

## NITROSAMINAS: FORMAÇÃO, ASPECTOS TOXICOLÓGICOS E ANÁLISE

Felix G. R. Reyes

Nestor F. Mendoza Campos

Faculdade de Engenharia de Alimentos-UNICAMP

Campinas, SP - Brasil

### INTRODUÇÃO

Nitrosaminas (NAS) são compostos orgânicos de fórmula estrutural  $R_1 R_2 N=N=O$  onde  $R_1$  e  $R_2$  podem ser grupos alquila, arila ou parte de um anel. Estes compostos resultam da nitrosação, preferencialmente em meio ácido e principalmente de amins secundárias, pela ação de agentes nitrosantes como cloreto de nitrosila, anidrido nitroso e íon nitrônio, entre outros.

Pelo fato das reações de nitrosação ocorrerem no ar, solo, água e alimentos, as NAS se apresentam como um contaminante amplamente distribuído no meio ambiente.

Grande número de trabalhos tem sido publicado a respeito das NAS, abordando os seguintes aspectos: 1. Métodos de análise (Scanlan e Reyes, 1975). 2. Presença de NAS no ambiente, incluindo os alimentos (Reyes e Scanlan, 1984). 3. Mecanismos de formação de NAS (Skrypec e col., 1985), inclusive formação in vivo nas condições do estômago (Wagner e Tannenbaum, 1985). 4. Mecanismos para evitar a formação de NAS (Theiler e col., 1984).

A presença de tais compostos nos alimentos para consumo humano, constitui um assunto de grande interesse na área da toxicologia de alimentos. A grande maioria dos trabalhos relativos à presença de NAS em alimentos têm sido desenvolvidos nos EUA, Europa e Japão. Pelo fato da concentração e do tipo de NAS nos alimentos dependerem de vários fatores, é necessário que essas pesquisas também sejam feitas em outros países com diferentes hábitos e costumes alimentares, dado o risco potencial que esses compostos apresentam na etiologia do câncer humano.

## 2. FORMAÇÃO DE NITROSAMINAS

O estudo da química das NAs iniciou-se em 1863 com a síntese de nitrosodietilamina (NDEA). Os estudos relativos à cinética da reação em meio aquoso, do ácido nitroso e diversas aminas, foram porém iniciados somente a partir de 1929.

Nitrosodimetilamina (NDMA), o membro mais simples da família das NAs, tem sido utilizada como solvente industrial e como intermediária na síntese de 1,1-dimetilhidrazina. Além disso, tem sido sugerido o uso de outras NAs como repelentes de insetos, inseticidas, fungicidas e nematicidas.

Os primeiros indícios de que NAs poderiam estar presentes nos alimentos surgiram no período 1957-1962, na Noruega, quando foram detectadas alterações no fígado de ruminantes e martas que tinham consumido ração preparada com peixe ou farinha de peixe preservada com nitrito de sódio (Wogan e Tannenbaum, 1975). Em 1964, Ender e col. detectaram a presença de NDMA nessa ração animal e sugeriram que a metilamina, presente naturalmente na ração, reagira com nitrito para formar NDMA. Desde então, NAs tornaram-se objeto de grande interesse toxicológico, sendo reconhecidas como um perigo ambiental.

Vários tipos de estruturas contendo nitrogênio podem ser nitrosadas dentre as quais se incluem aminas, uréias, uretanos e guanidinas que se encontram presentes, praticamente, em todos os alimentos (Maga, 1978). A presença de nitrito em alguns alimentos é o resultado da redução de nitratos por plantas e enzimas microbianas e da adição de nitrito como aditivo no processamento de carnes curadas. As principais NAs encontradas em alguns alimentos e suas respectivas faixas de concentração, estão indicadas na Tabela 1.

Dentre as carnes curadas, o bacon é o alimento que tem recebido maior atenção, já que N-nitrosopirrolidina (NPIR) e também NDMA e N-nitrosodihidroxipirrolidina (NHPIR) encontram-se normalmente presentes neste produto. Outro composto que também tem sido detectado no bacon é N-nitrosotiazolidina, a qual é formada durante o processo de defumação.

