

# EXTRAÇÃO SEQUENCIAL DE COBRE, FERRO E ZINCO EM ERVAS MEDICINAIS<sup>1</sup>

Édira Castello Branco de ANDRADE<sup>2,\*</sup>, Simone Pinheiro ALVES<sup>2</sup>, Iracema TAKASE<sup>3</sup>

## RESUMO

A técnica de especiação dos metais, que determina a concentração das formas físico-químicas individuais dos elementos que, em conjunto, constituem a concentração total dos mesmos na amostra, possibilita a obtenção de novos dados para prever sua absorção. O termo biodisponibilidade, proposto inicialmente para a área farmacológica, indica a proporção do nutriente que é absorvida e utilizada pelo organismo. Sendo assim, a determinação do teor total do metal ingerido pelo organismo não possibilita traçar um perfil da eficiência de sua absorção. Técnicas de especiação química, como a extração sequencial, podem auxiliar na avaliação da biodisponibilidade dos minerais. Amostras de ervas medicinais de dois lotes foram analisadas quanto aos teores totais de cobre, ferro e zinco por espectroscopia de absorção atômica na chama, e a extração sequencial foi aplicada. Os testes F, de Dixon e *t-student* foram utilizados. Observou-se que, em média, as amostras apresentaram teores totais de cobre, ferro e zinco de respectivamente 1,37 mg%, 5,13 mg% e 2,96 mg%. Ao comparar estes valores com os teores destes metais em alimentos de origem vegetal, verifica-se que as ervas medicinais analisadas podem ser consideradas boas fontes de metais. Observou-se ainda que os metais cobre, ferro e zinco se encontram nas amostras sob no mínimo quatro espécies químicas distintas e que os extratores I e IV foram os de melhor eficiência. Técnicas de especiação química que possam identificar os compostos obtidos nos diferentes extratores podem auxiliar na avaliação da biodisponibilidade dos mesmos e, conseqüentemente, nos processos de absorção.

**Palavras-chave:** ervas medicinais, cobre, ferro, zinco, biodisponibilidade, extração sequencial.

## SUMMARY

SEQUENTIAL EXTRACTION OF COPPER, IRON AND ZINC IN MEDICINAL PLANTS. Speciation of the metals, which determines the concentration of the elements individual physiochemical forms that, together, constitute the total concentration of them in the sample, makes possible the attainment of new data to foresee its absorption. The term bioavailability, considered initially for the pharmacists, indicates the ratio of the nutrient that is absorbed and used by the organism. This way, the determination of the total content of the metal ingested by the organism does not make possible to trace a profile of the efficiency of its absorption. Techniques of chemical speciation, as the sequential extraction, can assist in the evaluation of the bioavailability of minerals. Samples of medicinal grass of two lots were analyzed in relation to the total content of copper, iron and zinc for spectroscopy of atomic absorption in the flame, and the sequential extraction was applied. F, Dixon and *t-student* tests were used. One observed that, in average, the samples presented copper, iron and zinc total content of respectively 1.37 mg%, 5.13 mg% and 2.96 mg%. When comparing these values with the content of these metals in foods of vegetal origin, it can be verified that the analyzed medicinal grass can be considered a good source of metals. It was still observed that the metals have copper, iron and zinc can be found in the samples under at least four distinct chemical species and that extractors I and IV were more efficient. Techniques of chemical speciation that can identify the compounds obtained from different extractors can assist in the evaluation of their bioavailability, as well as in the absorption processes.

**Keywords:** medicinal plants, copper, iron, zinc, bioavailability, sequential extraction.

## 1 - INTRODUÇÃO

O estudo dos minerais teve um grande avanço a partir da década de 70 com o desenvolvimento de técnicas analíticas mais sensíveis e precisas, que permitiram não apenas a quantificação de elementos encontrados como traços em alimentos e fluidos biológicos, mas também desvendar alguns dos mecanismos através dos quais estes exercem suas funções no organismo. A técnica de especiação dos metais, que determina a concentração das formas físico-químicas individuais dos elementos que, em conjunto, constituem a concentração total dos mesmos na amostra, possibilita a obtenção de novos dados para prever sua absorção [10, 11, 12, 18, 24].

