

DETERMINAÇÃO DE NITRITOS E NITRATOS EM CONSERVAS DE CARNE *

Walkyria H. LARA **
Michiko Y. TAKAHASHI **
Neusa SILVEIRA **

RIALA6/466

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

RESUMO: O Método de Follet & Ratcliff para determinação de nitritos e nitratos em produtos cárneos foi adaptado a condições mais simples e, por seu intermédio, foi feito um levantamento em 100 amostras de embutidos (55 de presuntos e 45 de salsichas) comprados em supermercados na cidade de São Paulo. Apenas em uma amostra o valor encontrado excedeu a 300 p.p.m., quando calculada a soma de nitrito e nitrato, expressa em nitrito de sódio.

DESCRITORES: nitrato, nitrito, determinação em conservas de carne; conservas de carne, determinação de nitrato e nitrito.

INTRODUÇÃO

Nitratos e nitritos de sódio ou potássio são permitidos pela legislação brasileira² como aditivos intencionais em conservas de carne, com exceção do charque. Quando usados juntos, não devem exceder a 300 p.p.m. (calculadas em nitrito de sódio) no produto a ser consumido.

Os riscos para a saúde humana que podem advir do emprego destes aditivos têm preocupado grande número de investigadores e muito tem sido publicado em relação às possibilidades de formação de nitrosaminas, substâncias consideradas cancerígenas, a partir da ação de nitritos e nitratos sobre aminas secundárias, em condições semelhantes às vigentes em estômagos de mamíferos. A questão foi colocada em termos risco-benefício, pois há vantagens indiscutíveis no emprego de nitritos e nitratos como conservadores nas conservas de carne, onde impedem o desenvolvimento de microrganismos, como o *Clostridium botulinum*, cujas toxinas produzem botulismo. Existem excelentes revisões sobre o assunto^{7, 10}. Como o uso de nitritos e nitra-

tos foi mantido, torna-se importante o controle dos níveis desses conservadores nos produtos em que possam ser utilizados.

A metodologia empregada para este controle oferece algumas dificuldades. A determinação de nitratos nos produtos protéicos e em presença de quantidade de cloreto de sódio apresenta dificuldades quando o método empregado é o da reação colorimétrica, seja com brucina ou com ácido fenoldissulfônico. Para sais de cura simples, onde apenas há íons de cloro, o método espectrofotométrico direto apresenta resultados muito bons⁸ mas, em presença de proteínas, não se conseguiram resultados satisfatórios. Todos estes problemas analíticos são discutidos em revisões recentes^{1, 9, 11}. Por esta razão e por não ter sido apresentado nos métodos oficiais do Instituto Adolfo Lutz⁶ um para determinação de nitritos e nitratos em conservas de carne e embutidos em geral, decidimos rever a literatura, a fim de estabelecer um método com essa finalidade.

Neste estudo foram examinados os problemas referentes às etapas de extração, desproteinização e determinação, como segue:

* Realizado na Seção de Aditivos e Pesticidas Residuais do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

Extração: a mais usada é a aquosa, pelo fato de o nitrito e nitrato serem solúveis em água. Sabendo-se que nitritos tendem a ser destruídos em pH abaixo de cinco⁸, é necessário realizar a extração em meio neutro ou alcalino. Na adição de nitritos e nitratos à carne, há possibilidade de ocorrerem formas ligadas do nitrito, como os nitrosotióis e nitrosilmoglobina que, em meio neutro ou alcalino, são degradados e assim os extratos conterão todo o nitrito (livre ou ligado). Escolhemos o método de extração aquosa já associado à desproteíntização.

Desproteíntização: a obtenção de um extrato claro exige uma desproteíntização e alguns autores têm apresentado uma grande variedade de agentes desproteíntizantes. Preferimos aqueles recomendados pelo Draft International Standard ISO/DIS 2918 que alia um tratamento térmico aos agentes bórax, ferrocianeto de potássio e acetato de zinco. Outros métodos como a filtração em gel (Sephadex G 25) ou a cromatografia em camada delgada podem ser usados, mas julgamos aquele acima o mais acessível, além de ter recomendação internacional.

