



BRUNA FERNANDES ANDRADE

**EVALUATION OF S-NITROSO THIOLS AS A NITRITE
SUBSTITUTE IN MEAT PRODUCTS**

**LAVRAS - MG
2024**

BRUNA FERNANDES ANDRADE

**EVALUATION OF S-NITROSO THIOLS AS A NITRITE SUBSTITUTE IN MEAT
PRODUCTS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos para a obtenção do título de Doutora.

Prof. Dr. Eduardo Mendes Ramos
Orientador

**LAVRAS – MG
2024**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Andrade, Bruna Fernandes.

Evaluation of s-nitrosothiols as a nitritesubstitute in meat
products / Bruna Fernandes Andrade. - 2024.

182 p. : il.

Orientador(a): Eduardo Ramos.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2024.
Bibliografia.

1. Produtos Cárneos. 2. Substituto de Nitrito. 3. S-nitrosotióis.
I. Ramos, Eduardo. II. Título.

BRUNA FERNANDES ANDRADE

EVALUATION OF S-NITROSO THIOLS AS A NITRITE SUBSTITUTE IN MEAT PRODUCTS

AVALIAÇÃO DE S-NITROSOTIÓIS COMO SUBSTITUTO DE NITRITO EM PRODUTOS CÁRNEOS

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 18 de outubro de 2024.

Dra. Alcinéia de Lemos Souza Ramos, UFLA

Dr. Paulo Rogério Fontes, UFV

Dr. Robledo de Almeida Torres Filho, UFV

Dra. Vanelle Maria da Silva, UFV

Prof. Dr. Eduardo Mendes Ramos
Orientador

**LAVRAS – MG
2024**

*Aos meus pais, Tânia e Sérgio, meus maiores exemplos de vida
e meu PORTO SEGURO.
Ao meu noivo, Renan, meu cúmplice.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder o dom da vida, pela proteção, por todas as bênçãos concedidas a mim e minha família durante esses anos, por ser sempre o meu amparo, proteção e minha direção. À Nossa Senhora, que com seu amor de mãe, intercede por mim junto a Deus e caminha sempre à minha frente.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao programa de Pós-graduação de Ciência dos Alimentos (PPGCA) pela oportunidade concedida para a realização do Doutorado. Ao Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA) pela disponibilidade e estrutura para que eu pudesse realizar a pesquisa, aqui deixo meu carinho a todos os professores e técnicos do DCA, que de forma direta ou indireta colaboraram para a minha formação.

Ao meu orientador, professor Dr. Eduardo Ramos por todo ensinamento, dedicação, paciência, colaboração agregando de forma imensurável em minha formação acadêmica e pessoal. A Alcinéia de Lemos Souza Ramos, pela parceria, compreensão e incentivo. Aos membros da banca, professores Robledo Torres, Vanelle da Silva e Paulo Rogério, por todas as contribuições que agregaram de forma grandiosa no trabalho e na minha formação acadêmica. A Central de Análise e Prospecção Química (CAPQ – DQI) pela recepção e realização das análises, em especial as técnicas Lidiany e Franciane por toda dedicação e disponibilidade.

Aos meus pais, Tânia e Sérgio, meu porto seguro e minhas referências, pessoal e profissional. Obrigada por toda compreensão e incentivo, por vibrarem por mim em minhas conquistas e me confortar meio as dificuldades, e sobretudo, por sempre manifestarem carinho e amor. Amo muito vocês! Ao meu noivo, Renan, por ser meu cúmplice durante toda essa jornada; e toda sua família, por embarcarem junto a mim nessa trajetória. A toda minha família, minha avó, tios e primos, que sempre me apoiaram e me incentivaram. À Marcela, minha prima por todo carinho, paciência e amor. Obrigada por ser minha companheira. À Karine, que com seu jeito sempre alegre e cuidadosa comigo, tornou meus dias mais felizes. Aos meus companheiros do laboratório (LabCarnes) agradeço pela prontidão, colaboração, ensinamentos, cuidado e carinho. Jayda, Graci, Marielle, Ana Paula, Isadora, Márcia, Angélica, Marcelo, Lorrany, Mirian, Jean e Roberta; à vocês minha eterna gratidão.

Ao meu professor de química, Odilon Rosa, que me inspirou desde o ensino médio. Aos meus professores de Química e da Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de

Viçosa - Florestal que me incentivaram, torceram por mim e colaboram para minha formação acadêmica e pessoal, fica aqui minha eterna gratidão e carinho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/Brasil), na concessão da bolsa de Doutorado no PPGCA/UFLA, e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brasil; processos 430206/2016-0 e 311305/2022-9) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG/Brasil; processo CVZ APQ 02904-17), no aporte financeiro ao projeto de pesquisa.

RESUMO

Esse trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da adição dos S-nitrosotióis (RSNOs) como substituto total do aditivo nitrito de sódio em produtos curados cozidos (apresentados). No primeiro artigo, foi feita uma revisão sobre o uso de tecnologias não térmicas para redução de nitrito em produtos cárneos. No segundo e terceiro artigos foi avaliado a equivalência de substituição (5 a 300 mg de nitrito equivalente, NEq/kg) dos RSNOs S-nitroso-N-acetilcisteína (NAC-SNO) e S-nitroso-N-acetilcisteína etil éster (NACET-SNO) e seus efeitos nas características tecnológicas e sensoriais dos produtos. No quarto artigo foram avaliados o perfil sensorial descritivo e a estabilidade das características tecnológicas dos produtos reformulados com NAC-SNO (50 a 300 mg NEq/kg) durante o armazenamento a vácuo por 60 dias (a 4°C). No quinto artigo, foi conduzido um estudo cinético de soluções (NAC-SNO_S) e pó liofilizado (NAC-SNO_P) de NAC-SNO, em diferentes concentrações (200 a 400 mM) e temperaturas de armazenamento (-18 a 30 °C). Os RSNOs não diferiram entre si, produzindo baixos níveis de nitrito residual (0-10 mg/kg) e não afetando o pH do produto. Nos índices de TBARS, foram observados maiores valores para RSNOs em concentrações de até 50 mg NEq/kg e valores similares ao nitrito a partir de 75 mg NEq/kg de adição. Concentrações acima de 50 mg NEq/kg de RSNOs resultaram em um índice de cor curada instrumental dentro da faixa ideal, mas somente a partir da adição de 150 mg NEq/kg foi verificada similaridade ao nitrito para a percepção sensorial. Durante o armazenamento, foram observados maiores valores de TBARS em amostras contendo 50 mg NEq/kg do agente de cura (RSNOs ou nitrito) do que 150 e 300 mg NEq/kg, com valores ligeiramente maiores nas amostras adicionadas de NAC-SNO. A perda da cor curada durante o armazenamento das amostras contendo NAC-SNO foi similar às contendo nitrito. A percepção da intensidade de sabor e aroma característico e as notas de aceitação sensorial dos produtos adicionados de NAC-SNO foram maiores do que nos produtos contendo nitrito. A decomposição do NAC-SNO seguiu uma reação de primeira ordem nas soluções não-estabilizadas e de ordem zero nas estabilizadas, com o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) aumentando de 1,1 dia para 9,9 dias, mas reduzindo em soluções mais concentradas. A decomposição do NAC-SNO_P seguiu um decaimento de segunda ordem, com energia de ativação média de 92 kJ/mol e Q_{10} de 4,0. A estabilidade dos pós aumentou com a concentração, com os valores de $t_{1/2}$ alcançando até 100 dias na maior concentração a 2 °C. Assim, os resultados sugerem a adição de 150 mg NEq/kg de NAC-SNO para obtenção e manutenção das características tecnológicas de produtos cozidos durante o processamento e armazenamento. Conclui-se também que o processo de estabilização e liofilização do NAC-SNO em maiores concentrações e o seu armazenamento refrigerado ou congelado é uma estratégia de otimização interessante para o seu uso industrial, pois apresenta bom rendimento, estabilidade e praticidade de uso.

Palavra-chaves: S-nitroso-N-acetilcisteína; S-nitroso-N-acetilcisteína etil éster; estabilidade; oxidação lipídica; perfil sensorial descritivo; cinética.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effects of adding S-nitrosothiols (RSNOs) as a complete substitute for the sodium nitrite additive in cooked cured products (ham-like products). In the first article, a review was made on the use of non-thermal technologies for nitrite reduction in meat products. In the second and third articles, the equivalence of replacement (5 to 300 mg of nitrite equivalent, NEq/kg) of the RSNOs S-nitroso-N-acetylcysteine (NAC-SNO) and S-nitroso-N-acetylcysteine ethyl ester (NACET-SNO) was evaluated, as well as their effects on the technological and sensory characteristics of the products. In the fourth article, the sensory descriptive profile and the stability of the technological characteristics of the products reformulated with NAC-SNO (50 to 300 mg NEq/kg) during vacuum storage for 60 days (at 4°C) were assessed. In the fifth article, a kinetic study of solutions (NAC-SNOS) and freeze-dried powder (NAC-SNOP) of NAC-SNO was conducted, at different concentrations (200 to 400 mM) and storage temperatures (-18 to 30°C). The RSNOs did not differ from each other, producing low levels of residual nitrite (0-10 mg/kg) and not affecting the pH of the product. In the TBARS index, higher values were observed for RSNOs at concentrations up to 50 mg NEq/kg and values similar to nitrite from 75 mg NEq/kg. Concentrations above 50 mg NEq/kg of RSNOs resulted in an instrumental cured color index within the ideal range, but similarity to nitrite in sensory perception was only observed from the addition of 150 mg NEq/kg. During storage, higher TBARS values were observed in samples containing 50 mg NEq/kg of the curing agent (RSNOs or nitrite) than at 150 and 300 mg NEq/kg, with slightly higher values in samples with added NAC-SNO. The loss of cured color during storage in samples containing NAC-SNO was similar to those with nitrite. The perceived intensity of characteristic flavor and aroma and the sensory acceptance notes of products added with NAC-SNO were higher than in products containing nitrite. The decomposition of NAC-SNO followed a first-order reaction in non-stabilized solutions and zero-order in stabilized solutions, with the half-life ($t_{1/2}$) increasing from 1.1 days to 9.9 days, but reducing in more concentrated solutions. The decomposition of NAC-SNOP followed a second-order decay, with an average activation energy of 92 kJ/mol and a Q_{10} of 4.0. The stability of the powders increased with concentration, with $t_{1/2}$ values reaching up to 100 days at the highest concentration at 2°C. Thus, the results suggest the addition of 150 mg NEq/kg of NAC-SNO to obtain and maintain the technological characteristics of cooked products during processing and storage. It is also concluded that the stabilization and freeze-drying process of NAC-SNO at higher concentrations and its refrigerated or frozen storage is an interesting optimization strategy for industrial use, as it presents good yield, stability, and ease of use.

Keywords: S-nitroso-N-acetylcysteine; S-nitroso-N-acetylcysteine ethyl ester; stability; lipid oxidation; descriptive sensory profile; kinetics.

INDICADORES DE IMPACTO

A proposta de estudo sobre a substituição do nitrito por S-nitrosotióis (RSNOs) em produtos cárneos gera novos *insight* para a aplicação dos RSNOs em alimentos, oferecendo valiosas contribuições à literatura científica e um alto potencial de impacto ao processo de fabricação da indústria cárnea. Do ponto de vista social, substituir um aditivo potencialmente nocivo por uma alternativa mais segura atende à crescente demanda dos consumidores por alimentos com menor risco à saúde. Além disso, esta proposta está em alinhamento com Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da ONU, especificamente: (i) Saúde e Bem-estar (ODS 3): ao promover o desenvolvimento de produtos que reduzem os riscos de doenças associadas ao consumo de nitrito; (ii) Indústria, Inovação e Infraestrutura (ODS 9): ao incentivar inovações tecnológicas no setor de alimentos; e (iii) Consumo e Produção Responsáveis (ODS 12): ao promover a produção de alimentos mais seguros e sustentáveis. Em relação às áreas temáticas da Política Nacional de Extensão, o impacto deste trabalho pode ser classificado principalmente nas áreas de "Tecnologia e Produção" e de "Saúde".

IMPACT INDICATORS

The proposed study on the substitution of nitrite with S-nitrosothiols (RSNOs) in meat products generates new insights for the application of RSNOs in food, offering valuable contributions to the scientific literature and a high potential impact on the manufacturing process of the meat industry. From a social perspective, replacing a potentially harmful additive with a safer alternative meets the growing consumer demand for foods with lower health risks. Furthermore, this proposal aligns with the United Nations Sustainable Development Goals (SDGs), specifically: (i) Health and Well-being (SDG 3): by promoting the development of products that reduce the risks of diseases associated with nitrite consumption; (ii) Industry, Innovation, and Infrastructure (SDG 9): by encouraging technological innovations in the food sector; and (iii) Responsible Consumption and Production (SDG 12): by promoting the production of safer and more sustainable food. In relation to the thematic areas of the National Extension Policy, the impact of this work can be primarily classified in the areas of "Technology and Production" and "Health".

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	13
1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Tendências de consumo de produtos cárneos no Brasil.....	16
2.2	Sais de cura em carne processada.....	17
2.2.1	Química do nitrito e seu mecanismo de cura em carne	19
2.2.2	Cor da carne curada	21
2.2.3	Atividade antioxidante.....	23
2.2.4	Desenvolvimento do <i>flavor</i>	26
2.2.5	Atividade antimicrobiana: <i>Clostridium botulinum</i>	27
2.3	Relação entre o consumo de produtos cárneos e a saúde	30
2.4	Alternativas à adição de sais de cura	32
2.4.1	Uso de corantes alimentares	33
2.4.2	Técnicas de biopreservação	34
2.4.2.1.	Bacteriocinas	34
2.4.2.2	Enzimas	35
2.4.2.3	Ácidos orgânicos	36
2.4.2.4	Óleos essenciais e extratos vegetais	38
2.4.3	Uso de fontes naturais de nitrato	39
2.4.4	Carreadores de óxido nítrico	41
	REFERÊNCIAS	47
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	57
	ARTIGO 1. Nonthermal technology for reducing or replacing nitrite in meat products.....	58
	ARTIGO 2. S-Nitrosotióis como substitutos de nitrito em apesuntados	89
	ARTIGO 3. S-Nitrosothiols as nitrite alternatives: effects on residual nitrite, lipid oxidation, volatile profile, and cured color of restructured cooked ham	106
	ARTIGO 4. Sensory profile and color and oxidative stabilities of sliced restructured cooked hams with added S-nitroso-N-acetylcysteine as a nitrite replacement.....	139
	ARTIGO 5. Estudo da cinética de decomposição da solução e do pó liofilizado de S-nitroso-N-acetilcisteína para utilização como substituto de nitrito em produtos cárneos	163
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	182

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Sabe-se que a produção e comercialização de produtos cárneos possui grande importância para a nutrição humana e economia, devido ao seu conteúdo proteico e a valorização de cortes cárneos comercializados *in natura*. O mercado dispõe de uma grande variedade de produtos, que podem ser classificados em curados e não curados. Entende-se por produtos curados aqueles adicionados de sais de cura, que compreendem aos sais de nitrito e seus percussores de nitrato. Os sais de cura são aditivos ‘curinga’ na indústria cárnea devido a sua múltipla ação na geração de importantes características sensoriais (cor e *flavor*), de estabilidade oxidativa e na segurança microbiana, que tem como microrganismo alvo o *Clostridium botulinum*, microrganismo produtor de neurotoxina altamente letal. A adição dos sais de cura possui um papel ainda mais importante na segurança contra o botulismo em produtos prontos para consumo, uma vez que esses produtos não recebem o tratamento térmico antes do consumo. Já no momento de compra e de consumo, as características sensoriais impactam sob a aceitação do consumidor que, ao vivenciar uma experiência positiva tende a consumi-lo novamente.

A cura é um processo que envolve uma série de reações químicas da decomposição do nitrito à oxido nítrico (NO; espécie ativa). A espécie NO possui alta afinidade com íon ferro, que se encontra presente no pigmento de mioglobina e em algumas enzimas microbianas. Contudo, durante o processo de cura também são formadas espécies intermediárias são precursoras das N-nitrosaminas, compostos de grande preocupação para saúde pública a longo prazo porque possuem potencial mutagênico. Logo, embora a aplicabilidade e necessidade do uso de sais de cura seja incontestável, há um paradoxo no que se refere a relação entre sais de cura e saúde do consumidor. Por um lado, o nitrito previne a intoxicação botulínica e por outro gera compostos que são indesejáveis. Por essa razão, uma série de pesquisas tem sido desenvolvidas buscando uma nova estratégia de substituição parcial ou total para os sais de cura como o uso de corantes, agentes biopreservativos, aplicação de tecnologias não térmicas, e suas combinações. Devido ao amplo espectro de ação dos sais de cura e a limitação de cada uma das técnicas de substituição, ainda não se tem uma proposta capaz de inviabilizar o uso do tradicional sal de cura. Em geral, até o momento as propostas de substituição que garantem a segurança microbiana apresentam como desvantagens a alteração de características sensoriais e redução da estabilidade.

Entre os compostos candidatos para a substituição dos sais de cura em produtos cárneos, os S-nitrosotióis (RSNOs) têm despertado interesse científico devido a sua

capacidade de carrear e doar NO. Acredita-se que estes compostos possuem o mesmo mecanismo de ação do nitrito, com a vantagem de limitar a geração de N-nitrosaminas, já que entrega prontamente o NO ao íon ferro. Os RSNOs são espécies conhecidas há muitos anos na medicina para o entendimento de fenômenos fisiológicos e fisiopatológicos. A aplicação desses compostos no âmbito das ciências dos alimentos ainda é muito recente e escassa. De um modo geral, foram obtidos resultados promissores na geração de cor, atividade antioxidante e controle microbiano, contudo, até o momento foram realizadas apenas a simulações de condições de processamento.

Sabe-se que a cura tradicional (com sais de cura) por si só é afetada por diferentes fatores, como os ingredientes utilizados; o teor do sal adicionado; pH, tempo e temperatura do meio. Nesse sentido surgem algumas lacunas no que diz respeito a geração de características tecnológicas e sensoriais de produtos cárneos adicionados de RSNOs durante a elaboração e armazenamento em condições similares as praticadas industrialmente. No que se refere a aplicabilidade dos RSNOs, sua principal limitação se dá devido à alta instabilidade de suas soluções, sendo necessário seu preparo e uso imediato. Sabe-se que o processo de decomposição dos RSNOs em solução pode ser influenciado por fatores como concentração, pH e temperatura do meio, presença de íons metálicos e oxigênio. Nesse sentido, para a aplicação dos RSNOs na indústria cárnea seria interessante propor condições que viabilizem seu uso e aumente a estabilidade desses compostos.

Nesse sentido, o objetivo principal desse trabalho foi avaliar o uso de RSNOs como agentes de cura alternativos ao nitrito de sódio em apressentados. Buscou-se analisar o efeito da adição de RSNOs nas características tecnológicas e sensoriais do apressentado, tanto após o processamento quanto durante o armazenamento, além de investigar a cinética de decomposição do S-nitroso-N-acetilcisteína (NAC-SNO) em solução e em pó como aditivo alimentar.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Tendências de consumo de produtos cárneos no Brasil

Os produtos cárneos podem ser classificados como reestruturados (embutidos ou não) ou inteiros, frescos, crus ou cozidos. Além disso, podem ou não serem submetidos à processos como salga, secagem, fermentação, emulsão e defumação. A aplicação e combinação desses processos, matéria-prima e ingredientes oferece aos consumidores uma diversidade de produtos de alto valor biológico, atendendo às diferentes classes sociais e proporcionando diferentes experiências sensoriais. A elaboração de produtos cárneos é uma estratégia da indústria para agregar valor à cortes e recortes cárneos, bem como a miúdos (como coração e fígado), que possuem menor comercialização na forma *in natura*. De acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Alimentos, 86,1% dos produtos industrializados são compostos por alimentos básicos da dieta dos brasileiros, como carne, leite, óleos, gorduras e derivados de trigo. Os produtos cárneos e conservas de pescados representam 30,9% das vendas de alimentos (ABIA, 2020). No Brasil, os produtos cárneos são normatizados pelos Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade (RTIQ), que asseguram a transparência na produção, processamento e comercialização dos produtos, com devidas atualizações. Esses documentos fixam a identidade e os parâmetros mínimos de qualidade que cada produto deve apresentar, incluindo a natureza da matéria-prima, composição físico-química mínima, tipo de processamento, modo de apresentação, designação de venda e ingredientes obrigatórios e opcionais. Os limites de adição de aditivos são definidos pela Instrução Normativa nº 211, de 1º de março de 2023 (Brasil, 2024) enquanto os padrões microbiológicos são estabelecidos pela Instrução Normativa nº 161, de 1º de julho de 2022, alterada pela Instrução Normativa IN nº 313, de 4 de setembro de 2024 (Brasil, 2022).

O desenvolvimento e lançamento de produtos alimentícios seguem as tendências de mercado, visando aumentar as chances de sucesso do produto e, conseqüentemente, gerar receita para as empresas. Nesse sentido, essas tendências buscam compreender os desejos e necessidades dos consumidores, que, segundo o relatório técnico Brasil *Foods Trends 2020*, são fortemente influenciadas pelas mudanças sociais, políticas e econômicas do país. O perfil de consumo também muda com o maior acesso à informação e a crescente incidência de doenças como a obesidade e aterosclerose, associadas à dieta alimentar. A predominância da

população acima dos quarenta anos e a variação na renda familiar também influenciam as tendências de mercado (ITAL, 2010; 2023).

Entre as macrotendências na alimentação para produtos cárneos, destacam-se: a) Saudabilidade e bem-estar: a elaboração de produtos segue a ideia de ‘menos é mais’, focando na redução de ingredientes como gordura e sódio; e b) Produtos *Clean label*: a tendência dos rótulos limpos visa a retirada de aditivos como fosfato e sais de nitrito e nitrato (ITAL, 2010; 2023). Vale ressaltar que a desinformação dos consumidores pode influenciar seu julgamento sobre os benefícios e malefícios do uso de aditivos. Alguns aditivos vistos como prejudiciais são, na verdade, naturais, como o corante urucum e os sais de ascorbato e eritorbato de sódio (derivados da vitamina C).

Os aditivos são ingredientes adicionados aos alimentos com a finalidade de alterar suas características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, sem o propósito de nutrir (Brasil, 2023). A reformulação de produtos cárneos visando a retirada de aditivos é um desafio, visto que o produto reformulado deve apresentar as mesmas características do produto convencional no que se refere a qualidade sensorial (aparência, textura e *flavor*), microbiológica e de estabilidade durante sua vida útil. Além disso, é crucial considerar as particularidades de cada produto e processo, o custo de produção que impacta o valor final do produto, bem como a realidade de cada país em termos de distribuição e clima. No Brasil, por exemplo, o clima tropical e a grande extensão territorial podem afetar as condições da cadeia de frio durante a distribuição e nos pontos de venda, reduzindo a vida útil dos produtos

2.2 Sais de cura em carne processada

Os sais de cura incluem nitrito de sódio ou potássio (NaNO_2 ou KNO_2) e nitrato de sódio ou potássio (NaNO_3 ou KNO_3). A maioria dos produtos cárneos, principalmente os produtos prontos para consumo (*ready-to-eat*; RTE), são obrigatoriamente curados, isto é, adicionados de sais de cura, que podem conter apenas nitrito ou uma combinação com nitrato. Desde 3.000 a.C., os sais de cura estão presentes na história da civilização humana devido à contaminação do sal utilizado para salgar carnes, composto predominantemente por cloreto de sódio (NaCl), mas contaminado por salitre (nitrato de potássio) (Milkowski *et al.*, 2010; Sindelar; Milkowski, 2012). Com a identificação e compreensão das propriedades dos sais de cura, eles começaram a ser utilizados como aditivos alimentares. Esses sais são responsáveis por gerar as características sensoriais desejáveis de cor, sabor e aroma, além de garantir a estabilidade oxidativa e microbiana dos produtos cárneos (Majou; Christieans, 2018).

Geralmente, os sais de cura são comercializados em uma mistura com cloreto de sódio (NaCl), em concentração conhecida, facilitando a manipulação, uma vez que são necessárias adições em pequenas quantidades para a elaboração de produtos cárneos. A adição de sais de cura pode ser feita através do método de cura seca ou cura úmida, dependendo do tipo de produto cárneo a ser elaborado e das características desejadas no produto. Na cura seca, os sais são friccionados sobre a superfície dos cortes ou apenas depositados sobre a carne. A equalização dos sais ocorre lentamente nas peças inteiras, dependendo do princípio de osmose. Na cura úmida, uma salmoura é preparada com os sais de cura previamente diluídos em água, permitindo uma equalização mais rápida. Esta solução salina pode ser injetada de forma intramuscular nos cortes ou os mesmos podem ser imersos na salmoura (Ramos; Fontes; Gomide, 2005).

O uso de nitrito e nitrato em produtos cárneos é aprovado pela legislação brasileira, que se baseia em referências internacionalmente reconhecidas, como o *Codex Alimentarius*, a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (*European Food Safety Authority – EFSA*) e a Agência Americana para Administração de Alimentos e Medicamentos (*US Food and Drug Administration – FDA*). A quantidade de nitrito e nitrato permitida no produto varia conforme a legislação de cada país. No Brasil, são permitidas concentrações residuais máximas de nitrito (INS 249 e INS 250) e nitrato (INS 251 e INS 252) de, respectivamente, 300 e 150 mg/kg no produto cárneo (Brasil, 20249). Na Europa, o limite máximo para nitrito residual em produtos curados não tratados termicamente é de 100 mg/kg, enquanto os tratados termicamente têm um limite de 50 mg/kg (EFSA, 2017). A legislação estabelece limites residuais porque a quantidade desses íons tende a reduzir durante o processamento e armazenamento, isto é, o teor de nitrito encontrado no produto final é inferior do que o inicialmente adicionado, devido à capacidade dessas espécies de reagirem com diferentes constituintes da carne, bem como com os ingredientes adicionados (Silva *et al.*, 2021).

O nitrato e nitrito presentes no organismo humano podem ter origem exógena, quando ingerido dos alimentos, ou endógena, presentes na saliva. O nitrato na saliva humana ajuda a promover a imunidade inata contra patógenos (Bedale; Sindelar; Milkowski, 2016). Naturalmente, nitrato e nitrito são encontrados no plasma sanguíneo humano em concentrações fisiológicas normais de aproximadamente 20 – 40 μM e 50 – 300 nM, respectivamente (Liu *et al.*, 2018), porém, seus níveis podem ser alterados de acordo com a alimentação. O nitrato está presente em muitos alimentos como vegetais e água potável (Bedale; Sindelar; Milkowski, 2016; Vlachou *et al.*, 2020). O consumo de vegetais, especialmente vegetais de folhas verdes, contribui com cerca de 80-90% do nitrato total na

dieta, sendo que a água potável (15% - 20%) e outros alimentos, como produtos de origem animal (10% - 15%), têm menor contribuição (Ma *et al.*, 2018). Em geral, um indivíduo consome aproximadamente 1,2-3,0 mg de nitrato por dia, através da ingestão de vegetais, sendo absorvido quase que em sua totalidade no duodeno e jejuno, porém cerca de 75% são excretados na urina (Ma *et al.*, 2018). De acordo com Ma *et al.* (2018), cerca de 80% - 85% do nitrito presente no organismo resulta da conversão endógena do nitrato em nitrito.

2.2.1 Química do nitrito e seu mecanismo de cura em carne

Embora seja possível adicionar sais de nitrito e nitrato na elaboração de produtos cárneos, o agente ativo de cura é o nitrito, sendo necessária primeiramente a conversão de nitrito (NO_3^-) em nitrato (NO_2^-) por bactérias nitrato redutases (Nired) presentes naturalmente na carne, como *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Lactobacillus* ou *Staphylococcus* (Honikel, 2008). Segundo a revisão recente de Majou e Christieans (2018), as proteínas de membrana dos microrganismos nitrato redutase conseguem importar o nitrato ($\text{pKa HNO}_3 = -1,6$ a 25 °C), usado como substrato para a respiração anaeróbica, e exportar nitrito ($\text{pKa HNO}_2 = 3,42$ a 25 °C) para fora da célula bacteriana. Por essa razão, os sais de cura podem ser divididos em: sais de “cura rápida” (contendo nitrito) e sais de “cura lenta” (composto por nitrito e nitrato). Em geral, sais de “cura lenta” são utilizados apenas em produtos que exigem longos períodos de processamento, como presunto cru e salames, pois o nitrato age como um reservatório de nitrito, mantendo os níveis ideais de nitrito durante o processo.

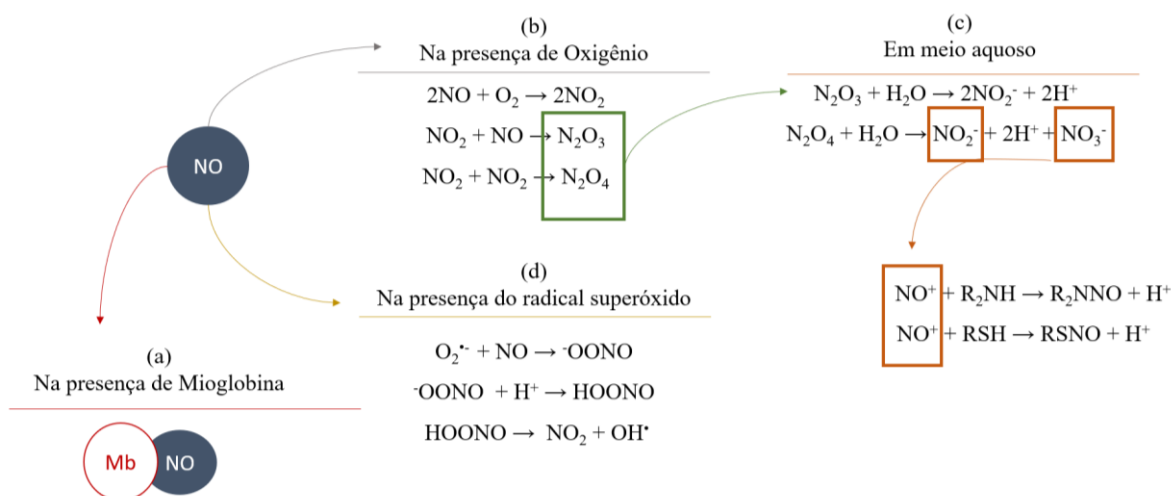
Quando o nitrito é adicionado à carne, o sal se dissolve facilmente devido à sua boa solubilidade na porção aquosa da matriz cárnea (pH entre 5,4 e 5,6). Devido ao princípio de equilíbrio químico dos ácidos fracos, a forma não dissociada (ácido nitroso; HNO_2) e dissociada (NO_2^-) do nitrito coexistem em proporções que dependem do pH do meio. Em pH 5,0, cerca de 2,5% do ácido nitroso encontra-se em sua forma não dissociada (HNO_2) (Majou; Christieans, 2018). Ainda que em pequena quantidade, o HNO_2 disponível encontra-se em equilíbrio com seu anidrido, dinitrogênio trióxido ou anidrido nitroso (N_2O_3). Em condições redutoras, na ausência de luz e oxigênio, ocorre a decomposição de N_2O_3 em dióxido de nitrogênio (NO_2) e o radical óxido nítrico (NO) (Pegg; Honikel, 2014).

De acordo com Sindelar (2006), o teor de NO produzido durante o processo de cura depende do pH, da temperatura do meio e do tempo de cura. Por exemplo, em situações em que a carne possui pH inferior a 5,6, espera-se um aumento na conversão de HNO_2 em NO. No mesmo sentido, se o pH da carne estiver acima de 5,6, espera-se uma menor produção de

NO e, conseqüentemente, uma maior concentração de nitrito residual nos produtos acabados. O NO é uma substância de baixo peso molecular ($MM = 30,01 \text{ g/mol}$) e gasosa nas condições normais de temperatura e pressão (CNT). Sua solubilidade em água é moderada ($1,9 \text{ mM}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$), sendo mais solúvel em solventes apolares, como hexano ($0,13 \text{ M}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$) (Barreto; Correia; Muscará, 2005). Por isso, em sistemas biológicos, o NO se concentra predominantemente em ambientes lipofílicos (membranas e domínios hidrofóbicos de proteínas), com solubilidade em água comparável à do oxigênio (O_2) e do dióxido de carbono (CO_2) (Barreto; Correia; Muscará, 2005; Ford; Miranda, 2020; Lim; Dedon; Deen, 2008). O NO é uma substância neutra, possuindo onze elétrons em sua camada de valência, com um elétron não emparelhado ocupando um orbital molecular de alta energia, o que lhe confere o caráter de radical livre altamente reativo (Barreto; Correia; Muscará, 2005). Além dos produtos cárneos, essa espécie é encontrada no ambiente, no organismo humano e em plantas desempenhando, papéis biológicos importantes. Também é utilizada como princípios ativos de alguns medicamentos (Yang; Huang; Li, 2012).

A espécie NO, que possui um elétron desemparelhado no orbital π^* (NO^\bullet), pode ter esse elétron removido (potencial de ionização de $9,23 \text{ eV}$), resultando na formação do cátion nitrosônio (NO^+). O NO também pode ser reduzido, formando o ânion nitroxila (NO^-), ou sofrer reações de desproporcionamento (auto-oxirredução), onde um mesmo elemento sofre oxidação e redução simultaneamente, resultando em N_2O e NO_2 (Seabra, 2006). De maneira geral, o NO possui como alvo biológico os íons de metais de transição e espécies com elétrons desemparelhados (radicais) (Lancaster *et al.*, 2008). Ele pode também reagir com substâncias simples como O_2 , e NO_2 (dióxido de nitrogênio), tióis (R-SH), e aminas (Barreto; Correia; Muscará, 2005). Os íons metálicos podem ser encontrados em metaloproteínas (que contêm metais de transição), como a hemoglobina, mioglobina e citocromo oxidase, as quais contêm ferro no grupo heme, resultando na formação de complexos nitrosil-metálicos (Barreto; Correia; Muscará, 2005) (Figura 1; a). Na presença de O_2 , o NO pode produzir o NO_2 (Figura 1; b). O NO_2 formado pode então reagir com outra molécula de NO, produzindo trióxido de dinitrogênio (N_2O_3), ou dimerizar com outro NO_2 , formando tetróxido de dinitrogênio (N_2O_4) (Barreto; Correia; Muscará, 2005).

Figura 1 – Possibilidade de reações químicas envolvendo o óxido nítrico: a), II) propagação e III) finalização.



Fonte: Da autora.

As espécies N_2O_3 e N_2O_4 podem reagir rapidamente com água, formando NO_2^- e NO_3^- (Figura 1; c). Elas são consideradas potenciais doadoras de NO^+ , que podem reagir (nitrosação) com uma grande variedade de regiões nucleofílicas presentes em biomoléculas (hidroxilas, aminas – R_2NH , ou tióis - RSH), levando à formação de nitrito, N- nitrosaminas e S-nitrosotióis, respectivamente. Nas células, os principais alvos de espécies reativas derivadas do NO são proteínas e resíduos de aminoácidos contendo cisteína e tirosina (Barreto; Correia; Muscará, 2005). Embora a espécie NO^+ não seja estável em pH neutro ou levemente ácido, esse grupo pode ser transferido para outra espécie (Lancaster *et al.*, 2008). O NO pode também reagir com $\text{O}_2^{\cdot-}$, formando ONOO^- (Figura 1; d). Em pH neutro, ONOO^- pode ser rapidamente protonado, formando ácido peroxinitroso (HONO_2), que é instável e se decompõem em NO_2 e OH^{\cdot} (Barreto; Correia; Muscará, 2005).

2.2.2 Cor da carne curada

A cor dos produtos cárneos pode ser apontada como o atributo sensorial mais relevante na escolha da compra pelo consumidor, influenciando na percepção de qualidade e segurança do produto, embora essa correlação nem sempre seja verdadeira (Furnols; Guerrero, 2014). A cor da carne e dos produtos cárneos resulta da interação do pigmento de mioglobina com a luz na superfície do alimento, ou seja, determinada pela relação entre a absorção e reflexão da luz (Gomide; Ramos; Fontes, 2017; Suman; Joseph, 2012).

A mioglobina é uma metaloproteína sarcoplasmática composta por um grupo heme, que contém uma estrutura tetrapirrólica cíclica (anel de porfirina ou hematina) e o íon ferro (grupo cromóforo). O íon ferro possui seis valências: quatro delas estão envolvidas nas ligações com o anel de porfirina, uma está ligada à proteína globina através do resíduo de histidina, e a última é responsável pela ligação com substâncias de baixo peso molecular, como água (H₂O), oxigênio (O₂), monóxido de carbono (CO) e NO (Suman; Joseph, 2012). Em geral, a capacidade do ferro de se ligar a outras substâncias depende do seu estado de oxidação (Fe⁺²; forma ferrosa / Fe⁺³, forma férrica) e de seu estado energético (*spin* alto e baixo), sendo a forma ferrosa de *spin* baixo a mais adequada (Gomide; Ramos; Fontes, 2017). O pigmento de mioglobina pode se apresentar basicamente em três formas principais: deoximioglobina (DMb; Fe⁺², *spin* alto, sem gás ligante), oximioglobina (OMb; Fe⁺², *spin* baixo, com oxigênio ligante) e metamioglobina (MMb; Fe⁺³, sem gás ligante). Esses pigmentos coexistem em diferentes proporções, dependendo das condições do ambiente, como a pressão parcial de oxigênio e a presença de agentes oxidantes ou redutores, sendo que a cor observada correspondente ao pigmento em maior proporção (maior que 40%) (Gomide; Ramos; Fontes, 2017). De uma maneira geral, o teor de pigmento e seu estado químico são capazes de alterar a cor percebida. No músculo *in vivo* (pH entre 6,9 e 7,2), o pigmento de mioglobina é responsável por armazenar oxigênio (oximioglobina, OMb), estabilizado pela ligação de hidrogênio do anel imidazol (pKa próximo a 6,0; desprotonado) da histidina distal. O pH de carne dito normal (entre 5,8 e 6,2) é elemento chave no processo de cura, visto que, quando o grupo imidazol encontra-se predominantemente em sua forma protonada, a afinidade pelo oxigênio diminui. Dessa forma, o sítio de ligação do ferro torna-se mais facilmente disponível para a ligação com o NO (Jo *et al.*, 2020; Majou; Christieans, 2018).

Após a adição dos sais de cura à carne, ela muda de cor vermelho brilhante (OMb) ou vermelho púrpura (DMb) para marrom, uma cor característica do pigmento transiente e oxidado de metamioglobina (MMb). Em seguida, o ferro da MMb é reduzido (Fe⁺³ → Fe⁺²) por agentes redutores: 1) processo natural em carnes frescas, como por exemplo, a ação da atividade do complexo enzimático MRA (*Metamyoglobin Reductase Activity*), que é considerado um processo lento; e 2) atividade redutora de sais do ácido ascórbico e eritórbito (ascorbato e eritorbato), capazes de doar elétrons para o íon Fe⁺³, um processo mais rápido. Por essa razão, os sais de ascorbato e eritorbato são classificados como agentes aceleradores de cura e são frequentemente incorporados nas práticas de cura, reduzindo significativamente o tempo necessário para o desenvolvimento da cor da carne curada (Jo *et al.*, 2020; Majou; Christieans, 2018; Parthasarathy; Bryan, 2014). A redução do ferro associada à presença de

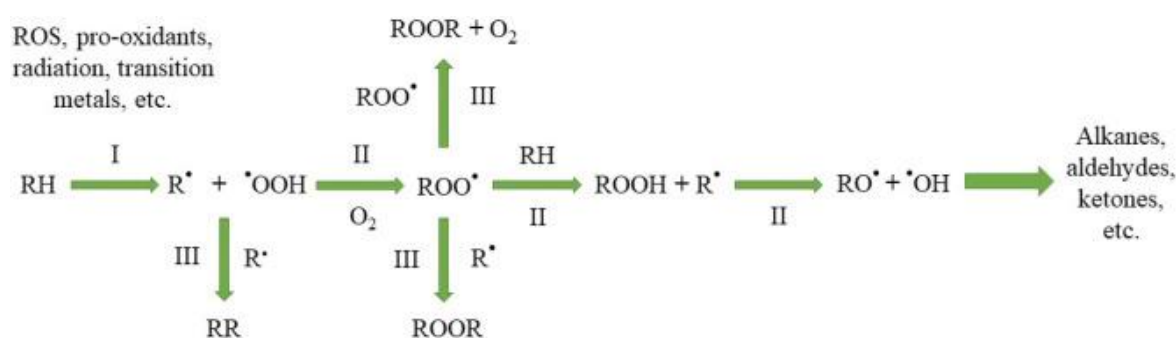
NO provoca uma segunda transformação na cor da carne, passando de marrom para rósea avermelhada (pigmento nitrosomioglobina; NOMb), característico de produtos cárneos curados crus, ou para uma cor rósea (pigmento nitrosohemocromo; NOHemo) em produtos cozidos, devido à desnaturação da proteína globina (Gomide; Ramos; Fontes, 2017; Suman; Joseph, 2012). Para obter a cor característica (rósea) de produtos cárneos curados, geralmente são adicionados entre 50 a 75 mg/kg de NO_2^- (Dutra *et al.*, 2017). No entanto, de acordo com Sindelar e Milkowski (2012), devido à redução de NO_2^- durante o processamento e armazenamento, apenas cerca de 10 a 20% do nitrito permanece no produto como nitrito residual. Por isso, para manter a cor desejada durante o armazenamento, acredita-se que sejam necessárias concentrações residuais de nitrito entre 10 e 15 mg/kg. A exposição do pigmento ao oxigênio e à luz resulta no desbotamento da cor curada (Andersen, Bertelsen, Boegh-Soerensen, Shek & Skibsted, 1988), embora a presença de quantidade suficiente de nitrito residual e compostos redutores diminua esse processo.

2.2.3 Atividade antioxidante

Os produtos cárneos estão sujeitos a deterioração durante o processamento e armazenamento devido a ações microbianas ou bioquímicas que são capazes de diminuir a vida útil, modificar as características sensoriais e formar substâncias potencialmente tóxicas para o consumidor (Hadidi *et al.*, 2022). Durante o processamento, a deterioração bioquímica via oxidação de lipídios insaturados, bem como de proteínas, é particularmente relevante (Ma *et al.*, 2021). A oxidação envolve a reação entre radicais, conhecidos como espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species*, ROS) e, ou, espécies reativas de nitrogênio (*Reactive Nitrogen Species*, RNS), com macromoléculas como lipídeos e proteínas. No músculo vivo e em condições fisiológicas normais, os radicais formados são facilmente eliminados através da ação enzimática, mantendo um equilíbrio dinâmico. Porém, após o abate e, consequentemente, a conversão do músculo em carne, as enzimas antioxidantes endógenas (catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase) são rapidamente inativadas, resultando no desequilíbrio entre agentes pró-oxidantes e antioxidantes, também conhecido como estresse oxidativo, que leva ao acúmulo de radicais livres (Ma *et al.*, 2021). De acordo com Domínguez *et al.* (2019), a oxidação lipídica ocorre por três vias principais: auto-oxidação, oxidação catalisada por enzimas e foto-oxidação. Dentre estas, a auto-oxidação é a via mais importante de oxidação lipídica nos produtos cárneos, sendo resultado de uma série de reações em cadeia que afetam ácidos graxos insaturados, tanto livres quanto esterificados.

As reações de auto-oxidação podem ser divididas em três etapas (Figura 2): iniciação, propagação e término. A etapa de iniciação (I) ocorre através da reação entre o oxigênio, na forma de radical, e um ácido graxo insaturado (RH), resultando na retirada de um hidrogênio do carbono adjacente à ligação dupla e formação do radical alquil (R^{\bullet}). O radical alquil tende a ser estabilizado por um rearranjo da ligação dupla, resultando em dienos ou trienos conjugados (Domínguez *et al.*, 2019; Hadidi *et al.*, 2022).

Figura 2 – Mecanismo geral da oxidação lipídica: I) iniciação, II) propagação e III) finalização.



Fonte: Hadidi *et al.* (2022)

Para que a reação entre oxigênio e ácido graxo ocorra, o oxigênio (no estado eletrônico triplete) deve ser ativado, formando oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) ou espécies reativas de oxigênio (ROS), como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e radical hidroxila (OH^{\bullet}), sendo esse processo catalisado pela presença de uma fonte de energia (temperatura e, ou, luz) e, ou, pela presença de metais de transição (Domínguez *et al.*, 2019). A carne contém ferro (heme e livre), uma espécie capaz de catalisar as reações de oxidação de produtos cárneos. Ademais, as condições de processamento de cada produto podem favorecer ou não as reações de oxidação. A oxidação lipídica tende a ser favorecida em processos como: moagem (devido à incorporação do oxigênio), exposição à luz e temperaturas acima de 4 °C durante armazenamento e, ou, processamento, bem como o cozimento. A etapa de propagação (II, Figura 2) consiste na ampliação da formação de radicais, onde o radical alquil (R^{\bullet}) reage com os radicais de oxigênio (HOO^{\bullet} , hidroperóxil), formando o radical peroxi (ROO^{\bullet}), que é altamente reativo e capaz de abstrair o hidrogênio de outros lipídeos. Esse processo resulta na formação de um hidroperóxido (ROOH) e um novo radical alquil (R^{\bullet}) (Hadidi *et al.*, 2022). Uma vez iniciada com a formação do radical alquil, as reações continuam em cadeia até que ocorra o esgotamento dos ácidos graxos insaturados e das espécies reativas de oxigênio. De

acordo com [Domínguez et al. \(2019\)](#), os hidroperóxidos formados durante a propagação podem se decompor em novos radicais (hidroxila, peroxi e alcoxi), atuando como iniciadores da autooxidação, seja pela interação entre dois hidroperóxidos ou pela presença de ferro (heme e não-heme). A etapa de terminação (III, Figura 2) caracteriza-se pela reação entre radicais ou entre radicais e antioxidantes, dando origem a produtos não radicais através do processo de transferência de átomos ([Domínguez et al., 2019](#)).

Dentre os possíveis produtos finais da oxidação lipídica estão os hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas e ésteres, que podem ser voláteis, influenciando positivamente ou negativamente na geração do sabor e aroma do produto a depender do grau da extensão das reações ([Hadidi et al., 2022](#)). Produtos mais oxidados tendem a ser caracterizados sensorialmente pelo aroma e sabor de ranço (rancidez oxidativa). A extensão das reações oxidativas depende do teor de gordura e da composição dos ácidos graxos da matriz cárnea, da temperatura e tempo de armazenamento dos produtos, da concentração de oxigênio, da exposição à luz; e da adição de antioxidantes e, ou, agentes redutores ([Sindelar; Milkowski, 2011](#)). De uma maneira geral, produtos com maior teor de gordura e maior fração de ácidos graxos insaturados, bem como submetidos à temperatura ambiente e de cozimento, e expostos à luz e oxigênio, são mais susceptíveis à oxidação lipídica.

De acordo com [Sies e Stahl \(1995\)](#), substâncias antioxidantes são aquelas que, mesmo em baixas concentrações em comparação ao substrato oxidável, são capazes de retardar ou impedir de forma eficaz a oxidação do substrato. Produtos cárneos curados geralmente apresentam menores níveis de oxidação lipídica em relação aos não curados, pois, quando o nitrito é adicionado a sistemas contendo ferro, (um pró-oxidante natural), consegue reduzir substancialmente as taxas de oxidação do meio. Os mecanismos que envolvem a ação antioxidante do nitrito em produtos cárneos são: 1) ligação e estabilização do ferro heme de pigmentos da carne durante o processo de cura, limitando sua atividade pró-oxidante e reduzindo a quantidade de ferro livre liberada durante o cozimento; 2) quelante de metais livres; 3) sequestro de oxigênio e outras espécies reativas de oxigênio; 4) como radical livre, pode interromper a auto-oxidação lipídica estabilizando lipídios insaturados (fosfolipídios) ([Alahakoon et al., 2015; Parthasarathy; Bryan, 2012; Pegg; Shahidi, 2006](#)).

A oxidação proteica ocorre de forma similar à oxidação lipídica, isto é, é resultando de uma série de reações em cadeia mediadas por radicais livres, que envolvem as fases de iniciação, propagação e terminação. Porém, de acordo com [Hadidi et al. \(2022\)](#), a oxidação das proteínas é um processo bem mais complexo e lento do ponto de vista cinético em comparação com a oxidação lipídica, que resulta em uma maior variedade de produtos e

tendem a ser menos perceptíveis sensorialmente (sabor e aroma) pelos consumidores. Em geral, as modificações das proteínas ocorrem na composição dos aminoácidos, polimerização da proteína e, ou, perda da atividade proteolítica, sendo alguns aminoácidos mais propensos à oxidação, como: arginina, cisteína, histidina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, triptofano e tirosina (Domingues *et al.*, 2021). As proteínas podem ser oxidadas pelo ataque direto de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio ou pela indução indireta causada por subprodutos oxidativos de açúcares e lipídios. A oxidação de proteínas pode resultar em modificações na textura e redução na qualidade nutricional da carne e de produtos cárneos devido à diminuição da biodisponibilidade, digestibilidade e solubilidade das proteínas. A oxidação também pode alterar a cor dos produtos devido a modificações na estrutura química do pigmento de mioglobina (Hadidi *et al.*, 2022).

2.2.4 Desenvolvimento do *flavor*

O sabor de um alimento envolve tanto os estímulos gustativos quanto os olfativos, sendo resultado da combinação entre o gosto (percebido pela língua) e o aroma (percebido pelo olfato), que é reflexo da característica de compostos voláteis presentes no alimento. A combinação desses sentidos à outras sensações, como textura e sensação na boca gera uma experiência completa proporcionada pelo alimento que pode ser entendida como *flavor* (Lawless, 2010). Sabe-se que o nitrito influencia indiretamente o sabor e a textura dos produtos (Dong *et al.*, 2007).

Nos produtos cárneos, acredita-se que a adição de sais de cura é importante na indução e na manutenção do *flavor*, porém os mecanismos exatos ainda não sejam totalmente conhecidos, visto que envolve a interação de muitos fatores como a matéria-prima, ingredientes, presença de aditivos (sal e sais de cura) e o processo de fabricação (Flores, 2018). A hipótese mais aceita é que o nitrito retarda a formação de produtos indesejáveis, como os compostos carbonílicos (por exemplo, o hexanal), resultantes da oxidação lipídica e, conseqüentemente, prolongando a vida útil dos produtos (Jo *et al.*, 2020; Yotsuyanagi *et al.*, 2016). A oxidação lipídica e a geração de sabores aquecidos tentem a desenvolver-se durante o aquecimento, originando o sabor de requentado (*warmed-over flavor*) (Parthasarathy; Bryan, 2012).

Segundo Flores (2018), os aldeídos resultantes da oxidação lipídica são capazes de mascarar outros compostos produzidos em menores concentrações, como os compostos sulfurados, que compõem as características dos produtos cárneos. Por exemplo, o 2-metil-3-

(metilditio), produzido pela degradação da tiamina (vitamina B1), que é um composto chave para o aroma de presunto cozido (Thomas *et al.*, 2014). Portanto, embora os sais de cura não resultem na formação de um composto específico, que confere o “odor curado”, a presença desses aditivos estabelece um equilíbrio na percepção do odor. Também é sugerido que os sais de cura sejam capazes de induzir a formação do aldeído de Strecker, que é oriundo da degradação de aminoácidos por dicarbonílicos a partir da reação de Maillard (Flores, 2018; Jo *et al.*, 2020;). Ademais, as reações de nitrosação de álcoois e fenóis também são consideradas contribuintes para o sabor de carne curada (Bedale; Sindelar; Milkowski, 2016).

2.2.5 Atividade antimicrobiana: *Clostridium botulinum*

A carne contém em sua composição nutrientes que favorecem a multiplicação de microrganismos, que quando em condições ideais, podem ser desejáveis ou indesejáveis nos produtos. Microrganismos desejáveis geralmente contribuem para gerar as características sensoriais do produto, como ocorre no processo fermentativo. Já os indesejáveis podem causar deterioração ou doenças aos consumidores (Huang *et al.*, 2020; Reckem *et al.*, 2021). A microbiota presente no produto cárneo é influenciada pela qualidade e pelo tipo de carne utilizada, manejo antes e após o abate, resfriamento da carcaça, condições sanitárias de manipulação, técnicas de processamento, tipo de embalagem e condições de distribuição e estocagem (Reckem *et al.*, 2021).

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) são de preocupação médica, causadas por agentes biológicos, químicos ou físicos, e que se manifestam como infecções, quando os micro-organismos vivos são prejudiciais à saúde, como *Salmonella* e *Shigella*, são prejudiciais à saúde; ou em forma de intoxicações, quando toxinas produzidas por microorganismos são ingeridas, como no caso da toxina do *Clostridium botulinum* responsável pelo botulismo. Dentre as bactérias deteriorantes em carne estão aquelas do gênero *Pseudomonas*, bem como a *Brochothrix thermosphacta*, *Carnobacterium divergen*, *Lactococcus piscium*, *Leuconostoc carnosum*, e *Clostridium sporogenes* (de Alcântara; Morais; Souza, 2021; Reckem *et al.*, 2021). O nitrito adicionado a produtos cárneos atua como um importante agente bacteriostático e bactericida, prevenindo ou controlando a multiplicação de várias bactérias, como *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Pseudomonas spp.* e *Clostridium spp.*, porém, com ênfase especial no gênero *Clostridium* (Majou; Christieans, 2018).

A família *Clostridiaceae* é composta por 11 gêneros de bactérias, dentre eles o gênero *Clostridium*. As bactérias desse gênero são bacilos mesófilos, Gram-positivos, anaeróbios estritos e formadores de esporos (endósporos). A formação de endósporo está relacionada à exigência anaeróbia do microrganismo, que possui um ciclo de vida complexo e estritamente regulamentado, resultando em alta resistência (Dworkin, 2006; Wiegel, 2015). O endósporo é uma célula especial onde o citoplasma está em estado de completa dormência e o núcleo parcialmente desidratado, o que permitindo a sobrevivência da bactéria em situações de estresses ambiental (Dworkin, 2006; Wiegel, 2015). As espécies de *Clostridium* causadoras de doenças produzem toxinas que podem ser classificadas em: neurotoxinas, que atuam na função neuromuscular sem causar lesão tecidual (*C. botulinum* e *C. tetani*); histolísticas, capazes de provocar lesão tecidual no músculo e no fígado (alguns tipos de *C. perfringens*); e enterotoxinas, que provocam lesão inflamatória no trato gastrointestinal (alguns tipos do *C. perfringens* e *C. difficile*) (Dworkin, 2006). As cepas de *C. botulinum*, produtoras de neurotoxinas, dividem-se em quatro grupos distintos (de I a IV), sendo que os grupos I e II capazes de desenvolver a doença botulismo em humanos por origem alimentar e outras formas de botulismo humano; o grupo III está associado ao botulismo em animais; e o grupo IV ainda não foi fortemente associado ao botulismo (Peck; Vliet, 2016). Além disso, na literatura também é relatado que as cepas de *C. baratii* e *C. butyricum* também são capazes de produzir a neurotoxina botulínica e estão associadas ao botulismo em humanos (Hill *et al.*, 2007; Peck; Vliet, 2016).

