

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE SULFITOS EM VINHOS E EM
SUCOS DE FRUTAS E ESTIMATIVA DE SUA INGESTÃO**

RITA MARGARETE DONATO MACHADO
Engenheira de Alimentos
Mestre em Ciência de Alimentos

Profa. Dra. MARIA CECÍLIA DE FIGUEIREDO TOLEDO
Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos
da Universidade Estadual de Campinas para obtenção
do título de Doutor em Ciência de Alimentos

Campinas – SP

2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

M180d Machado, Rita Margarete Donato
Determinação dos níveis de sulfitos em vinhos e em sucos
de frutas e estimativa de sua ingestão / Rita Margarete Donato
Machado. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Maria Cecília de Figueiredo Toledo
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Dióxido de enxofre. 2. Vinho. 3. Sucos de frutas. 4.
Alimentos - Aditivos. 5. Estimativas. 6. Ingestão. I. Toledo,
Maria Cecília de Figueiredo. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(ckn/fea)

Titulo em ingles: Analytical determination of sulphites in wines and fruit juices and
estimation of their intake

Palavras-chave em inglês (Keywords): Sulfur dioxide, Wine, Fruit juices, Food – Additive,
Estimates, Intake

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Maria Cecília de Figueiredo Toledo

Anne Hélène Fostier

Eduardo Vicente

Elizabeth de Souza Nascimento

Neura Bragagnolo

Sílvia Amélia Verdiani Tfouni

Programa de Pós-Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Cecília de Figueiredo Toledo
(orientadora)

Profa. Dra. Anne Hélène Fostier

Dr. Eduardo Vicente

Profa. Dra. Elizabeth de Souza Nascimento

Profa. Dra. Neura Bragagnolo

Dra. Sílvia Amélia Verdiani Tfouni

Aos meus pais pela eterna motivação e
ao meu marido Ricardo pelo amor e carinho ...

...

O valor das coisas não está no tempo que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem.

Por isso, existem momentos inesquecíveis,
coisas inexplicáveis e
pessoas incomparáveis.

...

(Fernando Pessoa)

Agradecimentos

À Profa. Dra. Maria Cecília de Figueiredo Toledo pela orientação e motivação que me impulsionaram para a realização plena desse projeto;

ao Dr. Eduardo Vicente pelo apoio técnico e pela constante disponibilidade nos momentos de dúvidas;

ao Centro de Química e Nutrição Aplicada do Instituto de Tecnologia de alimentos, em especial aos pesquisadores, técnicos e estagiários do laboratório de Bromatologia pela incalculável colaboração na execução desse trabalho e pelos bons momentos de convívio;

ao cnpq pela concessão de bolsa e taxa de bancada;

ao Departamento de Ciência de Alimentos e aos amigos e colegas do Laboratório de Toxicologia de Alimentos que tanto me auxiliaram em mais essa etapa, em especial à técnica Sílvia Helena Vitorino;

aos amigos que conquistei durante esses anos na UNICAMP, em especial a Sílvia Helena, Mônica Camargo, Sílvia Amélia, Karla Nery, Adriana Pavesi, Suzana Okubo, Pricila e tantos outros que fizeram e fazem parte da minha vida;

à minha família que tanto me apoiou, em especial ao meu irmão José Luiz pela inúmeras vezes em que me estendeu a mão;

ao meu marido Ricardo pelo companheirismo e incentivo ao longo dessa jornada;

e a Deus pelo amparo em todos os momentos no cumprimento de mais essa etapa e a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho através do incentivo, amizade e sugestões técnicas.

Sumário

Resumo Geral	01
Summary	03
Introdução Geral	05
Referências Bibliográficas	07
Capítulo 1: Revisão bibliográfica: Sulfitos em alimentos	09
Resumo	11
Abstract	11
1. Introdução	13
2. Propriedades químicas dos sulfitos	15
3. Aplicações tecnológicas dos agentes sulfitantes	17
4. Metodologias de análise	22
5. Toxicidade dos sulfitos	26
6. Avaliação do risco a sulfitos	29
7. Considerações finais	34
Referências bibliográficas	34
Capítulo 2: Determinação dos níveis de sulfitos em vinhos e estimativa de sua ingestão	43
Resumo	45
Abstract	47
1. Introdução	49
2. Materiais e métodos	53
2.1. Amostragem	53
2.2. Procedimento analítico	53

Reagentes	53
Preparação da amostra	54
Sistema de destilação	54
Preparação do sistema	55
Quantificação do dióxido de enxofre	55
Confirmação gravimétrica da presença de SO ₂	56
Recuperação	57
2.3. Avaliação da exposição aos sulfitos pelo consumo de vinhos	58
3. Resultados e discussão	59
3.1. Determinação analítica dos sulfitos	59
3.2. Avaliação da exposição aos sulfitos pelo consumo de vinhos	65
4. Conclusão	68
Referências bibliográficas	69

Capítulo 3: Analytical determination of sulphites in fruit juices

available on the Brazilian market	75
Abstract	77
1. Introduction	79
2. Materials and methods	82
2.1. Reagents	82
2.2. Sampling	82
2.3. Sample preparation	83
2.4. Determination	83
2.5. Gravimetric confirmation procedure	84
2.6. Recovery	85
3. Results and discussion	86
4. Conclusion	91
References	91

Capítulo 4: Estimation of the intake of sulphites by adolescents from the consumption of fruit juices in Brazil	95
Abstract	97
1. Introduction	99
2. Procedure	102
2.1. Food consumption data	102
2.2. Analytical data	104
2.3. Intake estimate modeling	104
3. Results e discussion	105
4. Conclusion	111
References	111
 Conclusão Geral	 117
 Anexos	 119
Anexo 1: Sistema de destilação empregado nas análises e montado de acordo com o modelo descrito na AOAC (1995) para o método Monier- Williams otimizado.....	119
Anexo 2: Sulfato de bário precipitado após adição de 4 gotas de HCl a 1N e solução de cloreto de bário (BaCl_2) a 10% em excesso na solução de H_2O_2 titulada com NaOH para confirmação gravimétrica da presença de SO_2	121

Índice de tabelas

Capítulo 1 – Revisão bibliográfica: Sulfitos em alimentos	09
Tabela 1: Fórmulas químicas, rendimento teórico de SO ₂ e respectivos números de identificação internacional dos agentes sulfitantes .	15
Tabela 2: Alimentos em que os agentes sulfitantes podem ser adicionados com a função de conservadores e seus respectivos limites máximos, de acordo com a legislação brasileira vigente	18
Tabela 3: Diferentes técnicas analíticas empregadas para a determinação quantitativa de sulfitos em alimentos e bebidas	24
 Capítulo 2: Determinação dos níveis de sulfitos em vinhos e estimativa de sua ingestão	 43
Tabela 1: Valores de recuperação de dióxido de enxofre em amostras analisadas pelo método oficial da AOAC (1995) após adição de metabissulfito de sódio	59
Tabela 2: Resultados da análise gravimétrica e seus respectivos valores de recuperação em relação às concentrações obtidas na análise titulométrica	61
Tabela 3: Concentração de sulfitos, expressos como SO ₂ , em vinhos nacionais e importados	62
Tabela 4: Estimativa da contribuição dos vinhos como fonte de exposição aos sulfitos com base em níveis médios de sulfitos determinados nas amostras combinados com três cenários distintos de consumo	66

Capítulo 3: Analytical determination of sulphites in fruit juices available on the Brazilian market	75
Table 1: Recovery and coefficient of variation (CV) of sulphur dioxide (SO ₂) in fruit juice samples fortified with sodium metabisulphite and analysed by AOAC official method (AOAC, 1995)	86
Table 2: SO ₂ concentrations from gravimetric analyses in comparison with those from titration	87
Table 3: Sulphite concentration (mg/L) found in concentrated fruit juices analysed by the optimized Monier-Williams method	88
Table 4: Sulphite concentration (mg/L) in fruit juices as served to the consumer	89
 Capítulo 4: Estimation of the intake of sulphites by adolescents from the consumption of fruit juices in Brazil	 95
Table 1: Contribution of fruit juices to the daily intake of sulphites (mg/kg bw per day) by adolescents	106
Table 2: Mean daily intake of sulphites (mg/kg bw per day) from each type of fruit juice by selected adolescents (n=140) and the intakes at the 90 th , 95 th and 97.5 th percentiles of the distribution	107

Índice de figuras

Capítulo 2: Determinação dos níveis de sulfitos em vinhos e estimativa de sua ingestão	43
Figura 1: Aparato utilizado no método de destilação Monier-Williams otimizado pelo FDA	54
Figura 2: Histograma de frequência das concentrações de sulfito (mg de SO ₂ /L) nas amostras de vinhos brancos e tintos	63
Figura 3: Histograma de frequência das concentrações de sulfito (mg de SO ₂ /L) nas amostras de vinhos brancos (a) e tintos (b) de acordo com a categoria fino ou comum	65
 Capítulo 4: Estimation of the intake of sulphites by adolescents from the consumption of fruit juices in Brazil	 95
Figure 1: Distribution of the daily consumption of fruit juices by selected adolescents	103
Figure 2: Distribution of sulphite intake among the selected adolescents from consumption of mango juice	108

Resumo Geral

Embora os sulfitos sejam utilizados amplamente na indústria de alimentos, a ingestão desses aditivos têm sido associada a reações adversas em humanos, tais como broncoespasmos em indivíduos asmáticos sensíveis. Em avaliação da exposição aos sulfitos conduzida pelo Comitê Conjunto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA) durante sua 51ª reunião em 1998, concluiu-se que o consumo de determinados alimentos e bebidas pode resultar em valores de ingestão de sulfitos acima da Ingestão Diária Aceitável (IDA) de 0,7 mg/kg peso corpóreo/dia, expressa como dióxido de enxofre (SO_2). Com base nessas informações, o Comitê do Codex sobre Aditivos e Contaminantes de Alimentos (CCFAC) recomendou que a exposição diária a sulfitos a partir de todos os alimentos e bebidas fosse novamente avaliada pelo JECFA. O presente trabalho teve como objetivo a determinação analítica dos níveis de sulfito residual em vinhos e em sucos de frutas disponíveis comercialmente na região de Campinas, utilizando para isso o método oficial de Monier-Williams otimizado. Os níveis de sulfitos determinados foram comparados com valores máximos estabelecidos pela legislação brasileira e posteriormente utilizados para estimar a contribuição de vinhos e sucos de frutas como fonte de ingestão diária desses conservadores na dieta. Foram adquiridas 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 recordatório de 24 horas. A ingestão média de sulfitos a partir do consumo de sucos de frutas ficou bem abaixo da IDA estabelecida pelo JECFA. 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 ingestões 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.

Palavras chaves: sulfitos, vinhos, sucos de frutas, conservadores de alimentos, estimativas de ingestão, destilação Monier-Williams.

Summary

ANALYTICAL DETERMINATION OF SULPHITES IN WINES AND FRUIT JUICES AND ESTIMATION OF THEIR INTAKE. Although sulphites are used worldwide in the food industry, they have been implicated in causing adverse-type reactions in humans, such as asthmatic reactions (bronchospasms) in some subjects with asthma. Additionally, it was reported by the Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) at its fifty-first meeting that the consumption of certain foods and beverages may result in intakes of sulphites above the Acceptable Daily Intake (ADI) of 0.7 mg/kg body weight, driving the Codex Committee on Food Additives and Contaminants to recommend Member States to monitor sulphite intake in their countries. The present work aimed on determining the residual sulphite content in a variety of wines and sulphite-containing fruit juices commercially available in the region of Campinas-SP in order to check whether current uses of these preservatives are in accordance with the Brazilian legislation. These data were also used to estimate the contribution of wines and fruit juices to the intake of sulphites in Brazil. Seventy-five samples of wines (66 of national brands and 9 of brands from other South American countries), 15 samples of other alcoholic beverages (ciders, fruit-based beverages and sparkling wines), and 39 samples of national fruit juices, either concentrated (37) or ready-to-drink (2) were collected on the market, and analysed for sulphites using the optimized Monier-Williams distillation method. All samples of beverages presented residual sulphite levels, expressed as sulphur dioxide, below 350 mg/L (maximum permitted level established by the Brazilian legislation) with most samples (90%) containing residual sulphite up to 150 mg/L. The samples of fruit juices presented residual sulphite levels below 50% of the national maximum permitted level of 200 mg/L (333 mg/L for cashew apple juice). To estimate the contribution of wines to the intake of sulphites three hypothetical scenarios of wine daily consumption were assumed: 150, 300 and 450 mL. The data on intake indicated that the daily consumption of 150 mL of wine that contain sulphites at the level equal to or above 150 mg/L may contribute with more than 50% of the ADI of these additives. The contribution of fruit juices to the sulphite intake was assessed using consumption

data from a group of 11-17 year-old Brazilian adolescents generated by a 24-hour dietary recall. The calculated sulphite intakes for average consumers of fruit juices were lower than the ADI set by the JECFA. However, estimates at the 95th percentile indicated that the consumption of juices containing sulphites at a concentration of 40 mg/L or above, what is the case of Antilles cherry, guava, mango, pineapple, and tomato juices, may lead to the intakes of these additives equal to or above the ADI. Despite the results have indicated that the actual use of sulphites by the industry in wines and fruit juices are well below those legally permitted by the Brazilian legislation, the ADI of sulphites may be exceeded by individuals whose dietary patterns lead to a high regular consumption of wines and sulphite-containing fruit juices.

Keywords: sulphites, wines, fruit juices, food preservatives, food additive intake, Monier-Williams distillation

Introdução Geral

Sulfitos são aditivos alimentares amplamente utilizados na indústria de alimentos e bebidas e incluem o dióxido de enxofre (SO₂) e seus sais de sódio, potássio e cálcio, que liberam SO₂ nas condições de uso (Taylor et al., 1986). Os agentes sulfitantes atuam na inibição da deterioração provocada por bactérias, fungos e leveduras em alimentos ácidos, e na inibição de reações de escurecimento enzimático e não enzimático durante processamento e estocagem. Adicionalmente, os sulfitos são utilizados como agentes antioxidantes e redutores em várias aplicações tecnológicas (Liu & Pilone, 2000; Ribera et al., 2001).

Apesar da eficácia dos sulfitos, diversos efeitos adversos à saúde humana têm sido associados à sua ingestão, principalmente broncoespasmos em indivíduos asmáticos sensíveis a sulfitos (Yang & Purchase, 1985; Taylor et al., 1986; Anibarro et al., 1992; Peroni & Boner, 1995; Vally & Thompson, 2003). Sérios distúrbios neurológicos também foram diagnosticados em uma pequena parcela da população com reduzida atividade da enzima sulfito oxidase, responsável pela conversão de sulfito a sulfato, este último inócuo e rapidamente excretado pelo organismo (Kisker et al., 1997; Edwards et al., 1999).

O uso de conservadores e outros aditivos alimentares em diferentes países é limitado por legislações específicas, estabelecidas com base na segurança de uso e necessidade tecnológica. O Brasil, assim como outros países, segue as recomendações do JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) na utilização segura dos aditivos em alimentos e bebidas (Brasil, 1997).

Em uma avaliação da exposição aos sulfitos conduzida pelo JECFA utilizando os limites máximos que estão sendo propostos para sulfitos no âmbito da Norma Geral Codex para Aditivos Alimentares, em conjunto com os dados de ingestão de alimentos fornecidos por alguns países, concluiu-se que certos alimentos e/ou bebidas tais como frutas secas, sucos de frutas e vinhos, são as principais fontes da ingestão de sulfitos. Observou-se, ainda, que o consumo desses alimentos e/ou bebidas pode resultar em valores de ingestão de sulfitos acima de sua IDA

(Ingestão Diária Aceitável) de 0,7 mg/kg peso corpóreo/dia, expressa como SO₂ (WHO, 2000).

Em âmbito internacional, tem sido uma preocupação constante a ingestão excessiva de sulfitos, o que se reflete na recente recomendação do Comitê do Codex sobre Aditivos e Contaminantes de Alimentos (CCFAC) para que a exposição diária a sulfitos a partir de todos os alimentos e bebidas seja novamente avaliada pelo JECFA (Codex Alimentarius Commission, 2006). A esta solicitação foi dada alta prioridade na última reunião do CCFA (Comitê do Codex sobre Aditivos de Alimentos) ocorrida em abril de 2007 em Pequim (Beijing) na China (Codex Alimentarius Commission, 2007).

Em vista disso, torna-se importante conhecer os níveis residuais de sulfitos presentes em alimentos e/ou bebidas que podem vir a representar importante fonte de exposição a estes aditivos alimentares no Brasil, assim como a sua contribuição para a ingestão diária de sulfitos na dieta. Cabe destacar que a quantidade de sulfitos adicionadas em um alimento ou bebida não reflete os teores remanescentes no momento do consumo do produto, devido a perdas que podem ocorrer durante processamento e estocagem (Taylor et al., 1986; WHO, 2000). Portanto, o monitoramento do uso e ingestão de sulfitos com base em dados analíticos resultará em uma avaliação de exposição mais realista desses conservadores (WHO, 2000).

Levando em conta essas informações, o presente estudo teve como objetivo a determinação analítica dos níveis de sulfito residual em vinhos e em sucos de frutas disponíveis comercialmente na cidade de Campinas-SP, utilizando o método oficial de Monier-Williams otimizado (AOAC, 1995). Os níveis de sulfitos determinados analiticamente foram comparados com valores máximos estabelecidos pela legislação brasileira e posteriormente utilizados para estimar a contribuição de vinhos e sucos de frutas como fonte de ingestão diária desses conservadores na dieta.

O capítulo 1 do presente trabalho apresenta uma revisão bibliográfica intitulada “Sulfitos em Alimentos”, publicada na revista Brazilian Journal of Food Technology (v. 9, n. 4, p. 265-275, out./dez. 2006). Os artigos que correspondem

aos capítulos 2 e 4 foram redigidos segundo as normas de publicação da revista Food Additives and Contaminants e o artigo do capítulo 3 segundo as normas da revista Journal of Food Composition and Analysis.

Referências Bibliográficas

- Anibarro, B.; Caballero, M. T.; García-Ara, M. C.; Díaz-Pena, J. M.; Ojeda, J. A. Asthma with sulfite intolerance in children: a blocking study with cyanocobalamin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 90, n. 1, p. 103-109, 1992.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1995. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 16th Edition (Arlington, Virginia, USA: AOAC International), Chapter 47, p. 27-29, 1995.
- Brasil. *Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997*. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego. Diário Oficial da União; Brasília, DF, 28 de outubro de 1997.
- Codex Alimentarius Commission. Report of the 38th Session of the Codex Committee on Food Additives and Contaminants. *ALINORM 06/29/12* - The Hague, The Netherlands 24-28 April 2006.
- Codex Alimentarius Commission. Report of the 39th Session of the Codex Committee on Food Additives. *ALINORM 07/30/12* - Beijing, China 24-28 April 2007.
- Edwards, M. C.; Johnson, J. L.; Marriage, B.; Graf, T. N.; Coyne, K. E.; Rajagopalan, K. V.; Macdonald, I. M. Isolated sulfite oxidase deficiency – review of two cases in one family. *Ophthalmology*, v. 106, n. 10, p. 1957-1961, 1999.
- Kisker, C.; Schindelin, H.; Pacheco, A.; Wehbi, W. A.; Garrett, R. M.; Rajagopalan, K. V.; Enemark, J. H.; Rees, D. C. Molecular basis of sulfite oxidase deficiency from the structure of sulfite oxidase. *Cell*, v. 91, p. 973-983, 1997.

- Liu, S-Q.; Pilone, G. J. An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 35, p. 49–61, 2000.
- Peroni, D. G.; Boner, A. L. Sulfite sensitivity. *Clinical and Experimental Allergy*, v. 25, p. 680-681, 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 Additives and Contaminants*, v. 18, n. 2, p. 103-114, 2001.
- Taylor, S. L.; Higley, N. A.; Bush, R. K. Sulfites in foods: uses, analytical methods, residues, fate, exposure, assessment, metabolism, toxicity, and hypersensitivity. *Advances in Food Research*, v. 30, p. 1-76, 1986.
- Vally, H.; Thompson, P. J. Allergic and asthmatic reactions to alcoholic drinks. *Addiction Biology*, v. 8, p. 3-11, 2003.
- World Health Organisation (WHO). Evaluation of certain food additives (Fifty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). *WHO Technical Report Series*, N° 891 (Geneva: WHO), 2000.
- Yang, W. H.; Purchase, E. C. R. Adverse reactions to sulfites. *Canadian Medical Association Journal*, v. 133, n. 1, p. 865-867, 1985.

Capítulo 1

Revisão bibliográfica: Sulfitos em alimentos

Revisão bibliográfica: Sulfitos em alimentos

Resumo

Apesar da ampla utilização de sulfitos na indústria de alimentos, inúmeros efeitos adversos à saúde humana têm sido relacionados à ingestão desses aditivos alimentares, entre eles náusea, irritação gástrica local, urticária e broncoespasmos em indivíduos asmáticos sensíveis. Esta revisão aborda diferentes aspectos associados ao emprego dos agentes sulfitantes como aditivos alimentares tais como: propriedades químicas, metodologias de análise, regulamentação de uso, potencial tóxico e avaliação do risco.

Palavras chaves: sulfitos, aditivos alimentares, conservadores de alimentos,

Abstract

Although sulphites are used worldwide in the food industry, they have been implicated in causing adverse-type reactions in humans, such as local gastric irritation, nausea, headaches, urticaria, and asthmatic reactions (bronchospasms) in some subjects with asthma. This paper provides an overview on the different aspects related to the use of sulphites as food additives including chemical properties, methodology of analysis, regulation of use, toxicological potential, and risk evaluation.

Key words: sulphite, food additives, food preservatives

1. Introdução

Sulfitos ou agentes sulfitantes têm uma longa história de uso como ingredientes de alimentos e incluem o dióxido de enxofre (SO_2) e as diversas formas de sulfitos inorgânicos que liberam SO_2 nas condições de uso (TAYLOR et al., 1986; LECLERCQ et al., 2000). Essas substâncias também podem derivar da produção endógena de leveduras durante a fermentação de vinho e cerveja (TAYLOR et al., 1986).

Os agentes sulfitantes são classificados como aditivos alimentares e atuam na inibição da deterioração provocada por bactérias, fungos e leveduras em alimentos ácidos, e na inibição de reações de escurecimento enzimático e não enzimático durante processamento e estocagem. Adicionalmente, os sulfitos são utilizados como agentes antioxidantes e redutores em várias aplicações tecnológicas (TAYLOR et al., 1986; LECLERCQ et al., 2000; RIBERA et al., 2001).

Devido às suas múltiplas funções, os sulfitos são amplamente utilizados em alimentos, bebidas e produtos farmacêuticos. No entanto, apesar da eficácia dos sulfitos, inúmeros efeitos adversos à saúde humana têm sido relacionados à sua ingestão, principalmente, crises asmáticas em indivíduos asmáticos sensíveis a sulfitos (YANG e PURCHASE, 1985; TAYLOR et al., 1986; FAZIO e WARNER, 1990; ANIBARRO et al., 1992; WÜTHRICH et al., 1993; PERONI e BONER, 1995; WARNER et al., 2000; VALLY e THOMPSON, 2003). Sérios distúrbios neurológicos também foram diagnosticados em uma pequena parcela da população com reduzida atividade da enzima sulfito oxidase, responsável pela conversão de sulfito a sulfato, este último inócuo e rapidamente excretado pelo organismo (KISKER et al., 1997; EDWARDS et al., 1999). Os mecanismos de ação que poderiam explicar a intolerância aos agentes sulfitantes ainda são controversos, sendo mais provável que mecanismos múltiplos atuem em conjunto, o que poderia explicar as diferenças observadas entre os vários casos registrados de sensibilidade a esses compostos (ANIBARRO et al., 1992; PERONI e BONER, 1995).

O uso de conservadores e outros aditivos alimentares em diferentes países é limitado por legislações específicas, estabelecidas com base na segurança de uso

e necessidade tecnológica. O Brasil, assim como outros países, segue as recomendações do JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) na utilização segura dos aditivos em alimentos (BRASIL, 1997).

