

# INDUSTRIE ALIMENTARI

Dalla materia alla forma.



ESTRUSIONE E TERMOFORMATURA. PER RISULTATI PERFETTI.



CONTENITORI  
RICICLABILI  
ED ECOLOGICI



Strada Chieri, 79 - 10020 Andezeno (TO) - Tel. 011.943.31.11 - [www.arcoplastica.com](http://www.arcoplastica.com) - E-mail: [info@arcoplastica.com](mailto:info@arcoplastica.com)

 **ARCOPLASTICA**



CHIRIOTTI  EDITORI

10064 PINEROLO - ITALIA - Tel. +039 0121393127 - Fax +039 0121794480 - [info@chiriottieditori.it](mailto:info@chiriottieditori.it)

# Livelli naturali dei nitriti e dei nitrati in prosciutto di San Daniele DOP e in carne, sale e sugna utilizzati per la sua produzione

*Natural levels of nitrites in San Daniele dry cured ham PDO and in meat, salt and sugna used for its production*

## • PAROLE CHIAVE

nitriti, nitrati, concentrazione naturale, limiti soglia, prosciutto crudo di San Daniele

## • KEYWORDS

nitrite, nitrate, natural concentration, threshold value, San Daniele dry cured ham

## • SOMMARIO

Lo scopo del lavoro è stato quello di valutare la concentrazione naturale dei nitriti e nitrati in carne fresca, sale e sugna usati per produrre il prosciutto di San Daniele e in prosciutti di San Daniele ottenuti dopo 14-19 mesi di stagionatura. Il capitolato di produzione del prosciutto di San Daniele DOP non permette l'utilizzo dei nitriti e dei nitrati, ma solo carne suina (coscia) italiana, sale e... tempo. La stabilità dipende dal sale, dall'Aw, dalla disidratazione e dalla stagionatura, e la qualità finale è influenzata dal processo tecnologico, dalla lunghezza della disidratazione e dalla stagionatura. Il lavoro ha determinato la concentrazione dei nitriti e dei nitrati "naturali" presenti nella carne di coscia suina, nel sale, nella sugna e in prosciutti San Daniele DOP ottenendo valori medi rispettivamente di 2, 1, 5, 1 mg/kg di nitrito e di 8, 6, 8 e 4 mg/kg di nitrate. I dati hanno permesso di calcolare dei valori soglia per i due composti: la concentrazione dei nitriti e nitrati nei prosciutti crudi di San Daniele DOP deve essere considerata naturale quando è, rispettivamente, inferiore a 4 e 22 mg/kg.

## • SUMMARY

The aim of the present study was to determine the "natural" nitrite and nitrate in raw meat, salt and lard, used to produce San Daniele Dry Cured Ham and in San Daniele Dry Cured Ham obtained after 14-19 months of ripening under controlled environmental conditions. The PDO of San Daniele dry cured ham does not permit the use of either nitrite and nitrate. The stability of the product depends on the salt, the drying, ripening and the Aw reduction; the quality is influenced by the processing technology, for example the length of the drying and ripening period. San Daniele dry cured ham has a final Aw of less than 0.92 and a water content of between 57 and 63%. The average of natural nitrite in meat, salt, lard and dry cured ham was respectively about 2, 1, 5 and 1 mg/kg, and natural nitrate was 8, 6, 8 and 4 mg/kg. From this data it was possible to determine a threshold value for both compounds: the nitrite and nitrate concentrations in San Daniele PDO ham must be considered "natural and not an additive" when they are less than 4 and 22 mg/kg respectively.

G. Comi<sup>1</sup> - P. Cattaneo<sup>3</sup>  
C. Zuccolo<sup>2</sup> - S. Galanetto<sup>2</sup>  
A. Acquafredda<sup>3</sup> - L. Iacumin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze AgroAlimentari, Ambientali e Animali, Università degli Studi di Udine Via Sondrio 2/a - 33100 Udine

<sup>2</sup>Consorzio del Prosciutto di San Daniele - Via Ippolito Nievo, 19 33038 San Daniele del Friuli (UD)

<sup>3</sup>Dipartimento di Scienze Veterinarie per la Salute, la Produzione Animale e la Sicurezza Alimentare, Laboratorio di Ispezione degli Alimenti di Origine Animale, Università degli Studi di Milano, Via Celoria 10 - 20121 Milano \*email: giuseppe.comi@uniud.it

## Introduzione

Il prosciutto di San Daniele è un tipico prodotto della salumeria italiana costituito da carne di suino (coscia) italiana salata e lasciata maturare nel tempo per acquisire aroma e sapore (10,11). È considerato da tutti una prelibatezza perché caratterizzato da uno specifico e particolare aroma e sapore (10,11,31,34,41). La sua popolarità in Europa e nel mondo è in continuo aumento. Lo stato italiano ha promosso una tutela organica di questo prodotto fin dal 1970 (legge 4 luglio 1970, n. 507), e nel 1990 ha approvato una nuova legge di tutela - n. 30 del 14 febbraio 1990.

Dal 1996 con il Regolamento CE n. 1107/96 del 12 giugno 1996, il prosciutto di San Daniele è riconosciuto anche dall'Unione Europea come prodotto a Denominazione di Origine Protetta (DOP).

Attualmente il Regolamento (UE) n. 1151/2012, che istituisce la tutela comunitaria per i prodotti agro-alimentari a denominazione d'origine sui regimi di qualità dei prodotti agricoli e alimentari, ha rinforzato, adattato e sviluppato regimi per identificare i prodotti e gli alimenti di qualità europei.

Le fasi di lavorazione - già codificate nel Regolamento 16 febbraio 1993, n. 298 - sono state pubblicate nel Disciplinare della DOP con provvedimento del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali 21 marzo 2007. Esse derivano dalla tradizione artigianale. La moderna industria ha solo cercato di organizzare i diversi passaggi in una forma migliore proprio per dare risalto alle operazioni che caratterizzano il prosciutto di San Daniele. Gli stadi di processo consistono in: scelta delle carni, raffreddamento, rifa-

tura, massaggiatura, salatura, pressatura, preriposo e riposo, toelettatura, rinvenimento e lavaggio, asciugamento, prestagionatura, stuccatura e sugnatura e stagionatura (12). Le cosce fresche di suino pesanti (kg 150-180) vengono ricevute direttamente nello stabilimento di produzione e provengono esclusivamente dalle regioni Friuli Venezia Giulia, Veneto, Lombardia, Piemonte, Emilia Romagna, Umbria, Toscana, Marche, Abruzzo e Lazio, complete di piedino o zampetto, tranne che nelle circostanze codificate all'art. 25, CO 1 della legge 30/90, che verrà lasciato anche sul prodotto finito, costituendo una caratteristica del prosciutto di San Daniele.

Al momento del ricevimento le cosce sono sottoposte ad un presidio tecnico sanitario e solo su quelle ritenute idonee viene applicato un premarchio, indicante la dicitura DOT e la data completa di inizio produzione (11,12).

Il prosciutto di San Daniele viene ottenuto attraverso salatura e disidratazione/maturazione nel tempo. La sua stabilità deriva dall'aggiunta del sale e dalla maturazione. Non viene permessa l'aggiunta di additivi quali nitriti e nitrati sia ai fini di stabilizzarne il colore che ai fini antimicrobici e antiossidanti. L'impiego del sale è stato uno dei primi metodi utilizzati dall'uomo per conservare la carne. La carne era ricoperta di sale, che penetrava internamente e la conservava. Il sale conteneva come impurezza il nitrato, che incrementava il suo effetto stabilizzante e antimicrobico. Tuttavia, l'aggiunta intenzionale di concentrazioni appropriate di nitrito e nitrato alla carne fu fatta solo agli inizi del secolo scorso.

Ora è noto che è il nitrito la molecola attiva e che il nitrato serve come riserva di nitrito; questi additivi svolgono la funzione di produr-

re e mantenere il colore rosso della carne, di creare sapori caratteristici, di impedire l'ossidazione dei grassi e lo sviluppo di microrganismi patogeni e alteranti (10-12,51). Proprio a causa di queste loro proprietà sono stati usati e sono ancora usati per la produzione di salumi, se pure con limitazioni.

