

## Ocorrência de nitratos e nitritos em queijos Minas Frescal, Mussarela, Parmesão e Prato

### Occurrence of nitrate and nitrite in cheeses Minas Frescal, Mozzarella, Parmesan and Prato

RIALA6/1363

Janilson Fernandes GONÇALVES<sup>1</sup>, Wemerson de Castro OLIVEIRA<sup>2</sup>, Claudia Aparecida de Oliveira e SILVA<sup>3\*</sup>, Mariem Rodrigues Ribeiro CUNHA<sup>3</sup>, Flavio Rodrigues PEREIRA<sup>3</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>3</sup>Serviço de Química, Divisão de Vigilância Sanitária, Instituto Octávio Magalhães, Fundação Ezequiel Dias, Rua Conde Pereira Carneiro, 80, Gameleira, Belo Horizonte/MG, Brasil. CEP 30510-010. Tel.: 31 3371-9471 / 31 9988-5042. E-mail: claudia.aparecida@funed.mg.gov.br e claudiaufv@yahoo.com.br.

<sup>1</sup>Instituto Metodista Izabela Hendrix

<sup>2</sup>Universidade Federal de Viçosa

Recebido: 08.11.2010 – Aceito para publicação: 17.05.2011

#### RESUMO

Neste trabalho foram avaliados os teores de nitratos e nitritos em queijos expostos à venda no Estado de Minas Gerais em 2009. As análises qualitativas e quantitativas foram realizadas em 77 amostras de queijos: Minas Frescal, Mussarela, Parmesão e Prato, coletadas pela Vigilância Sanitária por meio de PROMAC – Programa de Monitoramento de Aditivos e Contaminantes. Do total de amostras de queijo Minas Frescal, 7% apresentaram não conformidade com a legislação brasileira, em função da presença de nitrato. Os teores de nitrato estavam acima do limite estabelecido pela legislação em 18% das amostras de queijo Parmesão. No queijo Prato foram encontradas 10% das amostras com teor de nitrato acima do limite máximo permitido. Todas as amostras de queijo Mussarela avaliadas estavam em conformidade com a legislação. Em todas as amostras de queijo analisadas neste estudo não houve ocorrência de nitrito.

**Palavras-chave.** lácteos, nitrosaminas, legislação, padrões de identidade.

#### ABSTRACT

The occurrence of nitrate and nitrite contents was assessed in cheeses marketed in the State of Minas Gerais in 2009. The qualitative and quantitative analyses were performed in 77 samples of four different types of cheeses: Minas Frescal, Mozzarella, Parmesan and Prato, which were collected by the Sanitary Surveillance through PROMAC – Food Additives and Contaminants Monitoring Program. Of the total cheese samples analyzed, 7% showed the presence of nitrate and being nonconformity with Brazilian legislation. In Parmesan cheese, 18% of samples showed the nitrate contents above the limit established by legislation. Nitrate levels above the allowed maximum limit were found in 10% of Prato cheese samples. All of Mozzarella cheese samples were in compliance with the legislation. None of the cheese samples analyzed in this study showed the presence of nitrite.

**Keywords.** milk, milk products, nitrosamines, legislation, standards of identity.

## INTRODUÇÃO

Sais de nitrato e nitrito são aditivos comumente utilizados em alimentos, desempenhando tanto a função de conservantes, evitando sua deterioração<sup>1,2</sup>, como a de antioxidantes de lipídeos e realçadores da cor. Dentre os diversos alimentos que contêm o nitrato como conservante, destacam-se os embutidos como: salsicha, linguiça, bacon, salame, presunto e mortadela<sup>3</sup>.

Nas indústrias de laticínios, os sais de nitrato são utilizados por possuírem ação inibidora sobre bactérias esporuladas do grupo butírico, especialmente *Clostridium butyricum* e *Clostridium tyrobutyricum*, principais responsáveis pelo estufamento tardio nos queijos. Estas bactérias, quando presentes no queijo, fermentam o lactato, produzindo na massa ácido butírico, gás carbônico e hidrogênio. Esses gases são responsáveis pela formação de olhaduras grandes e irregulares no interior dos queijos e pela formação de trincas na casca, provocando deformação, alteração do sabor e conseqüentemente prejuízos econômicos para a indústria<sup>4</sup>.