Em avaliação da exposição aos sulfitos conduzida pelo JECFA utilizando os limites máximos que estão sendo propostos para sulfitos no âmbito da Norma Geral Codex para Aditivos Alimentares, em conjunto com os dados de ingestão de alimentos fornecidos por alguns países, concluiu-se que frutas secas, geléias, sucos de frutas e vinhos são as principais fontes da ingestão de sulfito (WHO, 2000). Observou-se, ainda, que o consumo desses alimentos poderá resultar em valores de ingestão acima da Ingestão Diária Aceitável (IDA = 0,7 mg/kg peso corpóreo/dia, expressa como SO₂), quando o nível residual de sulfitos nesses alimentos se aproximar do limite máximo permitido (WHO, 2000). Estudos de ingestão de sulfitos em vários países europeus foram publicados, alertando sobre o uso indiscriminado dos agentes sulfitantes, principalmente em alimentos que não necessitam de cozimento antes do consumo, como as frutas desidratadas e bebidas alcoólicas. De acordo com esses estudos, uma parcela da população adulta pode exceder a ingestão diária aceitável (IDA) através do consumo de vinhos (MARESCHI et al., 1992; VERGER et al., 1998; LECLERCQ et al., 2000).

É necessário, portanto, que se realizem estudos que forneçam dados da quantidade de sulfitos presente em alimentos que mais contribuem para a sua ingestão, de forma a possibilitar estimativas de exposição mais próximas do real. No entanto, a determinação analítica de sulfitos em alimentos é dificultada em decorrência da elevada reatividade desses compostos (WEDZICHA, 1984, 1992). Diversos métodos utilizam soluções ácidas ou básicas (AOAC, 1995), e a maioria dos procedimentos baseia-se no princípio da conversão das várias formas de sulfito a dióxido de enxofre (HILLERY et al., 1989; FAZIO e WARNER, 1990; WARNER et al., 2000).

Com base nessas considerações, o presente trabalho faz uma revisão de diferentes aspectos associados à utilização dos agentes sulfitantes como aditivos alimentares incluindo propriedades químicas, metodologias de análise, regulamentação de uso, aspectos toxicológicos e segurança de uso.

2. Propriedades químicas dos sulfitos

Os termos “agente sulfitante” e “sulfito” referem-se ao dióxido de enxofre gasoso ou aos sais de sódio, potássio e cálcio de sulfito hidrogênio (bissulfito), dissulfito (metabissulfito) ou íons de sulfito. Os sulfitos utilizados como aditivos alimentares permitidos pela legislação brasileira estão listados na Tabela 1.

Tabela 1. Fórmulas químicas, rendimento teórico de SO₂ e respectivos números de identificação internacional dos agentes sulfitantes.

Substância	Fórmula química	Rendimento teórico de SO ₂ (%)	INS
Dióxido de enxofre	SO ₂	100	220
Metabissulfito de sódio	Na ₂ S ₂ O ₅	67,4	223
Metabissulfito de potássio	K ₂ S ₂ O ₅	57,6	224
Sulfito de cálcio	CaSO ₃ .2 H ₂ O	64,0	226
Sulfito de sódio	Na ₂ SO ₃ (anidro)	50,8	221
Sulfito de potássio	K ₂ SO ₃	---*	225
Bissulfito de cálcio	Ca(HSO ₃) ₂	---*	227
Bissulfito de sódio	NaHSO ₃	61,6	222
Bissulfito de potássio	KHSO ₃	53,3	228

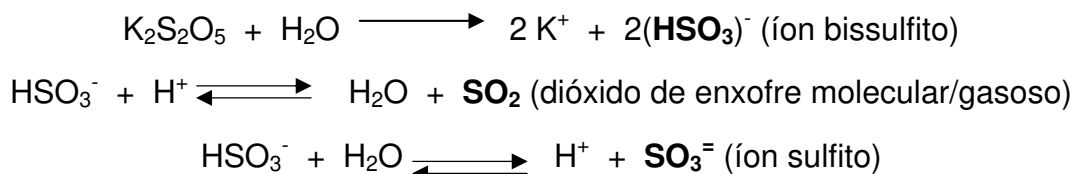
Fonte: (LÜCK e JAGER, 1997; BRASIL, 1988; ABIA, 2001)

INS: International Numbering System (Sistema Internacional de Numeração)

* não foi encontrado na literatura

Os agentes sulfitantes são quimicamente equivalentes após incorporação no alimento, uma vez que são convertidos às mesmas espécies iônicas ou não-iônicas em um determinado pH, força iônica, concentração não-eletrolítica e temperatura.

O esquema a seguir mostra a dissociação do metabissulfito de potássio ($K_2S_2O_5$) em meio aquoso (OUGH, 1986; WEDZICHA, 1992).



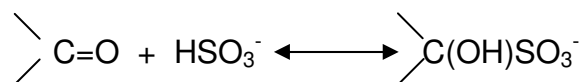
O íon bissulfito é a espécie predominante em alimentos que apresentam pH entre 3 e 7, enquanto que em valores de pH menores que 3 e maiores que 7, o desvio do equilíbrio é direcionado para a formação de SO_2 molecular e íon sulfito, respectivamente (WARNER et al., 2000).

Parte dos sulfitos adicionados em alimentos pode se ligar reversível ou irreversivelmente a outras moléculas presentes na matriz, como aldeídos, cetonas, açúcares, taninos e proteínas, originando diferentes formas combinadas de sulfitos. A fração de sulfitos que não se liga a outros compostos do alimento é definida como sulfito livre, constituindo uma mistura de SO_2 , íons bissulfito e íons sulfito em um equilíbrio químico dinâmico. Essa fração é convertida rapidamente em dióxido de enxofre molecular quando o alimento sulfitado é acidificado (FAZIO e WARNER, 1990; WEDZICHA, 1992; LÜCK e JAGER, 1997).

Sulfito ligado é normalmente representado pela proporção do aditivo que está na forma de adutos hidroxissulfonados, formados pela reação de grupos carbonilas com o íon HSO_3^- . A reatividade dos sulfitos em alimentos deve-se à elevada nucleofilicidade do íon bissulfito (WEDZICHA, 1992).

A reversibilidade da ligação do íon bissulfito a componentes de alimentos é definida em termos da natureza lábil dos adutos sob determinadas condições de pH e temperatura (WEDZICHA, 1992). Sulfitos ligados reversivelmente podem se dissociar e formar sulfito livre quando o pH do alimento é elevado para valores acima de 10, ou quando soluções acidificadas são aquecidas até ebulição (OUGH, 1986; FAZIO e WARNER, 1990; LÜCK e JAGER, 1997; LECLERCQ et al., 2000).

A formação de um aduto hidroxissulfonado pode ser ilustrada com a seguinte equação estequiométrica (WEDZICHA, 1992).



Os compostos presentes em alimentos que se ligam ao íon bissulfito para formar adutos hidroxissulfonados reversíveis são, em sua maioria, glicose, xilose e L-xilose, arabinose, ácido galacturônico (liberado a partir da degradação da pectina) e acetaldeído, ácido pirúvico e ácido 2-cetoglutarico, como subprodutos da fermentação de leveduras. A reação dos sulfitos com antocianinas, derivados de nicotinamida, flavoenzimas e folatos também forma ligações do tipo reversível (WEDZICHA, 1992).

Os adutos ligados irreversivelmente são formados, geralmente, quando os sulfitos reagem com alcanos ou compostos aromáticos para formar ácidos sulfônicos, não sendo recuperados quando o alimento sulfitado é submetido a condições alcalinas ou quando é destilado em meio ácido (WARNER et al., 1986; WEDZICHA, 1992). As principais contribuições para formar ligações irreversíveis com sulfitos em alimentos são de intermediários da reação de escurecimento não enzimático e das ligações de dissulfeto de proteínas (SWALES e WEDZICHA, 1992; WEDZICHA, 1992).

3. Aplicações tecnológicas dos agentes sulfitantes

De acordo com a legislação brasileira, dióxido de enxofre e seus sais são classificados como aditivos alimentares e seu emprego está restrito a alguns alimentos conforme ilustrado na Tabela 2.

Tabela 2. Alimentos em que os agentes sulfitantes podem ser adicionados com a função de conservadores e seus respectivos limites máximos, de acordo com a legislação brasileira vigente.

Alimentos	Limite máximo (g/100g – g/100 ml) (expresso em SO ₂ residual)
Açúcar refinado	0,002
Batata descascada cozida (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	0,004
Subcategorias: Prontas para o consumo e preparados líquidos	
Camarões e lagostas (exclusivamente na matéria-prima após a captura)	0,003 (no produto cozido)
Camarões e lagostas (exclusivamente na matéria-prima após a captura)	0,01 (no produto cru)
Cervejas (somente ditonito)	0,006
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

Continuação da Tabela 2

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) (metabilssulfito 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 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	0,004

Fonte: (ABIA, 2001; BRASIL, 1988, 1999a, 1999b, 2002, 2005b, 2005c).

* - no produto a ser consumido

Os sulfitos são antimicrobianos seletivos com efeito inibitório sobre bactérias e leveduras (LÜCK e JAGER, 1997). A atividade antimicrobiana dos sulfitos é dependente de sua forma química, sendo mais pronunciada em valores de pH inferior a 3, devido à maior liberação de dióxido de enxofre molecular (TAYLOR et al., 1986; USSEGLIO-TOMASSET, 1992).

Dióxido de enxofre molecular existe como um gás ou molécula simples, com odor e sabor sulfuroso, sendo a única forma que pode atravessar as paredes celulares de leveduras e bactérias. Comparativamente ao íon bissulfito, possui ação antimicrobiana 500 vezes mais ativa contra leveduras e 1000 vezes contra bactérias (USSEGLIO-TOMASSET, 1992). A ligação de sulfitos com componentes

dos alimentos afeta a sua atividade porque os adutos hidroxissulfonados não apresentam ação antimicrobiana (TAYLOR et al., 1986; WEDZICHA, 1992).

Os sulfitos são amplamente utilizados na indústria de vinhos devido à sua capacidade de eliminar bactérias e leveduras indesejáveis ao processo e por auxiliar a extração de pigmentos. Apresentam ainda ação antioxidante que protege da oxidação os compostos responsáveis pelo padrão sensorial dos vinhos (Burroughs, 1981; Ough, 1986).

O efeito antioxidante dos sulfitos é parcialmente responsável pela inibição do escurecimento não enzimático e enzimático (TAYLOR et al., 1986; LÜCK e JAGER, 1997) e se baseia, principalmente, em sua capacidade de seqüestrar outros agentes oxidantes que são formados quando o oxigênio entra em contato com o alimento. Como exemplo, pode-se citar a reação do ácido ascórbico com oxigênio, que forma ácido dehidroascórbico e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Este último é um agente oxidante forte que pode oxidar outros componentes do alimento, conferindo aroma indesejável. Os agentes sulfitantes reagem rapidamente com o H_2O_2 , protegendo assim outros constituintes do alimento (OUGH, 1986).

As reações de escurecimento não enzimático mais importantes são a reação de Maillard, que envolve aminoácidos e açúcares redutores, e a caramelização de açúcares. Uma variedade de intermediários carbonílicos podem ser formados durante o processo de escurecimento não enzimático, incluindo açúcares redutores, carbonílicos simples, dicarbonílicos e α,β -carbonílicos insaturados. Os sulfitos, devido a sua elevada reatividade, podem reagir com todos esses intermediários e, desta forma, bloquear a formação de pigmentos marrons (TAYLOR et al., 1986; SWALES e WEDZICHA, 1992; WEDZICHA, 1992; LÜCK e JAGER, 1997).

Os sulfitos também podem agir como inibidores de inúmeras enzimas, incluindo polifenoloxidase, ascorbato oxidase, lipoxigenase, peroxidase e enzimas dependentes de tiamina (TAYLOR et al., 1986; IYENGAR e McEVILY, 1992; WARNER et al., 2000). A polifenoloxidase (PFO) é encontrada em frutas e vegetais e a inibição de sua atividade é amplamente utilizada no controle da

deterioração enzimática. A atividade da PFO é alta em alimentos que são particularmente sensíveis ao escurecimento oxidativo, como batatas, maçãs, cogumelos, bananas, pêssegos, sucos de frutas e vinhos. Sulfitos podem inibir diretamente a enzima ou também interagir com os intermediários da reação de escurecimento, impedindo sua participação nas reações que levam à formação de pigmentos escuros (TAYLOR et al., 1986; IYENGAR e McEVILY, 1992; WARNER et al., 2000). Uma prática muito comum na prevenção da formação de melanose (manchas pretas) em camarões e lagostas é a imersão desses crustáceos em uma solução contendo sulfitos. A reação de formação de melanose é catalisada pela enzima tirosinase, um tipo de PFO (TAYLOR et al., 1986; CINTRA et al., 1999).

Sulfitos também são amplamente utilizados como condicionadores de massa na indústria de biscoitos e massas. Nesses produtos, os agentes sulfitantes atuam na quebra das ligações de dissulfeto na fração de glúten da massa (RIBERA et al., 2001). Dióxido de enxofre também tem sido utilizado para auxiliar a extração de pectinas de várias fontes através de sua capacidade de despolimerização (TAYLOR et al., 1986).

Devido ao intenso odor que pode ser aparente em alimentos, os sulfitos são em geral empregados, como conservadores temporários, sendo adicionados primariamente aos produtos crus ou semi-prontos e removidos durante o processamento pela ação do calor ou vácuo (LÜCK e JAGER, 1997).

Uma das principais desvantagens da utilização dos agentes sulfitantes em alimentos é a perda da atividade da vitamina B1 (tiamina). A destruição da tiamina ocorre devido a um ataque nucleofílico irreversível do íon bissulfito ao nitrogênio quaternário do anel tiazol. Além disso, os sulfitos também podem agir como catalisadores de outros nucleófilos que em sua ausência não reagiriam com a tiamina (WEDZICHA, 1992).

4. Metodologias de análise

Diversos métodos utilizam soluções ácidas ou básicas na determinação de sulfitos (total e livre) em alimentos (AOAC, 1995), e a maioria dos procedimentos baseia-se no princípio da conversão das várias formas de sulfito a dióxido de enxofre (WARNER et al., 2000).

O procedimento de Monier-Williams foi o primeiro de muitos métodos analíticos desenvolvidos para a determinação de sulfitos em alimentos e bebidas. O método baseia-se na separação do dióxido de enxofre da matriz alimentar, através do aquecimento com ácido clorídrico por aproximadamente duas horas. O dióxido de enxofre liberado é coletado em uma solução de peróxido de hidrogênio, onde é oxidado a ácido sulfúrico e, em seguida, titulado com solução de hidróxido de sódio. A concentração de dióxido de enxofre é relacionada diretamente com a quantidade de ácido sulfúrico gerado. Esse método quantifica sulfitos totais no alimento, que correspondem ao sulfito livre mais uma fração dos sulfitos ligados (WARNER et al., 1986; FAZIO e WARNER, 1990; LÜCK e JAGER, 1997).

A destilação de Monier-Williams é aplicável em diversas matrizes, com exceção dos vegetais das famílias *Brassica* e *Allium*, porque os mesmos possuem, como componentes do aroma, dissulfetos que podem interferir na análise (WEDZICHA, 1992).

Em 1989 o FDA (US Food and Drug Administration) propôs alterações no método de destilação de Monier-Williams, que permitiram a quantificação de sulfitos em concentrações iguais ou superiores a 10 mg/L em alimentos, uma vez que este nível de sensibilidade era requerido pela legislação de rotulagem de alimentos vigente nos Estados Unidos. As modificações não alteraram a química do método, mas estabeleceram especificações adicionais para se obter maior sensibilidade. Uma das alterações foi a redução da concentração do titulador por um fator de 10, que permitiu medidas mais exatas e sensíveis dos níveis residuais de SO₂. Além disso, foi diminuído o risco da co-destilação de substâncias interferentes tais como ácidos e bases voláteis através das novas especificações para temperatura de resfriamento do condensador, taxa de refluxo e fluxo de nitrogênio (HILLERY et al., 1989). O método de Monier-Williams otimizado pelo

FDA foi utilizado para a determinação de dióxido de enxofre em vários tipos de alimentos comercializados nos Estados Unidos. Entre os alimentos analisados, as frutas secas apresentaram os maiores níveis de sulfitos, variando de 2259 a 3722 mg/kg. Os dados desse estudo mostraram que, com algumas exceções, os níveis residuais de sulfitos em alimentos comercializados naquele país estavam abaixo dos níveis máximos permitidos para cada uso (DANIELS et al., 1992).

Em diversos países, incluindo o Brasil, a indústria de vinhos utiliza a titulação iodométrica, baseada no método Ripper, para o controle dos níveis de sulfito livre e ligado durante a elaboração dos vinhos devido a sua conveniência e rapidez (OUGH, 1986; WILLIAMS et al., 1992; BRASIL, 2005a). Embora o método Ripper seja amplamente utilizado, autores de um estudo colaborativo (VAHL e CONVERSE, 1980) não recomendaram o método para adoção pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists), devido à baixa precisão e grande erro sistemático. As dificuldades na obtenção de resultados confiáveis com o método Ripper devem-se, principalmente, a diferenças na interpretação do ponto de viragem em amostras de vinho tinto, devido a variações nas cores desses vinhos e à presença de adutos formados pela ligação entre as antocianinas e os íons bissulfito. Esses adutos se dissociam facilmente em meio ácido e o dióxido de enxofre liberado é titulado como sulfito livre (VAHL e CONVERSE, 1980).

Em substituição aos métodos de titulação, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector eletroquímico foi implantada em algumas indústrias para a determinação de SO₂ total em vinhos. Em um estudo comparativo, a CLAE forneceu níveis equivalentes de SO₂ total em relação àqueles obtidos com a destilação Monier-Williams. A grande vantagem da cromatografia é a simplicidade na preparação da amostra e o menor tempo de análise, aproximadamente 12 minutos. Entretanto, devido à demora na estabilização do detector eletroquímico, em torno de 12 horas, a determinação de SO₂ utilizando CLAE seria mais indicada para análises de rotina com um número grande de amostras (WILLIAMS et al., 1992).

Para minimizar tempo e custo analítico, métodos alternativos baseados em sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA) têm sido desenvolvidos para a determinação de sulfitos em alimentos e bebidas. Entre as vantagens inerentes

aos sistemas por injeção em fluxo estão a minimização de contaminações e a facilidade de associação com vários tipos de detectores. Nesse contexto, detecções fotométrica, eletroquímica e quimiluminescente são as técnicas mais empregadas para detectar o SO₂ liberado das amostras (SULLIVAN et al., 1986; DECNOP-WEEVER e KRAAK, 1997; SÁDECKÁ e POLONSKÝ, 1999; CORBO e BERTOTTI, 2002; ISAAC et al., 2006). Embora vários métodos estejam disponíveis na literatura para a determinação de sulfitos em alimentos e bebidas (WEDZICKA, 1984; OUGH, 1986; FAZIO e WARNER, 1990; AOAC, 1995; ISAAC et al., 2006), muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas com o intuito de buscar um método simples, rápido e sensível que possa ser utilizado em uma ampla faixa de amostras. A Tabela 3 apresenta detalhes de alguns estudos em que diferentes técnicas de análise foram empregadas na determinação quantitativa de sulfitos.

Tabela 3: Diferentes técnicas analíticas empregadas para a determinação quantitativa de sulfitos em alimentos e bebidas.

Referência	Matriz	Técnica de Quantificação
ANDERSON et al., 1986	Maçã seca, suco de frutas, cogumelo, cebola, batata, vinhos, entre outros	Extração com ácido fosfórico 2 N e análise por cromatografia iônica com detector eletroquímico.
SULLIVAN et al., 1986	Vinhos, suco de maçã, damasco e maçã secos, batata, cebola em conserva, camarão, repolho e alface	Análise por injeção em fluxo baseada na descoloração do verde de malaquita para indicar a presença de SO ₂ .
YABIKU et al., 1987	Sucos naturais de frutas (graviola, caju, goiaba, maracujá, manga, abacaxi, uva, entre outros)	Destilação Monier-Williams com modificações relacionadas ao ácido, à concentração do indicador e ao sistema de destilação usado.
PAÍNO-CAMPA et al., 1991	Lingüiça fresca	Extração com diferentes solventes e análise por cromatografia iônica com detector eletroquímico.
DANIELS et al., 1992	Frutas secas (damasco, pêssego), batata, camarão, suco de frutas, cogumelos e outros	Destilação Monier-Williams otimizada pelo FDA.

Continuação da Tabela 3

SU e TAYLOR, 1995	Margarina, vinagre e aroma de manteiga	Destilação Monier-Williams otimizada pelo FDA.
TRENERRY, 1996	Vinhos, vegetais frescos, damasco seco, mostarda, camarão, dentre outros	Destilação Monier-Williams para liberar SO ₂ , subsequente oxidação de sulfito a sulfato e quantificação utilizando eletroforese capilar.
DECNOP-WEEVER e KNAAK, 1997	Vinhos	Análise por injeção em fluxo com detecção fotométrica utilizando uma célula de difusão gasosa.
LOWINSOHN e BERTOTTI, 2001	Vinhos	Extração de SO ₂ com ácido hidrocloreídrico e quantificação utilizando titulação coulométrica com iodo.
BRAGAGNOLO et al., 2001	Cogumelos em conserva	Destilação Monier Williams modificada por Shipton.
HARDISSON et al., 2002	Camarão	Destilação Monier Williams, método AOAC (1984).
CORBO e BERTOTTI, 2002	Suco de uva e vinhos	Análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica utilizando eletrodo de cobre.
McFEETERS e BARISH, 2003	Conserva de vegetais, purê de batata desidratado e maçã desidratada	Determinação de sulfito livre e ligado utilizando CLAE com detector de UV.
SEZGINTÜRK e DINÇKAYA, 2005	Biscoito, cerveja e vinagre	Biosensor amperométrico com homogeneizado de tecido de planta. No estudo foi utilizado <i>Malva vulgaris</i> que contem a enzima sulfito oxidase em grande quantidade.

Em decorrência do fato de que sulfitos livres e ligados atuam no organismo da mesma forma (WEDZICHA, 1992; LÜCK e JAGER, 1997) e que a atividade antimicrobiana dos sulfitos é dependente de sua forma química (TAYLOR et al., 1986; USSEGLIO-TOMASSET, 1992), também estão sendo conduzidas

pesquisas com a finalidade de desenvolver métodos de análise dos produtos de reação dos sulfitos com componentes de alimentos, como aqueles formados com os grupos carbonilas (LEA et al., 2000).

No presente, a destilação Monier-Williams é o procedimento mais comumente utilizado na quantificação de sulfitos em alimentos e bebidas, sendo adotado como método oficial em muitos países (DANIELS et al., 1992; AOAC, 1995; LECLERCQ et al., 2000; ISAAC et al., 2006). Adicionalmente, desde a sua primeira versão publicada em 1927, o método de Monier-Williams continua sendo o método de escolha e de referência para o desenvolvimento de novas metodologias (HILLERY et al., 1989; FAZIO e WARNER, 1990; ISAAC et al., 2006).

5. Toxicidade dos sulfitos

Embora os sulfitos sejam amplamente utilizados na indústria de alimentos e bebidas, efeitos adversos à saúde humana têm sido relacionados à sua ingestão, principalmente, anafilaxia, urticária, angioedema, hipotensão, náusea, irritação gástrica local, diarreia e crise asmática em indivíduos asmáticos sensíveis a sulfitos (YANG e PURCHASE, 1985; TAYLOR et al., 1986; FAZIO e WARNER, 1990; ANIBARRO et al., 1992; WÜTHRICH et al., 1993; PERONI e BONER, 1995; WARNER et al., 2000; VALLY e THOMPSON, 2003). A quantidade de sulfito necessária para desencadear as reações adversas em humanos é variável: enquanto certos indivíduos toleram até 4 g de sulfito diariamente sem efeitos indesejáveis, outros reclamam de dores de cabeça, náuseas e diarreia após a ingestão de quantidades muito inferiores (LÜCK e JAGER, 1997). Sulfitos livres e ligados atuam no organismo da mesma forma, sendo que as diferenças ocorrem somente na intensidade e velocidade com que as reações de sensibilidade se iniciam (TAYLOR et al., 1986; WEDZICHA, 1992).

