

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre una cuestión planteada por la Dirección Ejecutiva de la AESAN, en relación con el riesgo de la posible presencia de N-nitrosaminas en productos cárnicos crudos adobados cuando se someten a tratamientos culinarios de asado o fritura

Miembros del Comité Científico

Andreu Palou Oliver, Juan José Badiola Díez, Arturo Anadón Navarro, Margarita Arboix Arzo, Albert Bosch Navarro, Juan Francisco Cacho Palomar, Francesc Centrich Escarpenter, M^o Luisa García López, Manuela Juárez Iglesias, Manuel Martín Esteban, Susana Monereo Megías, Juan Antonio Ordóñez Pereda, Andrés Otero Carballeira, Fernando Rodríguez Artaejo, Elías Rodríguez Ferrí, José Manuel Sánchez-Vizcaino Rodríguez, Vicente Sanchís Almener, Gregorio Varela Moreiras, Pablo Vera Vera, Gonzalo Zurera Cosano

Secretario

Jesús Campos Amado

Número de referencia: AESAN-2007-007

Documento aprobado por el Comité Científico en su sesión plenaria de 14 de noviembre de 2007

Grupo de Trabajo

Juan Antonio Ordóñez Pereda (Coordinador), Arturo Anadón Navarro, Margarita Arboix Arzo, Francesc Centrich Escarpenter, Manuela Juárez Iglesias, Andreu Palou Oliver, Lourdes Suárez González (AESAN), Ana Isabel Blanch Cortés (Consultora externa), María Teresa Marín Tapia (Consultora externa)

Resumen

Los preparados cárnicos crudos adobados son los elaborados con piezas cárnicas enteras o trozos pertenecientes a las especies de abasto, aves y caza autorizados que se someten a la acción de la sal, especias y condimentos sin recibir tratamiento por el calor que haga coagular total o parcialmente las proteínas. En estos productos crudos adobados se utilizan nitritos y/o nitratos y su consumo se efectúa después de haber sido sometidos a tratamientos culinarios de asado o fritura. Han de mantenerse continuamente en refrigeración (≤ 4 °C), se distribuye en piezas enteras (lomo) o troceadas (pinchos morunos) envueltas en una película permeable y su vida útil puede estimarse, en el caso de los lomos, en unos 15-20 días.

Los nitritos ejercen unos efectos de gran trascendencia en la elaboración de preparados cárnicos curados. El hecho de inhibir a *Clostridium botulinum* es un argumento poderoso acerca de la necesidad de utilizar nitritos por estar comprometida la salud del consumidor. Además, los nitritos, desde un punto de vista tecnológico, ejercen también unas funciones muy importantes, ya que refuerzan, por una parte, la acción conservadora de otras tecnologías (salazonado, ahumado, deshidratación) y, por otra, participan en el sabor y aroma característicos de los productos nitrificados.

El uso de nitratos y nitritos en la elaboración de productos cárnicos curados conlleva la producción de N-nitrosaminas que se forman por nitrosación de aminas y amidas y otros compuestos nitrogenados. Las N-nitrosaminas pueden surgir mediante formación exógena (en el producto dependiendo de diversos factores que, en el caso de los alimentos, el más importante es el tratamiento térmico aplicado en el cocinado, fritura, asado, cocción, etc.) y por síntesis endógena (en el organismo, fundamentalmente en la saliva y el estómago). Existen evidencias de que la mayoría de las N-nitrosaminas analizadas (alrededor de 300) poseen actividad tóxica, mutagénica y cancerígena para un amplio número de especies animales, incluyendo primates. Entre las más potentes se encuentran las N-nitrosami-

nas volátiles dialquilo y heterocíclicas más simples. Por ello, y por ser las más frecuentes en los alimentos curados, son las que mayor atención han recibido.

Las N-nitrosaminas volátiles se encuentran en los diversos productos cárnicos curados (adicionados de nitratos y nitritos) habitualmente pero a valores muy bajos. En los productos que se consumen tras un cocinado térmico (fritura, asado, horneado en microondas, etc.) las cantidades son mayores porque el tratamiento térmico acelera los fenómenos implicados en la síntesis de estos compuestos. En los productos cárnicos las nitrosaminas que adquieren más importancia son la N-nitrosopirrolidina (NPYR) que es la que surge en mayor cuantía al formarse por nitrosación de la prolina, seguida de la N-nitrosodimetilamina. La presencia de estas sustancias ha de considerarse, por una parte, en el contexto del efecto inhibitorio de los nitritos sobre el crecimiento de *C. botulinum* y, por otra, atendiendo a las propiedades tecnológicas de los nitritos (fundamentalmente fijación del color y participación en el sabor de los productos curados).

Por otro lado, hay que apuntar que la ingestión de nitratos presentes en otros alimentos (hortalizas principalmente) puede conducir al incremento en la boca, primero de nitratos y, tras su reducción, a nitritos, dispuestos para la generación de agentes nitrosantes y, en definitiva, de N-nitrosaminas vía endógena. No obstante, estas mismas hortalizas pueden contener ácido ascórbico que inhibe las reacciones de nitrosación de las aminas y amidas secundarias. Pero no sólo los alimentos son fuentes de nitritos y N-nitrosaminas sino que se han detectado también en otros productos de uso habitual, como los cosméticos, agentes de limpieza, productos de caucho y, especialmente, en el tabaco, en el que incrementan los niveles de N-nitrosaminas vía pirolisis durante su combustión.

No se dispone de datos sobre el contenido de nitrosaminas en la carne cruda adobada una vez cocinada (fritura o asado) que indiquen cuál es la verdadera exposición de los humanos. No obstante, a partir de los contenidos medios que se han hallado en el bacon (50-100 µg/kg) y los porcentajes descritos de volatilidad durante el cocinado (70% para la NDMA y 45% para la NPYR) puede estimarse que las cantidades ingeridas por ración (100 g) de producto son del orden de 0,15 µg de NDMA y 6,75 µg de NPYR aunque estas cantidades sólo representarían un 15-20% de las ingresadas por otras vías exógenas y las endógenas. Aún así, los valores totales estarían muy por debajo de la TD₅₀ estimada en ratas para la NDMA y NPYR (95,9 µg/kg y 799 µg/kg peso corporal/día, equivalentes a 6,7 mg y 56 mg, respectivamente, para una persona de 70 kg de peso).

A la vista de la complejidad del problema, lo que interesa es restringir la presencia de nitrosaminas y sus posibles precursores tanto como sea posible en los alimentos. Esto no debería ir acompañado de una pérdida de protección frente al botulismo u otros atributos y, por ello, quizás la mejor alternativa sea la utilización de inhibidores de la nitrosación, como el ácido ascórbico.

Puede inferirse que la carne cruda adobada apenas contiene N-nitrosaminas, sin embargo, se generarán en el proceso culinario, no obstante, dada la volatilidad de las mismas y su condición de producto muy magro, las cantidades que se retengan en la matriz cárnica no parece que puedan contribuir de forma significativa a la ingesta total de N-nitrosaminas.

En cualquier caso, se recomienda utilizar ácido ascórbico y/o eritórbito en la formulación de las sales del curado. Se aconseja igualmente que el tratamiento térmico no sea de fritura sino a la plancha o en microondas. Asimismo, se sugiere que el cocinado se realice siempre en recipientes sin tapar para favorecer la disipación de las N-nitrosaminas que se vayan formando.

Finalmente, la carne cruda adobada es un producto cárnico fresco que es necesario mantenerlo en refrigeración continua ($\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) hasta su uso, habitualmente envuelto en una película bastante permeable a los gases. Su vida útil es corta, no más allá de unos veinte días. Estas circunstancias hacen que el efecto inhibitorio de los nitritos sobre *C. botulinum* tenga menos importancia que en otros productos nitrificados. En consecuencia, podría estudiarse la posibilidad de reducir los niveles de nitratos y nitritos adicionados hasta niveles en que sólo fuesen necesarios para desempeñar sus funciones tecnológicas.

Palabras clave

Productos cárnicos, crudos adobados, nitritos, aminos, compuestos N-nitroso, N-nitrosaminas.

Abreviaturas: N-nitrosodimetilamina: NDMA; N-nitrosodietilamina: NEMA; N-nitrosodibutilamina: NBMA; N-nitrosopirrolidina: NPYR; N-nitrosopiperidina: NPIP.

Report of the Scientific Committee of Spanish Agency For Food Safety and Nutrition (AESAN) about a question of the Executive Direction of AESAN, in relation to the risk of the possible presence of N-nitrosamines in marinated fresh meat products when they are subjected to culinary treatments of frying or roasting.

Abstract

Marinated fresh meat products are made from meat pieces are those elaborated from whole meat pieces or parts from authorized livestock, poultry and game subjected to the action of salt, spices and condiments without heat treatment enough to provoke total or partial coagulation of proteins. In these products nitrites and/or nitrates are used and they are consumed after a culinary treatment of frying or roast. The must be kept under continuous refrigeration ($\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$), distributed in whole pieces (loin) or cuts (brochette) wrapped in a permeable film and their shelf life can be estimated, in the case of loins, in 15-20 days.

Nitrites have very important effects on the manufacture of marinated fresh meat products. The fact of inhibiting *Clostridium botulinum* is a powerful argument that remarks the need of using nitrites since the consumer's health is put at risk. Besides, nitrites, from a technological point of view, have other important functions, since they reinforce the preservative action of other technologies (salting, smoking, dehydration) and on the other hand, participate in the characteristic flavour and aroma of nitrified products.

The use of nitrites and nitrates in the manufacture of fresh meat products entails the production of N-nitrosamines, formed by nitrosation of amines and amides and other nitrogenous compounds. N-nitrosamines may arise by exogenous formation (in the product, depending on diverse factors. In the case of foods the most important is the heat treatment of cooking –frying, roasting, boiling, etc.– and by endogenous synthesis (in the body, mainly in saliva and stomach). There are evidences that show that most of the analysed N-nitrosamines (about 300) have toxic, mutagenic and carcinogenic activity on a wide number of animal species including primates. Among the most powerful are the vola-

tile N-nitrosamines dialkyl and the most simple heterocyclic. Therefore, and because they are the most frequent in cured foods, they have become more attention.

Volatile N-nitrosamines are normally found in many cured meat products (with addition of nitrites and nitrates) but at very low rates. In products consumed after a thermal treatment (frying, roasting, baking in microwave, etc.) the quantities are greater because the thermal treatment accelerates the phenomena involved in the synthesis of such compounds. In meat products, the most important nitrosamines are N-nitrosopyrrolidine (NPYR), which is the one that arises in greatest quantities by nitrosation of proline, followed by N-nitrosodimethylamine. The presence of these substances must be considered, on one hand, within the context of the inhibiting effect of nitrites on *Clostridium botulinum* growth and on the other hand, in relation to the technological properties of nitrites (mainly colour fixation and participation in flavour of cured products).

Intake of nitrates present on other foods (mainly vegetables) can lead to an increase in the mouth, first of nitrates and after reduction of nitrites, available for the formation of nitrosant agents, and eventually of N-nitrosamines endogenously. Nevertheless, these vegetables can contain ascorbic acid, which inhibits the reactions of nitrosation of amines and secondary amides. However, not only foods are the source of nitrites and N-nitrosamines, but they have also been detected in common use products, like cosmetics, cleaning products rubber products and, specially, in tobacco, where the levels of N-nitrosamines are increased by pyrolysis during combustion.

There are no available data about the content of nitrosamines in cooked marinated fresh meat products (fried or roasted) that might indicate the actual exposition in humans. Nevertheless, from the average contents found in bacon (50-100 µg/kg) and the percentages of volatility described during cooking (70% for NDMA and 45% for NPYR) it can be estimated that the ingested quantities per ration (100 g) of product are around 0,15 µg of NDMA and 6,75 µg of NPYR, though these quantities would only represent a 15-20% of those reaching the body by other exogenous and endogenous ways. Anyway, the total values would be very under the TD₅₀ estimated in rats for NDMA and NPYR (95,9 µg/kg and 799 µg/kg body weight/day, equivalent to 6,7 mg and 56 mg, respectively, for a person of 70 kg body weight).

In view of the complexity of the problem, it is interested to restraint the presence of nitrosamines and their potential precursors in foods as much as possible. This should not be accompanied by a reduction in protection against botulism or other attributes, and therefore the best alternative probably is to use inhibitors of nitrosation, like the ascorbic acid.

It can be inferred that marinated fresh meat products hardly contain N-nitrosamines. However, they will be generated during the cooking. Due to their volatility and the condition of very lean products, the quantities retained in the meat matrix do not seem to significantly contribute to the total intake of N-nitrosamines.

In any case, it is recommended to use ascorbic and/or eritorbic acid in the formulation of curing salts. It is also advisable that the thermal treatment is not of frying but grilling or baking in the microwave. Also it is suggested that cooking is always made in pans with no lid to help the dissipation of forming N-nitrosamines.

Finally, marinated fresh meat is a fresh meat product, which needs of continuous refrigeration ($\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) until use, generally wrapped in a permeable to gases film. Shelf life is short, not longer than 20 days.

In these circumstances, the inhibitor effect of nitrites on *Clostridium botulinum* is less important than in other nitrificated products. Consequently, it may be studied the possibility of reducing added nitrates and nitrites levels to levels in which they would be only necessary for their technological functions.

Key Words

Meat products, marinated fresh products, nitrites, amines, N-nitroso compounds, N-nitrosamines.

Abbreviations: N-nitrosodimethylamine: NDMA; N-nitrosodiethylamine: NEMA; N-nitrosodibuthylamine: NBMA; N-nitrosopyrolidine: NPYR; N-nitrosopiperidine: NPIP.