La normativa UE sui nitrati e nitriti limita infatti l'uso del nitrato ai soli prodotti non sottoposti a cottura, dove la riduzione batterica può avvenire. Il loro impiego è una scelta obbligata ai fini di mantenere intatti nel tempo i principi nutrizionali della carne; per migliorare le caratteristiche organolettiche, sensoriali e edonistiche della stessa (11,40,53). Nella carne il nitrito, che in ambiente acido si trasforma in ossido di azoto, reagisce con la mioglobina a formare nitrosilmioglobina, che determina il mantenimento del colore rosso (10). Il nitrito ha un'azione batteriostatica nei confronti di specie microbiche alteranti quali *Pseudomonas*, *Shewanella putrefaciens* ed enterobatteri, e nei confronti di specie patogene quali *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium botulinum* (10-12,42-44,52-54). Proprio l'inibizione della germinazione delle spore di *Clostridium botulinum* giustifica l'impiego di nitriti/nitrati. L'attività del nitrito/nitrato è pH dipendente e sembra che l'ossido di azoto, generato dal nitrito in substrato a pH acido (5,3-5,7) si leghi a proteine e al ferro delle cellule microbiche inibendone l'attività.

L'aggiunta del nitrito è vista con sospetto dagli igienisti e da alcuni consumatori, perché si ritiene che possa legarsi alle ammine a formare nitrosammine, molecole ritenute cancerogene. Tale convinzione è, a nostro avviso, infondata, perché prodotti di salumeria sia cotti che crudi contengono piccole quanti-

tà di nitrosammine, di norma inferiori a 25 ppb; quantità innocue per il consumatore. Inoltre, la reazione nitrito/ammine avviene in ambiente fortemente acido (pH 3,1) o in seguito all'impiego di alte temperature (es. friggitura del bacon).

La formazione di nitrosammine nello stomaco (ambiente acido) è trascurabile sia per la concentrazione di nitriti normalmente ingerita tramite l'alimentazione, sia perché i prodotti salnitriati sono di norma assunti con alimenti contenenti sostanze polifenoliche, flavoni, chinoni, adrenalina, triptofano e tirosina (bevande, vino, pane, prodotti di origine animale, ecc.). Tali sostanze oltre ad essere presenti nello stomaco in concentrazioni nettamente superiori alle ammine, reagiscono più rapidamente di queste con il nitrito e quindi svolgono un'azione protettiva, impedendo la formazione di nitrosammine. Infine, l'aggiunta di acido ascorbico, isoascorbico e dei loro sali ha lo scopo di inibire la formazione delle nitrosammine nei prodotti di salumeria (5,7,14,30). Nei prodotti quali il prosciutto crudo, invece, essendo a pezzi interi, e quindi difficilmente contaminabili internamente con *Clostridium botulinum*, i nitriti/nitrati possono essere omessi perché bastano il sale e la disidratazione/maturazione per stabilizzarli e renderli salubri. La perdita di umidità, la maturazione della carne e il sale impediscono lo sviluppo di qualsiasi microrganismo alterante o patogeno (10-12). Inoltre, l'ambiente, essendo riducente, permette il mantenimento del colore della carne.

Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di verificare la presenza di nitriti e nitrati in sale, carni e sugna utilizzate nella produzione del prosciutto di San Daniele e in prosciutti di San Daniele di diversi periodi di stagionatura.

Tabella 1 - Metodi standardizzati internazionali basati sulla riduzione dei nitrati con colonna al cadmio.

Standard	Ricerca di NO <sub>2</sub> /NO <sub>3</sub>
ISO 2918/1975 (E) - 3091/1975 (E) -	Carni e prodotti a base di carne
ISO 20541 IDF197 2006	Latte e prodotti lattierocaseari
BS 1473-16.1 1983	Latte in polvere e prodotti a base di latte in polvere
EPA 353.2 1993	Substrati vari
AOAC 976.14	Formaggio
AOAC 973.31	Carni
AOAC 993.03	Cibi per neonati

## Materiali e metodi

Allo scopo di determinare il contenuto naturale di nitrati e nitriti nel prosciutto, sono stati considerati i suoi ingredienti fondamentali, la carne ed il sale, che diffondendosi nella carne potrebbero contribuire al contenuto di nitriti e nitrati del prodotto finito, nonché la sugna usata nella fase terminale. Sono stati analizzati per la ricerca dei nitriti e dei nitrati:

50 fette di circa 100 g di prosciutti di San Daniele di diversi tempi di maturazione (14-19 mesi) e quindi di diverse Aw e umidità;

50 campioni di 100 g di carne suina derivante da cosce utilizzate per la produzione del prosciutto di San Daniele;

3 campioni di sugna e 10 campioni di sale alimentare prelevati presso diversi impianti produttivi e appartenenti a 10 lotti diversi.

Al solo fine di poter disporre di ogni elemento utile per valutare i risultati relativi ai nitriti e nitrati ed esprimerli sulla sostanza secca, sui campioni di carne è stata determinata l'umidità, mentre sui campioni di prosciutto crudo oltre all'umidità è stata determinata l'attività dell'acqua (Aw), verificando nel

contempo, la stabilità dei campioni oggetto dell'analisi. La ricerca di nitriti e nitrati è stata effettuata tramite il metodo di Mirna e Schütz (38), modificato AOAC (2). Questo metodo è ampiamente usato per la determinazione dei nitriti e dei nitrati nei prodotti alimentari (carni e prodotti a base di carne, latte e formaggi, vegetali e acque potabili e reflue). È più produttivo di altri metodi colorimetrici perché presenta un limite soglia di rilevazione nella carne di 1 mg/kg. La stessa EPA (United States Environmental Protection Agency) impone un metodo simile per la determinazione dei nitriti e nitrati basati su metodo colorimetrico che utilizza una colonna di riduzione al cadmio (Tab. 1). Il metodo utilizzato in questa sede oltre ad essere stato validato da diverse Organizzazioni Internazionali di Standardizzazione dei metodi (Tab. 1) è un metodo spettrofotometrico, e quindi economico, facile da utilizzare, non richiede attrezzature particolari o costose (HPLC) ed è applicabile a diverse matrici (vegetali, prodotti a base di carne, alimenti per l'infanzia, prodotti caseari e acque superficiali). Considerando il basso costo dei reagenti e delle attrezzature utilizzate, il metodo può essere di facile impiego in laboratori di aree in via di sviluppo. È

efficace ed efficiente, basta considerare il valore dell' $R^2$  0,99848 ottenuto durante la produzione della retta di taratura. Tale valore è accettabile per  $p < 0,001$ .

Il metodo in breve: Determinazione dei nitrati e nitriti nelle carni (fresche e trasformate). Dieci grammi di campione vengono trattati in beuta con 10 mL di una soluzione satura di borace e 100 mL di acqua distillata. L'ambiente deve essere debolmente alcalino (borace), poiché in condizioni acide lo ione nitrito è instabile e può reagire con diversi gruppi funzionali come le ammine primarie e secondarie o i gruppi sulfidrilici presenti nell'alimento. Si scalda per 10 min in acqua bollente (estrazione a caldo) allo scopo di evitare eventuali interferenze dovute all'acido ascorbico o ad altri riducenti. Si raffredda e quindi si aggiunge 1 mL di Carrez II (30 g di  $ZnSO_4$  in 100 mL di acqua distillata) per deproteinizzare. Si filtra e il filtrato limpido è portato a 200 mL con acqua distillata.

Nitrito: 20 mL del filtrato vengono trasferiti in matraccio tarato da 50 mL, addizionati di 5 mL di tampone (pH 9.6-9.7 - 20 mL HCl con-

centrato/densità 1,19 + 50 mL di  $NH_3$  concentrato/densità - 0,88) e addizionati con 5 mL di Griess 1 (sulfanilammide allo 0,33% in acido acetico al 15%) e 5 mL di Griess 2 (N-(1-Naftil)etilendiammina.2HCl - NED allo 0,13% in acido acetico al 15%). Dopo agitazione si porta a volume con acqua. Lo sviluppo di una colorazione rossa, la cui intensità è misurabile spettrofotometricamente a 540 nm, avviene in seguito alla diazotazione da parte dei nitriti della sulfanilammide (Griess 1) che, in ambiente debolmente acido, si copula agevolmente con le ammine aromatiche in generale (Griess 2).

