

ACTIVITATEA ANTIOXIDANTĂ A UNOR COMPUȘI DIN PRODUSE SECUNDARE VINICOLE LA REDUCEREA NITRITULUI

Maria GONȚA, Diana PORUBIN

Catedra Chimie Industrială și Ecologică

In the stomach, the dietary nitrite reacts with the nitrosable substrates (amines, amides, etc.) forming carcinogenic N-nitroso compounds. The process of inhibition of NOC formation is based on the reduction of the nitrite to NO, which is not a direct nitrosating agent. Considering all this, we have decided to study the nitrite reduction, using various compounds, as: quercetin (Que), (+)catechin ((+)Ct), rezveratrol (Rezv), dihydroxyfumaric acid (DFH), the dimethylic ester of the dihydroxyfumaric acid (EDMD), the dimethylic ester of the tartaric acid (EDMT) and ascorbic acid (AA) used as reference.

We obtained that the increase of the reductants concentration leads to the increase of the reduction rate of nitrite, which indicates the existence of a dose dependent effect.

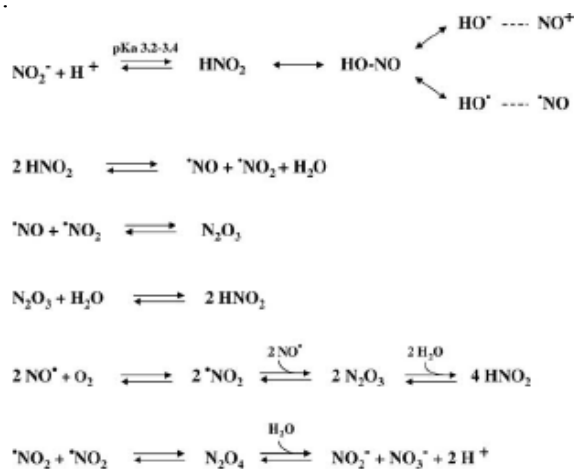
The reduction rate was investigated function of the pH value: 1.5, 2.6, 3.4, 4.6 and 5.6. The reductants and nitrite concentrations were of $1 \cdot 10^{-4}$ M. The best results were obtained at pH 1.5 for all reductants. Thus, the pH has a direct influence on nitrite reduction.

The most efficient nitrite-reducing agents are Cver, (+)Ct, Rezv, and DFH₄, followed by EDMD and AAs, whereas EDTM showed very weak antioxidant properties. This can be explained by the chemical structure of the investigated compounds and their behavior in various reaction media.

Introducere

Creșterea interesului științific privind generarea N-nitrozocompușilor cancerigeni din nitratul și nitritul alimentar [1] în tractul gastrointestinal [2] clasează acest domeniu ca unul prioritar. Acest proces poate decurge în stomac datorită acidifierii nitritului cu formarea acidului nitric și a agenților de nitrozare [3].

Sursa principală de nitrit în stomac este saliva înghițită care conține o concentrație substanțială de nitrit ce derivă din circuitul entero-salivar al nitratalui alimentar. Nitratalui este absorbit din intestinul subțire, dar cca 25% este reciclat în glandele salivare și resecretat în cavitatea bucală [4,5]. Bacteriile reduc cca 30% din acest nitrat până la nitrit [6,7]. Astfel, în condiții normale, conținutul de nitrit salivar este de cca 50 μM, dar crește până la 200 μM după utilizarea alimentelor din dieta alimentară, cu un conținut de nitrat de 2 mmol [8]. S-a constatat că concentrația de nitrit din esofag este similară cu cea din salivă [9]. Atunci când secreția alimentară ajunge în sucul gastric acid, nitritul este convertit în acid nitric și diferiți agenți de nitrozare, cum ar fi NO⁺, N₂O₃ [26]. Aceste specii pot interacționa în continuare cu moleculele N-nitrozabile cu formarea ulterioară a N-nitrozocompușilor.



N-nitrozocompuși sunt cancerigeni potențiali datorită abilității lor de a alchila moleculele de AND [3].