Para especiação em amostras sólidas, inicialmente deve ser aplicado um método de extração, que pode ser seletivo ou sequencial. Um elemento pode estar presente em um

sólido sob a forma de espécies adsorvidas na superfície, como precipitados, em sítios de troca iônica nas superfícies das partículas, como co-precipitados, ocluídos ou como compostos de coordenação. Quando a extração sequencial é aplicada, está baseada na progressão de extratores fracos, como a água, até um extrator forte, como um ácido concentrado [13, 14, 15, 21, 22, 25, 26].

Os primeiros extratores 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 [14, 15, 17].

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 solução tampão de ácido acético/acetato de amônia pH - 5,0. Os extratores com propriedades de redução ácida continuam o processo de extração e promovem a dissolução de oxi-hidratos de ferro e manganês, tendo como exemplo a solução diluída de ácido acético [14, 15, 17].

Por fim, dois últimos extratores são utilizados: primeiro aqueles que enfraquecem a ligação do metal com compostos

<sup>1</sup>Recebido para publicação em 12/07/2005. Aceito para publicação em 10/10/2005 (001569).

<sup>2</sup>Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – Escola de Nutrição – Departamento de Tecnologia de Alimentos – E-mail: ediracba@unirio.com.br.

<sup>3</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro – Departamento de Química Analítica.

\*A quem a correspondência deve ser enviada.

orgânicos e sulfetos, representados por soluções ácidas de peróxido de hidrogênio, soluções de hidróxido de sódio pH - 12,0, pois permitem a degradação da matéria orgânica, por hidrólise ou oxidação, facilitando a liberação dos metais; e segundo são utilizados extratores que promovem a dissolução dos silicatos e minerais, representados por ácidos fortes, como HCl 2M [14, 15, 17].

O termo biodisponibilidade, proposto inicialmente para a área farmacológica, indica a proporção do nutriente que é absorvido e utilizado pelo organismo. Existem diversos fatores intrínsecos e extrínsecos que influenciam em um melhor ou pior aproveitamento dos nutrientes. Dentre os fatores intrínsecos, podemos destacar: a espécie do nutriente, a matriz onde o nutriente está incorporado e a ligação molecular desse nutriente. Com relação aos fatores extrínsecos, destacam-se: a quantidade desse nutriente na dieta associada às interações que ele pode promover, os atenuadores de bioconversão, o estado nutricional do indivíduo e os fatores genéticos relacionados ao indivíduo. Sendo assim, a determinação do teor total do metal ingerido pelo organismo não possibilita traçar um perfil da eficiência de sua absorção. Técnicas de especificação química, como a extração sequencial, podem auxiliar na avaliação da biodisponibilidade dos minerais [9, 20, 23].

As ervas medicinais vêm sendo amplamente estudadas e comercializadas em nosso país. A maioria destes estudos versa sobre seus ativos, normalmente compostos orgânicos de funções diversas no organismo. Visto seu consumo cada vez mais freqüente, sob forma de chás ou cápsulas, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a composição no que diz respeito aos metais cobre, ferro e zinco, e as formas químicas que estes possam apresentar [1, 7].

## 2 - MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 - Amostras

Foram analisadas amostras de dois lotes de ervas medicinais consumidas na região sudeste, obtidas sob a forma de ervas secas utilizadas para preparo de chás. As amostras analisadas foram: alcachofra (*Cynara scolymus L.*), alcaçuz (*Periandra dulcis Martius*), agoniada (*Plumeria lancifolia Muller*), assa-peixe (*Vernonia spp*), camomila (*Matricaria recutita L.*), cana-do-brejo (*Costus spicatus-Swartz*), capim-cidreira (*Cymbopogon citratus Stapf*), eucalipto (*Eucalyptus spp*), guaco (*Mikania glomerata Sprengel*), menta (*Mentha piperita L.*), picão preto (*Bidens pilosa L.*), poejo (*Mentha pulegium*), sálvia (*Sálvia officinalis*), urucum (*Bixa orellana L.*), uva-do-mato (*Cissus gonyoloides Burch*). As amostras foram adquiridas em farmácia de manipulação da cidade do Rio de Janeiro.