Nitrati - Poiché solo i nitriti reagiscono con il reattivo di Griess, occorre ridurre i nitrati a nitriti, facendo passare per percolazione la soluzione del campione su una colonna riducente al cadmio ottenendo i nitriti totali. 20 mL del filtrato limpido sono addizionati di 5 mL di tampone e versati nella colonna di cadmio, dove il nitrato viene ridotto a nitrito. L'eluato è raccolto in un matraccio tarato da 100 mL che accoglierà anche i successivi lavaggi della colonna per un to-

tale di 100 mL. 20 mL di questa soluzione sono sottoposti alla reazione colorimetrica come riportato sopra, ottenendo i nitriti totali. I nitrati, infatti, sono determinati per sottrazione del valore dei nitriti determinati sul filtrato tal quale dal valore dei nitriti totali. Il limite minimo di rilevabilità è di circa 1 mg/kg. Si esegue di volta in volta anche una curva di taratura (**Grafico 1**).

I nitriti sono espressi in mg/kg come nitrito di sodio; i nitrati come nitrato di sodio, arrotondati alla unità.

L'Aw è stata determinata attraverso l'impiego di AquaLab CX-2 Steroglass (Pullman, WA, USA).

L'umidità è stata valutata tramite A.O.A.C, 1995. Official Methods of Analysis, sixteenth ed. AOAC, Alington, USA.

## Risultati

Lo scopo della ricerca è stato quello di determinare la concentrazione dei nitriti e dei nitrati naturalmente presenti in prosciutti di San Daniele pronti per il commercio di diversi livelli di maturazione e in carni fresche, sale marino e coadiuvanti tecnologici (sugna composta da grasso suino fuso, sale, pepe e derivati di cereali) utilizzate per la loro produzione. Si ricorda che il prosciutto di San Daniele, come da disciplinare DOP e da regola aurea, deve essere prodotto con cosce di suino pesante italiano, salato con sale marino, e protetto nella parte esposta con sugna. Non è permessa l'aggiunta di sali di nitrito o di nitrato. Infatti, si dice che per ottenere questo eccellente prodotto, considerato uno dei migliori salumi della salumeria italiana, occorra carne di suini italiani, sale e... tempo (superiore ai 13 mesi) e null'altro.

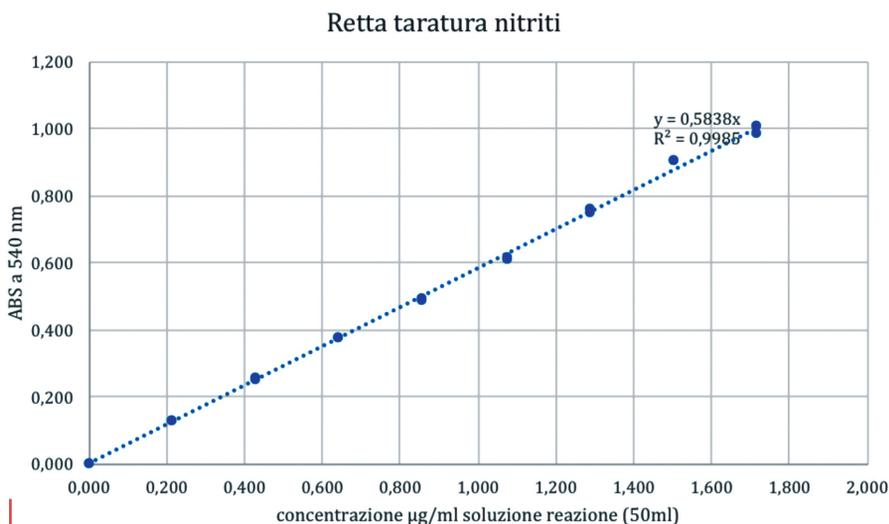


Grafico 1 - Retta di taratura per la determinazione dei nitriti in carni secondo la metodica (AOAC modificata).

Tabella 2 - Valore medio, valori minimi e massimi e deviazione standard dell'umidità dei campioni di carne, prosciutto e sugna (%).

Umidità %	Carne	Prosciutto	Sugna
Media	73,0	56,4	4,3
Valore minimo	66,2	49,8	4,0
Valore massimo	84,2	60,4	4,9
Deviazione standard	2,1	2,4	0,5
Numero campioni	50	50	3

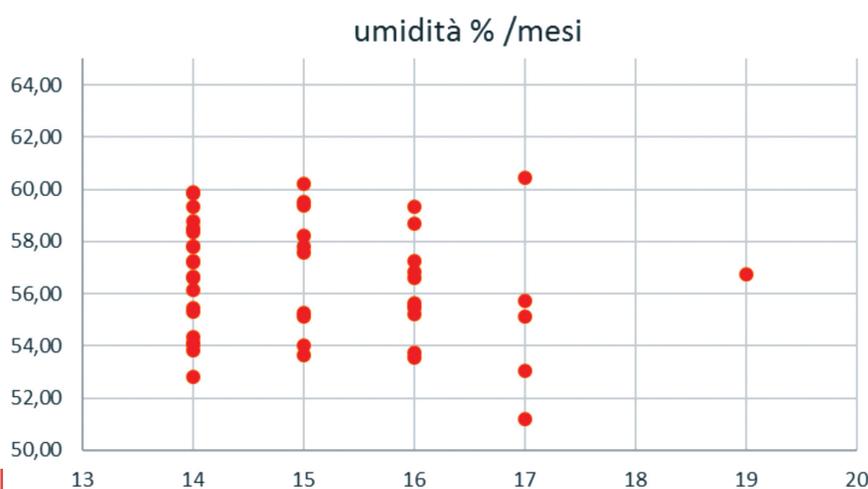


Grafico 2 - Umidità dei campioni di prosciutto crudo in relazione al tempo di stagionatura.

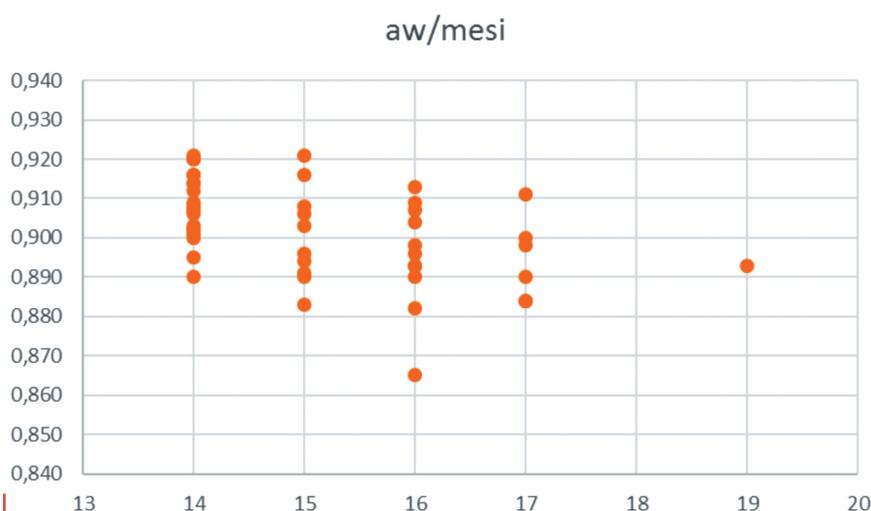


Grafico 3 - Attività dell'acqua dei campioni di prosciutto crudo in relazione al tempo di stagionatura.

