UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FCF / FEA / FSP
Programa de Pós-Graduação Interunidades
em Nutrição Humana Aplicada – PRONUT

WELLITON DONIZETI POPOLIM

Análise de sulfitos em sucos de frutas e estimativa de seu consumo por escolares

Tese para obtenção do grau de
Doutor
Orientadora:
Profa. Dra. Marilene De Vuono
Camargo Penteado

São Paulo
2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FCF / FEA / FSP
Programa de Pós-Graduação Interunidades
em Nutrição Humana Aplicada – PRONUT

WELLITON DONIZETI POPOLIM

Análise de sulfitos em sucos de frutas e estimativa de seu consumo por escolares

Tese para obtenção do grau de
Doutor
Orientadora:
Profa. Dra. Marilene De Vuono
Camargo Penteado

São Paulo
2009

WELLITON DONIZETI POPOLIM

Análise de sulfitos em sucos de frutas e estimativa de seu consumo por escolares

Comissão Julgadora
Tese para obtenção do grau de Doutor

_____
Profa. Dra. Marilene De Vuono Camargo Penteado (FCF-USP)
(Orientador/Presidente)

_____
Prof. Dr. Koiti Araki (IQ-USP)
1° Examinador

_____
Profa. Dra. Elizabeth de Souza Nascimento (FCF-USP)
2° Examinador

_____
Profa. Dra. Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres (FSP-USP)
3° Examinador

_____
Prof. Dr. Odair Zenebon (IAL-SP)
4° Examinador

São Paulo, 11 de maio de 2009.

À minha esposa Joelma e
aos meus pais Solange e Augusto
pelo carinho e compreensão.
E aos que sempre estiveram
presentes nesta jornada.

“Um caminho de mil
quilômetros começa
com o primeiro passo.”
Lao

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Marilene De Vuono Camargo Penteado, pela paciência e entendimento das dificuldades enfrentadas durante o período de realização do doutorado, pelas orientações no desenvolvimento do trabalho e pelas contribuições para a obtenção do resultado aqui apresentado.

Ao Prof. Dr. Koiti Araki do Instituto de Química (IQ) pelas grandes contribuições durante todo o processo das análises dos sucos e construção dos resultados.

A Profa. Dra. Elizabeth de Souza Nascimento pelas valiosas contribuições para a revisão bibliográfica e construção do texto.

A Paulo R. Martins do Instituto de Química (IQ) e Letícia Araújo Farah Nagato da Divisão de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz (IAL), pela grande contribuição na realização das análises químicas e análise dos dados.

Aos amigos, por sempre ouvirem as minhas necessidades e anseios.

Aos professores do PRONUT, pelas oportunidades de apresentação e aperfeiçoamento do projeto.

À secretária Mônica Dealis Perussi do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pela paciência e atenção.

A Jorge Alves de Lima e Tânia, da secretaria do SPG/PRONUT, pela atenção às informações solicitadas e pelo auxílio no processo de cumprimento dos prazos.

A Rose Magda Fiorotti, responsável pela Alimentação Escolar do Município de São Caetano do Sul, que conduziu a autorização da coleta de dados nas escolas municipais selecionadas.

Às coordenadoras Maria Helena, Maria Cristina e Meire pela colaboração na coleta de dados nas escolas do município de São Caetano do Sul.

SUMÁRIO

Página

1. INTRODUÇÃO..... 1

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 4
   2.1. Considerações gerais sobre os aditivos no Brasil..... 4
   2.2. Avaliação da segurança dos aditivos..... 5
   2.3. Considerações sobre os métodos de avaliação do consumo de aditivos..... 12
   2.4. Considerações sobre os sulfitos..... 23
   2.4.1. Usos e funções..... 23
   2.4.2. Alimentos com SO_2..... 25
   2.4.3. Compostos SO_2 usados como conservantes..... 26
   2.4.4. Formas de usos dos compostos SO_2..... 26
   2.4.5. Toxicocinética dos sulfitos..... 29
   2.4.6. Aspectos nutricionais e tecnológicos..... 30
   2.4.7. Efeitos tóxicos: reações de sensibilidade..... 35
   2.4.8. Pesquisas de consumo e limites máximos permitidos..... 43
   2.4.9. Métodos de análise quantitativa..... 54

3. OBJETIVOS..... 80
   3.1. Objetivo geral..... 80
   3.2. Objetivos específicos..... 80

Página

4. METODOLOGIA..... 81
   4.1. População e local de estudo..... 81
   4.2. Coleta de dados de consumo de alimentos e instrumento de coleta..... 81
   4.3. Definição dos padrões de comparação..... 82
   4.4. Amostragem de produtos alimentícios para análise quantitativa..... 83
   4.5. Métodos de análise quantitativa..... 83
   4.5.1. Método Monier-Williams (M-W) otimizado..... 84
   4.5.2. Análise por injeção em fluxo (FIA) modificada..... 86
   4.6. Análise estatística..... 89
   4.7. Considerações éticas..... 89

5. RESULTADOS e DISCUSSÃO..... 90
   5.1. Caracterização da população..... 90
   5.2. Local de consumo e compra de alimentos..... 92
   5.3. Conhecimentos sobre aditivos..... 93
   5.4. Consumo de alimentos sulfitados..... 93
   5.5. Ingestão de sulfitos e IDA..... 96
   5.6. Análise quantitativa de sucos de frutas..... 99

6. CONCLUSÕES..... 113

Página

7. RECOMENDAÇÕES..... 114

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 115

Apêndice I – Questionário de Freqüência de Consumo de Alimentos..... 144

Apêndice II – Instruções para preenchimento do QFCA..... 147

Apêndice III – Termo de consentimento livre e esclarecido..... 148

Anexo I – Resumos em eventos e publicações..... 150

Anexo II – Documentos..... 152

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 – Reclamações de consumidores e número de reações severas ao uso de sulfitos por tipo de alimento — Estados Unidos, 1982-1985..... 39

Tabela 2 – Produtos alimentícios relatados ao *Food and Drug Administration* (FDA) por consumidores alegando eventos adversos provocados por sulfitos, no período de janeiro de 1996 a junho de 1999, comparado com períodos anteriores (1988-1995 e 1980-1987), Estados Unidos..... 39

Tabela 3 – Limites máximos de sulfitos nos alimentos em que podem ser adicionados, de acordo com a legislação brasileira..... 43

Tabela 4 – Estimativa das quantidades de SO_2 ingeridas pela alimentação — França (1988/1989)..... 49

Tabela 5 – Técnicas utilizadas em estudos realizados nas últimas três décadas para quantificação de sulfitos em matrizes alimentares e outras substâncias..... 56

Tabela 6 – Resultados da determinação de SO_2 pelos métodos Monier-Williams (M-W) e cromatografia líquida de alta performance (HPLC)..... 77

Tabela 7 – Resultados da determinação de SO_2 pelos métodos de análise de injeção em fluxo (FIA), Monier-Williams (M-W), colorimétrico (Color.) e enzimático (Enzym.)..... 78

Tabela 8 – Comparação entre resultados de análises de sulfitos pelo método Monier-Williams (M-W) de estudos brasileiros em diversos tipos de sucos de frutas industrializados..... 79

cont. LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 9 – Distribuição percentual dos principais parâmetros quanto a freqüência de consumo, porção consumida e tamanho da porção dos alimentos do Questionário de Freqüência de Consumo de Alimentos (QFCA)..... 94
Tabela 10 – Resultados comparativos de ingestão de sulfitos..... 99
Tabela 11 – Resultados das determinações de sulfitos (mg SO_2/L) pelo método Monier-Williams (M-W) otimizado em amostras de sucos de frutas concentrados das marcas A, B e C e em água de coco das marcas D e E..... 102
Tabela 12 – Resultados das determinações de sulfitos (mg SO_2/L) pelo método de análise por injeção em fluxo (FIA) em amostras de sucos de frutas concentrados das marcas A, B e C e em água de coco das marcas D e E..... 103
Tabela 13 – Comparação entre as médias (razão) dos resultados das determinações de sulfitos (mg SO_2/L) pelos métodos M-W e FIA em sucos de frutas concentrados..... 104
Tabela 14 – Diferenças de composição, quanto à presença de aditivos, entre os sucos de frutas e água de coco analisados..... 105

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1 – Aparelho de Monier-Williams otimizado. A, canal adaptador; B, funil separador; C, frasco redondo; D, tubo de gás; E, condensador Allihn; F, bulbo; G, receptor, ca 2,5 cm i.d. x 18 cm..... 65

Figura 2 – Aparato de destilação: canal adaptador, funil separador, frasco redondo, tubo de gás, condensador, bulbo e receptor..... 86

Figura 3 – Célula FIA e eletrodo..... 88

Figura 4 – Distribuição porcentual dos escolares do ensino fundamental de escolas públicas, em relação à idade (anos), São Caetano do Sul-SP, Brasil, 2007..... 90

Figura 5 – Distribuição porcentual dos escolares do ensino fundamental de escolas públicas, em relação ao peso (kg), São Caetano do Sul-SP, Brasil, 2007..... 91

Figura 6 – Distribuição porcentual dos escolares do ensino fundamental de escolas públicas, em relação à altura (cm), São Caetano do Sul-SP, Brasil, 2007..... 91

Figura 7 – Distribuição porcentual dos escolares do ensino fundamental de escolas públicas, em relação ao IMC (kg/m^2), São Caetano do Sul-SP, Brasil, 2007..... 92

Figura 8 – Distribuição porcentual dos escolares do ensino fundamental de escolas públicas, em relação ao consumo per capita diário de sulfitos (mg SO_2), São Caetano do Sul-SP, Brasil, 2007..... 96

cont. LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 9 – Distribuição porcentual dos escolares do ensino fundamental de escolas públicas, em relação ao consumo de SO_2, em mg/kg pc/dia, São Caetano do Sul-SP, Brasil, 2007..... 98

Figura 10 – Análise por injeção em fluxo utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de porfirina tetrarutenada de ZnTRP/FeTPPS. Injeções consecutivas de amostras (a) do suco concentrado da marca A (sabores caju, 10A, e maracujá, 10B) e de soluções contendo adições de sulfito de 1 x 10^{-4} (b), 2 x 10^{-4} (c), 3 x 10^{-4} (c) e 4 x 10^{-4} (d) mol L^{-1}. E = + 0,90 V, eletrólito = tampão fosfato (0,1 mol L^{-1}) pH 6,8 e KNO3 0,2 mol L^{-1}, carregador = H_2SO_4 2,0 mol L^{-1}. Volume da amostra injetado = 75 µL e vazões de 1,5 mL min^{-1}. Comprimento das bobinas = 20 cm (ø = 0,7 mm)..... 106

Figura 11 – Análise por injeção em fluxo utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de porfirina tetrarutenada de ZnTRP/FeTPPS. Injeções consecutivas de amostras (a) do suco concentrado da marca B (sabores caju, 11A, e maracujá, 11B) e de soluções contendo adições de sulfito de 1 x 10^{-4} (b), 2 x 10^{-4} (c), 3 x 10^{-4} (c) e 4 x 10^{-4} (d) mol L^{-1}. E = + 0,90 V, eletrólito = tampão fosfato (0,1 mol L^{-1}) pH 6,8 e KNO3 0,2 mol L^{-1}, carregador = H_2SO_4 2,0 mol L^{-1}. Volume da amostra injetado = 75 µL e vazões de 1,5 mL min^{-1}. Comprimento das bobinas = 20 cm (ø = 0,7 mm)..... 107

cont. LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 12 – Análise por injeção em fluxo utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de porfirina tetrarutenada de ZnTRP/FeTPPS. Injeções consecutivas de amostras (a) do suco concentrado da marca C (sabores caju, 12A, maracujá, 12B, e uva, 12C) e de soluções contendo adições de sulfito de 1 x 10^{-4} (b), 2 x 10^{-4} (c), 3 x 10^{-4} (c) e 4 x 10^{-4} (d) mol L^{-1}. E = + 0,90 V, eletrólito = tampão fosfato (0,1 mol L^{-1}) pH 6,8 e KNO3 0,2 mol L^{-1}, carregador = H_2SO_4 2,0 mol L^{-1}. Volume da amostra injetado = 75 µL e vazões de 1,5 mL min^{-1}. Comprimento das bobinas = 20 cm (ø = 0,7 mm)..... 108

Figura 13 – Análise por injeção em fluxo utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de porfirina tetrarutenada de ZnTRP/FeTPPS. Injeções consecutivas de amostras (a) da água de coco da marca D e de soluções contendo adições de sulfito de 1 x 10^{-4} (b), 2 x 10^{-4} (c), 3 x 10^{-4} (c) e 4 x 10^{-4} (d) mol L^{-1}. E = + 0,90 V, eletrólito = tampão fosfato (0,1 mol L^{-1}) pH 6,8 e KNO3 0,2 mol L^{-1}, carregador = H_2SO_4 2,0 mol L^{-1}. Volume da amostra injetado = 75 µL e vazões de 1,5 mL min^{-1}. Comprimento das bobinas = 20 cm (ø = 0,7 mm)..... 109

cont. LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 14 – Análise por injeção em fluxo utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de porfirina tetrarutenada de ZnTRP/FeTPPS. Injeções consecutivas de amostras (a) da água de coco da marca E e de soluções contendo adições de sulfito de 1 x 10^{-4} (b), 2 x 10^{-4} (c), 3 x 10^{-4} (c) e 4 x 10^{-4} (d) mol L^{-1}. E = + 0,90 V, eletrólito = tampão fosfato (0,1 mol L^{-1}) pH 6,8 e KNO3 0,2 mol L^{-1}, carregador = H_2SO_4 2,0 mol L^{-1}. Volume da amostra injetado = 75 µL e vazões de 1,5 mL min^{-1}. Comprimento das bobinas = 20 cm (ø = 0,7 mm)..... 110

Figura 15 – Fiagrama para soluções de sulfito de sódio em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1}, pH = 6,8, com as seguintes concentrações: (a) 0,64; (b) 1,6; (c) 3,2; (d) 4,8; (e) 6,4 e (f) 16 ppm SO_2..... 111

Figura 16 – Fiagrama para dez injeções de suco de caju (a) e de soluções fortificadas com sulfito de sódio, nas seguintes concentrações: 6,4 (b) e 12,8 ppm SO_2 (c)..... 112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIA –	Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos
ADI –	*Acceptable Daily Intake*
AOAC –	*Association Official Analytical Chemistry*
BSES –	*Bi-national Surveillance and Enforcement Strategy*
BPF –	Boas Práticas de Fabricação
BHT –	*Butylated hydroxytoluene* ou butil hidroxi tolueno
CCFAC –	Comitê *Codex* sobre Aditivos Alimentares e Contaminantes
CE –	*Capillary Electrophoresis* ou eletroforese capilar
CFR –	*Code of Federal Regulations*
CMTDI –	C*orrected Maximum Theoretical Daily Intake* ou Ingestão Diária Teórica Máxima Corrigida
CNS –	Conselho Nacional de Saúde
CV –	Coeficiente de variação
DL_{50} –	Dose letal 50 %
DNPH –	*Dinitrophenylhydrazine* ou dinitrofenilhidrazina
E –	Potencial
ELSA –	*Electrostatic self-assembly* ou auto-montagem eletrostática
FAO –	*Food and Agriculture Organization*
FASEB –	*Federation of American Societies for Experimental Biology*
FDA –	*Food and Drug Administration*
FEV_1 –	*Forced Expiratory Volume in 1 second* ou Volume Expiratório Forçado em 1 segundo
FIA –	*Flow Injection Analysis* ou análise por injeção em fluxo

cont. LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GC –	*Gas Chromatography* ou cromatografia gasosa
GRAS –	*Generally Recognised as Safe* ou geralmente reconhecido como seguro
HCl –	ácido clorídrico
H_2O_2 –	água oxigenada
HPLC –	*High Perfomance Liquid Chromatography* ou cromatografia líquida de alta performance
H_2SO_4 –	ácido sulfúrico
IC –	*Ion Chromatography* ou cromatografia de exclusão de íon
IDA –	Ingestão Diária Aceitável
IDP –	Ingestão Diária Potencial
IMC –	Índice de Massa Corporal
INFID –	*Irish National Food Ingredient Database*
INNS –	*Irish National Nutrition Survey*
JECFA –	*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additive*
LC –	*Liquid Chromatography* ou cromatografia líquida
LMP –	Limite Máximo Permitido
LMR –	Limite Máximo de Resíduos
LOAEL –	*Lowest Observed Adverse Effect Level* ou nível mais baixo no qual um efeito adverso é observado
LQ –	Limite de Quantificação
MPL –	M*aximum Permitted Level*
MRCA –	*Marketing Research Corporation of America*
MS –	Ministério da Saúde
M-W –	Método Monier-Williams

cont. LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NADH –	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo – forma reduzida
NaOH –	hidróxido de sódio
NOAEL –	*No Observed Adverse Effect Level* ou nível no qual nenhum efeito adverso é observado
NOEL –	*No Observed Effect Level* ou nível no qual nenhum efeito é observado
NRA –	*National Restaurant Association*
OMS –	Organização Mundial de Saúde
P –	Percentil
pc –	Peso corpóreo
PFO –	Polifenol oxidase
POD –	Sulfito peroxidase
ppm –	Partes por milhão
Pt –	Platina
PTWI –	*Provisional Tolerable Weekly Intake* ou Ingestão Semanal Tolerável Prov*isória*
PUFA –	*Poly Unsaturated Fatty Acids* ou ácidos graxos polinsaturados
QFA –	Questionário de Freqüência Alimentar
QFCA –	Questionário de Freqüência de Consumo de Alimentos
R24 –	Recordatório 24 horas
RDA –	*Recommended Dietary Allowance* ou Ingestão Dietética Recomendada
RfD –	*Reference Dose* ou dose de referência
RTMDI –	R*educed Theoretical Maximum Daily Intake* ou Ingestão Diária Máxima Teórica Reduzida

cont. LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SIA –	*Sequential Injection Analysis*
SO_2 –	dióxido de enxofre
SOD –	Sulfito oxidase
TACO –	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
TDI –	*Tolerable Daily Intake* ou Ingestão Diária Tolerável
TMDI –	*Theoretical Maximum Daily Intake* ou Ingestão Diária Máxima Teórica
WHO –	*World Health Organization*

RESUMO

Análise de sulfitos em sucos de frutas e estimativa de seu consumo por escolares. No Brasil os dados sobre a utilização dos sulfitos pela indústria de alimentos e pesquisas sobre o seu consumo são escassos. Sendo assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o nível de sulfitos em sucos de frutas e estimar seu consumo por escolares de 5ª. a 8ª. séries de escolas públicas, do ensino fundamental, do município de São Caetano do Sul-SP, Brasil. Foi aplicado questionário de freqüência de consumo de alimentos (QFCA) em 313 escolares, sendo 56,9 % do sexo feminino e 43,1 % do sexo masculino, com média de idade de 14,7 anos. Os alimentos sulfitados mais consumidos foram os néctares ou sucos de frutas, o açúcar refinado, as batatas fritas congeladas, o coco ralado, o suco de caju e as frutas secas e cristalizadas. Considerando os limites máximos permitidos (LMP) pela legislação brasileira, o consumo de SO_2, em mg SO_2/kg pc/dia, foi de 0,12 mg SO_2/kg pc/dia, sendo que este valor médio corresponde a 17% da IDA (0,7 mg SO_2/kg pc/dia). Já os resultados das análises dos sucos de frutas demonstram que a análise por injeção em fluxo (*Flow injection analysis* - FIA) modificada obteve resultados de sulfitos nas amostras analisadas com menor variação do que aqueles obtidos pelo método Monier-Williams (M-W) otimizado, e que nenhuma amostra ultrapassou os LMP.

Palavras-chave: Sulfitos. Escolares. Sucos de frutas. Alimentos e bebidas sulfitados. Estimativa de ingestão. Análise de sulfitos. Método Monier-Williams. Análise por injeção em fluxo.

ABSTRACT

Analytical determination of sulphites in fruit juices and estimation of their intake by students. In Brazil there are no data on use of sulphites by the food industry and research on their consumption by population. Thus, the objective of this research was to evaluate sulphites in fruits juices and estimate intake sulphites in a group of 5^{th} – 8^{th} schoolchildren of public schools in São Caetano do Sul-SP, Brazil. It was applied a food frequency questionnaire (FFQ) at 313 schoolchildrens (56.9% female, 43.1% male and average age 14.7 years). Sulphited products identified were fruits juices, sugar, frozen chips, grated coconut, cashew juice and dried fruits. Considering maximum permitted levels (MPL) stabilished by Brazilian legislation, none of the students exceeded the ADI of 0.70 mg SO_2/kg bw/day, with average of consumption of 0.12 mg SO_2/kg bw/day (17 % of the ADI). The results of the fruits juices analysis demonstrated flow injection analysis (FIA) modified obtained better results than optimized Monier-Williams method (M-W) and no sample exceeded the MPL.

Keywords: Sulphites. Students. Fruit juices. Sulphited foods and beverages. Food additive intake. Sulphites analytical determination. Monier-Williams method. Flow injection analysis.

1 INTRODUÇÃO

A utilização dos aditivos pela indústria de alimentos, associada ao desenvolvimento constante de novas tecnologias, tem tornado possível o acesso a uma diversidade cada vez maior de alimentos pela população mundial, apesar do percentual de mal nutridos no mundo ter sofrido reduções pouco expressivas.

Contudo, a presença de aditivos em alimentos suscita uma série de dúvidas, ainda mais quando se consideram os seguintes aspectos: as quantidades de aditivos utilizadas pelas indústrias obedecem às Boas Práticas de Fabricação (BPF), não colaborando para que o consumo de determinados alimentos faça com que o indivíduo ultrapasse a Ingestão Diária Aceitável (IDA) dos mesmos; não existe obrigatoriedade legal em declarar as quantidades presentes no alimento, mas somente a relação dos aditivos utilizados; são praticamente desconhecidos pela população a função dos aditivos nos alimentos e seus efeitos adversos no caso de consumo em excesso (doses acima da IDA).

Os sulfitos, representados pelo dióxido de enxofre (SO_2), fazem parte de um importante grupo de aditivos, utilizados, há séculos, como conservantes em frutas secas, sucos de frutas, vinhos e em vários outros alimentos (DiPERSIO; KENDALL & SOFOS, 2004; KELLY *et al*. 2002; JARVIS & LEA, 2000; LECLERCQ *et al*. 2000; TAYLOR, 1993; WEDZICHA, 1992; SAFAVI & ENSAFI, 1991; FAZIO & WARNER, 1990; ROSE & PILKINGTON, 1989). Apesar de vários estudos (LECLERCQ *et al*. 2000; LARSEN & PASCAL, 1998; OSTERGAARD & KNUDSEN, 1998; RENWICK, 1996) demonstrarem que, quase sempre, serem os indivíduos que consomem grandes quantidades dos alimentos adicionados deste aditivo os mais expostos ao risco de alcançarem ou ultrapassarem a IDA, ainda há necessidade de estudos que monitorem periodicamente as quantidades de aditivos utilizados pela indústria de alimentos

e as quantidades realmente consumidas pela população e que avaliem as quantidades efetivamente presentes nos alimentos adicionados de aditivos.

Vários métodos estão disponíveis para a determinação dos sulfitos em alimentos, mas poucos são passíveis de uso na rotina moderna. Preconiza-se o uso de um método que possa mensurar compostos nos produtos alimentícios que estejam correlacionados com a quantidade dos sulfitos adicionados. O método não precisa medir todos os constituintes químicos resultantes do agente adicionado, porque isto é impraticável como uma rotina de controle e garantia da qualidade, mas ele pode medir alguns indicadores do tratamento com sulfitos que tenham relação comprovada com a quantidade adicionada. Atualmente, tem-se a disposição métodos para os equivalentes de dióxido de enxofre total, baseados no método Monier-Wlliams (M-W), e outros como a análise por injeção em fluxo (*Flow Injection Analysis* – FIA), método mais rápido e sensível que o anterior.

Durante o desenvolvimento da dissertação de mestrado “Estimativa da ingestão de sulfitos por escolares pela análise qualitativa da dieta”, entre 2002 e 2004 (POPOLIM & PENTEADO, 2004), os autores observaram a necessidade de se obter dados dos níveis de sulfitos em alimentos brasileiros, nos quais seu uso é permitido, que possam ser comparados com os limites máximos permitidos (LMP ou M*aximum Permitted Level* – MPL) pela legislação brasileira, de modo a aferir a real quantidade deste aditivo utilizada pelas indústrias, bem como o nível residual do mesmo em produtos alimentícios industrializados.

Os dados nacionais sobre sulfitos em alimentos, bem como seu consumo pela população, são escassos (MACHADO & TOLEDO, 2007; POPOLIM & PENTEADO, 2005; BRAGAGNOLO; SILVA & TANIWAKI, 2001; AZEVEDO *et al*., 1999; TAVARES *et al*. 1987; YABIKU *et al*. 1987), diferentemente de outros países, que fazem monitoramento, por reconhecer sua importância como um dos fatores implicados em alergias, principalmente do trato respiratório, mais nitidamente em asmáticos (LECLERCQ *et al*. 2000; VERGER *et al*. 1998; ENVIRONMENTAL HEALTH SERVICE, 1996; TAYLOR & BUSH, 1987). Sendo

assim, justifica-se a realização de pesquisa que possa contribuir com dados sobre os níveis de sulfitos em alimentos consumidos pela população brasileira, além de estimar, de forma mais precisa, a quantidade de sulfitos consumida por grupos populacionais, ou seja, a contribuição dos alimentos adicionados de sulfitos no consumo deste aditivo, comparando-a com a IDA.

Desta forma, será possível fornecer subsídios para os organismos legisladores, visando controlar a quantidade de sulfitos adicionada aos alimentos industrializados, com a verificação dos limites para cada grupo de alimentos, como já ocorre em alguns países europeus e nos Estados Unidos, e também trazer contribuições à adequada rotulagem dos alimentos.

Para tanto, fazem-se necessárias análises comparativas entre os métodos disponíveis de quantificação (o método clássico, o M-W, e outros, como a análise por injeção em fluxo) devido à variabilidade nos resultados finais, além da utilização de método para a coleta de dados de consumo de alimentos, o mais representativo possível do hábito alimentar.

Apesar das limitações da pesquisa em relação à população de estudo e a amostragem de alimentos analisados, o mesmo visa a atender, inclusive, demanda gerada pelo Comitê *Codex* sobre Aditivos Alimentares e Contaminantes (CCFAC) que recomenda a revisão da exposição diária a sulfitos pelo *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additive* (JECFA), e tem sido discutida pelo Grupo Técnico em Aditivos do Ministério da Saúde (MS) do Brasil.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Considerações gerais sobre os aditivos no Brasil

O emprego de aditivos em alimentos está regulamentado, no Brasil, desde 1965, por meio do Decreto nº. 55.871. A Resolução CNS/MS nº.04/88 revisa as tabelas anexas a esse Decreto. Desde então, foram feitas diversas atualizações na legislação brasileira, como autorizações para extensão de uso e inclusão de aditivos.

Segundo a Portaria SVS/MS nº. 540/97, aditivo alimentar é qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem o propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenamento, transporte ou manipulação de um alimento. Ao agregar-se, poderá fazer com que o próprio aditivo ou seus derivados se convertam em um componente de tal alimento. Essa definição não inclui os contaminantes ou as substâncias nutritivas que são incorporadas ao alimento para manter ou melhorar suas propriedades nutricionais.

No Brasil, cabe ao Ministério da Saúde, em particular à Comissão Permanente de Aditivos para Alimentos e ao Grupo Técnico em Aditivos, estabelecer a legislação nacional. Tomando como base o resultado de pesquisas internacionais e as recomendações do CCFAC do JECFA, a Comissão define e fiscaliza o emprego de aditivos pela indústria nacional.

A regulamentação dos aditivos para a área de alimentos baseia-se em três aspectos:

- Necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos visando proteger a saúde da população;

- Importância de compatibilizar a legislação nacional com base nos instrumentos harmonizados no Mercosul, levando em conta as premissas dos

organismos internacionais, principalmente aqueles ligados à Organização Mundial de Saúde (OMS),

- Demandas geradas por novas tecnologias e/ou novos conhecimentos.

2.2 Avaliação da segurança dos aditivos

A exposição de um indivíduo a um composto químico alimentar é função do consumo de alimentos e dos níveis do composto no alimento. Ambos dependem de uma série de fatores. Para o consumo de alimentos, esses fatores podem ser categorizados em componentes de variação dentro ou entre os indivíduos. O consumo de alimentos modifica-se ao longo do tempo como resultado de fatores como sazonalidade, dias da semana e de final de semana, alimentação fora de casa e feriados. A variação intraindividual, por definição, é dependente do tempo, enquanto a variação interindividual sofre influências de fatores como idade, sexo, região e nível educacional. O nível de um composto químico no alimento depende de fatores biológicos (nutrientes), da legislação (por exemplo, presença de pesticidas, aditivos e enriquecimento com nutrientes) e de fatores relacionados à manipulação dos alimentos (incluindo armazenamento e transporte) e ao preparo (CHEN *et al*. 2001; TORRES & MACHADO, 2001; CAMARGO, 2000; COLLINS *et al*. 1999a; COLLINS *et al*. 1999b; LÖWIK *et al*. 1999; WHO, 1994; OLIVEIRA, 1989; SZTAJN, 1988).

Um conceito importante na avaliação de segurança de compostos químicos alimentares é a medida do risco, cujo objetivo é a caracterização da natureza e da probabilidade de resultados danosos por conta da exposição humana a substâncias do meio ambiente, contendo informações qualitativas e quantitativas. A avaliação do risco químico resulta numa relação entre exposição a um agente e a probabilidade de que efeitos adversos a saúde poderão ocorrer em indivíduos da população exposta. As decisões de controle do risco dependem dos resultados de sua avaliação, mas podem também envolver a significância que o risco tem em Saúde Pública, bem como os custos econômicos e sociais desse controle (NRC, 1998).

A avaliação do risco químico requer a organização de informações geradas por estudos epidemiológicos e toxicológicos e a definição das incertezas relacionadas com os dados e com as inferências feitas. Os efeitos adversos que podem ser causados por um nutriente ou componente do alimento ocorrem quando o limiar da dose é excedido ou em casos associados a susceptibilidade individual (NRC, 1998; WHO, 1996).

A investigação da toxicidade dos aditivos requer a realização de diversos estudos (GANDARA, LOZANO & LOSADA, 1989). Contudo, na avaliação da toxicidade de aditivos alimentares, devem ser considerados os seguintes aspectos: a toxicidade esperada, os níveis de exposição, a ocorrência natural nos alimentos, a ocorrência como um componente normal do organismo, o uso tradicional nos alimentos, o conhecimento dos efeitos no homem, a estrutura do composto químico e suas características metabólicas (WHO, 2000; OSTERGAARD & KNUDSEN, 1998; WALKER, 1998; WHO, 1996; WHO, 1991).

Com o avanço da ciência, é cada vez mais fácil obter dados fidedignos quanto ao risco do consumo dos componentes adicionados aos alimentos, como os aditivos (WHO, 1996). Os procedimentos para avaliação do risco de substâncias devem levar em conta:

- dados de identificação e uso proposto;
- justificativa tecnológica/alvo;
- dados para avaliação toxicológica;
- dados para avaliação de resíduos;
- dados para avaliação de exposição dietética,
- métodos analíticos.

A Portaria SVS/MS nº. 540/97 estabelece como critérios principais para a avaliação de aditivos alimentares no Brasil:

a) Segurança de uso:

- se o aditivo foi submetido a uma adequada avaliação e/ou reavaliação toxicológica;

- se há dados científicos atualizados,

- e quais são as referências.

b) Restrição de uso:

- o uso deve ser limitado a alimentos específicos, condições específicas e ao menor nível para alcançar o efeito desejado.

c) Necessidade tecnológica:

- demonstração das razões tecnológicas que justifiquem o uso do aditivo.

d) Emprego:

- aditivos autorizados em concentrações que não superem a IDA recomendada;

- atendimento às exigências de pureza estabelecidas pela FAO/WHO – JECFA ou *Food Chemicals Codex*.

e) Proibições:

- quando houver evidência ou suspeita de que o mesmo não é seguro;

- interferir no valor nutritivo do alimento;

- encobrir falhas no processamento/técnicas de manipulação, alteração ou adulteração da matéria-prima ou do produto acabado,

- induzir o consumidor a erro, engano ou confusão.

f) Princípio de transferência:

- quando o aditivo for utilizado na matéria-prima ou ingrediente para fins de rotulagem.

Para os aditivos alimentares intencionais cuja avaliação é proposta, solicita-se a apresentação de quatro tipos de dados (WHO, 1996):

- a reatividade química geral do aditivo;

- a sua estabilidade durante o armazenamento;

- as reações do aditivo no sistema alimentar atual; e

- a função do aditivo em sistemas vivos. Estes dados são importantes para relacionar os dados de testes biológicos com o uso atual do aditivo em alimentos.

O JECFA geralmente estabelece a IDA de um aditivo alimentar com base em informações sobre as propriedades físico-químicas, metabólicas, farmacológicas e toxicológicas, advindas de estudos conduzidos com animais de laboratórios, e realizados com procedimentos reconhecidos internacionalmente e que forneçam uma avaliação de segurança sem a necessidade de dados reais do seu uso ou consumo. No entanto, na definição da IDA, é importante considerar grupos populacionais específicos expostos ao risco. Assim, informações gerais sobre a exposição devem ser consideradas no momento da avaliação de segurança (WHO, 1996).

A IDA é uma estimativa da quantidade de aditivo alimentar que pode ser ingerida diariamente durante toda a vida sem risco considerável à saúde (WHO, 1987). Esse conceito baseia-se na premissa de que o organismo tem uma capacidade limitada para se adaptar às mudanças químicas e, somente quando essa capacidade é excedida, os efeitos tóxicos se manifestam. Isso fica claro na definição da IDA que preconiza a exposição diária por toda a vida (WALKER, 1998). As pesquisas de estimativa de ingestão devem se concentrar nos consumidores com potencial de exceder a IDA, incluindo os grandes consumidores do aditivo em questão (RENWICK, 1996). Tal conceito ainda permanece, sendo utilizado nos mais diversos estudos.

Durante a avaliação dos estudos toxicológicos é definido o NOEL (*No Observed Effect Level*) ou o NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*), que correspondem a maior concentração ou quantidade do aditivo, em mg/kg p.c. (peso corpóreo), determinada experimentalmente que não causa reações ou reações adversas detectáveis, respectivamente, no organismo exposto. O NOAEL é o maior nível de ingestão (ou dose oral experimental) de um nutriente que não resultou em nenhum efeito adverso observado nos indivíduos estudados, utilizado na identificação do dano e na avaliação da dose resposta

nas etapas de caracterização do risco químico. Se não há dados adequados demonstrando o NOAEL, então o LOAEL (*Lowest Observed Adverse Effect Level*) pode ser utilizado. Um LOAEL é a ingestão mais baixa (ou dose oral experimental) na qual um efeito adverso tenha sido identificado (WHO, 1996).

Todos os valores de IDA podem ser considerados equivalentes desde que sejam baseados no NOAEL. A IDA é calculada pela divisão do NOAEL por um fator de segurança que, normalmente, é 100. Este fator de segurança se origina da multiplicação de outros dois fatores:

- 10, quando o NOAEL é derivado de estudos com animais de experimentação e sua extrapolação para humanos;

- 10, quando é derivado de estudos com humanos (devido à variabilidade da sensibilidade).

A ingestão, por um curto período acima da IDA, pode não apresentar um dano à saúde. Por outro, o mesmo pode ocorrer em exposições prolongadas, sendo que a natureza e a magnitude do risco podem ser determinadas somente por meio da natureza dos efeitos detectados em estudos com animais com ingestão acima do NOAEL. Mesmo que a ingestão de todos os aditivos acima da IDA seja equivalente, os possíveis riscos não o são. Se o objetivo das pesquisas de consumo for permitir o levantamento dos impactos potenciais do uso do aditivo à saúde, os possíveis riscos acima da IDA podem ser usados como parte da prioridade das pesquisas de consumo com atenção especial àqueles aditivos que excedem a IDA. A maior prioridade pode ser dada aos aditivos que mostram efeitos histopatológicos adversos em animais por meio de ingestão acima do NOAEL e para aqueles cujos cálculos teóricos indiquem a probabilidade de exceder a IDA, tanto pelos grandes consumidores (para uma única categoria de aditivo) quanto pelos consumidores médios (para múltiplas categorias de aditivos) (RENWICK, 1999; LARSEN & PASCAL, 1998; WALKER, 1998; RENWICK, 1996).

A avaliação da toxicidade é realizada levando-se em conta dois aspectos: a) a dose com efeito tóxico para os animais: considera-se a dose

máxima que, em estudos de longa duração, não causou efeito tóxico significativo (NOEL); b) a IDA para o homem. A IDA, por sua vez, pode ser dividida em três categorias. IDA incondicional: aquela em que se pode assegurar a inocuidade absoluta do produto na quantidade expressa. IDA condicional: sob determinadas circunstâncias, deve-se admitir certa margem do risco. (Assim, pode-se usar uma dose superior à IDA incondicional em situações climáticas e econômicas de países em desenvolvimento para garantir a conservação do produto.) IDA temporária: quando os dados biológicos, químicos e toxicológicos são insuficientes, permite-se o uso de determinado aditivo, estabelecendo um período de tempo, normalmente de 3 a 5 anos, durante o qual deverão ser ampliadas as informações, decidindo-se, assim, pelo seu uso ou não (SZTAJN, 1988; WHO, 1987).

A avaliação segura dos aditivos alimentares e contaminantes envolve uma revisão dos efeitos adversos observados na dose mais baixa (LOAEL). A IDA, a Ingestão Diária Tolerável (*Tolerable Daily Intake* – TDI), a Ingestão Semanal Tolerável Prov*isória* (*Provisional Tolerable Weekly Intake* – PTWI) e a dose de referência (*Reference Dose* – RfD) são baseadas na ingestão em doses inferiores ao NOAEL ou LOAEL. Independente disso, deve-se considerar que o efeito observado em animais é relevante aos humanos e que a ordem das relações da dose resposta para efeitos adversos diferentes, no LOAEL ou acima, em animais, pode ocorrer da mesma forma em humanos. Nos casos em que o LOAEL produzisse mais de um efeito adverso, cada efeito seria considerado e o risco total de exceder a ingestão estimada consideraria fatores como severidade, reversibilidade e a duração da ingestão necessária para demonstrar efeito em animais (RENWICK, 1999; SPEIJERS, 1999; SULLIVAN, 1999).

Embora o conceito de IDA tenha sido desenvolvido originalmente para os aditivos alimentares, atualmente ele também é aplicado aos pesticidas e aos resíduos veterinários; já a TDI, conceito similar, é aplicada a contaminantes com meia vida biológica curta (WALKER, 1998).

As crianças são mais susceptíveis que um indivíduo adulto por possuírem menor quantidade de componentes químicos circulantes, quando expressa com base no peso corpóreo. Assim, os fatores de segurança estarão adequados para a prevenção de reações de sensibilidade nessa população. Contudo, as crianças apresentam uma ingestão de alimentos maior que os adultos, expressa em kg de peso corpóreo, e outras preferências alimentares. Em estudo realizado na Inglaterra, as necessidades de energia e proteína e a ingestão de água foram, respectivamente, 3, 2,5 e 5 vezes maiores em relação aos adultos, também com base no peso corpóreo. A média de consumo dos principais grupos de alimentos, como frutas e hortaliças, pão e cereais, carne, peixe e ovos, derivados de leite, açúcar e produtos de confeitaria era 2,5 vezes maior, aproximadamente. A média de consumo de bebidas não-alcoólicas era cerca de 2 vezes maior, e 10 vezes maior, quando consideradas as bebidas carbonatadas (LARSEN & PASCAL, 1998; OSTERGAARD & KNUDSEN, 1998).

A IDA não pode ser aplicada em crianças com idade inferior a 12 semanas devido à adaptação do metabolismo e ao fato de que se preconiza a alimentação somente por meio do aleitamento materno, sendo, ainda, proibida a adição de aditivos às fórmulas infantis (LAWRIE, 1998; OSTERGAARD & KNUDSEN, 1998; WALKER, 1998).

Ao se estabelecer o risco, deve-se fazer distinção entre os consumidores médios e os consumidores que têm ingestão de alimentos específicos ou, quantitativamente, acima da média de consumo (CHAMBOLLE, 1999). Normalmente, essa ingestão está disponível para alimentos ou grupos de alimentos e não para os componentes dos alimentos (como os contaminantes, os aditivos alimentares, os nutrientes etc.). Quando a distribuição da ingestão está disponível (tanto pela determinação direta por meio de pesquisas individuais quanto pelo cálculo por meio de pesquisas domiciliares), os percentis são utilizados para caracterizar o consumo dos grandes consumidores. O percentil *x* é o valor de consumo levantado em *n* indivíduos

em uma ordem consecutiva de consumidores entrevistados *p*, sendo *n*/*p* = *x*/100 (VERGER, GARNIER-SAGNE & LEBLANC, 1999).