Uma vez que o grupo butírico é composto por microrganismos esporulados, o nitrito possui ação inibidora contra a germinação e o crescimento dos esporos. A inibição ocorre pelo acúmulo de peróxido de hidrogênio resultante da reação de formação de nitrosomioglobina<sup>1,2</sup>.

Segundo Furtado<sup>4</sup>, os resultados obtidos com o uso de sais de nitrato em queijos dependem do pH, teor de sal e umidade, além do nível de contaminação inicial do leite. O mesmo autor reporta que para a redução do nitrato para nitrito no queijo é necessária a ação da enzima xantina oxidase, a qual é inativada se o leite for aquecido a temperaturas superiores a 80 °C por 10 segundos. Entretanto, o uso desses sais ainda é uma necessidade tecnológica no Brasil, pois outros métodos que combatem o estufamento tardio não contam com apoio legal, ou dependem de melhoria da qualidade higiênica<sup>5-9</sup>, de apoio financeiro (salvo as usinas de grande porte), de tecnologia ou mesmo da comprovação de sua eficiência<sup>10</sup>.

O maior problema associado à ingestão desses sais está relacionado com seu potencial efeito tóxico em indivíduos expostos a esses aditivos, o que depende tanto da quantidade ingerida quanto da susceptibilidade do organismo<sup>11</sup>. O excesso desses íons causa danos à saúde humana e é preocupante sob o ponto de vista toxicológico, uma vez que o nitrato é convertido em N-nitrosaminas, que possuem ação carcinogênica após a digestão<sup>2,12-15</sup>.

Nitrosaminas são compostos N-nitrosos (NOC), formados pela interação entre um grupo de nitrogênio secundário (amina, amida, alquil-ureia ou um anel peptídico) e um agente nitrosante<sup>16-18</sup>. Os agentes nitrosantes reagem rapidamente com superóxido para formar peróxido de nitrito (ONOO-), o qual é altamente reativo e responsável pelos efeitos celulares adversos como o câncer<sup>15</sup>.

O nitrato possui basicamente duas maneiras distintas de conversão em nitrito: na primeira, pode ocorrer redução do nitrato em nitrito no próprio alimento devido às condições que ele oferece; e na segunda, uma conversão através da redução pela ação de bactérias redutoras no trato gastrointestinal e no estômago, onde pode chegar a ser transformado em nitrosamina<sup>18</sup>. Foi observado por Mcknight et al.<sup>19</sup> que, além dessas possibilidades de transformação do nitrato em nitrito, nas condições ácidas do estômago, o nitrito também dá origem aos agentes nitrosantes, através de sua decomposição em ácido nitroso (HNO<sub>2</sub>) e este em vários óxidos de nitrogênio espontaneamente.

O nitrito é bem mais tóxico que o nitrato e produz vasodilatação e relaxamento da musculatura lisa em geral<sup>20</sup>. Além disso, quando está presente no organismo, especialmente no infantil, age sobre a hemoglobina, oxidando o ferro (Fe) ao estado férrico, impedindo assim a função normal da hemoglobina de transportar oxigênio, doença conhecida como metemoglobinemia, que pode levar à anoxia e morte<sup>21</sup>. A avaliação dos teores de nitratos e nitritos nos alimentos em geral deve ser realizada a fim de que a Ingestão Diária Aceitável (IDA) não seja ultrapassada, o que colocaria em risco a população. O Brasil utiliza como referência os mesmos valores de IDA do Mercosul e da FAO/OMS: 0,06 mg/Kg/dia de íon nitrito e 3,7 mg/Kg/dia para nitrato. Deve-se ressaltar que a IDA não deve ser aplicada para crianças menores de 3 meses de idade. Alimentos destinados a crianças com menos de 6 meses de idade não podem conter nitrito como aditivo<sup>10</sup>.