Scopo aggiuntivo è stato quello di definire i valori soglia della concentrazione di nitriti e di nitrati naturalmente presenti, in maniera da individuare eventuali discostamenti dagli standard ammessi. Questo poiché, negli anni e soprattutto a livello di mercato estero, si è occasionalmente riscontrata la presenza di prosciutti venduti come "San Daniele" ma che presentavano tali composti concentrazioni simili a quelle di salumi in cui è permesso il loro utilizzo. I campioni analizzati, tutti prelevati da prosciutti rigorosamente DOP e marchiati, provenivano da diverse aziende site in San Daniele ed erano stati maturati per tempi superiori ai 13 mesi, come da disciplinare DOP, e in particolare erano costituiti da 22 campioni di 14 mesi, 10 di 15 mesi, 10 da 16 mesi, 7 da 17 mesi e 1 da 19 mesi.

I risultati relativi all'umidità dei campioni di carne, prosciutto e sugna sono riassunti in **Tab. 2**. I **Grafici 2 e 3** riportano, rispettivamente, la percentuale dell'umidità e l'Aw in relazione ai mesi di stagionatura. Ricordando che la determinazione è stata eseguita ai soli fini della valutazione dei risultati e sono relativi ai campioni impiegati per le analisi, si sottolinea che tutti i campioni analizzati avevano livelli di Aw inferiori a 0,92, indicativi della raggiunta stabilizzazione; i valori di umidità, risultati abbastanza variabili e non differenziati rispetto ai diversi tempi di stagionatura, sono tutti al di sotto del limite massimo ammesso dal Consorzio (63%).

Tra gli ingredienti e i coadiuvanti tecnologici impiegati per la produzione del prosciutto di San Daniele troviamo il sale e la sugna.

Entrambi tali ingredienti/coadiuvanti possono contenere naturalmente nitriti e nitrati, che potenzialmente possono "contamina-

Tabella 3: Nitriti e nitrati in sugna, espressi in mg/kg sul tal quale (tq) e sulla sostanza secca (ss).

Dati	nitriti tq	nitriti ss	nitrati tq	nitrati ss
Media	5	5	8	9
Valore minimo	4	4	4	4
Valore massimo	5	5	14	14
Deviazione standard	0,30	0,30	5,20	5,40
Numero campioni	3	3	3	3

Tabella 4 - Nitriti e nitrati in sale, espressi in mg/kg sul tal quale.

Dati	nitriti	nitrati
Media	1	6
Valore minimo	< 1	2
Valore massimo	3	12
Deviazione standard	0,80	2,90
Numero campioni	10	10

re” le carni e i prosciutti. Pertanto, è stata svolta la ricerca di tali additivi anche in 10 campioni di sale e 3 campioni di sugna provenienti da diversi prosciuttifici. Le tabb. 3 e 4 riportano i risultati di tali indagini. La concentrazione media dei nitriti della sugna è di 5 mg/kg, mentre quella dei nitrati di 8 mg/kg. I nitrati presentano una maggiore variabilità rispetto ai nitriti. Infatti la concentrazione dei nitrati varia da un minimo di 4 ad un massimo di 14 mg/kg con una deviazione standard pari a 5,2 mg/kg (Tab. 3). Anche nel sale utilizzato per il prosciutto di San Daniele la concentrazione dei nitriti/nitrati è limitata (Tab. 4). Infatti, si osserva una concentrazione media dei nitriti pari a 1 mg/kg e dei nitrati di 6 mg/kg. Pertanto, l'apporto del sale alla concentrazione di entrambi questi composti nel prosciutto di San Daniele è teoricamente molto basso, pur consi-

derando che l'intervallo di sale nel prodotto finito può variare da una concentrazione di 4,4% a quella del 7,1%, calcolate sulla base dei valori limite del rapporto sale/umidità imposti dal Disciplinare DOP.

Le carni utilizzate per la produzione del prosciutto di San Daniele contengono concentrazioni di nitriti e nitrati naturali ridotte, come riassunto in Tab. 5. La concentrazione media dei nitriti è pari a 2 mg/kg con deviazione standard di 0,90 mg/kg, mentre quella dei nitrati di 8 mg/kg con deviazione standard di 3,40 mg/kg. La Tab. 6 riporta le concentrazioni medie dei nitriti e nitrati in prosciutti crudi di San Daniele, rispettivamente pari a 1 mg/kg e 4 mg/kg. Anche in questo caso si osserva una certa variabilità per entrambi gli additivi; tuttavia i valo-

ri massimi osservati risultano molto bassi. Nel prosciutto crudo i valori sono inferiori a quelli osservati in carni fresche, ma a questo proposito occorre fare alcune considerazioni. Le carni analizzate non sono le stesse utilizzate per la produzione dei prosciutti crudi campionati; inoltre le quantità trovate sono spesso al limite della rilevanza e quindi così basse da permettere di affermare la scarsa significatività delle differenze osservate tra i valori, se non considerate in assoluto. Assumendo che le carni utilizzate come materia prima dei prodotti finiti in esame avessero contenuti di nitriti e nitrati simili a quelle qui analizzate, si può ipotizzare che lo sgocciolamento della carne con perdita di essudati e di sangue, il sequestro da parte della mioglobina di NO, derivante da nitrito, possa aver portato ad una riduzione della concentrazione dei nitriti e dei nitrati naturalmente presenti inizialmente. Questo è anche confermato dalla non corrispondenza dei valori del tal quale e quelli espressi sulla sostanza secca.

I valori ottenuti nelle carni fresche corrispondono a quelli determinati in carni di salmone allevato (nitriti 1-2 mg/kg e nitrati 4-6 mg/kg, dati non pubblicati). Per-

Tabella 5 - Nitriti e nitrati in carne di coscia, espressi in mg/kg sul tal quale (tq) e sulla sostanza secca (ss) con intervalli fiduciali della media alla probabilità del 95 e del 99%.

Dati	nitriti tq	nitriti ss	nitrati tq	nitrati ss
Media	2	7	8	32
Valore minimo	<1	1	1	3
Valore massimo	7	22	21	83
Mediana	2	7	8	31
Deviazione standard	0,90	3,22	3,40	15,13
Numero campioni	50	50	50	50
Intervallo fiduciale della media del 95%	2 ± 0,25	7 ± 0,90	8 ± 0,95	32 ± 4,24
Intervallo fiduciale della media del 99%	2 ± 0,33	7 ± 1,16	8 ± 1,23	32 ± 5,47

tanto in base a questi risultati e considerando la possibilità che gli ingredienti possano apportare nitriti e nitrati, che la disidratazione li possa concentrare e viceversa che la perdita di acqua e di esudati li possa parzialmente eliminare, si è proceduto a definire i valori soglia della concentrazione naturale e non aggiunta di nitriti e nitrati che indichino quando un prosciutto affettato e confezionato possa essere identificato come prosciutto crudo di San Daniele DOP o come prosciutto crudo (nazionale, estero, ecc.). I valori soglia sono stati determinati sulla base di alcune considerazioni. Le variabilità osservate nel prosciutto sono descritte nella Tab. 6, dove si riportano valori minimi, massimi, media, mediana, deviazione standard e intervalli fiduciali della media calcolati al 95 e al 99% di probabilità sulla base dell'errore standard (deviazione standard/radice di n.) e dell'integrale di probabilità k. Come si può notare, anche alla probabilità del 99%, il limite massimo dell'intervallo fiduciale resta a circa 1 mg/kg per i nitriti nel prosciutto crudo, valore che è al di sotto del valore massimo osservato con l'analisi di 50 campioni (2 mg/kg), mentre per i nitrati la media si colloca con il 99% di probabilità a circa 4 mg/kg contro il valore massimo osservato di 11 mg/kg. Si è quindi deciso di raddoppiare il valore massimo osservato e di considerare questo come valore soglia. A questo proposito, altri autori hanno adottato il metodo di raddoppiare il valore massimo osservato per stabilire il limite massimo ammissibile (26,27). I valori soglia proposti risultano essere ampiamente al di sotto dei livelli riscontrati nei casi osservati dal consorzio del prosciutto di San Daniele in fase di verifica e vigilan-

Tabella 6 - Nitriti e nitrati in campioni di prosciutto San Daniele, espressi in mg/kg sul tal quale (tq) e sulla sostanza secca (ss) con intervalli fiduciali della media alla probabilità del 95 e del 99%.