Tabela 1 -

Principais nitrosaminas em alimentos

Nitrosamina	Concentração $\mu\text{g}/\text{kg}$ de alimento (ppb)
NPIR, NTHZ e NDMA no bacon frito	1 - 50
NDMA, NDEA, NMOR, NPIP, NTHZ e NPRO esporadicamente nas carnes curadas	1 - 25
NHPIR no bacon frito	1 - 3
NDMA esporadicamente em queijo	1 - 13
NDMA esporadicamente em peixe	1 - 25
NDMA em farinha de peixe	45 - 1700
NDMA em leite em pó desengordurado	0,1 - 6
NDMA em cerveja	0,1 - 15

NPIR: nitrosopirrolidina  
 NDMA: nitrosodimetilamina  
 NMOR: nitrosomorfolina  
 NPRO: nitrosoprolina

NTHZ; nitrosotiazolidina  
 NDEA: nitrosodietilamina  
 NPIP: nitrosópiperidina  
 NHPIR: nitrosohidroxipirrolidina

A presença de dimetil e trimetil amina em peixes tornam possível a formação de NDMA em peixes preservados com nitrito e defumados (Howard e col., 1970). A formação de NDMA ocorre também durante a etapa de secagem para obtenção da farinha de peixe, por ação de óxidos de nitrogênio presentes no fluxo de gases quentes.

A produção de óxidos de nitrogênio explica também a formação de Nas em outros alimentos secados por aquecimento direto, onde o fluxo de gases quentes entra em contato direto com o alimento. Dentre esses alimentos incluem-se sopas desidratadas, alimentos infantis, malte, cerveja e leite em pó desengordurado, nos quais tem sido detectada a presença de NDMA e café solúvel no qual tem sido detectado NPIR ( Sen e Seaman, 1981).

### 3. ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DAS NITROSAMINAS

Os aspectos toxicológicos dos compostos N-nitroso foram estudados por Freund em 1937, descrevendo a NDMA como uma "substância tóxica volátil a qual, depois de inalada, exercia uma ação característica no fígado" (hipertrofia degenerativa difusa e proliferação de células hepáticas). Em 1954, Barnes e Magge redescobriram este efeito e demonstraram, dois anos depois, que NDMA não só era altamente hepatotóxica, mas também altamente carcinogênica em animais de laboratório. Este fato, junto ao reconhecimento, em 1948, do risco apresentado por N-nitroso-N-metil uretano, levou a que as Nas fossem consideradas como um perigo industrial.

As características toxicológicas das Nas estão associadas a efeitos teratogênicos, mutagênicos e principalmente carcinogênicos (tumores hepático, renal e esofágico). As propriedades tóxicas das Nas estão abaixo resumidas.

- a. Tóxico agudo
- b. Mutagênico
- c. Teratogênico
- d. Carcinogênico

- Pode produzir tumores após uma dose única
- Induz neoplasmas transplacentalmente
- Órgano específico
- Ativo em todas as espécies testadas

Tais efeitos têm sido observados numa grande variedade de espécies que vão desde roedores até pássaros e peixes.

Uma alta atividade carcinogênica, associada a uma estrutura química simples, é propriedade comum dos compostos N-nitroso. Entre, aproximadamente, 300 compostos N-nitroso testados, a maior parte apresentou ação carcinogênica. Vários destes compostos produzem câncer mesmo quando administrados em dose única, sendo capazes também de induzir tumores na prole, quando administrados em fêmeas grávidas.

No homem, a quantidade de NAs ingerida, inalada ou absorvida através da pele, é estimada entre 1 e 6  $\mu\text{g}$  por dia, e provem de alguns ambientes industriais (borracharia e curtumes), fumo de cigarro, cosméticos, pesticidas, interiores de carros e alimentos. Uma outra fonte de exposição, estimada em 7  $\mu\text{g}$  por dia, provem da formação de NAs in vivo, a nível do trato gastrointestinal, por ingestão de precursores. Estes valores, provavelmente são menores que os valores reais, já que não se tem conhecimento suficiente a respeito da exposição às NAs não-voláteis.

#### 4. ANÁLISE DE NITROSAMINAS

As concentrações nas quais as NAs se encontram presentes nos alimentos são de poucos  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de alimento. Tais níveis são significativos, se considerarmos que as estimativas de uma exposição "tolerável" para o homem situam-se ao redor de 5 a 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de alimento. Este fato limita o uso de métodos analíticos para aqueles com sensibilidade mínima de 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Drescher e Frank, 1978).

Um outro aspecto a considerar na seleção do método de análise é a especificidade. Esta característica influi diretamente no tratamento ("clean up") de amostras complexas como são os alimentos, exigindo múltiplas etapas para a remoção de componentes naturais que possam interferir na detecção e identificação das NAs presentes.

