

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

GISLENE SANTOS SILVA CARNEIRO

**Determinação de microelementos e elementos traço em folhas de
amora (*Morus nigra* L.) comercializadas na Bahia empregando MIP
OES e Redes Neurais de Kohonen**

JEQUIÉ - BA

NOVEMBRO/ 2023

GISLENE SANTOS SILVA CARNEIRO

**Determinação de microelementos e elementos traço em folhas de
amora (*Morus nigra* L.) comercializadas na Bahia empregando MIP
OES e Redes Neurais de Kohonen**

Dissertação (em formato de artigo)
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Química da Universidade
Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte
dos requisitos para a obtenção do título de
Mestra em Química.

Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Erik Galvão Paranhos
da Silva (UESC)

Coorientadora: Prof. Dr. Luciana Bagdeve
de Oliveira dos Santos (UEFS)

JEQUIÉ-BA

NOVEMBRO/2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me abençoar com mais essa conquista.

Aos meus pais, Eledi e Gileno, e meus irmãos, Juliana e Lenno, por todo incentivo, apoio e orações. Vocês são a minha fortaleza!

Ao meu esposo, Matheus, pelo companheirismo, dedicação, compreensão, incentivo e, principalmente, apoio para que eu chegasse até aqui. Te amo!

Aos meus colegas de turma, que sempre estiveram solícitos.

A minha grande amiga e companheira de jornada, Naiara, que tornou esse processo muito mais leve e feliz. Você é luz, amiga!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Erik Galvão Paranhos da Silva, por todos os ensinamentos, compreensão, paciência e confiança. Muito obrigada!

A minha coorientadora, Profa. Dra. Luciana Bagdeve, por todo o suporte, dedicação, conselhos, ensinamentos e amizade. Você foi essencial, Lu!

Ao Prof. Dr. Allison Gonçalves Silva, do Laboratório de Análises Ambientais do Extremo Sul da Bahia do Instituto Federal da Bahia, por todo suporte, colaboração, receptividade, disponibilidade e ensinamentos sobre o MIP OES. Você é 1000!

Ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (PGQUI/UESB), em especial a Leiliane, sempre solícita e gentil, e aos docentes, por todos os ensinamentos e vivências compartilhadas.

Aos professores da Pós-graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual de Bahia, Prof. Dr. Anibal de Freitas Santos Júnior e Prof. Dr. Walter Nei Lopes dos Santos, e aos discentes Williane, João e Eliabe, pela recepção, suporte e apoio na realização das minhas análises. Muito obrigada!

LISTA DE TABELAS

Pág.

Tabela 1. Procedimentos de digestão em amostras foliares para análises espectroanalíticas.....5

Tabela2. Cidades de aquisição das amostras e informações adicionais.....6

Tabela 3. Determinação de metais em folhas de maçã (material de referência certificado NIST 1515) por MIP OES após digestão ácida assistida por micro-ondas (média±desvio padrão, n=3, intervalo de confiança de 95%).....8

Tabela 4. Limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) em mg.kg⁻¹ para Al, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni e Pb determinados em folhas de amora por MIP OES após digestão assistida por micro-ondas.....9

Tabela 5. Concentração dos microelementos em mg.kg⁻¹ nas amostras de folhas de amora comercializadas em cidades baianas (média±desvio padrão, n=3, intervalo de confiança de 95%).....9

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CRM – Material de referência certificado, do inglês *Certified reference material*

CV - Coeficiente de variação

ETAAS - espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmico, do inglês *Electrothermal atomic absorption spectrometry*

FAAS – Espectrometria de absorção atômica com chama, do inglês *Flame atomic absorption spectrometry*

GFAAS – Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, do inglês *Graphite furnace atomic absorption spectrometry*

ICP MS- Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado

ICP OES – Espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado

LOD - Limite de Detecção, do inglês *limit of detection*

LOQ - Limite de Quantificação, do inglês *limit of quantification*

MIP OES - Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas, do inglês *Microwave-induced plasma optical emission spectrometry*

MTC – Medicina tradicional e complementar

MW – Digestão ácida assistida por micro-ondas, do inglês *Microwave-assisted digestion*

NIST – Instituto Nacional de Padrões e Tecnologias, do inglês *National Institute of Standards and Technology*

RNA – Redes neurais artificiais

SOM - Mapa auto-organizável, do inglês *self-organizable map*

SUS – Sistema Único de Saúde

Determinação de microelementos e elementos traço em folhas de amora (*Morus nigra* L.) comercializadas na Bahia empregando MIP OES e Redes Neurais de Kohonen

Autora: Gislene Santos Silva Carneiro

Orientador: Prof. Dr. Erik Galvão Paranhos da Silva

Coorientadora: Prof. Dr. Luciana Bagdeve de Oliveira dos Santos

RESUMO: No Brasil, cerca de 82% da população recorrem as plantas medicinais na prevenção e/ou tratamento de doenças. O objetivo desse estudo foi determinar os microelementos (Al, Ba, Cr, Cu e Mn) em amostras de folhas de amora da espécie *Morus nigra* L. comercializadas na Bahia utilizando a espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES) após digestão assistida por micro-ondas. O mapa auto-organizável de Kohonen foi utilizado para a análise exploratória. A exatidão foi avaliada a partir do CRM de folhas de maçã (NIST 1515), com valores de recuperação na faixa de 93% a 110%. Valores de coeficiente de variação abaixo de 10% foram obtidos, confirmando a precisão do método. As concentrações dos metais nas amostras (mínimo-máximo em mg kg⁻¹) foram: Al (95-1103), Ba (17-485), Cr (1,64-3,31), Cu (3,30-6,62) e Mn (42-988). O mapa auto-organizável de Kohonen mostrou que as amostras foram divididas em cinco grupos. O MIP OES mostrou-se um método simples, sensível, rápido e confiável para a análise multielementar em amostras de folhas de amora.

Palavras-chave: planta medicinal, análise multielementar, análise exploratória, MIP OES.

