



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

JOSÉ ODIMAR DE CALDAS BRANDÃO FILHO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DO
TEOR DE ÁCIDO OXÁLICO EM *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg.**

RECIFE
2022

JOSÉ ODIMAR DE CALDAS BRANDÃO FILHO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DO
TEOR DE ÁCIDO OXÁLICO EM *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção de grau de mestre em Inovação Terapêutica.

Orientador: Profa. Dra. Karina Perrelli Randau

Coorientador: Prof. Dr. Fernando José Malagueño de Santana

RECIFE

2022

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Natália Nascimento, CRB4/1743

Brandão Filho, José Odimar de Caldas

Desenvolvimento de método analítico para determinação do teor de ácido oxálico *Artocapus altilis* (Parkinson) Fosberg. / José Odilmar de Caldas Brandão Filho. – 2022.

107 f. : il., fig.; tab.

Orientadora: Karina Perrelli Randau.

Coorientador: Fernando José Malagueño de Santana.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2022.

Inclui referências.

1. Matrizes vegetais. 2. *Artocapus altilis* Parkinson Fosberg. 3. Ácido oxálico. 4. Complicações renais. I. Randau, Karina Perrelli (orient.). II. Santana, Fernando José Malagueño de (coorient.). III. Título.

587

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023-051

JOSÉ ODIMAR DE CALDAS BRANDÃO FILHO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DO
TEOR DE ÁCIDO OXÁLICO EM *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde. Área de concentração: Desenho, Modelagem Molecular e Preparação de Produtos Bioativos.

Aprovado em: 31 / 05 / 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. **Karina Perrelli Randau** (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. **José Lamartine Soares Sobrinho** (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^a. Dr^a. **Danielle Cristine Almeida Silva de Santana** (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que semeou este universo. Aos meus pais que jamais mediram esforços para prover uma educação digna para seus filhos, que jamais mediram esforços para me tornar um homem digno. Grato pela ética que transmitiram, ao senso moral, a sensibilidade e a capacidade de refletir sobre a vida.

Ao meu irmão, José Odnilson, sempre me apoiando, me ensinando, transmitindo valores, me motivando, me ensinando a ser o que eu quiser ser. Um vínculo maior que o sangue.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Karina Perrelli Randau, pela excelente condução da pesquisa, pelo apoio, pela confiança em mim depositada e pelos ensinamentos transmitidos.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Fernando José Malagueño de Santana, pela acolhida no laboratório, pela colaboração com o desenvolvimento do trabalho, pelos ensinamentos e conselhos de vida.

À Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa concedida

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, pelos ensinamentos que contribuíram para minha formação.

Aos amigos que estiveram comigo durante essa trajetória me dando apoio e transmitindo confiança. Em especial à Denis Roberto que, sem sombra de dúvidas, tornou-se um segundo irmão que sempre esteve presente quando mais precisei. Ao meu grande e amado primo Murilo Brandão: Grato por todo o companheirismo, conversas e aventura que me proporcionou e proporcionará.

RESUMO

Embora a terapia alopática seja predominante, a utilização de plantas medicinais como forma adjuvante na terapia de enfermidades, como as Doenças Crônicas não Transmissíveis (DCNTs), é bastante difundida. *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg, popularmente conhecida como “jaca”, é uma espécie utilizada para fins terapêuticos em DCNTs. Não obstante haja um benefício no tratamento, as matrizes vegetais são complexas, contendo compostos bioativos com efeitos farmacológicos e/ou toxicológicos. Dentre eles, destaca-se o ácido oxálico, presente em mais de 200 famílias de plantas. O consumo de ácido oxálico ou oxalato, metabólito presente em altas concentrações em diferentes espécies vegetais, pode causar complicações renais a curto e longo prazo, principalmente se a concentração plasmática for $\geq 0,8-2,5 \mu\text{mol. L}^{-1}$ e a concentração urinária for $\geq 20-30 \text{ mg. } 24\text{h}^{-1}$. Algumas pessoas predispostas a complicações renais, como aquelas com DCNTs, como diabetes e hipertensão, apresentam uma predisposição a desenvolverem distúrbios renais em decorrência de sua condição fisiopatológica e ao mesmo tempo fazem uso de espécies de plantas medicinais como terapia adjuvante, como *Artocarpus altilis* (parkinson) fosberg. Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar o desenvolvimento de um método analítico para determinação do teor de ácido oxálico em *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg. A separação cromatográfica dos analitos em fase reversa foi obtida em uma coluna C18 (250 x 4,6 mm; 5 μm ; 80 Å) em modo isocrático e usando água acidificada com ácido fosfórico:metanol (99:1) a 0,6 mL. min^{-1} em pH 2,0 como fase móvel (25°C e detecção a 220 nm). O tempo de análise foi de 5 min. Para o preparo da amostra, lâminas foliares de *Artocarpus altilis* foram coletadas, secas em estufa, trituradas e acondicionadas até o momento de preparo do extrato. O extrato era preparado a cada dia de análise a partir de 1,0 g do triturado com 20 mL de HCl 2 mol. L^{-1} , a 21 ° C, por 15 min (sob agitação), centrifugado e filtrado. O método apresentou intervalo linear de concentração de 5 a 45 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ para ácido oxálico. O método demonstrou boa precisão e exatidão intra e intercorrida com erros relativos inferior a 15%. Ainda, o método foi aplicado em amostras de lâmina foliar de *Artocarpus altilis* encontrando uma concentração de 1,06 mg. g^{-1} de ácido oxálico. Os resultados trouxeram dados inéditos a respeito do teor de ácido oxálico contido em *Artocarpus altilis*. Espera-se que esse método possa contribuir para o desenvolvimento de outros métodos com o mesmo propósito.

Palavras-chave: Matrizes vegetais; *Artocarpus altilis* (parkinson) fosberg; ácido oxálico; complicações renais

ABSTRACT

Although the therapy is predominantly therapeutic, the use of medicinal plants as an adjuvant in the therapy of diseases, such as Chronic Non-Communicable Diseases (NCDs), is widespread. *Artocarpus altilis* (*Parkinson*) *Fosberg*. Popularly known as ‘‘jackfruit’’, it is a species used for therapeutic purposes in NCDs. Although there is a benefit in the treatment, plant matrices are complex, containing pharmacological and/or toxicological bioactive compounds. Among them, oxalic acid stands out, present in more than 200 families of plants. Long-term consumption of oxalic acid or short-mold oxala-2,2, present at high temperatures, in different plant species, can cause renal complications and especially if the plasma concentration is 0.8 Y. L-1 and urine concentration to $\geq 20\text{-}30\text{ mg. }24\text{h-}1$. Some people predispose to kidney complications, such as CDs such as diabetes and hypertension, have a predisposition to develop Renaissance disorders as a result of their pathophysiological condition and at the same time make use of medicinal plant species as an adjuvant therapy, such as *Artocarpus altilis* (*Parkinson*) *Fosberg*. Thus, the objective of this work was to carry out the development of an analytical method to determine the oxalic acid content in *Artocarpus altilis* (*Parkinson*) *Fosberg*. Reverse-phase chromatographic separation of the analytes was found on a C18 column (250 x 4.6 mm; 5 μm ; 80 \AA) in isocratic mode and using water acidified with phosphoric acid:methanol (99:1) at 0.6 mL . min-1 at pH 2.0 as mobile phase (25°C and detection at 220 nm). The analysis time was 5 min. For sample preparation, leaf blades of *Artocarpus altilis* were collected, oven-dried, crushed and stored until extract preparation. The extract was prepared each day of analysis from 1.0 g of the mixture triturated with 20 mL of 2 mol HCl. L -1, at 21 °C, 15 min (under, by centrifugation and filtration). The method showed a linear concentration range from 5 to 45 $\mu\text{g. mL-}1$ for oxalic acid. The method of precision and intra- and inter-run precision with relative errors less than 15%. Still, the method was applied in a sample of leaf blade of *Artocarpus* finding a concentration of 1.06 mg. g-1 of oxalic acid. The results brought unprecedented data regarding the content of oxalic acid contained in *Artocarpus altilis*. It is expected that this method can contribute to the development of other methods with the same purpose.

Keywords: Plant matrices; *Artocarpus altilis* (parkinson) fosberg; oxalic acid; kidney complications

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Rotas de biossíntese do ácido oxálico nas espécies vegetais.....	26
Figura 2 - Fluxograma da pesquisa estratégica na literatura científica.	43
Figura 3 - Microscopia eletrônica de varredura e composição química elementar dos cristais na lâmina foliar de <i>Artocarpus altilis</i> (Parkinson) Fosberg.....	74
Figura 4 – Espectro de varredura do ácido oxálico solubilizado em H_3PO_4 e metanol (99:1) e pH 2,0 (200-230nm)	75
Figura 5 - Áreas absolutas dos sinais analíticos de uma mesma amostra (ácido oxálico 200 $\mu g \cdot mL^{-1}$) frente a diferentes acidificantes da fase móvel.....	76
Figura 6 - Cromatogramas de uma mesma amostra (ácido oxálico 200 $\mu g \cdot mL^{-1}$) frente a diferentes acidificantes da fase móvel	77
Figura 7 - Áreas absolutas dos sinais analíticos de uma mesma amostra (ácido oxálico 200 $\mu g \cdot mL^{-1}$) frente a diferentes pHs da fase móvel.....	77
Figura 8 - Cromatogramas de uma mesma amostra (ácido oxálico 200 $\mu g \cdot mL^{-1}$) frente a diferentes pHs da fase móvel ($H_2O + H_3PO_4$).	78
Figura 9 - Áreas absolutas dos sinais analíticos de uma mesma amostra (ácido oxálico 200 $\mu g/mL$) frente a diferentes proporções de metanol da fase móvel.	81
Figura 10- Cromatogramas de uma mesma amostra (ácido oxálico 200 $\mu g \cdot mL^{-1}$) frente a diferentes proporções de metanol da fase móvel.....	82
Figura 11 - Cromatograma do ácido oxálico; ácido tartárico, ácido málico; ácido ascórbico e ácido cítrico obtido utilizando o método cromatográfico desenvolvido.....	83
Figura 12 - Áreas absolutas dos sinais analíticos obtidos após extração por SPE-troca iônica, utilizando como dessorvente o HCL ou H_2SO_4	85
Figura 13 - Áreas absolutas dos sinais analíticos obtidos após extração por SPE-troca iônica, utilizando como condicionante o NaOH ou $H_2O + MetOH$ (1:1).	86
Figura 14 - Diagrama de interpretação de interação de segunda ordem entre o pH e o Dessorvente (mL).....	91
Figura 15 - Diagrama de interpretação conjunta de interação de segunda ordem entre o Condicionante (mL) e o Dessorvente ($mol \cdot L^{-1}$).....	92
Figura 16- Diagrama de interpretação conjunta de interação de segunda ordem entre o pH e o Condicionante (mL).....	93

Figura 17 - Diagrama de interpretação conjunta de interação de terceira ordem entre o Condicionante (mL), Dessorvente (mol. L^{-1}) e Dessorvente (mL).....	94
Figura 18 - Diagrama de interpretação de interação conjunta de terceira ordem entre o Condicionante (mL), pH e Dessorvente (mL).....	95
Figura 19 - Diagrama de interpretação de interação conjunta de terceira ordem entre o Condicionante (mL), Dessorvente (mol. L^{-1}) e pH.....	95
Figura 20 – Curva analítica do ácido oxálico (padrão) no intervalo de concentração de 5 – 45 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ obtida através da extração em fase sólida (SPE-troca iônica) sob as condições especificadas no quadro 8.....	96
Figura 21 – Gráfico de dispersão de resíduos.....	97
Figura 22 – Curva de calibração do padrão de ácido oxálico em triplicata.....	98
Figura 23 – Cromatograma obtido a partir da análise de extratos de <i>Artocarpus altilis</i> (Parkinson) Fosberg após desenvolvimento e validação do método.....	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sumarização dos dados extraídos dos estudos selecionados.....	50
Tabela 2 - Planejamento fatorial 2 ⁴ completo com ponto central para otimização dos parâmetros da extração em fase sólida por troca iônica (SPE de Troca Iônica)	72
Tabela 3 - Parâmetros cromatográficos obtidos em diversos pHs para o ácido oxálico.....	79
Tabela 4 - Efeitos dos parâmetros e suas interações na área dos picos.....	89
Tabela 5 - Regressão linear e teste de falta de ajuste da curva analítica.....	97
Tabela 6 - Resultados da avaliação do efeito matriz.....	99
Tabela 7 - Precisão e exatidão intra e intercorrida da análise do ácido oxálico em extrato de <i>Artocarpus altilis</i> (Parkinson) Fosberg. empregando SPE-troca iônica	100
Tabela 8 - Resultados obtidos a partir do estudo da robustez.....	101