A TMDI (*Theoretical Maximum Daily Intake* ou Ingestão Diária Máxima Teórica – IDMT) dos aditivos pode ser calculada e expressa em mg/kg pc/dia (peso corporal médio = 60 kg) e depois comparada com a IDA expressa na mesma unidade. Quando a razão TMDI/IDA é menor que 1 para um determinado aditivo, não há um padrão de segurança com relação a esse aditivo para o consumidor (VERGER *et al*. 1998; CADBY, 1996). A TMDI é calculada multiplicando-se os limites máximos estabelecidos (LMP) pelo consumo médio diário regional estimado para cada alimento e, então, somando-se os resultados dessa multiplicação, pela fórmula:

$TMDI = \Sigma (LMP)_n (C)_n$ onde:

LMP = limite máximo permitido do aditivo nos produtos nas quais um dado ingrediente ativo encontra-se autorizado

C = consumo médio diário regional dos produtos nos quais um dado ingrediente ativo encontra-se autorizado, para pessoa de 60 kg

n = número de produtos nos quais um dado ingrediente ativo encontra-se autorizado

Caso o valor da TMDI seja inferior ao da IDA, é possível realizar a inclusão de um produto ou a alteração de um LMP. Esta avaliação de exposição aos aditivos pela ingestão de alimentos é indispensável para a conclusão sobre a aceitabilidade do LMP, quando da inclusão de um novo produto ou a alteração deste LMP, do ponto de vista de Saúde Pública.

2.3 Considerações sobre os métodos de avaliação do consumo de aditivos

Os estudos de consumo são importantes para estimar o uso seguro dos aditivos alimentares numa determinada população. A caracterização do consumo alimentar é dificultada porque os alimentos são constituídos por centenas de compostos químicos, que podem ser modificados no processo de

produção e mesmo quando ingeridos. Os fatores causais estão presentes, em maior ou menor quantidade, muitas vezes variando pouco dentro dos grupos analisados; além disso, sua variação ao longo do tempo faz-se por vezes de forma gradual, pouco visível e até pouco percebida pelo próprio indivíduo (CAMARGO, 2000; CHAMBOLLE, 1999; SZTAJN, 1988).

As estimativas de consumo também são utilizadas com o objetivo de estabelecer medidas de controle da qualidade dos alimentos. As estimativas de ingestão de aditivos alimentares são importantes não só para a população, mas para grupos específicos de consumidores. Os cálculos de consumo para adultos têm se baseado em métodos estatísticos e pesquisas domiciliares de consumo de alimentos. Os riscos são obtidos por meio da comparação da estimativa do consumo diário com os valores da IDA fornecidos pelo *Codex Alimentarius* e pelo JECFA (BAUNWART & TOLEDO, 2001; DICH *et al*. 1996; LANGLAIS, 1996; PENTTILÄ, 1996; GANGOLLI *et al*. 1994; SABA, TURRINI & CIALFA, 1992; KNIGHT *et al*. 1987; QUATTRUCCI, 1981; DISSELDUFF, TRY & BERRY, 1979).

Um dos métodos mais utilizados para coleta de informações nutricionais é o recordatório 24 horas (R24). A principal vantagem em relação aos outros métodos é a sua simplicidade logística. Em comparação com outras técnicas ele é geralmente aplicado a grupos grandes de indivíduos e, quando bem conduzido, fornece uma estimativa da média de consumo que pode ser comparável àquelas obtidas com técnicas mais precisas. Por outro lado, o método é criticado por não fornecer uma estimativa confiável do consumo habitual do indivíduo ou uma descrição confiável da distribuição do consumo habitual de uma população. Se o tamanho do grupo for razoável, pode-se obter uma boa estimativa da média de consumo com os dados de um dia. Além disso, no caso de uma pequena variação intraindividual, a chance de erro de classificação de indivíduos é reduzida e a probabilidade de detecção de relações é aumentada (GIBNEY, 1999; LÖWIK, 1996; THOMPSON & BYERS, 1994; BEATON *et al*. 1979).

Outro método que pode ser utilizado é o Questionário de Freqüência de Consumo de Alimentos (QFCA), que apresenta como vantagens, o fato de ser um instrumento de baixo custo e fácil de ser aplicado, podendo assim ser utilizado em estudos com grande número de indivíduos. A reprodutibilidade das informações dos questionários de freqüência é razoavelmente boa, e a validade é aceitável quando se faz a comparação da média de ingestão de nutrientes com outros métodos (SALVO & GIMENO, 2002; JOHNSON *et al*., 2001; BEATON, BUREMA & RITENBAUGH, 1997).

A variação diária no consumo de energia e de nutrientes é reconhecida como uma fonte de erro na estimativa da ingestão habitual do indivíduo. A ingestão habitual é definida como a média de consumo do indivíduo em um período de tempo extenso (meses ou anos), mas é comumente estimada como a média de um número finito de dias de observação (freqüentemente de 1 a 7 dias) (FROBISHER & MAXWELL, 2003; LÖWIK *et al*. 1999; TARASUK & BEATON, 1992).

A princípio, o próprio nível do risco requer que o período das estimativas de consumo de produtos alimentícios seja similar aos níveis toxicológicos sob os quais estão baseados os padrões de segurança (como, por exemplo, a IDA) (LÖWIK, 1996). Para os aditivos alimentares, os níveis toxicológicos são baseados na exposição pela vida toda e expressos por meio da ingestão por kg pc/dia (WHO, 1987). Os dados de consumo de alimentos não podem ser coletados pela vida toda dos indivíduos, mas devem ser feitos esforços para se obter padrões alimentares similares à ingestão habitual ou usual (LAMBE *et al*. 2000).

Para Beaton (1994), o consumo alimentar não pode ser estimado sem a interferência de possíveis erros. A coleta e a análise dos dados são essenciais para o levantamento de questionamentos sobre o consumo de alimentos e a saúde. Uma das limitações mais importantes não diz respeito aos erros eventualmente presentes nos dados obtidos, mas, sim, à falha ao analisar a natureza desses erros — como eles diferem de acordo com a escolha da

metodologia de coleta e qual é o impacto provocado nas estratégias de análise dos dados.

De acordo com Douglass & Tennant (1997), todos os métodos de pesquisa do consumo de compostos químicos alimentares são originados das seguintes expressões:

- consumo de um alimento = concentração do composto químico no alimento x consumo do alimento;

- ingestão total = soma da ingestão de todos os alimentos que contêm o composto químico.

A estimativa da ingestão de aditivos alimentares per capita pode ser obtida baseando-se na produção e no uso pelas indústrias:

$$\text{Ingestão per capita de aditivo} = \frac{\text{produção} + \text{importação} - \text{exportação}}{\text{população}}$$

Isso equivale a dizer que o consumo de um aditivo alimentar pode ser obtido por meio da combinação de dados da quantidade do aditivo presente em todos os produtos alimentícios com a sua quantidade consumida pela população (BAUNWART & TOLEDO, 2001; LECLERCQ *et al*. 2000; DICH *et al*. 1996; GANGOLLI *et al*. 1994; SABA, TURRINI & CIALFA, 1992; KNIGHT *et al*. 1987; QUATTRUCCI, 1981).

Em 1989, o *Codex Alimentarius* propôs, para uma avaliação simplificada da ingestão dos aditivos alimentares, as seguintes considerações baseadas na IDA: o impacto dos aditivos para os grandes consumidores de alimentos adicionados dos mesmos e os aditivos autorizados em alimentos muito consumidos pela população (GIBNEY, 1999).

Na União Européia, foram feitos os seguintes questionamentos: se o aditivo se encontra em um grande número ou em um número limitado de alimentos; se os alimentos que contêm os aditivos são consumidos por grupos potencialmente de risco, como crianças e diabéticos; o número de porções de alimentos necessário para atingir a IDA; a importância da função tecnológica do aditivo em relação à IDA (GIBNEY & LAMBE, 1996; LAWRIE & REES, 1996;

LÖWIK, 1996; RENWICK, 1996). Mais recentemente, propôs-se: uma estimativa padrão baseada nos níveis de exposição e as supostas conseqüências à saúde; a falta de informação do item anterior, especialmente se o nível de exposição estimado para o aditivo em questão exceder a IDA; o aditivo é o único, ou um dos poucos, que produz um efeito tecnológico específico. Assim, os objetivos iniciais da investigação são prevenir que a coleta de dados seja pouco fidedigna e garantir que as fontes para a coleta de dados sejam usadas de forma correta (LAMBE *et al*. 2000).

As estimativas brutas de ingestão de aditivos alimentares podem ser calculadas, inicialmente, com os dados de consumo de alimentos e de uso do aditivo. No caso dos dados de consumo de alimentos, três pontos de referência estão disponíveis:

- em nível nacional, as pesquisas de balanço alimentar;
- em nível doméstico, as pesquisas em domicílio;
- em nível individual, as pesquisas de nutrição.

No caso do uso do aditivo, os dados são mais difíceis de serem obtidos. Para os aditivos com uma IDA numérica, o LMP para alimentos específicos, estabelecido em legislação, pode ser um ponto de partida. Outras possíveis fontes de dados são os níveis recomendados para uma determinada função tecnológica (nível tecnológico), estatísticas de produção, dados analíticos e dados provenientes dos fabricantes. A estimativa bruta pode envolver, por exemplo, a combinação dos dados brutos de consumo de alimentos com o LMP (quando a IDA existe) com a suposição de que todos os alimentos nos quais o aditivo é permitido contêm o aditivo no seu LMP (DOUGLASS *et al*. 1997; GIBNEY & LAMBE, 1996).

Se as estimativas brutas continuarem para a obtenção de dados adicionais, o refinamento da ingestão estimada pode dar lugar tanto ao refinamento dos dados de consumo de alimentos quanto ao refinamento dos níveis de uso do aditivo alimentar. Os dados de consumo de alimentos podem ser refinados pela subdivisão das categorias de alimentos em subcategorias e,

se os dados permitirem, essas subcategorias também podem ser subdivididas. Por outro lado, a criação de muitas categorias pode gerar mais custos à pesquisa ao invés de esclarecer as variações dos padrões de consumo de marcas específicas. Outra forma de refinamento é transferir as estimativas de ingestão na população para a ingestão entre determinado grupo de consumidores. Considera-se vital o conhecimento da porcentagem de consumidores e os dados que não a incluem são bastante limitados. Uma das vantagens de estimar a ingestão somente entre os consumidores é evitar a subestimativa. Uma dificuldade, porém, é que o método de coleta influenciará, por si só, uma porcentagem da estimativa entre os consumidores. Por exemplo, um dia de pesquisa pode mostrar que metade (50 %) da população consome determinado alimento. Se a pesquisa for realizada durante dois dias, a porcentagem de consumidores aumentará, mostrando que nem todos os consumidores consomem aquele alimento todos os dias. Dessa forma, uma pesquisa com mais de 7 dias deve mostrar que 75 % da população consome aquele alimento. Para reduzir os custos da coleta, a aplicação de um questionário de freqüência alimentar (QFA) em um período curto de dias é uma forma de manter a exatidão dos dados [não mais que de 3 a 4 dias consecutivos para Chambolle (1999)]. Um refinamento adicional dos dados do nível de uso do aditivo alimentar pode ser a determinação da porcentagem de marcas de uma determinada categoria de alimentos que contém o aditivo em questão. É incorreto supor que todos os aditivos permitidos para uso nos alimentos são atualmente usados em seu processamento (DOUGLASS *et al*. 1997; GIBNEY & LAMBE, 1996; LÖWIK, 1996; RENWICK, 1996).

Nos Estados Unidos, uma metodologia chamada *Menu Census Survey* foi desenvolvida pelo Comitê de Revisão GRAS (*Generally Recognised as Safe*) da Academia Nacional de Saúde com o objetivo de estimar a ingestão de substâncias por meio da dieta. A metodologia, que sofreu modificação da *Marketing Research Corporation of America* (MRCA), é usada pelo Governo e por organizações econômicas para estimar a ingestão de substâncias, como os

aditivos alimentares. A *Menu Census Survey* é baseada no diário alimentar de 14 dias, considerado mais representativo do que o R24 ou o recordatório de 1 a 3 dias. Esse tipo de pesquisa é dispendioso, sendo difícil manter pesquisadores de campo para cobrir os 14 dias para uma amostra grande. As responsabilidades dos participantes aumentam, podendo levar a uma menor participação. Além disso, a qualidade dos dados pode diminuir com o prolongamento da pesquisa. Em certas situações, a aplicação de pesquisas mais curtas (recordatório de 1 a 3 dias), intercaladas com QFA, torna-se uma alternativa viável (LAMBE *et al*. 2000).

Nos estudos realizados por Verger *et al*. (1998), foram desenvolvidas três etapas. Na primeira etapa, os dados de consumo de alimentos foram derivados de fontes previamente definidas. As quantidades de aditivos consideradas foram os LMP definidos pelas autoridades européias. Dessa forma, foi possível avaliar a Ingestão Diária Máxima Teórica Reduzida (R*educed Theoretical Maximum Daily Intake* – RTMDI), a média e os percentis (90, 95 e 97,5) de distribuição de consumo de alimentos na população geral. Com isso, a RTMDI representa uma superestimação do consumo real do aditivo alimentar. É mais usual considerar a estimativa baseada nos LMP de aditivos nos alimentos e bebidas pelos regulamentos do que as quantidades preconizadas pelos fabricantes e pelos órgãos governamentais de controle.

Na segunda etapa, as indústrias usuárias de aditivos alimentares ofereceram informações quanto às quantidades de aditivos utilizadas do início ao final do processo de industrialização, permitindo a exclusão de algumas categorias de produtos, que nunca contiveram o aditivo considerado; à estimativa da fatia de mercado ocupada pelos produtos que contêm tal aditivo em relação a toda a categoria de produtos considerada (ou, inversamente, a estimativa da fatia de mercado dos produtos que não contêm o aditivo), e à utilização das quantidades médias de aditivos, fornecidas pela indústria ou por meio de análise. Todas essas informações permitiram reduzir a superestimação da primeira etapa, usando níveis reais da utilização dos aditivos, sendo

possível, inclusive, estabelecer a Ingestão Diária Teórica Máxima Corrigida (C*orrected Maximum Theoretical Daily Intake* – CMTDI).

A terceira etapa consistiu na caracterização dos maiores consumidores de três aditivos, dentre eles os sulfitos, que excederam a IDA. Para esse estudo, os consumidores, selecionados de diversas fontes, foram caracterizados somente por características socioeconômicas dos domicílios (compras, classe socioeconômica, área residencial) e não de acordo com as características sociodemográficas dos indivíduos (sexo, idade e categoria profissional).

Em estudo clássico para determinar os níveis máximos para os aditivos utilizados em alimentos, Hansen (1966) partiu do pressuposto de que quando a criança começar a ingerir alimentos que contêm aditivos, a ingestão energética não excederá 100 kcal/kg pc/dia. Essa suposição foi possível por meio da análise de dados que demonstraram uma relação inversa entre a idade e as necessidades energéticas por unidade de peso corporal. Foi usado um fator de conversão de 2 kcal/g para os alimentos, incluindo leite e excluindo as outras bebidas, para estimar a quantidade máxima de alimentos que contêm aditivo, ou seja, 50 g de alimento/kg pc/dia. Os limites máximos de aditivos podem então ser calculados como sendo iguais a IDA por 50 g de alimento ou (IDA x 20) mg/kg de alimento. Considerando que os fatores de segurança da IDA cobrem diferenças entre adultos e crianças, mas levando em conta a incerteza quanto aos cálculos para crianças muito jovens, foi estabelecido um fator 2, ajustando os limites máximos dos aditivos para (IDA x 40) mg/kg de alimento.

Hansen (1966) também propôs ajuste dos limites máximos para os níveis tecnológicos, por meio da restrição do uso de aditivos relevantes a metade ou a um quarto dos alimentos, usando hipóteses relacionadas às proporções dos alimentos processados, que são interpretadas levando em conta que os alimentos processados não representam mais de 50 % da ingestão total de alimentos e que metade dos alimentos é representada por leite, carne, peixe, aves, legumes e cereais, que contêm menos aditivos. Os níveis máximos de

aditivos alimentares podem ser então (IDA x 80) mg/kg de alimento ou (IDA x 160) mg/kg de alimento.

Para determinar os limites máximos de aditivos em líquidos, Hansen (1966) revisou a literatura em relação à ingestão de líquidos por bebês, crianças e adultos em climas quentes e concluiu que nenhuma pessoa consome mais de 100 mL/kg pc/dia de líquido, excluindo o leite. Assim, com base nesse consumo, há a cobertura tanto de crianças quanto de adultos. Foi proposto o ajuste dos níveis máximos dos aditivos para os níveis tecnológicos, se necessário, dobrando os níveis máximos. Ao considerar os níveis máximos para as bebidas carbonatadas, supõe-se que elas representam 25 % da ingestão máxima de 100 mL/kg pc/dia. Supondo uma densidade de 1 g/mL, o nível máximo para o uso de um aditivo em bebidas carbonatadas pode ser calculado como (IDA x 40) mg/kg de bebida. Obtêm-se, dessa forma, as TMDIs tanto para alimentos sólidos quanto para líquidos (DOUGLASS *et al*. 1997).

Foram essas as premissas envolvidas para o desenvolvimento do *Danish Budget Method*, ou Método *Budget*, desenvolvido na Dinamarca e considerado um bom instrumento que permite iniciar o estabelecimento de prioridades para o controle da ingestão de aditivos alimentares, com base na duração média potencial de consumo de alimentos. É um método de estimativa de consumo que prevê comparações com a IDA. Ele é baseado na suposição de que a ingestão de aditivos é limitada pela quantidade de energia requerida e pela quantidade de alimentos e bebidas ingeridos diariamente. Esse método é baseado na existência de um limite fisiológico para as quantidades de alimentos e bebidas que podem ser ingeridos diariamente, ou seja, 1,5 kg de alimentos e 6 L de bebidas para um adulto de 60 kg (HANSEN, 1979).

Outras suposições são baseadas no maior número de alimentos e bebidas que contêm aditivos e na quantidade máxima de aditivos nos alimentos sólidos e nos líquidos, o que deve ser analisado criteriosamente, já que determinados aditivos são permitidos somente em alimentos ou ingredientes que não fazem parte da dieta habitual. Nesse caso, outros métodos são

necessários (VERGER *et al*. 1998). Nas estimativas de cálculo de consumo para os aditivos utilizados em alimentos sólidos e bebidas, as IDAs são divididas em duas frações — uma proporção para os alimentos e outra proporção para as bebidas. Essas proporções são definidas arbitrariamente (DOUGLASS *et al*. 1997).

Métodos probabilísticos podem ser usados para todos os dados disponíveis. Os consumidores não consomem somente uma quantidade de alimento e as substâncias não estão presentes nos alimentos em uma única concentração. As técnicas probabilísticas são desenvolvidas para combinar as distribuições de consumo e concentração, gerando um modelo de distribuição da ingestão real. O modelo Monte Carlo é um exemplo de técnica probabilística. A sua característica principal é a obtenção de um padrão de consumo de alimento por meio de uma distribuição randomizada, representado graficamente. As representações gráficas obtidas são combinadas para gerar a primeira figura da distribuição da ingestão. O processo pode ser repetido por mais de 500.000 vezes para gerar a distribuição da ingestão, inclusive para cada alimento. Assim, a distribuição da ingestão total pode ser analisada com o objetivo de realizar estudos estatísticos na população. Para fixar a magnitude do risco alimentar acima dos percentis, recomenda-se a caracterização do nível alto de ingestão. Se a distribuição da ingestão foi uma representação exata da ingestão real, então poderia se esperar que a ingestão de 0,1 % da população excedesse aquele nível — embora existam razões para acreditar que o maior percentil de ingestão não reflita, necessariamente, a situação real (TENNANT, 1999).

Na Irlanda (FOOD SAFETY AUTHORITY OF IRELAND, 2001), o uso dos aditivos é monitorado pelo *Irish National Food Ingredient Database* (INFID) 1995-99, que concluiu:

- 68 % dos alimentos do INFID usam pelo menos um tipo de aditivo;

- dos 300 aditivos permitidos pela União Européia, 54 % estão presentes nos alimentos do INFID;

- as categorias de aditivos mais comumente utilizadas representam, respectivamente, 18 e 13 % do uso de aditivos. Ambos são distribuídos em mais de 50 % dos grupos de alimentos;

- algumas categorias de aditivos, como os antiumectantes, umectantes e seqüestrantes representam menos de 1 % dos aditivos utilizados;

- os cálculos levaram em conta o número de porções necessário para alcançar a IDA, considerando que o aditivo estava presente em seu LMP. Esses cálculos são apropriados para aditivos permitidos em um único alimento ou em um número limitado de alimentos;

- os cálculos de nutrientes para comparação com a ingestão atual de nutrientes foram conduzidos com relação a alguns aditivos;

- a ingestão de alimentos crus, baseada no *Irish National Nutrition Survey* (INNS), foi multiplicada pelo LMP, o que forneceu uma estimativa conservadora da ingestão do aditivo;

- nos casos em que os grupos de alimentos não cobriram a ingestão de alimentos específicos, os tamanhos padrões de porções e o consumo diário foram considerados para representar a ingestão.

- entre os conservantes, os sulfitos: metabissulfito de sódio, dióxido de enxofre, sulfito de sódio e metabissulfito de potássio são utilizados no seguinte número de marcas de alimentos: 120, 108, 27 e 6, o que representa, respectivamente, as seguintes porcentagens de contribuição no uso de conservantes: 11, 10, 2 e 1. Em outras categorias, como os antioxidantes, a contribuição não é representativa.

Antes de aplicar qualquer método de avaliação, o INFID estabeleceu um padrão de presença ou ausência de aditivos nos diversos grupos de alimentos. Quando o aditivo estava ausente em um grupo de alimentos representado no INFID, o mesmo era excluído dos cálculos de ingestão. Quando era permitido em um determinado grupo de alimentos, considerado pouco consumido, as estimativas de ingestão desse grupo de alimentos não eram necessárias. E quando era permitido em um grupo de alimentos comumente consumido,

mesmo que pouco representado no INFID, as estimativas de ingestão potencial eram calculadas. Em todas as estimativas de consumo de um aditivo, considerava-se que o aditivo em questão estava presente no alimento no qual era permitido, em seu LMP, o que pode representar um fator de superestimação da ingestão do aditivo.

2.4 Considerações sobre os sulfitos

2.4.1 Usos e funções

O tratado *Pomona,* de John Evelyn, publicado em 1670, é a primeira referência em relação ao uso de enxofre na produção de bebidas (JARVIS & LEA, 2000; ROSE & PILKINGTON, 1989).

Os gregos, romanos e egípcios já utilizavam o dióxido de enxofre para limpar e desinfetar as cascas de uva, mas foi somente nos anos de 1920 que os sulfitos passaram a ser aplicados com várias funções tecnológicas durante o preparo, o armazenamento e a distribuição dos alimentos, transformando-se nos conservantes mais extensamente utilizados (DiPERSIO; KENDALL & SOFOS, 2004; KELLY *et al*. 2002; KROKIDA *et al*., 2000; LECLERCQ *et al*. 2000; SOLOMON; RHODEHAMEL & KAUTTER, 1994; TAYLOR, 1993; WEDZICHA, 1992; SAFAVI & ENSAFI, 1991; BRANEN, DAVIDSON & SALMINEN, 1990; FAZIO & WARNER, 1990; ROSE & PILKINGTON, 1989; TAVARES *et al*. 1987; TAYLOR & BUSH, 1987; YABIKU *et al*. 1987; BEHRE, 1986; MARTIN, NORDLEE & TAYLOR, 1986; MODDERMAN, 1986; OUGH, 1986; TAYLOR & BUSH, 1986; BARNETT, 1985; SULLIVAN & SMITH, 1985; BURROUGHS, 1981; CARR, 1981; LLOYD, 1981; WEDZICHA, 1981a; WEDZICHA, 1981b; UNITED STATES, 1975).

Essas funções incluem:

- a antimicrobiana, atuando como inibidor da lactato desidrogenase e outras desidrogenases bacterianas;

- a fungistática;

- a inibidora de reações enzimáticas e não-enzimáticas, como as reações de escurecimento — em frutas e hortaliças levemente coloridas, como maçãs e batatas desidratadas;

- as antioxidantes, para prevenir a oxidação — seqüestradores de oxigênio e agentes redutores;

- a inibidora de várias enzimas, incluindo proteases, oxidases e peroxidases;

- e, por último, a quelante (em açúcares e amido).

Além dessas funções primárias, os sulfitos têm outras funções secundárias durante o processamento dos alimentos. Alguns sulfitos ligam-se a moléculas presentes nos alimentos tais como aldeídos, cetonas, açúcares e taninos. Os sulfitos que não se ligam a outras moléculas são chamados de sulfitos livres, sendo uma mistura de dióxido de enxofre (SO_2), íon bissulfito (HSO_3^-) e íon sulfito (SO_3^{2-}) em equilíbrio químico dinâmico. Em certas condições, uma porção das moléculas de sulfitos ligados, chamada de ligação sulfito reversível, dissocia-se, formando sulfitos livres, sendo que o uso dos sulfitos em alimentos está relacionado às atividades funcionais dos mesmos. Os sulfitos também podem se originar de produção endógena por leveduras na fermentação de produtos, como cerveja e vinho (TAYLOR & BUSH, 1987; TAYLOR & BUSH, 1986; WALKER, 1985).

Para manter os alimentos atrativos ao consumidor, os sulfitos são utilizados com a finalidade de preservar a textura, o odor, o conteúdo de vitaminas e a cor dos mesmos. O tratamento com dióxido de enxofre é amplamente utilizado na indústria de alimentos para reduzir o escurecimento de frutas durante a secagem e o armazenamento, possuindo também aplicações em restaurantes e supermercados. Absorvidos pelos alimentos, substituem o ar dos tecidos vegetais, fragilizam as paredes celulares (o que torna a secagem mais fácil), destroem enzimas que provocam o escurecimento nas superfícies cortadas, apresentando, ainda, propriedades fungicidas/inseticidas, além de tornar a cor das frutas secas mais atrativa. Ele inibe o escurecimento de frutas

secas durante o armazenamento e a comercialização, preservando o ácido ascórbico e o caroteno (CARDOSO *et al*, 2007; RAHMAN & PERERA, 1999; SAPERS, 1993; IYENGAR & McEVILY, 1992; TAYLOR & BUSH, 1987; YABIKU *et al*. 1987; BEHRE, 1986; TAYLOR & BUSH, 1986).

2.4.2 Alimentos com SO_2

Devido às suas múltiplas funções, os sulfitos são usados em vários produtos, como licores, frutas secas, hortaliças desidratadas (exceto cebola e alho), frutas e legumes frescos, sucos de frutas, bebidas carbonatadas, produtos cárneos como salsichas, peixes e lingüiças, e vinhos (CINTRA *et al*. 1999; ENVIRONMENTAL HEALTH SERVICE, 1996; TAYLOR, 1993; QUATTRUCCI & MASCI, 1992; USSEGLIO-TOMASSET, 1992; LECOS, 1988; TAYLOR & BUSH, 1987; TAYLOR & BUSH, 1986; SULLIVAN & SMITH, 1985; UNITED STATES, 1975).

Os alimentos e bebidas que podem conter sulfitos são: batatas (fatiadas, frescas, congeladas, desidratadas ou enlatadas); frutas (frescas, desidratadas ou em conserva tipo *maraschino*); hortaliças (frescas, congeladas, enlatadas ou secas); cogumelos frescos; peixes (frescos, congelados, enlatados ou secos, mariscos, caranguejo, ostra, vieiras, camarão); cerveja; sidra; vinho (industrializado ou caseiro); vinagre de vinho; saladas (particularmente saladas embaladas); temperos para saladas; salada de abacate (*guacamole*); bebidas com frutas; sucos, purês e tortas de frutas; sucos de hortaliças; biscoitos assados (*cookies*, *crackers*, *waffles*, massa assada para torta); ingredientes processados de alimentos (gelatina, açúcar de beterraba, adoçantes de milho e amidos); molhos e temperos; geléias e gomas; chucrute e salada de repolho (*coleslau*); sopas (enlatadas e desidratadas); coberturas de frutas, xaropes e molhos doces (xarope de eucalipto, xarope de milho); chá instantâneo; salgadinhos, petiscos e aperitivos (misturas de frutas secas, castanhas e nozes, *crackers* recheados) (STEINMAN, LE ROUX & POTTER, 1993; FAZIO & WARNER, 1990; BEHRE, 1986).

2.4.3 Compostos SO_2 usados como conservantes

Os compostos que contêm enxofre e que são permitidos para uso como aditivos alimentares são: dióxido de enxofre (SO_2 – anidrido sulfuroso), sulfito de sódio (Na_2SO_3), bissulfito de sódio ($NaHSO_3$ – sulfito ácido de sódio, sulfito hidrogenado de sódio), metabissulfito de sódio ($Na_2S_2O_5$ – pirossulfito de sódio), metabissulfito de potássio ($K_2S_2O_5$ – pirossulfito de potássio), sulfito de potássio (K_2SO_3), bissulfito de potássio ($KHSO_3$), metabissulfito de cálcio (CaS_2O_5), sulfito de cálcio ($CaSO_3$), bissulfito de cálcio ($Ca(HSO_3)_2$) e ácido sulfúrico (H_2SO_4). Os íons são: sulfito (SO_3^{2-}), bissulfito (sulfito hidrogênio – HSO_3^-) e metabissulfito ($S_2O_5^{2-}$) (PIZZOFERRATO, DI LULLO & QUATTRUCCI, 1998; ENVIRONMENTAL HEALYH SERVICE, 1996; WEDZICHA, 1992; FRANÇOIS-COLLANGE *et al*. 1991; BRANEN, DAVIDSON & SALMINEN, 1990; FAZIO & WARNER, 1990; PERRIN-ANSART, 1989; ROSE & PILKINGTON, 1989; LECOS, 1988; BEHRE, 1986; MODDERMAN, 1986).

2.4.4 Formas de usos dos compostos SO_2

A adição de sulfitos aos alimentos é altamente dependente da natureza química do alimento, do tipo e da extensão do processamento utilizado, da duração e das características das condições de armazenamento, da permeabilidade da embalagem e do limite de adição. Eles reagem rapidamente com uma variedade de componentes dos alimentos, incluindo açúcares reduzidos, aldeídos e cetonas, e proteínas para formar vários compostos (TAYLOR & BUSH, 1987; TAYLOR & BUSH, 1986).

O tratamento com sulfitos pode ser feito pelo aquecimento do enxofre ou pela imersão em solução de sulfitos. O gás dióxido de enxofre pode ser produzido pelo aquecimento do enxofre com oxigênio do ar. As vantagens do uso de uma solução de bissulfito são a diminuição da poluição do ar, o maior controle do processo de adição dos sulfitos, o menor tempo de contato com o

agente sulfurado e a queda nas perdas por desabsorção durante a secagem (RAHMAN & PERERA, 1999).

O metabissulfito de sódio é o principal composto usado na conservação de alimentos, gerando o dióxido de enxofre e seus ânions. Em uma solução, o bissulfito gera SO_2 (aq), HSO_3^- e SO_3^{2-}. O tipo dominante, entre pH 2 e 5-7, é o HSO_3^-. Em valores de pH mais altos, o íon SO_3^{2-} é o dominante. Embora para valores de pH menores que 1,86, o SO_2 (aq) e o H_2SO_3 são os tipos mais presentes. Concentrações acima de 0,1 *M* levam à formação de quantidades significativas do íon metabissulfito ($S_2O_5^{2-}$). As reações químicas originadas quando o dióxido de enxofre é adicionado às frutas e a outros alimentos são complexas. Quando o dióxido de enxofre é absorvido pelas frutas, ou por produtos com pH similar, ele é convertido, principalmente, em íon bissulfito. O íon bissulfito pode permanecer livre e disponível para retardar a formação de compostos tipo *Maillard*, e pode também se ligar, reversivelmente, a certos compostos, como os grupos carbonilas de aldeídos. A maior parte do íon bissulfito fica disponível em solução a pH 3,5. Considera-se que esses sulfitos combinados não retardam a deterioração do alimento. Nos alimentos com pH ácido (pH > 4), o SO_2 pode volatilizar desprendendo-se do alimento (RAHMAN & PERERA, 1999; GUEKEZIAN *et al*., 1997; TAYLOR & BUSH, 1987; TAYLOR & BUSH, 1986; BARNETT, 1985; GUNNISON, 1981; UNITED STATES, 1975).

Um fator que influencia a ligação do dióxido de enxofre é a disponibilidade de oxigênio no sistema. Com o oxigênio presente, parte do dióxido de enxofre pode ser oxidada, irreversivelmente, a forma sulfato, um composto inócuo. Por meio da remoção dessas moléculas do dióxido de enxofre livre do sistema, o equilíbrio é deslocado e libera-se mais dióxido de enxofre ligado. A taxa de oxidação do dióxido de enxofre livre varia durante a secagem, dependendo da técnica utilizada, com uma taxa 50 % maior na secagem feita ao sol do que naquela realizada por desidratação da fruta. Alguns fatores afetam a utilização do dióxido de enxofre em frutas e hortaliças, tais como a concentração e a temperatura da solução de imersão, o tempo de

imersão, a forma e as condições das amostras (por exemplo, descascada ou não, inteira ou fatiada) e a agitação da solução (QUATTRUCCI & MASCI, 1992; WEDZICHA, 1992). A absorção de enxofre pelo damasco ocorre principalmente na superfície cortada. Não se observa absorção através da casca do damasco. Em damascos secos, de 30 a 40 % do dióxido de enxofre encontra-se na forma combinada (ROSE & PILKINGTON, 1989).

A forma ativa do aditivo como agente antimicrobiano é o SO_2, sendo que o aditivo combinado não possui ação antimicrobiana. Por outro lado, sua ação conservante com relação ao escurecimento enzimático e não-enzimático é devida inteiramente às espécies de sulfitos livres. Parte do aditivo é perdida em reações relacionadas à sua ação conservante, mas a maioria das reações do dióxido de enxofre com os componentes dos alimentos conduz a outras reações cuja contribuição à qualidade do alimento é desconhecida (ROSE & PILKINGTON, 1989; WEDZICHA, 1981a; WEDZICHA, 1981b).

Desde 1959, os sulfitos encontram-se nas regulamentações americanas (*Code of Federal Regulations* – CFR), sendo considerados compostos GRAS, quando utilizados de acordo com as BPF, exceto em carnes e alimentos fontes de vitamina B_1 (tiamina). Em resposta a questionamentos sobre sua segurança, em 1986, o *Food and Drug Administration* (FDA) cancelou o estado GRAS dos sulfitos em frutas e muitas hortaliças servidas ou vendidas cruas aos consumidores (PIZZOFERRATO, DI LULLO & QUATTRUCCI, 1998; LECOS, 1988; TAYLOR & BUSH, 1987; BEHRE, 1986; TAYLOR & BUSH, 1986). Em março de 1990, o FDA estendeu esse cancelamento às batatas frescas servidas ou vendidas sem embalagem (e rótulo), disposição essa revogada em maio de 1992 (SAPERS, 1993).

As restrições do FDA ao uso de sulfitos em certos produtos de frutas e hortaliças e a possibilidade da divulgação de outras limitações de uso permitiram que os pesquisadores e fabricantes desenvolvessem substitutos aos sulfitos, cuja multifuncionalidade é difícil de ser obtida. O ácido ascórbico (vitamina C) é um exemplo. Tem ocorrido também a proliferação de inibidores

de escurecimento. Pesquisa realizada em 1986 pelo *National Restaurant Association* (NRA) relacionou 13 tipos. Esses produtos contêm, geralmente, ácido ascórbico ou ácido eritrórbico, ou seus sais de sódio, normalmente em combinação com um ou mais coadjuvantes, como o ácido cítrico ou algum outro acidulante, sal de cálcio, fosfato, cloreto de sódio, cisteína, ou um conservante, como benzoato ou sorbato de potássio. Outras possíveis alternativas são os inibidores de PFO (polifenol oxidase), como o ácido cinâmico e o ácido benzóico; como o cobre é essencial para a PFO, agentes quelantes que se ligam ao cobre podem ser agentes inibidores do escurecimento; aminoácidos contendo grupo sulfidrila (a capacidade da cisteína de inibir a PFO já é reconhecida) (SAPERS, 1993).

Além dos aspectos toxicológicos, há outras razões para reduzir o uso de sulfitos: eles corroem os equipamentos (QUATTRUCCI & MASCI, 1992).

2.4.5 Toxicocinética dos sulfitos

O metabolismo dos sulfitos consiste essencialmente na sua oxidação em sulfato, via enzima sulfito oxidase (SOD). Essa enzima é amplamente distribuída nos tecidos mamários, com maior atividade no fígado, no coração e no rim; ela metaboliza e detoxifica os sulfitos ingeridos e o SO_2 inalado pelos pulmões, representando também a etapa final na conversão de sulfitos ligados a aminoácidos essenciais, cisteína e metionina, em sulfato. Esse processo metabólico normal converte o excesso desses aminoácidos ingeridos em sulfato, que pode ser facilmente excretado pela urina. Normalmente, um adulto excreta aproximadamente 2,5 g de sulfato por dia na urina. Os sulfitos exógenos ingeridos representam uma pequena fração dessa excreção de sulfato. A alta capacidade da SOD resulta em um rápido metabolismo dos sulfitos exógenos. Sulfitos administrados em macacos por via intravenosa têm meia vida biológica de 10 minutos somente. Em todas as espécies testadas, a maior parte dos sulfitos é rapidamente excretada na forma de sulfato. Pequenas quantidades de sulfitos não oxidadas em sulfato podem se converter em

tiossulfato, também excretado na urina, ou em tiossulfatos ligados a proteínas, permanecendo maior tempo no organismo (QUATTRUCCI & MASCI, 1992; HUI *et al*. 1989; TAYLOR & BUSH, 1987; TAYLOR & BUSH, 1986; WEVER, 1985; LLOYD, 1981; UNITED STATES, 1975).

Pequenas quantidades de sulfitos são formadas naturalmente no homem por meio do metabolismo intermediário e são logo metabolizadas em sulfatos pela SOD (LECLERCQ *et al*. 2000).

O metabolismo das formas combinadas de sulfitos, que são predominantemente encontradas nos alimentos, é pouco estudado. A administração de proteína sulfurada em ratos demonstrou que a maior parte do enxofre foi excretada na urina como sulfato em 48 horas. Outra forma combinada de sulfito, o 3-deóxi-4-sulfuhexocelulose (um açúcar sulfurado), é metabolicamente inerte e excretada na urina e nas fezes. O metabolismo das formas combinadas de sulfitos pode depender da sua estabilidade e da probabilidade de que se tornará livre durante o processo digestivo ou outro processo metabólico (TAYLOR & BUSH, 1987; TAYLOR & BUSH, 1986).

A importância da SOD no metabolismo dos sulfitos exógenos e endógenos é dramaticamente ilustrada por casos de deficiência congênita em humanos. Essa condição é caracterizada pelo grande aumento da excreção de sulfitos, tiossulfato e sulfato-S-cisteína na urina. Crianças com esse tipo de deficiência têm o globo ocular deslocado e apresentam anormalidades neurológicas severas que resultam em deficiência física e mental e pouco tempo de vida (CHIARANI, 2008; TIL & FERON, 1992; TAYLOR & BUSH, 1987; TAYLOR & BUSH, 1986).

2.4.6 Aspectos nutricionais e tecnológicos

Os sulfitos exercem um efeito positivo sobre o ácido ascórbico (vitamina C), não só inibindo seu envolvimento nas reações de escurecimento, mas também prevenindo a oxidação. De fato, os sulfitos agem sobre a ascorbato oxidase, amplamente presente em vegetais, e sobre a PFO. Ambas as

enzimas, por meio de mecanismos diferentes, podem induzir a oxidação do ácido ascórbico para formas biologicamente inativas (SAPERS, 1993).

O efeito do dióxido de enxofre sobre a tiamina em alimentos armazenados tem importância nutricional e toxicológica significativa. A molécula de tiamina é quebrada pelo dióxido de enxofre e a extensão da destruição depende do tempo e das condições de armazenamento. Há a possibilidade de que a destruição da tiamina pelos sulfitos possa levar a uma deficiência dessa vitamina. Em ratos com adequado suprimento de tiamina e que consumiam 300 mg/kg/dia de sulfitos não foi observado nenhum efeito adverso; já em ratos com deficiência de tiamina, os efeitos tóxicos apareceram em doses abaixo de 50 mg/kg/dia (UNITED STATES, 1975). O FDA proíbe o uso de sulfitos em alimentos que contribuem com mais de 10 % da Ingestão Dietética Recomendada (*Recommended Dietary Allowance* – RDA) de tiamina. As quantidades de sulfitos normalmente presentes nos alimentos, como frutas e hortaliças desidratadas, não causam destruição significativa do conteúdo de tiamina em uma refeição que inclui carne e outras fontes de tiamina. Além disso, os sulfitos não podem ser utilizados em carnes, pois devolverem a cor avermelhada a elas, dando a falsa sensação de frescor (BEHRE, 1986).

Os sulfitos podem induzir a oxidação das duplas ligações dos ácidos graxos poliinsaturados (*Poly Unsaturated Fatty Acids* – PUFA). Baixas concentrações de bissulfito induziram a oxidação em óleo de milho. Esse efeito tem pouca importância nutricional, já que as maiores fontes de PUFA não são tratadas com esse aditivo (QUATTRUCCI & MASCI, 1992). Sugere-se que os sulfitos em dietas semipuras armazenadas podem reagir com as gorduras insaturadas levando à formação de polímeros de ácidos graxos insaturados e/ou outras substâncias tóxicas (TIL & FERON, 1992).