Determination of microelements and trace elements in blackberry leaves (*Morus nigra* L.) sold in Bahia using MIP OES and Kohonen Neural Networks

Autora: Gislene Santos Silva Carneiro

Orientador: Prof. Dr. Erik Galvão Paranhos da Silva

Coorientadora: Prof. Dr. Luciana Bagdeve de Oliveira dos Santos

ABSTRACT: In Brazil, around 82% of the population uses medicinal plants to prevent and/or treat diseases. The objective of this study was to determine the microelements (Al, Ba, Cr, Cu and Mn) in samples of blackberry leaves of the species *Morus nigra* L. sold in Bahia using microwave-induced plasma optical emission spectrometry (MIP OES). after microwave-assisted digestion. Kohonen's self-organizing map was used for exploratory analysis. The exam was evaluated using apple leaf CRM (NIST 1515), with recovery values ranging from 93% to 110%. Coefficient of variation values below 10% were obtained, confirming the precision of the method. The concentrations of metals in the samples (minimum-maximum in mg kg⁻¹) were: Al (95-1103), Ba (17-485), Cr (1.64-3.31), Cu (3.30-6). .62) and Mn (42-988). Kohonen's self-organizing map showed that the samples were divided into five groups. MIP OES proved to be a simple, sensitive, fast and reliable method for multi-element analysis of blackberry leaf samples.

Keywords: medicinal plant, multi-element analysis, exploratory analysis, MIP OES.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	PARTE EXPERIMENTAL	5
2.1	Instrumentação.....	5
2.2	Reagentes e soluções.....	5
2.3.	Coleta das amostras.....	6
2.4	Preparo das amostras	6
2.5	Acidez residual	7
2.6	Validação do método	7
2.7	Análise multivariada.....	7
3.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	8
3.1	Desempenho analítico	8
3.2	Determinação de microelementos em folhas de amora	9
3.3	Análise Multivariada	11
4.	CONCLUSÕES.....	13
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15

APRESENTAÇÃO

O trabalho de dissertação foi desenvolvido no Laboratório de Química Analítica e Laboratório de Farmácia da Universidade Estadual da Bahia, *Campus* de Salvador. As análises utilizando a técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES) foram realizadas no Laboratório de Análises Ambientais do Extremo Sul da Bahia, em parceria com Prof. Dr. Allison Gonçalves Silva (IFBA) e no Laboratório de Farmácia da Universidade Estadual da Bahia, em parceria com o Prof. Dr. Anibal de Freitas Santos Júnior. Este trabalho foi escrito seguindo o formato de Publicação, conforme as orientações constantes no Manual para Elaboração de Dissertações do Programa de Pós-Graduação em Química (PGQUI-UESB). A escrita da dissertação seguiu as instruções do periódico *Journal of Food Composition and Analysis*, para submissão após as alterações sugeridas pela banca examinadora. O Periódico é enquadrado como estrato A2 na CAPES e Fator de Impacto de 4,30 (JCR 2022).

Link para acesso ao Manual de dissertações do PGQUI:
<http://www2.uesb.br/ppg/ppgquimica/wp-content/uploads/2018/09/Manual-paraelabora%C3%A7%C3%A3o-de-disserta%C3%A7%C3%A3o-Vers%C3%A3o-Final-01.04.pdf>

1. INTRODUÇÃO

A medicina tradicional e complementar (MTC) desempenha um papel fundamental na promoção à saúde e prevenção de doenças, sendo utilizada por cerca de 80% da população mundial de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) [1].

No Brasil, a PORTARIA N° 971/2006 aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS) e recomenda às secretarias de saúde dos seus Estados, Municípios e Distrito Federal a implantação e implementação dessas práticas [2]. Dentre as Práticas Integrativas e Complementares está o uso das plantas medicinais, que segundo Gadelha et al. (2013) [3] é toda e qualquer planta que tenha em sua composição substâncias capazes de tratar ou prevenir doenças.

As plantas medicinais desenvolvem um importante papel no bem-estar da população devido às suas propriedades fitoterápicas, nutricionais e aromáticas [4]. Cerca de 82% da população brasileira faz o uso de plantas medicinais em seus cuidados com a saúde³. O Decreto nº 5.813/2006 cria a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicas no Brasil com o objetivo de:

Garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional [5].

Dentre as plantas medicinais está a *Morus nigra* L. conhecida popularmente no Brasil como amora, amora-preta, amora-miúra e amora negra [6,7]. As folhas de amora são muito utilizadas na medicina popular por conta das suas propriedades antinociceptivas, antioxidantes, antibacterianas, hipoglicêmicas, entre outras [8-12]. Em regiões como a do Vale do Rio São Francisco e Barra do Jacu em Vila Velha - ES, o chá das folhas de amora é consumido pela população para o tratamento e prevenção de diabetes, colesterol, hipertensão, obesidade, derrame e alívio dos sintomas da menopausa [7,13].

Estudos toxicológicos *in vivo* demonstraram que tanto o chá quanto os extratos das folhas de amora não apresentaram toxicidade significativas, sugerindo que, nesse aspecto, o seu consumo não oferece riscos à saúde [7,14,15]. Entretanto, há uma lacuna de informações na literatura relacionadas a composição química e nutricional dessas folhas.

Determinar os teores dos microelementos em folhas de amora é de suma importância, uma vez que a existência de concentrações significativas de metais potencialmente tóxicos pode tornar o seu consumo nocivo à saúde [16].

Técnicas espectrométricas como a espectrometria de absorção atômica de chama (F AAS) [17-19], espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) [20], espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ET AAS) [21], espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) [21,22], espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) [16,23-25], espectrometria de emissão atômica com plasma induzido por micro-ondas (MIP OES) [26-28], são amplamente empregadas na determinação de metais em amostras foliares.

O uso do MIP OES em análises de rotina é recente e tem crescido significativamente nos últimos anos para a determinação multielementar em uma vasta gama de matrizes como em água [29,30], minérios [31], pães [32], vinho tinto [33], material particulado [34], fertilizantes e ração animal [35], sangue humano [36] e unha humana [37]. Essa técnica é uma alternativa econômica aos métodos tradicionais, FAAS e o ICP OES, pois seu plasma utiliza o gás nitrogênio retirado do ar pelo gerador do próprio aparelho, reduzindo assim o seu custo operacional. Além do baixo custo, o MIP OES apresenta um bom desempenho analítico, limites de detecção para a maioria dos metais na faixa de 0,1 a 33 µg/ml, boa sensibilidade, baixa interferência de matriz, fatores que o fazem semelhante ao ICP OES e superior ao FAAS [38]. Em uma pesquisa foi feita a comparação entre o MIP OES e o ICP OES na determinação de Mn em vinho tinto, nesta o MIP OES foi tão sensível e preciso quanto o ICP OES [33].