O Padrão Geral de Identidade e Qualidade de Queijos (PIQ) está descrito na Portaria nº 146 de 1996 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)<sup>22</sup>. De acordo com a portaria, permite-se a adição de nitrato de sódio ou potássio em queijos, com exceção daqueles classificados como de alta umidade (46,0 a 54,9% m/m) ou muito alta umidade (maior ou igual a 55,0% m/m), até um limite máximo de 50 mg/Kg (ppm), quantificados como nitrato de sódio ou potássio, isolados ou combinados. Para os nitritos, o critério de aceitação é ausência, independentemente do teor de umidade do queijo.

O queijo Minas Frescal é regulamentado pela Portaria 352 de 1997<sup>23</sup>, que o classifica como queijo de muito alta umidade e que não pode conter nitratos e nitritos. O queijo Mussarela possui seu regulamento descrito na Portaria 364 de 1997<sup>24</sup>, a qual o classifica como queijo de média, alta ou muito alta umidade. A norma regulamentadora do queijo Prato é a Portaria 358 de 1997<sup>25</sup>, que o classifica como queijo de média umidade, e para o queijo Parmesão temos a Portaria 353 de 1997<sup>26</sup>, que o classifica como queijo de baixa umidade.

A Fundação Ezequiel Dias (Funed) – Laboratório Central de Saúde Pública de Minas Gerais (Lacen-MG), através da Divisão de Vigilância Sanitária, em parceria com as Vigilâncias Sanitárias Estadual e Municipais, e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), realiza o monitoramento de alimentos expostos ao consumo em Minas Gerais, principalmente aqueles mais susceptíveis às contaminações e adulterações físico-químicas. Um dos programas realizados em 2009 foi o PROMAC – Programa de Monitoramento de Aditivos e Contaminantes, que avalia a presença de aditivos e contaminantes, como nitratos e nitritos, corantes naturais e artificiais, sulfitos e metais pesados em alimentos como derivados lácteos, sucos em pó e prontos para beber, balas e pirulitos, doces e geleias.

No presente estudo teve-se como objetivo avaliar a ocorrência de nitratos e nitritos em queijos, Minas Frescal, Mussarela, Prato e Parmesão, comercializados no estado de Minas Gerais no ano de 2009, tanto por técnicas qualitativas como quantitativas, conforme os Padrões de Identidade e Qualidade desses produtos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras

As análises foram realizadas no Laboratório de Química Bromatológica e Cromatografia da Funed/Lacen-MG, no período de abril a novembro de 2009. Foram analisadas 29 amostras de queijo Minas Frescal, 27 de Mussarela, 11 de Parmesão e 10 de Prato, totalizando 77 amostras. Estas foram coletadas aleatoriamente em diversos estabelecimentos do comércio do estado, pela Vigilância Sanitária Municipal, de acordo com o cronograma da Secretaria Estadual de Saúde, como parte do PROMAC.

### Metodologia

Para as determinações qualitativa e quantitativa de nitratos e nitritos, foram utilizadas as publicações

oficiais do MAPA (Instrução Normativa 68/2006 e Portaria 01 de 1981)<sup>27,28</sup>.

A determinação quantitativa dos teores de nitrato e nitrito foi aplicada somente para queijos de média e baixa umidade, conforme classificações consultadas nos Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade (RTIQ's) específicos para cada tipo de queijo. Os queijos não enquadrados nesta classificação foram submetidos apenas à análise qualitativa, uma vez que o critério de aceitação é somente presença ou ausência de nitrato e nitrito, não interessando sua quantificação. Para o queijo Mussarela, antes de se definir qual metodologia seria empregada, fez-se necessária a realização da determinação da umidade, por ser um queijo que pode ter classificação diversa.