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Exemplos de espécies consumidas pela população e seus efeitos tóxicos.....	23
Quadro 2 - Sumarização de todas as espécies vegetais e respectivas famílias quantificadas nos estudos selecionados, bem como a parte do vegetal utilizada.....	44
Quadro 3 - Detalhamento metodológico dos estudos selecionados.....	53
Quadro 4 - Variáveis estudadas para otimizar fase móvel.....	68
Quadro 5 - Condições otimizadas para a extração dos analitos por SPE-Troca iônica.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DCNT	Doenças Crônicas Não Transmissíveis
CG	Cromatografia gasosa
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
DPR	Desvio padrão relativo
LD	Limite de quantificação
MQ	Média quadrática
SQ	Soma quadrática
SPE	Solid phase extraction

LISTA DE SÍMBOLOS

HCL	Ácido Clorídrico
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
R ²	Coefficiente de determinação
mL	Mililitro
µL	Microlitro
s	Segundo
g	Gramma
mg	Miligramma
µg	Microgramma
min	Minuto
°C	Graus Celsius
C ₂ O ₄ ²⁻	Oxalato
Ca ²⁺ [C ₂ O ₄ ²⁻]	Oxalato de cálcio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	17
2.1. OBJETIVO GERAL.....	17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3.1 REVISÃO NARRATIVA.....	18
3.1.1 O papel do ácido oxálico na relação entre as doenças crônicas não transmissíveis e o consumo de plantas medicinais.....	19
3.2 REVISÃO INTEGRATIVA.....	38
3.2.1 Artigo – Métodos de extração e quantificação de ácido oxálico em matrizes vegetais: Revisão Integrativa.....	38
4.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO.....	66
4.2 METODOLOGIA.....	67
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
4.3.1 Desenvolvimento de metodologia <i>clean up</i> com spe-troca iônica.....	84
4.3.2 Validação.....	95
5 CONCLUSÃO	104
REFERÊNCIAS.....	105

1 INTRODUÇÃO

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) constituem a nível mundial um dos maiores problemas no tocante a mortes prematuras e perda da qualidade de vida, acarretando em limitações no trabalho e lazer, além de gerar impactos no âmbito econômico e social. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), as quatro principais doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), doenças cardiovasculares, câncer, doenças respiratórias crônicas e diabetes são responsáveis por 71% das mortes globais e representam mais de 80% de todas mortalidade prematura, ou seja, óbitos entre 30 e 69 anos (OMS, 2019). No âmbito nacional, as DCNT acometem amplamente a população brasileira, sendo umas das principais causas de mortalidade prematura. Após uma reavaliação e correção para sub-registro e redistribuição de causas mal esclarecidas de óbitos, segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS), 72,6% do total de óbitos corridos em território nacional foram por DCNT e, destes, 79,4% foram ocasionados pelas 4 mais relevantes DCNT: doenças cardiovasculares, neoplasias, doenças respiratórias crônicas e diabetes mellitus (BRASIL, 2013).

Grande parte da população faz uso de espécies vegetais com propriedades terapêuticas (plantas medicinais) na terapia adjuvante de diversas enfermidades, dentre elas, as DCNTs. Oliveira *et al.*, (2012), mostram que grande parte da população faz uso de plantas medicinais e tem grande confiança na sua utilização. Segundo dados da OMS, o número de países que implementaram políticas públicas de incentivo a utilização de plantas medicinais como terapia complementar cresce a cada ano (OMS, 2019). A alta incidência de uso de plantas medicinais possivelmente deve-se ao fácil acesso, baixo custo e por serem consideradas inofensivas por grande parte da população (FONTANELLA *et al.*, 2017).

As plantas medicinais ainda são consideradas fontes promissoras de descoberta de medicamentos e fornecem uma variedade de produtos químicos bioativos e poderosas ações farmacológicas. (BAHMANI *et al.*, 2014). Zeni *et al.* (2017), relataram em seu estudo que 85% dos pacientes fazem uso de plantas medicinais na forma de chás feitos a partir das folhas. A exemplo, *Artocarpus altilis* (parkinson) fosberg, popularmente conhecida como “jaca” ou “jaqueira”, essa espécie nativa da Índia e bastante difundida no Brasil apresenta diversos efeitos farmacológicos das folhas e frutos, dentre eles, destacam-se o efeito hipoglicemiante e hipotensor (LOTULUNG *et al.*, 2013; BIWORO, 2016), por isso, essa espécie é bastante utilizada na medicina popular brasileira (BRITO, SENNA-VALLE, 2011; NETO GALVÃO *et al.*, 2021)

Em pesquisas etnobotânicas, os chás representam o método mais comum de preparação, uma vez que a escolha por esse método de preparo provavelmente está relacionada à disponibilidade da parte da planta utilizada, como as folhas, que ficam disponíveis ao longo do ano, bem como ser a parte vegetal onde está presente o maior número de metabólitos secundários (CARTAXO *et al.*, 2010; MARINHO *et al.*, 2011). No entanto, apesar do uso generalizado, existem riscos no seu uso não controlado.

As espécies vegetais são extremamente complexas e constituídas por uma diversidade de substâncias químicas como flavonoides, alcaloides, taninos e alguns ácidos orgânicos. Destes últimos, o ácido oxálico vem ganhando destaque nas pesquisas científicas relacionadas a quadro de intoxicação por sua ingestão oriundo da dieta. Em plantas, o acúmulo de ácido oxálico, encontrado na forma de oxalato de cálcio (CaOx) é comum, mais de 215 famílias de plantas acumulam essa substância em seus tecidos (NAKATA, 2003). De acordo com a diversidade dos cristais, sua distribuição espacial e concentração, existem várias hipóteses a respeito da função do CaOx em espécies vegetais (FRANCESCHI E NAKATA, 2005). Dentre essas diversas funções, os cristais de CaOx, são reservas de cálcio que contribuem com as funções fisiológicas da espécie vegetal e regulam suas concentrações, o que é essencial para o desenvolvimento inicial do vegetal (PRASAD; SHIVAY, 2017).

Todavia, o consumo de espécies vegetais com alto teor de CaOx está associado a quadros de intoxicação renal (ABEYSEKERA *et al.*, 2015; MARQUES *et al.*, 2017). Uma vez ingerido, o CaOx é convertido em oxalato, que na presença de íons de cálcio presentes em todo o trato urinário pode precipitar e levar à formação de cristais de CaOx que podem se depositar ao longo do aparato urinário (AL-WAHSY *et al.*, 2012). Há uma preocupação com pacientes portadores de DCNTs como diabetes e hipertensão uma vez que são predispostos a desenvolverem complicações renais e, portanto, essas doenças constituem fatores de risco na gênese da urolitíase (CAMERON *et al.*, 2006; MAZZUCCHI, SROUGI, 2009; BOYD *et al.*, 2018).

Por fim, diversos métodos analíticos são aplicados na determinação de ácido oxálico em matrizes vegetais consumidas pela população. Dentre eles, destacam-se os cromatográficos (NGUYỄN, LÊ, SAVAGE, 2018; SHIRAI, 2019), os espectrofotométricos (ROCHA *et al.*, 2020) e os titulométricos (SRIKANTH, 2019, Sá *et al.*, 2019). Embora haja diversos estudos sobre métodos analíticos, escassos são os estudos que se preocuparam em desenvolver, aprimorar ou validar o

método em questão. Pois, há uma grande lacuna na literatura científica que aponta para a pouca confiabilidade dos métodos de determinação de ácido oxálico em matrizes vegetais.

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar metodologia para extração e quantificação ácido oxálico em *Artocarpus altilis (Parkinson) Fosberg*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Redigir uma revisão narrativa sobre o estado da arte do ácido oxálico e sua correlação com doenças crônicas não transmissíveis.
- Realizar uma revisão integrativa sobre metodologias analíticas aplicadas na determinação de ácido oxálico em espécies vegetais.
- Caracterizar o cristal de oxalato de cálcio em *Artocarpus altilis (Parkinson) Fosberg*.
- Desenvolver uma metodologia de quantificação de ácido oxálico por HPLC-DAD.
- Otimizar a extração da matriz vegetal de ácido oxálico via planejamento fatorial completo;

3 CAPÍTULO I

3.1 REVISÃO NARRATIVA

3.2 REVISÃO INTEGRATIVA

3.1 REVISÃO NARRATIVA

3.1.1 O papel do ácido oxálico na relação entre as doenças crônicas não transmissíveis e o consumo de plantas medicinais

INTRODUÇÃO

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) constituem, a nível mundial, um dos maiores problemas no tocante a mortes prematuras e perda da qualidade de vida, acarretando em limitações no cotidiano do indivíduo, gerando impactos nos âmbitos social e econômico. A epidemia de DCNT é impulsionada pela pobreza, globalização do marketing e comércio de produtos prejudiciais à saúde, além da rápida urbanização e crescimento populacional (WHO, 2018). A maioria dos casos registrados ocorre em pessoas que vivem em países de médio e baixo desenvolvimento, atingindo principalmente grupos populacionais vulneráveis, como idosos e pessoas de baixa renda (WHO, 2010).

A utilização de plantas medicinais é uma das formas mais antigas de tratamento. A utilização de plantas na prevenção e /ou tratamento de enfermidades sempre esteve presente na história da humanidade (SILVA; HAHN, 2011). Apesar do uso popularmente difundido, existem riscos na sua utilização descontrolada. Sem orientação médica, farmacêutica ou até mesmo comprovação científica de eficácia e identificação, a utilização inadequada de algumas espécies vegetais pode acarretar em intoxicações, neutralização ou potencialização farmacológica, (se utilizado concomitantemente com medicamentos alopáticos) conduzindo ao agravamento no quadro clínico do paciente e, em último caso, ao óbito (PEREIRA, 2017).

As plantas são constituídas por uma complexa matriz química, um conjunto de substâncias conhecidas e outras desconhecidas que têm o potencial de beneficiar ou maleficar o quadro clínico de uma pessoa. No Brasil, há um imenso uso de plantas medicinais como terapia adjuvante no tratamento de diversas DCNT, entretanto, Vieira (2017), mostrou que muitas plantas utilizadas comumente para esse propósito, apesar de demonstrarem efeito sobre os animais, não foram testadas em humanos. No âmbito científico, ainda há pouco conhecimento sobre as plantas utilizadas pela população, tanto no aspecto qualitativo quanto no quantitativo (SILVA; HAHN, 2011).

Um dos constituintes químicos mais comuns nas plantas é o ácido oxálico, encontrado na forma de CaOx (cristal de oxalato de cálcio) cujo acúmulo nos tecidos é comum em mais de 215

famílias botânicas (NAKATA, 2003). Cristais de CaOx também são reservas de cálcio que contribuem com as funções fisiológicas da espécie vegetal e regulam suas concentrações (PRASAD; SHIVAY, 2017). Espécies vegetais ricas em ácido oxálico e cristais de CaOx, como a *Spinacia oleracea* L, *Theobroma cacao* L. e *Averrhoa bilimbi* L. são tradicionalmente usadas como alimento ou medicamento. Esse uso é comum e geralmente não acarreta danos ao homem. Entretanto, se a quantidade de ácido oxálico e/ou cristais de CaOx ingerida gerar concentração plasmática $\geq 0,8-2,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e urinária $\geq 20-30 \text{ mg}/24\text{h}$ podem surgir severos agravos à saúde, principalmente a nível renal (CHAUHAN *et al.*, 2012). Ademais, portadores de doenças crônicas não transmissíveis normalmente apresentam distúrbios renais em decorrência de suas condições fisiopatológicas. A diabetes predispõe a litíase renal por ácido úrico, que juntamente com os cristais de CaOx, compõe a maioria dos cálculos renais (CAMERON *et al.*, 2006). Já a hipertensão também é apontada como outro fator que pode acarretar mais facilmente o desenvolvimento da litíase (OBLIGADO; GOLDFARB, 2008).

A supersaturação urinária é a principal condição para a precipitação de sais nos túbulos renais, como CaOx, com dano nas suas células e ulceração ao longo do trato urinário. Além disso, contribui para o desenvolvimento de cálculos renais (TSUJIHATA, 2008), com agravamento, principalmente, do quadro clínico de pessoas que têm uma vulnerabilidade maior em desenvolver tais fatores, como os portadores de DCNT. O conhecimento da quantidade de oxalato nos vegetais é, portanto, altamente relevante para a prevenção de danos renais (SIENER *et al.*, 2021).

METODOLOGIA

Foi realizada uma revisão narrativa, de natureza qualitativa. A revisão narrativa tem a finalidade de descrever o estado da arte de um determinado assunto e possibilitar uma discussão ampliada (ROTHER, 2007). Esta revisão apresenta-se como análise crítica e pessoal dos autores, sem a pretensão de generalização. Foi realizada no mês fevereiro de 2021. A busca bibliográfica foi realizada nas bases de dados Science Direct, PubMed, Scielo, Scopus e Google Acadêmico. Não foi determinada limitação de data, país do estudo ou área de conhecimento. Foram incluídos no estudo artigos originais primários, revisão de literatura, artigos de opinião, documentos técnicos e relatos de caso nos idiomas inglês e português. Foram excluídos artigos duplicados e com descrição insuficiente da metodologia.

