

DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE ZINCO EM DIFERENTES EXTRATOS DE HORTALIÇAS DOS TIPOS A E B¹

Édira Castello Branco de ANDRADE^{2,*}; Anderson Junger TEODORO²; Iracema TAKASE³

RESUMO

O zinco é um elemento traço essencial às diversas funções bioquímicas do organismo humano. As interações físico-químicas entre nutrientes incluem: adsorção, formação de complexos e precipitação, influenciando na biodisponibilidade. 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 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. Para a especiação em amostras sólidas, inicialmente deve ser aplicado um método de extração seqüencial ou seletivo. Amostras de hortaliças dos tipos A e B foram analisadas quanto ao teor total de zinco através de espectroscopia de absorção atômica em chama, e o método de extração seqüencial foi aplicado com os seguintes extratores: solução de CaCl₂ 1M; 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. Em 8 amostras a extração do zinco foi considerada total, 6 amostras apresentaram extração superior a 75%, 5 amostras extração de 50%, amostra de quiabo teve 27% do total de zinco extraído e amostra de beterraba apenas 3%. Observa-se que para a maioria das amostras, o zinco se encontra sob a forma de no mínimo 6 espécies químicas distintas. Estudos posteriores, que permitam a identificação destas espécies, favorecerá a avaliação da biodisponibilidade deste metal.

Palavras-chave: zinco; extração seqüencial; biodisponibilidade.

SUMMARY

DETERMINATION OF ZINC IN DIFFERENT EXTRACTS IN SAMPLES OF A AND B VEGETABLES. Zinc which is an essential microelement or a trace-element, part in essential humans functions. Physicochemical interactions among nutrients include: adsorption, complex synthesis and precipitation which consequently have an influence in the bioavailability. It isn't possible to measure how much of the metal is absorbed, even if one knows its total intake. However, through metal's speciation technique, which is defined as the determination of the concentration of different physicochemical forms of the elements that together represent the total amount of this in the sample, we can have new data to foresee metal's absorption. Solid samples require a selective or sequential extraction method to assess metals' speciation. In that way, total contents of zinc were analysed in samples of A and B vegetables through atomic flame the absorption spectroscopy and sequential extraction made by the following extractors: CaCl₂ 1M solution; Acetic acid 0.1M solution; Acetic acid solution 0.5M/Ammonium acetate 5% [pH=5.0]; NaOH 0.1M solution and HCl 0.5M solution. Grubbs test was used to reject results. For 8 samples, the amount of zinc extracted was complete, 6 samples showed at least 75%, 5 samples extracted 50%, a sample of okra extracted 27% and a sample of beet only 3%. For the majority of samples, zinc was found in at least six different chemical species. Future studies which may identify these species will surely help to evaluate the bioavailability of this metal.

Keywords: zinc; 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) [8, 21].

Dentre os vários minerais existentes, destaca-se o zinco, classificado como microelemento essencial ou ele-

mento-traço e que exerce funções essenciais ao organismo [21].

O zinco é um microelemento de número atômico 30 e peso atômico de 65,37, está presente em enzimas, participa do processo de mobilização hepática da vitamina A e atua no crescimento e maturação sexual, funções imunológicas, dentre outras [8, 21].

O zinco só é absorvido passivamente, no duodeno e jejuno no teor de 10 a 40% da ingestão oral. Após liberar-se dos alimentos, forma complexos com ligantes endógenos e exógenos, como a histidina, ácido cítrico e ácido picolínico; passando para a corrente sangüínea por transporte ativo e combina-se com albumina e aminoácidos no teor de 55% e com macroglobulinas no teor de 40%, não se destinando a uso metabólico [8, 21].

Sua excreção é feita via urinária e é armazenado principalmente no fígado. Sua deficiência provoca retardo no crescimento, falta de apetite, lesões cutâneas e alterações de comportamento, enquanto que sua toxicidade

¹ Recebido para publicação em 11/07/2003. Aceito para publicação em 04/05/2005 (001165).

² Departamento de Tecnologia dos Alimentos, Escola de Nutrição, UNIRIO, UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO RIO DE JANEIRO, End.: Rua Xavier Sigaud nº 290, prédio II, 3º andar, Urca, Rio de Janeiro, CEP: 22290-180, E-mail: edigerah@aol.com

³ Departamento de Química Analítica, UFRJ.
A quem a correspondência deve ser enviada.

provoca náusea, vômitos, cefaléia e deficiência de cobre [8,21].