#### 4.1. - Extração

Para fins analíticos, as NAs são divididas em: voláteis e não voláteis. O termo NAs não voláteis aplica-se a todo composto N-nitroso não destilável dentro de um sistema aquoso. Tais compostos incluem dialquilnitrosaminas de cadeia longa, N-nitrosouréias, N-nitrosopeptídeos e N-nitrosoderivados de bases orgânicas, das quais N-nitrososarcosina e N-nitrosoprolina são as mais conhecidas. Amplas diferenças nas propriedades químicas e físicas desses compostos dificultam o estabelecimento de métodos analíticos de aplicação geral, motivo pelo qual, as NAs não voláteis têm sido pouco estudadas em alimentos.

As NAs voláteis são compostos de baixo peso molecular que apresentam suficiente pressão de vapor para serem extraídas por destilação a partir de um sistema aquoso, em meio alcalino ou neutro, já que em pH ácido as NAs tendem a se degradar. A destilação efetua-se a pressão atmosférica, a pressão reduzida ou por destilação rápida a pressão reduzida a partir de um sistema contendo óleo mineral, sendo a destilação a pressão reduzida o método de maior recuperação. Para o procedimento utilizando o sistema contendo o óleo mineral, que foi adotado pela AOAC em 1982, têm sido sugeridas algumas modificações para torná-lo ainda mais rápido e seletivo (Owens e Kinast, 1980). A extração direta com solventes, utilizando extractores contínuos tipo Soxhlet, tem demonstrado ser útil na determinação de ambos os tipos de NAs (Hotchkiss e col., 1980).

#### 4.2. - Purificação dos extratos

Avanços na especificidade dos métodos de detecção têm permitido a simplificação do tratamento da amostra. Colunas de celite eluídas com pentano e/ou diclorometano, produzem extratos a partir de amostras de bacon, de isolados e concentrados protéicos de soja, de cerveja e de leite em pó desengordurado com pureza suficiente para a determinação de NAs voláteis com concentrações de  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de alimento. O uso combinado de um gás de arraste (nitrogênio ou argônio) com materiais adsorventes de NAs, dispostos em um determinado arranjo, tem dado bons resultados na extração e purificação de NAs voláteis em amostra de rações animais e alimentos infantis.

#### 4.3. - Detecção

Os compostos N-nitroso são degradados pela ação do ácido bromídrico, pela redução eletroquímica, pelo cloreto de tionilo e pela radiação ultravioleta. São produtos principais desta reação o ácido nitroso ou um derivado deste, e a correspondente amina secundária. A detecção destes produtos de decomposição constituem a base de grande parte dos métodos indiretos que têm sido utilizados na determinação de NAs em alimentos.

Existem vários métodos para detectar o ácido nitroso sendo alguns deles aplicados na análise de NAs. Dentre esses métodos encontram-se aqueles em que o ácido nitroso reage quantitativamente com o reagente de Griess (ácido sulfanílico/1-naftilamina), com o reagente NEDSA (N-1-naftilendiamina/ácido sulfanílico), ou com o reagente de Preussmann (cloreto de paládio/difenilamina) formando compostos coloridos. Estes compostos são utilizados na visualização de NAs em cromatografia em camada delgada, ou para quantificação das mesmas por determinação espectrofotométrica. Alguns componentes dos alimentos (ácidos graxos, tocoferóis e alguns pigmentos) produzem resultados falso-positivos, principalmente com o reagente de Preussmann, limitando a aplicação desses métodos.

Métodos baseados na redução eletroquímica das NAs também estão sujeitos a interferências.

Na detecção de aminas secundárias, geralmente por cromatografia em camada delgada, têm sido utilizados: Ninidrina; Cloreto de Dansilo-DANS-Cl- (cloreto de 1-dimetilamino-naftalen-5-sulfonila); DNP-F (2,4-dinitrofluorobenzeno); NBD-Cl(7-cloro-4nitrobenzeno-2-oxa-1,3 diazol); Fluorescamina (4-fenilspiro furan-2 (3H), 1-ftalan-3,3-diona) e cloreto de heptafluorobutanol o qual forma amidas que têm sido detectadas por cromatografia gasosa, utilizando detector de captura de elétrons.

Os métodos considerados diretos são baseados na determinação e confirmação direta das NAs. Pertencem a esta classificação os métodos que usam detectores polarográficos, detectores específicos (usados em cromatografia gasosa e/ou HPLC) e espectroscopia de massa.

