

# Verificação do método Monier-Williams otimizado na determinação de dióxido de enxofre em sucos de frutas, água de coco e cogumelo em conserva

## Verification of the optimized Monier-Williams method for determining sulfur dioxide in fruit juices, coconut water and mushroom in conserve

RIALA6/1539

Leticia Araújo Farah NAGATO<sup>1\*</sup>, Emy TAKEMOTO<sup>1</sup>, Jussara Carvalho Moura DELLA TORRE<sup>1</sup>, Jaim LICHTIG<sup>2</sup> (*in memoriam*)

\*Endereço para correspondência: Núcleo de Química, Física e Sensorial, Centro de Alimentos, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, CEP: 01246-902, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: lefarah@ig.com.br

<sup>2</sup>Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

Recebido: 23.08.2012 - Aceito para publicação: 18.03.2013

### RESUMO

Neste estudo foram avaliados os parâmetros analíticos de validação, tais como limite de quantificação (LQ), faixa de trabalho, linearidade, sensibilidade, seletividade, precisão e exatidão do método oficial Monier-Williams otimizado na determinação de dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>). Três amostras de suco de caju, seis de suco de maracujá, cinco de suco de uva, duas de água de coco e seis de cogumelo em conserva foram adquiridas no comércio. O estudo de recuperação foi realizado em 10 concentrações do padrão de sulfito de sódio na faixa de 5 a 2.675 mg/L e, também, adicionando-se soluções de sulfito de sódio às amostras. A metodologia mostrou-se eficiente, tendo constatado linearidade na faixa de trabalho de SO<sub>2</sub> (7 a 2.675 mg/L), com equação da reta  $y = 1,0647x - 13,8697$  ( $r^2=0,9979$ ), recuperação de 87 a 109 %, LQ de 7 mg/L com DPR de 7 %. Os resultados de recuperação média nas amostras variaram de 81 a 115%. Os teores de SO<sub>2</sub> encontrados nas amostras de sucos e água de coco estavam de acordo com a legislação brasileira. Três marcas de cogumelo em conserva revelaram teores acima do limite máximo estabelecido de 50 mg/kg.

**Palavras-chave.** sulfitos, destilação Monier-Williams, sucos de fruta, água de coco, cogumelo em conserva, parâmetros de desempenho.

### ABSTRACT

This study aimed at assessing the validation analytical parameters of the optimized Monier-Williams method, such as: limit of quantification (LQ), concentration range, linearity, sensibility, selectivity, precision and accuracy for analyzing sulphur dioxide (SO<sub>2</sub>). Three samples of cashew juice, six of passion fruit juice, five of grape juice, two of coconut water and six of mushroom in conserve were obtained from retail market. The recovery study was carried out on 10 concentrations of sodium sulphite standard solutions ranging from 5 to 2,675 mg/L, and also adding SO<sub>2</sub> solutions into the samples. The methodology was considered efficient and the linearity parameter was proved in the SO<sub>2</sub> applied concentration interval (from 7 to 2,675 mg/L); the curve equation was  $y = 1.0647x - 13.8697$  ( $r^2=0.9979$ ). The recovery rates ranged from 87 to 109 %, LQ of 7 mg/L, with RSD of 7 %. The mean recovery results in spiked test samples showed acceptable levels varying from 81 to 115 %. The concentrations of SO<sub>2</sub> found in fruit juices and coconut water complied with the Brazilian legislation. Three brands of mushroom in conserve revealed values above the established maximum limit of 50 mg/kg.

**Keywords.** sulphites, Monier-Williams distillation, fruit juices, coconut water, mushroom in conserve, performance parameters.

## INTRODUÇÃO

Sulfitos, ou agentes sulfitantes, são aditivos conservadores eficazes, muito utilizados em alimentos e bebidas. Essas substâncias, em geral, evitam o escurecimento enzimático e não enzimático e impedem o crescimento de microrganismos indesejáveis (leveduras, fungos e bactérias), que causam a deterioração de alimentos durante o seu processamento e armazenamento. O escurecimento enzimático é uma consequência indireta da ação da polifenoloxidase, enzima encontrada em muitas frutas e hortaliças, que é liberada durante o manuseio pós-colheita e na industrialização. A enzima catalisa a oxidação de compostos fenólicos, a reação prossegue por meio de oxidações não enzimáticas, ocorrendo finalmente a polimerização das quinonas, formando complexos coloridos<sup>1-4</sup>. Os agentes sulfitantes mais usados pela indústria de alimentos e bebidas são o sulfito de sódio, metabissulfito e bissulfito de sódio e potássio, que liberam o SO<sub>2</sub> nas condições de uso<sup>5</sup>. Existe certa preocupação acerca da segurança dos sais de sulfito, pois podem causar dificuldades respiratórias em algumas pessoas sensíveis, reações alérgicas, como irritação da pele, irritação gástrica e asma. Outras reações que têm sido reportadas, associadas à sua ingestão são reação anafilática, hipotensão, cefaleia, náusea e dor abdominal<sup>1,6,7</sup>.

O JECFA, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, na última avaliação, em 1998, estabeleceu a ingestão diária aceitável (IDA) para o homem de 0,7 mg/kg de peso corpóreo/dia, para a ingestão de sulfito (expressos como SO<sub>2</sub>)<sup>6</sup>. Esses dados são usados por todos os países para propor o uso e níveis de adição de aditivos intencionais em alimentos, de forma segura e dependente da necessidade tecnológica.

A Resolução nº 04/88, do Conselho Nacional de Saúde (CNS), do Ministério da Saúde<sup>8</sup>, estabelece limite máximo de sais de sulfito (expresso em SO<sub>2</sub> residual) em cogumelos em conserva de 0,005 g/100 g (50 mg/kg ou 50 ppm) em sucos de fruta e 0,02 g/100 mL (200 mg/L ou 200 ppm) em água de coco. A Resolução RDC nº 12/02 da Anvisa/MS<sup>9</sup> estabelece o limite de 0,30 g/100 mL (3.000 mg/L) para o suco de caju com alto teor de polpa e o limite de 0,033 g/100 mL (330 mg/L) para o suco de caju diluído, ou seja, no produto a ser consumido.

Alguns autores estudaram a estimativa de ingestão do conservador sulfito, combinando dados obtidos de concentração desse aditivo nos alimentos

e o consumo médio diário desses produtos na dieta. Produtos como frutas secas e vinhos levaram a uma maior ingestão de sulfito, excedendo a sua IDA<sup>10</sup>. Machado<sup>11</sup> concluiu em seu trabalho que a ingestão média de sulfitos devido ao consumo de sucos de frutas ficou bem abaixo da IDA estabelecida pelo JECFA. Quanto ao consumo de vinhos, os dados de ingestão indicaram que o consumo diário de 150 mL, pode contribuir com mais de 50 % da IDA de sulfito, caso a concentração deste seja igual ou superior a 150 mg/L.