1. Concepto de productos curados

La conservación de la carne mediante curado es un método muy eficaz practicado desde hace mucho tiempo; los productos obtenidos son muy apreciados por los consumidores y gozan, además, de un excelente historial en lo que se refiere a su seguridad alimentaria. Los productos cárnicos curados son muy diversos pero todos tienen en común que se utilizan "sales del curado" (sal común, nitratos y nitritos, acompañados de ascorbato y azúcar y, a veces, fosfatos) en su elaboración. Estos productos incluyen los curados tratados con calor, enlatados o no (jamón cocido, mortadelas y otros fiambres, paté, salchichas tipo Frankfurt, etc.), los curados frescos sin recibir tratamientos térmicos, representados por los crudos adobados (p.e., cinta de lomo) o no (salchichas frescas), etc., los curados crudos sometidos a maduración y secado y, opcionalmente, ahumado (embutidos madurados, jamón serrano, cecinas, etc.).

Los productos objeto de esta opinión son los crudos adobados, definidos por Orden Ministerial (O.M. 5.11.81) como los productos cárnicos crudos adobados elaborados con piezas cárnicas enteras o trozos pertenecientes a las especies de abasto, aves y caza autorizados que se someten a la acción de la sal, especias y condimentos sin recibir tratamiento por el calor que haga coagular total o parcialmente las proteínas. En estos productos crudos adobados se utilizan nitritos y/o nitratos y su consumo se efectúa después de haber sido sometidos a tratamientos culinarios de asado o fritura.

En el año 2000 se produjeron 174.500 toneladas de preparados crudos adobados (Huerta, 2007) que eran fundamentalmente lomo adobado. Se ha estimado que un 10% de lomo adobado se cocina mediante microondas y el resto mediante fritura y plancha a partes iguales (Huerta, 2007).

En relación con el presente informe el aspecto de mayor relevancia de estos productos es el uso de nitratos y nitritos en su elaboración por la posible formación de N-nitrosaminas en el producto o por efecto de los tratamientos culinarios de asado o fritura a que se someten estos alimentos inmediatamente antes de su consumo.

2. Funciones de nitratos y nitritos

Los nitratos (NO_3^-) y nitritos (NO_2^-) se han utilizado desde tiempos remotos (2000-3000 años antes J.C.) en el curado de las carnes y pescado aunque su uso era accidental al ser impurezas habituales de la sal común empleada en la salazón. A partir del siglo XIX se usan de forma regular. Los nitratos y nitritos ejercen cuatro funciones fundamentales:

a) Efectos antimicrobiano: quizás sea esta actividad el argumento más poderoso para el uso de nitratos y nitritos, ya que está comprometida la salud del consumidor. El nitrato por sí mismo carece de esta actividad; se requiere que se reduzca a nitrito que es el compuesto que ejerce esta función tan importante acompañado de otras sustancias que surgen procedentes de las transformaciones del nitrito, como el óxido nítrico (NO) y el ácido nitroso (HNO_2). La actividad antimicrobiana de estos compuestos recae principalmente sobre *C. botulinum* impidiendo la germinación de sus esporas y, por tanto, la formación de la neurotoxina (Roberts e Ingram, 1977) (Wirth, 1993) pero, además, también inhibe a otros microorganismos patógenos, como *Staphylococcus aureus* (Buchanan y Solberg, 1972) y *Clostridium perfringens* (O'Leary y Solberg, 1976) aunque son ineficaces frente a bacterias Gram negativas (Jay et al., 2005). Ocasionalmente, procedente del suelo, *C. botulinum* puede llegar a la

carne (EFSA, 2003), como han demostrado varios autores (Roberts y Smart, 1976) (Lund y Peck, 2000) e incluso se ha hallado en el hígado de animales sanos (Hauschild y Hilsheimer, 1983). No es posible asegurar su ausencia con las tecnologías actuales (EFSA, 2003).

La gran estabilidad y seguridad microbiológica de los productos cárnicos curados no sólo se debe a los nitritos sino que esta asociada también a otros agentes/factores. Entre ellos, el pH y actividad de agua del medio, concentración de NaCl, potencial redox, presencia (p.e. cisteína) o adición (p.e. ascorbato) de sustancias reductoras, condiciones del procesado, en especial, el tratamiento térmico (Roberts, 1975) (Vösgen, 1993) (Tompkin et al., 1978). Cualquier variación de estos factores podría traducirse en cambios microbianos en el producto, lo que podría llevar a aplicar modificaciones tecnológicas para garantizar la seguridad del producto. La actividad antimicrobiana de los nitritos se ha observado entre 80 y 150 ppm (Robert e Ingram, 1977).

No se conocen con precisión los mecanismos de inhibición del crecimiento de *C. botulinum* por los nitritos, no obstante, se han propuesto varios modelos:

- La forma no disociada de HNO_2 atraviesa la membrana celular provocando modificaciones que afectan a la viabilidad de la bacteria (Skovgaard, 1992).
- Acción bloqueante del nitrito en la ruta del ácido pirúvico (Walker, 1990).
- Inactivación de la ferredoxina piruvato oxidoreductasa (Carpenter et al., 1987).
- Interacción con diversos grupos, como $-\text{SH}_2$, $-\text{NH}_2$ y $-\text{OH}$ (Williams, 1988).
- Interacción de tres factores: oxidación de componentes celulares, quelación del hierro presente en proteínas microbianas y otros metales esenciales en el metabolismo y desorganización de la membrana celular (Benedict, 1980). La restricción del hierro viene apoyada por la observación de que en las carnes con elevado contenido de hierro (p.e. hígado y corazón de vacuno) se reducía el efecto antibotulínico del nitrito hasta tal punto que la acción protectora del nitrito desaparecía en el hígado (Tompkin et al., 1978).

b) Desarrollo y estabilización del color: el color de un alimento es la primera impresión del consumidor acerca de la calidad del mismo e influye directamente en la decisión de compra. En los productos curados, el nitrito es el responsable del color rosado-rojizo de los mismos, muy apreciado por los consumidores. Se forma al reaccionar el pigmento del músculo, la mioglobina, con compuestos procedentes de la reducción de los nitritos a través de complejas reacciones de oxidación y reducción (Cassens, 1990) (Fennema, 2000), siendo el NO el que finalmente se liga al pigmento para rendir nitrosilmioglobina que al sufrir un tratamiento térmico, tal es el caso de diversos productos cárnicos curados, se transforma en nitrosilhemocromo (Nychas y Arkoudelos, 1990). La actividad reductora del músculo favorece la reducción de nitratos y nitritos a NO, interviniendo activamente el sistema redox cisteína/cistina y, posiblemente, otros sistemas enzimáticos tipo citocromo-C y NADH aunque participen también ciertos aditivos que acompañan comúnmente a las sales del curado, como el ácido ascórbico. En los embutidos madurados, la reducción de nitratos y nitritos se produce vía biológica, merced a bacterias que poseen actividades nitrato y nitrito reductasa y en aquellos el pigmento final es la nitrosilmioglobina, ya que no han sido tratados térmicamente.

c) Participación en el sabor y aroma: en los productos cárnicos curados, los nitritos proporcionan un sabor y aroma característicos que los diferencia de otros muchos productos cárnicos. En otras ocasiones, se añaden diversos ingredientes que ayudan a conferir otros sabores distintos; aumenta así la diversificación de los productos cárnicos. Brooks et al. (1940) fueron los primeros en relacionar los nitritos con el sabor y aroma de los productos curados, observando que sensorialmente superaban a los no adicionados de nitritos. Este efecto se acentúa a medida que aumenta la concentración de nitrato añadida, hasta un máximo de 200 mg/kg (Greene y Price, 1975) pero no por sí mismo sino siempre en conjunción con el NaCl (Price y Greene, 1978). Si bien el aroma "a curado" surge de la interacción del nitrato y sus derivados con compuestos propios de la carne, las reacciones implicadas y los productos finales no están bien definidos aunque se ha observado (Mottram et al., 1984) (Ramarathnam et al., 1991) que en los productos curados hay una menor proporción de compuestos carbonilo en comparación con carnes elaboradas sin la adición de nitritos, lo que, probablemente, se deba a la minimización de los fenómenos de oxidación lipídica que se ha relacionado con la presencia de nitrosilmioglobina y S-nitrosilcisteína que se forman durante el curado de las carnes (Kanner, 1979) (Kanner y Juven, 1980).

Se estima que, en general, es suficiente la adición de nitritos a concentraciones de 20- 40 ppm para obtener un satisfactorio sabor y aroma "a curado" aunque, en cualquier caso, los niveles de nitritos para este fin varían dependiendo del producto, la naturaleza de la carne, especias utilizadas, grado de ahumado, etc.

d) Efecto antioxidante: el nitrato tiene un poder antioxidante que en las carnes curadas modula los matices a rancio asociados a la oxidación lipídica. Se ha observado en sistemas modelos que los nitritos inhiben los fenómenos autooxidativos de los lípidos (MacDonald et al., 1980), manifestándose especialmente en presencia de promotores de la oxidación, como cloruro sódico (Pierson y Smoot, 1982). Además, se ha informado que el nitrato al reaccionar con el hierro del grupo hemo, mantiene a éste en estado ferroso, evitándose así la canalización de la oxidación por la forma férrica (MacDonald et al., 1980).

En resumen, se podría concluir que los nitritos ejercen unos efectos de gran trascendencia en la elaboración de productos cárnicos curados. Quizás, el solo hecho de inhibir a *C. botulinum* sea un argumento muy poderoso acerca de la necesidad de utilizar nitritos para la salvaguarda de la salud del consumidor. Además, los nitritos, desde un punto de vista tecnológico, ejercen también unas funciones muy importantes, ya que refuerzan, por una parte, la acción conservadora de otras tecnologías, como la cocción, el salazonado, el ahumado, la deshidratación y, por otra, contribuyen a la diversificación de los productos derivados de la carne, confiriéndoles un sabor y aroma característicos.

Cuestión y términos en que se plantea

La cuestión que se plantea es analizar, a la luz de los conocimientos actuales, si constituye un riesgo para la salud del consumidor la presencia de N-nitrosaminas en productos cárnicos crudos adobados cuando se someten a tratamientos culinarios de asado o fritura.

1. Identificación del peligro

El uso de nitratos y nitritos en la elaboración de productos cárnicos curados conlleva la producción de N-nitrosaminas que se forman por nitrosación de aminas y amidas y otros compuestos nitrogenados. Aunque la mayor parte de las aminas susceptibles de ser nitrosadas que existen en muchos alimentos pueden dar lugar a derivados N-nitroso no volátiles relativamente complejos, los que mayor atención han recibido son, sin lugar a dudas, las N-nitrosaminas volátiles dialquilo y heterocíclicas más simples existentes en los productos cárnicos por ser las más frecuentes y las que tienen mayor poder mutagénico y carcinogénico. Tales sustancias pueden aislarse sin dificultad alguna de esos alimentos y determinarse inequívocamente mediante métodos instrumentales, como la combinación de la cromatografía de gases y la espectrometría de masas de alta resolución.

Existen evidencias de que la mayoría de las N-nitrosaminas analizadas (alrededor de 300) poseen actividad tóxica, genotóxica y cancerígena para un amplio número de especies animales, incluyendo primates (Magee y Barnes, 1967) (Preussmann y Stewart, 1964) (Sheweitia y Mostaza, 1996). Por ejemplo, la N-nitrosodietilamina mostró tener actividad cancerígena en las doce especies que se ensayó, desde peces hasta primates superiores (Walters, 1992).

Aunque las N-nitrosaminas se encuentran en pequeñas concentraciones en muchos alimentos de forma natural, la inquietud por la presencia de estas sustancias en los mismos se extendió a sus precursores a raíz del descubrimiento de Koppang (1964) quien observó procesos tóxicos similares a los originados por las N-nitrosaminas en animales alimentados con pienso que contenía harina de pescado (ricos en aminas secundarias) y nitrito sódico. Más tarde se demostró que se podían formar N-nitrosaminas *in vivo* en el estómago (Sander y Burkle, 1969) (Sen et al., 1969) en los alimentos durante su procesado y almacenamiento (Boylund et al., 1971), en el intestino por acción bacteriana (Hawksworth y Hill, 1971) e incluso en la boca a partir de componentes de la saliva (Tannenbaum, 1972) y que el tratamiento térmico (fritura) de bacon curado potenciaba la formación de N-nitrosaminas (Crosby et al., 1972) (Sen et al., 1973) (Fazio et al., 1973).

Los nitratos son los agentes nitrosantes más comunes y abundantes en la naturaleza. Sin embargo, es necesario primero su reducción antes de reaccionar con las aminas que, en el caso de los embutidos, corre a cargo de bacterias, las de la familia *Micrococcaceae*. En el curado de las carnes se añaden nitratos y nitritos; éstos últimos, durante el proceso, se reducen a óxido nítrico, óxido nitroso e incluso nitrógeno. El óxido nítrico puede ocasionar la nitrosación de aminas secundarias, particularmente en presencia de cobre o hierro que actúan como catalizadores (Walters, 1992). No hay indicios de que el óxido nitroso sea un agente nitrosante pero el dióxido de nitrógeno que se forma a partir del óxido nítrico es un poderoso reactivo para la formación de N-nitrosaminas, sobre todo en presencia de oxígeno (Walters, 1992).

El peligro se debe a la presencia de N-nitrosaminas en el alimento pero para su síntesis se requiere la presencia de aminas en el medio y de agentes nitrosantes los que, a su vez, han de formarse a partir de precursores. La nitrosación es un fenómeno muy complejo que depende de diversos factores/agentes, como el pH, temperatura, actividad del agente nitrosante, tipo de amina, etc. En consecuencia, el establecimiento del verdadero peligro conlleva conocer los agentes/factores más destacados que participan en el fenómeno.