O *C. botulinum* produz oito tipos de neurotoxinas: A, B, C1, C2, D, E, F e G (Hatheway, 1990; Nigam; Nigam, 2010). A doença botulismo em humanos está relacionada aos sorotipos toxigênicos A, B, E e F (neurotoxinas), sendo A e B os mais recorrentes. Em animais como os bovinos, o botulismo é causado pela ingestão de neurotoxinas do tipo C ou D (Proverbio *et al.*, 2016). A toxina botulínica é uma proteína (Hill *et al.*, 2007) que cliva as proteínas envolvidas na fusão das vesículas sinápticas com a membrana plasmática (SNARE – *soluble NSF attachment receptor*), impossibilitando a liberação de acetilcolina na placa motora, o que impede a transmissão e interiorização do estímulo nervoso para a célula muscular, promovendo uma paralisia flácida que pode levar a morte (Hatheway, 1990; Nigam; Nigam, 2010; Proverbio *et al.*, 2016). Estima-se que a intoxicação pode ocorrer com o consumo de apenas 50 ng de neurotoxina (Hill *et al.*, 2007).

As condições ideais para a multiplicação de cepas de *C. botulinum* incluem um meio anaeróbico, pH > 4,5, baixa concentração de sal e açúcar; e disponibilidade adequada de nutrientes (Proverbio *et al.*, 2016). Essas cepas são mesofílicas, com temperatura ótima de

crescimento de 35-37 °C (Merialdi *et al.*, 2016). Apenas a bactéria em sua forma vegetativa (de crescimento) é capaz de produzir a toxina botulínica, que é termolábil (85 °C/5 minutos). Porém, a forma esporulada do *Clostridium* é resistente a temperaturas de até 120 °C/15 minutos e pode retornar ao ciclo vegetativo, produzindo posteriormente novas toxinas (Proverbio *et al.*, 2016).

No que se refere ao botulismo de origem alimentar, os alimentos em conservas caseiras, principalmente, de vegetais, peixes e carnes enlatadas, são mais susceptíveis ao desenvolvimento desse microrganismo (Merialdi *et al.*, 2016). Devido à resistência dos esporos de *C. botulinum* às temperaturas convencionais utilizadas na indústria de alimentos, seu amplo espectro de crescimento e sua virulência, produtos cárneos industriais armazenados à vácuo recebem a adição de sais de cura, visando a segurança alimentar contra esse patógeno. No entanto, segundo Majou e Christieans (2018), a ação dos sais de cura sobre as bactérias depende do pH, da temperatura, das concentrações de nitrato ou nitrito, da presença ou ausência de aceleradores de cura como cloreto de sódio ou ascorbato e eritorbato de sódio, do efeito inibitório da concentração de ferro e da carga bacteriana inicial de deterioração.

Acredita-se que os sais de cura atuem inibindo a enzima metabólica aldolase (Weiss *et al.*, 2010) e as enzimas ferro-dependentes reponsáveis pela produção de energia (ATP) da bactéria em seu estágio de crescimento, como a piruvato-ferrodoxina oxidorreductase, ferrodoxina e hidrogenase, inibindo a germinação dos esporos. Ademais, a formação de substâncias como NO, ONOO⁻ e os nitrosotióis (R-SNO) é sugerida como agentes potenciais na degradação do material genético da bactéria (Majou; Christieans, 2018). Durante o processamento, para assegurar a ação bacteriostática contra o *C. botulinum*, são adicionadas concentrações de nitrito iguais ou superiores a 150 mg/kg (Dutra *et al.*, 2016). Concentrações residuais de nitrito entre 40 e 80 mg/kg são necessárias para prevenir a formação de esporos de *C. botulinum* em produtos cárneos (Sindelar; Milkowski, 2012).

Durante o processamento dos alimentos, os riscos associados às cepas dos grupos I e II de *C. botulinum* variam significativamente. As cepas pertencentes ao grupo I são proteolíticas e mesofílicas, com temperatura mínima de crescimento de 10 – 12 °C e máxima de 45 - 50 °C, demonstrando maior resistência ao calor. Por essa razão, tendem a se desenvolver quando os processos térmicos não são adequados e em condições de baixa acidez, sendo mais recorrente em processos de fabricações caseiras (Diao; André; Membre, 2014; Merialdi *et al.*, 2016; Peck; van Vliet, 2016). Em contraste, as cepas do grupo II não são proteolíticas, são bactérias psicrotróficas, com temperatura mínima de crescimento de 3 °C, formando esporos de resistência moderada ao calor e capazes de fermentar carboidratos.

Assim, as cepas do grupo II, por crescerem em temperaturas refrigeração, representam um risco maior à segurança de alimentos processados industrialmente (Merialdi *et al.* 2016; Peck; van Vliet, 2016). As cepas de *C. botulinum* do grupo I possuem até três genes de neurotoxinas, que podem produzir as neurotoxinas do tipo A, B e, ou, F. Já as cepas do grupo II possuem apenas um gene de neurotoxina, capaz de formar neurotoxinas dos tipos B, E ou F (Peck; van Vliet, 2016).

2.3 Relação entre o consumo de produtos cárneos e a saúde

O NO desempenha funções importantes no organismo humano, ao atuar como mediador celular e regulador de várias funções fisiológicas. Sendo fundamental no processo de dilatação dos vasos sanguíneos, o que contribui para a regulação da pressão arterial e o aumento do fluxo sanguíneo. Além disso, o NO é essencial na comunicação entre células, por iniciar respostas imunológicas e a neurotransmissão. Sua capacidade de atuar como um sinalizador em diferentes sistemas do corpo o torna vital para a manutenção da saúde cardiovascular e do funcionamento adequado dos órgãos. Nesse sentido, é avaliado como medicamento para o tratamento de doenças (Martina *et al.*, 2012).

Embora a oferta de produtos cárneos proporcione aos consumidores proteínas de alto valor biológico, a presença de algumas espécies ou precursores de espécies nocivas ao organismo humano gera preocupações sobre os possíveis malefícios à saúde. Em geral, são associadas a possíveis modificações no metabolismo humano, substâncias formadas pela adição de ingredientes como sais de nitrito, gerando as N-nitrosaminas; técnicas de processamento como a defumação, gerando hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs); e aquecimento durante ou após o processamento, resultando em gerando produtos de glicosilação avançada (AGEs) (Yang *et al.*, 2021), benzopireno, aminas heterocíclicas e acrilamida (Jagerstad; Skog, 2005). Dentre esses compostos, podem ser considerados como de maior responsabilidade da indústria de alimentos aqueles oriundos da adição intencional de nitrito e do processo de defumação. Contudo, propostas alternativas à defumação tradicional, como a aplicação de fumaça em pó e líquida livre de HPAs, já foram validadas e estão disponíveis no mercado.

Em um relatório da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IACR), juntamente com a Organização Mundial de Saúde (OMS), classificou as carnes processadas como carcinógenos do grupo 1 do IARC; isto é, o consumo desses alimentos pode predispor ao desenvolvimento de câncer devido à formação de N-nitrosaminas (IACR, 2015). As N-

nitrosaminas são uma classe de compostos formada por um grupo nitroso (-NOO) ligado a uma amina, que pode apresentar diferentes radicais R1 e R2, geralmente hidrocarbonetos, o resulta em uma grande variedade de compostos. As N-nitrosaminas podem ser classificadas como aquelas voláteis ou não voláteis, dependendo de seu ponto de ebulição. São consideradas voláteis quando podem ser destiladas de soluções fortes de sais ou hidróxido de sódio com recuperação mínima de 80% (Bonefacie *et al.*, 2021). Entre as N-nitrosaminas estudadas, apenas 18% de seus derivados são consideradas não carcinogênicas (Thresher *et al.*, 2020). A ausência de potencial de carcinogênico de algumas N-nitrosaminas é atribuída à sua estrutura química, tendo em vista que, espécies com radicais (R1 e R2) de alto peso molecular, ou seja, extensas cadeias carbônicas extensas, são menos susceptíveis a metabolização e, conseqüentemente, a liberação do radical diazônio devido ao impedimento estérico da molécula. Por isso, são atribuídas as N-nitrosaminas de menor peso molecular, como a N-nitroso dimetil amina (NDMA) e a N-nitroso dietil amina (NDEA), têm maior potencial mutagênico (López-Rodríguez *et al.*, 2020).

As N-nitrosaminas são formadas a partir da reação entre uma espécie doadora do grupo nitroso, com aminas secundárias ou terciárias, sendo esse processo favorecido em condições ácidas (pH próximo a 3,0) (Bryan *et al.*, 2012; Sindelar; Milkowski, 2012; Thresher *et al.*, 2020). As N-nitrosaminas derivadas de aminas primárias são instáveis e sofrem desaminação, resultando na formação de uma amina primária e um álcool (Lancaster *et al.*, 2008). Embora essa rota seja a mais comum, as N-nitrosaminas também podem se formar pela redução de compostos que já contêm o grupo nitro e pela oxidação de hidrazinhas e hidrazonas (López-Rodríguez *et al.*, 2020).

Segundo López-Rodríguez *et al.* (2020), uma vez presentes no organismo humano, as N-nitrosaminas sofrem metabolização enzimática, produzindo o radical diazônio ($R=N=N$), que é um eletrófilo muito reativo, capaz de reagir com as macromoléculas celulares, como as bases nitrogenadas (espécies nucleofílicas) presentes no ácido desoxirribonucleico (DNA). As lesões no DNA podem ser revertidas por enzimas especializadas que regeneram a região afetada da macromolécula, mas também podem ser permanentes, transmitindo modificações genéticas às futuras gerações celulares e resultando em mutações que podem dar origem ao câncer. Nesse sentido, as nitrosaminas aumentam significativamente o potencial de desenvolvimento de câncer (López-Rodríguez *et al.*, 2020; Thresher *et al.*, 2020).

As nitrosaminas podem ser encontradas em água, em alimentos e bebidas de origem animal e vegetal, cigarros, pesticidas, cosméticos (Gushgari; Halden, 2018; Li *et al.*, 2021), e alguns medicamentos (Parr; Joseph, 2019). Em 2020, uma grande parcela da população

brasileira tomou conhecimento dos efeitos das carcinogênicos das N-nitrosaminas em função da grande repercussão nas mídias sobre a retirada do mercado e suspensão do uso do medicamento cloridrato de ranitidina pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Essas medidas foram tomadas porque esse medicamento apresentava concentrações de nitrosaminas acima do limite aceitável. A ranitidina era amplamente utilizada para evitar complicações gástricas, mas que continha na estrutura do Insumo Farmacêutico Ativo (IFA), ou seja, mas seu princípio ativo continha uma amina terciária e um agente de nitrosação, essenciais para a produção das nitrosaminas. Assim, durante o período de validade do medicamento, havia a degradação do IFA e a produção das N-nitrosaminas (Giménez-Campillo *et al.*, 2021). Na indústria farmacêutica, tem sido discutida a abordagem “*less than lifetime*”, que propõe diferentes limites aceitáveis de substâncias com potencial carcinogênico de acordo com o grau de exposição, considerando o uso contínuo ou temporário de medicamentos (ICH M7, 2018).

O nitrito e nitrato são substâncias potencialmente doadoras de anidro nitroso (N_2O_3), que quando associadas a presença de amins podem produzir N-nitrosaminas. Em geral, as N-nitrosaminas podem ser formados no alimento durante o processamento em condições de altas temperaturas e, ou durante a digestão, onde se tem condições mais ácidas (Kanner *et al.*, 2019; Ning *et al.*, 2019; Shpaizer *et al.*, 2018; Thresher *et al.*, 2020). Como apresentado, a ingestão e produção de N-nitrosaminas tem múltiplas origens, o que ressalta a necessidade de mais estudos, especialmente sobre os alimentos. Há recomendações preventiva para que as pessoas minimizem o consumo de alimentos como os produtos cárneos curados e demais fontes reconhecidas de N-nitrosaminas. Em resposta, a indústria tem buscado alternativas para reduzir a formação desses compostos, como por exemplo a substituição de nitrito e nitrato em produtos cárneos. Porém, vale ressaltar que a discussão sobre a saúde de um indivíduo é muito mais complexa, sendo influenciada por uma combinação de fatores, incluindo a dieta, a prática de exercícios físicos e a predisposição genética.

2.4 Alternativas à adição de sais de cura

Tendo em vista a incontestável necessidade de retirar parcial ou totalmente os sais de cura das formulações dos produtos cárneos convencionais diferentes propostas de substituição e aplicação de técnicas foram estudadas. Alguns estudos foram conduzidos 1) visando a obtenção de cor curada similar com uso de agentes corantes (Kausar-ul-Alam *et al.*, 2021; Yu; Wu; Zhang, 2015); 2) utilizando técnicas de biopreservação (controle da microbiota e, ou uso

de bacteriocinas; uso de ácidos orgânicos, aplicação de óleos e extratos vegetais) (Barcenilla *et al.*, 2022; Huang *et al.*, 2020); 3) aplicando de diferentes tecnologias não térmicas (como irradiação, plasma frio, alta pressão e ultrassom); e a combinação de diferentes propostas. Para além dessas técnicas, também têm sido discutido o uso de fontes naturais de nitrato (Guimarães *et al.*, 2021). Recentemente, o uso de carreadores de óxido nítrico também foi proposto como uma nova classe de substitutos aos sais de cura (Shpaizer; Kanner; Tirosh, 2021; Kanner *et al.*, 2019). Vale ressaltar que, embora inúmeras pesquisas tenham sido realizadas, ainda não se tem um substituto comercial que garanta as mesmas características do nitrito de sódio e ofereça segurança contra a formação de nitrosaminas.

2.4.1 Uso de corantes alimentares

Embora o nitrito de sódio gere a cor curada desejada em produtos cárneos, seu uso pode ser frequentemente associado a adição de corantes alimentícios, principalmente em produtos cozidos. Essa prática é regulamentada e praticada por muitas indústrias afim de garantir a uniformidade e padronização da cor, além de auxiliar na manutenção da mesma durante o período de armazenamento. Por isso, o uso de alguns corantes é permitido pelas agências de segurança alimentar em muitos países.

Os corantes podem ser classificados em naturais ou sintéticos, ou quanto a sua origem ou método de produção. São entendidos como corantes naturais aqueles obtidos por plantas ou microrganismos ou insetos, como o corante carmin obtido a partir de cochonilhas (insetos); o corante urucum derivado de sementes de urucum (*Bixa orellana L.*); e a inoculação do fungo *Monascus ruber*, que também apresenta atividade antioxidante (Yu; Wu; Zhang, 2015). Já os corantes sintéticos podem ser compreendidos como aqueles sintetizados em laboratório, como o vermelho allura (INS 129). De acordo com Castro *et al.* (2021) os corantes sintéticos e naturais apresentam vantagens e desvantagens que devem ser consideradas. Segundo esses autores, de uma maneira geral, os corantes sintéticos tendem a apresentar alta estabilidade frente a luz, oxigênio, calor e pH; bem como uniformidade; poder corante; ausência de contaminação microbiológica e custo de produção relativamente baixo. Contudo, o uso de aditivos sintéticos tem reduzido gradualmente devido aos seus potenciais danos à saúde e a mudança no perfil de consumo das pessoas, buscando por produtos com menor conteúdo ou ausência de aditivos sintéticos. O uso de corantes naturais é interessante porque além de promover a coloração podem ser capazes de promover efeitos funcionais e de conservação. Além disso, essa estratégia tende a ser mais sustentável, já que possui como

matéria prima os subprodutos ou resíduos comestíveis de cascas de vegetais e vegetais sem valor comercial, por exemplo (Czech-Zaľubská *et al.*, 2023).

Checa-Zaľubská *et al.* (2023) avaliaram rótulos de diferentes produtos cárneos poloneses quanto ao uso de corantes. Segundo esses autores, dentre os corantes comerciais têm-se como mais comuns o corante carmim, extrato de cochonilha, extrato de páprica, betanina, caramelo e bixina; com predominância em produtos de salsicharia. De uma maneira geral, a proposta de uso de corantes em produtos cárneos se enquadra na possibilidade de substituição parcial de nitrito; ou substituição total quando associada a outras técnicas.

2.4.2 Técnicas de biopreservação

O uso dos agentes biopreservativos em carne e produtos cárneos visa principalmente a segurança alimentar contra microrganismos deteriorantes e patógenos, seja substituindo alguma técnica de conservação ou compondo a tecnologia de obstáculos (Barcenilla *et al.*, 2022; Nikodinoska *et al.*, 2019), podendo também minimizar a oxidação de lipídios e estabilizar a cor dos alimentos (Barcenilla *et al.* 2022; Huang *et al.*, 2020; Pisoschi *et al.*, 2018; Wakamatsu *et al.*, 2020). Consistem em técnicas de biopreservação: 1) a aplicação de culturas microbianas atuando diretamente através da competição por nutrientes, espaço, e, ou indiretamente através da produção de compostos inibitórios (metabólitos primários ou secundários), como bacteriocinas, ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e enzimas (Pedonese *et al.*, 2020); 2) a aplicação direta de metabólitos, primários ou secundários (Barcenilla *et al.*, 2022; Huang *et al.*, 2020); e 3) a aplicação de metabólitos derivados de plantas, como uso de extratos ou óleos vegetais (Barcenilla *et al.*, 2022; Huang *et al.*, 2020).

2.4.2.1. Bacteriocinas

As bacteriocinas são metabólitos que apresentam em sua composição peptídios ou proteínas que variam entre si de acordo a composição de aminoácidos, resultando em propriedades bioquímicas específicas, bem como a atividade antimicrobiana e modo de ação (Barcenilla *et al.*, 2022; Huang *et al.*, 2020). São reconhecidamente bacteriocinas os metabólitos primários ou secundários, como a nisinas, pediocinas, lacticinas, lactococinas, leuconocinas, plantaricinas, enterocinas, carnobacteriocinas, dentre outras. Em geral, as bacteriocinas são incolores, inodoras e insípidas (Woraprayote *et al.*, 2016). Em geral, as essas bacteriocinas apresentam sensibilidade a enzimas proteolíticas, e sua ação dependente

de condições do meio como pH, da temperatura e da natureza do substrato (Woraprayote *et al.*, 2016).

As principais abordagens de bacteriocinas em carne e produtos cárneos são: inoculação direta de cepas de bactérias produtoras de bacteriocinas como cultura starter ou cultura protetora; aplicação direta da bacteriocina como aditivo alimentar, após sua purificação; aplicação da bacteriocina purificada na embalagem do alimento (Woraprayote *et al.*, 2016); encapsulação das bacteriocinas (Kaur; Kaur, 2021). As bactérias podem ser aplicadas em sua forma fresca ou liofilizada; diretamente a massa de um produto cárneo ou através de pulverização superficial sobre produtos frescos ou acabados (Barcenilla *et al.*, 2022).

Segundo Kalschne *et al.* (2014) a adição direta de nisina em presunto fatiado e embalado à vácuo é capaz de reduzir de 2 a 3 ciclos log durante o armazenamento refrigerado (60 dias) em relação ao produto cárneo não adicionado de nisina. Nos estudos de Kumar *et al.* (2017) foi concluído que a combinação de pediocina produzida por *Pediococcus pentosaceus* e *Murraya koenigii* em carne emulsionada refrigerada possui atividade antilisterial e antioxidante comparável a formulação tradicional com uso de nitrito, ademais não foram verificadas alterações nos parâmetros de cor e estabilidade da emulsão. Segundo Nieto-Lozano *et al.* (2010) a aplicação de pediocina ou do microrganismo (*Pediococcus acidilactici*) produtor dessa bacteriocina pode ser uma estratégia viável para inibir cepas de *Listeria monocytogenes* e de *Clostridium perfringens* em linguiças de fermentadas. Os principais mecanismos de ação dos bacteriocinas contra microrganismos indesejáveis são, a inibição da síntese da parede celular, permeabilizando a membrana da célula alvo ou inibindo a atividade enzimática (Barcenilla *et al.* 2022; Huang *et al.*, 2020). Embora seja uma proposta permissora, a aplicação de bacteriocinas como aditivos pode ser limitada por seu custo elevado ou por sua eficácia limitada contra certos microrganismos patogênicos no produto final (Barcenilla *et al.*, 2022).

2.4.2.2 Enzimas

As enzimas são proteínas que atuam catalisando as velocidades das reações químicas, sendo a ação enzimática dependente de fatores como: concentração de substrato, concentração salina, temperatura e pH do meio; fatores que acabam por limitar sua aplicação. Em geral, tem sido discutido a adição de microrganismos produtores de enzimas; ou a adição direta da enzima.

Algumas espécies de *Staphylococcus* como o *S. epidermis*, *S. warneri* e *S. lentus* já foram isoladas em presunto parma e indicadas como responsáveis pela geração da cor característica do produto (Kausar-ul-Alam *et al.*, 2021; Maere *et al.*, 2018), sendo resultado da remoção do ferro presente no pigmento heme e inclusão do zinco, formando o pigmento denominado protoporfirina de zinco IX (Kausar-ul-Alam *et al.*, 2021; Maere *et al.*, 2018; Wakamatsu *et al.*, 2020). A formação desse pigmento ainda não é bem elucidada pela literatura, porém, uma das possibilidades é de que algumas bactérias possuem atividade da enzima ferroquelatase (ferrochelatase; FECH) que é capaz de favorecer a retirada de ferro do pigmento para obtenção da cor vermelha dos produtos cárneos (Kausar-ul-Alam *et al.*, 2021; Maere *et al.*, 2018; Wakamatsu *et al.*, 2020).

De acordo com Zhu, Guo e Yang (2020) a inoculação de *Lactobacillus plantarum* (7 log UFC/g) pode substituir em até 50% o uso de nitrito de sódio, devido à alta atividade nitrato e nitrito redutase da cepa, resultando em uma alta liberação de óxido nítrico e baixo conteúdo residual de nitrato e nitrito. Ainda segundo esses autores, nessas condições há atividade antioxidante similar ao nitrito nas concentrações convencionais, e redução na produção de aminas biogênicas, como a tiramina.

A lisozima é uma enzima presente na clara de ovo que possui potencial antibacteriano, embora seu uso ainda não seja aprovado na indústria de produtos cárneos, estudos têm sido conduzidos para melhor compreender seus efeitos. Nattress, Yost e Baker (2001) avaliaram a combinação de nisina com lisozima no crescimento das bactérias deteriorantes da carne (*Brochothrix thermosphacta* e *Carnobacterium sp.*), e sugeriram que a lisozima pode aumentar atuar de forma sinérgica a nisina, prolongando a vida de prateleira da carne. Segundo Li *et al.* (2021), o uso de lisozima associado ao licor chinês atua efetivamente na inibição do crescimento e produção de enterotoxina de *Staphylococcus aureus* em produto fermentado. De acordo com Kroll *et al.* (2012) a lisozima atua como antibactericida ao catalisar a hidrólise das ligações glicosídicas β -1, 4 entre o ácido N- acetilmurâmico e a N-acetilglucosamina em peptidoglicanos das paredes celulares bacterianas.

2.4.2.3 Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos compreendem a uma classe de compostos, que em geral, possuem origem natural em plantas, como o ácido cítrico, ascórbico e benzóico, ou tecidos animais, como o ácido láctico, fórmico e propiônico; ou do metabolismo de microrganismos (bactérias, fungos e leveduras), como por exemplo a produção de ácido láctico por bactérias

ácido lácticas (BAL). Por isso, esses ácidos podem estar naturalmente presentes nos alimentos ou podem ser adicionados com o propósito de aumentar a vida útil e controlar os patógenos alimentares (Braiek; Smaoui, 2021). Em geral, as propostas de uso de ácidos orgânicos e seus derivados visam reduções parciais de nitrito, ou substituições totais quando esses compostos são associados a outras técnicas de substituição, tendo em vista que o uso de altas concentrações pode interferir nas características sensoriais dos produtos.

Esses ácidos orgânicos podem ser aplicados pelos métodos de pulverização, imersão, injeção, incorporação em filmes de embalagens bioativas (Braiek, Smaoui, 2021), nanoencapsulação (Wang *et al.*, 2018). O mecanismo antibacteriano desses ácidos e seus derivados pode ser variável de acordo com a bactéria alvo, porém, em geral, esses compostos agem alterando a atividade de água do meio, e após a sua entrada pela membrana celular, pode ser capaz de modificar o pH intracelular, induzindo danos celulares e modificação da funcionalidade de enzimas, afetando o metabolismo bacteriano com inibição da geração de trifosfato de adenosina (ATP), e danificando proteínas estruturais e DNA (Alahakoon *et al.*, 2015; Braiek; Smaoui, 2021).

O ácido láctico (ácido 2-hidróxiopropanóico; $pK_a = 3,85$) e seus derivados por exemplo, podem ser incorporados às formulações de produtos cárneos atuando como antimicrobiano, ressaltar o sabor salgado, estabilizar a cor e atuar como antioxidante (Braiek, Smaoui, 2021). Redondo-Solano *et al.* (2021) avaliaram diferentes formulações de presunto variando as concentrações de nitrito (0 ou 100 ppm), sal (1 ou 2%) com a adição de uma mistura de lactato de potássio e diacetato de sódio (0, 1,5 ou 2,5%) sob a germinação e crescimento de esporos de *Clostridium perfringens*. Foi verificado que embora a redução do teor de sal aumente o risco de germinação e crescimento de esporos de *C. perfringens*, o uso de nitrito e, ou, sais de ácidos orgânicos pode contornar esse problema, de forma que os sais de ácidos orgânicos apresentaram efeito sinérgico.

O ácido sórbico (ácido 2,4-hexadienóico; $pK_a = 4,76$) e seus derivados podem ser obtidos a partir de bagas de sorveira (*Sorbus aucuparia*) ou sintetizados (Silva; Lidon, 2016). O uso desse ácido e seus sais correspondentes como conservantes antifúngicos e antimicrobianos, é permitido em diferentes países, como no Brasil, Estados Unidos e países da União Europeia. Porém, também é reconhecido que essa substância pode desencadear efeitos indesejáveis, citotóxicos, genotóxicos e alérgicos (Dehghan *et al.*, 2018). Khanipour *et al.* (2014) evidenciaram que o uso combinado de sal (NaCl) e sorbato em culturas é eficaz para a redução de células de *Clostridium sporogenes* em condições de alta umidade e pH levemente ácidos.

O uso de bacteriocinas, enzimas e ácidos orgânicos como alternativas ao nitrito na conservação de alimentos oferece benefícios como a segurança microbiana associada a redução dos riscos à saúde associados ao nitrito, atendendo a demanda dos consumidores por alimentos mais seguros e naturais. Contudo, é importante realizar mais pesquisas para avaliar a eficácia, segurança e viabilidade comercial dessas estratégias em diferentes tipos de produtos e condições de processamento. Uma vez assegurada a eficácia de conservação microbiana, outras estratégias devem ser associadas para que haja a substituição total do nitrito de sódio.

2.4.2.4 Óleos essenciais e extratos vegetais

Os óleos essenciais e extratos podem ser obtidos de plantas, vegetais e frutas, e são entendidos como uma mistura complexa de compostos como hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, polifenóis, ésteres (Moghaddam; Mehdizadeh, 2017), mas ácidos graxos, óxidos e derivados de enxofre também podem fazer parte de sua composição (Šojić *et al.*, 2020). Cada uma das substâncias presentes pode estar presente em altas concentrações (majoritárias) ou baixas concentrações (traços). Essas substâncias podem apresentar características voláteis e serem odoríferas (Šojić *et al.*, 2019). Em geral, esses compostos tendem a apresentar principalmente ação antimicrobiana contra microrganismos deteriorantes e patógenos, e ação antioxidante (Pateiro *et al.*, 2021; Šojić *et al.*, 2020).

Genericamente, o que diferencia os óleos dos extratos é sua forma de obtenção. Os óleos essenciais são obtidos por processos mecânicos, sendo o mais comum a destilação, em conjunto com o hidrolato (subproduto). Já os extratos são obtidos através da aplicação de solventes na matéria-prima (Ferraz *et al.*, 2022). Os óleos e extratos vegetais podem ser aplicados nas embalagens, diretamente no produto, serem incorporados a revestimentos comestíveis (pectina, quitosana, alginato e gelatina), ou ainda microencapsulados.

Dentre os compostos antimicrobianos naturais estão o eugenol de cravo, timol de tomilho e orégano, carvacrol de orégano, vanilina de baunilha, alicina de alho, aldeído cinâmico de canela e isotiocianato de alilo de mostarda (Flores; Toldará, 2021). De acordo com Falleh *et al.* (2020) as substâncias presentes nos óleos podem apresentar efeitos bacteriostáticos, isto é, inibem o crescimento bacteriano, ou efeito bactericida, quando matam células bacterianas indesejáveis. Quando se trata de substâncias de natureza hidrofóbica, o mecanismo de ação mais aceito é de ruptura da membrana citoplasmática do microrganismo,

desencadeando a perda de estrutura, da impermeabilidade, dos constituintes celulares e das funções da membrana (Pateiro *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2021).

Nos estudos de Šojić *et al.* (2020) foi concluído que a reformulação de linguiças de porco cozidas utilizando nitrito (50 mg/kg), extrato de bagaço de tomate (0,075 µL/g) e óleo essencial de hortelã-pimenta orgânico e (0,075 µL/g) apresenta menor oxidação e teor de nitrito residual. O uso do extrato intensificou o índice de cor vermelha e o óleo reduziu (em 38%, aproximadamente) contagem total de microrganismos em placa, em relação ao controle (nitrito;100 mg/kg). Kramer *et al.* (2021) evidenciaram que o uso de 0,4 g/kg de extrato de lúpulo (que contem beta-ácidos) em mortadela, foi suficiente para reduzir 3 ciclos log de *L. monocytogenes* durante o armazenamento (28 dias; 7°C) em relação a formulação sem adição de lúpulo. Quando dobrada a concentração de extrato de lúpulo (0,8 g/kg). De acordo com Kim e Chin (2021) é possível reduzir o teor de nitrito em 75% da formulação de mortadela, quando é adicionado uma solução de oleoresina de páprica (0,1%) sem que altere a as propriedades físico-químicas, de textura, contagens microbianas e oxidação lipídica dos produtos. A ação da solução de óleo resina se dá através da presença de antioxidantes em sua composição, como vitaminas (C e E), tocoferol e carotenóides.

Embora possa apresentar efeitos positivos no controle de microrganismos indesejáveis, a proposta de uso de óleos e extratos apresenta algumas desvantagens e limitações. A obtenção desses compostos bioativos tende a ser mais caros e menos eficazes em relação aos aditivos sintéticos (Šojić *et al.*, 2019), podem carrear micotoxinas, que são metabólitos tóxicos produzidos por fungos filamentosos, e impactar negativamente sobre as características sensoriais do produto cárneo. Os óleos essenciais e extratos tendem a ser instáveis, isto é, são facilmente degradados, pois reagem na presença de luz, calor, umidade e metais, o que dificulta a manutenção de suas propriedades durante seu armazenamento (Turek; Stintzing, 2013). O uso de óleos e extratos em produtos cárneos pode alterar consideravelmente o aroma do produto levando a rejeição do produto pelo consumidor (Silva *et al.*, 2021). Além disso, de acordo com Ferraz *et al.* (2022) a produção em larga escala de extratos e óleos têm potencial para atingir o meio ambiente, visto que seus componentes podem apresentar efeitos tóxicos sob organismos de diferentes níveis tróficos.

2.4.3 Uso de fontes naturais de nitrito

Os extratos vegetais podem ser aplicados nas formulações de produtos cárneos com o intuito de ofertar nitrito a partir do nitrato sob determinadas circunstâncias. A grande

maioria dos vegetais contém naturalmente uma quantidade significativa de nitrato. Segundo Flores e Toldará (2021), a adição de extratos vegetais em durante o processamento pode ser conduzida por duas formas, sendo: 1) adição direta do extrato à salmoura ou aos demais ingredientes, seguida da adição de culturas starter capazes de permitir a conversão de nitrato à nitrito durante a fabricação; 2) adição dos chamados extratos “cultivados” ou “pré-fermentados”, em que o extrato vegetal é primeiramente submetido ao processo de fermentação de bactérias via enzimas nitrato redutase. Segundo Guimarães *et al.* (2021) o extrato adicionado a formulação pode ser aplicado em forma de pó, obtido da secagem dos vegetais *in natura*, ou em solução aquosa, ou ainda utilizando o resíduo da extração da solução aquosa. Ainda segundo esses autores, o extrato pode apresentar substâncias capazes de atuar de forma sinérgica ao nitrito como antioxidante, por exemplo os compostos fenólicos.

Santamaria *et al.* (2006) sugerem uma classificação para o nível de nitrato que pode vir a ser encontrado em vegetais, sendo: 1) muito baixa, com concentrações inferiores a 200 mg/kg; 2) baixa, entre 200 e 500 mg/kg; 3) média, entre 500 e 1000 mg/kg; 4) alta, entre 1000 e 2500 mg/kg), e 5) muito alta, com concentrações maiores do que 2500 mg/kg. Ainda segundo esses autores os principais vegetais em que são esperadas concentrações muito altas de nitrato são: rabanete e rúcula (família Brassicaceae); beterraba, acelga e espinafre (*Chenopodiaceae*); alface (*Asteraceae*); e aipo (*Apiaceae*).

Ozaki *et al.* (2021) avaliaram a adição de 0,5 e 1% m/m de extratos em pó de rabanetes e de beterrabas com a adição da cultura starter de *Staphylococcus carnosus* em salames fermentados. Foi verificado maior teor de nitrato no extrato de rabanete 16.263 mg/kg em relação ao extrato de beterraba 14.037mg/kg. Em geral, a adição de extratos vegetais resultou em uma diminuição no teor de umidade e atividade de água (a_w), e aumento da perda de peso dos salames. As formulações com adição de extrato obtiveram maior redução nos valores de pH em relação a formulação controle (convencional), sendo um importante barreira para o crescimento de microrganismos indesejáveis. O uso do extrato de beterraba resultou em salames de cor mais escura devido a presença de altos teores de betalaína. A concentração ideal de extratos vegetais para o desenvolvimento do pH, cor, nitrato e teores de nitrito e desenvolvimento das bactérias do ácido lático (BAL) foi de 1%.

Riel *et al.* (2017) avaliaram a substituição do nitrito de sódio das formulações de mortadela por extrato de salsa em pó em diferentes concentrações (1,07; 2,14; e 4,29 g/kg). Foi verificado que no tratamento utilizando a maior concentração de extrato houve menor contagem de *Listeria monocytogenes*, menor teor de nitrito residual em relação ao tratamento controle com nitrito. Os extratos não afetaram os parâmetros de textura, cor, atividade de água

e as características sensoriais (aparência, sabor e textura). [Guimarães *et al.* \(2021\)](#) todas as formas de derivados de rabanete (em pó, solução aquosa de rabanete, e resíduos da solução aquosa) apresentam alta concentração de nitrato e consideráveis concentrações de compostos (ácido ascórbico e fenóis) com capacidade antioxidante.

Como a adição de nitrato e nitrito ocorre de forma indireta e proveniente de vegetais, têm-se como vantagem a possibilidade de classificação do produto como sendo “orgânico” ou “natural” ([Sebranek; Bacus, 2007](#)), visto que são mais atrativos para o consumidor ([De Smet; Vossen, 2016](#); [Domingo; Nadal, 2017](#)). Porém, o uso de extratos vegetais não evita a formação de N-nitrosaminas, visto que o nitrito residual associado as condições de nitrosação permite a formação desses produtos indesejáveis. Desta forma, o uso das alegações de produto “não curado” ou o termo “nenhum nitrato ou nitrito adicionado” já proposto, trata-se de um termo não transparente ([Flores; Toldrá, 2021](#)). Outras desvantagens do uso de extratos vegetais são, principalmente a presença de pesticidas e certas micotoxinas ([Van Asselt; Banach; Van Der Fels-Klerx, 2018](#)); e a possibilidade de alteração das características sensoriais de cor e sabor do produto cárneo, limitando sua utilização ([Flores; Toldrá, 2021](#); [Martínez-Zamora *et al.*, 2020](#)). Ademais, as concentrações de nitrato nos vegetais são muito variáveis já que são dependentes de fatores como a capacidade de absorção e acúmulo de nitrato de cada planta, da região da planta utilizada (pecíolo, folha, raiz, caule, inflorescência, tubérculo e bulbo) ([Santamaria *et al.*, 1999](#)), bem como por aqueles fatores associados ao desenvolvimento da planta, como atividade da enzima nitrato redutase, taxa de crescimento, condições ambientais (temperatura do solo, intensidade da luz e nível de precipitação, aplicação de fertilizantes, práticas agrícolas, genética, e dos métodos de processamento ([Razgallah *et al.*, 2016](#); [Sindelar; Milkowski, 2012](#)).

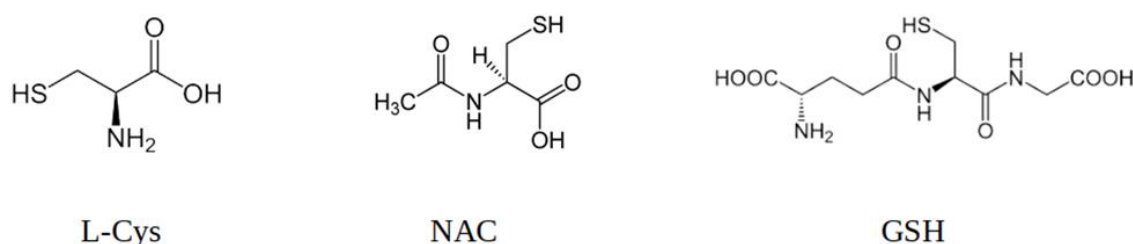
2.4.4 Carreadores de óxido nítrico

Carreadores químicos são espécies doadoras ou transportadores de substâncias de interesse (espécies ativas), que podem ser produzidas e, ou, adicionadas diretamente a um sistema, ou ainda associados a tecnologia de encapsulação em polímeros ou nanomateriais, a fim de regular a liberação das espécies ativas em locais e em condições específicas, evitando a decomposição da substância de interesse ([Seabra; Raj; Durán, 2014](#); [Yang; Huang; Li, 2021](#)). Os carreadores de NO são de ocorrência natural em seres humanos, sendo uma das formas mais estáveis do NO ([Yang; Huang; Li, 2021](#)), bem como em animais e plantas ([Ahmad *et al.*, 2021](#); [Seabra; Raj; Durán, 2014](#)). Os carreadores de NO têm sido sintetizados para aplicação

biomédica (Yang; Huang; Li, 2021; Zhou *et al.*, 2020), na agricultura para melhorar principalmente defesa e o crescimento das plantas (Seabra; Raj; Durán, 2014), e recentemente, como uma possível alternativa à adição direta de nitrito em produtos cárneos (Kanner *et al.*, 2019; Shpaizer *et al.*, 2018; Shpaizer; Kanner; Tirosh, 2021).

In vivo, os carreadores de NO atuam como sinalizadores em fenômenos fisiológicos e fisiopatológicos (Liu *et al.*, 2018; Seabra; Raj; Durán, 2014). O NO produzido no músculo esquelético, por exemplo, desempenha a função de mensageiro secundário na transdução de sinais em inúmeros processos fisiológicos, através da via cíclica do monofosfato de guanosina (cGMP) e da via independente do cGMP, conhecida como nitrosilação da proteína S (Liu *et al.*, 2018). Processos importantes como o *rigor mortis*, que consiste na conversão do músculo em carne, são controladas pelo NO e pela nitrosilação da proteína S. Por influenciar no metabolismo da glicólise, na liberação de Ca^{+2} (cálcio), na apoptose e na proteólise (Liu *et al.*, 2018), a liberação de NO pode estar correlacionada com a qualidade da carne *in natura* (Cook; Scott; Devine, 1998). Aminoácidos ou peptídeos que possuem o grupo tiol (-SH), também conhecidos como mercaptonas (Harada *et al.*, 2001), são espécies com alto potencial para atuar como carreadores de NO *in vivo*, como a L-cisteína (L-Cys), glutathiona (GSH) e a N-acetilcisteína (NAC) (Aldini *et al.* 2018). A estrutura química desses compostos é apresentada na Figura 3.

Figura 3 – Estruturas químicas dos compostos L-cisteína (L-Cys), glutathiona (GSH) e a N-acetilcisteína (NAC).



Fonte: Da autora.

Os tióis atuam como carreadores ao incorporar o grupo NO através da ligação entre enxofre e nitrogênio (RS-NO), formando os compostos conhecidos como nitrosotióis, ou tionitritos (RSNOs). As espécies nitrosiladas de L-Cys, NAC e GSH, correspondem a S-nitroso-L-cisteína (Cys-SNO), S-nitroso-N-acetilcisteína (NAC-SNO) e S-nitroso-glutathiona (GSNO) (de Souza *et al.*, 2019; Lancaster *et al.*, 2008). Na biomedicina, além dos RSNOs, outras categorias de fármacos são utilizadas como doadoras de NO, como os nitratos

orgânicos, n-diazeniodiolatos, furoxanos, compostos metálicos nitrosílicos e nitrobenzenos. (Yang; Huang; Li, 2021). Contudo, os RSNOs são mais pesquisados devido a sua maior eficácia e mínima toxicidade (Zhou *et al.*, 2020).

Como medicamento, exclusivamente o GSNO é armazenado em pó, a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, protegido da luz e sob atmosfera inerte (Zhou *et al.*, 2020). A administração exógena de nitrosotióis como Cys-SNO, GSNO e NAC-SNO é normalmente realizada por via intravenosa devido à baixa estabilidade dessas substâncias (Tsikas *et al.*, 2018). Devido à instabilidade dessas substâncias e baixa biodisponibilidade oral dos RSNOs, algumas estratégias foram adotadas para sua manipulação como a conjugação desses carreadores a matrizes poliméricas hidrofílicas (alginato e quitosana) ou hidrofóbicas (Zhou *et al.*, 2020; Seabra; Raj; Durán, 2013); ou modificações químicas nas estruturas dos carreadores para modificar características como peso molecular, hidrofiliicidade e formação de cargas em sistemas biológicos (Tsikas *et al.*, 2018). Tsikas *et al.* (2018) sugeriram a síntese de S-nitroso-N-éster etílico de acetil-L-cisteína (NACET-SNO), em que o grupo éster etílico é adicionado a estrutura química do NAC, formando o éster etílico de N-acetil-L-cisteína (NACET), seguido pela adição do grupo nitroso. Essa modificação estrutural é necessária pois, em pH fisiológico, o grupo carboxílico livre de NAC está predominantemente na forma carregada negativamente, o que requer transporte ativo transmembrana. Ademais, o NACET possui maior potencial antioxidante em relação ao NAC e maior solubilidade em água e solventes orgânicos (Tsikas *et al.*, 2018). Modificações químicas na estrutura do polissacarídeo quitosana, através da adição do grupo S-nitroso (S-NO), resultam na formação da S -nitroso-quitosana, que também tem sido relatada na literatura para uso medicinal (Pelegriño *et al.*, 2021).

Em produtos cárneos, Emi-Miwa, Okltani e Fujimaki (1976) relataram que espécies como RSNOs, aminoácidos nitrosados (nitrosoprolina e nitrotirosina), nitrosomioglobina e compostos de nitrogênio gasoso (N_xO_x), podem se formar naturalmente em formulações tradicionais (adicionadas de nitrito de sódio), contudo, o teor de RSNOs foi considerado baixo em comparação aos derivados gasosos, como NO e óxido nitroso (N_2O). Recentemente, os RSNOs têm sido sugeridos como agentes de cura, sendo uma alternativa em potencial para a substituição total de nitrito de sódio em produtos cárneos (Kanner *et al.*, 2019; Shpaizer *et al.*, 2018). De uma maneira geral, essa proposta tem como objetivo a entrega direta do NO, reduzindo as reações paralelas da cura já que a S-nitrosilação é cineticamente favorecida em relação a N-nitrosilação, ou seja, o uso dos RSNOs oferece o mesmo princípio ativo do nitrito, como benefício de reduzir a probabilidade de formação das nitrosaminas (Bryan *et al.*, 2012).

Até o momento o efeito da adição dos RSNOs, S-nitroso cisteína (Cys-SNO) e, ou, S-nitroso N-acetilcisteína (NAC-SNO), foi avaliada em simulações de processamento de produtos cárneos. [Kanner e Juven \(1980\)](#) elaboraram modelos cárneos com carne de peru moída (81,0%), sal (2,5%), água (16,5%) e Cys-SNO. Neste estudo, a adição equivalente de Cys-SNO e nitrito de sódio mostrou ser efetiva na geração de cor similar à cor curada (adição de nitrito), além de reduzir a oxidação lipídica e a contagem de esporos de *C. botulinum*. [Shpaizer et al. \(2018\)](#) avaliaram o efeito da adição dos carreadores Cys-SNO e NAC-SNO na formação de cor e de nitrosaminas (N-NA) em diferentes condições: carne de peru moída em pH = 6,2; simulando o processamento (adição de ingredientes e aquecimento à 72 °C/ 2 minutos); e simulando as condições de digestão (pH = 3,0 e 37 °C). Esses autores sugeriram que a adição de RSNOs promove maior estabilidade de cor da carne e maior redução na formação de nitrosaminas (N-NA) em comparação a formulação com sais de nitrito, sendo o NAC-SNO mais eficaz (redução de 99% da N-NA) durante o processamento, armazenamento e digestão, possivelmente devido ao seu maior tempo de meia-vida ($t_{1/2} = 107$ horas) em relação ao Cys-SNO ($t_{1/2} = 2,8$ horas) à temperatura de 37 °C.

Em outro trabalho, [Kanner et al. \(2019\)](#) avaliaram o efeito oxidante do NAC-SNO em diferentes concentrações (de 0 a 2,5 mM) e diferentes valores de pH (3,0 e 6,2), na presença ou ausência de ácido ascórbico (1:1,14), em comparação à adição de nitrito de sódio em modelos cárneos de carne de peru moída, adicionada de aditivos, aquecida à 75 °C/5 minutos e armazenada a 4 °C. Segundo esses autores, o pH afeta significativamente a oxidação lipídica, sendo que em pH 6,2 há maior (aproximadamente 50%) presença de malonaldeído, indicando maior oxidação lipídica, do que em pH 3,0. Ainda segundo eles, em pH 6,2 (simulando o pH da carne) o NAC-SNO apresenta maior eficácia como agente oxidante do que o nitrito, independente das concentrações. Já em pH 3,0 (simulando o pH do suco gástrico), somente o NAC-SNO atua como antioxidante. Ademais, a adição de NAC-SNO promove menor oxidação de vitamina A em comparação ao uso de nitrito, sugerindo que a adição de NAC-SNO resulta em uma menor perda nutricional. [Shpaizer, Kanner e Tirosh \(2021\)](#) avaliaram o NAC-SNO como agente anticlostridial em cultura e em caldo de carne, e sua relação com a produção de nitrosaminas no sangue de camundongos alimentados com NAC-SNO em comparação ao nitrito. Eles verificaram que a eficácia do NAC-SNO no crescimento de *C. sporogenes* é semelhante ao nitrito, quando utilizado nas mesmas concentrações, e gera menor quantidade de nitrosaminas detectáveis no sangue de camundongos *in vivo*.

Embora os RSNOs sejam apresentados como substâncias de alto potencial para a substituição ao nitrito, ainda existem lacunas a respeito da aplicação dessas substâncias. Isso se deve a grande variedade de produtos, elaborados a partir de diferentes matérias-primas (carne de aves, suína, bovina e caprina, por exemplo) e ingredientes; além de diferentes técnicas (cozimento, defumação, secagem, fermentação) e tempos de processamento que ainda devem ser avaliados para validar seu uso. Outros fatores a serem considerados incluem a faixa de concentração ideal para geração e manutenção das características tecnológicas e sensoriais durante o armazenamento.

A principal limitação para aplicação dos RSNOs em alimentos é sua alta instabilidade. Os RSNOs utilizados no processamento de modelos cárneos são sintetizados em soluções ácidas (pH de aproximadamente 2,0) e usados imediatamente após o preparo (Kanner *et al.*, 2019; Shpaizer *et al.*, 2018). A síntese dos compostos nitrosotíois é um processo relativamente simples, que ocorre através da reação de S-nitrosação entre o grupo sulfidril (SH) e espécies nitrosantes, como o nitrito. Em condições ácidas, o nitrito pode ser protonado, produzindo o ácido nitroso (OH-NO) que é doador do cátion nitrosônio (NO^+), uma espécie reativa que realiza ataque eletrofílico ao átomo de enxofre do grupo sulfidril, seguido pela eliminação de uma molécula de água (de Souza *et al.*, 2019). A absorvância dos RSNOs é mensurada em comprimentos de ondas específicos ($\lambda_{\text{NAC-SNO}} = 330 \text{ nm}$) e calculadas através da lei de Lambert-beer ($\epsilon_{\text{NAC-SNO}} = 727 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Mathews; Kerr, 1993).

A estabilidade dos RSNOs é influenciada por fatores intrínsecos como a estrutura do RSNOs (primário ou terciário) e conformação espacial (sin e anti) (Meyer *et al.*, 2016); e extrínsecos como a concentração de RSNOs, pH do meio, temperatura, luz, presença de íons metálicos (como o cobre) (de Souza *et al.*, 2019). A principal via de decomposição dos RSNOs ocorre através da clivagem homolítica da ligação S-NO, formando os radicais tiil (RS^{\bullet}) e óxido nítrico (NO^{\bullet}), seja por efeito autocatalítico ou iniciada pela variação de temperatura ou presença de luz. De acordo com de Souza *et al.* (2019) o radical RS^{\bullet} formando é capaz de reagir com outro radical RS^{\bullet} ou com outros RSNOs formando dímeros (S-S). Sendo esperado que em meios mais ácidos (pH menor que 5) ou básicos (pH maior que 9) a taxa de decomposição dos RSNOs seja intensificada. Ainda segundo esses autores, é esperado que em pH próximo ao 7,0 as soluções apresentem maior estabilidade. A degradação dos nitrosotíois em meio básico pode envolver um ataque nucleofílico do ânion hidroxila (OH^-) no nitrogênio do grupo nitrosila, formando um intermediário (RS-NO_2^{-2}), que posteriormente libera o NO_2^- . Já a degradação em meio ácido é resultado da protonação do átomo de enxofre dos RSNOs, favorecendo o ataque nucleofílico do átomo de oxigênio da molécula de água

sobre o átomo de nitrogênio do grupo NO, que sofre hidrólise produzindo o tiol (R-SH) (de Souza *et al.*, 2019).

Hornyák *et al.* (2012) avaliaram a síntese e estabilidade de soluções de nitrosotióis, S-nitroso glutationa (GSNO) e S-nitroso n-acetilcisteína (NAC-SNO), em diferentes pH (de 0,3 a 12,6), sendo observado que para a síntese o pH ácido (pH = 1,6) resultou maior rendimento. Segundo esses autores, a decomposição dos RSNOs resulta naturalmente na redução do pH. Quando os nitrosotióis são armazenados à 4°C, na ausência de luz, a taxa de decomposição é menor em pH entre 8,4 e 8,8. Para maior estabilidade das soluções ácidas, foi sugerido a aplicação de gás inerte (N₂); ou a associação do nitrosotiol em matriz polimérica em pH básico (pH= 8,8). de Souza *et al.* (2019) avaliaram o efeito da concentração (1 - 50mM) e temperatura (15 - 40 °C) na decomposição de soluções de GSNO e NAC-SNO. Para a avaliação, as soluções foram preparadas em tampão de sais de fosfato (0,09 M, pH 7,0), adicionadas de 3,4 mM de EDTA (0,1% p/p), e 0,6 mM de cloreto de benzalcônio (0,02% p/p). Nesse trabalho, uma maior taxa de decomposições foi observada nas maiores concentrações (40 - 50 mM) em relação a menor concentração (1 mM) analisada, sendo evidenciada através dos tempos de monitoramento de 10 e 80 dias respectivamente; bem como uma maior decomposição da solução de 1 mM na maior temperatura de armazenamento (40 °C; 10 dias).

Logo, para aplicação na indústria cárnea há limitações no que se refere a síntese, estabilidade e forma de aplicação dos RSNOs, sendo necessário o desenvolvimento de processos que promovam a otimização para a obtenção e manuseio desse novo aditivo. Vale ressaltar que, para atender a grande demanda das indústrias, algumas características para a comercialização de aditivos são importantes como fornecer o aditivo pronto para uso, em sua maior concentração possível, em um estado físico específico (sólido ou líquido), com menor exigência possível de refrigeração para armazenamento, bem como maior vida de prateleira.

REFERÊNCIAS

- ABIA. **Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação**. Relatório anual 2019. Disponível em: <<https://www.abia.org.br/downloads/aliementacao-e-ciencia.pdf>> Acesso em: 03 de fevereiro de 2021.
- AHMAD, Aqeel *et al.* Synergistic effects of nitric oxide and silicon on promoting plant growth, oxidative stress tolerance and reduction of arsenic uptake in Brassica juncea. **Chemosphere**, v. 262, p. 128384, 2021.
- ALAHAKOON, Amali U. *et al.* Alternatives to nitrite in processed meat: Up to date. **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, n. 1, p. 37-49, 2015.
- ALDINI, Giancarlo *et al.* N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why. **Free radical research**, v. 52, n. 7, p. 751-762, 2018.
- ANDERSEN, H. J. *et al.* Effect of light and packaging conditions on the colour stability of sliced ham. **Meat Science**, 22, 283-292, 1988.
- BARCENILLA, Coral *et al.* Application of lactic acid bacteria for the biopreservation of meat products: A systematic review. **Meat Science**, v. 183, p. 108661, 2022.
- BARRETO, Ricardo de L.; CORREIA, Carlos Roque D.; MUSCARÁ, Marcelo N. Nitric oxide: properties and therapeutic use. **Química Nova**, v. 28, p. 1046-1054, 2005.
- BEDALE, Wendy; SINDELAR, Jeffrey J.; MILKOWSKI, Andrew L. Dietary nitrate and nitrite: Benefits, risks, and evolving perceptions. **Meat science**, v. 120, p. 85-92, 2016.
- BEN BRAÏEK, Olfa; SMAOUI, Slim. Chemistry, safety, and challenges of the use of organic acids and their derivative salts in meat preservation. **Journal of Food Quality**, v. 2021, p. 1-20, 2021.
- BONIFACIE, Aline *et al.* Determination of nitroso-compounds in food products. **MethodsX**, v. 8, p. 101289, 2021.
- BRASIL. Decreto no 9.013 de 29 de março de 2017. Aprova o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA).
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 211, de 1º de março de 2023 da ANVISA, alterada pela Instrução Normativa nº 303, de 28 de maio de 2024. Estabelece os aditivos alimentares autorizados para uso em carnes e produtos cárneos.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 778, de 1 de março de 2023. Dispõe sobre os princípios gerais, as funções tecnológicas e as condições de uso de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia.
- BRYAN, Nathan S. *et al.* Ingested nitrate and nitrite and stomach cancer risk: an updated review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 10, p. 3646-3665, 2012.

CASTRO, Tiago Alves *et al.* Red tomato products as an alternative to reduce synthetic dyes in the food industry: A review. **Molecules**, v. 26, n. 23, p. 7125, 2021.

COOK, Christian John; SCOTT, Sheryl Marie; DEVINE, Carrick Erskine. Measurement of nitric oxide and the effect of enhancing or inhibiting it on tenderness changes of meat. **Meat science**, v. 48, n. 1-2, p. 85-89, 1998.

CZECH-ZAŁUBSKA, Katarzyna *et al.* Dyes Used in Processed Meat Products in the Polish Market, and Their Possible Risks and Benefits for Consumer Health. **Foods**, v. 12, n. 13, p. 2610, 2023.

DE ALCANTARA, Marcela *et al.* Principais Microrganismos envolvidos na deterioração das características sensoriais de derivados cárneos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 6, n. 1, p. 1-20, 2012.

DE MAERE, Hannelore *et al.* Influence of meat source, pH and production time on zinc protoporphyrin IX formation as natural colouring agent in nitrite-free dry fermented sausages. **Meat science**, v. 135, p. 46-53, 2018.