Redução do nitrato: a modificação do método de Grau & Mirna, proposta por FOLLETT & RATCLIFF⁹, torna possível a determinação simultânea de nitrito e nitrato em um só extrato. A redução do nitrato é feita com cádmio esponjoso em coluna de vidro com capilares de entrada e saída. O ótimo da redução é em pH 9,7 e, após cada uso, a coluna é regenerada com HCl 0,1 N. ELLIOT & PORTER³ propuseram uma técnica mais rápida onde o cádmio é colocado diretamente com o extrato. A presença de polifosfato reduz a eficiência desse processo.

Escolhemos o método de Follett & Ratcliff, simplificando a coluna de modo a ser possível usar um simples tubo estirado e funil de separação. O detalhe mais importante é o empacotamento do cádmio em pó, na ausência do ar. Mantendo-se a ponta do funil de separação mergulhada no líquido sobre a coluna, consegue-se evitar bolhas de ar. O fato de se poder controlar a eficiência da coluna de cádmio após a regeneração da mesma representa uma vantagem sobre as demais técnicas.

Tendo assim estabelecido as técnicas para as diferentes etapas de um método de determinação de nitritos e nitratos em conservas de carne, realizamos um levantamento em amostras de presuntos e salsichas postos à venda no comércio da cidade de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODO

Material

100 amostras compradas em supermercados da cidade de São Paulo, sendo 45 amostras de salsichas e 55 amostras de presuntos.

Reagentes

Para desproteíntização

Solução I

Tetraborato de sódio decahidratado
($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_{10} \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$) 50 g
Água destilada até completar
1000 ml

Solução II

Ferrocianeto de potássio trihidratado
($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 106 g
Água destilada até completar
1000 ml

Solução III

Acetato de zinco dihidratado
 $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 220 g
Ácido acético glacial 30 ml
Água destilada até completar
1000 ml

Para obtenção da coluna

Solução de sulfato de cádmio a 20%
Zinco em bastão
Solução tampão (pH 9,6 — 9,7)

Adicione 20 ml de ácido clorídrico concentrado a 500 ml de água destilada. Agite e adicione 50 ml de hidróxido de amônio concentrado e complete o volume para 1000 ml.

Para desenvolvimento da cor

Solução de alfa-naftol

Aqueça 360 ml de água destilada e 50 ml de ácido acético a 50°C e transfira para um frasco escuro contendo 0,25 g de ácido sulfanílico. Agite até dissolver e adicione 0,20 g de alfa-naftol agitando bem. Esfrie à temperatura ambiente e adicione 90 ml de solução de NH_4OH a 10%. O pH desta solução deve ser $4,0 \pm 0,5$.

Preparo da coluna

Prepare uma coluna estirando um tubo de vidro de 1,5 cm de diâmetro e 12 cm de comprimento. Adapte ao topo da coluna um funil de separação de 50 ml, com haste de 1 mm de diâmetro e 25 cm de comprimento.

Coloque de dois a três bastões de zinco em um béquer contendo cerca de 100 ml da solução de sulfato de cádmio. Remova o depósito esponjoso formado depois de 2 a 3 horas com uma vareta de vidro, colocando em um béquer contendo água destilada. Transfira o cádmio formado e aproximadamente 200 ml de água destilada para um liquidificador e triture durante 1 a 2 segundos. Passe em peneira de 20 a 40 malhas. Coloque um pouco de lã de vidro seguida de uma camada de 1 cm de

TABELA 1

Eficiência da coluna na recuperação de nitritos e nitratos

Quantidade de NaNO ₂ passada na coluna	Valor teórico de NaNO ₂ correspondente a NaNO ₂	Valor encontrado em NaNO ₂	Recuperação
µg	µg	µg	%
4	3,24	3,33	102,7
8	6,48	6,66	102,7
12	9,72	9,66	99,3
20	16,20	16,60	102,4
40	32,40	32,66	101,7
56	45,36	46,32	102,1

areia na extremidade afilada da coluna e transfira o cádmio até quase o topo da mesma, mantendo-a sempre com água. Adapte o funil de separação à coluna através de uma rolha de cortiça e previna a entrada de ar na coluna, mantendo-a sempre com água.

Antes da determinação do nitrato, lave a coluna com 25 ml de HCl 0,1 N, em seguida com 50 ml de água destilada e finalmente com 25 ml de solução tampão diluída a 1:9 com água destilada.

