

# DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE COBRE EM DIFERENTES EXTRATOS DE HORTALIÇAS DO TIPO A E B<sup>1</sup>

Édira Castello Branco de ANDRADE<sup>2,\*</sup>, Anderson Junger TEODORO<sup>2</sup>,

Iracema TAKASE<sup>3</sup>

## RESUMO

Amostras de hortaliças dos tipos A e B foram analisadas quanto ao teor total de cobre através de espectroscopia de absorção atômica em chama, e o método de extração seqüencial foi aplicado com os seguintes extratores: solução de CaCl<sub>2</sub> 1,0M; solução de ácido acético 0,1M; solução de ácido acético 0,5M / acetato de amônio 5% [pH=5,0]; solução de NaOH 0,1M e solução de HCl 0,5M. Na análise da rejeição de resultados foi aplicado o teste de Grubbs e na comparação dos dados o teste t de Student foi utilizado. Em média 25,4% do teor total de cobre foram extraídos com solução de CaCl<sub>2</sub> 1,0M, sendo o máximo de 50,5% e o mínimo de 8,3%. Em média 14,8% do teor total de cobre, sendo que 32,6% e 6,4%, máximo e mínimo respectivamente, foram extraídos com solução de ácido acético 0,1M. Com relação ao uso de solução de ácido acético 0,5M / acetato de amônio 5% [pH=5,0], o mínimo extraído obteve valor de 6,2% e o máximo 27,6%, com média de 13,7%. O extrator de NaOH 0,1M foi o que teve menor extração, cerca de 10,5% e com extrator de HCl 0,5M a extração foi em média de 12,6%. A fração extraída de cobre nas amostras foi de no mínimo 34,5% e no máximo 100%. Observa-se que para a maioria das amostras, o cobre se encontra sob a forma de, no mínimo, 6 espécies químicas distintas.

**Palavras-chave:** cobre; extração seqüencial; biodisponibilidade.

## SUMMARY

DETERMINATION OF COPPER IN DIFFERENTS EXTRACTS IN SAMPLES OF A AND B VEGETABLES. Total copper content analysed in samples of A and B vegetables through atomic flame absorption spectroscopy and sequential extraction were performed by using the following extractants: CaCl<sub>2</sub> 1.0M solution; acetic acid 0.1M; acetic acid 0.5M / ammonium acetate 5% solution [pH = 5.0]; NaOH 0.1M solution and HCl 0.5M solution. For evaluation of the results Grubbs test and Student test were used. On average 25.4% of total copper were extracted in CaCl<sub>2</sub> 1.0M solution with a maximum extraction of 50.5% and a minimum of 8.3%. On average 14.8% of the total amount of copper, a maximum of 32.6% and a minimum of 6.4% were extracted in acetic acid 0.1M solution. Using acetic acid 0.5M / ammonium acetate 5% [pH = 5.0] solution, the minimum extracted was 6.2% and the maximum 27.6% with 13.75% as average. The less effective extractant was NaOH 0.1M (10.5%) and HCl 0.5M extractant which had an average of 12.6% of extraction. The copper extracted was present at least in of six different chemical species.

**Keywords:** copper; sequential extraction; bioavailability.

## 1 - INTRODUÇÃO

Os minerais constituem um grupo de elementos largamente distribuídos na natureza e que exercem papel dos mais importantes em diversas funções e setores do organismo. Eles atuam tanto na forma iônica quanto como constituintes de compostos (enzimas, hormônios, secreções e proteínas do tecido orgânico) [9, 26].

Dentre os vários minerais existentes destaca-se o cobre, classificado como microelemento essencial ou elemento-traço e que exerce funções essenciais ao organismo [26].