A ingestão de alimentos contendo sulfitos tem sido considerada como uma das principais causas de broncoespasmos em indivíduos asmáticos (ANIBARRO et al., 1992; PERONI e BONER, 1995; VALLY e THOMPSON, 2003), muito embora indivíduos sensíveis a sulfitos sem histórico de reações asmáticas também possam

apresentar reações adversas após ingestão de alimentos sulfitados (YANG e PURCHASE, 1985; FDA, 1996). Os dados disponíveis indicam que tal ocorrência atinge cerca de 5 a 10% dos adultos asmáticos (SIMON et al., 1982) e que indivíduos sensíveis a sulfito são mais afetados quando essas substâncias são inaladas (ANIBARRO et al., 1992; NANNINI e HOFER, 1997; WARNER et al., 2000). Em crianças que apresentam quadro clínico severo de asma, a ocorrência dessas reações pode afetar um número maior de indivíduos, de 35 a 65% (FRIEDMAN e EASTON, 1987; BONER et al., 1990).

Embora os mecanismos envolvidos na manifestação de sensibilidade aos sulfitos ainda estejam pouco esclarecidos, registros clínicos permitiram verificar que certas condições médicas, como asma severa e dependência de esteróis, estavam associadas a uma predisposição à hipersensibilidade a sulfitos, e que o dióxido de enxofre era o agente responsável pelas respostas fisiológicas adversas (LESTER, 1995; WARNER et al., 2000). Um possível mecanismo baseia-se na ação do SO₂ sobre os receptores de membrana traqueobronquiais, induzindo um reflexo colinérgico (SNASHALL e BALDWIN, 1982; PERONI e BONER, 1995). De fato, a broncoconstrição por sulfito em humanos tem sido atenuada pela administração de agentes anticolinérgicos (PERONI e BONER, 1995). Entretanto, ainda não há explicação amplamente aceita da patogênese dessas reações e da prevalência de sensibilidade a sulfitos em crianças (ANIBARRO et al., 1992; PERONI e BONER, 1995).

Em um estudo realizado para verificar a frequência e as características de reações asmáticas iniciadas por bebidas alcoólicas em uma população de asmáticos, constatou-se que 33,1% dos 366 pacientes acima de 18 anos associaram o consumo de bebidas alcoólicas com o início de crise asmática em pelo menos 2 ocasiões. Nesse mesmo estudo, os vinhos foram identificados como os principais causadores de respostas asmáticas em 30,3% dos entrevistados (VALLY et al., 2000). Apesar da limitação de evidências diretas, vários estudos sugerem que os sulfitos sejam os principais causadores de reações asmáticas causadas por vinhos (VALLY et al., 2000; VALLY e THOMPSON, 2001).

Desde 1985, reações adversas à saúde causadas pelo consumo de alimentos e bebidas contendo sulfitos são monitoradas nos Estados Unidos. Durante os primeiros 10 anos, mais de 1000 casos foram relatados. Entretanto, devido a mudanças na legislação de alimentos e a campanhas de conscientização para que indivíduos sensíveis a sulfitos aprendessem a evitar alimentos sulfitados, o número de registros caiu para uma média anual de 10 casos, entre os anos de 1996 e 1999 (FDA, 1996; TIMBO et al., 2004).

Um outro mecanismo possível para a toxicidade de sulfitos envolve a deficiência no metabolismo oxidativo de sulfitos, que atinge uma pequena parcela da população com reduzida atividade da enzima sulfito oxidase (KISKER et al., 1997; EDWARDS et al., 1999). A enzima sulfito oxidase é responsável pela oxidação de sulfito (SO_3) endógeno e exógeno ao inativo sulfato (SO_4), que é rapidamente excretado na urina. O sulfito endógeno é formado durante a reação terminal da degradação oxidativa dos aminoácidos cisteína e metionina (TAYLOR et al., 1986; PERONI e BONER, 1995; KISKER et al., 1997). A deficiência da enzima sulfito oxidase é uma condição autossomal recessiva que se manifesta na infância, ocasionando doenças neurológicas severas e progressivas, dentre elas deslocamento ocular, retardamento mental e atrofia cerebral (KISKER et al. 1997; EDWARDS et al., 1999).

A atividade reduzida da sulfito oxidase ocasiona acúmulo de sulfito no organismo, não estando ainda esclarecido se os danos que ocorrem no cérebro são resultado dos níveis tóxicos de sulfito, da ausência (ou diminuição da quantidade) de sulfato ou, ainda, de uma combinação de ambos (KISKER et al., 1997). Adicionalmente, os sulfitos podem destruir a tiamina, através da ruptura da ligação entre a pirimidina e a porção tiazol da molécula, resultando em um metabolismo anormal do piruvato no sistema nervoso central (TAYLOR et al., 1986; LÜCK e JAGER, 1997; EDWARDS et al., 1999).

Os mecanismos de ação que poderiam explicar a intolerância aos agentes sulfitantes ainda são controversos, sendo mais provável que mecanismos múltiplos atuem em conjunto, os quais poderiam explicar as diferenças observadas entre os vários casos que têm sido registrados de sensibilidade a esses compostos (ANIBARRO et al., 1992; PERONI e BONER, 1995).

Em uma avaliação realizada pela IARC (International Agency for Research on Cancer) os sulfitos foram classificados como pertencentes ao Grupo 3, isto é, não oferecem risco de carcinogenicidade a humanos (IARC, 1992).

6. Avaliação do risco a sulfitos

O uso de conservadores e outros aditivos alimentares em diferentes países é limitado por legislações específicas, estabelecidas com base na segurança de uso e necessidade tecnológica. O Brasil, assim como muitos outros países, segue as recomendações do JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and Contaminants) na utilização segura dos aditivos em alimentos (BRASIL, 1997). De acordo com o JECFA, o uso seguro de um aditivo pode ser expresso em termos de sua IDA (Ingestão Diária Aceitável), que representa a quantidade de uma substância, expressa em mg/kg peso corpóreo, que pode ser ingerida diariamente, por toda a vida, sem afetar a saúde humana, com base em informações toxicológicas disponíveis na época da avaliação. Em 1974, o JECFA estabeleceu uma IDA de grupo para sulfitos, expressa como dióxido de enxofre, de 0,7 mg/kg p. c., que foi mantida durante o último encontro realizado pelo comitê em 1999 (WHO, 2000).

Em uma avaliação preliminar da ingestão dos agentes sulfitantes presentes em alimentos utilizando o método Budget (HANSEN, 1979) e os limites máximos que estão sendo propostos na Norma Geral Codex para Aditivos Alimentares (NGAA), verificou-se a necessidade de investigações mais detalhadas levando-se em consideração níveis máximos nacionais de uso e dados de consumo de alimentos por populações ou indivíduos (FAO/WHO, 1999).

Levando em consideração essas informações, o Comitê do Codex sobre Aditivos e Contaminantes de Alimentos (CCFAC) recomendou aos Estados Membros que submetessem dados nacionais de ingestão desses aditivos ao JECFA para avaliação. Durante sua 51ª reunião em 1999, o JECFA avaliou a ingestão dos agentes sulfitantes com base em informações de 10 estados membros (WHO, 2000). As estimativas nacionais de ingestão de sulfitos avaliadas

pelo comitê foram baseadas nos limites máximos de uso especificados na NGAA, nos níveis máximos permitidos pela União Européia, nos limites máximos de uso nacionais e em dados analíticos dos níveis residuais de dióxido de enxofre. Estimativas de ingestão diária *per capita* de sulfitos, baseadas em dados de produção/desaparecimento do aditivo ou alimento sulfitado e em níveis máximos de uso nacionais, submetidas por 6 Estados Membros, variaram de 0,07 mg/kg p.c na Finlândia a 3 mg/kg p.c. na França (para grandes consumidores). Segundo o Comitê, estimativas baseadas nesses dados resultaram em valores superestimados de ingestão devido a perdas não contabilizadas que podem ocorrer durante processamento, estocagem e manipulação caseira dos alimentos sulfitados. As estimativas de ingestão obtidas utilizando dados de dietas modelo ou de registros de consumo individual variaram de 0,03 mg/kg p.c. a 30 mg/kg p.c., sendo que valores superestimados ocorreram quando a ingestão diária *per capita* foi calculada com base nos limites máximos especificados na NGAA. O Comitê observou que as estimativas de ingestão *per capita* de sulfitos feitas pelo Japão e Estados Unidos, que utilizaram níveis analíticos de sulfitos em alimentos prontos para o consumo, foram muito menores do que aquelas obtidas pelo restante dos estados membros, que utilizaram níveis máximos nacionais de uso. Embora alguns métodos para estimar a ingestão diária, notadamente aqueles baseados nos limites máximos e faixa de alimentos propostos na NGAA, terem mostrado que os grandes consumidores de alimentos sulfitados podem exceder a IDA, a ingestão média de sulfitos, estimada a partir de dados de consumo de dietas modelo ou de registro de dieta individual baseada em níveis máximos nacionais de uso, ficou abaixo da IDA. O Comitê concluiu que os dados submetidos foram insuficientes para identificar e estimar o número dos grandes consumidores de sulfitos (WHO, 2000).

Os resultados da avaliação da ingestão de aditivos alimentares permitidos no Reino Unido, realizada com base em dados de produção e níveis de uso dos fabricantes, indicaram que, para a maioria dos aditivos, as estimativas de ingestão *per capita* estavam abaixo das respectivas IDAs, com exceção dos aditivos dióxido de enxofre, nitrato de sódio, ácido benzóico, eritrosina e urucum/bixina (LAWRIE e REES, 1996). Em uma avaliação mais detalhada da ingestão de sulfitos com base

em dados analíticos e em uma pesquisa nacional de consumo de alimentos entre adultos do Reino Unido, constatou-se que os níveis residuais de dióxido de enxofre nos alimentos estavam geralmente muito abaixo das quantidades inicialmente adicionadas e que a ingestão estimada estava abaixo da IDA, até mesmo para indivíduos considerados grandes consumidores (LAWRIE e REES, 1996).

De acordo com estudo realizado na França, o consumo de bebidas alcóolicas representava mais de 90% da ingestão estimada de sulfitos, sendo o consumo médio de dióxido de enxofre pela população em geral igual a 20 mg/dia/pessoa, valor este abaixo da IDA de 42 mg/dia/pessoa, com base em um peso corpóreo de 60 kg. Entretanto, verificou-se que o consumo de vinhos contribuía com 85% da ingestão de sulfitos e que, no caso de se considerar apenas consumidores, os níveis médios de ingestão de sulfitos poderiam variar entre 10 mg/dia/pessoa para o consumidor ocasional de vinho a 40 mg/dia/pessoa para o consumidor regular (MARESCI et al., 1992). Posteriormente, a ingestão diária máxima teórica (IDMT) dos sulfitos na França foi estimada com base em níveis máximos permitidos de uso para cada categoria de alimento e em dados de compra de mais de 30.000 produtos alimentares em 6.000 domicílios no período de 1 ano. Nesse estudo, os valores da IDMT para os agentes sulfitantes excederam a IDA e os vinhos e as frutas secas foram identificados como os principais responsáveis pela exposição teórica a sulfitos, totalizando 77% da ingestão. Os autores concluíram que não foi possível identificar os grupos de riscos e que dados analíticos de sulfitos em alimentos e dados individuais de consumo, particularmente para crianças, seriam necessários para uma futura avaliação de risco desses compostos (VERGER et al., 1998).

Em um estudo mais detalhado realizado na Itália, que teve como objetivo investigar a ingestão de sulfitos a partir de dietas elaboradas para adultos e crianças, foi observado que os níveis residuais de sulfito em alimentos prontos para o consumo eram menores do que os limites máximos permitidos. Os autores também verificaram que o consumo de refeições elaboradas resultaria em uma ingestão de sulfitos de 23,4 mg/dia (11% acima da IDA) por crianças e 50,3 mg/dia (20% acima da IDA) por adultos, para pesos corpóreos de 30 e 60 kg,

respectivamente. Nesse estudo, foram analisadas 211 amostras de alimentos e bebidas (incluindo 85 amostras de vinhos) e os itens que mais contribuíram para a ingestão de sulfitos foram as frutas secas e os vinhos. Foi observado também que, levando-se em consideração somente o consumo de vinhos, os grandes consumidores poderiam alcançar até 99% da IDA para sulfitos, com um consumo diário de 451 mL (LECLERCQ et al., 2000).

Em 1999, em uma primeira tentativa para obtenção de uma perspectiva global da ingestão de aditivos alimentares no âmbito do perfil alimentar na União Européia, o Comitê Científico em Alimentos da Comunidade Européia elaborou diretrizes para que os Estados Membros enviassem dados de monitoramento do consumo de aditivos alimentares. Um relatório preliminar com resultados de ingestão para adultos e crianças foi elaborado com informações enviadas por 12 países membros. Neste relatório, verificou-se que o consumo da maior parte dos 171 aditivos e grupos de aditivos atualmente autorizados na União Européia ficou abaixo da ingestão diária aceitável. No entanto, de acordo com os resultados enviados pela Dinamarca, Espanha, França, Itália, Holanda, Reino Unido e Noruega, a estimativa de ingestão de sulfitos para um adulto de 60 kg ficou entre 20 e 266% da IDA e no caso de crianças (com peso corpóreo de 15 kg), a estimativa de ingestão de sulfitos excedeu a IDA em 1227%. No caso dos sulfitos, foram realizadas estimativas de ingestão conservadoras baseadas no pressuposto de que o aditivo é utilizado na faixa mais ampla possível de alimentos, no nível máximo permitido de uso. O Comitê Científico em Alimentos da Comunidade Européia recomendou aos Estados Membros que mais países enviassem informações sobre o consumo de aditivos e que as estimativas de ingestão fossem refinadas com base em dados reais de uso dos aditivos e de consumo real de alimentos (EUROPEAN COMMISSION, 2001).

No Brasil, são poucos os dados disponíveis sobre ingestão dos agentes sulfitantes pela população brasileira. A maioria dos estudos refere-se à determinação de sulfitos em alimentos e bebidas para fins de fiscalização. Em um desses estudos, 51% de 473 amostras de sucos de frutas integrais, disponíveis no comércio brasileiro no período de outubro de 1986 a março de 1987, apresentaram teores de dióxido de enxofre superiores ao limite máximo permitido

pela legislação brasileira que, na época, correspondia a 200 mg/L (YABIKU et al., 1987). Os maiores teores de SO₂ foram encontrados no suco de caju, atingindo o máximo de 1.439 mg/L. De acordo com a legislação hoje vigente, o limite máximo de dióxido de enxofre em sucos de frutas ainda permanece o mesmo (200 mg/L), exceto para o suco de caju pronto para consumo e suco de caju com alto teor de polpa, que tiveram seus limites aumentados para 333 mg/L e 3000 mg/L, respectivamente (BRASIL, 2002).

Mais recentemente, uma estimativa da ingestão de sulfitos por alunos do ensino médio foi obtida através da análise qualitativa da dieta, utilizando para isso os limites máximos de uso permitidos pela legislação brasileira e dados de consumo fornecidos por um questionário recordatório de 24 horas. Foram coletadas informações de 176 adolescentes entre 14 e 19 anos em duas escolas do Estado de São Paulo, uma pública e outra particular. O consumo de pelo menos uma fonte de sulfito foi relatado por 43,8% da amostragem. As principais fontes de sulfitos foram os sucos industrializados e similares, consumidos por 81,8% dos escolares que ingeriram fontes alimentares de sulfitos. Os alunos da escola pública consumiram quase que exclusivamente sucos industrializados e similares, enquanto que os da escola particular relataram outras fontes de exposição, como as bebidas alcoólicas, representadas, principalmente, pelo vinho e cerveja. A ingestão média *per capita* diária de sulfitos na amostra pesquisada foi de 0,07 mg/kg p. c., valor bem abaixo da IDA de 0,7 mg/kg p. c.. Somente 4,5% da amostra pesquisada tiveram ingestões maiores que 50% da IDA, ou seja, acima de 0,35 mg SO₂/kg p. c./dia. Esses escolares, classificados como grandes consumidores de sulfitos, alcançaram níveis diários de ingestão de sulfitos de até 0,52 mg /kg p. c. devido ao consumo elevado de sucos de frutas industrializados (mais de 500 mL/dia) e, no caso da escola particular, devido também ao consumo de bebidas alcólicas (POPOLIM e PENTEADO, 2005).

Resultados preliminares de pesquisa conduzida por Machado et al, (MACHADO et al., 2006a, 2006b, 2006c), que tem como objetivo estimar a ingestão de sulfitos através do consumo de sucos de frutas e vinhos no Brasil, indicaram que as concentrações de sulfitos presentes nesses produtos estão abaixo dos respectivos limites máximos permitidos pela legislação brasileira. Os

resultados desse estudo salientam também a importância do uso de dados analíticos no cálculo das estimativas de ingestão de aditivos alimentares, particularmente, para aqueles aditivos com baixa IDA que são amplamente utilizados em alimentos e bebidas.

7. Considerações finais

Embora os sulfitos sejam aditivos cujo nível de uso normalmente não reflete a quantidade remanescente em um alimento no momento de seu consumo, em razão de perdas durante o processamento e/ou estocagem, os dados disponíveis indicam que sua ingestão diária pode se aproximar ou exceder a IDA para alguns indivíduos.

Em âmbito internacional, tem sido uma preocupação constante a ingestão excessiva de sulfitos, o que se reflete na recente recomendação do Comitê do Codex sobre Aditivos e Contaminantes de Alimentos (CCFAC) para que a exposição diária a sulfitos a partir de todos os alimentos e bebidas seja novamente avaliada pelo JECFA (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION 2006, 2007).

Apesar da utilidade e versatilidade dos agentes sulfitantes como aditivos alimentares, recomenda-se que métodos alternativos de conservação sejam utilizados pela indústria de alimentos e bebidas, particularmente nas aplicações em que são adicionadas concentrações elevadas desses aditivos.

Referências bibliográficas

- ABIA. **Compêndio da legislação brasileira de alimentos** – Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação, seção 3.31, 2001.
- ANDERSON, C.; WARNER, C. R.; DANIELS, D. H.; PADGETT, K. L. Ion chromatographic determination of sulfites in foods. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 69, p. 14-19, 1986.

- ANIBARRO, B.; CABALLERO, M. T.; GARCÍA-ARA, M. C.; DÍAZ-PENA, J. M.; OJEDA, J. A. Asthma with sulfite intolerance in children: a blocking study with cyanocobalamin. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 90, n. 1, p. 103-109, 1992.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 16th Edition (Arlington, Virginia, USA: AOAC International), Chapter 47, pp.27-29, 1995.
- BONER, A. L.; GUARISE, A.; VALLONE G.; FORNARI, A.; PIACENTINI, F.; SETTE, L. Metabilsulfite oral challenge: Incidence of adverse responses in chronic childhood asthma and its relationship with bronchial hyperactivity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 85, p. 479-483, 1990.
- BRAGAGNOLO, N.; SILVA, C. A.; TANIWAKI, M. H. Avaliação dos teores de dióxido de enxofre e da qualidade microbiológica de cogumelos em conservas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 60, n. 2, p. 103-107, 2001.
- BRASIL. **Resolução nº 4, de 24 de novembro de 1988**. Aprova revisão das Tabelas I, III, IV e V referente a Aditivos Intencionais, bem como os anexos I, II, III e VII, todos do Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 19 dezembro de 1988.
- BRASIL. **Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997**. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego. Diário Oficial da União; Brasília, DF, 28 de outubro de 1997.
- BRASIL. **Resolução nº 382, de 05 de agosto de 1999**. Aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo sua funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos 13- molhos e condimentos. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 09 de agosto de 1999a.
- BRASIL. **Resolução nº 389, de 05 de agosto de 1999**. Aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos 16: bebidas - subcategoria 16.2.2 - bebidas não alcoólicas gaseificadas e não gaseificadas. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 09 de agosto de 1999b.

- BRASIL. **Resolução RDC ANVISA/MS nº. 12, de 10 de janeiro de 2002.** Aprova a extensão de uso do aditivo INS 220 dióxido de enxofre na função de conservador para suco de caju. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 14 de janeiro de 2002.
- BRASIL. **Instrução Normativa nº 24, de 08 de setembro de 2005.** Aprova o Manual Operacional de Bebidas e Vinagres. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 20 de setembro de 2005a.
- BRASIL **Resolução RDC nº 217, de 29 de julho de 2005.** Aprova a extensão de uso do aditivo dióxido de enxofre e seus sais de cálcio, sódio e potássio de acordo com o anexo da presente Resolução. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 01 de agosto de 2005b.
- BRASIL. **Resolução RDC nº 25, de 15 de fevereiro de 2005.** Aprova uso dos aditivos alimentares, estabelecendo suas Funções e limites máximos para a categoria de alimentos: produtos protéicos - subcategoria: bebidas não alcoólicas a base de soja. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 16 de fevereiro de 2005c.
- BURROUGHS, L. F. Dissociable products formed with sulphur dioxide in wine in food: Safety panel sulphur dioxide in foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 32, n. 11, p. 1140-1144, 1981.
- CINTRA, I. H. A.; OGAWA, N. B. P.; SOUZA, M. R.; DINIZ, F. M.; OGAWA, M. Decomposition of trimethylamine oxide related to the use of sulfites in shrimp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 3, p. 314-317, 1999.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Report of the 38th Session of the Codex Committee on Food Additives and Contaminants. **ALINORM 06/29/12** - The Hague, The Netherlands 24-28 April 2006.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Report of the 39th Session of the Codex Committee on Food Additives. **ALINORM 07/30/12** - Beijing, China 24-28 April 2007.
- CORBO, D.; BERTOTTI, M. Use of a copper electrode in alkaline medium as an amperometric sensor for sulphite in a flow-through configuration. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 374, n. 3, p. 416-420, 2002.

- 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 Additives and Contaminants**, v. 9, n. 4, p. 283-289, 1992.
- DECNOP-WEEVER, L. G.; KRAAK, J. C. Determination of sulphite in wines by gas-diffusion flow injection analysis utilizing spectrophotometric pH-detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 337, p. 125-131, 1997.
- EUROPEAN COMMISSION. **Report from the commission on dietary food additive intake in the European Union**. Final report submitted, Brussels, 2001. Disponível no site: http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/additives/intake_en.html. Acessado em 09 de agosto de 2006.
- EDWARDS, M. C.; JOHNSON, J. L.; MARRIAGE, B.; GRAF, T. N.; COYNE, K. E.; RAJAGOPALAN, K. V.; MACDONALD, I. M. Isolated sulfite oxidase deficiency – review of two cases in one family. **Ophthalmology**, v. 106, n. 10, p. 1957-1961, 1999.
- FAZIO, T.; WARNER, C. R. A review of sulphites in foods: analytical methodology and reported findings. **Food Additives and Contaminants**, v. 7, n. 4, p. 433-454, 1990.
- FAO/WHO. Evaluation of national assessments of intake of sulfites. **World Health Organization - Food Additives Series**: 42, Geneva, 1999. Disponível no site: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v042je25.htm>. Acessado em 11 de maio de 2004.
- FDA. Sulfites: Safe for most, dangerous for some. **U. S. Food and Drug Administration – FDA Consumer Magazine**, v. 30, n. 10, 1996. Disponível no site: www.fda.gov/fdac/features/096_sulf.html. Acessado em 09 de agosto de 2005.
- FRIEDMAN M. E.; EASTON, J. G. Prevalence of positive metabisulfite challenges in children with asthma. **Pediatric Asthma, Allergy and Immunology**, v. 1, p. 53-59, 1987.