DE SMET, Stefaan; VOSSSEN, Els. Meat: The balance between nutrition and health. A review. **Meat Science**, v. 120, p. 145-156, 2016.

DE SOUZA, Gabriela Freitas P. *et al.* Long-term decomposition of aqueous S-nitrosoglutathione and S-nitroso-N-acetylcysteine: Influence of concentration, temperature, pH and light. **Nitric Oxide**, v. 84, p. 30-37, 2019.

DEHGHAN, Parvin *et al.* Pharmacokinetic and toxicological aspects of potassium sorbate food additive and its constituents. **Trends in Food Science & Technology**, v. 80, p. 123-130, 2018.

DIAO, Mamadou Moctar; ANDRÉ, Stéphane; MEMBRÉ, Jeanne-Marie. Meta-analysis of D-values of proteolytic *Clostridium botulinum* and its surrogate strain *Clostridium sporogenes* PA 3679. **International journal of food microbiology**, v. 174, p. 23-30, 2014.

DOMINGO, José L.; NADAL, Martí. Carcinogenicity of consumption of red meat and processed meat: A review of scientific news since the IARC decision. **Food and chemical toxicology**, v. 105, p. 256-261, 2017.

DOMÍNGUEZ, Rubén *et al.* A comprehensive review on lipid oxidation in meat and meat products. **Antioxidants**, v. 8, n. 10, p. 429, 2019.

DONG, Q. L., *et al.* The effect of sodium nitrite on the textural properties of cooked sausage during cold storage. **Journal of Texture Studies**, 38(5), 537-554., 2007.

DUTRA, Monalisa Pereira *et al.* Use of gamma radiation on control of *Clostridium botulinum* in mortadella formulated with different nitrite levels. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 119, p. 125-129, 2016.

DWORKIN, Martin. **The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria**. New York: Springer, 2006.

- EFSA. Panel on food additives and nutrient sources added to food (ANS) et al. Re-evaluation of potassium nitrite (E 249) and sodium nitrite (E 250) as food additives. **Efsa journal**, v. 15, n. 6, p. e04786, 2017.
- EMI-MIWA, Misao; OKITANI, Akihiro; FUJIMAKI, Masao. Comparison of the fate of nitrite added to whole meat, meat fractions and model systems. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 40, n. 7, p. 1387-1392, 1976.
- FALLEH, Hanen *et al.* Essential oils: A promising eco-friendly food preservative. **Food chemistry**, v. 330, p. 127268, 2020.
- FERRAZ, Celso Afonso *et al.* Ecotoxicity of plant extracts and essential oils: A review. **Environmental Pollution**, v. 292, p. 118319, 2022.
- FLORES, Mónica. Understanding the implications of current health trends on the aroma of wet and dry cured meat products. **Meat Science**, v. 144, p. 53-61, 2018.
- FLORES, Mónica; TOLDRÁ, Fidel. Chemistry, safety, and regulatory considerations in the use of nitrite and nitrate from natural origin in meat products-Invited review. **Meat Science**, v. 171, p. 108272, 2021.
- FONT-I-FURNOLS, Maria; GUERRERO, Luis. Consumer preference, behavior and perception about meat and meat products: An overview. **Meat science**, v. 98, n. 3, p. 361-371, 2014.
- FORD, Peter C.; MIRANDA, Katrina M. The solution chemistry of nitric oxide and other reactive nitrogen species. **Nitric Oxide**, v. 103, p. 31-46, 2020.
- GIMÉNEZ-CAMPILLO, Claudia *et al.* Development of a new methodology for the determination of N-nitrosamines impurities in ranitidine pharmaceuticals using microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Talanta**, v. 223, p. 121659, 2021.
- GUIMARÃES, Angélica Sousa *et al.* Assessment of Japanese radish derivatives as nitrite substitute on the physicochemical properties, sensorial profile, and consumer acceptability of restructured cooked hams. **Meat Science**, v. 192, p. 108897, 2022.
- GUIMARÃES, Angélica Sousa *et al.* Characterization of natural curing agents from Japanese radish (*Raphanus sativus L.*) for their use in clean label restructured cooked meat products. **LWT**, v. 150, p. 111970, 2021.
- GUSHGARI, Adam J.; HALDEN, Rolf U. Critical review of major sources of human exposure to N-nitrosamines. **Chemosphere**, v. 210, p. 1124-1136, 2018.
- HADIDI, Milad *et al.* Plant by-product antioxidants: Control of protein-lipid oxidation in meat and meat products. **Lwt**, v. 169, p. 114003, 2022.
- HATHEWAY, Charles L. Toxigenic clostridia. **Clinical microbiology reviews**, v. 3, n. 1, p. 66-98, 1990.

HILL, K. K. *et al.* Genetic diversity among botulinum neurotoxin-producing clostridial strains. **Journal of bacteriology**, v. 189, n. 3, p. 818-832, 2007.

HONIKEL, Karl-Otto. The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. **Meat science**, v. 78, n. 1-2, p. 68-76, 2008.

HORNYÁK, István *et al.* Increased stability of S-nitrosothiol solutions via pH modulations. **Free radical research**, v. 46, n. 2, p. 214-225, 2012.

HUANG, Ling *et al.* Production of a safe cured meat with low residual nitrite using nitrite substitutes. **Meat science**, v. 162, p. 108027, 2020.

IARC-WHO, 2015. Iarc Monographs Evaluate Consumption of Red Meat and Processed Meat. Disponível em: https://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2015/pdfs/pr240_E.Pdf. Acesso em: 04 nov. 2016

ICHI. M7(R1). **Assessment and control of dna reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk M7**. In: International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: Geneva. 2018.

ITAL - Instituto de Tecnologia de Alimentos. **Brasil Food Trends 2020**. São Paulo: ITAL/FIESP, 2010. 173 p. Disponível em: <<https://alimentosprocessados.com.br/arquivos/Consumo-tendencias-e-inovacoes/Brasil-Food-Trends-2020.pdf>>. Acesso em: 03 de fevereiro de 2021.

JÄGERSTAD, Margaretha; SKOG, Kerstin. Genotoxicity of heat-processed foods. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 574, n. 1-2, p. 156-172, 2005.

JO, Kyung *et al.* Nitrite sources for cured meat products. **Lwt**, v. 129, p. 109583, 2020.

KALSCHNE, Daneyssa L. *et al.* Growth inhibition of lactic acid bacteria in ham by nisin: A model approach. **Meat Science**, v. 98, n. 4, p. 744-752, 2014.

KANNER, Joseph.; JUVEN, B. J. S-nitrosocysteine as an antioxidant, color-developing, and anticlostridial agent in comminuted turkey meat. **Journal of Food Science**, v. 45, n. 5, p. 1105-1112, 1980.

KANNER, Joseph *et al.* S-nitroso-N-acetylcysteine (NAC-SNO) as an antioxidant in cured meat and stomach medium. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 67, n. 39, p. 10930-10936, 2019.

KAUR, Sumanpreet; KAUR, Sukhraj. Bacteriocins as potential anticancer agents. **Frontiers in pharmacology**, v. 6, p. 165109, 2015.

KAUSER-UL-ALAM, Md *et al.* High ZnPP-forming food-grade lactic acid bacteria as a potential substitute for nitrite/nitrate to improve the color of meat products. **Meat Science**, v. 176, p. 108467, 2021.

KHANIPOUR, Elham *et al.* Evaluation of the effects of sodium chloride, potassium sorbate, nisin and lysozyme on the probability of growth of *Clostridium sporogenes*. **International journal of food science & technology**, v. 49, n. 6, p. 1506-1512, 2014.

KIM, Geon Ho; CHIN, Koo Bok. Characteristics of low-nitrite pork emulsified-sausages with paprika oleoresin solution during refrigerated storage. **Journal of Animal Science and Technology**, v. 63, n. 2, p. 394, 2021.

KUMAR, Yogesh *et al.* Antilisterial, antimicrobial and antioxidant effects of pediocin and *Murraya koenigii* berry extract in refrigerated goat meat emulsion. **LWT-Food Science and Technology**, v. 79, p. 135-144, 2017.

LANCASTER JR, Jack R. Protein cysteine thiol nitrosation: maker or marker of reactive nitrogen species-induced nonerythroid cellular signaling?. **Nitric Oxide**, v. 19, n. 2, p. 68-72, 2008.

LAWLESS, H. T., HEYMANN, H. Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices (2nd ed.), 2010.

LI, Hong-Wei *et al.* A novel bacteriocin from *Lactobacillus salivarius* against *Staphylococcus aureus*: Isolation, purification, identification, antibacterial and antibiofilm activity. **Lwt**, v. 140, p. 110826, 2021.

LI, Xiao *et al.* Ingestão de nitrosaminas voláteis por residentes chineses em diferentes províncias através de alimentos e água potável. **Ciência do Meio Ambiente Total**, v. 754, p. 142121, 2021.

LIM, Chang Hoon; DEDON, Peter C.; DEEN, William M. Kinetic analysis of intracellular concentrations of reactive nitrogen species. **Chemical research in toxicology**, v. 21, n. 11, p. 2134-2147, 2008.

LIU, Rui *et al.* Contribution of nitric oxide and protein S-nitrosylation to variation in fresh meat quality. **Meat Science**, v. 144, p. 135-148, 2018.

LÓPEZ-RODRÍGUEZ, Rocío *et al.* Pathways for N-nitroso compound formation: secondary amines and beyond. **Organic Process Research & Development**, v. 24, n. 9, p. 1558-1585, 2020.

MA, Linsha *et al.* Nitrate and nitrite in health and disease. **Aging and disease**, v. 9, n. 5, p. 938, 2018.

MAJOU, Didier; CHRISTIEANS, Souad. Mechanisms of the bactericidal effects of nitrate and nitrite in cured meats. **Meat Science**, v. 145, p. 273-284, 2018.

MARTINA, Antsova *et al.* Óxido nítrico: mensageiro importante no corpo humano. **Journal of molecular and integrative physiology**, 2012.

MARTÍNEZ-ZAMORA, Lorena; ROS, Gaspar; NIETO, Gema. Designing a clean label fish patty with olive, citric, pomegranate, or rosemary extracts. **Plants**, v. 9, n. 5, p. 659, 2020.

- MATHEWS, W. Rodney; KERR, Steven W. Biological activity of S-nitrosothiols: the role of nitric oxide. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 267, n. 3, p. 1529-1537, 1993.
- MERIALDI, Giuseppe *et al.* Study on potential *Clostridium botulinum* growth and toxin production in Parma ham. **Italian journal of food safety**, v. 5, n. 2, 2016.
- MEYER, Benjamin *et al.* Structure and stability studies of pharmacologically relevant S-Nitrosothiols: a theoretical approach. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 120, n. 24, p. 4191-4200, 2016.
- MILKOWSKI, Andrew *et al.* Nutritional epidemiology in the context of nitric oxide biology: A risk–benefit evaluation for dietary nitrite and nitrate. **Nitric oxide**, v. 22, n. 2, p. 110-119, 2010.
- MOGHADDAM, Mohammad; MEHDIZADEH, Leila. Chemistry of essential oils and factors influencing their constituents. In: **Soft chemistry and food fermentation**. Academic Press, 2017. p. 379-419.
- NATTRESS, F. M.; YOST, C. K.; BAKER, L. P. Evaluation of the ability of lysozyme and nisin to control meat spoilage bacteria. **International journal of food microbiology**, v. 70, n. 1-2, p. 111-119, 2001.
- NIETO-LOZANO, Juan C. *et al.* The effect of the pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* in Spanish dry-fermented sausages and frankfurters. **Food Control**, v. 21, n. 5, p. 679-685, 2010.
- NIGAM, Pramod Kumar; NIGAM, Anjana. Botulinum toxin. **Indian journal of dermatology**, v. 55, n. 1, p. 8-14, 2010.
- NIKODINOSKA, Ivana *et al.* Protective cultures against foodborne pathogens in a nitrite reduced fermented meat product. **Lwt**, v. 101, p. 293-299, 2019.
- NING, Cheng *et al.* L-Lysine/l-arginine/l-cysteine synergistically improves the color of cured sausage with NaNO₂ by hindering myoglobin oxidation and promoting nitrosylmyoglobin formation. **Food chemistry**, v. 284, p. 219-226, 2019.
- OZAKI, Maristela Midori *et al.* Beetroot and radish powders as natural nitrite source for fermented dry sausages. **Meat Science**, v. 171, p. 108275, 2021.
- PARR, Maria Kristina; JOSEPH, Jan F. NDMA impurity in valsartan and other pharmaceutical products: Analytical methods for the determination of N-nitrosamines. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 164, p. 536-549, 2019.
- PARTHASARATHY, Deepa K.; BRYAN, Nathan S. Sodium nitrite: The “cure” for nitric oxide insufficiency. **Meat science**, v. 92, n. 3, p. 274-279, 2012.

- PATEIRO, Mirian *et al.* Application of essential oils as antimicrobial agents against spoilage and pathogenic microorganisms in meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 337, p. 108966, 2021.
- PECK, Michael W.; VAN VLIET, Arnoud HM. Impact of *Clostridium botulinum* genomic diversity on food safety. **Current Opinion in Food Science**, v. 10, p. 52-59, 2016.
- PEDONESE, Francesca *et al.* Effect of a *Lactobacillus sakei* and *Staphylococcus xylosus* protective culture on *Listeria monocytogenes* growth and quality traits of Italian fresh sausage (salsiccia) stored at abusive temperature. **Italian Journal of Animal Science**, v. 19, n. 1, p. 1363-1374, 2020.
- PEGG, Ronald B.; HONIKEL, Karl O. Principles of curing. **Handbook of fermented meat and poultry**, p. 19-30, 2014.
- PEGG, Ronald B.; SHAHIDI, Fereidoon. 12 Processing of Nitrite-Free Cured Meats. **Advanced technologies for meat processing**, p. 309, 2006.
- PELEGRINO, Milena T. *et al.* Chitosan chemically modified to deliver nitric oxide with high antibacterial activity. **Nitric oxide**, v. 106, p. 24-34, 2021.
- PISOSCHI, Aurelia Magdalena *et al.* An overview of natural antimicrobials role in food. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 922-935, 2018.
- PROVERBIO, Maria Renata *et al.* Early diagnosis and treatment in a child with foodborne botulism. **Anaerobe**, v. 39, p. 189-192, 2016.
- RAMOS, Eduardo Mendes. *et al.* Meat color evaluation and pigment levels in bullfrog (*Rana catesbeiana*) slaughtered by different methods. **Aquaculture**, v. 245, n. 1-4, p. 175-182, 2005.
- RAMOS, Eduardo Mendes.; FONTES, Paulo Rogério. **Tecnologia do Processamento de Carnes e Derivados**. Texto didático (apostila reprografada), v.1 (Fundamentos Teóricos). Itapetinga: Universidade Federal do Sudoeste da Bahia (UESB). 2015.
- RAMOS, Eduardo Mendes; DE MIRANDA GOMIDE, Lúcio Alberto. **Avaliação da qualidade de carnes: fundamento e metodologias**. UFV, 2007.
- RAZGALLAH, Nesrine *et al.* Nitrate contents in some vegetables in Tunisia. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 62, n. 4, p. 473-483, 2016.
- REDONDO-SOLANO, Mauricio *et al.* Control of *Clostridium perfringens* spore germination and outgrowth by potassium lactate and sodium diacetate in ham containing reduced sodium chloride. **Lwt**, v. 137, p. 110395, 2021.
- RIEL, Greta *et al.* Effects of parsley extract powder as an alternative for the direct addition of sodium nitrite in the production of mortadella-type sausages–Impact on microbiological, physicochemical and sensory aspects. **Meat Science**, v. 131, p. 166-175, 2017.

SANTAMARIA, Pietro *et al.* A survey of nitrate and oxalate content in fresh vegetables. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 13, p. 1882-1888, 1999.

SANTAMARIA, Pietro. Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, n. 1, p. 10-17, 2006.

SEABRA, Amedea B.; RAI, Mahendra; DURÁN, Nelson. Nano carriers for nitric oxide delivery and its potential applications in plant physiological process: A mini review. **Journal of plant biochemistry and biotechnology**, v. 23, p. 1-10, 2014.

SEBRANEK, Joseph G.; BACUS, James N. Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues?. **Meat science**, v. 77, n. 1, p. 136-147, 2007.

SHPAIZER, Adi *et al.* S-nitroso-N-acetylcysteine generates less carcinogenic N-nitrosamines in meat products than nitrite. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 66, n. 43, p. 11459-11467, 2018.

SHPAIZER, Adi *et al.* S-nitroso-N-acetylcysteine generates less carcinogenic N-nitrosamines in meat products than nitrite. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 66, n. 43, p. 11459-11467, 2018.

SHPAIZER, Adi; KANNER, Joseph; TIROSH, Oren. S-Nitroso-N-acetylcysteine (NAC–SNO) vs. nitrite as an anti-clostridial additive for meat products. **Food & function**, v. 12, n. 5, p. 2012-2019, 2021.

SIES, Helmut; STAHL, Wilhelm. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **The American journal of clinical nutrition**, v. 62, n. 6, p. 1315S-1321S, 1995.

SILVA, Douglas RG *et al.* Reducing the safety risk of low nitrite restructured sliced cooked ham by gamma radiation. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 45, n. 1, p. e15071, 2021.

SILVA, Maria Manuela; LIDON, Fernando. Food preservatives—An overview on applications and side effects. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, p. 366-373, 2016.

SINDELAR, Jeffrey J.; MILKOWSKI, Andrew L. Human safety controversies surrounding nitrate and nitrite in the diet. **Nitric oxide**, v. 26, n. 4, p. 259-266, 2012.

SINDELAR, Jeffrey Joseph. **Investigating uncured no nitrate or nitrite added processed meat products**. Iowa State University, 2006.

ŠOJÍČ, Branislav *et al.* Tomato pomace extract and organic peppermint essential oil as effective sodium nitrite replacement in cooked pork sausages. **Food Chemistry**, v. 330, p. 127202, 2020.

SUMAN, Surendranath P.; JOSEPH, Poulson. Myoglobin chemistry and meat color. **Annual review of food science and technology**, v. 4, p. 79-99, 2013.

THOMAS, Caroline *et al.* Identification and origin of odorous sulfur compounds in cooked ham. **Food chemistry**, v. 155, p. 207-213, 2014.

THRESHER, Andrew *et al.* **Are all nitrosamines concerning? A review of mutagenicity and carcinogenicity data.** *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 116, p. 104749, 2020.

TSIKAS, Dimitrios *et al.* S-Nitroso-N-acetyl-L-cysteine ethyl ester (SNACET) and N-acetyl-L-cysteine ethyl ester (NACET)–Cysteine-based drug candidates with unique pharmacological profiles for oral use as NO, H₂S and GSH suppliers and as antioxidants: Results and overview. **Journal of pharmaceutical analysis**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2018.

TUREK, Claudia; STINTZING, Florian C. Stability of essential oils: a review. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 12, n. 1, p. 40-53, 2013.

VAN ASSELT, E. D.; BANACH, J. L.; VAN DER FELS-KLERX, H. J. **Prioritization of chemical hazards in spices and herbs for European monitoring programs.** *Food Control*, v. 83, p. 7-17, 2018.

VAN RECKEM, Emiel *et al.* Next-generation sequencing to enhance the taxonomic resolution of the microbiological analysis of meat and meat-derived products. **Current Opinion in Food Science**, v. 37, p. 58-65, 2021.

VLACHOU, Christina *et al.* Risk assessment of nitrites for the Austrian adult population with probabilistic modelling of the dietary exposure. **Food and Chemical Toxicology**, v. 143, p. 111480, 2020.

WAKAMATSU, Jun-ichi *et al.* Improving the color of meat products without adding nitrite/nitrate using high zinc protoporphyrin IX-forming microorganisms. **Meat science**, v. 161, p. 107989, 2020.

WANG, Lei *et al.* Impacts of chitosan nanoemulsions with thymol or thyme essential oil on volatile compounds and microbial diversity of refrigerated pork meat. **Meat Science**, v. 185, p. 108706, 2022.

WEISS, Jochen *et al.* Advances in ingredient and processing systems for meat and meat products. **Meat science**, v. 86, n. 1, p. 196-213, 2010.

WIEGEL, J. Clostridiaceae. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, p. 1–5, 2015.

WORAPRAYOTE, Weerapong *et al.* Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. **Meat Science**, v. 120, p. 118-132, 2016.

YANG, Yi-fang *et al.* Progress in understanding the effect of lipid oxidation on the formation of four types of harmful substances in meat products. 2021.

YANG, Yueqi; HUANG, Zhangjian; LI, Li-Li. Advanced nitric oxide donors: chemical structure of NO drugs, NO nanomedicines and biomedical applications. **Nanoscale**, v. 13, n. 2, p. 444-459, 2021.

YOTSUYANAGI, Suzana E. *et al.* Technological, sensory and microbiological impacts of sodium reduction in frankfurters. **Meat Science**, v. 115, p. 50-59, 2016.

YU, Xiang; WU, Haizhou; ZHANG, Jianhao. Effect of *Monascus* as a nitrite substitute on color, lipid oxidation, and proteolysis of fermented meat mince. **Food Science and Biotechnology**, v. 24, p. 575-581, 2015.

ZHOU, Yi *et al.* Challenging development of storable particles for oral delivery of a physiological nitric oxide donor. **Nitric Oxide**, v. 104, p. 1-10, 2020.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

Artigo redigido conforme a norma do periódico

Food Technology and Biotechnology

Nonthermal technology for reducing or replacing nitrite in meat products

Running head: Nonthermal technology for nitrite reduction

SUMMARY

Nitrite and nitrate salts are preservatives that act as antimicrobial (bacteriostatic and bactericidal activity) and antioxidant agents during the processing of meat products and confer sensory characteristics to meat (by generating and maintaining colours and flavours). Nitrite is mainly applied as a preservative to prevent the growth of *Clostridium botulinum* and production of toxins. However, nitrite and nitrate are also associated with the production of N-nitroso compounds, such as carcinogenic N-nitrosamines, which may cause adverse health effects. Therefore, the health risks of these preservatives must be weighed against the need to prevent foodborne pathogens from infecting food, especially spores of *C. botulinum*. In this review, we discuss the advantages and disadvantages of using nonthermal technologies as a strategy for partially or totally replacing nitrite in meat products, especially regarding antimicrobial efficacy and N-nitrosamine formation.

Keywords: nitrosamines, *Clostridium botulinum*, irradiation, plasma, high pressure

INTRODUCTION

Curing salts, such as nitrite (NO^{2-}) or nitrate (NO^{3-}), are food additives that must be included in the formulations of cured meat products. Although classified as antimicrobial preservatives, curing salts perform a variety of activities in the meat matrix, such as maintaining the colour and flavour (taste and aroma) characteristics of meat and acting as an antioxidant agent to ensure greater physicochemical stability (1, 2). The use of these additives ensures that the sensory quality and stability of meat products are maintained throughout their shelf life, which is important for customer acceptance and satisfaction. Most cured products are ready-to-eat (RTE) or have not undergone heat treatment before being consumed. For this reason, ensuring the microbiological safety of these products is a major concern in the food industry. The use of additives, such as curing salts, is even more important in meat products with high pH (~ 6.5), as well as products with added mechanically separated meat, products

stored at room temperature, and products handled after processing or subjected to a variable cold chain; this is a particular concern in countries near the tropics, with high temperatures most of the year, and where food is transported over great distances (3, 4).

The minimum amount of nitrite needed to generate sensory characteristics and maintain microbiological safety is variable. In general, 50 to 75 mg/kg nitrite is needed to generate the characteristic cured colour, while a residual concentration of nitrite between 40 and 80 mg/kg is needed to effectively control microbes (5, 6). As nitrites and nitrates are highly reactive, they react with different constituents of the meat and the added ingredients; these reactions are favoured by thermal processes, such as cooking. Therefore, the amount of nitrite or nitrate (hereafter referred to as nitrite/nitrate) added to the formulations is greater than the amount found in the final product and continues to decrease during storage (1). The amount of nitrite/nitrate that is permitted in the final product varies with the legislation of each country. In Brazil, the maximum residual concentrations of nitrite (E249 and E250) and nitrate (E251 and E252) permitted in meat products are 300 and 150 mg/kg, respectively (7). In Europe, the maximum concentration of residual nitrite in non-heat-treated cured products and heat-treated products is 100 mg/kg and 50 mg/kg, respectively (8). The Codex Committee on Food Additives (CCFA/FAO/WHO) has set a maximum limit of 80 mg/kg nitrite in meat products (9).

The nitrite/nitrates present in the human body can be exogenous in origin (when ingested through food, such as vegetables, water, and meat products), or endogenous, such as nitrite/nitrates present in human saliva. According to Milkowski (10), 5% of dietary nitrite/nitrate originates from meat products, and the remainder originates from other foods, such as vegetables. The lethal doses of nitrite/nitrate are 300 and 800 mg/kg body weight, respectively (9). The ingestion of nitrite/nitrate may harm the human body and cause disorders, such as blood disorder-related methemoglobinemia, which results in a lack of oxygen in the cells (4); however, the consumption of nitrite/nitrate in meat products is not a concern due to the low available levels and the amount of meat products generally ingested. The potential health risks associated with the use of these additives mainly results from the generation of N-nitroso compounds (NOCs), especially N-nitrosamines; these compounds exhibit mutagenic and genotoxic properties and therefore have a strong oncogenic effect in humans, particularly with respect to colorectal cancer (11, 12). NOCs can induce cancer in approximately 40 different animal species, including higher primates, and are carcinogenic in multiple organs in animals (13). Due to these concerns, the International Agency for Research on Cancer (IARC) concluded that ingested nitrates or nitrites are probable carcinogens to

humans under conditions favouring endogenous nitrosation; thus, cured meat products were classified as a group 1 carcinogens (11).

N-Nitrosamines are ubiquitous and are found in drinking water, animal or vegetable foods and drinks (14), in addition to cigarettes, pesticides, and cosmetics. However, despite the ubiquity of N-nitrosamines in common environments, individuals argue that curing salts should be banned due to the potential presence of these compounds and the high levels of residual nitrite in meat products. Nevertheless, it is the responsibility of the meat industry to reduce or eliminate the risk of its products, as the scientific community is increasingly focused on designing better strategies to completely or partially replace conventional nitrites in meat products.

Although there is an undeniable need to reduce or remove curing salts from meat formulations, this task is challenging because curing salts additives have multiple purposes. In general, potential nitrite substitutes include the use of natural food dyes to obtain a "cured colour" similar to that of cured products (15, 16); biopreservation techniques involving the use of bacteriocin, essential oils and nitrate-free plant extracts to guarantee microbiological safety (17-19); and the use of "natural curing agents", which replace nitrite with plant extracts that contain relatively high levels of nitrate (20, 21). However, the use of these techniques involves the partial reduction of nitrite or requires additional procedures to generate all the effects (sensory, antimicrobial, and antioxidant) conferred by curing salts (22). Replacing synthetic nitrites with "natural" nitrite sources is not superior to utilizing synthetic nitrite salts and is performed to attain a clean label on the product. Moreover, the labelling and advertising of these products as "naturally cured" can mislead the consumer, as the elimination of N-nitrosamines is not confirmed; the residual nitrite (and possible N-nitrosamine content) of "naturally cured" products is similar (or even greater) to that of products cured with synthetic nitrite or nitrate.

Recently, researchers have suggested the use of S-nitrosotiois (RSNO), which is derived from amino acids or peptides (such as L-cysteine, glutathione, and N-acetyl-L-cysteine), as oxide nitric (NO[•]) carriers for use as total curing salt substitutes in meat products (23-26). Researchers have demonstrated that these carriers show high potential, can provide desirable sensorial and microbiological properties through mechanisms similar to those of nitrite, and can reduce the production of N-nitrosamines. However, research on the use of RSNO in meat products remains in early stages, and there is very little information about its application at the industrial scale. Andrade *et al.* (27) reported that for nitrite concentrations of 100–200 mg/kg, which are commonly used in cured cooked hams, equimolar amounts of

RSNO (S-nitroso-N-acetylcysteine or S-nitroso-N-acetylcysteine ethyl ester) could achieve the same antioxidant effect, instrumental colour and volatile profile characteristic of these products, but producing lower amounts of residual nitrite.

The replacement of additives tends to depend on whether the characteristics of the food product can be maintained in some other way, which is challenging. Replacing nitrite/nitrate in the meat processing industry is complex because the food characteristics (composition, whole, or reconstituted) and processes applied (cooking, fermentation, drying, and smoking) are different. Thus, a proposed alternative to nitrite/nitrate should reduce the amount of N-nitrosamines while maintaining the sensory aspects of product; above all, the nitrite/nitrate alternative should exert effective activity against foodborne bacteria, especially *C. botulinum*, which produces a lethal toxin. In this context, emerging nonthermal technologies have revolutionized the food processing sector, as they increase the shelf life of food and retain the quality, such as nutritional, freshness, and sensory attributes, of food products (28). These technologies have great potential in reducing the health risks of cured meat products, either by allowing the reduction and/or even elimination of nitrite/nitrate salts.

NITRITE/NITRATE EFFECTS

Although nitrate and nitrite salts are used as curing salts, the active curing agent is nitrite, which requires the prior conversion of nitrate to nitrite by nitrate-reducing bacteria (species of *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, or *Staphylococcus*) that are naturally present in meat and produce nitrate reductase (3, 29). Thus, nitrate salts are generally used as reserve agents for the generation of nitrite in products that require a long processing period.

Biochemically, most of the favourable actions of curing salts directly or indirectly result from the NO[•] formed from the decomposition of nitrite in solution. Likewise, the formation of undesirable compounds, such as N-nitrosamines, originates from the reactivity of intermediate components of these reactions (Fig. 1).

Curing in meat products

Soon after nitrite is added to the meat batter, the haem iron present in the deoxymyoglobin (DMb; MbFe⁺²) or oxymyoglobin (OMb; MbFe⁺²O₂) is oxidized, as evidenced by the characteristic brown colour of metmyoglobin (MMb; MbFe⁺³). According to the chemical equilibrium of nitrosylated species, nitrite in an acidic medium (pH 5.8 to 6.2) produces nitrous acid (HNO₂, pK_a = 3.42 at 25 °C), which is in equilibrium with its

anhydrous dinitrogen trioxide (N_2O_3). Under reducing conditions and in the absence of light and oxygen, N_2O_3 decomposes into nitrogen dioxide (NO_2^-) and NO^* . Then, NO^* reacts with DMb to form nitrosylmyoglobin (NOMB; $MbFe^{+2}NO$) and/or with MMb to form nitrosylmetmyoglobin ($MbFe^{+3}NO$), a transient pigment that is converted to NOMB (1, 30). Thus, the binding of NO^* to myoglobin generates the pinkish-red colour pigment NOMB in the raw cured products or the pinkish colour nitrosyl-haemochrome (NOhemo) in the cooked cured products due to the denaturation of the pigment globin protein (Fig. 1a). The generation of these pigments is responsible for developing the characteristic colours of these products (31).

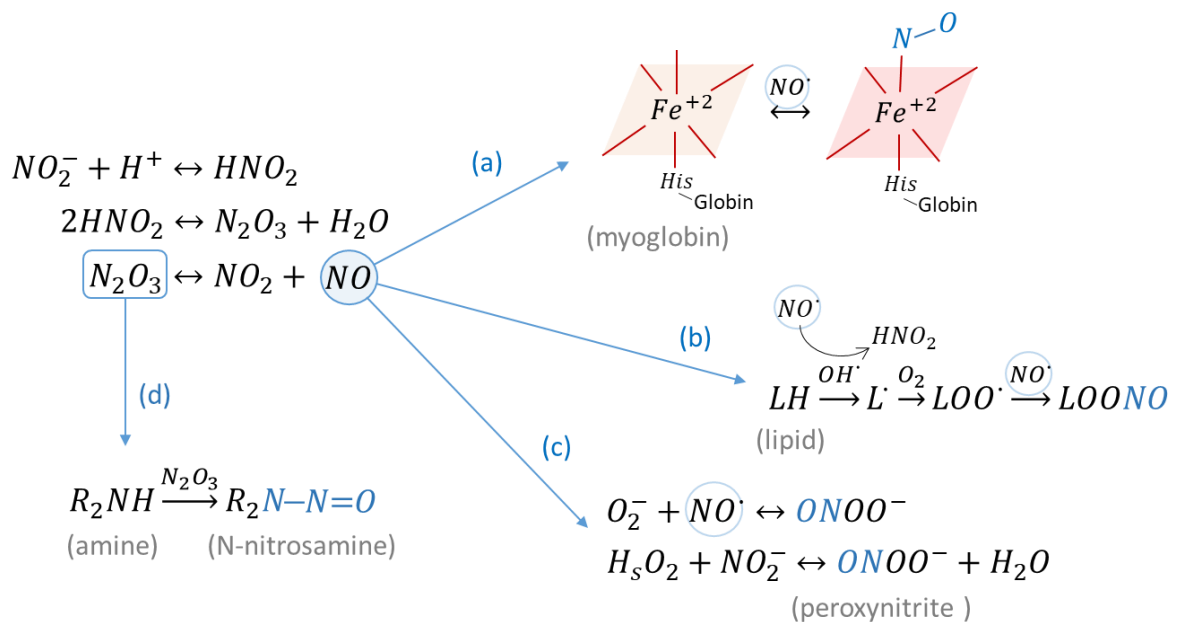


Fig. 1. The mechanisms of nitrite actions in meat curing: (a) development of cured color, (b) antioxidant effect; (c) antimicrobial effect; and (d) N-nitrosamine formation.

In addition, NO^* stabilizes the haem iron of the meat pigments in cured products, limiting the pro-oxidant activity of iron. The presence of transition metals, especially iron (both haem and nonheme), is among the main factors that determines the oxidative stability of meat because they can catalyse different processes and stages of lipid oxidation (32). Lipid autoxidation is a complex process that involves the formation (initiation stage) and propagation of lipid free radicals, beginning with the oxidation of unsaturated lipids by reactive oxygen species (ROS), such as hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide anion (O_2^-) and hydroxyl radicals (OH^\cdot); then, lipid peroxy radicals (L^\cdot , LOO^\cdot) and hydroperoxides (LOOH) are formed that are further degraded into secondary compounds (2, 30). The main secondary compounds released include alcohols, ketones, alkanes, aldehydes, ethers, and

hydrocarbons, which are responsible for the deterioration of sensory aspects, such as odours and flavours associated with lipid oxidation (32). NO[•] chelates free metals and sequesters oxygen and other ROS, inhibiting the initiation of lipid oxidation (Fig. 1b). Moreover, NO[•] shuts down lipid autoxidation by generating nonradical compounds and reacting with lipid peroxy radicals (2). Therefore, the binding of NO[•] to the haem iron of myoglobin prevents its oxidization and destroys the radical chain reactions of lipid oxidations, maintaining the characteristic flavour of cured meat products.

Antimicrobial action

Meat contains nutrients that, under ideal conditions, promote the growth of desirable and undesirable microorganisms. Desirable microorganisms are generally involved in the formation of sensory characteristics and stability of products, as occurs in the fermentation process. Undesirable microbes accelerate the deterioration of products and may cause disease in consumers. In general, the profile of the microbiota present in the meat product is influenced by the initial bacterial count in the raw material, the additional microbial load from the added ingredients, the sanitary conditions during handling, the processing techniques applied, the postprocessing handling method used, the type of packaging, and the distribution and storage conditions (33).

Curing salts can extend the shelf life of meat and meat products by inhibiting the outgrowth of pathogenic and spoilage bacteria. The predominant bacteria associated with the spoilage of refrigerated meat products are *Brochothrix thermosphacta*, *Carnobacterium* ssp, *Lactobacillus* ssp, *Leuconostoc* ssp, and *Weissella* ssp, which cause defects such as sour off-flavours, discolouration, gas production, slime production and decreased pH. Nitrite has an inhibitory effect on the growth of several spoilage bacteria, such as *Enterobacteriaceae* and *B. thermosphact*; however, the presence of nitrite combined with microaerophilic conditions favours the growth of psychotropic lactic acid bacteria (34). Nitrite is also recognized for its bacteriostatic and bactericidal effects against pathogenic bacteria, such as *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Clostridium* spp. (2, 3).

The antimicrobial action of nitrite is also attributed to reactions associated with the decomposition of nitrite to NO[•] (Fig. 1c). More precisely, this activity is directly related to the level of oxidative stress caused by peroxynitrite (ONOO⁻), which is formed by the reaction of nitrite with H₂O₂ and NO[•] with O₂[•] (3). Peroxynitrite is in equilibrium with peroxynitrous acid (ONOOH) under physiological conditions, and both compounds are powerful oxidants and nitrating agents. They lead to the oxidation and nitration of proteins, DNA, and lipids through

direct or indirect oxidative reactions radical-mediated mechanisms (2, 3). Therefore, adding nitrite improves the microbial safety of meat products.

Although different bacteria are influenced by nitrite/nitrate, curing salts are added to specifically control *C. botulinum*, a strictly anaerobic gram-positive rod-shaped (bacillus) bacterium that causes food poisoning (botulism) by a potent and lethal neurotoxin. Botulinic neurotoxins inhibit the release of acetylcholine at synapses and the electrical stimuli responsible for muscle contraction; these process cause paralysis and suffocation, which can lead to death. It is estimated that intoxication can occur with the consumption of foods containing 30-50 ng of toxins (35). *C. botulinum* strains are classified as Group I, II, III, or IV according to the most prevalent way in which the bacterium obtains energy (proteolytic or saccharolytic mechanism) and the threshold and optimal temperature and pH for growth. With respect to public health, the most dangerous spore-formers in low-acid chilled foods (such as meat) are from Group II, the psychrotrophic nonproteolytic strains, which can germinate and grow at temperatures as low as 3 °C (36). Although lower storage temperatures (less than 2 °C) tend to reduce or impede the production of toxins, maintaining this temperature throughout the distribution and storage chain to the point of sale is very challenging, especially in developing countries. Therefore, nonproteolytic *Clostridium* can only be controlled through the presence of residual nitrite, which prevents the germination of spores and, consequently, inhibits the production of toxins.

Nitrites show antibotulinal activity in a heated system by preventing vegetative cell growth from spores and inhibiting the cell division of any vegetative cell. In addition to the action of the peroxy nitrite formed, the main inhibition of *C. botulinum* by nitrite may involve a reaction between NO[•] and important iron–sulphur enzymes (e.g., ferredoxin and yruvate-ferredoxin oxidoreductase) necessary for energy production in clostridial vegetative cells (37, 38). However, despite the high lethality of *C. botulinum*, the survival or growth of this microorganism in the reformulated product is not considered in many studies on the replacement and/or reduction of nitrite in meat products.

N-Nitrosamine formation

N-Nitrosamines are a class of compounds that contain a nitrous group (-N-N=O) attached to a secondary amine (R₂-), which can present different radicals (generally hydrocarbons), allowing a wide variety of compounds. Once present in the human body, these compounds undergo enzymatic metabolization and produce the diazonium radical, which is a

very reactive electrophile that can react with cellular macromolecules, such as nitrogenous bases (nucleophilic species) present in DNA (12).

N-Nitrosamines are divided into volatile N-nitrosamines and non-volatile N-nitrosamines. The former are typically potent carcinogenic nitrosamines present in processed meat products, including N-nitrosodimethylamine (NDMA), N-nitrosodiethylamine (NDEA), N-nitrosopiperidine (NPIP), N-nitrosopyrrolidine (NPYR), N-nitrosomorpholine (NMOR), N-nitrosomethylethylamine (NMEA), N-nitroso-di-n-propylamine (NDPA) and N-nitrosodibutylamine (NDBA). Among the volatile compounds for which N-nitrosamines have been studied, only 18% are considered noncarcinogenic, while the nonvolatile N-nitrosamines are weakly carcinogenic or assumed to be noncarcinogenic (39). The lack of carcinogenic potential by some N-nitrosamines is attributed to their chemical structure. Species with high molecular weight radicals, as well as extensive carbon chains, are less susceptible to metabolization and consequently the release of diazonium radicals due to steric hindrance. Therefore, N-nitrosamines of lower molecular weight, such as NDMA and NDEA, have the highest mutagenic potential (12).

In meat, N-nitrosamines are formed during processing through reactions between secondary amines and nitrosating agents, such as N_2O_3 , which are derived from the curing reactions of nitrite to NO^* (Fig. 1d) (12, 39). In the food processing industry, ascorbate or iso-ascorbate (or erythorbate) salts are commonly used to accelerate curing reactions and, consequently, reduce processing time and the availability of nitrosating agents to form N-nitrosamines (3). However, according to Majou and Christeians (3), ascorbate can also participate in the reduction cycle of metmyoglobin reductase (MMR), generating NO^* from nitrite, which binds to DMb and maintains the production of O_2^* and H_2O_2 ; these increase peroxynitrite production and promoting antimicrobial activity.

The N-nitrosamines found in cured meat products are called preformed N-nitrosamines, and their inhibition during processing remains a major challenge for the safety of meat products. The levels of N-nitrosamines in meat products vary widely, from undetectable ($<1 \mu\text{g}/\text{kg}$) to several thousand parts per billion ($\mu\text{g}/\text{kg}$) orders of magnitude, depending on the type of N-nitrosamines (14, 39). However, in addition to the N-nitrosamines found in different types of food products (14), they can also be formed endogenously during food digestion under acidic conditions (pH close to 3.0) in the human stomach. It is estimated that endogenous formation contributes 45%-75% of the total human exposure to NOC (40). According to Hinuma *et al.* (41), the stomach is an important place for nitrosation because the precursors of N-nitrosamines, such as secondary amines and nitrite, enter the stomach in

foods with saliva, and the acidity of gastric juice may be appropriate for nitrosation. Importantly, nitrite is also formed in the human body from the reduction of nitrate by bacteria in the oral cavity; therefore, humans are primarily exposed to nitrite from the consumption of vegetables and water, which are the main sources of nitrate intake (4, 41).

NON-THERMAL TECHNOLOGIES

Antimicrobial technologies in food processing can be classified as thermal or nonthermal. During thermal processing, food is preserved by exposure to a very high temperature, which decreases microbial growth or contamination from food but also leads to some deleterious effects on food products, such as a loss of heat-sensitive nutritional components, textural changes in food, changes in rheological characteristics and changes in sensory attributes (28). In nonthermal processing, food is processed at near room temperature and is not damaged due to heat-sensitive nutritious materials; these processes results in a reduction in the microbial load in food with an increase in shelf life, achieving good sensory and textural characteristics (42). Various researchers have proposed the use of nonthermal techniques to reformulate meat products by reducing or replacing curing salts to enhance the quality of products and meet consumer expectations.

Irradiation

Food irradiation involves exposing food to a controlled amount of ionizing radiation (energy). With irradiation, little or no heating is applied to the food matrix, nothing is added to the food, and less energy and water are needed for processing. Additionally, irradiation can be applied to either packaged or bulk food in large or small quantities. The amount of energy absorbed, which is expressed in grey (Gy) – equivalent to one unit of joules per kilogram of food (J/kg), can be disrupted by several factors, including physicochemical properties (temperature, physical state, and density) of the food to be irradiated, the dose applied, the exposure time and the distance of the food to the radiation source (43, 44).

Ionizing radiation can be classified into high-speed electrons, alpha (α ; composed of two protons and two neutrons) and beta (β ; composed only of electrons), and elementary particles of electromagnetic waves, X-rays and gamma rays (γ), which have zero charge, and the latter being the most energetic (44). Stronger interactions of radiation with matter are known to occur for high-energy charged particles emitted from electron beams than for photons of gamma rays and X-rays. Therefore, the three types of radiation used for treating foods show different penetration and effects with respect to the microbiological and

physicochemical qualities of foods (45). Gamma particles can penetrate matter more intensely by emitting continuous rays at a predictable rate and, therefore, are the most important type of radiation in the food processing industry. In general, the radioactive isotopes cobalt-60 (^{60}Co) and caesium-137 (^{137}Cs) are used for the emission of gamma rays (42, 44). However, the future use of these isotopes is uncertain due to the rising prices of cobalt-60, increased public concerns about the safety of radioactive materials and issues related to their safe disposal (45). This safety concern has provided an opportunity for the application of electron beams in food products; electron beam accelerators are used to generate high-energy electrons (of 10 mega-electronvolts – MeV) that can penetrate up to 39 mm deep in food with high moisture content (42). As the energy of ionizing radiation is high but lower than the threshold of nuclear reactions, food does not become radioactive (44). Therefore, the use of ionizing radiation in food processing has been approved and regulated in as many as 60 countries.

Irradiation can increase the shelf life of foods and increase their safety. The process promotes chemical, physical, and biological changes in the structure of microorganisms, preventing their multiplication; direct irradiation results in the unfolding of DNA and damage to nucleic acids, and the ionization of water molecules results in oxidative damage to microbial cells (42, 43). According to Ehlermann (46), the effects of irradiation applications in food processing to control the growth of microorganisms can be classified as radappertization, radacidation, or radurization, which are differentiated by the dose of radiation applied. Radappertization involves the use of extremely high doses of radiation (greater than 10 kGy), ranging between 30 and 50 kGy. These doses can kill all microorganisms in foodstuffs up to the level of spores and are typically used in the sterilization process. During radacidation, moderate doses of radiation (between 1 and 10 kGy) are used to reduce spoilage and microbial pathogens, resulting in food pasteurization. Low doses (less than 1 kGy) are used in the radurization process to inhibit respiration, control microbial growth in fresh meats, slow the ripening of vegetables, and prevent infestations of insects and parasites in grains and fruits.

Irradiation alters food components in meat, particularly lipids and proteins, but can preserve the original quality of the meat (47). Fats begin to oxidize when exposed to radiation, leading to rancid off-flavours, oxidation of the meat pigment, and unfavourable colour changes (48, 49). Nevertheless, food irradiation at doses up to 10 kGy does not cause any unique nutritional issues (47).

The recent results obtained using irradiation in cured meat processing related to microbial control and/or N-nitrosamine formation are presented in Table 1.

Table 1. Recent research with gamma irradiation application for microbial control and reduction of N-nitrosamines in meat products.

Reference	Product	Assessment	Main conclusions
Rodrigues <i>et al.</i> (50)	Sausage	Effect of different gamma irradiation doses (1.5, 3.0 and 4.5 kGy) associated with reduced sodium content (2 and 1.25%) on microbiological safety and shelf life of cured (150 mg/kg nitrite) cooked sausages.	The reduction in microbial load was dose dependent; the minimum dose (1.5 kGy) provided reductions of up to 6 log cycles in lactic acid bacteria.
Dutra <i>et al.</i> (5)	Mortadella	Effect of different gamma irradiation doses (0, 10 and 20 kGy) associated with different levels of nitrite (0, 150 and 300 mg/kg) in products inoculated with spores of <i>Clostridium botulinum</i> (10^7 spores/g).	Gamma irradiation of 10 kGy is capable of inactivating <i>C. botulinum</i> , regardless of the addition of nitrite salts.
Silva <i>et al.</i> (51)	Cooked ham	Effect of different gamma irradiation doses (0, 1.5, 3.0, 4.5 and 6.0 kGy) associated with different levels of sodium nitrite (0, 50 and 150 mg/kg) on <i>Clostridium sporogenes</i> (10^7 spores/g).	The guarantee of microbiological safety was obtained with 50 mg/kg of nitrite and irradiation with a dose of 1.5 kGy.
Silva <i>et al.</i> (49)	Cooked and sliced ham	Effect of different gamma irradiation doses (0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 kGy) on <i>Listeria monocytogenes</i> (10^6 CFU/g) survival and development in products formulated with different levels of nitrite (0, 50 and 150 mg/kg).	There was a synergistic effect between the use of nitrite and irradiation against <i>Listeria</i> , being estimated to eliminate <i>Listeria</i> irradiation with 1.5 kGy for 150 mg/kg of nitrite and irradiation with 1.8 kGy for 50 mg/kg of nitrite.
Wei <i>et al.</i> (53)	Chinese Rugao ham	Effect of gamma irradiation application (5 kGy, rate 10-15 kGy/h) on the profile of biogenic amines, N-nitrosamines and residual nitrite in products added with 150 mg/kg of nitrite.	Irradiation was able to reduce the residual nitrite content. The levels of some biogenic amines (tyramine and putrescine) decreased and others (spermidine, cadaverine, tryptamine and phenylethylamine) increased. Irradiation is capable of degrading volatile N-nitrosamines.

Reference	Product	Assessment	Main conclusions
Ahn <i>et al.</i> (54)	Smoked sausage	Effect of different gamma irradiation doses (0, 5, 10 and 20 kGy) on products added with 150 mg/kg of nitrite.	The application of 10 and 20 kGy reduced the formation of N-nitrosodimethylamine (NDMA) in the vacuum-packed product or under aerobic conditions. N-nitrosopyrrolidine (NPYR) was not detected in irradiated samples, regardless of concentration.
Ahn <i>et al.</i> (55)	Sausage	Effect of applying different irradiation doses (0, 5, 10, 20 and 30 kGy) on products added with 156 mg/kg of nitrite, stored in aerobic and anaerobic packaging.	Irradiation to control nitrosamines was more effective in products stored in aerobic packaging, with a reduction effect starting at 10 kGy. In anaerobic packaging, a minimum dose of 20 kGy was required.
Ahn <i>et al.</i> (56)	Sausage	Effect of irradiation (0, 5, 10 and 20 kGy) and different nitrite levels (75 and 150 mg/kg) on N-nitrosamine content during storage (4 weeks / 4 °C).	The effect of irradiation on N-nitrosamines was observed with storage. A dose equal to or greater than 10 kGy was necessary to control N-nitrosodimethylamine (NDMA) and N-nitrosopyrrolidine (NPYR).

CFU = colony form units

When doses lower than 6.0 kGy were applied, a significant, dose-dependent reduction in vegetative cells was reported for spoilage microorganisms and pathogens (50, 51). In cooked ham, Silva et al. (52) reported that the number of *C. sporogenes* spores recovered decreased with increasing doses of radiation (up to 6.0 kGy), but the radiation sensitivity (D-values) decreased from 1.98 kGy in uncured samples to 1.81 and 1.57 kGy in cured samples. According to these authors, the microbiological safety was guaranteed with 50 mg/kg nitrite and irradiation at a dose of 1.5 kGy. Nevertheless, Dutra et al. (5) reported that gamma irradiation greater than 10 kGy could inactivate *C. botulinum* spores, regardless of the addition of nitrite salts. However, the resistance of spores to irradiation depends upon multiple factors, such as the type of spores (proteolytic or nonproteolytic strains), the temperature of the product and environment, the medium of treatment, and the initial dose of microorganisms; compared to nonproteolytic strains, proteolytic *C. botulinum* spores are more resistant to irradiation (53).

The radiolysis (dissociation of molecules) caused by gamma radiation also helps reduce the amount of residual nitrite and N-nitrosamines in meat products. Furthermore, products that handle irradiated nitrites cannot function as nitrosating agents; therefore, the formation of N-nitrosamines can be inhibited (55-59). Although positive bactericidal effects and N-nitrosamine degradation have been verified, the use of radiation may be limited due to changes in the sensory characteristics of the product. Considering that radiolysis is not selective, the lysis of other substances, such as water, can also occur; this process releases hydroxyl radicals (OH[•]), which can increase the extent of lipid oxidation in food products. Lipid oxidation induced by radiolysis produces compounds, such as sulfurates, can negatively modify aroma and taste, impairing the sensory acceptance of meat products (51, 60-62). Although irradiation intensifies lipid oxidation, Dutra *et al.* (61) observed that adding nitrite to emulsified sausages had a greater effect than irradiation on the quality parameters evaluated; even at low levels (~75 ppm), the use of irradiation decreased the deleterious effects of irradiation at doses as high as 20 kGy.

Therefore, the use of irradiation has great potential as a tool for reformulating meat products aimed at reducing nitrite levels, contributing to the reduction of residual nitrite and N-nitrosamines while ensuring microbiological safety. However, the level of nitrite reduction and irradiation dosage applied must be evaluated for each specific meat product (emulsified, fermented, smoked, etc.), as well as the technical and financial feasibility of this type of application. Moreover, it is crucial to change the current consumer perceptions about irradiation since it restricts the growth of this technology in the food industry sector.

Plasma

Cold plasma is an emerging, economical and environmentally friendly technology with potential applications in the food and bioprocessing industry, including microbial decontamination, enzyme inactivation, shelf life extension, and physicochemical modification (63).

Plasma is the fourth state of matter and is formed by gases subjected to extremely high energies; as a result, molecular agitation overcomes the energy of external electrons. Then, the released electrons form a shapeless, electrically neutral mass composed of electrons and dissociated nuclei (64). Basically, plasma treatment can be divided into two types: thermal plasma and cold plasma (nonthermal). Thermal plasma produces a large amount of energy by utilizing high temperature. Cold plasma is a nonthermal treatment that works in the temperature range of 25–65 °C (42, 65). Cold plasmas can be induced and sustained through an electric discharge in a gas at atmospheric or low pressures, using the corona, dielectric barrier discharge (DBD), or gliding arc discharge configurations (66); cold plasmas can be obtained using air and feed gases, such as helium, nitrogen, and argon, or a mixture of gases, which are subjected to different levels to increase the kinetic energy of electrons. Depending on the discharge gas, the cold plasma process yields different biologically active agents: reactive oxygen species (ROS), including atomic oxygen, ozone (O₃), hydroxyl radical (OH[•]), and hydrogen peroxide (H₂O₂); and reactive nitrogen species (RNS), such as peroxyxynitrite (ONOO[•]), nitrate (NO₃⁻), nitrite (NO₂⁻), their corresponding acids, and nitrogen oxides (NO_x) (64, 65). The reactive species and their concentration in the plasma vary depending on many factors, including the gas in which plasma is induced, the configuration of the plasma source, the power input to the gas, the duration of treatment, and the humidity levels (66).

In food processing, cold plasma is an effective strategy for controlling microbial development. The ROS generated from plasma detrimentally interact with vital cellular biomolecules, such as DNA, proteins and enzymes, in cells and may alter the function of biological membranes via interactions with lipids; this process causes unsaturated fatty acid peroxides to form and amino acids in proteins to oxidize (53, 65, 66). The mechanism of action of cold plasma is different for gram-positive and gram-negative bacteria. Cleavage of specific peptidoglycan bonds and oxidation of lipids present in lipopolysaccharides occur in gram-negative bacteria, while oxidative damage to intracellular components, such as DNA, occurs in gram-positive bacteria (67). The effectiveness of the antibacterial action depends on numerous factors, including the type of plasma discharge, operating conditions, choice of gas,

relative humidity of the product, state (solid or liquid) of the food, and the microorganisms present (66).

Due to the formation of RSN during its application, plasma can generate a "natural" source of nitrite. Therefore, in meat processing, cold plasma has been used to induce the curing process and is applied postprocessing (68); in addition, cold plasma can be incorporated into the processing steps directly into the meat batter (69) or indirectly when applied to water (64, 70-72) or some ingredient (73, 74) of the formulation. When plasma is applied to the water that is incorporated into the formulation, this mixture can be considered an additive. According to Jung *et al.* (70), the application of plasma in deionized water can favour its acidification (pH decreases from 7 to 2), and a concentration of 782 mg/L nitrite and 358 mg/L nitrate can be formed after 120 min. When the meat mass is directly exposed to cold plasma, a concentration of 66 mg/kg nitrite is formed after 30 min of application (69). In general, the level of nitrite production tends to increase with increasing plasma potency (71), but since the application of cold plasma increases the temperature of the meat mass, the optimal nitrite content without exceeding the recommended temperature (< 13 °C) was reported to be 42 mg/kg (72). Nevertheless, as previously described, it is important to highlight that replacing synthetic nitrites with "natural" nitrite sources does not provide healthier or safer advantages over synthetic nitrite salts.