Micșorarea expunerii omului față de NOC endogen-formați, ca o cale de prevenire a cancerului, este posibilă prin utilizarea inhibitorilor proceselor de nitrozare. Astfel, acidul ascorbic și ascorbatul sunt cunoscuți ca inhibitori ai procesului de nitrozare prin reacția cu agenții de nitrozare [10-14]. S-a constatat [27] că acidul

ascorbic (AAs) este unul dintre cei mai efectivi antioxidanți cu greutate moleculară mică în plasmă. Cercetările experimentale au demonstrat că AAs inhibă formarea N-nitrozaminelor; prin urmare, poate preveni dezvoltarea cancerului [28]. Acidul ascorbic sau vitamina C poate contracara efectul apariției cancerului sistemului gastrointestinal și al cavității bucale [29-32]. Astfel, efectul protectiv al AAs s-a observat în diferite varietăți de cancer ce includ: laringeal, esofagal, pancreatic, gastric, colorectal, cervical și cancerul vezicii urinare [28].

Deoarece AAs este un captor de radicali liberi, este posibil ca el să blocheze procesul de nitrozare prin captarea radicalilor NO^{\bullet} și, prin urmare, să prevină nitrozarea. De asemenea, el poate să inhibe formarea cancerigenelor prin blocarea conversiei precursorilor (procancerigenelor) în cancerigeni și metaboliți cancerigeni [33].

În acest caz, AAs interacționează cu agenții de nitrozare (cum ar fi N_2O_3) și se oxidează la acid dihidroascorbic. La fiecare mol de AAs oxidat se formează doi moli de NO , care nu mai sunt agenți de nitrozare [34].

Compușii polifenolici, care pătrund în organism în cantități mari o dată cu dieta alimentară la utilizarea fructelor, sucurilor, vinurilor, la fel sunt potențiali agenți de blocare în formarea NOC [15-18]. Polifenolii includ un șir de compuși sintetizați de plante, cum ar fi: flavonoizii ce se găsesc în ceai (catehinele), izoflavonoizii din soia (ginisteinul și daidyeinul) și stilbenii din strugurii roșii (resveratrolul).

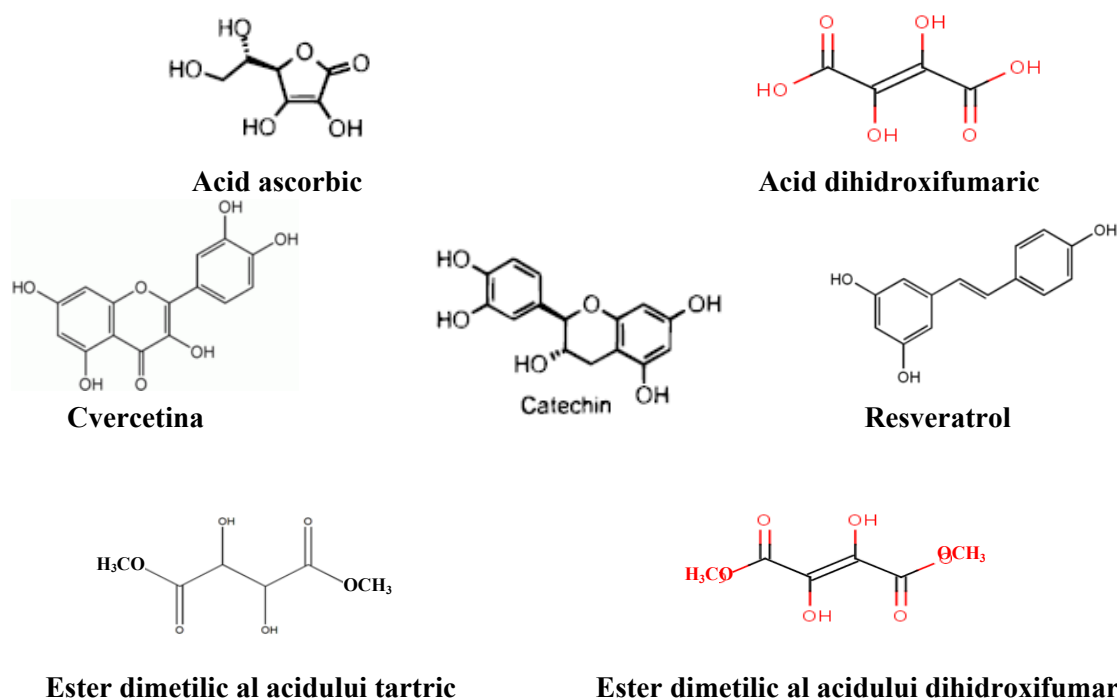
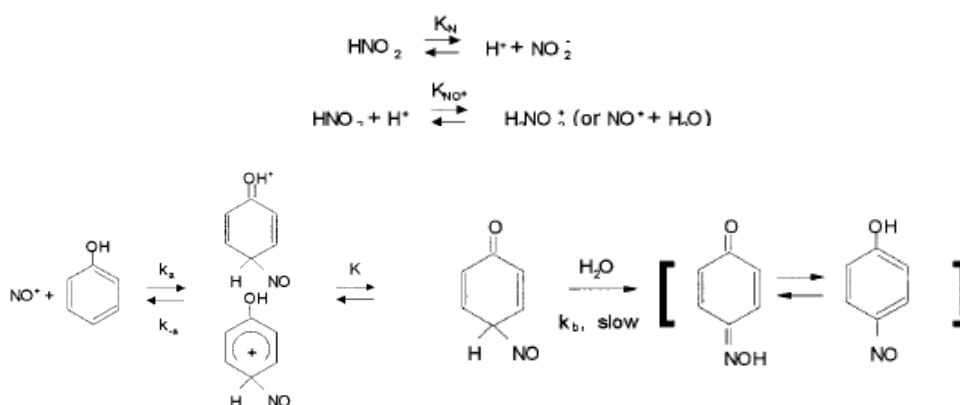