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 [6, 7, 16].

Com relação ao zinco, sabe-se que o ferro, cálcio e cádmio diminuem significativamente sua absorção, enquanto que sua interação com a vitamina A possui efeito positivo [5, 6, 8, 21].

Segundo GALLARDO-LARA et al. [9] e VULKAN et al. [20] a forma química dos elementos traço mais disponível é a forma de compostos orgânicos.

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 dos metais, que é definida como a determinação da concentração das formas físico-químicas individuais dos elementos que, em conjunto constitua a concentração total do mesmo na amostra, podemos ter novos dados para prever sua absorção [9, 15, 20].

Para a especiação em amostras sólidas, inicialmente deve ser aplicado um método de extração seqüencial ou seletivo. A maioria dos esquemas de extração seqüencial inclui diferentes grupos de extratores, já que esta se baseia na progressão de extratores fracos, como a água, até um extrator forte, como um ácido concentrado [9, 11, 15, 20].

Os primeiros extratores da extração seqüencial, geralmente são aqueles com propriedades de troca iônica. Em seguida, são utilizados extratores com propriedades de dissolução de carbonatos. Os extratores com propriedades de redução ácida continuam o processo de extração. Por fim, dois últimos extratores são utilizados: primeiro aqueles que enfraquecem a ligação do metal com compostos orgânicos e sulfetos; posteriormente os que promovem a dissolução dos silicatos e minerais [10, 11, 14, 15, 17, 18, 19, 20].

Este trabalho tem como objetivo promover a extração seqüencial de zinco em hortaliças dos tipos A e B.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Material

2.1.1 - Amostras

As amostras analisadas foram: hortaliças do tipo A - abobrinha verde (*Cucurbita peto*), agrião (*Nasturtium officinalis*), bertalha (*Basella rubra*), brócolo (*Brassica oleracea* var. itálica) chicória (*Chicorium endivia*), espinafre (*Spinacea oleracea*) e tomate (*Lycopersicon esculentum*); hortaliças do tipo B abóbora (*Cucurbita moschata*), abóbora-moranga (*Cucurbita maxima*),

beterraba (*Beta vulgaris*), cebola (*Allium cepa*), cenoura (*Daucus carota*), couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*), couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), ervilha (*Pisum sativum*), jiló (*Solanum gilo*), nabo (*Raphanus sativa*), pimentão (*Capsicum annum*), quiabo (*Hibiscus esculentus*), repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*) e vagem (*Phaseolus vulgaris*). As amostras foram adquiridas em mercado e foram utilizadas todas as partes comestíveis das mesmas no processo de homogeneização. As amostras não passaram por processamento tendo sido analisadas *in natura*.

2.2 - Métodos

2.2.1 - 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 2molL⁻¹ e transferidas quantitativamente para balão volumétrico de 25mL [13].

2.2.2 - 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 CaCl₂ 1M; 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. Foram utilizados de cada extrator, 20mL que ficou em contato com a amostra durante 1 hora, sendo depois filtrado, e este utilizado para determinação do teor total de zinco.

2.2.3 - Determinação do teor total de zinco

O teor total de zinco nas amostras foi determinado através da espectroscopia de absorção atômica em chama [13].

2.2.4 - Tratamento estatístico

Na análise da rejeição de resultados foi aplicado o teste de Grubs [12].

O processo de extração seqüencial, o teor de umidade e a determinação dos teores totais de zinco foram feitos em triplicata. O aparelho de absorção atômica foi sempre previamente calibrado com solução analítica do respectivo metal.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 encontram-se os teores de umidade e de zinco total. Em média, as hortaliças do tipo A apresentaram 0,36mg% de zinco e as hortaliças do tipo B 0,29mg%. Comparando esses valores com os obtidos por ANDRADE et al. [1, 2, 3, 4], constata-se que em relação ao zinco, as hortaliças A e B possuem um teor total médio

TABELA 1 - Teores % de umidade e teor total de zinco mg% em hortaliças dos tipos A e B