RESULTADOS

DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS

Consoante a Organização Mundial da Saúde (OMS), as DCNT foram responsáveis por 38 milhões das 56 milhões de mortes em 2012 (WHO, 2014) e por 41 milhões das 57 milhões de morte em 2016 (WHO, 2018). Além disso, estima-se que que as DCNT são responsáveis por cerca de 71% das mortes globais a cada ano. A maioria dos casos registrados ocorre em pessoas que vivem em países de médio e baixo desenvolvimento, atingindo principalmente grupos populacionais vulneráveis, como idosos e pessoas de baixa renda (WHO, 2010).

Dentre as DCNTs, a diabetes e hipertensão arterial fazem parte do grupo das 4 mais relevantes do mundo e juntas ocasionam cerca de 19,5 milhões de mortes todos os anos (WHO, 2018). Essas doenças destacam-se pela gravidade de suas complicações que surgem a curto e longo prazo (agudas e crônicas). As complicações agudas da diabetes incluem a hipoglicemia, o estado hiperglicêmico hiperosmolar e a cetoácidos e diabética. Já as crônicas incluem a retinopatia, nefropatia, cardiopatia isquêmica, neuropatias, doença cerebrovascular e vascular periférica (CORTEZ *et al.*, 2015). Na hipertensão arterial as complicações incluem: doença cardíaca coronária, acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca congestiva, insuficiência renal e doença vascular periférica (ZHANG *et al.*, 2011). A doença renal crônica (DRC), bastante comum em pacientes com hipertensão arterial, pode ser definida como lesão renal caracterizada por alterações estruturais ou funcionais dos rins, com ou sem redução da taxa de filtração glomerular (TFG), manifestadas por alterações patológicas ou indícios de lesão renal (BORTOLOTTI, 2008). Além disso, a nefropatia diabética, caracterizada por um aumento na excreção urinária de albumina, acompanhado pelo aumento da pressão arterial e um declínio na TFG, também pode acarretar em quadros de DRC (MIN, *et al.*, 2012). Petterle; Barboza e Carvalho (2017), concluíram que indivíduos com valores mais elevados de glicemia de jejum são mais propensos a desenvolverem cálculos renais. Estudos demonstram que a síndrome metabólica, diabetes e hipertensão constituem fatores de risco para a formação de cálculos renais (SHAKHAEI *et al.*, 2012; TAYLOR; STAMPEER; CURHAN, 2005; CAMERON *et al.*, 2006; MAZZUCCHI; SROUGI, 2009; BOYD *et al.*, 2018).

Embora haja a necessidade de tratar essas doenças com medidas não farmacológicas como a dieta e atividade física, o tratamento principal consiste na utilização de medicamentos

específicos para cada doença. Um grande avanço tem sido feito nos cuidados básicos, proporcionando a existência de um grande leque de medicamentos convencionais e estratégias preventivas disponíveis contra as DCNTs; entretanto, há uma grande dificuldade de adesão ao tratamento e acesso aos medicamentos. Diante disso, as últimas décadas testemunharam um interesse renovado em terapias complementares ou adjuvantes por parte dos pacientes, como a utilização de plantas medicinais (CHINTAMUNNEE; MAHOMOODALLY, 2012).

PLANTAS MEDICINAIS

As plantas medicinais se constituem de quaisquer espécies vegetais com propriedades terapêuticas que são utilizadas como terapia principal ou adjuvante em diversas enfermidades e, portanto, são amplamente utilizadas por grande parte da população mundial. Uma grande parcela da população mundial tem confiança nos meios tradicionais para seus cuidados com a saúde e em torno de 80% da população, principalmente entre os países que estão em desenvolvimento, têm confiança nos derivados de plantas medicinais para seus cuidados com a saúde (FIRMO *et al.*, 2011).

A importância das plantas medicinais e seus efeitos terapêuticos vêm sendo constatados ao longo tempo. O conhecimento tradicional é uma ferramenta impulsora na descoberta dessas propriedades medicinais, sendo necessária à sua valorização e reconhecimento, pois mesmo com o desenvolvimento dos fármacos sintéticos as plantas medicinais permanecem como forma alternativa de tratamento no Brasil e no mundo (OLIVEIRA, 2017). Nesse contexto, Fitzgerald *et al.*, 2019, relatam o grande avanço na pesquisa científica envolvendo espécies vegetais no último século, além de marcos regulatórios e farmacopeicos importantes. O uso de plantas medicinais pela população em geral, além de ter apoio em evidências empíricas, também vem se fundamentando na pesquisa científica. A exemplo disso, diversos estudos relatam a atividade anti-diabética e anti-hipertensiva de diversas espécies vegetais que são utilizadas pela população (LATHA, PARI, NADU, 2004; XIE *et al.*, 2005; ANTIA; OKOKON; OKON, 2005; ADEMILUYI *et al.*, 2016; DORNAS *et al.*, 2009; AMAECHINA, OMOGBAI, 2007; SOUZA *et al.*, 2011; BERKE *et al.*, 2019; SALEHI *et al.*, 2019).

Em um estudo com 701 pacientes com DCNTs que fazem uso de plantas medicinais, Zeni *et al.*, (2017), mostram que a principal forma de preparo das drogas vegetais são os chás (infusões, decocções ou macerações) medicinais preparados a partir das folhas ou frutos (87%). Esses dados

corroboram com outros estudos que constataam a prevalência do preparo de chás medicinais a partir das folhas ou frutos de plantas medicinais para uso terapêutico (CHINTAMUNNEE, MAHOMOODALLY, 2012; HUGHES *et al.*, 2015; MELRO *et al.*, 2020).

Além do fácil preparo das formulações caseiras, muitas vezes as drogas vegetais suprem a falta de medicamentos nos serviços de saúde, estando presentes em diversas comunidades (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007; ALBUQUERQUE *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Não obstante a utilização de diversos remédios caseiros, Oliveira *et al.*, 2012, observaram que há uma prevalência do uso de planta medicinal. A alta incidência de uso de plantas medicinais possivelmente deve-se ao fácil acesso, baixo custo e por serem consideradas inofensivas por grande parte da população (FONTANELLA *et al.*, 2007). Com isso, programas vieram sido desenvolvidos ao longo do tempo como forma de reconhecer a prática popular de utilização de plantas medicinais. O Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, criado pelo Ministério da Saúde, em 2019, tem como objetivo “Promover e reconhecer as práticas populares e tradicionais de uso de plantas medicinais, fitoterápicos e remédios caseiros” (BRASIL, 2009).

TOXICIDADE DE PLANTAS MEDICINAIS

As espécies vegetais e suas partes formam uma matriz complexa que apresenta diversos tipos de substâncias conhecidas e desconhecidas que podem gerar efeitos tanto benéficos (terapêuticos) quanto maléficos (tóxicos). Há uma concepção errônea da população de que, por ser natural, o uso de plantas no tratamento de doenças é seguro e eficaz, sendo essas, muitas vezes, utilizadas nas DCNTs associadas ou não com medicamentos convencionais (TOVAR; PETZEL, 2009). Portanto, há uma séria preocupação a respeito da utilização indiscriminada de espécies vegetais pela população, principalmente em quem já apresenta predisposições.

As plantas medicinais são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, propagadas por seus usuários ou aqueles que as comercializam. Muitas vezes essas plantas são, inclusive, empregadas para fins medicinais diferentes daqueles utilizados pelas populações tradicionais (JUNIOR *et al.*, 2005). De acordo com os últimos dados do Sistema Nacional de Informações Tóxico-farmacológicas (SINITOX), em 2017, 1,08% do total de intoxicações no território nacional foi ocasionado pelo uso inadequado de espécies vegetais (SINITOX, 2020). O Quadro 1 traz de forma resumida exemplos dos principais efeitos tóxicos observados em algumas espécies vegetais consumidas pela população. Diversos são os agentes

tóxicos presentes em espécies vegetais (VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005; CHINTAMUNNEE; MAHOMOODALLY, 2012; CHEN *et al.*, 2018), como exemplo, o ácido oxálico, presente em inúmeras espécies é uma substância que pode levar a ação tóxica das espécies (Quadro 1)

Quadro 1 – Exemplos de espécies consumidas pela população e seus efeitos tóxicos.

Autor	Espécie	Usos	Efeitos tóxicos	Agente tóxico
RIDKER 1987;	Camellia sinensi	medicinal	Hepatotoxicidade, / cardiotoxicidade	Alcalóides
TSILIGIANN <i>et al.</i> , 2009	<i>Mandrago officinarum</i> L.	Medicinal	Cardiotoxicidade	ND
BAKUL <i>et al.</i> , 2013	<i>Averrhoa billimbi</i> L.	Alimentar/medic inal	Nefrotoxicidade	Ácido oxálico
KHNEIZER <i>et al.</i> , 2017	<i>Spinacia oleracea</i> L.	Alimentar	Nefrotoxicidade	Ácido oxálico
MORETES, GERON, 2019, OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2019	<i>Curcuma longa</i> L.	Alimentar/Medi cinal	Hepatotoxicidade / cancerígeno	ND
YASAWARD ENE <i>et al.</i> , 2020	<i>Averrhoa carambola</i> L.	Alimentar/medic inal	Nefrotoxicidade / neurotoxicidade	Ácido oxálico / Caramboxina

Abreviação: ND: não descrito.

ÁCIDO OXÁLICO

Características químicas

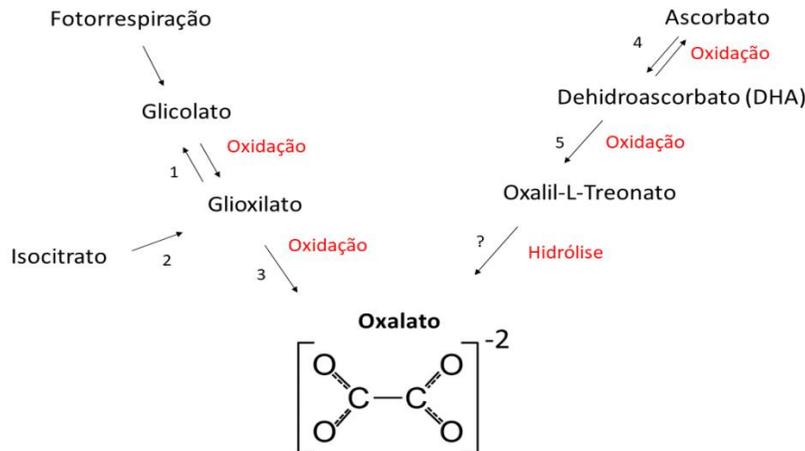
O ácido oxálico, na forma molecular ($C_2H_2O_4$) ou na forma sal de oxalato de cálcio ($CaOx$), é bastante empregado na química analítica para a padronização de soluções, como soluções titulantes de permanganato de potássio (HARRIS; LUCY, 2017). Inúmeros cátions metálicos formam precipitados quando se ligam ao ácido oxálico, como o Ca^{2+} , Na^{1+} (VOGEL, 1981). É um ácido dicarboxílico que cristaliza a partir de solução aquosa como cristal di-hidrato branco. O hidrato perde água acerca de $100^\circ C$ e o ácido anidro sublima, com decomposição, acima de $150^\circ C$. Além disso o ácido oxálico é um ácido relativamente forte ($pK_{a1} = 1,23$; $pK_{a2} = 4,19$) e é moderadamente solúvel em água (8,7 g / 100 g de água a $20^\circ C$) (HODGKINSON, 1970).

Biossíntese do ácido oxálico

As espécies vegetais produzem uma grande ordem de componentes orgânicos divididos em metabólitos primários e secundários. Os metabólitos secundários, produtos secundários ou produtos naturais, aparentemente não possuem relação com crescimento e desenvolvimento da planta. Por outro lado, os metabólitos primários possuem função estrutural, plástica e de armazenamento de energia (BORGES; AMORIM, 2020). Um desses metabólitos é o ácido oxálico.

A biossíntese do ácido oxálico vem sendo estudada desde a primeira metade do século passado. Pucher, Wakeman e Vickery (1939) relataram que em um estudo com trigo sarraceno a concentração de ácido oxálico aumentou durante a iluminação da planta. Além disso, a concentração de oxalato continuou a aumentar no escuro, embora em uma taxa mais baixa, indicando a transformação de alguma substância, provavelmente derivada da fotossíntese, em ácido oxálico. Uma relação muito próxima entre a formação de oxalato e a fotossíntese também foi encontrada em *Oxalis corniculata* por Seal e Sen (1970). A concentração de oxalato aumentou durante as horas de pico da fotossíntese e diminuiu durante a tarde e à noite, o que demonstra uma certa dependência das substâncias derivadas da fotossíntese. Eles propuseram que o glicolato derivado da fotossíntese é oxidado pela glicolato oxidase a glioxilato. O glioxilato é posteriormente oxidado em ácido oxálico pela mesma enzima. O oxigênio liberado pela fotossíntese é usado como um aceitador de elétrons durante a oxidação. Sabe-se também, que o gicolato pode ser derivado do isocitrato oriundo do ciclo de Krebs a partir da isocitrato Liase (MIYAGI *et al*, 2013) (Figura 1).