Fig.1. Structurile chimice ale unor compuși cu proprietăți antioxidante și reducătoare.

Fiecare dintre acești compuși au demonstrat proprietăți anticancerigene asupra culturilor de celule de cancer [19-21]. Din cauza complexității lor de acțiune, activitatea anticancerigenă a polifenolilor nu este îndeajuns cunoscută.

În mediul acid, fenolii de obicei interacționează cu nitriții mai rapid decât aminele [35]. 1,2- și 1,4-dihidroxifenolii, cum ar fi cateholul, hidrochinona, 1,2,3-trihidroxifenolii și mulți alți polifenoli naturali, inhibă formarea N-nitrozocompușilor. În același timp, este cunoscut că N-nitrozarea este catalizată de monohidroxifenoli [36], nu însă de toți polifenolii [37]. Activitatea catalitică se observă numai în cazul când concentrația agentului de nitrozare este în exces față de concentrația fenolului, dar această situație rar apare *in vivo* sau în mediul înconjurător [37]. Mecanismul de nitrozare al fenolilor poate fi explicat prin substituția electofilă aromatică cu participarea cationului de nitrozonium sau a ionului acidului azotos [35]:



Studiul cinetic al reacțiilor de nitrozare a fenolilor și a derivaților fenolici indică [35] la faptul că reactivitatea substratelor nitrozabile depinde de trei factori structurali: 1) poziția grupelor hidroxile și este preferabilă para-orientarea grupelor hidroxile în fenoli pentru atacul electrofilic al agenților de nitrare – $\text{NO}^+/\text{NO}_2\text{H}_2^+$; 2) efectul hiperconjugativ al substituenților metilici și 3) hidranța sterică a substituenților alchilici, care blochează partea activă a nitrozării.

Proprietățile antioxidante ale polifenolilor sunt determinate de procesul de blocare a radicalilor liberi [22-24] ce se formează în diferite sisteme *in vitro* și *in vivo*.

Material și metode

Cvercetina (Cver) – *Sigma-Aldrich, Germania*, acidul dihidroxifumaric (DFH_4) – *Sigma-Aldrich, Germania*; rezveratrolul – *Fluka*; (+)catehina – *Fluka*; esterul dimetilic al acidului dihidroxifumaric (EDMD) – *sintetizat* (Facultatea de Chimie și Tehnologie Chimică a USM); esterul dimetilic al acidului tartric (EDMT) – *sintetizat* (Facultatea de Chimie și Tehnologie Chimică a USM); acidul ascorbic (AAs), α -naftilamina, acidul sulfanilic (Fig.1).