O método utilizado neste trabalho para a quantificação de sulfitos em alimentos e bebidas foi o de Monier-Williams otimizado, preconizado pela AOAC, 2006<sup>12</sup>. O método de Monier-Williams quantifica o SO<sub>2</sub> total (sulfito livre mais uma fração dos sulfitos ligados), por meio do aquecimento da amostra com ácido clorídrico, em atmosfera inerte. O SO<sub>2</sub> liberado é coletado em solução de peróxido de hidrogênio a 3 %, na qual é oxidado a ácido sulfúrico, sendo este estequiometricamente determinado por titulação com hidróxido de sódio. A destilação de Monier-Williams é aplicável em diversas matrizes, com exceção dos vegetais do gênero *Brassica* spp. (couve, repolho, nabo, mostarda) e *Allium* spp. (cebola, alho, alho-poró), porque possuem, como componentes do aroma, dissulfetos que podem interferir na análise. Este é, reconhecidamente, um método tradicional e adotado como oficial em muitos países.

Vários métodos de determinação de SO<sub>2</sub> em alimentos estão descritos na literatura, e em diversos trabalhos são comparados ao método de Monier-Williams<sup>5,13,14</sup>, podendo ser citados, entre outros: o método combinado de Monier-Williams-cromatografia líquida de alta eficiência<sup>13</sup>; a cromatografia de íons, com separação em coluna de exclusão de ânions<sup>14</sup>; a titulação direta com iodo, após uma rápida destilação<sup>15</sup>; a titulação com iodo<sup>16</sup>; o método enzimático<sup>17</sup>; a cromatografia líquida de alta eficiência<sup>18-20</sup> e a análise por injeção em fluxo<sup>21-23</sup>.

O laboratório deve assegurar suficiente qualidade e confiabilidade dos resultados obtidos nos ensaios químicos realizados. O desenvolvimento de métodos de análise deve ser acompanhado de validação. O Inmetro<sup>24</sup>, em 2010, indicou as orientações a serem seguidas pelo laboratório para o processo de validação de um método analítico. A validação de um método estabelece, por meio de estudos sistemáticos, que ele é adequado à finalidade, isto é, suas características de desempenho são capazes de

produzir resultados correspondentes às necessidades do problema analítico. As características de desempenho do método devem estar explícitas, devendo incluir, quando aplicável: seletividade, linearidade, faixa de trabalho e faixa linear, sensibilidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), tendência/recuperação, precisão (repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade) e robustez.

A Anvisa<sup>25</sup>, em 2003, aprovou o “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”, cujo objetivo é auxiliar os pesquisadores dos centros analíticos na validação e no desenvolvimento de metodologias.

Uma das exigências da norma ABNT ISO/IEC 17025:2005<sup>26</sup> é a validação de métodos não normalizados, métodos criados/desenvolvidos pelo próprio laboratório, métodos normalizados ampliados, modificados ou usados fora dos escopos para os quais foram concebidos. A validação é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos.

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas dessa substância (*spike*). O ensaio de recuperação analítica é um dos métodos normalmente utilizados para avaliar a tendência de um método. A exatidão é avaliada numericamente por meio da tendência<sup>24</sup>.

Linearidade é a habilidade de um método em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito, em uma dada faixa de concentração. A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. A linearidade é formulada como expressão matemática. A equação da reta que relaciona as duas variáveis é  $y=a+bx$ , sendo  $y$  = resposta medida;  $x$  = concentração;  $a$  = interseção com o eixo  $y$ , quando  $x = 0$  e  $b$  = inclinação da curva analítica = sensibilidade. A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito e verificada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. O coeficiente de correlação linear ( $r$ ) é frequentemente utilizado para indicar o quanto a reta pode ser considerada adequada como modelo matemático<sup>24</sup>. Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor é a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor é a incerteza

dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de correlação ( $r$ ) maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. A Anvisa<sup>25</sup> recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99.

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentrações do analito ou valores da propriedade no qual o método pode ser aplicado. A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado e a concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho. No limite inferior da faixa de concentração, o fator limitante é o valor do limite de quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição<sup>24</sup>.

O limite de quantificação é também denominado “Limite de Determinação”. Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco). Segundo o Inmetro<sup>24</sup>, para a análise em nível de traços, é recomendado adotar o LQ como a concentração mais baixa da curva analítica obtida com o nível satisfatório de precisão e exatidão.

A sensibilidade é refletida na menor diferença de concentração que é mensurável por um método. É um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da variação da concentração do analito. A sensibilidade depende da natureza do analito e da técnica de detecção utilizada sendo determinada simultaneamente aos testes de linearidade e expressa pela inclinação da curva de regressão na faixa linear. O método é mais sensível quando pequenas variações de concentração resultam em maior variação na resposta, ou seja, maior inclinação.

Precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. É normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e as três formas mais comuns de expressá-la são: por meio da repetitividade, precisão intermediária e da reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio-padrão e coeficiente de variação. O número de replicatas para cada nível de concentração deve expressar a rotina do laboratório<sup>24</sup>. Uma maneira simples de melhorar a precisão é aumentar o número de replicatas.

A seletividade avalia o quanto o método é indiferente à presença de espécies que poderiam interferir na determinação do analito na amostra. A matriz da

amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. Os interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, e a magnitude do efeito também pode depender da concentração. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a tendência e a precisão estarão seriamente comprometidas<sup>24</sup>.

O presente estudo teve como objetivo verificar parâmetros analíticos de validação, tais como limite de quantificação (LQ), faixa de trabalho (aplicação) e faixa linear, linearidade, taxas de recuperação (exatidão), precisão (repetitividade), sensibilidade e seletividade do método Monier-Williams otimizado, empregando ácido clorídrico na etapa de destilação, como preconizado pela AOAC<sup>12</sup>, para a determinação analítica de dióxido de enxofre em amostras de sucos de frutas (caju, maracujá, uva), água de coco e cogumelo em conserva. Houve também comparação da exatidão e precisão do método em baixa e alta concentração de SO<sub>2</sub>, empregando-se ácido clorídrico ou ácido fosfórico na etapa de destilação, visto que trabalhos publicados<sup>5,27</sup> citam o uso de ácido fosfórico. Fazio e Warner<sup>5</sup> justificam que a substituição do ácido clorídrico pelo fosfórico representa uma redução favorável na temperatura de fervura na destilação, em aproximadamente 30°C, devendo-se, contudo, tal alteração ser mais bem avaliada, tendo em vista que o ácido fosfórico é mais fraco que o ácido clorídrico, podendo revelar resultados desfavoráveis de recuperação.