Alimentos	Umidade %	Zinco mg%
Abóbora	86,67 ± 1,15	0,10 ± 0,01
Abóbora-Moranga	89,33 ± 1,15	0,13 ± 0,01
Abobrinha verde	95,33 ± 1,15	0,12 ± 0,01
Agrião	90,67 ± 1,15	0,52 ± 0,11
Bertalha	90,00 ± 0,00	0,49 ± 0,02
Beterraba	90,00 ± 0,00	0,29 ± 0,06
Brócolo	88,66 ± 1,15	0,61 ± 0,08
Cebola	89,33 ± 1,15	0,32 ± 0,08
Cenoura	89,33 ± 1,15	0,27 ± 0,04
Couve	86,67 ± 1,15	0,47 ± 0,00
Couve flor	90,00 ± 0,00	0,44 ± 0,06
Chicória	96,98 ± 1,15	0,13 ± 0,02
Ervilha	88,00 ± 12,0	0,43 ± 0,02
Espinafre	94,67 ± 1,15	0,44 ± 0,01
Jiló	92,00 ± 0,00	0,15 ± 0,01
Nabo	92,00 ± 0,00	0,29 ± 0,02
Pimentão	94,00 ± 0,00	0,26 ± 0,00
Quiabo	90,67 ± 1,15	0,44 ± 0,04
Repolho	92,67 ± 1,15	0,19 ± 0,01
Tomate	94,00 ± 1,15	0,18 ± 0,03
Vagem	92,67 ± 1,15	0,31 ± 0,02

menor do que cereais e leguminosas 1,55mg% e 3,65mg%, respectivamente. Os teores de zinco nas hortaliças A e B são superiores aos encontrados nas frutas, 0,18mg% e similares aos valores médios encontrados nas hortaliças do tipo C 0,33mg%.

A Tabela 2 apresenta os teores de zinco extraídos pelo método de extração seqüencial. A fração I correspondente ao extrator I está relacionada aos compostos com propriedades de troca iônica, deslocando sítios iônicos específicos, representando compostos facilmente solúveis [15, 17, 20]. Observa-se que a maioria das amostras apresenta extração superior a 15%, com este extrator. Em média, para as hortaliças do tipo A, 19% do teor total de zinco foram extraídos nesta primeira etapa da extra-

TABELA 2 - Teores de zinco em mcg/g nos extratos de hortaliças do tipo A e B

Amostras	Extratores				
	I	II	III	IV	V
Abóbora	0,40 ± 0,02	0,16 ± 0,06	0,16 ± 0,03	0,09 ± 0,01	0,18 ± 0,01
Abóbora-Moranga	0,21 ± 0,00	0,20 ± 0,00	0,23 ± 0,10	0,12 ± 0,04	0,21 ± 0,01
Abobrinha verde	0,51 ± 0,02	0,19 ± 0,01	0,15 ± 0,03	0,25 ± 0,05	0,25 ± 0,01
Agrião	0,94 ± 0,01	0,74 ± 0,12	1,10 ± 0,30	0,61 ± 0,04	0,84 ± 0,01
Bertalha	1,00 ± 0,10	1,10 ± 0,20	1,20 ± 0,30	0,65 ± 0,16	0,92 ± 0,01
Beterraba	0,24 ± 0,02	0,16 ± 0,01	0,15 ± 0,07	0,21 ± 0,02	0,07 ± 0,01
Brócolo	1,20 ± 0,01	0,67 ± 0,01	1,00 ± 0,01	0,55 ± 0,09	0,82 ± 0,01
Cebola	0,30 ± 0,02	0,23 ± 0,04	0,37 ± 0,14	0,31 ± 0,03	0,35 ± 0,01
Cenoura	0,63 ± 0,09	0,62 ± 0,06	0,42 ± 0,05	0,25 ± 0,02	0,33 ± 0,01
Chicória	0,31 ± 0,09	0,17 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,13 ± 0,04	0,14 ± 0,01
Couve	1,10 ± 0,10	1,20 ± 0,30	0,99 ± 0,20	0,72 ± 0,12	0,61 ± 0,01
Couve-flor	1,20 ± 0,20	0,72 ± 0,06	0,79 ± 0,22	0,58 ± 0,17	1,30 ± 0,01
Ervilha	0,64 ± 0,05	0,88 ± 0,05	0,82 ± 0,00	0,53 ± 0,14	0,65 ± 0,01
Espinafre	0,58 ± 0,20	0,46 ± 0,07	0,54 ± 0,17	0,28 ± 0,06	0,48 ± 0,01
Jiló	0,44 ± 0,03	0,26 ± 0,01	0,28 ± 0,06	0,17 ± 0,00	0,34 ± 0,01
Nabo	0,49 ± 0,03	0,20 ± 0,01	0,37 ± 0,07	0,16 ± 0,06	0,28 ± 0,01
Pimentão	0,46 ± 0,01	0,29 ± 0,05	0,26 ± 0,08	0,17 ± 0,07	0,17 ± 0,01
Quiabo	0,20 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,30 ± 0,04	0,17 ± 0,02	0,34 ± 0,01
Repolho	0,50 ± 0,01	0,26 ± 0,06	0,27 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,21 ± 0,01
Tomate	0,32 ± 0,02	0,30 ± 0,06	0,27 ± 0,06	0,21 ± 0,06	0,20 ± 0,01
Vagem	0,31 ± 0,03	0,33 ± 0,02	0,50 ± 0,16	0,39 ± 0,04	0,14 ± 0,01