### 2.2 - Determinação do teor total de cobre, ferro e zinco

Foram utilizados cerca de 1 g de amostra seca sendo calcinada em mufla a 550°C por um período mínimo de 2 horas. O resíduo obtido foi dissolvido em HCl 2 mol/L e avolumado a 25 mL. O teor total nas amostras foi deter-

minado através da espectrometria de absorção atômica em chama. A determinação dos teores de cobre, ferro e zinco foi feita em triplicata.

### 2.3 - Extração sequencial

Foram utilizados cerca de 2 g de amostra dos pós e 1 g de amostra das ervas secas e cada amostra passou por processo de extração sequencial. Os extratores utilizados foram: solução de cloreto de cálcio 1,0M; solução de ácido acético 0,1 M com acetato de amônio 5% [pH=5,0]; solução de ácido acético 0,5 M e solução de HCl 0,5 M. Cada extrator esteve em contato com a amostra durante 1 hora, sendo depois filtrado e utilizado para determinação do teor total de cobre, ferro e zinco. O processo de extração foi feito em triplicata

### 2.4 - Tratamento estatístico

Os testes de Dixon, *t-student* e F foram aplicados [16].

### 2.5 - Garantia da qualidade

Na análise dos metais cobre, ferro e zinco por espectroscopia de absorção atômica, o aparelho foi sempre previamente calibrado com solução analítica do respectivo metal.

## 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

No cálculo das médias, foi utilizado o teste de Dixon para rejeição dos resultados, com o nível de significância de 90%. Não houve rejeição de nenhum dos valores, sendo a média obtida sempre considerando N=3. Na comparação entre os lotes das ervas analisadas, foi utilizado o teste F, verificando não haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os lotes. A Tabela 1 apresenta o teor total de cobre, ferro e zinco obtido.

Em média, as ervas medicinais apresentaram 1,37 mg% de cobre, 5,13 mg% de ferro e 2,96 mg% de zinco. ANDRADE *et al.*, analisando estes metais em diferentes grupos de ali-

**TABELA 1** – Teor (mg%) de cobre, ferro e zinco em ervas medicinais secas (utilizadas para elaboração de chás)

Amostras	Cobre	Ferro	Zinco
Alcachofra	1,10±0,15	7,78±0,23	2,60±0,15
Alcaçuz	1,23±0,05	4,43±0,69	1,37±0,12
Agoniada	0,58±0,06	4,18±0,56	2,42±0,16
Assa-peixe	1,98±0,15	6,81±0,05	4,95±0,19
Camomila	1,12±0,06	3,38±0,37	4,17±0,51
Cana-do-brejo	1,37±0,10	3,75±0,41	2,79±0,21
Capim-cidreira	1,22±0,02	5,36±0,76	1,63±0,19
Eucalipto	1,20±0,11	7,74±0,65	1,85±0,05
Guaco	1,75±0,21	6,82±0,20	3,48±0,37
Menta	1,51±0,11	5,41±0,27	2,82±0,06
Picão Preto	1,35±0,09	3,95±0,23	3,03±0,26
Poejo	1,36±0,13	5,97±0,70	3,67±0,59
Sálvia	1,26±0,06	6,06±0,31	4,12±0,45
Urucum	1,74±0,05	4,14±0,21	2,57±0,08
Uva-do-mato	0,95±0,02	3,46±0,33	1,69±0,58

mentos, observaram que uma boa fonte de cobre é o grupo de leguminosas apresentando em média 0,89 mg%; para o zinco, as leguminosas são consideradas boas fontes por apresentarem 3,2 mg% em média [2, 3, 4, 5, 6].

Segundo MARTÍNEZ *et al.*, as leguminosas são as que apresentam maiores teores de ferro, 5,3-8,5 mg%, quando comparadas com outras fontes de ferro de origem vegetal [8, 12, 19].

Comparando estatisticamente os valores médios obtidos dos metais cobre, ferro e zinco encontrados nas ervas analisadas com as consideradas fontes alimentares de origem vegetal para estes metais, pode-se caracterizar que estas ervas são boas fontes destes metais.

