

## ARTIGO

## Formação de nitrato e nitrito em sardinha (*Triportheus angulatus* (Spix & Agassiz, 1829) decorrente do processamento térmico através do uso de carvão vegetal

## Formation of nitrate and nitrite in sardine (*Triportheus angulatus* (Spix & Agassiz, 1829) due to the thermal processing through the use of vegetable coal

Daniel Wolinger  
Marcondes

Laboratório Central de  
Saúde Pública do Amazonas  
(LACEN - AM), Manaus, AM,  
Brasil  
E-mail: [dwm7@bol.com.br](mailto:dwm7@bol.com.br)

### RESUMO

Pesquisas sugerem que, em alimentos submetidos a altas temperaturas, reações entre compostos nitrosantes (nitratos e nitritos) e substâncias que podem sofrer nitrosação (proteínas, aminoácidos entre outros) originem substâncias secundárias, como as nitrosaminas. O objetivo deste trabalho foi quantificar a formação de nitratos e nitritos a partir da degradação proteica em sardinha (*Triportheus angulatus*) decorrente do assamento realizado com carvão vegetal em churrasqueira em condições de temperatura e tempo controlados. A média de nitratos encontrada nas amostras *in natura*, assadas 30 minutos e 60 minutos, foi de 0,0020% (m/m), 0,00001% (m/m) e 0,00001% (m/m), respectivamente, e de nitritos foi de 0,0001% (m/m), 0,0063% (m/m) e 0,0030% (m/m), respectivamente. A pesquisa permite concluir a existência da relação direta entre a formação desses compostos nitrosantes e aplicação de calor para seu preparo para consumo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Nitrito; Nitrato; Pescado; Amazônia

### ABSTRACT

Research suggests that in foods subjected to high temperature reactions between nitrosating compounds (nitrate and nitrite) and substances which can undergo nitrosation (proteins, amino acids, etc.) originate secondary substances such as nitrosamines. The aim of this study was to quantify the formation of nitrates and nitrites from protein degradation in sardine (*Triportheus angulatus*) arising from the baking done with charcoal barbecue in temperature and time controlled. The average of nitrates found in fresh samples, baked 30 minutes and 60 minutes was 0.0020% (m/m) 0.00001% (m/m) and 0.00001% (w/w) respectively and nitrite was 0.0001% (w/w), 0.0063% (w/w) and 0.0030% (w/w) respectively. The research suggests that the scope of the direct relationship between the formation of these compounds and nitrosating applying heat using charcoal for their preparation for consumption.

**KEYWORDS:** Nitrite; Nitrate; Fish; Amazon



## Introdução

A abundância de peixes em quantidade e espécies, a ausência de uma cultura agrícola efetiva, entre outros fatores, fazem da região amazônica uma grande produtora e consumidora de peixes.

A pesca torna-se, portanto, uma importante atividade extrativista que gera renda, lazer e base alimentar, e para a maior parcela da população da região Norte do Brasil é a principal fonte de proteínas<sup>1,2</sup>.

Na região amazônica, a principal forma de consumo do pescado é o assamento com carvão vegetal. Esse procedimento objetiva basicamente a alteração das propriedades sensoriais dos alimentos, melhorando a palatabilidade e aumentando a gama de sabores, aromas e texturas.

O uso do calor com carvão vegetal envolve ao mesmo tempo a transferência de massa através da saída de umidade e da entrada de calor na amostra, em grande parte na forma de condução e por vezes convecção. Essas transferências variam conforme o tamanho e a condutividade térmica dos alimentos.

Quando colocado sob uma fonte de calor, a baixa umidade do ar gera um gradiente de pressão de vapor, evaporando a umidade na superfície do alimento, criando um movimento da umidade do interior para a superfície, mesmo com formação de uma crosta aparentemente seca<sup>3</sup>. Uma das principais consequências desse tratamento é a alteração da estrutura dos componentes da musculatura, especialmente as proteínas.