- HANSEN, S. C. Conditions of the Budget method for screening food additives. **Food Additives and Contaminants**, 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**, v. 13, 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. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, n. 3, p. 470-475, 1989.
- IARC - International Agency Research on Cancer Monographs. Occupational Exposures to Mists and Vapours from Strong Inorganic Acids; and Other Industrial Chemicals. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, v. 54, 336p., 1992. Disponível no site <http://monographs.iarc.fr/monoeval7grlist.html>, acessado em 17 de junho de 2004.
- ISAAC, A.; LIVINGSTONE, C.; WAIN, A. J.; COMPTON, R. G.; DAVIS, J. Electroanalytical methods for the determination of sulfite in food and beverages. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 6, p. 589-598, 2006.
- IYENGAR, R.; McEVILY, A. J. Anti-browning agents: alternatives to the use of sulfites in foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 3, p. 60-64, 1992.
- KISKER, C.; SCHINDELIN, H.; PACHECO, A.; WEHBI, W. A.; GARRETT, R. M.; RAJAGOPALAN, K. V.; ENEMARK, J. H.; REES, D. C. Molecular basis of sulfite oxidase deficiency from the structure of sulfite oxidase. **Cell**, v. 91, p. 973-983, 1997.
- LAWRIE, C. A.; REES, N. M. A. The approach adopted in the UK for the estimation of the intake of food additives. **Food Additives and Contaminants**, 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. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 35, 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 Additives and Contaminants**, v. 17, n. 12, p. 979-989, 2000.
- LESTER, M. R. Sulfite sensitivity: significance in human health. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 14, n. 3, p. 229-232, 1995.
- LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. Determination of sulphite in wine by coulometric titration. **Food Additives and Contaminants**, v. 18, n. 9, p. 773-777, 2001.
- LÜCK, E.; JAGER, M. Sulfur Dioxide, Chapter 12 in: **Antimicrobial Food Additives – characteristics, uses, effects**. 2nd Edition – Berlin: Springer-Verlag, 260p., 1997.
- MACHADO, R. M. D.; ALMEIDA, C. A.; VICENTE, E.; TOLEDO, M. C. F. Levels of sulphites in concentrated fruit juices available on the Brazilian market. **In Proceedings of the 2006 IFT Annual Meeting held at the Orange County convention Center**, June 24-28, Orlando, Florida. ift.org/amfe. 49 p., 2006a.
- MACHADO, R. M. D.; TOLEDO, M. C. F.; VICENTE, E. Sulphites in Brazilian white wines. **In Proceedings of the 43rd Congress of The European Societies of Toxicology and 6th Congress of Toxicology in Developing Countries held at Cavtat / Dubrovnik**, September 20-24, Cavtat / Dubrovnik, Croatia, 2006b.
- MACHADO, R. M. D.; VICENTE, E.; TOLEDO, M. C. F. Content of sulphites in Brazilian red wines. **In Proceedings of the IUFOST XIIIth World Congress of Food Science and Technology "FOOD IS LIFE" held at Congress Centre Hall**, September 17-21, Nantes, France, 2006c.
- MARESCHI, J. P.; FRANÇOIS-COLLANGE, M.; SUSCHETE, M. Estimation of sulphite in food in France. **Food Additives and Contaminants**, v. 9, n. 5, p. 541-549, 1992.
- McFEETERS, R. F.; BARISH, A. O. Sulfite analysis of fruits and vegetables by high-performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet spectrophotometric detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 6, p. 1513-1517, 2003.

- NANNINI, L. J. JR.; HOFER, D. Effect of inhaled magnesium sulfate on sodium metabisulfite-induced bronchoconstriction in asthma. **The Cardiopulmonary and Critical Care Journal**, v. 111, n. 4, p. 858-861, 1997.
- OUGH, C. S. Determination of sulfur dioxide in grapes and wines. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 69, n. 1, p. 5-7, 1986.
- PAÍNO-CAMPA, G.; PENÃ-EGIDO, M. J.; GARCÍA-MORENO, C. Liquid chromatographic determination of free and total sulphites in fresh sausages. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 56, p. 85-93, 1991.
- PERONI, D. G.; BONER, A. L. Sulfite sensitivity. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 25, p. 680-681, 1995.
- POPOLIM, W. D.; PENTEADO, M. V. C. Estimate of dietary exposure to sulphites using Brazilian students as a sample population. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, n. 11, p. 1106-1112, 2005.
- 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 Additives and Contaminants**, v. 18, n. 2, p. 103-114, 2001.
- SÁDECKÁ, J.; POLONSKÝ, J. Determination of inorganic ions in food and beverages by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 834, p. 401-417, 1999.
- SEZGINTÜRK, M. K.; DINÇKAYA, E. Direct determination of sulfite in food samples by a biosensor based on plant tissue homogenate. **Talanta**, v. 65, p. 998-1002, 2005.
- SIMON, R. A.; GREEN, L.; STEVENSON, D. D. The incidence of metabisulfite sensitivity in an asthmatic population. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 69, p. 118A, 1982.
- SNASHALL, P.; BALDWIN, C. Mechanisms of sulphur dioxide induced bronchoconstriction in normal and asthmatic man. **Thorax**, v. 37, p. 118-123, 1982.

- SU, Y-C; TAYLOR, S. L. Sulphite analysis of food ingredients: false positive responses with butter flavourings in the optimized Monier-Williams method. **Food Additives and Contaminants**, v. 12, n. 2, p. 153-160, 1995.
- SULLIVAN, J. J.; HOLLINGWORTH, T. A.; WEKELL, M. M.; NEWTON, R. T.; LAROSE, J. E. Determination of sulfite in food by flow injection analysis. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 69, n. 3, p. 542-546, 1986.
- SWALES, S.; WEDZICHA, B. L. Kinetics of the sulphite-inhibited browning of fructose. **Food Additives and Contaminants**, v. 9, n. 5, p. 479-483, 1992.
- TAYLOR, S. L.; HIGLEY, N. A.; BUSH, R. K. Sulfites in foods: uses, analytical methods, residues, fate, exposure, assessment, metabolism, toxicity, and hypersensitivity. **Advances in Food Research**, v. 30, p. 1-76, 1986.
- TIMBO, B.; KOEHLER, K. M.; WOLYNIAC, C.; KLONTZ, K. C. Sulfites – A Food and Drug Administration review of recalls and reported adverse events. *Journal of Food Protection*, v. 67, n. 8, p. 1806-1811, 2004.
- TRENERRY, V. C. The determination of the sulphite content of some foods and beverages by capillary electrophoresis. **Food Chemistry**, v. 55, n. 3, p. 299-303, 1996.
- USSEGLIO-TOMASSET, L. Properties and use of sulphur dioxide. **Food Additives and Contaminants**, v. 9, n. 5, p. 399-404, 1992.
- VAHL, J. M.; CONVERSE, J. E. Ripper procedure for determining sulfur dioxide in wine: collaborative study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 63, n. 2, p. 194-199, 1980.
- VALLY, H.; KLERK, N.; THOMPSON, P. J. alcoholic drinks: important triggers for asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 105, n. 1, p. 462-467, 2000.
- VALLY, H.; THOMPSON, P. J. Role of sulfite additives in wine induced asthma: single dose and cumulative dose studies. **Thorax**, v. 56, p. 763-769, 2001.
- VALLY, H.; THOMPSON, P. J. Allergic and asthmatic reactions to alcoholic drinks. **Addiction Biology**, v. 8, p. 3-11, 2003.

- VERGER, P.; CHAMBOLLE, M.; BABAYOU, P.; BRETON, S.; VOLATIER, J. L. Estimation of the distribution of the maximum theoretical intake for ten additives in France. **Food Additives and Contaminants**, v. 15, n. 7, p. 759-766, 1998.
- WARNER, C. R.; DANIELS, D. H.; JOE, F. L.; FAZIO, T. Revaluation of Monier-Williams method for determining sulfite in food. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 69, n. 1, p. 3-5, 1986.
- WARNER, C. R.; DIACHENKO, G. W.; BAILEY, C. J. Sulfites: an important food safety issue. **Food Testing & Analysis**, August/September, 2000. Disponível no site <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fssulfite.html>, acessado em 17 de junho de 2004.
- WEDZICHA, B. L. **Chemistry of sulphur dioxide in foods**. London, Elsevier Applied Science Publishers, 381p., 1984.
- WEDZICHA, B. L. Chemistry of sulphiting agents in food. **Food Additives and Contaminants**, v. 9, n. 5, p. 449-459, 1992.
- WILLIAMS, D. J.; SCUDAMORE-SMITH, P. D.; NOTTINGHAM, S. M.; PETROFF, M. A comparison of three methods for determining total sulfur dioxide in white wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 43, n. 3, p. 227-229, 1992.
- WHO - World Health Organisation. **Evaluation of certain food additives** (Fifty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). **WHO Technical Report Series**, Nº 891 (Geneva: WHO), 2000.
- WÜTHRICH, B.; KAGI, M. K.; HAFNER, J. Disulfite-induced acute intermittent urticaria with vasculitis. **Dermatology**, v. 187, p. 290-292, 1993.
- 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. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 47, n. 1/2, p. 65-75, 1987.
- YANG, W. H.; PURCHASE, E. C. R. Adverse reactions to sulfites. **Canadian Medical Association Journal**, v. 133, n. 1, p. 865-867, 1985.

Capítulo 2

Determinação dos níveis de sulfitos em vinhos
e estimativa de sua ingestão

Determinação dos níveis de sulfitos em vinhos e estimativa de sua ingestão

Resumo

Sulfitos são utilizados amplamente na indústria de vinhos como agentes antimicrobianos e antioxidantes. Embora evidências diretas sejam limitadas, vários estudos têm sugerido que os sulfitos são os principais causadores de crises asmáticas desencadeadas por vinhos. O presente trabalho teve como objetivo a determinação analítica dos níveis de sulfito residual em vinhos e em outras bebidas alcoólicas a base de frutas disponíveis comercialmente na região de Campinas, utilizando para isso o método oficial de Monier-Williams otimizado. Adicionalmente, a exposição a 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). Em todas as amostras analisadas (n=90) os níveis de sulfito, expressos como dióxido de enxofre (SO₂), 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. Os dados de ingestão indicaram que o consumo diário de 150 mL de vinho branco nacional, contendo em média 122,0 mg de SO₂/L, poderia contribuir com 43% da ingestão diária aceitável (IDA) de sulfitos (0,7 mg/kg peso corpóreo) estabelecida pelo Comitê Conjunto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares. Ainda considerando o consumo de vinho branco, os grandes consumidores (consumo de 450 mL) poderiam exceder a IDA em 29%. Em relação aos vinhos tintos nacionais (nível médio de 71,3 mg de SO₂/L), as estimativas de ingestão variaram entre 29% e 71% da IDA, considerando-se o consumo de 150 mL/dia e 450 mL/dia, respectivamente. Esses resultados indicam que o consumo regular diário de apenas uma taça de vinho (150 mL) pode contribuir com mais de 50% da IDA desses aditivos, caso a concentração de sulfitos presente seja ≥ 150 mg/L.

Palavras chaves: Sulfitos, vinhos, estimativa de ingestão, destilação Monier-Williams

Abstract

Sulphites are used worldwide in the wine industries as antimicrobial and antioxidant agents. Although direct evidence is limited, studies suggest that sulphiting agents may be important triggers for wine-induced asthma. This work aimed on the determination of sulphites in a variety of wines, ciders and fruit-based beverages and sparkling wines commercially available in the region of Campinas-SP, using the optimized Monier-Williams distillation method. Additionally, sulphite exposure from wines was assessed by combining sulphite levels determined analytically with three hypothetical scenarios of wine consumption: 150, 300 and 450 mL. All samples presented residual sulphite levels, expressed as sulphur dioxide, below 350 mg/L (maximum permitted level established by the Brazilian legislation) with most samples (90%) containing residual sulphite up to 150 mg/L. The data on intake indicated that the daily consumption of 150 mL of white wine (mean level of 122.0 mg of SO₂/L) would contribute with 43% of the Acceptable Daily Intake (ADI) established by JECFA for these preservatives (0.7 mg/kg body weight). With regard to heavy consumers (450 mL/day) of white wines, the intakes would represent 129% of the ADI. Intake estimates of national red wines (mean level of 71.3 mg of SO₂/L) ranged from 29% to 71% of the ADI considering the consumption of 150 mL/day and 450 mL/day, respectively. Based on these results, it is expected that the daily consumption of 150 mL of wine that contain sulphites at the level equal to or above 150 mg/L may contribute with more than 50% of the ADI of these additives.

Keywords: sulphites, wines, food additive intake, Monier-Williams distillation

1. Introdução

Sulfitos são aditivos alimentares amplamente utilizados na indústria de alimentos e bebidas e incluem o dióxido de enxofre (SO_2) e seus sais de sódio, potássio e cálcio, que liberam SO_2 nas condições de uso (Taylor et al. 1986). Na indústria de vinhos, os sulfitos são utilizados na inibição do crescimento de bactérias e leveduras indesejáveis ao processo e como agentes antioxidantes que protegem da oxidação os compostos responsáveis pelo padrão sensorial dos vinhos (Burroughs 1981; Ough 1986). Em vinhos (pH 3-4), os sulfitos se apresentam nas formas livre e ligada. Sulfito livre consiste principalmente do ânion bissulfito (HSO_3^{-1}) e em menor proporção de dióxido de enxofre molecular ($\text{SO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e do ânion sulfito (SO_3^{-2}). Numerosos compostos carbonílicos como acetaldeído, ácido pirúvico e ácido α -ceto-glutárico podem se ligar ao íon bissulfito para formar os sulfitos ligados (conhecidos como hidroxissulfonados), que apresentam reduzida atividade antimicrobiana em comparação às formas livres (Buechsenstein and Ough 1978; Usseglio-Tomasset 1992; Wedzicha 1992). O produto de adição bissulfito-acetaldeído é responsável pela maior parte do sulfito ligado e tem grande importância no padrão sensorial de vinhos. Acetaldeído (etanal, CH_3CHO) é um dos mais importantes compostos voláteis formados durante a vinificação e constitui mais do que 90% do conteúdo total de aldeídos nos vinhos. O acetaldeído se origina principalmente do metabolismo de leveduras durante fermentação alcoólica ou através da auto-oxidação do etanol. Quando presente em níveis baixos, o acetaldeído confere um aroma frutado agradável, mas em excesso provoca odor pungente indesejável (odor de oxidado) no vinho de mesa, o que é minimizado pela adição de dióxido de enxofre (Burroughs and Sparks 1973; Burroughs 1981; Lui and Piloni 2000).

Devido aos efeitos adversos à saúde humana associados à ingestão dos agentes sulfitantes, principalmente broncoespasmos em indivíduos asmáticos (Yang and Purchase 1985; Taylor et al. 1986; Anibarro et al. 1992; Peroni and Boner 1995; Warner et al. 2000; Vally and Thompson 2003), o consumo desses aditivos alimentares por indivíduos sensíveis tem sido motivo de preocupação. Embora evidências diretas sejam limitadas, vários estudos têm sugerido que os

sulfitos são os principais causadores de crises asmáticas desencadeadas por vinhos (Vally et al. 2000; Vally and Thompson 2001).

Em uma avaliação da exposição aos sulfitos conduzida pelo Comitê Conjunto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA) utilizando os limites máximos que estão sendo propostos para sulfitos no âmbito da Norma Geral Codex para Aditivos Alimentares, em conjunto com os dados de ingestão de alimentos fornecidos por alguns países, concluiu-se que o consumo de certos alimentos e/ou bebidas, incluindo os vinhos, pode resultar em valores de ingestão de sulfitos acima de sua IDA (Ingestão Diária Aceitável) de 0,7 mg/kg peso corpóreo/dia, expressa como SO₂ (WHO 2000). Levando em conta essas informações, o Comitê do Codex sobre Aditivos Alimentares e Contaminantes de Alimentos (CCFAC) recomendou que a exposição diária a sulfitos a partir de todos os alimentos e bebidas fosse novamente avaliada pelo JECFA e que os estados membros enviassem informações sobre a ingestão de sulfitos com base em dados reais de uso e em dados individuais de consumo (CAC 2006, 2007).

O consumo de vinhos no Brasil é considerado baixo – cerca de 2,0 litros *per capita* no ano de 2005 - em comparação a países tradicionalmente vinícolas como Itália e França, onde o consumo anual de vinhos pode alcançar 54 litros *per capita* (Guerra et al. 2003; Mello 2006b). No entanto, nos últimos anos, políticas públicas têm sido propostas de modo a aumentar o consumo de vinhos no Brasil, especialmente de marcas nacionais. Além disso, a produção nacional de vinhos apresenta boas perspectivas de crescimento devido a recentes investimentos em novas áreas de vitivinicultura no Rio Grande do Sul (responsável por mais de 90% da produção nacional) e em outras regiões do país como, por exemplo, os estados de Pernambuco e Bahia, no Vale do São Francisco (Guerra et al. 2003; Mello 2006a,b). De acordo com dados de produção de vinhos do ano de 2003, apresentados pela Organização Internacional da Uva e do Vinho (OIV 2003), o Brasil ocupa a 17^a posição no volume de produção mundial com 262 milhões de litros/ano. Dados nacionais mais recentes mostram que o volume de vinhos produzidos no país em 2005 foi superior a 271 milhões de litros (Mello 2006).

Em vista disso, torna-se importante conhecer os níveis residuais de sulfitos presentes nessas bebidas, já que estas podem vir a representar importante fonte de exposição a estes aditivos alimentares no Brasil. Cabe destacar que a quantidade de sulfitos adicionadas em um alimento ou bebida não reflete os teores remanescentes no momento do consumo do produto, devido a perdas que podem ocorrer durante processamento e estocagem (Taylor et al. 1986; WHO 2000). Portanto, o monitoramento do uso e ingestão de sulfitos com base em dados analíticos resultará em uma avaliação de exposição mais realista desses conservadores (WHO 2000).

Em diversos países, incluindo o Brasil, a indústria de vinhos utiliza, devido à sua conveniência e rapidez, a titulação iodométrica (direta ou após destilação ácida) baseada no método Ripper para controle dos níveis de sulfitos livre e ligado durante a elaboração de vinhos (Vahl and Converse 1980; Ough 1986; Williams et al. 1992; Brasil 2005; OIV 2006). Embora o método Ripper seja amplamente utilizado, o mesmo não foi adotado pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists) como método oficial devido à baixa precisão e grande erro sistemático na obtenção dos resultados (Vahl and Converse 1980).

Muito embora não quantifique sulfitos livres e ligados separadamente, mas apenas sulfitos totais, que correspondem aos sulfitos livres mais uma fração dos sulfitos ligados, o método de destilação de Monier-Williams tem sido o mais amplamente utilizado na determinação de SO_2 em alimentos e bebidas. Desde a sua primeira versão em 1927, o método de Monier-Williams sofreu diversas modificações para tornar-se aplicável a diferentes matrizes e continua sendo o método de escolha e de referência para o desenvolvimento de novas metodologias (Warner et al. 1986; AOAC 1995; Fazio and Warner 1990; Lück and Jager 1997).

O método de referência adotado pela Organização Internacional da Uva e do Vinho (OIV) e pela Comunidade Européia para a determinação de sulfitos livres e totais em vinhos é uma modificação do procedimento de destilação de Monier-Williams, que tem como base o princípio da conversão das várias formas de sulfito a dióxido de enxofre (EC 1990; Kirk and Sawyer 1991; AOAC 1995; OIV 2006).

Em 1989, pesquisadores do FDA (US Food and Drug Administration) publicaram um estudo intercolaborativo (Hillery et al. 1989) introduzindo alterações no método de destilação de Monier-Williams, de forma a permitir a quantificação de sulfitos em concentração igual ou superior a 10 mg/kg ou mg/L em alimentos ou bebidas, respectivamente, uma vez que este nível de sensibilidade é requerido pela legislação de rotulagem de alimentos vigente nos Estados Unidos (CFR 2006a,b). No Brasil não há relatos do uso do método Monier-Williams otimizado pelo FDA na determinação de sulfitos em alimentos ou bebidas.

Levando em conta essas informações, o objetivo do presente trabalho foi determinar analiticamente os níveis de sulfito residual em vinhos e em outras bebidas alcoólicas a base de frutas disponíveis comercialmente onde o uso de agentes sulfitantes é permitido, utilizando o método oficial de Monier-Williams otimizado pelo FDA. Os níveis de sulfitos determinados analiticamente serão comparados com valores máximos estabelecidos pela legislação brasileira e posteriormente utilizados para estimar a contribuição de vinhos como fonte de ingestão diária desses conservadores na dieta.

2. Materiais e métodos

2.1. Amostragem

Amostras de várias marcas e tipos de vinho (comum e fino) e de outras bebidas alcoólicas incluindo sidras, fermentados de frutas, filtrados de vinho e espumantes foram adquiridas em supermercados e lojas especializadas da cidade de Campinas, SP, no período de abril a novembro de 2005. Foram adquiridas 31 garrafas de vinhos brancos nacionais, 35 de vinhos tintos nacionais, 9 de vinhos importados de países da América do Sul (brancos e tintos), 9 de sidras e fermentados de frutas e 6 de espumantes e filtrados de vinho.

Os vinhos selecionados para compor a amostragem foram de safras recentes, preferencialmente elaborados nos anos de 2004 e 2005, visto que, teoricamente, apresentariam maior conteúdo de sulfitos em relação a vinhos de safras anteriores, devido a perdas de sulfitos que podem ocorrer durante estocagem. Para efeito de discussão dos resultados, os vinhos foram separados de acordo com a classificação estabelecida pela legislação brasileira que define como finos os vinhos elaborados a partir de uvas européias da espécie *Vitis vinifera* e como comuns os vinhos elaborados a partir de uvas americanas (*V. labrusca* e *V. bourquina*) e ou híbridas (Brasil 1988b).

Cada unidade (garrafa) do produto foi considerada uma amostra e analisada em duplicata.

2.2. Procedimento analítico

Reagentes

- ácido clorídrico (HCl) a 4 mol/L, preparado pela diluição de 90 mL de ácido clorídrico concentrado (37%) em 180 mL de água;
- solução alcoólica do indicador vermelho de metila a 0,25%;
- solução padronizada de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,01 mol/L, preparada pela diluição em água deionizada de uma ampola contendo hidróxido de sódio em solução (0,1 mol/L, Titrisol[®] Merck,) até o volume final de 1000 mL e padronizada com biftalato de potássio a 0,01 mol/L;

- solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3%, preparada diariamente pela diluição de 10 mL de H_2O_2 a 30% em 90 mL de água;
- nitrogênio para arraste do SO_2 com pureza mínima de 99,9%
- solução aquosa de etanol a 5%.

Os reagentes utilizados para preparação das soluções foram todos de grau analítico e a água deionizada foi obtida em sistema de purificação MilliQ-Plus (Millipore).

Preparação da amostra

A abertura da garrafa de bebida foi realizada no momento da análise. Uma alíquota de 25 mL de amostra foi retirada e misturada com 100 mL de solução aquosa de etanol a 5% e em seguida adicionada no balão de 3 vias, com fundo chato, do sistema de destilação.

Sistema de destilação

Para a determinação analítica de sulfito residual total (sulfito livre mais uma fração dos sulfitos ligados) nas amostras foi utilizado o método oficial (990.28) de destilação de Monier-Williams otimizado pelo FDA (AOAC 1995).

O modelo do sistema de destilação empregado para as análises é representado pela Figura 1.

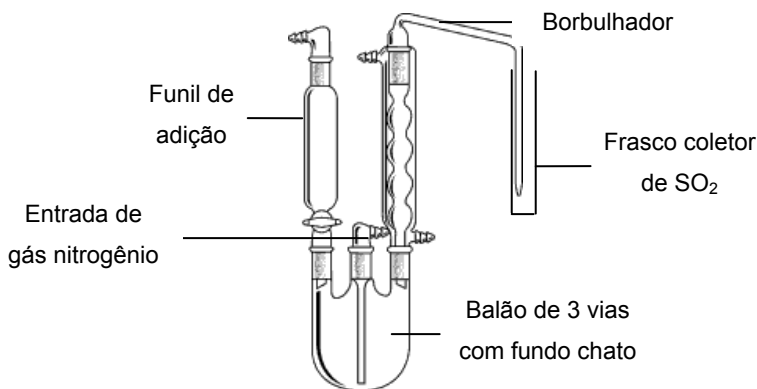
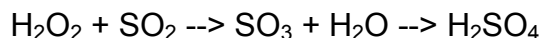


Figura 1: Aparato utilizado no método de destilação Monier-Williams otimizado pelo FDA.