Note que, quando o cádmio esponjoso é mantido debaixo d'água, sua atividade decresce depois de 24 horas. A eficiência de redução da coluna deve ser sempre controlada. Esta pode ser regenerada por passagens sucessivas de porções de HCl 0,1 N, água e tampão, como descrito acima.

Eficiência da coluna: a eficiência da coluna é testada passando-se soluções padrões de NaNO₂ através da coluna, determinando-se a quantidade de nitrito, de acordo com o método descrito adiante, e calcula-se a percentagem de recuperação. Os dados obtidos com a coluna por nós usada estão configurados na tabela 1.

Curva padrão de nitrito de sódio

Pese 0,46 g de AgNO₂ e dissolva em 100 ml de água destilada quente. Transfira a solução obtida e as águas correspondentes às três lavagens com 30 ml de água destilada para um balão volumétrico de 1000 ml. Pese 0,25 g de NaCl e adicione ao balão, completando o volume com água destilada — agite. Deixe decantar. Pipete 5 ml de sobrenadante e transfira para um balão volumétrico de 100 ml, completando com água destilada. Um mililitro desta solução corresponde a 10 microgramas de NaNO₂.

Pipete alíquotas (de 0,25 a 10 ml) desta solução para balões volumétricos de 25 ml. Adicione 5 ml da solução tampão e 10 ml do reagente para desenvolver cor. Complete o

volume com água. Coloque os balões em banho à temperatura de 25 a 30°C, durante 30 minutos, para o desenvolvimento da cor. Esfrie à temperatura ambiente e leia em espectrofotômetro em cela de 1 cm a 474 nm, usando como branco uma solução contendo 10 ml do reagente para desenvolver cor, e água destilada.

Com os valores obtidos construa a curva padrão.

Procedimento

Preparo da amostra

Coloque cerca de 100 g da amostra no liquidificador, batendo até completa homogeneização. Guarde em recipiente com tampa, enchendo-o bem de modo que fique livre do ar. Conserve em geladeira. A análise do produto deve ser feita o mais breve possível, após a homogeneização. Em casos de produtos crus, a análise deve ser efetuada imediatamente.

Desproteíntização

Pese 10 g da amostra homogeneizada em um béquer de 150 ml. Adicione 5 ml da solução I (bórax) e cerca de 40 ml de água destilada, à temperatura acima de 70°C. Aqueça em banho-maria fervente por 15 minutos, agitando freqüentemente. Deixe esfriar à temperatura ambiente. Adicione 2 ml da solução II (ferrocianeto de potássio) e 2 ml da solução III (acetato de zinco). Agite vigorosamente após cada adição. Transfira a amostra para um balão volumétrico de 100 ml. Deixe o balão em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente. Complete o volume com água destilada. Agite o conteúdo do balão vigorosamente e filtre em papel livre de nitritos e nitratos. Esta solução está pronta para as determinações de nitrito e nitrato.

Determinação de nitrito

Pipete 10 ml da solução desproteíntizada da amostra para um balão volumétrico de 25 ml.

TABELA 2

Determinação de nitritos e nitratos em amostras de salsicha

Amostra n.º	NaNO ₂ p.p.m.	NaNO ₃ p.p.m.	NaNO ₂ + NaNO ₃ expressos em NaNO ₂ p.p.m.	Amostra n.º	NaNO ₂ p.p.m.	NaNO ₃ p.p.m.	NaNO ₂ + NaNO ₃ expressos em NaNO ₂ p.p.m.
1	92,65	156,61	219,87	24	34,24	152,22	157,89
2	41,33	98,61	121,43	25	60,00	47,15	98,30
3	3,09	197,67	163,66	26	6,82	55,23	51,68
4	9,89	165,00	143,92	27	9,50	175,00	151,66
5	6,24	14,85	18,30	28	5,66	122,80	105,41
6	3,16	70,97	60,81	29	26,49	187,70	178,96
7	2,91	136,34	113,66	30	14,82	85,57	84,33
8	15,90	139,89	129,53	31	4,66	114,12	97,36
9	2,82	23,16	21,63	32	240,00	22,50	258,27
10	5,91	9,12	13,31	33	4,66	154,13	129,86
11	5,16	12,27	15,12	34	4,99	95,27	82,38
12	5,99	146,66	125,12	35	44,32	93,10	119,94
13	6,24	14,85	18,30	36	126,60	127,22	229,94
14	13,74	239,50	208,29	37	41,62	254,42	248,30
15	35,07	64,44	87,41	38	5,99	109,57	95,00
16	55,80	149,78	177,47	39	45,80	249,28	248,30
17	26,99	65,53	80,22	40	90,00	270,81	309,99
18	31,89	255,07	239,09	41	135,00	161,88	266,50
19	44,07	200,14	206,65	42	129,95	168,22	266,60
20	27,83	53,34	71,16	43	39,18	136,42	150,90
21	46,33	160,88	177,02	44	30,00	43,06	64,98
22	16,18	213,33	189,47	45	7,66	187,53	159,99
23	36,67	70,27	93,75				