Studiul experimental a fost efectuat după variația conținutului de nitrit în sistem. Pentru determinarea nitriților a fost utilizată metoda Griess, care constă în măsurarea intensității culorii zmeurii ($\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ nm}$) a compusului diazoc format în urma reacției de diazotare dintre acidul sulfanilic și nitriți și cuplarea ulterioară cu α -naftilamina. Proba analizată (2 ml) se amestecă cu același volum (2 ml) de reactiv Griess (amestec de volume egale de soluții ale α -naftilaminei și acidului sulfanilic), se agită și se lasă timp de 20-30 min. (nu mai mult de 4 ore) la întuneric, după care se măsoară absorbanta la lungimea de undă 520 nm față de soluția de comparație (reactiv Griess și apă distilată se ia în raport de 1:1).

Procesul de oxidoreducere în sistemul NO_2^- -Red a fost studiat în funcție de diferiți parametri fizico-chimici: variația concentrației reducătorilor, variația concentrației nitritului și variația mediului de reacție (pH). Timpul procesului a fost de 30 min. la temperatura de 37°C.

Rezultate și discuții

În studiul procesului de transformare a nitriților în funcție de concentrația reducătorilor, concentrația nitritului în sistem a fost de $1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, pH 2,6.

Deoarece acidul ascorbic este deja recunoscut ca un bun inhibitor al procesului de nitrozare, el a fost utilizat cu scop comparativ [25]. Pentru a compara efectul reducerii nitriților în prezența AAs cu efectul reducerii lor în prezența altor reducători, a fost studiată cinetica procesului de reducere a nitriților sub acțiunea diferitelor concentrații de AAs: $C_1 = 2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $C_2 = 5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $C_3 = 8 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $C_4 = 1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $C_5 = 5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. Din datele experimentale obținute s-a constatat că AAs micșorează $[\text{NO}_2^-]$ în sistem și cu creșterea $[\text{AAs}]_0$ viteza consumului de nitrit crește (Tab.1).

Din datele cinetice obținute s-a observat că reacția AAs cu NO_2^- are un comportament de cinetică rapidă (Fig.2. a). La variația $[\text{AAs}]_0$ de la C_0 până la C_5 viteza inițială crește de la $1 \cdot 10^{-7} \text{ Ms}^{-1}$ la $9,6 \cdot 10^{-7} \text{ Ms}^{-1}$. Concentrația nitriților scade în primul minut pentru $C=0$ cu $1,05 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ de nitrit, iar cu creșterea $[\text{AAs}]_0$ de la C_0 la C_5 , $\Delta C_{\text{NO}_2^-}$ crește: $1,3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $2,3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $2,4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $2,65 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ și $6,15 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ corespunzător (Fig.2).

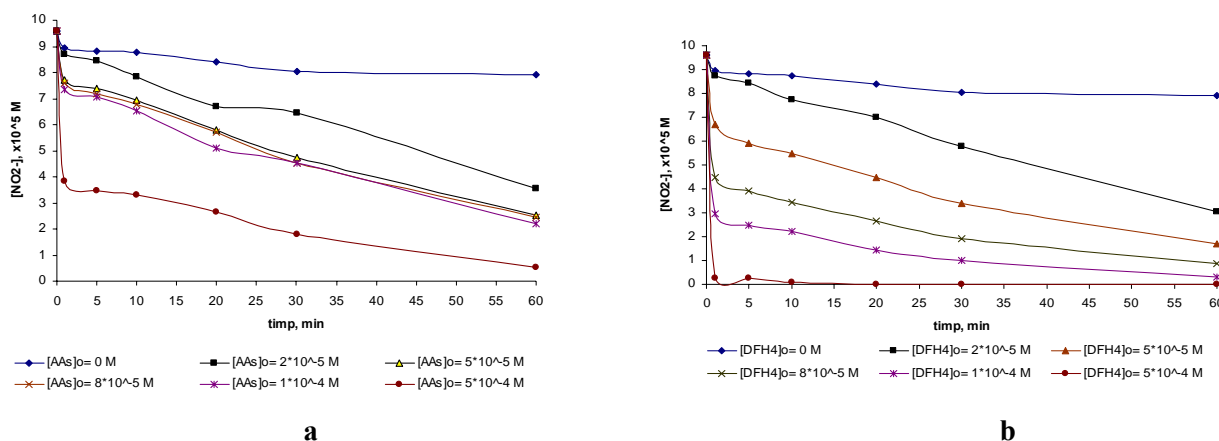


Fig.2. Curbele cinetice de reducere a nitritului cu AAs (a) și cu DFH₄ (b), $f[Red]_0$ (pH 2,6, $[NO_2^-]_0 = 1 \cdot 10^{-4}$ M, $t = 37^\circ C$).