Preparação do sistema

O sistema de destilação foi montado sobre uma manta de aquecimento. Inicialmente, um volume de 400 mL de água destilada foi adicionado no balão de 3 vias de fundo chato e em seguida todas as conexões do sistema foram fechadas. No frasco coletor de SO₂ foram adicionados 30 mL de solução de peróxido de hidrogênio a 3% e no funil de adição 90 mL de ácido clorídrico a 4 mol/L. Em seguida, o fluxo de nitrogênio e o resfriamento do condensador foram iniciados e mantidos por 15 minutos para desoxigenação do sistema.

Após essa etapa, o funil de adição foi retirado do sistema e a amostra introduzida no balão. Após o fechamento de todas as conexões, 90 mL de HCl 4 mol/L foram adicionados no balão contendo a amostra e o aquecimento foi ligado. A amostra acidificada foi destilada durante 1 hora e 45 minutos contados após o início da fervura. O fluxo de gás nitrogênio mantido durante a destilação foi suficiente para manter a pressão positiva no interior do balão de 3 vias de modo a evitar o refluxo da amostra acidificada para o interior do frasco coletor de SO₂. Dióxido de enxofre liberado na forma gasosa foi carreado pela corrente de nitrogênio até o interior da solução de H₂O₂ a 3%, onde foi oxidado a ácido sulfúrico (H₂SO₄), conforme descrito a seguir.



A concentração de dióxido de enxofre foi relacionada diretamente com a quantidade de ácido sulfúrico gerado.

Quantificação do dióxido de enxofre

A quantificação de sulfito residual na amostra foi realizada com determinação titulométrica imediatamente após o término da destilação. A solução de peróxido de hidrogênio a 3% do frasco coletor de SO₂ foi titulada com solução padronizada de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,01 mol/L até o ponto de viragem amarelo brilhante (neutralização do pH). A solução alcoólica de vermelho de metila a 0,25% foi utilizada como indicador de pH.

A verificação da interferência dos reagentes e das matrizes na determinação de SO₂ foi realizada através de análises de brancos analíticos (50 mL de água destilada ou 50 mL de suco de uva sem adição de sulfito).

As concentrações residuais de sulfito nas amostras, expresso como SO₂, foram calculadas de acordo com a seguinte expressão:

$$\text{SO}_2 \text{ (mg/L)} = (32,03 \times (V_t - V_b) \times M \times 1000) / V_a$$

32,03 = massa molar equivalente do dióxido de enxofre (g/mol)

V_t = volume da solução de NaOH necessário para atingir o ponto de viragem da amostra (mL)

V_b = volume da solução de NaOH necessário para atingir o ponto de viragem do branco analítico (mL)

M = concentração molar da solução de NaOH determinada por padronização com biftalato de potássio (mol/L)

1000 = converte grama em miligrama

V_a = volume de amostra (mL)

A massa molar equivalente do dióxido de enxofre (32,03 g/mol) foi calculada multiplicando a massa molar do dióxido de enxofre (64,06 g/mol) pelo fator de equivalência (NaOH/H₂SO₄) 0,5.

Confirmação gravimétrica da presença de SO₂

Com o intuito de verificar se a quantidade de ácido titulada era proveniente somente do dióxido de enxofre destilado, foi realizada a análise gravimétrica de algumas amostras analisadas de acordo com o procedimento descrito em AOAC (1995).

Após a análise titulométrica, a solução de H₂O₂ foi transferida para um béquer de 400 mL sendo então adicionadas 4 gotas de HCl a 1 mol/L e solução de cloreto de bário (BaCl₂) a 10% em excesso (Por exemplo: 2 mL de solução BaCl₂ para

concentrações de SO₂ de até 300 mg/L). Após 12 horas de repouso, a solução foi filtrada em cadinho de vidro previamente pesado, que foi lavado com 400 mL de água destilada quente e, em seguida, colocado em estufa a aproximadamente 105°C até obtenção de peso constante.

A quantidade de sulfito recuperado foi calculada conforme a seguinte expressão:

$$\text{SO}_2 (\mu\text{g/mL ou mg/L}) = (\text{BaSO}_4 \times 0,274476 \times 1000)/V_a$$

BaSO₄ = quantidade do sal sulfato de bário formado (precipitado fino branco) (mg)

0,274476 = número obtido pela divisão das massas molares do dióxido de enxofre e do sulfato de bário (SO₂/BaSO₄)

V_a = volume de amostra (mL)

1000 = converte miligrama em micrograma

Recuperação

Os testes de recuperação, para avaliar a exatidão e repetibilidade do método nas condições do laboratório utilizado para as análises, foram realizados com amostras de sucos de uva, caju e maracujá (sem adição de sulfitos) e vinhos (tinto e branco). Foram utilizadas soluções aquosas de metabissulfito de sódio (marca Mallinckrodt, grau analítico) em concentrações que variaram de 10,0 a 1192,0 mg/L. Em todos os testes de recuperação foram utilizadas soluções padrões preparadas no mesmo dia do teste. Os dados de concentração, expressos em mg de dióxido de enxofre por litro, foram calculados utilizando-se os dados de pureza do padrão (98,9%) e a quantidade equivalente de SO₂ por mol de metabissulfito de sódio.

A repetibilidade foi avaliada em amostras de suco de maracujá (sem adição de sulfitos) fortificadas com níveis de 25,6 mg SO₂/L (n=6) e 68,0 mg SO₂/L (n=4). Nesse caso, as fortificações em cada nível avaliado foram feitas com a mesma solução padrão, apesar das análises terem sido feitas em dias diferentes.

2.3. Avaliação da exposição aos sulfitos pelo consumo de vinhos

No presente estudo, a contribuição dos vinhos como fonte de exposição aos sulfitos foi estimada combinando os níveis médios de sulfitos determinados nas amostras analisadas com estimativas de consumo hipotético de vinho em três cenários distintos. Foi utilizada esta abordagem de consumo hipotético devido à não disponibilidade de dados de consumo individual de vinhos pela população, e ao desconhecimento da porcentagem de brasileiros que consomem regularmente essa bebida. Assim, de forma a retratar o perfil de diferentes consumidores regulares de vinho, foram delineados os seguintes cenários:

- consumo diário de 1 taça de vinho (150 mL)
- consumo diário de 2 taças (300 mL)
- consumo diário de 3 taças (450 mL)

O consumo diário de 450 mL de vinho foi considerado como o consumo dos grandes consumidores de vinhos, o que corresponde à média do consumo individual diário multiplicada por um fator de 3. Esse fator de 3 indica que 5% da população consomem uma quantidade de alimento ou bebida três vezes acima do consumo médio. Nesse cálculo considera-se também que o restante, ou seja, 95% da população consomem menos do que 3 vezes o consumo médio (CAC 1989).

As estimativas de ingestão diária de sulfitos, de acordo com os cenários de consumo descritos acima, foram obtidas multiplicando-se o consumo hipotético pela concentração de sulfitos determinada analiticamente em vinhos nacionais brancos e tintos. O nível máximo de sulfito encontrado nas amostras e o limite máximo permitido (LMP) pela legislação brasileira também foram utilizados nos cálculos das estimativas de ingestão desses conservadores.

Estudos de ingestão de aditivos alimentares são realizados a fim de verificar sua segurança de uso na dieta, o que é feito através da comparação da ingestão diária estimada do aditivo com a ingestão diária aceitável (IDA) estabelecida pelo JECFA (Kroes et al. 2002). Como a IDA é expressa em miligramas por quilo de peso corpóreo por dia (mg/kg p.c./dia) (WHO 2000), as estimativas da ingestão de sulfitos pelo consumo de vinhos foram calculadas com base em um peso corpóreo de 60 kg para um adulto.

3. Resultados e discussão

3.1. Determinação analítica dos sulfitos

A Tabela 1 mostra os valores de recuperação de dióxido de enxofre de acordo com as faixas de concentrações adicionadas. A recuperação média obtida (n=24) foi de 89,8%, com coeficiente de variação (CV) de 7,2%.

Tabela 1: Valores de recuperação de dióxido de enxofre em amostras analisadas pelo método oficial da AOAC (1995) após adição de metabissulfito de sódio.

Níveis adicionados de SO ₂ (mg/L)	n	Faixa de recuperação (%)
10 – 50	11	80,0 – 104,0
51 – 100	7	80,8 – 94,2
> 100	6	91,4 – 99,0
	Média	89,8
	DP	6,5
	CV (%)	7,2

n = número de análises

A repetibilidade do método, avaliada em amostras de suco de maracujá, apresentou coeficientes de variação de 6,0% e 4,5% para os níveis de adição de 25,6 mg SO₂/L e 68,0 mg SO₂/L, respectivamente. Esses valores estão abaixo do limite máximo de 15% sugerido por Horwitz et al. (1980) para compostos presentes em alimentos em níveis de mg/L.

Para a maioria das amostras (88%) os coeficientes de variação (CV) entre duplicatas foram inferiores a 5%, sendo que apenas uma amostra de espumante contendo 151,7 mg de SO₂/L apresentou CV de 11,4%.

Os valores de CV entre duplicatas encontrados nesse estudo são condizentes com a avaliação estatística dos resultados analíticos de um estudo intra-laboratorial que utilizou o método de Monier-Williams otimizado (AOAC 1995) na determinação de sulfitos em alimentos, onde se obteve coeficiente de variação máximo de 9,8% para concentração igual ou superior a 10 mg/kg ou mg/L (Hillery

et al. 1989). Resultados similares de coeficientes de variação entre duplicatas também foram encontrados por Leclercq et al. (2000) que analisaram 211 amostras de alimentos e bebidas, incluindo 85 amostras de vinhos.

No método oficial da AOAC (1995), recomenda-se recuperação acima ou igual a 80% para concentrações adicionadas ao redor de 10 mg/L, para a definição de um limite de quantificação (LQ) de 10,0 mg/L. Em face dos valores de recuperação ($\geq 80\%$) obtidos nesse estudo estarem em acordo com o estabelecido pela AOAC (1995) foi estabelecido um limite de quantificação de 10,0 mg/L. Apenas uma amostra de vinho tinto comum apresentou concentração de sulfitos abaixo do LQ ($< 10,0$ mg/L), e nesse caso foi assumido que a mesma continha metade desse limite de quantificação, isto é, 5,0 mg SO_2 /L (Kroes et al. 2002) para efeito do cálculo da concentração média da respectiva categoria.

As confirmações gravimétricas foram realizadas em oito amostras em duplicata (Tabela 2). O valor médio de recuperação relativa foi de 97,4% com CV de 3,6%. A recuperação relativa foi obtida dividindo-se a concentração de SO_2 (mg/L) recuperada pela análise gravimétrica pela concentração de SO_2 (mg/L) obtida pela análise titulométrica. Para o restante das análises foi realizada uma avaliação qualitativa da presença ou não de sulfato de bário precipitado. Em todas as amostras analisadas verificou-se a formação de precipitado fino de cor branca, o que confirmou a presença de sulfato de bário e indiretamente a presença de SO_2 .

Tabela 2: Resultados da análise gravimétrica e seus respectivos valores de recuperação em relação às concentrações obtidas na análise titulométrica.

Amostras	Análise titulométrica Concentração de SO ₂ ^a (mg/L)	Análise gravimétrica Concentração de SO ₂ ^b (mg/L)	Recuperação relativa ^c (%)
1 - Suco de uva com adição de 80,9 mg/L de SO ₂	69,2 ^d	66,7	96,4
2 - Sidra	140,2	138,9	99,1
3 - Vinho branco espumante	151,6	142,7	94,1
4 - Vinho branco comum	234,8	233,8	99,6
5 - Vinho branco comum	132,9	135,0	101,6
6 - Vinho branco fino	91,2	83,4	91,4
7 - Vinho tinto fino	74,1	74,7	100,8
8 - Vinho tinto comum	130,3	125,7	96,5
		Média	97,4
		DP	3,5
		CV (%)	3,6

^c recuperação relativa calculada como (b/a)x100

^d média de concentração entre duplicatas

Em todas as amostras analisadas (n=90) os níveis de sulfito residual ficaram abaixo do valor máximo permitido pela legislação brasileira, que é de 350 mg/L (Brasil 1988a). Os valores encontrados situaram-se na faixa de concentração de <10,0 mg SO₂/L em vinho tinto comum a 235,0 mg SO₂/L em vinho branco comum (Tabela 3). A maioria das amostras (90%) apresentou teores de sulfitos de até 150 mg/L, sendo que em 57% delas foram determinados níveis iguais ou inferiores a 100 mg de SO₂/L.

Os níveis de sulfitos nas amostras de sidras, fermentados de frutas, filtrados de vinho e espumantes variaram de 16,1 mg/L em fermentado de frutas a 186,1 mg/L em vinho branco espumante. Nesse grupo de bebidas, 20% das 15 amostras analisadas apresentaram teores de sulfitos acima de 150 mg/L.

Tabela 3: Concentração de sulfitos, expressos como SO₂, em vinhos nacionais e importados.

Categorias	n ^a	Faixa de concentração de SO ₂ (mg/L)	Média ^b (mg/L)	CV ^c (%)
Sidra e fermentado de frutas	9	16,1 – 140,4	81,7	51,9
Filtrado de vinho	3	61,3 – 163,7	119,6	44,0
Espumante	3	122,0 – 186,1	153,3	20,9
Vinhos nacionais				
Vinho branco comum ^d	13	62,7 – 235,0	133,7	34,5
Vinho branco fino ^e	18	60,8 – 189,3	113,5	29,8
Vinho tinto comum ^d	19	<10,0 – 130,4	73,3	46,6
Vinho tinto fino ^e	16	38,6- 125,6	68,9	35,6
Vinhos importados				
Vinho branco fino	5	80,5 – 143,1	112,6	23,6
Vinho tinto fino	4	18,1 – 127,5	71,8	64,8

^a número total de amostras analisadas

^b valor médio da concentração de SO₂ entre amostras

^c coeficiente de variação das médias das concentrações de SO₂ entre amostras

^d vinhos elaborados com uvas americanas e/ou híbridas

^e vinhos elaborados com uvas de cultivares *Vitis vinifera*

Considerando-se apenas os vinhos nacionais que apresentaram concentração média de 95,1 mg de SO₂/L, 9% das amostras continham níveis de sulfitos acima de 150 mg/L, enquanto que entre os vinhos importados a maior concentração detectada foi de 143,1 mg de SO₂/L.

Quando se comparam as frequências das concentrações de sulfito nos vinhos nacionais amostrados (Figura 2), nota-se que a maioria das amostras dos vinhos brancos (68%) apresentou níveis de sulfitos superiores a 100 mg/L, enquanto que os vinhos tintos tiveram apenas 20% das amostras acima desse valor.

Em uma análise mais detalhada dos resultados, observou-se que 39% das amostras de vinhos brancos continham níveis de sulfitos acima de 130,4 mg/L, valor este correspondente ao teor máximo de sulfitos determinado em vinhos tintos.

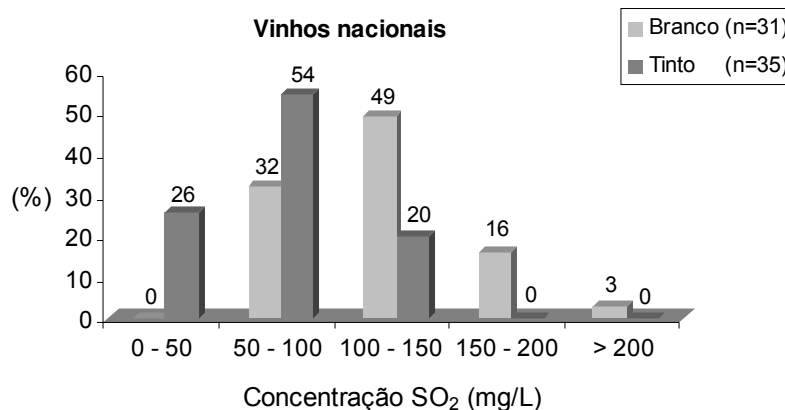


Figura 2: Histograma de freqüência das concentrações de sulfito (mg de SO₂/L) nas amostras de vinhos brancos e tintos.

Os níveis de sulfitos determinados nas 75 amostras de vinhos analisadas foram similares aos níveis de sulfitos encontrados em vinhos de outros países, conforme relatado por Peterson et al. (2000) e Leclercq et al. (2000). Entre janeiro de 1994 e setembro de 1998, a ATF (The Bureau of Alcohol, Tobacco and Firearms), agência federal dos Estados Unidos que controla a produção e o comércio de vinhos, analisou aproximadamente 5000 amostras de vinhos produzidos nos Estados Unidos através de programas de monitoramento do uso de sulfitos. Dentre as amostras que apresentaram níveis detectáveis de sulfitos (≥ 10 mg/L), apenas 16 (0,38%) continham níveis destes conservadores acima de 350 mg/L, que é o limite máximo estabelecido pela legislação vigente dos Estados Unidos (CFR 2003). A maioria dos vinhos (82%) apresentou concentrações de SO₂ abaixo de 100 mg/L e 94% apresentaram teores de sulfitos abaixo de 150 mg/L (Peterson et al. 2000). Dados de um estudo realizado na Itália mostraram

que os níveis residuais de sulfito encontrados em 85 amostras de vinhos variaram de <10 mg/L a 198 mg/L com concentração média de 92 mg de SO₂/L (Leclercq et al. 2000).

O setor vinícola brasileiro possui características que o diferenciam dos países tradicionalmente vinícolas que elaboram vinhos somente a partir de cultivares da espécie *Vitis vinifera*. A maior parte da produção de vinhos no Brasil, aproximadamente 80%, é composta por vinhos comuns elaborados a partir de uvas americanas e ou híbridas tais como Bordô, Isabel e Concord, e o restante da produção, ao redor de 20%, é elaborada a partir de cultivares da espécie *Vitis vinifera* (Cabernet Sauvignon, Chardonnay, Merlot, etc). Os vinhos comuns são comercializados geralmente a preços mais acessíveis em relação aos vinhos finos e, por este motivo, são demandados por uma ampla faixa da população com baixo poder aquisitivo. Além disso, os vinhos comuns apresentam sabor intenso e frutado, atributos característicos das uvas americanas e híbridas e que os tornam únicos no mercado brasileiro, uma vez que não apresentam concorrentes externos (Protas et al. 2002; Mello 2002).

Levando em consideração essas informações, os níveis de sulfito determinados nas amostras de vinhos nacionais também foram discutidos em função do tipo do vinho, ou seja, comum ou fino.

O resultado desta análise indicou que tanto para os vinhos brancos como para os tintos, o tipo fino apresentou níveis médios de sulfitos inferiores aos dos vinhos comuns. Na Figura 3a é possível verificar que das 13 amostras de vinhos brancos comuns analisados, 77% tiveram concentrações acima de 100 mg/L, enquanto que para os vinhos brancos finos uma porcentagem menor, 50%, ficou acima desse valor. No caso dos vinhos tintos (Figura 3b), observou-se que apenas 13% das amostras dos vinhos finos tiveram teores de sulfitos acima de 100 mg/L, enquanto que para os vinhos comuns essa porcentagem subiu para 26%.

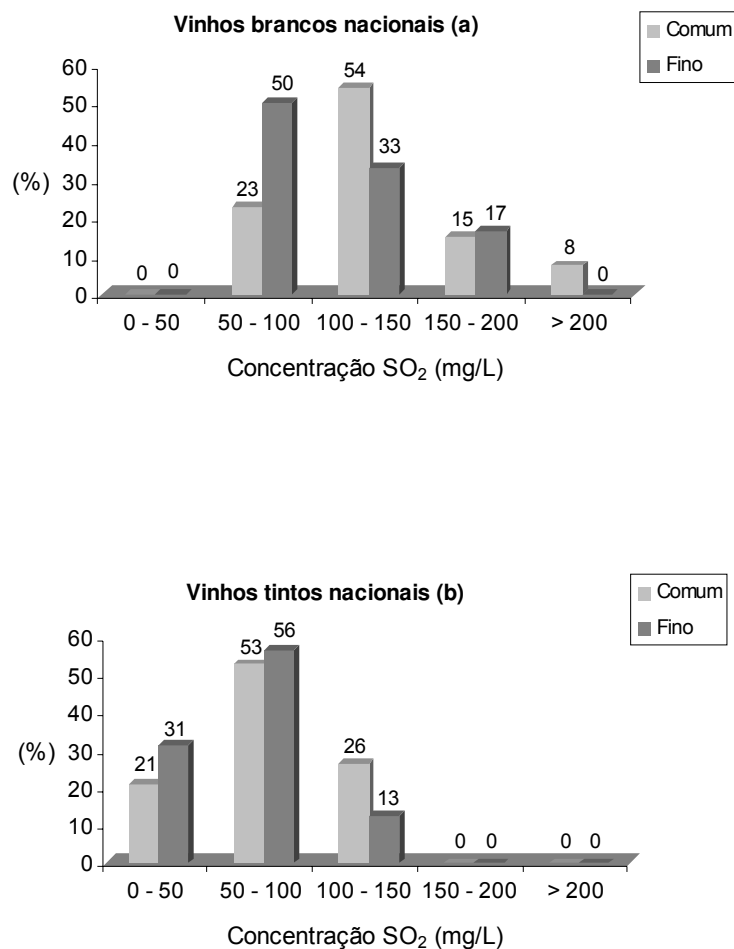


Figura 3: Histograma de freqüência das concentrações de sulfito (mg de SO₂/L) nas amostras de vinhos brancos (a) e tintos (b) de acordo com a categoria fino ou comum.

3.2. Avaliação da exposição aos sulfitos pelo consumo de vinhos

A Tabela 4 mostra as estimativas da contribuição de vinhos na ingestão diária de sulfitos, utilizando-se os níveis médios de sulfitos determinados nas amostras de vinhos nacionais e três hipotéticos cenários de consumo.

Tabela 4: Estimativa da contribuição dos vinhos como fonte de exposição aos sulfitos com base em níveis médios de sulfitos determinados nas amostras combinados com três cenários distintos de consumo.

Categoria	Sulfitos (mg/L)	Estimativa de ingestão de sulfitos (mg/kg p.c./dia)		
		150 mL	300 mL	450 mL
Vinhos brancos	122,0 ^b	0,3	0,6	0,9
Vinhos tintos	71,3 ^b	0,2	0,4	0,5
Vinho branco comum ^a	235,0	0,6	1,2	1,8
LMP ^c	350	0,9	1,8	2,6

^a amostra com maior concentração de sulfitos

^b valor médio da concentração de SO₂

^c limite máximo permitido pela legislação brasileira (Brasil 1988a)

Em comparação com a IDA dos sulfitos de 0,7 mg/kg p.c./dia, o consumo diário de apenas uma taça de vinho branco, contendo em média 122,0 mg de SO₂/L, pode contribuir com 43% (0,3 mg/kg p.c.) do valor da ingestão diária aceitável desses aditivos. Ainda considerando o consumo de vinho branco, os grandes consumidores (consumo de 450 mL) podem exceder a IDA em 29%. As estimativas obtidas com a concentração média de sulfitos em vinhos tintos (71,3 mg/L) em conjunto com os três diferentes cenários de consumo resultaram em valores de ingestão diária com variação de 29% a 71% da IDA.

Estimativas mais conservadoras, calculadas utilizando-se como concentração de sulfito o valor máximo determinado analiticamente (235,0 mg/L em vinho branco comum) resultaram em valores de ingestão diária desses conservadores correspondentes a 86% e 157% da IDA para consumo de 1 e 3 taças de vinho, respectivamente. Caso esses aditivos estejam presentes no limite máximo de uso estabelecido pela legislação brasileira (350 mg/L), as estimativas de ingestão excedem a IDA em todos os cenários de consumo assumidos.

Conforme observado no presente estudo e já relatado em estudos de ingestão de sulfitos realizados em outros países (Mareschi et al. 1992; Verger et al. 1998;

Leclercq et al. 2000), uma parcela da população adulta pode exceder a ingestão diária aceitável de sulfitos através do consumo de vinhos, mesmo que a concentração desses aditivos nesses produtos esteja bem abaixo dos limites máximos permitidos para cada país. Mareschi et al. (1992) verificaram que o consumo de vinhos na França contribuía com 85% da ingestão de sulfitos e que no caso de se considerar apenas consumidores, a ingestão média diária de sulfitos poderia variar entre 24% da IDA para o consumidor ocasional de vinho a 96% da IDA para o consumidor regular.