Figura1 - Rotas de biossíntese do ácido oxálico nas espécies vegetais.



Enzimas: 1:Glicolato Oxidase; 2: Isocitradoliase; 3: Glicolato Oxidase; 4: Ascorbato Peroxidase; 5: DHA oxidase. Fonte: Autor próprio (2021).

Todavia, o ácido glioxílico ou glioxilato não é a única substância que foi encontrada como precursor de oxalato em plantas. Pressupõe-se que em muitas espécies vegetais o metabolismo do ácido L-ascórbico, que pode ser sintetizado a partir da D-glicose, é envolvido na formação de oxalato (WAGNER; LOEWUS, 1973). Mais recentemente, essa hipótese foi confirmada por Dewhirst *et al.*, 2017. Os pesquisadores conduziram um experimento no qual utilizaram o ascorbato (oriundo da glicólise) marcado radioativamente nas folhas de espinafre e descobriram que durante sua degradação, o oxalato é o principal produto formado (Figura 1).

Na espécie humana, há evidências de que biossíntese do ácido oxálico envolve as mesmas enzimas que estão presentes nas espécies vegetais. O glioxilato, produto do metabolismo dos hepatócitos, é um dos principais precursores de oxalato no homem (FARGUE *et al.*, 2018). O ácido L-ascórbico também demonstrou ser um precursor importante de oxalato (WILLIAMS, 1978; FRANCESCHI, HORNER, 1980). Confirmando a hipótese anterior, há evidências de que a ingestão elevada de ácido ascórbico aumenta os níveis de oxalato urinário e pode levar à formação de cálculos de CaOx nos rins e outras regiões do sistema urinário (KING *et al.*, 2013).

Oxalato de Cálcio

Assim que formado, o ácido oxálico conjuga-se (principalmente) a íons de cálcio do interior celular, formando cristais de CaOx que ocorrem na maioria das espécies vegetais. Além

disso, esses cristais estão presentes tanto no meio intracelular quanto no meio extracelular. Quando formados no meio intracelular, as células que os comportam recebem o nome de idioblastos (NAKATA, 2012). Com base em sua morfologia, os cristais vegetais são frequentemente classificados em uma das cinco categorias: areia cristalina, ráfides, drusa, estiloide ou cristal prismático (FRANCESCHI; HORNER, 1980).

Em decorrência desse mecanismo de formação, o ácido oxálico / oxalato tem como principal função manter o controle dos níveis de cálcio e outros íons nos vegetais (FRANCESCHI; NAKATA, 2005). Muitas plantas, incluindo numerosas plantas de cultivo, acumulam oxalato na faixa de 3% -80% (p / p) de seu peso seco assim como 90% (p / p) do cálcio total de uma planta que ocorre na forma de cristais de CaOx (LIBERT; FRANCESCHI, 1987; HORNER, *et al.*, 1997). Em alguns casos, o excesso de cálcio na rizosfera (região onde o solo e as raízes das plantas entram em contato) favorece o acúmulo de cristais de CaOx ao passo que, com a limitação da absorção de cálcio na rizosfera, os cristais de CaOx dissolvem-se, remobilizando o cálcio ligado para o crescimento e desenvolvimento vegetal (FRANCESCHI, 1989; VOLK *et al.*, 2002).

Outra função extremamente importante exercida pelo CaOx está relacionada com a proteção contra a herbivoria. Como exemplo, a espécie *Tragia ramosa* tem sua superfície coberta de pelos ardentes. Cada pelo consiste em uma célula alongada que abrange um grande cristal de CaOx em forma de agulha que é capaz de causar rupturas na derme do animal. Dessa forma, a planta libera uma toxina que é canalizada através da agulha até o tecido do animal, causando uma sensação de ardência (THURSTON, 1976). Além disso, há evidências que sugerem que o ácido oxálico faz parte de um mecanismo de desintoxicação de metais pesados, como o alumínio, cádmio, zinco, níquel e cobre por meio da conjugação com esses metais e excreção na rizosfera (MARIANO *et al.*, 2005; OSMOLOVSKAYA; DUNG; KUCHAEVA, 2018).

Aspectos toxicológicos do ácido oxálico

Nas últimas décadas, o ácido oxálico ganhou maior enfoque científico, pois várias evidências sugeriam que o consumo dessa substância estava correlacionado com quadros de intoxicação, principalmente a nível renal (WILLIAMS, 1978; FRANCESCHI; HORNER, 1980; DAI *et al.*, 2013; ARAÚJO *et al.*, 2020). Apesar de não haver na literatura estudos toxicológicos completos, abordando aspectos como a toxicidade aguda e/ou crônica, alguns estudos abordam características toxicológicas importantes dessa substância. Após consumido, o ácido oxálico pode levar de 1 a 6 horas para ser absorvido (LIEBMAN, CHAI, 1997; SAVAGE, BROGEN, 2003). Há

certa escassez nos estudos relacionados aos mecanismos de absorção do ácido oxálico / oxalato, entretanto, algumas evidências apontam que o mesmo é absorvido, principalmente, a nível intestinal (MOKOTU *et al.*, 2006; TICINESI *et al.*, 2020). Whittamore e Hatch (2016), destacaram que o oxalato livre (não conjugado) é transportado ao longo do intestino delgado por transportadores aniônicos.

Um dos fatores que parecem estar envolvidos na regulação da absorção de oxalato oriundo da dieta é *Oxalo bacterformigenes* presente na microbiota intestinal. Esta bactéria é responsável pela metabolização (degradação) do oxalato oriundo da dieta (TICINESI; NOUVENNE; MESCHI, 2019). Todavia, ainda não há evidências concretas sobre a significância da presença ou ausência dessa bactéria na prevenção de quadros de hiperoxalúria e distúrbios renais (TICINESI *et al.*, 2020). Outro fator bastante relevante na absorção do oxalato da dieta, é a presença de sais inorgânicos. Os sais de cálcio, por exemplo, ligam-se ao oxalato, tornando-o insolúvel, impedindo sua absorção a nível intestinal e facilitando sua excreção (HOSSAIN *et al.*, 2003; VON UNRUH, 2004). Há evidências que a biodisponibilidade do oxalato reduz significativamente quando ingerido com leite (BROGREN, SAVAGE, 2003). Além disso, em seu estudo, Chai *et al.*, (2004), concluíram que a ingestão de altas quantidades de ácido ascórbico intensificou a síntese endógena de ácido oxálico. A contribuição do oxalato na dieta para a quantidade de oxalato excretado na urina é de até 50%, em média (HOLMES *et al.*, 2001). Ademais, a grande maioria do CaOx no corpo é excretada através dos rins onde 90-95% do CaOx circulante é eliminado na urina (COSTELLO; SADOVNIC, 1992). Já foi também observado que pacientes com nefrolitíase apresentam maior absorção de oxalato (HOLMES *et al.*, 2001, VESS *et al.*, 2006), inclusive em dietas com baixo nível de ingestão, como 10 mg/dia de oxalato, há efetiva absorção e contribuição significativa para excreção urinária de oxalato (HOLMES *et al.*, 2001).

As principais evidências da toxicidade agudam encontram-se em relatos de casos de ingestão acidental de ácido oxálico e da ingestão de espécies vegetais que contém altos níveis de oxalato. Dassanayak e Gnanathan (2012) relataram o caso de uma mulher que após ingerir aproximadamente 12,5g de ácido oxálico dissolvido em água, apresentou imediatamente dores abdominais. Após biópsia do tecido renal, foi verificado a presença de necrose epitelial de células tubulares ocasionado pela deposição de cristais de CaOx (DASSANAYAK; GNANATHASAN, 2012). Geralmente é considerado que a produção endógena de oxalato fornece a principal contribuição para o oxalato urinário e que a sua ingestão alimentar e absorção intestinal são fontes

menos importantes. No entanto, a dieta pode fornecer a quantidade crítica de oxalato necessário para desencadear a formação de cálculos renais (SIENER *et al.*, 2013). O consumo de alimentos com alto teor de ácido oxálico pode causar hiperoxalúria, uma vez que o oxalato é a base conjugada do ácido oxálico. Por sua vez o oxalato pode ligar-se a íons de cálcio presentes no trato urinário onde, posteriormente, poderá haver subsequente precipitação e formação de cristais de CaOx, um componente primário do cálculo renal (KHAN; GLENTON; BYER, 2007; AL-WAHSH; WU; LIEBMAN, 2012).

Siener *et al.*, (2013), verificaram que a ingestão, durante 6 semanas seguidas, de 600mg/dia de oxalato em um grupo controlado de indivíduos saudáveis composto por 10 homens e 10 mulheres, foi suficiente para levar os pacientes a um quadro de hiperoxalúria a partir da primeira semana. Para Ratkalkar e Kleinman (2011), a hiperoxalúria é um dos fatores de risco na formação do cálculo renal ou litíase urinária, pois contribui, cronicamente, para a dinâmica de formação do cálculo renal no qual é formado majoritariamente por CaOx. Portanto, há a sugestão de que é essencial a restrição de alimentos ricos em oxalato em pacientes com hiperoxalúria de origem dietética (HOLMES *et al.*, 2001). Diversos relatos apontam que a ingestão de algumas espécies vegetais com alto teor de ácido oxálico acarretam em nefrite túbulo intersticial aguda induzida pelo depósito de cristais de CaOx em um quadro que os autores chamaram de nefropatia induzida por oxalato após biópsia do tecido renal de pacientes hospitalizados (BAKUL *et al.*, 2013; ABEYSEKERA *et al.*, 2015; MAHMOOD, 2015; MARQUES *et al.*, 2017).

CONCLUSÃO

Os dados da literatura sugerem que o consumo de ácido oxálico parece estar envolvido no agravamento e/ou surgimento de problemas a nível renal, principalmente em pessoas que apresentam predisposição a desenvolver distúrbios nefrológicos, como os diabéticos e hipertensos. Embora estudos mais aprofundados precisem ser realizados para verificar a real correlação entre o consumo e o desfecho, a identificação de espécies que são consumidas pela população e quantificação do ácido oxálico contido, pode ajudar médicos e profissionais prescritores de plantas medicinais no manejo de pacientes predispostos a desenvolverem complicações renais.

REFERÊNCIAS

- ABEYSEKERA, R. A. *et al.* Star fruit toxicity: a cause of both acute kidney injury and chronic kidney disease: a report of two cases. **BMC Research Notes**, v. 8, p. 1–4, 2015.
- ADEMILUYI, A. O. *et al.* A comparative study on antihypertensive and antioxidant properties of phenolic extracts from fruit and leaf of some guava (*Psidium guajava* L.) varieties. **Comparative Clinical Pathology**, v. 25, n. 2, p. 363–374, 2016.
- AL-WAHSH. I. A.; WU. Y.; LIEBMAN, M. A Comparison of Two Extraction Methods for Food Oxalate Assessment. **Journal of Food Research**, v. 1, n. 2, p. 233-239, 2012.
- ALBUQUERQUE, U. P. *et al.* How ethnobotany can aid biodiversity conservation reflections on investigations in the semi-arid region of NE Brazil. **Biodiversity Conservation**, v. 18, p. 127-150, 2009
- ALBUQUERQUE, U.P.; Monteiro, J.M.; Ramos, M.A. & Amorim, E.L.C. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, p. 76-91, 2007.
- ANTIA, B. S.; OKOKON, J. E.; OKON, P. A. Hypoglycemic activity of aqueous leaf extract of *Persea americana* mill. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 37, n. 5, p. 325–326, 2005.
- ARAÚJO, L. *et al.* Sodium Oxalate-Induced Acute Kidney Injury Associated With Glomerular and Tubulo interstitial Damage in Rats. **Frontiers in Physiology**, v. 11, 2020.
- BAHMANI, M. *et al.* Medicinal plants and secondary metabolites for diabetes mellitus control. **Asian Pac J Trop Dis**, v. 4, n. 2, p. 687-692, 2014.
- BRASIL, ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada, RDC N° 18, 03/04/ 2013. **Boas práticas de processamento e armazenamento de plantas medicinais, preparação e dispensação de produtos magistrais e oficinais de plantas medicinais e fitoterápicos em farmácias vivas no âmbito**. 2013
- BRASIL, ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada, RDC N° 166, 24/07/2017. **Guia para validação de métodos analíticos**, 2017
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília MS; 2009.
- BRASIL, ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução. RDC N° 10, 09/03/2010. **Notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. p. 1–11, 2010.