Adicione 5 ml da solução tampão e 10 ml da solução de alfa-naftol. Deixe em banho a 25-30°C, durante 30 minutos. Esfrie à temperatura ambiente, faça a medida a 474 nm em espectrofotômetro em cela de 1 cm. Calcule o valor de nitrito na amostra, usando a curva padrão previamente estabelecida.

Determinação de nitrato

Pipete 20 ml da solução desproteïnizada para um béquer de 150 ml e adicione 5 ml da solução tampão. Coloque o conteúdo no funil de separação e passe pela coluna de cádmio a uma velocidade de 5 ml/min, rejeitando os primeiros 10 ml. Passe água destilada através da coluna até recolher 100 ml do eluado em

um balão volumétrico. Tome precauções para que a coluna não seque. Pipete 10 ml do eluado para balão volumétrico de 25 ml, adicione 5 ml da solução tampão e 10 ml do reagente para desenvolver cor e proceda como na determinação de nitrito.

Calcule o valor de nitrito total da amostra, usando a curva padrão. Depois de subtrair o valor de nitrito obtido anteriormente, calcule o valor de nitrato na amostra, multiplicando pelo fator 1,231.

Cálculo

$$[(\text{nitrito} + \text{nitrato}) - \text{nitrito}] \cdot 1,231 =$$

em NaNO₂ em NaNO₂

= nitrato, em NaNO₃

TABELA 3

Determinação de nitritos e nitratos em amostras de presunto

Amostra n.º	NaNO ₂ p.p.m.	NaNO ₃ p.p.m.	NaNO ₂ + NaNO ₃ expressos em NaNO ₂ p.p.m.	Amostra n.º	NaNO ₂ p.p.m.	NaNO ₃ p.p.m.	NaNO ₂ + NaNO ₃ expressos em NaNO ₂ p.p.m.
1	21,00	92,74	96,33	29	32,33	75,04	93,29
2	5,63	13,52	16,61	30	22,13	79,36	86,60
3	2,51	245,66	202,07	31	22,13	157,40	150,00
4	21,82	135,12	131,58	32	108,30	100,51	189,95
5	43,24	19,05	58,71	33	7,32	52,53	50,00
6	85,80	181,59	233,31	34	18,65	52,93	61,65
7	2,91	43,55	38,28	35	8,99	87,35	79,95
8	28,24	26,77	49,98	36	6,66	47,13	44,95
9	51,24	281,55	279,95	37	146,65	172,13	286,48
10	19,99	6,12	24,96	38	28,99	73,05	88,34
11	43,34	102,54	126,64	39	16,82	155,30	143,38
12	25,33	141,10	139,95	40	7,65	136,21	118,30
13	8,33	142,14	123,79	41	13,33	143,58	129,97
14	8,99	9,42	16,66	42	9,66	86,47	79,90
15	9,42	9,03	16,75	43	5,32	38,54	36,63
16	33,33	78,99	97,50	44	3,33	14,34	14,98
17	35,66	288,34	289,90	45	5,32	38,54	36,63
18	12,99	109,14	101,65	46	15,99	62,36	66,65
19	6,66	61,53	56,65	47	50,00	28,69	73,31
20	25,32	20,06	41,62	48	33,33	59,45	81,63
21	29,00	118,13	124,97	49	40,66	99,63	121,60
22	26,66	131,27	133,30	50	15,99	62,36	66,65
23	5,66	20,07	21,96	51	43,33	90,25	116,65
24	32,99	107,04	119,95	52	36,32	47,57	74,97
25	21,66	92,33	96,67	53	33,91	225,44	217,04
26	24,99	159,00	154,16	54	72,45	269,50	291,37
27	17,99	234,27	208,30	55	31,89	130,97	138,29
28	6,32	80,35	71,60				