## MATERIAL

### Amostras

No período de março a setembro de 2008, foram avaliadas um total de 22 amostras comerciais, sendo três de suco de caju integral, seis de suco de maracujá integral, cinco de suco de uva integral, duas de água de coco e seis de cogumelo em conserva.

### Equipamentos e vidraria

Balança analítica com resolução de 0,1 mg; banho de ultrassom; nitrogênio gasoso comum (pureza 98,5 %); sistema de purificação de água tipo I (ultrapura ou desionizada); buretas de 5, 10 e 25 mL; pipetas volumétricas 1, 2, 4, 5, 10, 20 e 50 mL; aparelho para a determinação de dióxido de enxofre com sistema de destilação (Figura 1) constituído por balão (de reação) de fundo chato de 500 mL com entrada (junta 24/40) para nitrogênio gasoso e saída (junta 24/40) para condensador de Liebig do tipo liso (juntas 24/40); manta aquecedora;

erlenmeyer de 500 mL com boca esmerilhada (frasco A); erlenmeyer de 125 mL comum (frasco B) e conexões.

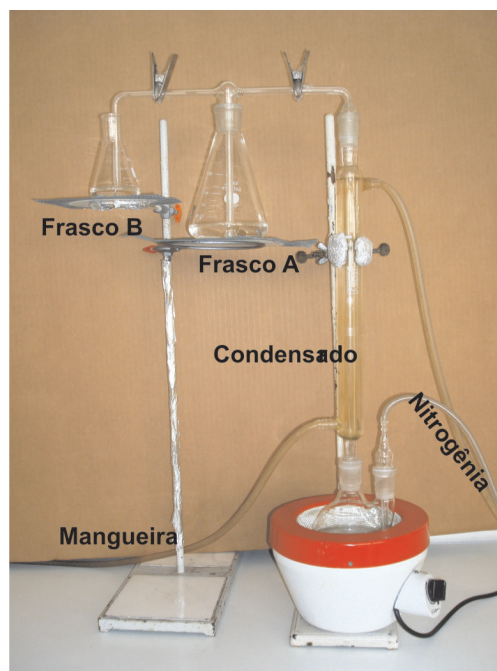


Figura 1. Aparelho para determinação de SO<sub>2</sub>

### Reagentes e soluções

Sulfito de sódio; ácido fosfórico; iodeto de potássio; ácido clorídrico concentrado; peróxido de hidrogênio a 3 % recém-preparado com água desionizada; ácido clorídrico 4 M; hidróxido de sódio 0,05 M padronizado com biftalato de potássio e fenolftaleína; sulfito de sódio 0,05 M padronizado, indicador vermelho de metila (0,2 % m/v em etanol a 95 %); dicromato de potássio 0,0167 M (= 0,1 N); tiosulfato de sódio 0,1 M e solução de amido a 1 %. Os reagentes foram de grau analítico. A água utilizada no preparo de soluções-padrão e na dissolução da amostra no balão foi do tipo I (ultrapura), fervida e colocada no banho de ultrassom.

## MÉTODOS

### Padronização da solução de sulfito de sódio 0,05 M

A solução de sulfito de sódio 0,05 M foi padronizada com solução de dicromato de potássio 0,0167 M (= 0,1 N), iodeto de potássio, ácido clorídrico concentrado, titulando-se o iodo liberado com a solução fatorada de tiosulfato de sódio 0,1 M. A padronização foi feita diariamente e, as concentrações obtidas foram consideradas como valor teórico de SO<sub>2</sub> e utilizadas nos

cálculos de comparação com os resultados obtidos pelo método Monier-Williams otimizado.

### Método Monier-Williams otimizado

A análise quantitativa de dióxido de enxofre nos alimentos foi realizada pelo método de Monier-Williams otimizado, tendo como referência o descrito na AOAC<sup>12</sup>, utilizando como preconizado o ácido clorídrico 4 M na etapa de destilação. O resultado foi expresso em SO<sub>2</sub> e calculado em mg/L ou mg/kg (ppm), conforme a Equação 1.

Equação 1

$$\text{SO}_2, \text{ mg/kg (ppm)} = \frac{(V_A - V_B) * M * f * 32,03 * 1.000}{m}$$

V<sub>A</sub> = volume (mL) de NaOH de molaridade M gasto na titulação da amostra

V<sub>B</sub> = volume (mL) de NaOH de molaridade M gasto na titulação do branco

M = molaridade da solução de hidróxido de sódio

f = fator da solução de hidróxido de sódio obtido na padronização

m = massa (g) da amostra

Foram utilizados os sucos de frutas do tipo integral, sendo homogeneizados pela agitação da embalagem fechada antes da tomada da amostra (50 g). As amostras de cogumelo em conserva foram drenadas, picadas em pequenos pedaços com faca e imediatamente pesadas (50 g) para início da análise. O método consistiu, basicamente, em: montar a aparelhagem conforme a Figura 1; adicionar nos frascos A e B, 43 mL e 7 mL de peróxido de hidrogênio a 3 %, respectivamente; acoplar os frascos no conjunto de destilação, devendo estar mergulhados em banho de gelo; adicionar 150 mL de água desionizada no balão de reação; pesar 50 g da amostra e transferência quantitativa para o balão de reação com auxílio de água; adicionar 90 mL de ácido clorídrico 4 M; vedar imediatamente a entrada do balão iniciando a passagem de gás nitrogênio a menor vazão possível para borbulhamento no frasco B; iniciar o resfriamento do condensador com água; ligar a manta aquecedora e manter a ebulição por 2 horas. Remover os frascos A e B do conjunto de destilação; transferir a solução do frasco B para o frasco A com auxílio de água; adicionar 3 gotas de indicador vermelho de metila 0,2 % e titular com solução de hidróxido de sódio 0,05 M até o ponto de viragem de coloração amarela que persista

mais que 20 segundos. Realizar a titulação diária de um branco de 50 mL de peróxido de hidrogênio a 3 %, nas mesmas condições para correção dos resultados. Preparar a amostra (homogeneização), pesar e iniciar a análise o mais rápido possível para evitar perda de sulfito lábil. Examinar também cada junta para certificação do vedamento do aparelho (Figura 1).