## Nitratos e nitritos nos alimentos

Os nitratos e nitritos em alimentos podem ter duas origens: intencionalmente adicionados ou ocorrência/formação natural. Quando intencionalmente adicionados possuem três funções principais. Primeiro atuam como antibacterianos dose-dependente<sup>1</sup>, fixadores e/ou intensificadores de coloração avermelhada nos produtos cárneos<sup>4,5,6</sup> e fornecedores do que pode ser descrito como um sabor "curado"<sup>7</sup>.

Independente de sua quantidade nos alimentos, os nitratos e nitritos tendem a formar composto N-nitrosos, comprovadamente nocivos<sup>7,8</sup>.

Considerando-se uma dieta normal, a quantidade de nitrato ingerido situa-se em torno de 100 mg ao dia, sendo os principais representantes, devido ao uso de fertilizantes, as hortaliças (até 200 mg ao dia) e raízes, podendo representar entre 72% e 94%, além de cereais e carnes curadas (que podem representar 90% do consumo diário)<sup>4,9</sup>.

Os nitritos são encontrados apenas em níveis de traços frequentemente em cereais, vegetais fermentados ou em conservas e carnes, em especial as curadas<sup>10</sup>, peixe defumado e salgado. Sua presença ou formação deriva também da oxidação do amônio<sup>11,12</sup>.

Nos animais o nitrato está diretamente relacionado à sua presença no meio ambiente. Nos animais aquáticos, como os peixes, não apresenta ser um sério problema, já que possui um importante papel sobre a osmorregulação e transporte do oxigênio nesses organismos<sup>13</sup>.

Devido aos prós e contras, são grandes as discussões a respeito do uso e da presença de nitratos e nitritos nos alimentos. Os efeitos benéficos, como a inibição do crescimento de bactérias, principalmente as patogênicas nos alimentos e o aprimoramento de suas características organolépticas, são argumentos a favor do seu uso.

Além disso, há evidências de que o nitrato dietético apresenta destacado papel benéfico, protegendo a área gastrintestinal contra microrganismos patogênicos. Estudos mostram que a adição de nitrito ao ácido estomacal inibe microrganismos como *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Helicobacter pylori*<sup>4</sup>.

## Aspectos toxicológicos de nitratos e nitritos

Segundo a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer<sup>15</sup>, nitratos e nitritos são classificados no grupo 2A como provavelmente carcinogênicos para muitos animais, e com alguma similaridade no organismo humano e de alguns roedores, e no grupo 2B com evidência carcinogênica comprovada em algumas espécies animais, independente do órgão-alvo. Em humanos, somente a N-nitrosornicotina a partir do tabaco tem sua ação cancerígena comprovada<sup>16,17,18</sup>.

Grande parte dos compostos N-nitrosos não são bioacumulativos e estáveis, porém são tóxico dose-dependente e dependente do tempo de exposição para exercerem ação mutagênica e carcinogênica<sup>16</sup>.

Em humanos os primeiros estudos de exposição de nitratos ocorreram em 1945 por Comly e mais tarde por Robertson & Riddell em 1949, onde níveis de meta-hemoglobinemia associadas a sinais de toxicidade por nitrato foram observados em crianças que consumiram água com alta concentração de nitratos (entre 388 e 619 mg.L<sup>-1</sup>)<sup>19</sup>. A toxicidade de nitratos e nitritos está relacionada a vários fatores além do tipo de matriz alimentar ingerida: estilo de vida, exposição ambiental, idade, grau de nutrição e estado de saúde e a quantidade e frequência ingerida de matrizes alimentares que possuem estes compostos ao contrário de grandes e espaçadas doses únicas<sup>20</sup>. A consideração desse fato é importante, pois as disparidades dos resultados encontrados nessas associações podem ser explicadas, pelo menos em parte, pela dificuldade de controle das concentrações corporais derivadas de quantidades ingeridas e de diferentes fontes<sup>17,18</sup>.