O cobre é um microelemento de número atômico 29 e peso atômico de 63,55 e essencial para diversas funções como: mobilização do ferro para a síntese de hemoglobina e componente de várias enzimas, como citocromo C-oxidase, superóxido dismutase, monoamino-oxidase, etc... [9, 26]. O cobre é absorvido na proporção de 40 a

50% da ingestão oral, no estômago e duodeno proximal por transporte ativo junto a aminoácidos ou por difusão. Uma vez absorvido é transportado para o fígado, ligado à albumina e transcupreína, incorporando-se então a ceruloplasmina e várias metaloenzimas, que permite o transporte do cobre para os tecidos extra-hepáticos [9].

A excreção é feita via fecal e, em maior teor pela bile, assim como a urina e o suor. Sua deficiência provoca anemia, leucopenia, neutropenia, hiperucemia, retardo no crescimento; enquanto que sua toxicidade provoca diarreia, náusea, vômitos, cirrose, anemia e bronquite [9, 26].

Existem várias interações entre vitaminas e minerais e o conhecimento destas, permite um maior controle de algumas variáveis, para uma melhor utilização do nutriente. As interações físico-químicas entre nutrientes incluem: adsorção e formação de complexos e precipitação, com influência da estabilidade de ambos, interferindo na biodisponibilidade dos metais [7, 8, 20].

A biodisponibilidade do cobre está comprometida com o excesso de vitamina C e do zinco, ambos diminuindo o processo de absorção do cobre [6, 7, 9, 26].

Vale ressaltar que em relação à forma química dos elementos traço, a mais disponível é a forma de compostos orgânicos em relação aos sais [10, 25].

Através da determinação do teor total do metal ingerido, não é possível medir o quanto deste metal será absorvido. Entretanto através da técnica de especiação

<sup>1</sup> Recebido para publicação em 18/06/2003. Aceito para publicação em 12/05/2004 (001153).

<sup>2</sup> Departamento de Tecnologia dos Alimentos, Escola de Nutrição, UNIRIO, UNIVERSIDADE DO RIO DE JANEIRO, Rua Xavier Sigaud nº 290, prédio II, 3º andar, Urca, Rio de Janeiro, CEP 22290-180, Email: ediracba@unirio.br

<sup>3</sup> Departamento de Química Analítica, UFRJ

\* A quem a correspondência deve ser enviada.

dos metais, que é definida como a determinação da concentração das formas físico-químicas individuais dos elementos que, em conjunto, constituem a concentração total do mesmo na amostra, podemos ter novos dados para prever sua absorção [10, 19, 25].

Para a especiação em amostras sólidas, inicialmente deve ser aplicado um método de extração seqüencial ou seletivo. Um elemento pode estar presente em um sólido sob a forma de espécies adsorvidas na superfície, co-precipitadas, ocluídos ou compostos de coordenação. A maioria dos esquemas de extração seqüencial inclui diferentes grupos de extratores, já que ela se baseia na progressão de extratores fracos, como a água, até um extrator forte, como um ácido concentrado [10, 12, 19, 25].

Os primeiros extratores da extração seqüencial geralmente são aqueles com propriedades de troca iônica, deslocando íons de sítios iônicos específicos, sendo representados por soluções iônicas, como o cloreto de magnésio e de cálcio e nitrato de sódio. Em seguida, são utilizados extratores com propriedades de dissolução de carbonatos, já que metais ligados a carbonatos são sensíveis à variação de pH. Estes são representados por soluções tampão de ácido/acetato de amônia pH = 5,0. Os extratores com propriedades de redução ácida continuam o processo de extração e promovem a dissolução de oxidrilatos de ferro e manganês, tendo como exemplo a solução diluída de ácido acético. Por fim, dois últimos tipos de extratores são utilizados: primeiro aqueles que enfraquecem a ligação do metal com compostos orgânicos e sulfetos, representados por soluções ácidas de peróxido de hidrogênio, soluções de hidróxido de sódio pH = 12,0 e ácido clorídrico pH = 2,0, pois permitem a degradação da matéria orgânica, por hidrólise ou oxidação, facilitando a liberação dos metais; e, por último são utilizados os extratores que promovem a dissolução dos silicatos e minerais, representados por ácidos fortes. Um método de especiação ideal é definido como aquele que pode fornecer informações desejáveis, sem alterar a amostra original em momento algum [11, 12, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 25].