A cobalamina (vitamina B_{12}) é destruída quando os sulfitos estão em altas concentrações nos alimentos. Sugere-se que a anemia severa observada em ratos seja induzida pela administração de alimentos com alta concentração de sulfitos. O dióxido de enxofre forma substâncias estáveis com as flavinas

resultando na sulfuração do átomo N5 da flavina (vitamina B_2) que representa o receptor de hidrogênio. Isso significa a redução da riboflavina nos alimentos e a inibição da atividade das enzimas que contêm flavina nos seus grupos prostéticos. Em relação à piridoxina (vitamina B_6), o dióxido de enxofre reage com o grupo aldeído e forma um composto hidroxisulfurado. Na presença de Mn^{2+}, O_2, e glicina no pH dos sistemas alimentares, o dióxido de enxofre catalisa a destruição do β-caroteno. Essa perda pode ser prevenida pela adição de seqüestrantes de radicais livres, como o α-tocoferol e o butil hidroxi tolueno (*Butylated hydroxytoluene* – BHT). Estudos experimentais conduzidos *in vivo* sobre o efeito do metabissulfito de potássio ($K_2S_2O_5$) nos níveis hepáticos de vitamina A obtiveram resultados controversos. O sulfato derivado do metabolismo dos sulfitos pode aumentar a excreção de cálcio. Em experimentos *in vivo* esse efeito foi comprovado dependendo do conteúdo de cálcio da dieta (QUATTRUCCI & MASCI, 1992; STAMMATI *et al*. 1992).

De acordo com Quattrucci & Masci (1992), em vinho tratado com 400 ppm de SO_2, 50 % da tiamina (vitamina B_1) foram destruídos em uma semana. Em frutas e hortaliças desidratadas armazenadas a temperatura ambiente, a perda de tiamina depois de 28 dias de armazenamento variou de 26 a 38 % do conteúdo total. A manipulação subseqüente de alimentos tratados pode levar a perdas adicionais substanciais. Em países como a Itália (QUATTRUCCI & MASCI, 1992) e o Brasil (TAVARES *et al*. 1987), a adição de sulfitos não é permitida em produtos derivados de carne, como as salsichas, que são consideradas fontes desse nutriente.

Os sulfitos são usados em hambúrguer habitualmente e, algumas vezes, de maneira abusiva. Em relação ao produto cru, 62,5 % das amostras apresentaram valores acima daquele considerado o máximo permitido (30 % com concentração de SO_2 total 2 vezes esse valor), e o restante um pouco maior, embora essa categoria exclua todos os hambúrgueres de frango. Em particular, algumas amostras continham de 8 a 16 vezes o nível máximo. Isso mostra que as quantidades de sulfitos adicionadas são muito altas, embora

existam perdas entre 25 e 46 % em produtos cárneos, dependendo da composição e da forma de preparo. Os resultados de perdas em hambúrgueres fritos sob condições controladas mostraram que elas variaram de 18 a 1745 µg/g para o SO_2 livre e entre 55 e 5006 µg/g para o SO_2 total. Ao considerar a porcentagem de redução para as diferentes amostras, observa-se que ela não depende da concentração de sulfitos. Igualmente, a redução não tem qualquer relação com o componente principal usado no preparo dos hambúrgueres. Para os sulfitos livres, a perda seria de 36,8 ± 11,1 %; para os sulfitos totais, de 40,9 ± 12,6 %. Aplicando esse valor ao nível residual máximo permitido de SO_2 (450 µg/g) e considerando um fator de correção de perda médio (1,48 ± 0,15), pode-se estabelecer um nível aproximado de 394 µg/g de SO_2 total como limite para hambúrgueres fritos. Usando esse critério, a maioria dos hambúrgueres crus considerados impróprios para consumo, do ponto de vista legal, pode se tornar própria para consumo após a fritura. Se levada em conta a IDA para um adulto (42 mg SO_2), para 25 % das amostras estudadas, o consumo de 2 ou 3 hambúrgueres por semana foi considerado seguro (ARMENTIA-ALVAREZ *et al*. 1993; ARMENTIA-ALVAREZ, PEÑA-EGIDO & GARCIA-MORENO, 1993).

Em muitos alimentos, somente uma pequena fração dos sulfitos adicionados permanece livre (sulfitos inorgânicos no produto final). De fato, em massas de biscoito doce, 63 % dos sulfitos adicionados reagem com os componentes da farinha, 30 % são oxidados em sulfato e menos de 0,2 % permanece livre. Em geléia de morango, 98,5 % dos sulfitos absorvidos são volatilizados a SO_2 durante a cocção ou reagem com os componentes da geléia; menos de 1,5 % permanece como sulfitos inorgânicos. A alface adicionada de sulfitos é uma exceção, já que a maior parte dele permanece livre, podendo explicar as reações adversas causadas aos asmáticos por conta de seu consumo (TAYLOR & BUSH, 1987; BEHRE, 1986; TAYLOR & BUSH, 1986; BARNETT, 1985; UNITED STATES, 1975).

Em estudo realizado por Martin, Norddlee & Taylor (1986), alface preparada tratada com solução contendo 3400 mg/kg de SO_2 total retém altos

níveis de SO_2 livre (537-683 mg/kg) e total (746-784 mg/kg) durante um período de armazenamento de 24 horas. No controle, os equivalentes de SO_2 variavam de 16 a 75 mg/kg. Esses níveis são suficientemente altos (o que demonstra abuso na quantidade de sulfitos utilizada — até 20 vezes acima do limite permitido — e no tempo de tratamento) para permitir que os asmáticos sensíveis aos sulfitos possam facilmente obter uma dose de sulfitos acima do seu nível de tolerância individual, ainda mais quando se considera que a forma de sulfitos mais presente, a inorgânica, é reconhecida como aquela que causa problemas a essa população. A alta proporção de SO_2 livre é esperada porque a alface apresenta grande quantidade de água e celulose, componentes que não permitem que os sulfitos se liguem (em 270 mg de sulfitos há somente 0,6 mg de SO_2 total). Na salada de repolho (*coleslau*) tratada, foram encontrados níveis residuais de 350 mg/kg de SO_2 total, enquanto na salada não tratada, somente 25 mg/kg. Os menores níveis de SO_2 total na salada de repolho podem ser explicados devido à ocorrência natural de compostos contendo enxofre e outros ácidos voláteis no repolho e na cebola.

Beelman, Barder & Edwards (1988) observaram que cogumelos lavados em solução de sulfitos de sódio a 1000 ppm tinham uma quantidade residual total inicial baixa (média de 48,3 ppm). Também as concentrações eram rapidamente reduzidas a níveis não detectados (menos que 10 ppm), após 24 horas de armazenamento, sugerindo que cogumelos frescos e lavados não representam risco de intoxicação quando processados, embalados e comercializados obedecendo às práticas corretas.

Algumas análises realizadas na Itália mostraram redução de 25 % a 50 % de sulfitos após um mês de armazenamento de produtos derivados de peixe, batatas e frutas secas (LECLERCQ *et al*. 2000).

2.4.7 Efeitos tóxicos: reações de sensibilidade

O primeiro caso de sensibilidade aos sulfitos foi registrado em 1976 em um indivíduo não asmático com urticária e angioedema após o consumo de uma refeição em um restaurante (PERONI & BONER, 1995).

O dióxido de enxofre, dentro das quantidades permitidas nos alimentos, não causa efeitos adversos na maioria das pessoas. No entanto, alguns grupos populacionais, particularmente os asmáticos, podem ser bastante sensíveis a este conservante. As reações aos sulfitos ocorrem de 10 a 20 minutos após a ingestão (RIBERA *et al*. 2001; ENVIRONMENTAL HEALTH SERVICE, 1996; TAYLOR, 1993; LECOS, 1988; TAYLOR & BUSH, 1987; BEHRE, 1986; TAYLOR & BUSH, 1986). Há também casos de reações adversas em pacientes em nutrição parenteral (SMOLINSKE, 1992; PERRIN-ANSART, 1989).

Pequena parcela da população de asmáticos (4,6-8,4 %) é sensível aos sulfitos. A sensibilidade varia de indivíduo a indivíduo. Os mais sensíveis reagem a cápsulas contendo 5 mg de metabissulfito de potássio (aproximadamente 3 mg de equivalentes de SO_2), enquanto os menos sensíveis reagem a cápsulas contendo 200 mg de $K_2S_2O_5$. Pacientes sensíveis a 200 mg não terão problemas com a dieta devido à baixa probabilidade em alcançar esse nível, o que já não acontece com os mais sensíveis. Não foram demonstradas reações adversas após o consumo de porções grandes (227-341 g) de batata desidratada (purê) (30-80 mg SO_2 total/kg) e camarão (100 mg SO_2 total/kg). Também não ocorreram reações adversas à alface (400-500 mg SO_2 total/kg), ao damasco seco (2000-3000 mg SO_2 total/kg) e ao suco de uva branca (180-250 mg SO_2 total/kg) (TAYLOR & BUSH, 1987; BEHRE, 1986; TAYLOR & BUSH, 1986).

De acordo com Peroni & Boner (1995), de 35 a 65 % das crianças com asma severa apresentam broncoespasmo após a ingestão de alimentos com sulfitos.

Para a maior parte da população, não há evidências de que os sulfitos representam um risco, considerando-se os limites de uso preconizados pelos

órgãos oficiais. Essa conclusão foi obtida comparando as estimativas de ingestão de sulfitos com informações da toxicidade dos sulfitos em experimentos com animais (RIBERA *et al*. 2001; TIL & FERON, 1992; HUI *et al*. 1989; TAYLOR & BUSH, 1987; TAYLOR & BUSH, 1986; DULAK, CHIANG & GUNNISON, 1984; GUNNISON *et al*. 1981; GIBSON & STRONG, 1974; GIBSON & STRONG, 1973; SHTENBERG & IGNAT'VE, 1970). Em ratos, o nível no qual não se observa efeito adverso (NOAEL) foi de 72 mg de equivalentes de SO_2/kg pc/dia (TIL, FERON & DE GROOT, 1972a). Em suínos, o NOAEL foi de 3500 mg/kg, correspondendo a doses que variaram entre 42 e 179 mg de equivalentes de SO_2/kg por dia (TIL, FERON & DE GROOT, 1972b). Baseado no primeiro estudo, o JECFA (1974) estabeleceu um fator de segurança de 100 e estimou a IDA para humanos em 0,7 mg/kg por dia. Para um homem de 60 kg, a IDA é de aproximadamente 42 mg de equivalentes de SO_2 por dia, índice bem distante da média de consumo que é de 6 mg/dia para alimentos e 10 mg para os consumidores regulares de vinho e cerveja (TAYLOR, 1993; DUPUY, 1992; TAYLOR & BUSH, 1987; TAYLOR & BUSH, 1986).

Em resposta à proposta de renovar o estado GRAS dos sulfitos, foram enviados ao FDA vários estudos das reações alérgicas adversas atribuídas ao consumo de alimentos contendo sulfitos. Os estudos indicavam que os sulfitos poderiam induzir a episódios de asma na população de asmáticos. Em casos raros, reações asmáticas graves ou do tipo anafiláticas poderiam ocorrer. Por solicitação do FDA, a *Federation of American Societies for Experimental Biology* (FASEB) organizou, em 1984, um painel de revisão para reavaliar o estado GRAS dos sulfitos. No parecer final, o painel concluiu que os sulfitos não são teratogênicos, mutagênicos, ou carcinogênicos em animais de experimentação. O painel não encontrou nenhum dado toxicológico novo que sugerisse a necessidade de alterar o NOAEL, que é aproximadamente 10 vezes o limite de dióxido de enxofre para os grandes consumidores (percentil 99) e 180 vezes a média diária per capita de consumo (RENWICK, 1995; SAPERS, 1993).

Os sulfitos não têm efeito adverso no processo de reprodução e não foi comprovada resposta carcinogênica. Eles induzem mutações em testes com microrganismos e podem produzir danos ao cromossomo de células mamárias. Contudo, esses efeitos mutagênicos necessitam de doses muito elevadas. Não há comprovação científica da diferença de toxicidade entre as formas combinadas e as formas livres dos sulfitos (TIL & FERON, 1992; TAYLOR & BUSH, 1987; TAYLOR & BUSH, 1986; GUNNISON, 1981; UNITED STATES, 1975; GIBSON & STRONG, 1973). Para Stammati *et al*. (1992), não há efeito negativo dos sulfitos quer de natureza tóxica quer de natureza antinutricional.

Ribera *et al*. (2001) obtiveram um NOAEL de 310 mg SO_2/kg ou 25 mg/kg pc/dia quando ratos foram alimentados com dietas contendo biscoitos com níveis de 0, 10, 35 e 75 % correspondendo, respectivamente, a 10-15, 35-45, 150-170 e 310-340 mg SO_2/kg de dieta. Não se observou nenhuma alteração hematológica, química e clínica, ocular, renal, urinária, de peso e em exames microscópicos. As concentrações de vitaminas A, B_1, C e E do fígado não sofreram alterações.

Diferentemente da exposição via oral, a administração por inalação em estudo realizado com ratos relacionou a exposição a SO_2 e seus derivados à queda da pressão arterial e dano funcional do sistema cardiovascular, e ainda conclui que o SO_2 é um agente tóxico não só para o sistema respiratório, mas para outros órgãos (ZIQIANG *et al*., 2003). Em outro estudo realizado com ratos, contatou-se que o SO_2 pode se transformar em sulfito *in vivo*, distribuindo-se pelo pulmão e outros órgãos, como cérebro e coração (MENG, LI & ZHANG, 2005). Özkaya *et al*. (2006) concluíram que a administração exógena de sulfito afetou a atividade elétrica cerebral na deficiência de SOD, e melhorou a neuroproteção, e Kucukatay *et al*. (2007) relataram que o tratamento com sulfito pode causar estresse oxidativo, sendo que os animais SOD competentes enfrentam esta condição por meio da capacidade oxidativa do hipocampo, o que não ocorre com ratos SOD deficientes. Por outro lado, em

estudo in *vitro*, os sulfitos aumentaram a morte de células cerebrais (DANI *et al*., 2007).

Em 1988, o FDA propôs novas regras para que a presença de sulfitos fosse declarada no rótulo dos alimentos, quando os sulfitos tivessem um efeito funcional ou estivessem presentes em um limite detectável acima de 10 ppm. Outras regras exigiam que, em certos alimentos, a presença de sulfitos fosse declarada por meio de placas indicativas, sinais, ou outra forma de mostrar que tal alimento é tratado com sulfitos, como em restaurantes e supermercados (SAPERS, 1993).

Desde novembro de 1982, mais de 1400 reclamações de reações relacionadas aos sulfitos foram recebidas pelo FDA. Em março de 1985, o FDA criou um sistema, o *Adverse Reaction Monitoring System*, para investigar e avaliar tais reclamações. Até o final de 1987, o FDA investigou 709 das 887 reclamações recebidas desde março de 1985 e determinou que 51% poderiam ser classificadas como advindas de reações sérias, incluindo 17 mortes relacionadas ao consumo de vários alimentos e medicamentos contendo sulfitos (LECOS, 1988). Vide Tabela 1. A Tabela 2 apresenta dados de outros períodos.

Tabela 1 – Reclamações de consumidores e número de reações severas ao uso de sulfitos por tipo de alimento — Estados Unidos, 1982-1985.

Tipo de alimento	Nº. de reclamações	% do total	Nº. de reações	% de reações
Saladas	280	31,5	161	30,4
Frutas e hortaliças frescas, exceto batatas	143	16,1	82	15,5
Vinho	111	12,4	67	12,7
Frutos do mar	98	11	59	11,2
Batatas (não frescas)	57	6,5	39	7,4
Batatas frescas	53	6	28	5,3
Frutas secas	43	4,8	21	4
Biscoitos assados	35	3,9	24	4,5
Medicamentos	28	3,1	22	4,2
Cerveja	14	1,6	8	1,5
Sucos de frutas e hortaliças	14	1,6	6	1
Outras bebidas alcoólicas	13	1,5	12	2,3

Fonte: FDA (adaptado por Lecos, 1988).

Tabela 2 – Produtos alimentícios relatados ao *Food and Drug Administration* (FDA) por consumidores alegando eventos adversos provocados por sulfitos, no período de janeiro de 1996 a junho de 1999, comparado com períodos anteriores (1988-1995 e 1980-1987), Estados Unidos.

Tipo de alimento	No. (%)		
	1980–1987	1988–1995	1996–1999
Saladas	280 (31)	11 (5)	3 (7)
Frutas e hortaliças frescas, exceto batatas	143 (16)	68 (32)	8 (19)
Vinho	111 (12)	26 (12)	8 (19)
Frutos do mar	98 (11)	38 (18)	7 (16)
Batatas (não frescas)	57 (6)	12 (6)	4 (9)
Batatas frescas	53 (6)	6 (3)	1 (2)
Frutas secas	43 (5)	11 (5)	5 (12)
Biscoitos assados	35 (4)	15 (7)	0
Medicamentos	28 (3)	7 (3)	2 (5)
Cerveja	14 (2)	7 (3)	3 (7)
Sucos de frutas e hortaliças	14 (2)	6 (3)	0
Outras bebidas alcoólicas	13 (1)	3 (1)	2 (5)
Total	889 (100)	210 (100)	43 (100)

Fonte: adaptado de TIMBO *et al*. (2004).

Stevenson & Simon (1981) concluíram que em quatro pacientes asmáticos com quadro severo de congestionamento das vias nasais e sintomas anafiláticos associados, a combinação da ingestão e inalação de sulfitos poderia explicar a perpetuação de seus quadros asmáticos.

Steinman & Weinberg (1986) realizaram pesquisa com os pais de 114 crianças sul-africanas, entre 2 anos e 7 meses e 13 anos e 6 meses. Os pais foram questionados sobre reações adversas ao consumo de bebidas carbonatadas por meio de um questionário que relacionava as mais comumente ingeridas (182 tipos). 62,3 % das crianças reagiam a uma ou mais bebidas e desse número 95 % eram asmáticas extrínsecas. Os sintomas eram somente tosse ou tosse e peito congestionado. O aparecimento das reações variou de 5 a 30 minutos após a ingestão. 27,2 % reagiram a bebidas que continham dióxido de enxofre, mas as crianças não reagiram a todas as bebidas que continham o conservante. As reações variaram de 9 a 92 % das bebidas ingeridas conservadas com dióxido de enxofre. Altas concentrações de dióxido de enxofre resultaram em mais reações. É provável que esses resultados tenham sido influenciados por outros fatores e por outros aditivos, como a tartrazina.

Em estudo conduzido por Steinman, Le Roux & Potter (1993) foi administrado, para 37 crianças asmáticas, suco de maçã com SO_2 em dose similar àquela comumente encontrada em bebidas carbonatadas. As respostas das crianças foram comparadas com as respostas de 22 crianças asmáticas que receberam somente suco de maçã. Observou-se que 16 das 37 crianças (43,2 %) reagiram com queda no volume expiratório forçado em 1 segundo (*Forced Expiratory Volume in 1 second* – FEV_1) em mais de 10 % quando comparado com 9 das 22 crianças do grupo controle (p = 0,0016). Atestou-se também que as meninas mostraram-se mais sensíveis do que os meninos.

Nagy *et al*. (1995) recomendaram aos fabricantes de salsa refrigerada o uso da menor quantidade possível de sulfito após relatarem reações adversas, tais como tosse, asma, irritações na garganta, em 6 pacientes que consumiram

o produto. Após a análise de 3 marcas de salsa, observou-se que a marca 1 apresentava 2,4 a 5 vezes mais sulfitos que as outras duas marcas. Advertido pelo FDA, o fornecedor desta marca deixou de usar os sulfitos.

Lee & Nixon (2001) relataram caso de dermatite por contato em funcionária de uma padaria que teve contato com recheio de maçã adicionado com composto sulfitado para evitar descoloração, antes do seu uso em pão.

Em estudo conduzido por Vally & Thompson (2001) um pequeno número de asmáticos sensíveis ao vinho responderam a uma dose única de vinho adicionado de sulfitos em condições laboratoriais, sugerindo que o papel dos sulfitos e / ou vinho em desencadear respostas asmáticas tem sido superestimado. Alternativamente, cofatores ou outros componentes no vinho podem desempenhar papel importante na asma induzida por vinho. As mudanças nas doses de sulfitos não induziram um aumento da sensibilidade aos sulfitos em asmáticos sensíveis ao vinho, exigindo uma abordagem alternativa para a identificação de asmáticos sensíveis aos sulfitos / vinho, como já apontado em outro estudo (VALLY *et al*., 1999) que concluiu que a asma induzida por vinho parece ser um fenômeno complexo, podendo envolver diversos mecanismos codependentes.

Indivíduos sensíveis ao dióxido de enxofre costumam apresentar sensação de desconforto crescente na garganta, congestionamento no peito, tosse e, às vezes, dores respiratórias, broncoespasmos, perda de consciência, hipotensão, angioedema, anafilaxia em asmáticos e dermatite de contato. Além disso, foram registrados sintomas gastrintestinais como dores abdominais, diarréia, náuseas e vômito. A magnitude da reação depende do tipo de alimento, da sua acidez, da quantidade de dióxido de enxofre e da sensibilidade do indivíduo (LECLERCQ *et al*. 2000; SIMON, 2000; PIZZOFERRATO, DI LULLO & QUATTRUCCI, 1998; TAYLOR, 1993; PARKE & LEWIS, 1992; SAFAVI & ENSAFI, 1991; BRANEN, DAVIDSON & SALMINEN, 1990; TAYLOR & BUSH, 1987; BEHRE, 1986; TAYLOR & BUSH, 1986; SULLIVAN & SMITH, 1985; WALKER, 1985; QUATTRUCCI, 1981).

De acordo com Waring & Klovrza (2000), crianças com autismo parecem ter o metabolismo dos sulfitos alterado, possuindo deficiência de SOD e provisão de sulfato anormal.

A sensibilidade aos sulfitos pode ser explicada por dois mecanismos (HARDISSON *et al*. 2002; TAYLOR & HEFLE, 2001; BJÖRKSTÉN, 1996; BRANEN, DAVIDSON & SALMINEN, 1990):

1) os sulfitos agem como um seqüestrante, combinando-se com uma proteína corporal para formar um novo antígeno, tornando-se um antígeno específico IgE, o que resultará em uma reação de hipersensibilidade Tipo I;

2) a deficiência da SOD, que converte os sulfitos em sulfato.

Ainda em relação à sensibilidade aos sulfitos, é importante considerar, também, os seguintes aspectos (BRANEN, DAVIDSON & SALMINEN, 1990; GUNNISON, JACOBSEN & SCHWARTZ, 1987; TAYLOR & BUSH, 1987; TAYLOR & BUSH, 1986; UNITED STATES, 1975):

a) as reações aos alimentos com sulfitos dependem do nível de sulfitos residuais no alimento, da sensibilidade do indivíduo e do tipo de alimento;

b) não há evidência científica de que evitar o consumo de todas as fontes de sulfitos melhora os sintomas da asma;

c) a exposição de indivíduos que não são sensíveis aos sulfitos representa um risco muito pequeno a essas pessoas;

d) os sulfitos não são desnaturados pela cocção;

e) os sulfitos são altamente reativos na presença de substâncias dos alimentos, como proteínas, amido e açúcares. Eles não são eliminados pelo processo de lavagem dos alimentos;

f) os sulfatos não provocam os mesmos efeitos adversos dos sulfitos. Eles são inertes ao organismo e não necessitam ser evitados pelos indivíduos sensíveis aos sulfitos.

2.4.8 Pesquisas de consumo e limites máximos permitidos

De acordo com Anderson, Cunningham & Lindstrom (1994), a ingestão relativa de enxofre (como % do total diário) é dominada pelos alimentos fontes de proteína (proteínas relacionadas à cisteína), com uma contribuição relativamente pequena dos aditivos: produtos lácteos, ovo, carne e grãos, que correspondem a 70-80 % do total. Para crianças de 6 a 11 meses, as fórmulas infantis correspondem, somente, a 8 % da ingestão de enxofre, enquanto os produtos lácteos (integral, a 2 %, magro, chocolate e leite evaporado) correspondem a, aproximadamente, 30 %; os produtos lácteos a, aproximadamente, 18 % para crianças de 2 anos, cerca de 15 % para crianças de 14 a 16 anos, aproximadamente 7 % para adultos de 25 a 30 anos, e cerca de 5 % para idosos de 60 a 65 anos. Respectivamente, os produtos cárneos representam 11, 16, 22 e 11 % da ingestão total de enxofre. O pão branco é o cereal considerado a fonte mais importante de enxofre, correspondendo a 3 % do total para crianças de 6 a 11 meses e 5-9 % para os outros grupos.

No Brasil, vários alimentos podem ser sulfitados. Os limites máximos permitidos (LMP) pela legislação brasileira estão presentes na Tabela 3.

Tabela 3 – Limites máximos de sulfitos nos alimentos em que podem ser adicionados, de acordo com a legislação brasileira.

Alimentos	Limite máximo (g/100g – g/100mL expresso em SO_2 residual)
Açúcar refinado	0,002
Batata cozida descascada (somente metabissulfito de sódio)	0,01
Batatas fritas congeladas	0,01
Bebidas alcoólicas fermentadas	0,01
Bebidas alcoólicas mistas	0,01
Bebidas não alcoólicas a base de soja	0,004
Bebidas não alcoólicas gaseificadas e não gaseificadas (subcategorias: prontas para o consumo e preparados líquidos)	0,004
Camarões e lagostas (exclusivamente na matéria-prima após a captura)	0,003 (no produto cozido) 0,01 (no produto cru)
Cervejas (somente ditionito)	0,006

cont. Tabela 3

Alimentos	Limite máximo (g/100g – g/100mL expresso em SO_2 residual)
Coco ralado	0,02
Cogumelos	0,005
Cooler	0,035
Filtrado doce	0,035
Frutas dessecadas	0,01
Frutose	0,002
Geléias artificiais	0,02
Jeropiga	0,01
Legumes e verduras desidratadas	0,02
Leite de coco esterilizado	0,01
Leite de coco pasteurizado	0,03
Licores de frutas	0,01
Mistela composta	0,025
Néctares de frutas	0,02
Passas de frutas	0,15
Picles	0,01
Polpas de vegetais (incluindo cogumelos, fungos, legumes, hortaliças, raízes e tubérculos, castanhas e algas marinhas)	0,03
Purê de vegetais (incluindo cogumelos, fungos, legumes, hortaliças, raízes e tubérculos, castanhas e algas marinhas)	0,06
Raiz-forte (polpa de rábano ou wasabi) (somente metabissulfito de sódio)	0,05 no p.s.c.
Sangria	0,035
Saquê	0,035
Sidras	0,035
Suco de caju	0,0333 no p.s.c.
Suco de caju com alto teor de polpa (diluição 1:9)	0,30
Sucos de frutas	0,02
Vinagres	0,02
Vinhos	0,035
Vinhos compostos	0,025
Vinhos de frutas	0,035
Xarope de glicose (exceto metabissulfito de cálcio)	0,004

No p.s.c. = no produto a ser consumido

Fonte: adaptado de Machado, Toledo & Vicente (2006) e ABIA (2001).

No Reino Unido, no final da década de 70, já era observada uma variação muito grande na quantidade permitida para uso de sulfitos — de 50-70 ppm em bebidas carbonatadas, coco ralado, cerveja e iogurte a 50.000 ppm em cervejas finas. Havia limites intermediários entre 2000 e 2500 ppm para hortaliças desidratadas — exceto batata — (550 ppm) e para frutas desidratadas. Para os outros produtos havia variação de 100-450 ppm (WEDZICHA, 1981a).

Na Espanha, na década de 90, o máximo permitido nas partes comestíveis de camarões congelados era de 150 mg/kg, quantidade não excedida pelos valores médios encontrados, ou seja, entre 105,3 e 115,8 mg/kg, em pesquisa realizada por Hardisson *et al*. 2002. Devido à falta de dados de consumo diário de camarão, estimou-se que as porções médias consumidas pelos espanhóis eram de 100, 150 e 200 g. Dessa forma, a ingestão estimada de sulfitos (considerando as concentrações de sulfitos nas partes comestíveis de produtos congelados, sem perda durante a fervura) seria 10,5-11,58, 15,8-17,37 e 21,06-23,16 mg, o que se mostrou distante da IDA. Em ocasiões como o Natal ou outras celebrações, a porção ultrapassava 400 g e a ingestão de sulfitos seria de 42,12-46,32 mg, podendo ser maior que a IDA para uma pessoa de 65 kg (45,5 mg/dia). O conteúdo médio de sulfitos determinado das partes não comestíveis foi de 2428,4 mg/kg e isso poderia representar um aumento considerável em seu consumo, já que existe o hábito, entre os espanhóis, de degustar essas partes antes de desprezá-las durante o consumo de pratos com camarão.

Na Austrália, permite-se o uso de sulfitos em uma grande variedade de alimentos, em concentrações que variam de 29 a 3000 mg/kg (BARNETT, 1985). Em estudo envolvendo a Austrália e a Nova Zelândia foram coletados dados analíticos disponíveis em relação à concentração de sulfitos nos alimentos. Nos grupos de alimentos que era permitida a adição de sulfitos, alguns alimentos analisados apresentavam concentrações que excediam o LMP. Em contrapartida, em alguns alimentos nos quais não era permitida a

adição de sulfitos, tais como carne fresca e frutas e hortaliças processadas, foram detectados resíduos de sulfitos. Os dados mostraram, por exemplo, que algumas amostras de salsicha excediam o LMP em 500 mg/kg e de licores em 115 mg/kg (ENVIRONMENTAL HEALTH SERVICE, 1996).

A existência do risco em exceder a IDA está, provavelmente, relacionada aos grupos populacionais que possuem padrões monótonos de consumo de alimentos, incluindo aqueles que são importantes fontes de sulfitos. As crianças possuem um risco maior devido ao seu elevado consumo de alimentos por kg pc. Se os sulfitos estiverem presentes, nos níveis preconizados pelos LMP, no vinho, na cerveja e nas bebidas carbonatadas, uma parte considerável da população pode exceder a IDA (LECLERCQ *et al*. 2000).

Os americanos consumiam, na década de 80, diariamente, em média, 6 mg de equivalentes de SO_2. É possível consumir quantidades maiores de sulfitos. Uma refeição hipotética com alface adicionada de sulfitos, batatas desidratadas (purê), camarão e vinho pode alcançar um total de 93 mg de equivalentes de SO_2 (TAYLOR & BUSH, 1987; TAYLOR & BUSH, 1986). A cerveja acrescenta 0,4 mg per capita por dia e o vinho de 0,8 a 3,7 mg. Dessa forma, a média de consumo levando em consideração as bebidas é de 10 mg. Por outro lado, estima-se que o consumo dos indivíduos considerados grandes consumidores de alimentos sulfitados possa chegar a 180 mg de equivalentes de dióxido de enxofre por dia (BEHRE, 1986). Em 1973, Gibson & Strong relataram um consumo médio per capita de 2 mg SO_2 / dia derivados de alimentos sólidos e bebidas não-alcoólicas, sendo que a cerveja contribuía com mais 1,2 mg SO_2 / dia e o vinho com mais 4,0 mg SO_2 / dia.

Martin, Nordlee & Taylor (1986) realizaram pesquisa sobre o uso de sulfitos em saladas em 25 restaurantes e lojas de conveniência incluindo alface, repolho e batata. Das 16 amostras de alface pesquisadas, 81 % estavam abaixo de 10 mg/kg de SO_2 total; 15 amostras abaixo de 22 mg/kg e uma contendo 62 mg/kg. Em relação à salada de repolho (*coleslau*), foram detectadas quantidades entre 10 e 65 mg/kg de SO_2 total, com 47 % abaixo de

20 mg/kg e média de 24 mg/kg. No caso da salada de batata, mais de metade das amostras apresentou quantidades abaixo de 20 mg/kg.

A existência de um risco teórico em exceder a IDA para sulfitos foi evidenciada na União Européia pelo Método *Budget*. Os sulfitos são usados em uma variedade de alimentos sólidos com LMP que variam de 15 a 500 mg/kg, com algumas exceções com níveis maiores: 600 a 2000 mg/kg em frutas secas, 800 mg/kg em polpa de raiz-forte e em várias bebidas variando de 20 mg/kg em bebidas carbonatadas a 200 mg/kg em vinhos. Uma das hipóteses levantada foi que 25 % da ingestão fisiológica máxima de alimentos podem conter 500 mg/kg de sulfitos e que 50 % da ingestão fisiológica máxima de líquidos de um adulto (100 % em crianças) podem conter 200 mg/L de sulfitos. Dessa forma, por meio da ingestão de alimentos e bebidas pode-se alcançar 19 vezes a IDA em adultos e 33 vezes em crianças. Por esse motivo, na maior parte dos países europeus, os sulfitos têm alta prioridade nos estudos de consumo de aditivos (LECLERCQ *et al*. 2000).

Em estudo realizado por Leclercq *et al*. (2000), a quantidade média de sulfitos detectada em vinho foi de 92 mg/kg, que é menor que o LMP de 200 mg/kg, estabelecido pela legislação italiana. O desvio foi grande, variando desde quantidades não detectadas até 198 mg/kg, próxima ao LMP — embora em 80 % das amostras a quantidade de SO_2 tenha variado de 60-135 mg/L. Considerando os LMP estabelecidos pela União Européia e os cardápios definidos na pesquisa, uma criança pode alcançar o consumo de 68,33 mg de sulfitos, o que representa 325 % da IDA para essa faixa etária (21 mg), enquanto um adulto pode alcançar o consumo de 123,4 mg, o que corresponde a 294 % da IDA. O conteúdo de sulfitos em alimentos cozidos foi bem menor em relação aos seus LMP e nos alimentos industrializados pode ser bem diferente do conteúdo nos alimentos prontos para consumo, pois os sulfitos apresentam como característica o fato de serem muito voláteis. Por essa razão, o levantamento dos níveis residuais é necessário para confirmar a existência do risco teórico associado ao uso do LMP.

Pesquisas têm demonstrado que indivíduos que consomem grandes quantidades de vinho (percentil 95) podem alcançar, só com consumo do mesmo, até 99 % da IDA para sulfitos. A ingestão, por exemplo, de 8 g de *Musli* por uma criança de 30 kg pode levá-la a alcançar 10 % da IDA, considerando o LMP, e 7 % considerando a quantidade residual (LECLERCQ *et al*. 2000).

Na Itália, a TMDI dos sulfitos foi calculada por meio do consumo médio e dos LMP da legislação italiana (MANZI *et al*. 1992 *apud* LECLERCQ *et al*. 2000). A TMDI obtida foi 54,5 mg, incluindo 20,2 mg do consumo potencial de vinho (média de consumo de 160 mL per capita). Mais recentemente, em outro estudo, a TMDI obtida por meio da legislação foi de 49,3 mg de sulfitos. A maior fonte de sulfitos foi o vinho (32 mg), seguido de frutas secas (8 mg) e de peixe (2 mg) (STACCHINI *et al*. 1999 *apud* LECLERCQ *et al*. 2000). É importante considerar que esses estudos, apesar de baseados nos LMP, indicam somente as principais fontes potenciais de sulfitos na população em geral, sem levar em consideração os indivíduos que consomem maiores quantidades de uma ou mais categorias de alimentos que contêm sulfitos (LECLERCQ *et al*. 2000).

Na França, a análise de dados de consumo em domicílios sugeriu que o vinho é responsável por 47 % da exposição teórica aos sulfitos. Peixes e frutas secas podem ser importantes fontes de sulfitos, mas há necessidade de mais estudos, particularmente para crianças (VERGER *et al*. 1998). A análise da exposição por meio do consumo também foi realizada baseando-se nas quantidades residuais nos alimentos no final do processo industrial, mas não nos alimentos prontos para consumo depois do processo de cocção nos domicílios (MARESCHI, FRANÇOIS-COLLANGE & SUSCHETET, 1992). François-Collange *et al*. (1991) estimaram a média de consumo em 20 mg/dia/pessoa com o risco de exceder a IDA em 5-10 % da população. O consumo de sulfitos foi estimado em 1,96 mg/dia/pessoa para os não consumidores de vinho, cerveja e sidra e 31,53 mg/dia/pessoa para a população que consome tais bebidas (367 mL/dia), que é, respectivamente,

61,5 % da população acima de 14 anos, 49 % também da população acima de 14 anos e 50 % da população total. Vide Tabela 4.

Dessa forma, de acordo com a pesquisa de Mareschi, François-Collange & Suschetet (1992), os indivíduos em risco estão entre os consumidores de bebidas alcoólicas cujos níveis de ingestão de sulfitos podem variar de 10 mg/dia/pessoa para os consumidores ocasionais de vinho a 38-40 mg para os consumidores regulares. Esse número pode ser estimado em 4,25 milhões, o que significa 9,5 % da população acima de 14 anos e 7,6 % da população total. Eles podem ser divididos em 28 % (mulheres) e 62 % (homens), na faixa etária de 40 a 75 anos.

Tabela 4 – Estimativa das quantidades de SO_2 ingeridas pela alimentação — França (1988/1989).

Alimento	Quantidade de SO_2 mg/ano/pessoa		% da quantidade / alimento	
Vinho*	6248		85,3	
Sidra*	210,4	6608,4	4,2	90,2
Cerveja*	50		0,7	
Sucos de frutas	72		0,95	
Frutas e legumes secos	258		3,5	
. damasco seco				
. uva passa				
Compotas	13,8	718,5	0,2	9,8
Batata desidratada (em flocos)	26		0,35	
Batata descascada	50		0,7	
Mostarda	117		1,6	
Filés de peixe salgado	181,7		2,5	
SO_2 total (mg/pessoa/ano)		7327		100
SO_2 total (mg/pessoa/dia)		21,1		

*: População acima de 14 anos
Fonte: François-Collange *et al*. (1991)

Na Holanda, Löwik *et al*. (1999) concluíram que os principais itens que contribuíram para a ingestão de sulfitos foram a cerveja e as bebidas carbonatadas. Os grandes consumidores (percentil 97,5) de bebidas

carbonatadas (principalmente crianças) e de cerveja podiam atingir metade da IDA — embora apenas uma marca de cerveja e uma marca de bebida carbonatada possuíssem sulfitos. Dokkum *et al*. (1982) calcularam em dieta total de adolescentes masculinos entre 16 e 18 anos um conteúdo médio de sulfitos de 3 mg, com máximo de 13 mg, sendo que as maiores concentrações foram encontradas em carne, frango, ovo, açúcares e doces.

A TMDI de sulfitos excedeu a IDA no percentil 97,5 da população, mas quando a comparação foi realizada com as médias corrigidas (CMTDI, obtida por meio de informações da indústria), a média real de ingestão foi significativamente menor quanto comparada à estimativa obtida por meio do uso dos LMP (IDA = 0,7; média = 1,34; P 90 = 2,19; P 95 = 3,13; P 97,5 = 4,34 e CMTDI = 0,97 mg/dia/kg pc). A dieta dos maiores consumidores de sulfitos incluiu frutas secas, vinho e peixes secos e salgados. Os resultados são parecidos com os de outros estudos (FRANÇOIS-COLLANGE *et al*. 1991) e devem ser tratados com outros métodos mais precisos e utilizando dados analíticos. Associados a análises de alimentos, resultados obtidos na Finlândia e na Grã-Bretanha indicaram níveis menores de consumo de sulfitos — respectivamente 0,07 e 0,31 mg/kg pc/dia (PENTTILÄ *et al*. 1988 e MAFF, 1993 *apud* VERGER *et al*. 1998).

Soubra *et al*. (2006), em estudo realizado em Beirute, no Líbano, avaliaram a ingestão atual de alguns aditivos alimentares, dentre eles os sulfitos. A exposição foi obtida combinando os dados de consumo de alimentos com os níveis de aditivos nos alimentos, determinados por análise química. A IDA para sulfitos poderia ser excedida por uma parte da população, principalmente crianças entre 9 e 13 anos, sendo as nozes, o alimento que mais contribuiria para este cenário já que são consumidas em grandes quantidades (120 g).

Em estudo recente, Bemrah, Leblanc & Volatier (2008) calcularam a estimativa de ingestão para 13 aditivos considerando dois cenários: 1) os consumidores ingerem alimentos que podem ou não conter aditivos e 2) os

consumidores sempre ingerem alimentos que contêm aditivos. Concluí-se que a IDA de sulfitos foi excedida por consumidores adultos em 118,4 %, considerando o primeiro cenário. No cenário 2, os grandes consumidores adultos excedem a IDA em 156,4 % e as crianças em 130,6 %.

No Brasil, Tavares *et al*. (1987) concluíram que se a prática de pré-moagem de carnes vendidas a varejo fosse coibida pelos órgãos competentes, certamente a ocorrência do emprego de sais de sulfitos no produto seria minimizada ou até evitada. Tendo em vista a elevada porcentagem (44 %) de amostras de carne que apresentaram provas positivas para sais de sulfitos, colhidas em São Paulo e adjacências, locais em que existe fiscalização, presume-se que, em regiões onde ela não existe ou é praticamente nula, a ocorrência deva ser maior. Tancredti & Silva (2007) observaram que, das 56 amostras de carnes bovinas analisadas, provenientes de estabelecimentos comerciais localizados nas zonas Sul, Norte e centro do Município do Rio de Janeiro, 7,14 % apresentaram resultados positivos para sulfito, demonstrando que a prática ilegal de adição deste conservante em carnes ainda ocorre.