Similar to the irradiation process, cold plasma produces free radicals and reactive species via gaseous electrical discharge that act as antibacterial agents but can also induce lipid oxidation, especially during the storage of meat products (63, 73). Lipid oxidation induced by an oxygen-containing cold plasma process can affect the acceptability and shelf life of foods. The nutritional, sensory, and other quality attributes can change depending on the cold plasma process, time, and exposure conditions. In the case of solid foods, however, the lower penetration depth of plasma and the reactive species (10–50 µm depth) affect only the surface and help retain nutrients inside the product (65).

In **Table 2**, we summarize the results obtained to date from cold plasma treatment of meat, both in terms of microbial control (other than *C. botulinum*) and minimization of N-nitrosamines. Although the application of cold plasma in meat processing has high potential, this decontamination technology is a relatively newer approach in the food industry, and more research is needed to optimize the technology for specific applications in meat processing. Since there are no reports on the effect of cold plasma treatment on *C. botulinum* growth and N-nitrosamine levels, further research is needed to clarify its effectiveness in reducing the risks attributed to the use of nitrite/nitrate in meat products.

Table 2. Recent research with cold plasma application for microbial control and reduction of N-nitrosamines in meat products.

Reference	Product	Assessment	Main conclusions
Inguglia <i>et al.</i> (63)	Jerky beef	Effect of applying cold plasma (20 kHz; supplied with air or nitrogen) in brine water with different nitrite contents (0, 50 and 150 mg/kg) in products inoculated with <i>Listeria innocua</i> .	Only plasma-treated samples had residual nitrite concentrations. A reduction of 0.5 log CFU/mL of <i>Listeria</i> was verified in the samples treated with plasma, regardless of the nitrite content.
Yong <i>et al.</i> (74)	Jerky beef	Effect of applying cold plasma (4 kHz; air) for 0, 20, 40 and 60 min after marinating pork meat in brine (with and without nitrite).	The application of cold plasma for 40 minutes was sufficient to reach the same nitrite concentration as in the conventional formulation (150 mg/kg). Greater antibacterial action against <i>Staphylococcus spp.</i> and <i>Bacillus spp.</i> was verified in samples treated with cold plasma.
Gök <i>et al.</i> (75)	Pastrami	Effect of application time (0, 180 and 300 s) and composition of oxygen, argon and two oxygen/argon mixtures (25:75 and 50:50) of cold plasma on the control of <i>Staphylococcus aureus</i> (10 ⁶ CFU/g) and <i>Listeria monocytogene</i> (10 ⁶ CFU/g).	There was a reduction in the counts of <i>S. aureus</i> (0.85 log CFU/cm ²) and <i>L. monocytogenes</i> (0.83 log CFU/cm ²), regardless of the time of application. Plasma from oxygen gas was more effective for the reduction of <i>L. monocytogenes</i> .
Marcinkowska-Lesiak <i>et al.</i> (72)	Sausage	Effect of plasma application in plant solutions (soybean and lentil) as a substitute for nitrite (75 mg/kg) on microbiological and technological characteristics.	There was no difference in residual nitrite content (50 mg/kg) and in the development of aerobic bacteria, regardless of treatment.
Kim <i>et al.</i> (73)	Sausage	The effect of adding onion powder treated with plasma (550 W and 25 kHz) and without sodium nitrite on carcinogenic potential was evaluated using the Ames test.	Onion powder treated with plasma did not show an increase in the number of His ⁺ revertant colonies, suggesting safety for application.

CFU = colony form units.

High-pressure process

High hydrostatic pressure (HHP) technology is applied in food processing mainly to control microbes through enzyme inactivation (28, 77). In an HPP system, the high pressure (100–1000 MPa) is uniformly distributed by an incompressible (hydraulic) fluid, usually water, to packaged food in a thermally insulated airtight vessel; this process provides a pasteurization effect through the uniform and instantaneous application of isostatic pressure for approximately 10–20 min. According to the isostatic principle, when pressure is applied to a liquid medium in a closed environment, equal pressure is applied to the food product at any point, regardless of its size and shape; therefore, food products of different volumes can be processed within the same batch. Moreover, HPP reduces the influence of temperature on food components. Although the effect of high pressure induces adiabatic heating in water at 3 °C every 100 MPa, the initial pasteurization temperature is controlled within 5–10 °C so that the water temperature will not exceed 30 °C when the pressure reaches 600 MPa (78, 79). The efficiency of HPP application can be affected by several parameters related to the process (such as adiabatic heating, decompression time, pressure level, combination of time and pressure, and packaging material), as well as factors intrinsic to the product (pH, water activity, composition, etc.) and extrinsic factors (storage and transport conditions) (28).

In addition to increasing the health benefits of food products, HPP is a nonthermal technique that potentially enhances the shelf life of food and maintains its quality and safety. In addition to inactivating pathogens, this technology provides several positive effects, as it better preserves the flavour compounds and provides better nutritional value compared to conventional thermal methods (42). HPP acts in the range from 5 to 30 °C, which reduces the occurrence of the Maillard reaction and caramelization and prevents the release of new aromatic compounds; consequently, the use of colouring and flavouring agents for meat products is reduced. On the other hand, HPP can affect the microstructure and negatively affect the texture and water retention capacity of certain meat products (80). Regarding food safety, although high pressure can eliminate pathogens, a large variety of microbes with different physiological characteristics occur in food products, which leads to highly diverse pressure tolerance characteristics among these microbes. HHP treatment is more effective against eukaryotes, gram-negative bacteria, protozoa, and parasites than against yeast and mould, which inactivate at much higher pressures (28, 78).

In recent years, the success of HHP against important pathogens in meat products has been reported in several studies (Table 3).

Table 3. Recent research with high hydrostatic pressure (HHP) application for microbial control and reduction of N-nitrosamines in meat products.

Reference	Product	Assessment	Main conclusions
Higuero <i>et al.</i> (81)	Dry-cured sirloin (sliced)	Effect of HHP treatment at 600 MPa for 7 min on technological and physicochemical characteristics of products made with reduced amounts of sodium nitrite and nitrate (150, 75, 37.5 and 0 mg/kg), sliced and stored under refrigeration for 240 days.	The HPP treatment applied (600 MPa, 7 min) minimally affected the color and oxidation of lipids and proteins, regardless of the added sodium nitrite/nitrate content. The reduction of nitrate/nitrite in up to 75 % proved to be feasible without affecting the instrumental color, lipid and protein oxidation.
Lopez <i>et al.</i> (82)	Fermented sausage	Effect of HHP applied at 593 MPa for 290s in fermented sausages made without nitrite and inoculated with <i>Listeria innocua</i> (106 CFU/g) and <i>Salmonella enterica</i> (10 ⁶ CFU/g) strains.	Sausages that were treated with HHP reduced by up to 4.74 and 3.83 log CFU/g for <i>L. innocua</i> and <i>Salmonella spp.</i> , respectively.
Balamurugan <i>et al.</i> (83)	Cooked Sausages	Effects of HHP (600 MPa for 3 min) and hot water (HW; 75°C for 15 min) pasteurization on the inactivation of inoculated <i>Listeria monocytogenes</i> (10 ⁸ CFU/g) in vacuum-packaged cooked sausages and their recovery during storage at 4 and 10°C for 35 days.	The combined effect of HPP and HW resulted in a > 6 log reduction in the number of <i>L. monocytogenes</i> inoculated during storage, regardless the temperature.
Lavieri <i>et al.</i> (84)	Restructured ham (sliced)	To investigate the effect of 0.50 and 100 mg/Kg of vegetable source nitrite and the use of HHP at 400 and 600 MPa for 4 min on the <i>Listeria monocytogenes</i> count inoculated (10 ⁵ CFU/g) into slices of restructured ham.	Treatment of 600 MPa HHP for 4 min led to populations of <i>L. monocytogenes</i> below the limit of detection, independent of the added nitrite concentration.
Myers <i>et al.</i> (85)	Cooked ham (sliced)	Effect of added nitrite source (chemical or vegetable powder) and HHP (600 or 400 MPa for 3 min) on <i>Listeria monocytogenes</i> (10 ⁶ CFU/g) growth and physicochemical and technological characteristics.	The application of HHP at 600 MPa, regardless of the nitrite source used, reduced the number of <i>L. monocytogenes</i> by more than 3 log CFU/g, whereas the use of 400 MPa had a minimal effect. Furthermore, the use of HHP did not change the concentration of residual nitrite in the formulations.

Reference	Product	Assessment	Main conclusions
Myers <i>et al.</i> (86)	Cooked ham and turkey (sliced)	Effect of HHP treatment at 600 MPa for 3 min in products made with different meat species and varying sodium nitrite concentration (0 and 200 mg/kg), both inoculated (10^5 CFU/g) with <i>Listeria monocytogenes</i> , over 28 days of refrigerated storage.	The use of HHP reduced <i>L. monocytogenes</i> counts by more than 3 log CFU/g after 182 days in storage, while cured products achieved growth.
Cava <i>et al.</i> (87)	Salchichón and Dry-cured loin	The effect of applying HPP (600 MPa, 8 min) on the control of <i>L. monocytogenes</i> was evaluated in products made with 150 mg/kg of nitrite, sliced and vacuum-packed.	Average reductions of 2.30 log CFU/g in the <i>L. monocytogenes</i> population were observed immediately after high-pressure treatment.
Pietrzak <i>et al.</i> (88)	Cooked ham	Effects of HHP (600 MPa, 10 min, 20 °C) on the control of <i>Salmonella</i> , coliforms and <i>Staphylococcus aureus</i> in nitrite-reduced ham (50 and 80 mg/kg).	The reduction of sodium nitrite did not affect the microbiological quality when associated with high pressure after 8 weeks of storage.
Hayman <i>et al.</i> (89)	Pastami, Strassburg, Sausage and Cajun meat	Effect of HHP (600 MPa, 20°C, for 180 s) on shelf-life extension and safety against <i>L. monocytogenes</i> .	High pressure was efficient in controlling aerobic and anaerobic bacteria, generating counts below detectable limits and lower than untreated ones after 95 days of storage at 4 °C.

CFU = colony form units.

HPP exhibits antibacterial activity by modifying the morphology of the microorganism, which causes damage in the cell membranes, the denaturation of proteins and enzymes involved in important genetic mechanisms and chemical reactions that inhibit the growth of microorganisms. The inactivation of microorganisms through HPP may also be related to the rupture of the cell membrane, the formation of ripples and subsequent swelling and reduction in cell volume (79). However, although HPP inactivates bacteria, it only partially inactivates spores. Moreover, *C. botulinum* spores are very resistant to HPP, especially at room temperature; in a minced raw chicken inoculated with five nonproteolytic strains of *C. botulinum*, which were cooked and treated at 600 MPa for 2 min at 20 °C, Linton et al. (81) observed that the spores survived after treatment and germinated during storage. Factors related to bacteria (type, initial count, etc.), food matrix (pH, water activity, etc.) and treatment conditions (pressure cycles, temperature, etc.) influence the resistance of cells and spores to the applied HPP or even the combination of treatments. Similarly, spore recovery after HPP application depends on the medium, additives and incubation conditions (53). Therefore, many researchers have combined HHP with sodium nitrite or other antibacterial agents (bacteriocin, plant extract, essential oil, etc.) to reduce the addition of sodium nitrite or produce a synergistic antibacterial effect.

Therefore, the application of HHP on an industrial scale has been recommended, mainly for postprocessing and ready-to-eat (RTE) packaged products. In this sense, the use of HHP as a sterilization treatment helps reduce the need to add nitrite to meat products, meeting the growing consumer demand for natural, preservative-free, and minimally processed products. However, research on this technology is scarce, especially regarding the effects on the survival of *C. botulinum* and the quantification and formation of N-nitrosamines in cured meat products.

Prospects

Some additional nonthermal technologies—such as pulsed electric field (PEF) and ultrasound—have not been tested as strategies for replacing nitrite in meat products. However, promising results have been obtained in the reduction of other ingredients, such as salt (sodium chloride) and phosphate, with increased diffusion of salting.

PEF processing involves repeated applications of pulses with an electric field strength of 0.1–100 kV/cm to the food between the electrodes; the resulting electric field causes the formation of pores in the cell membranes of microbes (91). Although the application of PEF in solid foods is less studied than its application in liquid foods (42)—in which researchers

aim to sterilize and inactivate enzymes—this technology may reduce the amount of sodium nitrite and the curing time needed by disrupting cellular tissues and affecting the mass transfer processes (92).

Ultrasonication is used at different frequencies, including low-frequency (20 kHz–100 kHz), medium-frequency (100 kHz–1 MHz), and high-frequency (1 MHz–100 MHz) ultrasonication; low-frequency ultrasonication produces large shear forces in the medium, whereas high-frequency ultrasonication produces less shear force in the medium (42). The propagation of mechanical energy by ultrasonic waves results in a cavitation effect, which is characterized by compression (negative pressure) and decompression (positive pressure) zones. The resulting gas bubbles can implode when unstable, promoting an increase in temperature and pressure that exerts mechanical, chemical, and biochemical effects (93). Due to the effects caused by cavitation and other acoustic phenomena, ultrasound can affect the technological properties of proteins and meat products; thus, this technology has already been applied to reduce sodium chloride and additives, such as phosphate (94, 95).

CONCLUSIONS

In addition to ensuring the sensory quality and food safety of meat products, the use of curing salts can promote the formation of N-nitrosamines. Completely replacing curing salts is challenging due to the versatility and effectiveness of these additives in developing the sensory characteristics of food products and controlling microbial growth. Thus, a validated alternative to curing salts that can be applied on an industrial scale is lacking in the food processing industry. Most alternative technologies have not adequately reduced the use of N-nitrosamines in meat products. Combining technologies may be an effective alternative to curing salts, limiting the generation of N-nitrosamines without impairing the sensory characteristics of the product.

However, there are gaps in the relevant research on antimicrobial effects, particularly the effects of these alternative techniques on highly toxic *C. botulinum*. The difficulty in performing tests on highly resistant spores of *C. botulinum* spores is among the main challenges in this field of food safety research. *C. botulinum* spores are generally resistant to HPP and irradiation, but promising results in terms of inactivation have been achieved when one of these techniques were combined with heat treatment. Likewise, nonthermal technologies can be used to exert synergistic effects on the inactivation of *C. botulinum*.

Although nonthermal technologies generally require higher initial investments, maintenance and high energy inputs compared to conventional thermal processes, these

methods achieve high operational efficiency. Future research related to nonthermal technologies should focus primarily on increasing the cost-effectiveness and viability of these technologies to broaden their production and marketing scope in the food processing sector. Through this research, nutritious and safe food can be generated without eliminating the sensory characteristics that make these foods palatable to consumers.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Higher Education Personnel Improvement Coordination (CAPES/Brazil) for the doctorate scholarships granted to the first author, and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq/Brazil) for the Research Productivity Fellows (PQ) granted to the last two authors.

FUNDING

This work was funded by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq/Brazil; Award Number: 430206/2016-0) and Minas Gerais State Research Support Foundation (FAPEMIG/Brazil; Award Number: CVZ APQ 02904-17).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

There are no supplementary files.

REFERENCES

1. Honikel KO. The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Sci.* 2008;78(1–2):68-76. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.05.030>
2. Jo K, Lee S, Yong HI, Choi Y-S, Jung S. Nitrite sources for cured meat products. *LWT - Food Sci Tech.* 2020;129:109583. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109583>
3. Majou D, Christieans S. Mechanisms of the bactericidal effects of nitrate and nitrite in cured meats. *Meat Sci.* 2018;145:273-84. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.06.013>
4. Shakil MH, Trisha AT, Rahman M, Talukdar S, Kobun R, Huda N, et al. Nitrites in cured meats, health risk issues, alternatives to nitrites: a review. *Foods (Basel, Switzerland).* 2022;11(21):3355. <https://doi.org/10.3390/foods11213355>

5. Dutra MP, Aleixo GC, Ramos ALS, Silva MHL, Pereira MT, Piccoli RH, et al. Use of gamma radiation on control of *Clostridium botulinum* in mortadella formulated with different nitrite levels. *Radiat Phys Chem.* 2016;119:125-9.
<https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2015.10.008>
6. Sindelar J, Milkowski A. Sodium nitrite in processed meat and poultry meats: a review of curing and examining the risk and benefit of its use. *White Paper, Series.* 2011;3:1-14.
7. ANVISA RDC no. 52, May 14 2019, Provides for food additives authorized for use in meat and meat products (in Portuguese), 272. Sect. 1 (2019).
8. EFSA. Opinions of the Scientific Panel on biological hazards (BIOHAZ) related to the effects of Nitrites/Nitrates on the Microbiological Safety of Meat Products. 2004;14:1-34.
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2004.14>
9. CCFA. Codex general standard for food additives (GSFA): CODEX STAN 192-1995. Rome: Codex Committee on Food Additives; Food and Agriculture Organization of the United Nations; World Health Organization, 2021.
10. Milkowski AL. Sources of Exposure to Nitrogen Oxides. In: Bryan NS, Loscalzo J, editors. *Nitrite and Nitrate in Human Health and Disease.* Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 69-82.
11. IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Red Meat and Processed Meat. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2018.
12. López-Rodríguez R, McManus JA, Murphy NS, Ott MA, Burns MJ. Pathways for N-Nitroso Compound Formation: Secondary Amines and Beyond. *Org Process Res Dev.* 2020;24(9):1558-85. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.0c00323>
13. Bogovski P, Bogovski S. Special report animal species in which n-nitroso compounds induce cancer. *Int J Cancer.* 1981;27(4):471-4. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910270408>
14. Park J-e, Seo J-e, Lee J-y, Kwon H. Distribution of Seven N-Nitrosamines in Food. *Toxicol Res.* 2015;31(3):279-88. <https://doi.org/10.5487/TR.2015.31.3.279>
15. Luzardo-Ocampo I, Ramírez-Jiménez AK, Yañez J, Mojica L, Luna-Vital DA. Technological Applications of Natural Colorants in Food Systems: A Review. *Foods (Basel, Switzerland).* 2021;10(3):634. <https://doi.org/10.3390/foods10030634>
16. Shahidi F, Pegg RB. Nitrite-free meat curing systems: Update and review. 1992;43(3):185-91. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(92\)90171-W](https://doi.org/10.1016/0308-8146(92)90171-W)

17. Barcenilla C, Ducic M, López M, Prieto M, Álvarez-Ordóñez A. Application of lactic acid bacteria for the biopreservation of meat products: A systematic review. *Meat Sci.* 2022;183:108661. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108661>
18. Campolina GA, Cardoso MG, Caetano ARS, Nelson DL, Ramos EM. Essential Oil and Plant Extracts as Preservatives and Natural Antioxidants Applied to Meat and Meat Products: A Review. *Food Tech Biotech.* 2023;61(2):212-25. <https://doi.org/10.17113/ftb.61.02.23.7883>
19. Kurćubić VS, Mašković PZ, Vujić JM, Vranić DV, Vesković-Moračanin SM, Okanović ĐG, et al. Antioxidant and antimicrobial activity of *Kitaibelia vitifolia* extract as alternative to the added nitrite in fermented dry sausage. *Meat Sci.* 2014;97(4):459-67. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.03.012>
20. Guimarães AS, Guimarães JS, Rodrigues LM, Fontes PR, Ramos AdLS, Ramos EM. Assessment of Japanese radish derivatives as nitrite substitute on the physicochemical properties, sensorial profile, and consumer acceptability of restructured cooked hams. *Meat Sci.* 2022;192:108897. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2022.108897>
21. Sindelar JJ, Cordray JC, Sebranek JG, Love JA, Ahn DU. Effects of varying levels of vegetable juice powder and incubation time on color, residual nitrate and nitrite, pigment, pH, and trained sensory attributes of ready-to-eat uncured ham. *J Food Sci.* 2007;72(6):S388-S95. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00404.x>
22. Andrade BF, Guimarães AS, do Carmo LR, Tanaka MS, Fontes PR, Ramos AdLS, et al. S-nitrosothiols as nitrite alternatives: Effects on residual nitrite, lipid oxidation, volatile profile, and cured color of restructured cooked ham. 2024;209:109397. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2023.109397>
23. Kanner J, Juven BJ. S-Nitrosocysteine as an antioxidant, color-developing, and anticlostridial agent in comminuted Turkey meat. *J Food Sci.* 1980;45(5):1105-12. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1980.tb06497.x>
24. Shpaizer A, Nussinovich A, Kanner J, Tirosh O. S-Nitroso-N-acetylcysteine generates less carcinogenic N-nitrosamines in meat products than nitrite. *J Agric Food Chem.* 2018;66(43):11459-67. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04549>
25. Kanner J, Shpaizer A, Nelgas L, Tirosh O. S-Nitroso-N-acetylcysteine (NAC-SNO) as an antioxidant in cured meat and stomach medium. *J Agric Food Chem.* 2019;67(39):10930-6. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03741>

26. Shpaizer A, Kanner J, Tirosh O. S-Nitroso-N-acetylcysteine (NAC–SNO) vs. nitrite as an anti-clostridial additive for meat products. *Food Funct.* 2021;12(5):2012-9. <https://doi.org/10.1039/D0FO02839H>
27. Allai FM, Azad ZRAA, Mir NA, Gul K. Recent advances in non-thermal processing technologies for enhancing shelf life and improving food safety. *Appl Food Res.* 2023;3(1):100258. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100258>
28. Sebranek JG, Bacus JN. Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues? *Meat Sci.* 2007;77(1):136-47. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.03.025>
29. Møller JKS, Skibsted LH. Nitric Oxide and Myoglobins. *Chem Rev.* 2002;102(4):1167-78. <https://doi.org/10.1021/cr000078y>
30. Ramos EM, Gomide LAM. Meat quality assessment: Fundamentals and methodologies (in portuguese). 2nd ed. Viçosa, MG, Brazil: Editora UFV; 2017.
31. Domínguez R, Pateiro M, Gagaoua M, Barba FJ, Zhang W, Lorenzo JM. A comprehensive review on lipid oxidation in meat and meat products. *Antioxidants (Basel).* 2019;8(10). <https://doi.org/10.3390/antiox8100429>
32. Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. *Modern food microbiology.* 7th ed ed. New York: Springer New York; 2005.
33. Borch E, Kant-Muermans M-L, Blixt Y. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *Int J Food Microbiol.* 1996;33(1):103-20. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01135-X](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01135-X)
34. Hill KK, Xie G, Foley BT, Smith TJ, Munk AC, Bruce D, et al. Recombination and insertion events involving the botulinum neurotoxin complex genes in *Clostridium botulinum* types A, B, E and F and *Clostridium butyricum* type E strains. *BMC Biol.* 2009;7:66. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-66>
35. Peck MW. *Clostridium botulinum* and the safety of minimally heated, chilled foods: an emerging issue? *J Appl Microbiol.* 2006;101(3):556-70. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02987.x>
36. Cammack R, Joannou CL, Cui XY, Torres Martinez C, Maraj SR, Hughes MN. Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics.* 1999;1411(2-3):475-88. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(99\)00033-X](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(99)00033-X)
37. Carpenter CE, Reddy DS, Cornforth DP. Inactivation of clostridial ferredoxin and pyruvate-ferredoxin oxidoreductase by sodium nitrite. *Appl Environ Microbiol.* 1987;53(3):549-52. <https://doi.org/10.1128/aem.53.3.549-552.1987>

38. Xie Y, Geng Y, Yao J, Ji J, Chen F, Xiao J, et al. N-nitrosamines in processed meats: Exposure, formation and mitigation strategies. *J Agric Food Res.* 2023;13:100645. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100645>
39. Tricker AR. N-nitroso compounds and man: sources of exposure, endogenous formation and occurrence in body fluids. *Eur J Cancer Prev.* 1997;6(3).
40. Hinuma K, Matsuda J, Tanida N, Hori S, Tamura K, Ohno T, et al. N-nitrosamines in the stomach with special reference to in vitro formation, and kinetics after intragastric or intravenous administration in rats. *Gastroenterol Jpn.* 1990;25(4):417-24. <https://doi.org/10.1007/bf02779329>
41. Jadhav HB, Annapure US, Deshmukh RR. Non-thermal Technologies for Food Processing. *Front Nut.* 2021;8. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.657090>
42. Ravindran R, Jaiswal AK. Wholesomeness and safety aspects of irradiated foods. *Food Chemistry.* 2019;285:363-8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.002>
43. Indiarto R, Irawan AN, Subroto E. Meat Irradiation: A Comprehensive Review of Its Impact on Food Quality and Safety. *Foods (Basel, Switzerland).* 2023;12(9):1845. <https://doi.org/10.3390/foods12091845>
44. Rather SA, Hussain PR, Suradkar PP, Ayob O, Sanyal B, Tillu A, et al. Comparison of gamma and electron beam irradiation for using phyto-sanitary treatment and improving physico-chemical quality of dried apricot and quince. 2019;12(1):245-59. <https://doi.org/10.1080/16878507.2019.1650223>
45. Ehlermann DAE. Particular applications of food irradiation: Meat, fish and others. 2016;129:53-7. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2016.07.027>
46. Khalid W, Maggiolino A, Kour J, Arshad MS, Aslam N, Afzal MF, et al. Dynamic alterations in protein, sensory, chemical, and oxidative properties occurring in meat during thermal and non-thermal processing techniques: A comprehensive review. 2023;9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1057457>
47. Brewer S. Irradiation effects on meat color - a review. *Meat Sci.* 2004;68(1):1-17. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.02.007>
48. Rodrigues LM, Sales LA, Fontes PR, Torres Filho RA, Andrade MPD, Ramos ALS, et al. Combined effects of gamma irradiation and aging on tenderness and quality of beef from Nellore cattle. *Food Chem.* 2020;313:126137. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126137>

49. Silva DRG, Moura APR, Haddad GBS, Souza PM, Ramos ALS, Hopkins DL, et al. Reducing the safety risk of low nitrite restructured sliced cooked ham by gamma radiation. 2021;45(1):e15071. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15071>
50. Rodrigues I, Baldini A, Pires M, Carvalho Barros J, Fregonesi R, Gonçalves de Lima C, et al. Gamma ray irradiation: A new strategy to increase the shelf life of salt-reduced hot dog wieners. 2021;135:110265. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110265>
51. Silva DRG, Haddad GBS, de Moura AP, de Souza PM, Ramos ALS, Hopkins DL, et al. Safe cured meat using gamma radiation: Effects on spores of *Clostridium sporogenes* and technological and sensorial characteristics of low nitrite cooked ham. LWT. 2021;137:110392. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110392>
52. Munir MT, Mtimet N, Guillier L, Meurens F, Fravallo P, Federighi M, et al. Physical Treatments to Control *Clostridium botulinum* Hazards in Food. Foods (Basel, Switzerland). 2023;12(8):1580. <https://doi.org/10.3390/foods12081580>
53. Wei F, Xu X, Zhou G, Zhao G, Li C, Zhang Y, et al. Irradiated Chinese Rugao ham: Changes in volatile N-nitrosamine, biogenic amine and residual nitrite during ripening and post-ripening. 2009;81(3):451-5. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.09.005>
54. Ahn HJ, Kim JH, Jo C, Lee JW, Yook HS, Byun MW. Effects of gamma irradiation on residual nitrite, residual ascorbate, color, and N-nitrosamines of cooked sausage during storage. 2004;15(3):197-203. [https://doi.org/10.1016/s0956-7135\(03\)00047-1](https://doi.org/10.1016/s0956-7135(03)00047-1)
55. Ahn HJ, Kim JH, Jo C, Lee CH, Byun MW. Reduction of carcinogenic N-nitrosamines and residual nitrite in model system sausage by irradiation. 2002;67(4):1370-3. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb10291.x>
56. Ahn HJ, Jo CR, Kim JH, Chung YJ, Lee CH, Byun MW. Monitoring of nitrite and N-Nitrosamine levels in irradiated pork sausage. 2002;65(9):1493-7. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-65.9.1493>
57. Ahn HJ, Kim JH, Jo C, Yook HS, Byun MW. Radiolytic characteristics of nitrite by gamma irradiation. 2003;82(3):465-8. [https://doi.org/10.1016/s0308-8146\(02\)00591-5](https://doi.org/10.1016/s0308-8146(02)00591-5)
58. Ahn HJ, Yook HS, Rhee MS, Lee CH, Cho YJ, Byun MW. Application of Gamma Irradiation on Breakdown of Hazardous Volatile N-Nitrosamines. 2002;67(2):596-9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb10644.x>
59. Ahn DU, Lee EJ, Feng X, Zhang W, Lee JH, Jo C, et al. Mechanisms of volatile production from non-sulfur amino acids by irradiation. Radiat Phys Chem. 2016;119:64-73. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2015.09.008>

60. Dutra MP, Cardoso GP, Fontes PR, Silva DRG, Pereira MT, Ramos AdLS, et al. Combined effects of gamma radiation doses and sodium nitrite content on the lipid oxidation and color of mortadella. 2017;237(1):232-9. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.108>
61. Feng X, Moon SH, Lee HY, Ahn DU. Effect of irradiation on the parameters that influence quality characteristics of raw turkey breast meat. Radiat Phys Chem. 2017;130:40-6. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2016.07.015>
62. Gavahian M, Chu Y-H, Mousavi Khaneghah A, Barba FJ, Misra NN. A critical analysis of the cold plasma induced lipid oxidation in foods. 2018;77:32-41. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.04.009>
63. Inguglia ES, Oliveira M, Burgess CM, Kerry JP, Tiwari BK. Plasma-activated water as an alternative nitrite source for the curing of beef jerky: Influence on quality and inactivation of *Listeria innocua*. Innov Food Sci Emerg Technol. 2020;59:102276. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102276>
64. Mandal R, Singh A, Pratap Singh A. Recent developments in cold plasma decontamination technology in the food industry. 2018;80:93-103. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.014>
65. Misra NN, Jo C. Applications of cold plasma technology for microbiological safety in meat industry. 2017;64:74-86. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.04.005>
66. Lee J, Lee CW, Yong HI, Lee HJ, Jo C, Jung S. Use of atmospheric pressure cold plasma for meat industry. 2017;37(4):477-85. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2017.37.4.477>
67. Souza VR, Illera AE, Keener KM. High voltage atmospheric cold plasma technology as a food safety intervention for decontamination of cutting tools during ready-to-eat poultry meat slicing. 2022;80:103065. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103065>
68. Jung S, Lee J, Lim Y, Choe W, Yong HI, Jo C. Direct infusion of nitrite into meat batter by atmospheric pressure plasma treatment. Innov Food Sci Emerg Technol. 2017;39:113-8. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.11.010>
69. Jung S, Kim HJ, Park S, Yong HI, Choe JH, Jeon HJ, et al. Color developing capacity of plasma-treated water as a source of nitrite for meat curing. Korean J Food Sci Anim Resour. 2015;35(5):703-6. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2015.35.5.703>
70. Luo J, Yan W, Nasiru MM, Zhuang H, Zhou G, Zhang J. Evaluation of physicochemical properties and volatile compounds of Chinese dried pork loin curing with plasma-treated water brine. Sci Rep. 2019;9(1):13793. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50351-5>

71. Lee J, Jo K, Lim Y, Jeon HJ, Choe JH, Jo C, et al. The use of atmospheric pressure plasma as a curing process for canned ground ham. *Food Chem.* 2018;240:430-6. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.148>
72. Marcinkowska-Lesiak M, Wojtasik-Kalinowska I, Onopiuk A, Stelmasiak A, Wierzbicka A, Poltorak A. Application of atmospheric pressure cold plasma activated plant protein preparations solutions as an alternative curing method for pork sausages. *Meat Sci.* 2022;187:108751. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2022.108751>
73. Kim JW, Lee HJ, Shin D-J, Baek KH, Yong H-I, Jung S, et al. Enrichment of nitrite in onion powder using atmospheric pressure plasma and egg whites for meat curing. 2021;135:110050. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110050>
74. Yong HI, Lee SH, Kim SY, Park S, Park J, Choe W, et al. Color development, physiochemical properties, and microbiological safety of pork jerky processed with atmospheric pressure plasma. 2019;53:78-84. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.09.005>
75. Gök V, Aktop S, Özkan M, Tomar O. The effects of atmospheric cold plasma on inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* and some quality characteristics of pastırma—A dry-cured beef product. 2019;56:102188. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102188>
76. Oliveira TLCd, Ramos ALS, Ramos EM, Piccoli RH, Cristianini M. Natural antimicrobials as additional hurdles to preservation of foods by high pressure processing. 2015;45(1):60-85. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.05.007>
77. Huang H-W, Hsu C-P, Wang C-Y. Healthy expectations of high hydrostatic pressure treatment in food processing industry. 2020;28(1):1-13. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2019.10.002>
78. Aganovic K, Hertel C, Vogel RF, John R, Schlüter O, Schwarzenbolz U, et al. Aspects of high hydrostatic pressure food processing: Perspectives on technology and food safety. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2021;20(4):3225-66. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12763>
79. Roobab U, Afzal R, Ranjha MMAN, Zeng X-A, Ahmed Z, Aadil RM. High pressure-based hurdle interventions for raw and processed meat: a clean-label prospective. *Int J Food Sci Tech.* 2022;57(2):816-26. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15499>
80. Linton M, Connolly M, Houston L, Patterson MF. The control of *Clostridium botulinum* during extended storage of pressure-treated, cooked chicken. *Food Control.* 2014;37:104-8. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.042>

81. Higuero N, Ramírez MR, Vidal-Aragón MdC, Cava R. Influence of high-pressure processing and varying concentrations of curing salts on the color, heme pigments and oxidation of lipids and proteins of Iberian dry-cured loins during refrigerated storage. 2022;160:113251. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113251>
82. Lopez CM, Dallolio G, Bonilauri P, Rebecchi A. Strategies for Nitrite Replacement in Fermented Sausages and Effect of High Pressure Processing against *Salmonella* spp. and *Listeria innocua*. *Foods* (Basel, Switzerland). 2021;10(11):2617. <https://doi.org/10.3390/foods10112617>
83. Balamurugan S, Inmanee P, Souza J, Strange P, Pirak T, Barbut S. Effects of High Pressure Processing and Hot Water Pasteurization of Cooked Sausages on Inactivation of Inoculated *Listeria monocytogenes*, Natural Populations of Lactic Acid Bacteria, *Pseudomonas* spp., and Coliforms and Their Recovery during Storage at 4 and 10°C. *Journal of Food Protection*. 2018;81(8):1245-51. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.Jfp-18-024>
84. Lavieri NA, Sebranek JG, Cordray JC, Dickson JS, Horsch AM, Jung S, et al. Effects of Different Nitrite Concentrations from a Vegetable Source with and without High Hydrostatic Pressure on the Recovery of *Listeria monocytogenes* on Ready-to-Eat Restructured Ham. 2014;77(5):781-7. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-401>
85. Myers K, Cannon J, Montoya D, Dickson J, Lonergan S, Sebranek J. Effects of high hydrostatic pressure and varying concentrations of sodium nitrite from traditional and vegetable-based sources on the growth of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat (RTE) sliced ham. 2013;94(1):69-76. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.12.019>
86. Myers K, Montoya D, Cannon J, Dickson J, Sebranek J. The effect of high hydrostatic pressure, sodium nitrite and salt concentration on the growth of *Listeria monocytogenes* on RTE ham and turkey. 2013;93(2):263-8. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.09.007>
87. Cava R, Higuero N, Ladero L. High-pressure processing and storage temperature on *Listeria monocytogenes*, microbial counts and oxidative changes of two traditional dry-cured meat products. *Meat Sci*. 2021;171:108273. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108273>
88. Pietrzak D, Fonberg-Broczek M, Mucka A, Windyga B. Effects of high pressure treatment on the quality of cooked pork ham prepared with different levels of curing ingredients. 2007;27(1):27-31. <https://doi.org/10.1080/08957950601091087>

89. Hayman MM, Baxter I, O'Riordan PJ, Stewart CM. Effects of high-pressure processing on the safety, quality, and shelf life of ready-to-eat meats. *Journal of Food Protection*. 2004;67(8):1709-18.
90. Bhat ZF, Morton JD, Mason SL, Bekhit AE-DA. Current and future prospects for the use of pulsed electric field in the meat industry. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2019;59(10):1660-74. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1425825>
91. Stoica M, Antohi VM, Alexe P, Ivan AS, Stanciu S, Stoica D, et al. New strategies for the total/partial replacement of conventional sodium nitrite in meat products: a review. 2022;15(3):514-38. <https://doi.org/10.1007/s11947-021-02744-6>
92. Alarcon-Rojo AD, Janacua H, Rodriguez JC, Paniwnyk L, Mason TJ. Power ultrasound in meat processing. *Meat Sci*. 2015;107:86-93. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.04.015>
93. Pinton MB, Correa LP, Facchi MMX, Heck RT, Leães YSV, Cichoski AJ, et al. Ultrasound: A new approach to reduce phosphate content of meat emulsions. *Meat Sci*. 2019;152:88-95. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.02.010>
94. Barretto TL, Bellucci ERB, Barbosa RD, Pollonio MAR, Romero JT, da Silva Barretto AC. Impact of ultrasound and potassium chloride on the physicochemical and sensory properties in low sodium restructured cooked ham. *Meat Sci*. 2020;165:108130. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108130>

ARTIGO 2

Artigo redigido conforme a norma do periódico

Semiário De Visu

S-Nitrosotióis como substitutos de nitrito em apresetados

S-Nitrosothiols as nitrite substitutes in restructured cooked hams

Resumo

Objetivou-se avaliar o uso dos S-nitrosotióis (RSNOs) S-nitroso-N-acetilcisteína (NAC-SNO) e S-nitroso N-acetilcisteína etil éster (NACET-SNO) como doadores de óxido nítrico (NO) na substituição de nitrito de sódio em apresetados. Produtos com diferentes concentrações (0,07 a 2,17 mM; i.e. 5, 10, 25, 50 e 150 mg nitrito equivalente - NEq/kg) de RSNOs foram elaborados e avaliados quanto ao teor de nitrito residual (NO₂R), oxidação lipídica (índice de TBARS), cor instrumental e sensorial (intensidade de cor curada), comparando-os com amostras referências: não curadas (CONT-); e curadas com 150 mg/kg de nitrito de sódio (CONT+). Os valores de NO₂R aumentaram com maiores adições de RSNO, mas foram 86% menores do que CONT+ quando adicionados na maior concentração. Menores valores de TBARS (0,40±0,29 mg MAD/kg) foram observadas nas amostras contendo 50 e 150 mg NEq/kg de RSNO e CONT+, e os maiores valores (1,42±0,26mg MAD/kg) nas amostras contendo 5 e 10 mg NEq/kg de RSNO e CONT-. Os índices de cor *L** e *h* das amostras contendo 50 e 150 mg NEq/kg de RSNO não diferiram, independentemente do tipo de agente de cura, mas apenas a cor das amostras contendo 150 mg NEq/kg de NAC-SNO foram percebidas como sendo similares a CONT+ pelo painel sensorial. Concluiu-se que a substituição completa do nitrito de sódio por 2,17 mM de NAC-SNO (150 mg NEq/kg) é uma alternativa viável para obtenção da cor curada e ação antioxidante característica em apresetados.

Palavras-chave: Nitrito residual, cor sensorial, oxidação lipídica, aditivos.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the use of the S-nitrosothiols (RSNOs) S-nitroso-N-acetylcysteine (NAC-SNO) and S-nitroso N-acetylcysteine ethyl ester (NACET-SNO) as donors of nitric oxide (NO) to replace of sodium nitrite in restructured cooked hams. Products with different concentrations (0.07 to 2.17 mM; i.e. 5, 10, 25, 50, and 150 mg nitrite equivalent - NEq/kg) of RSNOs were prepared and evaluated for residual nitrite content

(NO₂R), lipid oxidation (TBARS index), and instrumental and sensorial color (cured color intensity), comparing them with reference samples: uncured (CONT-); and cured with 150 mg/kg of sodium nitrite (CONT+). NO₂R values increased with higher RSNO additions but were 86% lower than CONT+ when added at the highest concentration. Lower TBARS values (0.40±0.29 mg MAD/kg) were observed in samples containing 50 and 150 mg NEq/kg of RSNO and CONT+, and the highest values (1.42±0.26mg MAD/kg) in samples containing 5 and 10 mg NEq/kg of RSNO and CONT-. The color indices *L** and *h* of the samples containing 50 and 150 mg NEq/kg of RSNO did not differ, regardless of the type of curing agent, but only the color of the samples containing 150 mg NEq/kg of NAC-SNO were perceived as being similar to CONT+ by the sensory panel. It was concluded that the complete replacement of sodium nitrite by 2.17 mM NAC-SNO (150 mg NEq/kg) is a viable alternative for obtaining the cured color and characteristic antioxidant action in restructured cooked hams.

keywords: Residual nitrite, sensory color, lipid oxidation, additives.

Introdução

Os sais de cura, sais de nitrito e, ou, nitrato, são aditivos alimentares tradicionalmente utilizados na elaboração da grande maioria dos produtos cárneos cozidos (presunto e apresuntado), crus (salame e presunto cru), emulsionados (mortadela, salsicha), salgados (*jerked beef*), e defumados (bacon). O nitrito possui multifunções na matriz carne, sendo considerado um aditivo “curinga”, com efeitos positivos sob as características sensoriais (cor e sabor) e na extensão de vida útil, devido ao controle de reações oxidativas e na segurança contra microrganismos (MAJOU; CHRISTIEANS, 2018). Embora o nitrito atue sob diferentes classes de bactérias, com efeito bactericida ou bacteriostático, sua principal adição visa a prevenção do botulismo alimentar, causado pelo *Clostridium botulinum*; bactéria Gram-positiva, com morfologia de bastonetes, mesófila, anaeróbias estrictas, e produtora de neurotoxina altamente letal (WIEGEL, 2015). Apesar de a toxina botulínica ser termolábil (85°C/5 min), a célula esporulada é resistente à temperatura elevada (120°C/15 min) e pode germinar, isto é, retornar a sua forma vegetativa (de crescimento) e produzir novas toxinas (PROVERBIO et al., 2016).

O mecanismo de cura de carne é bem estabelecido na literatura científica e foi descrito em revisões como a de Sindelar e Milkowski (2011) e, mais recentemente, de Stoica et al. (2022). O nitrito é o agente ativo de cura, sendo necessário a conversão de nitrato à nitrito por bactérias nitrato redutoras naturalmente presente na carne. Em resumo, a cura consiste no

desencadeamento de uma série de reações e equilíbrios químicos do íon nitrito (NO_2^-) até a geração do gás óxido nítrico (NO), espécie que possui alta afinidade com o íon ferro (Fe^{+2}). A complexação do NO com o ferro (Fe-NO) presente na mioglobina (Mb) resulta no pigmento nitrosomioglobina (NO-Mb) de cor rosa-avermelhada característica. A ligação Fe-NO também é responsável por retardar os processos oxidativos como a oxidação lipídica, uma vez que mantém o ferro, espécie naturalmente pró-oxidante, em seu estado reduzido. A geração de NO também é responsável pela principal ação bactericida do nitrito, uma vez que o NO é capaz de complexar com o ferro presente em enzimas metabólicas do *C. botulinum* cessando irreversivelmente o metabolismo microbiano.

No entanto, durante a formação de NO nas reações de cura também são formados compostos intermediários indesejáveis, como o anidrido nitroso (N_2O_3), uma espécie nitrosante que pode reagir com aminas secundárias presentes na carne formando N-nitrosaminas (HONIKEL, 2008). As N-nitrosaminas possuem potencial mutagênico e genotóxico reconhecido quando no organismo humano, em razão da formação do radical diazônio que é capaz de reagir e inviabilizar as macromoléculas celulares, como bases nitrogenadas presentes no DNA. Por essa razão esses compostos são frequentemente associados ao desenvolvimento de câncer colorretal (IARC, 2018; VAN BREDA et al., 2021). Além de poder ser previamente formadas no produto cárneo, as N-nitrosaminas também podem ser formadas durante a digestão estomacal onde ocorre a catálise ácida (em pH próximo à 3) de compostos precursores do nitrito/nitrato da dieta (de fontes vegetais, água ou mesmo produtos cárneos) e aminas (LÓPEZ-RODRÍGUEZ et al., 2020). Apesar dos relatos científicos da presença de N-nitrosaminas pré-formadas em diversos produtos alimentícios, de origem animal ou vegetal (PARK et al., 2015), e mesmo em água potável (QIU et al., 2020), a potencial presença destes compostos e os altos níveis de nitrito residual em produtos cárneos são argumentos que têm sido usados para banir o uso dos sais de cura nestes produtos.

Há muito tempo tem-se discutido a respeito de propostas eficazes de redução e, ou, substituição de nitrito e suas combinações. Essas propostas são bastante desafiadoras, tendo em vista que o produto reformulado deve apresentar as mesmas características do produto convencional no que se refere a qualidade sensorial e microbiológica e de estabilidade durante sua vida útil. Genericamente, as propostas de substituição do nitrito consistem na aplicação de técnicas de biopreservação, com uso de compostos com atividade antimicrobiana (bacteriocinas, ácidos orgânicos, óleos essenciais e extratos vegetais, etc.), mas que requerem combinações com corantes e, ou, antioxidantes para obter todos os efeitos conferidos pelos sais de cura (DELGADO-PANDO et al., 2021; STOICA et al., 2022). Outras técnicas

pressupõem o uso de fontes “naturais” de nitrito, por uso de extratos vegetais ricos em nitrato (GUIMARÃES et al., 2022) ou por geração através de plasma à pressão atmosférica (JUNG et al., 2017), mas estas não oferecem qualquer vantagem “mais saudável” em relação aos sais de nitrito, apenas proporcionam uma opção de rótulo sem aditivos (*clean label*) para o consumidor. Ainda não se tem uma proposta de substituição aplicável em escala industrial que seja capaz de promover os mesmos benefícios do nitrito.

Um dos maiores obstáculos para substituição do nitrito pode ser atribuído as variações nas características sensoriais, com a não formação da cor curada característica e a geração de sabores e aromas indesejáveis. Uma vez que, bioquimicamente, todas as propriedades favoráveis dos sais de cura são devidas ao NO formado a partir da decomposição do nitrito, uma alternativa em potencial é o uso de S-nitrosotióis (RSNOs) como substitutos deste aditivo. RSNOs são compostos carreadores de NO, geralmente aminoácidos ou peptídeos que possuem o grupo tiol (R-SH), de ocorrência natural em seres humanos; constituem uma das formas mais estáveis do NO e *in vivo* são utilizados principalmente como sinalizadores em fenômenos fisiológicos e fisiopatológicos (LIU et al., 2018). Assim, os RSNOs têm alto potencial para serem usados como substitutos do nitrito, uma vez que podem “entregar” o NO para reação direta com outros compostos na carne sem a formação de intermediários, como o N_2O_3 , conferindo as propriedades sensoriais e microbiológicas desejáveis e evitando e, ou, reduzindo a produção de N-nitrosaminas.

Apesar de grande uso na área farmacêutica, as pesquisas sobre a utilização de RSNOs em produtos cárneos estão nos estágios iniciais e ainda com informações bastantes escassas. Poucos trabalhos avaliaram o uso de RSNOs no processo de cura de produtos cárneos, sendo que a maioria realizou testes *in vitro* ou em sistemas cárneos modelos (KANNER; JUVEN, 1980; SHPAIZER et al., 2018 e 2021; KANNER et al., 2019). Além disso, os efeitos tecnológicos, sensoriais, químicos e microbiológicos nos produtos cárneos tradicionais, onde se têm uma matriz e processos complexos, ainda são desconhecidos e precisam ser investigados. Entre os compostos que têm sido estudados estão S-nitroso-glutationa (GSNO), S-nitroso-L-cisteína (Cys-SNO), S-nitroso-N-acetil-L-cisteína (NAC-SNO), mas modificações na estrutura dos RSNOs também podem ser realizadas; como, por exemplo, a esterificação do grupo ácido carboxílico do tiol N-acetil cisteína (NAC), produzindo éster etílico de N-acetil-L-cisteína (NACET), visando a obtenção de um maior potencial antioxidante e maior solubilidade em água e solventes orgânicos que o seu precursor (TSIKAS et al., 2009). Assim, esse trabalho teve como objetivo avaliar a substituição do nitrito da formulação de apesuntados por diferentes tipos e concentrações de RSNOs (a partir

do NAC e NACET), verificando os efeitos no teor de nitrito residual, ação antioxidante e desenvolvimento da cor curada.

Material e métodos

Síntese dos RSNOs

Os RSNOs S-nitroso-N-acetil-L-cisteína (NAC-SNO) e S-nitroso-N-acetil-L-cisteína etil éster (NACET-SNO) foram sintetizados através da reação equimolar entre o tiol N-acetil-L-cisteína (NAC) ou N-acetil-L-cisteína etil éster (NACET) em solução ácida com nitrito de sódio (SHPAIZER et al., 2018; TSIKAS et al., 2009). O NACET foi previamente sintetizado a partir do NAC usando cloreto de acetila e etanol absoluto, conforme descrito por Van den Broeke e Van Henegouwen (1995). Imediatamente antes de uso, a absorvância das soluções de RSNOs foram medidas em espectrofotômetro (Genesys 10 UV; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA) a 330 nm para o NAC-SNO e 334 nm para o NACET-SNO e as concentrações obtidas foram calculadas a partir dos coeficientes de extinção de $727 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e $780 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, respectivamente (KUMAR et al., 2021; MATHEWS; KERR, 1993).

Elaboração dos apresentados

O uso de RSNOs como substituto do nitrito foi avaliada em apresentados, elaborados em três lotes independentes (repetições). Foi feito uma massa base com a mesma matéria-prima para cada lote contendo: 81% de paleta e pernil suíno, 1,8% de sal (NaCl), 0,3% de glutamato monossódico, 0,4% de tripolifosfato, 1% de fécula de mandioca e 0,5% de aromatizante Condimento California (New Max Industrial Ltd., Americana, SP, Brasil). Da massa base, 12 porções de ~500 g foram separadas e aleatorizadas nos tratamentos: controle (CONT+), com 150 mg/kg de nitrito de sódio; e 11 formulações com cinco concentrações diferentes (de 0,072 a 2,175 mM, que equivalem à adição de 5, 10, 25, 50 e 150 mg de nitrito equivalente – NEq/kg) de NAC-SNO e cinco de NACET-SNO, mais uma amostra sem RSNO ou nitrito (controle negativo; CONT-). A faixa de concentração de RSNOs, bem como o CONT+, foram escolhidos com base no teor de nitrito residual (150 mg/kg) permitido pela legislação brasileira (BRASIL, 2019). As amostras controle (CONT- e CONT+) foram ainda adicionadas de eritorbato de sódio (500 mg/kg), não sendo adicionada nos produtos com RSNO já que, segundo Shpaizer et al. (2018) e Kanner et al. (2019), estes apresentam alta atividade antioxidante.

Após a moagem das carnes em discos de 10 mm de diâmetro (PB-22; Beccaro Ltda, Rio Claro, SP, Brasil), os ingredientes da massa base foram adicionados com 10% de água e misturada (Jamar; Indústrias Jamar, Tapuã, SP, Brasil) por 15 min. O restante da água (5%) da formulação foi adicionado junto com o agente de cura (soluções de nitrito ou RSNO) em cada porção pré-estabelecida, sendo misturadas manualmente, embaladas à vácuo (BS420; R.Baião, Ubá, MG, Brasil) e embutidas em tripas de náilon-poliamida de 45 mm (Walsroder K plus; Walsroder Packaging LLC, Illinois, EUA), produzindo amostras de aproximadamente 300 g. Os produtos foram armazenados a 4 °C durante a noite para o processo de cura e cozidos em banho-maria até uma temperatura interna de 70°C (acompanhados com sonda termopar flexível). Após o cozimento, os produtos foram imediatamente imersos em banho de água gelada por 10 min e armazenados (a 4 °C) por 24 h antes das análises.

Análises dos apresentados

O teor de nitrito residual (NO₂R) foi determinado conforme descrito [Guimarães et al. \(2022\)](#). Resumidamente, cerca de 5 g do produto triturado foi adicionado de 40 mL de água quente e submetido à extração em banho-maria a 80 °C por 2 h. Após padronização do volume, uma alíquota de 2 mL foi adicionada de 0,2 mL de sulfanilamida 1% (em HCl 0,5 M), mantida no escuro por 5 min e então adicionado de 0,1 mL de cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina (NED) 0,1%. Após nova incubação no escuro por 15 min, a absorvância foi medida a 540 nm e o NO₂R determinado (mg/kg) utilizando uma curva analítica de nitrito de sódio.

A oxidação lipídica dos produtos foi avaliada pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito por [Pikul, Leszczynski e Kummerow \(1989\)](#) com algumas adaptações. Cerca 5 g da amostra foram homogeneizados (Turratec TE 102; TECNAL, Piracicaba, SP, Brasil) em 15 mL de solução de ácido perclórico 3,86% e 1 mL de butilhidroxitolueno 0,15%. O extrato foi filtrado, uma alíquota de 2 mL foi adicionada a 2 mL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,02 M (em ácido perclórico 3,86%), agitada em vórtice e a mistura incubada em banho-maria (a 90 °C) por exatamente 30 min. Após resfriamento em banho de gelo por 5 min, a absorvância foi medida a 532 nm. Os valores de TBARS foram expressos em miligramas de malondialdeído (MDA) por quilograma de produto (mg MDA/kg) utilizando uma curva analítica de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP).

A cor instrumental foi avaliada utilizando um colorímetro portátil CM-700 (Kônica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japão) com abertura de porta de 8 mm, iluminante D65, ângulo de observação de 10°, e componente especular excluído (SCE). Foram feitas cinco leituras da

superfície das amostras fatiadas, sendo registrado o espectro de refletância (360–740 nm) e os índices de cor obtidos no sistema CIELCH: luminosidade (L^*), saturação (C^*) e ângulo de tonalidade (h , graus). O índice de cor curada (formação de pigmento nitrosil hemocromo) foi determinado utilizando a razão de refletância dos comprimentos de onda R650/570 nm (KING et al., 2023).

A análise visual da cor curada dos apresuntados foi avaliada com 20 julgadores não treinados através da técnica de perfil descritivo otimizado (PDO), segundo Cardoso et al. (2019), aprovada no Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFLA (CAAE:61211922.0.0000.5148). Todos os painelistas assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. As amostras fatiadas (~1 cm espessura) embaladas a vácuo (BS420; R.Baião, Ubá, Brasil) foram avaliadas em cabines individuais e sob luz branca. Durante a avaliação dos tratamentos, também foram apresentados aos painelistas referências de intensidade de cor curada: “cor rosa intenso” = amostra formulada com 150 mg/kg de nitrito (CONT+); e “cor rosa suave” = amostra CONT- (sem adição de nitrito ou RSNOs). As amostras (incluindo as referências) rotuladas (código de três dígitos) foram apresentadas de forma simultânea, em três seções (uma para cada repetição). Foi pedido aos painelistas que comparassem os produtos com as referências e indicassem a intensidade percebida do rosa para cada amostra em uma escala não estruturada de 9 cm.

Análise estatística

Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 2 (RSNOs) x 6 (concentrações; 0, 5, 10, 25, 50 e 150 mg NEq/kg) em três lotes independentes (repetições) para comparação dos produtos elaborados (RSNO) com nitrito. Para análise de PDO os tratamentos foram dispostos em delineamento de blocos casualizados (DBC), em que cada painalista era um bloco. Os principais fatores e sua interação foram testados por análise de variância (ANOVA) e, quando significativa ($p < 0,05$), as médias foram separadas pelo teste de Tukey. Quando necessário, os tratamentos também foram comparados ($p < 0,05$) com a amostra CONT+ através do teste de Dunnett. A análise estatística foi realizada utilizando o software Statistica® 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK).