### Determinação qualitativa

#### Clarificação

Foram pesados 10 gramas das amostras de queijo previamente processadas e homogeneizadas em um béquer de 250 mL. Em seguida, adicionou-se 25 mL de tetraborato de sódio (bórax) 5% e 100 mL de água destilada fervente. As misturas foram mantidas em banho-maria por 15 minutos com agitação ocasional. Após este processo, resfriou-se a temperatura ambiente. Adicionou-se 10 mL de ferrocianeto de potássio 0,25 M e 10 mL de acetato de zinco 1,0 M com agitação sequencial e repouso por 30 minutos a temperatura ambiente. Após o repouso, as amostras foram filtradas em papel filtro qualitativo<sup>28</sup>.

#### Pesquisa de nitratos

Foram transferidos 5 mL de cada filtrado para um tubo de ensaio. Adicionou-se 1 gota de solução saturada de cloreto de sódio em cada recipiente e 4 mL de solução de difenilamina 17,0 mg/100mL (esta solução foi preparada com 30 mL do volume total de água e o restante de ácido sulfúrico concentrado) cuidadosamente pelas paredes do tubo. As amostras foram mantidas em repouso por 30 minutos para avaliação do resultado. Fez-se o branco nas mesmas condições, utilizando-se 5 mL de água ultrapura em substituição da amostra. Também foi feito um controle positivo fortificando uma amostra com 0,6 mL de uma solução-padrão de nitrato de sódio a 1%. O desenvolvimento de um anel de coloração azul indicou a presença de nitratos na amostra<sup>28</sup>.

#### Pesquisa de nitritos

Foram transferidos 10 mL dos mesmos filtrados para um tubo de ensaio, onde foram adicionados 5 mL da

solução tampão pH 9,6 – 9,7 (HCl/NH<sub>4</sub>OH) e 10 mL do reagente de cor (ácido sulfanílico e  $\alpha$ -naftol em ácido acético 15%) em ausência de luz direta. Os tubos foram mantidos em repouso por 30 minutos para desenvolvimento da coloração. Como na determinação de nitratos, também foi feito um branco e um controle positivo nas mesmas condições das amostras, sendo que o controle positivo foi realizado a partir de uma solução de nitrito de sódio a 10 mg/L (ppm). O desenvolvimento de coloração rósea alaranjada indicou a presença de nitritos na amostra<sup>28</sup>.

## Determinação Quantitativa

### Clarificação

Foram pesados 10 gramas da amostra em béquer de 100 mL. Ao béquer foram adicionados 5 mL de solução de tetraborato de sódio a 5% (bórax) e 40 mL de água fervente. O conteúdo foi deixado em banho-maria com agitação constante por 15 minutos e em seguida resfriado a temperatura ambiente. Todo o conteúdo do béquer foi transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL. O conteúdo do balão foi submetido ao processo de clarificação através da adição de 10 mL de solução de ferrocianeto de potássio 0,25 M e 10 mL de solução de acetato de zinco 1,0 M sob agitação. O conteúdo do balão foi completado com água ultrapura e filtrado em papel filtro qualitativo<sup>27</sup>.

### Nitrito original

Para a determinação de nitrito original presente na amostra, foram transferidos 20 mL do filtrado clarificado para balão volumétrico de 100 mL e procedeu-se a reação de cor<sup>27</sup>.

### Nitrito total – Redução do nitrato a nitrito

Foram transferidos 20 mL do filtrado para um erlenmeyer de 125 mL. Em seguida, foram adicionados 5 mL de solução tampão (pH 9,6 – 9,7) e aproximadamente 20 g de cádmio esponjoso ao erlenmeyer, o qual foi colocado no agitador por 30 minutos. O sobrenadante foi filtrado em papel filtro qualitativo diretamente em balão volumétrico de 100 mL<sup>27</sup>.

