de pH (DAS; ANJANEYULU; BISWAS, 2006).

A formação de metamioglobina ($MbFe^{3+}$) por radicais livres é um fator predominante que influencia a estabilidade da cor e a maior parte das pesquisas desenvolvidas que buscam avaliar o efeito da carnosina na cor da carne relacionam a capacidade antioxidante deste dipeptídeo em inibir a formação do pigmento durante o período de armazenamento dos produtos. Carlsen et al. (2002) relataram uma fraca habilidade da carnosina em reduzir $MbFe^{3+}$ à $MbFe^{2+}$, indicando que a capacidade antioxidante da carnosina não pode ser atribuída à sua capacidade de agir como agente redutor. Porém, resultados obtidos por Lee; Hendricks; Cornforth (1999) indicam que o ácido ascórbico (0,1%) e/ou carnosina (1%) inibiram significativamente ($p < 0,05$) a formação de metamioglobina em um sistema modelo onde carne de gado moída foi utilizada. Estes autores também relataram que a carnosina teve um efeito superior ao ácido ascórbico onde a concentração de oxigênio no sistema estava reduzida, enquanto o ácido ascórbico teve um melhor resultado que a carnosina na superfície do produto em contato com o oxigênio. Portanto, a baixa capacidade da carnosina em agir como reagente redutor pode estar associada à presença de oxigênio no sistema.

Como esperado, os resultados da formação de *N*-nitrosaminas no sistema modelo em solução pH 5,6 apontam que o processo de aquecimento (75 ± 1 °C during 15 minutos) promoveu um aumento significativo ($p < 0.05$) na concentração destes compostos cancerígenos nitrogenados, observado no tratamento controle. O aumento da temperatura contribui para um aumento da concentração de espécies de nitrogênio responsáveis pela nitrosação de aminas precursoras. Este fato pode ser possivelmente associado com o aumento da liberação de íons Fe^{2+} previamente ligados à molécula de mioglobina com o aumento da temperatura. As condições oxidativas e o íon nitrito presente no sistema podem promover a oxidação do Fe^{2+} a Fe^{3+} , o qual pode reagir com NO formando NO^+ (uma das principais espécies nitrogenadas usadas na reação de formação de *N*-nitrosaminas) (FAUSTMAN et al., 2010; TOLDRÁ, 2010; HONIKEL, 2008). A adição de eritorbato de sódio (0,5 g/L) e/ou carnosina (4,5 g/L) inibiu

significativamente ($p < 0,05$) a formação de *N*-nitrosaminas em relação ao controle sem a aplicação do tratamento térmico (com exceção de *N*-nitrosopiridina) e também quando as amostras foram submetidas ao aumento da temperatura. Este resultado pode ser atribuído à capacidade antioxidante destas substâncias, promovendo a diminuição das espécies de nitrogênio utilizadas na formação de *N*-nitrosaminas através de diferentes mecanismos, incluindo a redução direta do ácido nitroso (HNO_2) à óxido nítrico (NO), reação com N_2O_3 e NOCl e redução do íon NO^+ à NO (SKIBSTED, 2011; TANNENBAUM; WISHNOK; LEAF, 1991). Entretanto, o efeito do ascorbato de sódio sozinho ou combinado com a carnosina na inibição da formação dos compostos cancerígenos nitrogenados foi significativamente maior ($p < 0.05$) que o efeito da carnosina sozinha quando as amostras foram submetidas ao tratamento térmico. A atividade antioxidante inferior da carnosina em relação ao eritorbato associada às indicações de que a carnosina tem sua capacidade antioxidante reduzida na presença de oxigênio permitiram concluir que a carnosina é provavelmente menos efetiva para reagir com N_2O_3 and NO^+ e formar NO comparada ao eritorbato e isto possivelmente explica porque sua eficiência na inibição da formação de *N*-nitrosaminas foi inferior à do eritorbato quando o processamento térmico foi aplicado.