### Modificações do método Monier-Williams otimizado

Houve poucas alterações do método, como aumento da concentração da solução titulante de hidróxido de sódio (NaOH) de 0,01 M para 0,05 M, facilitando a visualização do ponto final da titulação, utilizando o indicador vermelho de metila. O tempo total de aquecimento e destilação foi estabelecido em 2 horas, para que todo o SO<sub>2</sub> que estivesse na forma combinada fosse liberado e destilado (o método preconiza 1,7 h). Os frascos coletores (A e B) com solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram colocados em béquer, acrescentando-se cubos de gelo para manter a temperatura da solução resfriada, evitando-se escape do gás SO<sub>2</sub> para o ar. Essas pequenas alterações não mudaram o princípio do método, mas forneceram condições adicionais para que, no procedimento de análise, houvesse menores perdas de SO<sub>2</sub>.

### Comparação entre o uso de ácido clorídrico e ácido fosfórico

Foi realizada a comparação da exatidão e precisão entre o uso de ácido clorídrico 4 M (90 mL) e o ácido fosfórico concentrado (30 mL), como reagente, na etapa de acidificação, no método Monier-Williams otimizado. Esses testes foram realizados com 8 repetições para padrões de sulfito de sódio em baixa concentração (44 - 45 mg/L) e 4 repetições para alta concentração (2.419 - 2.675 mg/L). A recuperação relativa média (%) foi calculada dividindo-se o valor analítico de SO<sub>2</sub> (mg/L) obtido na análise segundo o método Monier-Williams pela concentração teórica de SO<sub>2</sub> (mg/L) obtida na padronização da solução de sulfito de sódio utilizada na fortificação.

### Parâmetros de verificação do método Monier-Williams otimizado

#### Recuperação

O estudo da recuperação/tendência foi realizado em 10 concentrações do padrão de sulfito de sódio 5; 7; 13; 44; 45; 285; 825; 1371; 2419; 2675 mg SO<sub>2</sub>/L.

Foram realizadas sempre no mesmo dia, no mínimo em triplicata, as determinações de SO<sub>2</sub> pelo método Monier-Williams otimizado (AOAC)<sup>12</sup> e a padronização da solução de sulfito de sódio 0,05 M para cálculo do SO<sub>2</sub> teórico. O mesmo procedimento foi aplicado no estudo de recuperação de amostras adicionando-se soluções do padrão de sulfito de sódio 0,05 M, pelo menos em duas concentrações (metade e dobro do teor de SO<sub>2</sub> encontrado) nas diversas amostras comerciais de sucos de fruta, água de coco e cogumelo em conserva (fortificação). Para se evitar perdas de sulfito por oxidação, foi passada corrente de nitrogênio (borbulhamento do gás nos líquidos) e rápido fechamento dos frascos, tanto nas amostras como na solução-padrão de sulfito de sódio. A fortificação da amostra com a adição de solução-padrão de sulfito de sódio 0,05 M foi realizada somente no momento da análise. O cálculo de recuperação (Equação 2) seguiu as orientações do Inmetro<sup>24</sup>.

Equação 2

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{(C_1 - C_2) * 100}{C_3}$$

C<sub>1</sub> = concentração de SO<sub>2</sub>, determinada na amostra adicionada de solução-padrão;

C<sub>2</sub> = concentração de SO<sub>2</sub>, determinada na amostra diretamente, sem adição de padrão;

C<sub>3</sub> = concentração de SO<sub>2</sub>, que foi adicionada à amostra.

### Linearidade

A linearidade do método Monier-Williams otimizado foi obtida do gráfico dos resultados de SO<sub>2</sub> determinado *versus* SO<sub>2</sub> teórico, e verificada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. Os coeficientes de determinação (r<sup>2</sup>) e de correlação (r) foram utilizados para indicar evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão.

### Faixa de trabalho e faixa linear

A faixa de trabalho ou de aplicação foi obtida a partir da faixa linear de concentrações de SO<sub>2</sub> da reta de regressão (SO<sub>2</sub> determinado *versus* SO<sub>2</sub> teórico). O limite inferior da faixa de trabalho refere-se ao limite de quantificação e o limite superior, o valor máximo de concentração obtido com exatidão e precisão satisfatórios.

### Sensibilidade

A sensibilidade foi determinada simultaneamente aos testes de linearidade e expressa pela inclinação da curva de regressão na faixa linear.

### Precisão

A precisão foi expressa pela dispersão dos resultados de repetitividade entre as replicatas das amostras comerciais e nos níveis de concentração do padrão de SO<sub>2</sub>, por meio do coeficiente de variação (CV), usualmente expresso em %, também conhecido como desvio-padrão relativo (DPR), calculado conforme a Equação 3.

Equação 3

$$CV = DPR = \frac{DP \times 100}{CMD}$$

DP = desvio padrão;

CMD = concentração média determinada

### Limite de quantificação (LQ)

O LQ foi estabelecido neste trabalho como o padrão de sulfito de sódio de menor concentração medido de forma quantitativa com o nível satisfatório de precisão e exatidão.

### Seletividade

Para avaliar a seletividade do método ou o efeito da matriz foram utilizados os resultados dos ensaios para as amostras comerciais fortificadas pelo menos em três níveis de concentração (cogumelo em conserva, sucos de uva e maracujá) e do padrão SO<sub>2</sub> utilizando o teste de comparação de inclinação de retas analíticas de recuperação das amostras fortificadas *versus* padrão de SO<sub>2</sub>, segundo a análise estatística de Student<sup>28</sup>.

### Tratamento estatístico dos dados

#### Comparação entre o uso de ácido clorídrico e fosfórico

Para demonstrar a significância de resultados decorrentes da alteração do método original, recorreu-se ao teste F (Distribuição *Fisher-Snedecor*) e teste t (*Student*)<sup>24</sup>. O teste F se baseia na comparação de variâncias F-Snedecor. Nesse teste, o F calculado é obtido por meio da divisão das variâncias, colocando-se a maior variância no numerador. Ao mesmo tempo, o valor de F tabelado é obtido, com (n<sub>1</sub>-1) graus de liberdade no numerador e (n<sub>2</sub>-1) graus de liberdade no denominador, para um nível de

confiança de 95 %. Os valores de  $F_{\text{calc}}$  e  $F_{\text{tab}}$  são comparados. Se o  $F_{\text{calc}}$  for menor que o  $F_{\text{tab}}$ , não há diferença estatística de variância entre os grupos estudados. Se as variâncias dos grupos forem semelhantes, os desvios-padrão dos 2 grupos de testes podem ser agrupados e a significância das diferenças das médias dos dois conjuntos de amostras pode ser testada com a distribuição t de *Student*, que verifica se há diferença estatística entre as médias encontradas. Se as variâncias forem diferentes, os desvios-padrão não são agrupados, mas também se testa as médias pelo teste t. O valor de t tabelado é obtido a partir da tabela da distribuição de *Student* para  $(n_1 + n_2 - 2)$  graus de liberdade e o nível de confiança desejado. O nível de confiança estabelecido neste trabalho foi de 95 %. Se  $t_{\text{calc}}$  for menor que  $t_{\text{tab}}$ , não há diferença estatística entre as médias.