1.1 Nitratos y nitritos en alimentos

Los nitratos se encuentran presentes de forma natural en los alimentos; muchas plantas almacenan nitratos y nitritos en sus tallos y hojas, especialmente cuando se han abonado con nitrato amónico. Valga como muestra, el contenido (mg/kg de NO_3^- y NO_2^- , respectivamente) en las siguientes hortalizas (Fritsch y Saint Blanquant, 1985): remolacha (2.134 y 3,3), acelga (2.028 y 1,7), zanahoria (183 y 1,5), pepino (156 y 8,0), espinaca (442 y 3,2), rábano (2.600 y 7,3), lechuga (1.361 y 8,7) y escarola (795 y 8,8). El agua de bebida puede también contener nitrato, habiéndose ofrecido tasas de hasta 100 mg/litro (Linder, 1995). Todas estas fuentes aportan cantidades importantes de nitratos que pueden reducirse y acumularse en la saliva (Walters, 1992), habiéndose estimado que aproximadamente el 20% del nitrato que llega a la boca (alrededor del 5% del ingerido) se reduce a nitrito por la actividad nitrato reductasa de la microbiota existente en la misma (Eisenbrand et al., 1980). Por otra parte, nitratos y nitritos se añaden también intencionadamente a los alimentos por los efectos tecnológicos y protectores que anteriormente se han mencionado. Por tanto, ya sea por ingestión involuntaria (agua, hortalizas, etc.) o por encontrarse entre las sustancias añadidas a los alimentos (productos cárnicos curados, productos ahumados, etc.) de la dieta, estas sales son con frecuencia ingeridas por los humanos, calculándose en un consumo diario mínimo de nitratos de 83-100 mg/individuo (Green et al., 1981) (Bartholomew y Hill, 1984) (Ikken, 2005). Los cálculos realizados por White (1975), corregidos por Birdsall (1977), indican que sólo el 21% del nitrito ingerido por el hombre medio americano procede del existente en las carnes curadas; la mayor parte del restante proviene de la reducción del nitrato en la saliva. Cabe inferir que ese porcentaje sea mayor en países europeos, sobre todo en los, por una parte, consumidores de productos curados (bacon, codillos, patés, etc.) y, por otra, los consumidores de productos madurados (jamón, embutidos, cecina, etc.).

1.2 Aminas en alimentos y en el organismo

Los alimentos contienen naturalmente diversas aminas a partir de las cuales pueden formarse compuestos N-nitroso. Baste, a modo de ejemplo, citar (Tabla 1) las concentraciones (mg/kg) de las aminas de mayor importancia por ser precursoras de las N-nitrosaminas más relevantes (Belitz y Grosch, 1997).

En las especies marinas destaca la presencia de óxido de trimetilamina (OTMA), trimetilamina (TMA) y dimetilamina (DMA), principales precursores de N-nitrosodimetilamina (NDMA) (Ohshima y Kawabata, 1978). En la cerveza se ha descrito la presencia de DMA y TMA (Hrdlicka y Kuca, 1965) (Singer y Lijinsky, 1976).

En el caso particular de los miosistemas cabe añadir que se pueden formar aminas heterocíclicas, fundamentalmente piridinas y pirazinas, durante su cocinado, resultantes de la reacción de Maillard en las que participa activamente la creatinina (Jones y Weisburger, 1988). Así, se ha comprobado (Abdulkarim y Smith, 1998) en diversas carnes (salchichas de varios tipos, carne picada de dos niveles de grasa) procesadas térmicamente (fritura a 150-230 °C y horneado a 200 y 240 °C).

Tabla 1. Contenido típico (mg/kg) de aminas precursoras de N-nitrosaminas en algunos alimentos (Belitz y Grosch, 1997)

Producto	AMINAS						
	MA	EA	DMA	DEA	PIR	PIP	BA
Espinacas	12,0	8,4	-	1,5	2,5	-	6,1
Repollo	16,6	1,0	-	-	-	-	3,8
Lechuga	37,7	3,3	7,2	-	-	-	11,5
Apio	5,1	6,4	-	-	0,4	-	3,4
Arenque en salmuera	3,4	0,1	7,8	1,9	-	0,7	-
Queso Camember	12,0	4,0	-	-	1,0	-	-

MA: metilamina; EA: etilamina; DMA: dimetilamina; DEA: dietilamina; PIR: pirrolidina; PIP: piperidina; BA: benzilamina.

En el caso particular de los miosistemas cabe añadir que se pueden formar aminas heterocíclicas, fundamentalmente piridinas y pirazinas, durante su cocinado, resultantes de la reacción de Maillard en las que participa activamente la creatinina (Jones y Weisburger, 1988). Así, se ha comprobado (Abdulkarim y Smith, 1998) en diversas carnes (salchichas de varios tipos, carne picada de dos niveles de grasa) procesadas térmicamente (fritura a 150-230 °C y horneado a 200 y 240 °C).

1.3 Nitrosación

Los compuestos N-nitroso surgen de reacciones en las que están implicadas aminas primarias, secundarias y terciarias, amidas, aminas aromáticas, aminoácidos y compuestos guanidínicos. El agente nitrosante necesario para la formación de N-nitrosaminas procede de la reacción del ion nitrito (NO_2^-) con protones del medio, convirtiéndose en ácido nitroso (HNO_2) que, al igual que el nitrito, no tiene capacidad nitrosante pero es el intermediario de la formación de los verdaderos agentes activos (Tricker y Kubacki, 1992): trióxido de nitrógeno (N_2O_3 ; reaccionante en la mayoría de los casos), tetróxido de nitrógeno (N_2O_4) y los iones nitroso ($\text{H}_2\text{O}^+\text{NO}$ y NO^+). Una vez generado el agente nitrosante, éste reacciona electrofílicamente con el par libre de electrones del átomo de nitrógeno. En el caso de las aminas secundarias, la nitrosación puede producirse por sustitución del hidrógeno por el agente nitrosante pero en la formación de compuestos N-nitroso a partir de aminas terciarias, es necesario que se produzca una desalquilación oxidativa para rendir una amina secundaria que reaccionará con el agente nitrosante (Schweinsberg y Sander, 1972) (Moliner, 1979). Las aminas primarias no suelen considerarse como precursores importantes de N-nitrosaminas ya que las reacciones de nitrosación se producen generalmente vía diazotación y sustitución nucleofílica del grupo amino (Tricker y Kubacki, 1992). Las N-nitrosaminas pueden también formarse a partir de diaminas vía ciclación, como es el caso de la putrescina (Warthesen et al., 1975). Las poliaminas biológicas complejas, como la espermina y espermidina, pueden igualmente originar derivados de aminas cíclicas N-nitroso y una gran variedad de N-nitrosaminas con grupos dialquilo sustituidos (Hildrim et al., 1975). Sin

embargo, el procedimiento más común de generación de N-nitroso dimetilaminas es, en cualquier caso, la nitrosación de aminas secundarias.

La formación de N-nitrosaminas depende de múltiples factores. Entre ellos:

- pH del medio, próximo también al pH del estómago humano, lo que explicaría la formación de compuestos N-nitroso (nitrosaminas y nitrosamidas) *in vivo* a partir de los precursores ingeridos.
- Tipo de amina. La velocidad de formación de N-nitrosaminas a pH óptimo depende también de la basicidad de la función amina implicada, existiendo una relación inversa entre ese carácter y la generación del compuesto N-nitroso (Sander y Schweinsberg, 1972) (Gray et al., 1979). Así, la velocidad de nitrosación aumenta progresivamente desde la pirrolidina y dimetilamina a la metilbencilamina y metiletanolamina y piperacina y aminopirina. Cabe añadir que el contenido de aminas de los alimentos condiciona también la formación de N-nitrosaminas, ya que, al parecer, existe una concentración mínima por encima de la cual el rendimiento es más elevado, siendo éste límite dependiente del tipo de amina y se estima en unos 1.000 mg/kg para la pirrolidina y unos 2.000 mg/kg para la dimetilamina (Challis y Challis, 1982).
- Temperatura. La formación de compuestos N-nitroso aumenta con el incremento de la temperatura y del tiempo de exposición (Ender y Ceh, 1971) aunque se ha demostrado que la nitrosación puede producirse, por supuesto muy lentamente, incluso a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Ender y Ceh, 1971). Durante los tratamientos térmicos se potencia la liberación de aminoácidos y aminas susceptibles de ser nitrosados (Lijinsky y Epstein, 1970).
- Agentes inhibidores y catalizadores. Las reacciones de nitrosación pueden verse afectadas por diversos agentes, como ciertos aniones y ácidos débiles (Davies y McWeeny, 1977) (Tricker y Kubacki, 1992), fenoles (Pignatelli et al., 1980), α -tocoferol (Fiddler et al., 1974) propilgalato (Sen et al., 1974), piperacina (Sen et al., 1974), pero, sin lugar a dudas, uno de los más estudiados y más utilizados en la práctica es el ácido ascórbico que se comporta como un potente inhibidor de la nitrosación. Este ácido inhibe la formación de la mayoría, si no todas, las aminas (Mirvish et al., 1972). Asimismo, Kamm et al. (1973) observaron que la administración conjunta de ácido ascórbico y aminas y amidas a animales evitaba los efectos hepatotóxicos, teratógenos y carcinogénicos que se podrían esperar de la N-nitrosamina o N-nitrosamida sintetizada *in vivo*. Más tarde, se demostró el mecanismo de acción; el ácido actúa reduciendo el anhídrido nitroso (N_2O_3) a óxido nítrico (NO) que carece de efecto nitrosante (Wagner et al., 1985) (Chow y Hong, 2002).
- Presencia de NaCl. Hildrim et al. (1975) demostraron que el efecto del NaCl es dependiente del pH, de tal forma que a pH de 4 y 5,5 (próximo al de los productos fermentados/curados) inhibe la formación de compuestos N-nitroso. Puede decirse, pues, que el NaCl, en los productos cárnicos, ejerce un efecto protector frente a la síntesis de compuestos N-nitroso.

Las N-nitrosaminas pueden formarse en el organismo (vía endógena) y en el alimento (vía exógena).

1.3.1 Formación endógena de N-nitrosaminas

El nitrito que ingresa en el organismo procedente de cualquier fuente, reaccionará en el estómago, bajo las condiciones de acidez existente en este órgano, con las aminas que han ingresado con los alimentos, fármacos, humo, tabaco, etc. Además del origen exógeno, el ión nitrito de los tejidos puede

proceder, también, del propio organismo, como resultado del metabolismo tisular o por actividad de la microbiota gastrointestinal (Ward et al, 1986) (Vittozi, 1992), habiéndose estimado que la formación diaria de nitrito por vía endógena en animales y humanos es de 1 mg/kg de peso corporal (Vittozi, 1992).

La síntesis endógena de N-nitrosaminas se ha detectado en la cavidad oral, estómago y porción distal del intestino delgado y grueso (Hashimoto et al., 1976) (Krul et al., 2004) y puede producirse por:

- a) Catálisis en el estómago, ya que se requiere un pH inferior a 4,0. El proceso se inicia con los nitritos procedentes de la saliva o ingeridos que, al pH del estómago, forma ácido nitroso (HNO_2), transformándose en presencia de agua en la especie nitrosante N_2O_3 . En estas condiciones la generación de N-nitrosaminas tendría lugar rápidamente si existen aminas en el medio.
- b) Actividades microbianas de especies con actividad nitrato y nitrito reductasa (Calmels et al., 1988) que habitan en los fluidos de la cavidad bucal y tracto gastrointestinal (Leaf et al., 1989) (Mirvish, 1995) (Bartsch y Frank, 1996). Se forma óxido nítrico (NO) dispuesto para generar agentes nitrosantes.
- c) Una tercera vía es enzimática, merced a la inducción de la enzima óxido nítrico sintetasa, que cataliza la reacción de arginina a citrulina, liberándose NO que se oxida a ONOO^- y se mantiene en equilibrio con los agentes nitrosantes N_2O_3 y N_2O_4 . Esta reacción tiene lugar a un pH próximo a la neutralidad. La actividad de esta enzima se encuentra incrementada en macrófagos y hepatocitos durante procesos inflamatorios e infecciosos (Bartsch y Frank, 1996) (Ohkuma y Katsura, 2001).

1.3.2 Precursores y formación exógena de N-nitrosaminas.

Las N-nitrosaminas pueden formarse inadvertidamente en diversos procesos industriales en los que se utilizan nitratos y/o nitritos y aminas cuando las aminas, principalmente alquilaminas, entran en contacto con los óxidos de nitrógeno y ácido nitroso o cuando ocurren transnitrosaciones de compuestos N-nitroso (ATSDR, 1989). Entre las industrias en que pueden formarse cabe citar las del caucho, tenerías, preparación de pesticidas, industria alimentaria, fabricación de colorantes, etc. De estas industrias pueden pasar al medio ambiente y contaminar otros productos, como el agua de bebida o la de regadío.

El principal precursor de la NDMA es la dimetilamina (Walters, 1984) (Yoo et al., 1992) (McIntyre y Scanlan, 1993). No obstante, puede, igualmente, surgir de la nitrosación de aminas terciarias (McIntyre y Scanlan, 1993) y de la metilamina (Mende et al., 1989). Con el calentamiento, la cadaverina y putrescina se convierten por ciclación en las aminas secundarias piperidina y pirrolidina, respectivamente (Lijnsky y Epstein, 1970) (Warthesen et al., 1975), cuya nitrosación rinde las N-nitrosaminas correspondientes: NPIP y NPYR. La NPYR puede también sintetizarse a partir de la prolina a temperaturas elevadas (Hwang y Rosen, 1976).

Algunas operaciones tecnológicas o culinarias aplicadas a los alimentos potencian la formación de N-nitrosaminas. Entre ellas pueden citarse:

- a) Ahumado. Se ha detectado NDMA en salami (entre 20 y 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y en salchichas ahumadas (10-20 $\mu\text{g}/\text{kg}$). La síntesis de este compuesto se ha asociado con los óxidos de nitrógeno presentes

en el humo dado que la cantidad de N-nitrosaminas en los productos sin ahumar es insignificante (alrededor de 10 ppb).