As hortaliças podem ser classificadas segundo o teor de glicídios onde as do tipo A contém até 5% de glicídios, as do tipo B 10% e as do tipo C até 20% do teor em glicídios [16].

Este trabalho tem como objetivo promover a extração seqüencial e análise de cobre em hortaliças do tipo A e B.

## 2 – MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 – Amostras

As amostras analisadas foram: hortaliças do tipo A – abobrinha-verde, agrião, bertalha, brócolis, chicória, espinafre e tomate; hortaliças do tipo B – abóbora, abóbora-moranga, beterraba, cebola, cenoura, couve, couve-flor, ervilha, jiló, nabo, pimentão, quiabo, repolho e vagem.

### 2.2 – Tratamento das amostras

As amostras foram fracionadas e parte retirada para determinação da umidade através do processo de perda de substâncias voláteis em estufa a 105°C, sendo o restante dessecado na mesma temperatura até total secagem. As amostras secas após homogeneização foram calcinadas a 550°C por um período mínimo de 2 horas. As cinzas foram dissolvidas em HCl 2,0M e transferidas quantitativamente para balão volumétrico de 25mL [5].

### 2.3 – Extração seqüencial

Foram utilizados cerca de 5g de amostra seca e cada amostra passou por processo de extração seqüencial. Os extratores utilizados foram: solução de CaCl<sub>2</sub> 1,0M; solução de ácido acético 0,1M; solução de ácido acético 0,5M / acetato de amônio 5% [pH=5,0]; solução de NaOH 0,1M e solução de HCl 0,5M. Cada extrator esteve em contato com a amostra durante 1 hora, sendo depois filtrado, e este utilizado para determinação do teor total de cobre.

- Determinação do teor total de cobre – o teor total de cobre nas amostras foi determinado através da espectrometria de absorção atômica em chama [5].
- Tratamento estatístico – na análise da rejeição de resultados foi aplicado o teste de Grubs e o teste t de Student foi usado [14].
- Garantia da qualidade – os processos de extração seqüencial, determinação de umidade e de determinação dos teores totais de cobre foram feitos em triplicata. O aparelho de absorção atômica foi sempre previamente calibrado com solução analítica do respectivo metal.

## 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos são apresentados a seguir. Na *Tabela 1* encontram-se os teores de umidade e de cobre nas amostras analisadas. Os dados foram tratados estatisticamente aplicando o teste de Grubs, nível de confiança 95%, não houve dados rejeitados. Em média, as hortaliças do tipo A apresentaram 0,09mg% de cobre e as hortaliças do tipo B 0,08mg%. Comparando esses valores com os obtidos por ANDRADE et al. [1], na análise destes metais em frutas; em hortaliças do tipo C [2]; em cereais crus e processados [3]; e em leguminosas cruas e processadas [4], constata-se que em relação ao cobre, as hortaliças A e B possuem um teor total médio menor do que frutas, cereais, hortaliças C e leguminosas, já que estes apresentam teores médios de cobre de 0,13mg%, 0,21mg%, 0,24mg% e 0,89mg%, respectivamente.

Estima-se com a “Ingestão Dietética Diária Considerada Segura e Adequada” (ESADDI – Estimate and Adequate Daily Dietary Intake) para o cobre 1,5 a 3,0mg/dia [13, 15]. Considerando que o teor médio de cobre nas amostras de hortaliças dos tipos A e B foi de 0,085mg%, 100g destes alimentos que corresponde a porção usualmente ingerida dos mesmos, pode fornecer cerca de 5,7% do valor da RDA.