### Seletividade

O efeito da matriz (seletividade) foi verificado por meio do teste de comparação de inclinação de retas analíticas, segundo a análise estatística de *Student*. As curvas analíticas de recuperação das amostras comerciais fortificadas pelo menos em três níveis de concentração (suco de uva, cogumelo em conserva e suco de maracujá) foram construídas obtendo-se a equação de reta por regressão linear, e as inclinações foram comparadas com a do padrão de  $\text{SO}_2$  de acordo com as equações apresentadas por Rego<sup>28</sup>. O valor de t tabelado foi obtido da distribuição t de *Student*, com  $(GL_1 + GL_2)$  graus de liberdade e a confiança desejada que, neste caso, foi de 95 %. Se o valor de  $t_{\text{calc}}$  for menor que o de  $t_{\text{tab}}$ , pode-se concluir que as inclinações foram estatisticamente iguais e não há efeito de matriz (matriz não afeta o ensaio). Se o valor de  $t_{\text{calc}}$  for maior que o esperado, pode-se concluir que a matriz tem um efeito significativo sobre o resultado.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Comparação entre o uso de ácido clorídrico e ácido fosfórico

Os resultados comparativos do uso dos reagentes ácido clorídrico ou ácido fosfórico, para acidificação no método Monier-Williams, na determinação de dióxido de enxofre ( $\text{SO}_2$ ) a baixas concentrações (44 - 45 mg/L) revelaram recuperações relativas médias de 95 % (DP=3; DPR=3 %) para o ácido clorídrico e 96 % (DP=3; DPR=3 %) para o ácido fosfórico. Nas altas concentrações de  $\text{SO}_2$  (2.419 - 2.675 mg/L) os resultados de recuperação foram de 107 % (DP=3; DPR=3 %) para o ácido clorídrico e 105 % (DP=2;

CV=2 %) para o ácido fosfórico. Nos testes estatísticos a baixas e altas concentrações de  $\text{SO}_2$ , o teste F revelou homogeneidade entre variâncias (não houve diferença - nível de confiança de 95 %) e o teste t (presumindo variâncias equivalentes) evidenciou igualdade estatística entre as médias (nível de confiança de 95 %). Portanto, os ácidos clorídrico ou fosfórico podem ser utilizados na etapa de destilação do método Monier-Williams a baixas ou altas concentrações de  $\text{SO}_2$ , sem alterações estatisticamente significativas dos resultados das análises. Ressalta-se, no entanto, que neste estudo de verificação da metodologia, optou-se pelo ácido clorídrico como preconizado pela AOAC<sup>12</sup>.

### Parâmetros de verificação do método Monier-Williams otimizado

#### Recuperação

Os resultados de recuperação relativa média e desvio-padrão relativo (DPR) das soluções-padrão de sulfito de sódio obtidos nos 10 níveis de concentração estão apresentados na Tabela 1. A recuperação relativa média variou de 87 % (5 mg/L) a 109 % (2.675 mg/L) estando de acordo com o método oficial Monier-Williams (AOAC)<sup>12</sup> que recomenda recuperação  $\geq 80$  % na concentração de  $\text{SO}_2$  de 10 mg/L, assegurando a exatidão do resultado analítico.

#### Limite de quantificação (LQ)

A concentração de 5 mg/L (5 ppm), embora com recuperação satisfatória de 87 %, revelou menor precisão por apresentar maior dispersão dos resultados (DPR = 13 %) comparado ao  $\text{DPR}_r \leq 8$  % para a concentração  $< 10,0$   $\mu\text{g/mL}$  (ppm) estabelecido pela AOAC<sup>29</sup> como valor de desempenho para método-padrão com um único analito. Portanto, neste estudo, estabeleceu-se uma concentração acima, ou seja, 7 mg/L (7 ppm), expresso em  $\text{SO}_2$ , como o LQ para o método, por apresentar recuperação relativa média de 96 % e DPR de 7 %, estando este valor de concentração ainda abaixo do LQ de 10 ppm estabelecido na validação do método (AOAC<sup>12</sup>).

#### Faixa de trabalho e faixa linear

Segundo a Figura 2(A), os resultados de recuperação nos 9 níveis de concentração (exceto 5 mg/L devido a dispersão), quando plotados na curva de teores de  $\text{SO}_2$  determinado e teórico, revelaram faixa linear de trabalho ou aplicação de 7 a 2.675 mg/L, com equação da reta  $y = 1,0647x - 13,8697$ , coeficientes de determinação ( $r^2$ ) 0,9979 e de correlação linear (r) 0,9989. No gráfico de

**Tabela 1.** Recuperação relativa de dióxido de enxofre das soluções-padrão de sulfito de sódio nos níveis de concentração

SO <sub>2</sub> teórico (mg/L) C*	SO <sub>2</sub> encontrado Variação (mg/L)	SO <sub>2</sub> encontrado Média (mg/L) CMD**	DP	DPR (%)	Recuperação Média (%)	Recuperação Variação (%)
2.675	2.893 - 2.932	2.913	28	1	109	108 - 110
2.419	2.488 - 2.621	2.555	94	4	106	103 - 108
1.371	1.327 - 1.394	1.368	32	2	100	97 - 102
825	868 - 917	886	27	3	107	105 - 111
285	270 - 288	278	8	3	97	95 - 101
45	41 - 43	42	1	3	94	91 - 96
44	40 - 44	42	2	4	96	91 - 100
13	11 - 12	11	1	5	87	85 - 92
7	6 - 7	7	1	7	96	86 - 100
5	4 - 5	4	1	13	87	80 - 100

\*C = Concentração de SO<sub>2</sub> teórico obtido na padronização da solução de sulfito de sódio 0,05 M

\*\*CMD = Concentração média determinada de SO<sub>2</sub> analítico encontrado no método Monier-Williams otimizado

Recuperação (%) = (CMD/ C) x 100

DP = Desvio padrão

DPR = desvio padrão relativo = DP/CMD \*100

resíduos (concentração *versus* diferença entre a resposta e o valor calculado pela equação da reta de regressão) pode ser evidenciada a inexistência de tendência, sendo os pontos independentes e não correlacionados, distribuídos aleatoriamente em torno do zero.