Os resultados do experimento conduzido em matriz cárnea mostraram que o comportamento do eritorbato de sódio e da carnosina como inibidores da formação de *N*-nitrosaminas foi inconsistente em relação ao que foi observado em solução. Ao contrário dos resultados obtidos em solução, na carne o eritorbato de sódio contribuiu para um aumento significativo ($p < 0.05$) na formação de *N*-nitrosaminas em relação ao controle. Além disso, a carnosina foi efetiva para diminuir este aumento na formação de *N*-nitrosaminas (causada pelo eritorbato) ao nível encontrado no controle. Para compreender os resultados obtidos no presente estudo, é importante lembrar que a quantificação de *N*-nitrosaminas foi realizada na carne curada cozida após um período de armazenamento de sete dias na presença de oxigênio. Sabe-se que o nitrito residual presente na carne pode ser convertido à espécies nitrogenadas que reagem com aminas precursoras e que, portanto, pode contribuir para o aumento da concentração de *N*-nitrosaminas durante o tempo de armazenamento. Portanto, se por um lado o fato do eritorbato de sódio possuir maior habilidade de reagir com N_2O_3 e NO^+ gerando NO

pode contribuir mais efetivamente para inibir a reação de formação de substâncias cancerígenas nitrogenadas, por outro lado, uma maior concentração de NO no sistema contribui para um aumento na concentração de *N*-nitrosaminas durante o período de armazenamento. Além disso, também é conhecido o fato de que, na presença de oxigênio, o ácido ascórbico age efetivamente na redução da formação da metamioglobina em produtos cárneos durante seu período de armazenamento (PEGG; SHAHIDI, 2000; LEE; HENDRICKS; CORNFORTH, 1999). Assim, reduz-se a quantidade disponível do antioxidante para ser utilizada na redução do NO⁺ formado durante o período de armazenamento. De acordo com Hipkiss (2009), apesar da sua função no mecanismo das reações de nitrosação não ser totalmente conhecida, a carnosina parece desempenhar um papel importante na geração de NO mas também na proteção contra o excesso da produção de NO em sistemas biológicos.

CONCLUSÃO

O eritorbato de sódio promoveu um aumento na concentração de *N*-nitrosaminas em carnes curadas cozidas armazenadas por um período de sete dias a uma temperatura de 4 °C na presença de oxigênio enquanto o mesmo comportamento não foi observado com a carnosina sozinha ou combinada com o eritorbato. Ao contrário dos resultados obtidos na matriz cárnea, em solução ambos os antioxidantes tiveram um efeito positivo na inibição da formação de *N*-nitrosaminas e a maior habilidade do eritorbato como redutor na presença de oxigênio, contribuiu para o seu efeito superior no controle da reação quando o processo térmico foi aplicado.

Eritorbato de sódio apresentou atividade antioxidante superior a carnosina mas os resultados para eritorbato de sódio permanecem constantes enquanto que para carnosina a atividade antioxidante aumentou em função da concentração. No entanto, não o efeito dos diferentes antioxidantes nas reações de oxidação lipídica e protéica não pode ser observado pois não houve evolução das reações oxidativas mesmo no controle.

As amostras de carne contendo carnosina tiveram uma diminuição significativa nos valores de L^* e b^* em relação aos tratamentos onde o dipeptídeo não foi adicionado, promovendo produtos com uma aparência mais púrpura e menos clara. Além disso, a adição de carnosina isolada ou combinada com eritorbato de sódio aumentou os valores de pH e de retenção de água durante o cozimento, enquanto a adição de eritorbato não apresentou nenhuma diferença em relação ao controle.

SUGESTÕES

Futuras pesquisas objetivando o monitoramento da qualidade microbiológica e sensorial de carnes com elevados níveis de carnosina e de produtos cárneos curados elaborados a partir desta matéria-prima são fortemente recomendadas. Além disso, sugere-se que mais investigações sejam conduzidas com o propósito de melhor compreender como as reações oxidativas (lipídicas e protéicas) e a formação da metamioglobina podem interferir na performance da carnosina, do eritorbato de sódio e da combinação de ambos no controle da formação de *N*-nitrosaminas durante o período de armazenamento, na ausência e presença de oxigênio.