### Reação de cor para determinação do nitrito

Foram transferidos 10 mL do conteúdo do balão de 100 mL para um balão volumétrico de 25 mL âmbar, onde foram adicionados mais 5 mL da solução tampão e 10 mL do reagente de cor (os mesmos utilizados na pesquisa de

nitritos). O conteúdo foi agitado. O balão foi mantido a 25 °C ao abrigo da luz por 30 minutos. Em seguida, fez-se a leitura em espectrofotômetro a 480 nm. Os cálculos para determinação do conteúdo de nitrito original e total foram realizados com base na equação obtida através da curva de calibração, com a leitura de padrões de nitrito (0,10; 0,40; 0,80; 1,20; 2,00 e 2,40 mg/L) na mesma faixa espectral. O teor de nitrato foi determinado a partir da diferença entre o teor de nitrito total e original multiplicado pelo fator de conversão. Os resultados finais foram convertidos em miligramas de nitrato ou nitrito por massa de amostra<sup>27</sup>.

### Avaliação da eficiência de redução do cádmio esponjoso

A avaliação da eficiência de redução do cádmio esponjoso foi determinada através da redução de uma solução-padrão de nitrato de sódio, que foi analisada concomitantemente com as amostras<sup>27</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi verificada a presença de nitratos em 7% das amostras de queijo Minas Frescal, estando em desacordo com a legislação, Portaria nº 352 de 1997<sup>23</sup>, que preconiza a ausência total desses sais na composição desse queijo, por ele ser classificado como um queijo de muito alta umidade.

Após determinação da umidade, 9 das 27 amostras de Mussarela foram classificadas como de alta ou muito alta umidade, sendo direcionadas para avaliação qualitativa. Em nenhuma delas foi detectada a presença de nitratos e de nitritos, estando de acordo com as legislações estabelecidas.

Quando foram determinados quantitativamente nitratos nas amostras de queijo Mussarela, Parmesão e Prato, observou-se que o queijo Parmesão apresentou valores de até 121,38 mg/Kg, ultrapassando o máximo permitido de 50 mg/Kg de queijo em 18% das amostras. Para o queijo Prato, foram encontrados valores até 56,77 mg/Kg (10% de amostras não conformes). Já para Mussarela, todas as amostras avaliadas quantitativamente estavam em conformidade para o valor estabelecido, apresentando, no máximo, 10,17 mg/Kg de queijo. Também não foram quantificados nitritos em nenhuma destas amostras. Tanto para nitrato como para nitrito, o limite de quantificação do método foi de 5 mg/Kg de queijo (Tabela 1).

Seraphim e Siqueira<sup>10</sup> avaliaram amostras de queijos industrializados e caseiros, não verificando a

**Tabela 1.** Avaliação quantitativa de Nitrato em amostras de queijo Mussarela, Parmesão e Prato coletadas no ano de 2009

Queijo	Amostras Avaliadas	Limite Máximo estabelecido	Avaliação	
			Satisfatório (%)	Não conformidades (%)
Mussarela	18	50 mg/Kg	100	0
Parmesão	11		82	18
Prato	10		90	10

presença de nitratos e nitritos em quantidades superiores a 10 mg/kg na maioria delas (88,37%). Silveira et al.<sup>5</sup> mostraram resultados muito semelhantes aos obtidos nesse trabalho, onde foram analisadas 112 amostras de queijos e verificado que em 104 (92,85 %) não havia nitrato e nitrito detectável (LD=10 mg/kg), e em 8 (7,14%) apenas o nitrato estava presente. Zerfiridis e Manolkidis<sup>29</sup> analisaram 54 amostras de queijos da Grécia, 20,4% apresentaram nitrato entre 35 e 104 mg/Kg e 46,3% foram negativos para nitrato e nitrito.

Para alguns estudiosos, os baixos níveis de nitrato e nitrito encontrados em queijos estão relacionados com a alta solubilidade desses íons em água, ficando pequena parte adsorvida na superfície das micelas da caseína coagulada<sup>6</sup>.