Quadros de saúde caracterizados pela baixa acidez estomacal e subnutrição, inclusive em crianças<sup>20,21</sup>, permitem o aumento de microrganismos que produzem enzimas (nitroreductases) capazes de reduzir nitratos a nitritos<sup>18</sup>.

## Materiais e métodos

Muitos métodos analíticos são propostos para determinação de íons nitrato e nitrito, entre os quais cromatográficos, espectrofotométricos e potenciométricos. O método espectrofotométrico, utilizado neste estudo, caracteriza-se pelos baixos limites de detecção, pela rapidez, simplicidade, além de se mostrar sensível a traços dos íons nitrato e nitrito, com um



erro máximo de 5% na determinação, mesmo quando aplicada em matrizes complexas com um grande número de interferentes, comum em amostras orgânicas<sup>22</sup>.

O isolamento do nitrato e nitrito da matriz tem sido frequentemente realizado em meio aquoso devido a maioria dos sais de nitrato e nitrito serem solúveis em água. Dependendo da matriz e se necessário, após a obtenção do extrato há necessidade de realizar um processo de clarificação, uma vez que para alguns métodos analíticos, como a espectrofotometria, extrato límpido é condição de análise<sup>21</sup>.

## Amostras

Foram utilizadas 50 amostras de sardinha (*Triporthus angulatus*) obtidas na feira do CEASA, Distrito Industrial de Manaus. Antes dos procedimentos, a essas amostras foi aplicada avaliação sensorial baseada na tabela da Torry Research-Station Escocia (UK)<sup>23</sup> (Tabela 1). Foram observados os itens guelras, olhos, pele, odor, textura e aspecto dos órgãos internos.

As amostras foram classificadas como classe "A" em uma escala da própria tabela que classifica também em classe B, C e rejeitável.

A tabela possui, para cada item, características que classificam a amostra em A, B, C ou rejeitável. Cada uma das classificações dos itens possui um valor que, somado no final, determina a qual classe corresponde a amostra. De 19 a 24 pontos, A; de 13 a 18, B; 6 a 12, C; e menor que 6, rejeitável. Todas as amostras utilizadas obtiveram 4 pontos em cada item, que somados resultaram em 24 pontos.

Em seguida, foi efetuada a evisceração das amostras através de corte no sentido ântero-posterior, ensacadas individualmente, refrigeradas em caixa térmica para o transporte e congeladas a -18°C até o momento do assamento.

## Preparo das amostras

Antes do assamento em churrasqueira, uma alíquota de aproximadamente 15 g da musculatura foi retirada das amostras, assim como aos 30 minutos e 60 minutos de assamento.

Todas as amostras retiradas, após o resfriamento em temperatura ambiente, foram devidamente envolvidas em plástico PVC e papel alumínio, recebendo a identificação "amostra crua", "amostra 30 minutos" e "amostra 60 minutos".

Tabela 1. Tabela de avaliação sensorial baseada nas características do pescado cru.