Em estudo realizado na Itália verificou-se que os grandes consumidores de vinhos (consumo diário de 450 mL) poderiam alcançar até 99% da IDA para sulfitos, sem considerar a ingestão de outros alimentos e ou bebidas sulfitados (Leclercq et al. 2000). Resultados do 21º Australian Total Diet Study indicaram que a ingestão média de sulfitos na Austrália era equivalente a 35% da IDA para homens e a 30% da IDA para mulheres, considerando indivíduos com idade igual ou superior a 2 anos. Os vinhos brancos foram um dos itens que mais contribuíram para a ingestão de sulfitos pela população adulta com idade igual ou superior a 19 anos, totalizando 25% da ingestão diária de sulfitos para os homens e 39% para as mulheres. Os vinhos tintos tiveram uma menor participação na exposição a esses aditivos, 9 e 7% para homens e mulheres, respectivamente (FSANZ 2005).

Embora o consumo eventual de um aditivo alimentar acima de sua IDA não represente, necessariamente, um risco à saúde humana (Speijers 1999), devido a fatores de segurança incorporados nos cálculos da IDA, avaliações de ingestão de sulfitos indicam que a IDA desses aditivos pode ser regularmente excedida por indivíduos considerados grandes consumidores de vinhos e frutas secas (WHO 2000). A quantidade de sulfito necessária para desencadear as reações adversas em humanos é variável: enquanto certos indivíduos toleram até 4 g de sulfito diariamente sem efeitos indesejáveis, outros reclamam de dores de cabeça, náuseas e diarreia após a ingestão de quantidades muito inferiores (Lück and Jager 1997). Além dos riscos associados à ingestão excessiva de sulfitos, o consumo de alimentos e bebidas contendo esses conservadores tem sido considerado como uma das principais causas de broncoespasmos em indivíduos

asmáticos (Anibarro et al. 1992; Peroni and Boner 1995; Vally and Thompson 2003), muito embora indivíduos sensíveis a sulfitos sem histórico de reações asmáticas também possam apresentar reações adversas após ingestão de alimentos sulfitados (Yang and Purchase 1985; FDA 1996).

Em um estudo realizado para verificar a frequência e as características de reações asmáticas iniciadas por bebidas alcoólicas em uma população de asmáticos (Vally et al. 2000), constatou-se que 33,1% dos 366 pacientes acima de 18 anos associaram o consumo de bebidas alcoólicas com o início de crise asmática em pelo menos 2 ocasiões. Nesse mesmo estudo, os vinhos foram identificados como os principais causadores de respostas asmáticas em 30,3% dos entrevistados. Apesar da limitação de evidências diretas, vários estudos sugerem que os sulfitos sejam os principais causadores das reações asmáticas causadas por vinhos (Vally et al. 2000; Vally and Thompson 2001).

4. Conclusão

O procedimento de Monier-Williams otimizado é adequado para o monitoramento de sulfitos em vinhos, sidras, fermentados de frutas, filtrados e espumantes.

As estimativas teóricas de ingestão indicam que o consumo regular diário de apenas uma taça de vinho (150 mL) pode contribuir com mais de 50% da ingestão diária aceitável desses aditivos, caso a concentração de sulfitos presente seja igual ou superior a 150 mg/L. Cabe ressaltar que os vinhos não são a única fonte de exposição humana aos sulfitos uma vez que, devido às suas múltiplas funções, esses aditivos são amplamente utilizados em outros alimentos e bebidas e em produtos farmacêuticos.

Considerando os resultados obtidos nesse estudo, recomenda-se que os grandes consumidores de vinhos sejam identificados através de pesquisas nacionais de consumo individual e que medidas para reduzir os níveis de sulfitos nesses produtos sejam consideradas.

Referências bibliográficas

- Anibarro B, Caballero MT, García-Ara MC, Díaz-Pena JM, Ojeda JA. 1992. Asthma with sulfite intolerance in children: a blocking study with cyanocobalamin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 90:103-109.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1995. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 16th Edition (Arlington, Virginia, USA: AOAC International), Chapter 47:27-29.
- Brasil. 1988a. Resolução nº 4, de 24 de novembro de 1988. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 19 de dezembro, 1988.
- Brasil. 1988b. Portaria nº 229, de 25 de outubro de 1988. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 31 de outubro de 1988.
- Brasil. 2005. Instrução Normativa Nº 24, de 08 de Setembro de 2005. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 20 de setembro, 2005.
- Buechsenstein JW, Ough CS. 1978. SO₂ determination by aeration-oxidation: a comparison with ripper. *American Journal of Enology and Viticulture* 29:161-164.
- Burroughs LF, Sparks AH. 1973. Sulphite-binding power of wines and ciders. II. Theoretical consideration and calculation of sulphite-binding equilibria. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 24: 199-206.
- Burroughs LF. 1981. Dissociable Products formed with Sulphur Dioxide in Wine in Food Safety Panel Sulphur Dioxide in Foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 32:1140-1144.
- Code of Federal Regulations (CFR). 2003. Labelling and advertising of wine: Title 27, Part 4, 27CFR4. Bureau of Alcohol, Tobacco, Firearms and Explosives. Revised as of April 1, 2003. Available from: <http://www.access.gpo.gov/cgi-bin/cfrassemble.cgi?title=200327>. Accessed 2007 January 19.
- Code of Federal Regulations (CFR). 2006a. Sulfites in standardized food: Title 21, Volume 2, 21CFR130.9. Revised as of April 1, 2006. U. S. Food and Drug Administration. Available from: <http://www.access.gpo.gov/cgi-bin/cfrassemble.cgi?title=200621>. Accessed 2007 January 01.

- Code of Federal Regulations (CFR). 2006b. Food labeling: Title 21, Volume 2, 21CFR101. Revised as of April 1, 2006. U. S. Food and Drug Administration. Available from: <http://www.access.gpo.gov/cgi-bin/cfrassemble.cgi?title=200621>. Accessed 2007 January 01.
- Codex Alimentarius Commission (CAC). 1989. Guidelines for simple evaluation of food additive intake. Codex Alimentarius Commission Vol. XIV. Supplement 2. Available from: www.codexalimentarius.net/download/standards/6/CXG_003e.pdf. Accessed 2005 November 14.
- Codex Alimentarius Commission (CAC). 2006. Report of the 38th Session of the Codex Committee on Food Additives and Contaminants. ALINORM 06/29/12 - The Hague, The Netherlands 24-28 April 2006.
- Codex Alimentarius Commission (CAC). 2007. Report of the 39th Session of the Codex Committee on Food Additives. ALINORM 07/30/12 - Beijing, China 24-28 April 2007.
- European Commission (EC). 1990. Commission Regulation (EEC) No 2676/90 of 17 September 1990 determining Community methods for the analysis of wines. Official Journal L 272:1–192.
- Fazio T, Warner CR. 1990. A review of sulphites in foods: analytical methodology and reported findings. Food Additives and Contaminants 7:433-454.
- Food and Drug Administration (FDA). 1996. Sulfites: Safe for most, dangerous for some. U. S. Food and Drug Administration – FDA Consumer Magazine 30. Available from: www.fda.gov/fdac/features/096_sulf.html. Accessed 2005 August 09.
- Food Standards Australia New Zealand (FSANZ). 2005. The 21st Australian Total Diet Study - A total diet study of sulphites, benzoates and sorbates. ©Food Standards Australia New Zealand, Published August 2005. Available from: <http://www.foodstandards.gov.au>. Accessed 2007 February 13.
- Guerra CC, Silva GA, Tonietto J, Mello LMR. 2003. Uva para processamento – pós-colheita. Embrapa Uva e Vinho, Brasília, 1ª Edição, 67p.

- Hillery BR, Elkins ER, Warner CR, Daniels D, Fazio T. 1989. Optimized Monier-Williams method for determination of sulfites in foods: collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 72:470-475.
- Horwitz W, Kamps LR, Boyer KW. 1980. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 63:1344-1354.
- Kirk RS, Sawyer R. 1991. *Pearson's composition and analysis of foods*. 9th Edition, Longman Scientific & Technical: Harlow. 479p.
- Kroes R, Müller D, Lambe J, Löwik MRH, Klaveren J, Kleiner J, Massey R, Mayer S, Urieta I, Verger P, Visconti A. 2002. Assessment of intake from the diet. *Food and Chemical Toxicology* 40:327–385.
- Leclercq C, Molinaro MG, Piccinelli R, Baldini M, Arcella D, Stacchini P. 2000. Dietary intake exposure to sulphites in Italy – analytical determination of sulphite-containing foods and their combination into standard meals for adults and children. *Food Additives and Contaminants* 17:979-989.
- Liu S-Q, Pilone GJ. 2000. An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications. *International Journal of Food Science and Technology* 35:49–61.
- Lück E, Jager M. 1997. Sulfur Dioxide. In: *Antimicrobial Food Additives – characteristics, uses, effects*. 2nd Edition, Berlin: Springer. p 102.
- Mareschi JP, François-Collange M, Suschete M. 1992. Estimation of sulphite in food in France. *Food Additives and Contaminants* 9:541-549.
- Mello LMR. 2002. Tendência de consumo e perspectivas do mercado de vinhos no Brasil. Embrapa Uva e Vinho. Available from: www.cnpuv.embrapa.br. Accessed 2004 October 21.
- Mello LMR. 2006a. Atuação do Brasil no mercado vitivinícola mundial – Panorama 2005. Embrapa Uva e Vinho. Available from: www.cnpuv.embrapa.br. Accessed 2006 March 23.

- Mello LMR. 2006b. Produção e comercialização de uvas e vinhos – Panorama 2005. Embrapa Uva e Vinho. Available from: www.cnpuv.embrapa.br. Accessed 2006 March 23.
- Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV). 2003. Situation report for the world vitivinicultural sector in 2003. Available from: http://news.reseau-concept.net/pls/news/p_entree?i_sid=&i_type_edition_id=20508&i_section_id=20510&i_lang=33. Accessed 2007 January 09.
- Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV). 2006. Compendium of international methods of wine and must analysis. Edition 2006, Volume 2, Office International de la Vigne et du Vin, Paris. Available from: http://news.reseau-concept.net/pls/news/p_entree?i_sid=&i_type_edition_id=20508&i_section_id=20510&i_lang=33. Accessed 2007 January 11.
- Ough CS. 1986. Determination of sulfur dioxide in grapes and wines. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 69:5-7.
- Peroni DG, Boner AL. 1995. Sulfite sensitivity. *Clinical and Experimental Allergy* 25:680-681.
- Peterson GF, Kirrane M, Hill N, Agapito A. 2000. A comprehensive survey of the total sulphur dioxide concentrations of American wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 51:189-191.
- Protas JFS, Camargo UA, Mello LMR. 2002. A vitivinicultura brasileira: realidade e perspectivas. Embrapa Uva e Vinho. Available from: <http://www.cnpuv.embrapa.br/>. Accessed 2007 January 29.
- Speijers GJA. 1999. Precision of estimates of an ADI (or TDI or PTWI). *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 30:S87-S93.
- Taylor SL, Higley NA, Bush RK. 1986. Sulfites in foods: uses, analytical methods, residues, fate, exposure, assessment, metabolism, toxicity, and hypersensitivity. *Advances in food Research* 30:1-76.
- Usseglio-Tomasset L. 1992. Properties and use of sulphur dioxide. *Food Additives and Contaminants* 9:399-404.

- Vahl JM, Converse JE. 1980. Ripper procedure for determining sulfur dioxide in wine: collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 63:194-199.
- Vally H, Klerk N, Thompson PJ. 2000. Alcoholic drinks: important triggers for asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 105:462-467.
- Vally H, Thompson PJ. 2001. Role of sulfite additives in wine induced asthma: single dose and cumulative dose studies. *Thorax* 56:763-769.
- Vally H, Thompson PJ. 2003. Allergic and asthmatic reactions to alcoholic drinks. *Addiction Biology* 8:3-11.
- Verger P, Chambolle M, Babayou P, Breton S, Volatier JL. 1998. Estimation of the distribution of the maximum theoretical intake for ten additives in France. *Food Additives and Contaminants* 15:759-766.
- Warner CR, Daniels DH, Joe FL, Fazio T. 1986. Revaluation of Monier-Williams method for determining sulfite in food. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 69:3-5.
- Warner CR, Diachenko GW, Bailey CJ. 2000. Sulfites: an important food safety issue. *Food Testing & Analysis*. Available from: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fssulfit.html>. Accessed 2004 July 17.
- Wedzicha BL. 1992. Chemistry of sulphiting agents in food. *Food Additives and Contaminants* 9:449-459.
- Williams DJ, Scudamore-Smith PD, Nottingham SM, Petroff M. 1992. A comparison of three methods for determining total sulfur dioxide in white wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 43:227-229.
- World Health Organisation (WHO). 2000. Evaluation of certain food additives (Fifty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). WHO Technical Report Series, N° 891 (Geneva: WHO).
- Yang WH, Purchase ECR. 1985. Adverse reactions to sulfites. *Canadian Medical Association Journal* 133:865-867.

Capítulo 3

Analytical determination of sulphites
in fruit juices available on the Brazilian market

Analytical determination of sulphites in fruit juices available on the Brazilian market

Abstract

Because sulphites have been implicated as the cause of adverse-type reactions such as bronchospasm in some subjects with asthma their use as food additives may represent a risk for sensitive individuals. The present work aimed on determining the sulphite content in fruit juices available on the Brazilian market. Thirty-nine samples of fruit juices, either concentrated (37) or ready-to-drink (2) were collected on the market and analysed for sulphites using the optimized Monier-Williams method. The residual sulphite levels, expressed as sulphur dioxide in juices ready to consume, ranged from <10.0 mg/L in grape and guava juices to 98.5 mg/L in mango juice. The mean recovery was 89.1% with a CV of 6.8%. All samples presented residual sulphite levels below 50% of the national maximum permitted level of 200 mg/L (333 mg/L for cashew apple juice). These findings indicate that the actual use of sulphites by the industry in fruit juices are well below those legally permitted by the Brazilian legislation.

Key words: Sulphites, Fruit juice, Preservatives, Food additive, Monier-Williams distillation

1. Introduction

Sulphites or sulphiting agents have been added to foods for centuries and include sulphur dioxide (SO₂) and the many forms of inorganic sulphites that release SO₂ under the conditions of use. These substances are used worldwide as food additives due to their function as antimicrobial agents, enzyme inhibitors, antioxidants and inhibitors of enzymatic and non-enzymatic browning (Taylor et al., 1986; Lück and Jager, 1997).

Among the mechanisms of browning, the one that involves the action of polyphenol oxidase (PPO) is of the greatest importance since this enzyme is largely found in fruits and vegetables. PPO activity is high in foods that are particularly sensitive to oxidative browning, such as potatoes, apples, mushrooms, bananas, peaches, fruit juices and wines. Although alternatives are being searched, sulphites are still the additives most widespread used for controlling browning in the food industry. Due to their multiple functions, sulphiting agents are used as preservative in fruit juices worldwide (Taylor et al., 1986; Iyengar and McEvily, 1992; Warner et al., 2000).

From a toxicological point of view, residual levels of sulphites in food and beverages have become implicated in causing adverse-type reactions, such as local gastric irritation, nausea, headaches, urticaria, and asthmatic reactions (bronchospasms) in some subjects with asthma (Yang and Purchase, 1985; Taylor et al., 1986; Anibarro et al., 1992; Wüthrich et al., 1993; Peroni and Boner, 1995; Warner et al., 2000). Although the physiological basis for asthmatic responses has not been fully understood, clinical observations have established that certain medical conditions, such as severe asthma and steroid-dependence, are associated with a predisposition to sulphite-hypersensitivity (Anibarro et al., 1992; Peroni and Boner, 1995; Warner et al., 2000). It was also observed that sulphite in the form of sulphur dioxide is the agent that causes the physiological response (Fazio and Warner, 1990; Warner et al., 2000). In addition, several neurological abnormalities, seizures and lenses subluxation were diagnosed in individuals that presented deficiency of sulphite oxidase. This enzyme is responsible for the final

oxidation of sulphite to inactive sulphate that can rapidly be excreted in the urine (Kisker et al., 1997; Edwards et al., 1999).

The use of food additives in different countries is limited by specific regulations established on the basis of their safety for use and technological needs. Brazil, as many other countries, has followed the recommendations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) on the safe use of food additives. According to the exposure assessment of sulphites conducted by the JECFA based on the proposed maximum limits for sulphites in the draft General Standard for Food Additives, in conjunction with the data on food intake provided by national governments, certain foods and beverages such as fruit juices, dried fruits and wines were identified as major contributors to the overall intake of sulphites. Additionally, it was considered that the consumption of these foods and beverages by certain individuals may result in intakes of sulphites above the Acceptable Daily Intake (ADI) of 0.7 mg/kg body weight, expressed as sulphur dioxide, driving the Codex Committee on Food Additives and Contaminants (CCFAC) to recommend Member States to monitor the sulphite intake in their countries (WHO, 2000; Codex Alimentarius Commission, 2006,2007).

National data concerning sulphite intake based on measured levels of sulphite residues in foods and beverages are scarce in Brazil. Most of the information available on sulphite contents in foods and beverages has been generated in order to control the use of these preservatives by the food industry. In this sense, Yabiku et al. (1987) determined the content of sulphites in 473 samples of fruit juices available on the Brazilian market using the Monier-Williams method modified by Shipton. Fifty-one percent of the analysed samples presented residual levels of sulphite above the national permitted level of 200 mg/L. The highest level of residual sulphite was found in cashew apple juice (1439 mg/L). Recently, Popolim and Penteado (2005) estimated the intake of sulphite by 14 to 19 year-old Brazilian students based on national maximum levels of use and individual consumption data. The authors reported that 4.5% of the studied individuals presented sulphite intakes above 50% of the ADI and that the main contributors for these intakes were manufactured fruit juices.

The fruit juice sector in Brazil is characterized by a continuous growing of sales (around 15% per year). The segment of concentrated fruit juices intended for direct sale to the consumer for the preparation of ready-to-drink fruit juice accounts for 22% of this sector (630 million of liters in the year of 2002) (Araújo, 2003). Moreover, data from a household budget survey conducted by the Brazilian Institute of Geography and Statistics from July 2002 to June 2003 showed a notable increase in the consumption of manufactured fruit juices in the last years (IBGE, 2004), what makes increasingly important to know the levels of residual sulphites in these beverages. Since sulphite levels of use typically do not reflect the concentration remaining in a food at the time of ingestion, owing to losses during processing and storage of treated foods (Taylor et al., 1986), the monitoring of usage and intake of sulphites based on analytical data of the residual sulphite levels will certainly result in a more accurate exposure assessment to these preservatives. As a consequence, the determination of residual sulphite, particularly in foods and beverages that are consumed without pre-treatment such as fruit juices, wine, and dried fruits, has become an issue of concern in the last few years (WHO, 2000).

The Monier-Williams method, which is a distillation-titration procedure, has been the procedure most widely used for the analytical determination of sulphite in foods and beverages (Warner et al., 1986; Fazio and Warner, 1990; AOAC, 1995). Although time consuming, this method is considered as a reference method to other procedures due to its accuracy and precision (Hillery et al., 1989; Fazio and Warner, 1990). In Brazil, the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply has adopted the Monier-Williams procedure modified by Shipton (Pearson, 1962) as an official method to analyze sulphites in non-fermented beverages (Brasil, 2005).

Since 1986, the United States Food and Drug Administration (FDA) has required warning labels on any food containing more than 10 mg/kg or beverage containing more than 10 mg/L of sulphites. For this purpose, Hillery et al. (1989) published a collaborative study using the Monier-Williams method optimized by the FDA for determining sulphites at the level of 10 ppm in foods and beverages. The minor modifications that were introduced by the FDA did not change the chemistry

of the Monier-Williams procedure but established additional specifications to achieve a lower level of quantification as required by the current labelling regulation in the USA (Code of Federal Regulations, 2006a,b).

The present work aimed on determining the residual sulphite content in a variety of fruit juices available on the Brazilian market using the optimized Monier-Williams distillation method, in order to check whether current uses of these preservatives are in accordance with the Brazilian legislation. These data will further be used to estimate the contribution of fruit juices to the intake of sulphites in Brazil.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

All chemicals were of analytical grade and the nitrogen gas used was over 99.9% of purity. Water was obtained from a Millipore Milli-Q water purification system. The solutions used for the residual sulphite determination were the following:

- a) 4 mol/L aqueous hydrochloric acid (HCl), prepared by diluting 90 mL of concentrated hydrochloric acid (37%) to 270 mL;
- b) 0.25% solution of methyl red in ethanol;
- c) Standardized titrant 0.01 mol/L sodium hydroxide (NaOH), prepared by diluting 100 mL of 0.1 mol/L NaOH (Titrisol[®] Merck) to 1000 mL and standardized with 0.01 mol/L potassium hydrogen phthalate;
- d) 3% hydrogen peroxide (H₂O₂) solution, prepared daily by diluting 10 mL of 30% H₂O₂ to 100 mL in water;
- e) 5% aqueous ethanol.

2.2. Sampling

For the purpose of this study, national brands of fruit juices whose label declared the addition of sulphites were purchased from supermarkets and

specialized stores in the city of Campinas, State of São Paulo, between August 2004 and April 2005. Most of the collected samples were available as concentrated juices to be consumed after the addition of water, with only one brand of cashew apple juice and one brand of tomato juice being commercialized as ready-to-drink juices.

The types and brands of juices collected were the following: Antilles cherry (2 brands), cashew apple (7 brands), grape (3 brands), graviola (sour sop) (1 brand), guava (5 brands), mango (6 brands), orange (1 brand), passion fruit (5 brands), peach (1 brand), pineapple (5 brands), tamarind (1 brand), tomato (1 brand), and mix, blended of orange, papaya and banana juices to be added in milk, (1 brand).

2.3. Sample preparation

Each sample comprised three different lots of the same type and brand of juice, which were carefully mixed before analysis. The samples were analysed in duplicate.

With exception of a sample of cashew apple juice and a sample of tomato juice, which were available as ready-to-drink juices, the analyses were carried out with the concentrated juice. The volume used for analysis ranged from 10 to 50 mL, depending on the sulphite level in the sample.

Sample preparation and analysis were carried out as quickly as possible to avoid loss of labile forms of sulphites.

2.4. Determination

The analyses were performed according to the AOAC Official Method 990.28 (AOAC, 1995), which measures free sulphite plus a reproducible portion of bound sulphite.

The sample, in 5% aqueous ethanol, was quantitatively transferred into a 1000 ml round-bottomed distillation flask followed by the addition of 90 ml of 4 mol/L hydrochloric acid. The acidified sample was refluxed for 1 h and 45 min. Any liberated SO₂ was carried through the apparatus by a stream of nitrogen gas into a

solution of 3% H₂O₂, where SO₂ was oxidized to sulphuric acid (H₂SO₄). The flow rate of the nitrogen was adequate to keep a positive pressure into the bottom flask avoiding the matrix reflux into the trap.

The generated H₂SO₄ was quantified by titration with standardized NaOH solution using 0.25% solution of methyl red in ethanol as the indicator. The blank determination on reagents was performed using distilled water and sulphite-free fruit juices. The residual sulphite levels, expressed as sulphur dioxide, were computed as follows:

$$\text{SO}_2 \text{ (mg/L)} = (32.03 \times (V_t - V_b) \times M \times 1000)/V_a$$

32.03 = equivalent molar mass of SO₂ (g/mol)

V_t = volume (mL) of standardized NaOH solution required to reach of sample end point

V_b = volume (mL) of standardized NaOH solution required to reach of blank end point

M = molar concentration of standardized NaOH solution determined by standardization with potassium hydrogen phthalate (mol/L)

1000 = convert gram to milligram

V_a = volume (mL) of sample introduced into the 1000 mL flask

As in the Brazilian legislation the provisions for the use of sulphites in fruit juices are expressed on a ready to consume basis, the residual sulphite concentrations in the juices as served to the consumer were further calculated according to the instructions of dilution recommended by the manufacturers.