Em estudo realizado por Bragagnolo, Silva & Taniwaki (2001), das 108 amostras analisadas de conservas de cogumelo, 50 (46 %) apresentaram teor de dióxido de enxofre acima do limite permitido (máximo de 50 mg/kg de dióxido de enxofre de acordo com a resolução CNS/MS 04/88). Altos níveis foram encontrados em algumas amostras, verificando-se valores de até 1052 mg/kg. Das 15 amostras comerciais analisadas, 17 (68 %) encontravam-se acima dos 50 mg/kg permitidos pela legislação vigente, sendo que os níveis variaram de não detectado (<0,15 mg/kg) a 1052 mg/kg. Em relação às amostras provenientes dos produtores, os teores de SO_2 variaram de não detectado a 1007 mg/kg, sendo que 61 % das amostras apresentaram valores acima do permitido. Dos lotes importados utilizados como matéria-prima para posterior processamento, os valores variaram de não detectado a 904 mg/kg, sendo que 23 % das amostras ficaram acima dos níveis aceitos. Observou-se que a maioria das amostras comerciais não declarava no rótulo o uso de dióxido de

enxofre. Os altos níveis de dióxido de enxofre encontrados em cogumelos em conserva evidenciam uma preocupação de saúde pública, necessitando maior atuação em termos de fiscalização e melhoria do controle de qualidade. Os resultados microbiológicos sugerem que níveis baixos de SO_2 seriam suficientes para a conservação do produto, não justificando as altas doses encontradas.

Ogawa *et al*. (2003) pesquisaram o teor residual de SO_2 em camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* cultivados em viveiros do estado do Ceará e destinados a exportação. Das amostras, 50,0 % apresentaram valores de SO_2 até 100 ppm, 30,8 % situaram-se na faixa de >100 – 200 ppm, 15,4 % entre >200 e 300 ppm e 3,8 % ficaram acima de 300 ppm, indicando que metade das amostras analisadas apresentou concentrações acima do limite máximo aceito pela legislação brasileira (100 ppm), níveis que não condizem com as BPF.

Quando a fiscalização era precária e os efeitos tóxicos ainda não eram bem evidentes, baseando-se em denúncias de que os sucos naturais de frutas do tipo integral disponíveis no comércio apresentavam teores de dióxido de enxofre acima dos valores permitidos pela legislação brasileira (que é de 200 mg/kg), Yabiku *et al*. (1987) observaram que do total de 473 amostras analisadas, mais da metade (51 %) apresentou níveis acima do permitido. As porcentagens de amostras condenadas variavam: 100 % no suco de graviola (425 – 1099 mg/kg), 97 % no suco de caju (78 – 1439 mg/kg), 68 % no suco de goiaba (27 – 670 mg/kg), 63 % no suco de maracujá (11 – 890 mg/kg), 56 % no suco de manga (79 – 447 mg/kg), 39 % no suco de pitanga (154 – 732 mg/kg), 18 % no suco de abacaxi (ND não detectado < 10 mg/kg – 1128 mg/kg), 9 % no suco de uva (ND – 325 mg/kg), 7 % no suco de tamarindo (47 – 303 mg/kg) e 0 % nos sucos de frutas (ND – 100 mg/kg), tomate (ND – 71 mg/kg), maçã (ND), laranja (ND – 111 mg/kg), tangerina (38 – 114 mg/kg), pêssego (ND), limão (ND – 40 mg/kg), mamão (ND – 133 mg/kg), banana (ND – 91 mg/kg) e morango (ND). Se for considerada a ingestão do suco de caju (nível máximo encontrado de 1439 mg/kg, sete vezes acima do permitido), devidamente diluído, por uma

criança pesando 40 kg que, em época de muito calor, ingere aproximadamente 80 mg/kg (até 4 copos de suco) de dióxido de enxofre, o valor estaria muito acima do recomendado, que é de 28 mg/kg, tendo em vista que a ingestão diária aceitável é de 0,7 mg/kg de peso corpóreo por dia.

Machado & Toledo (2007) analisaram, pelo método M-W, 75 amostras de vinhos (66 de marcas nacionais e 9 de outros países da América do Sul), 15 de outras bebidas alcoólicas (sidras, fermentados de frutas, espumantes e filtrados de vinho), e 39 amostras de sucos de frutas nacionais entre concentrados (37) e prontos para o consumo (2). Em todas as amostras de vinhos e de outras bebidas alcoólicas analisadas (n=90) os níveis de sulfito, expressos como SO_2, ficaram abaixo de 350 mg/L (limite máximo de uso estabelecido pela legislação brasileira), sendo que a maioria das amostras (90 %) apresentou teores de sulfitos de até 150 mg/L. As amostras de sucos de frutas apresentaram concentrações de sulfitos abaixo de 50 % do limite máximo permitido de 200 mg/L (333 mg/L para suco de caju). A exposição aos sulfitos pelo consumo de vinhos foi avaliada combinando níveis médios de sulfitos determinados analiticamente com estimativas de consumo hipotético em três cenários distintos (consumo diário de 150, 300 ou 450 mL). Os dados de ingestão indicaram que o consumo diário de 150 mL de vinho pode contribuir com mais de 50 % da IDA desses aditivos, caso a concentração de sulfitos presente seja igual ou superior a 150 mg/L. A contribuição dos sucos de frutas para a ingestão de sulfitos foi avaliada utilizando-se dados de consumo de adolescentes brasileiros, entre 11 e 17 anos, obtidos por um questionário R24. A ingestão média de sulfitos a partir do consumo de sucos de frutas ficou abaixo da IDA. No entanto, estimativas a percentil 95 indicaram que o consumo de sucos de frutas contendo sulfitos em concentrações iguais ou superiores a 40 mg/L (como foi o caso dos sucos de acerola, goiaba, manga, abacaxi e tomate) pode resultar em valores de ingestão desses aditivos iguais ou acima da IDA. Embora os resultados obtidos nesse estudo indiquem que as concentrações de uso dos sulfitos pela indústria de vinhos e sucos de frutas

estejam abaixo dos limites máximos estabelecidos pela legislação brasileira, a IDA desses aditivos pode ser excedida por indivíduos que consomem, regularmente, grandes quantidades desses produtos.

Para Popolim & Penteado (2005), o consumo per capita diário de sulfitos por adolescentes de um município brasileiro teve maior freqüência de distribuição (23,9 %) no intervalo de 0 a 5 mg SO_2, sendo a média de consumo de 3,8 mg SO_2. Em relação ao consumo de SO_2, em mg/kg pc/dia, a maior freqüência de distribuição (33,5 %) foi encontrada no intervalo de 0 a 0,2 mg SO_2/kg pc/dia, sendo o valor médio de consumo de 0,07 mg SO_2/kg pc/dia, estatisticamente diferente (p<0,001) da IDA para sulfitos de 0,7 mg SO_2/kg pc/dia.

Machado, Toledo & Caroba (2007) avaliaram a contribuição de sucos de frutas para o consumo de sulfitos por adolescentes de 11 a 17 anos por meio do R24 e do método M-W otimizado. A média de ingestão de sulfitos foi inferior a IDA. No entanto, as estimativas para o P95 indicam que o consumo de sucos contendo sulfitos numa concentração de 40 mg/L ou superior, como o de cereja, goiaba, manga, abacaxi, tomate, pode levar à ingestão do sulfito em níveis iguais ou superiores a IDA. Os resultados sugerem que os adolescentes cujos padrões dietéticos com um consumo regular elevado de sucos de frutas contendo sulfito são indivíduos em risco potencial de exceder a IDA desse conservante.

2.4.9 Métodos de análise quantitativa

O total de dióxido de enxofre é a soma das formas livres e das formas combinadas reversíveis de sulfitos (WEDZICHA, 1992; WEDZICHA & HERRERA-VILORIA, 1991; BARNETT, 1985).

Uma parte dos sulfitos adicionados não é considerada na medida do dióxido de enxofre total. Em alguns alimentos, os sulfitos adicionados são convertidos em compostos orgânicos contendo enxofre, normalmente não identificados, e que são ingeridos. A indústria de alimentos deve investigar as

reações dos sulfitos nos diferentes sistemas alimentares para criar e disponibilizar uma relação completa das reações nos produtos ingeridos pelos consumidores (MODDERMAN, 1986).

Uma questão importante a ser considerada é a relação entre o dióxido de enxofre mensurável, livre ou total, e as quantidades adicionadas. Por exemplo, em biscoitos adicionados de metabissulfito de sódio, dos 150 ppm de equivalentes de dióxido de enxofre adicionados, 95 ppm formam compostos orgânicos desconhecidos e somente 0,2 ppm é medido como resíduos totais de dióxido de enxofre. Neste caso, determinar os equivalentes de dióxido de enxofre no produto alimentício não mostra a quantidade de sulfitos adicionada ou que outros compostos químicos estão presentes, como resultado do tratamento com sulfitos (MODDERMAN, 1986). A distribuição típica do dióxido de enxofre na sidra fermentada, por exemplo, é a seguinte: 40 % na forma livre, sendo 38 % de íon bissulfito e 2 % de SO_2 molecular; 27 % ligados a acetaldeído; 12 % ligados a ácido galacturônico; 9 % ligados a piruvato e 12 % ligados a outros compostos (JARVIS & LEA, 2000).

Os sulfitos livres são o equilíbrio de uma solução de espécies de enxofre que consiste de dióxido de enxofre (SO_2), bissulfito (HSO_3^-) e sulfito (SO_3^{2-}), sendo a concentração relativa de cada uma destas três substâncias, uma função do pH do meio. Os sulfitos ligados, que ocorrem em diferentes formas, são divididos em sulfitos ligados reversíveis e irreversíveis. Os compostos carbonil, como a glicose, reagem com o bissulfito para formar 1-hidroxialquil-azolilo. Estas substâncias são revertidas em dióxido de enxofre porque elas se decompõem em compostos carbonil e espécies de enxofre tais como sulfito e bissulfito. Os sulfitos ligados irreversíveis são formados quando as espécies de enxofre reagem com álcalis ou compostos aromáticos para formar ácidos sulfurados. O método M-W e outros métodos podem ser usados para determinar os sulfitos livres ou ligados, embora procedimentos analíticos especiais possam ser desenvolvidos para determinar os produtos das reações

irreversíveis (LOWINSOHN & BERTOTTI, 2001; PIZZOFERRATO, DI LULLO & QUATTRUCCI, 1998; WARNER *et al* 1986).

Vários métodos clássicos e padronizados estão disponíveis para a determinação dos sulfitos em alimentos, tais como, espectrofotometria, quimioluminescência, potenciometria, amperometria, sendo que os métodos enzimáticos têm ganhado maior significância na análise industrial e de alimentos pela sua alta seletividade, mas poucos são passíveis de uso na rotina moderna (LOWINSOHN & BERTOTTI, 2001; FERRARINI *et al*. 2000; TRENERRY, 1996; SAFAVI & ENSAFI, 1991; BEUTLER, 1984; SULLIVAN & SMITH, 1985). A Tabela 5 apresenta levantamento de diversos métodos de análise utilizados desde a década de 80, bem como as matrizes / substâncias analisadas.

Tabela 5 – Técnicas utilizadas em estudos realizados nas últimas três décadas para quantificação de sulfitos em matrizes alimentares e outras substâncias.

Título original do artigo	Técnica utilizada	Matrizes / substâncias analisadas	Referência
▪ Ripper procedure for determining sulfur dioxide in wine: collaborative study	Método *Ripper* por titulação iodométrica direta	Vinhos	VAHL & CONVERSE, 1980
▪ Food additives and food components in total diets in the Netherlands	Acidificação seguida de destilação em atmosfera de dióxido de carbono com solução de peróxido de hidrogênio	Vários grupos de alimentos	DOKKUM *et al*., 1982
▪ A new enzimatic method for determination of sulphite in food	Método enzimático com uso da enzima sulfito oxidase isolada de fígado de frango e NADH[1] peroxidase de microrganismos	Vinhos, cerveja, sucos, especiarias, geléias e batatas	BEUTLER, 1984
▪ Determination of sulfite in foods by ion chromatography	Cromatografia iônica associada ao aparato de destilação do M-W[2]	Sucos de frutas, vinho branco, frutas secas, entre outros	SULLIVAN & SMITH, 1985
▪ Ion chromatographic determination of sulfites in foods	Extração com ácido fosfórico 2 N e análise por cromatografia iônica com detector eletroquímico	Maçã seca, sucos de frutas, cogumelo, cebola, batata, vinhos, entre outros	ANDERSON *et al*., 1986
▪ Uses and analysis of sulfites in the corn wet milling industry	Métodos M-W[2], iodométrico e pararosanilino	Xarope de milho	COKER, 1986

cont. Tabela 5

Título original do artigo	Técnica utilizada	Matrizes / substâncias analisadas	Referência
▪ Sulfite residues in restaurant salads	Método M-W[2]	Saladas de alface e batata e *coleslaw*	MARTIN, NORDLEE & TAYLOR, 1986
▪ Evaluation of Monier-Williams and committee methods for bisulfite determination as used by the potato processing industry	Método M-W[2]	Produtos de batata	MOYLAN, BOWES & PAPPIN, 1986
▪ Determination of sulfur dioxide in grapes and wines	Método *Ripper*	Vinhos	OUGH, 1986
▪ Determination of sulfite in food by flow injection analysis	Análise por injeção em fluxo (FIA[3]) baseada na descoloração do verde de malaquita para indicar a presença de SO_2	Vinhos, suco de maçã, damasco e maçã secos, batata, cebola em conserva, camarão, repolho e alface	SULLIVAN *et al*., 1986
▪ Reevaluation of Monier-Williams Method for determining sulfite in food	Método M-W[2]	Brócolis, uvas, suco de limão, cogumelos, entre outros	WARNER *et al*., 1986
▪ Analytical coulometry in Monier-Williams sulfite-in-food determinations	Colorimetria associada ao aparato do método M-W[2]	Frutas secas, batata desidratada, cerveja, vinho e vinagre de vinho	GREYSON & ZELLER, 1987
▪ Headspace liquid chromatografhic technique for the determination of sulfite in food	Cromatografia líquida *headspace*	Vinhos, flocos de batata, suco de maçã, camarão, entre outros	LAWRENCE & CHADHA, 1987
▪ Pesquisa de sais de sulfito em carnes comercializadas a varejo na região metropolitana de São Paulo	Tratamento com ácido clorídrico e uso de solução de iodo e de cloreto de bário	Carnes	TAVARES *et al*., 1987
▪ Níveis de conservadores intencionais em sucos naturais de frutas comercializados no Brasil	Destilação M-W[2] com modificações relacionadas ao ácido, à concentração do indicador e ao sistema de destilação usado	Sucos naturais de frutas (graviola, caju, goiaba, maracujá, manga, abacaxi, uva, entre outros)	YABIKU *et al*., 1987
▪ Total sulfur dioxide residuals in fresh mushrooms washed in sulfite solutions	Método M-W[2] otimizado pelo FDA[4]	Cogumelos	BEELMAN, BARDEN & EDWARDS, 1988
▪ Sulfite analysis by ion exclusion chromatography: applications to the food and beverage industries	Cromatografia de exclusão de íons	Frutas secas, amido de milho, cerveja, entre outros	KIM, KIM & SMITH, 1988
▪ Determination of sulfite in foods by headspace liquid chromatography	Cromatografia líquida *headspace*	Vinhos, flocos de batata, suco de maçã, camarão, entre outros	LAWRENCE & CHADHA, 1988
▪ Analysis of sulfites in shrimp using rapid distillation followed by redox tritation	Método M-W[2] e destilação rápida seguida de titulação iodométrica	Camarão	SIMPSON *et al*., 1988

cont. Tabela 5

Título original do artigo	Técnica utilizada	Matrizes / substâncias analisadas	Referência
▪ Optimized Monier-Williams method for determination of sulfites in foods: collaborative study	Método M-W[2] otimizado pelo FDA[4]	Suco de frutas, *hominy* (flocos de milho) e proteína de marisco	HILLERY *et al*., 1989
▪ Evaluation of an HPLC method for the determination of sulphiting agents in foods	Método HPLC[5] combinado com procedimento M-W[2] modificado	Cerveja, suco de *grapefruit*, geléia, mostarda, purê de batatas, camarão, açúcar, vinho	PIZZOFERRATO, QUATTRUCCI & DI LULLO, 1990
▪ A comparison of selected methods for determining sulfite in prawns	Método M-W[2], destilação rápida e método enzimático	Camarão	WILLIAMS, SLATTERY & NOTTINGHAM, 1990
▪ Determination of sulfite in food products by an enzyme electrode	Eletrodo com sulfito oxidase associado a eletrodo com peróxido de hidrogênio	Alimentos secos e bebidas	MULCHANDANI, GROOM & LUONG, 1991
▪ Liquid chromatographic determination of free and total sulphites in fresh sausages	Extração com diferentes solventes e análise por cromatografia iônica com detector eletroquímico	Lingüiça fresca	PAÍNO-CAMPA, PEÑA-EGIDO & GARCÍA-MORENO, 1991
▪ Kinetic spectrophotometric determination of traces of sulphite	Determinação espectrofotométrica baseada na reação do sulfito com o verde brilhante	Sucos de frutas	SAFAVI & ENSAFI, 1991
▪ Survey of sulphites determined in a variety of foods by the optimized Monier-Williams method	Método M-W[2] otimizado pelo FDA[4]	Frutas secas (damasco, pêssego), batata, camarão, suco de frutas, cogumelos e outros	DANIELS *et al*., 1992
▪ Estimation of sulphite in food in France	Método *Ripper* modificado	Vinho, cidra, cerveja, frutas secas, mostarda, entre outros	MARESCHI, FRANÇOIS-COLLANGE & SUSCHETET, 1992
▪ Improved method for determination of sulfites in shrimp	Extração com diferentes solventes e análise por cromatografia iônica com detector eletroquímico e método M-W[2]	Camarão	ARMENTIA-ALVAREZ, PEÑA-EGIDO & GARCIA-MORENO, 1993
▪ Residual levels of free and total sulphite in fresh and cooked burgers	Método M-W[2] e HPLC[5]	Hamburgueres crus e cozidos	ARMENTIA-ALVAREZ *et al*., 1993
▪ Enzymatic determination of sulfite in foods: NMKL interlaboratory study	Método enzimático (NADH[1])	Flocos de batata, vinho, maçã desidratada e sucos	EDBERG, 1993
▪ Determination of total and free sulfite in unstabilized beer by flow injection analysis	Análise por injeção em fluxo (FIA[3])	Cerveja	BENDTSEN & JORGENSEN, 1994

cont. Tabela 5

Título original do artigo	Técnica utilizada	Matrizes / substâncias analisadas	Referência
▪ Determination of sulphite by use of a fiber-optic biosensor based on a chemiluminescent reaction	Determinação por biosensor de fibra óptica baseada em reação de quimioluminescência	Diversos alimentos	HLAVAY & GUILBAULT, 1994
▪ Sulphite analysis of food ingredients: false positive responses with butter flavourings in the optimized Monier-Williams method	Destilação M-W[2] otimizada pelo FDA[4]	Margarina, vinagre e aroma de manteiga	SU & TAYLOR, 1995
▪ The determination of the sulphite content of some foods and beverages by capillary electrophoresis	Destilação M-W[2] para liberar SO_2, subseqüente oxidação de sulfito a sulfato e quantificação utilizando eletroforese capilar	Vinhos, vegetais frescos, damasco seco, mostarda, camarão, dentre outros	TRENERRY, 1996
▪ Determination of sulphite in wines by gas-diffusion flow injection analysis utilizing spectrophotometric pH-detection	Análise por injeção em fluxo (FIA[3]) com detecção fotométrica utilizando uma célula de difusão gasosa	Vinhos	DECNOP-WEEVER & KRAAK, 1997
▪ Presencia de sulfites en carne picada y preparados de carne elaborados en industrias de la comunidade valenciana	Método qualitativo de descoloração do verde de malaquita	Produtos cárneos	LAUZURICA & FAYOS, 1997
▪ Determination of free, bound and total sulphites in foods by indirect photometry-HPLC	Método M-W[2] e HPLC[5] com detecção fotométrica indireta	Cerveja, suco de *grapefruit*, geléia, mostarda, purê de batatas, camarão, açúcar, vinho	PIZZOFERRATO, DI LULLO & QUATTRUCCI, 1998
▪ Flow injection spectrophotometric determination of free and total sulfite in wines based on the induced oxidation of manganese(II)	Determinação espectrofotométrica por injeção em fluxo baseada na oxidação do manganês	Vinhos	SILVA et al., 1998
▪ Determination of sulfur dioxide in wines by gas-diffusion flow injection analysis utilizing modified electrodes with electrostatically assembled films of tetraruthenated porphyrin	Análise por injeção em fluxo (FIA[3]) por amperometria com membrana de porfirina tetrarutenada	Vinhos	AZEVEDO *et al*., 1999
▪ Sodium bisulfite analyses in shrimp by ion selective electrode, sulfite oxidase, and modified Monier-Williams	Métodos enzimático e M-W[2] modificado e eletrodo seletivo de íons	Camarão	GERDES *et al*., 1999
▪ The determination of total SO_2 in grape juice: a comparison among five methods	Métodos de destilação, M-W[2] modificado, titulação iodométrica *Ripper-Schmitt* e enzimático	Sucos de uva	FERRARINI *et al*., 2000

cont. Tabela 5

Título original do artigo	Técnica utilizada	Matrizes / substâncias analisadas	Referência
▪ Sulphite binding in cidres	HPLC[5] baseado na formação de DNPH[6]	Sidras	JARVIS & LEA, 2000
▪ Analytical techniques for the estimation of sulphite binding components in ciders and wines	HPLC[5] baseado na formação de DNPH[6] e método enzimático	Sidras e vinhos	LEA, FORD & FOWLER, 2000
▪ Dietary intake exposure to sulphites in Italy – analytical determination of sulphite-containing foods and their combination into standard meals for adults and children	Método M-W[2]	Vinhos, cerveja, produtos de batata, legumes e cogumelo, produtos com frutas secas, entre outros	LECLERCQ *et al*., 2000
▪ Avaliação dos teores de dióxido de enxofre e da qualidade microbiológica de cogumelos em conserva	Destilação M-W[2] modificada por *Shipton*	Cogumelos em conserva	BRAGAGNOLO, SILVA & TANIWAKI, 2001
▪ Determination of sulphite in wine by coulometric tritation	Extração de SO_2 com ácido hidroclorídrico e quantificação utilizando titulação colorimétrica com iodo	Vinhos	LOWINSOHN & BERTOTTI, 2001
▪ Elimination of disturbing effect caused by sulphur dioxide for sulphur determination in wines by ICP-OES	Espectrofotometria por emissão óptica com plasma ligado por indução	Vinhos	SARUDI *et al*., 2001
▪ Use of a copper electrode in alkaline medium as an amperometric sensor for sulphite in a flow-through configuration	Análise por injeção em fluxo (FIA[3]) com detecção amperométrica utilizando eletrodo de cobre	Suco de uva e vinhos	CORBO & BERTOTTI, 2002
▪ Content of sulphite in frozen prawns and shrimps	Destilação M-W[2], método AOAC[7] (1984)	Camarão	HARDISSON *et al*., 2002
▪ Survey of stable sulfur isotope ratios ($^{34}S/^{32}S$) of sulfite and sulfate in foods	Espectrometria de massa	Vinhos, sucos, frutas secas, sidras, produtos cárneos, entre outros	KELLY *et al*., 2002
▪ Highly sensitive N-(9-acridinyl)maleimide (NAM) fluorometry to determine sulfite below ppm level in environmental and biological samples	Determinação fluorométrica	Vinho, cerveja	MEGURO *et al*., 2002
▪ Determination of sulfite in dried garlic by reversed-phase ion-pairing liquid chromatography with post-column detection	Cromatografia líquida íon pareada de fase reversa com coluna posterior de detecção	Alho desidratado	PERFETTI & DIACHENKO, 2002
▪ Kinetic spectrophotometric determination of sulfite using a full curve (PLS) and a fixed time method	Espectrofotometria com uso de curva (PLS[8]) e método de tempo fixo	Soluções de sulfito	GHASEMI & MOHAMMADI, 2003

cont. Tabela 5

Título original do artigo	Técnica utilizada	Matrizes / substâncias analisadas	Referência
▪ Sulfite analysis of fruits and vegetables by high-performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet spectrophotometric detection	Determinação de sulfito livre e ligado utilizando HPLC[5] com detector de UV[9]	Conserva de vegetais, purê de batata desidratado e maçã desidratada	McFEETERS & BARISH, 2003
▪ Teor residual de SO_2 em camarões congelados exportados pelo estado do Ceará	Método M-W[2] otimizado	Camarão	OGAWA *et al*., 2003
▪ Indirect FIA amperometric determination of sulphite based on the autocatalytic generation of Cu^{3+} complexes	Análise por injeção em fluxo (FIA[3]) indireta por amperometria baseada na geração de complexos de Cu^{3+}	Vinho e sucos de frutas	LOWINSOHN *et al*., 2004
▪ Determination of free sulfite in wine by zone electrophoresis with isotachophoresis sample pretreatment on a column-coupling chip	Eletroforese de zona com pré tratamento das amostras com isótopos em *chip* acoplado a coluna	Vinho	MASÁR *et al*., 2004
▪ Energy transfer electrogenerated chemiluminescence for the determination of sulfite	Quimioluminescência com transferência de energia	Açúcar refinado	ZHANG, ZHANG & QI, 2004
▪ Length detection - flow analytical system using autocatalytic reaction	Sistema analítico por fluxo usando sistema de reação auto catalítica sulfito de sódio/peróxido de hidrogênio	Soluções de sulfito de sódio e peróxido de hidrogênio	KATO, KUBOTA & IGARASHI, 2005
▪ Direct determination of sulfite in food samples by a biosensor based on plant tissue homogenate	Biosensor amperométrico com homogeneizado de tecido de planta. No estudo foi utilizado *Malva vulgaris* que contém a enzima sulfito oxidase em grande quantidade	Biscoito, cerveja e vinagre	SEZGINTÜRK & DINÇKAYA, 2005
▪ Simple methods for rapid determination of sulfite in food products	Métodos pararosanilina-formaldeído modificado e 5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzóico)	Cerveja e produtos desidratados	LI & ZHAO, 2006
▪ Nickel(II) complexes with tetraaza macrocycles in the electrocatalytic oxidation of sulfite	Determinação por oxidação eletrocatalítica com complexos de níquel	Soluções de sulfito	VILLAGRÁN *et al*., 2006
▪ Rapid microstill determination of free and total sulfite in wine with conductimetric detection	Microdestilação otimizada	Vinho e suco de uva	McLEOD & DAVEY, 2007

cont. Tabela 5

Título original do artigo	Técnica utilizada	Matrizes / substâncias analisadas	Referência
▪ Dietary exposure of children and teenagers to benzoates, sulphites, butylhydroxyanisol (BHA) and butylhydroxytoluen (BHT) in Beirut (Lebanon)	Método enzimático (NADH[1])	Biscoitos, nozes, sucos, doces, geléias, açúcar, batata, entre outros	SOUBRA *et al*., 2007
▪ Fraudes por sulfito de sódio (SO_2) em carnes bovinas comercializadas na cidade do Rio de Janeiro, RJ	Método M-W[2]	Carne bovina pré-moída	TANCREDTI & SILVA, 2007
▪ Amperometric determination of sulfite by gas diffusion sequential injection with boron doped diamond electrode	Análise por injeção sequencial (SIA[10]) por amperometria com eletrodo de diamante revestido de boro	Vinho	CHINVONGAMORN *et al*., 2008
▪ Analytical determination of sulphites in fruit juices available on the Brazilian market	Método M-W[2]	Sucos de frutas	MACHADO *et al*., 2008

[1] NADH: Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo – forma reduzida
[2] M-W: *Monier-Williams*
[3] FIA: *flow injection analysis*
[4] FDA: *Food and Drug Administration*
[5] HPLC: *High Perfomance Liquid Chromatography* ou cromatografia líquida de alta performance
[6] DNPH: *Dinitrophenylhydrazine* ou dinitrofenilhydrazina
[7] AOAC: *Association Official Analytical Chemistry*
[8] PLS: *Partial Least Squares*
[9] UV: *ultraviolet*
[10] SIA: *sequential injection analysis*

Preconiza-se a existência de um método que possa mensurar compostos nos produtos alimentícios que estejam, inequivocadamente, correlacionados com a quantidade de sulfitos adicionados. O método não precisa medir, necessariamente, todos os constituintes químicos resultantes do agente adicionado, porque isto é impraticável como uma rotina de controle, mas ele pode medir alguns indicadores do tratamento com sulfitos que tenham relação comprovada com a quantidade adicionada (FERRARINI *et al*. 2000; MODDERMAN, 1986). Atualmente, tem-se a disposição métodos para os equivalentes de dióxido de enxofre total baseados no método M-W. Este método mede o dióxido de enxofre livre (ou seja, os sulfitos residuais) e o dióxido de enxofre que é combinado reversivelmente com componentes alimentares (COKER, 1986; MODDERMAN, 1986; BARNETT, 1985).

A classe de métodos que requer destilação longa de uma suspensão ou solução do alimento em ácido remete à publicação original de M-W (1927). Estes métodos têm atraído atenção porque, relativamente, poucas substâncias são comumente encontradas no alimento que são suficientemente voláteis para passar por um condensador e produzir ácido sulfúrico na reação com peróxido de hidrogênio no balão. Na verdade, poucos alimentos não tratados com sulfitos obtêm falso positivo mesmo a níveis abaixo de 10 ppm (calculados como dióxido de enxofre). As hortaliças do gênero *Allium* e *Brassica* e proteína de soja isolada são exceções a esta regra (FAZIO & WARNER, 1990).

Tipicamente, cebola e repolho não tratados fornecem respostas na faixa de 3 a 20 ppm de dióxido de enxofre; proteína isolada de soja e alho fornecem níveis de 30 e 200 ppm, respectivamente, mesmo na ausência de tratamento com sulfitos. Tentativas para distinguir entre esta resposta aos sulfitos naturais e a resposta por conta dos sulfitos adicionados não será bem sucedida se a destilação M-W for usada para o isolamento porque, na verdade, é, predominantemente, o dióxido de enxofre que destila no balão. O refluxo de 105 minutos no aquecimento do ácido clorídrico aparentemente hidrolisa compostos que ocorrem naturalmente, como dióxido de enxofre. Isto mostraria que análises com técnicas que evitam as condições muito rigorosas da destilação ainda detectariam sulfitos nas hortaliças *Allium* e *Brassica*, embora a níveis mais baixos que aqueles determinados pelos métodos tipo M-W (FAZIO & WARNER, 1990).

Inúmeros procedimentos utilizam a destilação M-W, que pode ser substituída por outras técnicas de quantificação mais seletivas como a colorimetria, a cromatografia de íons e a polarografia. Estes procedimentos são mais sensíveis do que a quantificação por titulação e a gravimétrica; por esta razão, amostras menores podem ser usadas para cada determinação. Isto pode ser uma vantagem significante na análise de alimentos. O fato do procedimento M-W requerer uma amostra de 50 a 100 g é uma vantagem porque a mesma pode ser selecionada sem muito preparo, o que, invariavelmente, leva a perda

dos sulfitos. Em termos de seletividade, uma pequena vantagem se deve ao tamanho da amostra porque a destilação efetivamente separa o dióxido de enxofre da solução do alimento e dos compostos interferentes. Os métodos que dependem da destilação não podem distinguir entre o dióxido de enxofre derivado dos sulfitos minerais adicionados e do dióxido de enxofre obtido como resultado da hidrólise de compostos que ocorrem naturalmente no alimento (FAZIO & WARNER, 1990; WARNER & FAZIO, 1987).

O método M-W permite detectar os sulfitos que estejam em quantidades acima de 10 ppm em alimentos (WARNER & FAZIO, 1987). Este é um método que fornece maiores informações nos produtos com sulfitos adicionados do que nos produtos com sulfitos livres. Tem a vantagem adicional de que tem sido aplicado em vários sistemas alimentares, provando ser um método consistente. A maior parte do tempo gasto no método M-W é usada para coletar a amostra, e a experiência tem demonstrado que o tempo gasto é necessário para converter todos os sulfitos reversivelmente ligados em compostos mensuráveis (SO_2). Uma desvantagem, que não o torna menos importante, é o fato de que há uma redução nas espécies de sulfitos livres com o tempo, que reagem com componentes dos alimentos. Tal fato pode levar a um alto coeficiente de variabilidade durante a análise, particularmente nos alimentos com baixo nível residual de sulfitos. O método M-W é demorado, não podendo ser utilizado como um método de rotina em laboratórios, e a destilação de outros ácidos voláteis pode ser um fator complicador (TAYLOR & BUSH, 1987; MODDERMAN, 1986; TAYLOR & BUSH, 1986; WEDZICHA, 1981b).

O método M-W foi o primeiro de muitos métodos analíticos para sulfitos, dependente da acidificação do produto, seguida pela fase de vapor, com a transferência do dióxido de enxofre para uma solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é então analisada para quantificar o dióxido de enxofre capturado ou produtos das reações. No método M-W (vide aparelho na Figura 1), a porção testada é aquecida em uma solução de refluxo de ácido clorídrico (HCl) 1*N*. Um fluxo de nitrogênio introduzido abaixo da superfície da solução de

refluxo permite um fluxo contínuo de dióxido de enxofre através do condensador de água gelada e, por intermédio de um bulbo fixado no condensador, numa solução de H_2O_2 a 3 %, onde o dióxido de enxofre é oxidado a ácido sulfúrico. O conteúdo de sulfitos é diretamente relacionado ao ácido sulfúrico gerado, determinado pela titulação com hidróxido de sódio padronizado, ou o sulfato é determinado gravimetricamente como sulfato de bário. A sensibilidade e seletividade da quantificação do dióxido de enxofre podem ser aumentadas com a utilização do ácido 2-nitrobenzóico. Modificações significantes do método M-W têm aparecido tanto com variações nas condições de destilação quanto com diferentes substitutos do sistema de medição do dióxido de enxofre, ou ambos (LOWINSOHN & BERTOTTI, 2001; GILBERT, 1996; AOAC, 1995; BARNETT, 1985; SULLIVAN & SMITH, 1985; WARNER & FAZIO, 1987; ANDERSON *et al*. 1986; COKER, 1986; WARNER *et al*. 1986).

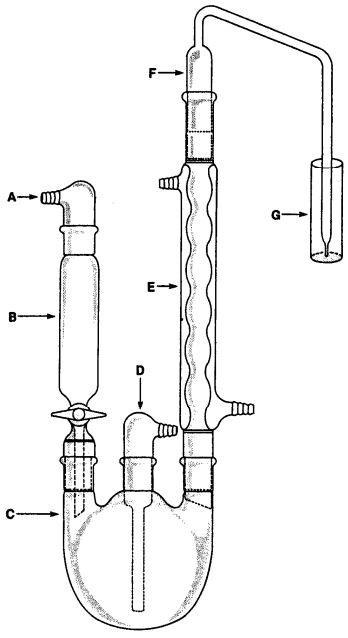


Figura 1 – Aparelho de Monier-Williams otimizado. A, canal adaptador; B, funil separador; C, frasco redondo; D, tubo de gás; E, condensador Allihn; F, bulbo; G, receptor, ca 2,5 cm i.d. x 18 cm.

Fonte: WARNER & FAZIO, 1987.

O método M-W é usado para determinar o conteúdo de sulfitos nos seguintes alimentos: frutas secas, batatas desidratadas, cogumelo em conserva, vinho, suco de laranja, melaço, abacaxi desidratado, pimenta em pó, amido de milho, camarão descascado congelado, hortaliças desidratadas, salsicha, gengibre e carne (>20 ppm). O sucesso do uso do método, com esta variedade de alimentos, demonstra que ele é um procedimento altamente seletivo, embora alguns compostos orgânicos possam interferir na análise (DANIELS *et al*. 1992; WARNER *et al*. 1986).

Algumas modificações do método M-W são descritas na literatura, como no método *Tanner*. Tem-se utilizado este procedimento porque a transferência do dióxido de enxofre é completada em 30 minutos, em contraste com o tempo de 105 minutos exigidos pelo método M-W, e o uso de um ácido não volátil (ácido hidroclorídrico) reduz o risco da transferência do reagente ácido para o frasco receptor (MOYLAN, BOWES & PAPPIN, 1986; OUGH, 1986; WARNER *et al*. 1986). Outra modificação substitui o ácido hidroclorídrico pelo ácido fosfórico. O efeito combinado destas duas mudanças é reduzir o rigor da destilação. A mistura entra em ebulição a uma temperatura em torno de 30 ℃ menor, e pelo fato do ácido fosfórico ser mais fraco que o ácido hidroclorídrico, é provável que uma parte das formas combinadas de sulfitos (com os componentes do meio) não resulte em equivalente de dióxido de enxofre sob as condições da análise (FAZIO & WARNER, 1990).

O método *Rankine* também usa ácido fosfórico em dois estágios da análise desenvolvidos para separar os sulfitos livres e combinados no vinho. Depois da adição do ácido fosfórico, o nitrogênio movimenta o dióxido de enxofre derivado dos sulfitos livres na solução teste. Então, a solução é aquecida até a fervura para remover o dióxido de enxofre das formas reversivelmente ligadas de sulfitos. Desde que algumas formas ligadas de carbonil-sulfito, como o α-hidróxi sulfurado, sejam relativamente estáveis a níveis de pH menores, este método é bem sucedido em separar as formas livre

e combinada de sulfitos em vinho (FAZIO & WARNER, 1990; WARNER & FAZIO, 1987).

Com o objetivo de obter vantagem na seletividade das destilações e reduzir o tempo de destilação de 105 minutos do método M-W, bem como o esforço associado à montagem do aparato de destilação, alguns procedimentos usam a destilação rápida como um procedimento de quantificação seletivo, tais como a polarografia ou a cromatografia de íons. Estas destilações requerem atenção constante para evitar, por exemplo, superaquecimento da solução, diferentemente das destilações M-W. Os esforços para solucionar estes problemas pela limitação da taxa de fluxo do nitrogênio ou pelo controle da temperatura do alimento em solução ou suspensão para reduzir a ebulição levam a uma redução de perdas. Basicamente estes procedimentos têm substituído a destilação M-W bem caracterizada e facilmente controlada por uma destilação pouco controlada que permite obter resultados variados nas mãos de diferentes operadores, usando diferentes materiais de vidro. A tentativa em reduzir a destilação por causa do superaquecimento pode também conduzir a resultados menores porque as formas mais resistentes de sulfitos não serão suficientemente hidrolisadas para cobrir o equivalente de dióxido de enxofre (AOAC, 1995; FAZIO & WARNER, 1990; WARNER & FAZIO, 1987; BARNETT, 1985).

Em resumo, os métodos que se baseiam na destilação tipo M-W para separar o dióxido de enxofre do alimento oferecem pouca vantagem sobre o próprio método M-W porque o resultado analítico é limitado pela destilação. As hortaliças *Allium* e *Brassica* e proteína isolada de soja mostram dióxido de enxofre mesmo na ausência de tratamento com sulfitos como resultado da hidrólise ácida rigorosa no processo de destilação (FAZIO & WARNER, 1990).

O uso da destilação gasosa rápida seguida de uma titulação por iodo permite uma determinação rápida e acurada do resíduo de sulfitos totais em camarão. Os valores para o método da destilação rápida variaram de 6 a 212 ppm enquanto os do método M-W variaram de 6 a 241 ppm para camarões não

tratados e tratados, respectivamente. A análise estatística não indicou diferenças significativas (p>0,05) para os níveis residuais abaixo de 100 ppm, diferentemente dos níveis próximos ou acima de deste valor (p<0,05). Em relação ao método de destilação, os resíduos de sulfitos em camarão foram analisados usando uma unidade de destilação rápida Kjeltec equipada com alguns tubos de amostra de 500 mL, modificados para a mudança de lado. Aproximadamente 10 g de camarão fatiado bem fino foram colocados no tubo de amostra com 50 mL de água deionizada. Os tubos com as amostras são colocados sob a unidade de destilação com 30 mL de HCl a 33,33 %. Cada amostra foi então destilada com o vapor enquanto que no condensador foi sendo titulada simultaneamente com solução de iodo 0,02*N* contendo amido como indicador. A solução de iodo foi padronizada com tiossulfato de sódio 0,1*N*. A concentração de sulfitos foi calculada usando a seguinte equação: ppm de SO_2 = VxNx32x1000/W, onde V é o volume (mL) de I_2 consumido, N é a normalidade da solução de I_2 durante o trabalho, 32 é o peso equivalente de SO_2 e W é o peso (g) da amostra. O método M-W foi modificado com o uso do nitrogênio grau 5 no lugar da solução de pirogalol. Aproximadamente 50 g do camarão fatiado bem fino foram destilados por 125 minutos em 350 mL de água contendo 90 mL de HCl 33,33 %. O SO_2 evaporado foi coletado em 10 mL de água oxigenada (H_2O_2) 3 % e titulado com hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 *N*, usando vermelho de metila como indicador. A concentração de sulfitos foi calculada usando a seguinte equação: ppm de SO_2 = (3,203)x(mL NaOH 0,1*N*)/peso da amostra em kg (SIMPSON *et al*. 1988).

Têm sido desenvolvidos procedimentos que dependem da conversão dos sulfitos a dióxido de enxofre e da transferência da fase de vapor para separar a porção analítica do alimento e outras substâncias interferentes. As condições empregadas, de qualquer modo, são consideravelmente semelhantes àquelas usadas no método M-W. Infelizmente não existem dados disponíveis para demonstrar em que grau estas condições reduzem o dióxido de enxofre obtido dos compostos sulfurados que ocorrem naturalmente e são encontrados em

algumas hortaliças e proteína isolada de soja. Os métodos nesta categoria utilizam um “headspace” sobre uma solução aquosa acidificada (FAZIO & WARNER, 1990).