Dati	nitriti tq	nitriti ss	nitrati tq	nitrati ss
Media	1	2	4	9
Valore minimo	<1	< 1	<1	<1
Valore massimo	2	5	11	26
Mediana	1	2	4	9
Deviazione standard	0,55	1,30	3,12	7,05
Numero campioni	50	50	50	50
Intervallo fiduciale della media del 95%	1 ± 0,16	2 ± 0,36	4 ± 0,89	9 ± 2,02
Intervallo fiduciale della media del 99%	1 ± 0,20	2 ± 0,47	4 ± 1,15	9 ± 2,60

za a livello internazionale, ma nel contempo possono comprendere eventuali campioni outliers. Non si correrà, quindi, il rischio di valutare negativamente, formulando un giudizio di non accettabilità, carni e prodotti finiti con concentrazioni più alte della media di nitrito e nitrato dovute invece alla variabilità naturale. Considerando i range di concentrazione di entrambi i composti valutati nei prosciutti crudi finiti e di diversi tempi di stagionatura, si può quindi affermare che un prosciutto di San Daniele non è stato addizionato di nitriti e nitrati quando la loro concentrazione non supera, rispettivamente, 4 mg/kg e 22 mg/kg. In **Tab. 7** si riportano i valori soglia di nitriti e nitrati proposti per il prosciutto San Daniele, la materia prima carne, la sugna e il sale.

## Discussione

Il prosciutto crudo è uno dei principali prodotti a base di carne ottenuto con una gran varietà di ingredienti e di tecnologie, che influenzano la texture e l'aroma. Il processo di produzione implica l'impiego di tecniche tradizionali che consistono in due fasi critiche: la salatura e la disidratazione seguite da una stagionatura, i cui tempi sono variabili a seconda del prodotto finito desiderato (52). Durante il processo di maturazione interviene un complesso di reazioni chimiche e biochimiche, che favoriscono lo sviluppo del caratteristico aroma e sapore (46). L'intensità aromatica e del sapore è strettamente legata al tempo di stagionatura e ai fenomeni lipolitici e proteolitici, dovuti

Tabella 7 - Valori soglia proposti di nitrito e nitrato espressi in mg/kg sul tal quale (tq) e sulla sostanza secca (ss).

Prodotto	nitrito tq	nitrito ss	nitrato tq	nitrato ss
Carne fresca	14	44	42	166
<b>Prosciutto crudo</b>	<b>4</b>	<b>10</b>	<b>22</b>	<b>52</b>
Sale	6	6	24	24
Sugna	10	10	28	28

all'attività di lipasi e proteasi prevalentemente tissutali che nel tempo e sequenzialmente si attivano. Tuttavia, i caratteri qualitativi dei prosciutti crudi dipendono non solo dalla tecnologia applicata, ma anche e soprattutto dalla qualità delle materie prime e dal sale e da eventuali additivi (29).

In molti prodotti di salumeria, vengono aggiunti i nitriti e i nitrati. Il nitrato, qualora aggiunto, deve essere ridotto a nitrito, tramite nitrato reductasi batteriche o tissutali. L'ossido di azoto reagisce con la mioglobina, formando la nitrosil mioglobina, e produce il tipico colore rosso/rosa dei prosciutti o dei salami (59). Infatti, i sali di nitrati (E251 e E252) e di nitriti (E249 e E250) assieme al cloruro di sodio sono usati comunemente come agenti di maturazione di prosciutti crudi, prodotti in Italia e in altre parti del mondo. L'aggiunta di tali sali ai prosciutti rinforza l'effetto conservante del sale e soprattutto inibisce la crescita di *Clostridium botulinum* e la formazione della sua tossina. Il nitrito favorisce anche lo sviluppo del sapore e del caratteristico colore rosso del prodotto finale; sapore e colore ampiamente ricercati dai consumatori. Inoltre, il nitrito ha anche una funzione antiossidante e ritarda lo sviluppo di rancidità e di sapori e odori anormali (53). Nonostante i benefici prodotti dal nitrito, il suo utilizzo viene osservato con sospetto fin dai primi anni sessanta perché può diventare il precursore di nitrosammine, molte delle quali sono ritenute carcinogeniche (21,45). Tali sospetti però sono stati fugati da diversi autori (7) e soprattutto dall'aggiunta di agenti riducenti alle carni, quali ascorbati o eritorbati, sia per stabilizzare il colore che per ridurre la formazione di nitrosammine (9,30). In ogni caso la quantità di nitrito aggiunto

è stata regolata dal REG. UE 1129 del 2011. Questo ha stabilito un residuo massimo di 250 mg/kg per i nitrati e 100 mg/kg per i nitriti nei prosciutti crudi alla fine del processo produttivo, inseriti tra i prodotti tradizionali a base di carne ottenuti mediante salatura a secco seguita da un periodo di stabilizzazione/stagionatura (16). Si pensa che prossimamente la concentrazione di nitrito possa essere ulteriormente ridotta (17) fino a 100 ppm; concentrazione ritenuta sufficiente, anche se bisogna tenere presente che una eccessiva riduzione possa influenzare la qualità e la salubrità del prodotto a base di carne. Infatti, una ulteriore riduzione di tali additivi può influenzare la popolazione microbica e la crescita di microrganismi alteranti e o patogeni, come osservato in prosciutti crudi spagnoli, la cui stabilità e sicurezza è dovuta al sale, al nitrito e nitrato e alla riduzione dell'Aw (24).

Ora il capitolato di produzione del prosciutto di San Daniele, così come quello di altre produzioni tipiche a Denominazione di Origine Protetta, non permette l'impiego dei nitriti e dei nitrati, come sopra riportato e prevede l'utilizzo di cosce suine italiane e l'impiego di sale. È ammesso l'uso della sugna come coadiuvante tecnologico. Il colore di tali prosciutti è dato dalla mioglobina, che viene denaturata per effetto di agenti denaturanti (sale, ridotta concentrazione di acqua) ottenendo il pigmento di colore rosso profondo Globinmioemcromogeno. Wakamatsu *et al.*, (57) hanno suggerito che una zinco-protoporfirina IX (ZPP) sia la maggior responsabile del colore rosso delle carni stagionate senza l'uso dei nitriti/nitrati. Infatti, lo zinco sostituisce il ferro nel gruppo eme formando una ZPP, che è un complesso di colore rosso stabile (40,42-

44,57). Ora poiché è stata evidenziata la presenza di nitriti e nitrati in concentrazioni superiori a 60-70 mg/kg in diverse confezioni di prosciutti crudi riportanti in etichetta la dicitura prosciutto di San Daniele, lo scopo del lavoro è stato quello di verificare la concentrazione naturale di tali additivi in materie prime (carni, sale), coadiuvanti tecnologici (sugna) utilizzati per produrre prosciutti di San Daniele e in prosciutti di San Daniele maturati oltre i 14 mesi. Inizialmente, si sono valutati i parametri Aw e Umidità dei prosciutti oggetto dell'analisi, al solo fine di determinare il loro livello di stabilità considerando che non è permesso l'uso del nitrito o del nitrato. La valutazione dell'umidità ha permesso di calcolare la concentrazione dei nitriti/nitrati "naturali" rispetto alla sostanza secca.