Assim como em outros métodos espectrométricos, o MIP OES requer que amostras sólidas sejam convertidas em solução. A digestão úmida é a mais utilizada na decomposição, principalmente em sistema fechado, através do aquecimento da amostra na presença de um ácido mineral oxidante concentrado, de misturas de

ácidos oxidantes ou da mistura de um ácido oxidante com um agente oxidante como o peróxido de hidrogênio [39].

A digestão assistida por micro-ondas (MW) é uma técnica de digestão úmida considerada como um padrão em análises orgânicas e inorgânicas por apresentar diversas vantagens como: baixo consumo de reagentes, curto tempo de procedimento, eficiência em uma vasta gama de matrizes, pequeno risco de contaminação, preservação de elementos voláteis, dentre outros [40]. A grande maioria das pesquisas em que o MW é aplicado utiliza a mistura entre HNO_3 e H_2O_2 devido ao alto poder oxidante, alcançando assim a digestão completa em uma grande variedade de amostras [41]. Na Tabela 1, são apresentadas algumas pesquisas que aplicaram diferentes técnicas de digestão em amostras foliares para determinação espectrométrica de metais.

O uso de ferramentas quimiométricas é muito importante para a avaliação e interpretação de uma grande quantidade de dados analíticos envolvendo ensaios multielementares. Uma dessas ferramentas é o mapa auto-organizável (SOM - Self-organized Map) de Kohonen, que se baseia em algoritmos de redes neurais artificiais (RNA) com alto poder de aprendizagem. Os mapas auto-organizáveis, especialmente o de Kohonen, tem ganhado espaço na análise exploratória por organizar de forma simples dados complexos em cluster por semelhança, proporcionando o reconhecimento de padrões por meio de mapas topológicos que facilitam a compreensão dos dados [45-47].

Essa pesquisa tem como objetivo determinar a concentração de microelementos em amostras de folhas de amora comercializadas em algumas cidades baianas por MIP OES e realizar a análise exploratória dos dados utilizando as redes neurais de Kohonen.

Tabela 1. Procedimentos de digestão em amostras foliares para análises espectroanalíticas

Analito	Amostra	Condições de digestão	Técnica de digestão	Ref.
Co, Ni, Al, Mn, Zn, Cu, Mg, V, Fe e K	Folhas de amoreira preta (<i>Morus Nigra L.</i>)	300 mg da amostra/ 4,0 ml de HNO ₃ 65% / 2,0 ml de H ₂ O ₂ 30%	Digestão úmida assistida por micro-ondas	22
Ca, Mg, K, Na, Cu, Zn, Mn, e Al	Folhas de plantas medicinais	200 mg da amostra/ 2,0 ml de HNO ₃ 65% / 1,0 ml de H ₂ O ₂ 30%	Digestão úmida em bloco digestor	23
Ca, Mg, Co, Cu, Fe, Se, Mn, Ni, Zn, Cd, Cr, Pb, Mo e V	Folhas de plantas medicinais	300 mg da amostra/ 7,0 ml de HNO ₃ 65% / 1,0 ml de H ₂ O ₂ 30%	Digestão úmida assistida por micro-ondas	24
B, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mn, Ni, Se, Sr, Zn, Ca, Mg, Na, Al, As, Cd, Hg, Pb	Extrato de frutos, folhas e raízes da amoreira branca (<i>Morus Alba L.</i>) e amoreira preta (<i>Morus Nigra L.</i>)	1000 mg do extrato/ 8,0 ml de HNO ₃ 65% / 1,0 ml de H ₂ O ₂ 30%	Digestão úmida assistida por micro-ondas	25
As, Ba, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, V e Zn	Folhas de orégano	500 mg da amostra/ 6,0 ml de HNO ₃ 3,0 mol.L ⁻¹	Digestão úmida assistida por micro-ondas	42
P, K, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, Zn	Folhas de plantas medicinais	500 mg da amostra/ 6,0 ml de HNO ₃ 6,5 mol.L ⁻¹ / 2,0 ml de H ₂ O ₂ 30%	Digestão úmida em bloco digestor	43
Ca, Fe, K, Mg e Mn, Al, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Sr e Zn	Sachês e folhas de chá verde e chá preto	500 mg da amostra / 2,0 ml de água régia/ banho ultrassônico (15 min, 50 °C) / centrifugação (10 min, 12.000 rpm)	Extração por ultrassom	44

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Instrumentação

Nesse estudo, para as determinações dos microelementos foi utilizado o MIP OES, modelo 4200 (Agilent Technologies, Melbourne, Austrália), equipado com o nebulizador OneNeb, um compressor modelo MSV12 (Schulz, Joinville, SC, Brasil), um gerador de nitrogênio modelo 4107 (Agilent Technologies, Melbourne, Austrália) e tocha de quartzo.

As digestões das amostras foram realizadas em um digestor assistido por micro-ondas (Milestone Ethos 1600 Microwave Labstation, Sorisole, Italy), frequência de 2.450 Hz, potência de saída de 900W, equipado com vasos de PTFE de 100mL.

2.2 Reagentes e soluções

Todas as vidrarias e materiais de laboratório utilizados foram deixados em banho de HNO_3 10% (v/v) por 24h. Após, foram enxaguadas abundantemente com água ultrapura e secas.

Todos os reagentes utilizados nesse estudo são de grau analítico. As soluções foram preparadas com água ultrapura preparadas em sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA; resistividade de 18,2 $\text{M}\Omega \text{ cm}$).

O ácido nítrico 65% (m/m) (Merck, Darmstadt, Alemanha) foi utilizado na etapa de digestão das amostras e no preparo de soluções. O peróxido de hidrogênio 30% (m/m) (Merck, Darmstadt, Alemanha) também foi utilizado na digestão. As soluções padrão para a calibração foram preparadas a partir da diluição das soluções estoque monoelementar 1000mg.L^{-1} de Al, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni e Pb (Specsol, São José dos Campos, Brasil) em HNO_3 5%. As curvas de calibração para todos os metais estavam na faixa de 0,05-5,0 mg L^{-1} .

Uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) $0,0979 \text{ mol L}^{-1}$ foi usada para o teste de acidez residual.

A avaliação da exatidão do método analítico foi realizada utilizando o material de referência certificado (CRM) folha de maçã (NIST 1515) do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia - NIST (Gaithersburg, MD, USA).