A concentração de dióxido de enxofre no “headspace” é medida e então deve ser usada para computar a concentração na amostra do alimento analisado. Essencialmente os métodos requerem uma estimativa ou a determinação da subdivisão do coeficiente para dióxido de enxofre entre a solução e a fase gasosa. Na maioria dos casos o ácido é adicionado à amostra para alterar o equilíbrio sulfito-bissulfito-dióxido de enxofre para dióxido de enxofre, que se subdivide entre a solução e a fase gasosa. Se os α-hidroxi sulfurados dissociam-se lentamente a um pH baixo, somente uma pequena porcentagem destas substâncias contribuem para o dióxido de enxofre no equilíbrio do sistema. Uma segunda amostra é tratada a um pH alcalino para causar a dissociação dos α-hidroxi sulfurados. A solução é então acidificada para a etapa de isolamento/determinação. O sucesso deste procedimento depende do fato de que a recombinação dos sulfitos com compostos carbonil é relativamente lenta, comparada com a subdivisão do dióxido de enxofre entre a solução e o “headspace” (AOAC, 1995; FAZIO & WARNER, 1990; WARNER & FAZIO, 1987).

Tem sido descrito procedimento de cromatografia líquida *“headspace”* (*Liquid Chromatography* – LC) que capta o dióxido de enxofre “headspace” sobre uma solução ácida ou uma suspensão de alimento na solução que é então submetida à separação por LC. Usa-se uma solução altamente alcalina para converter todas as formas livres de sulfitos a ânion sulfito com dupla carga e causar a dissociação imediata das formas de sulfito carbonil ligadas, como o produto da adição de bissulfito e acetaldeído. Para prevenir perda de sulfitos pela oxidação, adiciona-se manitol e sais de ferro na solução de extração alcalina. Não há como determinar se estes expedientes são suficientes para prevenir a perda de sulfitos durante o trabalho porque é usado o produto da adição de bissulfito-acetaldeído estável para tratar as amostras de alimento.

Também, não é possível determinar como o coeficiente de subdivisão é determinado e usado para corrigir os resultados para repetição (FAZIO & WARNER, 1990).

A cromatografia líquida também pode ser utilizada para determinar o conteúdo de sulfitos livres e o de sulfitos ligados reversíveis. As amostras são tratadas com solução aquosa de formaldeído a 2 % para converter os sulfitos em sulfonato de hidroximetano, cuja quantificação é realizada em coluna de fase reversa, que utiliza reação com KOH seguida de uma reação colorimétrica com o reagente de Ellman a pH 6,3. A detecção fotométrica a 412 *nm* quantifica o ânion 3-carboxi-4-nitrotiofenolato, com absortividade molar elevada, que é o produto da reação entre os sulfitos e o reagente de Ellman. O método permite quantificar os sulfitos a baixas concentrações (ppm). O método tem potencial para ser usado rotineiramente na quantificação das formas livres e reversivelmente ligadas em alimentos (ARMENTIA-ALVAREZ *et al*. 1993; LAWRENCE & CHADHA, 1988; WARNER & FAZIO, 1987; LAWRENCE & CHADHA, 1987).

Foi desenvolvido um método “headspace” utilizando cromatografia gasosa (*Gas Chromatography* – GC) para vinhos e sucos. O método é usado com certa freqüência para estes alimentos por causa do interesse no dióxido de enxofre livre. Embora seja reconhecido que o método tem um valor desconhecido quando aplicado a alimentos com baixa atividade de água porque a subdivisão do dióxido de enxofre entre o alimento e o “headspace” mudaria (FAZIO & WARNER, 1990).

Existem procedimentos que não utilizam a destilação ou a transferência da fase gasosa, mas requerem a conversão dos compostos derivados de sulfitos a dióxido de enxofre para quantificação. A eficiência da conversão de compostos derivados de sulfitos a dióxido de enxofre provavelmente tem maior influência no resultado final do que o procedimento de medição utilizado (FAZIO & WARNER, 1990).

Originalmente, a análise por injeção em fluxo (FIA) utiliza a conhecida descoloração do verde malaquita pelos sulfitos. O alimento é tratado com um sal de mercúrio para estabilizar os sulfitos como um complexo sulfito-mercúrio. Esta é a base química usada pelo procedimento West-Gaeke para o dióxido de enxofre no ar. A reação colorimétrica é relativamente não específica; por esta razão, a mistura sulfitos/alimento é acidificada para converter os sulfitos a dióxido de enxofre, que então migra através de uma membrana de Teflon que separa a amostra da solução de verde malaquita. Os resultados publicados sugerem que o método é limitado para determinar níveis ≥ 50 ppm de dióxido de enxofre na maior parte dos alimentos (CASTRO & LUQUE-GARCIA, 2000; FAZIO & WARNER, 1990; REIS *et al*., 1989).

Atualmente, é uma técnica analítica que envolve a injeção de uma solução da amostra num fluxo contínuo. Um dos procedimentos descritos é baseado na reação da pararosanilina e usa uma célula de difusão de gás para separar o SO_2 da amostra. Apesar de promissora, esta técnica, especificamente, possui problemas relacionados à reação entre o formaldeído e SO_2. Por outro lado, é uma técnica extremamente rápida, permitindo a detecção do conteúdo de SO_2 em aproximadamente 60 s, e bastante sensível, permitindo a detecção de níveis a 0,1 ppm. Além disso, os instrumentos são relativamente simples (RUIZ-CAPILLAS & JIMENÉZ-COLMENERO, 2009; SULLIVAN *et al*. 1986). Bendtsen & Jorgensen (1994) realizaram modificações resultando em menor dispersão, em um método mais estável devido à estabilização de soluções padrão e na redução do erro pelo uso de uma curva de calibração não linear.

Azevedo (1999) e Winnischofer (2004) utilizaram célula FIA construída especialmente para a detecção de sulfitos. Segundo os pesquisadores, o método FIA modificado é um método intrinsecamente diferencial e usa mecanismos de transporte de massa hidrodinâmicos, o que o torna altamente sensível, podendo-se detectar até nanogramas de amostra, em condições ideais.

A cromatografia de exclusão de íon (*Ion Chromatography* – IC) requer a conversão para dióxido de enxofre (FAZIO & WARNER, 1990). A cromatografia de íons é uma técnica bem conhecida para determinar íons como ânions, cátions, ácidos orgânicos, metais de transição, aminas, fenóis, surfactantes e açúcares em vários tipos de alimentos. A IC é utilizada para determinar rapidamente a concentração da solução e, desta forma, a concentração teórica de sulfitos. A IC pode ser uma alternativa ao método M-W por ser rápida, altamente sensível (de 1 a 1600 ppm) e de custo compatível (ANDERSON *et al*. 1986; SULLIVAN & SMITH, 1985). Para Kim, Kim & Smith (1988), este método fornece uma determinação rápida e acurada do total de sulfitos em alimentos e bebidas (frutas secas, hortaliças, batatas, coco, sopa instantânea, camarão, vinho e suco de fruta) com sensibilidade abaixo de 10 ppm sendo, portanto, uma alternativa ao método M-W.

Comparando cromatografia líquida de alta performance (*High Perfomance Liquid Chromatography* – HPLC) com o método M-W, os níveis de formas ligadas avaliados pelo método M-W após o aquecimento, particularmente no mosto de uva, foram afetados devido a ânions voláteis destilados. Como conseqüência, os sulfitos totais, calculados como a soma das frações livre e ligada, são superestimados. Esta superestimação dos níveis de sulfitos nos alimentos pode ser evitada utilizando um método de análise seletivo, como o proposto no HPLC, que evita a interferência potencial de substâncias voláteis, derivadas dos alimentos e dos compostos químicos utilizados (LEA, FORD & FOWLER, 2000; HLAVAY & GUILBAULT, 1994; PIZZOFERRATO, QUATTRUCCI & DI LULLO, 1990).

Armentia-Alvarez *et al*. (1993) concluíram que o método HPLC e o método M-W otimizado têm a mesma precisão (p=0,05), quando foram comparadas as médias de concentração de sulfitos totais, embora tenha havido diferenças estatisticamente significantes (p<0,05) entre as quantidades de sulfitos. O conteúdo de sulfitos determinado em hambúrgueres pelo método M-W otimizado é menor que o encontrado usando HPLC; isto pode ser explicado

pela presença de agentes interferentes ou devido à eficácia diferente dos tratamentos iniciais que estão relacionados à dissociação das formas ligadas. A presença de agentes interferentes no HPLC pode acontecer nos cromatogramas correspondendo a amostras de hambúrgueres sem sulfitos e na coluna de cromatografia com a sua não observância devido ao aditivo. No método M-W, a interferência pode acontecer devido a substâncias de natureza alcalina que podem prejudicar a conservação das amostras e as condições sob as quais ocorre a destilação. Desta forma, admite-se que em hambúrgueres, a extração alcalina pode levar a uma maior liberação das formas ligadas de sulfitos do que em meio ácido. Neste caso, a etapa mais comum na análise de sulfitos é o tratamento alcalino inicial a que a amostra é submetida.

O método espectrofotométrico é baseado na formação de cor entre a pararosanilina, o formaldeído e os sulfitos e tem uma sensibilidade limitada. Em estudo desenvolvido por Hlavay & Guilbault (1994), um biosensor de fibra óptica foi desenvolvido para determinar os sulfitos em alimentos. A SOD e a POD (sulfito peroxidase) foram imobilizadas em diferentes membranas. Primeiro, a SOD imobilizada foi usada para gerar H_2O_2 como se segue:

$$SO_3^{2-} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{SOD}} SO_4^{2-} + H_2O_2$$

O peróxido de hidrogênio é detectado por uma reação quimioluminescente usando luminol (5-amino-2,3-dihidro-fitalazina-1,4-diona) a pH>9:

$$\text{luminol} + 2H_2O_2 + HO^- \xrightarrow{\text{POD}} \text{3-aminofitalato} + N_2 + 3H_2O + h\nu$$

(λ_{max} = 430 *nm*).

A determinação cinética de micro quantidades de sulfitos tem sido pesquisada. Neste método os sulfitos catalisaram a decomposição do bromato em meio ácido. Embora outros ânions contendo enxofre, como tiocianato e

tiossulfato, possam interferir. Em estudo desenvolvido por Safavi & Ensafi (1991), a determinação de sulfitos se baseou na reação entre sulfitos e verde brilhante a pH 7.

Os métodos baseados na eletroforese capilar (*Capillary Electrophoresis* – CE) estão ganhando aceitação como um procedimento analítico consistente. Os procedimentos de CE são freqüentemente rápidos e com custo compatível quando comparados com outras técnicas instrumentais e têm a vantagem adicional de que a maioria das determinações pode ser conduzida usando a mesma membrana de sílica fundida. O método CE é capaz de detectar o conteúdo de sulfitos de uma variedade de alimentos, inclusive daqueles que tradicionalmente não são analisados pelo método M-W. Ele monitora os níveis de sulfitos livres de outros compostos voláteis que devem interferir na titulação ácido-base. O limite de detecção é o mesmo do método M-W, ou seja, 5 mg/kg (TRENERRY, 1996).

O método colorimétrico não tem sido muito utilizado a despeito de importantes vantagens como sua acurácia e precisão. Quando o método colorimétrico é empregado de forma constante, ele oferece a possibilidade de gerar uma titulação *in situ* de um precursor esperado com 100 % de eficiência, tornando a padronização dos reagentes desnecessária (LOWINSOHN & BERTOTTI, 2001). Os dados obtidos por Greyson & Zeller (1987) demonstram que o método colorimétrico é comparável com os procedimentos preconizados pelo FDA e pela *Association Official Analytical Chemistry* (AOAC), sendo uma alternativa à titulação ácido-base. Embora a colorimetria ofereça as seguintes vantagens: a) ela permite uma medida confortável de sulfitos no nível <10 ppm, dificilmente obtido pela titulação ácido-base ou pela determinação gravimétrica de sulfato; b) a medida colorimétrica é mais rápida que os protocolos da AOAC, oferecendo resultados em menos de 15 minutos (embora seja reconhecido que o procedimento que utiliza pararosanilina possa conduzir a uma análise mais rápida que o protocolo de destilação); c) os instrumentos colorimétricos não necessitam da preparação de soluções padrão para titulação ou para o

desenvolvimento de curvas padrão; d) a compleição de uma análise com os instrumentos colorimétricos é clara, ou seja, a taxa de titulação pode ser monitorada tanto visualmente quanto pelo computador, e o fim da análise pode ser determinado pela anotação do ponto em que a taxa de titulação atinge zero; e) a titulação iodométrica sobre uma célula colorimétrica não é sensível a ácidos voláteis nas amostras ou a qualquer outro que possa ser produzido no processo de destilação. Esta última vantagem também foi apontada por Su & Taylor (1995) tanto para o método colorimétrico com utilização de pararosanilina quanto para os procedimentos com SOD.

Um eletrodo enzimático que usa SOD e um eletrodo de peróxido de hidrogênio foi desenvolvido para a determinação de sulfitos em vários alimentos. A enzima é ligada com a albumina sérica bovina via glutaraldeído e conectada a uma área sensível do eletrodo polarográfico. O eletrodo detecta o peróxido de hidrogênio durante a oxidação dos sulfitos a sulfato pela SOD na presença de oxigênio como receptor de elétron. O eletrodo de enzima exibe uma resposta linear (MULCHANDANI, GROOM & LUONG, 1991).

Na maioria das vinícolas da Califórnia, o método *Ripper* é normalmente utilizado para determinar o SO_2 livre e total. Ele é simplesmente uma titulação direta com iodo. Os vinhos se tornam ácidos pela adição de H_2SO_4, sendo então as amostras tituladas para verificação do conteúdo de SO_2 livre (FERRARINI *et al*. 2000; OUGH, 1986). O método *Ripper* também é o método mais comum para análise do SO_2 livre (TAYLOR & BUSH, 1987; TAYLOR & BUSH, 1986; BARNETT, 1985).

No caso do xarope de glicose, a utilização do método M-W é preconizada, embora não possa ser utilizado rotineiramente devido ao tempo despendido. Desta forma, os métodos iodométricos aparecem como uma boa alternativa. A princípio a amostra é diluída e tratada com hidróxido de sódio para liberar o dióxido de enxofre. A solução é então acidificada e o ácido sulfuroso é determinado por titulação com uma solução iodada padrão, usando o amido como um indicador final. Pode ser utilizado o iodeto de potássio para

dissolver o iodo. A diluição do reagente iodado é variável, podendo ir de 0,01 a 0,05 *N*. A sensibilidade do indicador de amido utilizado diminui com o aumento da temperatura. É necessário, desta forma, manter a solução da amostra e todos os reagentes a uma temperatura de 25 ℃ ou me nos (COKER, 1986).

A determinação enzimática é aplicável em análises quantitativas de sulfitos a níveis abaixo de 100 mg SO_2/kg. Para concentrações muito pequenas, o tipo de alimento é importante. Na análise de amostras sólidas ou quando os sulfitos se aderem a partículas, como nos sucos, um desvio padrão alto é esperado (EDBERG, 1993; MULCHANDANI; GROOM & LUONG, 1991; BEUTLER, 1984).

Para Barnett (1985) outras considerações metodológicas (métodos indicativos) podem ser feitas:

- A reação específica dos sulfitos com o cloridrato de rosalanina e o verde malaquita é utilizada em testes rápidos de coloração e em determinações colorimétricas. Estes testes são aplicados em carnes e cerveja e fornecem resultados precisos com o mínimo de interferência dos componentes dos alimentos.

- Existe fita para teste de sulfitos (Merck™) para estimar os sulfitos em soluções de imersão, como as utilizadas para reduzir a deterioração de camarões destinados a exportação. A fita torna-se vermelha, aumentando a intensidade com o aumento da concentração de sulfitos. A detecção pode ser feita em intervalos de 10 a 500 mg/L SO_2.

- Outro teste comercial se baseia na utilização da enzima SOD associada com NADH/NAD^+ (Boehringer-Mannheim™). O sistema é bastante seletivo e sensível. A única interferência vem do ácido ascórbico que deve ser removido das amostras com alto teor. O método pode ser usado em concentrações de SO_2 de 0 a 100 mg/kg.

Williams, Slattery & Nottingham (1990) testaram três métodos comparativamente ao M-W: destilação rápida a vapor, HPLC e teste enzimático, em camarão. Análises estatísticas demonstraram que os níveis de sulfitos

determinados em soluções padrão pela destilação rápida foram muito próximos daqueles obtidos pelo método M-W, mesmo com a aplicação de fator de correção. O mesmo foi observado em relação ao método HPLC. O teste enzimático foi insatisfatório para análises de sulfitos em camarões.

Nas Tabelas 6, 7 e 8 são mostrados dados comparativos de análise de sulfitos em diversos alimentos, demonstrando, de modo geral, uma grande variação dos resultados. E na Tabela 8, observa-se redução da quantidade de sulfitos em sucos industrializados comercializados no Brasil, o que pode demonstrar maior atuação da vigilância sanitária, além do que existe, atualmente, maior conhecimento em relação aos efeitos tóxicos do SO_2.

Tabela 6 – Resultados da determinação de SO_2 pelos métodos Monier-Williams (M-W) e cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

Amostra	SO_2 adicionado (ppm)	Sulfitos, SO_2 ppm	
		M-W	HPLC
Padrão	12	11	11
Patê de anchova	179	150	147
Cerveja	12	10	10
Couve de bruxelas	26	25	25
Suco de *grapefruit*	24	21	21
Geléia	196	169	159
Mostarda	240	202	194
Cebola desidratada	306	334	309
Purê de batatas	116	101	102
Ameixa seca	214	178	178
Camarão	117	143	122
Açúcar	174	169	170
Vinho	100	88	83

Fonte: adaptada de Pizzoferrato, Quattrucci & Di Lullo, 1990.

Tabela 7 – Resultados da determinação de SO_2 pelos métodos de análise de injeção em fluxo (FIA), Monier-Williams (M-W), colorimétrico (Color.) e enzimático (Enzym.).

Produto	Tratamento de sulfitos, % usada	Sulfitos, ppm			
		FIA	M-W	Color.	Enzym.
Vinho branco	A[a]	92	165	105	93
Vinho tinto	A	49	91	70	112
Suco de maçã	0	ND(1,5)[b]	NS(7)[c]	NS(5)[c]	NS(5)[c]
Suco de maçã	0,01[d]	88	87	104	72
Suco de maçã	0,05[d]	478	448	493	420
Guacamole	0	ND(10)	NS(11)	NS(33)	ND(33)
Guacamole	0,05[e]	653	494	785	558
Damasco seco	A	1710	2043	2010	1680
Batatas	0	ND(6)	ND(16)	NS(20)	NS(20)
Batatas	0,4[f]	284	263	295	210
Batatas	2,0[f]	1544	1492	2104	1338
Cebolas picadas	A	13	36	14	22
Camarão do Golfo	0	ND(2)	NS(11)	NS(5)	ND(5)
Camarão do Golfo	1,25[g]	192	131	204	174
Camarão do Golfo	5,0[g]	603	496	623	632
Camarão	0	ND(2)	NS(11)	NS(5)	ND(5)
Camarão	0	ND(2)	NS(6)	NS(5)	ND(5)
Camarão	0	ND(2)	NS(6)	NS(5)	NS(5)
Camarão	0	ND(2)	NS(6)	NS(5)	NS(5)
Maçã seca	A	1694	2091	1764	1744
Alface	0	ND(10)	NS(11)	NS(25)	ND(25)
Alface	0,4[f]	465	417	463	311
Repolho	0	ND(10)	NS(11)	NS(26)	ND(25)
Repolho	0,4[f]	193	184	176	187

[a]Sulfitos adicionados durante o processamento.

[b]Não detectado; limite de detecção entre parênteses.

[c]Não significante; foi detectada resposta positiva mas abaixo do limite de detecção especificado. Limite de detecção entre parênteses.

[d]Na_2SO_3 adicionado diretamente ao suco no nível estabelecido.

[e]Sulfitos comerciais adicionados no nível estabelecido.

[f]1 minuto imerso em solução de sulfitos comerciais.

[g]1 minuto imerso em solução de $NaHSO_3$.

Fonte: SULLIVAN *et al*. 1986.

Tabela 8 – Comparação entre resultados de análises de sulfitos pelo método Monier-Williams (M-W) de estudos brasileiros em diversos tipos de sucos de frutas industrializados.

Tipos de suco	Yabiku *et al*. (1987)[1]	Machado *et al*. (2008)[2]
Graviola	425 – 1099	120,8
Caju	78 – 1439	
Goiaba	27 – 670	< 10,0 – 327,1
Maracujá	11 – 890	100,2 – 300,1
Manga	79 – 447	116,2 – 295,6
Pitanga	154 – 732	-
Abacaxi	ND[3] – 1128	130,0 – 316,6
Uva	ND – 325	<10,0 – 14,5
Tamarindo	47 – 303	112,2
Mix de frutas	ND – 100	83,4
Tomate	ND – 71	-
Maçã	ND	-
Laranja	ND – 111	145,4
Tangerina	38 – 114	-
Pêssego	ND	150,1
Limão	ND – 40	-
Mamão papaia	ND – 133	-
Banana	ND – 91	-
Morango	ND	-
Cereja	-	93,7 – 254,4
Caju com maçã	-	194,1 – 589,3

[1] sucos naturais de frutas do tipo integral (mg de SO_2 L^{-1})
[2] sucos de frutas concentrados (mg de SO_3 L^{-1})
[3] não detectado

3 OBJETIVOS

Pela falta de informações na literatura nacional sobre o grau de exposição diária da população brasileira aos sulfitos, utilizados como aditivos alimentares, os objetivos deste trabalho foram:

3.1 Objetivo geral:

– Avaliar o nível de sulfitos em produtos alimentícios e estimar seu consumo por escolares de 5ª. a 8ª. séries, do ensino fundamental, de escolas públicas, do município de São Caetano do Sul-SP, Brasil.

3.2 Objetivos específicos:

– Verificar o consumo de alimentos sulfitados contidos na dieta dos escolares.

– Estimar a ingestão média de sulfitos pelos escolares.

– Comparar a ingestão média de sulfitos à ingestão diária aceitável.

– Comparar os limites máximos permitidos de sulfitos em alimentos pela legislação brasileira com os dados de consumo alimentar.

– Analisar quantitativamente o nível de sulfitos em sucos de frutas.

– Comparar os métodos de análise quantitativa Monier-Williams otimizado e análise por injeção em fluxo modificado.

4 METODOLOGIA

4.1 População e local do estudo

Para a realização desta pesquisa foram selecionados todos os escolares adolescentes, de ambos os sexos, que estavam cursando a 5ª., 6ª., 7ª. ou 8ª. séries, do ensino fundamental de escolas públicas municipais, do município de São Caetano do Sul-SP, Brasil, e que deram suporte à realização desta pesquisa. As escolas que atenderam a estes requisitos foram Ângelo Pelegrino, SEMEF e Alcina Dantas Feijão.

O critério de exclusão foi a não assinatura do termo de consentimento pelo responsável do escolar e a falta no dia da coleta. Mesmo com o preenchimento do termo de consentimento com a anuência dos pais, o aluno poderia se recusar a participar da pesquisa, caso estivesse desenvolvendo alguma atividade na escola no dia da coleta, de modo a não prejudicar suas atividades escolares.

4.2 Coleta de dados de consumo de alimentos e instrumento de coleta

A coleta de dados de consumo de alimentos na população em estudo foi realizada por meio da aplicação de questionário de freqüência de consumo de alimentos (QFCA) especificamente desenvolvido para esse fim (FISBERG *et al*., 2005), utilizando-se como base os alimentos nos quais a legislação brasileira permite o uso de dióxido de enxofre (ABIA, 2001), conforme apresentado no Apêndice I.

Tendo em vista que todos os métodos que avaliam o consumo alimentar são, em algum momento, imperfeitos, e que não existe padrão-ouro em nutrição, o questionário utilizado no estudo foi de freqüência quantitativa e qualitativa sobre o consumo de produtos cuja adição de sulfitos é permitida de acordo com a legislação brasileira. Esse método foi selecionado pela facilidade

de aplicação, baixo custo e por permitir o conhecimento do consumo habitual desses alimentos.

O QFCA passou por pré-teste em grupo de indivíduos com as mesmas características da amostra pesquisada e nas mesmas condições previstas para a coleta de dados, de forma a avaliar a necessidade de ajustes neste instrumento e a cronometrar a duração do processo de coleta. Nesta etapa as diretoras das escolas municipais solicitaram a retirada das bebidas alcoólicas do QFCA tendo como justificativa a população pesquisada, adolescentes do ensino fundamental, e os possíveis questionamentos dos pais durante a assinatura do consentimento e a aplicação do QFCA.

As instruções para preenchimento do QFCA encontram-se no Apêndice II e foram entregues a cada aluno juntamente com o QFCA de modo a esclarecer dúvidas e auxiliar no preenchimento. O tempo de coleta era de, no máximo, 30 (trinta) minutos.

A coleta de dados ocorreu em 2007, conforme disponibilidade de agendamento das escolas e calendário escolar, e o QFCA foi aplicado pelo próprio pesquisador, reunindo os alunos em determinados horários em sala de aula ou em auditório, disponibilizado exclusivamente para este fim.

4.3 Definição dos padrões de comparação

As porções de alimentos adotadas seguiram como padrão o “Registro fotográfico para inquéritos dietéticos (utensílios e porções)” (ZABOTTO, 1996), a Resolução RDC 359/03 (Regulamento Técnico de porções de alimentos embalados para fins de rotulagem nutricional) e o “Manual de Receitas e Medidas Caseiras para Cálculo de Inquéritos Alimentares” (FISBERG & VILLAR, 2002) em conformidade com a informação declarada pelo pesquisado.

As quantidades de sulfitos nos alimentos consumidos foram estimadas por meio dos LMP estabelecidos pela legislação brasileira, conforme metodologia utilizada em pesquisas realizadas por Leclercq *et al*. (2000) e Verger *et al*. (1998).

A quantidade per capita de sulfitos consumida foi comparada à IDA de 0,7 mg SO_2/kg pc/dia (WHO, 2000). Cada indivíduo foi, então, classificado dentro do nível de segurança ou não em relação ao consumo de sulfitos. Para a classificação dos grandes consumidores, foi considerado o consumo de sulfitos acima do percentil 97,5, ou seja, acima de 0,65 mg SO_2/kg pc/dia.

4.4 Amostragem de produtos alimentícios para análise quantitativa

A metodologia foi baseada naquela preconizada para a elaboração da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) da Universidade Estadual de Campinas (NEPA, 2006), quanto à coleta e composição das amostras.

A coleta das amostras de produtos alimentícios foi realizada em supermercados / hipermercados, responsáveis por cerca de 85 % do total de compras de alimentos, no município de São Caetano do Sul, em maio de 2008.

As amostras foram compostas pelas principais marcas comerciais dos sucos de frutas industrializados concentrados (neste caso, 3 sabores – caju, maracujá e uva de 3 marcas mais freqüentemente encontradas nas prateleiras – A, B e C) e duas marcas de água de coco comercializadas nos locais de coleta (marcas D e E). Cada amostra (garrafa, frasco ou caixa) foi retirada da própria prateleira na qual se encontrava em exposição, considerando o lote mais recente do produto. Duas unidades do mesmo lote de cada tipo de produto foram coletadas no local de venda, sendo realizadas análises em triplicata de cada uma das unidades pelos métodos de quantificação de sulfitos selecionados.

O contato das amostras com o ar foi minimizado tanto quanto possível de modo a evitar a oxidação dos sulfitos pelo oxigênio.

4.5 Métodos de análise quantitativa

Os procedimentos metodológicos utilizados para a análise quantitativa de sulfitos por meio dos métodos M-W otimizado e FIA modificado seguiram as

normas preconizadas, respectivamente, por AOAC (2006), 990.28, e Brasil (2005), e Winnischofer (2004), Azevedo *et al*. (1999, 1998) e Araki *et al*. (1995).

4.5.1 Método Monier-Williams (M-W) otimizado

a) Reagentes

Água oxigenada (H_2O_2) a 3 %

Ácido clorídrico 4 mol L^{-1}

Hidróxido de sódio (NaOH) 0,05 mol L^{-1}

Indicador vermelho de metila (0,2 % de solução de etanol)

b) Procedimento

A aparelhagem foi montada conforme a Figura 2. Foram transferidos para os frascos A e B, 43 mL e 7 mL de água oxigenada a 3%, respectivamente. Os frascos A e B foram acoplados ao conjunto de destilação, que eram mergulhados em banho de gelo. Foram adicionados 130 mL de água bidestilada ou deionizada ao balão de destilação e a água do condensador foi aberta. Nesta etapa, cerca de 50g ou 50mL da amostra foram rapidamente pesadas e transferidas quantitativamente para o balão de destilação. Em seguida foram adicionados 90 mL de ácido clorídrico 4 mol L^{-1}. O manômetro de nitrogênio foi aberto, fazendo passar corrente a uma razão de gás a menor possível, de modo que houvesse pressão positiva no sistema. A manta aquecedora foi ligada e a ebulição no balão foi mantida por 120 minutos. Os frascos A e B foram retirados do conjunto de destilação. A solução do frasco B foi transferida para o frasco A, lavando com água bidestilada ou deionizada. 3 gotas do indicador vermelho de metila (0,2 % de solução de etanol) foram adicionadas, titulando-se com uma solução de hidróxido de sódio 0,05 mol L^{-1}. Foi feito um branco com 50 mL de água oxigenada a 3%, adicionadas 3 gotas do indicador e titulado com uma solução de hidróxido de sódio 0,05 mol L^{-1}.

c) Cálculo

$$\frac{(A - B) \times M \times 32{,}03 \times 10^3}{P} = SO_2 \text{ (ppm)}$$

Onde

A = nº de mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,05 mol L^{-1} gasto na titulação da amostra

B = nº de mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,05 mol L^{-1} gasto na prova em branco

M = molaridade da solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,05 mol L^{-1}

32,03 = peso miliequivalente do SO_2

10^3 = fator para conversão em ppm

P = peso da amostra, g

d) Aparato

- bureta de 10 mL
- circulador de água fria
- manta aquecedora
- cilindro de nitrogênio

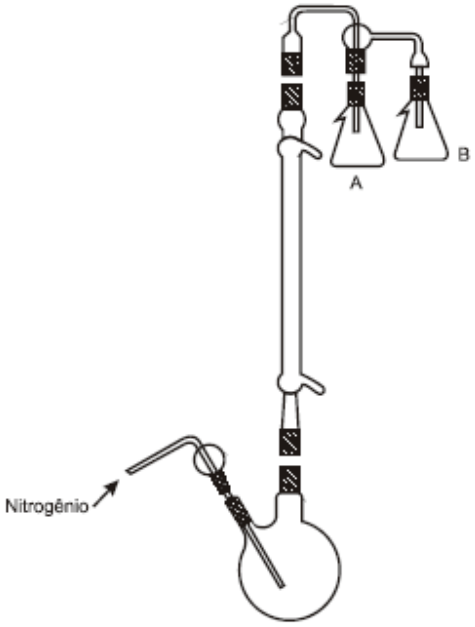


Figura 2 – Aparato de destilação: canal adaptador, funil separador, frasco redondo, tubo de gás, condensador, bulbo e receptor.
Fonte: IAL (1985).

e) Recuperação

Foram realizados testes de recuperação para avaliar a exatidão e a repetibilidade do método, utilizando-se fortificações com sulfitos na amostra inicial em concentrações padrão, utilizando os procedimentos metodológicos descritos anteriormente – itens a) a d).

4.5.2 Análise por injeção em fluxo (FIA) modificada

a) Reagentes

Ácido sulfúrico H_2SO_4 2,0 mol L^{-1}

Tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 6,8

KNO_3 0,2 mol L^{-1}

b) Procedimento

Todas as soluções foram preparadas com água Milli-Q water, R > 18 MΩ. A solução eletrolítica era uma solução 0,1 mol L^{-1} de tampão fosfato, pH 6,8. Uma solução de 0,05 mol L^{-1} de sulfito de sódio foi preparada pela dissolução do sal sólido em água previamente desaerada, por borbulhamento com nitrogênio, durante pelo menos 15 minutos. Esta solução foi titulada com KI/I_2 $2.5x10^{-3}$ mol L^{-1} e diluída com solução de eletrólito desaerada antes da sua utilização nas análises no sistema FIA. Os frascos das amostras de suco e água de coco foram abertos pouco antes do uso, em atmosfera de nitrogênio (inerte), para minimizar o contato com o oxigênio do ar.

Na célula FIA (Figura 3) foi efetuada a separação do sulfito da amostra real através de difusão gasosa e sua detecção amperométrica, utilizando-se um eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de porfirina tetrarutenada de ZnTRP/FeTPPS por montagem eletrostática, onde o ZnTRP era o $ZnTPyP\{Ru(bipy)_2Cl_4\}$ $(TFMS)_5 \cdot H_2O$ e o FeTPPS era a *meso*-tetra(4-sulfunatofenil)porfirinatoferrato(III). O equipamento era constituído de uma cela composta por três blocos cilíndricos, onde na interface entre o bloco superior e o do meio encontra-se uma membrana de Teflon® responsável pela separação por difusão gasosa. Na interface entre o bloco do meio e o inferior encontrava-se o eletrodo modificado responsável pela detecção.

A amostra real foi injetada num fluxo de solução de H_2SO_4 (2,0 mol L^{-1}) e transportada através da primeira parte do bloco (Figura 3A). O SO_3^{2-} em meio ácido era convertido em SO_2, o qual se difundia através da membrana de Teflon®. O caminho percorrido no separador consistia numa espiral (Figura 3B). Em fluxo com mesmo sentido, a solução carreadora eletrolítica (tampão fosfato, 0,1 mol L^{-1}, pH = 6,8, e KNO_3 0,2 mol L^{-1}) era transportada através da espiral e desce por um capilar até encontrar o eletrodo de carbono vítreo modificado com ZnTRP/FeTPPS. Um eletrodo de referência, constituído de $Ag/AgCl_{(KCl\ 1,0\ M)}$, foi montado no sistema através de um contato elétrico. O contra-eletrodo de aço inox foi montado na saída da solução para descarte (Figura 3C). O eletrodo de

trabalho era conectado ao carbono vítreo por meio de um fio de Platina (Pt) pressionado contra o eletrodo. Os fluxos do ácido sulfúrico e da solução eletrolítica foram mantidos o mais próximo possível e eram controlados pela mudança da altura do reservatório.

A influência do volume da amostra, do fluxo da solução e do potencial aplicado foi verificada e as melhores condições (alça de amostragem de 75 µL – volume da amostra injetado, controle de vazão de 1,5 mL min^{-1}, obtendo-se a freqüência superior a 60 determinações por hora, e E (potencial) = + 0,9 V *versus* Ag / AgCl) foram usadas em todos os experimentos.

c) Cálculo

Curva de calibração.

Para obter os teores de SO_2 contidos nas amostras, os valores obtidos nos gráficos foram corrigidos em função das diferentes diluições de cada tipo de suco.

d) Aparato

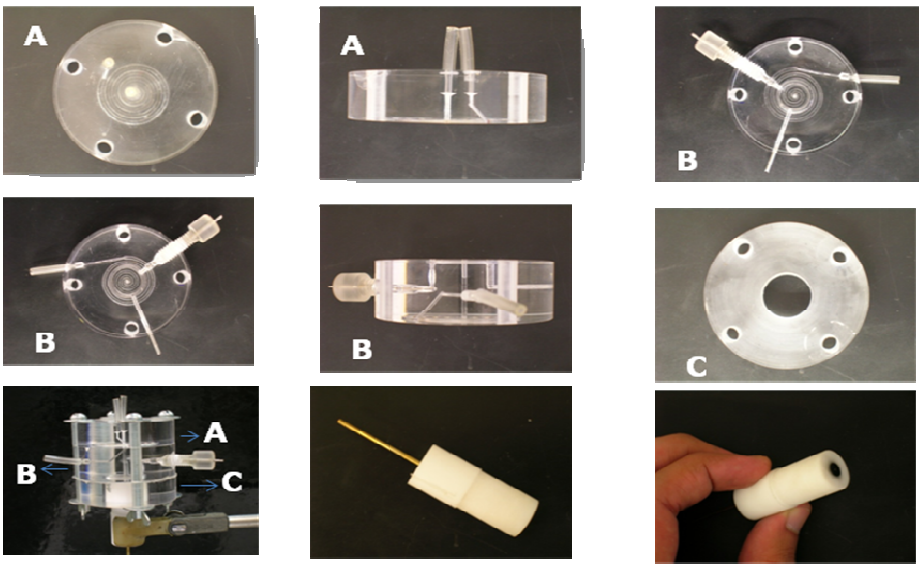


Figura 3 – Célula FIA (A, B e C) e eletrodo.

e) Recuperação

Realizada por meio de injeções consecutivas de amostras padrão, utilizando os procedimentos metodológicos descritos anteriormente – itens a) a d).

4.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada por programa estatístico específico para esse fim (OriginPro® 8.0), pelo Excel 2007 (Windows Vista) e Epi Info 3.5.1/2008.

A análise quantitativa dos alimentos levantados com o QFCA foi realizada por meio do Virtual Nutri (PHILIPPI, SZARFARC & LATTERZA, 1996) do Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública da USP. O programa também calculou o IMC (Índice de Massa Corporal), com base nas informações de peso e altura de cada escolar, estabelecendo a seguinte classificação: abaixo do peso – P5 (menor que 19,9), peso saudável – P5/P85 (20 a 24,9), sobrepeso – P85/P95 (25 a 29,9), obesidade – P95 (30 a 39,9) e obesidade mórbida – P95 (maior que 40).

Para a comparação da média de consumo de sulfitos e da IDA para sulfitos (valor de referência constante) foi aplicado o *t-test* de *Student*. Para testar a dependência entre variáveis numéricas e/ou categóricas, foi utilizada a regressão linear múltipla.

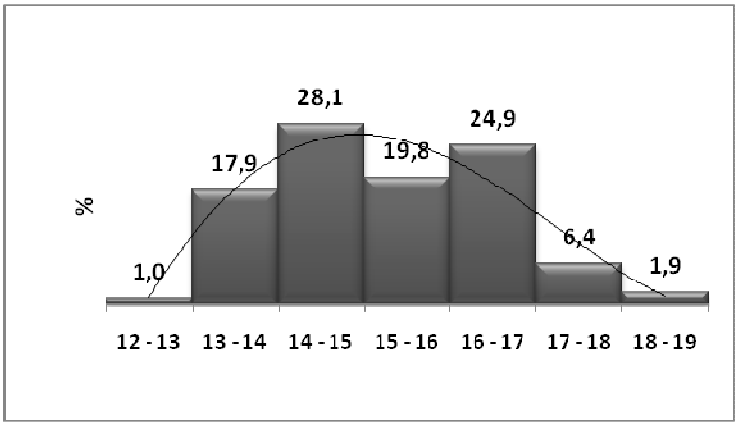
4.7 Considerações éticas

No Apêndice III encontra-se o termo de consentimento aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e que foi enviado às escolas no segundo semestre de 2006, e no Anexo III, a carta de autorização do Comitê de Ética em Pesquisa para realização deste projeto.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da população

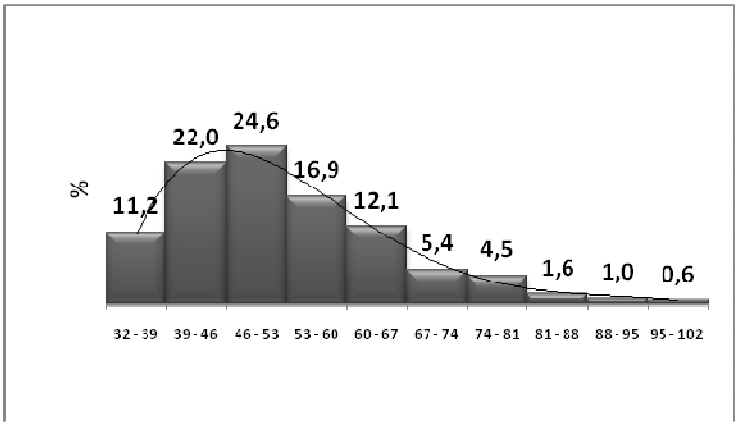
Foram pesquisados 313 escolares, sendo 178 do sexo feminino (56,9 %) e do sexo masculino 135 (43,1 %). Em relação à idade, a amostra foi composta por adolescentes entre 12 e 18 anos, com média de 14,8 anos (± 1,3 anos). Vide Figura 4.



Média = 14,8; mediana = 15,0; desvio padrão = 1,3; máximo = 18,0; mínimo = 12,0

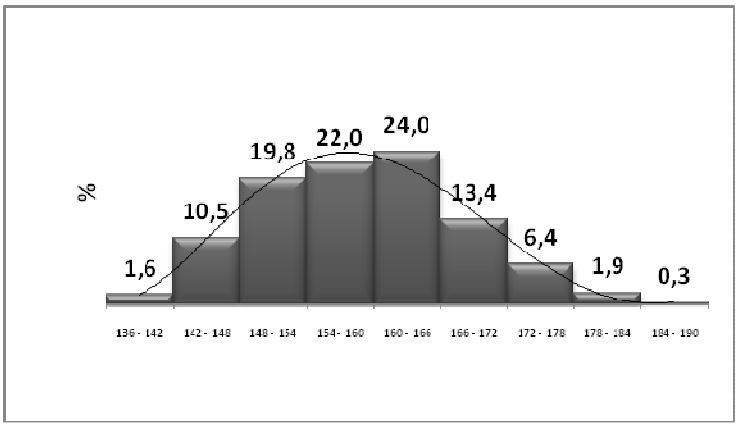
Figura 4 – Distribuição porcentual dos escolares do ensino fundamental de escolas públicas, em relação à idade (anos), São Caetano do Sul-SP, Brasil, 2007.