A Tabela 2 apresenta o teor de cobre extraído no processo de extração sequencial. A Figura 1 apresenta o teor recuperado por cada extrator e o teor total extraído das ervas analisadas. É possível observar que a maioria das amostras apresentou 100% de extração, o que caracteriza que estas ervas têm o cobre no mínimo sob 4 formas químicas. O perfil de extração também é similar para a maioria das amostras, onde o extrator  $\text{CaCl}_2$  1 M é o de maior eficiência seguido do extrator HCl 0,5 M. Considerando que estes extratores representam o início e o fim de um processo de extração sequencial que se caracteriza pela extração inicial de compostos fracamente ligados ao substrato, como sais, e compostos fortemente ligados ao substrato, como os complexos, é possível avaliar que a biodisponibilidade deste metal nas ervas analisadas é bem complexa. Isto porque se sabe que o cobre sob a forma de compostos iônicos é pouco aproveitado pelo organismo quando comparado à forma de complexos com aminoácidos e proteínas, pois tais complexos facilitam a absorção deste metal. ANDRADE *et al.* [5], aplicando a extração sequencial em hortaliças do tipo A e B, observaram

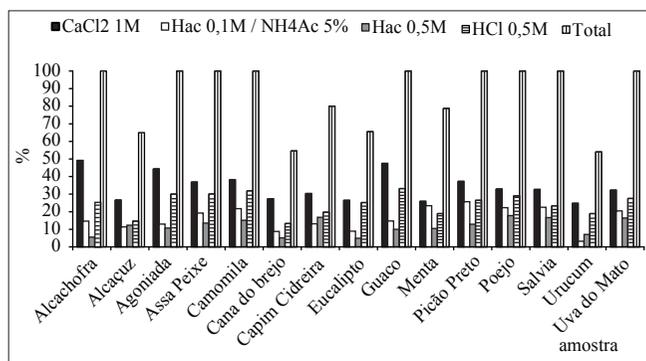


FIGURA 1 – Teor % de cobre recuperado durante a extração sequencial de ervas medicinais N=3

também que o extrator I foi o de maior eficiência, mas no caso destas amostras, o extrator HCl 0,5 M apresentou eficiência inferior à obtida nas ervas medicinais.

A Tabela 3 apresenta o teor de ferro extraído no processo de extração sequencial. A Figura 2 apresenta o teor recuperado por cada extrator e o teor total extraído das ervas analisadas.

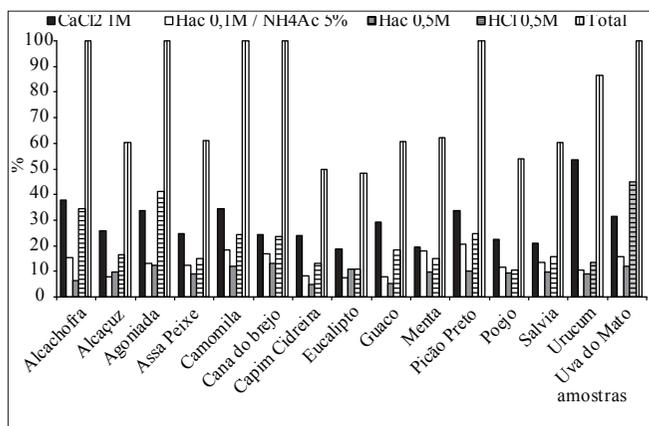
É possível observar que 6 amostras apresentaram 100% de extração, caracterizando a presença do ferro no mínimo em 4 espécies químicas distintas, pois cada extrator pode estar atuando em mais de uma espécie química. Nas demais, a eficiência da extração foi inferior a 60%, evidenciando a presença de ferro sob no mínimo 5 espécies químicas, as extraídas e a fração não extraída. O extrator  $\text{CaCl}_2$  1 M é o de melhor extração para a maioria das amostras. O extrator HCl 0,5 M apresenta eficiência similar ou superior ao extrator  $\text{CaCl}_2$  1 M para 4 das amostras estudadas. Ao contrário do cobre, não há similaridade no perfil da extração para a maioria das amostras.