Valores de nitrato em alta concentração foram encontrados por Pimentel et al.<sup>30</sup>, onde a presença foi observada em todas as amostras analisadas, com teores médios que variam de 5,11 a 159,1 mg/Kg. Teores médios mais elevados de nitrato de sódio foram encontrados em queijo tipo parmesão (49,09 mg/Kg), seguido por queijo parmesão (25,99 mg/Kg) e pelo queijo ralado (25,22 mg/Kg). Do total, 20% das amostras do queijo parmesão ralado, 25% das amostras de queijo tipo parmesão ralado e 25% das amostras de queijo ralado estariam em desacordo com o limite estipulado pela legislação. O mesmo autor reporta que a presença de nitrito de sódio foi observada em 94,4% das amostras analisadas, em teores que variaram de 4,15 a 129,2 mg/Kg. Teores médios mais elevados de nitrito de sódio foram encontrados em queijo tipo parmesão ralado (39,87 mg/Kg), seguido por queijo parmesão ralado (23,89 mg/Kg) e queijo ralado (20,46 mg/Kg).

A ausência de nitritos em queijos industrializados em que não foi detectado o nitrato foi reportada por outros pesquisadores, como Birkkjaer e Thomsen<sup>31</sup>; e Sen e Donaldson<sup>32</sup>. Provavelmente, isso se deve ao fato de que o nitrito, quando presente em queijos, é proveniente da redução do nitrato adicionado<sup>10</sup>.

A conversão de nitrato em nitrito no queijo ocorre pelas condições que o alimento oferece, como foi

observado por Levallois et al.<sup>33</sup>. Portanto, a ocorrência de resultados positivos para a presença de nitrato e negativos para nitrito pode ser explicada pelo fato de o alimento não ter tido condições favoráveis para que ocorresse a redução do nitrato para nitrito.

Plutta et al.<sup>34</sup> mostraram que em estudo dos níveis de nitrato e nitrito em queijo produzido na Polônia, onde de 0,01 a 0,02% de nitrato de sódio foi adicionado durante a fabricação, encontraram-se quantidades relativamente baixas, médias de 10 mg/Kg de nitrato e 1 mg/kg de nitrito. Deve-se ressaltar que a presença de 1 mg/Kg de nitrito pode ser oriunda da redução do nitrato adicionado nas amostras.

## CONCLUSÃO

O alto índice de não conformidade em queijos Parmesão e Prato indicam uso excessivo do nitrato nesse tipo de alimento.

A presença de nitrato em queijo Minas Frescal não era esperada em função de ser um produto de rápido consumo e o estufamento tardio não ser um problema característico desse tipo de queijo.

Os resultados reforçam a importância do monitoramento contínuo de aditivos intencionais em produtos como o queijo, largamente consumidos pela população.

## REFERÊNCIAS

1. Almudena A, Lizano J. Nitratos, nitritos y nitrosaminas. Madrid: Fundacion Ibérica para La Seguridad Alimentaria; 2001.
2. Petenuci ME, Matsushita M, Souza NE, Visentainer JV. Nitratos e nitritos na conservação de carnes. *Rev Nac Carne*. 2004;333:1-2
3. Pérez Rodrigues ML, Bosch Bosch N, García Mata M. Monitoring nitrite and nitrate residues in frankfurters during processing and storage. *Meat Sci*. 1996;44(1):65-73.
4. Furtado MM. Principais problemas dos queijos: causas e prevenção. São Paulo (SP): Fonte Comunicação e Editora; 1999. p. 176.