O peso dos escolares variou de 32 a 100 kg, com média de 52,4 kg (± 12,6 kg), enquanto a altura variou de 136 a 188 cm, com média de 158,3 cm (± 9,2 cm). Vide Figuras 5 e 6.



Média = 52,4; mediana = 50; desvio padrão = 12,6; máximo = 100,0; mínimo = 32,0

Figura 5 – Distribuição porcentual dos escolares do ensino fundamental de escolas públicas, em relação ao peso (kg), São Caetano do Sul-SP, Brasil, 2007.

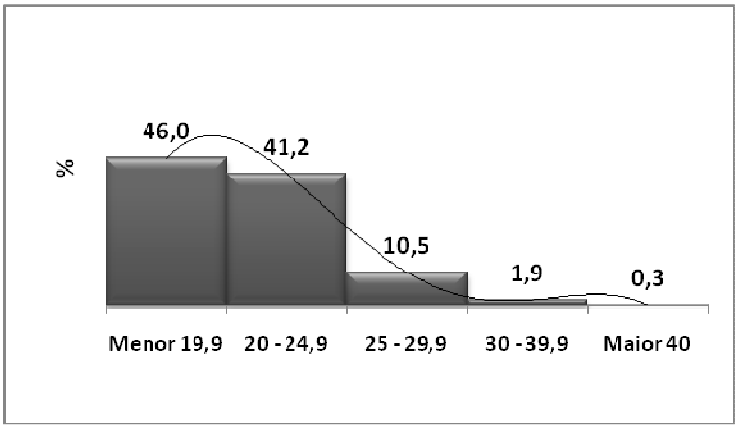


Média = 158,3; mediana = 158,0; desvio padrão = 9,2; máximo = 188,0; mínimo = 136,0

Figura 6 – Distribuição porcentual dos escolares do ensino fundamental de escolas públicas, em relação à altura (cm), São Caetano do Sul-SP, Brasil, 2006/2007.

Conforme demonstrado na Figura 7, a maior freqüência de distribuição do IMC também ocorreu dentro dos índices considerados normais (20 a 24,9 kg/m^2), ou seja, 41,2 % da amostra pesquisada no P5/P85, com média de 20,8 kg/m^2, variando de 14 a 47,6 kg/m^2. Nos extremos da distribuição, foi mais comum detectar escolares abaixo do peso (abaixo de 19,9 kg/m^2) do que acima do peso (sobrepeso ou obesidade, acima de 25 kg/m^2), respectivamente, 46,0 % e 12,7 %. Neste último caso, somente

2,2 % dos escolares apresentaram valores acima de 30 kg/m^2, considerados obesos (P95).



Média = 20,8; mediana = 20,1; desvio padrão = 4,0; máximo = 47,6; mínimo = 14,0

Figura 7 – Distribuição porcentual dos escolares do ensino fundamental de escolas públicas, em relação ao IMC (kg/m^2), São Caetano do Sul-SP, Brasil, 2007.

5.2. Local de consumo e compra de alimentos

O consumo de alimentos pelos escolares ocorre, quase sempre, em casa e na escola (68,7 %), mas ainda encontra-se um percentual significativo de alunos (31,3 %) que preferem consumir os alimentos somente em casa. Isto ocorre, pois os alunos moram próximos às escolas já que o Município de São Caetano é um município territorialmente pequeno, o que facilita o deslocamento casa-escola-casa. Não existe diferença para esta escolha entre os sexos.

As famílias normalmente adquirem os alimentos em supermercados (31,9 %) ou então associam as outras opções – feiras e sacolões (34,5 %), o que pode demonstrar certa preocupação quanto aquisição de alimentos *in natura*.

5.3 Conhecimentos sobre aditivos

Apesar de não ser possível relacionar o consumo de sulfitos com o aparecimento de reações alérgicas, nesse trabalho, os escolares foram questionados quanto à existência de reações alérgicas.

Mais de 50 % dos escolares pesquisados afirmaram possuir algum tipo de alergia, sendo mais comum as alunas (65,2 %) fazerem tal alegação que os alunos (49,6 %). As causas ou tipos de alergias mais alegadas foram: insetos (8,8 %), pó/poeira (35,1 %) e rinite (19,3 %). Somente um escolar alegou alergia a camarão e a outros alimentos, como chocolate, carne de porco e palmito, por exemplo. Contudo, não se observou a declaração de existência de algum tipo de alergia relacionada ao consumo de sulfitos.

Somente 4,2 % dos escolares sabiam o que eram aditivos, demonstrando desconhecimento quanto a sua importância para a indústria de alimentos. Em relação ao conhecimento dos sulfitos, este percentual se reduz, ou seja, 1,6 %.

Quanto ao conhecimento da função dos aditivos foram citadas aquelas mais diretamente relacionadas à conservação do alimento.

5.4 Consumo de alimentos sulfitados

Os alimentos, nos quais a legislação brasileira permite a adição de sulfitos, mais consumidos, considerando a freqüência de consumo, as porções consumidas e o tamanho da porção, foram: os néctares ou sucos de frutas (somente 8,3 % dos escolares pesquisados não os consumiram), o açúcar refinado, as batatas fritas congeladas, o coco ralado, o suco de caju e as frutas secas e cristalizadas, conforme demonstrado na Tabela 9.

Tabela 9 – Distribuição percentual dos principais parâmetros quanto a freqüência de consumo, porção consumida e tamanho da porção dos alimentos do Questionário de Freqüência de Consumo de Alimentos (QFCA).

Tipo de alimentos	Número de vezes consumido / %	Freqüência de consumo / %	Porção consumida / %	Tamanho porção / %
Açúcar refinado	Não/7,7 1X/24,9 2X/33,5 3X/14,7	Diário/72,7 Semanal/22,8	1 colher/48,8 2 colheres/33,6 3 colheres/9	Pequena/39,4 Média/52,2
Batata cozida industrializada	Não/57,8 1X/22,4 2X/10,5 3X/4,8	Semanal/59,1 Mensal/30,3	1 colher/29,5 2 colheres/15,2 1 porção/8,3	Pequena/45,5 Média/44,7
Batatas fritas congeladas	Não/10,2 1X/37,1 2X/28,1 3X/14,1	Semanal/44,1 Mensal/39,1	1 pacote/35,9 2 porção/19,2 1 prato/6,8	Pequena/22,1 Média/54,1 Grande/23,8
Camarões e lagostas	Não/50,2 1X/25,6 2X/8,9 3X/5,1	Mensal/47,4 Anual/41,7	1 porção/25,0 1 prato/12,2 1 colher/9,0	Pequena/42,9 Média/43,6
Coco ralado	Não/31,9 1X/31,9 2X/13,7 3X/11,2	Semanal/26,3 Mensal/58,6	1 colher/52,1 2 colher/8,9 3 colher/8,5	Pequena/52,6 Média/39,4
Cogumelos	Não/59,1 1X/17,3 2X/13,4 3X/5,1	Semanal/31,1 Mensal/58,6	1 colher/50,0 2 colher/23,4	Pequena/32,8 Média/56,3
Frutas secas e cristalizadas	Não/46,8 1X/23,1 2X/12,2 3X/7,7	Semanal/28,7 Mensal/42,5	1 colher/27,7 1 un/17,5 2 un/10,2	Pequena/39,2 Média/49,4
Geléias artificiais	Não/53,7 1X/24,6 2X/8,6 3X/5,4	Semanal/30,3 Mensal/42,1	1 colher/27,6 1 ponta faca/20,7 2 colher/9,7	Pequena/45,5 Média/42,8
Legumes e verduras desidratadas	Não/90,1 1X/5,4 2X/1,9 3X/1,3	Semanal/25,8 Mensal/61,3	1 colher/32,3 1 pacote/29,0	Pequena/64,5 Média/29,0
Leite de coco	Não/58,1 1X/18,8 2X/10,9 3X/5,8	Semanal/19,8 Mensal/60,3 Anual/19,8	1 colher/50,4 1 vidro/16,0 2 colher/13,0	Pequena/45,8 Média/43,5
Néctares ou sucos de frutas	Não/8,3 1X/20,1 2X/26,5 3X/15,7	Diário/42,9 Semanal/36,6	1 copo/51,6 2 copo/24,7 3 copo/3,8	Pequena/18,1 Média/61,7

cont. Tabela 9

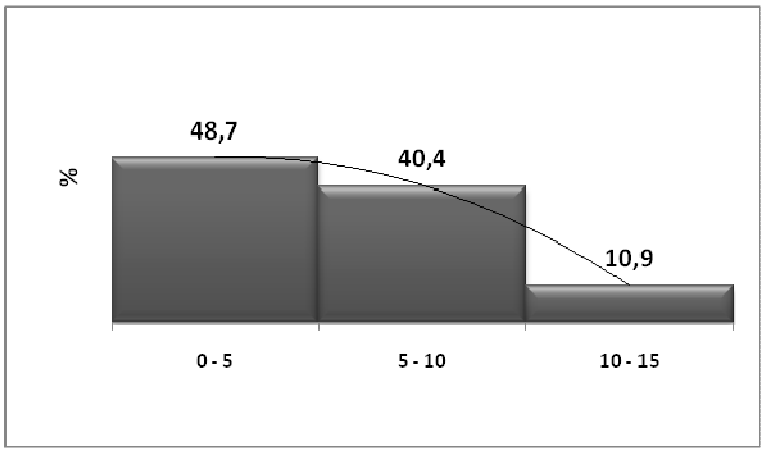
Tipo de alimentos	Número de vezes consumido / %	Freqüência de consumo / %	Porção consumida / %	Tamanho porção / %
Suco de caju	Não/45,7 1X/29,4 2X/9,9 3X/5,4	Semanal/45,9 Mensal/61,3	1 copo/62,4 2 copo/24,1 3 copo/3,5	Pequena/28,2 Média/54,1
Raiz-forte	Não/89,5 1X/7,0 2X/2,6 3X/0,3	Mensal/36,4 Anual/48,5	1 porção/84,8	Pequena/72,7 Média/21,2
Picles em conserva	Não/78,6 1X/10,5 2X/7,7 3X/1,0	Semanal/16,4 Mensal/65,7	1 colher/38,8 1 un/14,9 1 vidro/11,9	Pequena/50,7 Média/40,3
Xarope de glicose	Não/86,9 1X/8,6 2X/1,9 3X/1,6	Mensal/51,2 Anual/36,6	1 colher/63,4 1/2 colher/9,8	Pequena/56,1 Média/31,7

Em pesquisa anterior (POPOLIM & PENTEADO, 2005), com escolares, mas na faixa etária entre 14 e 19 anos, a fonte alimentar de sulfitos foi as bebidas não alcoólicas (sucos de frutas industrializados e similares, como néctares de frutas), consumidas por 81,8 % dos escolares que ingeriram alimentos sulfitados, com porcentual maior de consumidores de bebidas não alcoólicas na escola pública (94,3 %). Os alunos da escola particular consumiram maior variedade de fontes de sulfitos.

Várias pesquisas relatam fontes alimentares de sulfitos significativas na dieta dos indivíduos pesquisados. Soubra *et al*. (2006), nozes; Hardisson *et al*. (2002), camarão; Leclercq *et al*. (2000), frutas secas, bebidas carbonatadas, vinhos; Löwik *et al*. (1999), cerveja e bebidas carbonatadas; Verger *et al*. (1998), peixes e frutas secas; François-Collange *et al*. (1991), vinho, cerveja e sidra; Taylor & Bush, alface adicionada de sulfitos, batatas desidratadas (purê), camarão e vinho; Dokkum et al. (1982), carne, frango, ovo, açúcares e doces.

5.5 Ingestão de sulfitos e IDA

O consumo per capita diário de sulfitos teve maior freqüência de distribuição (48,7%) no intervalo de 0 a 5 mg SO_2, sendo a média de consumo de 6,0 mg SO_2, conforme demonstrado na Figura 9. Popolim & Penteado (2005) demonstraram, respectivamente, os seguintes valores, 23,9% e 3,8 mg SO_2. O aumento da quantidade de SO_2 consumida pode ser por conta da faixa etária e da diferença dos instrumentos de coleta, em 2005, R24, e em 2007, QFCA. Enquanto o primeiro obteve os alimentos consumidos no dia anterior (1 dia alimentar), o segundo foi estruturado somente com alimentos cuja legislação brasileira permite a adição de sulfitos, excluindo as bebidas alcoólicas.



Média = 6,0; mediana = 6,0; desvio padrão = 2,9; máximo = 15,0; mínimo = 0

Figura 8 – Distribuição porcentual dos escolares do ensino fundamental de escolas públicas, em relação ao consumo per capita diário de sulfitos (mg SO_2), São Caetano do Sul-SP, Brasil, 2007.

O valor máximo de SO_2 consumido não ultrapassou 15 mg já que não foram detectados grandes consumidores. Popolim & Penteado (2005) detectaram quantidade máxima de 30 mg e níveis de ingestão de até 0,52 mg SO_2/kg pc/dia devido a presença de grandes consumidores de sucos de frutas industrializados (mais de 500 mL/dia) ou, no caso da escola particular, por associar o seu consumo com bebidas alcoólicas como vinho e cerveja, o que não deve ser uma prática comum entre adolescentes devido à proibição da

venda/consumo de bebidas alcoólicas por menores de 18 anos, o que não foi observado na população deste estudo.

Machado, Toledo & Caroba (2007) em estudo com adolescentes de 11 a 17 anos relataram que a média de ingestão de sulfitos foi inferior a IDA. No entanto, as estimativas para o P95 indicam que o consumo de sucos contendo sulfitos numa concentração de 40 mg/L ou superior, como o de cereja, goiaba, manga, abacaxi, tomate, pode levar à ingestão do sulfito em níveis iguais ou superiores a IDA.

No Brasil, Yabiku *et al*. (1987) já haviam considerado que se uma criança pesando 40 kg, em época de muito calor, consumisse até 4 copos de suco de caju devidamente diluído (nível máximo encontrado de 1439 mg/kg, sete vezes acima do permitido), ela estaria ingerindo, aproximadamente, 80 mg SO_2 de dióxido de enxofre, valor muito acima do recomendado (28 mg SO_2, levando em conta a IDA de 0,7 mg SO_2/kg de peso corpóreo por dia).

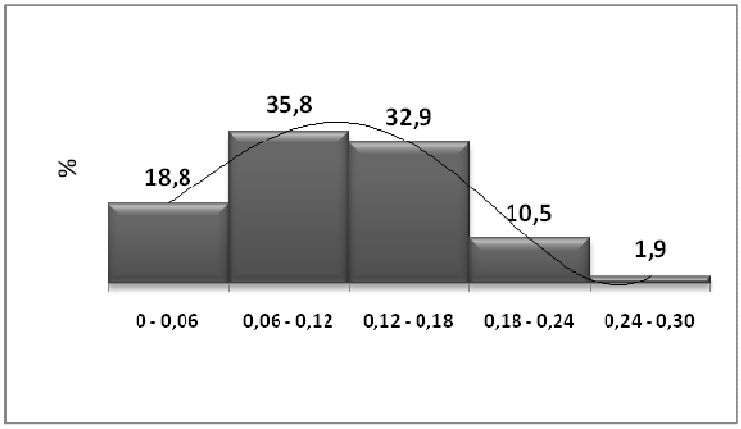
Fazendo cálculo semelhante com os dados de análise de sulfitos nos sucos, obtidos nesta pesquisa (item 5.6), e considerando o peso médio de 52,4 kg, o que corresponde ao consumo máximo de, aproximadamente, 37 mg SO_2/dia, pode-se aferir que para não ultrapassar a IDA:

1) para o suco de caju: consumo máximo de 6,5 copos de 200 mL;

2) para o suco de maracujá: consumo máximo de 3 copos de 200 mL.

Considerando o consumo médio diário de suco pelos indivíduos pesquisados, ou seja, 160 mL, os mesmos alcançariam, no máximo, 28,9 % da IDA, ou seja, 10,6 mg SO_2. Mesmo no P97,5 (312 ml de suco/dia), este percentual seria de 56 %.

Em relação ao consumo de SO_2, em mg/kg pc/dia, a maior freqüência de distribuição (35,8%) foi encontrada no intervalo de 0,06 a 0,12 mg SO_2/kg pc/dia (Figura 9), sendo o valor médio de consumo de 0,12 mg SO_2/kg pc/dia para a amostra pesquisada, que foi estatisticamente diferente (p<0,001) da IDA para sulfitos de 0,7 mg SO_2/kg pc/dia. Este valor médio corresponde a 17 % da IDA.



Média = 0,12 mediana = 0,11; desvio padrão = 0,06; máximo = 0,29; mínimo = 0

Figura 9 – Distribuição porcentual dos escolares do ensino fundamental de escolas públicas, em relação ao consumo de SO_2, em mg/kg pc/dia, São Caetano do Sul-SP, Brasil, 2007.

Na Tabela 10, Bemrah, Leblanc & Volatier (2008) apresentam comparativo entre as ingestões de sulfitos de diversos estudos, bem como os valores percentuais correspondentes a IDA, incluindo o estudo brasileiro realizado por Popolim & Penteado (2005). Apesar do valor de consumo de SO_2, em mg/kg pc/dia, desta pesquisa (0,12) ser superior ao obtido na pesquisa anterior (0,06), ambos permanecem bem distantes dos valores apresentados pelos estudos realizados em países como Itália e França, por conta, entre outros fatores, dos alimentos sulfitados consumidos nestes países.

Tabela 10 – Resultados comparativos de ingestão de sulfitos.

ESTUDOS	Média (mg kg^{-1} pc dia^{-1})	% IDA (0,7 mg kg^{-1} pc dia^{-1})
França (MARESCHI, FRANÇOIS-COLLANGE & SUSCHETET, 1992): método segmentado, sem consumidores de bebidas alcoólicas	0,033	4,7
Brasil (POPOLIM & PENTEADO, 2005): escolares	0,06	9,0
França: crianças cenário 1/2	0,102/0,249	14,6/35,6
França: adultos cenário ½	0,199/0,274	28,4/39,1
França (MARESCHI, FRANÇOIS-COLLANGE & SUSCHETET, 1992): método global	0,33	47,6
Líbano (SOUBRA *et al*., 2007)	0,400	57,1
França (MARESCHI, FRANÇOIS-COLLANGE & SUSCHETET, 1992): método segmentado, consumidores de bebidas alcoólicas médios	0,525	75,0
Itália (LECLERCQ *et al*., 2000*): crianças considerando dados analíticos	0,780	111,4
Itália (LECLERCQ *et al*., 2000*): adultos considerando dados analíticos	0,838	119,4
França (VERGER *et al*., 1998): média sem correção / média corrigida	1,340/0,970	191,4/138,6
Itália (LECLERCQ *et al*., 2000*): adultos considerando LMP	2,057	293,8
Itália (LECLERCQ *et al*., 2000*): crianças considerando LMP	2,278	325,4

*: A mesma combinação de refeições foi usada para calcular a ingestão considerando LMP e dados analíticos.

IDA = Ingestão Diária Aceitável

MPL = *Maximum Permitted Level* ou Limite Máximo Permitido (LMP)

Fonte: Bemrah, Leblanc & Volatier (2008)

5.6 Análise quantitativa de sucos de frutas

Existem vários estudos científicos para determinação de sulfitos em alimentos utilizando metodologias diversas, e entre os resultados obtidos há muita variabilidade (BENDTSEN & JORGENSEN, 1994; DANIELS *et al*., 1992; FAZIO & WARNER, 1990; HILLERY *et al*., 1989; SULLIVAN *et al*., 1986).

A busca por métodos adequados que possam ser utilizados para medir as concentrações de espécies que podem estar inequivocamente correlacionadas com a quantidade de enxofre adicionada já acontece há

décadas. Isto não significa que todas as espécies em equilíbrio, produtos e subprodutos resultantes da utilização de sulfito devem ser medidas, mas as quantidades das principais espécies que podem estar correlacionadas, de forma inequívoca, com aquelas quantidades realmente adicionadas (FERRARINI *et al*., 2000; AZEVEDO *et al*., 1999; MODDERMAN, 1986). O método padrão para a determinação da quantidade total de dióxido de enxofre é o método M-W (COKER, 1986; MODDERMAN, 1986; BARNETT, 1985) e, conseqüentemente, todos os métodos alternativos devem ser validados em comparação com o mesmo.

A análise por injeção em fluxo é um método de grande interesse, pois permite uma análise química rápida e conveniente, utilizando pequenas quantidades de amostras, além de permitir acompanhamento contínuo, por exemplo, em uma unidade de produção industrial. A detecção pode ser realizada utilizando vários métodos como o espectrofotométrico, a luminescência, a condutividade e o amperométrico. A detecção amperométrica de sulfitos foi escolhida já que eles podem ser facilmente oxidados sobre a superfície de eletrodos modificados com materiais especialmente desenvolvidos e nanomateriais. No entanto, os alimentos são misturas complexas de vários componentes potencialmente interferentes, de tal forma que sensores com alta seletividade e especificidade devem ser desenvolvidos, a fim de evitar possíveis erros na análise. Considerando os métodos amperométricos, os principais interferentes são espécies com características semelhantes ou com potencial redox menor do que aquele utilizado para a análise, porque eles estão propensos a oxidação simultânea de substâncias indesejáveis. Além disso, existem várias espécies que podem adsorver ou reagir com a superfície do eletrodo levando ao seu envenenamento e / ou inativação.

Os sulfitos podem ser facilmente convertidos para SO_2 gasoso, o que permite sua separação utilizando membrana semipermeável, seguida de seu recolhimento em outra solução. Na realidade, o processo demandado pelo método M-W é baseado em uma seqüência de processos similares (destilação /

adsorção). No entanto, o processo de difusão / recolhimento pode ser convenientemente realizado em segundos numa célula de difusão gasosa a temperatura ambiente. De fato, um sensor FIA com uma célula de difusão gasosa integrada com alta sensibilidade e reprodutibilidade para análises de sulfitos foi previamente demonstrada por Azevedo *et al*. (1999) e Winnischofer (2004). O sensor empregado no presente trabalho é uma evolução da versão anterior, em que os canais e a configuração do eletrodo foram otimizados para minimizar o comprimento, o tamanho e o tempo de repetição, a fim de maximizar a produtividade (uma análise por minuto), a reprodutibilidade e a sensibilidade das medições, que podem ir até cerca de 0,1 ppm, como já apontado por Sullivan *et al*. (1986).

No presente estudo, nenhuma amostra apresentou níveis acima dos preconizados pela legislação brasileira (0,02 g SO_2 residual/100mL, inclusive as amostras de suco de caju com alto teor de polpa (diluição 1:9), cujo limite máximo permitido é de 0,30 g SO_2 residual/100mL, conforme já apontado por estudo recente realizado por Machado *et al*. (2008). Contudo, observaram-se divergências de resultados entre os métodos por conta de influência da matriz, contato da amostra com o oxigênio do ar, apesar dos cuidados preconizados pelos métodos. Os resultados estão demonstrados nas Tabelas 11 e 12.

Tabela 11 – Resultados das determinações de sulfitos (mg SO_2/L) pelo método Monier-Williams (M-W) otimizado em amostras de sucos de frutas concentrados das marcas A, B e C e em água de coco das marcas D e E.

Tipos de suco / marcas	Faixa de concentração (mg SO_2/L)	Média (mg SO_2/L) (±DP*)	CV** (%)	Recuperação relativa média (%)
Suco de caju				
A	276,0–277,3	276,7 (±0,9)	0,3	–
B	193,9–202,1	198,4 (±4,1)	2,1	–
C	195,3–200,8	198,1 (±3,9)	2,0	101,3
Suco de maracujá				
A	130,9–133,6	132,4 (±1,4)	1,0	101,3
B	108,4–116,0	112,2 (±5,4)	4,8	–
C	121,5–121,8	121,7 (±0,2)	0,2	–
Suco de uva				
A	< LQ***	–	–	–
B	< LQ***	–	–	101,2
C	10,2–10,9	10,4 (±0,4)	3,9	–
Água de coco				
D	60,7–64,1	62,4 (±2,4)	3,9	–
E	46,7–48,8	47,9 (±1,1)	2,2	101,1

*: DP = desvio padrão

**: CV = coeficiente de variação

***: < LQ = abaixo do limite de quantificação (10 mg SO_2/L)

n = 1 amostra de cada substrato analisada em triplicata

Tabela 12 – Resultados das determinações de sulfitos (mg SO_2/L) pelo método de análise por injeção em fluxo (FIA) em amostras de sucos de frutas concentrados das marcas A, B e C e em água de coco das marcas D e E.

Tipos de suco / marcas	Faixa de concentração (mg SO_2/L)	Média (mg SO_2/L) (±DP*)	CV** (%)
Suco de caju			
A	195,8–200,4	198,1 (±2,3)	1,1
B	212,2–215,6	214,4 (±2,0)	0,9
C	196,9–202,5	199,0 (±3,0)	1,5
Suco de maracujá			
A	72,7–74,9	74,1 (±1,2)	1,6
B	69,3–70,6	69,9 (±0,7)	1,0
C	84,6–87,1	86,0 (±1,3)	1,5
Suco de uva			
A	0,0	0,0	–
B	0,0	0,0	–
C	14,2–15,0	14,5 (±0,4)	2,9
Água de coco			
D	81,1–84,7	82,9 (±1,8)	2,2
E	58,1–58,9	58,6 (±0,4)	0,7

*: DP = desvio padrão

**: CV = coeficiente de variação

n = 1 amostra de cada substrato analisada em triplicata

Na maior parte das comparações, o coeficiente de variação do método FIA foi menor que o método M-W, demonstrando sua maior reprodutibilidade.

O cálculo da razão entre as médias dos resultados obtidos pelos métodos FIA e M-W (Tabela 13) demonstra uma nítida influência da matriz nos seguintes tipos de sucos: caju (marca A) e maracujá (todas as marcas). A influência da acidez e de diversos outros fatores, como qualidade da fruta, tipo da fruta, ácidos fenólicos, antioxidantes, adição de nutrientes, tratamento do suco por pectinase, efeito da concentração já foram apontados em estudo realizado por Jarvis & Lea (2000), além de fatores e situações diversas relatadas por outros estudos (SCOTTER & CASTLE, 2004; DAVIES & WEDZICHA, 1992; GODDARD & WEDZICHA, 1992; SWALES & WEDZICHA,

1992; WEDZICHA, 1992; FAZIO & WARNER, 1990; HILLERY *et al*., 1989; BARNETT, 1985).

Tabela 13 – Comparação entre as médias (razão) dos resultados das determinações de sulfitos (mg SO_2/L) pelos métodos M-W e FIA em sucos de frutas concentrados.

Tipos de suco / marcas	Média (mg SO_2/L ou ppm)		FIA / M-W
	M-W	FIA	
Suco de caju			
A	276,7	198,1	0,7
B	198,4	214,4	1,1
C	198,1	199,0	1,0
Suco de maracujá			
A	132,4	74,1	0,6
B	112,2	69,9	0,6
C	121,7	86,0	0,7
Suco de uva			
A	0,0	0,0	-
B	0,0	0,0	-
C	10,4	14,5	1,4
Água de coco			
D	62,4	82,9	1,3
E	47,9	58,6	1,2

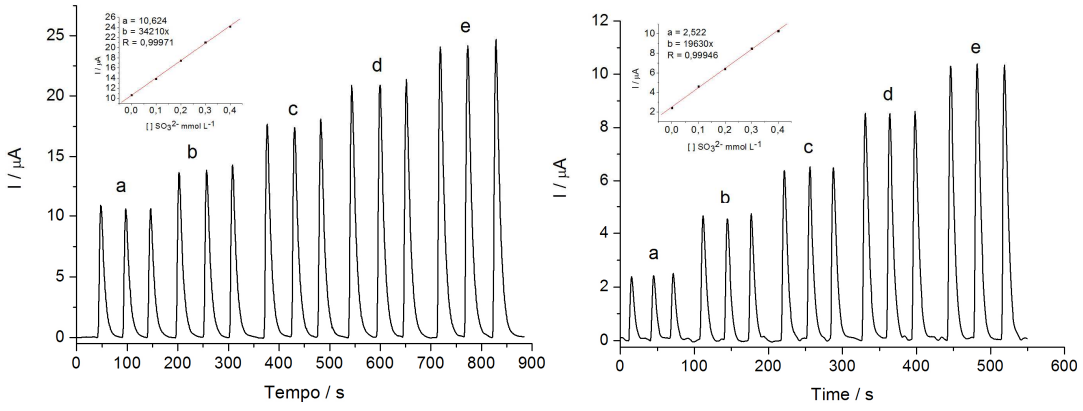
Nos sucos de frutas analisados, perceberam-se diferenças na sua composição, conforme apresentado na Tabela 14, podendo ser um dos fatores de variação dos resultados. Em relação a este aspecto, observa-se, também, uma queda nos níveis de sulfitos utilizados pela indústria (duas marcas de suco de uva não declaram o sulfito na rotulagem e os mesmos não foram detectados pelas análises, ou estavam abaixo do limite de quantificação no caso do M-W), bem como a associação com outros aditivos, como o conservador benzoato de sódio.

Tabela 14 – Diferenças de composição, quanto à presença de aditivos, entre os sucos de frutas e água de coco analisados.

Marcas	Suco de uva	Suco de caju	Suco de maracujá
A	acidulante ácido cítrico conservador benzoato de sódio aroma natural	acidulante ácido cítrico estabilizante carboximetilcelulose sódica conservadores benzoato de sódio e metabissulfito de sódio	conservadores benzoato de sódio e metabissulfito de sódio acidulante ácido cítrico
B	conservador benzoato de sódio	estabilizante goma xantana conservadores benzoato de sódio e anidrido sulfuroso acidulante ácido cítrico	conservadores benzoato de sódio e anidrido sulfuroso estabilizante pectina cítrica
C	conservadores benzoato de sódio e metabissulfito de sódio	aroma natural acidulante ácido cítrico estabilizante goma xantana conservadores benzoato de sódio e metabissulfito de sódio	conservadores benzoato de sódio e metabissulfito de sódio corante beta-caroteno sintético
	Água de coco		
D e E	conservador metabissulfito de sódio		

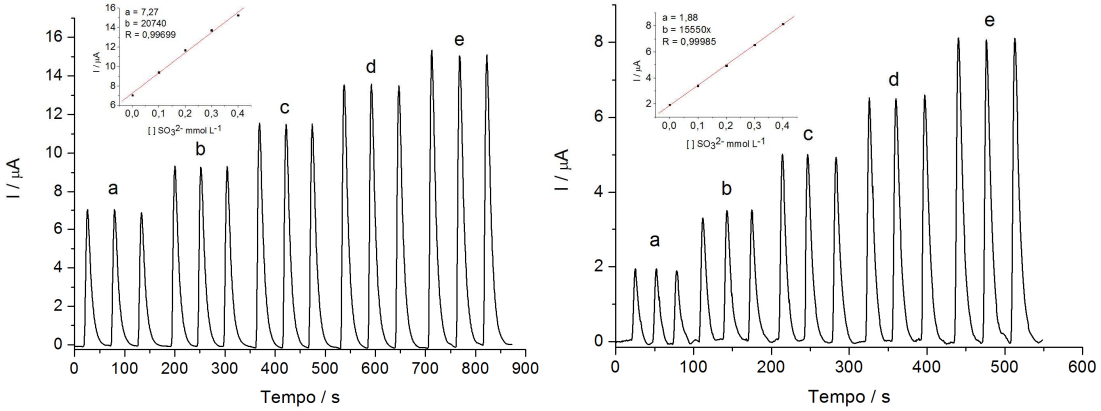
Existe uma diferença significativa de tempo para realização da análise entre o M-W e o FIA. Enquanto o primeiro leva, em média, 2 horas, o segundo dura aproximadamente 60 segundos, o que já é apontado por vários estudos que utilizaram e discutem os dois métodos (BENDTSEN & JORGENSEN, 1994; DANIELS *et al*., 1992; FAZIO & WARNER, 1990; HILLERY *et al*., 1989; SULLIVAN *et al*., 1986). Este fato é de suma importância para que a quantidade de sulfito real da amostra seja preservada durante os procedimentos de análise específicos de cada método. Quase sempre os resultados obtidos pelo FIA são maiores que aqueles obtidos pelo M-W, como no suco de caju (marca B), suco de uva (marca C) e água de coco (marcas D e E).

A seguir são apresentados (Figuras 10 a 14) os fiagramas das injeções das amostras de sucos concentrados e água de coco no sistema FIA, com respostas bastante satisfatórias.



A) **B)**

Figura 10 – Análise por injeção em fluxo utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de porfirina tetrarutenada de ZnTRP/FeTPPS. Injeções consecutivas de amostras (a) do suco concentrado da marca A (sabores caju, A, e maracujá, B) e de soluções contendo adições de sulfito de 1 x 10^{-4} (b), 2 x 10^{-4} (c), 3 x 10^{-4} (c) e 4 x 10^{-4} (d) mol L^{-1}. E = + 0,90 V, eletrólito = tampão fosfato (0,1 mol L^{-1}) pH 6,8 e KNO3 0,2 mol L^{-1}, carregador = H_2SO_4 2,0 mol L^{-1}. Volume da amostra injetado = 75 µL e vazões de 1,5 mL min^{-1}. Comprimento das bobinas = 20 cm (ø = 0,7 mm).



A) **B)**

Figura 11 – Análise por injeção em fluxo utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de porfirina tetrarutenada de ZnTRP/FeTPPS. Injeções consecutivas de amostras (a) do suco concentrado da marca B (sabores caju, A, e maracujá, B) e de soluções contendo adições de sulfito de 1 x 10^{-4} (b), 2 x 10^{-4} (c), 3 x 10^{-4} (c) e 4 x 10^{-4} (d) mol L^{-1}. E = + 0,90 V, eletrólito = tampão fosfato (0,1 mol L^{-1}) pH 6,8 e KNO3 0,2 mol L^{-1}, carregador = H_2SO_4 2,0 mol L^{-1}. Volume da amostra injetado = 75 µL e vazões de 1,5 mL min^{-1}. Comprimento das bobinas = 20 cm (ø = 0,7 mm).

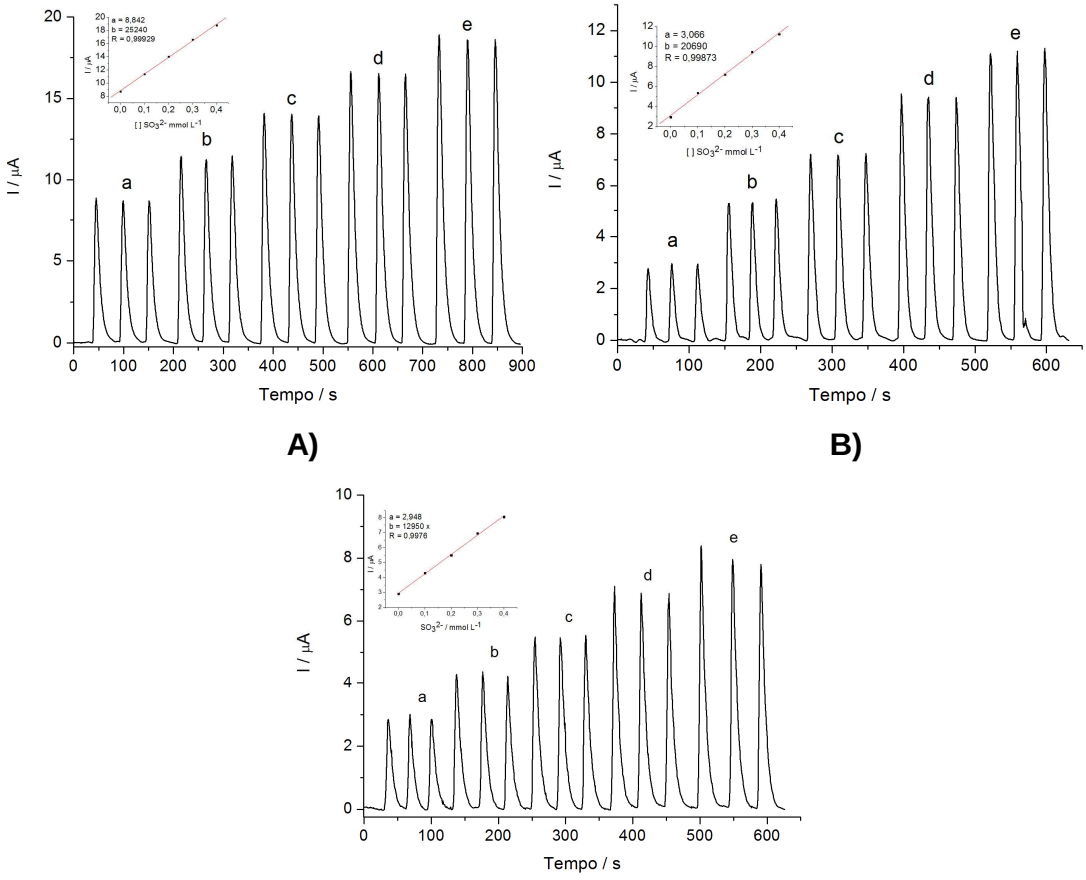


Figura 12 – Análise por injeção em fluxo utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de porfirina tetrarutenada de ZnTRP/FeTPPS. Injeções consecutivas de amostras (a) do suco concentrado da marca C (sabores caju, A, maracujá, B, e uva, C) e de soluções contendo adições de sulfito de 1 x 10^{-4} (b), 2 x 10^{-4} (c), 3 x 10^{-4} (c) e 4 x 10^{-4} (d) mol L^{-1}. E = + 0,90 V, eletrólito = tampão fosfato (0,1 mol L^{-1}) pH 6,8 e KNO3 0,2 mol L^{-1}, carregador = H_2SO_4 2,0 mol L^{-1}. Volume da amostra injetado = 75 µL e vazões de 1,5 mL min^{-1}. Comprimento das bobinas = 20 cm (ø = 0,7 mm).

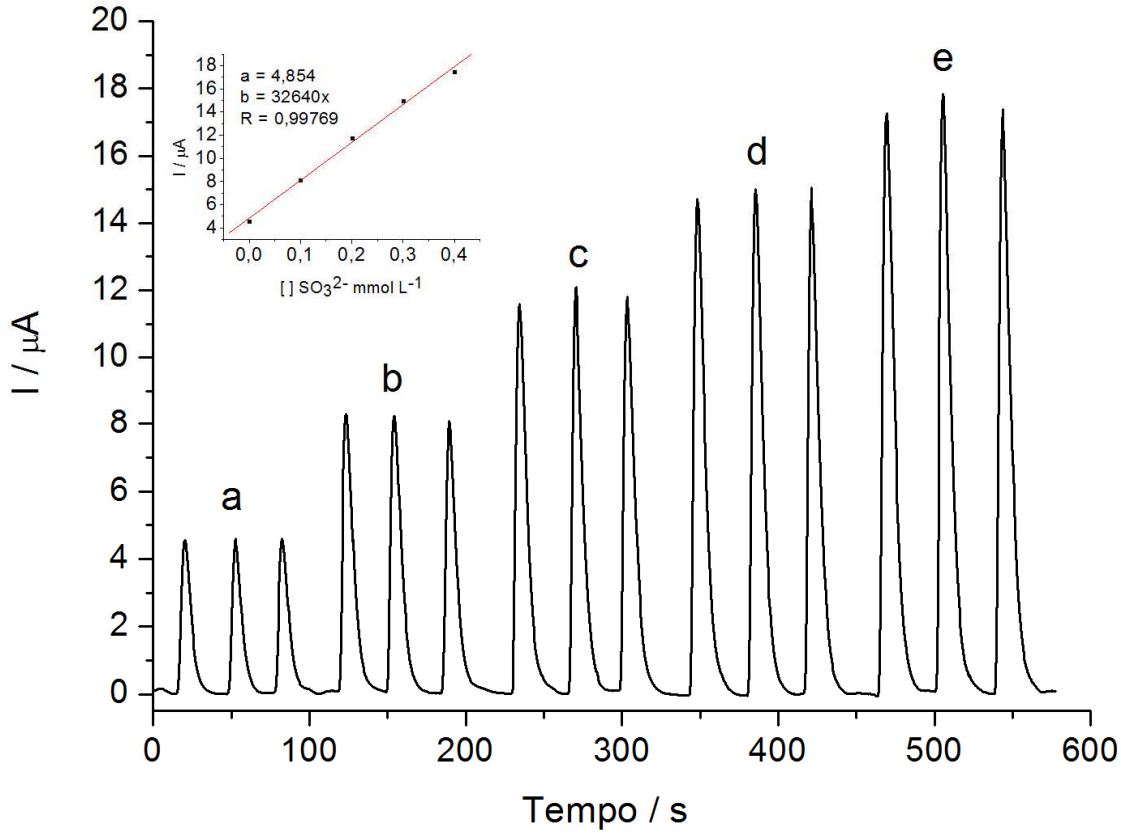


Figura 13 – Análise por injeção em fluxo utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de porfirina tetrarutenada de ZnTRP/FeTPPS. Injeções consecutivas de amostras (a) da água de coco da marca D e de soluções contendo adições de sulfito de 1 x 10^{-4} (b), 2 x 10^{-4} (c), 3 x 10^{-4} (c) e 4 x 10^{-4} (d) mol L^{-1}. E = + 0,90 V, eletrólito = tampão fosfato (0,1 mol L^{-1}) pH 6,8 e KNO3 0,2 mol L^{-1}, carregador = H_2SO_4 2,0 mol L^{-1}. Volume da amostra injetado = 75 µL e vazões de 1,5 mL min^{-1}. Comprimento das bobinas = 20 cm (ø = 0,7 mm).