- BAKUL, G. *et al.* Acute oxalate nephropathy due to ‘Averrhoabilimbi’ fruit juice ingestion. **Indian J Nephrol**, v. 23, n. 4, p. 297–301, 2013.
- BERKE, B. *et al.* A review of Algerian medicinal plants used in the treatment of diabetes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 238, n. April, p. 111841, 2019.
- BORGES, L. P.; AMORIM, V. A. metabólitos secundários de plantas. **Revista Agrotecnologia**, v. 11, n.1, p.54-67, 2020.
- BORTOLOTTI, L. A. Hipertensão arterial e insuficiência renal crônica. **Rev Bras Hipertens**, v.15, n.3, p. 152-155, 2008
- BOYD, C. *et al.* The influence of metabolic syndrome and its components on the development of nephrolithiasis. **Asian Journal of Urology**, v. 5, n. 4, p. 215–222, 2018.
- BROGREN, M.; SAVAGE, G. P. Bioavailability of soluble oxalate from spinach eaten with and without milk products. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 12, n. 2, p. 219–224, 2003.
- CAMERON, M. A. *et al.* Urine Composition in Type 2 Diabetes: Predisposition to Uric Acid Nephrolithiasis. **J Am Soc Nephrol**, v. 17, p. 1422–1428, 2006.
- CARTAXO, S.L., SOUZA, M. A., ALBUQUERQUE, U.P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern. **Brazil. J Ethnopharmacol**, v. 131, p. 326-342. 2010.
- CHAUHAN, N. *et al.* Immobilization of barley oxalate oxidase onto gold–nanoparticle-porous CaCO₃ microsphere hybrid for amperometric determination of oxalate in biological materials. **Clin. Biochem.** v. 35, p. 253-258, 2012.
- CHEN, Y. *et al.* Acute and chronic toxicity of a polyherbal preparation - Jueyin granules. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 1, p. 1–13, 2018.
- CHINTAMUNNEE, V.; MAHOMOODALLY, M. F. Herbal medicine commonly used against non-communicable diseases in the tropical island. of Mauritius. **Journal of Herbal Medicine**, v. 2, n. 4, p. 113–125, 2012.
- CORDEIRO, C. H. G.; CHUNG, M. C.; SACRAMENTO, L. V. S. DO. Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 272–278, 2005.
- CORTEZ, D. N. *et al.* Complicações e o tempo de diagnóstico do diabetes mellitus na atenção primária. **ACTA Paulista de Enfermagem**, v. 28, n. 3, p. 250–255, 2015.
- COSSEY, L. N.; RAHIM, F.; LARSEN, C. P. Oxalate Nephropathy and Intravenous Vitamin C. **YAJKD**, v. 61, n. 6, p. 1032–1035, 2013.

- COSTELLO, F.; SADOVNIC, J. Extrarenal Clearance of Oxalate Increases With Progression of Renal Failure in the Rat. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 3, n. 5, 1992.
- DAI, M. *et al.* Dietary Factors and Risk of Kidney Stone: A Case-Control Study in Southern China. **Journal of Renal Nutrition**, v. 23, n. 2, p. e21–e28, 2013.
- DASSANAYAKE, U.; GNANATHASAN, C. A. Acute renal failure following oxalic acid poisoning: a case report. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**, v. 7, n. 17, p. 1-4, 2012.
- DEWHISRT, R. A. *et al.* Novel insights into ascorbate retention and degradation during the washing and post-harvest storage of spinach and other salad leaves. **Food Chemistry**, v. 233, p. 237-246, 2017.
- DORNAS, W. C. *et al.* Efeitos antidiabéticos de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, p. 488–500, 2009.
- FANG, H. C., *et al.* Mechanisms of star fruit-induced acute renal failure. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 1744-1752, 2008.
- FARGUE, S. *et al.* Hydroxyproline metabolism and oxalates synthesis in primary hyperoxaluria. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 29, n. 6, p. 1615–1623, 2018.
- FIRMO, W. C. A. *et al.* Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Caderno de pesquisa**, São Luís-MA. v. 18, 2011.
- FITZGERALD, M.; HEINRICH, M.; BOOKER, A. Medicinal plant analysis: A historical and regional discussion of emergent complex techniques. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 1–14, 2019.
- FONTANELLA, F. *et al.* Conhecimento, acesso e aceitação das práticas integrativas e complementares em saúde por uma comunidade usuária do Sistema Único de Saúde na cidade de Tubarão – SC. **Arq Catarin Med**, v. 36, n. 2, p. 69-74, 2007.
- FRANCESCHI, V. R. Calcium oxalate formation is a rapid and reversible process in *Lemna minor* L. **Protoplasma**, v. 148, p. 130–137, 1989.
- FRANCESCHI, V. R.; HORNER, H. T. Calcium oxalate crystals in plants. **The Botanical Review**, v. 46, n. 4, p. 361–427, 1980.
- FRANCESCHI, V. R.; NAKATA, P. A. Calcium oxalate in plants: Formation and function. **Annual Review of Plant Biology**, v. 56, p. 41–71, 2005.
- HARRIS, C. D.; LUCY, C. A. **Análise química quantitativa**. 9. Ed. Rio de Janeiro: LTC. 2017.

- HODGKINSON, A. Determination of Oxalic Acid in Biological Material. **Medical Research Council**, v. 16, n. 7, p. 547–557, 1970.
- HOFFMANN, R.; ANJOS, M. D. C. R. DOS. Construção histórica do uso de plantas medicinais e sua interferência na socialização do saber popular. **Guaju**, v. 4, n. 2, p. 142, 2018.
- HOLMES, R. P., GOODMAN H. O., ASSIMOS D. G. Contribution of dietary oxalate to urinary oxalate excretion. **Kidney Int**, v.59, p.270-6. 2001
- HORNER, H. T. ILARSAN, H. PALMER, R. G. CALCIUM OXALATE CRYSTALS IN DEVELOPING SOYBEAN SEEDS. **Scanning Microscopy International**, v. 13, n. 2-3, p. 321-339, 1997.
- HOSSAIN, R. Z. *et al.* Urinary oxalic acid excretion differs after oral loading of rats with various oxalate salts. **International Journal of Urology**, v. 10, n. 1, p. 43–48, 2003.
- HUGHES, G. D. *et al.* Characterizing Herbal Medicine Use for Noncommunicable Diseases in Urban South Africa. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-10, 2015.
- JUNIOR, V. V., PINTO, A. plantas medicinais: cura segura?. **Química Nova**, v. 28, n.3, p. 519-528, 2005.
- KHAN, S. R.; GLENTON, P. A.; BYER, K. J. Dietary Oxalate and Calcium Oxalate Nephrolithiasis. **The journal of nephology**, v. 178, p. 2191–2196, 2007.
- KHNEIZER, G. *et al.* Chronic dietary oxalate nephropathy after intensive dietary weight loss regimen. **J Nephrothol**, v. 6, n. 3, p. 126-129, 2017
- KING, D. E. *et al.* Ascorbic acid Supplements and Kidney Stone Incidence Among Men: A prospective Study. **Jama Intern Med**, v. 173, n. 5, p. 386-388, 2013.
- LATHA, M.; PARI, L.; NADU, T. Effect of an aqueous extract of *Scoparia dulcis* on blood glucose plasma insulin and some polyol pathway enzymes in experimental rat diabetes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 577–586, 2004.
- LIBERT, B.; FRANCESCHI, V. R. Oxalate in Crop Plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 35, n. 6, p. 926–938, 1987.
- LIEBMAN, M.; CHAI, W. Effect of dietary calcium on urinary oxalate excretion after oxalate loads. **American J Clinical Nutrition**, v, 65, p. 1453-1459, 1997.
- MAHMOOD, N. Star Fruit Intoxication. **Akmmc j**, v. 6, n. 2, p. 30–33, 2015.
- MARIANO, E. D. *et al.* Metabolism and Root exudation of organic acid anions under aluminium stress. **Braz. J. Plant Physiol**, v 17, n. 1, p. 157-172, 2005.

- MARINHO, M.G.V, *et al.* Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em área de caatinga no município de São José de Espinharas, Paraíba, Brasil. **Rev Bras Plantas Med**, v. 13, n.2, p. 170-182, 2001.2011
- MARQUES, S. *et al.* Teaching Case A Case of Oxalate Nephropathy: When a Single Cause Is Not Crystal Clear. **American Journal Kidney Diseases**, v. 70, p. 722–724, 2017.
- MAZZUCCHI, E.; SROUGI, M. O que há de novo no diagnóstico e tratamento da litíase urinária? **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 55, n. 6, p. 723–728, 2009.
- MELRO, J. C. L. *et al.* Erratum: Ethnobotanical study of Medicinal plants used by the population assisted by the “Programa de Saúde da Família” (Family Health Program) in Marechal Deodoro – AL. **Brazilian Journal of Biology**, v. 80, n. 1, p. 231, 2020.
- MIN, T. Z. *et al.* Renal complications of diabetes. **British Medical Bulletin**, v. 104, n. 1, p. 113–127, 2012.
- MIYAGI, A. *et al.* An antagonist treatment in combination with tracer experiments reveals the disacrylate pathway of oxalate biosynthesis in *Rumex obtusifolius* L. **Metabolomics**, v. 9, n. 3, p. 590–598, 2013.
- MOREIRA, F. G. *et al.* Intoxicação por carambola em paciente com insuficiência renal crônica: relato de caso. **Revista Brasileira Ter Int**, v. 22, n. 1, p. 395–398, 2010
- MOKOTO, M., *et al.* Gastrointestinal oxalic acid absorption in calcium-treated rats. **Urol Res**, v. 34, p. 168-172, 2006.
- NAKATA, P. A. Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. **Plant Sci**, v.164, n.6, p. 901-909, 2003.
- NAKATA P. A. Plant calcium oxalate crystal formation, function, and its impact on human health. **Front Biol**, v. 7, p. 254–266, 2012.
- OBLIGADO, S. H.; GOLDFARB, D. S. The Association of Nephrolithiasis With Hypertension and Obesity: A Review. **American Journal of Hypertension**. v. 21, n. 3, p. 257-264, 2008.
- OLIVEIRA, S. G. D, *et al.* An ethnomedical survey on phytotherapy with professionals and patients from Care Units in the Brazilian Unified Health System. **J Ethnopharmacol**, v. 140, n. 2 p. 428-437, 2012.
- OLIVEIRA, R. L. C. *et al.* Conservation Priorities and population structure of woody medicinal plants in area of caatinga vegetation (Pernambuco state, NE Brazil). **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 132, p. 189-206, 2010.
- OLIVEIRA, C. J. Determinação do teor de ácido oxálico presente na carambola e sua influência na bioquímica renal. 2017. 73f. Monografia. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia

(IFBA). Vitória da Conquista, 2017.

OSMOLOVSKAYA, N.; DUNG, V. V.; KUCHAEVA, L. The role of organic acids in heavy metal tolerance in plants. **Biological Communications**, v. 63, n. 1, p. 9–16, 2018.

PEREIRA, W. A. *et al.* Estudo do consumo de plantas medicinais obtidas em feiras livres de São Luís, para o tratamento de doenças crônicas. **Rev. Ceuma Perspectivas**, v.30, n.2, p.174-175, 2017.

PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Review**, v. 6, n. 11, p. 1-5, 2012.

PETTERLE, R. R, *et al.* Fatores de risco associados à nefrolitíase recorrente via regressão logística binária. **Rev. Bras. Biom**, v. 35, n.2, p.348-360, 2017

PRASAD, R.; SHIVAY, Y. S. Oxalic acid/oxalates in plants: From self-defence to phytoremediation. **Current Science**, v. 112, n. 8, p. 1665–1667, 2017.

PUCHER, G. W.; WAKEMAN, A. J.; VICKERY, H. B. Organic Acid Metabolism of the Buck wheat Plant. **Plant Physiology**, v. 14, n. 2, p. 333–340, 1939.

RATKALKAR, V. N.; KLEINMAN, J. G. Mechanisms of stone formation. **Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism**, v. 9, n. 3–4, p. 187–197, 2011.

RIDKER, PAUL M. Toxic Effects of Herbal Teas. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, v. 42, n.3, p. 133–136, 1987.

SALEHI, B. *et al.* Antidiabetic Potential of Medicinal Plants and Their Active Components. **Biomolecules**, v. 9, n. 551, p. 2-111, 2019.

SAVAGE, G. P., BROGEN, M. Bioavailability of soluble oxalate from spinach eaten with and without milk products. **Asia Pacific J clin Nutr**, v. 12, n. 2, p. 219-224, 2003.

SEAL, S. N.; SEN, S. P. The photosynthetic production of oxalic acid in *Oxalis corniculata*. **Plant and Cell Physiology**, v. 11, n. 1, p. 119–128, 1970.