	Classe A	*Pts	Classe B	Pts	Classe C	Pts	Rejeitável	Pts
Guelras	Cor vermelho-vivo, muco límpido e forte odor de plantas aquáticas	04	Cor vermelho-pálido e castanho-avermelhado, perda de odor de plantas aquáticas	03	Castanho-escuro a castanho-amarelado, muco leitoso, odor de pão ou leite azedo	02	Cor branca, muco granuloso, odores de amônia, ácido sulfúrico, odores fecais	01
Olhos	Claros, brilhantes e salientes, pupilas negras com matrizes amareladas, córneas translúcidas	04	Encovados, brancos, nebulosos ou amarelados, pupilas com algumas descolorações, córneas opacas	03	Encovados, brancos baços ou sanguíneos, pupilas leitosas ou acinzentadas, córneas côncavas sujeitas à descoloração	02	Muito sanguíneos pupilas opacas e cobertas de muco, córneas descoloradas ou enrugadas	01
Pele	Cor normal, lustrosa e clara	04	Cor baça, sem aparência límosa	03	Ausência de cor normal e lustrosa, estrutura muscular visível	02	Descolorada em avançado estado de decomposição	01
Cheiro	Típico de peixe capturado recentemente	04	Odor pouco acentuado, neutro	03	Ligeiramente azedo ou rançoso, mas não a putrefação	02	Azedo, mau cheiroso ou a putrefação	01
Textura	Escamas brilhantes e fortemente aderidas, nenhuma deformação, musculatura firme e elástica, especialmente no abdômen	04	Com pouco brilho, cor ligeiramente escura, ligeiras deformações ou mutilações, musculatura firme não elástica	03	Superfície rugosa, escamas aderentes, algumas fendas, musculatura mole	02	Superfície áspera, muitas fendas, musculatura flácida; quando apertada entre os dedos, não torna à posição inicial	01
Órgãos Internos	Peritônio íntegro, parede abdominal íntera, rim vermelho-vivo, fígado íntegro	04	Peritônio oxidado (escuro), parede abdominal com início de digestão, rim vermelho, fígado e intestino em decomposição	03	Peritônio desfeito (cor preta), parede abdominal digerida e com espinhas salientes, rim vermelho-escuro, fígado e intestino ligeiramente desfeitos	02	Escuros e desfeitos	01
Valor	24-19		18-13		12-06		Menor do que 06	

\*Pts=pontos

Fonte: FAO (1987); BURGESS (1967).

Fonte: <http://www.scielo.br/img/revistas/cr/v36n4/a38tab01.gif>



## Extração do nitrato e nitrito

Em um erlenmeyer foram adicionados 10 ml da amostra, 40 ml de água deionizada e 5 ml de tetraborato de sódio. Homogeneizou-se e levou-se ao banho-maria por 15 minutos. A solução então foi transferida para balão de 200 ml, adicionados 5 ml de ferrocianeto de potássio 15% e 5 ml de acetato de zinco 30% e em seguida filtrado em papel qualitativo<sup>24</sup>.

## Quantificação de nitrito

Foram colocados 10 ml do filtrado em balão volumétrico de 50 ml e adicionados 5 ml de sulfanilamida e, após 3 minutos, 3 ml de naftlenodiamino 0,5%. Completou-se o volume e aguardou-se 30 minutos. Foi feita a leitura em espectrofotometria em absorvância a 540 nm<sup>24</sup>.

## Quantificação do nitrato

Foram colocados 20 ml do filtrado em um béquer e adicionados 5 ml de solução tampão pH 9,6-9,7. Passou-se pela coluna de cádmio e foi recolhido em balão de 100 ml; 10 ml do filtrado pela coluna de cádmio foram colocados em balão volumétrico de 50 ml e adicionados 5 ml de sulfanilamida, e após 3 minutos 3 ml de naftlenodiamino 0,5%. Completou-se o volume e aguardou-se 30 minutos. Foi feita a leitura em espectrofotometria em absorvância a 540 nm<sup>24</sup>.

## Resultados

A média de nitratos encontrados nas amostras *in natura*, assadas 30 minutos e 60 minutos, foi de 0,0020% (m/m), 0,00001% (m/m) e 0,00001% (m/m), respectivamente, e de nitritos foi de 0,0001% (m/m), 0,0063% (m/m) e 0,0030% (m/m), respectivamente, com médias que demonstram a correlação significativa entre tempo de assamento e os teores de nitrato e nitrito<sup>25,26</sup>.

A quantificação de nitritos das amostras assadas aos 30 minutos e 60 minutos demonstrou um aumento aos 30 minutos e, apesar de diminuir aos 60 minutos, mantém-se em níveis mais elevados do que o nitrato.

## Tratamento estatístico

Métodos estatísticos são utilizados para o planejamento e condução de um estudo, descrição dos dados e para tomada de decisões, onde se podem citar os testes de hipóteses que se baseiam nos riscos associados a elas.

Os testes de hipóteses se dividem em paramétricos, o qual utiliza parâmetros de distribuição ou estimativa para cálculos,

e não paramétricos, atribuídos aos dados ordenados e livres da distribuição de probabilidades dos dados estudados<sup>24</sup>.

Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, considerado um teste não paramétrico utilizado para comparar três ou mais amostras e testar a hipótese nula de que todas as populações possuem funções de distribuição iguais, contra a hipótese alternativa de que ao menos duas das populações possuem funções de distribuição diferentes. As principais vantagens são a possibilidade de comparação de mais de duas amostras e a não exigência de normalidade ou de outra distribuição qualquer para as populações estudadas<sup>25,26</sup>.

Enquanto a análise de variância dos testes depende da hipótese de que todas as populações em confronto são independentes e normalmente distribuídas, o teste de Kruskal-Wallis não coloca nenhuma restrição sobre a comparação. Utilizam-se para teste de k amostras independentes que provêm de uma mesma população ou de populações idênticas em relação à média<sup>26</sup>.

As médias obtidas, com níveis de significância para 1% ( $p$  valor < 0,01), demonstraram que a correlação entre tempo de cozimento e os teores de nitrato e nitrito é significativa, com um valor de -0,5352, e a relação entre nitrato e nitrito nas condições pesquisadas apresentou relação linear também significativa para todos os tratamentos, com coeficientes de correlação altos (Tabela 3).

## Discussão

Por ser uma fonte alimentar rica em compostos nitrosos, existirem inúmeras espécies de peixes ainda não estudadas e serem intensamente consumidos na região Norte do País na forma de assamento através do carvão vegetal, há necessidade de mais pesquisas a respeito da formação de nitratos, nitritos e possíveis compostos nitrosos.

Ao contrário de muitos produtos cárneos industrializados, especialmente embutidos e enlatados, existe carência de estudos para muitos tipos de pescados e de seus poucos produtos industrializados, a fim de estabelecer possível presença ou formação de nitratos e nitritos.

O comitê para aditivos alimentares da Organização Mundial da Saúde para Alimentação (WHO/FAO) define como segura a ingestão diária de nitritos na forma de íons entre 0 e 0,07 mg.kg<sup>-1</sup> de peso corpóreo e entre 0 e 3,7 mg.kg<sup>-1</sup> de nitrato de sódio e potássio na forma de íons<sup>21</sup>. Em 2002, esse mesmo comitê confirmou esses valores, ressaltando a não aplicação dos valores para crianças abaixo de 3 meses<sup>27,28</sup>.

O limite tolerado de nitrito e nitrato como aditivo alimentar depende da matriz e da legislação correspondente vigente no país. No Brasil, a Portaria nº 1.004/ANVISA/MS, de 11 de

Tabela 2. Quantificação e desvio padrão de nitratos e nitritos de amostras *in natura*, assadas 30 e 60 minutos.

Tratamento	Amostras <i>in natura</i>		Amostras assadas 30 minutos		Amostras assadas 60 minutos	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
Nitrato (%m/m)	0,00020	0,00017	0,00001	0,0001	0,00001	0,0001
Nitrito (%m/m)	0,00001	0,0004	0,00063	0,00003	0,00030	0,00007

Tabela 3. Tratamento estatístico segundo Kruskal-Wallis da quantificação de nitratos e nitritos em amostras *in natura* e assadas 30 e 60 minutos.

Tratamento	Amostras <i>in natura</i>		Amostras assadas 30 minutos		Amostras assadas 60 minutos	
	Nitrato	Nitrito	Nitrato	Nitrito	Nitrato	Nitrito
Repetições	50	50	50	50	50	50
Média	0,00020	0,00001	0,00001	0,00063	0,00001	0,00030
Soma de graus	255.000	55.000	155.000	255.000	55.000	155.000
Classificação	a	c	b	a	c	b
Correlação	0.9537		0.9260		0.8878	

dezembro de 1998, define como limite máximo 0,03 g/100 g (300 ppm) para nitrato e 0,015 g/100 g (150 ppm) para nitrito de sódio, e ou potássio em produtos cárneos curados industrializados ou frescos<sup>29</sup>. Apesar de não existir legislação específica referente a pescados, industrializados ou não, podemos tomar como base a definição da OMS.