### Linearidade

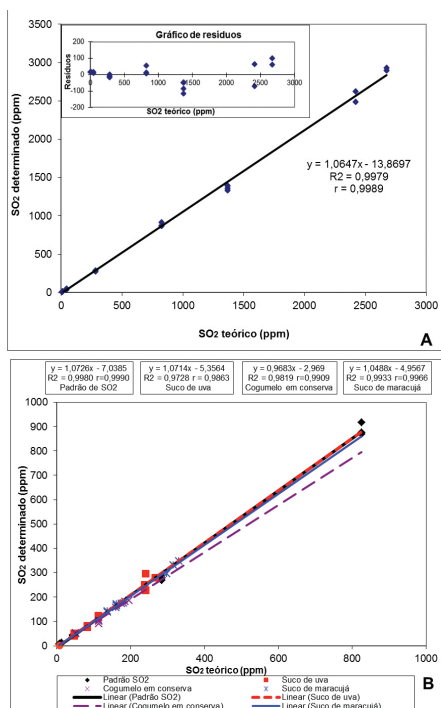
O coeficiente de correlação linear (r) de 0,9989 da curva de regressão dos resultados de recuperação do padrão sulfito de sódio foi maior que o valor mínimo de (r) 0,99 preconizado pela Anvisa<sup>25</sup>, considerando-se, portanto, evidência do ajuste ideal dos dados para a linha de regressão bem como da linearidade.

### Sensibilidade

A sensibilidade foi determinada simultaneamente aos testes de linearidade e expressa pela inclinação da curva na faixa de trabalho, lembrando-se que, quanto maior a inclinação, maior é a sensibilidade. Neste estudo, a sensibilidade foi de 1,0647, correspondente ao ângulo de inclinação de 46,8°, muito próximo a 45°, indicando que variações de concentração (eixo x) resultam em variações diretamente proporcionais na resposta (eixo y), ou seja, equivalência entre o valor teórico e o valor medido, bem como ausência ou minimização de erros sistemáticos.

### Precisão

A precisão no estudo de recuperação das soluções-padrão de sulfito de sódio nos 9 níveis de concentração (exceto 5 mg/L) ficou estabelecida pelo desvio-padrão relativo (DPR) que revelou variação de 1 a 7 % (Tabela 1). O valor de DPR máximo obtido neste trabalho, de 7 % para a concentração de 7 mg/L (ppm), pode ser considerado satisfatório, segundo a AOAC<sup>29</sup>, que apresenta para concentração <10,0 µg/mL (ppm) um DPR<sub>r</sub> ≤ 8 % como valor de desempenho para um único analito.



**Figura 2.** (A) Curva de regressão dos teores de SO<sub>2</sub> teórico e determinado no método Monier-Williams otimizado e Gráfico de resíduos. (B) Comparação da inclinação das curvas de regressão do padrão SO<sub>2</sub> e das amostras comerciais fortificadas no estudo da seletividade do método Monier-Williams otimizado



**Tabela 2.** Teores de dióxido de enxofre encontrados nas amostras comerciais de sucos, água de coco e cogumelo em conserva

Amostras	Marca /	SO <sub>2</sub> (mg/kg)	SO <sub>2</sub> (mg/kg)	DP	DPR
	Lote	Média*	Variação		
Suco de caju	A	284	276-298	12	4
	B	198	194-202	4	2
	C	194	186-201	7	4
Suco de maracujá	A - Lote 1	133	131-134	1	1
	A - Lote 2	121	119-123	2	2
	B	117	108-126	9	8
	C - Lote 1	118	111-122	6	5
	C - Lote 2	138	133-142	4	3
	D	87	76-95	7	8
Suco de uva	A	<LQ	<LQ	-	-
	B	<LQ	<LQ	-	-
	C - Lote 1	10	10-11	0,4	4
	C - Lote 2	<LQ	<LQ	-	-
	C - Lote 3	20	16-23	3	16
Água de coco	E	65	61-71	5	8
	F	48	47-49	1	2
Cogumelo em conserva	G	1130	1052-1180	69	6
	H	64	63-65	1	2
	I	70	66-75	6	9
	J	8	8	0,2	3
	K - Lote 1	35	35	0,2	0
	K - Lote 2	33	32-35	2	5

LQ = limite de quantificação (7 mg/kg) \*Média de triplicata DP = Desvio-padrão DPR = Desvio-padrão relativo

### Teor de dióxido de enxofre nas amostras comerciais

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos de SO<sub>2</sub>, nas amostras de sucos integrais de caju, maracujá e uva, água de coco e cogumelo em conserva. Os teores médios de SO<sub>2</sub> encontrados nos sucos variaram de 194 a 284 mg/kg para caju, de 87 a 138 mg/kg para maracujá, menor que LQ a 19 mg/kg para uva e de 48 a 65 mg/kg para água de coco. Estes valores estavam de acordo com a legislação brasileira de aditivos intencionais, do Ministério da Saúde. Os resultados de SO<sub>2</sub> das 6 amostras de cogumelo em conserva variaram de 8 a 1.130 mg/kg, sendo que 3 amostras revelaram teores médios de SO<sub>2</sub> superiores ao limite máximo estabelecido pela legislação brasileira, que é de 50 mg/kg. Uma amostra apresentou elevado teor de SO<sub>2</sub> (1.130 mg/kg). Verificaram-se teores

de SO<sub>2</sub> muito próximos para as amostras comerciais de mesma marca com diferentes lotes.

Yabiku et al<sup>27</sup>, em análise de 473 amostras de sucos de frutas naturais, do tipo integral, de diversas marcas, encontraram em 51 % das amostras valores de SO<sub>2</sub> acima da legislação, sendo que o suco de caju é o que apresentou valor mais elevado, atingindo o máximo de 1439 mg/kg. Bragagnolo et al<sup>30</sup>, avaliou o teor de dióxido de enxofre de 25 amostras comerciais de cogumelos em conserva e verificou que 68 % encontraram-se acima dos 50 mg/kg permitidos pela legislação vigente, sendo que os níveis variaram de não detectado a 1.052 mg/kg. Machado<sup>11</sup>, em 39 sucos de fruta analisados, concluiu que as amostras continham concentração de SO<sub>2</sub> dentro do limite da legislação e