SHAKAEE. K.; MALAOUF. N.M. Kidney stones: Pathogenesis, Diagnosis and Management, **J Clin Endocrinol Metab**, v. 97, p.1847-1860, 2012.

SIENER, R. *et al.* Dietary hyperoxaluria is no treduced by treatment with lactic acid bacteria. **Journal of Translational Medicine**, v. 11, n. 306, p. 1–7, 2013.

SIENER, R. *et al.* Oxalate-rich Foods. **Food Science and Technology**, v. 41, n.1, p. 169-173, 2021

SILVA, B. Q.; HAHN, S. R. Uso de plantas medicinais por indivíduos com hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus ou dislipidemias. **Rev. Bras. Farm. Hosp. Serv. Saúde São Paulo**, v.2. n.3, p. 36-40, 2011.

SINITOX (Sistema Nacional de Informações Toxicofarmacológicas) [online]. **Registros de Intoxicações**. Disponível em <<https://sinitox.icict.fiocruz.br/dados-nacionais>> Acesso em 03/01/2021.

SOUZA, P. *et al.* Hypotensive mechanism of the extracts and artemetin isolated from *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) in rats. **Phytomedicine**, v. 18, n. 10, p. 819–825, 2011.

TAYLOR, E. R. I. C. N. T.; STAMPFER, M. E. I. R. J. S.; CURHAN, G. A. R. Y. C. C. Diabetes mellitus and the risk of nephrolithiasis. **Kidney internacional**, v. 68, p. 1230–1235, 2005.

THURSTON, E. L. Morphology, Fine Structure and Ontogeny of the Stinging Emergence of *Tragia ramosa* and *T. Saxicola* (Euphorbiaceae). **American Journal of Botany**, v. 63, n. 6, p. 710, 1976.

TICINESI, A. *et al.* Calcium oxalate nephrolithiasis and gut microbiota: Not just a gut-kidneyaxis. a nutritional perspective. **Nutrients**, v. 12, n. 2, 2020.

TICINESI, A.; NOUVENNE, A.; MESCHI, T. Gut microbiome and kidney stone disease: not just na Oxalobacterstory. **Kidney International**, v. 96, n. 1, p. 25–27, 2019.

TOVAR, T. R.; PETZEL, M. R. Herbal toxicity. **Disease-a-Month**, v. 55, n. 10, p. 592-641, 2009.

TSUJIHATA, M. Mechanism of calcium oxalate renal stone formation and renal tubular cell injury. **International Journal of Urology**, v. 14, n. 2, p. 115-120, 2008

TSILIGIANNI, G. I. *et al.* A two cases clinical report of mandragora poisoning in primary care in Crete, Greece: two case report. **Cases Journal**, v. 2, n. 9331, p. 1-3, 2009.

VEIGA, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Medicinal plants: Safe cure? **Quimica Nova**, v. 28, n. 3, p. 519–528, 2005.

VOGEL, A. I. **Química analítica qualitativa**. 5 ed. São Paulo: Mestre Jou, 1981.

VOLK, G. M. *et al.* The role of druse and raphide calcium oxalate crystals in tissue calcium regulation in Pistiastratiotes leaves. **Plant Biology**, v. 4, n. 1, p. 34–45, 2002.

VON UNRUH, G. E. *et al.* Dependence of oxalate absorption on the daily calcium intake. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 15, n. 6, p. 1567–1573, 2004.

VOSS, S., *et al.* Intestinal oxalate absorption is higher in idiopathic calcium oxalate stone formers than in healthy controls: measurements with the [(13)C2] oxalate absorption test. *J Urol*, v.175, n.5, p. 1711-1715, 2006.

WAGNER, G.; LOEWUS, F. The Biosynthesis of (+)-Tartaric Acid in *Pelargonium crispum*. *Plant Physiology*, v. 52, n. 6, p. 651–654, 1973.

WHO. World Health Organization. **Global status report on noncommunicable diseases 2014**. Geneva: WHO Press, 2014.

WHO. World Health Organization. **Global status report on noncommunicable diseases 2010**. Italy.

WHO. World Health Organization. **Noncommunicable diseases country profiles 2018**. Switzerland.

WHO. World Health Organization. **global report on traditional and complementary medicine 2019**. Geneva

WILLIAMS, H. E. Oxalic acid and the hyperoxaluric syndromes. *Kidney International*, v. 13, n. 5, p. 410–417, 1978.

XIE, J. *et al.* Antihyperglycemic effects of total ginsenosides from leaves and stem of *Panax ginseng*. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 26, n. 9, p. 1104–1110, 2005.

YASAWARDENE, P., *et al.* Mechanisms of star fruit (*Averrhoa carambola*) toxicity: A mini-review. *Toxicon*, v. 187, p 198-202, 2020.

ZENI, A. L. B. *et al.* Utilização de plantas medicinais como remédio caseiro na Atenção Primária em Blumenau, Santa Catarina, Brasil. *Ciência e Saúde Coletiva*, v. 22, n. 8, p. 2703–2712, 2017.

ZHANG, M. *et al.* Major inducing factors of hypertensive complications and the interventions required to reduce the prevalence: Na epidemiological study of hypertension in a rural population in China. *BMC Public Health*, v. 11, p. 1–8, 2011.

3.2 REVISÃO INTEGRATIVA

3.2.1 Artigo – Métodos de extração e quantificação de ácido oxálico em matrizes vegetais: Revisão Integrativa

RESUMO: Espécies vegetais são largamente consumidas ao redor do mundo, tanto para fim alimentar quanto medicamentoso. Já é relatado que o consumo de ácido oxálico, presente em espécies vegetais, pode ocasionar intoxicações renais a curto e longo prazo. Ademais, há poucos estudos voltados para a identificação e quantificação dessa substância em espécies vegetais consumidas pela população. Este trabalho objetivou uma revisão integrativa acerca dos métodos de quantificação do ácido oxálico em espécies vegetais consumidas. A revisão integrativa da literatura do período de 2010 a 2020 foi realizada através das plataformas ScienceDirect, Web of Science, Scopus, Pubmed e Scielo. Ao todo, foram identificados 808 estudos e ao final da etapa, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão estabelecidos, 21 estudos foram incluídos nesta revisão. Os resultados mostram que a maior parte dos estudos utilizam métodos cromatográficos na quantificação do ácido oxálico em espécies vegetais, seguido por métodos espectrofotométricos e titulométricos. Foi evidenciado a ausência de fidelidade nos resultados da maior parte dos estudos, já que não houve validação da metodologia de quantificação proposta.

Palavras-chave: Ácido oxálico, espécies vegetais, quantificação

INTRODUÇÃO

Espécies vegetais apresentam diferentes composições químicas. Elas produzem inúmeros componentes orgânicos que podem ser divididos em dois grandes grupos: Metabólitos primários e secundários. Metabólitos primários estão presentes em todas as espécies vegetais em grande quantidade e são responsáveis pelas suas funções vitais. Metabólitos secundários têm uma distribuição mais restrita e estão presente em pequena quantidade e são responsáveis por funções secundárias, como proteção, pigmentação e regulação do crescimento.

Ainda, metabólitos secundários diminuem o valor nutricional das espécies vegetais, pois geralmente são obtidos a partir de seus nutrientes essenciais, o que reduz sua disponibilidade, ingestão e / ou absorção (SOUZA *et al*, 2019). Entre os componentes orgânicos antinutricionais podemos citar os taninos, saponinas, inibidores de proteases, ácido fítico e ácido oxálico

(HIGASHIJIMA *et al* 2020). Soma-se a isso, importantes efeitos farmacológicos e toxicológicos dose-dependentes dos metabólitos secundários no homem: Benefícios ao organismo (dose efetiva); efeitos adversos (dose tóxica) e em casos extremos, ao óbito (dose letal) (PEREIRA; CARDOSO, 2012; ROCKENBACH *et al*, 2018).

O ácido oxálico, ou ácido etanodióico, ($H_2C_2O_4$) é um ácido dicarboxílico muito usado na produção de moléculas orgânicas complexas uma vez que sua capacidade redutora e ponto de sublimação (≥ 125 °C) tornam a purificação de moléculas orgânicas voláteis, por meio de calor, mais fácil e de menor custo (SONG *et al*, 2012). O ácido oxálico obtido a partir de organismos vivos ou como produto de síntese laboratorial é usado em diversas áreas, como na produção de medicamentos, tecidos e couros e na purificação de equipamentos metálicos (SONG *et al*, 2013).

Naturalmente, o ácido oxálico é biossintetizado por bactérias, fungos e plantas (PALMIERE *et al*, 2018). Nas plantas, o ácido oxálico é convertido a CaOx via biomineralização (HE *et al*, 2014). Esse processo ocorre por diferentes vias a partir da captação de cálcio do substrato das plantas que contém ácido oxálico. Entre as vias podemos citar: a oxidação do glicolato e glioxilato pela enzima glicolato oxidase, a fotorrespiração nos tecidos fotossinteticamente ativos, a atividade da isocitratoliase no isocitrato e da oxidação do oxaloacetato. A conversão de ácido oxálico à CaOx pode ocorrer em uma série de espécies vegetais. Nesses casos, cristais de CaOx com diferentes formas e tamanhos são encontrados tanto no interior quanto no exterior das células vegetais (FRANCESCHI; NAKATA, 2005). Entre as espécies ricas em ácido oxálico e CaOx podemos citar: carambola (*Averrhoa Carambola*) jaqueira (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg.), maxixe (*Cucumisanguria* Lam.), picão-preto (*Bidens pilosa* L.), abacate (*Persea americana* Mill.), melão de São Caetano (*Momordicacharantia* L.), mangaba (*Hancorniaspeciosa* Gomes), pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), chá verde / chá preto (*Camelliasinensis* L.), espinafre (*Spinaciaoleracea* L.), acelga (*Beta vulgaris* L. var. cicla) e cacau (*Theobromacacao* L.) (SCARDELATO; LEGRAMANDI; SACRAMENTO, 2013).

As funções do ácido oxálico e dos cristais de CaOx nas espécies vegetais são variadas. Por exemplo, os cristais de CaOx são reservas de CO_2 que permitem a fotossíntese dessas espécies mesmo nos períodos de estiagem e evitam sua desidratação (TOOULAKOU *et al*, 2016). Cristais de CaOx também são reservas de cálcio que contribuem com as funções fisiológicas da espécie vegetal e regulam suas concentrações de ácido oxálico e de cálcio; em grandes quantidades esses componentes orgânicos podem levar a uma série de alterações nessas funções (PRASAD;

SHIVAY, 2017). Ainda, ácido oxálico e CaOx são agentes quelantes secretados por algumas espécies vegetais para sua proteção em solos ricos em metais tóxicos como o alumínio (MORITA *et al.*, 2011). Outra função desses compostos orgânicos é na defesa das espécies vegetais contra predadores como os herbívoros. Após serem dilaceradas, para aumentar a proteção contra herbívoros, as espécies vegetais produzem maior quantidade de CaOx independentemente da concentração de cálcio no seu substrato (MOLANO, 2011).

Soma-se a essas ações, uma série de efeitos fisiológicas do ácido oxálico e CaOx na espécie humana. Espécies vegetais ricas em ácido oxálico e cristais de CaOx são tradicionalmente usadas como alimento ou medicamento. Entretanto, se a quantidade de ácido oxálico e/ou cristais de CaOx ingerida gerar concentração plasmática $\geq 0,8-2,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e urinária $\geq 20-30 \text{ mg}/24\text{h}$ podem surgir severos agravos a saúde (CHAUHAN *et al.*, 2012). Siener *et al.*, (2013), verificaram que a ingestão, durante 6 semanas seguidas, de 600 mg/dia de oxalato em um grupo controlado de 10 homens e 10 mulheres, foi suficiente para levar os pacientes a um quadro de hiperoxalúria a partir da primeira semana e 4 semanas após a suspensão da administração de oxalato de cálcio, os níveis plasmáticos e de excreção de oxalato voltaram ao normal. Para Ratkalkar e Kleinman (2011), a hiperoxalúria é um dos fatores de risco na formação do cálculo renal ou litíase urinária, pois contribui para a dinâmica de formação do cálculo renal que é formado majoritariamente por CaOx. Ademais, há relatos que a ingestão do fruto e do suco do fruto da carambola acarretou em nefrite tubulointersticial aguda induzida pelo depósito de CaOx em um quadro que os autores chamaram de nefropatia induzida por carambola e bilimbi, após biopsia do tecido renal de pacientes hospitalizados (BAKUL *et al.*, 2013; ABEYSEKERA *et al.*, 2015). Ademais Fanget *al.*, (2008) discutem que a ingestão do suco das frutas com alto teor de CaOx pode induzir insuficiência renal aguda associada a lesão na estrutura do néfron seguida de dilatação nos túbulos renais em decorrência da deposição de cristais de CaOx.