REFERÊNCIAS

- ALIANI, M. et al. The synergistic effect of ribose, carnosine, and ascorbic acid on the sensory and physico-chemical characteristics of minced bison meat. **Food Science & Nutrition**, v. 1, n. 2, p.172-183, 2013.
- ANDRÉE, S. et al. Chemical safety of meat and meat products. **Meat Science**, n. 86, p. 38-48, 2010.
- AOAC. **AOAC guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals**. Arlington: AOAC International, 2002.
- BOLDYREV, A. A.; ALDINI, G.; DRAVE, W. Physiology and pathophysiology of carnosine. **Physiological Reviews**, v. 93, p. 1803-1845, 2013.
- BOON, C. S. et al. Factors affecting lycopene oxidation in oil-in-water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 4, p. 1408–1414, 2008.
- BRANEN, L. et al. **Food Additives**. Nova Yorque: Marcel Dekker, 1990. 952 p.
- BRASIL. Portaria nº 1.004, de 11 de dezembro de 1998. Regulamento Técnico de Atribuição de Função de Aditivos, e seus Limites Máximos de Uso para a Categoria 8 – Carne e Produtos Cárneos. **Diário Oficial da União**: Brasília, 1998.
- BRUM, E. B. **Antioxidante natural de marcela (*Achyrocline satureioides*) e de erva mate (*Ilex paraguariensis*) na elaboração de linguiça toscana**. 2009. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.
- BRYAN, N. S.; VAN GRINSVEN, H. The role of nitrate in human health. **Advances in Agronomy**, v. 119, p. 153-182, 2013.
- CANADA. Canadian Food Inspection Agency. **Animal Products Food of Animal Origin: Livestock and Meat Processing – Nitrosamines**. Date modified: 2003-02-07. Disponível: < <http://www.inspection.gc.ca>>. Acesso em: 18 de fevereiro de 2013.
- CHEMICALIZE, 2005. Disponível em: <<http://www.chemicalize.org>>. Acesso em: 18 de dezembro de 2015.
- DAS, A. K.; ANJANEYULU, A. S. R.; BISWAS, S. Effect of carnosine preblending on the quality of ground buffalo meat. **Food Chemistry**, v. 97, p. 531-538, 2006.
- DAVIDSON, P. M.; SOFOS, J. N.; BRANEN, A. L. **Antimicrobials in food**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2004. 720 p.

DJENANE, D. et al. Antioxidant effect of carnosine and carnitine in fresh beef steaks stored under modified atmosphere. **Food Chemistry**, v. 85, n. 3, p. 453-459, 2004.

DRYDER, F. D. & BIRDSALL, J. J. 1980. Why nitrite does not impart color. **Food Technology**, v. 34, n. 7, pp. 29-31.

DUARTE, M. T. **Avaliação do teor de nitrito de sódio em linguças do tipo frescal e cozida comercializadas no estado do Rio de Janeiro**. 2010. 86f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro.

FARIA, J. A. F. et al. Formação e estabilidade da cor de produtos cárneos curados: revisão. **Revista TeC Carnes**. v. 3, n. 2, p. 16-22, 2001.

FAUSTMAN, C. et al., Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control, **Meat Science**, v. 86, n. 1, p. 86-94, 2010.

FERNANDEZ-LOPEZ, J. et al. Evaluation of the antioxidant potential of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extracts in cooked pork meat. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 2, p. 660–664, 2003.

FISCHER, A. et al. Reddening of emulsion type sausage without nitrite curing salt — Part 1: Colour, colour stabilisation, nitrite and nitrate concentrations, sensory properties. **Fleischwirtschaft**, v. 85, p. 110–115, 2005.

GAYSINSKY, S., Weiss, J. Aromatic and spice plants: Uses in food safety. **Stewart Postharvest Solutions**, v. 4, p. 9–16, 2007.

GRANADO-LORENCIO, F. et al. Lutein-enriched frankfurter-type products: Physicochemical characteristics and lutein in vitro bioaccessibility. **Food Chemistry**, v. 120, n. 3, p. 741–748, 2010.

HEDRICK et al. **Principles of Meat Science**. Third Ed. Dubuque: Kendall/Hunt Publishing Company, 1994. 354 p.

HERNANDEZ-HERNANDEZ, E. et al. Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. **Meat Science**, v. 81, n. 2, p. 410–417, 2009.

HERRMANN, S. S. et al. Simultaneous determination of volatile and non-volatile nitrosamines in processed meat products by liquid chromatography tandem mass spectrometry using atmospheric pressure chemical ionisation and electrospray ionisation. **Journal of Chromatography A**, v. 1330, p. 20–29, 2014.