### Conclusão

Existe a formação de nitratos e nitritos em pescado decorrente do processo térmico realizado com carvão vegetal, mas abaixo dos limites definidos pela OMS e pela legislação brasileira para consumo humano.

O consumo dessa matriz alimentar nas condições reproduzidas neste trabalho não oferece risco à saúde humana em relação à formação de nitratos e nitritos.

### Referências

- Doria CRC, Queiroz LJ. A pesca comercial das sardinhas (*Tripurtheus spp.*) desembarcadas no mercado pesqueiro de Porto Velho, Rondônia (1990-2004): produção pesqueira e perfil geral. *Biotemas*. 2008(21):99-106.
- Santos GM, Efrem JG, Ferreira JASZ. Peixes comerciais de Manaus. Manaus: Ibama; 2006.
- Fellows PJ. Tecnologia do Processamento de alimentos: princípios e práticas. 2. ed. Porto Alegre, RS: Artmed; 2006.
- Shibamoto T, Bjeldanes LF. Introducción a la toxicología de los alimentos. Zaragoza: Acribia; 1996.
- Reyes FGR, Campos NFM. Nitrosaminas: presença e formação em agrotóxicos. In: Almeida WF, Almeida MEW. *Ecotoxicología y seguridad química*. México: Metepec; 1987. p. 153-61. [acesso em 10 mar. 2012]. Disponível em: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/eco/002826/02826-13.pdf>
- Ganhão FMC. Evolução do teor de nitritos e de nitratos e da concentração de pigmentos no fiambre e na mortadela ao longo do seu processo produtivo e do seu prazo de vida útil [dissertação] [internet]. Lisboa, Portugal: Universidade Nova de Lisboa; 2010. [acesso em 20 jul. 2013]. Disponível em: [http://run.unl.pt/bitstream/10362/5689/1/Ganhao\\_2011.pdf](http://run.unl.pt/bitstream/10362/5689/1/Ganhao_2011.pdf)
- Walker R. Nitrates, nitrites and N-nitrosocompounds - review of the occurrence in food and diet and the toxicological implications. *Food Addit Contam*. 1990;7(6):717-68.
- Fennema WR. *Química de los alimentos*. 2. ed. Zaragoza: Acribia; 1993.
- Benini ERY, Takahashi HW, Neves CSVJ, Fonseca ICB. Teor de nitrato em alface cultivada em sistemas hidropônico e convencional. *Hortic Bras*. 2002;20(2):183-186.
- Kunisaki N, Hayashi M. Formation of N-Nitrosamines from Secondary Amines and Nitrite by Resting Cells of *Escherichia coli* B. *Appl Environ Microbiol*. 1979;2(37):279.
- Dusman E, Berti AP, Soares LC, Vicentini VEP. Principais agentes mutagênicos e carcinogênicos de exposição humana. *SaBios: Rev. Saúde e Biol*. [internet] 2012 [acesso em 22 jul. 2013];7(2):66-81, maio./ago., 2012. Disponível em: <http://www.revista.grupointegrado.br/revista/index.php/sabios2/article/view/943/438>
- Luz GL, Medeiros SLP, Manfron PA, Amaral AD, Müller L, Torres MG, Mentges L. A questão do nitrato em alface hidropônica e a saúde humana. *Cienc Rural* [internet]. 2008 [acesso em 06 ago. 2013];38(8):2388-2394. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cr/v38n8/a49v38n8.pdf>
- Graeff A, Pruner EN. Variáveis que podem interferir na sobrevivência e desenvolvimento da *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) na região fria do Estado de Santa Catarina. *Comunicación Científica* [internet]. 2006 [acesso em 10 abr. 2012];70-9. Disponível em: <http://www.crmvsc.org.br/pdf/artigo-cientifico-005.pdf>
- Matsui H. On the oxidizing substance which appears in Shiozuke extracts of various vegetables. *J Agric Che Soc Jpn*. 1944;16:1167-68.
- International Agency for Research on Cancer. Agents Classified by the IARC Monographs, Ingested Nitrate and Nitrite, and Cyanobacterial Peptide Toxins. Vol. 94. [acesso em 22 jul. 2013]. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol94/mono94.pdf>
- World Health Organization. International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 5. Nitrates, Nitrites and N-Nitroso Compounds. Geneva; 1978. [acesso em 12 set. 2012]. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc005.htm>
- Luz GL, Medeiros SLP, Manfron PA, Amaral AD, Müller L, Torres MG, Mentges L. A questão do nitrato em alface hidropônica e a saúde humana. *Cienc. Rural*. [internet]. 2008 [acesso em 12 maio 2012];38(8):2388-2394. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782008000800049&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782008000800049&script=sci_arttext)