2.3. Coleta das amostras

As amostras de folhas de amora (*Morus nigra* L.) foram adquiridas em lojas de produtos naturais em cidades baianas, secas à granel ou em sachê. Todas as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e devidamente guardadas até o procedimento de preparo. A Tabela 2 apresenta as cidades onde as amostras foram adquiridas e informações adicionais.

Tabela 2. Cidades de aquisição das amostras e informações adicionais

Cidade de aquisição	Forma de aquisição	Informações adicionais
Feira de Santana (FS)	Folhas secas à granel	Comercializada e produzida na cidade
Ilhéus (IL)	Folhas secas à granel	Comercializada e produzida na cidade
Itabuna (IT)	Chá em sachê	Comercializada na cidade e produzida em Brasília -DF
Itapetinga (IP)	Folhas secas à granel	Comercializada e produzida na cidade
Itapetinga (IG)	Folhas secas de marca comercial	Comercializada na cidade e produzida em Goiânia-GO.
Jaguaquara (JA)	Folhas secas à granel	Comercializada e produzida na cidade
Jequié (JE)	Folhas secas à granel	Comercializada e produzida na cidade
Juazeiro (JU)	Folhas secas à granel	Comercializada e produzida na cidade
Salvador (SA)	Folhas secas à granel	Comercializada e produzida na cidade
Vitória da Conquista (VC)	Folhas secas à granel	Comercializada e produzida na cidade

2.4 Preparo das amostras

Para a digestão assistida por micro-ondas, 300mg de cada amostra foram pesados em tubos de digestão de PTFE e, após, 7,0mL de HNO₃ 65% (m/m) e 1,0mL de H₂O₂ 30% (m/m) foram adicionados. Um programa de aquecimento em quatro etapas foi adotado, mantendo a pressão constante em 35 bar: etapa 1 - 6 min, 750W e 90 °C; etapa 2 – 4min, 750W e 90 °C; etapa 3- 8min, 1000W e 180 °C; etapa 4- 15min, 1000W e 180 °C. Por fim, o sistema foi submetido a 20min de ventilação.

Após a ventilação, as amostras digeridas foram diluídas para 50mL com água ultrapura. Os brancos foram preparados em cada lote de amostras. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata. As soluções finais foram analisadas por MIP OES. A metodologia de digestão aplicada foi proposta nos estudos de Santos et al. (2017) [24].

2.5 Acidez residual

A acidez residual das amostras digeridas foi determinada pela titulação ácido-base de 1000 μL do digerido final com uma solução padronizada de NaOH (0,0979 mol L^{-1}) e solução de fenolftaleína (1% m/v).

2.6 Validação do método

Os parâmetros avaliados para a validação do método foram: exatidão, precisão, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ). Para avaliar a exatidão das medições foi utilizado o CRM folha de maçã (NIST 1515). A precisão foi avaliada por meio do coeficiente de variação (CV). Os LOD e LOQ foram calculados de acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), multiplicando por três e dez vezes, respectivamente, o desvio padrão de dez leituras independentes do branco, dividido pelo coeficiente angular da curva de calibração. Os dados experimentais foram processados utilizando os softwares Microsoft Excel™ 2003 (The Microsoft, Co, EUA)

2.7 Análise multivariada

As redes neurais de Kohonen foram utilizadas para realizar a análise exploratória das amostras de acordo com as concentrações elementares adquiridas pelo MIP OES. Foi utilizado um pacote de ferramentas desenvolvido pelo Laboratório de Ciência da Computação e Informação (Universidade de Tecnologia de Helsinque, Finlândia) [48]. Os mapas auto-organizáveis de Kohonen foram implementados utilizando o software MatLab (versão R2018b, MathWorks, EUA). O código de implementação foi elaborado a partir de algoritmos sugeridos na literatura [49]. O conjunto de dados foi organizado em uma matriz composta por 30 amostras (triplicata foi usada) e 5 variáveis, e o total de neurônios utilizados no mapa foi definido pela fórmula $5\sqrt{n}$ onde n é o número total de amostras usando a folha do tipo mapa e grade hexagonal [50]. O algoritmo foi treinado com o conjunto de grupos de dados de entrada utilizando um algoritmo de treinamento em lote, no qual todo o conjunto é apresentado ao mapa antes de qualquer ajuste. A função que limitou a vizinhança utilizada no treinamento da plataforma e na estrutura da rede foi hexagonal. Mesmo com esta configuração, foram realizados inúmeros treinos até que fosse alcançado o melhor com os menores erros e os melhores índices. A arquitetura da rede foi avaliada

com base em índices qualitativos como erro de quantização (QE) e erro topológico (TE).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Desempenho analítico

As curvas analíticas para todos os metais determinados (Al, Ba, Cr, Cu e Mn) apresentaram coeficientes de determinação (R^2) superiores a 0,994, evidenciando a boa linearidade do método de digestão assistido por micro-ondas.

A exatidão do método foi verificada pela análise da maioria dos metais estudados em folhas de maçã (NIST 1515) pelo MIP OES. Os resultados estão expressos na Tabela 3. O teste t mostrou que não houve diferença significativa entre os valores determinados e os valores certificados para o intervalo de confiança de 95% ($n=3$). Os valores de recuperação encontram-se todos dentro do aceitável pela literatura (80%-120%) [51].

Tabela 3. Determinação de metais em folhas de maçã (material de referência certificado NIST 1515) por MIP OES após digestão ácida assistida por micro-ondas (média±desvio padrão, $n=3$, intervalo de confiança de 95%)

Elemento	Valores certificados (mg.kg ⁻¹)	Valores determinados (mg.kg ⁻¹)	Recuperação (%)
Al	284±6	272±5	96%
Ba	49±2	45±2	93%
Cu	5,7±0,1	6,1±0,5	110%
Mn	54±1	57±4	106%

Os LOD e LOQ foram calculados de acordo com a IUPAC, multiplicando por três e dez vezes, respectivamente, o desvio padrão de dez leituras independentes do branco, dividido pelo valor da inclinação da curva de calibração. Os valores de LOD obtidos variaram entre 0,002 e 0,359 mg.kg⁻¹, demonstrando que o método tem boa sensibilidade. Os valores de LOD e LOQ para os metais Al, Ba, Cr, Cu e Mn determinados por MIP OES estão expressos na Tabela 4.