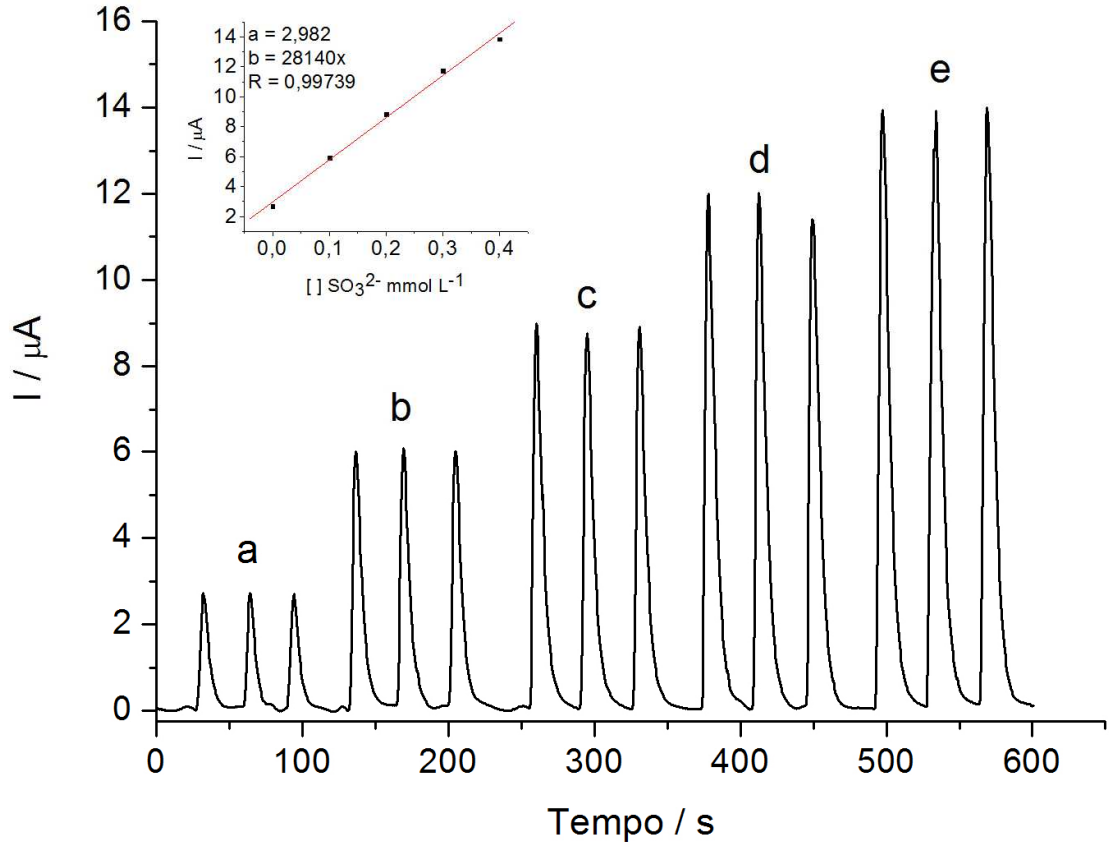


Figura 14 – Análise por injeção em fluxo utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de porfirina tetrarutenada de ZnTRP/FeTPPS. Injeções consecutivas de amostras (a) da água de coco da marca E e de soluções contendo adições de sulfito de 1 x 10^{-4} (b), 2 x 10^{-4} (c), 3 x 10^{-4} (c) e 4 x 10^{-4} (d) mol L^{-1}. E = + 0,90 V, eletrólito = tampão fosfato (0,1 mol L^{-1}) pH 6,8 e KNO3 0,2 mol L^{-1}, carregador = H_2SO_4 2,0 mol L^{-1}. Volume da amostra injetado = 75 µL e vazões de 1,5 mL min^{-1}. Comprimento das bobinas = 20 cm (ø = 0,7 mm).

A dinâmica da célula do FIA foi testada com o uso de amostras padrões de sulfito de sódio com concentrações de 0 a 16 ppm SO_2. Foi obtida uma correlação linear (R^2 = 0,998) positiva em todos os níveis de concentrações, em particular no intervalo de 0 a 6,4 ppm. Como pode ser observado na Figura 15, a relação sinal-ruído obtida até 0,64 ppm de SO_2 foi muito boa, indicando que o sistema FIA tem um limite muito menor detecção que o M-W. Na verdade, ele foi estimado em 0,2 ppm de SO_2 nas condições experimentais empregadas, a

partir da análise da relação da corrente *versus* concentração de sulfito, utilizando a equação 1,

$$\zeta = 3(sda)/b, \qquad \text{Eq.1}$$

onde *sda* é o desvio padrão para o intercepto e *b* é o declive.

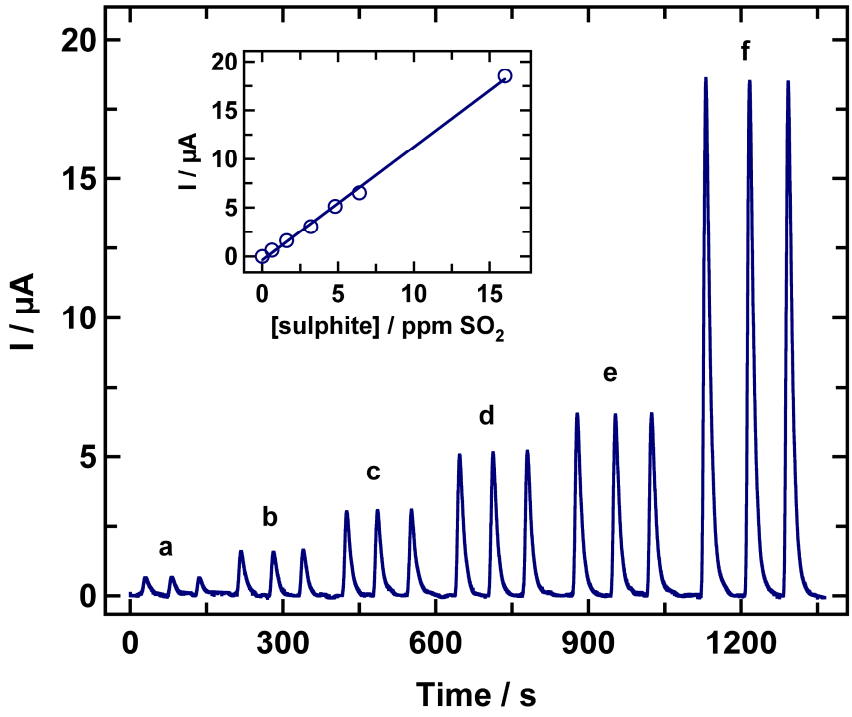


Figura 15 – Fiagrama para soluções de sulfito de sódio em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1}, pH = 6,8, com as seguintes concentrações: (a) 0,64; (b) 1,6; (c) 3,2; (d) 4,8; (e) 6,4 e (f) 16 ppm SO_2.

Experimentos de recuperação também foram realizados utilizando amostras sintéticas preparadas por dissolução de sulfito de sódio na solução eletrolítica desaerada. Em todos os casos, foi obtida aproximadamente 100% de recuperação, demonstrando a validade da análise por injeção em fluxo pelo método amperométrico, utilizando o sistema integrado de detecção, baseado

em eletrodos de carbono vítreo e modificado com filme de porfirina supramolecular.

A validade do método para análise de amostras reais foi testada utilizando os sucos de caju, uva e maracujá e água de coco, conforme os resultados apresentados anteriormente. O método de adição padrão é comumente utilizado como um método analítico baseado na medição do sinal da amostra, em comparação com a resposta para a amostra fortificada com quantidades conhecidas da substância a analisar, como o sulfito. Como observado na Figura 16, as medições têm boa reprodutibilidade, como ocorreu com o suco de caju concentrado diluído (1:10 v / v) com solução de eletrólito desaerada.

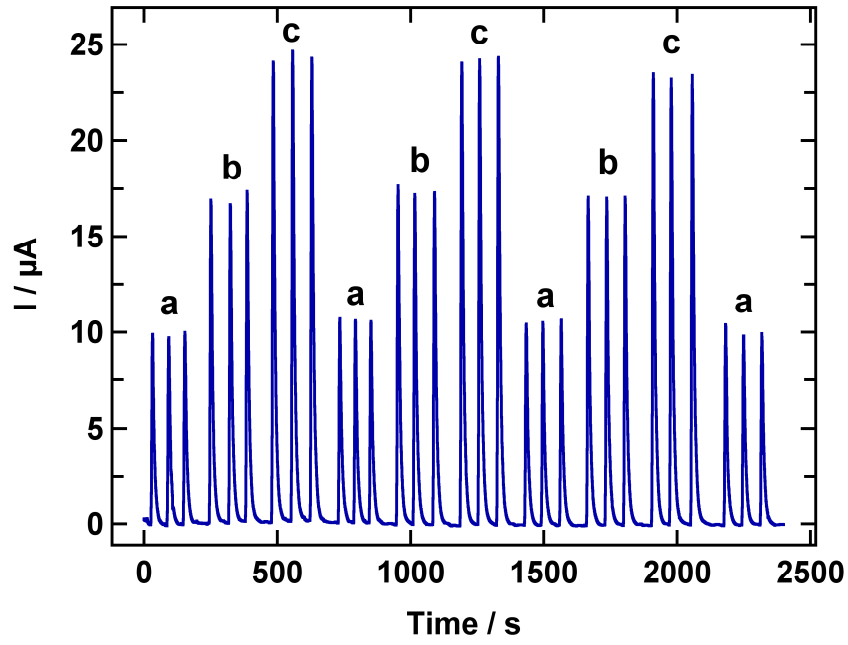


Figura 16 – Fiagrama para dez injeções de suco de caju (a) e de soluções fortificadas com sulfito de sódio, nas seguintes concentrações: 6,4 (b) e 12,8 ppm SO_2 (c).

6 CONCLUSÕES

Pelo exposto, pode-se concluir que:

- o alimento sulfitado mais consumidos foi os néctares ou sucos de frutas;

- o consumo médio per capita diário de sulfitos foi de 6,0 mg SO_2;

- em relação ao consumo de SO_2, mg SO_2/kg pc/dia, o valor médio foi de 0,12 mg SO_2/kg pc/dia, estatisticamente diferente (p<0,001) da IDA para sulfitos de 0,7 mg SO_2/kg pc/dia. Este valor médio corresponde a 17% da IDA;

- o analisador por injeção em fluxo apresentou sensibilidade e precisão similar a do método tradicional, o M-W, sendo muito mais rápido e econômico no consumo de materiais, podendo ser usado para o monitoramento de sulfito em uma ampla faixa de concentrações, compatível com a encontrada em alimentos. Além disso, as análises em fluxo minimizam a manipulação das amostras, a influência do operador e o contato com o ar, diminuindo a possibilidade de contaminações e reação com o O_2. Este último fator é mais relevante para amostras com concentrações do aditivo relativamente baixas (inferiores a cerca de 50 ppm);

- nenhuma amostra apresentou sulfitos acima dos limites máximos permitidos pela legislação brasileira para sucos de frutas, ou seja, 0,02 g/L (expresso em SO_2 residual), inclusive as amostras de suco de caju alto teor de polpa (diluição 1:9), cujo limite máximo permitido é de 0,30 g/L (expresso em SO_2 residual), indicando, portanto, que as empresas estão utilizando as quantidades de sulfitos de acordo com as BPF.

7 RECOMENDAÇÕES

Considerando que o objetivo para a regulamentação dos sulfitos (e dos outros aditivos) é a proteção dos indivíduos sensíveis, já é consenso de que estes, nos limites atualmente preconizados, não representam risco a maioria dos consumidores; considerando que embora existam evidências de que a exposição contínua de indivíduos sensíveis pode causar graus razoáveis de sensibilidade, e considerando que não há informações suficientes sobre os riscos causados especificamente por cada tipo de alimento ou aqueles associados às formas livres e combinadas de sulfitos e sobre os mecanismos de sensibilidade aos sulfitos, recomenda-se a realização de estudos com outros grupos populacionais, associando dados de consumo, dados analíticos e dados da quantidade de aditivos efetivamente utilizada pela indústria alimentícia.

Sugere-se ainda a criação de um banco de dados com as concentrações de sulfitos em diversos tipos de alimentos, aproveitando os inúmeros trabalhos realizados para sua detecção. Contudo, devem ser considerados os diferentes métodos e protocolos de análises utilizados, alimentos específicos de determinadas regiões nas quais os trabalhos foram realizados, entre outros fatores tais como a reprodutibilidade dos resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, C.; WARNER, C.R.; DANIELS, D.H.; PADGETT, K.L. Ion chromatographic determination of sulfites in foods. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, Washington, v.69, n.1, p.14-19, 1986.

ANDERSON, D.L.; CUNNINGHAM, W.C.; LINDSTROM, T.R. Concentrations and intakes of H, B, S, K, Na, Cl, and NaCl in foods. **J. Food Compos. Anal.**, Sidcup, v.7, n.1/2, p.59-82, 1994.

ARAKI, K.; ANGNES, L.; AZEVEDO, C.M.N.; TOMA, H.E. Electrochemistry of a tetraruthenated cobalt porphyrin and its use in modified electrodes as sensors of reducing analytes. **J. Electroanalytical Chem.**, v.397, p.205-210, 1995.

ARMENTIA-ALVAREZ, A.; FERNANDEZ-CASERO, A.; GARCIA-MORENO, C.; PEÑA-EGIDO, M.J. Residual levels of free and total sulphite in fresh and cooked burgers. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.10, n.2, p.157-165, 1993.

ARMENTIA-ALVAREZ, A.; PEÑA-EGIDO, M.J.; GARCIA-MORENO, C. Improved method for determination of sulfites in shrimp. **J. AOAC Int.**, Gaithersburg, v.76, n.3, p.565-569, 1993.

ABIA – Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação; compilador Léo F. Bick. **Compêndio da legislação de alimentos: consolidação das normas e padrões de alimentos**. São Paulo: ABIA, 2001.

AOAC – Association Official Analytical Chemistry International. **AOAC official methods of analysis**. 16.ed. Arlington: AOAC International, 1995. p.27-29.

AOAC – Association Official Analytical Chemistry International. **AOAC official methods of analysis**. Arlington: AOAC International, 2006. p.28-34.

AZEVEDO, C.M.N. **Desenvolvimento de eletrodos modificados e métodos analíticos**. São Paulo, 1999. 119p. Tese de Doutorado – Instituto de Química – Universidade de São Paulo.

AZEVEDO, C.M.N.; ARAKI, K.; ANGNES, L.; TOMA, H.E. Electrostatically assembled films for improving the properties of tetraruthenated porphyrin modified electrodes. **Electroanalysis**, Weinheim, v.10, n.7, p.467-471, 1998.

AZEVEDO, C.M.N.; ARAKI, K.; TOMA, H.E.; ANGNES, L. Determination of sulfur dioxide in wines by gas-diffusion flow injection analysis utilizing modified electrodes with electrostatically assembled films of tetraruthenated porphyrin. **Anal. Chim. Acta**, Orlando, v.387, p.175-180, 1999.

BARNETT, D. Sulphites in foods: their chemistry and analysis. **Food Technol. Aust.**, Sydney, v.37, n.11, p.503-505, 1985.

BAUNWART, G.C.M.C.; TOLEDO, M.C.F. Estimates of the theoretical maximum daily intake of phemolic antioxidants BHA, BHT and TBHQ in Brazil. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.18, n.5, p.365-373, 2001.

BEATON, G.H. Approaches to analysis of dietary data: relationship between planned analyses and choice of methodology. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.59, suppl.1, p.253-261, 1994.

BEATON, G.H.; BUREMA, J.; RITENBAUGH, C. Errors in the interpretation of dietary assessments. **Am. J. Clin. Nutr,** Bethesda, v.65, p.1100S-1107S, 1997.

BEATON, G.H.; MILNER, J.; COREY, P.; McGUIRE, V.; COUSINS, M.; STEWART, E.; RAMOS, M.; HEWITT, D.; GRAMBSCH, P.V.; KASSIM, N.; LITTLE, J.A. Sources of variance in 24-hour dietary recall data: implications for nutrition study design and interpretation. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.32, n.1, p.2546-2559, 1979.

BEELMAN, R.B.; BARDEN, C.L.; EDWARDS, C.G. Total sulfur dioxide residuals in fresh mushrooms washed in sulfite solutions. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.51, n.11, p.903-905, 1988.

BEHRE, L.M. Sulfite food additives: to ban or not to ban? **Dairy Food Sanit.**, Ames, v.6, n.9, p.386-390, 1986.

BEMRAH, N.; LEBLANC, J.C.; VOLATIER, J.L. Assessment of dietary exposure in the French population to 13 selected food colours, preservatives, antioxidants, stabilizers, emulsifiers and sweeteners. **Food Addit. Contam.: Part B**, Basingstoke, v.1, n.1, p.2-14, 2008.

BENDTSEN, A.B.; JORGENSEN, S.S. Determination of total and free sulfite in unstabilized beer by flow injection analysis. **J. AOAC Int.**, Gaithersburg, v.77, n.4, p.948-951, 1994.

BEUTLER, H.O. A new enzimatic method for determination of sulphite in food. **Food Chem.**, Amsterdam, v.15, n.1, p.157-164, 1984.

BJÖRKSTÉN, B. The role of the gastrointestinal tract in the development of respiratory hypersensitivities. **Toxicol. Lett.**, Amsterdam, v.86, n.1, p.85-88, 1996.

BRAGAGNOLO, N.; SILVA, C.A.; TANIWAKI, M.H. Avaliação dos teores de dióxido de enxofre e da qualidade microbiológica de cogumelos em conserva. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v.60, n.2, p.103-107, 2001.

BRANEN, A.L.; DAVIDSON, P.M.; SALMINEN, S., eds. **Food additives**. New York: Marcel Dekker, 1990. 736p. (Food Science and Technology, 35).

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária; coord. Odair Zenebon; Neus Sadocco Pascuet. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4ª. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. p. 143-144.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Visalegis. Legislação. Decreto nº. 55.871, de 26 de março de 1965. Modifica o Decreto nº. 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto nº. 691, de 13 de março de 1962. Disponível em: http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=22. Acesso em: 30 jan. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Portarias. Portaria nº. 540, de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares e Coadjuvantes de Tecnologia de Fabricação. Disponível em: htpp://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/540_97.htm. Acesso em: 20 abr. 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Resoluções. Resolução CNS/MS n.04, de 24 de novembro de 1988. Revisa as tabelas anexas ao Decreto 55.871/65. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/04_cns.pdf. Acesso em: 30 jan. 2004.

BURROUGHS, L.F. Dissociable products formed with sulphur dioxide in wine. **J. Sci. Food Agric.**, Bognor Regis, v.32, n.1, p.1140-1141, 1981.

CADBY, P. Estimating intakes of flavouring substances. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.13, n.4, p.453-460, 1996.

CAMARGO, M.C.R. DE. **Avaliação da ingestão de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos através da dieta**. Campinas, 2000. 267p. Tese de Doutorado – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas.

CARDOSO, W.S.; PINHEIRO, F de A.; PATELLI, T.; PEREZ, R.; RAMOS, A.M. Determinação da concentração de sulfito para a manutenção da qualidade da cor em maçã desidratada. **Rev. Analytica**, São Paulo, n.29, p.66-72, 2007.

CARR, J.G. Antimicrobial activity of sulphur dioxide. **J. Sci. Food Agric.**, Bognor Regis, v.32, n.1, p.1140, 1981.

CASTRO, M.D.L. DE; LUQUE-GARCIA, J.L. Biosensors in wine production monitoring. **Anal. Letters**, Philadelphia, v.33, n.6, p.963-996, 2000.

CHAMBOLLE, M. Assessment of extreme levels of chronic food intakes. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, Orlando, v.30, suppl.1, p.13-18, 1999.

CHEN, J.J.; CHEN, Y.J.; RICE, G.; TEUSCHLER, L.K.; HAMERNIK, K.; PROTZEL, A.; KODELL, R.L. Using dose addition to estimate cumulative risks from exposures to multiple chemicals. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, Orlando, v.34, n.1, p.35-41, 2001.

CHIARANI, F. **Estudos bioquímicos em modelo experimental de deficiência de sulfito oxidase**. Porto Alegre, 2008. 61p. Dissertação de Mestrado – Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

CHINVONGAMORN, C.; PINWATTANA, K.; PRAPHAIRAKSIT, N.; IMATO, T.; CHAILAPAKUL, O. Amperometric determination of sulfite by gas diffusion sequential injection with boron doped diamond electrode. **Sensors**, Basel, v.8, n.3, p.1846-1857, 2008.

CINTRA, I.H.A.; OGAWA, N.B.P.; SOUZA, M.R.; DINIZ, F.M.; OGAWA, M. Decomposition of trimethylamine oxide related to the use os sulfites in shrimp. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.19, n.3, p.314-317, 1999.

COKER, L.E. Uses and analysis of sulfites in the corn wet milling industry. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, Washington, v.69, n.1, p.8-10, 1986.

COLLINS, F.X.C.; SPRANDO, R.L.; SHACKELFORD, M.E.; HANSEN, D.K.; WELSH, J.J. Food and Drug Administration proposed testing guidelines for developmental toxicity studies. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, Orlando, v.30, n.1, p.39-44, 1999a.

COLLINS, F.X.C.; SPRANDO, R.L.; SHACKELFORD, M.E.; HANSEN, D.K.; WELSH, J.J. Food and Drug Administration proposed testing guidelines for reproduction studies. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, Orlando, v.30, n.1, p.29-38, 1999b.

CORBO, D.; BERTOTTI, M. Use of a copper electrode in alkaline medium as an amperometric sensor for sulphite in a flow-through configuration. **Anal. Bioanal. Chem.**, Heidelberg, v.374, n.3, p.416-420, 2002.

DANI, C.; VESTRI, V.; BERTINI, G.; PRATESI, S.; RUBALTELLI, F.F. Toxicity of corticosteroids and catecholamines for mice neuronal cell cultures: role of preservatives. **J. Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, Boca Raton, v.20, n.4, p.325-333, 2007.

DANIELS, D.H.; JOE JR., F.L.; WARNER, C.R.; LONGFELLOW, S.D.; FAZIO, T.; DIACHENKO, G.W. Survey of sulphites determined in a variety of foods by the optimized Monier-Williams method. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.9, n.4, p.283-289, 1992.

DAVIES, C.G.A.; WEDZICHA, B.L. Kinetics of the inhibition of ascorbic acid browning by sulphite. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.9, n.5, p.471-477, 1992.

DECNOP-WEEVER, L.G.; KRAAK, J.C. Determination of sulphite in wines by gas-diffusion flow injection analysis utilizing spectrophotometric pH-detection. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v.337, n.2, p.125-131, 1997.

DICH, J.; JÄRVINEN, R.; KNEKT, P.; PENTILLÄ, P.L. Dietary intakes of nitrate, nitrite and NDMA in the Finnish Mobile Clinic Health Examination Survey. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.13, n.5, p.541-552, 1996.

DiPERSIO, P.A.; KENDALL, P.A.; SOFOS, J.N. Investigation of *Listeria monocytogenes* during drying and storage of peach slices treated with acidic or sodium metabisulfite solutions. **Food Microbiology**, v.21, n.6, p.641-648, 2004.

DISSELDUFF, M.M.; TRY, G.P.; BERRY, W.T.C. Possible use of dietary surveys to assess intake of food additives. **Food Cosmet. Toxicol.**, Oxford, v.17, n.4, p.391-396, 1979.

DOKKUM, W.V.; VOS, R.H.; CLOUGHLEY, F.A.; HULSHOF, K.F.A.M.; DUKEL, F.; WIJSMAN, J.A. Food additives and food components in total diets in the Netherlands. **Br. J. Nutr.**, Wallingford, v.48, n.2, p.223-231, 1982.

DOUGLASS, J.S.; BARRAJ, L.M.; TENNANT, D.R.; LONG, W.R.; CHAISSON, C.F. Evaluation of the Budget Method for screening food additive intakes. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.14, n.8, p.791-802, 1997.

DOUGLASS, J.S.; TENNANT, D.R. Estimation of dietary intake of food chemicals. In: TENNANT, D.R., ed. **Food chemical risk analysis**. London: Chapman & Hall, 1997. cap.8, p.195-218.

DULAK, L.; CHIANG, G.; GUNNISON, A.F. A sulphite oxidase-deficient rat-model: reproductive toxicology of sulphite in the female. **Food Chem. Toxicol.**, Amsterdam, v.22, n.8, p.599-607, 1984.

DUPUY, P. Révision de la place du sulfite comme additif alimentaire. **Ann. Falsif. Expert. Chim.**, Paris, v.85, n.908, p.219-222, 1992.

EDBERG, U. Enzymatic determination of sulfite in foods: NMKL interlaboratory study. **J. AOAC Int.**, Gaithersburg, v.76, n.1, p.53-58, 1993.

ENVIRONMENTAL HEALTH SERVICE. **Food additives**: sulphur dioxide in foods. Perth: Health Department of Western Australia, 1996. 6p.

FAZIO, T.; WARNER, C.R. A review of sulphites in foods: analytical methodology and reported findings. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.7, n.4, p.433-454, 1990.

FERRARINI, R.; CELOTTI, E.; VERSARI, A.; GALASSI, S. The determination of total SO_2 in grape juice: a comparison among five methods. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.17, n.12, p.973-977, 2000.

FISBERG, R.M.; SLATER, B; MARCHIONI, D.M.L; MARTINI, L.A. **Inquéritos alimentares: métodos e bases científicos**. São Paulo: Manole, 2005. 334p.

FISBERG, R.M.; VILLAR, B.S. **Manual de receitas e medidas caseiras para cálculo de inquéritos alimentares**. São Paulo: Signus, 2002. 71p.

FOOD SAFETY AUTHORITY OF IRELAND. **Legislation, intake and usage of food additives in Ireland**. Dublin: Food Safety Authority of Ireland, 2001. 63p.

FRANÇOIS-COLLANGE, M.; PERNOT, F.; SUSCHETET, M.; MARESCHI, J.P. Estimation de la consommation alimentaire de sulfites en France. **Cah. Nutr. Diet.**, Vineuil, v.26, n.5, p.352-358, 1991.

FROBISHER, C.; MAXWELL, S.M. The estimation of food portion sizes: a comparison between using descriptions of portion sizes and a photographic food atlas by children and adults. **J. Hum. Nutr. Dietet.**, Oxford, v.16, n.3, p.181-188, 2003.

GANDARA, J.S.; LOZANO, J.S.; LOSADA, P.P. Aproximacion a la toxicidad de los agentes conservantes de alimentos. **Alimentaria**, Madrid, v.26, n.204, p.53-56, 1989.

GANGOLLI, S.D.; BRANDT, P.A. VAN DEN; FERON, V.J.; JANZOWSKY, C.; KOEMAN, J.H.; SPEIJERS, G.J.A.; SPEIGELHALDER, B.; WALKER, R.; WISHNOK, J.S. Nitrate, nitrite and *N*-nitroso compounds. **Eur. J. Pharmacol. Environ. Toxicol. Pharmacol. Sect.**, Amsterdam, v.292, n.1, p.1-38, 1994.

GERDES, D.L.; HIRCHAK, R.D.; GRODNER, R.M.; MARTIN, R.M. Sodium bisulfite analyses in shrimp by ion selective electrode, sulfite oxidase, and modified Monier-Williams. **J. Aquatic Food Product Tech.**, v.8, n.1, p.59-64, 1999.

GHASEMI, J.; MOHAMMADI, D.E. Kinetic spectrophotometric determination of sulfite using a full curve (PLS) and a fixed time method. **Anal. Letters**, Philadelphia, v.36, n.10, p.2243-2254, 2003.

GIBNEY, M.J. Dietary intake methods for estimating food additive intake. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, Orlando, v.30, suppl.1, p.31-33, 1999.

GIBNEY, M.J.; LAMBE J. Estimation of food additive intake: methodology overview. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.13, n.4, p.405-410, 1996.

GIBSON, W.B.; STRONG, F.M. Accumulation of ingested sulphite- and sulphate-sulphur and utilization of sulphited proteins by rats. **Food Cosmet. Toxicol.**, Oxford, v.12, n.5/6, p.625-640, 1974.

GIBSON, W.B.; STRONG, F.M. Metabolism and elimation of sulphite by rats, mice and monkeys. **Food Cosmet. Toxicol.**, Oxford, v.11, n.2, p.185-198, 1973.

GILBERT, J. **Progress in food contaminant analysis**. London: Blackie Academic & Professional, 1996. p.401-402.

GODDARD, S.J.; WEDZICHA, B.L. Kinetics of the reaction of sorbic acid with sulphite species. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.9, n.5, p.485-492, 1992.

GREYSON, J.; ZELLER, S. Analytical coulometry in Monier-Williams sulfite-in-food determinations. **American Lab.**, p.44-51, jul 1987.

GUEKEZIAN, M.; COICHEV, N.; SUÁREZ-IHA, M.E.V.; NEVES, E.A. Stability of sulfur(IV) solutions in the presence of amines and the tendency of sulfite ions to disproportionate in stock solutions. **Anal. Letters**, Philadelphia, v.30, n.7, p.1423-1436, 1997.

GUNNISON, A.F. Sulphite toxicity: a critical review of *in vitro* and *in vivo* data. **Food Cosmet. Toxicol.**, Oxford, v.19, n.5, p.667-682, 1981.

GUNNISON, A.F.; DULAK, L.; CHIANG, G.; ZACCARDI, J. A sulphite-oxidase-deficient rat model: subchronic toxicology. **Food Cosmet. Toxicol.**, Oxford, v.19, n.2, p.221-232, 1981.

GUNNISON, A.F.; JACOBSEN, D.W.; SCHWARTZ, H.J. Sulfite hypersensitivity: a critical review. **Critical Reviews Toxicol.**, Cleveland, v.17, n.3, p.185-214, 1987.

HANSEN, S.C. Acceptable daily intake of food additives and ceiling on levels of use. **Food Cosmet. Toxicol.**, Oxford, v.4, n.4, p.427-432, 1966.

HANSEN, S.C. Conditions for use of food additives based on a budget for an acceptable daily intake. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.42, n.5, p.429-434, 1979.

HARDISSON, A.; RUBIO, C.; FRÍAS, I.; RODRÍGUEZ, I.; REGUERA, J.I. Content of sulphite in frozen prawns and shrimps. **Food Control**, Oxfordshire, v.13, n.5, p.275-279, 2002.

HILLERY, B.R.; ELKINS, E.R.; WARNER, C.R.; DANIELS, D.; FAZIO, T. Optimized Monier-Williams method for determination of sulfites in foods: collaborative study. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, Washington, v.72, n.3, p.470-475, 1989.

HLAVAY, J.; GUILBAULT, G.G. Determination of sulphite by use of a fiber-optic biosensor based on a chemiluminescent reaction. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v.299, n.1, p.91-96, 1994.

HUI, J.Y.; BEERY, J.T.; HIGLEY, N.A.; TAYLOR, S.L. Comparative subchronic oral toxicity of sulphite and acetaldehyde hydroxysulphonate in rats. **Food Chem. Toxicol.**, Amsterdam, v.27, n.6, p.349-359, 1989.

IYENGAR, R.; McEVILY, A.J. Anti-browning agents: alternatives to the use of sulfites in foods. **Trends Food Sci. Technol.**, Amsterdam, v.3, n.3, p.60-64, 1992.

JARVIS, B.; LEA, A.G.H. Sulphite binding in cidres. **Int. J. Food Sci. Technol.**, Oxford, v.35, n.1, p.113-127, 2000.

JOHNSON, B.; HACKETT, M.; ROUNDFIELD, M.; COUFOPOULOS, A. An investigation of the validity and reliability of a food intake questionnaire. **J. Hum. Nutr. Dietet.**, Oxford, v.14, n.6, p.457-465, 2001.

KATO, J.; KUBOTA, T.; IGARASHI, S. Length detection - flow analytical system using autocatalytic reaction. **Anal. Letters**, Philadelphia, v.38, n.14, p.2431-2437, 2005.

KELLY, S.D.; SCOTTER, M.J.; MACARTHUR, R.; CASTLE, L.; DENNIS, M.J. Survey of stable sulfur isotope ratios ($^{34}S/^{32}S$) of sulfite and sulfate in foods. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.19, n.11, p.1003-1009, 2002.

KIM, H.J.; KIM, Y.K.; SMITH, M. Sulfite analysis by ion exclusion chromatography: applications to the food and beverage industries. **Food Technol.**, Chicago, v.42, n.11, p.113-116, 1988.

KNIGHT, T.M.; FORMAN, D.; AL-DABBAGH, S.A.; DOLL, R. Estimation of dietary intake of nitrate and nitrite in Great Britain. **Food Chem. Toxicol.**, Amsterdam, v.25, n.4, p.277-285, 1987.

KROKIDA, M.K.; KIRANOUDIS, C.T.; MAROULIS, Z.B.; MARINOS-KOURIS, D. Effect of pretreatment on color of dehydrated products. **Drying Tech.**, Philadelphia, v.18, n.6, p.1239-1250, 2000.

KUCUKATAY, V.; BOR-KUCUKATAY, M.; ATSAK, P.; AAR, A. Effect of ingested sulfite on hippocampus antioxidant enzyme activities in sulfite oxidase competent and deficient rats. **Int. J. Neuroscience**, v.117, n.7, p.971-983, 2007.

LAMBE, J.; KEARNEY, J.; LECLERCRQ, C.; BERARDI, D.; ZUNFT, H.F.J.; SULZER, S.; HENAUW, S.; VOLDER, M.; LAMBERG-ALLARDT, C.J.E.; KARKKAINEN, M.U.M.; DUNNE, A.; GIBNEY, M.J. Enhancing the capacity of food consumption surveys of short duration to estimate long term consumer-only intakes by combination with a qualitative food frequency questionnarie. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.17, n.3, p.177-187, 2000.

LANGLAIS, R. Additive usage levels. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.13, n.4, p.443-452, 1996.

LARSEN, J.C.; PASCAL, G. Workshop on the appicability of the ADI to infants and children: consensus summary. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.15, suppl.1, p.1-9, 1998.

LAUZURICA, L.Z.; FAYOS, J.G. Presencia de sulfites en carne picada y preparados de carne elaborados en industrias de la comunidade valenciana. **Rev. Esp. Salud Pública**, Madrid, v.71, n.4, p.401-407, 1997.

LAWRENCE, J.F.; CHADHA, R.K. Determination of sulfite in foods by headspace liquid chromatography. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, Washington, v.71, n.5, p.930-933, 1988.

LAWRENCE, J.F.; CHADHA, R.K. Headspace liquid chromatografhic technique for the determination of sulfite in food. **J. Chrom.**, Amsterdam, v.398, n.3, p.355-359, 1987.

LAWRIE, C.A. Different dietary patterns in relation to age and the consequences for intake of food chemicals. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.15, suppl.1, p.75-81, 1998.

LAWRIE, C.A.; REES, N.M.A. The approach adopted in the UK for the estimation of the intake of food additives. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.13, n.4, p.411-416, 1996.

LEA, A.G.H.; FORD, G.D.; FOWLER, S. Analytical techniques for the estimation of sulphite binding components in ciders and wines. **Int. J. Food Sci. Technol.**, Oxford, v.35, n.1, p.105-112, 2000.

LECLERCQ, C.; MOLINARO, M.G.; PICCINELLI, R.; BALDINI, M.; ARCELLA, D.; STACCHINI, P. Dietary intake exposure to sulphites in Italy – analytical determination of sulphite-containing foods and their combination into standard meals for adults and children. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.17, n.12, p.979-989, 2000.

LECOS, C.W. An order of fries – hold the sulfites. **Dairy Food Sanit.**, Ames, v.8, n.10, p.528-531, 1988.

LEE, A.; NIXON, R. Contact dermatitis from sodium metabisulfite in a baker. **Contact Dermatitis**, Munksgaard, v.44, n.2, p.127-128, 2001.

LI, Y.; ZHAO, M. Simple methods for rapid determination of sulfite in food products. **Food Control**, Oxfordshire, v.17, n.12, p.975-980, 2006.

LLOYD, A.G. Metabolic aspects of sulphite toxicology. **J. Sci. Food Agric.**, Bognor Regis, v.32, n.1, p.1143-1144, 1981.

LÖWIK, M.R.H. Possible use of food consumption surveys to estimate exposure to additives. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.13, n.4. p.427-441, 1996.

LÖWIK, M.R.H.; HULSHOF, K.F.A.M.; BRUSSAARD, J.H.; KISTEMAKER, C. Dependence of dietary intake estimates on the time frame of assessment. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, Orlando, v.30, suppl.1, p.48-56, 1999.

LOWINSOHN, D.; ALIPÁZAGA, M.V.; COICHEV, N.; BERTOTTI, M. Indirect FIA amperometric determination of sulphite based on the autocatalytic generation of Cu^{3+} complexes. **Microchim. Acta**, v.144, n.1-3, p.57-62, 2004.

LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. Determination of sulphite in wine by coulometric tritation. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.18, n.9, p.773-777, 2001.

MACHADO, R.M.D.; TOLEDO, M.C.F. **Determinação dos níveis de sulfitos em vinhos e em sucos de frutas e estimativa de sua ingestão**. Campinas, 2007. 121p. Tese de Doutorado – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas.

MACHADO, R.M.D.; TOLEDO, M.C.F.; ALMEIDA, C.A.S.; VICENTE, E. Analytical determination of sulphites in fruit juices available on the Brazilian market. **Braz. J. Food Technol. (ITAL)**, Campinas, v.11, n.3, p.226-233, 2008.

MACHADO, R.M.D.; TOLEDO, M.C.F.; CAROBA, D.C.R. Estimation of the intake of sulphites by adolescents from the consumption of fruit juices in Brazil. **Toxicol. Lett.**, Amsterdam, v.172, supl.1, p.S197-S198, 2007.

MACHADO, R.M.D.; TOLEDO, M.C.F.; VICENTE, E. Sulfitos em alimentos. **Braz. J. Food Technol. (ITAL)**, Campinas, v.9, n.4, p.265-275, 2006.

MARESCHI, J.P.; FRANÇOIS-COLLANGE, M.; SUSCHETET, M. Estimation of sulphite in food in France. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.9, n.5, p.541-549, 1992.

MARTIN, L.B.; NORDLEE, J.A.; TAYLOR, S.L. Sulfite residues in restaurant salads. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.49, n.2, p.126-129, 1986.

MASÁR, M.; DANKOVÁ, M.; OLVECKÁ, E.; STACHURAVÁ, A.; KANIANSKY, D.; STANISLAWSKI, B. Determination of free sulfite in wine by zone electrophoresis with isotachophoresis sample pretreatment on a column-coupling chip. **J. Chrom. A**, Amsterdam, v.1026, n.1-2, p.31-39, 2004.

McFEETERS, R.F.; BARISH, A.O. Sulfite analysis of fruits and vegetables by high-performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet spectrophotometric detection. **J. Agric. Food Chem.**, Davis, v.51, n.6, p.1513-1517, 2003.

McLEOD, S.; DAVEY, D.E. Rapid microstill determination of free and total sulfite in wine with conductimetric detection. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v.600, n.1, p.72-77, 2007.

MEGURO, H.; AKASAKA, K.; OHRUI, H.; MATSUI, S.I. Highly sensitive N-(9-acridinyl)maleimide (NAM) fluorometry to determine sulfite below ppm level in environmental and biological samples. **J. Trace Microprobe Techniques**, Florida, v.20, n.4, p.463-472, 2002.

MENG, Z.; LI, R.; ZHANG, X. Levels of sulfite in three organs from mice exposed to sulfer dioxide. **Inhalation Toxicol.**, New York, v.17, n.6, p.309-313, 2005.

MODDERMAN, J.P. Technological aspects of use sulfiting agents in food. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, Washington, v.69, n.1, p.1-3, 1986.

MOYLAN, J.G.; BOWES, F.W.; PAPPIN, W.J. Evaluation of Monier-Williams and committee methods for bisulfite determination as used by the potato processing industry. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, Washington, v.69, n.1, p.11-14, 1986.

MULCHANDANI, A.; GROOM, C.A.; LUONG, J.H.T. Determination of sulfite in food products by an enzyme electrode. **J. Biotech.**, Amsterdam, v.18, n.1-2, p.93-102, 1991.

NAGY, S.M.; TEUBER, S.S.; LOSCUTOFF, S.M.; MURPHY, P.J. Clustered outbreak of adverse reactions to a salsa containing high levels of sulfites. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.58, n.1, p.95-97, 1995.

NRC – National Research Council. **Dietary Reference Intakes: a risk assessment model for establishing upper intake levels for nutrients**. Washington, D.C, National Academy Press, 1998, 71p.

NEPA – Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação. **Tabela brasileira de composição de alimentos**. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2006. 105p.

OGAWA, N.B.P.; ARAÚJO, I.N.F. de; LUCENA, L.H.L. de; MAIA, E.L.; OGAWA, M. Teor residual de SO_2 em camarões congelados exportados pelo estado do Ceará. **Bol. Téc. Cient. CEPNOR**, Belém, v.3, n.1, p.191-196, 2003.

OLIVEIRA, C.A.F. Utilização de aditivos intencionais nos alimentos e sua relação com a saúde pública. **Comun. Cient. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. São Paulo**, São Paulo, v.13, n.2, p.65-73, 1989.

OSTERGAARD, G.; KNUDSEN, I. The applicability of the ADI (Acceptable Daily Intake) for food additives to infants and children. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.15, suppl.1, p.63-74, 1998.