Tabelul 1

Reducerea $[NO_2^-]$ în $f[AAs]_0$; $[NO_2^-]_0 = 1 \cdot 10^{-4}$ M; pH 2,6; $t = 37^\circ C$

$[Inhib]_0, \times 10^{-5}$ M	$V_{init} \times 10^7$ Ms ⁻¹	$[NO_2^-]$ redus la 30 min., %	Activitatea față de control, %
0,0	1,0	16,0	0
2,0	1,58	32,8	16,8
5,0	3,26	50,5	34,6
8,0	3,3	52,6	36,6
10,0	3,8	52,8	36,8
50,0	9,6	81,4	65,4

În continuare a fost studiat procesul de reducere a nitritului cu diferiți compuși reducători: Rezv, (+)Ct, Cver, DFH₄, EDMD, EDTM (Tab.2).

Tabelul 2

Reducerea $[NO_2^-]$ în $f[Red]_0$; $[NO_2^-]_0 = 1 \cdot 10^{-4}$ M; pH 2,6; $t = 37^\circ C$

În $f[Rezv]_0$				În $f[(+)-Ct]_0$		
$[Inhib]_0, 10^5$ M	$V_{init} 10^7$ Ms ⁻¹	$[NO_2^-]$, % redus la 30 min.	Activitatea față de control, %	$V_{init} 10^7$ Ms ⁻¹	$[NO_2^-]$, % redus la 30 min.	Activitatea față de control, %
0,0	1,08	16,0	0	1,08	16,1	0
2,0	1,95	53,0	37,0	2,83	59,7	43,6
5,0	2,80	64,6	48,0	3,5	66,7	50,6
8,0	3,66	76,6	60,6	4,0	74,3	58,2
10,0	6,33	84,9	68,9	5,7	85,0	68,9
50,0	-	-	-	9,0	98,4	82,3

În $f[Cver]_0$				În $f[DFH_4]_0$		
$[Inhib]_0, 10^5$ M	$V_{init} 10^7$ Ms ⁻¹	$[NO_2^-]$, % redus la 30 min.	Activitatea față de control, %	$V_{init} 10^7$ Ms ⁻¹	$[NO_2^-]$, % redus la 30 min.	Activitatea față de control, %
0,0	1,08	16,0	0	1,08	16,1	0
2,0	3,66	74,4	58,3	1,4	39,8	23,7
5,0	4,78	82,6	66,5	4,8	64,6	48,5
8,0	7,17	85,9	69,8	8,5	80,0	63,9
10,0	8,83	90,0	73,9	11,1	89,6	73,5
50,0	-	-	-	15,6	98,95	82,9

În f[EDMD] ₀				În f[EDMT] ₀		
[Inhib] ₀ , 10 ⁵ M	V _{iniț} , 10 ⁷ Ms ⁻¹	[NO ₂ ⁻], % reduc la 30 min.	Activitatea față de control, %	V _{iniț} , 10 ⁷ Ms ⁻¹	[NO ₂ ⁻], % reduc la 30 min.	Activitatea față de control, %
0,0	1,0	16,1	0	1,0	16,1	0
2,0	0,3	38,2	22,2	0,1	23,1	7,0
5,0	1,3	46,4	24,2	0,2	38,9	22,8
8,0	2,0	54,8	38,8	0,5	35,4	19,3
10,0	2,4	57,8	41,8	1,0	38,5	22,4
50,0	5,8	92,9	76,9	1,6	44,0	27,9

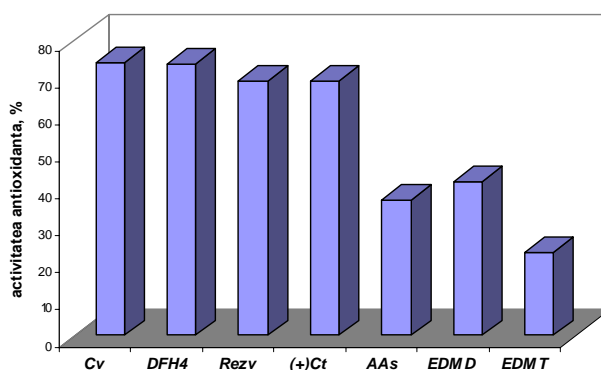


Fig.3. Activitatea antioxidantă față de control a compușilor testați;
[NO₂⁻]₀ = 1·10⁻⁴ M; [Red]₀ = 1·10⁻⁴ M; pH 2,6; t = 37°C.