Tabela 4. Limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) em mg.kg⁻¹ para Al, Ba, Cr, Cu e Mn determinados em folhas de amora por MIP OES após digestão assistida por micro-ondas

	Al	Ba	Cr	Cu	Mn
LOD	0,017	0,003	0,002	0,018	0,008
LOQ	0,056	0,008	0,008	0,055	0,026

A precisão foi avaliada em termos do CV para todos os microelementos determinados por MIP OES. Os valores calculados de CV foram inferiores a 10%, indicando que o método tem boa precisão. O método de digestão adotado apresentou em todas as amostras soluções límpidas, com ausência total de partículas, mostrando-se muito eficiente em matrizes foliares. Os valores de acidez residual ficaram em torno de $2,0 \pm 0,4$ mol L⁻¹.

3.2 Determinação de microelementos em folhas de amora

As concentrações de Al, Ba, Cr, Cu e Mn foram determinadas por MIP OES em dez amostras de folhas de amora comercializadas em cidades baianas (identificadas como FS, IL, IT, IG, IP, JA, JE, JU, SSA e VC). Na Tabela 5 estão expressos os resultados das análises em todas as amostras de folhas de amora.

Tabela 5. Concentração dos microelementos em mg.kg⁻¹ nas amostras de folhas de amora comercializadas em cidades baianas (média±desvio padrão, n=3, intervalo de confiança de 95%)

Amostra	Al	Ba	Cr	Cu	Mn
FS	148±10	72±2	1,64±0,01	4,95±0,02	42±2
IL	336±13	41±1	<0,002	4,91±0,01	252±1
IT	305±14	319±5	<0,002	4,97±0,01	216±12
IG	95±10	17±1	<0,002	4,96±0,01	88±1
IP	1103±28	287±7	<0,002	6,62±0,02	561±10
JA	527±13	140±3	1,65±0,01	3,30±0,01	148±1
JE	471±12	202±17	1,64±0,01	4,93±0,02	355±1
JU	779±52	129,1±0,2	3,31±0,01	6,62±0,01	159±4
SA	117±5	386±2	1,65±0,01	4,96±0,01	988±4
VC	764±6	485±10	1,65±0,01	6,62±0,05	711±16

Freiberger et al. [17] determinou metais em folhas de *Morus Nigra L.* colhidas em Joaçaba - SC, utilizando a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). Dentre os resultados, pode-se destacar as concentrações de Mn (214,15 mg

kg⁻¹) e Cu (33,86 mg kg⁻¹). A concentração de Mn está em concordância com os valores encontrados em algumas das amostras deste estudo.

Em análise por ICP OES, Schafranski [52] avaliou os minerais presentes em folhas jovens de *Morus Nigra L.* coletadas em Ponta Grossa-PR. Foram encontrados 77±7 mg kg⁻¹ de Al, 120±9 mg kg⁻¹ de Mn, 4,74±0,18 mg kg⁻¹ de Cu. À exceção do cobre, todos os demais metais apresentaram teores distintos aos encontrados neste estudo.

Ygit et al. [53] utilizou a Fluorescência de Raio-X para avaliar a composição mineral das folhas de *Morus Nigra L.* comercializadas em regiões da Turquia. Foram obtidos os teores de 253±11 mg kg⁻¹ de Al, 2,5 ± 0,3 mg kg⁻¹ de Cr e 32,2 ± 1,7 mg kg⁻¹ de Mn. A concentração de Al encontrada está em conformidade com algumas amostras deste estudo.

Os valores encontrados para a maioria dos metais nessa pesquisa diferem dos verificados nas literaturas citadas. Inclusive, entre as próprias amostras do estudo foram obtidas concentrações variadas para os mesmos metais, com exceção do Cu e Cr que apresentaram conformidade. Fatores como condições do solo (pH, umidade, concentração de nutrientes), época do plantio, clima, região de cultivo, idade das plantas, práticas agrícolas (fertilização, irrigação, uso de agrotóxicos), proximidade de regiões urbanas e industriais, dentre outros, influenciam diretamente na composição nutricional das plantas, justificando assim, as concentrações distintas dos mesmos metais em amostras de folhas da mesma espécie [52-54].

Os metais Cu, Cr e Mn são essenciais, pois, participam de processos bioquímicos importantes para o funcionamento do organismo humano, entretanto, devem ser consumidos em pequenas quantidades. Já o Al e Ba são metais potencialmente tóxicos, nocivos à saúde quando consumidos acima dos valores permitidos pelos órgãos oficiais do país.

No Brasil, a RDC n° 269/2005 estabelece os valores de Ingestão Diária Recomendada (IDR) de Proteínas, Vitaminas e Minerais. De acordo com essa RDC, os valores de IDR para adultos de Cu, Cr e Mn são 900µg, 35 µg e 2,3mg, respectivamente [55]. Para o Al é estabelecido como limite máximo de ingestão semanal o valor de 2,0mg por Kg corporal [56]. A concentração de bário na maioria dos alimentos é menor que 30 mg kg⁻¹, exceto a castanha-do-pará que apresenta a faixa de 1500 – 3000 mg Kg⁻¹ [57]. Apesar do bário estar presente em alguns

alimentos, não foi encontrado nenhuma resolução que trata sobre a concentração máxima de bário em folhas, chás ou qualquer alimento.

3.3 Análise Multivariada

O mapa auto-organizável de Kohonen foi obtido a partir da análise multivariada dos dados obtidos no estudo. Cada hexágono do mapa representa um neurônio e cada neurônio representa uma amostra. Na Figura 1 são apresentados os mapas das variáveis e a matriz de distância gerados a partir dos dados representados na Tabela 4. Na Figura 2 (A) são apresentados o dendograma para as variáveis e linha fenon, bem como em (B) a o mapa neural com os clusters das cidades agrupadas em função das variáveis.