18. Dutra CB, Reyes FGR. Nitrosaminas voláteis em alimentos. *Alim. Nutr.* [internet]. 2007 [acesso em 12 maio 2012]; 18(1):111-20. Disponível em: <http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/view/142/150>
19. Fewtrell L. Drinking-water nitrate, methemoglobinemia, and global burden of disease: a discussion. *Environ. Health Perspect.* 2004 [acesso em 21 abr. 2012];112c(14):1371-74. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1247562/>
20. Reyes FGR, Toyohara DQK, Toletto MCF. Nitratos e nitritos em alimentos: ocorrência, absorção e efeitos tóxicos. In: Almeida WF, Almeida MEW. *Ecotoxicología y seguridad química.* [internet]. México: Metepec; 1987. p.129-41. [acesso em 11 ago. 2012]. Disponível em: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/eco/002826/02826-11.pdf>
21. Andrade R. Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de nitratos, nitritos e N-nitrosaminas em produtos cárneos [tese]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2004. [acesso em 22 jul. 2013]. Disponível em: <http://biq.iqm.unicamp.br/arquivos/teses/ficha63322.htm>
22. Pessoa Neto AR, Korn MG. Os nutrientes nitrato e nitritos como contaminantes ambientais e alternativas de determinação [internet]. *Candombá Rev Virtual.* 2006;2(2):90-7.
23. Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura. Tabela de avaliação sensorial baseada nas características do pescado cru. [acesso em 10 nov. 2012]. Disponível em: <http://www.scielo.br/img/revistas/cr/v36n4/a38tab01.gif>
24. Association of Official Analytical Chemists. *Methods 973.31.* In: Association of Official Analytical Chemists. *Official methods of analysis of AOAC international.* 18. ed. Maryland: AOAC; 2005.
25. Reis GM, Ribeiro Junior JI. Comparação de testes paramétricos e não paramétricos aplicados em delineamentos experimentais. In: III SAEPRO. Viscoça, MG: UFV; 2007. [acesso em 08 abr. 2013]. Disponível em: <http://www.mat.ufrgs.br/~viali/estatistica/mat2282/material/textos/SA03.pdf>
26. Silva FAS, Azevedo CAV. A new version of The Assisat-Statistical Assistance Software. In: *World Congress on computers in Agriculture 4., 2006.* Orlando: American Society of Agricultural and Biological Engineers; 2006. p. 393-96.
27. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 30691, de 29 de março de 1952. Dispõe e aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. *Diário Oficial da União.* 29 mar. 1952; Seção 1.
28. Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, Organização Mundial da Saúde. *International Programme on Chemical Safety* [internet]. [acesso em 11 mar. 2013]. Disponível em: <http://apps.who.int/ipsc/database/evaluations/chemical.aspx?chemID=709>
29. Brasil. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 1.004, de 11 de dezembro de 1998. Regulamento Técnico de Atribuição de Função de Aditivos e seus limites máximos para carne e produtos cárneos. *Diário Oficial da União.* 22 mar. 1999. Seção 1. p.15.

Data de recebimento: 30/11/2012

Data de aceite: 30/07/2013