

AUTORES

AUTHORS

✉ **Rita Margarete Donato MACHADO**
Maria Cecília Figueiredo TOLEDO

Departamento de Ciência de Alimentos
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP
CP 6121, CEP 13083-862
Campinas-SP, Brasil

Eduardo VICENTE

Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada – ITAL
Av. Brasil 2880, CP 139, CEP 13070-178
Campinas-SP, Brasil

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.

SUMMARY

Although sulphites are used worldwide in the food industry, they have been implicated in 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 of the different aspects related to the use of sulphites as food additives, including the chemical properties, analytical methodologies, regulations for use, toxicological potential and risk evaluation.

PALAVRAS-CHAVE

KEY WORDS

Sulfitos; Aditivos Alimentares; Conservadores;
Conservantes.

Sulphite; Food Additives; Food Preservatives.

1. INTRODUÇÃO

Sulfitos ou agentes sulfítantes têm uma longa história de uso como ingredientes de alimentos e incluem o dióxido de enxofre (SO₂) e as diversas formas de sulfitos inorgânicos que liberam SO₂ 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 sulfítantes 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 & PURCHASE, 1985; TAYLOR *et al.*, 1986; FAZIO & WARNER, 1990; ANIBARRO *et al.*, 1992; WÜTHRICH *et al.*, 1993; PERONI & BONER, 1995; WARNER *et al.*, 2000; 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). Os mecanismos de ação que poderiam explicar a intolerância aos agentes sulfítantes 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 & 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 sulfítantes, 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 (MARESCCHI *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 & WARNER, 1990; WARNER *et al.*, 2000).

Com base nessas considerações, o presente trabalho faz uma revisão de diferentes aspectos associados à utilização dos agentes sulfítantes 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 sulfítantes.

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

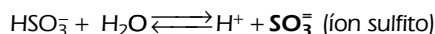
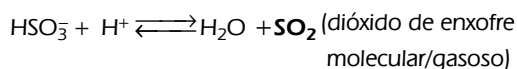
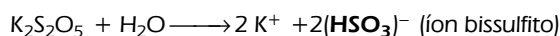
Fonte: (LÜCK & JAGER, 1997; BRASIL, 1988; ABIA, 2001)

INS: International Numbering System (Sistema Internacional de Numeração)

* não foi encontrado na literatura

Os agentes sulfítantes 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,

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

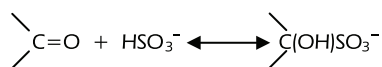


O íon bissulfito é a espécie predominante em alimentos que apresentam pH entre 3 e 7, enquanto que em valores de pH menores que 3 e maiores que 7, o desvio do equilíbrio é direcionado para a formação de SO_2 molecular e íon sulfito, respectivamente (WARNER *et al.*, 2000).

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 & WARNER, 1990; WEDZICHA, 1992; LÜCK & JAGER, 1997).

Sulfito ligado é normalmente representado pela proporção do aditivo que está na forma de adutos hidroxissulfonados, formados pela reação de grupos carbonílicos 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 & WARNER, 1990; LÜCK & 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 & 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 sulfítantes 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 gasificadas e não gasificadas Subcategorias: Prontas para o consumo e preparados líquidos	0,004
Camarões e lagostas (exclusivamente na matéria-prima após a captura)	0,003 (no produto cozido)
Camarões e lagostas (exclusivamente na matéria-prima após a captura)	0,01 (no produto cru)
Cervejas (somente ditionito)	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
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

Alimentos	Limite máximo (g/100g – g/100 mL)
	(expresso em SO ₂ residual)
Purê de vegetais (incluindo cogumelos, fungos, legumes, hortaliças, raízes e tubérculos, castanhas e algas marinhas)	0,06
Raiz Forte (polpa de rábano ou wasabi) (somente metabisulfito 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 & 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 & 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 (H₂O₂). Este último é um agente oxidante forte que pode oxidar outros componentes do alimento, conferindo aroma indesejável. Os agentes sulfitantes reagem rapidamente com o H₂O₂, 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 & WEDZICHA, 1992; WEDZICHA, 1992; LÜCK & 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 & 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 & 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 & 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 & WARNER, 1990; LÜCK & 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 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 & 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 & KRAAK, 1997; SÁDECKÁ e POLONSKÝ, 1999; CORBO & BERTOTTI, 2002; ISAAC *et al.*, 2006). Embora vários métodos estejam disponíveis na literatura para a determinação de sulfitos em alimentos e bebidas (WEDZICHA, 1984; OUGH, 1986; FAZIO & 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.

Em decorrência do fato de que sulfitos livres e ligados atuam no organismo da mesma forma (WEDZICHA, 1992; LÜCK & 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; LECLERCO *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 & WARNER, 1990; ISAAC *et al.*, 2006).