- b) Deshidratación por combustión de gases. El caso más emblemático es el de la malta para la elaboración de cerveza y whisky, donde se ha encontrado NDMA procedente de la reacción de la dimetilamina de los granos con el óxido nítrico presente en los gases de combustión.
- c) Actividad microbiana. La presencia en los alimentos de microorganismos con capacidad reductora de nitratos y nitritos aumenta la posibilidad de formación de N-nitrosaminas. En los embutidos madurados es lo que ocurre como se ha discutido en párrafos previos. Parte del NO formado está dispuesto para rendir fracciones nitrogenadas con actividad nitrosante aunque la mayor parte se utiliza para fijar el color de estos productos. Las N-nitrosaminas halladas en encurtidos tiene un origen similar.
- d) Tratamientos térmicos. La formación de N-nitrosaminas en las condiciones mencionadas se acelera al aumentar la temperatura y el tiempo de exposición. Este aspecto es el que más preocupa y, sobre todo, en los productos cárnicos curados e incluso en los únicamente salazonados, cárnicos o no (como panceta, bacalao, etc.) porque entre las impurezas de la sal se encuentran nitratos y nitritos. El bacon es el producto cárnico que más se ha estudiado porque el tratamiento culinario de fritura es más "agresivo" que, por ejemplo, el de cocción a que se someten una gran variedad de productos curados (jamón cocido, mortadela, salchichas tipos Frankfurt y Viena, chopped, etc.), que el de asado, donde se ha observado que el contenido de NPYR de diversos productos se incrementa en torno a un 10% al aplicar este tratamiento culinario (Tricker y Preussmann, 1990) y, por supuesto, mucho más que los sometidos a maduración (embutidos, jamón serrano, cecinas).

La NPYR se produce consistentemente durante el asado o fritura (Hwang y Rosen, 1976). Puede formarse por nitrosación de la prolina seguida de descarboxilación, rindiendo NPYR o por descarboxilación primero a pirrolidina y nitrosación después a NPYR (Nakamura et al., 1976) (Hwang y Rosen, 1976). En cierto modo, el progreso de la reacción por una u otra ruta depende de la temperatura; en el intervalo 100-150 °C, la nitrosación de la prolina se produce de una forma activa pero la descarboxilación de la N-prolina formada está marcadamente restringida. Dentro del mismo intervalo térmico, la descarboxilación de la prolina ocurre muy lentamente mientras que la nitrosación de la pirrolidina se produce con gran facilidad. Por tanto, en frituras a bajas temperaturas pueden darse ambas rutas simultáneamente para rendir NPYR (Nakamura et al., 1976) pero como la energía de activación de la descarboxilación de la N-prolina es menor que la de la prolina, la formación de NPYR vía nitrosación de la prolina es más probable que vía descarboxilación inicial de ésta (Goutefongea, 1994). Sin embargo, a temperaturas entre 175 y 200 °C la cantidad de NPYR formada a partir de la prolina es mucho mayor y ocurre principalmente por la vía prolina → pirrolidina → NPYR (Nakamura et al., 1976) habiéndose informado que a 185 °C se produce ya la nitrosación a la máxima velocidad (Wasserman et al., 1972).

2. Análisis

Los nitratos y nitritos no presentan problemas para su determinación, utilizándose en general técnicas de extracción sencillas con agua o mezclas hidroalcohólicas y posterior análisis por técnicas

espectrofotométricas. También están muy extendidas las técnicas cromatográficas, tanto con detección UV como por cromatografía iónica. Los niveles habituales de análisis son de mg/kg de alimento.

La determinación de nitrosaminas requiere aplicar procedimientos analíticos más sofisticados tanto por la naturaleza de los analitos como por los niveles a los que hay que llegar. Los métodos más habitualmente empleados para su análisis se caracterizan por procesos de extracción y concentración más complejos y caracterización final por técnicas de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. En estas determinaciones se evalúan niveles mucho más bajos que los descritos para los nitratos y nitritos, siendo normales valores del orden de $\mu\text{g}/\text{kg}$ de alimento o inferiores.

Presencia de N-nitrosaminas en los alimentos

1. En alimentos en general

En los alimentos, sólo se encuentran de forma natural concentraciones muy bajas de N-nitrosaminas; sus niveles están, en términos generales, por debajo de $0,5 \mu\text{g}/\text{kg}$. Preussmann et al. (1984) analizaron el contenido de NDMA, NPYR y NPIP de 2.826 muestras de 169 tipos de alimentos de consumo habitual, encontrando que el 70% de las muestras contenía NDMA, el 97% NPYR y el 98% NPIP a concentraciones muy pequeñas ($<0,5 \mu\text{g}/\text{kg}$) pero en ocasiones (6% en el caso de NDMA y 1% en los de NPYR y NPIP) podían ser de hasta $5 \mu\text{g}/\text{kg}$. En otro estudio realizado en Suecia (Österdahl, 1988) se analizaron 764 muestras de diversos alimentos (cárnicos, pescado, bebidas, quesos, cacao, té, café y cereales). Se detectaron N-nitrosaminas en un porcentaje cercano al ofrecido por Preussmann et al. (1984), ya que se observaron en el 62% de las muestras. NDMA sólo se detectó en productos cárnicos ahumados (16 de 23 muestras) a valores medios menores de $0,3 \mu\text{g}/\text{kg}$; NPIP en siete alimentos diferentes a concentraciones medias inferiores a $0,5 \mu\text{g}/\text{kg}$, excepto en una mezcla de especias que se encontraron $1,3 \mu\text{g}/\text{kg}$; NPYR en once tipos de productos en tasas más bajas a $1,0 \mu\text{g}/\text{kg}$, excepto en productos cárnicos que se encontraron cantidades significativamente más altas, de forma especial en jamón curado (en 17 de 18 muestras con un valor medio de $2,6 \mu\text{g}/\text{kg}$), jamón ahumado frito (20 de 21 muestras a una concentración media de $4,0 \mu\text{g}/\text{kg}$) y bacon frito (en el 100% de las muestras –68–, con valores medios de $7,6 \mu\text{g}/\text{kg}$); NDMA fue la nitrosamina más frecuente, ya que sólo en cuatro tipos de productos no se detectó (4 muestras de salsa de soja, 12 de quesos, 60 de vinos y 1 de arenque fermentado). Los valores máximos de esta N-nitrosamina se hallaron en alimentos sometidos a cocción térmica, como bacon frito (en las 68 muestras analizadas con un valor medio de $1,7 \mu\text{g}/\text{kg}$), arenque frito (100% de las muestras –5– con una tasa media de $2,3 \mu\text{g}/\text{kg}$) y pescado ahumado (en 55 muestras de 61 con una concentración media de $1,3 \mu\text{g}/\text{kg}$). Cabe mencionar además el caso del whisky donde esta nitrosamina se detectó en 11 de 15 muestras a una concentración media de $1,2 \mu\text{g}/\text{kg}$ y el de la cerveza en 169 muestras de las 274 analizadas a concentraciones entre $0,3$ y $0,6 \mu\text{g}/\text{kg}$ pero en este producto se han ofrecido incluso valores de entre $1,5$ y $5,9 \mu\text{g}/\text{l}$ de NDMA (Fazio et al., 1979).

A modo de resumen puede decirse que la NDMA es la nitrosamina volátil más frecuente; el origen del agente nitrosante es, en los productos vegetales, la síntesis a partir de los nitratos que forman parte de su composición y, además, pueden formarse en ciertos tratamientos como el de secado. En los productos de origen animal, la presencia de N-nitrosaminas es especialmente importante en pro-

ductos cárnicos y pescados y el agente nitrosante proviene de los nitratos y nitritos añadidos, unidos a la aplicación de tratamientos térmicos y ahumado, siendo las N-nitrosaminas más frecuentes NDMA y NPYR.

2. En productos cárnicos

Dado que la NDBA, NDEA y NPIP se han detectado sólo en contadas ocasiones, el siguiente análisis se refiere preferentemente a la NDMA y NPYR.

2.1 Bacon

El bacon ha sido el alimento más estudiado debido a la agresividad del proceso de fritura (alrededor de 180 °C) que cataliza su formación. Debido a ello, es necesario diferenciar la presencia de N-nitrosaminas volátiles en el producto curado sin cocinar y en el frito.

Fazio et al. (1973) no pudieron detectar N-nitrosaminas volátiles en bacon sin freír a un nivel de detección mínimo de 10 µg/kg pero tras la fritura, las ocho muestras que analizaron de diferentes orígenes contenían niveles comprendidos entre 10 y 108 µg/kg de NPYR. Del mismo modo, Gough et al. (1977) tampoco detectaron N-nitrosaminas en 23 muestras de bacon crudo pero después de la fritura, alrededor de la mitad contenían NDMA en concentraciones de 1-5 µg/kg y en casi todas NPYR en tasas muy variables, entre 1 y 200 µg/kg. Otros autores (Groenen et al., 1976) tampoco encontraron N-nitrosaminas en el bacon sin cocinar pero sí en el frito, identificando la presencia de NDMA pero no de NPYR. Sin embargo, Sen et al. (1973) confirmaron la presencia de NDMA en bacon no cocinado y la generación de NPYR durante la fritura y Stephany et al. (1976) encontraron ambas N-nitrosaminas en cinco muestras sin freír a concentraciones inferiores a 2 µg/kg y las detectaron también en las mismas muestras tras su fritura y en una de ellas la NPYR alcanzó la tasa de 59 µg/kg. Puede decirse, pues, que tanto la NDMA como la NPYR se encuentran habitualmente en el bacon frito pero en el producto crudo sólo se han detectado ocasionalmente y siempre en tasas muy bajas (< 5 µg/kg). A los resultados anteriores podríamos añadirse los de otros autores que sólo han analizado el producto cocinado.

Así, Österdahl (1988) detectó en las 68 muestras analizadas tanto NDMA como NPYR a concentraciones medias de 1,7 y 7,6 µg/kg, respectivamente.

Aunque esas dos N-nitrosaminas son las que se encuentran más frecuentemente en el bacon, no quiere esto decir que sean las únicas. Ocasionalmente, algunos autores han detectado otras a bajas concentraciones, como NDBA, NPIP (Stephany et al., 1976) y NDEA (Groenen et al., 1976), tanto en bacon sin cocinar (Stephany et al., 1976) (Groenen et al., 1976), como en el frito (Stephany et al., 1976).

Como estas N-nitrosaminas son volátiles, preocupa qué proporción se volatiliza y se disipa en la atmósfera circundante durante el proceso de fritura. Gough et al. (1976) hicieron pasar los humos desprendidos por "traps" y encontraron que, en el caso de la NDMA, un 10% quedaba retenido en las lonchas, un 20% en la grasa fundida que se separaba de la matriz cárnica y el resto se volatilizaba. Para la NPYR, las cifras equivalentes fueron del 25% y del 30%. Sen et al. (1976) llegaron a las mismas conclusiones pero, además, observaron que el tratamiento del bacon con ascorbil palmitato inmediatamente antes de ser frito conducía a que el contenido de NDMA y NPYR retenido en la trampa fuese mucho menor.

Aparte de la temperatura, el sistema de calentamiento también condiciona la formación de N-nitrosaminas. Se ha comprobado que el empleo de microondas es la mejor opción para minimizar la formación de estos compuestos en el bacon (Vecchio et al., 1986) (Österdhal y Alriksson, 1990). Estos últimos autores observaron que el producto calentado con microondas presentaba una concentración del orden de 0,3 µg/kg de NDMA y 0,1 de NPYR que fueron un 20-25% más bajas que cuando se sometió a fritura.

2.2 Otros productos cárnicos

La incidencia de N-nitrosaminas se ha estudiado también en una amplia variedad de productos cárnicos distintos al bacon. Por ejemplo, Crosby et al. (1972) detectaron NDMA en una muestra de carne tipo "luncheon", en salami y en jamón a concentraciones de 1-4 µg/kg. En 64 muestras de diferentes productos (carne de vacuno apertizada, carne tipo "luncheon", carne de vacuno ahumada, carne magra de cerdo salazonada, embutidos estilo continental y salami) sólo se detectó NDMA en una muestra de salami y en tres de las 36 de embutidos analizadas a concentraciones de 10-80 µg/kg (Sen, 1972). El grupo de Sen amplió el estudio analizando 68 muestras de carnes curadas (Panalaks et al., 1974) y llegaron a resultados similares, es decir, la incidencia de N-nitrosaminas volátiles fue esporádica y sus tasas variables. Sin embargo, en 14 muestras detectaron, además de NDMA, NPYR entre 13 y 105 µg/kg y NDEA en cinco muestras entre 7 y 25 µg/kg. En 40 muestras de salchichas Frankfurt, sólo se detectaron en tres, a niveles de 11-48 µg/kg (Wassermann et al., 1972). En mortadela boloñesa no se han detectado usando un método de una sensibilidad de 5 µg/kg (Palumbo et al., 1974). En 75 muestras de productos curados (Gough et al., 1977) se estudió la presencia de seis N-nitrosaminas (dialquil y heterocíclicas); en una muestra se detectó NDEA y en el resto sólo se detectó nada más que NDMA, en 11 de ellas a niveles de 1-5 µg/kg, excepto una que tuvo 8 µg/kg.

Otros autores (Groenen et al., 1976) (Stephany et al., 1976) han hecho también estudios sobre este tema, llegando a resultados similares, es decir, en prácticamente todos los productos cárnicos curados se ha detectado algún tipo de N-nitrosamina volátil, tanto dialquiladas (NDMA, NDEA, NDBA) como heterocíclicas (NPYR y NPIP), siendo las más frecuentes la NDMA aunque, a diferencia del bacon, se ha encontrado junto a NPYR, la otra heterocíclica (NPIP). La concentración de NDMA típica se sitúa en valores inferiores a 10 µg/kg aunque alguna muestra puede llegar a los 50 µg/kg.