TABELA 2 – Teor de cobre em mg% em extratos de ervas medicinais após aplicação da extração sequencial (N = 3)

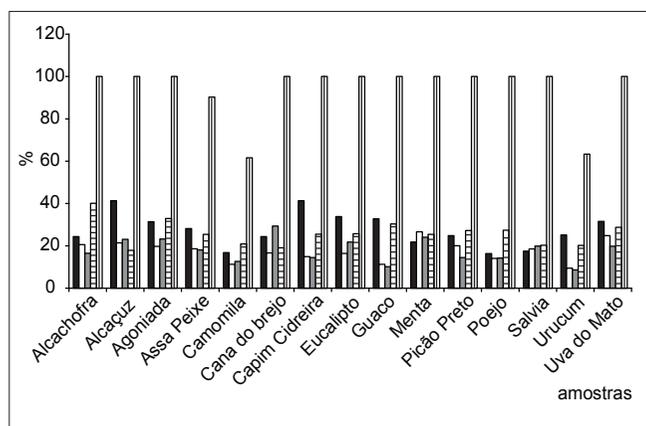
Amostras	Extratores			
	$\text{CaCl}_2$ 1 M	Hac 0,1 M / $\text{NH}_4\text{Ac}$ 5% pH = 5	Hac 0,5 M	HCl 0,5 M
Alcachofra	0,54±0,03	0,16±0,02	0,06±0,00	0,28±0,02
Alcaçuz	0,33±0,02	0,14±0,01	0,15±0,00	0,18±0,01
Agoniada	0,26±0,01	0,08±0,02	0,06±0,01	0,17±0,04
Assa-peixe	0,73±0,04	0,38±0,03	0,27±0,01	0,60±0,06
Camomila	0,43±0,01	0,24±0,02	0,17±0,00	0,36±0,02
Cana-do-brejo	0,37±0,05	0,12±0,01	0,07±0,02	0,18±0,04
Capim-cidreira	0,37±0,01	0,16±0,01	0,21±0,08	0,24±0,01
Eucalipto	0,32±0,02	0,11±0,03	0,06±0,02	0,30±0,00
Guaco	0,83±0,02	0,26±0,02	0,18±0,01	0,58±0,04
Menta	0,39±0,03	0,35±0,00	0,16±0,00	0,29±0,01
Picão Preto	0,50±0,00	0,35±0,01	0,17±0,01	0,36±0,02
Poejo	0,45±0,02	0,30±0,00	0,24±0,01	0,39±0,03
Sálvia	0,41±0,00	0,28±0,04	0,21±0,01	0,29±0,02
Urucum	0,43±0,05	0,06±0,01	0,12±0,01	0,33±0,06
Uva-do-mato	0,31±0,01	0,19±0,00	0,16±0,01	0,26±0,02

TABELA 3 – Teor de ferro em mg% em extratos de ervas medicinais após aplicação da extração sequencial (N=3)

Amostras	Extratores			
	$\text{CaCl}_2$ 1 M	Hac 0,1 M / $\text{NH}_4\text{Ac}$ 5% pH = 5	Hac 0,5 M	HCl 0,5 M
Alcachofra	2,95±0,12	1,19±0,06	0,48±0,02	2,69±0,36
Alcaçuz	1,15±0,10	0,36±0,02	0,43±0,07	0,73±0,06
Agoniada	1,41±0,07	0,55±0,05	0,52±0,13	1,73±0,30
Assa-peixe	1,68±0,15	0,83±0,10	0,62±0,05	1,03±0,09
Camomila	1,17±0,07	0,63±0,01	0,41±0,05	0,82±0,08
Cana-do-brejo	0,92±0,06	0,64±0,02	0,49±0,02	0,88±0,08
Capim-cidreira	1,28±0,04	0,44±0,03	0,25±0,02	0,70±0,06
Eucalipto	1,46±0,07	0,58±0,05	0,85±0,20	0,84±0,04
Guaco	2,00±0,07	0,54±0,06	0,37±0,03	1,25±0,11
Menta	1,05±0,14	0,96±0,00	0,52±0,10	0,82±0,06
Picão Preto	1,33±0,02	0,82±0,03	0,40±0,04	0,98±0,08
Poejo	1,34±0,01	0,70±0,01	0,56±0,04	0,62±0,05
Sálvia	1,28±0,06	0,82±0,08	0,60±0,01	0,96±0,11
Urucum	2,22±0,28	0,44±0,05	0,37±0,05	0,55±0,12
Uva-do-mato	1,09±0,01	0,55±0,00	0,41±0,04	1,55±0,16