**Tabela 3.** Recuperação de SO<sub>2</sub> das amostras comerciais adicionadas de padrão sulfito de sódio

Amostra	SO <sub>2</sub> (mg/kg) na amostra fortificada (C <sub>1</sub> )	SO <sub>2</sub> (mg/kg) na amostra (C <sub>2</sub> )	SO <sub>2</sub> (mg/kg) adicionado (C <sub>3</sub> )	Recuperação* (%)	Recuperação média (%)	DP	DPR (%)
Suco de caju	283		74	120			
	277	194	73	114	113	8	7
	286		88	105			
	459		236	112			
	465	194	234	116	112	4	3
	446		232	109			
Suco de maracujá	331		198	108			
	348	118	212	108	105	6	5
	296		180	99			
	166		43	110			
	166	118	43	112	115	7	6
	171		43	122			
	176		64	92			
	156	117	43	91	92	1	1
	143		50	112			
	139	87	50	104	108	6	5
Suco de uva	251		238	105			
	247	<LQ	238	104	102	5	5
	230		238	97			
	78		83	94			
	83	<LQ	83	100	95	4	4
	76		83	92			
	227		240	95			
	297	<LQ	240	124	108	15	14
	279		267	104			
	52		47	111			
	41	<LQ	47	87	97	12	12
	44		47	94			
	120		93	108			
118	20	93	105	108	3	2	
123		93	111				
Água de coco	78		29	103			
	77	48	29	100	101	3	3
	77		29	100			
	162		112	104			
	166	46	112	107	105	2	2
	161		112	103			
Cogumelo em conserva	182		121	98			
	185	64	131	92	96	4	4
	174		111	99			
	53		16	112			
	49	35	16	88	98	13	13
	50		16	94			
	101		81	84			
	91	33	81	72	81	9	11
105		81	89				

\*Recuperação (%) =  $(C_1 - C_2) * 100 / C_3$  (Inmetro, 2010)<sup>2</sup> C<sub>1</sub> = concentração de SO<sub>2</sub>, determinada na amostra adicionada de solução padrão (fortificada);

C<sub>2</sub> = concentração de SO<sub>2</sub>, determinada na amostra diretamente, sem adição de padrão;

C<sub>3</sub> = concentração de SO<sub>2</sub>, que foi adicionada à amostra.

DP = Desvio-padrão      DPR = Desvio-padrão relativo

que a maioria delas estava abaixo de 50 % do limite máximo permitido.

### Recuperação de SO<sub>2</sub> nas amostras comerciais fortificadas

Na Tabela 3 estão apresentados os teores de SO<sub>2</sub> determinados nas amostras comerciais fortificadas (C<sub>1</sub>), o teor inicial obtido na amostra (C<sub>2</sub>), os valores adicionados (C<sub>3</sub>), os resultados de recuperação e recuperação média, desvio-padrão (DP) e desvio-padrão relativo (DPR), tendo-se o mínimo de 2 e o máximo de 5 níveis de concentração na fortificação. As recuperações médias para os sucos foram de 112-113 % para caju; 92-115 % para maracujá; 95-108 % para uva; 101-105 % para a água de coco e 81-98 % para o cogumelo em conserva. Os resultados de recuperação de SO<sub>2</sub> nas amostras comerciais com variação de 81 % a 115 % estão de acordo com as recomendações da AOAC<sup>12</sup>, que preconiza valores  $\geq 80$  %, para alimentos fortificados. O DPR com mínimo de 1 % e máximo de 14 % também foi inferior ao DPR<sub>r</sub> de 16,9 % para suco de fruta, estabelecido no estudo interlaboratorial para sulfitos (AOAC<sup>12</sup> – Tabela 990.28).

### Seletividade

Referente à seletividade ou efeito de matriz, a Figura 2 (B) apresenta as curvas de regressão linear de SO<sub>2</sub> teórico e SO<sub>2</sub> determinado no método Monier-Williams para o padrão sulfito de sódio e amostras de suco de uva, cogumelo em conserva e suco de maracujá fortificadas pelo menos em três níveis de concentração (resultados da Tabela 3). O padrão SO<sub>2</sub> na faixa de concentração de 7 a 825 mg/L revelou linearidade com equação da reta  $y = 1,0726x - 7,0385$  e coeficiente de correlação (r) 0,9990. O coeficiente angular da reta (1,0726) corresponde ao ângulo aproximado de 47°, indicando sensibilidade satisfatória. Segundo as equações de regressão das amostras fortificadas, a mesma tendência de linearidade e sensibilidade foi verificada. Tem-se um pequeno distanciamento da curva de regressão para o cogumelo em conserva, devido, provavelmente, ao seu estado sólido, comparado às outras matrizes líquidas que favorecem a remoção do SO<sub>2</sub> (livre e ligado).

As concentrações de SO<sub>2</sub>, os graus de liberdade (referente ao número de repetições) e as equações da reta de regressão foram utilizadas no teste de comparação de inclinação de retas, segundo a análise estatística

de Student<sup>28</sup>. Aplicando-se o teste t-Student para as inclinações das retas de recuperação do padrão de SO<sub>2</sub> ( $b_1=1,0726$ ) e do suco de uva fortificado ( $b_2=1,0714$ ), com critério de aceitação de 95 %, obteve-se  $t_{\text{calc}}=0,003$  e  $t_{\text{tab}}=2,034$ . Como  $t_{\text{calc}} < t_{\text{tab}}$  pode-se concluir que  $b_1=b_2$ , isto é, os coeficientes angulares das retas foram equivalentes, não havendo efeito de matriz.

O teste t-Student para inclinações também foi aplicado para as outras amostras, revelando para o cogumelo em conserva  $t_{\text{calc}}=1,358 < t_{\text{tab}}=2,052$ , e suco de maracujá  $t_{\text{calc}}=0,447 < t_{\text{tab}}=2,048$ , evidenciando a não existência de efeito de matriz para as amostras comerciais avaliadas. Os resultados estatísticos mostraram a não influência das matrizes de sucos de uva, maracujá e cogumelo em conserva, o que pôde também ser observado pelas pequenas variações das inclinações das retas apresentadas na Figura 2(B). Portanto, ficou estabelecida a seletividade do método Monier-Williams na determinação de dióxido de enxofre e, portanto, os estudos de linearidade, limite de quantificação, sensibilidade, exatidão e precisão podem ser realizados na curva padrão (sem as respectivas matrizes).

Os resultados do estudo de verificação mostraram que o desempenho do método Monier-Williams otimizado foi adequado para a análise de dióxido de enxofre, com limite de quantificação de 7 mg/L, faixa linear de trabalho de 7 a 2.675 mg/L, coeficiente de determinação (r<sup>2</sup>) de 0,9979, sensibilidade de 1,0647, recuperação de 87 – 109 %, repetitividade com DPR  $\leq 7$  %, sendo seletivo sem influência de matriz para os sucos integrais de uva, maracujá e cogumelo em conserva.

### CONCLUSÃO

O método Monier-Williams otimizado revelou seletividade, boa precisão e exatidão na determinação de dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) em sucos de frutas, água de coco e cogumelo em conserva. A faixa linear de trabalho, o limite de quantificação e a sensibilidade foram adequados para os teores que são encontrados normalmente nas amostras de alimentos.