Datele obținute indica asupra faptului ca cele mai bune proprietăți reducătoare posedă Cver, chiar și la concentrații mici. (+)Ct și Rezv la fel demonstrează capacități reducătoare bune, dar mai reduse decât cele pentru cvercetină. DFH₄ la concentrații mai mari de 1·10⁻⁴ M manifestă activitate antioxidantă comparabilă cu cea a polifenolilor (+)Ct, Rezv, Cver) – 73,5% față de 68,9%, 68,9% și 73,9%, respectiv. Esterii dimetilici ai acizilor dihidroxifumaric și tartric reduc nitritul în proporții mai mici, deși la concentrații mici EDMD, precum și AAs, se deosebesc neesențial de activitatea reducătoare a DFH₄. Activitatea mică a EDTM (atât pentru concentrații mici, cât și pentru concentrații mai mari) poate fi explicată prin lipsa legăturilor duble în structură, care joacă un rol esențial în procesul de reducere.

În continuare a fost studiată **influența pH-ului** mediului de reacție asupra reducerii nitritului cu diferiți reducători ([Red]₀ = 1·10⁻⁴ M, [NO₂⁻]₀ = 1·10⁻⁴ M). pH-ul mediului de reacție a fost variat: 1,5; 2,6; 3,4; 4,6; 5,6. Activitatea antioxidantă a reducătorilor în procesul de reducere a nitritului a fost calculată la 30 min. de reacție pentru fiecare pH (Fig.4).

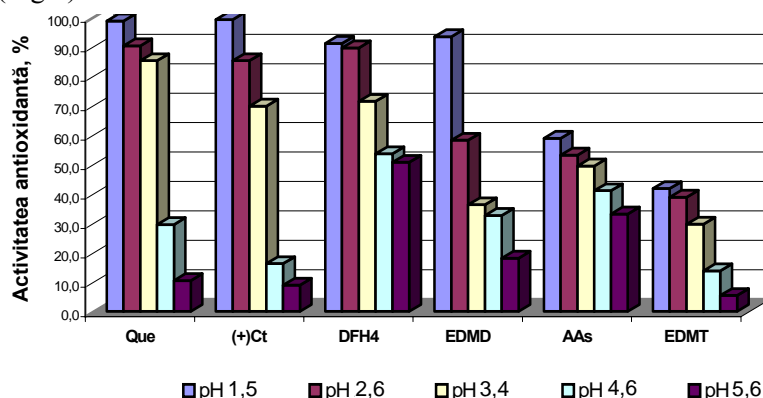


Fig.4. Activitatea antioxidantă a reducătorilor f(pH) timp de 30 min. de reacție
([NO₂⁻]₀ = [Red]₀ = 1·10⁻⁴ M, 30 min., t = 37°C)

pH-ul are o influență foarte mare asupra procesului de reducere a nitritului. Astfel, la pH mic gradul de reducere a nitritului este mai mare comparativ cu un pH mai mare. Concluzia este valabilă pentru toți reducătorii. Aceasta indică asupra faptului că reacția este acid-catalizată, ceea ce este pozitiv pentru procesul de inhibiție al formării NOC, care la fel decurge cu o viteză mai mare la un pH acid, prezent în stomac.

Prezintă interes activitatea polifenolilor Cver și (+)Ct la valori de pH mai mari de 4, pentru care se observă o scădere bruscă a activității de reducere a nitritului. În acest caz, concentrația formelor agenților de nitrozare (NO^+ și N_2O_4) se micșorează.