RESULTADOS E CONCLUSÃO

Os resultados obtidos na análise das 100 amostras estão distribuídos nas tabelas 2 e 3. Pode-se observar uma grande variabilidade nos valores de nitrato de sódio, sendo que apenas algumas amostras ultrapassaram 200 p.p.m. e, em apenas uma, a soma de nitrito e nitrato atingiu 300 p.p.m. É interessante comparar esses resultados com levantamentos feitos com o método de eliminação de íons de cloro e reação colorimétrica, com ácido fenoldissulfônico, como foi feito por KOMATSU *et*

*alii*³. Analisando 510 amostras de embutidos diversos, coletados em supermercados e frigoríficos em São Paulo, aqueles autores não encontraram nenhum valor excedendo 200 p.p.m. Tanto um como o outro levantamento indicam que as indústrias estão se atendo às recomendações legais vigentes, não ultrapassando os limites de emprego de nitritos e nitratos.

Recomendamos o método descrito para análise de conservas de carnes e embutidos pelas vantagens que apresenta em tempo e segurança sobre os outros.

RIALA6/466

LARA, W. H.; TAKAHASHI, M. Y. & SILVEIRA, N. — Determination of nitrites and nitrates in cured meat. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 38(2):161-166, 1978.

SUMMARY: Follet & Ratcliff's method for determination of nitrite and nitrate in meat products was simplified and successfully employed in the analysis of 55 samples of ham and 45 of sausage obtained at São Paulo city supermarkets. Only one sample gave a value of more than 300 p.p.m. of nitrite plus nitrate (expressed as sodium nitrite).

DESCRIPTORS: nitrate, nitrite, determination in cured meat; meat, cured, nitrite and nitrate determination.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOLTZ, D. F. apud USHER, C. D. & TELLING, G. M.¹¹.
2. BRASIL — Leis, decretos etc. — Resolução n.º 9 de 1976 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos do Ministério da Saúde. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 28 mai. 1976. Cad. 121, p. 8904.
3. ELLIOT, R. J. & PORTER, A. G. — A rapid cadmium reduction method for the determination of nitrate in bacon and curing brines. *Analyst*, 96: 522-7, 1971.
4. FOLLETT, M. J. & RATCLIFF, P. W. — Determination of nitrite and nitrate in meat products. *J. Sci. Fd Agric.*, 14: 138-44, 1963.
5. KOMATSU, I.; TAKINO, M. & GALLI, F. — O teor de nitritos e nitratos nos produtos cárneos fabricados no Estado de São Paulo. *Ciênc. Cult., supl.*, 29(7): 124, 1977. [Resumo 53-A.5.1].
6. LARA, W. H. & TAKAHASHI, M. Y. — Determinação espectrofotométrica de nitritos e nitratos em sais de cura. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 35-9, 1974.
7. ROGERS, R. W. — A review of the nitrosamine problem in cured meats. *Fd Prod. Develop.*, 8(6): 40-5, 1974.
8. SÃO PAULO. Instituto Adolfo Lutz — *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 2.ª ed.* São Paulo, Melhoramentos, 1976. 371 p.
9. SCHULLER, P. L. & VEEN, E. — Preservatives: a review of methods of analysis. *J. Ass. off. analyt. Chem.*, 50: 1127-45, 1967.
10. SEBRANEK, J. G. & CASSENS, R. G. — Nitrosamines: a review. *J. Milk Fd Technol.*, 36: 76-91, 1973.
11. USHER, C. D. & TELLING, G. M. — Analysis of nitrate and nitrite in foodstuffs: a critical review. *J. Sci. Fd Agric.*, 2: 1793-805, 1975.

Recebido para publicação em 9 de dezembro de 1977.