Os altos níveis de SO<sub>2</sub> nos cogumelos em conserva evidenciam uma preocupação de saúde pública, necessitando melhoria no controle de qualidade industrial e maior atuação da fiscalização, assegurando a saúde do consumidor.

Apesar do método de Monier-Williams otimizado demandar tempo longo de análise, ele é simples,

reprodutivo e não requer reagentes e equipamentos caros, possibilitando o uso da metodologia na rotina dos laboratórios de controle de qualidade.

### DEDICATÓRIA

As autoras dedicam esse artigo ao Prof. Dr. Jaim Lichtig, grande amigo, colaborador e incentivador da nossa pesquisa, e que recentemente nos deixou lembranças e saudades.

### REFERÊNCIAS

1. Taylor SL, Higley NA, Bush RK. Sulfites in foods: uses, analytical methods, residues, fate, exposure assessment, metabolism, toxicity, and hypersensitivity. *In: Chichester CO. Advances in Food Research*. Orlando: Academic Press, Inc.; 1986. p. 1-76.
2. Whitaker JR. Enzymes. *In: Fennema OR. Food Chemistry*. New York: Marcel Dekker; 1996. p. 431-530.
3. Haard NF, Chism GW. Characteristics of edible plant tissues. *In: Fennema OR. Food Chemistry*. New York: Marcel Dekker; 1996. p. 943-1011.
4. Sayavedra-Soto LA, Montgomery MW. Inhibition of polyphenoloxidase by sulfite. *J Food Sci*. 1986;51(6):1531-36.
5. Fazio T, Warner CR. A review of sulphites in foods: analytical methodology and reported findings. *Food Addit Contam*. 1990;7(4):433-54.
6. Sulfur dioxide and sulfites (WHO Food Additives Series 18). [Acesso 2009 abr 10]. Disponível em: [<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v18je14.htm>].
7. Walker R. Sulphiting agents on foods: some risks/benefit considerations. *Food Addit and Contam*. 1985;2(1):5-24.
8. Brasil. Ministério da Saúde. CNS. Resolução nº 4, de 24 de novembro de 1988. Aprova a 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 26/03/1965. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 19 dez 1988. p. 24.716-23.
9. Brasil. Ministério da Saúde. ANVISA. Resolução RDC 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] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 14 jan. 2002. Seção 1, nº 9. p.51.
10. Leclercq C, Molinaro MG, Piccinelli R, Baldini M, Arcella D, Stacchini P. Dietary intake exposure to sulphites in Italy – analytical determination of sulphite-containing foods and their combination into standard meals for adults and children. *Food Addit Contam*. 2000;17(12):979-89.
11. Machado RMD. Determinação dos níveis de sulfitos em vinhos e em sucos de frutas e estimativa de sua ingestão [tese de doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2007.
12. AOAC. Official methods of analysis of AOAC International. AOAC Official Method 990.28. Sulfites in Foods. Optimized Monier-Williams Method. 18<sup>th</sup> ed. Gaithersburg (MD); 2006. Chapter 47. Section 47.3.43, p. 29-31.
13. Pizzoferrato L, Quattrucci E, Di Lullo G. Evaluation of an HPLC method for the determination of sulphiting agents in foods. *Food Addit and Contam*. 1990;7(2):189-95.
14. Kim HJ. Comparison of the ion exclusion chromatographic method with the Monier-Williams method for determination of total sulfite in foods. *J Assoc Off Anal Chem*. 1989;72(2):266-72.
15. Devries JW, Ge H, Ebert FJ, Magnuson JM, Ogawa MK. Analysis for total sulfite in foods by using rapid distillation followed by redox titration. *J Assoc Off Anal Chem*. 1986;69(5):827-30.
16. Vahl JM, Converse JE. Ripper procedure for determining sulfur dioxide in wine: collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem*. 1980;63(2):194-9.
17. Beutler HO. A new enzymatic method for determination of sulphite in food. *Food Chem*. 1984;15:157-64.
18. Pizzoferrato L, Di Lullo G, Quattrucci E. Determination of free, bound and total sulphites in foods by indirect photometry HPLC. *Food Chem*. 1998;63(2):275-9.
19. Mcfeeters RF, Barish AO. Sulfite analysis of fruits and vegetables by high-performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet spectrophotometric detection. *J Agric Food Chem*. 2003;51(6):1513-7.
20. Warner CR, Daniels DH, Fitzgerald MC, Joe FLJr, Diachenko GW. Determination of free and reversibly bound sulphite in foods by reverse-phase, ion-pairing high performance liquid chromatography. *Food Addit Contam*; 1990;7(5):575-81.
21. Sullivan JJ, Holligworth TA, Wekell MM, Meo VA, Saba HH, Etemad-Moghadam A, et al. Determination of total sulfite in shrimp, potatoes, dried pineapple and white wine by flow injection analysis: collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem*. 1990;73(1):35-42.
22. Ruiz-Capillas C, Jiménez-Colmenero F. Application of flow injection analysis for determining sulphites in food and beverages: a review. *Food Chem*. 2009;112(2):487-93.
23. Martins PR, Popolim WD, Nagato LAF, Takemoto E, Araki K, Toma HE, et al. Fast and reliable analysis of sulphite in fruit juices using a supramolecular amperometric detector encompassing in flow gas diffusion unit. *Food Chem*. 2011;127(1):249-55.
24. INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro; 2011. Revisão 4, 19 p. DOQ-CGCRE-008.
25. Brasil. Ministério da Saúde. ANVISA. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Aprova o “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. [acesso 2011 Fev 25]. Disponível em: [<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php>].
26. Norma ABNT NBR ISO/IEC 17025. Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro: ABNT, 2005. 31p.
27. Yabiku HY, Takahashi MY, Martins MS, Heredia R, Zenebon O. Níveis de conservadores intencionais em sucos naturais de frutas comercializadas no Brasil. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 1987;47(1/2):65-75.
28. Rego ECP. Determinação de 1-Hidroxipireno urinário como indicador da exposição humana a hidrocarbonetos

- policíclicos aromáticos [dissertação de doutorado]. Niterói (RJ): Universidade Federal Fluminense; 2007.
29. AOAC. Official methods of analysis of AOAC International. Appendix F: guidelines for standard method performance requirements. 2012. [acesso 2012 Nov 07]. Disponível em: [http://www.eoma.aoac.org/appendices.asp].
30. Bragagnolo N, Silva CA, Taniwaki MH. Avaliação dos teores de dióxido de enxofre e da qualidade microbiológica de cogumelos em conserva. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2001; 60(2):103-7.