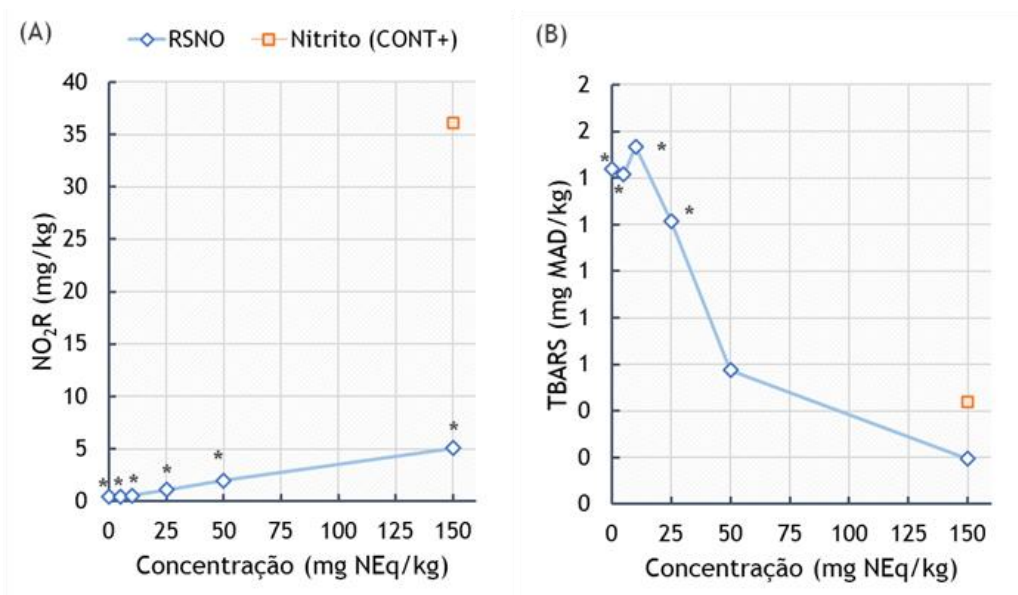
Resultados e discussão

Não houve diferença ($p > 0,05$) entre os RSNOs (NAC-SNO e NACET-SNO), para o teor de nitrito residual, oxidação lipídica (TBARS) e nos índices de cor instrumental dos apresuntados. Logo, os efeitos percebidos para as características físico-químicas e

tecnológicas foram apresentados e discutidos entre RSNO e nitrito, e entre seus diferentes níveis de adição.

Os valores de nitrito residual das amostras adicionadas de até 25 mg NEq/kg de RSNO (valores médios de $0,71 \pm 0,32$ mg/kg) não diferiram ($p > 0,05$) da amostra não-curada ($0,43 \pm 0,33$ mg/kg) (Figura 1A). Além disso, todas as amostras adicionadas de RSNO possuíam valores de nitrito residual abaixo do limite de detecção do teste utilizado (Griess) que, segundo [Usher e Telling \(1975\)](#), não é indicado para determinar teores muito abaixo de 10 mg/kg de nitrito em amostras de alimentos. De forma geral, as amostras CONT+ possuíam maior ($p < 0,05$) teor de nitrito residual do que todas as amostras adicionadas RSNO; ainda, as amostras adicionadas de 150 mg NEq/kg RSNO possuíam apenas 14% dos valores residuais de nitrito das amostras curadas convencionalmente em quantidades equimolares (CONT+).

Figura 1 – Efeito da concentração de RSNO, em relação à amostra curada com nitrito (CONT+; 150 mg/kg), nos valores de (A) nitrito residual (NO_2R) e (B) índice de TBARS de apresuntados.



Legenda: RSNO = S-nitrosotióis, S-nitroso-N-acetilcisteína (NAC-SNO) e S-nitroso-N-acetilcisteína etil éster (NACET-SNO); NEq = nitrito equivalente; MAD = Malonaldeído.

*Média difere ($P < 0,05$) da amostra CONT+ pelo teste de Dunnet.

De princípio, não é esperado que o nitrito residual encontrado nas amostras adicionadas de RSNOs seja oriundo da reação de síntese incompleta dos RSNOs, uma vez que em soluções muito ácidas a decomposição do nitrito ao gás NO é extremamente

favorecida (HONIKEL, 2008). Assim, é mais provável que o nitrito residual nas amostras RSNO seja oriundo da sua decomposição na amostra durante a cura ou cozimento, uma vez que, segundo o mesmo autor, na presença de oxigênio o gás NO pode ser oxidado ao ânion NO_2^- .

Sabe-se que os níveis de nitrito tendem a reduzir durante o processamento dos produtos cárneos devido à alta reatividade do nitrito e às altas temperaturas no cozimento (HONIKEL, 2008; SILVA et al., 2021). De acordo com Sindelar e Milkowski (2011) é esperado que cerca de 10 a 20% do nitrito adicionado permaneça no produto após sua fabricação, podendo variar de acordo com o tipo de carne, tempo e temperatura de cozimento, ingredientes adicionados, dentre outros. Neste trabalho foi observado um percentual médio de permanência de 24% de nitrito em relação a quantidade adicionada (150 mg/kg), redução devido apenas ao processo de cura e cozimento.

Em geral, a redução nos teores de nitrito residual em produtos curados é um importante fator para redução na formação de N-nitrosaminas endógenas no trato gastrointestinal de humanos (STOICA et al., 2022). Porém, a atividade antimicrobiana também é dependente do teor de nitrito residual e pode ser comprometida, caso seja insuficiente. Segundo Sindelar e Milkowski (2012) concentrações residuais de nitrito entre 40 e 80 mg/kg são necessárias para prevenir a formação de esporos de *C. botulinum* em produtos cárneos. Outros patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* tem seu crescimento reduzido na presença de nitrito (SHAKIL et al., 2022). Além disso, a estabilidade de cor e o controle de reações oxidativas também são dependes do teor de nitrito residual, ao atuar como reserva de NO durante o armazenamento. Cerca de 10 a 15 mg/kg de nitrito residual é dita como necessária para regenerar a cor curada e retardar o processo de descoloração (*fading*) do produto (SEBRANEK; BACUS, 2007; SINDELAR; MILKOWSKI, 2011).

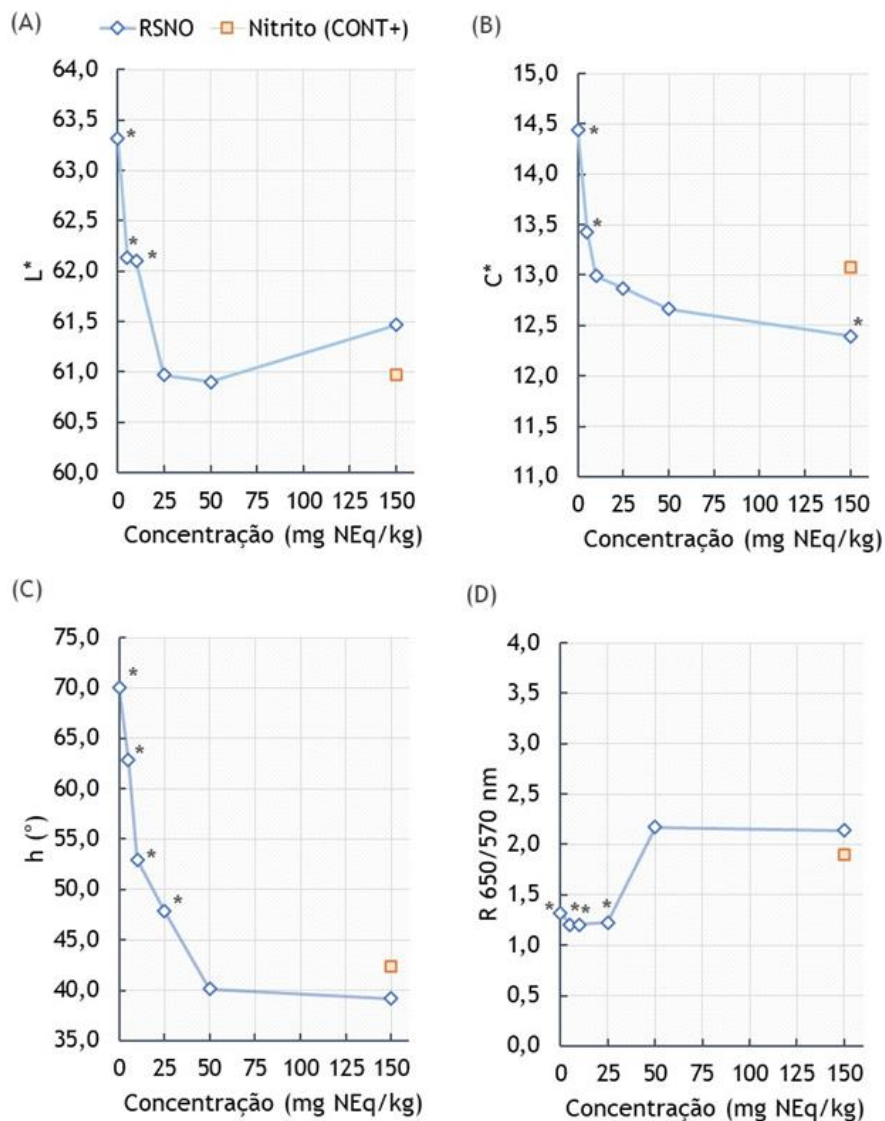
Da mesma forma que observado para nitrito residual, o efeito antioxidante dos RSNOs em apresuntados foi ($p < 0,05$) dependente dos níveis de adição do agente de cura (Figura 1B). De forma geral, adições de até 10 mg NEq/kg de RSNOs resultaram em menor retardo da oxidação lipídica, sendo que os valores de TBARS ($1,39 \pm 0,68$ mg MAD/kg) não foram diferentes ($p > 0,05$) da amostra não-curada ($1,44 \pm 0,17$ mg MAD/kg). Além disso, os valores de TBARS das amostras CONT+ não diferiram ($p > 0,05$) daquelas adicionadas de 50 ou 150 mg NEq/kg de RSNO (média de $0,40 \pm 0,29$ mg MAD/kg). A ação antioxidante do nitrito é atribuída a ligação do NO com o ferro heme na formação do pigmento nitrosil mioglobina (NOMb), que além de gerar a cor curada característica (cor rósea), atua controlando a

oxidação lipídica ao deixar o ferro indisponível para atuar como catalisador (RAMOS; GOMIDE, 2017). É reconhecido que na carne o fator de maior contribuição para o desenvolvimento de processos oxidativos é o ferro, por atuar como catalisador de diferentes processos e estágios da oxidação lipídica (DOMÍNGUEZ et al., 2019). Durante o cozimento o íon ferro pode ser liberado do pigmento heme, e a oxidação da sua forma reduzida (estado ferroso) livre tende a catalisar a geração de radicais peróxido, que por sua vez são capazes de iniciar a peroxidação lipídica através da abstração do hidrogênio (DUTRA et al., 2017). De forma adicional à complexação com o ferro, o NO formado também pode atuar como sequestrador de radicais e oxigênio e cessar as reações de oxidação lipídica (HONIKEL, 2008). Já os RSNOs, uma vez que são “doadores” de NO, também podem atuar como antioxidante de forma similar ao nitrito (KANNER et al., 2019), doando o NO para complexação com o ferro heme, e adicionalmente como decompositor de hidroperóxidos pré-formados, inibindo diretamente a oxidação de ácidos graxos, em especial do ácido linoleico.

Como observado por Dutra et al. (2017), a adição de 150 mg/kg de nitrito foi eficiente no controle de reações oxidativas decorrentes do processo de elaboração do produto. Comparativamente, quantidades iguais ou superiores a 50 mg NEq/kg de RSNO são necessárias para apresentar ação antioxidante equivalente ao nitrito. Esse resultado é similar ao observado por Kanner e Juven (1980) em carne de pato moída adicionada de 50 e 100 mg NEq/kg de nitrito e NAC-SNO, mas difere da observação de Kanner et al. (2019) de equivalência entre os mesmos agentes de cura também em carne de pato, porém adicionados em quantidades menores (35 mg NEq/kg). As diferenças observadas nestes experimentos podem estar associadas a diferentes fatores como o tipo de carne e as condições de análise, mas em especial devido a diferenças na formulação do produto e nas etapas de processamento, que naqueles trabalhos foram conduzidos em sistemas modelos (em condições muito distintas do processamento industrial).

Quanto a cor instrumental também foi verificada diferença significativa com o aumento nos níveis de adição de RSNO (Figura 2). De forma geral, adições crescentes de RSNO implicaram em amostras mais claras (menores valores de L^*) e de cor mais avermelhada (menores valores de h) e menos intensa (menores valores de C^*). Exceto para h , estas diferenças não são observadas ($p > 0,05$) nas amostras adicionadas com quantidades iguais ou maiores que 25 mg NEq/kg de RSNO, sendo que amostras adicionadas de 50 e 150 mg NEq/kg de RSNOs não diferiram ($p > 0,05$) da CONT+.

Figura 2 – Efeito da concentração de RSNO, em relação à amostra curada com nitrito (CONT+; 150 mg/kg), nos índices de cor instrumental (CIELCH) e cor curada (R650/570 nm) de apresentados.



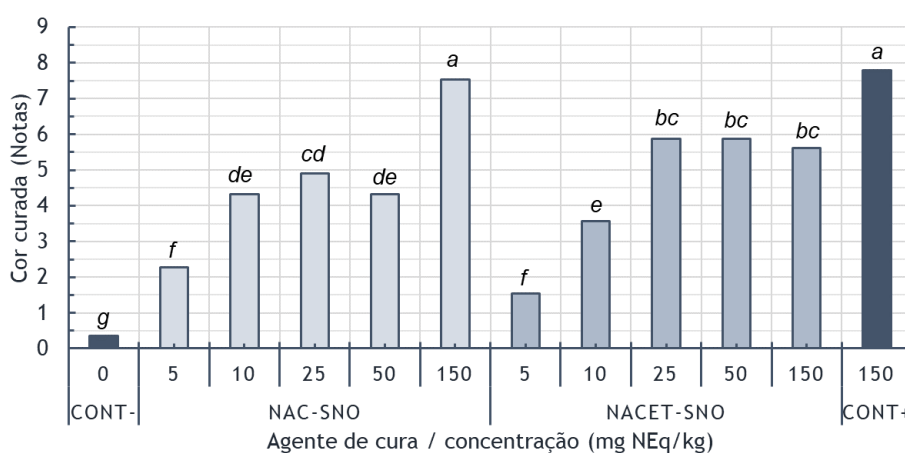
Legenda: RSNO = S-nitrosotióis, S-nitroso-N-acetilcisteína (NAC-SNO) e S-nitroso-N-acetilcisteína etil éster (NACET-SNO); NEq = nitrito equivalente; MAD = Malonaldeído.*Média difere ($P < 0,05$) da amostra CONT+ pelo teste de Dunnett.

Em produtos curados, a principal alteração associada à formação da cor curada com o aumento nos níveis nitrito é a redução nos valores de h (DUTRA et al. 2017; GUIMARÃES et al. 2022). Neste experimento esta alteração também é observada para os RSNOs, com os valores de h alterando de $\sim 70^\circ$ das amostras não-curadas (CONT-) para próximo de 40° nas amostras adicionadas de 50 e 150 mg NEq/kg de RSNO. O índice de cor curada (razão R650/570 nm; Figura 2D) destas amostras não diferiu ($p > 0,05$) das CONT+ (média de $2,20 \pm 0,19$), estando próximo dos limites (2,2 a 2,6) definidos por King et al. (2023) como

sendo de “excelente cor curada”. Vale ressaltar que a razão R650/570 nm das amostras adicionadas de quantidades inferiores a 50 mg NEq/kg de RSNO, incluindo a CONT-, foi de apenas $1,24 \pm 0,06$, indicando amostras não-curadas ou descoloridas, ainda segundo aqueles autores.

Pelo exposto, adições iguais ou superiores a 50 mg NEq/kg de RSNOs são necessárias para geração de cor curada (instrumental) característica em produtos cárneos adicionados de 150 mg/kg de nitrito. No entanto, considerando que também é importante mensurar qual seria o limiar da percepção humana para discriminar as amostras quanto a intensidade de cor curada, uma análise de PDO foi conduzida com as amostras embaladas a vácuo. Curiosamente, diferentemente do observado na cor instrumental, foi verificada diferença significativa na intensidade de cor curada percebida entre os RSNOs (NAC-SNO e NACET-SNO) avaliados (Figura 3). Além disso, os painelistas perceberem uma cor curada similar à amostra contendo nitrito (CONT+) apenas naquelas adicionadas de 150 mg NEq/kg de NAC-SNO. Por outro lado, em concentrações menores de NACET-SNO (25 a 50 mg NEq/kg), a percepção da cor curada foi mais próxima da amostra referência do que a das amostras contendo NAC-SNO nas mesmas concentrações.

Figura 3 – Efeito do tipo e concentração de agente de cura na percepção da cor curada de fatias de apresuntados embaladas a vácuo.



Legenda: Pontuações de 0 (cor rosa suave) a 9 (cor rosa intensa). NEq = equivalente nitrito; CONT- = amostra controle não-curada; CONT+ = amostra controle adicionada de 150 mg/kg de nitrito de sódio; NAC-SNO = S-nitroso-N-acetilcisteína; e NACET-SNO = S-nitroso-N-acetilcisteína etil éster. Médias seguidas de letras diferentes (^{a-g}) diferem ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. As barras escuras representam as referências para as notas 0 (CONT-) e 9 (CONT+).

Assim, do ponto de vista sensorial, os resultados sugerem que o uso do NAC-SNO como substituto de nitrito é mais interessante do que o NACET-SNO, sendo necessários adições de 150 mg NEq/kg para se perceber uma cor curada característica. No entanto, vale ainda ressaltar que as diferenças percebidas na cor do produto imediatamente após o cozimento tendem a se tornar ainda mais perceptíveis durante o armazenamento, visto que, a manutenção da estabilidade da cor curada é dependente da disponibilidade de NO no produto, ou seja, também é dependente do nitrito residual (SEBRANEK; BACUS, 2007). A exposição do pigmento nitrosil hemocromo à luz e baixos níveis de oxigênio, durante o fatiamento e embalagem por exemplo, podem promover sua oxidação à globina hemicromo (RAMOS; GOMIDE, 2017), de cor acinzentada, acarretando mudanças na cor percebida. Neste contexto, o uso de ácido ascórbico, ou outro antioxidante, associado aos RSNOs pode ser uma alternativa interessante para ser avaliada, visando a obtenção de uma ação antioxidante sinérgica, principalmente em produtos adicionados de baixos níveis de entrada de RSNOs.

Conclusões

Os resultados deste experimento comprovam que os RSNOs possuem um grande potencial de substituição do nitrito de sódio em produtos curados cozidos. Adições de 50 ou 150 mg NEq/kg de RSNOs são suficientes para gerar cor curada instrumental e capacidade antioxidante similares à adição de quantidades equimolares de nitrito, porém com valores bem baixos de nitrito residual. No entanto foi necessária a adição de 150 mg NEq/kg de NAC-SNO para que a percepção sensorial da cor curada fosse similar à amostra referência que continha quantidades equimolares de nitrito. Entre os RSNOs, a modificação na molécula de NAC para a geração de NACET-SNO não foi vantajosa, pois a cor curada percebida foi menos intensa do que aquelas de referência, mesmo em adições de 150 mg NEq/kg.

Trabalhos futuros são necessários para avaliar a estabilidade dos produtos adicionados de RSNOs comparada ao nitrito durante o armazenamento pois, de acordo com os resultados obtidos, o “estoque” de NO através do nitrito residual é limitado para manutenção das características desejadas, como cor e retardo da peroxidação lipídica. Além disso, a formação de N-nitrosaminas e a atividade antimicrobiana contra deterioradores e patógenos, em especial o *Clostridium botulinum*, também devem ser avaliadas, pois estas estão associadas, direta ou indiretamente, à formação de NO e ao teor de nitrito residual.

Referências

BRASIL. Ministério da Saúde (MS), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC no. 272, 14 de março de 2019. Dispõe sobre os aditivos alimentares autorizados para uso em carnes e produtos cárneos. Brasília, **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, seção no. 52, 2019.

CARDOSO, G.P. et al. Retail display of beef steaks coated with monolayer and bilayer chitosan-gelatin composites. **Meat Science**, v.152, p.20-30, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.02.009>

DELGADO-PANDO, G. et al. Clean label alternatives in meat products. **Foods**, v.10, n.7, p.1615, 2021. <https://doi.org/10.3390/foods10071615>

DOMÍNGUEZ, R. et al. A comprehensive review on lipid oxidation in meat and meat products. **Antioxidants (Basel)**, v.8, n.10, 2019. <https://doi.org/10.3390/antiox8100429>

DUTRA, M. P. et al. Combined effects of gamma radiation doses and sodium nitrite content on the lipid oxidation and color of mortadella. **Food Chemistry**, v.237, n.1, p.232-239, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.108>

GUIMARÃES, A. S. et al. Assessment of Japanese radish derivatives as nitrite substitute on the physicochemical properties, sensorial profile, and consumer acceptability of restructured cooked hams. **Meat Science**, v.192, p.108897, 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2022.108897>

HONIKEL, K.O. The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. **Meat Science**, v.78, n.1-2, p.68-76, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.05.030>

IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. In: **Red Meat and Processed Meat**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, v.114, 2018.

JUNG, S. et al. Direct infusion of nitrite into meat batter by atmospheric pressure plasma treatment. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.39, p.113-118, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.11.010>

KANNER, J.; JUVEN, B. J. S-Nitrosocysteine as an antioxidant, color-developing, and anticlostridial agent in comminuted Turkey meat. **Journal of Food Science**, v.45, n.5, p.1105-1112, 1980. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1980.tb06497.x>

KANNER, J. et al. S-Nitroso-N-acetylcysteine (NAC-SNO) as an antioxidant in cured meat and stomach medium. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.67, n.39, p.10930-10936, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03741>

KING, D. A. et al. American Meat Science Association Guidelines for Meat Color Measurement. **Meat and Muscle Biology**, v.6, n.4, p.1-81, 2023. <https://www.iastatedigitalpress.com/mmb/article/id/12473/>

KUMAR, R. et al. S-Nitroso-N-acetyl-L-cysteine ethyl ester (SNACET) catheter lock solution to reduce catheter-associated infections. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v.13, n.22, p.25813-25824, 2021. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c06427>

LIU, R. et al. Contribution of nitric oxide and protein S-nitrosylation to variation in fresh meat quality. **Meat Science**, v.144, p.135-148, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.04.027>

LÓPEZ-RODRÍGUEZ, R. et al. Pathways for N-nitroso compound formation: secondary amines and beyond. **Organic Process Research & Development**, v. 24, n. 9, p.1558-1585, 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.0c00323>

MAJOU, D.; CHRISTIEANS, S. Mechanisms of the bactericidal effects of nitrate and nitrite in cured meats. **Meat Science**, v.145, p.273-284, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.06.013>

MATHEWS, W. R.; KERR, S. W. Biological activity of S-nitrosothiols: the role of nitric oxide. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.267, n.3, p.1529-37, 1993. <https://jpet.aspetjournals.org/content/267/3/1529.short>

PARK, J.-E. et al. Distribution of Seven N-Nitrosamines in Food. **Toxicological Research**, v.31, n.3, p.279-288, 2015. <http://dx.doi.org/10.5487/TR.2015.31.3.279>

PIKUL, J. et al. Evaluation of three modified TBA methods for measuring lipid oxidation in chicken meat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.37, n.5, p.1309-1313, 1989.

PROVERBIO, M. R. et al. Early diagnosis and treatment in a child with foodborne botulism. **Anaerobe**, v.39, p.189-192, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.12.002>

QIU, Y. et al. One representative water supply system in China with nitrosamine concern: Challenges and treatment strategies. **Journal of Environmental Sciences**, v.88, p.12-20, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2019.08.005>

RAMOS, E.M.; GOMIDE, L.A.M. **Avaliação da qualidade de carnes: Fundamentos e metodologias**. 2a ed. Viçosa: Editora UFV, 2017. 473p.

SEBRANEK, J. G.; BACUS, J. N. Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues? **Meat Science**, v.77, n.1, p.136-147, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.03.025>

SHPAIZER, A. et al. S-Nitroso-N-acetylcysteine generates less carcinogenic N-nitrosamines in meat products than nitrite. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.66, n.43, p.11459-11467, 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04549>

SINDELAR, J.; MILKOWSKI, A. Sodium nitrite in processed meat and poultry meats: a review of curin and examining the risk and benefit of its use. **White Paper**, Series No, v.3, p.1-14, 2011.

STOICA, M. et al. New strategies for the total/partial replacement of conventional sodium nitrite in meat products: a review. **Food and Bioprocess Technology**, v.15, n.3, p.514-538, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11947-021-02744-6>

TSIKAS, D. et al. GC–MS analysis of S-nitrosothiols after conversion to S-nitroso-N-acetyl cysteine ethyl ester and in-injector nitrosation of ethyl acetate. **Journal of Chromatography B**, v.877, n.28, p.3442-3455, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.06.032>

USHER, C. D.; TELLING, G. M. Analysis of nitrate and nitrite in foodstuffs: A critical review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.26, n.11, p.1793-1805, 1975. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740261122>

VAN BREDA, S. G. et al. Replacement of nitrite in meat products by natural bioactive compounds results in reduced exposure to n-nitroso compounds: the PHYTOME project. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.65, n.20, p.2001214, 2021. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202001214>

VAN DEN BROEKE, L. T.; VAN HENEGOUWEN, G. M. J. B. UV Radiation Protecting Efficacy of Cysteine Derivatives, Studies with UVA-induced Binding of 8-MOP and CPZ to Rat Epidermal Biomacromolecules in Vivo. **International Journal of Radiation Biology**, v.67, n.4, p.411-420, 1995. <https://doi.org/10.1080/09553009514550471>

WIEGEL, J. Clostridiaceae. In: TRUJILLO, M.E. et al. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, 2015. p.1-5.

ARTIGO 3

Artigo publicado na revista *Meat Science* (ISSN 0309-1740)

DOI: 10.1016/j.meatsci.2023.109397

Meat Science 209 (2024) 109397



ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Meat Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meatsci



S-nitrosothiols as nitrite alternatives: Effects on residual nitrite, lipid oxidation, volatile profile, and cured color of restructured cooked ham

Bruna Fernandes Andrade^a, Angélica Souza Guimarães^a, Lorrany Ramos do Carmo^a,
Marcelo Stefanini Tanaka^a, Paulo Rogério Fontes^b, Alcinéia de Lemos Souza Ramos^a, Eduardo
Mendes Ramos^{a,*}

^a Departamento de Ciência dos Alimentos, Escola de Ciências Agrárias de Lavras, Universidade Federal de Lavras, 37200-900 Lavras, Minas Gerais, Brazil

^b Departamento de Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900 Viçosa, Minas Gerais, Brazil

S-Nitrosothiols as nitrite alternatives: effects on residual nitrite, lipid oxidation, volatile profile, and cured color of restructured cooked ham

Abstract

This study evaluated the use of the S-nitrosothiols, S-nitroso-N-acetylcysteine (NAC-SNO) and S-nitroso-N-acetylcysteine ethyl ester (NACET-SNO), at different concentrations (25–300 mg nitrite equivalent – NEq/kg) as sodium nitrite substitutes in restructured cooked hams. The pH value and instrumental cured color were not affected by the type or amount of curing agent used. Products with 25 and 50 mg/kg ingoing nitrite had lower thiobarbituric acid-reactive substance values than those with equimolar amounts of S-nitrosothiols. Products with more than 150 mg NEq/kg of S-nitrosothiols had residual nitrite similar to 50 mg/kg nitrite, and this resulted in the same volatile compound profile as nitrite added in equimolar amounts. A 300 mg NEq/kg of S-nitrosothiols was required to obtain a similar and minimally stable cured pink color perception as sliced samples with 50–150 mg/kg added nitrite. The results obtained collaborate the great potential of both alternative curing agents in the complete replacement of nitrite by equimolar amounts in restructured cooked products; however, differences in cured color stability should be considered.

Keywords: S-nitrosothiols, N-acetyl cysteine (NAC), N-acetyl cysteine ethyl ester (NACET), sensorial color, nitrite residual.

1. Introduction

Curing is a traditional food preservation method involving the use of nitrite salts or their nitrate precursors. Nitrite is a food additive that acts as a multifunctional meat-curing ingredient that confers the unique reddish-pink color and flavor, and possesses proper attributes of oxidative stability, microbiological safety, and shelf-life extension of processed cured meats ([Guimarães, Guimarães, Rodrigues, Fontes, Ramos, & Ramos, 2022](#); [Stoica et al., 2022](#)). Despite the advantages of using curing salts in the meat industry, their addition is associated with the production of nitrous compounds, such as N-nitrosamines, which have mutagenic and genotoxic properties and, therefore, have a strong oncogenic effect in humans, particularly with respect to colorectal cancer ([IARC, 2018](#); [van Breda et al., 2021](#)). In meat products, N-nitrosamines can be formed during processing and/or during stomach digestion, in which the acidic condition acts as a catalytic agent. N-nitrosamines can be formed through a reaction between secondary amines and nitrosating agents, such as nitrous anhydride

(N_2O_3), derived from the curing reactions of nitrite to nitric oxide (NO) (Li et al., 2021). In view of its role in nitrous compounds formation, the scientific community is increasingly focusing on designing better strategies to completely or partially replace conventional nitrites in meat products (Sebranek & Bacus, 2007). Therefore, there is a growing consumer demand for low-nitrite or nitrite-free meat products.

There is an undeniable need to reduce or remove curing salts from meat formulations, but this is challenging because they are additives with multiple purposes. In general, proposals for nitrite substitutes include the use of natural food colorants to obtain similar cured colors (Kauser-Ul-Alam, Hayakawa, Kumura, & Wakamatsu, 2021; Luzardo-Ocampo, Ramírez-Jiménez, Yañez, Mojica, & Luna-Vital, 2021; Shahidi & Pegg, 1992), biopreservation techniques (bacteriocin, essential oils, plant extracts, protective cultures, enzymes, organic acids and amino acids) or non-thermal technologies (irradiation, high pressure, pulse electric field and cold plasma) to ensure microbiological safety (Barcenilla, Ducic, López, Prieto, & Álvarez-Ordóñez, 2022; Dutra et al., 2016; Martins et al., 2021; Silva et al., 2021; Stoica et al., 2022), and plant powders or extracts as “natural curing agents” (Guimarães et al., 2021; Guimarães et al., 2022; Sindelar, Cordray, Sebranek, Love, & Ahn, 2007). However, the use of these techniques involves the partial reduction of nitrite or requires combinations with other techniques to obtain all the effects (sensory, antimicrobial, and antioxidant) conferred using curing salts. Replacing synthetic nitrites with “natural” nitrite sources obviously does not reduce the risk of nitrous compounds formation any more than simply reducing the addition of nitrite.

The great difficulty in replacing nitrite lies in the fact that new strategies must ensure the same safety (chemical and microbiological) as curing with this additive, not to mention the same sensory attributes. In this sense, chemical carriers of NO have a high potential as substitutes for nitrite, since they can “deliver” NO for direct reactions with other meat compounds without the formation of intermediates (such as N_2O_3), conferring sensory properties, desirable microbiological conditions, and avoiding or reducing the production of N-nitrosamines (Shpaizer, Kanner, & Tirosh, 2021). NO carriers naturally occur in humans and constitute one of the most stable forms of NO; *in vivo*, they are mainly used as signals in physiological and pathophysiological phenomena (Liu, Warner, Zhou, & Zhang, 2018).

Thiols (R-SH) derived from amino acids or peptides, such as L-cysteine, glutathione, and N-acetyl-L-cysteine, have been suggested as NO carriers for use as total curing salt substitutes in meat products (Kanner & Juven, 1980; Kanner, Shpaizer, Nelgas, & Tirosh, 2019; Shpaizer et al., 2021; Shpaizer, Nussinovich, Kanner, & Tirosh, 2018). The active form

of the carriers comprises forming S-nitrosothiols obtained through the reaction of S-nitrosylation with NO (Mathews & Kerr, 1993). In heated meat models (ground beef or turkey meat), S-nitroso-N-acetylcysteine (NAC-SNO) generates a nitrosyl-hemochrome pink pigment (Kanner & Juven, 1980; Shpaizer et al., 2018) and acts as antioxidant (Kanner & Juven, 1980; Kanner et al., 2019) similar to nitrite; however, it is much less reactive for N-nitrosamine formation under conditions relevant to meat production and digestion in the stomach (Shpaizer et al., 2018). More recently, Shpaizer et al. (2021) reported that NAC-SNO in meat and sausage broth have anticlostridial effects similar to those of nitrite under the same conditions and concentrations. Although these studies have shown promising results, there are many gaps in the industrial application of these compounds in meat products.

There are still many limitations to the use of S-nitrosothiols with regard to scientific understanding and application forms consistent with industrial practices, especially regarding the technological, sensory, chemical, and microbiological effects on traditional meat products. Furthermore, only the application of the NAC-SNO compounds in meat products has been evaluated in more depth within the scientific literature; however, these evaluations were conducted *in vitro* or in model systems. Modifications to the structure of S-nitrosothiols to improve their properties are also a potential field of study. An example of this is the esterification of the carboxylic acid group of N-acetyl-L-cysteine, producing N-acetyl-L-cysteine ethyl ester, which has greater antioxidant potential and greater solubility in water and organic solvents than N-acetyl-L-cysteine (Tsikas et al., 2018). Thus, the objective of this study was to evaluate the equivalence of the use of NAC-SNO and S-nitroso-N-acetylcysteine ethyl ester (NACET-SNO) in relation to sodium nitrite in the restructured cooked ham formulation, and to evaluate the effects of the type and concentration of S-nitrosothiols on the residual nitrite content, antioxidant action, and development and stability of the cured color.

2. Materials and methods

2.1 S-Nitrosothiol synthesis

S-nitrosothiols were synthesized by the S-nitrosation of the thiols N-acetylcysteine and N-acetylcysteine ethyl ester in an acidic sodium nitrite (NaNO_2) solution (Shpaizer et al., 2018; Tsikas, Dehnert, Urban, Surdacki, & Meyer, 2009). N-acetyl-L-cysteine was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and N-acetylcysteine ethyl ester was synthesized from N-acetyl-L-cysteine using acetyl chloride and absolute ethanol, as described by Van den Broeke and Van Henegouwen (1995). To 50 mL of a solution of N-acetyl-L-cysteine

(61.3 mmol) in absolute ethanol, anhydrous hydrochloric acid (generated by 2.42 mL acetyl chloride + 3.0 mL absolute ethanol) was added slowly with stirring. After 4 h of stirring at room temperature (approximately 25 °C), the solution was evaporated until dehydrated. According to [Tsikas et al. \(2018\)](#), N-acetylcysteine ethyl ester is a white powder that is freely soluble in water and organic solvents at room temperature.

S-nitrosothiols were synthesized by reacting equimolar amounts of sodium nitrite aqueous solution with the corresponding thiol (N-acetylcysteine or N-acetylcysteine ethyl ester) in HCl (0.1 M) with stirring at 30 °C for 10 min while protected from light. S-Nitroso-N-acetylcysteine (NAC-SNO) and S-nitroso-N-acetylcysteine ethyl ester (NACET-SNO) solutions were used up to 4 h after synthesis (stored at 4°C protected from light). The S-nitrosothiols solution concentration were previously quantified immediately before use in the products formulations (to ensure equimolar concentrations the amount of nitrite used) by measuring UV absorbance (Genesys 10 UV; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) at 330 nm and 334 nm and calculated from the extinction coefficients of $727 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ and $780 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for NAC-SNO (MW = 192.20) and NACET-SNO (MW = 220.25), respectively ([Kumar, Massoumi, Chug, & Brisbois, 2021](#); [Mathews & Kerr, 1993](#)).

2.2 S-Nitrosothiol equivalence with nitrite

To evaluate the equivalence of the use of S-nitrosothiols as substitutes for nitrite, base formulations of restructured cooked hams (designated as “apresentado” in Brazil) were prepared in five independent batches (repetitions) with the same raw material and ingredients in each batch containing: 81% pork shoulder, 1.8% salt (NaCl), 0.3% monosodium glutamate, 0.4% tripolyphosphate, 1% cassava starch and 0.5% flavoring and seasonings (“Condimento California”; New Max Industrial Ltd., Americana, SP, Brazil). For each batch, the basic batter was divided into 19 portions, which were randomized into the following treatments: one formulation without nitrite or S-nitrosothiols (control); and 18 formulations with six different concentrations (0.36 to 4.35 mM) of NaNO₂, NAC-SNO and NACET-SNO, which are equivalent to the addition of 25, 50, 75, 150, 225, and 300 mg nitrite equivalent – NEq/kg. Formulations containing nitrite were also added to the antioxidant sodium erythorbate (500 mg/kg), which was not used in the formulations containing S-nitrosothiols because of the antioxidant activity of these carriers, as reported by [Shpaizer et al. \(2018\)](#) and [Kanner et al. \(2019\)](#).

2.2.1 Restructured cooked ham processing

For the manufacturing of the restructured cooked hams, pork shoulders were ground (PB-22; Beccaro Ltda, Rio Claro, SP, Brazil) through discs with 10-mm diameter holes, the basic meat batter ingredients and 10% of water were added. This was mixed (Jamar; Indústrias Jamar, Tapuã, SP, Brazil) for 15 min, and the final batter was equally distributed among the treatments. For each defined treatment, solutions of nitrite or S-nitrosothiols (dissolved in 5% of water) were added to the batter, manually mixed, and stuffed in 45-mm diameter opaque nylon-polyamide casings (Walsroder K plus; Walsroder Packaging LLC, Lombard, IL, USA) to produce samples of approximately 300 g. The products were stored at 4 °C overnight for the curing process, and cooked in a water bath (80 °C) until reaching an internal temperature of 70 °C (accompanied by a flexible thermocouple probe). After cooking, the products were immediately immersed in an ice-water bath for 10 min and stored (at 4 °C) for 24 h before analysis.

2.2.2 pH and residual nitrite content

The cooked hams were unpacked, and the mean pH value was determined by inserting the electrode of a portable pH meter (Testo 206-pH 2; Testo do Brazil, Campinas, SP, Brazil) into the three central regions of the products.

Residual nitrite content (NO₂R) was determined using the Griess test according to the procedure described by [Guimarães et al. \(2021\)](#). Briefly, samples were homogenized (Turratéc TE 102; TECNAL, Piracicaba, SP, Brazil) in hot distilled water (proportion 1:8, w/v) and incubated for 2 h in a water bath at 80 °C. The homogenate was then filtered and diluted to a known volume with distilled water. A 2 mL aliquot was mixed with 1 mL distilled water and 0.2 mL of 1% sulfanilamide solution (0.5 M HCl) and incubated in the dark for 5 min at room temperature. Then, the mixture of 0.2 mL of 0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine hydrochloride (NED) solution was added, vortexed, and total volume brought to 10 mL with distilled water. After incubation for 15 min (at room temperature) in the dark, the absorbance was measured at 540 nm. NO₂R was determined using an analytical curve of NaNO₂ and was expressed as mg NO₂/kg.

2.2.3 Lipid oxidation

The lipid oxidation of the products was assessed by the thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) method, with modifications of the procedures described by [Pikul, Leszczynski, and Kummerow \(1989\)](#). Approximately 5 g of the sample was homogenized in

15 mL of 3.86% perchloric acid solution and 1 mL of 0.15% butylhydroxytoluene. The extract was filtered, an aliquot of 2 mL was added to 2 mL of 0.02 M thiobarbituric acid (TBA) solution (in 3.86% perchloric acid), vortexed, and the mixture incubated in a water bath (at 90 °C) for exactly 30 min. After cooling in an ice bath for 5 min, absorbance was measured at 532 nm. The TBARS values were expressed as milligrams of malondialdehyde (MDA) per kilogram of product (mg MDA/kg), using 72.02 g/mol as molecular weight of MDA and $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ as the extinction coefficient of the pink TBA chromogen (Sinnhuber & Yu, 1958).

2.2.4 Color

The products were cut into slices of 1-cm thickness and the inner surface was immediately evaluated using a CM-700 portable colorimeter (Kônica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japan) with a door opening of 8 mm, illuminant D65, observation angle of 10°, and specular component excluded (SCE). Five readings were taken from the surface of the samples, with the reflectance spectrum (360–740 nm) recorded and the color indices obtained in the CIELAB and CIELCH systems: lightness (L^*), redness (a^*), yellowness (b^*), chroma (C^*), and hue angle (h , degrees). The cured color index (nitrosyl hemochrome pigment formation) was determined using the reflectance ratio of the wavelengths R650/570 nm (AMSA, 2012).

2.3 Color perception

To determine the effects of nitrite substitutes on the sensory perception of cured color, products containing 50, 150, and 300 mg NEq/kg of each treatment (NaNO₂, NAC-SNO, and NACET-SNO), plus the control (no curing agent), were prepared using the same formulation described in Section 2.2. For this analysis, 1 kg of each treatment was prepared in triplicate (batch). Restructured cooked ham was processed as described by Guimarães et al. (2022). The pork shoulders were ground, supplemented with ingredients, vacuum-packed (TM-250; TecMaq, SP, Brazil) in nylon-polyethylene bags, and shaped into a 1-kg cooked ham using a metal form. After curing for 12 h at 4 °C, the products were cooked in a water bath (80 °C) until reaching an internal temperature of 70 °C (determined by a flexible thermocouple probe). Immediately after cooking, the products were cooled in an ice-water bath for 15 min and kept overnight (at 4 °C) for the slicing process.

The products were removed from the packaging and sliced into 1-cm thick slices, which were cut into pieces of 6 × 8 cm surface area and individually vacuum-packed in

nylon-polyethylene bags (90 μm thick and with an oxygen transmission rate of 30–60 $\text{cm}^3/\text{m}^2/\text{d}/\text{atm}$) to conduct the sensorial and physiochemical evaluation.

2.3.1 Sensorial analysis

A sensory analysis of appearance was carried out to evaluate the intensity of the cured color attribute in samples with different types and concentrations of curing agents through the methodology optimized descriptive profile (ODP). The analysis was conducted in the sensory analysis laboratory of the Food Science department of the Federal University of Lavras after ethical approval was obtained from the Human Research Ethics Committee of UFLA (CAAE:61211922.0.0000.5148), and the volunteers signed a Free and Informed Consent Form. Therefore, 25 panelists who claimed to be frequent consumers of restructured cooked hams (“apresentados”) were selected.

The ODP analysis was conducted as described by Cardoso et al. (2019) but using untrained panelists. According to O'Sullivan, Byrne, and Martens (2003) the sensory visual assessment of meat products can be performed effectively without training when the product color is familiar to the assessors. All samples was presented at one time to prainelistas and they were asked to compare the samples with the reference materials for indicate the pink intensity for each sample on the scale on a 9-cm unstructured scale. The coded (3-digit code) samples was presented using a balanced block design, in which each panelist evaluated all treatments (including the coded references) in three sections (one for each repetition). The reference for “intense pink cured color” (score 9) was the 300 mg/kg nitrite-formulated sample, and that for “mild pink cured color” (score 0) was the uncured samples (without curing agent). The sliced samples were evaluated vacuum-packed, in individual booths and under white light, within a maximum period of 2 hours after slicing and packaging (being kept in the dark at 4 °C before evaluation).

2.3.2 Physiochemical analysis

The color of the internal surface of the samples was evaluated immediately after slicing (inner) and at the time of sensory evaluation (sliced; after packaging storage at 4 °C for about 2 h). Color readings were performed using a CM-700d portable spectrophotometric colorimeter, as described in Section 2.2.5. The colorimeter was calibrated with a packaging film over a white calibration standard when packed samples (sliced) were evaluated. After the sensorial analysis, the sample packages were opened, and TBARS and NO_2R analyses were conducted according to Sections 2.2.2 and 2.2.3, respectively.

2.4 Volatile compound profile

Rather than quantifying volatile organic compound concentrations, the approach was intended to observe the relative changes between cured and uncured samples and relate these findings to the curing agent type and concentration used. Therefore, this analysis was conducted on the uncured samples and those cured with each curing agent (nitrite, NAC-SNO, and NACET-SNO) from section 2.3 before slicing process. Portions of the three replicates of each treatment were ground simultaneously to obtain a pooled sample for the screening analysis.

The separation and identification of volatile organic compound were conducted as reported by [Haddad et al. \(2022\)](#) using a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer (GC-MS, QP2010 Plus model; Shimadzu®, Kyoto, Japan), equipped with an automatic injector for liquids and gases (AOC-5000; Shimadzu®) and an SLB®-5MS capillary column (5% phenyl- 95% dimethylsiloxane; 30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness; Supelco, Bellefonte, PA, USA). Helium 5.0 was used as carrier gas at a flow rate of 1.0 mL/min. The ionization potential of MS was 70 eV, the interface and ion source temperatures were 250 °C and 200 °C, respectively, and the scan range was 45 to 350 Da with a solvent cut in 0.55 min.

About 2.5 g of the pooled sample (in duplicate) was weighed into a 22 mL headspace vial and sealed with a PTFE-faced silicone septum (Supelco). The volatile organic compound were extracted by headspace-solid phase micro-extraction (HS-SPME), using a divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane fiber (DVB/CAR/PDMS; 10 mm length, 50-30 µm-thick layer; Supelco Bellefonte, PA, USA) as the stationary phase, and cleaned before extraction at 250 °C for 5 min to prevent possible contamination. The vials were preheated for 10 min at 60 °C in a heating block, and then the SPME fibers were exposed in the headspace for 45 min to extract the compounds. Thermal desorption was performed at 250 °C in a splitless-mode injector for 2 min. Ramped oven temperature was used to improve the separation of volatiles: it began with 35 °C for 2 min and then increased to 80 °C by 2 °C/min, then to 150 °C at 4 °C/min, and finally to 230 °C at 8 °C/min.

Volatiles were identified by comparing the mass spectral data of the samples with those in the MS software library (Wiley 8 and FFNSC 1.2). A homologous series of alkanes (Supelco Bellefonte, PA, USA) were used as standards to confirm the identification using a mass-selective detector. The area of each peak was integrated using the GCMS Solutions Software (Shimadzu®) and the data presented as total ion counts.

2.5 Statistical analysis

For equivalence analyses of the S-nitrosothiols with nitrite (section 2.2), the treatments were arranged in a completely randomized design (CRD) in a factorial scheme of 3 (curing agents) \times 6 (concentrations: 25 to 300 mg NEq/kg) in five independent batches (repetitions).

The treatments (combinations of three curing agents at three concentrations and an uncured sample) for the ODP analysis (section 2.3) were arranged in a randomized block design, in which each panelist represented a block. Data for the color and physicochemical analyses of the sensorial samples were arranged in a CDR scheme with 3 (curing agents) \times 3 (concentrations: 50–300 mg NEq/kg), with three repetitions.

The main factors and their interactions were tested using two-way analysis of variance (ANOVA). When significant ($P < 0.05$), the means were separated using Tukey's test. When necessary, treatments were also compared ($P < 0.05$) with uncured samples using Dunnett's test. To explore the relationships between volatile organic compound within treatments (cured agent type \times concentration) a principal component analysis (PCA) was performed. The uncured sample was also included, however, the volatile organic compound formed only in these samples were not evaluated in the PCA.

Statistical analysis was performed using the Statistica® 8.0 software (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

3. Results and discussion

3.1 S-nitrosothiols equivalence with nitrite

The effects of different curing agents at different concentrations on the physicochemical and technological characteristics of restructured cooked hams are shown in Table 1.

3.1.1 pH and residual nitrite

There were no significant differences ($P < 0.05$) in pH values among the different treatments and concentrations evaluated (Table 1). The average pH value (6.26 ± 0.09) found for cured products was similar to the uncured samples (6.24 ± 0.10) and was in line with what is expected for “apresentados” which varies from 6.00 to 6.35 (Guimarães et al., 2022). The addition of extremely acidic S-nitrosothiols solutions (close to pH 2.0) did not cause any change in the final pH of the product, most likely because of the small volume added (relative to the percentage of meat mass).

Table 1. Effects of the type (T) and concentration (C, as nitrite equivalent) of the curing agent on pH values, nitrite residual content (NO₂R), lipid peroxidation (TBARS), CIE color indices and cured color of the restructured cooked hams.

Effects	Source of variation	pH	NO ₂ R (mg/kg)	TBARS (mg MAD/kg)	CIE color					Cured color (R650/570 nm)
					<i>L</i> *	<i>a</i> *	<i>b</i> *	<i>C</i> *	<i>h</i> (°)	
Curing agente, T	Nitrite	6.29	41.76	0.30	61.46	8.47	7.51	11.34	41.75	2.04
	NAC-SNO	6.28	5.09	0.46	61.33	8.56	7.54	11.42	41.55	2.06
	NACET-SNO	6.23	4.70	0.49	62.21	8.46	7.69	11.45	42.32	2.03
Concentration, C (mg NEq/kg)	25	6.28	2.03	1.15	61.43	8.62	7.20 ^c	11.25	40.04	2.06
	50	6.28	4.24	0.52	61.50	8.48	7.50 ^{bc}	11.33	41.64	2.04
	75	6.28	6.79	0.26	61.56	8.42	7.41 ^{bc}	11.24	41.57	2.04
	150	6.26	17.19	0.20	62.13	8.53	7.65 ^{ab}	11.47	42.12	2.04
	225	6.25	34.12	0.18	61.82	8.46	7.81 ^{ab}	11.53	42.82	2.04
	300	6.25	38.74	0.18	61.55	8.47	7.90 ^a	11.60	43.07	2.05
	SEM	0.01	2.99	0.08	0.39	0.14	0.09	0.10	0.67	0.02
Pr > F*	T	<i>0.069</i>	<0.001	<0.001	<i>0.666</i>	<i>0.925</i>	<i>0.362</i>	<i>0.920</i>	<i>0.611</i>	<i>0,797</i>
	C	<i>0.933</i>	<0.001	<0.001	<i>0.997</i>	<i>0.997</i>	0.003	<i>0.893</i>	<i>0.124</i>	<i>0,999</i>
	TxC	<i>0.989</i>	<0.001	<0.001	<i>1.000</i>	<i>0.998</i>	<i>0.457</i>	<i>0.998</i>	<i>0.773</i>	<i>0,999</i>

NAC-SNO = S-nitroso-N-acetylcysteine; NACET-SNO = S-nitroso-N-acetylcysteine ethyl ester; TBARS = thiobarbituric acid-reactive substances; MAD = malondialdehyde; NEq = nitrite equivalent; *L** = lightness; *a** = redness; *b** = yellowness; *C** = chroma; *h* = hue angle; and SEM = standard error of the mean (*n* = 90).

* Significant probabilities ($P < 0.05$) were highlighted in bold.

^{a-c} Means followed by different letters in the column, within the effects, differ ($P < 0.05$) by Tukey test.

For the residual nitrite values (NO_2R), there was a significant interacting effect between the curing agents and the evaluated concentrations (Table 1). Overall, the formulations with NAC-SNO and NACET-SNO did not differ ($P > 0.05$) from each other in terms of NO_2R content, regardless of the concentration used (Figure 1); however, the observed values were significantly lower than those found in the samples containing nitrite at concentrations greater than 25 mg NEq/kg. Moreover, the NO_2R content of the samples with 25 mg/kg nitrite added and up to 150 mg NEq/kg S-nitrosothiols did not differ ($P > 0.05$) from those of the uncured samples (mean of 2.71 ± 1.69 mg/kg). Some ingredients from the basic formula, including sea salt and spices/seasonings, could be nitrate sources (Sebranek & Bacus, 2007), which explains the presence of NO_2R in the control samples, even at very low concentrations. Furthermore, according to Usher and Telling (1975), the determination of nitrite by the formation of a diazo compound (Griess test) is not reliable for determining low (< 10 mg/kg) nitrite levels in food samples.

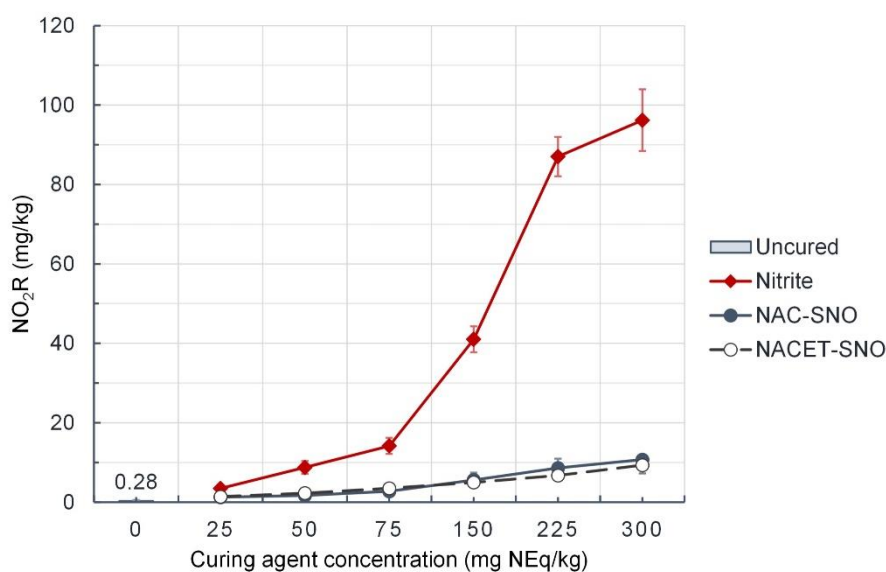


Figure 1. The effect of different types and concentrations of curing agents on residual nitrite values (NO_2R) in restructured cooked hams. NEq = nitrite equivalent; Nitrite = sodium nitrite; NAC-SNO = S-nitroso-N-acetylcysteine; NACET-SNO = S-nitroso-N-acetylcysteine ethyl ester. Bars represent the standard error of the mean ($n = 5$).

In principle, the presence of NO_2R in samples containing S-nitrosothiols can be attributed to its synthesis or degradation. The synthesis reaction takes place under acidic conditions (pH close to 2.0) and yield more than 95% of S-nitrosothiols (Shpaizer et al., 2018). Moreover, as the amount of nitrite in the reaction is equimolar to the thiols, it is not

expected that there will be a residual nitrite in the solution because under these conditions, nitrite tends to rapidly decompose to NO gas (Honikel, 2008), and most of the NO interacts with thiols to yield S-nitrosothiols. Therefore, the generation of NO₂R, although minimal, may be related to the direct decomposition of S-nitrosothiols and the release of NO, which in the presence of oxygen can be easily oxidized to nitrite anions (Honikel, 2008; Pegg & Shahidi, 2004). On average, the NO₂R values after cooking were in the order of 3.9% of the amount of added S-nitrosothiols.

Adding more sodium nitrite implied higher NO₂R concentrations, as observed by Dutra et al. (2017) in a mathematical model of mortadella elaborated with different concentrations of nitrite (up to 300 mg/kg). Moreover, the NO₂R concentration in the nitrite-supplemented samples decreased sharply with processing (Figure 1). This was expected because much of the nitrite added during product manufacturing is depleted through a series of reactions or is physically lost during certain manufacturing steps (Pegg & Shahidi, 2004). As an extremely reactive compound, nitrite can react with or bind to several constituents of the meat system, and heat during thermal processing accelerates these reactions (Silva et al., 2021). According to Sindelar & Milkowski (2011) about 10 to 20% of added nitrite is expected to remain after the manufacturing process, but this depends on several conditions (type of meat product, time and temperature of the thermal processing, ingredients added, etc.). In the present study, the amount of nitrite added was reduced to 16.7% for a 25–75 mg/kg ingoing level, and close to 32.7% for 150–300 mg/kg. In cooked hams, a reduction of 38% with 100 and 150 mg/kg ingoing nitrite was reported by Myers, Cannon, Montoya, Dickson, Lonergan, and Sebranek (2013) and a reduction of 32% of 200 mg/kg was noted by Sindelar et al. (2007), whereas Guimarães et al. (2022) observed a reduction of 23% and 13% when the amounts of ingoing nitrite were 150 mg/kg and 40 mg/kg, respectively.