5. Silveira NVV, Yabiku HY, Duarte M, Takahashi MY, Chicourel EL. Níveis de nitritos, nitratos e sorbatos em queijos comercializados na cidade de São Paulo. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 1991;51(1/2):37-40.
6. Abreu LR, Costa LCG, Furtado MM. Influência da adição de nitrato de sódio ao leite destinado a fabricação de queijo prato nos teores de nitrato e nitrito do soro e do queijo. *Rev Inst Lat Cândido Tostes*. 1986; 41(247):35-6.
7. Diraman H. A research on nitrite determination of cheese produced in Thrace region. *Gida*. 1993;18(5):293-5.
8. Glaesser H. Use of nitrite in cheese production. *Dairy Ind Int*. 1989;54(11):21-3.
9. Abo-Elnaga IG, Abdel-Mottaleg L, El-Gendy SM. Effect of some late-blowing inhibitors on bacteriological and chemical changes in Swiss cheese. *Sudan J Food Sci Tech*. 1974;6:32-5.
10. Seraphim KR, Siqueira MEPB. Nitratos e nitritos em queijos caseiros e industrializados comercializados na região sul de Minas Gerais, Brasil. *Arch Latinoam Nutr*. 2000;50(1):87-90.
11. Martins DI, Mídio AF. Toxicologia de alimentos. São Paulo (SP): Varela; 2000. 2ª ed. p. 295.
12. Duarte M, Mídio AF. Nitratos e nitritos em alimentos. *Cad Nutr*. 1996;12:19-30.
13. Lijinski W. Induction of tumours in rats by feeding nitrosatable amines together with sodium nitrite. *Food Chem Toxicol*. 1984;22:715-20.
14. World Health Organization – WHO. Nitrates, nitrites and N-nitroso compounds. Geneva; 1978. Environmental Health Criteria, n. 5.
15. Chow CK, Hong CB. Dietary vitamins and selenium and toxicity of nitrite and nitrate. *Toxicol*. 2002;180:195-207.
16. Britto AV. Câncer de estômago: fatores de risco. *Cad Saúde Pública*. 1997;13:1-12.
17. Mirvish SS. The diet cancer story. *Oxford Health News*. 1994;12(2):6.
18. Walker R. Nitrate, nitrites and N-nitrosocompounds: a review of the occurrence in food and diet and the toxicological implication. *Food Addit Contam*. 1990;7(6):717-68
19. Mcknight GM et al. Dietary nitrate in man: friend or foe? *Braz J Nutr*. 1999;81:349-58.
20. Sgarbieri VC. Alimentação e nutrição: fator de saúde e desenvolvimento. São Paulo (SP): Almed Editora e Livraria Ltda; 1987. p. 387.
21. Santos JS, Beck L, Walter M, Sobczak M, Olivo CJ, Costabeber I, et al. Nitrato e nitrito em leite produzido em sistemas convencional e orgânico. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2005;25(2):304-9.
22. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 07 mar 1996. Seção 1, p. 3977.
23. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Portaria nº 352 de 04 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 08 set 1997. Seção 1, p. 19684.
24. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Portaria nº 364 de 04 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Mozzarella (Muzzarella ou Mussarela). *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 08 set 1997. Seção 1, p. 19694-19695.
25. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Portaria nº 358 de 04 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Prato. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 08 set 1997. Seção 1, p. 19690.
26. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Portaria nº 353 de 04 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Parmesão, Parmesano, Reggiano, Reggianito e Sbrinz. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 08 set. 1997. Seção 1, p. 19684.
27. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006. Estabelece os métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 14 dez 2006. Seção 1, p. 8.
28. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Portaria nº 01 de 07 de outubro de 1981. Aprova os métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II – Métodos Físicos e Químicos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 13 out 1981. Seção 1.
29. Zerfiridis GK, Manolkidis KS. Contents of nitrates and nitrites in some Greek and imported cheeses. *J Food Prot*. 1981;44(8):576-79.
30. Pimentel EF, Dias RS, Cunha MRR, Glória MBA. Avaliação da rotulagem e da qualidade físico-química e microbiológica de queijo ralado. *Rev Ciênc Tecnol Aliment*. 2002;22(3):289-94.
31. Birkkjaer HE, Thomsen D. Varying the addition of saltpetre in manufacture of different types of Danish cheese. *Beterning fra Statens Forsogsmejeri* 1978; 230.
32. Sen NP, Donaldson B. Improved colorimetric method for determination nitrate and nitrite foods. *J Assoc Off Anal Chem*. 1975;61:1755-60.
33. Levallois P, Phaneuf D. Contamination of drinking water by nitrates: analysis of health risks. *Can J Public Health*. 1994;85(3):192-6.
34. Pluta A, Zmarlicki S, Gawel J, Ostrowski S. Nitrate and nitrite in maturing cheese produced in Poland. *Przem Spozyw*. 1986;40(7/8/9):166-7.