Durante la disidratazione e la successiva stagionatura si osserva una lenta ma progressiva perdita di umidità, che porta poi anche per la presenza di sale alla stabilizzazione del prosciutto. Tale riduzione dipende dalla carne utilizzata, dalle condizioni di asciugatura, dalle Umidità Relative e dalla temperatura delle celle in cui i prosciutti sono processati (10,11). La velocità del decremento dell'Aw influenza l'attività enzimatica e conseguentemente le caratteristiche sensoriali del prodotto finito (28). Nel caso dei prosciutti considerati in questo studio si osserva una ampia variabilità dei livelli di Aw e di umidità; variabilità indipendente dai tempi di maturazione. Infatti, si osserva che vari prosciutti, pur avendo tempi di asciugatura diversi, compresi tra i 14 e i 19 mesi, presentano stesse Aw e umidità. Ciò è dovuto a differenze registrate a livello della materia prima, utilizzata e dalla tecnologia applicata che varia tra un sito produttivo e l'altro. Tut-

tavia, tale variabilità non influenza la salubrità e la stabilità dei prosciutti considerati perché indipendentemente dai tempi di stagionatura alla fine i prosciutti presentano un livello di Aw inferiore a 0,92 e ciò li rende stabili, idonei alla conservazione in toto, in tranci o all'affettamento e soprattutto salubri ed edibili (10-12). Inoltre, i parametri Aw e Umidità osservati sono simili a quelli riportati in studi di altri autori (14,15,32,42-45). Solo prosciutti maturati per tempi inferiori ai 14 mesi possono presentare livelli di Aw e umidità superiori ai parametri osservati in questo studio. Infatti, considerata la tendenza oggi diffusa di ridurre i tempi di stagionatura spesso si osserva la commercializzazione di prosciutti con umidità medie del 63,52% e comprese tra il 61,11% e il 67,13% (4,14) e prosciutti con Aw medie di 0,899 e quindi accettabili, ma con valori di minima e di massima ampi e compresi tra 0,822 e 0,945 (6,14). Aw superiori a 0,92 non assicurano stabilità al prosciutto e sicuramente non lo rendono adatto all'affettamento. Comunque, la variabilità dell'Aw nei prosciutti crudi è ampia e in particolare può superare di molto il valore di 0,92 (14,32) o essere al di sotto di essa, da 0,80 a 0,89 (6). Nel caso del prosciutto di San Daniele, come anche da noi osservato, esiste una ampia variabilità nei parametri umidità e Aw, ma in ogni caso il controllo che il prodotto subisce per ottenere la DOP, permette la marchiatura e la commercializzazione di un prosciutto con Aw sempre inferiore a 0,92.

Il sale è un importante ingrediente per la produzione dei prosciutti. Infatti, la salatura, che consiste nel distribuire il sale sul muscolo esposto e parte sulla cotenna delle cosce, è la prima fase tecnologica nella produzione del pro-

sciutto (35) e in particolare del prosciutto di San Daniele. Si usa sale marino, umido di grana media, senza l'aggiunta di altri ingredienti quali il nitrito e il nitrato. Il capitolato di produzione della DOP prevede solo sale senza nitrito. Il sale inibisce lo sviluppo di microrganismi alteranti e/o patogeni e solubilizza le proteine sale solubili, che verranno degradate dagli enzimi tissutali, responsabili della maturazione; anzi il sale attiva tali enzimi e soprattutto le catepsine D (54,55). Tuttavia, il sale può contenere come impurezza nitriti e nitrati. Conseguentemente si è ricercato la presenza di tali composti nei sali impiegati per la salatura delle cosce in San Daniele. Dai dati è emerso che l'apporto di nitriti e nitrati al prosciutto tramite il sale è irrisorio. Infatti, considerata la percentuale di sale nel prodotto finito (max. 6-7%, 60-70 g/kg), se ne deduce che la sua aggiunta alle carni apporta un incremento dei nitriti e dei nitrati rispettivamente dello 0,1 mg/kg e 0,4 mg/kg. Tale incremento è accettabile. Tuttavia, si è voluto definire un valore soglia della concentrazione dei nitriti e dei nitrati anche per il sale, e tale valore è rispettivamente di 6 mg/kg e 24 mg/kg. Stesso discorso deve essere fatto per la sugna. Questa viene considerata un coadiuvante tecnologico. Viene, infatti, usata per ammorbidire la superficie del muscolo esposto per evitare la sua incrostazione e favorire quindi una omogenea disidratazione durante le fasi finali della stagionatura (10-12). Il pepe della sugna può contenere nitriti e nitrati. Dai dati è emersa una presenza contenuta di entrambi gli additivi. E anche in questo caso l'apporto della sugna all'incremento di nitriti e nitrati nel prosciutto è irrisorio e nettamente inferiore a quello dato dal sale, nonostante la su-

gna contenga una concentrazione di entrambi i composti superiore a quella del sale, tanto più che il contatto avviene solo su una superficie parziale del prodotto e in una fase dove la migrazione del sale risulta minore visto il ridotto contenuto di acqua della massa. Anche per la sugna, comunque, si è stabilito un valore soglia che per il nitrito è 10 ppm, mentre per il nitrato 28 ppm.

La carne fresca può contenere nitriti e nitrati naturali (26,27), così come i prodotti di carne trattati solo con sale e zuccheri e i prodotti biologici non trattati con sostituti dei nitrati (1,30,36,47,56,58) e i valori riferiti concordano con quelli qui determinati. Per quanto riguarda l'origine si può ipotizzare che derivino dal metabolismo azotato dell'animale o dagli alimenti. Nei mammiferi è noto che l'ossido di azoto derivi dalla degradazione dell'arginina attraverso l'azione dell'enzima NO-sintetasi (19,20,22). Poi l'ossido di azoto prodotto, in presenza di emoglobina ossidata o l'enzima superossido dismutasi (5), viene ossidato a livello cellulare a nitrito o nitrato e questi vengono eliminati con le urine o le feci e in parte trattenuti nell'organismo. Infatti, è stato dimostrato che l'uomo e l'animale eliminano più nitrato di quello che ingeriscono (39). I nitriti, come i nitrati, possono derivare anche dai vegetali, utilizzati per l'alimentazione dei suini. Una volta ingeriti, i nitrati vengono ridotti dai batteri della saliva o da nitrato riduttasi endogene in nitriti (33,48). I nitriti vengono anche ingeriti direttamente in questa forma con il mangime, essendo noto che durante la conservazione dei vegetali si sviluppano batteri con capacità nitrato riduttrice come ad esempio *Staphilococchi*, *Micrococchi*

e Streptococchi (5,33), considerazioni che avvalorano il ritrovamento di nitriti e nitrati nelle carni fresche utilizzate per la produzione dei prosciutti di San Daniele. Anche in questo caso si è suggerito un limite soglia di accettabilità dei nitriti della carne utilizzata per la produzione di prosciutto di San Daniele. Si suggerisce di accettare la carne fresca quando la concentrazione dei nitriti è inferiore ai valori soglia di 14 mg/kg e dei nitrati inferiore a 42 mg/kg. In questo caso possono essere utili anche i valori soglia espressi sulla sostanza secca (44 mg/kg per i nitriti e 166 mg/kg per i nitrati) ai fini di evitare contestazioni legate al grado di umidità della carne; umidità che può variare a causa della genetica del suino, della tecnica di macellazione, della frollatura, del tempo e della temperatura di conservazione della carne prima della salatura. Tali valori soglia sono inferiori a quelli proposti per carni di diverse specie animali da lammarino e Di Taranto (26). Questi in un'indagine su carni fresche di diverse specie del mercato italiano hanno trovato concentrazioni di nitrato comprese tra 10,2 e 36,5 mg/kg e concentrazioni di nitrito inferiori al limite soglia del metodo (4,5 mg/kg). Considerando la variabilità della distribuzione dei nitrati, gli stessi autori hanno suggerito un valore soglia massimo ammissibile di 30 mg/kg di nitrati in carni fresche suine o bovine e di 40 mg/kg in carni fresche equine; valori soglia simili a quelli proposti in questa sede.

La parte più importante del lavoro ha riguardato la valutazione della concentrazione "naturale" dei nitriti e dei nitrati nei prosciutti crudi di San Daniele. Lo scopo, ribadiamo, è stato quello di definire i livelli della loro presenza

naturale ai fini di contrastare una loro aggiunta illegale. A tal proposito per evitare di incorrere in sterili discussioni riguardanti la correlazione della concentrazione di tali composti e il livello di maturazione del prosciutto, è stata formulata anche una proposta di valore soglia, oltre il quale i livelli determinati possono essere ragionevolmente considerati non naturali, bensì frutto di un'aggiunta intenzionale o nel caso del sale e della sugna, non adatti all'impiego per questa produzione come descritto sopra nei risultati.