La concentración habitual de las otras N-nitrosaminas es siempre más baja. Al igual que en bacon, cuando el producto cárnico se somete a fritura aumenta la concentración de N-nitrosaminas, de forma especial la NPYR que puede pasar de una media de 0,4 µg/kg a 15,6 µg/kg (Stephany et al., 1976).

Sólo un autor (Hauser, 1977) ha proporcionado un informe sobre una consistente ausencia de N-nitrosaminas volátiles a niveles superiores a 1 µg/kg en un amplio espectro de 112 productos cárnicos curados de Suiza, tanto cocinados como no.

Sen et al. (1973) descubrieron que en los polvos del curado, compuestos por especias (pimienta negra y pimentón) y sales (sal, nitrato y nitritos) se formaban las N-nitrosaminas heterocíclicas NPYR y NPIP y observaron que después se detectaban en las salchichas que se elaboraban con estos polvos. En un estudio posterior, estos mismos autores analizaron las N-nitrosaminas de 100 muestras de diversos productos cárnicos una vez que se abandonó el uso de las premezclas del curado (Sen et al.,

1976). El contenido en N-nitrosaminas se redujo significativamente y en muchas muestras no se detectaron (nivel de detección del método alrededor de 1 µg/kg), siendo el nivel más alto hallado el de 50 µg/kg.

2.3 Factores que reducen o eliminan la formación de NDMA y NPYR en productos cárnicos

En salchichas tipo Frankfurt, Fiddler et al. (1973) estudiaron el efecto de las sales sódicas del ácido ascórbico e isoascórbico en la formación de NDMA. Utilizando concentraciones de los ácidos de 550 mg/kg (concentraciones autorizadas en EEUU) y los niveles de nitritos permitidos en EE UU en esos productos (156 mg/kg) en aquel tiempo. No pudieron detectar cantidades mensurables de NDMA en salchichas sometidas a calentamiento durante 4 horas. Sin embargo, si añadían nitritos a concentraciones 10 veces mayor a las permitidas (o sea, 1.500 mg/kg) las salchichas elaboradas contenían entre 10 y 22 µg/kg de NDMA si no contenían ascorbato o isoascorbatato y se reducían a 0 y 6-7 µg/Kg cuando los tiempos de calentamientos eran de 2 y 4 horas, respectivamente.

Estudios similares llevados a cabo en bacon (Herring, 1973) (Wasserman y Fiddler, 1974) demostraron que el ascorbato sódico, a tasas de 500-2.000 mg/kg es eficaz en la inhibición, pero no en la eliminación de la formación de NPYR en bacon frito. La forma liposoluble del ácido ascórbico, el ascorbil palmitato, se comporta de forma similar (Sen et al., 1974) (Walters et al., 1976). Igualmente, se ha observado que cuando se añadió α -tocopherol a niveles de 500 mg/kg del antioxidante no se detectó NPYR y cuando el bacon se sometió a fritura en grasa que contenía 400 o 800 mg/kg de α -tocopherol, la producción total de NPYR y NDMA en el bacon frito, exento de la grasa y de los vapores emitidos, se redujo marcadamente pero no se eliminó totalmente (Wasserman y Fiddler, 1974). Estos resultados indican que el ascorbato, isoascorbatato y α -tocopherol reducen, pero no anulan siempre, la formación de compuestos N-nitroso.

3. Presencia de N-nitrosaminas en otros productos de uso habitual

Las N-nitrosaminas se encuentran también en otros muchos productos de uso corriente. Se pueden mencionar, entre ellos, los cosméticos (champú, geles de baño, cremas, etc.), productos de limpieza (detergentes, agentes de superficie, espumantes, etc.), derivados del caucho (productos de medicina que contienen caucho, guantes, tapones de botellas, etc.). El tabaco es una fuente importante de N-nitrosaminas; se han detectado volátiles, no volátiles y específicas del tabaco. Además, la combustión del tabaco ocasiona la formación de nuevas N-nitrosaminas vía pirólisis.

En relación con la NDMA se ha hecho un estudio (CICADS, 2002) detallado por edades, cuyo resultado ofrece datos acerca de las cantidades de N-nitrosaminas que ingresa (µg/kg peso corporal/día) el hombre por día. Por ejemplo, los humanos entre 20 y 59 años (asumiendo un peso de 70,9 kg, un consumo de agua de bebida de 1,5 litros diario y que respira diariamente 16,2 m³ de aire) ingresan 0,0004 (0,7%)-0,004 (5,97%) procedente del aire; 0,0003 (0,53%)-0,001 (1,5%) del agua de bebida; 0,0043 (7,6%)-0,011 (16,4%) de los alimentos; 0,05 (89,4-74,7%) del humo ambiental del tabaco; 0,0009 (1,6-1,3%) de la cerveza y 0,00002 (0,03-0,02%) del champú.

1. Toxicidad de las N-nitrosaminas

Las N-nitrosaminas constituyen el grupo más importante de los compuestos N-nitroso como sustancias tóxicas, mutagénicas y carcinogénicas. Estas actividades se han demostrado en peces, reptiles, aves, mamíferos y en humanos. En éstos se han descrito procesos patológicos agudos y subagudos similares a los observados en animales de experimentación (Magee, 1996). El efecto tóxico de una nitrosamina se observó por primera vez hace medio siglo cuando la administración a animales de experimentación (rata, conejo y perro) de dietas suplementadas con NDMA condujo a necrosis hemorrágicas en el hígado que derivaron en necrosis y neoplasias malignas al prologar el aporte de la N-nitrosamina (Magee y Barnes, 1956). Los estudios realizados *in vivo* han revelado que distintas N-nitrosaminas, entre ellas las dialquiladas, actúan inhibiendo la actividad enzimática microsomial, reduciendo la actividad de la glutatión-S-transferasa hasta un 80% (Sheweita y Mostafa, 1996). El efecto tóxico favorece y potencia la mutagenicidad y carcinogenicidad de las N-N-nitrosaminas, debido a que los cambios enzimáticos que provocan conlleva un aumento de compuestos mutagénicos a partir de las mismas. Sin embargo, las N-nitrosotiolnitrosaminas tienen mucho menos efecto citotóxico, incluso no se ha observado (Lin y Gruenwedel, 1990), lo que se ha atribuido a una protección por el grupo tiol.

En las N-nitrosaminas también se ha podido detectar un efecto teratogénico en animales de experimentación, ya que se ha encontrado una asociación entre la exposición a estos compuestos y la aparición de malformaciones congénitas que afectan al sistema nervioso central (Givelber y Dipaolo, 1969) y, epidemiológicamente, se ha observado una mayor incidencia de malformaciones y tumores intracraneales en neonatos y recién nacidos en regiones que se consume agua con un elevado contenido de nitritos (Dorsch et al., 1984).

Como es bien sabido existe una estrecha relación entre mutagénesis y carcinogénesis. El desarrollo de los carcinomas por las N-nitrosaminas se debe a la inducción de mutaciones en células somáticas de órganos diana para la actividad nitrosamínica (Wakabayashi et al., 1987) (Kneckt et al., 1999). Las N-nitrosaminas requieren actividad metabólica para transformarse en mutágenos, ya que por sí mismas no pueden reaccionar con el DNA. En consecuencia en el mecanismo de carcinogénesis se contempla la siguiente secuencia (Hecht, 2002): exposición a la nitrosamina, activación metabólica de la misma e interacción con el DNA u otros componentes de la célula.

La actividad metabólica está catalizada por enzimas que oxidan las N-nitrosaminas (entre ellas NDMA, NDEA y NPYR) a compuestos genotóxicos por diferentes enzimas P450, especialmente P450 2E1 (CYP2E1) y 2A6 (CYP2A6) (Kato et al., 1995) produciendo metilaciones en el DNA y hepatotoxicidad (Goldman y Shield, 2003). La activación metabólica por la CYP2E1 y 2A6 comienza con una reacción de α -hidroxilación del átomo de carbono próximo al grupo nitrosamino rindiendo una α -hidroxinitrosamina muy inestable (vida media alrededor de 10 segundos) que, rápidamente, se disocia en un aldehído y una alquilnitrosamina (Liteplo et al., 2002) cuyos subsiguientes metabolitos son también agentes alquilantes y su reacción con el DNA se considera como punto clave en la inducción de mutaciones y, por consiguiente, para la iniciación de la carcinogénesis (Cooper y Porter, 2000) (Goldman y Shield, 2003).

En el caso particular de la NDMA, el ión metanodiazonio, resultante de la activación metabólica de esta N-nitrosamina, es el agente alquilante responsable de producir metilaciones en diferentes sitios de las bases nitrogenadas (Yang et al., 1985) (Hecht, 1999a) (Hecht, 1999b), específicamente en las posiciones N-7, N-3, N-1, N² y O⁶ de la guanina; N-3, O² y O⁴ de la tiamina y uridina; N-3, O² y N⁴ de la citosina y N-1, N-7, N-3 y N-6 de la adenina (Cloutier, 2001). Las proporciones relativas de los átomos de N y O dependen del agente alquilante y de la especificidad de la enzima P450 implicada en la activación de la N-nitrosamina en los diferentes tejidos (Cloutier, 2001). Se ha podido comprobar que el daño genómico más significativo es la metilación de los nucleótidos de guanina (Magee, 1996) (Liteplo et al., 2002), aceptándose que la formación de O⁶-metilguanina es la responsable de la carcinogénesis inducida por la NDMA (Hecht, 1997a) (Hecht, 1997b) (Hecht, 1999a) (Hecht, 1999b) con el resultado, si no hay reparación del daño por la O⁶-metilguanina-DNA alquiltransferasa (Pegg et al., 1995), de formación de mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores. Una consideración similar puede hacerse por la etilación del DNA por la NDEA (Swenberg et al., 1992) o la NPIP y NPYR (Okochi et al., 1997) (Mancebo et al., 2004).

Se ha observado que alrededor del 90% de las N-nitrosaminas estudiadas se comportan como potentes carcinógenos (Walker, 1990) (Lijinsky, 1992) (Mancebo et al., 2004) en al menos 30 especies animales y se han identificado unos 300 compuestos diferentes de N-nitrosaminas con dicho potencial. La NDMA y NDEA están entre las de mayor potencial mientras que las arilnitrosaminas y los compuestos N-nitroso aminoácidos no inducen procesos cancerígenos o lo hacen con escasa incidencia (Walker, 1990). Las N-nitrosaminas heterocíclicas más frecuentes en los alimentos, NPIP y NPYR, son también potentes carcinógenos (Preussmann et al., 1977) (Shenoy y Choughuley, 1992).

En relación con los órganos afectados, el estómago es uno de los más comunes y fue aceptado así desde los primeros estudios, lo que puede explicarse al estar directamente expuesta la mucosa gástrica a la acción de la N-nitrosaminas, ya que el bajo pH potencia la nitrosación (Marquardt et al., 1997) (Kono y Hirohata, 1966). No obstante, los tumores son igualmente frecuentes en el hígado (Tricker y Preussmann, 1991) pero también se han observado en otros muchos órganos y tejidos, como la cavidad bucal, riñón, pulmón, mucosa nasal y en otros tejidos y órganos (Lijinsky, 1992) (Tricker y Preussmann, 1991).

La carcinogénesis es claramente el punto crítico para evaluar cuantitativamente el grado de exposición a las N-nitrosaminas. Las más bajas concentraciones calculadas (mg/kg peso corporal/día) en ratas que inducen procesos tumorales [TD₅₀ (tumorigenic dose)] en hígado son de 0,0959; 0,0265; 0,799 y 1,43 para NDMA, NEMA, NPYR y NPIP, respectivamente (CPDB, 2007). Asimismo, para la NDMA se ha ofrecido también una TD₀₅ de 34 µg/kg peso corporal/ día.

Estudios epidemiológicos en humanos han intentado demostrar una relación directa entre el consumo de nitritos o nitratos y la formación de compuestos N-nitroso y el desarrollo de cáncer, no obstante los resultados no han sido concluyentes, posiblemente debido a la dificultad para establecer el tiempo y el nivel de exposición (Cassens, 1990) (McKnight et al., 1999) (Mensinga et al., 2003). En la mayor parte de estos estudios epidemiológicos sí que se constató un incremento de efectos tóxicos en los individuos que habían consumido más productos con presencia de nitritos y/o nitratos (Forman et al., 1989) (Weyer et al., 2001) (De Roos et al., 2003) (Brender et al., 2004). En un estudio realizado

con voluntarios sanos adultos para evaluar la metahemoglobinemia, tampoco se observó ninguna reacción adversa, tras la ingesta de una dosis única de hasta 380 mg de nitrito sódico (Kortboyer et al., 1997). La Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) ha realizado recientemente un evaluación de los nitratos y nitritos ingeridos en la dieta y los ha clasificado en el grupo de la "Categoría 2A", que indica que probablemente son carcinogénicos en humanos (IARC, 2006), ya que se ha podido demostrar la presencia de N-nitrosaminas en saliva y en orina de personas que habían tomado alimentos que contienen aminos y bajas concentraciones de nitratos (pescado y vegetales) y agua con una dosis de nitratos igual a la IDA (Vermer et al., 1998).

2. Estimación de la exposición

No es fácil estimar el nivel de exposición de los humanos a las N-nitrosaminas procedentes de los alimentos y, en particular la que puede proceder de la carne adobada, ya que como se ha apuntado a lo largo del informe son diversas las fuentes exógenas de N-nitrosaminas a las que hay que añadir las que pueden formarse por vía endógena y las condiciones que influyen en la síntesis de estos compuestos. Los datos anteriores de TD_{50} pueden ayudar a hacerse una idea del nivel de exposición al peligro pero es necesario también tener en cuenta otras circunstancias.