A Tabela 2 apresenta os teores de cobre extraídos pelo método de extração seqüencial. Os dados foram tratados estatisticamente aplicando o teste de Grubs, nível de confiança 95%, não foi rejeitado nenhum resultado. A fração correspondente ao extrator I representa a fração com propriedades de troca iônica, deslocando sítios iônicos específicos, ou seja, é uma fração facilmente solúvel [19, 22, 25]. Em média 25,4% foram extraídos do total de cobre encontrado nas hortaliças, sendo o máximo de 50,5% e o mínimo de 8,3%. Vale ressaltar as amostras de couve-flor e beralha que apresentaram extração de 50% do teor total de cobre.

No caso do extrator II, que possui propriedades de redução ácida e promove dissolução dos oxihidratos de ferro e manganês [11, 18], a fração extraída possui uma solubilidade média de 14,8%, sendo 32,6% e 6,4%, o máximo e o mínimo extraídos, respectivamente. Observa-se que as amostras de abóbora, abobrinha-verde, agrião, beralha, brócolis, chicória, couve-flor, espinafre, jiló, nabo, pimentão, repolho e tomate, apresentaram cerca de 50% da extração pelo extrator I. Aplicando-se o teste t de Student, intervalo de confiança 95% observa-se que as amostras de abóbora-moranga, beterraba, cebola, cenoura, couve, ervilha, quiabo e vagem tiveram o cobre extraído com o extrator II, em igual proporção do extrator I.

Com relação ao extrator III, a fração extraída corresponde a fração carbonatada que sofre alta variação de pH [11, 18]. O mínimo extraído foi de 6,2% e o máximo 27,6% com média de 13,7%. Observa-se que com exceção das amostras de beralha, cenoura, couve-flor, jiló e vagem, as demais apresentaram teor de cobre extraído similar ao teor extraído com o extrator II, ao aplicar o teste t de Student, intervalo de confiança 95%.

**TABELA 1.** Teor % de umidade e teor total de cobre mg% em hortaliças dos tipos A e B

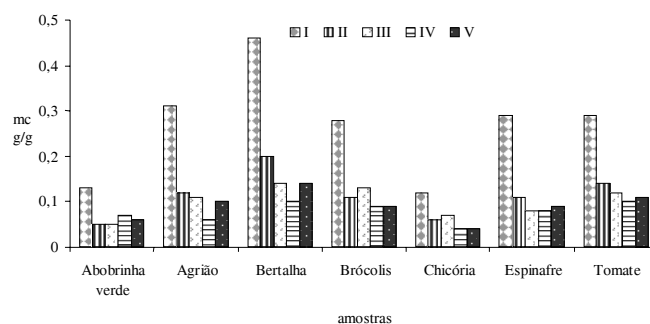
Alimentos	Umidade %	Cobre mcg/g
Abóbora	96,00 ± 0,00	0,48 ± 0,08
Abóbora-Moranga	89,33 ± 1,15	0,61 ± 0,04
Abobrinha-verde	95,33 ± 1,15	0,68 ± 0,02
Agrião	90,67 ± 1,15	1,13 ± 0,15
Bertalha	90,00 ± 0,00	0,91 ± 0,04
Beterraba	90,00 ± 0,00	0,81 ± 0,01
Brócolis	88,66 ± 1,15	1,00 ± 0,00
Cebola	89,33 ± 1,15	0,49 ± 0,01
Cenoura	89,33 ± 1,15	0,98 ± 0,08
Couve	86,67 ± 1,15	1,20 ± 0,10
Couve-flor	90,00 ± 0,00	0,46 ± 0,01
Chicória	96,98 ± 1,15	0,56 ± 0,07
Ervilha	88,00 ± 12,0	0,58 ± 0,02
Espinafre	94,67 ± 1,15	1,33 ± 0,30
Jiló	92,00 ± 0,00	1,30 ± 0,10
Nabo	92,00 ± 0,00	0,65 ± 0,02
Pimentão	94,00 ± 0,00	0,61 ± 0,00
Quiabo	90,67 ± 1,15	1,10 ± 0,10
Repolho	92,67 ± 1,15	0,87 ± 0,12
Tomate	94,00 ± 1,15	1,07 ± 1,13
Vagem	92,67 ± 1,15	0,73 ± 0,06