Although lower NO₂R values in meat products are important for reducing the endogenous formation of N-nitrosamines in the human gastrointestinal tract (Stoica et al., 2022), the amount of nitrite present as residual nitrite is important to the effectiveness of its antimicrobial activity. Residual nitrite is a significant factor influencing *Clostridium* inhibition and, therefore, anti-botulinal protection (Dutra et al., 2016; Sebranek & Bacus, 2007). Pathogens such as *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, and *Escherichia coli* grow slower in the presence of nitrite at levels found in cured meat and poultry products (Myers et al., 2013; Shakil et al., 2022). Moreover, 10–15 mg/kg of residual nitrite is recommended to maintain cured meat color during storage, acting as a reservoir for cured color regeneration and delaying the fading process (Sebranek & Bacus, 2007; Sindelar

& Milkowski, 2011). In this context, despite the possible direct effect of S-nitrosothiols, a greater amount of this curing agent (300 mg NEq/kg) than sodium nitrite (50–75 mg/kg) is necessary to obtain NO₂R content in meat products.

3.1.2 Lipid oxidation

As observed for NO₂R, lipid oxidation, as evaluated by TBARS values, was affected ($P < 0.05$) by the interaction of curing agents and concentrations (Table 1), and formulations with NAC-SNO and NACET-SNO did not differ ($P > 0.05$) in each order, regardless of the concentration used (Figure 2). The antioxidant effects of S-nitrosothiols and nitrite were significantly dependent on their concentrations. However, the addition of 50 mg/kg sodium nitrite resulted in considerably lower ($P < 0.05$) TBARS values than the equimolar addition of S-nitrosothiols. Moreover, at lower concentrations (25 mg NEq/kg), the TBARS values of S-nitrosothiols samples did not differ significantly from the uncured cooked ones (mean of 1.39 ± 0.61 mg MAD/kg).

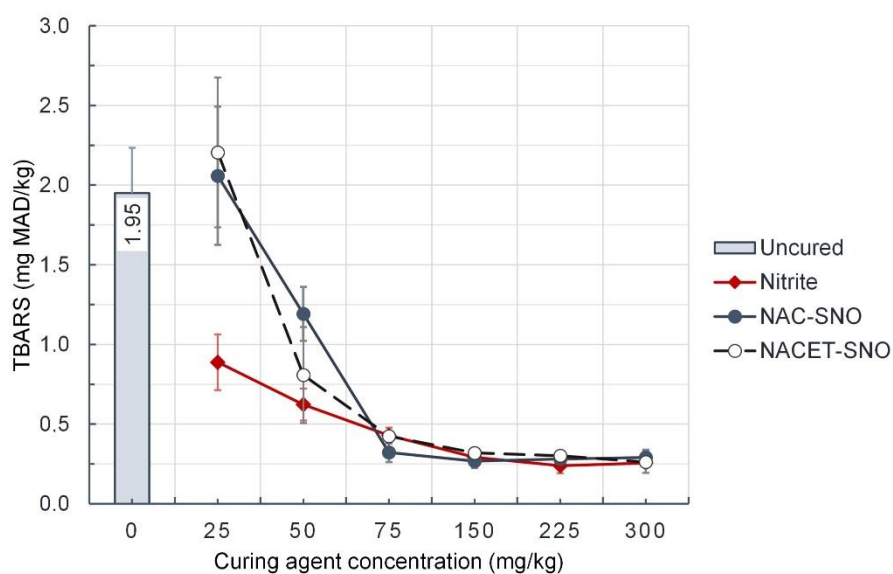


Figure 2. The effect of different types and concentrations of curing agents on TBARS values in restructured cooked hams. NEq = nitrite equivalent; MAD = malondialdehyde; Nitrite = sodium nitrite; NAC-SNO = S-nitroso-N-acetylcysteine; NACET-SNO = S-nitroso-N-acetylcysteine ethyl ester. Bars represent the standard error of the mean ($n = 5$).

According to Kanner et al. (2019), S-nitrosothiols acts as an antioxidant in two ways: the first being through the direct action of S-nitrosothiols as an inhibitor of linoleic acid oxidation and as a hydroperoxide decomposer; the second is through the donation of nitric

oxide to stabilize the reduced heme-iron present in myoglobin, similar to what happens with nitrite. Although nitrite is classified as a preservative, its strong antioxidant action is due to the stabilization of iron (both heme and non-heme) in its reduced state (Honikel, 2008; Pegg & Shahidi, 2004), especially when associated with a reducing agent such as ascorbic acid or its isomer (erythorbic acid).

Among the three complex reactions (autoxidation, enzymatic-catalyzed oxidation, and photooxidation) that oxidize lipids, autoxidation, which is a continuous free-radical chain reaction, is the most important process in meat and meat products (Araújo, 2011). Lipid autoxidation is a complex process which involves the formation (initiation stage) and propagation of lipid free radicals, beginning with the oxidation of the unsaturated lipids by reactive oxygen species, like hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) and hydroxyl radicals (OH^{\bullet}), forming hydroperoxides that are further degraded into secondary compounds. The main secondary compounds released include alcohols, ketones, alkanes, aldehydes, ethers, and hydrocarbons, which are responsible for sensory deterioration such as odors and flavors associated with lipid oxidation (Domínguez, Pateiro, Gagaoua, Barba, Zhang, & Lorenzo, 2019; Dutra et al., 2017). The TBARS assay measures the secondary species formed during lipid oxidation, such as carbonyls, ketones, and aldehydes, with higher TBARS values indicating greater lipid oxidation.

The oxidative stability of meat depends on the balance between anti- and prooxidant compounds, which can be intrinsic (meat composition) or extrinsic (processing and storage conditions). The presence of transition metals, especially iron (both heme and non-heme), is one of the main factors determining the oxidative stability of meat because they are capable of catalyzing different processes and stages of lipid oxidation (Domínguez et al., 2019). Free ionic iron released from heme pigments upon heating, especially in its reduced form (ferrous state), catalyzes the generation of hydroxyl radicals (OH^{\bullet}), which are highly oxidizing free radicals that initiate lipid peroxidation via hydrogen abstraction (Dutra et al., 2017). Therefore, by binding nitric oxide to myoglobin and forming the heat-stable nitrosylmyoglobin pigment (NOMb), nitrite, and S-nitrosothiols, it provides a cured color and prevents the release of heme iron and its subsequent catalysis of lipid oxidation. Moreover, the nitric oxide formed can react with radicals, interrupting radical chain reactions; in the presence of oxygen, it can be oxidized to form nitrite, contributing to the inhibition of autoxidation by oxygen sequestering (Honikel, 2008).

The behavior observed in this experiment for the TBARS values in relation to the amount of added sodium nitrite was very similar to that observed in mortadella by Dutra et al.

(2017), in which lower TBARS values were observed as greater amounts of nitrite were added. The addition of up to 50 mg/kg nitrite reduced ($P < 0.05$) the TBARS values of the cooked products, but greater additions did not result in significant differences. Moreover, the antioxidant effects of nitrite and S-nitrosothiols curing agents were not equivalent at all tested concentrations. Samples cured with up to 50 mg/kg nitrite showed lower TBARS values than samples containing the same equimolar amounts of S-nitrosothiols. These results are not in agreement with those observed by Kanner et al. (2019), who reported that NAC-SNO acts better than nitrite to provide antioxidant protection in meat models (turkey thigh meat grounded, mixed only with the curing agents, cooked to 75 °C in vacuum bags, stored in open bags at 4 °C for 10 d, and tested at pH 6.2 after incubation at 37 °C for 90 min). According to these authors, with additions of 0.5 mM to 2.5 mM (approximately 35 to 173 mg NEq/kg) of NAC-SNO, the TBARS values did not differ for samples containing nitrite, indicating an equimolar action as an antioxidant of both curing agents. Moreover, after four weeks of storage at 4 °C, these authors observed that the TBARS values of samples added with 2.5 mM NAC-SNO were approximately four times lower than samples with nitrite added at the same concentration. In a previous work, Kanner and Juven (1980) also evaluated the use of nitrite and NAC-SNO at different concentrations (0.73 mM and 1.45 mM = 50 and 100 mg NEq/kg) in the elaboration of a cured turkey ground meat (mixed with 2.5% salt) canned under vacuum and cooked to an internal temperature of 68.5 °C. In this experiment, the authors observed that the inhibitory effect of NAC-SNO on lipid oxidation was comparable to that of nitrite using two different methods (TBARS values and diene absorbance).

The differences in the results of this experiment may be due to the type and species of meat used, product formulation, and processing and analysis conditions. The oxidation conditions used by Kanner et al. (2019) were different and much higher than those used in this experiment. These authors induced oxidation in cooked samples during storage (10 d and 4 weeks), followed by homogenization (oxygenation) in aqueous solution and additional heat treatment. This degree of oxidation does not occur during the shelf life of commercially cured meat products under vacuum, even when considering the abuse of temperature. In the present study, oxidation was induced only by cooking the samples under anaerobic conditions. According to Kanner and Juven (1980), under anaerobic conditions at 2° or 27 °C, the TBARS value was very low, and no changes in the TBARS value of NAC-SNO or nitrite samples were found after 14 days of storage.

The action of S-nitrosothiols as a hydroperoxide decomposer is probably limited to low concentrations (< 50 mg NEq/kg). According to Kanner (1979), the inhibitory effect of S-

nitrosothiols depends on the initial concentration of hydroperoxides; increasing the hydroperoxide concentration in the system decreases the inhibitory effect of S-nitrosothiols. In samples containing nitrite at these concentrations, the inhibition of autoxidation in the initial phase was probably greater because of the addition of erythorbic acid to the formulation (not added to samples containing S-nitrosothiols). Like ascorbic acid, erythorbic acid is a reducing agent that acts maintaining heme proteins in a reduced non-catalytic form, but also as a synergistic antioxidant, being able to regenerate the endogenous antioxidants of the meat (donating hydrogen) and acting as scavenger of oxygen and various free radicals ($O_2\cdot^-$, $OH\cdot$ or $OOH\cdot$), reducing the conditions for the initiation and propagation of the autoxidation reaction (Araújo, 2011; Domínguez et al., 2019).

As lipids are highly susceptible to oxidation, being the main non-microbial cause of quality deterioration in meat products (Domínguez et al., 2019), nitrite acts to minimize economic losses in the meat industry by controlling oxidative processes during the creation and commercialization of the products. In this experiment, the equimolar action of nitrite and S-nitrosothiols as antioxidants in cured cooked products could only be considered at ingoing concentrations above 50 mg NEq/kg. Perhaps using a synergistic antioxidant with S-nitrosothiols, such as ascorbic or erythroid acid, could contribute to a more effective antioxidant action in meat products, especially when low amounts of these curing agents are added.

3.1.3 Cured color formation

The CIE color indices of the cooked products were not affected ($P > 0.05$) by the type of curing agent or its interaction with the added concentration. Only the yellowness (b^* values) was significantly affected by the concentration, which increased as higher amounts of curing agents were used (Table 1). However, color changes cannot be correctly predicted from the b^* values alone because color is a three-dimensional attribute described by luminosity (L^*), which indicates clarity, and the angular coordinates chroma (C^*) and hue (h), which indicate the intensity and real tone (red, yellow, etc.), respectively. In addition to the L^* values, the instrumental color is described by the relationship between the two coordinates that make up the chromaticity diagram, indices a^* and b^* , with color changes best described by the L^* , C^* , and h values (Ramos & Gomide, 2017).

Therefore, changes in the b^* value did not lead to changes in the color of the products because they did not affect the C^* or h values. This indicates an absence of effects of the treatments with nitrite or S-nitrosothiols on the product's cured color, also reinforced by the

absence of effect on the ratio values R650/570 nm (mean 2.03 ± 0.19), which fell within defined limits (1.7 to 2.2) as noticeable cured color (AMSA, 2012). This agrees with the observations of Kanner (1979), who reported that cured color developed (measured by the CIELAB) by 0.5 mM to 2.0 mM (35 to 138 mg NEq/kg) of NAC-SNO on cooked turkey meat product was similar to that produced by 138 mg/kg of sodium nitrite. In contrast, Shpaizer et al. (2018) observed that the addition of solutions (apparently 2.5 mM = 173 mg NEq/kg) of S-nitrosocysteine (Cys-SNO) and NAC-SNO to ground beef samples generated, after microwave heating, a cured color with twofold higher a^* values than when equimolar amounts of sodium nitrite were used.

Nevertheless, in this study, the pigment nitrosyl hemochrome, which confers a characteristic pink color to cooked cured meats (Pegg & Shahidi, 2004), appeared to be formed with all curing agents, regardless of the concentration used. From the mean L^* (61.71 ± 3.75), C^* (11.39 ± 0.93), and h ($43.20 \pm 6.54^\circ$) values of cured products, only h differed ($P < 0.05$) from the uncured ones ($L^* = 62.52 \pm 4.06$; $C^* = 11.22 \pm 0.78$; $h = 67.15 \pm 5.28^\circ$). Dutra et al. (2017) reported that increasing the addition (up to 150 mg/kg) of nitrite to mortadella resulted in lower h values, which corresponded to a product with a more reddish hue (pink color). Guimarães et al. (2021) also observed much lower h values (46.61°) in cured products cooked with 150 mg/kg nitrite than in uncured products ($h = 75.76^\circ$).

These results suggest that S-nitrosothiols can form the same instrumental color obtained through the equimolar addition of sodium nitrite, regardless of the concentration used. However, it was expected that an increase in the curing-agent concentration (especially at low concentrations), at least with regard to nitrite, would imply changes in some color indices. Using response surface methodology to model the effects of different concentrations of nitrite in mortadella subjected to different doses of gamma irradiation, Dutra et al. (2017) observed that increasing the addition of nitrite induced higher a^* and lower L^* and b^* values, implying that the samples were slightly darker and had a more reddish hue (lower h values). However, these authors reported that the reductions in h values with varying concentrations of curing agents may have been small and missed in some studies. Guimarães et al. (2022) also observed small but significant differences in h values between restructured hams supplemented with 40 and 150 mg/kg sodium nitrite. Moreover, according to Sebranek and Bacus (2007), in most meat and poultry products, color differences due to added nitrite are generally perceived because of differences in stability during shelf life.

3.2 Cured color perception

Although there were no significant differences in the instrumental CIE color indices, the effects of treatment with different curing agents on human perception needed to be confirmed. Therefore, a visual assessment by ODP analysis was performed using trained panelists, and the scores for the perception of pink cured color of the different treatments are shown in Figure 3. Clearly, the panelists differentiated vacuum-packed slices of cured samples (with nitrite or S-nitrosothiols) from uncured ones, with the highest scores given to samples with added nitrite, indicating an intense pink color. In addition, the panelists did not notice ($P > 0.05$) differences in cured color between nitrite-supplemented samples; however, higher scores ($P < 0.05$) were observed in samples containing 300 mg NEq/kg of S-nitrosothiols. This amount of added S-nitrosothiols, either NAC-SNO or NACET-SNO, generated a cured pink color similar to that of samples containing 50–150 mg/kg of nitrite.

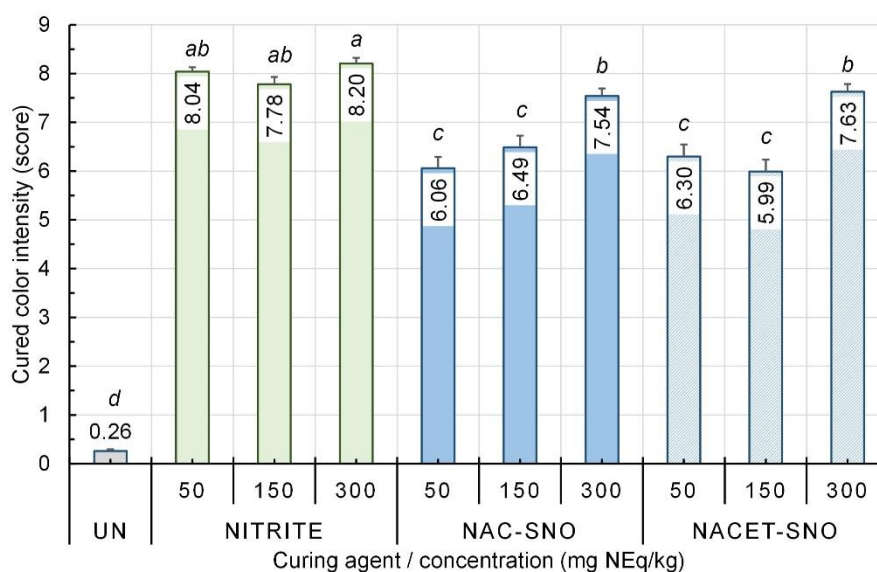


Figure 3. The effect of different types and concentrations of curing agents on cured color perception in vacuum-packed slices of restructured cooked hams. Scores from 0 (mild pink cured color; uncured samples) to 9 (intense pink cured color; 300 mg/kg nitrite sodium added). NEq = nitrite equivalent; UN = uncured; Nitrite = sodium nitrite; NAC-SNO = S-nitroso-N-acetylcysteine; and NACET-SNO = S-nitroso-N-acetylcysteine ethyl ester. Means followed by different letters (*a-d*) differ ($P < 0.05$) by according to Tukey's test. Bars represent the standard error of the mean ($n = 75$).

This result is consistent with previous results obtained for instrumental color (Table 1), but only for samples treated with nitrite. As previously mentioned, very little nitrite is

required to induce a cured color. [Guimarães et al. \(2022\)](#) did not observe differences in the appearance acceptance (with 108 untrained panelists) of restructured hams elaborated with 40 and 150 mg/kg sodium nitrite; however, when the pink cured color of these samples was directly compared by a difference from the control test (DCT), the panelists (85 untrained) perceived a “very slight” difference. According to [Sebranek and Bacus \(2007\)](#), although there are indications that the cured color may be less intense with 40–50 mg/kg of nitrite instead of 150–200 mg/kg depending on the product type, 40–50 mg/kg is generally considered adequate for cured color development in most products. Moreover, these authors stated that significantly higher levels are required to prevent rapid fading and nonuniform curing, as color differences are generally perceived owing to differences in stability during shelf life.

Exposure of the pigment nitrosyl hemochrome of cooked cured ham to light even at low oxygen levels promotes its oxidation to metmyoglobin which imposes dull grayness on the product ([Møller, Jensen, Olsen, Skibsted, & Bertelsen, 2000](#)). Thus, this oxidizing condition (light and oxygen) was present during the process of slicing and vacuum packaging of samples for sensory analysis. This, associated with low levels of residual oxygen trapped in the package during storage (at 4 °C) before analysis, can trigger pigment oxidation and consequently change color parameters and sensory evaluation. This hypothesis was confirmed by measuring the instrumental color of the inner surface of the samples immediately before slicing and on the vacuum-packed slices exposed in the sensorial analysis (approximately 2 h after slicing). The results are shown in Table 2.

The lightness of the samples was not affected ($P > 0.05$) by any of the curing agents, regardless of the concentration used, and did not change after slicing and storage (mean L^* values of 60.77 ± 0.83). [Guimarães et al. \(2022\)](#) did not observe changes in the L^* values of restructured cooked hams supplemented with nitrite and natural curing agents (radish derivative extracts) under conditions in which nitrosyl hemochrome pigment degradation was favored (packed with an oxygen-permeable film and stored at room temperature). [Sindelar et al. \(2007\)](#) also observed that the L^* values of cooked hams prepared with nitrite or natural curing agents (celery powder) remained stable during refrigerated storage (4 °C) under vacuum for 28 d.

Table 2. CIE color indices and cured color of different curing agent and concentrations on the surface of restructured cooked hams immediately after slicing (Inner) and after vacuum-packed and storage (at 4 °C) for about 2 h (Sliced).

Characteristic	Condition	Uncured	Nitrite (mg/kg)			NAC-SNO (mg NEq/kg)			NACET-SNO (mg NEq/kg)		
			50	150	300	50	150	300	50	150	300
Lightness, L^*	Inner	63.09 ^A	60.57	60.13	60.70	61.22	60.40	60.57	61.19	60.97	60.87
	Sliced	60.64 ^B	59.76	60.50	60.35	61.29	59.91	60.59	60.27	61.45	60.94
Redness, a^*	Inner	7.14 ^A	10.05	10.31	10.24	9.91 ^A	10.26 ^A	10.44 ^A	9.97 ^A	10.19 ^A	10.43 ^A
	Sliced	4.92 ^B	9.95	9.81	10.02	8.08 ^{Bb}	8.95 ^{Ba}	9.41 ^{Ba}	8.94 ^B	8.31 ^B	8.82 ^B
Yelowness, b^*	Inner	11.69 ^B	7.69	7.80	7.92	7.43 ^B	7.57 ^B	7.76 ^B	7.58 ^B	7.65 ^B	7.58 ^B
	Sliced	12.89 ^A	7.30	7.67	7.94	8.39 ^A	8.61 ^A	8.19 ^A	8.78 ^A	8.29 ^A	8.04 ^A
Chroma, C^*	Inner	13.71	12.65	12.93	12.95	12.39 ^A	12.75	13.01	12.53	12.74 ^A	12.90 ^A
	Sliced	13.80	12.33	12.45	12.79	11.67 ^B	12.43	12.47	12.54 ^a	11.74 ^{Bb}	11.93 ^{Bb}
Hue angle, h (°)	Inner	58.53 ^B	37.43	37.09	37.70	36.84 ^B	36.44 ^B	36.60 ^B	37.24 ^B	36.89 ^B	36.00 ^B
	Sliced	69.08 ^A	36.26	38.02	38.41	46.10 ^{Aa}	43.87 ^{Ab}	41.00 ^{Ab}	44.48 ^A	44.87 ^A	42.38 ^A
Cured color, R650/570 nm	Inner	1.87 ^A	2.22	2.27	2.24	2.18 ^A	2.25 ^A	2.26 ^A	2.19 ^A	2.23 ^A	2.26 ^A
	Sliced	1.61 ^B	2.22	2.24	2.24	1.98 ^{Bb}	2.12 ^{Ba}	2.15 ^{Ba}	2.10 ^B	2.00 ^B	2.07 ^B

NAC-SNO = S-nitroso-N-acetylcysteine; NACET-SNO = S-nitroso-N-acetylcysteine ethyl ester; and NEq = nitrite equivalent.

^{A-B} Means followed by different letters in the column, for each characteristic, differ ($P < 0.05$) by the F test.

^{a-b} Means followed by different letters in the row, for each curing agent, differ ($P < 0.05$) by the Tukey test.

During the short storage period between slicing and sensory analysis, the CIE color indices of the samples containing nitrite did not differ significantly. However, in the samples containing S-nitrosothiols (NAC-SNO and NACET-SNO), the a^* values decreased and the b^* values increased, leading to a significant increase in the h values, regardless of the concentration used. These changes indicate the fading of the cured color of the S-nitrosothiols products to a less pink and more brownish hue, reinforced by the observed reduction ($P < 0.05$) in the R650/570 nm ratio values, which may explain the differences observed in the cured pink color intensity scores (Figure 3) from the nitrite samples.

Even inside vacuum packaging, fading can occur slowly in the absence of light (Møller et al., 2000), triggered by the residual oxygen incorporated during the slicing process. The pink cured color fading occurs because of the light-catalyzed dissociation of nitric oxide from the nitrosyl hemeochrome pigment, followed by the oxidation of nitric oxide and heme groups by oxygen. The presence of adequate residual nitrite and reducing chemicals delays this process (Shakil et al., 2022). Therefore, CIE color changes may explain the observed differences in the color perception of samples containing S-nitrosothiols compared to those containing nitrite. In samples containing nitrite, in addition to the reserve of NO_2R (Figure 4A), which allows for the maintenance of the cured color under fading conditions, erythorbic acid is also present, which helps combat this oxidative process. In the samples cured with S-nitrosothiols (not added ascorbic acid), there were insufficient amounts of S-nitrosothiols to maintain the pink cured color intensity, especially at low concentrations (50–150 mg NEq/kg). This is possibly due to highly sensitive to the presence of ultraviolet light, radicals, heat, and enzymes (Yang, Huang, and Li, 2021). Furthermore, samples treated with low content of S-nitrosothiols did not have sufficient residual nitrite (mean of 1.24 ± 0.31 mg/kg) to serve as a reservoir for the regeneration of cured meat pigment lost from oxidation and light-induced fading as samples with nitrite had.

Overall, it appears that fading occurs differently in samples containing S-nitrosothiols, with sliced samples containing NAC-SNO having significantly higher h values at concentrations of 50 mg NEq/kg than at 150 and 300 mg NEq/kg, whereas no difference was observed in the NACET-SNO samples with respect to the concentration (Table 2). The color of the samples with low concentrations (50 mg NEq/kg) of NAC-SNO added and with high concentrations (150 and 300 mg NEq/kg) of NACET-SNO added also became less intense (lower C^* values) after vacuum storage. Nevertheless, the TBARS values of all samples before sensorial analysis did not differ significantly (Figure 4B), and no color changes were

observed between the same concentration of S-nitrosothiols samples in the sensorial panel (Figure 3).

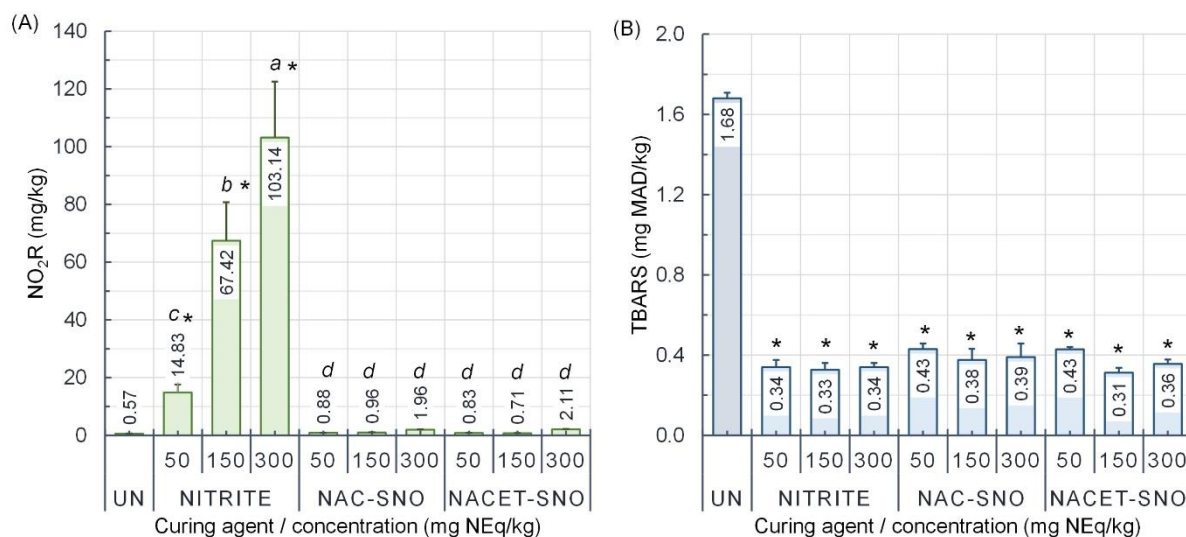


Figure 4. Effects of different types and concentrations of curing agents on (A) residual nitrite (NO₂R) and (B) TBARS values in sliced vacuum-packed restructured cooked hams. NEq = nitrite equivalent; MAD = malondialdehyde; UN = uncured; Nitrite = sodium nitrite; NAC-SNO = S-nitroso-N-acetylcysteine; and NACET-SNO = S-nitroso-N-acetylcysteine ethyl ester. Means of cured samples followed by different letters (*a-d*) differ ($P < 0.05$) from each other as determined by Tukey's test, and those marked with an asterisk (*) differed ($P < 0.05$) from the uncured ones according to Dunnett's test. Bars represent the standard error of the mean ($n = 3$).

This suggests that restructured cooked hams supplemented with S-nitrosothiols have lower color stability than those supplemented with nitrite under minimal oxidative conditions. Amounts close to 300 mg NEq/kg of S-nitrosothiols were required to obtain a similar and minimally stable cured pink color to the samples containing 50–150 mg/kg of added nitrite. Although there was a difference in the intensity of cured color between the evaluated S-nitrosothiols concentrations, this result does not necessarily suggest a possible lower preference or rejection of the product, considering that both mean scores are closer to the reference score “intense pink curing color.”

3.3 Volatile compounds profile

A total of 44 volatile compounds were detected, with a predominance of aldehydes ($n = 15$), followed by alcohols ($n = 11$), ketones ($n = 8$), hydrocarbons ($n = 4$), esters ($n = 5$), and carboxylic acids ($n = 1$) (Table 3). Thermal processing of meat products tends to generate a great complexity of volatile organic compound responsible for the perceived flavor, resulting from reactions such as the Maillard reaction, degradation of vitamins, lipid and protein oxidation, and interactions between the products of these reactions (Domínguez et al., 2019). Therefore, the variation in volatile organic compound profiles depends on the type of raw material, ingredients used, processing techniques, and storage conditions that favor these reactions.

Table 3. Profile of volatile compounds (total ion count $\times 10^4$) of restructured cooked hams uncured and cured with different curing agent.

Compounds	Uncured	Cured ¹	Curing agent		
			Nitrite	NAC-SNO	NACET-SNO
ACIDS					
Pentanoic acid, 4-Methyl-	/	36.93	/	36.93	/
ALCOHOLS					
Hexanol	863.46	285.46	103.02	341.58	474.93
Heptanol	237.87	94.49	50.15	39.23	249.36
2-Heptanol	/	16.44	/	16.44	/
Octanol	/	6.00	6.00	/	/
1-Octen-3-oL	748.26	138.53	75.59	181.16	158.83
2-Octen-1-ol	/	130.25	104.19	137.82	167.25
1-Octen-1-oL	107.39	169.12	/	169.12	/
Nonanol	12.47	10.56	10.88	10.23	/
2-Nonanol	247.92	136.00	136.00	/	/
2-Nonenol	21.62	26.06	/	25.47	26.64
6-Nonenol	4.31	/	/	/	/
ALDEHYDES					
Benzaldehyde	12.73	5.43	5.43	/	/
Benzene acetaldehyde	12.49	17.90	/	19.89	13.90
Heptanal	113.91	19.99	20.60	6.82	28.17
Hexanal	602.27	134.97	144.45	47.40	213.06
2-Heptenal	20.18	30.71	/	18.53	42.89
Octanal	248.16	27.24	21.36	15.87	44.50
2-Octenal	75.34	37.01	8.83	40.35	61.87
2-Nonenal	83.23	7.29	7.29	/	/
Nonanal	591.30	137.69	173.57	93.88	145.62
2,4-Decadienal	12.65	29.74	/	33.66	25.82
2-Decenal	68.86	43.62	10.20	48.65	72.01
2-Dodecenal	/	54.56	/	54.56	/

Compounds	Uncured	Cured ¹	Curing agent		
			Nitrite	NAC-SNO	NACET-SNO
Decanal	11.34	9.10	10.74	/	6.64
Undecenal	38.71	/	/	/	/
Tetradecanal	6.56	/	/	/	/
KETONES					
2-Heptanone	142.49	20.25	20.38	21.53	18.91
5-Heptenone, 6-Methyl-	/	14.44	14.44	/	/
Octalactone, Gamma-	17.14	/	/	/	/
3-Octanone	435.00	55.02	75.27	68.08	8.65
2-Octanone	171.34	/	/	/	/
2-Nonanone	113.74	44.08	23.13	18.05	91.06
2-Decanone	/	4.85	/	2.71	6.99
2-Undecanone	27.55	/	/	/	/
HYDROCARBONS					
Dodecane	26.43	21.09	/	21.09	/
Tetradecane	39.99	/	/	/	/
Tridecane	23.09	/	/	/	/
Undecane	13.49	/	/	/	/
ESTERS					
Acetate, Hexyl-	75.29	56.01	56.01	/	/
Acetate, Octyl-	7.04	/	/	/	/
Hexanoate, Isoamyl-	13.70	/	/	/	/
Hexanoate, Allyl-	528.89	/	/	/	/
Propionate, Hexyl-	/	12.11	9.41	14.80	/
Σ ACIDS	0.00	36.93	0.00	36.93	0.00
Σ ALCOHOLS	2243.30	1012.90	485.82	921.05	1077.02
Σ ALDEHYDES	1897.73	555.26	402.47	379.61	654.48
Σ KETONES	907.27	138.64	133.22	110.37	125.61
Σ HYDROCARBONS	103.00	21.09	0.00	21.09	0.00
Σ ESTERS	624.92	68.12	65.43	14.80	0.00
TOTAL	5776.21	1832.95	1086.94	1483.86	1857.11

NAC-SNO = S-nitroso-N-acetylcysteine; NACET-SNO = S-nitroso-N-acetylcysteine ethyl ester; and / = not detected.

¹Mean of all curing agent samples.

In addition to the fact that uncured samples had higher content of volatile organic compound than cured ones, many of which ($n = 12$) were found only in those samples: 1) the ketones gamma-octa lactone, 2-octanone, and 2-undecanone; 2) the hydrocarbons tetradecane, tridecane, and undecane; 3) the esters octyl-acetate, isoamyl-hexanoate, and allyl-hexanoate; 4) the aldehydes undecenal and tetradecanal; and 5) the alcohol 6-nonenol. This is likely due to the greater extent of lipid peroxidation reactions in the uncured cooked products (as shown in Figure 1), where the prooxidant capacity of iron has not been stabilized by curing agents.

According to [Pegg and Shahidi \(2004\)](#), volatile organic compound produced during the thermal processing of meat are believed to be derived from nonvolatile precursors derived from browning (Maillard) reactions and fat oxidation. [Ramarathnam, Rubin, and Diosady \(1993\)](#) also reported greater variability in hydrocarbons and carbonyl compounds such as 2-undecanone and tetradecanal in uncured cooked products than in cured ones. [Shahidi and Pegg \(1992\)](#) reported that the concentration of aldehydes produced from autoxidation of meat lipids was markedly reduced by the addition of nitrite; the amount of hexanal in nitrite-treated meat decreased drastically to 2% of the level in the uncured control. In our study, the reduction in the hexanal content was approximately 22%, with total aldehydes contents 3.4 times greater in uncured products than in cured ones.

PCA was applied to analyze the interrelationships between the curing agents and the volatile composition formed (except those present only in uncured samples that were removed from the PCA), being represented in Figure 5. The two principal components (PC) were extracted, which explains 71.29% of the total variance. Based on PC1 (50.01% of the total variance), it was possible to form three groups of samples with similar volatile organic compound profiles: 1) group composed only by the uncured sample and highly related to the majority of volatile organic compound formed; 2) samples with nitrite and S-nitrosothiols added at 50 mg NEq/kg; and 3) group formed by nitrite and S-nitrosothiols at 150 and 300 mg NEq/kg.

As shown in Figure 5 and Table 3, the uncured samples were characterized by the predominance of aldehydes, especially hexanal, octanal, and nonanal, which are often related as markers of lipid oxidation; hexanal is the most prominent volatile compound related to linoleic acid (C18:2n6) oxidation, while octanal and nonanal derived directly from the beta-oxidation of oleic acid (C18:1n9) during cooking ([Benet et al., 2015](#); [Chen et al., 2023](#)). According to [Thomas, Mercier, Tournayre, Martin, and Berdagué \(2013\)](#), the absence of nitrite favors the oxidation of fatty acids, and in particular the production of aldehydes (especially hexanal), which will mask the characteristic flavor of cooked ham. These reported reinforce the suggestion of greater lipid oxidation in the uncured sample, which is consistent with its higher values of TBARs in relation to the cured ones (Figures 2 and 4). Overall, the S-nitrosothiols were also able to inhibit or reduce the formation of these compounds in the same way as nitrite.

Despite being grouped by the PC1, S-nitrosothiols samples with 50 mg NEq/kg, especially NAC-SNO, also can be distinguished from those with an equimolar addition of nitrite by PC2 (21.28% of the total variance), being related to some ketones and aldehydes

associated with amino acid degradation products; like benzeneacetaldehyde (phenylacetaldehyde), an aromatic compound derived from the Maillard reaction, in which phenylalanine serves as its precursor (Mottram, 1998). In contrast, the volatile organic compound profiles of the samples with 50 mg/kg nitrite were closer (by both PC) to those of the samples with higher concentrations of the curing agent. Finally, the addition of 150 and 300 mg NEq/kg of *S*-nitrosothiols resulted in the formation of the same volatile profile for those samples added with nitrite at the same equimolar amounts. To some degree these differences may have been due to differences in antioxidant action against lipid peroxidation and even against protein oxidation.

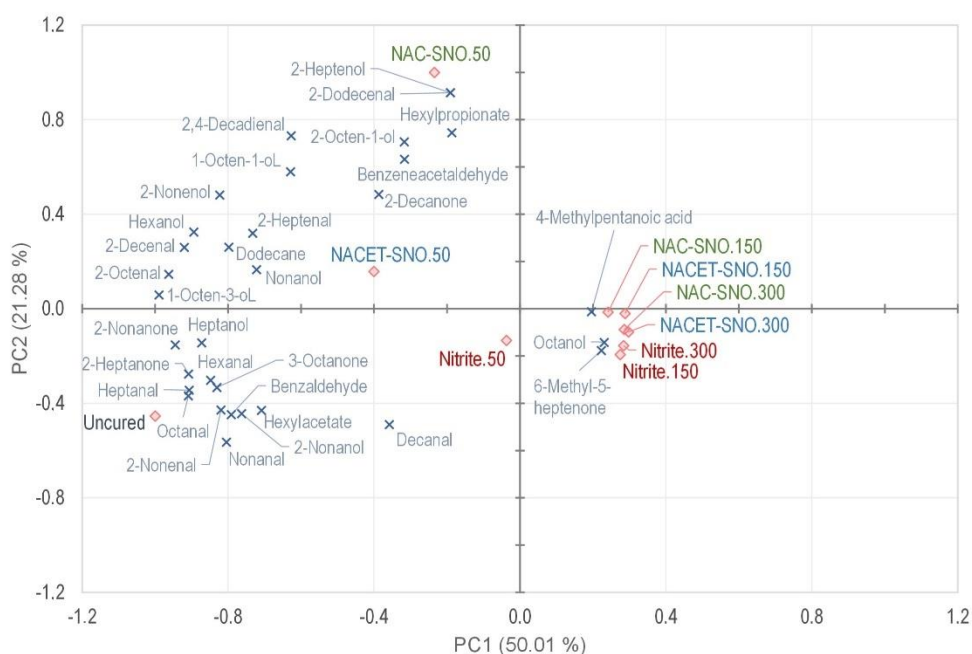


Figure 5. Principal component analysis (PCA) of the volatile organic compounds (VOCs) of the restructured cooked hams uncured and cured with different curing agent types (nitrite, SNAC-SNO, and NACET-SNO) and concentrations (50, 150, and 300 mg NEq/kg). Nitrite = sodium nitrite; NAC-SNO = *S*-nitroso-*N*-acetylcysteine; and NACET-SNO = *S*-nitroso-*N*-acetylcysteine ethyl ester. VOCs found only in uncured samples were not used.

4. Conclusion

The results of this study corroborate the high potential of both *S*-nitrosothiols (NAC-SNO or NACET-SNO) for the complete replacement of nitrite in cured cooked products. At nitrite concentrations (100–200 mg/kg) commonly used in cured cooked hams, equimolar amounts of *S*-nitrosothiols were sufficient to achieve the same antioxidant effect and the

instrumental color and volatile profile characteristic of these products. However, the cured color was less stable in products with S-nitrosothiols, requiring higher additions to obtain a sensorial cured color equivalent to that of sliced products containing nitrite.

Besides the desired color, antioxidant action, and volatiles characteristic of the cure process, the nitrite replacement by S-nitrosothiols generates extremely lower amounts of residual nitrite in the product. Although it can be presumed a lower formation of N-nitrosamines, this may also indicate lower stability of the product during prolonged storage, whether due to changes in color, lipid/protein oxidation, or microbial action. Further studies are needed to evaluate the effects of these substitutes on cured products' shelf life as well as their sensory acceptance.

Acknowledgments

The correspondent author E.M. Ramos is Research Productivity Fellows (PQ) from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq-Brazil). The authors would like to thank the Research Support Foundation of the State of Minas Gerais (FAPEMIG; CVZ APQ 02904-17) and the CNPq (MCT 430206/2016-0) for their financial support and to the Higher Education Personnel Improvement Coordination (CAPES/MEC-Brazil) for the doctoral scholarship granted to the first author. The authors also would like to thank the Central of Analysis and Chemical Prospecting of the Federal University of Lavras (UFLA) for supplying the equipment and technical support for experiments involving chromatographic analyzes.

References

- AMSA. (2012). *Meat Color Evaluation Guide*. Champaign, IL: American Meat Science Association (AMSA).
- Araújo, J.M. (2011). *Food Chemistry - Theory and Practice (in portuguese)* (5 ed.). Viçosa: Editora UFV.
- Barcenilla, C., Ducic, M., López, M., Prieto, M., & Álvarez-Ordóñez, A. (2022). Application of lactic acid bacteria for the biopreservation of meat products: A systematic review. *Meat Science*, 183, 108661. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108661>
- Benet, I., Guàrdia, M.D., Ibañez, C., Solà, J., Arnau, J., & Roura, E. (2015). Analysis of SPME or SBSE extracted volatile compounds from cooked cured pork ham differing

- in intramuscular fat profiles. *LWT - Food Science and Technology*, 60(1), 393-399. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.08.016>
- Cardoso, G.P., Andrade, M.P.D., Rodrigues, L.M., Massingue, A.A., Fontes, P.R., Ramos, A.L.S., & Ramos, E.M. (2019). Retail display of beef steaks coated with monolayer and bilayer chitosan-gelatin composites. *Meat Science*, 152, 20-30. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.02.009>
- Chen, C., Fan, X., Hu, Y., Zhou, C., Sun, Y., Du, L., & Pan, D. (2023). Effect of different salt substitutions on the decomposition of lipids and volatile flavor compounds in restructured duck ham. *LWT*, 176, 114541. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114541>
- Domínguez, R., Pateiro, M., Gagaoua, M., Barba, F.J., Zhang, W., & Lorenzo, J.M. (2019). A comprehensive review on lipid oxidation in meat and meat products. *Antioxidants (Basel)*, 8(10). <https://doi.org/10.3390/antiox8100429>
- Dutra, M.P., Aleixo, G.C., Ramos, A.L.S., Silva, M.H.L., Pereira, M.T., Piccoli, R.H., & Ramos, E.M. (2016). Use of gamma radiation on control of *Clostridium botulinum* in mortadella formulated with different nitrite levels. *Radiation Physics and Chemistry*, 119, 125-129. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2015.10.008>
- Dutra, M.P., Cardoso, G.P., Fontes, P.R., Silva, D.R.G., Pereira, M.T., Ramos, A.d.L.S., & Ramos, E.M. (2017). Combined effects of gamma radiation doses and sodium nitrite content on the lipid oxidation and color of mortadella. *Food Chemistry*, 237(1), 232-239. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.108>
- Guimarães, A.S., Guimarães, J.S., Araújo, A.B.S., Rodrigues, L.M., Carvalho, E.E.N., Ramos, A.d.L.S., & Ramos, E.M. (2021). Characterization of natural curing agents from Japanese radish (*Raphanus sativus* L.) for their use in clean label restructured cooked meat products. *LWT*, 150, 111970. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111970>
- Guimarães, A.S., Guimarães, J.S., Rodrigues, L.M., Fontes, P.R., Ramos, A.d.L.S., & Ramos, E.M. (2022). Assessment of Japanese radish derivatives as nitrite substitute on the physicochemical properties, sensorial profile, and consumer acceptability of restructured cooked hams. *Meat Science*, 192, 108897. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2022.108897>
- Haddad, G.B.S., Gomes, H.B., Buchili, A.F.M., Rodrigues, L.M., Fontes, P.R., Ramos, A.L., & Ramos, E.M. (2022). Accelerating the dry aging of bone-in beef from Nellore cattle by the freeze/thaw process. *Journal of Food Processing and Preservation*, e16573. <https://doi.org/10.1111/jfpp.16573>

- Honikel, K.O. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Science*, 78(1–2), 68-76. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.05.030>
- IARC. (2018). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. In *Red Meat and Processed Meat*, vol. 114). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- Kanner, J. (1979). S-nitrosocysteine (RSNO), an effective antioxidant in cured meat. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56(2), 74-76. <https://doi.org/10.1007/BF02914272>
- Kanner, J., & Juven, B.J. (1980). S-Nitrosocysteine as an antioxidant, color-developing, and anticlostridial agent in comminuted Turkey meat. *Journal of Food Science*, 45(5), 1105-1112. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1980.tb06497.x>
- Kanner, J., Shpaizer, A., Nelgas, L., & Tirosh, O. (2019). S-Nitroso-N-acetylcysteine (NAC-SNO) as an antioxidant in cured meat and stomach medium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(39), 10930-10936. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03741>
- Kauser-Ul-Alam, M., Hayakawa, T., Kumura, H., & Wakamatsu, J.-i. (2021). High ZnPP-forming food-grade lactic acid bacteria as a potential substitute for nitrite/nitrate to improve the color of meat products. *Meat Science*, 176, 108467. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108467>
- Kumar, R., Massoumi, H., Chug, M.K., & Brisbois, E.J. (2021). S-Nitroso-N-acetyl-L-cysteine ethyl ester (SNACET) catheter lock solution to reduce catheter-associated infections. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 13(22), 25813-25824. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c06427>
- Liu, R., Warner, R.D., Zhou, G., & Zhang, W. (2018). Contribution of nitric oxide and protein S-nitrosylation to variation in fresh meat quality. *Meat Science*, 144, 135-148. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.04.027>
- Luzardo-Ocampo, I., Ramírez-Jiménez, A.K., Yañez, J., Mojica, L., & Luna-Vital, D.A. (2021). Technological Applications of Natural Colorants in Food Systems: A Review. *Foods (Basel, Switzerland)*, 10(3), 634. <https://doi.org/10.3390/foods10030634>
- Martins, H.H.A., Simões, L.A., Isidoro, S.R., Nascimento, S.S., Alcântara, J.P., Ramos, E.M., & Piccoli, R.H. (2021). Preservative of Essential oil blends: control of clostridium perfringens type a in mortadella. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 64, e21200106. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2021200106>
- Mathews, W.R., & Kerr, S.W. (1993). Biological activity of S-nitrosothiols: the role of nitric oxide. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 267(3), 1529-1537.

- Møller, J.K.S., Jensen, J.S., Olsen, M.B., Skibsted, L.H., & Bertelsen, G. (2000). Effect of residual oxygen on colour stability during chill storage of sliced, pasteurised ham packaged in modified atmosphere. *Meat Science*, 54(4), 399-405. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(99\)00116-3](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(99)00116-3)
- Molognoni, L., Daguier, H., Motta, G.E., Merlo, T.C., & Lindner, J.D.D. (2019). Interactions of preservatives in meat processing: Formation of carcinogenic compounds, analytical methods, and inhibitory agents. *Food Research International*, 125, 108608. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108608>
- Mottram, D.S. (1998). Flavour formation in meat and meat products: a review. *Food Chemistry*, 62(4), 415-424. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00076-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00076-4)
- Myers, K., Cannon, J., Montoya, D., Dickson, J., Lonergan, S., & Sebranek, J. (2013). Effects of high hydrostatic pressure and varying concentrations of sodium nitrite from traditional and vegetable-based sources on the growth of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat (RTE) sliced ham. *Meat Science*, 94(1), 69-76. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.12.019>
- O'Sullivan, M.G., Byrne, D.V., & Martens, M. (2003). Evaluation of pork colour: sensory colour assessment using trained and untrained sensory panellists. *Meat Science*, 63(1), 119-129. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00065-7](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00065-7)
- Pegg, R.B., & Shahidi, F.S. (2004). *Nitrite curing of meat: the N-nitrosamine problem and nitrite alternatives* (1 ed.). Trumbull, USA: Wiley-Blackwell.
- Pikul, J., Leszczynski, D.E., & Kummerow, F.A. (1989). Evaluation of three modified TBA methods for measuring lipid oxidation in chicken meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(5), 1309-1313. <https://doi.org/10.1021/jf00089a022>
- Ramarathnam, N., Rubin, L.J., & Diosady, L.L. (1993). Studies on meat flavor. 3. A novel method for trapping volatile components from uncured and cured pork. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(6), 933-938. <https://doi.org/10.1021/jf00030a019>
- Ramos, E.M., & Gomide, L.A.M. (2017). *Meat quality assessment: fundamentals and methodologies (in portuguese)* (2nd ed.). Viçosa, MG, Brazil: Editora UFV.
- Sebranek, J.G., & Bacus, J.N. (2007). Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues? *Meat Science*, 77(1), 136-147. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.03.025>
- Shahidi, F., & Pegg, R.B. (1992). Nitrite-free meat curing systems: Update and review. *Food Chemistry*, 43(3), 185-191. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(92\)90171-W](https://doi.org/10.1016/0308-8146(92)90171-W)

- Shakil, M.H., Trisha, A.T., Rahman, M., Talukdar, S., Kobun, R., Huda, N., & Zzaman, W. (2022). Nitrites in cured meats, health risk issues, alternatives to nitrites: a review. *Foods (Basel, Switzerland)*, *11*(21), 3355. <https://doi.org/10.3390/foods11213355>
- Shpaizer, A., Kanner, J., & Tirosh, O. (2021). S-Nitroso-N-acetylcysteine (NAC–SNO) vs. nitrite as an anti-clostridial additive for meat products. *Food & Function*, *12*(5), 2012-2019. <https://doi.org/10.1039/D0FO02839H>
- Shpaizer, A., Nussinovich, A., Kanner, J., & Tirosh, O. (2018). S-Nitroso-N-acetylcysteine generates less carcinogenic N-nitrosamines in meat products than nitrite. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *66*(43), 11459-11467. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04549>
- Silva, D.R.G., Haddad, G.B.S., de Moura, A.P., de Souza, P.M., Ramos, A.L.S., Hopkins, D.L., & Ramos, E.M. (2021). Safe cured meat using gamma radiation: Effects on spores of *Clostridium sporogenes* and technological and sensorial characteristics of low nitrite cooked ham. *LWT - Food Science and Technology*, *137*, 110392. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110392>
- Sindelar, J., & Milkowski, A. (2011). Sodium nitrite in processed meat and poultry meats: a review of curin and examining the risk and benefit of its use. *White Paper, Series No, 3*, 1-14.
- Sindelar, J.J., Cordray, J.C., Sebranek, J.G., Love, J.A., & Ahn, D.U. (2007). Effects of varying levels of vegetable juice powder and incubation time on color, residual nitrate and nitrite, pigment, pH, and trained sensory attributes of ready-to-eat uncured ham. *Journal of Food Science*, *72*(6), S388-S395. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00404.x>
- Sinnhuber, R.O., & Yu, T.C. (1958). 2-Thiobarbituric acid method for the measurement of rancidity in fishery products. II. The quantitative determination of malonaldehyde. *Food Technology*, *12*, 9-12.
- Stoica, M., Antohi, V.M., Alexe, P., Ivan, A.S., Stanciu, S., Stoica, D., Zlati, M.L., & Stuparu-Cretu, M. (2022). New strategies for the total/partial replacement of conventional sodium nitrite in meat products: a review. *Food and Bioprocess Technology*, *15*(3), 514-538. <https://doi.org/10.1007/s11947-021-02744-6>
- Thomas, C., Mercier, F., Tournayre, P., Martin, J.-L., & Berdagué, J.-L. (2013). Effect of nitrite on the odourant volatile fraction of cooked ham. *Food Chemistry*, *139*(1), 432-438. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.033>

- Tsikas, D., Dehnert, S., Urban, K., Surdacki, A., & Meyer, H.H. (2009). GC–MS analysis of S-nitrosothiols after conversion to S-nitroso-N-acetyl cysteine ethyl ester and in-injector nitrosation of ethyl acetate. *Journal of Chromatography B*, 877(28), 3442-3455. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.06.032>
- Tsikas, D., Schwedhelm, K.S., Surdacki, A., Giustarini, D., Rossi, R., Kukoc-Modun, L., Kedia, G., & Ückert, S. (2018). S-Nitroso-N-acetyl-L-cysteine ethyl ester (SNACET) and N-acetyl-L-cysteine ethyl ester (NACET)–Cysteine-based drug candidates with unique pharmacological profiles for oral use as NO, H₂S and GSH suppliers and as antioxidants: Results and overview. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 8(1), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2017.12.003>
- Usher, C.D., & Telling, G.M. (1975). Analysis of nitrate and nitrite in foodstuffs: A critical review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 26(11), 1793-1805. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740261122>
- van Breda, S.G., Mathijs, K., Pieters, H.-J., Sági-Kiss, V., Kuhnle, G.G., Georgiadis, P., Saccani, G., Parolari, G., Virgili, R., Sinha, R., Hemke, G., Hung, Y., Verbeke, W., Masclee, A.A., Vleugels-Simon, C.B., van Bodegraven, A.A., de Kok, T.M., & consortium, t.P. (2021). Replacement of nitrite in meat products by natural bioactive compounds results in reduced exposure to n-nitroso compounds: the PHYTOME project. *Molecular Nutrition & Food Research*, 65(20), 2001214. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202001214>
- Van den Broeke, L., & Van Henegouwen, G.B. (1995). UV radiation protecting efficacy of cysteine derivatives, studies with UVA-induced binding of 8-MOP and CPZ to rat epidermal biomacromolecules in vivo. *International journal of radiation biology*, 67(4), 411-420.
- Yang, Y., Huang, Z., & Li, L.-L. (2021). Advanced nitric oxide donors: chemical structure of NO drugs, NO nanomedicines and biomedical applications. *Nanoscale*, 13(2), 444-459. <https://doi.org/10.1039/D0NR07484E>

ARTIGO 4

Artigo aceito para publicação no periódico *Food & Humanity* (ISSN: 2949-8244)

DOI: 10.1016/j.foohum.2024.100446



Food and Humanity

Available online 4 November 2024, 100446
In Press, Journal Pre-proof What's this?



Sensory profile and color and oxidative stabilities of sliced restructured cooked hams with added S-nitroso-N-acetylcysteine as a nitrite replacement

Bruna Fernandes Andrade¹ , Lorrany Ramos do Carmo² ,
Ana Paula Rocha de Moura³ , Alcinéia de Lemos Souza Ramos⁴ ,
Eduardo Mendes Ramos⁵

Sensory profile and color and oxidative stabilities of sliced restructured cooked hams with added S-nitroso-N-acetylcysteine as a nitrite replacement

Abstract

The objective of this study was to evaluate the effects of replacing sodium nitrite by S-nitroso-N-acetylcysteine (NAC-SNO) at different addition levels (50, 150, and 300 mg of equivalent nitrite–Neq/kg) on the sensory profile and on the quality characteristics of restructured cooked hams during sliced storage (up to 60 days at 4°C). The addition of NAC-SNO did not affect ($P > 0.05$) the pH of the products and resulted in lower ($P < 0.05$) residual nitrite content (1.79 ± 0.61 mg/kg) and higher ($P < 0.05$) TBARS values (0.86 ± 0.44 mg MAD/kg) than nitrite added samples (8.43 ± 2.37 mg/kg and 0.66 ± 0.25 mg MAD/kg, respectively). During storage, an increasing trend in lipid oxidation was observed regardless of the curing agent used. The addition of 50 mg NEq/kg of NAC-SNO resulted in products with a more yellowish color tone (higher h values) and less intensity (lower C^* values) than all the other products. The equimolar addition of 150 mg NEq/kg of NAC-SNO resulted in a similar pink color acceptance to nitrite; however, they were characterized by a higher ($P < 0.05$) characteristic flavor and aroma intensity and obtained greater ($P < 0.05$) sensory acceptance than nitrite. The addition of 150 mg NEq/kg of NAC-SNO was suggested as a substitute for nitrite to achieve the desired stability and sensory characteristics of cooked cured products.