En primer lugar cabe decir que en la carne cruda adobada y similares (por ejemplo, pinchos morunos y salchichas frescas con o sin pimentón) está autorizada la adición de 150 ppm de nitrito sódico (E-250) o potásico (E-249) y 150 mg de nitrato sódico (E-251) o potásico (E-252) con función conservante (MSC, 2002).

En segundo lugar es necesario estimar qué cantidades de N-nitrosaminas aporta la carne cruda adobada y la que se forma por efecto del cocinado (plancha, fritura, microondas, etc.). Quizás, en este punto sólo interesen la NDMA y la NPYR por ser, la primera, la más abundante y frecuente y la segunda por ser la que se forma en mayor cuantía en el cocinado térmico. No hay datos al respecto pero sí se tienen de otros productos cárnicos que pueden servir de modelo. Como la carne cruda adobada es un producto magro puede tomarse como modelo otro tipo de carne y en relación con el cocinado puede fijarse como patrón la fritura por ser en el que se alcanzan las mayores temperaturas (180-200 °C) y se tiene como muestra el bacon.

En los productos cárnicos crudos se han detectado ocasionalmente cantidades variables de diversas N-nitrosaminas pero la más frecuente es NDMA con concentraciones típicas inferiores a 5 µg/kg aunque, a veces, pueden hallarse valores superiores (véase 1.2.2). El tratamiento culinario térmico conduce a la generación de más N-nitrosaminas, destacando, al igual que en el caso del bacon, la NPYR. Esta N-nitrosamina se ha detectado en el bacon frito en cantidades variables, siendo los valores medios entre 50 y 100 µg/kg aunque Groenen et al. (1976) llegaron a determinar en una muestra 200 µg/kg. Como la carne cruda adobada siempre se consume tras un tratamiento culinario, puede perfectamente desecharse las N-nitrosaminas presentes en el producto crudo y tener en cuenta para la estimación del peligro, las que se generan en el proceso de fritura. En consecuencia, se pueden fijar valores de NDMA de 50 µg/kg y de 150 µg/kg de NPYR.

Es necesario tener presente también la volatilidad de estas N-nitrosaminas, ya que la mayor parte de las mismas escapan durante el proceso de fritura. En 1.2.1 se ha indicado que en el caso de la

NDMA el 70% se volatiliza y el 45% cuando se trata de NPYR. Asumiendo un consumo medio de dos lonchas de 50 gramos que se someten a fritura a 180 °C y teniendo en cuenta, por una parte, la concentración adjudicada al producto cocinado de cada una de las dos N-nitrosaminas y, por otra, los parámetros de volatilidad, puede fácilmente calcularse que las cantidades ingresadas durante el consumo de este producto son de 0,15 µg de NDMA y 6,75 µg de NPYR por ración. Son valores muy alejados de las TD₅₀ calculadas para ratas e incluso de la TD₀₅* establecida para la NDMA. Como la ingestión de N-nitrosaminas derivadas de los alimentos es, según se ha apuntado en el punto 2, de alrededor de un 16% (CICADS, 2002)-20% (Walters, 1992) habría que aumentar las cantidades anteriores pero aún así ni siquiera los valores de ingesta de N-nitrosaminas se acercarían a niveles que pudieran considerarse como peligrosos. Además, hay que añadir que el consumo de este alimento no se hace diariamente por lo que las N-nitrosaminas ingeridas se metabolizarían, siendo improbable, por tanto, que se acumularan en el organismo.

JECFA (WHO, 2002) ha establecido como NOEL la dosis de 6,7 mg/kg/día expresado como ion nitrito, por sus efectos sobre el corazón y el pulmón, cuando éste se administró, durante dos años, diariamente a ratas. Este valor ha sido utilizado para establecer la Ingesta Diaria Aceptable (IDA), expresada como ión nitrito, con un factor de seguridad de 100, fijándose en 0-0,07 mg/kg/día. Asimismo, y basándose en estudios realizados en voluntarios adultos, se ha fijado la IDA para el ión nitrato en 0-3,7 mg/kg/día.

La Agencia de Protección del Medioambiente de los Estados Unidos ha fijado como valores de Dosis de Referencia (RfD), 0,33 mg/kg/día para los nitritos y 1,6 mg/kg/día para los nitratos, usando datos de estudios en animales de experimentación y también usando datos epidemiológicos de incidencia de metahemoglobinemia en niños que habían tomado alimentos preparados con agua contaminada con nitratos y otros con niños que bebían agua contaminada con nitratos (CASRN, 1997).

Igualmente, se podría estimar la exposición por el consumo de carnes curadas de acuerdo con el nitrito ingerido. La Agencia de Protección del Medioambiente de los Estados Unidos (EPA), usando datos epidemiológicos de incidencia de metahemoglobinemia en niños y estudios en animales de experimentación, ha fijado como valores de dosis de referencia 0,33 mg/kg/día para los nitritos y 1,6 mg/kg/día para los nitratos (CASRN, 1997). Teniendo en cuenta los argumentos y premisas anteriores y suponiendo que el contenido en nitratos y nitritos en un alimento es de 50 mg/kg para los nitritos y 250 mg/kg para los nitratos (contenidos máximos establecidos por la anterior legislación: Real Decreto 145/1997), se puede hacer un cálculo que indicaría que una persona de 60 kg de peso cuando consume 100 g de lomo adobado, podría estar ingiriendo hasta un máximo de 5 mg de nitritos y 25 mg de nitratos (0,08 mg/kg de peso de nitritos y 0,41 mg/kg de nitratos), valores por debajo de los fijados para la IDA o para la RfD.

Así mismo, habida cuenta de que en la actual legislación (MSC, 2002) se ha eliminado la cantidad residual y que los datos analíticos procedentes de laboratorios de nuestro país (Blanch y Marín, 2007) muestran que las cantidades residuales se encontrarían por debajo de los niveles establecidos por la

* TD₀₅ : la dosis tumorigena (05) es la ingesta total (a menudo expresada en mg/kg p.c./día) asociada con un incremento del 5% en la incidencia o mortalidad debida a tumores.

anterior legislación (MSC, 1997), se puede afirmar que la cantidad de nitritos y nitratos que llegan al consumidor se encuentran por debajo de los niveles fijados para la IDA o para la RfD.

Finalmente, es necesario señalar que en la formulación de las sales de curado se incluyen también los ácidos ascórbico y eritórbito que reducen significativamente la formación de N-nitrosaminas durante el cocinado térmico (véase 1.3) con lo que disminuiría la ingestión de estos compuestos.

Conclusiones del Comité Científico

- Los nitratos y nitritos, tras su reducción a sustancias nitrogenadas más elementales con actividad nitrosante, dan lugar a la producción de N-nitrosaminas que se forman por nitrosación de aminas y amidas y otros compuestos nitrogenados. Es un fenómeno temperatura-dependiente, de tal forma que el cocinado (fritura, asado, horneado, etc.) cuanto más intenso es, más potencia la formación de N-nitrosaminas.
- Las N-nitrosaminas pueden proceder también de otros productos (cosméticos, caucho, tabaco, etc.) y formarse por síntesis endógena (saliva, estómago, etc.), habiéndose estimado que sólo un 15-20% del total ingerido procede de los alimentos.
- Se ha demostrado que una gran variedad de N-nitrosaminas poseen actividad tóxica, genotóxica y cancerígena para distintas especies animales, incluyendo los primates. Las que mayor atención han recibido en los productos cárnicos son las N-nitrosaminas volátiles dialquil y heterocíclicas (sobre todo, la N-nitrosodimetilamina –NDMA– y la N-nitrosopirrolidina –NPYR–) por ser las más frecuentes y las de mayor poder mutagénico y carcinógeno.
- No se poseen datos nacionales del nivel de N-nitrosaminas que pueden encontrarse en los preparados cárnicos frescos adobados, ni de las que se pueden formar durante su fritura y asado. Sí, en cambio, se dispone de valores en otros alimentos, especialmente el bacon, donde se han detectado ocasionalmente y siempre en cantidades muy bajas en el producto crudo sólo, pero en el cocinado (fritura a unos 180 °C) se encuentran de forma habitual NDMA y NPYR.
- La escasez de datos no permite hacer una valoración precisa de la exposición al peligro pero, basándose en los datos procedentes del bacon (contenido medio 50-100 µg/kg) y en los porcentajes descritos de volatilidad durante el cocinado, no parece que la carne adobada, tras su cocinado, pueda contribuir de forma significativa a la ingesta total de N-nitrosaminas.

Este Comité recomienda:

- ✓ restringir su presencia tanto como sea posible en los alimentos, si bien esto no debiera ir acompañado de una pérdida de protección frente al botulismo u otros atributos.
- ✓ la utilización de inhibidores de la nitrosación, como el ácido ascórbico y/o eritórbito en la formulación de las sales del curado.
- ✓ que el tratamiento térmico no sea de fritura sino a la plancha y de forma suave, y mejor en microondas. Asimismo, se sugiere que el cocinado se realice siempre en recipientes destapados para favorecer la disipación de las N-nitrosaminas que se vayan formando, y que se evite consumir la grasa que se desprende durante el cocinado.
- Dadas las características de envasado, almacenamiento y vida útil de la carne adobada hacen que el efecto inhibitor de los nitritos sobre *Clostridium botulinum* tenga menos importancia que en

otros productos. En consecuencia, podría estudiarse la posibilidad de reducir los niveles de nitratos y nitritos adicionados hasta los niveles estrictamente necesarios para desempeñar sus funciones tecnológicas.

Referencias

- Abdulkarim, B.G. y Smith, J.S. (1998) Heterocyclic amines in fresh and processed products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, pp: 4680-4687.
- ATSDR (1989). Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for N-nitrosodimethylamine. US Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Washington.
- Barnes, J.M. y Magee, P.N. (1954). Some toxic properties of dimethylnitrosamine. *British Journal of Industrial Medicine*, 11, pp: 167-174.
- Bartholomew, B. y Hill, M.J. (1984). The pharmacology of dietary nitrate and the origin of urinary nitrate. *Food and Chemical Toxicology*, 22, pp: 789-795.
- Bartsch, H. y Frank, N. (1996). Blocking the endogenous formation of N-nitroso compounds and related carcinogens. *IARC. Sci. Publ.* 139. pp:189-201.
- Belitz, H.D. y Grosch, W. (1997). Química de los alimentos. Zaragoza. Editorial Acribia, S. A.
- Benedict, R.C. (1980). Biochemical basic for nitrite inhibition of *Clostridium botulinum* cured meat. *Journal of Food Protection*, 43, pp: 877-881.
- Birdsall, J.J. (1977) *Proc. Second Inter. Symp. Nitrite Meat Prod., Zeist*. Pudoc. Wageningen.
- Blanch, A.I. y Marín M.T. (2007). Datos de nitritos y nitratos en productos cárnicos. Datos sin publicar. Subdirección General de Análisis y Normalización de Metodología analítica Agroalimentaria. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA).
- Boylard, E., Nice, E. y Williams, K. (1971). The catalysis of nitrosation by thiocyanate from saliva. *Food and Cosmetics Toxicology*, 9, pp: 639-643.
- Brender, J.D., Olive J.M., Felkner, M., Suarez, L., Marckwardt, W. y Hendricks, K.A. (2004) Dietary nitrites and nitrates, nitrosatable drugs, and neural tube defects. *Epidemiology*, 15, pp: 330-336.
- Brooks, J., Hainer, R.B., Morgan, T. y Pace, J. (1940). The function of nitrate, nitrite and bacteria in the curing of bacon and hams. Food Investigation Special Report No. 49, London. His Majesty's Stationary Office.
- Buchanan, R.L. y Solberg, M. (1972) Interaction of sodium nitrite, oxygen and pH on growth of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Science*, 37, pp: 81-85.
- Calmels, S., Ohshima, H. y Bartsch, H. (1988) Nitrosamine formation by denitrifying and non- denitrifying bacteria: implication in nitrite reductase and nitrate reductase in nitrosation catalysis. *Journal of General Microbiology*, 134, pp: 221-226.
- Carpenter, C.E., Reddy, D.S. y Cornforth, D.P. (1987). Inactivation of clostridial ferredoxin and pyruvate-ferredoxin oxidoreductase by sodium nitrite. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, pp: 549-552.
- CASRN (1997). (14797-65-0) Nitrite. Reference dose for Chronic Oral Exposure.
- Cassens, R.G. (1990). Nitrite-Cured Meat. A Food Safety Issue in Perspective. Food & Nutrition Press, Inc. Trumbull, Connecticut, USA.
- Challis, B.C. y Challis, J.A. (1982). N-nitrosamines and N-nitrosoimines. The chemistry of amino, Nitroso, and Nitro-compounds and their derivatives. New York: Wiley. Patai, S. (Ed), pp: 1151-1223.
- Chow, C.K. y Hong, C.B. (2002). Dietary vitamin E and selenium and toxicity of nitrite and nitrate. *Toxicology*, 180, pp: 195-207.
- CICADs (2002). Concise International Chemical Assessment Document 38. Geneva. Ed. UNEP, ILO y WHO.
- Cooper, M.T. y Porter, T.D. (2000). Mutagenicity of nitrosamines in methyltransferase-deficient strains of *Salmonella typhimurium* coexpressing human cytochrome P450 2E1 and reductase. *Mutation Research*, 454, pp: 45-52.