LEGENDA:

Extrator 1 - Solução de cloreto de cálcio - 1M pH 7;
 Extrator 2 - Solução ácido acético - 0,1M com acetato de amônio - 5% pH 5,0;
 Extrator 3 - Solução de ácido acético - 1M; Extrator 4 - Solução hidróxido de sódio - 0,1M;
 Extrator 5 - Solução de ácido clorídrico - 0,5M

ção seqüencial e para as hortaliças do tipo B, 22%.

Com o uso do extrator II, que possui propriedades de redução ácida promovendo dissolução dos oxihidratos de ferro e manganês [10, 14], 11 amostras apresentaram extração superior a 15%, sendo no máximo de 25%, para a couve. Amostras de beterraba, cebola, nabo e quiabo apresentaram extração inferior a 10%. Os dois tipos de hortaliças analisados apresentaram em média 14% do teor total de zinco extraído nesta segunda etapa da extração seqüencial.

Com relação ao extrator III, a fração extraída corresponde a fração carbonatada que sofre alta variação de pH [10, 14]. Treze amostras analisadas apresentaram extração superior a 15% com este extrator, tendo sido extraído no máximo 21% do teor total de zinco. As amostras de beterraba e quiabo apresentaram extração inferior a 10%. A hortaliças do tipo A apresentaram em média extração de 17% nesta etapa, já as do tipo B 14%.

Com o extrator IV que enfraquece ligações do metal com compostos orgânicos [10, 14], apenas 2 amostras apresentaram extração superior a 15%. Amostras de abóbora, abóbora-moranga, beterraba, brócolo, cebola, cenoura, chicória, espinafre, nabo, pimentão e quiabo, tiveram no máximo 10% do conteúdo total extraído. As hortaliças do tipo A, nesta etapa de extração, apresentaram em média 12% de extração, as do tipo B 10%.

Com o uso do extrator V que também atua enfraquecendo as ligações metal compostos orgânicos, 7 amostras apresentaram extração superior a 15%. As amostras de beterraba, pimentão, quiabo e vagem não tiveram extração superior a 8% do conteúdo total de zinco. As hortaliças A apresentaram cerca de 14% de extração e as do tipo B 13% nesta etapa.

As Figuras 1 e 2 apresentam os teores percentuais extraídos de zinco para cada extrator das hortaliças dos tipos A e B, respectivamente.

É possível observar, através da Figura 1 que, o extrator de maior eficiência é o extrator I, para a maioria das amostras, e o extrator III de menor eficiência. Não há um padrão de perfil de extração para as hortaliças do tipo A, e mesmo havendo a extração com todos os extratores aplicados, para a maioria das amostras cerca de 25% do metal não foi extraído. Ainda é possível observar que o zinco se encontra no mínimo sob a forma de cinco espécies químicas distintas.

Observa-se pela Figura 2 que, o extrator I é o de maior eficiência para a maioria das amostras. Como para as hortaliças do tipo A, não há um perfil de extração comum às hortaliças do tipo B. Para estas amostras também o zinco se encontra no mínimo sob a forma de cinco espécies químicas distintas.

Com os resultados apresentados, pode-se acreditar que para avaliar a biodisponibilidade deste metal nas amostras analisadas, é interessante identificar as espécies dos mesmos, extraídas pelos diferentes extratores.