HIPKISS, A. R. Carnosine and its possible roles in nutrition and health. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 57, p. 87-154, 2009.

HONIKEL, K-O. The use and the control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. **Meat science**, v. 78, p. 68-76, 2008.

HOOD, D. E. & RIORDAN, E. B. 1973. Discolouration in pre-packaged beef: measurement by reflectance spectroscopy and shopper discrimination. **Journal of Food Technology**, v. 8, pp. 333-343

JAY, J. M. **Microbiologia dos alimentos**. Porto Alegre: Artmed. 2005. 711 p.

JUDGE, M. D. et al. **Principles of Meat Science**. Duburque: Kendall/Hunt, 1989. 417 p.

KAHL, R; HILDEBRANDT, A. G. Methodology for studying antioxidant activity and mechanisms of action of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 24, n. 10/11, p. 1007-1014, 1986.

KIM, J., MARSHAL, M. R.; WEI, C. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 43, p. 2839-2845, 1985.

LEDWARD, D. A. Colour of raw and cooked meat. In: **The Chemistry of Muscle-based Foods**, ed. D. E. Johnston, M. K. Knight and D. A. Ledward. Special Publication 106, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UL, pp. 128-144, 1992.

LEE, B. J.; HENDRICKS, D. G.; CORNFORTH, D. P. A comparison of carnosine and ascorbic acid on color and lipid stability in a ground beef pattie model system. **Meat Science**, v. 51, p. 245-253, 1999.

LÜCKE, F. K. Use of nitrite and nitrate in the manufacture of meat products. **Fleischwirtschaft International**, v. 4, p. 38-41, 2000.

MARUŠIĆ, N.; ARISTOY, M-C.; TOLDRÁ, F. Nutritional pork meat compounds as affected by ham dry-curing. **Meat Science**, v. 93, p. 53-60, 2013.

MOHLER, K. **El curado**. Zaragoza: Acribia. 1982. 116 p.

MÜLLER, W. D. Curing nas smoking: are they healthier processes today than used to be? **Fleischwirtschaft**, v. 71, n. 1, p. 61-65, 1991.

NTZIMANI, A. G., GIATRAKOU, V. I.; SAVVAIDIS, I. N. Combined natural antimicrobial treatment (EDTA, lysozyme, rosemary and oregano oil) on semi cooked coated chicken meat stored in vacuum packages at 4C: Microbiological and sensory evaluation. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, p. 187-196, 2010.

OBERDIECK, R. Fat protection for foods, especially meat products. **Fleischwirtschaft**, v. 84, n. 10, p. 91-95, 2004.

OLMEDILLA-ALONSO, B.; JIMÉNEZ-COLMENERO, F.; SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J. Development and assessment of healthy properties of meat and meat products designed as functional foods. **Meat Science**, v. 95, p. 919-930, 2013.

OOSTINDJER, M. et al. The role of red and processed meat in colorectal cancer development: a perspective. **Meat Science**, v. 97, p. 583-596, 2014.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnología de alimentos: alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artmed. 2005. 280 p.

OZEL, M. Z. et al. Determination of volatile nitrosamines in various meat products using comprehensive gas chromatography-nitrogen chemiluminescence detection. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 48, p. 3268–3273, 2010.

PADILHA, A. D. G. **Antioxidante natural na conservação da carne de frango in vivo**. 2007. 126f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

PEARSON, A. M.; GILLETT, T. A. **Processed meat**. Nova Iorque: Chapman, 1996. 448 p.

PRICE, J. F.; SCHWEIGERT, B. S. **Ciencia de la carne y de los productos carnicos**. Zaragoza: Acribia. 1994. 581 p.

PEGG, R. B.; SHAIDI F. **Nitrite curing of meat: the N-nitrosamine problem and nitrite alternatives**. Trumbull: Food and Nutrition Press, 2000. 280 p.

PÜSSA T. Toxicological issues associated with production and processing of meat. **Meat Science**, v. 95, p. 844-853, 2013.

QUINN, P. J.; BOLDYREVT, A. A.; FORTNAZUYLCL, V. E. Carnosine: its properties, functions and potential therapeutic applications. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 13, p. 379-444, 1992.

RATH, S.; REYES, F. G. R. Nitrosamines. In: **Safety analysis of foods of animal origin**. Boca Raton (FL): CRC Press, 2011. Cap. 13, p. 421-440.