Cromatografia gás-liquido (GLC) tem sido a técnica mais utilizada na detecção e quantificação de NAs. Para aumentar a especificidade da resposta do detector, utilizam-se detectores mais específicos do que o detector convencional de ionização de chama (FID). Os detectores N-seletivos mais usados tem sido: Detector Termoiônico, Detector eletroquímico, Detector de Fotoemissão e Analisador de Energia Térmica (TEA). A teoria operacional e as características de resposta destes detectores foram revisadas por Hall em 1978.

Dos detectores referidos, o TEA é o mais seletivo uma vez que os outros detectores são mais N do que N-O seletivos. Porém, como os outros detectores, o TEA também está sujeito a interferentes, motivo pelo qual é necessário confirmar os resultados obtidos usando-se um outro método analítico. A espectroscopia de massa (MS) é geralmente aplicada toda vez que sejam detectadas Nas pela primeira vez, ou sejam analisadas novos tipos de amostras.

## 5. REFERÊNCIAS

- BARNES, J.M.; MAGGE, P.N. - Some properties of dimethylnitrosamine. Brit. J. Ind. Med. 11, 1967-174, 1954
- DRESCHER, G.S.; FRANK, C.W. - Estimation of extractable N-nitroso compounds at the parts per billion level. Anal. Chem., Washington, 50 (14): 2118-2121, 1978
- ENDER, F.; HAVRE, G.; HELGEBOSTAD, A.; KOPPANG, N.; MADSEN, R.; CEH, L. - Isolation and identification of a hepatotoxic factor in herring meal produced from sodium nitrite preserved herring. Naturwissenschaften, 24: 637-638, 1964
- FREUND, H. A. - Clinical manifestations and studies in parenchymatous hepatitis. Ann. intern. Med. 10, 1144-1155, 1937
- HALL, R. C. - The nitrogen detector in gas-chromatography. Crit. Rev. Anal. Chem., Cleveland, 7: 323-380, 1978
- HOTCHKISS, J. H.; LIBBEY, L.M.; BARBOUR, J.F.; SCANLAN, R.A. - Combination of GC-TEA and GC-MS- Data system for the µg/kg estimation and confirmation of volatile N-nitrosamines in foods. In WALKER, E.A.; CASTEGNARO, M.; GRICIUTE, L.; BORZSONYI, M. - N-nitroso-Compounds: Analysis formation and occurrence, Lyon, IARC Scientific Publications n° 31, 1980
- HOWARD, J.W.; FAZIO, T.; WATTS, J.O. - Extraction and gas chromatographic determination of N-nitrosodimethylamine in smoked-fish: Application to smoke nitrite-treated chuo. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Washington, 53 (2): 269-274, 1970
- MAGA, J. A. - Amines in foods. Crit. Rev. Food Sci. and Nutrition, Cleveland, 10 (4): 373-403, 1978
- OWENS, J.L.; KINAST, O.E. - An improved procedure for the determination of volatile N-nitrosamines in bacon grease by using the mineral oil distillation-thermal energy analyzer method. J. Agric. Food Chem., Washington, 28: 1262-1264, 1980
- REYES, F.G.; SCANLAN, R.A. - N-nitrosaminas: Formação e ocorrência em alimentos. Bol. SBCTA, Campinas, 18: 299-309, 1984
- SCANLAN, R. A.; REYES, F.G. - An update on analytical techniques for N-nitrosamines. Food Technol., Chicago, 39: 95-99, 1985
- SEN, N.P.; SEAMAN, S. - Volatile N-nitrosamines in dried foods. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Washington, 64 (5): 1238-1242, 1981
- SKRYPEC, D.J.; MANDAGERE, A.K.; GRAY, J.I.; BOOREN, A.M.; PEARSON, A.M.; CUPPETT, S.L. - Effect of bacon composition and processing on N-nitrosamines formation. Food Technol., Chicago, January: 74-79, 1985

THEILER, R.F.; SATO, K.; ASPELUND, T.G.; MILLER, A.P. -  
Inhibition of N-nitrosamine formation in a cured ground pork  
belly model system. J. Food Sci., Chicago, 49: 341-344, 1984

WAGNER, D.A.; TANNENBAUM, S.R. - In vivo formation of N-nitroso  
compounds. Food Technol., Chicago, January: 89-90, 1985

WOGAN, G.N.; TANNENBAUM, S.R. - Environmental N-nitroso  
compounds: Implications for public health. Toxicol. and App.  
Pharm., 31: 375-383, 1975