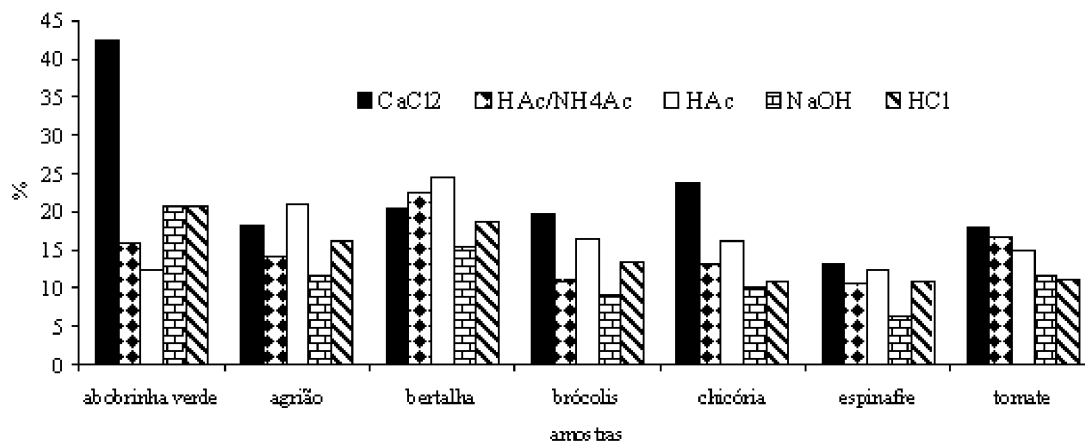


FIGURA 1 - Teores % de zinco extraído seqüencialmente de hortaliças do tipo A

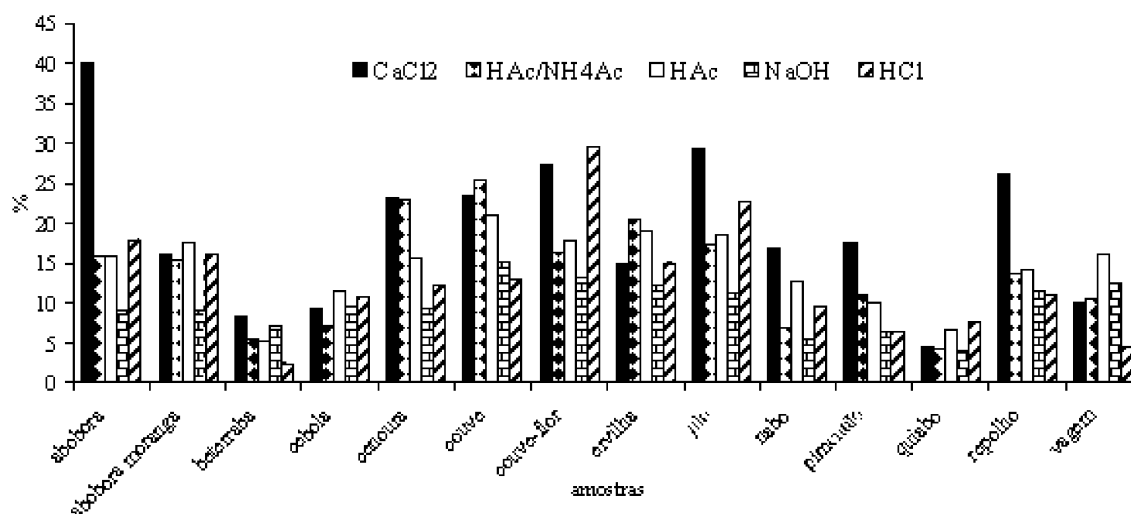


FIGURA 2 - Teores % de zinco extraído seqüencialmente de hortaliças do tipo B

Segundo VULKAN et al. [20], a forma iônica representada principalmente pela fração extraída com o extrator I, é uma das formas menos disponível e a forma orgânica do metal, sob a forma de complexos é a de melhor aproveitamento pelo organismo, representada pela fração V. Para a maioria das amostras analisadas, a fração I corresponde no mínimo 20% do teor total e a fração V 15%. Acredita-se que apenas analisar o teor total do zinco em alimentos não é possível para avaliar o teor absorvido deste metal pelo organismo. Como é comum, considerar a substituição dos alimentos pelos seus grupos, como as hortaliças, no caso do zinco, pode não ser o ideal, pois observa-se que o fornecimento de 100g de agrião ou bertaIha, por exemplo, apesar de fornecerem um teor total do zinco em torno de 0,50mg%, as espécies do metal são distintas, apresentando diferentes perfis de extra-

ção, o que certamente irá influenciar na biodisponibilidade.

Considerando que a fração I representa os compostos facilmente solúveis, possivelmente as hortaliças que passarem por processos de cocção em meio aquoso e principalmente em meio salino irão perder parte do zinco para a água de cocção, diminuindo o teor do metal a ser aproveitado pelo organismo.