REINIK, M. et al. Nitrites, nitrates and N-nitrosamines in Estonian cured meat products : intake by Estonian children and adolescents. **Food additives and contaminants**, v. 22, n. 11, p. 1098-1105, 2005.

ROÇA, R. O. **Artigos técnicos, científicos e teses. UNESP- Campus Botucatu**. Disponível em: <<http://dqta.fca.unesp.br/carnes/materialparadownload.php>>. Acesso em: 13 fev. 2013.

RYAN, E. et al. Bioactivity of herb-enriched beef patties. **Journal of Medicinal Food**, v. 12, n 4, 893–901, 2009.

SANCHEZ-ESCALANTE, A. et al. Antioxidant action of borage, rosemary, oregano, and ascorbic acid in beef patties packaged in modified atmosphere. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 1, p. 339–344, 2003.

SANNINO, A., BOLZONI, L. GC/CI–MS/MS method for the identification and quantification of volatile N-nitrosamines in meat products. **Food Chemistry**, v. 141, p. 3925–3930, 2013.

SANTARELLI, R. L. et al. Processed meat and colorectal cancer: a review of epidemiologic and experimental evidence. **Nutrition and Cancer**, v. 60, n. 3, p. 131-144, 2008.

SCHEEREN, M. B. et al. Determination of N-nitrosamines in processed meats by liquid extraction combined with gas chromatography-methanol chemical ionisation/mass spectrometry. **Food Additives & Contaminants: Part A**, 2015. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19440049.2015.1066037>. Acesso em: 08 jan. 2016.

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, 2007.

SEN; N. P & BADDOO, P. A. Trends in the Levels of Residual Nitrite in Canadian Cured Meat Products over the Past 25 Years. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 45, p. 4714-4718, 1997.

SINDELAR, J. J. **Investigating uncured no-nitrate-or-nitrite added processed meat products**. Ames: Iowa State University. 2006.

SKIBSTED, L. H. 2011 - Nitric oxide and quality and safety of muscle based foods. **Nitric Oxide**, v. 24, p. 176-183, 2011.

SOFOS, J. N. Challenges to meat safety in the 21st century. **Meat Science**, v. 78, n. 3–13, 2008.

SOUZA, M. A. A. **Casca de batata inglesa (*Solanum tuberosum*) na proteção antioxidante da carne de frango**. 2006. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

TANNENBAUM, S. R.; WISHNOK, J. S.; LEAF, C. D. Inhibition of nitrosamine formation by ascorbic acid. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 53, p. 247-250, 1991.

TERRA, N. N. **Apontamentos de tecnologia de carnes**. São Leopoldo: Unisinos, 2005. 216 p.

TERRA, N. N. et al. Valores de nitrito e TBARS durante o processamento da paleta suína curada, maturada e fermentada. **Ciência Rural**, v. 36, n. 3, p. 965-970, 2006.

TERRA, N. N. et al. Extrato de erva mate (*Ilex paraguariensis*) como antioxidante, em carne de peru, submetida a tratamento térmico. **Higiene Alimentar**, v. 22, n. 166/167, p. 189-193, 2008.

TOLDRÁ, F. **Handbook of meat processing**. Ames: Blackwell Publishing. 2010. 584 p.

TRICKER, A. R. N-nitroso compounds and man: Sources of exposure, endogenous formation and occurrence in body fluids. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 6, n. 226–268, 1997.

USDA - U.S. Department of Agriculture. U.S. **Code of Federal Regulations**, Food Safety and Inspection Service, Department of Agriculture, n. 424.22, 2011.

WEISS, J. et al. Advances in ingredient and processing systems for meat and meat products. **Meat Science**, v. 86, p. 196-213, 2010.

WHO – World Health Organization. **IARC Monographs evaluate consumption of red meat and processed meat**. Press release n. 240, 26 de outubro de 2015. Disponível em: <http://www.who.int>. Acesso em: 08 jan. 2016.

YUNES, J. F. F. **Avaliação dos efeitos da adição de óleos vegetais como substitutos de gordura animal em mortadela**. 2010. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

YURCHENKO, S., MÖLDER, U. The occurrence of volatile Nnitrosamines in Estonian meat products. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1713–1721, 2007.