Soma-se a isso que algumas enfermidades como diabetes e hipertensão constituem fatores de risco para a formação da urolitíase (SHAKAEE *et al.*, 2002; TAYLOR; STAMPEER; CURHAN, 2005; CAMERON *et al.*, 2006; SROUGI; MAZZUCCHI, 2009; BOYD *et al.*, 2018). Portanto, a ingestão tradicional de espécies vegetais ricas em ácido oxálico, por indivíduos com função renal reduzida, deve ser cuidadosamente mensurada. Há na literatura científica uma série de métodos analíticos de determinação de ácido oxálico em diferentes espécies vegetais (NAPPI *et al.*, 2006; NAIK *et al.*, 2014; SIENER *et al.*, 2016), todavia, não há estudo que compile, categorize,

analise e discuta essas metodologias de forma integrada. Assim, este estudo objetiva uma revisão integrativa dos métodos de quantificação do ácido oxálico em diferentes espécies vegetais visando identificar as características de cada um e sua adequabilidade na quantificação de ácido oxálico, contribuindo com a compreensão acerca dos métodos de análise e dos níveis de ácido oxálico nas diferentes espécies vegetais de modo a agregar conhecimento e fornecer subsídio para pesquisadores e profissionais da área.

METODOLOGIA

De acordo com os critérios descritos por Russel *et al* (2005), o método de revisão integrativa foi escolhido no presente estudo. Na construção da revisão, a pergunta norteadora foi “Qual ou Quais métodos analíticos existem para a determinação de ácido oxálico em espécies vegetais?” Foram incluídos (i) estudos primários de quantificação de ácido oxálico/oxalato em matrizes vegetais, (ii) artigos publicados na íntegra, disponíveis eletronicamente, em português, espanhol ou inglês, (iii) publicados entre 2010-2020. Foram excluídos editoriais, (i) cartas ao editor, (ii) monografias, (iii) dissertações, (iv) teses, (v) relatos de experiência e (vi) estudos de revisão, reflexivos ou sem descrição detalhada da metodologia analítica.

Buscas em cinco bases de dados - Literatura Latino-Americana em Ciências de Saúde (LILACS), ScienceDirect, Scielo, Pubmed e Scopus foram feitas em setembro de 2020. Os descritores usados foram "oxalic acid" and "calcium oxalate" and "content" and ("plant" OR "stem" OR "leaves" OR "root" OR "fruit" OR "tea" OR "vegetable" OR "juice"). Após identificação e análise dos títulos e seus resumos, os estudos selecionados foram analisados na íntegra. Essas etapas foram feitas em paralelo por dois revisores de forma independente. O viés de seleção dos artigos foi medido por meio do Risk of Bias in Systematic Reviews (ROBIS). O domínio dos critérios de identificação e seleção dos estudos foram classificados como de “baixo risco de viés”.

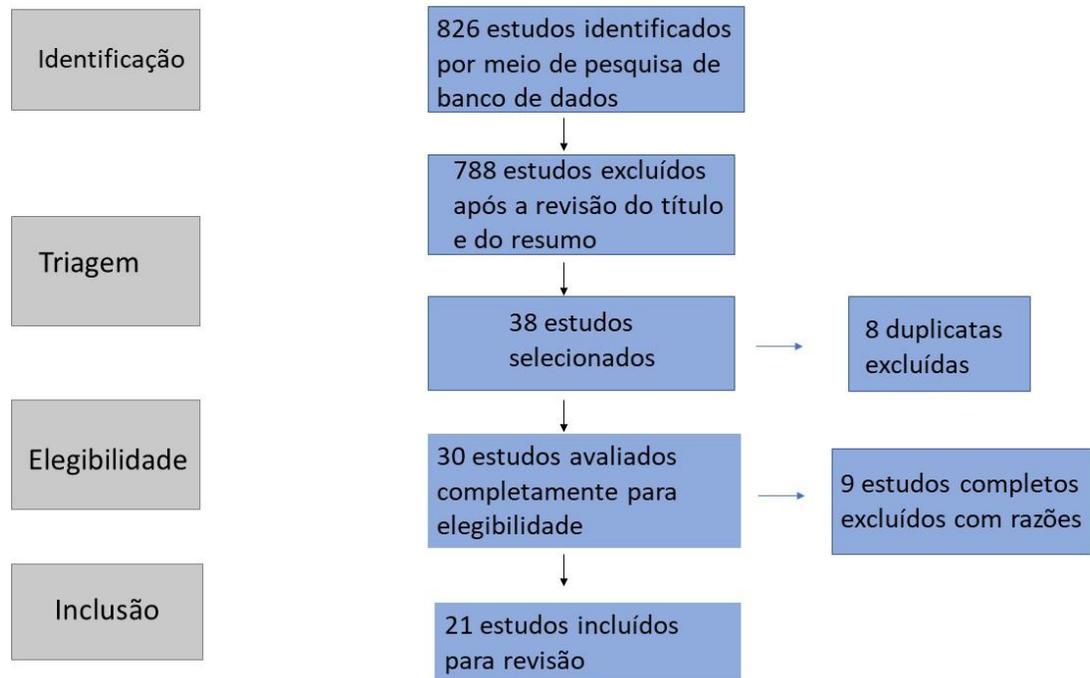
A extração de dados dos artigos selecionados foi feita em paralelo por dois revisores de forma independente. O 1º revisor analisou e categorizou cada artigo de acordo com o desenho do estudo. O 2º revisor checkou os dados extraídos e um consenso entre os revisores foi necessário para que as todas as informações relevantes fossem incluídas no estudo. Os dados extraídos foram: (i) 1º autor e ano de publicação, (ii) local do estudo, (iii) objetivo, (iv) parte da espécie vegetal utilizada (v) tipo de extração, (vi) instrumento analítico, (vii) método de quantificação, (viii) intervalo de concentração de ácido oxálico/oxalato, (xv) condições de análise, (xvi) condições de extração,

(xvii) validação metodológica (realização ou não de validação metodológico, bem como os parâmetros avaliados).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Scopus, Web of Science, Pubmed, Scielo e Science Direct retornaram 128, 43, 59, 3 e 593 estudos, respectivamente, totalizando 826 estudos. Desses, 38 foram selecionados para análise na íntegra. Após análise na íntegra, 6 estudos foram excluídos por descrição insuficiente da metodologia analítica usada para a determinação do ácido oxálico ou por descrição insuficiente do método. 3 estudos foram excluídos por não utilizarem espécies vegetais consumidas pela população e 8 foram excluídos por serem estudos duplicados. Os demais estudos (N=21) experimentais quantitativos atenderam à avaliação da qualidade e foram incluídos nessa revisão integrativa. Na Figura 1 é mostrado o fluxograma da pesquisa estratégica na literatura científica.

Figura 2 - Fluxograma da pesquisa estratégica na literatura científica.



A grande variedade de espécies e famílias catalogadas sugere a importância de quantificar o ácido oxálico em espécie vegetais consumidas pela população, tanto para uso alimentar, quanto para uso medicinal, seja na forma de chá, cozidos ou cru. Ao todo, 132 espécies vegetais foram analisadas (Quadro 2) nas quais a maior parte pertencente à família Rosaceae e Actinidiaceae. A parte das espécies vegetais analisadas foi: Frutos (41,6%); Folhas (18,7%); Raiz (11,8%); Sementes (11,1%); Flor (11,1%); ‘microgreens’ e caules (5,7%). Segundo Franceschi e Horner, (1980), os cristais de oxalato estão majoritariamente presentes nas folhas e frutos das espécies vegetais, isso pode explicar o fato dessas partes serem as mais analisadas nos estudos. Além disso, em um estudo com 701 pacientes com DCNTs que fazem uso de plantas medicinais, Zeni *et al.*, (2017), mostram que a principal forma de preparo das drogas vegetais são os chás medicinais preparados a partir das folhas ou frutos (87%).

Grande parte das espécies é de interesse alimentar, entretanto, o uso medicinal e popular no tratamento de DCNTs, como hipertensão e diabetes, foi observado em algumas dessas espécies: *Ginkgo biloba* L.; *Annona muricata* L e *A. squamosa* L.; *Psidium guajava* L.; *Cratogeomys* L. (MARTINS *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2010; WANG, XIONG, FENG, 2013; NASH, SHAH, 2015; ADEMILUYI *et al.*, 2015). Vale destacar que a família Oxalidaceae engloba 8 gêneros e 601

espécies ao redor do mundo (THE PLANT LIST, 2013). As espécies do gênero *Oxalis* são conhecidas como *trevinhos* ou *azedinhas*, pois apresentam altas concentrações de ácido oxálico, sendo por vezes utilizadas na forma de saladas ou refogadas, consideradas plantas alimentares não convencionais (KINUPP, LORENZI, 2014). Alguns estudos quantificaram o ácido oxálico em espécies do gênero *Averrhoa* (Família Oxalidaceae), como *Averrhoa carambola* L. e *Averrhoa bilimbi* L., espécies bastante consumidas pela população. Destaca-se que na literatura há relatos de quadros de intoxicação renal aguda em decorrência do consumo em grande quantidade dessas espécies (ABEYSEKERA *et al.*, 2015), em decorrência disso, há recomendações médicas proibindo o consumo dessas espécies por pacientes com problemas renais ou predisposição em desenvolvê-los (OLIVEIRA, AGUIAR, 2015).

Quadro 2 - Sumarização de todas as espécies vegetais e respectivas famílias quantificadas nos estudos selecionados, bem como a parte do vegetal utilizada.

Espécie	Família	Parte utilizada	Espécie	Família	Parte utilizada
<i>Actinidia arguta</i> L.	Actinidiaceae	Frutos	<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam.	Convolvulaceae	Folhas
<i>Actinidia chinensis</i> L.	Actinidiaceae	Frutos	<i>Juglans regia</i> L.	Juglandaceae	Nozes
<i>Actinidia deliciosa</i> L.	Actinidiaceae	Frutos	<i>Lablab purpurens</i> (L.) Sweet	Fabaceae	Flor e Frutos
<i>Allium cepa</i> L. var. Light Red Gavran	Amaryllidaceae	Raiz	<i>Lactuca sativa</i> L. var. longifolia Lam.	Asteraceae	Folhas
<i>Allium sativum</i> L.	Amaryllidaceae	Raiz	<i>Lagenaria siceraria</i> (Molina) Standl.	Curcubitaceae	Flor e fruto
<i>Allium tuberosum</i> Rottler ex Spreng.	Alliaceae	Raiz	<i>Litchi chinensis</i> Sonn	Sapindaceae	Frutos
<i>Alocasia odora</i> L.	Araceae	Folhas	<i>Luffa acutangula</i> (L.) Roxb.	Curcubitaceae	Flor e frutos
<i>Amaranthus tricolor</i> L.	Amaranthaceae	Folhas	<i>Luffa cylindrica</i> (L.) Roem.	Curcubitaceae	Flor e frutos
<i>Amygdalus persica</i> L. var. agano nucipersica (Schübler et Martens) Yüet Lu	Rosaceae	Frutos	<i>Lycium barburum</i> L.	Solanaceae	Frutos
<i>Anacardium occidentale</i> L.	Anacardiaceae	Sementes	<i>Lycium chinense</i> Mill.	Solanaceae	Folhas
<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr.	Bromeliaceae	Frutos	<i>Lycopersicum esculentum</i> L	Solanaceae	Frutos
<i>Annona muricata</i> L.	Annonaceae	Folhas	<i>Malus pumila</i> Mill.	Rosaceae	Frutos
<i>Annona squamosa</i> L.	Annonaceae	Folhas	<i>Malus sylvestris</i> (L.) Mill.	Rosaceae	Frutos
<i>Apium graveolens</i> L.	Apiaceae	Raízes	<i>Mangifera indica</i> L.	Anacardiaceae	Frutos
<i>Arachishy pogaea</i> L.	Fabaceae	Semente	<i>Matricaria chamomilla</i> L.	Asteraceae	Flor
<i>Averrhoa bilimbi</i> L.	Oxalidaceae	Folhas	<i>Momordica charantia</i> L.	Curcubitaceae	Flor e frutos
<i>Averrhoa carambola</i> L.	Oxalidaceae	Folhas	<i>Musa × paradisiaca</i> L.	Musaceae	Frutos
<i>Basella alba</i> L.	Basellaceae	Folhas	<i>Musa acuminata</i> Colla (AAA) cv. Dwarf Cavendish	Musaceae	Frutos
<i>Benincasa hispida</i> (Thunb.) Cogn. var. chieh-quaHow	Curcubitaceae	Flor e fruto	<i>Musa nana</i> Lour	Musaceae	Frutos