As frações extraídas pelos extratores IV e V, que enfraquecem ligações do metal com compostos orgânicos [11, 18], representaram em média 10,5% e 12,6% do teor total de cobre das amostras. Aplicando o teste t de Student, intervalo de confiança 95%, observa-se que exceto as amostras de abóbora, abóbora-moranga, agrião, beralha, couve-flor, couve, ervilha, jiló e vagem as demais amostras apresentaram teor similar de cobre extraído com os extratores IV e V.

**TABELA 2.** Teores de cobre em mcg/g nos extratos de hortaliças do tipo A e B

Amostras	Extratores				
	I	II	III	IV	V
Abóbora	0,15 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,09 ± 0,03
Abóbora-Moranga	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,12 ± 0,01
Abobrinha-verde	0,13 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,00
Agrião	0,31 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,05	0,06 ± 0,00	0,10 ± 0,01
Bertalha	0,46 ± 0,03	0,20 ± 0,05	0,14 ± 0,03	0,10 ± 0,01	0,14 ± 0,01
Beterraba	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,07 ± 0,01
Brócolis	0,28 ± 0,01	0,11 ± 0,03	0,13 ± 0,02	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,00
Cebola	0,14 ± 0,03	0,16 ± 0,02	0,11 ± 0,03	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,03
Cenoura	0,29 ± 0,00	0,27 ± 0,01	0,13 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,12 ± 0,11
Chicória	0,12 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,07 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01
Couve	0,37 ± 0,03	0,25 ± 0,05	0,26 ± 0,03	0,19 ± 0,06	0,11 ± 0,02
Couve-flor	0,23 ± 0,00	0,10 ± 0,03	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,10 ± 0,00
Ervilha	0,15 ± 0,02	0,16 ± 0,03	0,16 ± 0,03	0,11 ± 0,03	0,15 ± 0,04
Espinafre	0,29 ± 0,01	0,11 ± 0,00	0,08 ± 0,02	0,08 ± 0,04	0,09 ± 0,02
Jiló	0,43 ± 0,04	0,19 ± 0,06	0,15 ± 0,01	0,14 ± 0,06	0,21 ± 0,07
Nabo	0,12 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,09 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,08 ± 0,00
Pimentão	0,11 ± 0,02	0,07 ± 0,02	0,09 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,02
Quiabo	0,09 ± 0,01	0,07 ± 0,00	0,09 ± 0,03	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,01
Repolho	0,19 ± 0,01	0,08 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,00
Tomate	0,29 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,03	0,11 ± 0,00
Vagem	0,12 ± 0,03	0,10 ± 0,00	0,15 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,06 ± 0,02

Extrator I - Solução de cloreto de cálcio - 1,00M pH 7;  
Extrator II - Solução ácido acético - 0,10M com Acetato de amônio - 5,00% pH 5,00;  
Extrator III - Solução de ácido acético -1,00M;  
Extrator IV - Solução hidróxido de sódio - 0,10M;  
Extrator V - Solução de ácido clorídrico - 0,50M

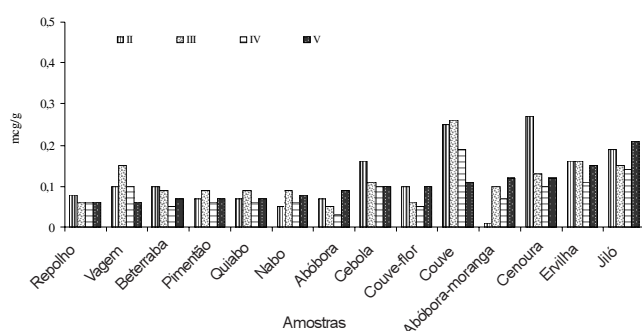


Extrator I - Solução de cloreto de cálcio - 1,00M pH 7;  
Extrator II - Solução ácido acético - 0,10M com Acetato de amônio - 5,00% pH 5,00;  
Extrator III - Solução de ácido acético -1,00M;  
Extrator IV - Solução hidróxido de sódio - 0,10M;  
Extrator V - Solução de ácido clorídrico - 0,50M