OUGH, C.S. Determination of sulfur dioxide in grapes and wines. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, Washington, v.69, n.1, p.5-7, 1986.

ÖZKAYA, Y.G.; KÜÇÜKATAY, V.; SAVCIOLU, F.; AAR, A.; YARGICOLU, P.; ÖNAL, M.Z. Spectral analysis of eeg in normal and sulfite oxidase deficient rats under sulfite administration. **Int. J. Neuroscience**, v.116, n.11, p.1359-1373, 2006.

PAÍNO-CAMPA, G.; PEÑA-EGIDO, M.; GARCÍA-MORENO, C. Liquid chromatographic determination of free and total sulphites in fresh sausages. **J. Sci. Food Agric.**, Bognor Regis, v.56, n.1, p.85-93, 1991.

PARKE, D.V.; LEWIS, D.F.V. Safety aspects of food preservatives. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.9, n.5, p.561-577, 1992.

PENTTILÄ, P.L. Estimation of food additive intake: Nordic approach. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.13, n.4, p.421-426, 1996.

PERFETTI, G.A.; DIACHENKO, G.W. Determination of sulfite in dried garlic by reversed-phase ion-pairing liquid chromatography with post-column detection. **J. AOAC Int.**, Gaithersburg, v.86, n.3, p.544-550, 3002.

PERONI, D.G.; BONER, A.L. Sulfite sensitivity. **Clin. Exp. Allergy**, Oxford, v.25, n.8, p.680-681, 1995.

PERRIN-ANSART, M.C. Sur les sulfites employés comme conservateurs. **Cah. Nutr. Diet.**, Vineuil, v.24, n.4, p.291-297, 1989.

PHILIPPI, S.T.; SZARFARC, S.C.; LATTERZA, A.R. **Virtual Nutri**: software. Versão 1.0. São Paulo: Departamento de Nutrição/FSP/USP, 1996. 3 disquetes.

PIZZOFERRATO, L.; DI LULLO, G.; QUATTRUCCI, E. Determination of free, bound and total sulphites in foods by indirect photometry-HPLC. **Food Chem.**, Amsterdam, v.63, n.2, p.275-279, 1998.

PIZZOFERRATO, L.; QUATTRUCCI, E.; DI LULLO, G. Evaluation of an HPLC method for the determination of sulphiting agents in foods. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.7, n.2, p.189-195, 1990.

POPOLIM, W.D; PENTEADO M. De V.C. Estimate of dietary exposure to sulphites using Brazilian students as a sample population. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.22, n.11, p.1106-1112, 2005.

POPOLIM, W.D.; PENTEADO M. De V.C. **Estimativa da ingestão de sulfitos por escolares pela análise qualitativa da dieta**. São Paulo, 2004. 102p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Nutrição Humana Aplicada – Universidade de São Paulo.

QUATTRUCCI, E. Potential intakes of sulphur dioxide: the European situation. **J. Sci. Food Agric.**, Bognor Regis, v.32, n.1, p.1141-1142, 1981.

QUATTRUCCI, E.; MASCI, V. Nutritional aspects of food preservatives. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.9, n.5, p.515-525, 1992.

RAHMAN, M.S.; PERERA, C.O. Drying and preservation. In: RAHMAN, M.S. **Handbook of food preservation**. New York: Marcel Dekker, 1999. cap.6, p.173-216. (Food Science and Technology, 94).

REIS, B.F.; GINÉ, M.F.; KRONKA, E.A.M. A análise química por injeção em fluxo contínuo. **Química Nova**, São Paulo, v.12, n.1, p.82-91, 1989.

RENWICK, A.G. Incidence and severity in relation to magnitude of intake above the ADI or TDI: use of critical effect data. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, Orlando, v.30, suppl.1, p.79-86, 1999.

RENWICK, A.G. Needs and methods for priority setting for estimating the intake of food additives. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.13, n.4, p.467-475, 1996.

RENWICK, A.G. The use of an additional safety or uncertainty factor for nature of toxicity in the estimation of acceptable daily intake and tolerable daily intake values. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, Orlando, v.22, n.3, p.250-261, 1995.

RIBERA, D.; JONKER, D.; NARBONNE, J.F.; O'BRIEN, J.; ANTIGNAC, E. Absence of adverse effects of sodium metabisulphite in manufactured biscuits: results of subacute (28-days) and subchronic (85-days) feeding studies in rats. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.18, n.2, p.103-114, 2001.

ROSE, A.H.; PILKINGTON, B.J. Sulphite. In: GOULD, G.W. **Mechanisms of action of food preservation procedures**. New York: Elsevier Applied Science, 1989. cap.8, p.201-223.

RUIZ-CAPILLAS, C.; JIMENÉZ-COLMENERO, F. Application of flow injection analysis for determining sulphites in food and beverages: a review. **Food Chem.**, Amsterdam, v.112, n.2, p.487-493, 2009.

SABA, A.; TURRINI, A.; CIALFA, E. Estimates of intakes: methodology and results of some studies carried out in Italy. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.9, n.5, p.527-534, 1992.

SAFAVI, A.; ENSAFI, A.A. Kinetic spectrophotometric determination of traces of sulphite. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v.252, n.1/2, p.121-126, 1991.

SALVO, V.L.M.A.; GIMENO, S.G.A. Reprodutibilidade e validade do questionário de freqüência de consumo de alimentos. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v.36, n.4, p.505-512, 2002.

SAPERS, G.M. Browning of foods: control by sulfites, antioxidants, and other means. **Food Technol.**, Chicago, v.47, n.10, p.75-81, 1993.

SARUDI, I.; VARGA-CSERESNYÉS, E; CSAPÓ-KISS, Z.; SZABÓ, A. Elimination of disturbing effect caused by sulphur dioxide for sulphur determination in wines by ICP-OES. **Anal. Letters**, Philadelphia, v.34, n.3, p.449-455, 2001.

SCOTTER, M.J.; CASTLE, L. Chemical interactions between additives in foodstuffs: a review. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.21, n.2, p.93-124, 2004.

SEZGINTÜRK, M.K.; DINÇKAYA, E. Direct determination of sulfite in food samples by a biosensor based on plant tissue homogenate. **Talanta**, London, v.65, n.4, p.998-1002, 2005.

SHTENBERG, A.J.; IGNAT'VE, A.D. Toxicological evaluation of some combinations of food preservatives. **Food Cosmet. Toxicol.**, Oxford, v.8, n.4, p.369-380, 1970.

SILVA, R.L.G.N.P.; SILVA, C.S.; NÓBREGA, J.A.; NEVES, E.A. Flow injection spectrophotometric determination of free and total sulfite in wines based on the induced oxidation of manganese(II). **Anal. Letters**, Philadelphia, v.31, n.13, p.2195-2208, 1998.

SIMON, R.A. Additive-induced urticaria: experience with monosodium glutamate (MSG). **J. Nutr.**, Bethesda, v.130, suppl.1, p.1063-1066, 2000.

SIMPSON, M.V.; OTWELL, W.S.; MARSHALL, M.R.; CORNELL, J.A. Analysis of sulfites in shrimp using rapid distillation followed by redox tritation. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.51, n.2, p.137-138, 1988.

SMOLINSKE, S.C. Review of parenteral sulfite reactions. **Clin. Toxicol.**, Denver, v.30, n.4, p.597-606, 1992.

SOLOMON, H.M.; RHODEHAMEL, E.J.; KAUTTER, D.A. Growth and toxin production by *Clostridium botulinum* in sliced raw potatoes under vaccum with and without sulfite. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.57, n.10, p.878-881, 1994.

SOUBRA, L.; SARKIS, D.; HILAN, C.; VERGER, Ph. Dietary exposure of children and teenagers to benzoates, sulphites, butylhydroxyanisol (BHA) and butylhydroxytoluen (BHT) in Beirut (Lebanon). **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, Orlando, v.47, n.1, p.68-77, 2007.

SPEIJERS, G.J.A. Precision of estimates of an ADI (or TDI or PTWI). **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, Orlando, v.30, suppl.1, p.87-93, 1999.

STAMMATI, A.; ZANETTI, C.; PIZZOFERRATO, L.; QUATTRUCCI, E.; TRANQUILLI, G.B. *In vitro* model for the evaluation of toxicity and antinutritional effects of sulphites. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.9, n.5, p.551-560, 1992.

STEINMAN, H.A.; LE ROUX, M.; POTTER, P.C. Sulphur dioxide sensitivity in South African asthmatic children. **S. Afr. Med. J.**, Cape Town, v.83, n.4, p.387-390, 1993.

STEINMAN, H.A.; WEINBERG, E.G. The effects of soft-drink preservatives on asthmatic children. **S. Afr. Med. J.**, Cape Town, v.70, n.5, p.404-406, 1986.

STEVENSON, D.D.; SIMON, R.A. Sensitivity to ingested metabisulfites in asthmatic subjects. **J. Allergy Clin. Immunol.**, Saint Louis, v.68, n.1, p.26-32, 1981.

SU, Y.C.; TAYLOR, S.L. Sulphite analysis of food ingredients: false positive responses with butter flavourings in the optimized Monier-Williams method. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.12, n.2, p.153-160, 1995.

SULLIVAN, D.M.; SMITH, R.L. Determination of sulfite in foods by ion chromatography. **Food Technol.**, Chicago, v.39, n.7, p.45-48, 53, 1985.

SULLIVAN, F.M. Significance of excursions of intake above the Acceptable Daily Intake: effect of time and dose in developmental toxicology. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, Orlando, v.30, suppl.1, p.94-98, 1999.

SULLIVAN, J.J.; HOLLINGWORTH, WEKELL, M.M.; NEWTON, R.T.; LAROSE, J.E. Determination of sulfite in food by flow injection analysis. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, Washington, v.69, n.3, p.542-546, 1986.

SWALES, S.; WEDZICHA, B.L. Kinetics of the sulphite-inhibited browning of fructose. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.9, n.5, p.479-483, 1992.

SZTAJN, M. **Avaliação da ingestão potencial de corantes artificiais por crianças em idade escolar**. Campinas, 1988. 169p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas.

TANCREDTI, R.C.P.; SILVA, Y. da. Fraudes por sulfito de sódio (SO_2) em carnes bovinas comercializadas na cidade do Rio de Janeiro, RJ. **Hig. Alimentar**, São Paulo, v.21, n.149, p.62-66, 2007.

TARASUK, V.; BEATON, G.H. Statistical estimation of dietary parameters: implications of patterns in within-subject variation: a case study of sampling strategies. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.55, n.1, p.22-27, 1992.

TAVARES, M.; LOBANCO, C.M.; TRUJILLO, L.M.; PENNACINO, M.R.; MARTINS, M.C.B. Pesquisa de sais de sulfito em carnes comercializadas a varejo na região metropolitana de São Paulo. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v.47, n.1/2, p.1-4, 1987.

TAYLOR, S.L. Why sulfite alternatives?. **Food Technol.**, Chicago, v.47, n.10, p.14, 1993.

TAYLOR, S.L.; BUSH, R.K. Sulfites as food ingredients. **Food Technol.**, Chicago, v.40, n.6, p.47-52, 1986.

TAYLOR, S.L.; BUSH, R.K. Sulfites as food ingredients. **Food Technol. Aust.**, Sydney, v.39, n.11, p.532-536, 1987.

TAYLOR, S.L.; HEFLE, S.L. Food allergies and other food sensitivities. **Food Technol.**, Chicago, v.55, n.9, p.68-83, 2001.

TENNANT, D.R. Estimating acute dietary intakes of chemicals. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, Orlando, v.30, suppl.1, p.99-102, 1999.

THOMPSON, F.E.; BYERS, T. Dietary assessment resource manual. **J. Nutr.**, Bethesda, v.124, suppl.11, p.2245-2317, 1994.

TIL, H.P.; FERON, V.J. Toxicology of sulphiting agents I: animal studies. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.9, n.5, p.587-595, 1992.

TIL, H.P.; FERON, V.J.; DE GROOT, A.P. The toxicity of sulphite. I. Long-term feeding and multigeneration studies in rats. **Food Cosmet. Toxicol.**, Oxford, v.10, n.3, p.291-310, 1972a.

TIL, H.P.; FERON, V.J.; DE GROOT, A.P. The toxicity of sulphite. II. Short- and long-term feeding studies in pigs. **Food Cosmet. Toxicol.**, Oxford, v.10, n.4, p.463-473, 1972b.

TIMBO, B.; KOEHLER, K.M.; WOLYNIAK, C.; KLONTZ, K.C. Sulfites – a Food and Drug Administration review of recalls and reported adverse events. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.67, n.8, p.1806-1811, 2004.

TORRES, E.A.F.S.; MACHADO, F.M.S. **Alimentos em questão**: **uma abordagem técnica para as dúvidas mais comuns**. São Paulo: Ponto Crítico, 2001. 140p.

TRENERRY, V.C. The determination of the sulphite content of some foods and beverages by capillary electrophoresis. **Food Chem.**, Amsterdam, v.55, n.3, p.299-303, 1996.

UNITED STATES INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS. Sulfites as food additives. **Food Technol.**, Chicago, v.29, n.10, p.117-120, 1975.

USSEGLIO-TOMASSET, L. Properties and use of sulphur dioxide. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.9, n.5, p.399-404, 1992.

VAHL, J.M.; CONVERSE, J.E. Ripper procedure for determining sulfur dioxide in wine: collaborative study. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, Washington, v.63, n.2, p.194-199, 1980.

VALLY, H.; CARR, A.; EL-SALEH, J.; THOMPSON, P. Wine-induced asthma: a placebo assessment of its pathogenesis. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.103, n.1, p.41-46, 1999.

VALLY, H.; THOMPSON, P.J. Role of sulfite additives in wine induced asthma: single dose and cumulative dose studies. **Thorax**, v.56, n.10, p.763-769, 2001.

VERGER, P.; CHAMBOLLE, M.; BABAYOU, P.; LE BRETON, S.; VOLATIER, J.L. Estimation of the distribution of the maximum theoretical intake for ten additives in France. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.15, n.7, p.759-766, 1998.

VERGER, P.; GARNIER-SAGNE, I.; LEBLANC, J.C. Identification of risk groups for intake of food chemicals. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, Orlando, v.30, suppl.1, p.103-108, 1999.

VILLAGRÁN, M.; COSTAMAGNA, J.; ZAGAL, J.H.; CÁRDENAS-JIRÓN, G.; PÁEZ, M. Nickel(II) complexes with tetraaza macrocycles in the electrocatalytic oxidation of sulfite. **J. Coord. Chem.**, Buffalo, v.59, n.13, p.1467-1475, 2006.

WALKER, R. Sulphiting agents in foods: some risk/benefit consideration. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.2, n.1, p.5-24, 1985.

WALKER, R. Toxicity testing and derivation of the ADI. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.15, suppl.1, p.11-16, 1998.

WARING, R.H.; KLOVRZA, J. Sulphur metabolism in autism. **J. Nutr. Environ. Med.**, York, v.10, p.25-32, 2000.

WARNER, C.; FAZIO, T., eds. **Food additives analytical manual**: a collection of analytical methods for selected food additives. Arlington: AOAC International, 1987. v.2, p.279-307.

WARNER, C.R.; DANIELS, D.H.; JOE Jr., F.L.; FAZIO, T. Reevaluation of Monier-Williams Method for determining sulfite in food. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, Washington, v.69, n.1, p.3-5, 1986.

WEDZICHA, B.L. Chemistry of sulphiting agents in food. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.9, n.5, p.449-459, 1992.

WEDZICHA, B.L. Suphur dioxide. **Nutr. Food Sci.**, Bradford, v.72, p.12-13, 19, 1981a.

WEDZICHA, B.L. Suphur dioxide part 2. **Nutr. Food Sci.**, Bradford, v.73, p.14-16, 1981b.

WEDZICHA, B.L.; HERRERA-VILORIA, J.C. Formation of sulphate ion during the dehydration of sulphited vegetables. **Food Addit. Contam.**, Basingstoke, v.8, n.6, p.683-692, 1991.

WEVER, J. Appearance of sulphite and *s*-sulphonates in the plasma of rats after intraduodenal sulphite application. **Food Chem. Toxicol.**, Amsterdam, v.23, n.10, p.895-898, 1985.

WILLIAMS, D.J.; SLATTERY, S.L.; NOTTINGHAM, S.M. A comparison of selected methods for determining sulfite in prawns. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.53, n.10, p.875-877, 1990.

WINNISCHOFER, H. **Interfaces e dispositivos baseados em porfirinas supramoleculares**. São Paulo, 2004. 140p. Tese de Doutorado – Instituto de Química – Universidade de São Paulo.

WHO – World Health Organization. **Assessing human health risks of chemicals**: derivation of guidance values for health-based exposure limits. Geneva: WHO, 1994. 73p. (Environmental Health Criteria, 170).

WHO – World Health Organization. **Evaluation of certain food additives (fifty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)**. Geneva: WHO Technical Report Series, no. 891, 2000.

WHO – World Health Organization. **Principles for the safety assessment of food additives and contaminants in food**. Albany: WHO Publications Center, 1987. 174p. (Environmental Health Criteria, v.70).

WHO – World Health Organization. **Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants**. Geneva, 1991. p.3-28, 365-420. (WHO Food Additives Series, v.28).

WHO – World Health Organization. **Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants**. Geneva, 1996. p.269-324, 377-402. (WHO Food Additives Series, v.28).

YABIKU, H.Y.; TAKAHASHI, M.Y.; MARTINS, M.S.; HEREDIA, R.; ZENEBON, O. Níveis de conservadores intencionais em sucos naturais de frutas comercializados no Brasil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v.47, n.1/2, p.65-75, 1987.

ZABOTTO, C.B. **Registro fotográfico para inquéritos dietéticos (utensílios e porções)**. Goiânia: Metha, 1996. 56p.

ZHANG, M.; ZHANG, C.; QI, H. Energy transfer electrogenerated chemiluminescence for the determination of sulfite. **Microchim. Acta**, v.144, n.1-3, p.155-160, 2004.

ZIQIANG; GENG, H.; BAI, J; YAN, G. Blood pressure of rats lowered by sulfur dioxide and its derivatives. **Inhalation Toxicol.**, New York, v.15, n.9, p.951-959, 2003.

N°

APÊNDICE I

QUESTIONÁRIO DE FREQUÊNCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS (QFCA)

Escola: _____

Nome: _____

Matrícula: _____ Série: _____ Turma: _____

Data da coleta: ____/____/_____ Data de nascimento: ____/____/_____

Peso (kg): _____ Altura (m): _____

Sexo: ( ) masculino ( ) feminino

E-mail (se desejar) _____

Autoriza enviar mensagens para este e-mail? ( ) Sim ( ) Não

Possui alergia? ( ) Sim ( ) Não De que tipo? _____

Onde costuma consumir os alimentos? ( ) Casa ( ) Escola ( ) Os dois ( ) Outro _____

Onde sua família costuma comprar os alimentos? ( ) Supermercado ( ) Sacolão ( ) Feira ( ) Outro _____

Você sabe o que são aditivos? ( ) Sim ( ) Não E sulfitos? ( ) Sim ( ) Não

Para que você acha que servem os aditivos? _____

Assinale com X quantas vezes você costuma consumir o alimento (N = nenhuma, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10), com que freqüência (D = diária, S = semanal, M = mensal, A = anual), a porção (quantidade) normalmente consumida, qual o tamanho da sua porção (P = pequena, M = média, G = grande) e a marca mais consumida ou conhecida. **Lembre-se que estas informações representam seu consumo nos últimos 6 meses**.

Tipo de alimentos	Quantas vezes você come											Quando				Porção que come	Sua porção é			Marcas mais consumidas
	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A		P	M	G	
Açúcar refinado (adicionado em bebidas como sucos, café, leite ou chá)																				
Batata cozida industrializada (em purê, maionese e outros tipos de saladas)																				
Batatas fritas congeladas																				
Camarões e lagostas (sozinhos ou em preparações)																				
Coco ralado (puro ou em preparações como quindim, cocada, queijadinha)																				
Cogumelos (em preparações como estrogonofe ou saladas)																				
Frutas secas e cristalizadas (ameixa, damasco, figo, uva)																				

Tipo de alimentos	Quantas vezes você come											Quando				Porção que come	Sua porção é			Marcas mais consumidas
	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	D	S	M	A		P	M	G	
Geléias artificiais (de qualquer sabor)																				
Legumes e verduras desidratadas																				
Leite de coco (em batidas ou preparações como peixe à baiana)																				
Néctares ou sucos de frutas (de qualquer sabor, menos caju)																				
Suco de caju																				
Raiz-forte (polpa de rábano ou wasabi)																				
Picles em conserva																				
Xarope de glicose (tipo Karo®)																				

APÊNDICE II

INSTRUÇÕES PARA PREENCHIMENTO DO QUESTIONÁRIO DE FREQUÊNCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS (QFCA)

No.: não preencher, deixar em branco.
Escola: nome da escola.
Nome: nome completo.
Matrícula: número da matrícula na escola.
Série: número da série que está cursando.
Turma: número ou letra da escola.

Data da coleta: **data atual.**
Data de nascimento: **data na qual nasceu.**
Peso (kg): **colocar o peso da última vez em que se pesou.**
Altura (m): **colocar a altura da última vez em que se mediu.**

Sexo: masculino ou feminino.
E-mail (se desejar): colocar o e-mail se quiser.
Autoriza enviar mensagens para este e-mail? sim ou não somente para quem preencheu o e-mail anteriormente.
Possui alergia? preencher sim ou não.
De que tipo? colocar o tipo da alergia ou o seu efeito.
Onde costuma consumir os alimentos? responder casa ou escola. Se for os dois responder a opção os dois. Se houver outro local escolher a opção outro e colocar o local no espaço reservado.
Onde sua família costuma comprar os alimentos? escolher quantas opções forem necessárias. Se houver outro local escolher a opção outro e colocar o local no espaço reservado.
Você sabe o que são aditivos? preencher sim ou não.
E sulfitos? preencher sim ou não.
Para que você acha que servem os aditivos? se não souber deixar em branco.
Deste ponto em diante a porção pode ser em unidades, colheres, conchas, copos, pegadores, vidro, frasco, ponta de faca, etc.
Açúcar refinado (adicionado em bebidas como sucos, café, leite ou chá): **colocar somente o açúcar refinado (não vale nem o açúcar cristal e nem o mascavo) utilizado para adoçar os alimentos, como as bebidas citadas anteriormente.**
Batata cozida industrializada (em purê, maionese e outros tipos de saladas): **é aquela batata que já vem em pacotes, limpas e pré-cozidas, prontas para serem consumidas. Não é aquela que compramos em feira e supermercados e limpamos para serem cozidas e consumidas.**
Batatas fritas congeladas: **são aquelas que vem em pacotes congeladas prontas para serem fritas ou que são consumidas nas grandes redes de lanchonetes junto com os lanches.**
Camarões e lagostas (sozinhos ou em preparações): **camarões e lagostas que podem ser consumidos como aperitivos ou em várias preparações.**
Coco ralado (puro ou em preparações como quindim, cocada, queijadinha): **coco ralado seco de pacote ou que é adicionado a diversas preparações, principalmente doces.**
Cogumelos (em preparações como estrogonofe ou saladas): **cogumelos em conserva (em vidro ou lata).**
Frutas secas e cristalizadas (ameixa, damasco, figo, uva): **somente aquelas frutas secas, muito consumidas no final do ano e Páscoa, em panetones, bolos ou puras.**
Geléias artificiais (de qualquer sabor): **aquelas de vidro que são passadas em pães, bolachas, etc.**
Legumes e verduras desidratadas: **aqueles que vem secos. Não são aqueles consumidos no dia-a-dia.**
Leite de coco (em batidas ou preparações como peixe à baiana): **aqueles em vidro.**
Néctares ou sucos de frutas (de qualquer sabor, menos caju): **todos os tipos de sucos industrializados que são comercializados em frascos, vidros ou garrafas, menos o de caju (colocar a quantidade em separado no item de baixo).**
Suco de caju
Raiz-forte (polpa de rábano ou wasabi): **aquela pasta verde que vem junto com sushi e sashimi.**
Picles em conserva: **aqueles legumes em conserva (cenoura, pepino).**
Xarope de glicose (tipo Karo®): **líquido doce viscoso parecido com mel, mas branco.**

APÊNDICE III

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL

1. Nome do Paciente:.....

Documento de Identidade Nº :..... Sexo: ( ) M ( ) F

Data de Nascimento:...../...../.....

Endereço:.....Nº:.....Apto:.....

Bairro:.....Cidade:.....

CEP:.....Telefone:.....

2. Responsável Legal:.....

Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.):.....

Documento de Identidade Nº:.....Sexo: ( ) M ( ) F

Data de Nascimento:...../...../.....

Endereço:.....Nº: .....Apto:.....

Bairro:.....Cidade:.....CEP:.....

Tel:.....

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

Título do Protocolo de Pesquisa: Consumo de sulfitos e análise quantitativa em alimentos

Pesquisador: Welliton Donizeti Popolim

Cargo/Função: nutricionista **Inscrição Conselho Regional Nº:** CRN-3ª. Região 5564

Departamento da FCF/USP: Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental

1. Avaliação do risco da pesquisa

Risco Mínimo (X) Risco Médio ( )

Risco Baixo ( ) Risco Maior ( )

(Probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como conseqüência imediata ou tardia do estudo.)

2. Duração da Pesquisa: O escolar participará da pesquisa no momento da aplicação do Questionário de Freqüência de Consumo de Alimentos (QFCA). A aplicação do QFCA a todos os escolares está prevista para ocorrer entre o 2º. semestre deste ano e o 1º. semestre de 2006.

III – EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA

Os sulfitos são produtos químicos, classificados como aditivos, utilizados pelas indústrias para conservar alimentos, tais como frutas secas, sucos industrializados (em frascos e em caixa longa vida) e vinhos. Durante pesquisa realizada com os sulfitos, entre 2002 e 2004, observamos a necessidade de saber que quantidade de sulfitos tem os alimentos consumidos por nós, principalmente entre os adolescentes que consomem grande quantidade de sucos industrializados, dentre outras bebidas. Desta forma, o objetivo deste trabalho é analisar a quantidade de sulfitos em alimentos consumidos por escolares de 5ª. a 8ª. séries do município de São Caetano do Sul. Os dados serão coletados por meio de questionário que avalia o consumo de alimentos, chamado de questionário de freqüência de consumo de alimentos (QFCA). Os alimentos mais consumidos pelos escolares serão coletados em supermercados do município para análise química em laboratório e confirmação da real quantidade de sulfitos adicionada a estes alimentos. Após a análise dos dados, os escolares serão informados, por meio de carta personalizada, sobre o perfil do seu hábito alimentar, com destaque para a identificação dos alimentos adicionados de sulfitos. Serão apresentadas recomendações gerais em relação ao hábito alimentar saudável e será oferecida palestra aos alunos e seus familiares sobre noções básicas de alimentação e nutrição, em local e horário a ser definidos com a diretora da escola.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

V – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS

Pesquisador Welliton Donizeti Popolim: Rua Traituba, 227 – apto. 82 – Saúde – 04142-050 – São Paulo – SP 11-5594-3870 ou 9964-5582 wpopolim@usp.br
Orientadora Profa. Dra. Marilene de Vuono Camargo Penteado: Av. Lineu Prestes, 580 – Cidade Universitária – 05508-900 – São Paulo – SP 11-3091-3656 devuono@usp.br

VI – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

_____ Assinatura do sujeito de pesquisa ou responsável legal

_____ Assinatura do pesquisador (carimbo ou nome legível)

ANEXO I

RESUMOS EM EVENTOS

MARTINS, P.R.; POPOLIM, W.D.; ARAKI, K.; TOMA, H.E.; PENTEADO, M. DE V.C. Sensor FIA para determinação de SO^3_{-2} em concentrados de frutas. In: REUNIÃO ANUAL, 31, Águas de Lindóia, 2008. **CD-ROM**. Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Química – SBQ, 2008, n.QI-146.

Sociedade Brasileira de Química (SBQ)

Sensor FIA para determinação de SO_3^{2-} em concentrados de frutas

Paulo R. Martins[1*](PG), Welliton D. Popolim[2](PG), Koiti Araki[1](PQ) e Henrique E. Toma[1](PQ), Marilene V. C. Penteado[2](PQ). ***pauloqmc@iq.usp.br***

[1] *Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia, Instituto de Química, USP*
[2] *Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP*

Palavras Chave: *FIA, eletrodo modificado, determinação de SO_3^{2-} em sucos concentrados.*

Introdução

Sais de sulfito são largamente utilizados na indústria alimentícia na conservação de alimentos e bebidas. Mas o consumo excessivo de alimentos contendo este conservante pode acarretar inúmeros problemas de saúde como: náuseas, urticárias e irritação gástrica em indivíduos sensíveis ao sulfito[1].

Neste aspecto, sensores FIA podem ser uma alternativa interessante para o controle de qualidade desses produtos, tendo-se em vista a praticidade, possibilidade de monitoramento contínuo e praticamente em tempo real quando comparada aos métodos convencionais como titulação iodométrica e Monier-Williams. Além disso, pode-se destacar a grande sensibilidade e faixa dinâmica de trabalho dos sensores FIA usando eletrodos modificados, na faixa de mM a sub-µM.

Resultados e Discussão

Uma cela FIA compacta conjugando uma cela de difusão e detector foi anteriormente desenvolvida. Contudo, foram percebidos algumas dificuldades operacionais como por exemplo falhas no contato elétrico, tempo muito longo para troca do eletrodo modificado e fragilidade do sistema. Isso decorria do fato da cela ter sido concebida para operar com eletrodos de FTO modificados com nanomateriais porfirínicos. Neste trabalho descrevemos os resultados obtidos com uma nova concepção de cela, que sofreu algumas alterações para melhorar todos os aspectos acima enumerados, mas também aumentar o seu desempenho e a reprodutibilidade dos sinais.

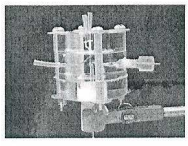


Fig. 1: Foto da cela FIA.

Assim, a nova cela foi concebida para utilizar um eletrodo removível. Este foi montado em teflon e fixado por pressão num orifício na peça inferior, sendo o espaçamento do canal controlado por um espaçador colocado entre a peça central e inferior. Esse arranjo tornou a substituição/regeneração do eletrodo muito mais fácil, sem a necessidade de desmontar a cela. Além disso, o eletrodo em teflon facilitou a regeneração e aumentou a homogeneidade do filme modificador.

Na figura 2 são mostrados os sinais obtidos para sulfito utilizando-se um eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de tetrapiridilporfirina coordenada a quatro grupos $[Ru^{II}(phen)_2Cl]^3$. As amostras foram injetadas num fluxo de H_2SO_4 2M e coletadas num fluxo coletor de tampão fosfato 0,1M pH 6,8 e KNO_3 0,2M. As análises foram realizadas aplicando-se E^0 = 0,85 V (EPH), usando um potenciostato/galvanostato PAR-283, e fluxo de 2 ml min^{-1}, alça de amostras 75 µL e gravidade.

Vários concentrados de frutas foram analisados logo depois da abertura do frasco. Todos os cuidados possíveis para evitar a oxidação pelo O_2 do ar foram tomados.

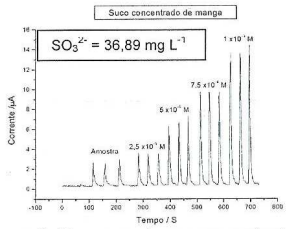


Figura 2: Fiagrama de um concentrado de manga e de soluções padrões.

Conclusões

Utilizando a técnica FIA o tempo de análise do sulfito em concentrados de frutas reduziu-se muito, sendo possível realizar uma análise em minutos. O método desenvolvido se mostrou reprodutível, confiável e de fácil uso. Tendo em vista os bons resultados está sendo desenvolvido um sistema de injeção automatizada bem como um sistema de aquisição e tratamento automático de dados, de modo a desenvolver um protótipo de sensores para monitoramento online de sulfito, nitrito e outros substratos de interesse.

Agradecimentos

CNPq, FAPESP.

[1] Taylor, S. L.; et al. *Advances in Food Research*, v. 30, p. 1-76, **1986**.
[2] Angnes, L.; et al. *Analytica Chimica Acta* 387 p.175-180, **1999**.
[3] Araki. K.; et al. Journal of Porphyrins and Phthalocyanines , v 2, p 467-472, **1998**

MARTINS, P.R.; POPOLIM, W.D.; GUTZ, I.G.R.; ANGNES, L.; PENTEADO, M. DE V.C.; TOMA, H.E.; FARAH, L.; TAKEMOTO, E.; LOPES, F.S.; ARAKI, K. Analisador amperométrico de sulfito em sucos concentrados de frutas por injeção em fluxo. In: REUNIÃO ANUAL, 32, Fortaleza, 30/05 a 02/06/09. Sociedade Brasileira de Química – SBQ.

Sociedade Brasileira de Química (SBQ)

Analisador amperométrico de sulfito em sucos concentrados de frutas por injeção em fluxo

***Paulo R. Martins[1] (PG), Welliton Popolim[2] (PG), Ivano G. R. Gutz[1] (PQ), Lúcio Angnes[1] (PQ), Marilene de V. C. Penteado[2] (PQ), Henrique E. Toma[1] (PQ), Letícia Farah[3] (PQ), Emy Takemoto[3] (PQ), Fernando Silva Lopes[1](TC), Koiti Araki[1](PQ). pauloqmc@iq.usp.br**

[1]Instituto de Química, Univ. São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 748, Butantã, São Paulo, SP, Brasil.
[2]*Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Univ. São Paulo, PRONUT , Av. Prof. Lineu Prestes 580, São Paulo, SP, Brasil*
[3]*Instituto Adolfo Lutz, Seção de Bebidas, Av. Dr. Arnaldo 355, São Paulo, SP, Brasil*

Palavras Chave: FIA, sulfito, porfirinas.

Introdução

Dentre os muitos conservantes utilizados na indústria alimentícia, a classe dos agentes sulfitantes merece uma atenção especial. Sulfitos são empregados comumente em alimentos com a finalidade de preservar a textura, o odor, as vitaminas e a cor dos alimentos, tornando-os atrativos para o consumidor. Mas, o consumo excessivo de alimentos contendo sulfitos pode acarretar reações adversas tais como diarréia, náuseas e irritação gástrica, em indivíduos sensíveis ao sulfito[1]. Sendo assim um monitoramento contínuo e eficaz torna-se necessário. Neste sentido, analisadores em fluxo possuem larga vantagem em relação a métodos tradicionais para a determinação de sulfito em alimentos como o método Monier-Williams[2] e titulação iodométrica[3], tanto pela sua rapidez, como pelo menor consumo de reagentes e de amostras. Neste trabalho apresentamos resultados obtidos com um analisador FIA completo desenvolvido no IQ-USP, integrando detector amperométrico, minipotenciostato, unidade de difusão gasosa (UDG) e válvulas solenóide, controlado por microcomputador, e os comparamos com métodos tradicionais.

Resultados e Discussão

A coleta das amostras de produtos alimentícios comerciais foi realizada em hipermercados e consistiu de sucos industrializados de caju, maracujá e uva e de água de coco. Três unidades de cada suco, da marcas principais, foram adquiridas, assim como duas unidades de marcas diferentes de água de coco.

A analise quantitativa de sulfito foi realizada por três métodos: Monier-Williams, titulação iodométrica e FIA. No caso do FIA, as amostras foram injetadas num fluxo de H_2SO_4 2 mol L^{-1} sendo parte do SO_2 coletado na UDG num fluxo de tampão fosfato pH 6,8 0,1 mol L^{-1} e KNO_3 0,2 mol L^{-1}, ambos com vazão de 1,5 mL min^{-1}. O eletrodo de carbono vítreo foi modificado com um filme de ZnTRP/FeTPPS por montagem eletrostática, onde ZnTRP é $ZnTPyP\{Ru(bipy)_2Cl_4\}$ $(TFMS)_5{\cdot}H_2O$ e FeTPPS é a *meso*-tetra(4-sulfonatofenil)porfirinato-ferrato(III). As análises foram realizadas aplicando-se E = 0,9 V (vs. Ag/AgCl) à célula, empregando alça de amostragem de 75 µL e controle de vazão por gravidade, obtendo-se a freqüência superior a 60 determinações por hora, com intercalação periódica de padrões. As amostras de sucos foram abertas em atmosfera inerte, para evitar a oxidação do sulfito pelo O_2 do ar.

Tabela 1 – Exemplos de comparação entre as médias dos resultados das análises de sucos de frutas concentrados pelos métodos M-W e FIA.

Tipo/marca	M-W (mg SO_2/L)	FIA (mg SO_2/L)
Suco de cajú /C	198,1 (±3,9)	199,0 (±3,0)
Suco de Uva /C	10,4 (±0,4)	14,5 (±0,4)
Água de coco /E	47,9 (±1,1)	58,6 (±0,4)

Conclusões

O analisador por injeção em fluxo apresentou sensibilidade e precisão similar à dos métodos tradicionais, sendo muito mais rápido e econômico no consumo de materiais, podendo ser usado para o monitoramento de sulfito em uma ampla faixa de concentrações, compatível com a encontrada em alimentos. Além disso, as análises em fluxo minimizam a manipulação das amostras, a influência do operador e o contato com o ar, diminuindo a possibilidade de contaminações e reação com o O_2. Este último fator é mais relevante para amostras com concentrações do aditivo relativamente baixas (inferiores a cerca de 50 ppm). Nenhuma das amostras apresentou níveis de sulfito acima do permitido pela legislação brasileira.

Agradecimentos

CNPq, FAPESP e RENAMI.

[1] Taylor, S. L.; et al. *Advances in Food Research*, v. 30, p. 1-76, **1986.**
[2] AOAC – Association Official Analytical Chemistry International .*AOAC official methods of analysis*. p. 29 – 31, **2006.**
[3] Vahl, J.M; Converse, J.E. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* V. 63, n 2, p 194 – 199, **1980.**

ANEXO II
DOCUMENTOS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FCF/FEA/FSP

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Nutrição Humana Aplicada

Instruções para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a argüição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para argüir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a argüição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a argüição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na argüição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 O candidato será aprovado por unanimidade ou por maioria.

5. Uma cópia da ata de defesa será encartada na versão definitiva do trabalho, que será depositada na biblioteca.

6. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 21 de março de 2005.

Profa. Dra. Silvia Maria Franciscato Cozzolino
Presidente da CPG/PRONUT/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 153/2005

São Paulo, 01 de novembro de 2005.

Ilmo(a). Sr(a).
Welliton Donizeti Popolim
Orientador: Prof. Marilene De Vuono Camargo Penteado
FBA

Prezado(a) Senhor(a),

Vimos informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 31 de outubro de 2005, **APROVOU** o projeto "Consumo de sulfitos e análise quantitativa em alimentos" (Protocolo CEP nº 321) apresentado por Vossa Senhoria, devendo apenas, ser apresentada, posteriormente, a carta de participação do Prof. Koiti Araki.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Ursula M. Campa Marques

Profª. Drª. Valentina Porta
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa da FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, nº 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone / Fax: (11) 3813-5093 - e-mail: cepfcf@usp.br

Ficha Aluno

Universidade de São Paulo

Documento sem validade oficial

89131 - 2015091/2 - Welliton Donizeti Popolim

Email:	wpopolim@usp.br
Data de Nascimento:	12/04/1972
Cédula de Identidade:	RG - 20.723.619-7 - SP
Local Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Nutricionista - Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 1993
Mestrado:	Mestre em Nutrição Humana Aplicada - Universidade de São Paulo - - São Paulo - Brasil - 2004

Curso:	Doutorado em Nutrição Humana Aplicada
Área:	Nutrição Humana Aplicada
Data da Matrícula:	15/02/2005
Início da Contagem de Prazo:	15/02/2005
Data Limite:	15/02/2009
Orientador(es):	Prof(a). Dr(a). Marilene de Vuono Camargo Penteado - 15/02/2005 a -- E.Mail: devuono@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 04/05/2005
Exame de Qualificação:	Aprovado em 13/08/2008
Data do Depósito do Trabalho:	
Data máxima para aprovação da Banca:	
Título do Trabalho:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Ocorrência:	Última matrícula em 24/07/2008

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Hor.	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Sit. Matric.
HNT5703-2	Introdução à Investigação Científica em Alimentos, Nutrição e Saúde Pública	01/03/2005	13/06/2005	60	4	100.00	B	N	Concluída
HNT5705-2	Consumo Alimentar em Populações	03/03/2005	02/05/2005	60	4	86.00	A	N	Concluída
EAD5894-3	Estratégias de Produtos e Novos Produtos	12/09/2005	16/12/2005	120	8	92.00	B	N	Concluída
Atividade do Programa	Publicação do trabalho "Avaliação do consumo alimentar pela internet por meio de inquérito de freqüência dietética simplificado", na Revista Nutrire, v. 32, n. 1, p. 11-22, 2007, São Paulo	01/04/2007	01/04/2007	-	4	0.00	-	-	-

Créditos mínimos exigidos	Para Exame de Qualificação	Para Depósito de Dissertação/Tese	Créditos obtidos	
Disciplinas:	20	20	**Disciplinas:**	20
Atividades Programadas:	0	0	**Atividades Programadas:**	0
Seminários:	0	0	**Seminários:**	0
Estágios:	0	0	**Estágios:**	0
Total:	20	20		20

Créditos Atribuídos à Tese : 76

Conceito até 31/12/1996:
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; D - Insuficiente, sem direito a crédito; E - Reprovado, sem direito a crédito; I - Incompleto; J - Abandono Justificado; T - Transferência.
Conceito a partir de 02/01/1997:
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a (0) horas de atividade programada.

Situação em: 12/02/2009 22:12