Quanto proposto corrisponde anche a quanto riportato da diversi autori che hanno ampiamente studiato l'evoluzione dei nitriti e nitrati in carni in pezzi durante la loro maturazione (18,49,50). È riportato che dopo un'aggiunta di concentrazioni di nitrato (150 mg/kg) in carni suine e/o bovine, si osserva una netta riduzione dello stesso dovuta alla sua riduzione a nitrito e a una comparsa di quest'ultimo. In ogni caso la concentrazione residua media di entrambi risulta superiore a quella "naturale". In particolare, i valori riscontrati sono sempre superiori a 40 mg/kg (nitrito) e 26 mg/kg (nitrato) sul pezzo tal quale (18,50). Tale concentrazione aumenta in caso di aggiunta iniziale superiore ai 150 mg/kg di nitrato o pari a 250 mg/kg di un mix di nitrito e nitrato (3,13,23-25).

## Conclusioni

Il metodo utilizzato per la determinazione dei nitriti e dei nitrati si è dimostrato valido, efficiente, semplice. Del resto il suo impiego viene suggerito e/o reso obbligatorio da numerose Or-

ganizzazioni internazionali per la standardizzazione dei Metodi (EPA, AOAC, ISO, CEN, ecc.). Per questo motivo, in questa sede, il metodo utilizzato non è stato confrontato con altri metodi della letteratura. In ogni caso citiamo Merino (37), che ha prodotto e proposto un nuovo metodo simile a quello utilizzato in questa sede con la sola variante costituita da una colonna di riduzione allo zinco al posto di quella al cadmio e l'ha confrontato con i metodi CEN (HPLC, 8) e ISO (simile al nostro con colonna al cadmio).

Lo scopo è stato quello di ottenere un metodo di facile applicazione, poco costoso e rispettoso dell'ambiente, considerando l'utilizzo della colonna allo zinco e l'eliminazione di quella al cadmio. Il nuovo metodo ha ottenuto risultati in buon accordo con quelli ottenuti utilizzando gli altri metodi. Quindi ha indirettamente confermato l'efficacia del metodo qui utilizzato.

I dati ottenuti hanno dimostrato che la concentrazione dei nitriti e nitrati nei prosciutti crudi di San Daniele DOP deve essere considerata naturale quando è, rispettivamente, inferiore a 4 e 22 mg/kg sul prodotto maturato e indipendentemente dal tempo di maturazione. In ogni caso, a nostro avviso, l'aggiunta dei sali di nitrito o di nitrato nella produzione del prosciutto crudo di San Daniele DOP è inutile, perché come abbiamo dimostrato la tecnologia applicata, consistente in una salatura a temperatura di refrigerazione, la disidratazione e la successiva maturazione permettono di ottenere un prodotto stabile caratterizzato da una bassa  $A_w$  ( $\leq 0,92$ ) e da un colore uniforme e ampiamente accettabile.

## Bibliografia

- (*Il Purcitàr te tradizion furlane*) a cura di Iacumin L.; 9, 198-199, 2015.
- 1) Ahn D.U. & Maurer A.J. "Concentration of nitrate and nitrite in raw turkey breast meat and the microbial conversion of added nitrate and nitrite in tumbled turkey breast meat". *Poultry Sci.*; 66, 12, 1957-1960, 1987.
  - 2) AOAC. "Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists", 15<sup>th</sup> ed. Arlington, TX USA. 973.31, 1990.
  - 3) Armenteros M., Aristoy M.C. & Toldrá F. "Evolution of nitrate and nitrite during the processing of dry-cured ham with partial replacement of NaCl by other chloride salts". *Meat Sci.*; 91, 378-381, 2012.
  - 4) Benedini R., Parolari G., Toscani T. & Virgili R. "Sensory and texture properties of Italian typical dry-cured hams as related to maturation time and salt content". *Meat Sci.*; 90 (2), 431-437, 2012.
  - 5) Benjamin N. & Collins J. "Nitrite" Chapter 6 in In: Russell N.J., Gould G.W. (eds) *Food Preservatives*. Springer, Boston, MA. pp. 102-118, 2003.
  - 6) Bjarnadottir S.G., Lunde K., Alvseike O., Mason A. & Al-Shamma'a A.I. 2015. "Assessing quality parameters in dry-cured ham using microwave spectroscopy". *Meat Sci.*; 108, 109-114, 2015.
  - 7) Cantoni C. & Bianchi Paleari M.A. "Nitrat, nitrit, nitrosamine e cancro". *Arch. Vet. It.*; Suppl. 2, 1980.
  - 8) CEN (European Committee for Standardisation) (2004) *Foodstuffs—determination of nitrate and/or nitrite—part 3: spectrometric determination of nitrate and nitrite content of meat products after enzymatic reduction of nitrate to nitrite*. Brussels.
  - 9) Chow C.K. & Hong C.B. "Dietary vitamin E and selenium and toxicity of nitrite and nitrate". *Toxicology*; 180, 195-207, 2002.
  - 10) Comi G. & Iacumin L. "Il salame friulano: tecnologia di produzione, microbiologia e difetti" *Manuale del Norcino*
  - 11) Comi, G. & Iacumin L. "Alimenti di origine animale e prodotti ittici" in "Microbiologia degli Alimenti" G. Gobetti, M. Vincenzini, G.A. Farris, E. Neviani eds., Ambrosiana Editrice, Milano, 2012.
  - 12) Comi G. & Cattaneo P. "Il prosciutto crudo in L.S. Cocolin e G. Comi, *Microbiologia Applicata alle produzioni alimentari*. Aracne Editrice, Roma, 2007.
  - 13) Comi G., Urso R., Iacumin L., Rantsiou K., Cattaneo P., Cantoni C. & Cocolin L. "Characterisation of Natural Fermented Sausages Produced in the North East of Italy". *Meat Sci.*; 69, 381-392, 2005.
  - 14) Cviková P., Juraj Čuboň J., Kunová S., Kačániová M., Hleba L., Haščík P., Trembecká L. & Bartošová G. "Chemical and physical parameters of dried salted pork meat". *Potravinarstvo*; 10 (1), 418-423, 2016.
  - 15) Dall'Asta C., Galaverna G., Bertuzzi T., Noseriti A., Pietri A., Dossena A. & Marchelli R. "Occurrence of chratoxin A in raw ham muscle, salami and dry-cured ham from pigs fed with contaminated diet". *Food Chemistry*; 120 (4), 978-983, 2010.
  - 16) European Commission. Commission Regulation (EU) No 1129/2011 of 11 November 2011 amending Annex II to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council by establishing a Union list of food additives. *Official Journal of the European Union*, L295, 1-177, 2011.
  - 17) Food Chain Evaluation Consortium. "Study on the monitoring of the implementation of Directive 2006/52/EC as regards the use of nitrites by industry in different categories of meat products" *European Commission*, 1-284, 2016.
  - 18) Frittoli M., Cantoni C. & Merlino M. "Osservazioni sulle variazioni quantitative di nitrati e nitriti durante la salagione delle carni". *S&TA*; Anno II, 4, 227-231, 1972.
  - 19) Green L.C., Tannenbaum S.R., and Goldman P. (1981a) Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. *Science*, 212, 56-58.
  - 20) Green L.C., Ruiz de Luzuriaga K., Wagner D.A., Rand W., Istfan N., Young V.R. & Tannenbaum S.R. "Nitrate biosynthesis in man" *Proceedings of the National Academy of Science USA*; 78, 7764-7768, 1981.
  - 21) Hecht S.S. "Approaches to cancer prevention based on an understanding of N-nitrosamine carcinogenesis". *Processings of the Society for Experimental Biology and Medicine*; 216, 181-191, 1997.
  - 22) Hibbs J.B.Jr, Westenfelder C., Taintor R., Vavrin Z., Kablitz C., Baranowski R.L., Ward J.H., Menlove R.L., McMurry M.P., Kushner J.P. *et al.* "Evidence for cytokine-inducible nitric oxide synthesis from L-arginine in patients receiving interleukin-2 therapy". *J. Clin. Inv.*; 89, 867-877, 1992. [Published erratum appears in *Clin. Inv.*; (1992), 90, 295].
  - 23) Honikel K.O. "The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products". *Meat Sci.*; 78, 68-76, 2008.
  - 24) Hospital X.F., Hierro E., Arnau J., Carballo J., Aguirre J.S., Gratacós-Cubarsí M. & Fernández M. "Effect of nitrate and nitrite on *Listeria* and selected spoilage bacteria inoculated in dry-cured ham". *Food Res. Int.*; 101, 82-87, 2017.
  - 25) Hu T.M. & Chen Y.J. "Nitrosation-modulating effect of ascorbate in a model dynamic system of coexisting nitric oxide and superoxide". *Free Radical Res.*; 44, 552-562, 2010.
  - 26) Iammarino M. & Di Taranto A. "Nitrate e nitrite in fresh meats: a contribution to the estimation of admissible maximum limits to introduce in directive 95/2/EC". *Int. J. Food Sci. Technol.* 47, 1852-1858, 2012.
  - 27) Iammarino M, Di Taranto A, Cristino M. "Endogenous levels of nitrites and nitrates in wide consumption foodstuffs: results of five years of official controls and monitoring". *Food Chem.*; 140, 763-771, 2013.
  - 28) Jiménez-Colmenero F., Pintado T., Cofrades S., Ruiz-Capillas C. & Bastida S. "Production variations of nutritional composition of commercial meat products". *Food Res. Int.*; 43 (10), 2378-2384, 2011.