**FIGURA 1.** Extração sequencial de cobre em mcg/g de hortaliças do tipo

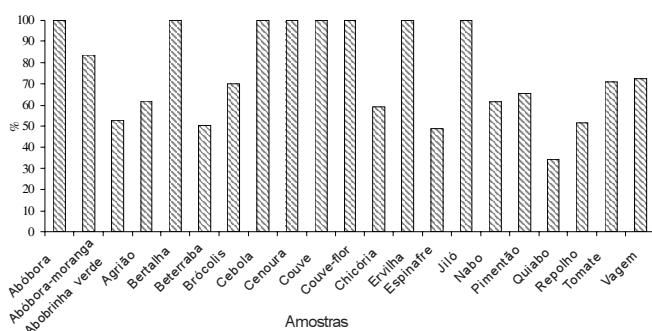
A *Figura 1* apresenta os teores de cobre extraídos durante o processo de extração sequencial em hortaliças do tipo A. Observa-se que todas as amostras apresentaram maior extração com o extrator I, e o comportamento frente aos diferentes extratores foi similar.

A *Figura 2* mostra os teores de cobre extraídos pelo processo de extração sequencial em hortaliças do tipo B. Comparando estas amostras com as hortaliças do tipo A verifica-se que o comportamento frente aos diferentes extratores é bem distinto. Considerando que a maioria das amostras apresenta, no mínimo, seis espécies químicas distintas de cobre, as extraídas pelos extratores I, II, III, IV e V e a fração não extraída, acredita-se que para avaliar a biodisponibilidade deste metal nestas amostras o estudo deva ser para cada amostra específica, em função dos diferentes comportamentos frente aos extratores.



Extrator I – Solução de cloreto de cálcio – 1,00M pH 7;  
Extrator II – Solução ácido acético – 0,10M com Acetato de amônio – 5,00% pH 5,00;  
Extrator III – Solução de ácido acético – 1,00M;  
Extrator IV – Solução hidróxido de sódio – 0,10M;  
Extrator V – Solução de ácido clorídrico – 0,50M

**FIGURA 2.** Extração sequencial de cobre em mcg/g de hortaliças do tipo B



**FIGURA 3.** Teor % de cobre extraído de hortaliças do tipo A e B através de extração sequencial

A *Tabela 3* mostra os teores totais de cobre nas amostras *in natura* e na fração total obtida pelo somatório dos teores de cobre extraídos durante o processo de extração sequencial. Aplicando o teste t de student, intervalo de confiança 95%, observa-se que 8 amostras apresentaram extração total do teor de cobre. As amostras de brócolis, tomate e vagem tiveram extração superior a 70% do teor total de cobre. Abobrinha-verde,

agrião, beterraba, chicória, nabo, pimentão e repolho apresentaram extração superior a 50% do teor total de cobre. Quiabo e espinafre apresentaram extração superior a 35% do teor de cobre. A *Figura 3* apresenta o percentual de cobre total extraído das amostras. Observa-se que a extração de cobre das amostras de abóbora, beralha, cebola, cenoura, couve, couve-flor, ervilha e jiló foi considerada 100% após os dados terem sido tratados estatisticamente com teste t de student, intervalo de confiança 95%.