**FIGURA 2** – Teor % de ferro recuperado durante a extração seqüencial de ervas medicinais N=3



**FIGURA 3** – Teor % de zinco recuperado durante a extração seqüencial de ervas medicinais N=3

A Tabela 4 apresenta o teor de zinco extraído no processo de extração seqüencial. A Figura 3 apresenta o teor recuperado por cada extrator e o teor total extraído das ervas analisadas

É possível observar que a maioria das amostras apresenta 100% de extração, o que caracteriza que o zinco se encontra em no mínimo 4 espécies químicas distintas. As ervas assa-peixe, camomila e urucum apresentam o zinco em no mínimo 5 espécies distintas, as que foram extraídas e a fração não extraída. Os extratores CaCl<sub>2</sub> 1 M e HCl 0,5 M apresentaram eficiência similar para a maioria das amostras, e o perfil de extração, como no caso do cobre, manteve-se similar para a maioria das amostras.

Interessante observar que, ao se comparar as extrações dos três metais para o zinco, os 4 extratores atuam de forma similar na maioria das amostras, sendo que para o cobre e o ferro, os extratores Hac 0,1 M/NH<sub>4</sub>Ac 5% e Hac 0,5 M são de baixa eficiência.

**TABELA 4** – Teor de zinco em mg% em extratos de ervas medicinais após aplicação da extração seqüencial (N=3)

Amostras	Extratores			
	CaCl <sub>2</sub> 1 M	Hac 0,1 M / NH <sub>4</sub> Ac 5% pH = 5	Hac 0,5 M	Hac 0,5 M
Alcaçuz	0,57±0,07	0,29±0,02	0,32±0,00	0,24±0,01
Agoniada	0,76±0,06	0,48±0,10	0,56±0,10	0,80±0,12
Assa-peixe	1,39±0,05	0,92±0,08	0,89±0,09	1,26±0,05
Camomila	0,70±0,01	0,47±0,02	0,53±0,04	0,87±0,09
Cana-do-brejo	0,68±0,04	0,46±0,03	0,82±0,05	0,53±0,05
Capim-cidreira	0,67±0,05	0,24±0,03	0,24±0,02	0,42±0,01
Eucalipto	0,63±0,03	0,30±0,03	0,40±0,00	0,48±0,01
Guaco	1,14±0,02	0,39±0,01	0,35±0,00	1,06±0,03
Menta	0,62±0,07	0,75±0,00	0,68±0,07	0,72±0,07
Picão Preto	0,75±0,01	0,61±0,02	0,44±0,07	0,82±0,03
Poejo	0,60±0,07	0,52±0,02	0,52±0,05	1,00±0,09
Sálvia	0,72±0,06	0,76±0,04	0,82±0,10	0,83±0,06
Urucum	0,65±0,06	0,24±0,03	0,22±0,03	0,52±0,10
Uva-do-mato	0,53±0,01	0,42±0,01	0,33±0,05	0,49±0,11

Os compostos iônicos deste metal não são absorvidos por processo de difusão passiva, devido ao tamanho da molécula ser superior aos poros da membrana celular. O transporte ativo que apresenta um “transportador” é o processo de absorção de maior eficiência. Sabendo que o extrator HCl 0,5 M caracteriza compostos orgânicos de maior complexidade quando comparado aos compostos extraídos pelo extrator CaCl<sub>2</sub> 1 M, compostos iônicos de fácil solubilidade em meio aquoso e salino, e que o transporte ativo é o de maior eficiência na absorção deste metal, acredita-se que a biodisponibilidade dos compostos extraídos pelo extrator HCl 0,5 M seja superior aos demais compostos extraídos pelos outros extratores. Técnicas de especiação química que identificam os compostos obtidos nos diferentes extratores podem auxiliar na avaliação da biodisponibilidade dos mesmos e, conseqüentemente, nos processos de absorção.