Concluzie

Compușii utilizați în calitate de reducători (Cver, (+)Ct, Rezv, AAs, DFH₄, EDMD, EDTM) micșorează concentrația nitriților în sistem prin reducerea lor. Creșterea concentrației reducătorilor duce la mărirea gradului de transformare a nitritului în sistem. Cei mai eficienți reducători ai nitritului s-au dovedit a fi Cver, (+)Ct și DFH₄. O influență mare asupra procesului de reducere a nitritului exercită pH-ul mediului. Cu creșterea pH-ului, viteza procesului de transformare a nitriților scade. Aceste legături se observă pentru toți reducătorii.

Referințe:

1. James Haorah, Lin Zhou, Xiaojie Wang, Guoping Xu, Sidney Mirvish. (2001) Determination of Total N-nitroso Compounds and Their Precursors in Frankfurters, Fresh Meat, Dried Salted Fish, Sauces, Tobacco, and Tobacco Smoke Particulates // *J. Agric.Food.Chem.*, 49, 6068-6078.
2. Dominique Pobel, Elio Riboli, Jacqueline Cornee, Bertrand Hemon and Monique Guyader. (1995) Nitrosamine, nitrate and nitrite in relation to gastric cancer: A case-control study in Marseille, France // *European Journal of Epidemiology* 11: 67-73.
3. Mirvish S.S. (1995) Role of N-nitroso compound (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. *Cancer Lett.*, 93, 17-48.
4. Walker R. (1990) Nitrates, nitrites and N-nitroso compounds: a review of the occurrence in food and diet and the toxicological implication // *Food Addit. Contam.*, 7, 717-768
5. Dougall H.T., Smith L., Duncan C. and Benjamin N. (1995) The effect of amoxycillin on salivary nitrite concentration: an important mechanism of adverse reaction? // *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 39, 460-462.
6. Badawi A., Hosny G., el-Hadary M., Mostafa M., (1998), Salivary nitrate, nitrite and nitrate reductase activity in relation to risk of oral cancer in Egypt // *Dis Markers* 14: 91-97.
7. Bos P.M.J., van den Brandt P.A., Wedel M., and Ockhuizen Th. (1988) The reproducibility of the conversion of nitrate to nitrite in human saliva after a nitrate load. // *Food chem. Toxicol.*, 26, 93-97.
8. Mowat C., Carswell A., Wirz A., and McColl K.E.L. (1999) Omeprazole and dietary nitrate independently affect levels of vitamin C and nitrite in gastric juice // *Gastroenterology*, 116, 813-822.
9. Suzuki H., Iijima K., Moriya A., McElroy K., Scobie G., Fyfe V. and McColl K.E.L. (2003) Condition for acid catalysed luminal nitrosation are maximal at the gastric cardia // *Gut.*, 52, 1095-1102.
10. Shibata A, Paganini-Hill A, Ross RK, and Henderson BE. (1992) Intake of vegetables, fruits, -carotene, vitamin C and vitamin supplements and cancer incidence among the elderly: a prospective study // *Br. J. Cancer* 66: 673-679.
11. Mirvish S.S. (1993) Role in cancer etiology of vitamin C inhibition of N-nitroso compound formation // *Am.J. Clin. Nutr.*, 57: 598-599.
12. Mirvish S.S. (1994) Experimental evidence for inhibition of N-nitroso compound formation as a factor in the negative correlation between vitamin C consumption and the incidence of certain cancers // *Cancer Res. (Suppl.)*, 54: 1948s-1951s.
13. Dyke G.W., Craven J.L., Hall R. and Garner R.C. (1994) Effect of vitamin C upon gastric mucosal O⁶-alkyltransferase activity and on gastric vitamin C levels // *Cancer Lett.*, 86: 159-165.
14. Wu Y.N., Wang H.Z., Li J.S., and Han C. (1993) The inhibitory effect of Chinese tea and its polyphenols on in vitro and in vivo N-nitrosation // *Biomed. Environ. Sci.*, 6: 237-258.
15. Helser M.A., Hotchkiss J.H., and Roe D.A. (1992) Influence of fruit and vegetable juices on the endogenous formation of N-nitrosoproline and N-nitrosothiazolidine-4-carboxylic acid in humans on controlled diets // *Carcinogenesis*, 13: 2277-2280.
16. Xu G.P., Song P.J., and Reed P.I. (1993) Effects of fruit juices, processed vegetable juice, orange peel and green tea on endogenous formation of N-nitrosoproline in subjects from a high-risk area for gastric cancer in Moping County, China // *Eur. J. Cancer Prevent.*, 2: 327-335.