Keywords: Curing agents, rate-all-that-apply, residual nitrite, vacuum-packed storage.

1 Introduction

Since the International Agency for Research on Cancer (IARC) classified the ingestion of nitrite or nitrate under conditions resulting in endogenous nitrosation as "probably carcinogenic" to humans (Group 2A) (IARC, 2010) and, subsequently, processed meat as "carcinogenic to humans" (Group 1), especially for the risk of colorectal cancer (IARC, 2018), the use of these salts in cured meat products has been the subject of increasing scientific debate. Nitrite and nitrate salts, known as "curing salts," are food additives traditionally used in the meat industry as a multifunctional ingredient in order to provide a unique pink-red color and flavor, prevent or reduce the growth of pathogenic bacteria, and maintain oxidative stability during storage (Andrade et al., 2024b; Sebranek and Bacus,

2007). However, the association of these additives with carcinogenic diseases has raised public concern, attributed to N-nitroso compounds (NOCs) that possess mutagenic and genotoxic properties, such as N-nitrosamines, which are formed in both the finished product and during digestion (Bonifacie et al., 2021). Additionally, consumer interest in the development of alternatives or other preservation methods that are perceived as healthier has grown.

The challenge in removing curing salts from meat formulations lies in the fact that these are additives with multiple purposes. Therefore, new strategies must ensure the same safety (chemical and microbiological), technological characteristics, and sensory attributes provided by curing with these additives (Andrade et al., 2024a). In this sense, chemical carriers of NO, such as S-nitrosothiols, have recently been suggested as curing agents, as they act on the same principle as nitrite addition, providing antioxidant and antimicrobial action and the characteristic cured color, but with the advantage of reducing the formation of preformed N-nitrosamines (in the product) or during digestion (Kanner et al., 2019; Shpaizer et al., 2021; Shpaizer et al., 2018). S-nitrosothiols have been extensively studied as drugs because of their presence in vivo in physiological and pathophysiological phenomena (Yang et al., 2021). They are formed through the reaction between a thiol (R-SH), derived from amino acids or peptides such as L-cysteine, glutathione, and N-acetyl-L-cysteine, and a nitrosating agent like nitrite (Mathews and Kerr, 1993), which in its process of spontaneous or induced degradation is capable of releasing NO for direct reactions with other meat components.

The potential use of these compounds as nitrite substitutes in meat products was demonstrated by Andrade et al. (2024a), who evaluated the effects of replacing equivalent levels (25–300 mg of equivalent nitrite-NEq/kg) of nitrite with two S-nitrosothiols, S-nitroso-N-acetylcysteine (NAC-SNO) and S-nitroso-N-acetylcysteine ethyl ester (NACET-SNO), on the technological characteristics of ham. According to these authors, the addition of 100–200 mg NEq/kg of S-nitrosothiols was sufficient to achieve the same antioxidative effect, instrumental color, and characteristic volatile profile. However, higher concentrations were needed to obtain a more stable cured color intensity (evaluated over 2 hours at 4°C) and sensorial equivalent to sliced products containing nitrite. The authors suggested that the lower color stability in products with added S-nitrosothiols was because they generated much smaller amounts of residual nitrite than those with nitrite added, indicating potentially lower product stability during prolonged storage. Therefore, this study aimed to evaluate the effects of completely replacing nitrite with NAC-SNO in the production of restructured cooked hams

on the acceptance and sensory profile, as well as color stability and lipid oxidation of sliced products during refrigerated storage.

2 Material and methods

2.1. Experimental design

To evaluate the use of S-Nitroso-N-acetylcysteine (NAC-SNO) as a total substitute for sodium nitrite, formulations of restructured cooked ham (called "Apresentado" in Brazil) were prepared in six treatments, using both curing agents at different addition levels: 0.72, 2.17 and 4.35 mM, which correspond to 50, 150 and 300 mg nitrite equivalent (NEq)/kg, respectively. The sliced products were evaluated every 15 days for up to 60 days of refrigerated storage (4 °C) under vacuum.

The addition levels were defined according to a previous study by [Andrade et al. \(2024a\)](#). These authors did not use any reducing agent in the formulation of S-nitrosothiols samples due to this known antioxidant action. However, they concluded that this was one of the possible factors responsible for the instability of the cured color and lower lipid action observed in the products added with 50 mg NEq/kg of S-nitrosothiols. Thus, the reducing agent erythorbic acid (isoascorbic acid), commonly used in cured products, was added to all formulations. Products with 150 mg NEq/kg as a control (curing standard) and additions of 50 and 300 mg NEq /kg were also evaluated to observe the possible effects of this addition.

The NAC-SNO was synthesized in acid medium (0.1 M HCl), after stirring and darkness at 30 °C for 10 min, as described by [Andrade et al. \(2024a\)](#). The NAC-SNO solution is subject to spontaneous decomposition in an aqueous medium, which implies important limitations for its storage and use as an ingredient in the food industry. Therefore, the solution was buffered, soaked in salt (NaCl) and freeze-dried, obtaining a stable slightly pinkish white powder (data under finalization for publication). Nevertheless, to ensure equimolar concentrations to the amount of nitrite, immediately before use the NAC-SNO concentration in the powder was determined by UV spectrophotometry (Genesys 10 UV; Thermo Fisher Scientific 117 Inc., Waltham, MA, USA) using the molar extinction coefficient at $\lambda = 330$ nm ($\epsilon = 727 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; MW = 192.20) ([Mathews and Kerr, 1993](#)).

2.2 Restructured cooked ham processing and slicing

Three genuine batches (repetitions) of restructured cooked ham were elaborated following the basic formula: 81% pork front leg, 1.8% salt (NaCl), 0.3% monosodium

glutamate, 0.4% tripolyphosphate, 1.0% cassava starch, 0.5% flavorings and seasonings (“Condimento California”; New Max Industrial Ltda., Americana, SP, Brazil), 0.05% sodium erythorbate, and curing agent in the quantity provided for in the treatments. The necessary amount of NAC-SNO powder (64 mg NEq/kg) for each treatment was added to replace the formulation salt. Deboned pork legs were obtained from a local market on three different days (batches).

In each batch, the meat was ground (PB-22; Beccaro Ltda, Rio Claro, SP, Brazil) with a 10-mm plate and portioned into six treatments (sodium nitrite or NAC-SNO at three addition levels). For each treatment, the grounded meat was mixed (Jamar; Indústrias Jamar, Tapuã, SP, Brazil) with the ingredients for 15 min. The batter was then vacuum-packed (BS420; R. Baião, Ubá, MG, Brazil) and formed into a metallic mold to produce samples of approximately 1 kg. The molds were stored (at 4 °C) for 16 h to cure and cooked in a water bath at 80 °C until the center of the piece reached a temperature of 72 °C (monitored by thermocouple). Immediately after cooking, the products were cooled in an ice water bath and stored (4 °C) for 24 h before slicing.

The cooked hams were sliced (USM2 slicer; Urano, Canoas, RS, Brazil) in a rectangular shape measuring 10.0 cm in length, 6.0 cm in width and 1.5-mm in thickness, manually superimposing on trays of polystyrene (six slices per tray), vacuum packed in nylon-polyethylene plastic (90 µm thick and oxygen transmission rate of 30 – 60 cm³/m²/day/atm), and randomly distributed into five (0, 15, 30, 45 and 60 days) storage (at 4 °C) times for analysis.

2.3 Physicochemical evaluation during storage

Before slicing, the pH values of the products were determined (in triplicates) using a portable pH meter (Testo 206–pH 2; Testo do Brazil, Campinas, SP, Brazil) equipped with an insertion electrode. Sliced sample trays for each treatment and storage time were randomly selected to evaluate the residual nitrite content (NO₂R), lipid oxidation, and instrumental color.

The NO₂R was determined as described by [Guimarães et al. \(2022\)](#). Briefly, one portion of samples were homogenized (Turratec TE 102; TECNAL, Piracicaba, SP, Brazil) in eight portions of hot distilled water (proportion 1:8, w/v) and incubated in a water bath at 80 °C for 2 horas. The homogenate was subjected to a colorimetric reaction with sulfanilamide (1%) and N-(1-naphthyl) ethylenediamine hydrochloride (NED; 0,1%) solutions and the absorbance of the mixture was measured at 540 nm (Genesys 10; Thermo Fisher Scientific

Inc., Waltham, MA, USA). NO₂R was determined using an analytical curve of NaNO₂ and was expressed as mg NO₂/kg.

Lipid oxidation of the products was assessed using the thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) method, with modifications to the procedures described by [Pikul et al. \(1989\)](#) and [del Olmo et al. \(2013\)](#). Pink chromogens, formed mainly from the interaction of malondialdehyde (MDA) with thiobarbituric acid (TBA) in the early stages of the formation of secondary lipid oxidation products, were measured at 532 nm (TBARS#1), while yellow chromogens, resulting mainly from the interaction of large lipid oxidation products with TBA in the later stages, were measured at 450 nm (TBARS#2). Approximately 5 g of each sample was homogenized in 14 mL of distilled water and 1 mL of 10% hydroxybutyltoluene (BHT) antioxidant and centrifuged (K14-4000; Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brazil) at 2000 × g for 5 min. Two milliliters of the supernatant were added to 2 mL of 2-thiobarbituric acid solution (TBA; in perchloric acid 7.72%) in test tubes, vortex, and analyzed in two ways: for TBARS#1, the tubes were incubated in a water bath at 70 °C for 30 min and cooling in an ice bath for 5 min before measure at 532 nm; and for TBARS#2, they were incubated at 30 °C for 2 h, cooled in an ice bath for 5 min, and measured at 450 nm. An analytical curve using 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP) and hexanal (HEX) were used to determine the TBARS#1 (mg MAD/kg) and TBARS#2 (mg HEX/kg) values, respectively.

The instrumental colors were measured using a portable spectrophotometer CM-700d (Kônica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japan) with a door opening of 8 mm, illuminant D65, observation angle of 10°, and specular component included (SCI) and excluded (SCE) modes. The CIELAB (lightness, L^* ; redness, a^* ; and yellowness, b^*), polar coordinate (chroma, C^* , and hue angle, h , in degrees) color indices, and reflectance spectra (400–700 nm) were obtained from five readings taken from the surfaces of the samples. The color of the samples was determined using the CIELCH values (L^* , C^* , and h) obtained in the SCE mode, and the cured color index (nitrosyl hemochrome pigment formation) was determined using the reflectance ratio of wavelengths R650/570 nm ([King et al., 2023](#)) in the SCI mode.

2.4 Sensory analysis

The sensory profiles of the six treatments were assessed after 30 d of storage using the rate-all-that-applies (RATA) methodology proposed by [Ares et al. \(2014\)](#). Ethical approval for the sensory analysis was obtained from the National Research Ethics System (SISNEP/Brazil; protocol CAAE: 61211922.0.0000.5148), and the volunteers signed a Free and Informed Consent Form.

In the RATA test, panelists were asked to indicate the degree of acceptance and the descriptors (previously selected by a focus group) that best characterized the sample (applicability) and its intensity. Eighteen subjects (five males and three females; age range: 20–42 years, average age: 28 years) who were frequent consumers (four to five times a week) of restructured cooked hams participated in a focus group (using the treatment samples) the day before the RATA test. Nine descriptors with citation frequencies of > 70% were selected. One hundred and one panelists (44 males and 55 females; age, 18–65 years; average age, 29 years) participated in the RATA test. No information about the specific aim of the study was provided during the recruitment and conduct of the focus group and RATA test.

The RATA test was conducted in standard sensory booths, under controlled temperature (~20 °C) and in two sessions. First, the panelists answered a form regarding demographic data and their consumption profiles and were instructed on how to carry out the analysis and familiarize themselves with the descriptors used. The samples were coded with three digits and presented monadically in a balanced order of presentation and transfer effects (Williams Latin square). In the first session, the vacuum-packed samples in the trays were presented to the panelists under white light for appearance evaluation only. In the next session (conducted immediately afterwards), the slices were removed from the packaging, cut in half and presented (6 x 5 cm and 1.5 mm thick; ~10 g average) to the panelists rolled up in 40 mL transparent plastic cups to be evaluated for aroma, flavor and texture. In this session, the evaluation was conducted under red light to avoid interference from other attributes. Mineral water and unsalted water crackers were offered to cleanse the palate between the samples. In each section and for each attribute, the panelists were asked to rate acceptability on a structured 9-point scale (1 = extremely dislike, 5 = neither like nor dislike, and 9 = extremely like), select the descriptors they considered appropriate to describe the samples, and then rate the intensity of these descriptors on an unstructured 9 cm hedonic scale.

2.5 Statistical analysis

Data for the CIE color and physicochemical analyses were arranged in a completely randomized design (CRD) in a split-plot scheme, with a factorial 2 × 3 (curing agents × concentration) in the whole plot and days of storage in the split-plot, with three repetitions (batches). The main factors and their interactions were tested using analysis of variance (ANOVA) and the means were separated using Tukey's test with a 5% probability.

For the sensory analyses, ANOVA was used to evaluate the effect of the treatments on the acceptance and perceived intensity (RATA) of the attributes according to the

recommendations of [Meyners et al. \(2016\)](#). An intensity matrix was constructed with the RATA scores assigned (in centimeters and to one decimal place) for each attribute, with unselected descriptors considered to have a score of "0." The intensity (RATA) and acceptance scores were arranged in a 2 (curing agent) \times 3 (concentration) factorial design in a randomized block design (DBC) in which each panelist constituted a block. The main factors and their interactions were tested using ANOVA, and the means were separated using Tukey's test ($P < 0.05$). A principal component analysis (PCA) was conducted on the mean intensity values from the RATA test against the overall impression data. Parallel factor analysis (PARAFAC) was used to simultaneously analyze the acceptance test attributes of appearance, taste, and texture ([Nunes et al., 2011](#)).

The statistical analyses were performed using the SensoMaker (UFLA; Lavras, MG, Brazil) and Statistica® 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK) softwares.

3 Results and discussion

3.1 pH and residual nitrite

There was no significant difference ($P > 0.05$) in the pH values between treatments (Table 1), with mean values of 6.34 ± 0.10 . These results are in line with those reported by [Andrade et al. \(2024\)](#), who observed that even extremely acidic solutions of S-nitrosothiols (NAC-SNO and NACET-SNO) (pH \sim 2.0) were unable to alter the pH of the product, regardless of their addition levels (mean of 6.26).

For the residual nitrite (NO₂R) values, there was an effect of the triple interaction among the curing agents, addition levels, and storage time, as shown in Figure 1. The concentration of NO₂R was not affected ($P > 0.05$) by the concentrations of NAC-SNO added throughout the storage period, with an average of 1.79 ± 0.61 mg/kg. These values were very close to the NO₂R values reported by [Andrade et al. \(2024a\)](#) for uncured restructured cooked hams (2.71 mg/kg). Increasing the addition of nitrite to the formulations increased ($P < 0.05$) the NO₂R levels in the products. However, the NO₂R values of products containing 50 mg/kg nitrite did not differ ($P > 0.05$) from those of products containing NAC-SNO and did not change significantly throughout the storage period (mean of 0.87 ± 0.36 mg/kg). Despite the higher values (8.43 ± 2.37 mg/kg) at time zero (24 h after cooking), from the 15th day onwards the NO₂R values of the products added with 150 mg/kg of nitrite did not differ ($P > 0.05$) from the others containing NAC-SNO, or even 50 mg/kg of nitrite.

Table 1. Effects of the type (T) and addition levels (L) of curing agents and time storage (S) on nitrite residual content (NO₂R), lipid peroxidation (TBARS), CIE color indexes, and cured color (R650/570 nm) in vacuum-packed slices of restructured cooked hams.

Factors	Variation source	pH	NO ₂ R (mg/kg)	TBARS#1 (mg MAD/Kg)	TBARS#2 (mg HEX/Kg)	L*	C*	h (°)	Cured color
Agent type (T)	Nitrite	6.34	10.86	0.66 ^B	0.29	59.68	10.87	38.59	1.59
	NAC-SNO	6.34	1.79	0.86 ^A	0.29	59.57	10.90	39.76	1.58
Addition level (L), mg NEq/kg	50	6.33	0.87	0.98 ^x	0.36	59.87	10.43	40.93	1.56
	150	6.34	2.50	0.66 ^y	0.26	59.44	11.13	37.96	1.59
	300	6.34	15.61	0.64 ^y	0.24	59.56	11.10	38.64	1.60
Storage (S), days	0	-	10.13	0.62 ^b	0.14	60.35	12.77 ^a	38.66	1.99 ^a
	15	-	7.10	0.57 ^b	0.14	59.48	10.43 ^b	38.35	1.76 ^{ab}
	30	-	6.23	0.92 ^a	0.17	59.33	10.45 ^b	39.68	1.68 ^b
	45	-	5.25	0.93 ^a	0.13	59.40	10.42 ^b	39.45	1.25 ^c
	60	-	2.92	0.77 ^a	0.86	59.56	10.36 ^b	39.76	1.25 ^c
	SEM	0.01	1.20	0.04	0.04	0.13	0.14	0.30	0.05
F > Pr ¹	T	0.388	<0.001	<0.001	0.913	0.688	0.875	0.023	0.928
	L	0.468	<0.001	<0.001	0.005	0.462	0.007	<0.001	0.956
	S	-	<0.001	<0.001	<0.001	0.169	<0.001	0.281	<0.001
	T×L	0.792	<0.001	0.065	0.289	0.506	0.018	0.004	0.947
	T×S	-	0.002	0.075	0.792	0.886	0.972	0.844	1.000
	L×S	-	<0.001	0.067	<0.001	0.998	0.957	0.307	1.000
	T×L×S	-	0.010	0.798	0.504	0.996	0.994	0.820	1.000

Nitrite = sodium nitrite; NAC-SNO = S-nitroso-N-acetylcysteine; NEq = nitrite equivalent; TBARS = thiobarbituric acid-reactive substances; MAD = malondialdehyde; HEX = hexanal; ΔE^* = overall color difference from samples with 150 mg/kg of sodium nitrite at day 0; and SEM = standard error of the mean ($n = 90$; $n = 18$ for pH).

¹ Significant probabilities ($P < 0.05$) were highlighted in bold.

Means followed by different letters in the row, between treatments (^{A,B}), concentration (^{x,y}) or storage (^{a-c}), differ ($P < 0.05$).

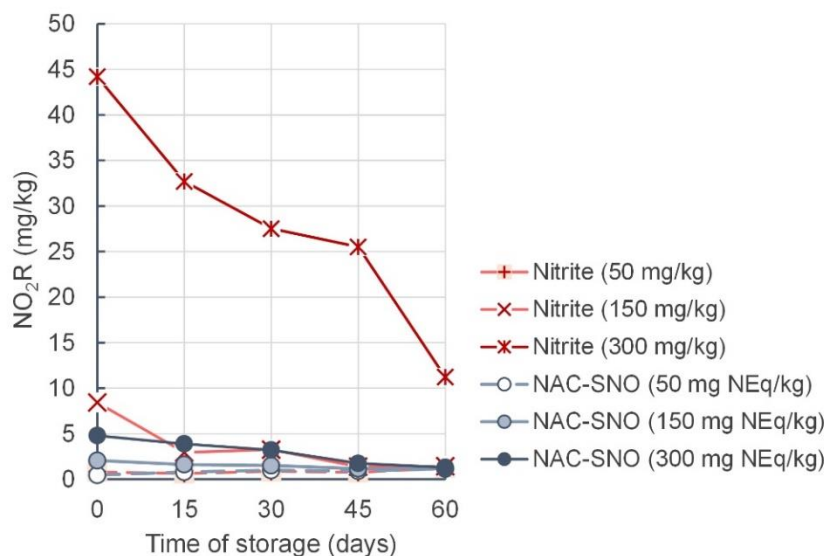


Figure 1. Effects of the type and addition levels (NEq = nitrite equivalent) of the curing agent on the residual nitrite (NO₂R) content in restructured cooked hams vacuum-packed slices during cold (4 °C) storage. Nitrite = sodium nitrite; NAC-SNO = S-nitroso-N-acetylcysteine; and NEq = nitrite equivalent.

Overall, the addition of NAC-SNO resulted in approximately 84% less NO₂R in the products than in those prepared with sodium nitrite (Table 1). Lower NO₂R values with the addition of NAC-SNO when compared to nitrite were also reported by [Andrade et al. \(2024a\)](#), who attributed its formation to the direct decomposition of S-nitrosothiol and the release of NO, which in the presence of oxygen could be easily oxidized to the nitrite anion (NO₂⁻). The reduction in NO₂R values in products cured with nitrite after processing and during storage was expected because of its high reactivity against myoglobin pigment and the various constituents of the meat system (sulfhydryl groups of amino acids, fats, non-heme proteins, etc.) and ingredients. This process is favored (endothermic) during cooking ([Honikel, 2008](#); [Sindelar and Milkowski, 2012](#)). According to [Sebranek and Bacus \(2007\)](#), NO₂R levels decline over the storage life of cured meat products until they are often undetectable. It is important to note that the amount of nitrite present as NO₂R is important for the effectiveness of its bacteriostatic effect, especially against pathogens such as *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli* ([Dutra et al., 2016](#); [Shakil et al., 2022](#)), and to act as a reservoir of NO, controlling oxidative processes and maintaining the intensity of the cured color during prolonged storage ([Andrade et al., 2024a](#); [Sindelar and Milkowski, 2012](#)).

3.2 Lipid peroxidation

For lipid oxidation measured by the TBARS#1 values, there was a significant difference ($P < 0.05$) between the three factors: curing agents, their addition levels, and storage time. This method is commonly used in meat products to monitor the secondary products of polyunsaturated fatty acid oxidation produced from peroxides and preformed free radicals, mainly malondialdehyde (MAD) (Domínguez et al., 2019). MAD is a non-volatile aldehyde formed mainly by the oxidation of linolenic acid (n-6) in the early stages of secondary lipid oxidation (Barriuso et al., 2013; del Olmo et al., 2013).

In general, lower TBARS#1 values were observed in the products added with nitrite than with NAC-SNO (Table 1). These values were higher when 50 mg NEq/kg was added and with increasing values from the 30th day of sliced storage. The antioxidant activity of nitrite is attributed to the formation of NO radicals, which act by complexing metal ions (the main pro-oxidants in meat), especially in stabilizing iron (heme and non-heme), reacting with reactive oxygen species (ROS), such as hydroxyl and peroxy radicals, and sequestering oxygen, thus reducing the conditions for the initiation and propagation of the auto-oxidation reaction (Dutra et al., 2017; Honikel, 2008; Shakil et al., 2022). Since the NO radical is generated from S-nitrosothiols, its antioxidant action is due to the same mechanisms observed for nitrite, although it also acts as a decomposer and free radical inhibitor on its own (Andrade et al., 2024a; Kanner et al., 2019).

A different result from this experiment was reported by Andrade et al. (2024a), who reported that the antioxidant action of NAC-SNO was equivalent to that of sodium nitrite at additions of 75–300 mg NEq/kg; however, at additions of 50 mg NEq/kg or less, TBARS values were lower in samples made with nitrite than in those containing equimolar amounts of S-nitrosothiols. These authors suggested the use of a synergistic antioxidant, together with S-nitrosothiols, such as ascorbic or erythorbic acid, to contribute to a more effective antioxidant action in meat products when these curing agents are added in small quantities. Ascorbate or isoascorbate (erythorbate) salts are additives used in the processing of cured meats to accelerate the curing process by shifting the reaction towards the formation of NO (Bonifacie et al., 2021; Sebranek and Bacus, 2007), while acting as a synergistic antioxidant to nitrite by regenerating endogenous antioxidants in the meat (donating electrons) and eliminating ROS and various other free radicals by stopping the spread of auto-oxidation (Domínguez et al., 2019). However, in this study, sodium erythorbate was added as a reducing agent to all the formulations. Thus, the difference in the results of Andrade et al. (2024a) seems to be because these authors assessed the oxidation induced only by cooking the samples and they did not

monitor this oxidation during prolonged storage. During the processing of cooked cured products, cooking is the main factor responsible for initiating lipid oxidation, as it releases species such as iron ions (mainly in its ferrous form), catalyzes the formation of hydroxyl radicals ($\text{OH}\cdot$), and accelerates the development of lipid oxidation (Domínguez et al., 2019; Dutra et al., 2017). This suggests that the lower efficiency of the antioxidant action of NAC-SNO compared to that of nitrite is due to the reduced formation of NO_2R , which acts as a reservoir for NO during storage.

During storage, a wide variety of volatile and non-volatile compounds are formed, such as carbonyls (e.g., ketones and aldehydes), alcohols, hydrocarbons (e.g., alkanes and alkenes), and furans, which are responsible for the appearance of rancid tastes and odors (Domínguez et al., 2019). While MAD is formed in the early stages of secondary oxidation, hexanal is a volatile aldehyde formed from n-6 polyunsaturated fatty acids in more advanced stages and is considered a major indicator of lipid oxidation in meat and meat products, as it correlates strongly with TBARS values (with MAD as a reference) and sensory scores (Barriuso et al., 2013; del Olmo et al., 2013; Domínguez et al., 2019). Thus, evaluation of hexanal can provide more information on the oxidative deterioration of the product during storage. Therefore, the compounds formed in more advanced stages of secondary lipid oxidation were evaluated in this experiment using TBARS#2 values with hexanal as a reference.

For the TBARS#2 values, there was no effect ($P > 0.05$) of the type of curing agent, but the interaction between the level of added curing agents and storage time was significant (Table 1). An increase in TBARS#2 values was observed ($P < 0.05$) only on day 60 of storage (Figure 2), with values almost twice as high in samples with 50 mg NEq/kg added (1.25 ± 0.14 mg HEX/kg) than in those with higher additions of curing agents (0.69 ± 0.35 mg HEX/kg). This demonstrates the similar antioxidant activity of nitrite and NAC-SNO during storage in terms of the formation of more complex secondary compounds. In this case, the lower levels of NO_2R , which act as an NO reservoir, do not seem to be a limiting factor for the antioxidant action of NAC-SNO. However, it is possible that this reserve was maintained by retaining the S-nitrosothiols in the product, since, according to Bonifacie et al. (2021), in addition to the presence of ascorbate considerably reducing the levels of pre-formed N-nitrosamines in meat models, it also protected the naturally formed S-nitrosothiols from degradation during the curing and cooking process.

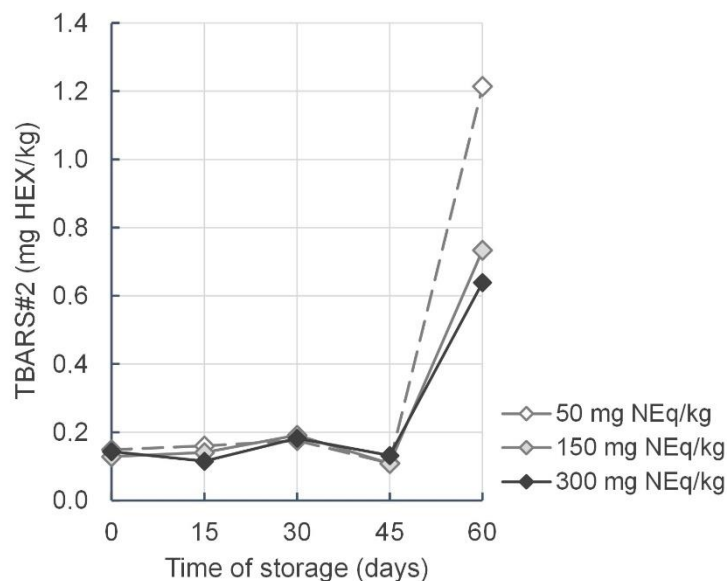


Figure 2. Effects of the addition levels of curing agent on the lipid peroxidation (TBARS values) in in restructured cooked hams vacuum-packed slices during cold (4 °C) storage. NEq = nitrite equivalent; and HEX = hexanal.

3.3 Instrumental color

Among the CIE color indices, brightness (L^*) was not affected ($P > 0.05$) by any of the evaluated factors, whereas color intensity (C^*) and hue (h) were significantly affected by the interaction between the type of curing agent and its addition levels (Table 1). In general, the different additions of nitrite (50-300 mg/kg) did not affect ($P > 0.05$) the color indices of the products, whereas the addition of 50 mg NEq/kg NAC-SNO resulted in products with a more yellowish color tone (higher h values) and less intensity (lower C^* values) than all the other products (Figure 3A and 3B).

Except for the lower C^* values in the samples cured with 50 mg NEq/kg NAC-SNO, these results corroborate the findings of [Andrade et al. \(2024a\)](#) in sliced cooked restructured hams, vacuum-packed and kept at 4 °C for 2 h. These authors attributed these differences to the low content of added S-nitrosothiols, which did not contain sufficient NO_2R (1.24 mg/kg) to serve as a reservoir for the regeneration of cured meat pigments lost through oxidation and slicing-induced fading. However, the results of this experiment did not indicate a color deficiency attributed to greater oxidation because despite the higher TBARS#1 values in the samples containing NAC-SNO (Table 1), the NO_2R values did not differ between the samples containing NAC-SNO and those containing 50 mg/kg of nitrite throughout storage (Figure 1). It is likely that the amount of NAC-SNO in these products was insufficient to generate a cured

color like that obtained with nitrite or when added at higher concentrations of S-nitrosothiols. In addition, the NAC formed from the decomposition of NAC-SNO may also contribute to maintaining the color of the cured products, as it is a precursor of the amino acid l-cysteine, which prevents the oxidation of hemoglobin in porcine blood (Zhou et al., 2012) or myoglobin in sausages (Ning et al., 2019) has been proven. Sullivan and Sebranek (2012) reported that the intensity of the cured pigment (nitrosyl hemochromogen) was not altered in a model meat curing system with 25-500 mg/kg of nitrite. Although Andrade et al. (2024a) did not observe any differences in the CIE color indices of products cured with 50-300 mg/kg of nitrite, Guimarães et al. (2022) observed higher *h* values in samples added with 40 mg/kg of nitrite than in those added with 150 mg/kg of nitrite.

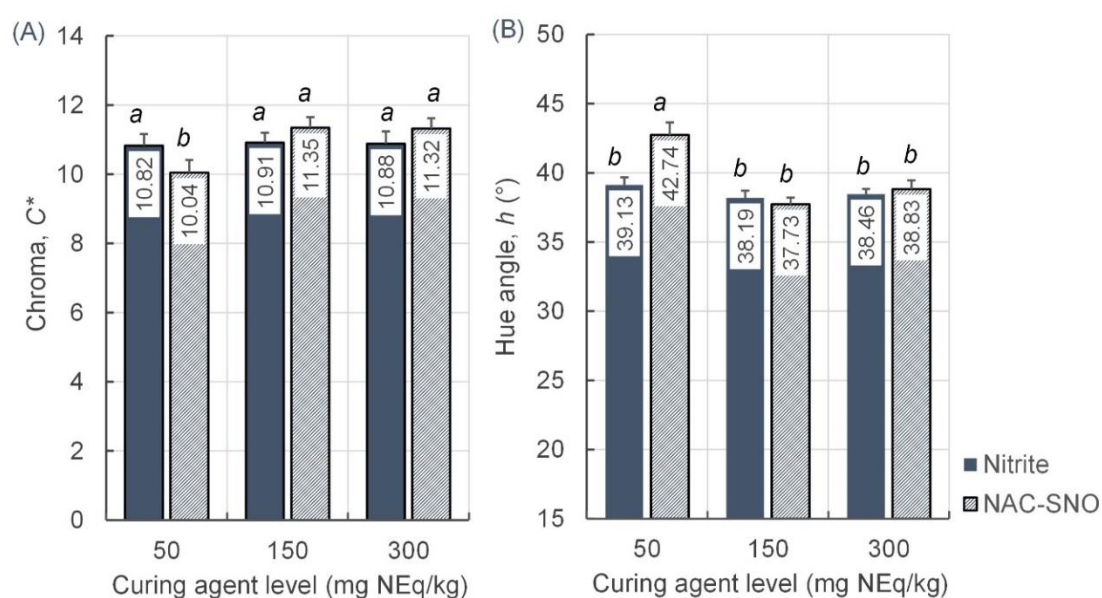


Figure 3. Effects of the type and addition levels of the curing agent on the CIE color indices, (A) chroma and (B) hue angle, in restructured cooked hams vacuum-packed slices during cold (4 °C) storage. Nitrite = sodium nitrite; NAC-SNO = S-nitroso-N-acetylcysteine; and NEq = nitrite equivalent. Means followed by different letters ^(a,b) differ ($P < 0.05$). Error bars represent the standard error of the means.

Despite the differences observed in the CIE color indices, the cured color measured by the R650/570 nm ratio was not affected ($P > 0.05$) by the type of the curing agent or its addition concentration, but by storage (Table 1). At time zero of storage, the average values of the cured color index were 1.99 ± 0.50 , which can be described as a perceptible cured color (King et al., 2023). This index decreased ($P < 0.05$) with storage, reaching values lower than

the perceptible cured color threshold (1.7 to 2.2), described by [King et al. \(2023\)](#), after 30 days of storage. This change was accompanied by a reduction in C^* values, indicating a loss of color intensity, and may be associated with the greater extent of lipid oxidation observed by the TBARS#1 values. The residual oxygen incorporated during the slicing process may induce the dissociation (catalyzed by light) of NO from the nitrosylhemochromogen pigment and its subsequent oxidation during vacuum storage ([Andrade et al., 2024a](#)). Under accelerated fading conditions (packaged in an oxygen-permeable film and stored at room temperature), the oxidation of the nitrous pigment induces an increase in h values and a reduction in the R650/570 nm ratio of baked cured products ([Guimarães et al., 2022](#)).

3.4 Sensorial analysis

The sensory panel consisted of consumers of cooked cured products, most of whom consumed them between three and five times a week (35%) or more than once a week (20%). Most consumers (67%) reported consuming these products as ingredients in other recipes, and only 15% consumed them as appetizers. In general, consumers buy this type of sliced product in a local market (86%), with price (73%), color (68%), and brand (62%) being the most important characteristics when choosing a product.

For the appearance of the products sliced, the "pink color" was the only discriminating descriptor ($P < 0.05$) in the samples evaluated (Table 2). The panelists observed a greater ($P < 0.05$) intensity of pink color in the samples added with 150 and 300 mg/kg nitrite and 300 mg NEq/kg NAC-SNO (Figure 4A). This is in line with the observations of [Andrade et al. \(2024\)](#), in which quantities close to 300 mg NEq/kg of NAC-SNO were necessary to obtain a cured pink color intensity similar to that of the samples cured with 150 mg/kg of nitrite.

Although the perceived intensity of the cured color of the samples containing 50 mg NEq/kg curing agent (nitrite or NAC-SNO) did not differ ($P > 0.05$) from that of the samples containing 150 mg NEq/kg NAC-SNO (Figure 4A), the differences observed did not corroborate the results of the instrumental color indices, in which replacing nitrite with equivalent amounts above 50 mg NEq/kg NAC-SNO did not alter the formation of cured color or its stability in the storage of restructured baked products (Table 1; Figure 3). Despite the lack of an effect on instrumental color indices, the difference in the intensity of pink color perceived between the products may be associated with the difference in the extent of oxidative processes during storage for 30 days, in which an increase in TBARS#1 values was observed (Table 1). However, the difference in perceived intensity did not affect ($P < 0.05$) the overall acceptability of the appearance of any of the products evaluated.

Table 2. Acceptance scores¹ and descriptors intensity² of sensorial attributes of restructured cooked hams elaborated with different curing agent types (T) and additions level (L).

Attributes/Descriptors	Agent type (T)		Addition level (L), mg NEq/kg			SEM	F > Pr ³		
	Nitrite	NAC-SNO	50	150	300		T	L	T×L
Appearance	7.6	7.5	7.4	7.6	7.6	0.06	0.278	0.183	0.248
Pink color	6.4	6.0	5.9	6.3	6.4	0.08	0.010	0.028	0.017
Pale color	1.2	1.4	1.3	1.3	1.4	0.09	0.280	0.861	0.497
Brightness	2.0	1.8	1.9	1.9	1.8	0.10	0.183	0.931	0.516
Aroma	6.4 ^B	6.9 ^A	6.6	6.8	6.6	0.08	0.001	0.353	0.379
Characteristic aroma	4.9 ^y	5.4 ^x	5.0	5.4	5.1	0.11	0.016	0.155	0.659
Odd aroma	0.8 ^x	0.6 ^y	0.5	0.7	0.9	0.06	0.018	0.064	0.518
Flavor	6.9	7.4	6.9	7.3	7.2	0.07	<0.001	0.042	0.045
Characteristic flavor	5.2 ^y	5.9 ^x	5.4	5.8	5.5	0.11	<0.001	0.171	0.936
Odd flavor	0.9 ^x	0.6 ^y	0.7	0.7	0.9	0.07	0.005	0.061	0.328
Texture	6.9 ^B	7.3 ^A	6.9 ^b	7.3 ^a	7.1 ^{ab}	0.07	0.001	0.038	0.118
Texture firm	5.4 ^x	4.9 ^y	5.2	5.0	5.3	0.12	0.002	0.408	0.320
Juicy	4.2	5.2	3.1	8.0	3.1	1.14	0.651	0.126	0.984
Overall liking	7.0 ^B	7.4 ^A	7.0 ^b	7.3 ^a	7.2 ^{ab}	0.06	<0.001	0.027	0.175

Nitrite = sodium nitrite; NAC-SNO = S-nitroso-N-acetylcysteine; NEq = nitrite equivalent; SEM = standard error of the mean ($n = 606$).

¹Scores on a scale of 1 (I disliked it very much) to 9 (I liked it very much), with an intermediate value of 5 (neither like nor dislike).

²Scores on an unstructured nine centimeters scale (from weak to intense, with unselected descriptors registered as zero).

³Significant probabilities ($P < 0.05$) were highlighted in bold.

Means followed by different letters in the row, between treatments (^{A,B}) acceptance and (^{x,y}) descriptors intensity and between additions levels (^{a-c}), differ ($P < 0.05$).

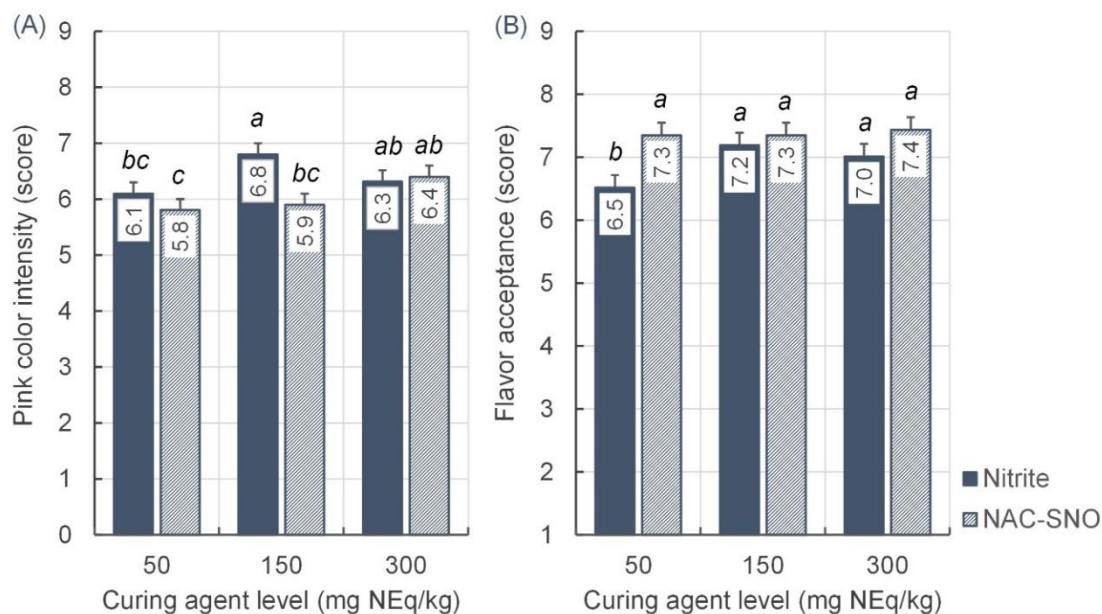


Figure 4. Effects of the type and addition levels of the curing agent on the sensory scores of (A) pink color intensity (0 = weak; and 9 = intense) and (B) flavor acceptance (1 = I disliked it very much; and 9 = I liked it very much) color indices in in restructured cooked hams vacuum-packed slices during cold (4 °C) storage. Nitrite = sodium nitrite; NAC-SNO = S-nitroso-N-acetylcysteine; and NEq = nitrite equivalent. Means followed by different letters (^{a-c}) differ ($P < 0.05$). Error bars represent the standard error of the means.

In addition to inducing fading in the cured products, lipid oxidation can also produce off-flavors and aromas during refrigerated storage, which are typically characterized as rancid (Domínguez et al., 2019). In this sense, higher acceptance scores were observed for the samples containing NAC-SNO, to which the panelists attributed ($P < 0.05$) higher intensity scores for the descriptor "characteristic aroma" and lower scores for "odd aroma" when compared to the samples containing nitrite (Table 2). The same behavior was observed for the intensity of the descriptors "characteristic flavor" and "odd flavor," although the samples containing 50 mg/kg of nitrite were less preferred ($P < 0.05$) than the other samples (Figure 4B). However, these results did not correlate with the TBARS values observed in the samples (Table 1; Figure 2). According to Sindelar and Milkowski (2011), sensory analysis suggests that the cured taste is not just the result of slowed lipid oxidation, but rather the combination of a complex cured aroma and flavor in cooperation with the lack of rancid flavors.

The addition of NAC-SNO seemed to intensify the characteristic aroma and flavor of the cured products. The degradation of peptides and amino acids in meat improves its sensory flavor characteristics (Khan et al., 2015). The presence of sulfur-containing amino acids alone

is of great importance in generating the aroma of meat during cooking because they are precursors of volatile compounds such as mercaptan and thiophene, which have a high perception threshold (Ma et al., 2020). L-cysteine is a well-known precursor of sulfur-containing flavors, and among the compounds formed by the Maillard reaction with reducing sugars, such as glucose and ribose, aromatic thiols (2-methylthiofuranthiol, 2-furfurylthiol, and 3-mercapto-2-pentanone) are the main compounds responsible for the meat flavor produced during heat treatment (Cerny and Davidek, 2003). Thus, it is possible that NAC thiol, a product of the decomposition of NAC-SNO, also contributes to the generation of volatile compounds that are important for generating the characteristic flavor and aroma in cured products.

The panelists preferred ($P < 0.05$) the texture of the samples containing NAC-SNO, which were described as having a greater firmness ("texture firm" descriptor) than the nitrite-added samples (Table 2). A higher ($P < 0.05$) firmness was also perceived with higher amounts of the curing agent. Dutra et al. (2014) reported an increase in cohesiveness and a reduction in flexibility, as measured by texture profile analysis (TPA), in cooked cured products made with higher additions of nitrite (0 to 300 mg/kg). According to Hofmann and Hamm (1978), one of the factors that can influence the firm texture of cured products is the possible formation of disulfide bonds (-S-S-) between the protein chains induced by heating. According to these authors, in the meat curing process, the NO formed from nitrite also interacts with the sulfhydryl groups (-SH) of amino acid residues in proteins; however, because this is very unstable under curing conditions, the NO group can be easily separated from the formed S-nitrosothiols and transferred to the iron donor heme group of myoglobin, resulting in the formation of thermally stable disulfide bridges between -SH residues in meat proteins. Thus, it is likely that the addition of S-nitrosothiols stabilizes these residues, reducing the formation of disulfide bridges during cooking, and consequently, the firmness of the products.

Finally, overall acceptance was higher ($P < 0.05$) for the products added with NAC-SNO than for those added with nitrite and was also higher for additions above 150 mg NEq/kg (Table 2). As shown in the PARAFAC graph (Figure 5), this surprisingly higher acceptance of the NAC-SNO-added samples can be attributed to the greater acceptance of the aroma, flavor, and texture attributes, as appearance was more related to the nitrite-added samples.

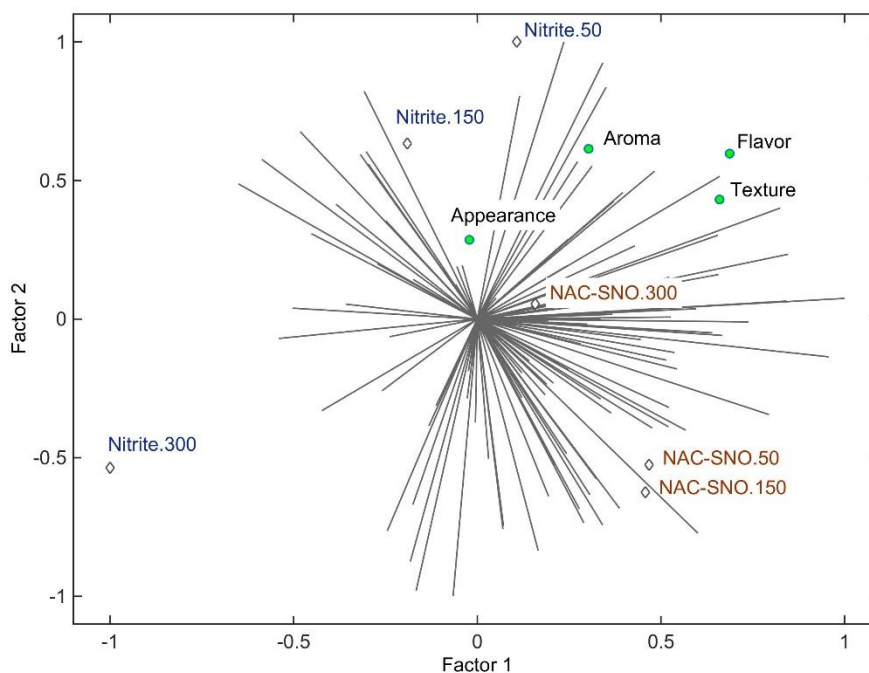


Figure 5. Tri-plot Internal Preference Map (PARAFAC) for sensorial attributes based on their consumer scores (shown as vectors in the plot) in the acceptance test of the restructured cooked hams elaborated with different curing agent types (sodium nitrite and S-nitroso-N-acetylcysteine, NAC-SNO) and additions (50, 150 and 300 nitrite equivalent/Kg) levels.

Evaluating the descriptors of the sensory attributes using principal component analysis (PCA), the two principal components (PC) extracted explained 86.81% of the total variance, with the greatest variability in the experimental data (62.39%) observed in PC1 (Figure 6). According to the perceptual map, the samples added with NAC-SNO and those with 150 mg/kg of nitrite were positively correlated in PC1, being strongly characterized by the descriptors "characteristic aroma" and "characteristic flavor," and separated in the two quadrants by PC2 (24.42% of the total variance) by the descriptors "juicy" (strongly related to the samples cured with 50 and 300 mg NEq/kg NAC-SNO) and "pallid" (related to the samples cured with nitrite). The samples cured with 50 and 300 mg/kg were negatively correlated in PC1, characterized mainly by "texture firm" and "brightness," while the samples containing 50 mg/kg of nitrite were strongly characterized by the descriptors "odd flavor" and "odd aroma." When considering the descriptors that contributed to better acceptance (characteristic aroma and flavor, pink color, and less firm texture), it can be concluded that the addition of 150 mg NEq/kg of NAC-SNO was sufficient to generate sensory characteristics

similar to those of cured (addition of 100-200 mg/kg nitrite) and cooked products that are commonly sold.

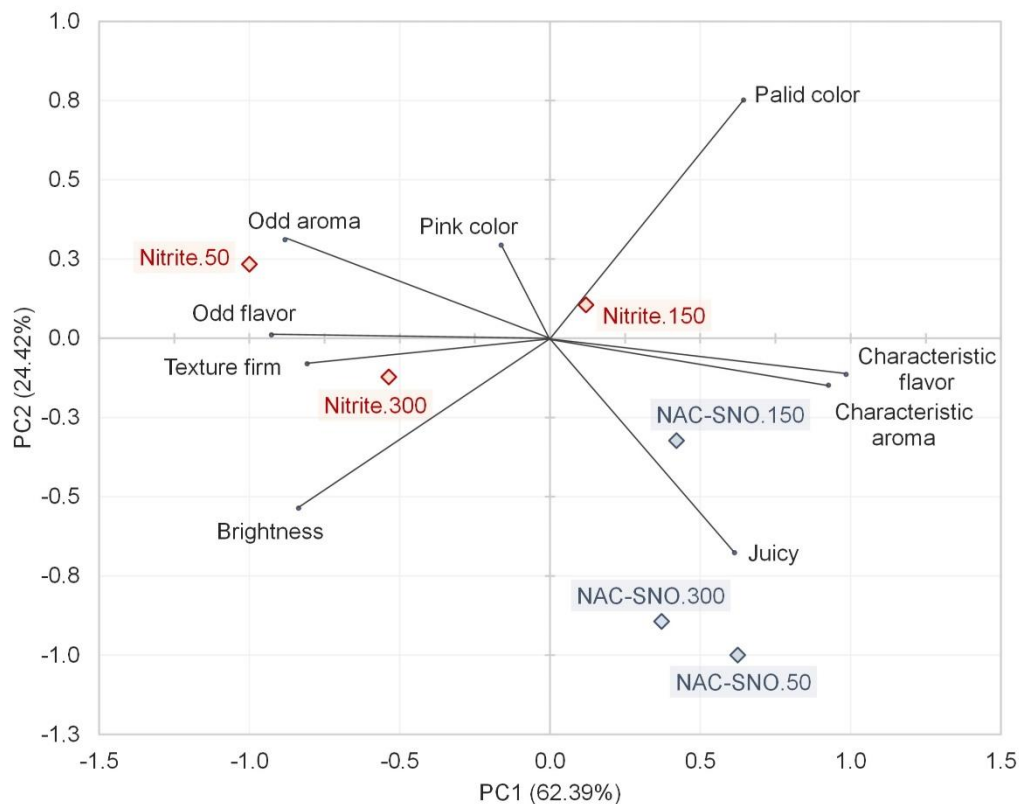


Figure 6. Principal Component Analysis (PCA) biplot graph of intensity mean values of sensorial descriptors for restructured cooked hams elaborated with different curing agent types (sodium nitrite and S-nitroso-N-acetylcysteine, NAC-SNO) and additions (50, 150 and 300 nitrite equivalent/Kg) levels.

4 Conclusions

The results of this study corroborated that replacing nitrite with NAC-SNO in cooked cured products is a highly promising strategy. At equimolar substitution concentrations above 50 mg/kg, the use of NAC-SNO resulted in the development of a characteristic cured pink color, which was maintained during storage of the sliced products in a manner similar to nitrite. Despite allowing slightly greater lipid oxidation in the sliced products, the replacement of nitrite with NAC-SNO resulted in a sensory profile characteristic of cooked cured products, with greater overall acceptability and showing greater notes of flavor intensity and characteristic flavor.

The addition of 150 mg NEq/kg NAC-SNO proved to be equivalent to the same concentration of nitrite commonly used in cured cooked hams and is suggested as a viable substitute for nitrite to achieve desirable stability and sensory characteristics in restructured cooked hams.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Research Support Foundation of the State of Minas Gerais (FAPEMIG; CVZ APQ 02904-17) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; MCT 430206/2016-0) for their financial support and to the Higher Education Personnel Improvement Coordination (CAPES/MEC-Brazil) for the doctoral scholarship granted to the first author and the CNPq-Brazil for the Research Productivity Fellows (PQ) granted to the last two authors.

References

- Andrade, B. F., Guimarães, A. S., do Carmo, L. R., Tanaka, M. S., Fontes, P. R., Ramos, A. d. L. S., & Ramos, E. M. (2024). S-nitrosothiols as nitrite alternatives: Effects on residual nitrite, lipid oxidation, volatile profile, and cured color of restructured cooked ham. *Meat Science*, 209, 109397. doi:10.1016/j.meatsci.2023.109397
- Ares, G., Bruzzone, F., Vidal, L., Cadena, R. S., Giménez, A., Pineau, B., . . . Jaeger, S. R. (2014). Evaluation of a rating-based variant of check-all-that-apply questions: Rate-all-that-apply (RATA). *Food Quality and Preference*, 36, 87-95. doi:10.1016/j.foodqual.2014.03.006
- Barriuso, B., Astiasarán, I., & Ansorena, D. (2013). A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: a challenging task. *European Food Research and Technology*, 236(1), 1-15. doi:10.1007/s00217-012-1866-9
- Bonifacie, A., Promeprat, A., Nassy, G., Gatellier, P., Santé-Lhoutellier, V., & Théron, L. (2021). Chemical reactivity of nitrite and ascorbate in a cured and cooked meat model implication in nitrosation, nitrosylation and oxidation. *Food Chemistry*, 348, 129073. doi:10.1016/j.foodchem.2021.129073
- Cerny, C., & Davidek, T. (2003). Formation of Aroma Compounds from Ribose and Cysteine during the Maillard Reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(9), 2714-2721. doi:10.1021/jf026123f
- del Olmo, A., Calzada, J., & Nuñez, M. (2013). Lipolysis, Lipid Peroxidation, and Color Characteristics of Serrano Hams from Duroc and Large White Pigs during Dry-

- Curing. *Journal of Food Science*, 78(11), C1659-C1664. doi:10.1111/1750-3841.12281
- Domínguez, R., Pateiro, M., Gagaoua, M., Barba, F. J., Zhang, W., & Lorenzo, J. M. (2019). A comprehensive review on lipid oxidation in meat and meat products. *Antioxidants (Basel)*, 8(10). doi:10.3390/antiox8100429
- Dutra, M. P., Aleixo, G. C., Ramos, A. L. S., Silva, M. H. L., Pereira, M. T., Piccoli, R. H., & Ramos, E. M. (2016). Use of gamma radiation on control of *Clostridium botulinum* in mortadella formulated with different nitrite levels. *Radiation Physics and Chemistry*, 119, 125-129. doi:10.1016/j.radphyschem.2015.10.008
- Dutra, M. P., Cardoso, G. P., Fontes, P. R., Silva, D. R. G., Pereira, M. T., Ramos, A. d. L. S., & Ramos, E. M. (2017). Combined effects of gamma radiation doses and sodium nitrite content on the lipid oxidation and color of mortadella. *Food Chemistry*, 237(1), 232-239. doi:10.1016/j.foodchem.2017.05.108
- Dutra, M. P., Ramos, E. M., Aroeira, C. N., Ramos, A. L. S., Silva, M. H. L., Contado, J. L., & Pereira, M. T. (2014). Gamma radiation and sodium nitrite in the chemical composition and texture of mortadella (in portuguese). *Ciência Rural*, 44(6), 1134-1140. doi:10.1590/S0103-84782014000600029
- Guimarães, A. S., Guimarães, J. S., Rodrigues, L. M., Fontes, P. R., Ramos, A. d. L. S., & Ramos, E. M. (2022). Assessment of Japanese radish derivatives as nitrite substitute on the physicochemical properties, sensorial profile, and consumer acceptability of restructured cooked hams. *Meat Science*, 192, 108897. doi:10.1016/j.meatsci.2022.108897
- Hofmann, K., & Hamm, R. (1978). Sulfhydryl and Disulfide Groups in Meats. In C. O. Chichester (Ed.), *Advances in Food Research* (Vol. 24, pp. 1-111): Academic Press.
- Honikel, K. O. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Science*, 78(1-2), 68-76. doi:10.1016/j.meatsci.2007.05.030
- IARC. (2010). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. In *Ingested Nitrate and Nitrite, and Cyanobacterial Peptide Toxins* (Vol. 94). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- IARC. (2018). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. In *Red Meat and Processed Meat* (Vol. 114). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.