A Figura 3 mostra o teor percentual total extraído do zinco nas amostras analisadas. Os dados foram tratados estatisticamente e as amostras de abóbora, abobrinha verde, bertaIha, couve, couve-flor e jiló foram as que apresentaram 100% do zinco extraído. Para estas amostras o zinco se encontra sob no mínimo 5 formas químicas distintas. Para as outras amostras este metal se encontra

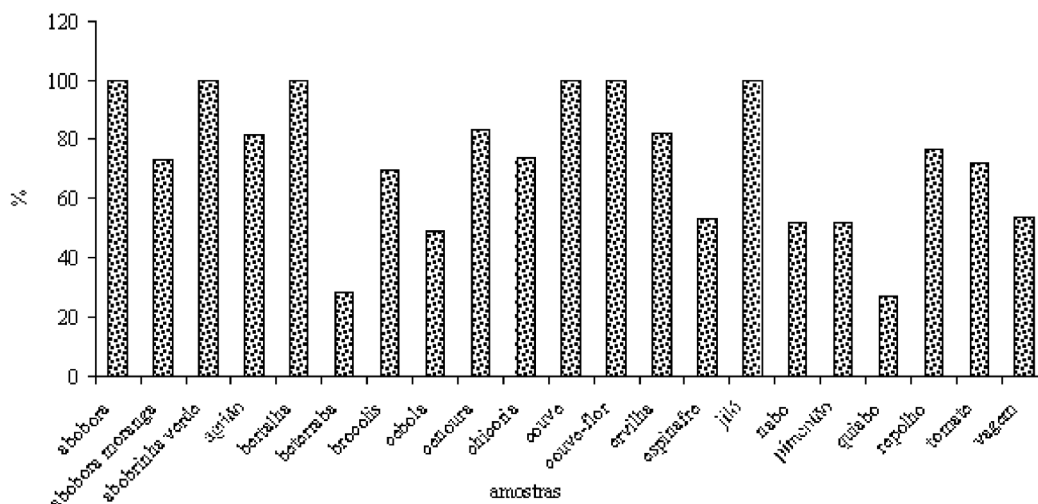


FIGURA 3 - Teor % de zinco extraído de hortaliças dos tipos A e B

sob no mínimo 6 formas químicas distintas. O estudo identificando as espécies químicas extraídas pelos diferentes extratores estudados pode auxiliar na avaliação da biodisponibilidade deste metal.

4 - CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados, observa-se que para a maioria das amostras, o zinco se encontra sob a forma de no mínimo 6 espécies químicas distintas, a extraída por cada um dos extratores I,II,III,IV e V e a fração não extraída. Observa-se ainda que este metal pode ser perdido durante o processo de cocção em meio aquoso e salino por provavelmente favorecer a extração dos compostos representados pela fração I.

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 85-89123-01-4, 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, 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] BARCELOUX,D.G.,Copper. **Journal of Toxicology Clinical Toxicology**, v. 37, n. 2, p. 217-30, 1999.
- [6] COZZOLINO, SILVIA M. F. Biodisponibilidade de Minerais. **Revista Nutrição**. Campinas, p. 87-98, jul-dez 1997.
- [7] FAIRWEATHER-TAIT,S.J., **Bioavailability of dietary minerals**. Biochemical Society Transactions Colchester, v.24, n.3, p.775-780, 1996.
- [8] FRANCO, GUILHERME. **Tabela de Composição de Alimentos**. 9a ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1999.
- [9] GALLARDO-LARA, F., AZCON, M., QUESADA, J.L., POLO, A. Phytoavaibility and Extractability of Copper and Zinc in Calcareous Soil Amended with Composted Urban Wastes. **Journal of Environmental Science and Health**, Bv. 34, p.1049-1064, 1999.
- [10] 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.
- [11] 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 Environmtal Monitoring**, aug, v. 4, n. 4, p.541-8, 2002.
- [12] MILLER, J. ; MILLER, J. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**, 4th ed., Inglaterra, Prentice Hall, 2001.
- [13] OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS, **Association of official analytical Chemists**, 40th ed, USA, 1984
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] SANDSTORM, B. Micronutrient interactions: effects on absorption and bioavailability. **The British Journal of Nutrition**, May, 85 Suppl 2:S181-5, 2001
- [17] 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 1, n. 36, 2002.
- [18] 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 18, n. 263, p.11-22, 2000.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] WAITZBERG, D. L. **Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica**. 3ed São Paulo: Editora Atheneu, p.131-134, 2002.