**TABELA 3.** Teor em mg% de cobre nas amostras *in natura* e na fração total extraída

Amostras	mcg/g Cu amostras <i>in natura</i>	Total de Cu extraído em mcg/g
Abóbora	0,48 ± 0,08	0,39
Abóbora-moranga	0,61 ± 0,04	0,51
Abobrinha-verde	0,68 ± 0,02	0,36
Agrião	1,13 ± 0,15	0,70
Beralha	0,91 ± 0,04	1,04
Beterraba	0,81 ± 0,01	0,41
Brócolis	1,00 ± 0,00	0,70
Cebola	0,49 ± 0,01	0,61
Cenoura	0,98 ± 0,08	0,91
Couve	1,20 ± 0,10	1,18
Couve-flor	0,46 ± 0,01	0,54
Chicória	0,56 ± 0,07	0,33
Ervilha	0,58 ± 0,02	0,73
Espinafre	1,33 ± 0,30	0,65
Jiló	1,30 ± 0,10	1,14
Nabo	0,65 ± 0,02	0,40
Pimentão	0,61 ± 0,00	0,40
Quiabo	1,10 ± 0,10	0,38
Repolho	0,87 ± 0,12	0,45
Tomate	1,07 ± 0,11	0,76
Vagem	0,73 ± 0,06	0,53

#### 4 – CONCLUSÕES

A partir dos resultados, observa-se que para a maioria das amostras, o cobre se encontra sob a forma de, no mínimo, 6 espécies químicas distintas, a extraída em cada um dos extratores I, II, III, IV e V e a fração não extraída. Estudos que permitam a identificação dos compostos extraídos pelos diferentes extratos utilizados poderão ser de grande valia para avaliação da biodisponibilidade do cobre.

#### 5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ANDRADE, E.C.B.; ASSIS, A.S.; FERREIRA, F.N.; MELLO, V.S.; TAKASE, I. Determinação dos teores de cobre e zinco em frutas, **ANAIS, XVIII CBCTA**, ISBN 85-89123-1-4, 2002.
- [2] ANDRADE, E.C.B.; BARROS, A.M.; ASSIS, A.S.; FERREIRA, F.N.; MELLO, V.S.; TAKASE, I. Avaliação dos teores de cobre e zinco em hortaliças C cruas e