- Kanner, J., Shpaizer, A., Nelgas, L., & Tirosh, O. (2019). S-Nitroso-N-acetylcysteine (NAC-SNO) as an antioxidant in cured meat and stomach medium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *67*(39), 10930-10936. doi:10.1021/acs.jafc.9b03741
- Khan, M. I., Jo, C., & Tariq, M. R. (2015). Meat flavor precursors and factors influencing flavor precursors--A systematic review. *Meat Science*, *110*, 278-284. doi:10.1016/j.meatsci.2015.08.002
- King, D. A., Hunt, M. C., Barbut, S., Claus, J. R., Cornforth, D. P., Joseph, P., . . . Weber, M. (2023). American Meat Science Association Guidelines for Meat Color Measurement. *Meat and Muscle Biology* *6*(4), 1-81. doi:10.22175/mmb.12473
- Ma, X., Yu, M., Liu, Z., Deng, D., Cui, Y., Tian, Z., & Wang, G. (2020). Effect of amino acids and their derivatives on meat quality of finishing pigs. *Journal of Food Science and Technology*, *57*(2), 404-412. doi:10.1007/s13197-019-04077-x
- Mathews, W. R., & Kerr, S. W. (1993). Biological activity of S-nitrosothiols: the role of nitric oxide. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *267*(3), 1529-1537.
- Meyners, M., Jaeger, S. R., & Ares, G. (2016). On the analysis of Rate-All-That-Apply (RATA) data. *Food Quality and Preference*, *49*, 1-10. doi:10.1016/j.foodqual.2015.11.003
- Ning, C., Li, L., Fang, H., Ma, F., Tang, Y., & Zhou, C. (2019). l-Lysine/l-arginine/l-cysteine synergistically improves the color of cured sausage with NaNO₂ by hindering myoglobin oxidation and promoting nitrosylmyoglobin formation. *Food Chemistry*, *284*, 219-226. doi:10.1016/j.foodchem.2019.01.116
- Nunes, C. A., Pinheiro, A. C. M., & Bastos, S. C. (2011). Evaluating consumer acceptance tests by three-way internal preference mapping obtained by parallel factor analysis (PARAFAC). *Journal of Sensory Studies*, *26*(2), 167-174. doi:10.1111/j.1745-459X.2011.00333.x
- Pikul, J., Leszczynski, D. E., & Kummerow, F. A. (1989). Evaluation of three modified TBA methods for measuring lipid oxidation in chicken meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *37*(5), 1309-1313. doi:10.1021/jf00089a022
- Sebranek, J. G., & Bacus, J. N. (2007). Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues? *Meat Science*, *77*(1), 136-147. doi:10.1016/j.meatsci.2007.03.025
- Shakil, M. H., Trisha, A. T., Rahman, M., Talukdar, S., Kobun, R., Huda, N., & Zzaman, W. (2022). Nitrites in cured meats, health risk issues, alternatives to nitrites: a review. *Foods (Basel, Switzerland)*, *11*(21), 3355. doi:10.3390/foods11213355

- Shpaizer, A., Kanner, J., & Tirosh, O. (2021). S-Nitroso-N-acetylcysteine (NAC-SNO) vs. nitrite as an anti-clostridial additive for meat products. *Food & Function*, 12(5), 2012-2019. doi:10.1039/D0FO02839H
- Shpaizer, A., Nussinovich, A., Kanner, J., & Tirosh, O. (2018). S-Nitroso-N-acetylcysteine generates less carcinogenic N-nitrosamines in meat products than nitrite. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(43), 11459-11467. doi:10.1021/acs.jafc.8b04549
- Sindelar, J., & Milkowski, A. (2011). Sodium nitrite in processed meat and poultry meats: a review of curing and examining the risk and benefit of its use. *White Paper, Series No*, 3, 1-14.
- Sindelar, J. J., & Milkowski, A. L. (2012). Human safety controversies surrounding nitrate and nitrite in the diet. *Nitric Oxide*, 26(4), 259-266. doi:10.1016/j.niox.2012.03.011
- Sullivan, G. A., & Sebranek, J. G. (2012). Nitrosylation of myoglobin and nitrosation of cysteine by nitrite in a model system simulating meat curing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(7), 1748-1754. doi:10.1021/jf204717v
- Yang, Y., Huang, Z., & Li, L.-L. (2021). Advanced nitric oxide donors: chemical structure of NO drugs, NO nanomedicines and biomedical applications. *Nanoscale*, 13(2), 444-459. doi:10.1039/D0NR07484E
- Zhou, C., Wang, H., Chen, Y., & Chen, C. (2012). Effect of l-cysteine and lactose on color stability of porcine red blood cell during freeze-drying and powder storage. *Food Science and Biotechnology*, 21(3), 669-674. doi:10.1007/s10068-012-0087-0

ARTIGO 5

Artigo redigido conforme a norma do periódico

Food and Bioprocess Technology

Estudo da cinética de decomposição da solução e do pó liofilizado de S-nitroso-N-acetilcisteína para utilização como substituto de nitrito em produtos cárneos

Resumo

Recentemente os S-nitrosotióis têm recebido atenção crescente na área de alimentos como substituto total dos sais de nitrito em produtos cárneos. No entanto, sua aplicação industrial é limitada devido à alta instabilidade em soluções aquosas concentradas. Neste estudo, soluções de S-nitroso-N-acetilcisteína (NAC-SNO) em diferentes concentrações (200, 300 e 400 mM) foram estabilizadas, impregnadas em sal e liofilizadas (NAC-SNO_P). Avaliou-se a cinética de decomposição, das soluções a 4 °C e dos pós resultantes a diferentes temperaturas (-18 a 30 °C) de armazenamento, empregando-se equações diferenciais ordinárias de zero, primeira e segunda ordem. A decomposição do NAC-SNO seguiu uma reação de primeira ordem nas soluções não-estabilizadas e de ordem zero nas estabilizadas, com o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) aumentando de 1,1 para 9,9 dias e reduzindo em soluções mais concentradas. A decomposição do NAC-SNO_P apresentou melhor ajuste para o decaimento de segunda ordem, com energia de ativação média de 92 kJ/mol e Q_{10} de 4,0. A estabilidade dos pós aumentou com a concentração, com os valores de $t_{1/2}$ alcançando até 100 dias na maior concentração e em temperatura de refrigeração (2 °C). O processo de estabilização e obtenção de NAC-SNO_P em maiores concentrações e o seu armazenamento refrigerado ou congelado é uma estratégia de otimização interessante para o seu uso industrial, pois apresenta bom rendimento (cerca de 79%), estabilidade e praticidade de uso.

Palavras-chave: Nitrosotiol, estabilização, liofilização, concentração, temperatura.

Introdução

Os S-nitrosotióis (RSNO), também conhecidos como tionitritos, são uma classe de compostos amplamente estudada em sistemas biológicos devido à sua habilidade de carrear (“doar”) o óxido nítrico (NO). Esses compostos são de ocorrência natural em mamíferos, funcionando, principalmente, como sinalizadores de processos fisiológicos e fisiopatológicos

(Liu, Warner, Zhou & Zhang, 2018). *In vivo*, os carreadores de NO são aminoácidos ou peptídeos contendo o grupo tiol (R-SH), mas eles também podem ser sintetizados para uso farmacêutico, atuando como vasodilatadores (Yang, Huang & Li, 2021) ou no tratamento de doenças e intoxicações (Mathews & Kerr, 1993). Além disso, os RSNOs têm sido estudados na agricultura para melhorar a defesa e o crescimento das plantas (Seabra, Raj & Durán, 2014) e, recentemente, como potencial aditivo alimentar para substituir aos sais de cura (nitrito/nitrato) em produtos cárneos (Andrade et al., 2024a, 2024b; Shpaizer, Kanner & Tirosch, 2021).

Os sais de nitrito de sódio (INS 249) ou potássio (INS 250) e de nitrato de sódio (INS 251) ou potássio (INS252), são aditivos alimentares versáteis, utilizados como conservantes em diversos produtos cárneos. Além de garantirem a segurança microbiológica e prolongarem a vida útil, o nitrito desempenha outras funções importantes na matriz cárnea, atuando no controle de reações oxidativas e conferindo importantes características sensoriais (cor vermelho rósea, sabor e aroma) de produtos curados (Majou & Christieans, 2018). No entanto, o uso dos sais de cura em produtos cárneos tem sido questionado devido aos riscos oriundos da formação de compostos nitrosos (NOCs), alguns dos quais são mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos, como as N-nirosaminas (IARC, 2018), que se formam a partir de reações de N-nitrosação com aminas secundárias durante o processamento dos produtos e, principalmente, durante a digestão estomacal (de Mey et al., 2017).

A substituição total dos sais de nitrito em produtos cárneos é uma preocupação atual importante e desafiadora, pois o produto reformulado precisa manter as características sensoriais, microbiológicas e de estabilidade durante sua vida útil em relação ao produto convencional (Guimarães et al., 2022). Neste sentido, a proposta de substituição de nitrito por RSNOs é interessante por eles compartilharem o mesmo mecanismo de ação, *i.e.*, a geração de NO (Andrade et al., 2024c). Durante o processo de cura de carnes, o NO complexa com o ferro-heme do pigmento de mioglobina (Mb), resultando na formação dos pigmentos característicos dos produtos curados crus (nitrosomioglobina), de cor vermelho-rósea, e cozidos (nitroso hemocromo), de cor rósea (Honikel, 2008). A ligação do NO com o ferro também é responsável por retardar os processos oxidativos, ao inibir a sua atuação como catalizador, além de sequestrar espécies reativas de oxigênio (ROS), inibindo o início da oxidação lipídica (Jo et al., 2020). Por fim, o NO formado também possui ação bactericida pela complexação com o ferro das enzimas metabólicas de alguns microorganismos, como o *C. botulinum*, e/ou pela formação do oxidante peroxinitrito a partir da reação com superóxido, que possui potente efeito antimicrobiano (Majou & Christieans, 2018). Segundo Bryan et al.,

(2012), a entrega direta de NO reduz as reações paralelas durante a cura, por exemplo com aminas secundárias, favorecendo a S-nitrosilação em detrimento da N-nitrosilação, e assim, reduzindo ou inibindo a formação de N-nitrosaminas.

A adição de RSNOs em produtos cárneos proporcionou cor instrumental (Kanner & Juven, 1980; Andrade et al., 2024b), características sensoriais (Andrade et al. 2024a), proteção oxidativa (Andrade et al. 2024a, 2024b; Kanner & Juven, 1980), e atividade anticlostridial (Shpaizer, Kanner & Tirosh, 2021) similares ao nitrito, mas com a vantagem de serem muito menos reativos na formação de N-nitrosaminas (Shpaizer et al., 2018). Contudo, até o momento, os estudos de aplicação de RSNOs na elaboração de produtos cárneos têm sido restritos ao preparo e uso imediato de soluções em razão da decomposição espontânea desses compostos em meio aquoso, o que representa uma limitação significativa para o seu armazenamento e utilização como ingrediente na indústria alimentícia.

Os RSNOs podem ser sintetizados por meio de uma rápida e simples reação de S-nitrosação entre tióis e o nitrito de sódio em meio ácido (Williams, 1985). Geralmente, os RSNOs terciários e secundários são identificados pelas colorações verde e vermelha, respectivamente, podendo ser quantificados por espectrofotometria em comprimentos de ondas específicos (Williams, 1985). No entanto, a estabilidade das soluções de RSNOs é influenciada por fatores como concentração, pH, temperatura, luz, presença de íons metálicos (como o cobre) (de Souza Denadai, Picheth & de Oliveira, 2019) e a estrutura dos RSNOs (secundário ou terciário), além de sua conformação espacial (*sin* e *anti*) (Meyer et al., 2016). Na área farmacêutica, os principais RSNOs estudados incluem: S-nitroso-glutationa (Glu-SNO), S-nitroso-L-cisteína (Cys-SNO) e S-nitroso-N-acetil-L-cisteína (NAC-SNO), obtidos a partir da S-nitrosação dos compostos L-cisteína, glutatona e N-acetil-L-cisteína, respectivamente (Mathews & Kerr, 1993; Souza et al., 2019).

Portanto, devido à instabilidade das soluções aquosas de RSNOs, é necessário estabilizá-las para aumentar a sua vida de útil e possibilitar seu uso pela indústria alimentícia. Estudos cinéticos sobre a estabilidade de soluções de RSNOs tem sido conduzidos para aplicação farmacológica (de Souza Denadai, Picheth & de Oliveira, 2019), mas são soluções preparadas em concentrações (< 50 mM) muito menores do que as necessárias para uso em produtos cárneos. Além disso, a elaboração de RSNOs em pó é importante para a aplicação industrial, pois oferece várias vantagens em relação às soluções, como redução de peso das embalagens, maior estabilidade e prazo de validade, e maior facilidade de armazenamento, manuseio e transporte. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a degradação cinética de soluções e pós de NAC-SNO obtidos a partir da estabilização da solução, impregnação em

sal e liofilização, durante o armazenamento sob diferentes temperaturas. Os modelos cinéticos de decomposição podem ser usados como referência para armazenamento e a preservação deste novo agente de cura, ampliando as perspectivas para seu uso como ingrediente na indústria de alimentos.

Materiais e Métodos

Síntese e cinética da decomposição das soluções de NAC-SNO

O NAC-SNO foi sintetizado através da reação de S-nitrosação equimolar entre o tiol, N-acetil-L-cisteína (NAC; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e o nitrito de sódio (NaNO_2) em meio ácido ($\text{pH} = 1,0$) conforme descrito por [Andrade et al. \(2024b\)](#). Foram elaboradas três soluções com concentrações diferentes: S1 = 200 mM; S2 = 300 mM; e S3 = 400 mM. O NAC foi diluído em uma solução ácida (HCl 0.1 M) e adicionada de uma solução aquosa de nitrito de sódio (na proporção de 20:1) de forma que a mistura continha quantidades equimolares de NAC e nitrito. A mistura foi mantida sob agitação a 30 °C por 15 min, ao abrigo da luz, para permitir a reação de S-nitrosilação. A solução resultante (Figura 1A) foi estabilizada pela neutralização com hidróxido de sódio (NaOH) 1 M e adição de sais de fosfato, para a obtenção de tampão (0,09 M; pH 7.0), e de 0,1 % de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), para complexar com possíveis metais presentes ([Souza et al 2019](#)).

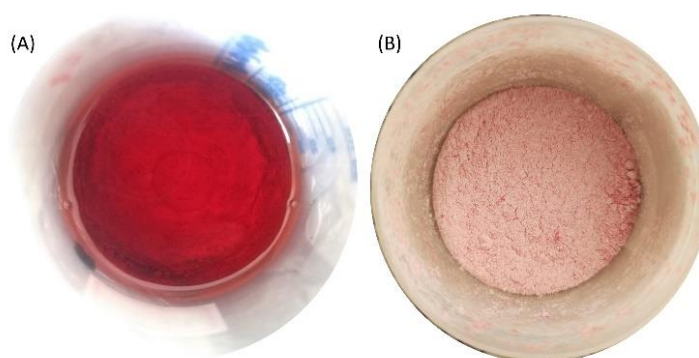


Figura 1. Representação da S-nitroso N-acetilcisteína (NAC-SNO; 300 mM) nas formas (A) em solução e (B) em pó.

As soluções aquosas (NAC-SNOs; $n = 3$) estabilizadas (S1, S2 e S3) e uma não estabilizada contendo 300mM (SN) foram armazenadas em frascos de vidro âmbar e mantidos ao brigo da luz em câmara climática (EL202; Eletrolab Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, Brasil) a 4°C. Para a quantificação do NAC-SNO as soluções foram coletadas ao longo de um

período de 30 dias de armazenamento, ou até que as soluções atingissem uma concentração de 1,0 mM. A amostragem foi conduzida a cada 1 dia, ou em um período maior quando observado uma lenta decomposição do composto. O frasco âmbar era aberto em cada tempo de análise para a coleta de uma alíquota padronizada (inicialmente de 10 uL) com pipeta volumétrica. As concentrações das soluções foram quantificadas por meio da leitura da absorvância (Genesys 10 UV; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA) a 330 nm e considerando um coeficiente de extinção molar (ϵ) de $727 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Mathews & Kerr, 1993). Quando necessário, uma diluição com água destilada foi realizada para a leitura na faixa de absorvância linear (entre 0,200 e 0,800).

Síntese, liofilização e cinética da decomposição do pó de NAC-SNO

Para obtenção do NAC-SNO em pó (NAC-SNO_P; n = 3), as soluções estabilizadas (S1, S2 e S3) foram sintetizadas conforme descrito previamente e impregnadas em sal cloreto de sódio (NaCl) na proporção de 2:1 (v/m). As misturas foram congeladas em ultrafreezer (REVCO, Asheville, EUA) a -70 °C e liofilizadas (Liobras-L101, São Carlos, Brasil) ao abrigo de luz. O tempo médio de liofilização das amostras foi de 72 h, sendo obtido pós com tonalidade ligeiramente rosadas (Figura 1B).

As amostras liofilizadas (P1, P2 e P3) foram maceradas em gral e pistilo, acondicionadas em frascos de *Eppendorfs* e distribuídas aleatoriamente em câmaras climáticas (EL202/3, EL202/4; Eletrolab Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, Brasil) e em freezer vertical (Electrolux Cycle Defrost 162L) para o armazenamento nas temperaturas -18, 2, 7, 15 e 30 °C. A quantificação do NAC-SNO_P foi realizada em um período de 50 dias de armazenamento ou até a concentração atingir 1 mg/g. A amostragem foi conduzida inicialmente a cada 1 dia, aumentando o período quando observado uma lenta decomposição do composto. Um *Eppendorf* foi aberto para cada tempo de análise, sendo o NAC-SNO_P (~ 100 mg) solubilizado em volume conhecido de água destilada para sua quantificação espectrofotométrica ($\lambda = 330 \text{ nm}$; $\epsilon = 727 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Modelagem estatística

Os dados cinéticos de decomposição do NAC-SNO_S, estabilizadas (S1, S2 e S3) e não estabilizadas (SN), e NAC-SNO_P (P1, P2 e P3) foram avaliados ajustando-os às reações de ordem zero (Eq.1) e de primeira (Eq.2) e segunda ordens (Eq.3). As constantes de velocidade de reação (k) foram calculadas utilizando regressão linear.

$$A = A_0 - kt \quad (1)$$

$$\ln\left(\frac{A}{A_0}\right) = -kt \quad (2)$$

$$\left(\frac{1}{A}\right) = \left(\frac{1}{A_0}\right) + kt \quad (3)$$

em que A é a concentração da substância após o tempo t , A_0 é a concentração inicial da substância, k é a constante de velocidade de reação, e t é o tempo.

O modelo e a constante k mais adequados aos dados experimentais foram selecionados utilizando o Coeficiente de Determinação (R^2) e a Raiz do Erro Médio Quadrático (*Root mean square error*; RMSE; Eq.4). A partir do modelo com melhor ajuste, o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) foi calculado como o tempo em que a concentração do NAC-SNO foi reduzida em 50% em relação à concentração inicial. Para o NAC-SNO_P, a extrapolação dos dados foi realizada para calcular $t_{1/2}$ superiores ao tempo de armazenamento avaliado (50 dias).

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_i^N (y_{exp,i} - y_{pred,i})^2} \quad (4)$$

em que $y_{exp,i}$ é o valor experimental, $y_{pre,i}$ é o valor predito para cada modelo linearizado, e N é o número total de dados.

Para avaliar o efeito da temperatura sobre a constante de velocidade (k) da reação de degradação do NAC-SNO_P, a energia de ativação (E_a), necessária para a clivagem térmica da ligação simples (S-NO), foi determinada por regressão linear a partir da equação linearizada de *Arrhenius* (Eq.5).

$$\ln(k) = -\frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right) + \ln(k_0) \quad (5)$$

em que E_a é a energia de ativação (kJ/mol), R é a constante universal dos gases ($8,314 \times 10^{-3}$ kJ. mol⁻¹.K⁻¹), T é a temperatura absoluta final (K), T_0 é a temperatura absoluta de referência (K), k é a constante de velocidade da reação e k_0 é o fator pré-exponencial.

O fator de aceleração da temperatura (Q_{10}), que corresponde ao valor de multiplicação ou divisão da taxa de degradação quando a temperatura aumenta ou reduz, significativamente em dez graus, foi determinado pela Equação 6.

$$Q_{10} = 10^{\left(\frac{E_a}{1,93 \times T^2}\right)} \quad (6)$$

em que E_a é a energia de ativação (kJ/mol) e T é o valor da temperatura média estudada (K).

Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software SAS® System for Windows™*, versão 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC). A média e o desvio padrão dos parâmetros cinéticos (k , $t_{1/2}$, E_a e Q_{10}) foram calculados a partir de três medidas independentes (repetições) das curvas de decomposição do NAC-SNO.

Resultados e Discussão

Cinética da decomposição das soluções de NAC-SNO

A reação de decomposição das soluções de NAC-SNO foi estudada monitorando a sua concentração em relação a concentração inicial ao longo do tempo. As NAC-SNOs apresentaram melhor ajuste dos dados de decomposição (maior R^2 e pequenos RSME) ao modelo cinético de reação de primeira ordem para a solução não estabilizada (SN) e de ordem zero para as soluções estabilizadas (S1, S2 e S3) (Tabela 1). A ordem da reação indica como matematicamente a velocidade da reação é ou não afetada pela concentração de um ou mais reagentes. A mudança de comportamento cinético entre as soluções estabilizadas e a SN sugere que a estabilização foi capaz de alterar o mecanismo de decomposição, reduzindo a dependência direta da concentração.

As curvas de concentração de NAC-SNOs pelo tempo de armazenamento foram ajustadas por equações de decaimento de ordem zero e de primeira ordem (Figura 2) e os tempos de meia-vida ($t_{1/2}$) correspondentes foram calculados. A velocidade da reação (k) de ordem zero das soluções estabilizada e de primeira ordem da decomposição da solução não-estabilizada (SN; 300 mM) reduziu, respectivamente, 3,58 e 3,72 vezes quando comparada à solução de mesma concentração estabilizada (S2). Desse modo, o $t_{1/2}$ aumentou 9 vezes (de 1,1 para 9,9 dias) com o processo de estabilização.

Tabela 1. Parâmetros cinéticos da decomposição das soluções não estabilizada (SN) e estabilizadas¹ (S1, S2 e S3) de S-nitroso-N-acetilcisteína (NAC-SNO) armazenadas ao abrigo de luz em temperatura de 4 °C.

Modelo	Solução	<i>k</i>	R ²	RSME	t _{1/2} (dias)
Ordem Zero	SN	9,9051	0,88	10,05	
	S1	1,0562	0,94	1,68	17,0
	S2	2,7667	0,94	0,38	9,9
	S3	9,4115	0,95	0,12	5,4
Primeira Ordem	SN	0,6239	0,94	0,21	1,1
	S1	0,0763	0,79	3,68	
	S2	0,1677	0,91	0,31	
	S3	0,3235	0,73	0,14	
Segunda Ordem	SN	0,0970	0,64	0,16	
	S1	0,0106	0,41	6,12	
	S2	0,0253	0,60	0,46	
	S3	0,0526	0,42	0,16	

SN = 300 mM; S1 = 200 mM; S2 = 300 mM; S3 = 400 mM; *k* = constante de velocidade da reação de zero (mM/dia), primeira (/dia) e segunda (/mM×dia) ordem; R² = coeficiente de determinação; RSME = raiz do erro médio quadrático (RMSE); e t_{1/2} = tempo de meia vida.

¹Estabilizada pela neutralização com solução NaOH 1 M e adição de sais de fosfato (0,09 M; pH 7,0) e 0,1% EDTA.

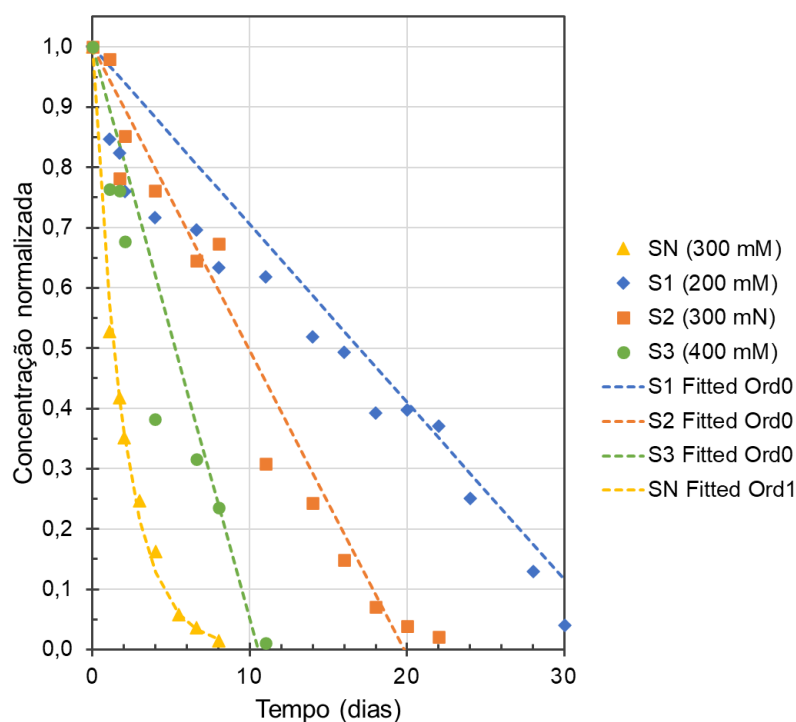


Figura 2. Curvas cinéticas de ordem zero (Ord0) e de primeira ordem (Ord1) da decomposição das soluções de S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) não-estabilizadas (SN) e estabilizadas (S1, S2 e S3) durante o armazenamento ao abrigo de luz à temperatura de 4 °C.

Ao avaliar o efeito do pH sobre as soluções 1 mM de Glu-SNO e NAC-SNO, [Souza et al. \(2017\)](#) verificaram que a decomposição dos RSNOs tende a ser favorecida em valores de pH inferior a 5,0 ou superior a 9,0, com maior estabilidade em pH próximo ao neutro. Embora nesse estudo tenha sido avaliada concentrações extremamente maiores, resultados semelhantes foram encontrados, sugerindo fortemente a necessidade de ajuste de pH para próximo ao neutro após a reação de S-nitrosação. Nas soluções SN, os valores de pH final foram próximos a 2,0, o que é necessário para o processo de síntese. Ao longo do armazenamento, as soluções de RSNOs tendem a se acidificar devido a decomposição em óxido nítrico (NO) e formação de ácido nítrico (HNO₂). Ademais, a adição de EDTA pode ter atuado de forma sinérgica como complexante de íons metálicos, como o Cu⁺ e Hg⁺², espécies já reconhecidas como capazes de catalisar a decomposição dos RSNOs ([Li et al., 2022](#)).

Nas soluções estabilizadas, foi verificado um aumento de k com o aumento da concentração de NAC-SNO (Tabela 1). Considerando o decaimento de ordem zero, o aumento na concentração de NAC-SNO de 200 mM (S1) para 400 mM (S3) proporcionou um aumento de 8,91 vezes em k . Comportamento similar foi relatado por [Souza et al. \(2017\)](#) que observaram que concentrações mais diluídas de soluções estabilizadas de Glu-SNO e NAC-

SNO (1 a 50 mM) eram muito mais estáveis durante o armazenamento a 25 °C que as soluções mais concentradas. Segundo estes autores, a concentração inicial de RSNOs influencia o mecanismo e, conseqüentemente, a velocidade da reação de decomposição, sendo que a via principal de decomposição é a clivagem homolítica espontânea da ligação S-N em pequenas concentrações iniciais. Já em soluções mais concentradas, o mecanismo preferencial é o de autocatálise, *i.e.*, o radical tiil (R-S•) formado atua como o catalisador da reação de decomposição de outros RSNOs intactos, gerando dímeros (R-S-S-R) e óxido nítrico (NO). Alguns trabalhos de química medicinal têm sugerido que o aumento da viscosidade das soluções de RSNOs (Yoder et al., 2001; Braden et al, 2001) ou a incorporação dos RSNOs em matrizes sólidas (Seabra & de Souza 2004) podem reduzir a sua taxa de decomposição por autocatálise.

Embora as concentrações avaliadas neste estudo sejam muito superiores (4 a 8 vezes) à concentração máxima (50 mM; $k = 0,325/\text{dia}$) de NAC-SNO monitorada por Souza et al. (2017), menores valores de k foram encontrados nas soluções estabilizadas, o que pode ser atribuído à adição de estabilizantes associada à menor temperatura de armazenamento (4 °C vs 25 °C) utilizada. Um aumento significativo na taxa de decomposição dos RSNOs é observado com o aumento da temperatura de armazenamento devido ao aumento da energia térmica disponível no sistema (Melvin et al. 2019; de Souza et al., 2017). Além da temperatura, o processo de decomposição de RSNOs pode ser influenciado por diferentes mecanismos dependendo das condições presentes, como a estrutura química específica da espécie avaliada, concentração, pH, presença de catalizadores, luz e oxigênio (Dorado et al. 2015).

Cinética da decomposição do pó de NAC-SNO

A liofilização das soluções estabilizadas impregnadas em sal gerou pós (NAC-SNO_P) que continham $38,42 \pm 0,98$ mg (P1), $71,73 \pm 0,99$ mg (P2) e $109,49 \pm 4,09$ mg (P3) de NAC-SNO/g. Desse modo, a decomposição do NAC-SNO durante o processo proporcionou um rendimento médio de aproximadamente 79%.

O melhor ajuste de modelo cinético (maior R^2 e menor RSME) observado para os NAC-SNO_P foi para a reação de segunda ordem (Tabela 2), com menores valores de k encontrados na menor temperatura avaliada (-18 °C). Conforme esperado, um aumento nos valores de k foi verificado com o aumento da temperatura de armazenamento (até 30 °C), *i.e.*, há aumento na estabilidade com a diminuição da temperatura de armazenamento.

Tabela 2. Parâmetros cinéticos da decomposição da S-nitroso-N-acetilcisteína (NAC-SNO) estabilizada¹ e impregnada em sal (NAC-SNO) em diferentes concentrações (P1, P2 e P3), armazenadas ao abrigo de luz em diferentes temperaturas.

Modelo	Temp (°C)	P1 (38 mg SNAC/g)			P2 (72 mg SNAC/g)			P3 (110 mg SNAC/g)		
		<i>k</i>	R ²	RSME	<i>k</i>	R ²	RSME	<i>k</i>	R ²	RSME
Ordem Zero	-18	0,1755	0,51	2,76	0,2633	0,62	3,22	0,2031	0,43	3,67
	2	0,3460	0,69	4,02	0,6125	0,84	5,68	0,6623	0,78	6,48
	7	0,5600	0,63	4,45	1,5779	0,92	4,76	0,9462	0,57	11,72
	15	0,4388	0,49	4,55	0,8492	0,49	9,05	1,5648	0,76	9,89
	30	2,8107	0,88	0,56	2,7259	0,85	0,87	10,2283	0,90	3,19
Primeira Ordem	-18	0,0058	0,56	0,08	0,0043	0,64	0,05	0,0020	0,43	0,04
	2	0,0266	0,77	0,25	0,0139	0,89	0,11	0,0079	0,80	0,07
	7	0,0622	0,88	0,23	0,0689	0,94	0,18	0,0138	0,61	0,15
	15	0,0726	0,75	0,42	0,0447	0,69	0,33	0,0270	0,87	0,13
	30	0,8141	0,96	0,07	0,3189	0,83	0,10	0,4851	0,95	0,09
Segunda Ordem	-18	0,0002	0,61	<0,01	0,0001	0,66	<0,01	0,0000	0,43	<0,01
	2	0,0024	0,79	0,02	0,0003	0,92	<0,01	0,0001	0,81	<0,01
	7	0,0097	0,97	0,02	0,0051	0,80	0,03	0,0002	0,64	<0,01
	15	0,0184	0,93	0,05	0,0030	0,86	0,01	0,0005	0,94	<0,01
	30	0,2839	0,98	0,02	0,0404	0,80	0,01	0,0262	0,95	0,01

k = constante de velocidade da reação de zero (mg/g×dia), primeira (/dia) e segunda (g/mg×dia) ordem; R² = coeficiente de determinação; e RSME = raiz do erro médio quadrático (RMSE).

¹Estabilizada pela neutralização com solução NaOH 1 M e adição de sais de fosfato (0,09 M; pH 7,0) e 0,1% EDTA.

Resultados similares foram relatados para as soluções de RSNOs (Souza et al., 2017; Melvin et al., 2019). As reações químicas podem ser entendidas pela teoria das colisões, que parte do princípio de que é necessário que as moléculas colidam entre si de forma efetiva para haver uma reação. A eficiência das colisões pode ser afetada pela frequência de colisões, a orientação adequada entre as moléculas e a energia no momento da colisão. Logo, o aumento da temperatura aumenta a energia cinética das moléculas e, conseqüentemente, aumenta a probabilidade de ocorrência de colisões efetivas (Koga et al., 2023). De nosso conhecimento, um estudo cinético de estabilidade de RSNOs em pó não foi relatado na literatura até o momento.

As curvas de concentração de NAC-SNO_P pelo tempo de armazenamento foram ajustadas por equações de decaimento de segunda ordem (Figura 3). Ao contrário do observado para as soluções, houve um aumento nos valores de k nos modelos de primeira e de segunda ordens com a diminuição da concentração de NAC-SNO impregnado no sal, independentemente da temperatura de armazenamento (Tabela 2). Uma reação entre reagentes em diferentes estados físicos é naturalmente diferente. De uma maneira geral, é esperado que as reações em sólidos sejam mais lentas em relação àquelas em solução, pois as moléculas têm menor mobilidade e energia cinética. Além disso, os sólidos possuem menor superfície de contato disponível para reação e, logo, a reação é limitada à sua superfície, enquanto em solução a presença do solvente tende a facilitar as colisões e aumentar a taxa de reações porque os reagentes podem interagir em toda a extensão do líquido. Ainda, o efeito de adsorção do NAC-SNO ao cloreto de sódio (NaCl) também pode ter contribuído positivamente para a estabilidade, reduzindo a disponibilidade do NAC-SNO para reação. De acordo com Dorado et al. (2015), o processo de decomposição de RSNOs pode ocorrer via diferentes mecanismos a depender da estrutura química e concentração da espécie avaliada e das condições presentes, como temperatura, pH e da presença de catalizadores, como luz, oxigênio e metais. Além disso, algumas espécies iônicas em solução também podem interferir na estabilidade da solução (DeMaster, Quust and Mitchell, 1997).

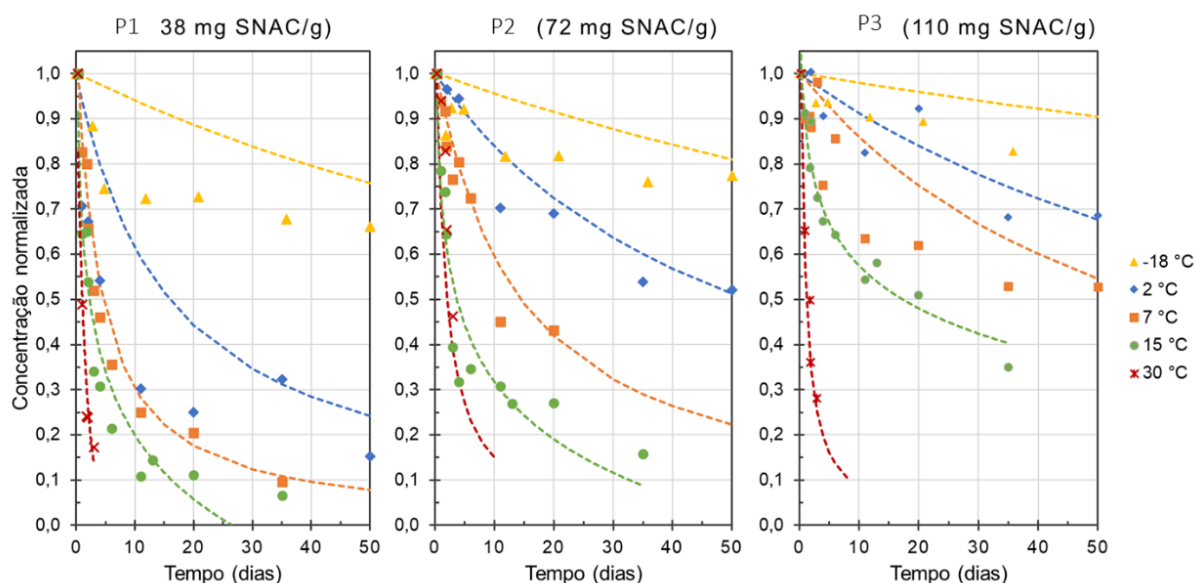


Figura 3. Curvas cinéticas de segunda ordem da decomposição do S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) impregnado em sal (SNACp) em diferentes concentrações (P1, P2 e P3) durante o armazenamento ao abrigo da luz em diferentes temperaturas.

As curvas de concentração de SNACp pelo tempo de armazenamento foram ajustadas por equações de decaimento de primeira ordem (Figura 3). Por outro lado, ao contrário do observado para as soluções, houve um aumento nos valores de k nos modelos de primeira e de segunda ordens com a diminuição da concentração de NAC-SNO impregnado no sal, independentemente da temperatura de armazenamento (Tabela 2). De acordo com [Dorado et al. \(2015\)](#), o processo de decomposição de RSNOs pode ocorrer via diferentes mecanismos a depender da estrutura química e concentração da espécie avaliada e das condições presentes, como temperatura, pH e da presença de catalizadores, como luz, oxigênio e metais. Além disso, algumas espécies iônicas em solução também podem interferir na estabilidade da solução ([DeMaster, Quust and Mitchell, 1997](#)).

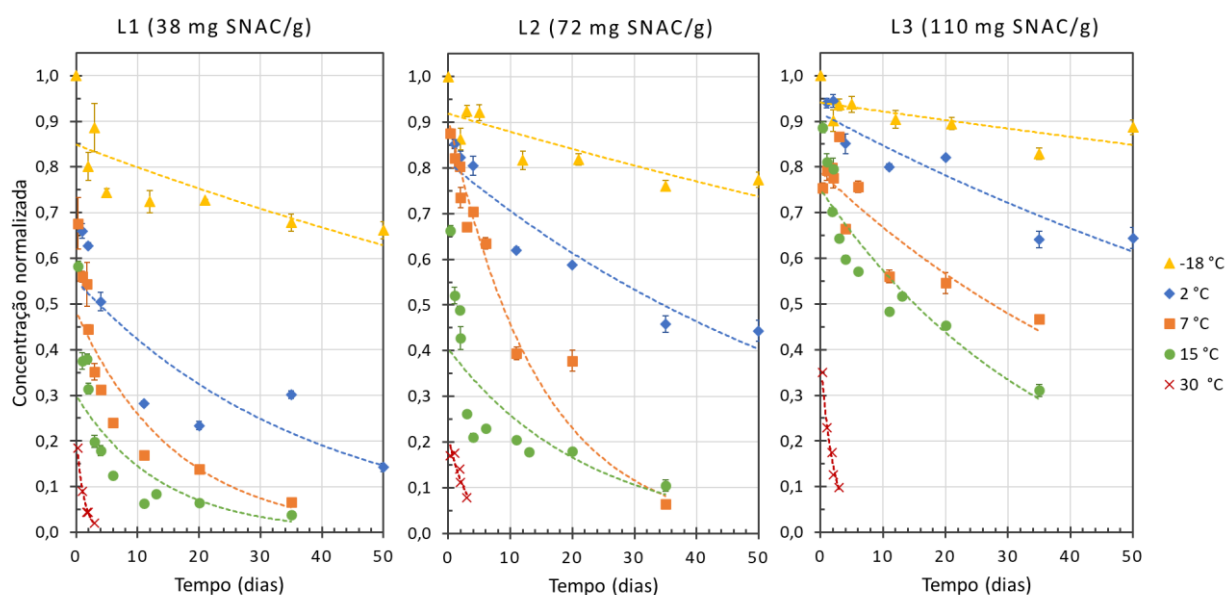


Figura 3. Curvas cinéticas de primeira ordem da decomposição do S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) impregnado em sal (SNACp) em diferentes concentrações (P1, P2 e P3) durante o armazenamento ao abrigo da luz em diferentes temperaturas.

Embora a secagem possa favorecer a estabilidade do composto alvo por controlar interações químicas, ela favorece a exposição deste ao oxigênio (não removido durante o armazenamento neste experimento), pelo que se acredita que a decomposição do NAC-SNO_P tenha ocorrido predominantemente via oxidação intermediada pelo oxigênio molecular. De acordo com [Zhang et al. \(2017\)](#) os RSNOs primários e secundários possuem baixa estabilidade em condições aeróbicas, sendo a extensão da decomposição dependente da concentração de oxigênio. Ainda segundo esses autores, o mecanismo de decomposição pode ser compreendido pela cisão homolítica da ligação S-NO, seguida pela reação do radical NO com o oxigênio, formando o anidrido nitroso (N₂O₃), espécie de alto poder oxidante responsável pela decomposição do RSNO. Na presença de N₂O₃, o íon cloreto (Cl⁻) pode formar um composto nitrosado intermediário (CINO), que pode ser hidrolisado a nitrito (NO₂⁻) ou, ainda, nitrosar o grupo tiol ([DeMaster, Quust and Mitchell, 1997](#)), propagando a oxidação do NAC-SNO.

Além disso, como cada frasco *Eppendorf* foi aberto apenas uma única vez no dia da análise, a quantidade de oxigênio provavelmente foi a mesma em todos os casos, variando a concentração de NAC-SNO_P em cada frasco. Assim, para maiores concentrações de NAC-SNO, o oxigênio foi o reagente limitante da reação de oxidação durante a degradação do composto. Isso, aliado a menor exposição dos NAC-SNO_P mais concentrados, poderia acarretar sua menor decomposição por oxidação, observada pelos seus menores valores de *k*,

e, logo, em sua maior estabilidade. Assim, é possível sugerir o uso de uma atmosfera inerte (como vácuo ou nitrogênio) durante a estabilização e o armazenamento dos NAC-SNO_P pode ser uma estratégia para reduzir ainda mais a sua decomposição e aumentar a sua estabilidade.

Uma menor decomposição do NAC-SNO foi observada em pós mais concentrados, resultado em maiores $t_{1/2}$ (Tabela 3). De forma geral, considerando uma reação de segunda ordem e a extrapolação do intervalo de tempo avaliado (50 dias), os valores de $t_{1/2}$ do NAC-SNO_P foram menores que 20 dias no armazenamento em temperaturas acima da refrigeração (15 e 30 °C), o que pode ser considerado como limitado para aplicação industrial; com a diminuição para temperaturas de refrigeração, os $t_{1/2}$ dos pós aumentaram para cerca de 53 (P2 a 2 °C e P3 a 7 °C) e 101 (P3 a 2 °C) dias; na temperatura de congelamento (-18 °C), os $t_{1/2}$ estimados foram maiores do que 142 dias, sendo o maior tempo observado na maior concentração de NAC-SNO_P (P3).

A energia de ativação (E_a) é a energia mínima necessária para que a reação aconteça e foi calculada com valores de 84 a 96 kJ/mol (13 a 17 kcal/mol), para o modelo de segunda ordem na faixa de temperatura avaliada (-18 a 30 °C). Esses valores são menores, mas próximos ao encontrado para as soluções com concentrações iguais ou menores que 50 mM de NAC-SNO (22 kcal/mol) relatadas por [de Souza et al. \(2019\)](#). De acordo com [Stamler & Toone \(2002\)](#), os RSNOs possuem energias de dissociação de ligações homolíticas na faixa de 20 a 32 kcal/mol, em condições em que a luz e a presença de oxigênio são excluídas. Logo, os menores valores encontrados podem estar associados as condições deste experimento, como a maior concentração avaliada e a presença de oxigênio, ainda que em baixas concentrações.

A energia de ativação obtida para os diferentes valores de concentração de NAC-SNO_P não apresentou relação direta com a concentração. Houve apenas uma variação em torno de 10% entre os valores extremos obtidos, com um valor médio de 92,3 kJ/mol para a reação de segunda ordem. Assim como a energia de ativação, o valor de Q_{10} variou pouco entre os NAC-SNO_P, sendo o valor médio igual a 4,0. Esse elevado valor de Q_{10} também demonstra a importância da redução da temperatura para a redução da velocidade de degradação do NAC-SNO_P e, logo, a obtenção de maior estabilidade.

Tabela 3. Médias e desvio padrão¹ do tempo de meia vida ($t_{1/2}$), da energia de ativação (E_A) e do fator de aceleração da temperatura (Q_{10}) estimadas (modelo de segunda ordem) para a decomposição da S-nitroso-N-acetilcisteína impregnada em sal (NAC-SNO_p) em diferentes concentrações (P1, P2 e P3) e armazenada ao abrigo da luz em diferentes temperaturas (TEMP).

TEMP (°C)	P1 (38 mg NAC-SNO/g)			P2 (72 mg NAC-SNO/g)			P3 (110 mg NAC-SNO/g)		
	$t_{1/2}$ (dias)	E_A (kJ/mol)	Q_{10}	$t_{1/2}$ (dias)	E_A (kJ/mol)	Q_{10}	$t_{1/2}$ (dias)	E_A (kJ/mol)	Q_{10}
-18	142,84±11,06	96,1 ± 2,1	4,3 ± 0,1	265,69±47,6	83,7 ± 4,7	3,6 ± 0,3	520,57±218,3	91,0 ± 7,0	4,0 ± 0,4
2	11,54±1,34	(R ² = 0,96)		56,75±10,37	(R ² = 0,88)		101,67±10,63	(R ² = 0,85)	
7	2,88±0,21			3,62±0,49			49±14,61		
15	1,54±0,20			6,37±1,43			19,2±0,86		
30	0,1±0,01			0,57±0,36			0,38±0,09		

$t_{1/2}$ = Tempo de meia-vida; E_A = Energia de ativação; e Q_{10} = Fator aceleração da temperatura.

¹ Calculados pela extrapolação dos dados quando o $t_{1/2}$ foi superior ao tempo de armazenamento de 50 dias avaliado.

Conclusão

A estabilização das soluções de NAC-SNO induziu um aumento no tempo de meia vida de nove vezes em comparação com as soluções não-estabilizadas, aumentando para 100 vezes quando da liofilização e impregnação em pó. Além disso, o efeito da concentração na decomposição do NAC-SNO dependeu do seu estado físico, sendo favorecido em concentrações maiores quando em solução e desfavorecido quando em pó. Os modelos cinéticos de decomposição obtidos neste estudo podem ser usados como referência para armazenamento e a preservação do NAC-SNO. Pelos resultados, o processo de estabilização e obtenção de NAC-SNO em pó é uma estratégia de otimização interessante para o seu uso industrial, pois apresenta bom rendimento, estabilidade e praticidade de uso. Ainda, o uso de concentrações maiores de NAC-SNO na impregnação em sal e o seu armazenamento congelado são sugeridos para se alcançar maior estabilidade.

References

- Andrade, B. F., do Carmo, L. R., de Moura, A. P. R., Souza Ramos, A. d. L., & Ramos, E. M. (2024a). Sensory profile and color and oxidative stabilities of sliced restructured cooked hams with added S-nitroso-N-acetylcysteine as a nitrite replacement. *Food and Humanity*, 100446. <https://doi.org/10.1016/j.foohum.2024.100446>.
- Andrade, B. F., Guimarães, A. S., do Carmo, L. R., Tanaka, M. S., Fontes, P. R., Ramos, A. d. L. S., et al. (2024b). S-nitrosothiols as nitrite alternatives: Effects on residual nitrite, lipid oxidation, volatile profile, and cured color of restructured cooked ham. *Meat Science*, 209, 109397. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2023.109397>.
- Andrade, B. F., Rodrigues, L. M., Tanaka, M. S., Torres Filho, R. A., Ramos, E. M., & Ramos, A. L. (2024c). Non-thermal technology perspectives to the reduction or substitution of nitrite in meat products. *Food Technology and Biotechnology*, (submitted to publication).
- Bryan, N. S., Alexander, D. D., Coughlin, J. R., Milkowski, A. L., & Boffetta, P. (2012). Ingested nitrate and nitrite and stomach cancer risk: An updated review. *Food and Chemical Toxicology*, 50(10), 3646–3665. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.07.062>
- de Mey, E., de Maere, H., Paelinck, H., & Fraeye, I. (2017). Volatile N-nitrosamines in meat products: Potential precursors, influence of processing, and mitigation strategies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(13), 2909–2923.

- <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1078769>
- de Souza, G. F. P., Denadai, J. P., Picheth, G. F., & de Oliveira, M. G. (2019). Long-term decomposition of aqueous S-nitrosoglutathione and S-nitroso-N-acetylcysteine: Influence of concentration, temperature, pH and light. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 84(October 2018), 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.01.002>
- Honikel, K. O. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Science*, 78(1–2), 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.05.030>
- Hornýák, I., Marosi, K., Kiss, L., Gróf, P., & Lacza, Z. (2012). Increased stability of S-nitrosothiol solutions via pH modulations. *Free Radical Research*, 46(2), 214–225. <https://doi.org/10.3109/10715762.2011.647692>
- IARC (2018). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. In *Red Meat and Processed Meat* (Vol. 114). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- Jo, K., Lee, S., Yong, H. I., Choi, Y.-S., & Jung, S. (2020). Nitrite sources for cured meat products. *LWT - Food Science and Technology*, 129, 109583. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109583>.
- Kanner, J., & Juven, J. (1980). S-nitrosocysteine as an antioxidant, color-developing, and anticlostridial agent in comminuted turkey meat. *Basic Science*, 45.
- Kanner, J., Shpaizer, A., Nelgas, L., & Tirosh, O. (2019). S-Nitroso- N-acetylcysteine (NAC-SNO) as an Antioxidant in Cured Meat and Stomach Medium [Research-article]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(39), 10930–10936. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03741>
- Li, W., Wang, D., Lao, K. U., & Wang, X. (2022). Buffer concentration dramatically affects the stability of S-nitrosothiols in aqueous solutions. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 118(November 2021), 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2021.11.002>
- Liu, R., Warner, R. D., Zhou, G., & Zhang, W. (2018). Contribution of nitric oxide and protein S-nitrosylation to variation in fresh meat quality. *Meat Science*, 144(April), 135–148. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.04.027>
- Majou, D., & Christieans, S. (2018). Mechanisms of the bactericidal effects of nitrate and nitrite in cured meats. *Meat Science*, 145(December 2017), 273–284. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.06.013>
- Mathews, W. R., & Kerr, S. W. (1993). Biological activity of S-nitrosothiols: The role of nitric oxide. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 267(3), 1529–1537.
- Melvin, A. C., Jones, W. M., Lutzke, A., Allison, C. L., & Reynolds, M. M. (2019). S-

- Nitrosoglutathione exhibits greater stability than S-nitroso-N-acetylpenicillamine under common laboratory conditions: A comparative stability study. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 92(April), 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.08.002>
- Meyer, B., Genoni, A., Boudier, A., Leroy, P., & Ruiz-Lopez, M. F. (2016). Structure and Stability Studies of Pharmacologically Relevant S-Nitrosothiols: A Theoretical Approach. *Journal of Physical Chemistry A*, 120(24), 4191–4200. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.6b02230>
- Seabra, A. B., Rai, M., & Durán, N. (2014). Nano carriers for nitric oxide delivery and its potential applications in plant physiological process: A mini review. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 23, 1-10. <https://doi.org/10.1007/s13562-013-0204-z>
- Shpaizer, A., Kanner, J., & Tirosh, O. (2021). S -Nitroso- N -acetylcysteine (NAC-SNO) vs. nitrite as an anti-clostridial additive for meat products. *Food and Function*, 12(5), 2012–2019. <https://doi.org/10.1039/d0fo02839h>
- Shpaizer, A., Nussinovich, A., Kanner, J., & Tirosh, O. (2018). S-Nitroso-N-acetylcysteine generates less carcinogenic N-Nitrosamines in meat products than nitrite. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, 11459–11467. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04549>
- Sindelar, J. J., & Milkowski, A. L. (2011). Sodium Nitrite in Processed Meat and Poultry Meats: A Review of Curing and Examining the Risk/Benefit of Its Use. *American meat science association white paper series*, 3, 1–15.
- Thresher, A., Foster, R., Ponting, D. J., Stalford, S. A., Tennant, R. E., & Thomas, R. (2020). Are all nitrosamines concerning? A review of mutagenicity and carcinogenicity data. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 116(August), 104749. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2020.104749>
- Williams, D. L. H. (1985). S-nitrosation and the reactions of S-nitroso compounds. *Chemical Society Reviews*, 14(2), 171–196. <https://doi.org/10.1039/CS9851400171>
- Yang, Y., Huang, Z., & Li, L. L. (2021). Advanced nitric oxide donors: Chemical structure of NO drugs, NO nanomedicines and biomedical applications. *Nanoscale*, 13(2), 444–459. <https://doi.org/10.1039/d0nr07484e>

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ambos os RSNOs avaliados, S-nitroso n-acetil cisteína (NAC-SNO) e S-nitroso n-acetilcisteína etil éster (NACET-SNO), são fortes candidatos à substituição total de nitrito de sódio em apesuntados, contudo o NAC-SNO é mais facilmente obtido. Adições iguais ou superiores a 50 mg NEq/kg de RSNOs é capaz de gerar características de cor, atividade antioxidante e perfil de compostos voláteis similares ao observado para os adicionados de nitrito de sódio adicionado nas mesmas concentrações em apesuntados. Contudo, foi verificado que para garantir a estabilidade das características tecnológicas durante o armazenamento de 60 dias é necessária a adição de concentrações iguais ou superiores e 150 mg NEq/kg, sendo o nitrito de sódio ligeiramente mais eficaz no controle da oxidação lipídica. A adição de NAC-SNO afetou positivamente a aceitação sensorial dos consumidores, intensificando o aroma e sabor característico.

O baixo teor de nitrito residual encontrado nos apesuntados adicionados de RSNOs foram independentes do seu nível de adição, sugerindo que esses produtos apresentem menor conteúdo de nitrosaminas. Contudo estudos são necessários para avaliar essa hipótese, visto que os RSNOs também apresentam potencial de nitrosação. Estudos avaliando o efeito desses compostos na estabilidade microbiana e ação no controle de *Clostridium botulinum* ainda devem ser avaliados. Esse trabalho fornece importantes parâmetros tecnológicos para o direcionar o uso dos RSNOs em apesuntados. Contudo, devido a grande extensão de produtos cárneos, suas particularidades de formulação e de processamento, se faz importante a avaliação dos RSNOs em produtos inteiros, emulsionados, fermentados e defumados.

A estabilização da solução e obtenção do NAC-SNO sólido proposta é uma estratégia eficaz para retardar a decomposição desses compostos, prolongando o tempo de meia vida de cerca de um dia para 17 meses em baixas temperaturas (-18 e 2 °C) na maior concentração avaliada. Logo, essa proposta viabiliza e otimiza aplicação desses compostos para distribuição e aplicação industrial.