2.5. Gravimetric confirmation procedure

In order to verify if the titrated acid content was provided only from SO₂ distilled, the barium sulphate (BaSO₄) gravimetric confirmation procedure was performed with the contents of the 3% hydrogen peroxide trap (AOAC, 1995). The

trapping solution was transferred into 400 mL beaker. Then, 4 drops of 1mol/L HCl and excess of 10% barium chloride (BaCl_2) solution were added. The mixture was allowed to stand overnight at room temperature. After decantation the precipitate was washed with hot water through weighed Gooch crucible and dried to constant weight at 103-105°C. The blank determination on reagents was also performed for this analysis.

The SO_2 recovery was computed as follows:

$$\text{SO}_2 (\mu\text{g/mL or mg/L}) = \text{BaSO}_4 \times 0.274476 \times 1000/V_a$$

BaSO_4 = barium sulphate precipitate formed (mg)

0.274476 = obtained by division of the SO_2 molar mass by BaSO_4 molar mass ($\text{SO}_2/\text{BaSO}_4$)

1000 = convert milligram to microgram

V_a = volume (mL) of sample used for distillation procedure

2.6. Recovery

The recovery assays were carried out by fortifying samples of sulphite-free fruit juices with standard solutions that were prepared fresh daily and diluted as appropriate just before use. The standard solutions were made by diluting sodium metabisulphite Granular AR (ACS) grade (Mallinckrodt Baker, Inc., Phillipsburg, USA) in purified water. The added sulphite amount, expressed as sulphur dioxide, ranged from 10 to 1192 mg/L.

The repeatability of the method was evaluated through the coefficients of variation (CV) associated to measurements of SO_2 obtained during recovery tests for two fortification levels of 25.6 mg SO_2/L (n=6) e 68.0 mg SO_2/L (n=4).

3. Results and discussion

Samples fortified at levels ranging from 10.0 to 1192.0 mg/L of sulphur dioxide presented average recovery of 89.1% with coefficient of variation of 6.8%. The detailed results obtained from the recovery studies, which were performed with cashew apple, passion fruit and grape juices without added sulphites are listed in Table 1. These results are comparable with the findings obtained by Warner et al. (1986), which reported recoveries higher than 90% of sulphite added to foods such as table grapes, hominy, dried mangoes, and lemon juice using the optimized Monier-Williams method. The CVs obtained from recovery tests performed in different days for two fortification levels, 25.6 mg SO₂/L (n=6) e 68.0 mg SO₂/L (n=4), were 6.0% e 4.5%, respectively. These results are below of the maximum limit of 15% for determinations at mg/L levels recommend by Horwitz et al. (1980).

Table 1: Recovery and coefficient of variation (CV) of sulphur dioxide (SO₂) in fruit juice samples fortified with sodium metabisulphite and analysed by AOAC official method (AOAC, 1995).

Added SO ₂ levels (mg/L)	n ^a	R ^b (%)	CV ^c (%)
10 – 50	7	80.0 – 89.0	4.4
51 – 100	7	80.8 – 94.2	5.4
> 100	6	91.4 – 99.0	3.2

^a number of fortified samples analysed in this range of SO₂ concentration

^b range of recovery

^c coefficient of variation among recovery values obtained in each range of SO₂ fortification

The coefficient of variation between analytical duplicates of the fruit juice samples ranged from 0.1 to 8.6%. These CVs are consistent with a statistical evaluation performed by Hillery et al. (1989) in an intralaboratorial study, which established that the optimized Monier-Williams procedure is capable of determining sulphites in foods with an overall CV ranging from 3.8 to 9.8%.

The recoveries obtained from fruit juices fortified at the 10 mg/L were ≥80%. These findings are in accordance to the AOAC recommendation that establishes recoveries of ≥80% for food matrixes fortified at the 10 mg/L level in order to

ensure accurate sulphite analytical data using the optimized Monier–Williams (Hillery et al., 1989; AOAC, 1995). Based on these results, a limit of quantification of 10.0 mg/L was established for the method employed. For the samples that presented sulphite levels below the limit of quantification, it was assumed that such samples contained 50% of this limit (5.0 mg/L) in order to calculate the average concentrations for each type of fruit juice.

Table 2 shows the gravimetric confirmations that were carried out with the contents of the 3% hydrogen peroxide trap after titration of eight analyses (4 samples in duplicates). The average recovery was 96.6% with CV of 2.3%. These findings confirm that the titrated acid content was provided only from SO₂ distilled. For the rest of the samples the presence of the barium sulphate precipitate was verified qualitatively.

Table 2: SO₂ concentrations from gravimetric analyses in comparison with those from titration.

Sample	SO ₂ concentration from titrimetric analysis (mg/L) ^a	SO ₂ concentration from gravimetric analysis (mg/L) ^b	Relative Recovery* (%)
1	71.4	68.1	95.3
2	67.0	65.3	97.4
3	170.0	165.8	97.5
4	174.3	172.4	98.9
5	337.7	332.6	98.5
6	337.4	330.4	97.9
7	139.5	132.8	95.2
8	145.2	133.9	92.3

*relative recovery calculated as (b/a)x100

The sulphite levels, expressed as sulphur dioxide, found in the concentrated fruit juices ranged from <10.0 mg/L in grape and guava juices to 589.3 mg/L in cashew apple juice (Table 3). In Brazil, a maximum permitted level of 200 mg sulphites/L in juices on ready to consume basis has been established for most fruit juices, with exception of cashew apple juice for which two provisions were

established: 333 mg/L for ready to consume juice and 3000 mg/L for high pulp juice (Brasil, 1988, 2002). According to the results, the six samples of concentrated (high pulp) cashew apple juice presented concentrations below the permitted level.

Table 3: Sulphite concentration (mg/L) found in concentrated fruit juices analysed by the optimized Monier-Williams method.

Juice	n ^a	Range of the residual sulphite concentrations (mg/L)	Mean (mg/L)	CV ^c (%)
Antilles cherry	2	93.7 – 254.4	174.0	65.3
Cashew apple	6	194.1 – 589.3	318.8	54.5
Grape	3	<10.0 – 14.5	<10.0	118.9
Graviola (sour sop)	1	120.8	120.8	---
Guava	5	<10.0 – 327.1	134.0	88.4
Mango	6	116.2 – 295.6	187.1	42.2
Orange	1	145.4	145.4	---
Passion fruit	5	100.2 – 300.1	163.3	50.5
Peach	1	150.1	150.1	---
Pineapple	5	130.0 - 316.6	178.9	44.0
Tamarind	1	112.2	112.2	---
Mix	1	83.4	83.4	---

^a number of samples analysed for each juice type

^b coefficient of variation obtained between averages of the different brands for each juice type

The tomato juice sample and one cashew apple juice brand were excluded from table because they were available as ready-to-drink juices.

As indicated by the results (Table 3), considerable variability in sulphite levels was found within different brands of the same fruit juice suggesting a lack of control

on the addition of this preservative to these products, differences in the quality of the processed fruits and or use of different processing conditions.

The residual sulphite concentration in the juices as served to the consumer was calculated by applying the factor of dilution recommended on the product labels. The levels found ranged from <10.0 mg/L in grape and guava juices to 98.5 mg/L in mango juice (Table 4).

Table 4: Sulphite concentration (mg/L) in fruit juices as served to the consumer.

Juice	n ^a	Range of the residual sulphite concentrations (mg/L)	Mean (mg/L)	CV ^c (%)
Antilles cherry	2	23.4 – 63.6	43.5	65.3
Cashew apple	7	13.4 – 58.9	29.2	59.3
Grape	3	<10	<10	105.7
Graviola (sour sop)	1	24.2	24.2	---
Guava	5	<10 – 81.8	34.3	83.5
Mango	6	37.9 – 98.5	56.4	42.3
Orange	1	36.4	36.4	---
Passion fruit	5	11.1 – 26.0	15.6	37.9
Peach	1	37.5	37.5	---
Pineapple	5	32.5 – 52.8	39.5	21.6
Tamarind	1	16.0	16.0	---
Tomato	1	41.7	41.7	---
Mix	1	27.8	27.8	---

^a number of samples analysed for each juice type

^b coefficient of variation obtained between averages of the different brands for each juice type

As shown in Table 4, all samples presented residual sulphites below the national maximum permitted level of 200 mg/L for ready to consume juices (333 mg/L for cashew apple juice). Comparing these results with those reported by

Yabiku et al. (1987) it is noted that there was a great decrease in the use of sulphites in fruit juices by the industry.

Sulphite intake from foods and beverages has been implicated as one of the main causes of the induction of bronchospasm in some asthmatic subjects (Anibarro et al., 1992; Peroni and Boner, 1995). Data available in the literature indicate that about 5-10% of all asthmatics are affected and that sulphite sensitive asthmatics are adversely affected mainly when these substances are inhaled (Simon et al., 1982; Anibarro et al., 1992; Nannini and Hofer, 1997; Warner et al., 2000). Taking into account these considerations, it is important to stand out that due to the release of gaseous SO₂ from a concentrated fruit juice such as cashew apple juice, which may contain sulphites up to 600 mg/L, only handling these products may represent a risk for sulphite-sensitive subjects.

Since its thirtieth meeting, the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives has recommended that alternative methods of preservation should be encouraged, particularly in those applications in which the use of sulphites may lead to high levels of acute intake and which have most commonly been associated with life-threatening adverse reactions (WHO, 1987).

In Brazil, researches have been conducted with the purpose of developing new technologies to produce concentrated fruit juices with minimized amounts of sulphites (Maia et al., 2001; Cianci et al., 2005). In this regard, the use of combining processes such as heat treatment, chemical preservatives and nitrogen stripping have been studied to produce high pulp cashew apple juice with reduced quantity of sulphites (Maia et al., 2001).

4. Conclusion

The optimized Monier-Williams method is suitable for monitoring of sulphites in concentrated fruit juices.

All analysed fruit juices presented residual sulphite levels within the maximum values established by the Brazilian legislation in force, indicating the adequate use of these preservatives by the industry.

The data generated in this work will contribute to a databank on the levels of sulphites in foods and beverages in Brazil, which has been developed in order to allow the assessment of the intake of sulphites by Brazilians.

References

- Anibarro, B., Caballero, M.T., García-Ara, M.C., Díaz-Pena, J.M., Ojeda, J.A., 1992. Asthma with sulfite intolerance in children: a blocking study with cyanocobalamin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 90 (1), 103-109.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1995. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 16th Edition (Arlington, Virginia, USA: AOAC International), Chapter 47, 27-29.
- Araújo, L., 2003. Sucos e Refrigerantes: um mercado em ebulição. *Brasil Alimentos* 18, 18-25.
- Brasil, 1988. Resolução nº 4, de 24 de novembro de 1988. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 19 de dezembro, 1988.
- Brasil, 2002. Resolução RDC ANVISA/MS nº. 12, de 10 de janeiro de 2002. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 14 de janeiro, 2002.
- Brasil, 2005. Instrução Normativa Nº 24, de 08 de Setembro de 2005. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 20 de setembro, 2005.
- Cianci, F.C., Silva, L.F. M., Cabral, L.M.C., Matta, V.M., 2005. Clarificação e concentração de suco de caju por processos com membranas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 25 (3), 579-583.

- Code of Federal Regulations, 2006a. Sulfites in standardized food: Title 21, Volume 2, 21CFR130.9. Revised as of April 1, 2006. U. S. Food and Drug Administration. Available from: <http://www.access.gpo.gov/cgi-bin/cfrassemble.cgi?title=200621>. Accessed 2007 January 01
- Code of Federal Regulations, 2006b. Food labeling: Title 21, Volume 2, 21CFR101. Revised as of April 1, 2006. U. S. Food and Drug Administration. Available from: <http://www.access.gpo.gov/cgi-bin/cfrassemble.cgi?title=200621>. Accessed 2007 January 01
- Codex Alimentarius Commission, 2006. Report of the 38th Session of the Codex Committee on Food Additives and Contaminants. ALINORM 06/29/12 - The Hague, The Netherlands 24-28 April 2006.
- Codex Alimentarius Commission, 2007. Report of the 39th Session of the Codex Committee on Food Additives. ALINORM 07/30/12 - Beijing, China 24-28 April 2007.
- Edwards, M.C., Johnson, J.L., Marriage, B., Graf, T.N., Coyne, K.E., Rajagopalan, K.V., Macdonald, I.M., 1999. Isolated sulfite oxidase deficiency – review of two cases in one family. *Ophthalmology* 106 (10), 1957-1961.
- Fazio, T., Warner, C.R., 1990. A review of sulphites in foods: analytical methodology and reported findings. *Food Additives and Contaminants* 7 (4), 433-454.
- Hillery, B.R., Elkins, E.R., Warner, C.R., Daniels, D., Fazio, T., 1989. Optimized Monier-Williams method for determination of sulfites in foods: collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 72 (3), 470-475.
- Horwitz W., Kamps L.R., Boyer K.W., 1980. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 63 (6), 1344-1354.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2004. Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2002-2003: análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no Brasil. Available from: <http://www.ibge.gov.br/>. Accessed 2006 September 11.

- Iyengar, R., McEvily, A.J., 1992. Anti-browning agents: alternatives to the use of sulfites in foods. *Trends in Food Science & Technology* 3, 60-64.
- Kisker, C., Schindelin, H., Pacheco, A., Wehbi, W.A., Garrett, R.M., Rajagopalan, K.V., Enemark, J.H., Rees, D.C., 1997. Molecular basis of sulfite oxidase deficiency from the structure of sulfite oxidase. *Cell* 91, 973-983.
- Lück, E., Jager, M., 1997. Sulfur Dioxide, Chapter 12 in: *Antimicrobial Food Additives – characteristics, uses, effects*. 2nd Edition – Springer, Berlin, 262p.
- Maia, G.A., Monteiro, J.C.S., Guimarães, A.C.L., 2001. Estudo da estabilidade físico-química e química do suco de caju com alto teor de polpa. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 21 (1), 43-46.
- Nannini, L.J.Jr., Hofer, D., 1997. Effect of inhaled magnesium sulfate on sodium metabisulfite-induced bronchoconstriction in asthma. *The Cardiopulmonary and Critical Care Journal* 111 (4), 858-861.
- Pearson, D., 1962. *The chemical analysis of food*. 5th Edition, J. A. Churchill, London, 464p.
- Peroni, D.G., Boner, A.L., 1995. Sulfite sensitivity. *Clinical and Experimental Allergy* 25, 680-681.
- Popolim, W.D., Penteado, M.V.C., 2005. Estimate of dietary exposure to sulphites using Brazilian students as a sample population. *Food Additives and Contaminants* 22 (11), 1106-1112.
- Simon R.A., Green, L., Stevenson, D.D., 1982. The incidence of metabisulfite sensitivity in an asthmatic population. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 69, 118A.
- Taylor, S.L., Higley, N.A., Bush, R.K., 1986. Sulfites in foods: uses, analytical methods, residues, fate, exposure, assessment, metabolism, toxicity, and hypersensitivity. *Advances in Food Research* 30, 1-76.
- Warner, C.R., Daniels, D.H., Joe, F.L., Fazio, T., 1986. Revaluation of Monier-Williams method for determining sulfite in food. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 69 (1), 3-5.

- Warner, C.R., Diachenko, G.W., Bailey, C.J., 2000. Sulfites: an important food safety issue. Food Testing & Analysis. Available from: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fssulfit.html>. Accessed 2004 July 17.
- World Health Organisation (WHO), 1987. Evaluation of certain food additives and contaminants (Thirtieth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). WHO Technical Report Series, N° 751 (Geneva: WHO).
- World Health Organisation (WHO), 2000. Evaluation of certain food additives (Fifty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). WHO Technical Report Series, N° 891 (Geneva: WHO).
- Wüthrich, B., Kagi, M.K., Hafner, J., 1993. Disulfite-induced acute intermittent urticaria with vasculitis. *Dermatology* 187, 290-292.
- Yabiku, H.Y., Takahashi, M.Y., Martins, M.S., Heredia, R., Zenebon, O., 1987. Níveis de conservadores intencionais em sucos naturais de frutas comercializados no Brasil. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 47 (1/2), 65-75.
- Yang, W.H., Purchase, E.C.R., 1985. Adverse reactions to sulfites. *Canadian Medical Association Journal* 133 (1), 865-867.

Capítulo 4

Estimation of the intake of sulphites by adolescents
from the consumption of fruit juices in Brazil

Estimation of the intake of sulphites by adolescents from the consumption of fruit juices in Brazil

Abstract

Although sulphiting agents have been used for centuries due to their cleansing and disinfecting properties, sulphites have become a concern as food additives because they have been implicated in causing adverse-type reactions such as bronchospasms in some asthmatic subjects. Additionally, it was reported by the Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) in its fifty-first meeting that the consumption of certain foods and beverages may result in intakes of sulphites above the Acceptable Daily Intake (ADI) of 0.7 mg/kg body weight, driving the Codex Committee on Food Additives and Contaminants to recommend Member States to monitor sulphite intake in their countries. The present work aimed on assessing the contribution of national fruit juices to the intake of sulphites by a group of 11-17 year-old Brazilian adolescents. The estimates of sulphite intake were obtained by combining individual consumption data generated by a 24-hour dietary recall with sulphite levels determined by chemical analysis using the optimized Monier-Williams method. The calculated sulphite intakes for average consumers of fruit juices were lower than the ADI set by the JECFA. However, estimates at the 95th percentile indicated that the consumption of juices containing sulphites at a concentration of 40 mg/L or above, what is the case of Antilles cherry, guava, mango, pineapple, and tomato juices, may lead to the intakes of these additives equal to or above the ADI. The results suggest that adolescents whose dietary patterns lead to a high regular consumption of sulphite-containing fruit juices are individuals potentially at risk of exceeding the ADI of these preservatives.

Key words: sulphites, food additive intake, preservatives, fruit juices

1. Introduction

Sulphiting agents (sulphur dioxide and their sodium, potassium and calcium salts) are used worldwide in the food and beverages due to their function as antimicrobial agents, enzyme inhibitors, antioxidants and inhibitors of enzymatic and non-enzymatic browning. However, these preservatives have become a concern as food additives because they have been implicated as the cause of headaches, local gastric irritation, nausea, urticaria, and bronchospasms in some asthmatic subjects (Yang and Purchase 1985; Taylor et al. 1986; Fazio and Warner 1990; Anibarro et al. 1992; Wüthrich et al. 1993; Peroni and Boner 1995; Warner et al. 2000; Vally and Thompson 2003). Several neurological abnormalities, seizures and lenses subluxation were also diagnosed in individuals that presented deficiency of sulphite oxidase. This enzyme is responsible for the final oxidation of sulphite to inactive sulphate that can be rapidly excreted in the urine (Kisker et al. 1997; Edwards et al. 1999).

The safety of food additives is monitored and assessed internationally by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). According to JECFA, the safety in use of an additive can be established in terms of its acceptable daily intake (ADI), expressed in mg of the additive per kg body weight, which represents the amount of the substance that can be consumed daily for a lifetime without health hazards. The ADI of a food additive is set on the basis of the highest no-observed-effect level (NOEL) obtained from animal studies. In calculating the ADI, a "safety factor", traditionally of 100, is applied to the NOEL to provide a conservative margin of safety on account of the inherent uncertainties in extrapolating animal toxicity data to potential effects in the human being and for variation within the human species (WHO 1987). In 1974, during its seventeenth meeting, the JECFA established for sulphites a group ADI of 0-0.7 mg/kg of body weight (bw), expressed as sulphur dioxide, that was maintained at its fifty-first meeting in 1998 (WHO 2000).

The risk characterization of a food chemical requires comparison of human intakes with the output of hazard characterization, which in the case of additives is the relevant ADI (Kroes et al. 2002; Renwick 2006). In 1999, JECFA assessed the

intake of sulphur dioxide and its calcium, potassium and sodium salts. The evaluation of the proposed maximum limits for sulphites in the draft General Standard for Food Additives, in conjunction with data on food intake supplied by national governments, led this committee to the conclusion that certain foods and beverages such as fruit juices, dried fruits and wines are the major contributors to overall sulphite intake. Moreover, it was reported by the JECFA that the consumption of these foods and beverages may result in intakes of sulphites above the ADI, driving the Codex Committee on Food Additives and Contaminants (CCFAC) to recommend Member States to monitor the sulphite intake in their countries (WHO 2000; Codex Alimentarius Commission 2006, 2007).

Estimates of food additive intake may be sequentially calculated starting with the simplest theoretical maximum daily intake (TMDI) estimate and proceeding to more refined estimates, if necessary. The TMDI is a conservative approach for initial prioritization/assessment of risk of exceeding the ADI which might involve *per capita* food consumption data combined with the maximum permitted level, with the assumption that all foods in which the additive is permitted contain the additive at the maximum permitted level. It is generally accepted that *per capita* estimates can only be a general guide to actual intake since they do not take account of the considerable variation in the dietary behavior of individuals in the population. However, they can be a very useful tool in prioritizing substances for further evaluation and in monitoring trends in the use of additives. If the ADI is exceeded using the TMDI, further estimate using more detailed information on the actual use of these additives and on individual food consumption are needed (Codex Alimentarius Commission 1989; Gibney and Lambe 1996; Kroes et al. 2002).

Assessments of sulphite intakes in some countries, such as Italy and France, using TMDI as a conservative approach for initial prioritization of risk of exceeding the ADI indicated that more refined approaches were needed (Leclercq et al. 2000; WHO 2000). In the study conducted by Verger et al. (1998) the theoretical maximum daily intake of 10 additives in France was estimated using their maximum permitted levels of use for each food category and national consumption data. With exception of sulphites, the additives selected presented TMDI values below the ADI. For the particular case of sulphites, the authors concluded that

further work was needed using refined analytical data of additives in foods and individual consumption data.

According to the European Parliament and Council Directives 94/35/EC (Article 8), 94/36/EC (Article 6) and 95/2/EC (Article 7) on food additives, the Member States of the European Union shall establish systems to monitor the usage and consumption of food additives in order to assess the risk of exceeding the ADI. The preliminary report that represents a first attempt to obtain an overview of the dietary food additive intake in the European Union (EU) indicated that for most of the 171 additives and additive groups that are permitted for use in the EU the dietary intake was below the acceptable daily intake. However, according to information submitted by Denmark, Spain, France, Italy, the Netherlands, United Kingdom and Norway, the sulphite intake estimate for an adult was among 20 and 266% of the ADI, based on a 60 kg body weight, and in the case of children (body weight of 15 kg), the sulphite intake estimate exceeded the ADI in about 1227%. Since the estimates reported for sulphites were extremely conservative based on the assumption that the additive is used in the widest possible range of foods and at maximum permitted levels, the Member States were requested to collect more detailed information on the real use of these additives and on the real food consumption (European Commission 2001).

Data in the literature concerning sulphite intake by the Brazilian population are scarce. Recently, Popolim and Penteado (2005) estimated the intake of sulphite by 14 to 19 year-old Brazilian students based on national maximum levels of use and on individual consumption data. The authors reported that 4.5% of the studied individuals presented sulphite intakes above 50% of the ADI and that the main contributors for these intakes were manufactured fruit juices.

The adolescents are oftentimes considered as a group exposed to nutritional risks due to their inadequate dietary practices such as the high consumption of processed food items. Moreover, this group is more likely to exceed the toxicological reference value (ADI) of the food additives due to their higher food consumption rates per kg body weight. The proportion of adolescents in the majority of the American continent countries has grown in the last decades. In

Brazil, the individuals with age between 10 and 17 years represented 17.1% of the population in the year 1999 (IBGE/UNICEF 2001; Carmo et al. 2006).

Taking into account these considerations the present work aimed on assessing the contribution of fruit juices to the intake of sulphites for a group of Brazilian adolescents aged 11 to 17 years old. The estimates of sulphite intake were obtained by combining individual consumption data with sulphite levels determined by chemical analysis.

Sulphite levels of use typically do not reflect the concentration remaining in a food at the time of ingestion, owing to losses during processing and storage of treated foods since these additives are reactive with air and food components (Taylor et al. 1986; WHO 2000). Therefore, the monitoring of usage and intake of sulphites based on analytical data of the residual sulphite levels will certainly result in a more accurate exposure assessment to these preservatives.

2. Procedure

2.1. Food consumption data

The contribution of fruit juices to the intake of sulphites was based on individual consumption data obtained from the survey conducted by Caroba (2002). The survey had as main objective the investigation of the nutritional status, food preferences and life style of adolescents registered in the public schools of the city of Piracicaba, which is located in the administrative region of Campinas, where the fruit juices sampling for sulphites analysis was made.