17. Kurech T., Kikugawa K., and Fukuda S. (1980) Nitrite-reacting substances in Japanese radish juice and their inhibition of nitrosamine formation // *J. Agric. Food Chem.*, 28: 1265-1269.
18. Park O.J., and Surh Y.J. (2004) Chemopreventive potential of epigallocatechin gallate and genistein: evidence from epidemiological and laboratory studies // *Toxicol. Lett.*, 150: 43-56.
19. Barnes S. and Peterson T.G. (1995) Biochemical targets of the isoflavone genistein in tumor cell lines // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 208: 103-108.
20. Mgbonyebi O.P., Russo J. and Russo I.H. (1998) Antiproliferative effect of synthetic resveratrol on human breast epithelial cells // *Int. J. Oncol.*, 12: 865-869.
21. Nguyen T., Brunson D., Crespit C.L., Penman B.W., Wishnok J.S. and Tannenbaum S.R. (1992) DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 3030-3034.
22. Kono Ya, Shibata H., Kodama Ya., Sawa Yo. (1995) The suppression of the N-nitrosation reaction by chlorogenic acid // *Biochem.J.*, 312, 947-953
23. Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. (1995) Use of a Free Radical method to Evaluate Antioxidant Activity // *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.*, 28, 25-30
24. Bondet V., Brand-Williams W., Berset C. (1997) Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH• Free Radical method // *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.*, 30, 609-615
25. Iijima K., Grand J., McElroy K., Fyfe V., Preston T. and McColl K.E.L. (2003) Novel mechanism of nitrosative stress from dietary nitrate with relevance to gastro-oesophageal junction cancers // *Carcinogenesis*, 24,12, 1951-1960.
26. Radcliffe Ch.E., Lamb R., Blinkhorn A.S., Drucker D.B. (2003) Effect of sodium nitrite and ascorbic acid on the growth and acid production of *Streptococcus* mutants // *Journal of Dentistry*, 31, 5: 367-370(4)
27. Chan S.W.Y., Reade P.C. (1998) The role of ascorbic acid in oral cancer and carcinogenesis // *Oral Dis*;4:120-9.
28. Melnikov O.R. (1998) Effects of endogenous N-nitrosodiethylamine and blocking of its synthesis with ascorbic acid on the condition of the liver monooxygenase system // *Technol Health Care*;6:131-7.
29. Duncan C., Dougall H., Johnston P. et al. (1995) Chemical generation of nitric oxide in the mouth from the entero salivary circulation of dietary nitrate // *Nat. Med.*;1:546-51.
30. Goaz P.W., Biswell H.A. (1961) Nitrate reduction in whole saliva // *J. Dent Res.*;40:355.
31. Gonzalez C.A., Riboli E., Badosa J. et al. (1994) Nutritional factors and gastric cancer in Spain // *Am. J. Epidemiol.*; 139:466-73.
32. Van Loon A.J.M, Botterweck A.A.M, Goldbohm R.A. et al. (1998) Nitrate and nitrite intake and gastric cancer // *Brit. Med. J.*; 78: 129-35.
33. Licht W.R., Tannenbaum S.R., Deen W.M. (1988) Use of ascorbic acid to inhibit nitrosation: kinetic and mass transfer considerations for an in vitro sytem // *Carcinogenesis* 9: 365-372.
34. Mancebo S.G., Pilar M., Santos G, Hernandez J. and Casado J. (1999) Nitrosation of Phenolic Compounds: Inhibition and Enhancement // *J. Agric. Food. Chem.*; 47, 2235-2240.
35. Mende P., Wacker C.D. Preussmann R., Splegelhalder B. (1993) Nitrosation of the antimicrobial drug hexetidine: Nitrosamines derived from triamine decomposition product // *Food Chem. Toxicol.*; 31,53.
36. Loeppky R.N., Bao Y.T., Bae J., Yu. L., Shevlin C. (1994) Blocking Nitrosamine formation. Understanding the Chemistry of Rapid Nitrosation. In *Nitrosamines and Related N-Nitroso Compounds Chemistry and Biochemistry* // American Chemical Society. – Washington: DC; 52-65.

Prezentat la 01.03.2007