- CPDB (2007). The Cancer Potency Project. Disponible en: <http://potency.berkeley.edu/>
- Crosby, N.T., Foreman, J.K., Palframan, J.F. y Sawyer, R. (1972). Estimation of steam-volatile N-nitrosamines in foods at the 1 µg/kg level. *Nature*, 238, pp: 342-345.
- Davies y McWeeny (1977). Catalytic effect of nitrosophenols on N-nitrosamina formation. *Nature*, 266, pp: 657-658.
- De Roos, A.J., Word, M.H., Lynch C.F. and Canto, K.P. (2003). Nitrate in public water supplies and the risk of colon and rectum cancer. *Epidemiology*, 14, pp: 640-649.
- Dorsch, M.M., Scragg, R.K., McMichael, A.J., Baghurst, P.A. y Dyer, K.F. (1984). Congenital malformations and maternal drinking water supply in rural South Australia: a case-control study. *American Journal of Epidemiology*, 119, pp: 473-486.
- Eisenbrand, G. Spiegelhalter, B. y Preussmann, R. (1980). Nitrate and nitrite in saliva. *Oncology*, 37, pp: 227-231.
- EFSA (2003). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazard on the request from the Commission related to the effects of nitrates/nitrites on the microbiological safety of meat products. The *EFSA Journal*, 14, pp: 1-31.
- Ender, F. y Ceh, L. (1971). Conditions and chemical reaction mechanisms by which nitrosamines may be formed in biological products with reference to their possible occurrence in food products. *Zeitsch. Lebensmittel. Untersuchung Forschung*, 145, pp: 133-142.
- Fazio, T., White, R.H., Dusold, R.L. y Howard, J.W. (1973). Nitrosopyrrolidine in cooked bacon. *J. Am. Assoc. Agric. Chem.* 56. pp: 919 -921.
- Fazio, T., Havery, D.C. y Howard, J.W. (1979). Determination of volatile N-nitrosamines in foodstuffs. I: A new clean-up technique for confirmation by GLC-MS; II: A continued survey of foods and beverages. En: N-nitroso compounds: Analysis, formation and occurrence. Walker, E. A.; Griçute, M.; Castegnaro, M. y Börzsönyi, M. (Eds). IARC Sci. Publ. No. 31, International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 419-431.
- Fennema, O.R. (2000). Química de los alimentos. 2ª ed. Acribia S.A. Zaragoza. España.
- Fiddler, W., Pensabene, J.W., Piotrowski, E.G., Doerr, R.C. y Wasserman, A.E. (1973). Use of sodium ascorbate or erythorbate to inhibit formation of N-Nitroso-dimethylamine in frankfurters. *Journal of Food Science*, 38, pp: 1084.
- Fiddler, W., Pensabene, J.W., Fagan, J.C., Thorne, E.J., Piotrowski, E.G. y Wasserman, E.A. (1974). The role of lean and adipose tissue on the formation of N-nitrosopyrrolidine in fried bacon. *Journal of Food Science*, 39, pp: 1070-1071.
- Fritsch, P. y Saint Blanquat, G. (1985). Nitrates, nitrites et nitrosamines dans l'alimentation. *La Recherche*, 16, pp: 1106-1115.
- Forman, D. (1989). Are nitrates a significant risk factor in human cancer?. *Cancer Surveys*, 8, pp: 443-458.
- Givelber, H.M. y DiPaolo, J.A (1969). Teratogenic effects of N-ethyl-N-nitrosourea in the Syrian hamster. *Cancer Research*, 29, pp: 1151-1155.
- Goldman, R. y Shields, P.G. (2003). Food mutagens. *Journal of Nutrition*, 133 (Suppl 3), pp: 965S-973S.
- Gough, T.A., Goodhead, K. y Walters, C.L. (1976). Distribution of some volatile nitrosamines in cooked bacon. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 27, pp: 181-185.
- Gough, T.A., McPhail, M.F., Webb, K.S., Wood, B.J. y Coleman, R.F. (1977). An examination of some foodstuff for the presence of volatiles nitrosamines. *Journal of Food Science*, 28, pp: 345-351.
- Goutefongea, R. (1994). Les Nitrosamines: formation et présence dans les aliments. *C. R. Acad. Agric. Fr.* 80. pp: 53-62.
- Gray, J.I., Irvine, D.M. y Kakuda, Y. (1979). Nitrates and N-nitrosamines in cheese. *Journal of Food Protection*, 42, pp: 263-272.
- Green, L.C., Ruiz de Luzuriaga, K., Wagner, D.A., Rand, W., Istfan, N., Young, V.R. y Tannenbaum, S.R. (1981). Nitrate biosynthesis in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, pp: 7764-7768.
- Greene, B.E. y Price, L.G. (1975). Oxidation-induced color and flavor changes in meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23, pp: 164-167.
- Groenen, P.J., Jonk, R.J., van Ingen, C. y Noever de Brauw, M.C. (1976) Determination of eight volatile nitrosami-

- nes in thirty cured meat products with capillary gas chromatography-high-resolution mass spectrometry: the presence of nitrosodiethylamine and the absence of nitrosopyrrolidine. *IARC Scientific Publications No 14*, 321 - 331. IARC, Lyon.
- Hauschild, A.H.W. y Hilsheimer, R. (1983). Prevalence of *Clostridium botulinum* in commercial liver sausage. *Journal of Food Protection*, 46, pp: 242-244.
- Hashimoto, S., Yokokura, T., Kawai, Y. y Mutai, M. (1976). Dimethylnitrosamine formation in the gastro-intestinal tract of rats. *Food and Cosmetics Toxicology*, 14, pp: 553- 556.
- Hauser, E. (1977). Proc. Second. Inter. Symp. Nitrite Meat Product., Zeist, Pudoc, Wageningen (Citado por Walters, C. L., 1984. Nitrosaminas en productos cárnicos. En: Avances de la Ciencia de la Carne. R. Lawrie, ed. Editorial Acribia. Zaragoza.)
- Hawksworth, G. y Hill, M.J. (1971). The formation of nitrosamines by human intestinal bacteria. *The Biochemical Journal*, 122, pp: 28-29.
- Hecht, S.S. (1997a). Approaches to chemoprevention of lung cancer based on carcinogens in tobacco smoke. *Environmental Health Perspectives*, 105, pp: 955-963.
- Hecht, S.S. (1997b). Approaches to cancer prevention based on an understanding of N-nitrosamine carcinogenesis. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 216, pp: 181-191.
- Hecht, S.S. (1999a). DNA adduct formation from tobacco-specific N-nitrosamines. *Mutation Research*, 424, pp: 127-142.
- Hecht, S.S. (1999b). Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 91, pp: 1194-1210.
- Hecht, S.S. (2002). Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention. *The Lancet Oncology*, 3, pp: 461-469.
- Herring, H.K. (1973). Effects of nitrite and other factors on the physicochemical characteristics and N-nitrosamine formation in bacon. *Proc. Meat. Ind. Res. Conf.*, p. 47. Chicago. Am. Meat Inst. Found.
- Hildrim, K.I., Scanlan, R.A. y Libbey, L.M. (1975). Identification of gamma-nutenyl-(beta-propenyl) nitrosamine, the principal volatile nitrosamine formed in the nitrosation of spermidin or spermin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 293, pp: 34 – 37.
- Hrdlicka, J. y Kuca, J. (1965). The changes of carbonyl compounds in the heat processing of meat. *Poultry Science*, 44, pp: 7-31.
- Huerta, M. (2007). AICE. Comunicación personal.
- Hwang, L.S. y Rosen, J.P. (1976). Nireosopyrrolidine formation y fried bacon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, pp: 1152.
- Ikken, Y. (2005) Estimación de la capacidad antimutagénica de extractos vegetales frente a N-nitrosaminas volátiles presente en los alimentos. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid
- Jay, M.J., Loessner, M.J. y Golden, D.A. (2005). *Modern Food Microbiology*. New York. 7ª ed. Springer Science.
- Jones, R.C. y Weisburgwe, J.H. (1988). L-tryptophan inhibits formation of mutagens during cooking of meta and in laboratory models. *Mutation Research*, 206, pp: 343 – 349.
- Kamm, J.J., Dashman, T., Conney, A.H. y Burns, J.J. (1973). Protective effect of ascorbic acid on hepatotoxicity caused by sodium nitrite and aminopyrin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70, pp: 747-749.
- Kanner, J. (1979). Nitric oxide myoglobin as inhibitor of lipid oxidation. Abstr. 39th Annual IFT Meeting, St. Louis, MO, June, paper 22.
- Kanner, J. y Juven, B.J. (1980). S-nitrosocysteine as an antioxidant, colour-developing, and anticlostridial agent in comminuted turkey meat. *Journal of Food Science*, 45, pp: 1105-1108.
- Kato, Y., Aoki, T., Kato, N., Nakamura, R. y Matsuda, T. (1995). Modification of ovalbumin with glucose 6-phosphate by amino-carbonyl reaction. Improvement of protein heat stability and emulsifying activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, pp: 301-305.

- Knecht, P., Jarvinen, R., Dich, J. y Hakulinen, T. (1999). Risk of colorectal and other gastro-intestinal cancers after exposure to nitrate, nitrite and N-nitroso compounds: a follow-up study. *International journal of cancer*, 80, pp: 852-856.
- Kono, S. y Hirohata, T. (1996). Nutrition and stomach cancer. *Cancer Causes & Control*, 7, pp: 41-55.
- Koppang, N (1964). An outbreak of toxic liver injury in ruminants. *Nordisk Veterinaermedicin*, 16, pp: 305 -322.
- Kortboyer, J.M., Olling M. y Zeilmaker, M.J. (1997). The oral bioavailability of sodium nitrite investigated in healthy adult volunteers. Bilthoven, Netherlands: National Institute of Public Health and the Environment.
- Krul, C.A M., Zeimaker, M.J., Schothorst, R.C. y Havenaar, R. (2004). Intra gastric formation and modulation of N-nitrosodimethylamine in a dynamic in vitro gastrointestinal model human physiological condition. *Food and Chemical Toxicology*, 42, pp: 51-63.
- Leaf, C.D., Wishnok, J.S. y Tannenbaum, S.R. (1989). Mechanism of endogenous nitrosation. *Cancer Survey*, 8, pp: 323-334.
- Lijinsky, W. (1992). Chemistry and biology of N-nitroso compounds, Cambridge University Press: Cambridge, U. K.
- Lijinsky, W. y Epstein, S.S. (1970). Nitrosamines as environmental carcinogens. *Nature*, 225, pp: 21-23.
- Lin, I.N.C. y Gruenwedel, D.W. (1990). Mutagenicity and cytotoxicity of N-nitrosothiazolidine-4-carboxylic acid. *Food Additives and Contaminants*, 7, pp: 357-368.
- Linder, E. (1995). Toxicología de los alimentos. Zaragoza. Editorial Acribia.
- Lund, B.M. y Peck, M.W. (2000). *Clostridium botulinum*. En The Microbiological Safety and Quality of Foods. Vol. II pags. 1057-1109. B.M. Lund, T.C. Baird-Parker and G.W Gould (eds). Aspen Publishers Inc. Gaithersburg, MD.
- Liteplo, R.G., Meek, M.E. y Windle, W. (2002). N-nitrosodimethylamine. En: Concise International Chemical Assessment Document 38. World Health Organisation, Geneva.
- MacDonald, B., Gray, J.I. y Gibbins, L.N. (1980). Role of nitrite in cured meat flavor: Antioxidant role of nitrite. *Journal of Food Science*, 45, pp: 893-897.
- Magee, P.N. (1996). Nitrosamines and human cancer: introduction and overview. *European Journal of Cancer Prevention*, 5 (Suppl. 1), pp: 7-10.
- Magee, P.N. y Barnes, J.M. (1956). The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine. *British Journal of Cancer*, 10, pp: 114-122.
- Magee, P.N. y Barnes, J.M. (1967). Carcinogenic nitroso compounds. *Advances in Cancer Research*, 10, pp: 163-246.
- Mancebo, S.G., Gaspar, J., Calle, E., Pereira, S., Mariano, A., Rueff, J. y Casado, J. (2004). Stereochemical effects in the metabolic activation of nitrosopiperidines: correlations with genotoxicity. *Mutation Research*, 558, pp: 45-51.
- Marquardt, H., Rufino, F. y Weisburger, J.H. (1977). Mutagenic activity of nitrite-treated foods: human stomach cancer may be related to dietary factors. *Science*, 196, pp: 1000-1001.
- McIntyre, T. y Scanlan, R.A. (1993). Nitrosamines produced in selected foods under extreme nitrosation conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, pp: 101-102.
- McKnight G.M., Duncan C.W., Leifert C. y Golden M.H. (1999). Dietary nitrate in man: friend or foe? *British Journal of Nutrition*, 81. pp: 349-358.
- Mende, P., Spiegelhalder, B., Wacker, C.D. y Preussmann, R. (1989). Trapping of reactive intermediates from the nitrosation of primary amines by a new type of scavenger reagent. *Food and Chemical Toxicology*, 27. pp: 469-473.
- Mensinga, T.T., Speijers, G.J. y Meulenbelt, J. (2003). Health implications of exposure to environmental nitrogenous compounds. *Toxicological Reviews*, 22, pp: 41-51.
- Mirvish, S.S. (1995). Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. *Cancer Letters*, 93, pp: 17-48.
- Mirvish, S.S., Wallcave, L., Eagen, M. y Shubik, P. (1972). Ascorbate-nitrate reaction: possible means of blocking the formation o carcinogenic N-nitroso compounds. *Science*, 111, pp: 65 - 68.