A representative sample of 578 adolescents aged 11 to 17 years old, of both genders, was withdrawn from seven public schools previously selected from a total of 54 units. Food and beverage consumption data were obtained through 24-hour dietary recall questionnaire that was fulfilled by the adolescents that participated of the survey, which received previous orientation on the correct way to record the information. The 24-hour dietary recall questionnaire adopted in the survey was tested and standardized previously.

The amounts of food and beverages consumed either outside or inside house were collected in the period from July to August 2001. Anthropometrical measurements (weigh and height) were also collected from the adolescents.

Among the participants of the survey, 140 adolescents that registered the consumption of any kind of fruit juice, excluding artificial juices, were selected for the purpose of this study. The type of fruit juice (natural or processed) was not informed by the adolescents. Because of that, a conservative approach was adopted assuming that the selected adolescents consumed manufactured fruit juices with added sulphites. Information on the volume (milliliters) of fruit juices consumed by each selected adolescent (78 girls and 62 boys) as well as their respective weight were also recorded and used in the calculations. Figure 1 shows the distribution of the daily consumption of fruit juices among the selected adolescents.

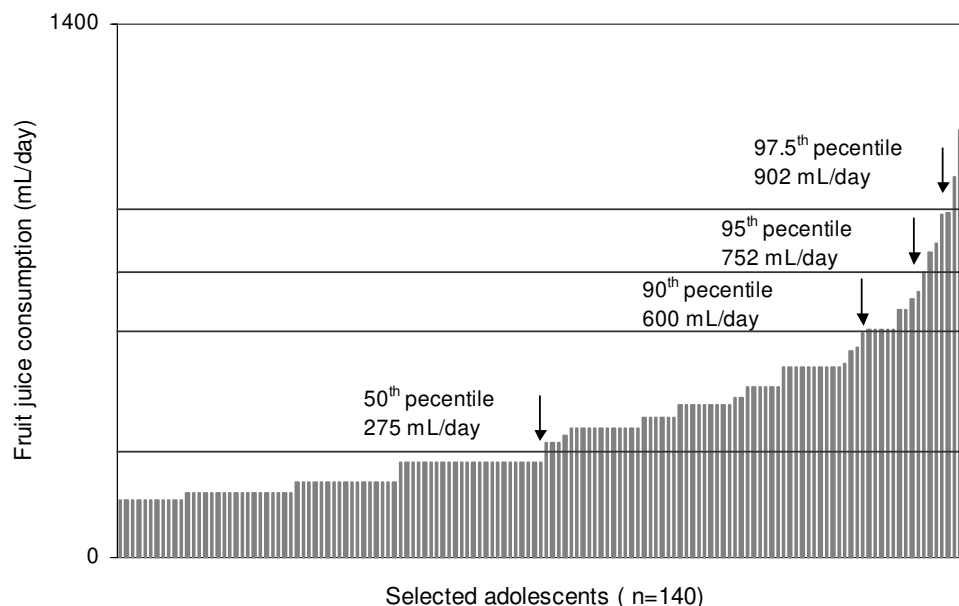


Figure 1: Distribution of the daily consumption of fruit juices by selected adolescents.

2.2. Analytical data

The analytical data on the levels of sulphite in fruit juices were obtained from Machado et al. (2007). Concisely, thirty-nine samples of national brands of fruit juices whose label declared the addition of sulphites were purchased from supermarkets and specialised stores in the city of Campinas, State of São Paulo, between August 2004 and April 2005 and analysed for sulphite contents using the optimized Monier-Williams distillation method, which is the AOAC Official Method 990.28 (AOAC 1995). Most of the collected samples (37) were available as concentrated juices to be consumed after the addition of water, with only one brand of cashew apple juice and one brand of tomato juice being commercialised as ready-to-drink juices. As the Brazilian legislation expresses the provisions for the use of sulphites in fruit juices on a ready to consume basis, the residual sulphite concentrations in the juices as served to the consumer were further calculated according to the instructions of dilution recommended by the manufacturers. Each sample comprised three different lots of the same type and brand of juice, which were carefully mixed before analysis. The samples were analysed in duplicate and the coefficient of variation was always below 9%. The limit of quantification (LOQ) of 10 mg/L was established for the method employed. When the analytical result was below the LOQ it was assumed that sulphites were either not added or not present. As a consequence, juices containing less than 10 mg/L were assumed as not containing sulphites.

2.3. Intake estimate modeling

In order to assess the exposure of each adolescent to sulphite from the consumption of manufactured fruit juices, the deterministic approach was used by multiplying a fixed value of consumption of fruit juice by a fixed value of sulphite level determined analytically (Kroes et al. 2002). For comparison with the ADI, the estimated sulphite daily intake, initially expressed in mg/day, was divided by each individual body weight. Calculations were made using the mean concentrations of sulphites determined analytically for each type of fruit juice.

To simulate a “worse case” scenario, estimates were also done using the national maximum permitted level of 200 mg of sulphites/L (333 mg of sulphites/L for cashew apple juice) in fruit juices as served to the consumer. Sulphite intakes at the 90th, 95th and 97.5th percentiles of the distribution are also reported. The risk associated to exposure to sulphites was assessed by comparing the estimated daily intake with the ADI of 0.7 mg/kg bw.

3. Results and discussion

All samples of the analyzed fruit juices presented sulphite contents below the maximum permitted levels established by the Brazilian legislation for fruit juices as served to the consumer (Brasil 1988, 2002). As it was assumed that sulphites were not present when the analytical result was less than the LOQ, three samples of grape juices and a sample of guava juice that presented contents below 10 mg/L were not accounted for the calculations of intake estimates.

Table 1 shows the mean contribution of each type of fruit juice to the daily intake of sulphites by selected adolescents (n=140) and by boys and girls, separately. The statistical test *t* was applied in order to verify if the mean intakes for each gender and for all adolescents were statistically different. The differences between means (mean of each gender related to mean of all selected adolescents) were not statistically significant at the 5% level. Then, further discussion on sulphite exposure by selected adolescents was made without specification according to their gender.

Table 1: Contribution of fruit juices to the daily intake of sulphites (mg/kg bw per day) by adolescents.

Types of fruit juices	Mean concentration of SO ₂ (mg/L)	Mean Daily intake of SO ₂ (mg/kg bw per day)		
		girls (n=78)	boys (n=62)	Selected sample (n=140)
Antilles cherry (n*=2)	43.5	0.31	0.32	0.31
Cashew apple (n=7)	29.2	0.21	0.22	0.21
Graviola (n=1)	24.2	0.17	0.18	0.17
Guava (n=4)	41.6	0.29	0.31	0.30
Mango (n=6)	56.4	0.40	0.42	0.41
Orange (n=1)	36.4	0.26	0.27	0.26
Passion fruit (n=5)	15.6	0.11	0.12	0.11
Peach (n=1)	37.5	0.26	0.28	0.27
Pineapple (n=5)	39.5	0.28	0.29	0.29
Tamarind (n=1)	16.0	0.11	0.12	0.12
Tomato (n=1)	41.7	0.29	0.31	0.30
Mix (n=1)	27.8	0.20	0.21	0.20
Mean level in all types of juices (n=35)	34.1	0.24	0.25	0.25

* number of fruit juice brands analysed for sulphite content.

The mean intake of sulphites ranged from 0.11 mg/kg bw to 0.41 mg/kg bw for passion fruit and mango juices, respectively, corresponding to 16% and 59% of the ADI (Table 2). For intakes at the 90th percentile it was noted that the ADI may be exceeded through the consumption of mango juice.

Table 2: Mean daily intake of sulphites (mg/kg bw per day) from each type of fruit juice by selected adolescents (n=140) and the intakes at the 90th, 95th and 97.5th percentiles of the distribution.

Types of fruit juices	Sulphite intake (mg/kg bw per day)		90 th percentile	95 th percentile	97.5 th percentile
	range	mean			
	(mg/kg bw per day)				
Antilles cherry	0.10 - 1.20	0.31	0.54	0.68	0.84
Cashew apple	0.07 - 0.81	0.21	0.36	0.46	0.57
Graviola (sour sop)	0.06 - 0.67	0.11	0.30	0.38	0.47
Guava	0.10 - 1.15	0.30	0.52	0.65	0.80
Mango	0.13 - 1.56	0.41	0.70	0.88	1.09
Orange	0.08 - 1.00	0.26	0.45	0.57	0.70
Passion fruit	0.04 - 0.43	0.11	0.19	0.24	0.30
Peach	0.09 - 1.03	0.27	0.47	0.58	0.73
Pineapple	0.09 - 1.09	0.29	0.49	0.61	0.76
Tamarind	0.04 - 0.44	0.12	0.20	0.25	0.31
Tomato	0.10 - 1.15	0.30	0.52	0.65	0.81
Mix	0.06 - 0.77	0.20	0.35	0.43	0.54
Mean level in all types of juices	0.08 - 0.94	0.25	0.42	0.53	0.66

The estimates at the 95th percentile indicate that the consumption of certain juices containing sulphites at a concentration of 40 mg/L or above such as observed for Antilles cherry, guava, mango, pineapple, and tomato juices, may result in intakes of these preservatives equal to or above the ADI. Internationally, it has been considered that the intakes for the 95th percentile represent the consumption pattern of the high consumers that eat normally more than 3 times the mean consumption (Codex Alimentarius Commission 1989).

Figure 2 illustrates the distribution of the daily intakes of sulphites by selected adolescents considering the consumption of mango juice, which presented the highest mean content of sulphites (56.4 mg/L). At this concentration, sulphite intake by high consumers (95th percentile) could reach 126% of the ADI.

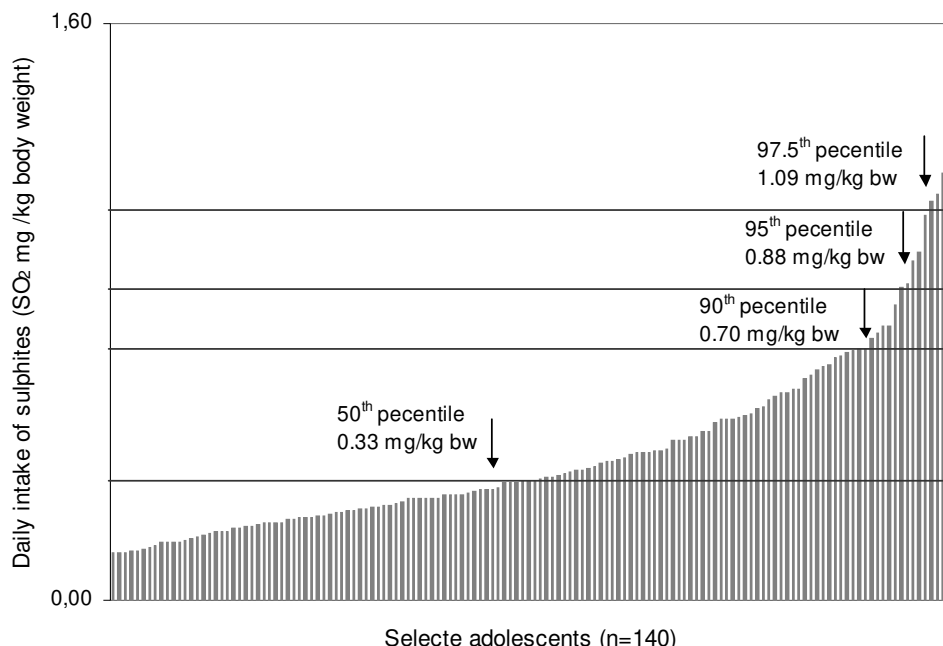


Figure 2: Distribution of sulphite intake among the selected adolescents from consumption of mango juice.

Among the 21 adolescents that presented sulphite intake estimates equal to or above the ADI from the consumption of mango juice, 8 of them (3 boys and 5 girls) had body weight below 40 kg and daily consumption above 350 mL of juice. The adolescent (a girl) that presented the highest sulphite intake (1.56 mg/kg bw) had a body weight of 29 kg and reported a consumption of 800 mL of juice. The consumption pattern observed in this study is supported by findings of other studies conducted in Brazil that verified a high consumption of processed items such as soft drinks and sugar-added beverages among adolescents (Levy-Costa et al. 2005; IBGE 2004). Carmo et al. (2006) evaluated the dietary patterns of 390

adolescents (aged 10 to 17 years old) enrolled in public schools in Piracicaba using a food frequency questionnaire. The authors reported daily average intakes of about 230mL of soft drinks and 550 mL of sugar-added beverages such as fruit juices and fruit based products (teas and artificial juices).

To simulate a “worse case” scenario estimates were also calculated using national maximum permitted levels in fruit juices as served to the consumer. The worse case calculations indicated that the mean consumption of fruits juices containing the national maximum permitted level of 200 mg/L could exceed the ADI in 207% (in 344% for cashew apple juice).

Although these estimates are likely to represent unrealistic intakes because food additives are not always used at their maximum permitted levels, as indicated in this study, the possibility that high consumers of sulphite-containing fruit juices exceed its ADI through the consumption of other food products which are also sulphite vectors, can not be excluded. Dietary exposure assessments to sulphites conducted in other countries have also indicated that a fraction of the population considered to be high consumer of sulphite-containing foods is potentially at risk of exceeding the ADI of these preservatives. In Italy, the dietary intake exposure to sulphites based on analytical determination of sulphite-containing foods and their combination into standard meals for adults and children resulted in a sulphite intake of 111% of the ADI in children and 120% in adults (bodyweight of 30 kg and 60 kg, respectively). Among all sulphite-containing foods, the highest contributors to the intake were dried fruit and wine, both ingested without further treatment (Leclercq et al. 2000).

The preliminary data on sulphite intake in the Republic of Korea using individual dietary intake data and analytical results in 322 food samples showed that the major contributors to the sulphites intake for average consumers were sugars, salt, flour, wine and orange juice. The calculated sulphite intake for the 95th percentile consumers was 109% of the ADI (Suh et al. 2007).

Soubra et al. (2007) assessed the actual intake of benzoates, sulphites, butylhydroxyanisol (BHA) and butylhydroxytoluen (BHT) for a group of the Lebanese population (students aged between 9 and 18 years old) likely to be highly exposed to food additives through the consumption of processed foods. Dietary exposure was obtained by combining food consumption data with food additives levels in 420 samples of foods and beverage determined by chemical analysis. The results indicated that the ADI could be exceeded for sulphites and BHT by a fraction of the population, in particular within children of 9-13 years old. Among all additive-containing foods, the highest contributors were: soft drinks to benzoates intake, nuts and canned juices to sulphite intake, bread and biscuits to BHA intake and chewing gum to BHT intake.

A food additive is considered safe for its intended use if its human exposure is less than, or is approximately, the same as the ADI. Although it has been recognised that eventual intakes above the ADI may not necessarily represent a risk to human health (Speijers 1999), mean intake over longer periods of time should not exceed it. For this purpose, measures should be encouraged in order to reduce the dietary sulphite intake (WHO 2000). In this sense, national researches have been conducted with the purpose of developing new technologies to produce concentrated fruit juices with minimized amounts of sulphite (Maia et al. 2001; Cianci et al. 2005). For this purpose, the use of combining processes such as heat treatment, chemical preservatives and nitrogen stripping have been studied to produce high pulp cashew apple juice with reduced quantity of sulphites (Maia et al. 2001).

4. Conclusion

The results of this study indicate that the ADI of sulphites may be exceeded by individuals whose dietary pattern leads to a high regular consumption of fruit juices containing added sulphites. Although concentrated fruit juices in Brazil have great importance due to their convenience, nutritional appeal and low cost, they can represent one of the major vectors to the overall dietary intake of sulphites. Moreover, if the instructions of dilution are not adequately followed as recommended by the manufacturers, the contribution of these juices to the intake of sulphites can be even much higher than that observed in this study.

As few data are available in Brazil concerning the intake of sulphites, dietary exposures to these additives should be further investigated including other foods and beverages that have been considered as main contributors to the overall sulphite intake. Additionally, in order to determine if the ADI of sulphites is exceeded by some population groups, consumption surveys should provide information on individual consumption for groups at risk such as children and adolescents, taking into consideration the regional differences on food consumption patterns in Brazil.

References

- Anibarro B, Caballero MT, García-Ara MC, Díaz-Pena JM, Ojeda JA. 1992. Asthma with sulfite intolerance in children: a blocking study with cyanocobalamin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 90:103-109.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1995. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 16th Edition (Arlington, Virginia, USA: AOAC International), Chapter 47:27-29.
- Brasil. 1988. Resolução nº 4, de 24 de novembro de 1988. *Diário Oficial da União*. Brasília-DF. 19 December 1988.
- Brasil. 2002. Resolução RDC ANVISA/MS nº. 12, de 10 de janeiro de 2002. *Diário Oficial da União*. Brasília- DF. 14 January 2002.

- Carmo MB, Toral N, Silva MV, Slater B. 2006. Consumo de doces, refrigerantes e bebidas com adição de açúcar entre adolescentes da rede pública de ensino de Piracicaba, São Paulo. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 9:121-130.
- Caroba DCR. 2002. A escola e o consumo alimentar de adolescentes matriculados na rede pública de ensino. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 162p.
- Cianci FC, Silva LFM, Cabral LMC, Matta VM. 2005. Clarificação e concentração de suco de caju por processos com membranas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 25:579-583.
- Codex Alimentarius Commission. 1989. Guidelines for simple evaluation of food additive intake. Vol. XIV. Supplement 2. Available from: www.codexalimentarius.net/download/standards/6/CXG_003e.pdf. Accessed 2005 November 14.
- Codex Alimentarius Commission. 2006. Report of the 38th Session of the Codex Committee on Food Additives and Contaminants. ALINORM 06/29/12 - The Hague, The Netherlands 24-28 April 2006.
- Codex Alimentarius Commission. 2007. Report of the 39th Session of the Codex Committee on Food Additives. ALINORM 07/30/12 - Beijing, China 24-28 April 2007.
- Edwards MC, Johnson JL, Marriage B, Graf TN, Coyne KE, Rajagopalan KV, Macdonald IM. 1999. Isolated sulfite oxidase deficiency – review of two cases in one family. *Ophthalmology* 106:1957-1961.
- European Commission. 2001. Report from the commission on dietary food additive Intake in the European Union. Commission of the European Communities. Available from: http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/addit_flavor/flav15_en.pdf. Accessed 2006 August 09.
- Fazio T, Warner CR. 1990. A review of sulphites in foods: analytical methodology and reported findings. *Food Additives and Contaminants* 7:433-454.
- Gibney MJ, Lambe J. 1996. Estimation of food additive intake: methodology overview. *Food Additives and Contaminants* 13:405-410.

- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 2004. Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2002-2003: análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no Brasil. Available from: <http://www.ibge.gov.br/>. Accessed 2006 September 11.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)/Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF). 2001. Indicadores sobre crianças e adolescentes: Brasil 1990-1999. 242p. Available from: <http://www.unicef.org/brazil/indicadores.htm>. Accessed 2007 April 26.
- Kisker C, Schindelin H, Pacheco A, Wehbi WA, Garrett RM, Rajagopalan KV, Enemark JH, Rees DC. 1997. Molecular basis of sulfite oxidase deficiency from the structure of sulfite oxidase. *Cell* 91:973-983.
- Kroes R, Müller D, Lambe J, Löwik MRH, Klaveren J, Kleiner J, Massey R, Mayer S, Urieta I, Verger P, Visconti A. 2002. Assessment of intake from the diet. *Food and Chemical Toxicology* 40:327–385.
- Leclercq C, Molinaro MG, Piccinelli R, Baldini M, Arcella D, Stacchini P. 2000. Dietary intake exposure to sulphites in Italy – analytical determination of sulphite-containing foods and their combination into standard meals for adults and children. *Food Additives and Contaminants* 17:979-989.
- Levy-Costa RB, Sichieri R, Pontes NS, Monteiro CA. 2005. Disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil: distribuição e evolução (1974-2003). *Revista de Saúde Pública* 39:530-540.
- Machado RMD, Almeida CAS, Vicente E, Toledo MCF. 2007. Analytical determination of sulphites in fruit juices available on the Brazilian market. *Food Composition and Analysis* (submitted).
- Maia GA, Monteiro JCS, Guimarães ACL. 2001. Estudo da estabilidade físico-química e química do suco de caju com alto teor de polpa. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 21:43-46.
- Peroni DG, Boner AL. 1995. Sulfite sensitivity. *Clinical and Experimental Allergy* 25:680-681.

- Popolim WD, Penteado MVC. 2005. Estimate of dietary exposure to sulphites using Brazilian students as a sample population. *Food Additives and Contaminants* 22:1106-1112.
- Renwick AG. 2006. The intake of intense sweeteners – an update review. *Food Additives and Contaminants* 23:327-338.
- Soubra L, Sarkis D, Hilan C, Verger P. 2007. Dietary exposure of children and teenagers to benzoates, sulphites, butylhydroxyanisol (BHA) and butylhydroxytoluen (BHT) in Beirute (Lebanon). *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 47:68-77.
- Speijers GJA. 1999. Precision of estimates of an ADI (or TDI or PTWI). *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 30:S87-S93.
- Suh H-J, Cho Y-H, Chung M-S, Kim BH. 2007. Preliminary data on sulphite intake from the Korean diet. *Journal of Food Composition and Analysis* 20:212-219.
- Taylor SL, Higley NA, Bush RK. 1986. Sulfites in foods: uses, analytical methods, residues, fate, exposure, assessment, metabolism, toxicity, and hypersensitivity. *Advances in food Research* 30:1-76.
- Vally H, Thompson PJ. 2003. Allergic and asthmatic reactions to alcoholic drinks. *Addiction Biology* 8:3-11.
- Verger P, Chambolle M, Babayou P, Breton S, Volatier JL. 1998. Estimation of the distribution of the maximum theoretical intake for ten additives in France. *Food Additives and Contaminants* 15:759-766.
- Warner CR, Diachenko GW, Bailey CJ. 2000. Sulfites: an important food safety issue. *Food Testing & Analysis*. Available from: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fssulfit.html>. Accessed 2004 July 17.
- World Health Organisation (WHO). 1987. Evaluation of certain food additives and contaminants (Thirtieth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). WHO Technical Report Series. N° 751 (Geneva: WHO).
- World Health Organisation (WHO). 2000. Evaluation of certain food additives (Fifty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). WHO Technical Report Series, N° 891 (Geneva: WHO).

- Wüthrich B, Kagi MK, Hafner J. 1993. Disulfite-induced acute intermittent urticaria with vasculitis. *Dermatology* 187:290-292.
- Yang WH, Purchase ECR. 1985. Adverse reactions to sulfites. *Canadian Medical Association Journal* 133:865-867.

Conclusão Geral

O procedimento de Monier-Williams otimizado é adequado para o monitoramento de sulfitos em vinhos, sidras, fermentados de frutas, filtrados, espumantes e em sucos de frutas.

Embora as concentrações de uso dos sulfitos pela indústria de vinhos e sucos de frutas estejam abaixo dos limites máximos estabelecidos pela legislação brasileira, os resultados obtidos nesse estudo indicam que a ingestão diária aceitável desses aditivos pode ser excedida por indivíduos que consomem regularmente grandes quantidades desses produtos. Cabe ainda ressaltar que os vinhos e os sucos de frutas não representam as únicas fontes de exposição humana aos sulfitos e que, devido às suas múltiplas funções, esses aditivos são amplamente utilizados em outros alimentos e bebidas e em produtos farmacêuticos.

Considerando os resultados obtidos nesse estudo, recomenda-se a realização de pesquisas de consumo individual para que os grandes consumidores de vinhos e sucos de frutas sejam identificados e que medidas para reduzir os níveis de sulfitos nesses produtos sejam consideradas.

Anexos

Anexo 1: Sistema de destilação empregado nas análises e montado de acordo com o modelo descrito na AOAC (1995) para o método Monier-Williams otimizado.



Anexo 2: Sulfato de bário formado (precipitado fino branco) após adição de 4 gotas de HCl a 1N e solução de cloreto de bário (BaCl_2) a 10% em excesso na solução de H_2O_2 titulada com NaOH para confirmação gravimétrica da presença de SO_2 .