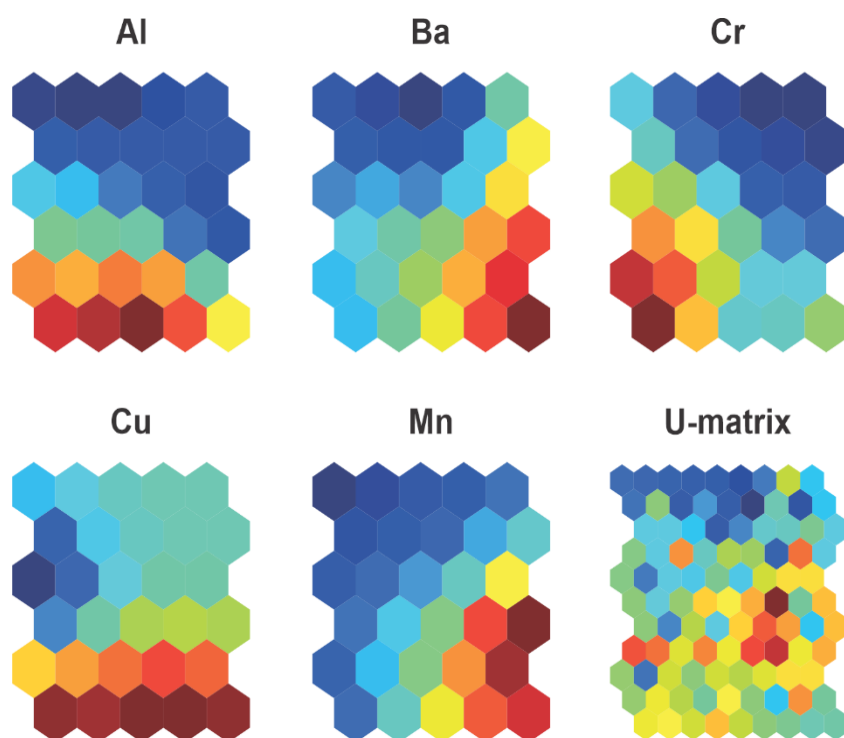


Figura 1. Mapa neural e matriz de distância (U-matrix) para dados gerados a partir da análise de metais em amostras de folhas de amora por MIP OES.

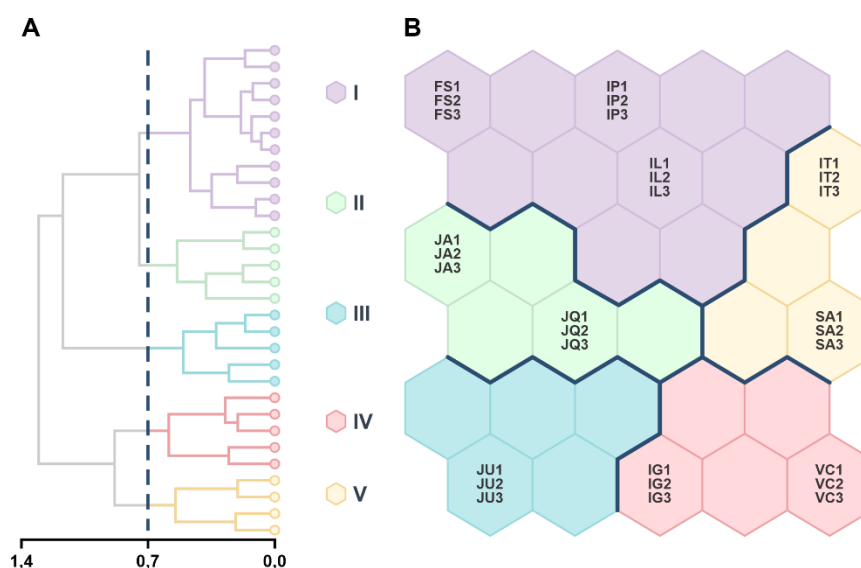


Figura 2. A) Dendrograma apresentando a distribuição amostral e linha fenon com suas respectivas distâncias (B) mapas de Kohonen mostrando a formação de cinco grupos com suas respectivas amostras e neurônios ativados.

Ao analisar as Figuras 1 e 2, é possível identificar os elementos que influenciam na separação dos grupos. As amostras do grupo I possuem baixas concentrações da Al, Ba, Cr e Mn. No grupo II, é possível identificar baixas concentrações de Cu e intermediárias de Mn. No grupo III, altas concentrações Cr e relativamente altas de Al e Cu são perceptíveis. Já no grupo IV é onde ocorrem as maiores concentrações da Ba e Cu e relativamente altas de Mn. Por fim, no grupo V são separadas em função das maiores concentrações de Mn e relativamente baixas de Cr. A matriz de distância pode dificultar a observação dos clusters, mas o mapa com as cidades (Figura 2 (B)) auxilia na elucidação dos grupos.

Os grupos de cidades formados em função da similaridade das variáveis são compostos pelos grupos I- Ilhéus, Itapetinga e Feira de Santana; II- Jaguaquara e Jequié; III- apenas Juazeiro; IV- Comercializadas em Itapetinga (vindas de Goiás) e Vitória da Conquista e V- Salvador e Itabuna. A proximidade relativa entre Itapetinga e Ilhéus, ambas localizadas ao sul da Bahia, e a possibilidade da amostra comercializada em Feira de Santana ser proveniente da mesma região que as demais, podem ser possíveis justificativas para a formação do grupo I. Já o grupo II é formado por amostras de duas cidades muito próximas, sendo Jaguaquara pertencente da microrregião de Jequié, justificando assim as similaridades. O grupo

III é formado apenas por Juazeiro, única cidade localizada na região do Vale do São Francisco. O grupo IV é formado por amostras comercializadas em cidades próximas, podendo ambas terem origem do mesmo local, Goiás, ou de regiões vizinhas. O fato de Salvador ser uma cidade litorânea e Itabuna estar localizada bem próxima ao litoral, pode ser um dos fatores que contribuem para a semelhança das suas amostras, ou, até mesmo serem da mesma região de origem, uma vez que as amostras são vendidas à granel sem qualquer informação do local de produção.

A validação dos mapas obtido a partir dos dados das amostras foi realizada a partir de (i) erro de quantização, que representa a média das distâncias entre cada vetor de dados e o vetor de peso correspondente do neurônio vencedor. O erro de quantização não possui um valor padrão, mas quanto menor o erro, melhor o neurônio vencedor definirá os vetores de entrada; (ii) o erro topográfico quantifica a capacidade do mapa de representar a topologia dos dados de entrada. É calculado verificando todas as entradas, qual neurônio é o melhor e qual é o segundo melhor [49,50]. O erro topográfico também não tem valor padrão, mas é melhor quando os valores tendem a zero. Neste estudo os valores de erro de quantização e topográfico foram iguais a 0,900 e 0,030 e estão de acordo com a literatura [46,47].

A análise por redes neurais de Kohonen é muito satisfatória para a identificação e organização de grupos amostrais e das variáveis a partir de mapas planos. Os mapas auto-organizáveis facilitam a interpretação e visualização dos resultados amostrais, sendo uma excelente ferramenta para as análises que geram grande quantidade de dados.