- Moliner, J.R. (1979). Nitrosación de aminas secundarias como factor de carcinogénesis ambiental. Fundación Juan March, Serie Universitaria, 84, pp: 1-45.
- Mottram, D.S., Croft, S.E. y Patterson, R.L. (1984). Volatile components of cured and uncured pork: the role of nitrite and the formation of nitrogen compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 35, pp: 233-239.
- MSC (1997). Ministerio de Sanidad y Consumo. Real Decreto 145/1997, de 31 de enero, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización (derogado). BOE núm. 70 de 22 de marzo de 1997, pp: 9378-9418.
- MSC (2002). Ministerio de Sanidad y Consumo. Real Decreto 142/2002, de 1 de febrero, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización. BOE núm. 44 de 20 de febrero de 2002, pp: 6756-6799.
- Nakamura, M., Baba, N., Nakaoka, T., Wada, Y., Ishibashi, T. y Kawabata, T. (1976). Pathways of formation of N-nitrosopyrrolidine in fried bacon. *Journal of Food Science*, 41, pp: 874 – 877.
- Nychas, G.J.E. y Arkoudelos, J.S. (1990). Staphylococci: their role in fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol. Sympos. Suppl*, 19, pp: 1675-1885.
- O'Leary, D.F. y Solberg, M. (1976). Effect of sodium nitrite inhibition on intracellular thiol group and on the activity of certain glycolytic enzymes in *Clostridium perfringens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 31, pp: 208-212.
- Ohkuma, S. y Katsuram M. (2001). Nitric oxide and peroxyxynitrite as factors to stimulate neurotransmitter release in the CNS. *Progress in Neurobiology*, 64, pp: 97-108.
- Ohshima, H. y Kawabata, T. (1978). Mechanism of N-nitrosodimethylamine formation from trimethylamine and trimethylaminoxide. *IARC. Sci. Publ*, 19, pp:143-153.
- Ohta, T. (1993). Modification of genotoxicity by naturally occurring flavorings and their derivatives. *Critical Reviews in Toxicology*, 23, pp:127-146.
- Okochi, E., Kurahashi, A. y Mochizuki, M. (1997). Detection of mutagenicity in Ames test using a metalloporphyrin/oxidant model system for cytochrome P450. *Mutation Research*, 373, pp: 99-105.
- Österdahl, B.G. (1988). Volatile nitrosamines in foods on the Swedish market and estimation of their daily intake. *Food Additives and Contaminants*, 5, pp: 587-595.
- Österdahl, B.G. y Alriksson, E. (1990). Volatile nitrosamines in microwave-cooked bacon. *Food Additives and Contaminants*, 7, pp: 51-54.
- Palumbo, S.A., Smith, J.L., Gentilcore, K.M. y Fiddler, W. (1974). Investigation on the possible occurrence of nitrosamine in Lebanon bologna. *Journal of Food Science*, 39, pp: 1257-1258.
- Panalaks, T., Iyengar, J R., Donaldson, B.A., Miles, W. y Sen, N.P. (1974). Further survey of cured meat products for volatile N-nitrosamines. *Journal of the Association of Official Analytical Chemistry*, 57, pp: 806 - 812.
- Pearson, A.M., Chen, C., Gray, J.I. y Aust, S.D. (1992). Mechanism(s) involved in meat mutagen formation and inhibition. *Free radical biology & medicine*, 3, pp: 161-167.
- Pegg, A. E., Swenn, K., Mi-Young, C., Dolan, M. E. y Moschel, R.C. (1995). Increased killing of prostate, breast, colon, and lung tumor cells by the combination of inactivators of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase and N,N'-bis(2-chloroethyl)-N-nitrosourea. *Biochemical Pharmacology*, 50, pp: 1141-1148.
- Pierson, M.D. y Smoot, L.A. (1982). Nitrite, nitrite alternatives, and the control of *Clostridium botulinum* in cured meats. *CRC. Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 17, pp: 141-187.
- Pignatelli, B., Friesen, M. y Walker, E.A. (1980). The role of phenols in catalysis of nitrosamine formation. En: N-nitroso compounds: Analysis, formation and occurrence., Walker, E. A.; Castegnaro, M.; Griçiuțe, L. y Börzsönyi, M. (Eds). International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, IARC Sci. Publ. 31, pp: 95-109.
- Preussmann, R., Eisenbrand, G. y Spiegelhalder, B. (1984). N-nitrosamines in food: Occurrence and reduction of exposure. *Carcinog. Mut. Environ*, 1, pp: 165-171.

- Preussmann, R. y Stewart, B.W. (1984). N-nitroso carcinogens. En: Chemical carcinogens, 2nd edn, Searle, C. E. (Ed). American Chemical Society Monograph 182, ACS, Washington, DC, pp: 643-828.
- Price, L.G. y Greene, B.E. (1978). Factors affecting panelist's perceptions of cured meat flavor. *Journal of Food Science*, 43, pp: 319-322.
- Ramarathnam, N., Rubin, L.J. y Diosady, L.L. (1991). Studies on meat flavour. II. A quantitative investigation of volatile carbonyls and hydrocarbons in uncured and cured beef and chicken. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, pp: 1839-1847.
- Roberts, T.A. (1975). The microbiological role of nitrite and nitrate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 26, pp:1755-1760.
- Roberts, T.A. y Ingram, M. (1977). Nitrite and nitrate in the control of *Clostridium botulinum* in cured meats. Proceedings of the second International Symposium in nitrite on meat products. Tinbergen, B. J. y Krol, B. (Eds). Wageningen, PUDOC, pp: 29-38.
- Roberts, T.A. y Smart, J.L. (1976). The occurrence and growth of *Clostridium* spp. in vacuum-package bacon with particular reference to *Clostridium perfringens (welchi)* and *Clostridium botulinum*. *Journal of Food Technology*, 11, pp: 229-244.
- Sander, J. y Burkle, G. (1969). Induction of malignant tumors in rats by simultaneous feeding of nitrites and secondary amines. *Zeitschrift für Krebsforschung*, 73, pp: 54-66.
- Sander, J. y Schweinsberg, F.U. (1972). Wechselbeziehungen zwischen nitrat, nitrit und kanzerogenen N-nitrosoverbindungen. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. B*, 156, pp: 334-335.
- Scanlan, R.A. (1983). Formation and occurrence of nitrosamines in food. *Cancer Research*, 43 (Suppl.), pp: 2435S-2440S.
- Scanlan, R.A., Barbour, J.F., Hotchkiss, J.H. y Libbey, L.M. (1980). N-nitrosodimethylamine in beer. *Food and Cosmetics Toxicology*, 18, pp: 27-29.
- Schweinsberg, F. y Sander, J. (1972). Cancerogenic nitrosamines consisting of simple aliphatic tertiary amines and nitrite. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, 353, pp: 1671-1676.
- Sen, N.P., Smith, D.C., Schwinghamer, L. (1969). Formation Of N-nitrosamine from secondary amines and nitrite in human and animal gastric juice. *Food and Cosmetics Toxicology*, 7, pp: 301-307.
- Sen, N.P., Donaldson, B.A., Inyengar, J.F. y Panalaks, T. (1973). Nitrosopyrrolidine and methylnitrosamine in bacon. *Nature*, 241, pp: 473 - 474.
- Sen, N.P., Donaldson, B., Charbonneau, C. y Miles, W.F. (1974). Effects of additives on the formation of nitrosamines in meat curing mixtures containing spices and nitrite. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 22, pp: 1125-1130.
- Sen, N.P., Donaldson, B.A., Seamen, S., Inyengar, J.F. y Miles, W.F. (1976). Inhibition of nitrosamine formation in fried bacon by propylgallate and L-ascorbyl palmitate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24, pp: 397-401.
- Sen, N.P., Miles, W.F., Donaldson, B.A., Panalaks, T y Inyengar, J.F. (1973). Formation of nitrosamines in a meta curing mixture. *Nature*, 245, pp: 104 – 105.
- Shenoy, N.R. y Choughuley, A.S.U. (1992). Characterisation of potentially mutagenic products from the nitrosation of piperidine. *Cancer Letters*, 64, pp: 235-239.
- Sheweita, S.A. y Mostafa, M.H. (1996). N-nitrosamines and their effects on the level of glutathione, glutathione reductase and glutathione S-transferase activities in the liver of male mice. *Cancer Letters*, 99, pp: 29-34.
- Singer, G.M. y Lijinsky, W. (1976). Naturally occurring nitrosatable compounds. Secondary amines in foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24, pp: 550-553.
- Skovgaard, N. (1992). Microbiological aspects and technological need: technological needs for nitrates and nitrites. *Food Additives and Contaminants*, 9, pp: 391-397.
- Stephany, R.W., Freudenthal, J. y Schuller, P.L. (1976). Quantitative and qualitative determination of some volatiles nitrosamines in various meat products, *IARC Sci. Publ.* 14, pp: 343 – 354. IARC, Lyon.

- Swenberg, J.A., Fedtke, N., Ciroussel, F., Barbin, A. y Bartsch, H. (1992). Etheno adducts formed in DNA of vinyl chloride-exposed rats are highly persistent in liver. *Carcinogenesis*, 13, pp: 727-729.
- Tannenbaum, S.R. (1972). Nitrite and nitrosamine content of foods: unsolved problems and current research. *Proc. of the 25th Rec. Meat Conf., American Meat Association*, Ames, Iowa, National Livestock and Meat Board, Chicago, IL.
- Tompkin, R.B., Christiansen, L.N. y Shaparis, A.B. (1978). Enhancing nitrite inhibition of *Clostridium botulinum* with isoascorbate in perishable canned cured meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 35, pp: 59 – 61.
- Tricker, A.R. y Kubacki, S.J. (1992). Review of the occurrence and formation of non-volatile N-nitroso compounds in foods. *Food Additives and Contaminants*, 9, pp: 39-69.
- Tricker, A.R. y Preussmann, R. (1990). Chemical food contaminants in the initiation of cancer. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 49, pp: 133-144.
- Tricker, A.R. y Preussmann, R. (1991). Carcinogenic N-nitrosamines in the diet: occurrence, formation, mechanisms and carcinogenic potential. *Mutation Research*, 259, pp: 277-289.
- Vecchio, A.J., Hotchkiss, J.H. y Bisogni, C.A. (1986). N-nitrosamine ingestion from consumer-cooked bacon. *Journal of Food Science*, 51, pp: 754-756.
- Vermeer, I.T., Pachen, D.M., Dallinga, J.W., Kleinjans, J.C. y Van Maanen, J.M. (1998). Volatile N-nitrosamine formation after intake of nitrate at the ADI level in combination with an amine-rich diet. *Environmental Health Perspectives*, 106, pp: 459-463.
- Vittozi, L. (1992). Toxicology of nitrates and nitrites. *Food Additives and Contaminants*, 9, pp: 579 -585.
- Vosgen, W. (1993). Brühwurst Alternatives Herstellungsverfahren aus nicht schlachtwarmen Fleisch. *Fleischwirtschaft*, 73, pp: 123.125.
- Wagner, D.A., Shuker, D.E., Bilmazes, C., Obiedzinski, M., Baker, I., Young, V.R. y Tannenbaum, S.R. (1985). Effect of vitamin C and E on endogenous synthesis of N-nitrosamino acids in humans: precursor-product studies with [15N]nitrate. *Cancer Research*, 45, pp: 6519-6522.
- Wakabayashi, K., Nagao, M., Ochiai, M., Fujita, Y., Tahira, T., Nakayasu, M., Ohgaki, H., Takayama, S. y Sugimura, T. (1987). Recently identified nitrite-reactive compounds in food: occurrence and biological properties of the nitrated products. *IARC. Sci. Publ.* 84, pp: 287-291.
- Walker, R. (1990). Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds: a review of the occurrence in food and diet and the toxicological implications. *Food Additives and Contaminants*, 7, pp: 717-768.
- Walters, C.L. (1980). The exposure to humans to nitrite. *Oncology*, 37, pp: 289-296.
- Walters, C.L. (1984). Nitrosaminas en productos cárnicos. En Libro: avances de la ciencia de la carne. R. Lawrie (ed.). Zaragoza. Editorial Acribia.
- Walters, C.L. (1992). Reaction of nitrates and nitrites in foods with special reference to the determination of N-nitroso compounds. *Food Additives and Contaminants*, 9, pp: 441-447.
- Walters, C.L., Edwards, M.W., Elsey, T.S. y Martin, M. (1976). The effect of antioxidants on the production of volatile nitrosamines during the frying of bacon. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung*, 162, pp: 377 – 385.
- Ward, F.W., Coates, M.E. y Walker, R. (1986). Nitrate reduction, gastro-intestinal pH and N-nitrosation in gnotobiotic and conventional rats. *Food and Cosmetics Toxicology*, 24, pp: 17-22.
- Warthesen, J.J., Scanlan, R.A., Bills, D.D. y Libbey, L.M. (1975). Formation of heterocyclic N-nitrosamines from the reaction of nitrite and selected primary diamines and amino acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23, pp: 898-902.
- Wasserman, A.E. y Talley, F. (1972). The effect of sodium nitrite on the flavor of frankfurters. *Journal of Food Science*, 37, pp: 536-539.
- Wasserman, A.E. y Fiddler, W. (1974). En Libro: N-nitroso compounds in the environment. Lyon. *IARC Scientific Publication*, Núm. 9, IARC.

- Wasserman, A.E., Fiddler, W., Doerr, R.C., Osman, S.F. y Dooley, C.J. (1972) Dimethylnitrosamine in frankfurters. *Food and Cosmetics Toxicology*, 10, pp: 681 – 684.
- Weyer, P. (2001). Nitrate in drinking water and human health. Iowa City: Center for Health Effects of Environmental Contamination.
- White, J.V. (1975). Relative significance of dietary sources of nitrate and nitrite. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23, pp: 886-891.
- WHO (2002). World Health Organization. Evaluation of certain food additives and contaminants. Fifty-ninth report of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.
- Williams, D.L.H. (1988). Nitrosation, Cambridge University Press, New York, pp: 176.
- Wirth, F. (1993). Methods for manufacture of meat products for special nutritional requirements. *Mitteilungsblatt der Bundesanstalt für Fleischforschung Kulmbach*, 32, pp: 200-206.
- Yang, C.S., Ju, Y.Y., Koop, D.R. y Coon, M.J. (1985). Metabolism of nitrosamines by purified rabbit liver cytochrom P-450 isozymes. *Cancer Research*, 45, pp: 1140-1145.
- Yoo, L.J., Barbour, J.F., Libbey, L.M. y Scanlan, R.A. (1992). Precursors of N-nitrosodimethylamine in malted barley. 2. Determination of dimethylamine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, pp: 2222-2225.