- 29) Jurado A., Garcia C., Timon M.L. & Carapiso A.I. "Effect of ripening time and rearing system on amino acid- related flavour compounds of Iberian ham". *Meat Sci.*; 75 (4), 585-594, 2007.
- 30) Kemp J.D., Langlois B.E., Fox J.D. & Varney W.Y. "Effect of curing ingredients and holding times and temperatures on organoleptic and microbiological properties of dry-cured sliced hams". *Food Sci.*: 40(3) 634-636, 1975.
- 31) Kim Y.H.B., Kemp R. & Samuelsson L.M. "Effects of dry-aging on meat quality attributes and metabolite profiles of beef loins". *Meat Sci.*; 111 (1), 168-176, 2016.
- 32) Kunová S., Juraj Čuboň J., Bučko O., Kačániová M., Tkáčová J., Hleba L., Haščík P. & Lopašovský L. "Evaluation of dried salted pork ham and neck quality". *Potravinárstvo*; 9 (1), 509-514, 2015.
- 33) Li H., Duncan C., Townend J., Killham K, Smith L.M., Johnston P., Dykhuizen R., Kelly D., Golden M., Benjamin N. & Leifert C. "Nitrate-reducing bacteria on rat tongues". *Appl. Environ. Microbiol.*; 63, 924-930, 1997.
- 34) Lorigo L., Estévez M., Ventanas J. & Ventanas S. "Salt and intramuscular fat modulate dynamic perception of flavour and texture in dry-cured hams". *Meat Sci.*; 107, 39-48, 2015.
- 35) Martínez-Onandi N., Rivas-Cañedo A., Nuñez M. & Picon A. "Effect of chemical composition and high pressure processing on the volatile fraction of Serrano dry-cured ham". *Meat Sci.*; 111 (1), 130-138, 2016.
- 36) Meah M.N., Harrison N. & Davies A. "Nitrate and nitrite in foods and the diet". *Food Add. Contam.*; 11 (4), 519-532, 1994.
- 37) Merino L. "Development and Validation of a Method for Determination of Residual Nitrite/Nitrate in Foodstuffs and Water After Zinc Reduction". *Food Anal. Methods*, 2, 212-220, 2009.
- 38) Mirna A. & Schütz G. "Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung des Pökelfarbstoffes sowie von Nitrit und Nitrat in Fleischerzeugnissen". *Fleischwirts.*; 52, 1337-1338, 1972.
- 39) Mitchell H.H., Shonle H.A. & Grindley H.S. "The origin of the nitrates in the urine". *J. Biol. Chem.*; 24, 461-490, 1916.
- 40) Møller J.K.S., Adamsen C.E. & Skibsted L.H. "Spectral characterisation of red pigment in Italian-type dry-cured ham. Increasing lipophilicity during processing and maturation". *Eur. Food Res. Technol.*; 216, 290-296, 2003.
- 41) Neethling J., Hoffman L.C. & Muller M. "Factors influencing the flavour of game meat: A review". *Meat Sci.*; 113 (3), 139-153, 2016.
- 42) Parolari G., Benedini R., Toscani T. "Color Formation in Nitrite-Free Dried Hams as Related to Zn-Protoporphyrin IX and Zn-Chelatase Activity". *J. Food Sci.*; 74 (6), C413-C418, 2009.
- 43) Parolari G., Gabba L. & Bertoli C. "The colour issue of nitrite-free dry cured ham". In: *Proceedings of the Third Dry Cured Ham World Congress on science, technology and marketing*; 2005 May; Teruel, Spain: Aragon Vivo.
- 44) Parolari G., Gabba L. & Saccani G. "Extraction properties and absorption spectra of dry cured hams made with and without nitrate". *Meat Sci.*; 64, 483-90, 2003.
- 45) Pegg R.B. & Shahidi F. "Nitrite curing of meat, the N-nitrosamine problem and nitrite alternatives". *Trumbull: Food and Nutrition Press Inc.*, 2000.
- 46) Ruiz J., García C., Muriel E., Andrés A.I. & Ventanas J. "Influence of sensory characteristics on the acceptability of dry-cured ham". *Meat Sci.*; 61 (4), 347-354, 2002.
- 47) Sebranek J.G. & Bacus J.N. "Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues?" *Meat Sci.*; 77, 136-147, 2007.
- 48) Sasaki T. and Matano K. (1979) Formation of nitrite from nitrate at the dorsum linguae. *J. Food Hyg. Soc. of Japan*; 20, 363-369.
- 49) Sebranek J.G. & Bacus J.N. "Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: What are the issues?" *Meat Sci.*; 77, 136-147, 2007.
- 50) Simonetti P., Cantoni C., Gaspari G.C. & Bianchi Paleari M.A. "Funzione dei nitriti e nitrati nella maturazione degli insaccati crudi stagionati". *Ind. Alim. Aprile*; 320-326, 1984.
- 51) Skibsted L.H. "Nitric oxide and quality and safety of muscle based foods". *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, 24, 176-183, 2011.
- 52) Toldrá F. "Ham: Dry-cured Ham. In: *Caballero et al. Encyclopedia of food and health*, Kidlington, Oxford: Academic Press, p. 307-310, 2016.
- 53) Toldrá F., Aristoy, M.C. & Flores, M. "Relevance of nitrate and nitrite in dry-cured ham and their effects on aroma development". *Grasas y Aceites*; 60, 291-296, 2009.
- 54) Toldrá F. "Ham". In Y.H. Hui, R. Chandan, S. Clark, N. Cross, J. Dobbs & W.J. Hurst et al. (Eds.), *Handbook of food product manufacturing*; vol. 2, pp. 231-247. NY: John Wiley Interscience, 2007.
- 55) Toldrá F. "Dry-cured ham. In Y. H. Hui (Ed.), *Handbook of food science technology and engineering*", vol. 4., pp. 164-1-164-1, Boca Raton, FL: CRC Press, 2006.
- 56) Usher C.D. & Telling G.M. "Analysis of nitrate and nitrite in foodstuffs: a critical review". *Sci. Food and Agricult.*; 26 (11), 1793-1805, 1975.
- 57) Wakamatsu J., Nishimura T. & Hattori A. "A Zn-porphyrin complex contributes to bright red color in Parma ham. *Meat Sci.*; 67:95-100, 2004.
- 58) Ysart G., Miller P., Barrett G., Farrington D., Lawrence P. & Harrison N. "Dietary exposures to nitrate in the UK". *Food Add. Contam.*; 16(12), 521-532, 1999.
- 59) Zhao Y., Abbar S., Amoah B., Phillips T.W., Schilling, M.W. "Controlling pests in dry-cured ham: A review. *Meat Sci.*; 111 (1), 183-191, 2016.