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

Referência	Matriz	Técnica de Quantificação
ANDERSON <i>et al.</i> , 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 <i>et al.</i> , 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 <i>et al.</i> , 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 <i>et al.</i> , 1991	Lingüiça fresca	Extração com diferentes solventes e análise por cromatografia iônica com detector eletroquímico.
DANIELS <i>et al.</i> , 1992	Frutas secas (damasco, pêssago), batata, camarão, suco de frutas, cogumelos e outros	Destilação Monier-Williams otimizada pelo FDA.
SU & 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 , subseqüente oxidação de sulfito a sulfato e quantificação utilizando eletroforese capilar.
DECNOP-WEEVER & KNAAK, 1997	Vinhos	Análise por injeção em fluxo com detecção fotométrica utilizando uma célula de difusão gasosa.
LOWINSOHN & BERTOTTI, 2001	Vinhos	Extração de SO ₂ com ácido hidrocloreídrico e quantificação utilizando titulação coulométrica com iodo.
BRAGAGNOLO <i>et al.</i> , 2001	Cogumelos em conserva	Destilação Monier Williams modificada por Shipton.
HARDISSON <i>et al.</i> , 2002	Camarão	Destilação Monier Williams, método AOAC (1984).
CORBO & BERTOTTI, 2002	Suco de uva e vinhos	Análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica utilizando eletrodo de cobre.
McFEETERS & 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 & 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.

5. TOXICIDADE DOS SULFITOS

Embora os sulfitos sejam amplamente utilizados na indústria de alimentos e bebidas, inúmeros 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 & PURCHASE, 1985; TAYLOR *et al.*, 1986; FAZIO & WARNER, 1990; ANIBARRO *et al.*, 1992; WÜTHRICH *et al.*, 1993; PERONI & BONER, 1995; WARNER *et al.*, 2000; VALLY & 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 & 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 & BONER, 1995; VALLY & THOMPSON, 2003), muito embora indivíduos sensíveis a sulfitos sem histórico de reações asmáticas também possam apresentar reações adversas após ingestão de alimentos sulfitados (YANG & PURCHASE, 1985). 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 & 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 & 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 & BALDWIN, 1982; PERONI & BONER, 1995). De fato, a broncoconstrição por sulfito em humanos tem sido atenuada pela administração de agentes anticolinérgicos (PERONI & 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 & 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 & 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 (SO₃) endógeno e exógeno ao inativo sulfato (SO₄), 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 & 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 crescimento atenuado do cérebro (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 & 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 & 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 & 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 & 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 (MARESCHI *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 (LECLERCO *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 & 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 (ALINORM 06/29/12, 2006)

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 – Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação. **Compêndio da Legislação Brasileira de Alimentos**, seção 3.31, 2001.
- ALINORM 06/29/12. **Report of the 38th Session of the Codex Committee on Food Additives and Contaminants** – The Hague, The Netherlands 24-28 April 2006.
- ANDERSON, C.; *et al.* Ion chromatographic determination of sulfites in foods. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 69, p. 14-19, 1986.
- ANIBARRO, B.; *et al.* 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.; *et al.* Metabisulfite 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.; *et al.* 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 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 **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. **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 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. **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. **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.; *et al.* 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.
- 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.; *et al.* 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.
- EDWARDS, M. C.; *et al.* Isolated sulfite oxidase deficiency – review of two cases in one family. **Ophthalmology**, v. 106, n. 10, p. 1957-1961, 1999.
- 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.
- 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.
- 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.
- FDA. Sulfitos: 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.; *et al.* Content of sulphite in frozen prawns and shrimps. **Food Control**, v. 13, p. 275-279, 2002.
- HILLERY, B. R.; *et al.* 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.; *et al.* 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.; *et al.* 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.; *et al.* 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.
- LECLERCO, C.; *et al.* 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.; *et al.* 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.
- MACHADO, R. M. D.; *et al.* 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.; *et al.* 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.
- MARESCHI, J. P.; *et al.* 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.
- PAÍÑO-CAMPA, G.; *et al.* 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.; *et al.* 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.; *et al.* 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.; *et al.* 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.; *et al.* 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.; *et al.* 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.
- TRENNERY, 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.; *et al.* 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. Allergic and asthmatic reactions to alcoholic drinks. **Addiction Biology**, v. 8, p. 3-11, 2003.
- 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.
- VERGER, P.; *et al.* 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.; *et al.* Reevaluation 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.; *et al.* 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 sulphiting agents in food. **Food Additives and Contaminants**, v. 9, n. 5, p. 449-459, 1992.
- WEDZICHA, B. L. **Chemistry of sulphur dioxide in foods**. London, Elsevier Applied Science Publishers, 381p., 1984.
- 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.
- WILLIAMS, D. J.; *et al.* 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.
- WÜTHRICH, B.; *et al.* Disulfite-induced acute intermittent urticaria with vasculitis. **Dermatology**, v. 187, p. 290-292, 1993.
- YABIKU, H. Y.; *et al.* 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.