#### 4 - CONCLUSÕES

Os teores de cobre, ferro e zinco em ervas medicinais podem ser considerados adequados ao se comparar com outras fontes de alimentos de origem vegetal. Por tais teores, estas ervas medicinais podem ser consideradas como fontes de suplementação destes metais, caso possam ser utilizadas em quantidades superiores a 25g em uma preparação, atingindo em média 10% da RDA para cobre e ferro e cerca de 7,5% de zinco. Isto se torna interessante como um auxiliar na suplementação destes metais, substituindo a suplementação medicamentosa. O teor total dos metais não pode ser considerado como a fração biodisponível, devido às particularidades nos processos de absorção. Técnicas de especiação química que identifiquem os compostos extraídos pelo método da extração seqüencial que caracterizou que os metais cobre, ferro e zinco se encontram nas ervas analisadas sob no mínimo 4 espécies químicas diferentes podem auxiliar na elucidação da biodisponibilidade destes metais e estimular o uso destas ervas como ingredientes de preparados alimentícios.

## 5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALVES, T.M. *et al.*, Biological screening of Brazilian medicinal plants, **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 95, 3, p. 367-73, 2000.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] ANDRADE, E.C.B.; TEODORO, A.J.; TAKASE, I. Determinação dos teores de cobre em diferentes extratos de hortaliças do tipo A e B. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 159-310, abr-jun. 2004.
- [6] ANDRADE, E.C.B.; BARROS, A.M.; MAGALHÃES, A.C.P.; CASTRO, L.L.S.; TAKASE, I. Comparação dos teores de cobre e zinco em leguminosas cruas e após processamento térmico em meio salino e aquoso, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 3, p. 316-318, 2004.
- [7] CORREA, M.P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984.
- [8] COUTINHO, R. **Noções de Fisiologia da Nutrição**, 2ª ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1981.
- [9] COZZOLINO, S.M.F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. Barueri, SP, Manole, 2005.
- [10] OLIVEIRA, J.F.D. *et al.* **Ciências Nutricionais**, São Paulo: Sarvier, 1998.
- [11] FAIRWEATHER-TAIT, S.J. Bioavailability of dietary minerals. **Biochemical Transactions Colchester**, v. 24, 3, p. 775-780, 1996.
- [12] FRANCO, G. **Tabela de Composição de Alimentos**. 9ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, p. 239-241, 268-269, 1999.
- [13] 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.
- [14] 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, 6-7, 2002.
- [15] 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, 4, p. 541-8, 2002.
- [16] LEHNINGER, A.L. *et al.* **Princípios de Bioquímica**, 2ª ed. São Paulo: Sarvier, 1998.
- [17] LOON, J.C.V & BAREFOOT, R.R. **Overview of Analytical Methods for Elemental Speciation - Speciation in Environmental and Biological Sciences**, 15-22, 1991.
- [18] MAHAN L.K. *et al.* Krause: **Alimentos, Nutrição & Dietoterapia**. São Paulo: Editora Roca, 1998.
- [19] MARTINEZ, C.; ROS, G.; PERIAGO, M.; LÓPEZ, G. Biodisponibilidad del Hierro de los Alimentos. **Archivos Latino-Americanos de Nutrição**, 49 (2), p. 106-113, 1999.
- [20] MILLER, J.; MILLER, J. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**, 4<sup>th</sup> ed. Inglaterra, Prentice Hall, 2001.
- [21] QIAN, J.; WANG, Z.; SHAN, X.; TU, Q.; WEN, B.; CHEN, B. Evaluation of plant availability of soil trace metals by chemical fractionation of multiple regression analysis. **Environmental Pollution**, v. 91, 3, p. 309-315, 1996.
- [22] 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, 3, p. 301-308, 1999.
- [23] SANDSTORM, B. Micronutrient interactions: effects on absorption and bioavailability. **The British Journal of Nutrition**, May, 85 Suppl. 2:S181-5, 2001.
- [24] SANZ-MEDEL, A. Trace element analytical speciation in biological systems: importance, challenges and trends. **Spectrochimica Acta Part B**, n. 53, p. 197-211, 1998.
- [25] 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, 36, 2002.
- [26] 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.