4. CONCLUSÕES

O procedimento de digestão assistida por micro-ondas se mostrou muito vantajoso, principalmente por conta da agilidade e eficiência. O MIP OES mostrou-se uma técnica com boa precisão, exatidão, sensibilidade e frequência analítica, podendo ser utilizada como alternativa as técnicas tradicionais (ICP OES e FAAS). A análise exploratória usando o mapa auto-organizável de Kohonen mostrou-se muito vantajosa, pois, além de facilitar a interpretação e compreensão dos dados obtidos, agrupou as amostras em razão das semelhanças das concentrações dos metais avaliados.

A partir dos resultados obtidos é possível concluir que o consumo das folhas de amora pesquisadas, em quantidades adequadas, pode ser benéfico à saúde, uma vez possuem concentrações satisfatórias dos metais essenciais Cr, Cu e Mn, e concentrações de Al e Ba, metais potencialmente tóxicos, abaixo da nocividade ao organismo humano.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization (WHO). Integrating traditional and complementary medicine into health systems: social, economic and health considerations. Geneva: **World Health Organization**, 2023.
2. BRASIL. Ministério da Saúde. PORTARIA Nº 971, DE 03 DE MAIO DE 2006. **Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde**. Brasília: Diário Oficial da União, 2006a.
3. GADELHA, C. S. et al. Estudo bibliográfico sobre o uso das plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 8, n. 5, p. 208–2012, 2013.
4. ROMANELLI, C. et al. Biodiversity and human health linkages: concepts, determinants, drivers of change and approaches to integration. In: Connecting Global Priorities: Biodiversity and Human Health. World Health Organization (WHO). **Connecting global priorities: biodiversity and human health: a state of knowledge review**. Geneva: Inís Communication, p. 28-29, 2015.
5. BRASIL. Ministério da Saúde. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. **Aprova Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília DF: Diário Oficial da União, 2006.
6. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Monografia da espécie Morus nigra L. (AMOREIRA)**. Brasília: Ministério da Saúde, 68 p., 2015.
7. OLIVEIRA, A. C. B. et al. Avaliação toxicológica pré-clínica do chá das folhas de Morus Nigra L. (Moraceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 15, n. 2, p. 244–249, 2013.
8. PADILHA, M. M. et al. Antinociceptive effect of the extract of Morus nigra leaves in mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 12, n.6, p. 1381-1385, 2009.
9. VOLPATO, G. T. et al. Effect of *Morus nigra* aqueous extract treatment on the maternal–fetal outcome, oxidative stress status and lipid profile of

- streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, n. 3, p. 691-696, 2011.
10. SOUZA, G. R. et al. Assessment of the antibacterial, cytotoxic and antioxidant activities of *Morus nigra* L. (Moraceae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 2, p. 248-254, 2018.
 11. ABD EL-MAWLA, A. M. A. et al. Induction of Biologically Active Flavonoids in Cell Cultures of *Morus nigra* and Testing their Hypoglycemic Efficacy. **Scientia Pharmaceutica**, v. 79, n.4, p. 951-961, 2011.
 12. HAGO, S. et al. Evaluation of antidiabetic activity of *Morus nigra* L. and *Bauhinia variegata* L. leaves as Egyptian remedies used for the treatment of diabetes. **Natural Product Research**, v. 35, n.5, p.829-835, 2021.
 13. ALBERTASSE, P. D.; THOMAZ, L. D.; ANDRADE, M. A. Plantas medicinais e seus usos na comunidade da Barra do Jucu, Vila Velha, ES. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.12, n.3, p.250-260, 2010.
 14. ALMEIDA, J. R. G. da S. et al. Evaluation of Hypoglycemic Potential and Pre-Clinical Toxicology of *Morus nigra* L. (Moraceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v.30, n. 1, p. 96-100, 2011.
 15. CASTRO, A. S. **Efeito de *Morus nigra* L. Como terapia hormonal em ratas ooforectomizadas**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Maranhão, São Luiz, 65 p., 2010.
 16. SZYMCZYCHA-MADEJA, A.; WELNA, M.; ZYRNICKI, W. Multi-element analysis, bioavailability and fractionation of herbal tea products. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 5, p. 777–787, 2013.
 17. FREIBERGER, G. et al. Determinação da composição mineral do fruto e folhas de amora-preta (*Morus nigra* L.) em três estágios de maturação. In: 7º Simpósio de Segurança Alimentar – sbCTA-RS, 2020.
 18. HUSSEIN, A. M. S. et al. Antioxidative, antibacterial and antifungal activities of tea infusions from berry leaves, carob and doum. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 61, n. 3, p. 201–209, 2011.

19. BIEL, W.; JAROSZEWSKA, A. The nutritional value of leaves of selected berry species. **Scientia Agricola**, v. 74, n. 5, p. 405–410, 2017.
20. KALNY, P. et al. Determination of selected microelements in polish herbs and their infusions. **Science of the Total Environment**, v. 381, n. 1–3, p. 99–104, 2007.
21. ARPADJAN, S. et al. Arsenic, cadmium and lead in medicinal herbs and their fractionation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 8, p. 2871–2875, 2008.
22. SCHAFRANSKI, K. et al. Avaliação de compostos bioativos e atividade antioxidante de extratos de folhas de amoreira preta (*Morus Nigra L.*) utilizando planejamento experimental. **Química Nova**, v. 42, n. 7, p. 736–744, 2019.
23. COSTA, V. C. et al. Multivariate Optimization for the Development of a Fast and Simple Ultrasound-Assisted Extraction Procedure for Multielemental Determination in Tea Leaves by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP OES). **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 7, p. 2004–2012, 2018.
24. SANTOS, A. D. F. et al. Multielement determination of Macro and micro contents in medicinal plants and phytomedicines from Brazil by ICP OES. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 2, p. 376–384, 2017.
25. RADOJKOVIĆ, M. M. et al. Characterization of *Morus* species in respect to micro, macro, and toxic elements. **Acta Periodica Technologica**, v. 45, p. 229–237, 2014.
26. ANTUNES, B. D. F. et al. Evaluation of physicochemical, bioactive composition and profile of fatty acids in leaves of different olive cultivars. **Revista Ceres**, v. 68, n. 6, p. 511–520, 2021.
27. VIRGILIO, A. et al. Calculating limits of detection and defining working ranges for multi-signal calibration methods. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 35, n. 8, p. 1614–1620, 2020.