- após processamento térmico em meio salino e aquoso, **ANAIS, XVIII CBCTA**, ISBN 85-89123-01-4, 2002.
- [3] ANDRADE, E.C.B.; BARROS, A.M.; MAGALHÃES, A.C.P.; CASTRO, L.L.S.; TAKASE, I. Avaliação da biodisponibilidade de cobre e zinco em cereais crus e processados termicamente em meio aquoso e salino. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 17, n. 3, p. 79-82, 2002.
- [4] ANDRADE, E.C.B.; DRADE, E.C.B.; BARROS, A.M.; MAGALHÃES, A.C.P.; CASTRO, L.L.S.; TAKASE, I. Avaliação dos teores de cobre e zinco em leguminosas cruas e após processamento térmico em meio salino e aquoso, **ANAIS, XVIII CBCTA**, ISBN 85-89123-01-4, 2002.
- [5] AOAC, OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. **Association of official analytical Chemists**, 40<sup>a</sup> ed, USA, 1984.
- [6] BARCELOUX, D.G. Copper. **Journal of Toxicology Clinical Toxicology**, v. 37, n. 2 p. 217-30, 1999.
- [7] COZZOLINO, S.M.F. Biodisponibilidade de Minerais. **Revista Nutrição**. Campinas, p. 87-98, jul.-dez., 1997.
- [8] FAIRWEATHER-TAIT, S.J. Bioavailability of dietary minerals. **Biochemical Society Transactions Colchester**, v. 24, n. 3, p. 775-780, 1996.
- [9] FRANCO, G. **Tabela de Composição de Alimentos**. 9<sup>a</sup> ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1999.
- [10] GALLARDO-LARA, F.; AZCON, M.; QUESADA, J.L.; POLO, A. Phytoavailability and Extractability of Copper and Zinc in Calcareous Soil Amended with Composted Urban Wastes. **Journal of Environmental Science and Health**, B, v. 34, p. 1049-1064, 1999.
- [11] GLEYZES, C.; TELLIER, S.; ASTRUC, M. et al. Fractionation studies of trace elements in contaminated Soils and sediments: a review of sequential extraction procedures Trends in **Analytical Chemistry**, v. 21, n. 6-7, 2002.
- [12] IPOLY, J.; BRUNORI, C.; CREMISINI, C.; FODOR, P.; MACALUSO, L.; MORABITO, R. Evaluation of performance of time saving extraction devices in the BCR-three-step sequential extraction procedure. **Journal Environmental Monitoring**, aug, v. 4, n. 4, p. 541-8, 2002.
- [13] MAHAN, L. KATHELEEN, KRAUSE, MARIE **Alimentos, Nutrição & Dietoterapia**. São Paulo: Rocca, 9<sup>a</sup> ed., 1998.
- [14] MILLER, J.; MILLER, J. Statistics and chemometrics for analytical chemistry, 4<sup>th</sup> ed., Inglaterra, Prentice Hall, 2001.
- [15] OMS, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Elementos Traço na Nutrição e Saúde**. São Paulo: Roca, 1998.
- [16] ORNELLAS, L. H. **Técnica Dietética Seleção e Preparo de Alimentos**, 3<sup>a</sup> ed, Rio de Janeiro: Julio C Reis Livraria, 1974.
- [17] PÉREZ-CID, B., LAVILLA, I., BENDICHO, C. Speeding up of three-stage sequential extraction method for metal speciation using focused ultrasound, **Analytica Chimica Acta**, n. 360, p. 35-41, 1998.
- [18] QIAN, J.; WANG, Z.; SHAN, X.; TU, Q.; WEN, B.; CHEN, B. Evaluation of plant availability of soil trace metals by chemical Fractionation d multiple regression analysis, **Environmental Pollution**, v. 91, n. 3, p. 309-315, 1996.
- [19] RAMOS, L.; Gonzales, M.T.; HERNANDEZ, L.M.; Sequential Extraction of Copper, Lead, Cadmium, and Zinc in Sediments from Ebro River [Spain]: Relationship with Levels Detected in Earthworms. **Bulletin of Environmental Contamination and toxicology**, v. 62, n. 3, p. 301-308, 1999.
- [20] SANDSTORM, B. Micronutrientes interactions: effects on absorption and bioavailability. **The British Journal of Nutrition**, May, 85 Suppl 2:S181-5, 2001
- [21] SANZ-MEDEL, A. Trace element analytical speciation in biological systems: importance, challenges and trends. **Spectrochimica Acta Part B**, n. 53, p. 197-211, 1998.
- [22] SCHEINOST, A.C.; KRETZSCHMAE, R.; PFISTER, S.; ROBERTS, D.R. Combine selective sequential extraction, X-ray absorption spectroscopy, and principal components analysis in soil. **Environmental Science & Technology**, dec, v. 1, n. 36, 2002.
- [23] SCHRAMMEL, O.; MICHALKE, B.; KETTRUP, A. Study of the copper distribution in contaminated soils of hop fields by single and sequential extraction procedures. **Science Total Environmental**, dec, v. 18, n. 263, p. 11-22, 2000.
- [24] SHIOWATANA, J.; TANTIDANAI, N.; NOOKABKAEW, S.; NACAPRICHA, D. A novel continuous flow sequential extraction procedure for metal speciation in solids. **Journal of Environmental Quality**, jul-aug, n. 30; 2001.
- [25] VULKAN, R.; MINGELGRIN, U.; BEN-ASHER, J.; FRENKEL, H. Copper and zinc speciation in the solution of a soil-sludge mixture. **Journal of Environmental Quality**, v. 31, n. 1, p. 193-203, jan.-feb., 2002.
- [26] WAITZBERG, D.L. **Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica**. 3<sup>a</sup> ed., São Paulo: Editora Atheneu, p. 131-134, 2002.