28. WILLIAMS, C. B. et al. Dry ashing and microwave-induced plasma optical emission spectrometry as a fast and cost-effective strategy for trace element analysis. **Microchemical Journal**, v. 132, p. 15–19, 2017.
29. KUMAR, A. et al. Assessment of radon concentration and heavy metal contamination in groundwater of Udhampur district, Jammu & Kashmir, India. **Environ Geochem Health**, v. 40, n. 2, p. 815–831, 2017.
30. SIPAHI, F.; USLU, S. Investigation of the quality and physical-geochemical characteristics of the drinking water in Gümüşhane (Turkey) city central. **Arabian Journal of Geosciences**, v. 9, n. 12, p. 1-14, 2016.
31. BALARAM, V. et al. Analysis of geochemical samples by microwave plasma-AES. **Atomic Spectroscopy**, v. 35, n. 2, p. 65-78, 2014.
32. OZBEK, N.; AKMAN, S. Method development for the determination of calcium, copper, magnesium, manganese, iron, potassium, phosphorus and zinc in different types of breads by microwave induced plasma-atomic emission spectrometry. **Food Chemistry**, v. 200, n. 8, p. 245–248, 2016.
33. JUNG, M. Y. et al. Analytical features of microwave plasma-atomic emission spectrometry (MP-AES) for the quantitation of manganese (Mn) in wild grape (*Vitis coignetiae*) red wines: Comparison with inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES). **Food Chemistry**, v. 274, n. 9, p. 20-25, 2019.
34. KAMALA, C. T. et al. Application of microwave plasma atomic emission spectrometry (MP-AES) for environmental monitoring of industrially contaminated sites in Hyderabad city. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.186, n. 11, p. 7097–7113, 2015.
35. LI, W. et al. Microwave plasma-atomic emission spectroscopy as a tool for the determination of copper, iron, manganese and zinc in animal feed and fertilizer. **Talanta**, v.112C, p. 43–48, 2013.
36. BARANYAI, E.; TÓTH, C.M.; FÁBIAN, I. Elemental analysis of human blood serum by microwave plasma-Investigation of the matrix effects caused by

- sodium using model solutions. **Biological Trace Element**, v. 194, n. 1, p. 13–23, 2020.
37. CARTER, J. A. et al. Combining elemental analysis of toenails and machine learning techniques as a non-invasive diagnostic tool for the robust classification of type-2 diabetes. **Expert Systems with Applications**, v. 115, p. 245–255, 2019.
38. BALARAM, V. Microwave plasma atomic emission spectrometry (MP-AES) and its applications – A critical review. **Microchemical Journal**, v. 159, 2020.
39. KORN, M. das G. et al. Sample Preparation for the Determination of Metals in Food Samples Using Spectroanalytical Methods - A Review. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 43, n. 2, p. 67-92, 2008.
40. OLIVEIRA, E. Sample Preparation for Atomic Spectroscopy: Evolution and Future Trends. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 174-182, 2003.
41. NÓBREGA, J. A. et al. Microwave-assisted digestion of organic samples: How simple can it become? **Talanta**, v. 98, p. 272–276, 2012.
42. Bizzi, C. A. et al. Evaluation of oxygen pressurized microwave-assisted digestion of botanical materials using diluted nitric acid. **Talanta**, v. 83, n. 5, p. 1324–1328, 2011.
43. GARCIA, C. A. B. et al. Métodos de digestão de amostras de tecido vegetal em sistema fechado. In: Safety, Health and Environment World Congress, XII., 2012, São Paulo. **Anais eletrônicos [...]** São Paulo: SHEWC, p.305-309, 2012.
44. SZYM CZYCHA-MADEJA, A.; WELNA, M.; POHL, P. Determination of essential and non-essential elements in green and black teas by FAAS and ICP OES simplified – multivariate classification of different tea products. **Microchemical Journal**, v. 121, p. 122–129, 2015.
45. FERDE, M. et al. Chemical characterization of the soils from black pepper (*Piper nigrum* L.) cultivation using principal component analysis (PCA) and Kohonen self-organizing map (KSOM). **Journal of Soils and Sediments**, v. 21, p. 3098-3106, 2021.

46. Kohonen, T. Essentials of the self-organizing map. **Neural Networks**, v. 37, p. 52-65, 2013.
47. NOVAES, C. G. et al. Screening of Passiflora L. mineral content using principal component analysis and Kohonen self-organizing maps. **Food Chemistry**, v. 233, p. 507-513, 2017.
48. VATANEN, T. et al. Self-organization and missing values in SOM and GTM. **Neurocomputing**, v. 147, n. 1, p. 60–70, 2015.
49. HAYKIN, S. **Redes neurais: princípios e prática**. 2.ed. Porto Alegre: Bookman, 2001, 898p.
50. VESANTO, J.; ALHONIEMI, E. Clustering of the self-organizing map. **IEEE Transactions on Neural Networks**, v.11, n. 3, p. 586–600, 2000.
51. USEPA (1989). Guidance for methods development and methods validation for the RCRA program SW-846 methods. **US Environmental Protection Agency**, Washghnton DC, 1989.
52. SCHAFRANSKI, K. et al. Avaliação de compostos bioativos e atividade antioxidante de extratos de folhas de amoreira preta (*Morus nigra* L.) utilizando planejamento experimental. **Química Nova**, v. 42, n. 7, p. 736-744, 2019.
53. YGIT, D. et al. Elemental Composition of Various Mulberry Species. **Asian Journal of Chemistry**, v. 22, n.5, p. 3554-3560, 2010.
54. FAYAD, J. A. et al. Absorção de nutrientes pelo tomateiro cultivado sob condições de campo e de ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 90-94, 2002.
55. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC Nº 269, DE 22 DE SETEMBRO DE 2005. **REGULAMENTO TÉCNICO SOBRE INGESTÃO DIÁRIA RECOMENDADA (IDR) PARA PROTEÍNA, VITAMINAS E MINERAIS**. Brasília: Diário Oficial da União, 2005.
56. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA). **Anvisa proíbe aditivos alimentares contendo alumínio**. Brasília – DF, 11 de nov. de 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt->

br/assuntos/noticias-anvisa/2019/anvisa-proibe-aditivos-alimentares-contendo-aluminio. Acesso em: 29 de out. de 2023.

57. PASQUOTO, C. G. **Estudo das interações de bário, chumbo e zinco com solos de áreas urbanas do estado de São Paulo**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.