<i>Bertholletia excelsa</i> Humb. et Bonpl.	Lecythidaceae	Semente	<i>Nasturtium officinale</i> Aiton	Brassicaceae	Folhas
<i>Beta vulgaris</i> L.	Amaranthaceae	Folhas e Caule	<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn.	Nelumbonaceae	Raízes e sementes
<i>Betula pendula</i> L.	Betulaceae	Folhas	<i>Ocimum basilicum</i> L.	Lamiaceae	Raíz, caule, folha
<i>Brassica campestris</i> L.	Brassicaceae	Folhas	<i>Oryza sativa</i> L. var. <i>glutinosa</i> Matsum.	Poaceae	Sementes
<i>Brassica chinensis</i> var. <i>parachinensis</i> L.	Brassicaceae	Folhas	<i>Passiflora edulis</i> Curtis	Passifloraceae	Frutos
<i>Brassica juncea</i> L.	Brassicaceae	Folhas	<i>Phyllanthus emblica</i> L.	Phyllanthaceae	Frutos
<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>botrytis</i> L.)	Brassicaceae	Folhas	<i>Phyllostachys edulis</i> (Carrière) Houz.	Poaceae	Raiz
<i>Brassica rapa</i> L. var. <i>chinensis</i> (L.) Kitamura	Brassicaceae	Folhas	<i>Pinus koraiensis</i> Siebold et Zucc.	Pinaceae	Sementes
<i>Camellia sinensis</i> L.	Theaceae	Folha	<i>Pistacia vera</i> L.	Anacardiaceae	Raiz
<i>Capsicum annuum</i> L. var. <i>grossum</i> (L.) Sendt .)	Solanaceae	Flor e fruto	<i>Prunus amygdalus</i> Batsch	Rosaceae	Raiz
<i>Carica papaya</i> L.	Caricaceae	Frutos	<i>Prunus avium</i> L.	Rosaceae	Frutos
<i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) K. Koch.	Juglandaceae	Sementes	<i>Prunus cerasifera</i> L	Rosaceae	Frutos
<i>Castanea mollissima</i> Blume	Fagaceae	Sementes	<i>Prunus domestica</i> L.	Rosaceae	Frutos
<i>Cetraria islandica</i> L.	Parmeliaceae	Líquen	<i>Prunus salicina</i> Lindl.	Rosaceae	Frutos
<i>Cichorium endivia</i> L.	Asteraceae	Folhas	<i>Psidium guajava</i> L	Myrtaceae	Frutos
<i>Cimicifuga racemosa</i> L.	Ranunculaceae	Raiz	<i>Pueraria lobata</i> (Willd.) Ohwi var. <i>thomsonii</i> (Benth.) Maesen	Fabaceae	Raízes
<i>Citrullus lanatus</i> (Thunb.) Matsum. Nakai	Curcubitaceae	Frutos	<i>Pyrus communis</i> L	Rosaceae	Frutos
<i>Citrus grandis</i> (L.) Osbeck	Rutaceae	Frutos	<i>Pyrus nivalis</i> Jacq.	Rosaceae	Frutos
<i>Citrus reticulata</i> Blanco	Rutaceae	Frutos	<i>Raphanus sativus</i> L. var. <i>Imp. Chetki</i>	Brassicaceae	Raíz, caule, folha

<i>Citrus × sinensis</i> (L.) Osbeck	Rutaceae	Frutos	<i>Rheum rhabarbarum</i> L	Polygonaceae	Folhas e Caule
<i>Citrus x paradisi</i> Macfad	Rutaceae	Frutos	<i>Ribes nigrum</i> L.	Grossulariaceae	Frutos
<i>Colocasia esculenta</i> (L.) Schott	Araceae	Raiz	<i>Ribes uva-crispa</i> L.	Grossulariaceae	Frutos
<i>Coriandrum sativum</i> L.	Apiaceae	Folhas	<i>Rubus idaeus</i> L.	Rosaceae	Frutos
<i>Corylus heterophylla</i> Fisch. Ex Trautv.	Betulaceae	Sementes	<i>Rubus occidentalis</i> L.	Rosaceae	Frutos
<i>Crataegus</i> L.	Rosaceae	Folhas	<i>Rubus ursinus</i> × <i>idaeus</i> L.	Rosaceae	Frutos
<i>Cucumis melo</i> L.	Curcubitaceae	Flor e fruto	<i>Sambucus nigra</i> L	Adoxaceae	Frutos
<i>Cucumis sativus</i> L.	Curcubitaceae	Flor e fruto	<i>Setaria italica</i> (L.) Beauv.	Poaceae	Sementes
<i>Cucurbita pepo</i> L.	Curcubitaceae	Flor e fruto	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	Solanaceae	Frutos
<i>Daucus carota</i> L.	Apiaceae	Raiz	<i>Solanum tuberosum</i> L.	Solanaceae	Raiz
<i>Diospyros kaki</i> Thunb.	Ebenaceae	Frutos	<i>Spinacea oleracea</i> L	Amaranthaceae	Folhas
<i>Echinacea pururea</i> L.	Asteraceae	Flor	<i>Tamarindus indica</i> L.	Fabaceae	Frutos
<i>Eleocharis dulcis</i> (Burm.f.) Trin. Ex Henschel	Cyperaceae	Raiz	<i>Theobroma cacao</i> L.	Malvaceae	Frutos
<i>Feijoa sellowiana</i> L.	Myrtaceae	Frutos	<i>Thymus vulgaris</i> L.	Lamiaceae	Folhas e flores
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	Apiaceae	Raíz, caule, folha	<i>Torreya grandis</i> Fort. exLindl. cv. Merrillii Hu	Taxaceae	sementes
<i>Fragaria × ananassa</i> Duchesne	Rosaceae	Frutos	<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	Fabaceae	Raíz, caule, folha
<i>Garicina mangostana</i> L.	Clusiaceae	Frutos	<i>Vaccinium corymbosum</i> L.	Ericaceae	Frutos
<i>Gentianae radix</i> L.	Gentianaceae	Flor	<i>Vaccinium vitisidaea</i> L	Ericaceae	Frutos
<i>Ginkgo biloba</i> L.	Ginkgoaceae	Sementes, Folhas	<i>Valeriana officinalis</i> L.	Caprifoleaceae	Raiz
<i>Glycine max</i> L.	Fabaceae	Sementes	<i>Vigna angularis</i> (Willd.) Ohwi et Ohashi	Fabaceae	Sementes
<i>Hedera Helix</i> L.	Fabaceae	Sementes	<i>Vigna radiata</i> (L.) Wilczek	Fabaceae	Sementes
<i>Helianthus annuus</i> L.	Asteraceae	Sementes	<i>Vigna umbellata</i> (Thunb.) Ohwi et Ohashi	Fabaceae	Sementes

<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	Malvaceae	Raíz, caule, folha	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp. subsp. <i>cylindrica</i> (L.) Verdc.	Fabaceae	Sementes
<i>Actinidia arguta</i>	Actinidiaceae	Frutos	<i>Vitex agnus-castus</i> L.	Lamiaceae	Frutos
<i>Actinidia chinensis</i> L.	Actinidiaceae	Frutos	<i>Vitis vinifera</i> L.	Vitaceae	Frutos
<i>Actinidia deliciosa</i> L.	Actinidiaceae	Frutos	<i>Xysmalobium undulatum</i> L.	Apocynaceae	Raiz
<i>Hylocereus undatus</i> (Haw.) Britt. et Rose	Cactaceae	Frutos	<i>Zea mays</i> L. var. <i>saccharata</i> (Sturtev.) Bailey	Poaceae	Sementes
<i>Hypericum perforatum</i> L.	Hypericaceae	Folhas	<i>Zingiber officinale</i> Rosc.	Zingiberaceae	Raiz
<i>Ilex paraguariensis</i> L.	Aquifoliaceae	Folhas	<i>Ziziphus mauritiana</i> Lam.	Rhamnaceae	Frutos

Os dados extraídos dos diferentes artigos foram categorizados na Tabela 1. Nos últimos 10 anos 21 métodos de determinação do ácido oxálico e/ou CaOx em matrizes vegetais foram desenvolvidos e apenas 1 validado de acordo com a legislação pertinente (MERUSI *et al.*, 2010). Métodos cromatográficos corresponderam a 52,38% dos estudos analisados (Cromatografia líquida de alta eficiência correspondeu a 47,6%, cromatografia gasosa correspondeu a 4,76%), seguidos pela espectrofotometria (28,57%) e titulometria (19,04%). Métodos cromatográficos são cada vez mais usados na determinação de uma série de compostos de interesse em diferentes matrizes complexas, pois, além de possibilitarem uma adequada separação dos compostos de interesse dos demais componentes da amostra, são métodos que permitem uma análise de compostos com diferentes características físico-químicas, apresentam uma elevada sensibilidade e seletividade, versatilidade, detectabilidade e possibilitam o uso de pequenas quantidades de amostra (uL) (MALVIYA *et al.*, 2010; DONG, LIANAS, 2013; COSKUN, 2016). Essas características podem explicar porque essas técnicas foram as mais frequentemente observadas. Apesar dos métodos cromatográficos serem considerados sensíveis e seletivos, são caros e muitas vezes demorados, pois exigem múltiplas etapas de preparo das amostras complexas antes da análise, além de permitirem uma separação menos eficiente que outros métodos (como a cromatografia gasosa) e ser de difícil operação por iniciantes; essas desvantagens podem justificar os demais métodos observados em nosso estudo.

Tabela 1: Sumarização dos principais dados extraídos dos estudos selecionados (autor/ano; país do estudo, proposta, método de extração, método de quantificação, janela de concentração de CaOx total e solúvel encontradas).

Autor/Ano	País do estudo	Proposta	Método de extração	Método de quantificação	Janela de concentrações de oxalato total e solúvel encontradas (mg/100g)
HONOW <i>et al.</i> , (2010)	Alemanha / China	Determinar o teor de oxalato do chá verde em função da origem, qualidade, época de colheita e preparo	Infusão	Cromatográfico/ HPLC	Oxalato total: ND Oxalato solúvel: 8.3 to 139.8 mg
MERUSI <i>et al.</i> , (2010)	Itália	Realizar uma análise simultânea de nitratos, nitritos e oxalatos em espécies vegetais de interesse alimentar;	Decocção	Eletroforético / Espectrofotométrico	Oxalato total: 784 ± 177 a 1976 ± 266 Oxalato solúvel: ND
KORUS <i>et al.</i> , (2011)	Polônia	Comparar a retenção de oxalato em dois tipos de produtos congelados obtidos de três espécies vegetais do Gênero Brassica.	Decocção	Espectrofotométrico/ Enzimático	Oxalato total: 34±3 a 1243 ± 108 Oxalato Solúvel: 12±8 a 695±97
RUAN <i>et al.</i> , (2013)	China	Determinar o teor de oxalato de uma grande variedade de alimentos.	Decocção	Espectrofotométrico / Enzimático	Oxalato total: n/d a 490.5 ± 69 Oxalato solúvel: ND
DAS GHOSH, SAVAGE (2013)	Nova Zelândia	Avaliar o teor de oxalato em diferentes pratos de espinafre.	Decocção	Cromatográfico / HPLC	Oxalato total: 290 ± 0,12 – 829 ± 025 Oxalato solúvel: 0,58 ± 0,04 – 6,40 ± 0,13
NGUYỄN;	Nova Zelândia	Construir um banco de dados confiável do teor total de oxalato solúvel de várias frutas disponíveis na Nova Zelândia	Maceração	Cromatográfico / HPLC	Oxalato total: 624 ± 11 – 907 ± 17 Oxalato solúvel: 565 ± 9 – 648 ± 11

SAVAGE (2013)					
SIENER <i>et al.</i> , (2015)	Alemanha	Avaliar e quantificar o teor de oxalato de remédios fitoterápicos e suplementos dietéticos baseados em extratos de plantas,	Maceração	Cromatográfico/ HPLC	Oxalato total: $3 \pm 0,01 - 57 \pm 0,02$ Oxalato solúvel: $0,58 \pm 0,01 - 18 \pm 0,01$
BRZEZIC HA-CIR OCKA,G REMBEC KA, SZEFER, (2016)	Polônia	Determinar as concentrações de oxalato, magnésio e cálcio no chá preto, escuro e verde e sua porcentagem de lixiviação para infusões.	Infusão	Titulometria	Oxalato total: ND Oxalato Solúvel: 40 - 170
SIENER <i>et al.</i> , (2016)	Alemanha	Determinar o teor de oxalato solúvel e total de vários tipos de sucos de frutas e vegetais, néctares e bebidas.	Maceração	Cromatográfico / HPLC	Oxalato total: n/d – 198,31 Oxalato solúvel: n/d – 197,14
WILLIA MS <i>et al.</i> , (2016)	Austrália	Investigar a distribuição e concentração de compostos bioativos em vários tecidos de kakadu .	Maceração /Decocção	Cromatográfico / HPLC	Oxalato total: 1636 a 2638 Oxalato solúvel: 400 a 1200
DU THANH <i>et al.</i> , (2017)	Vietnã	Determinar o teor de oxalato das folhas frescas de diversas variedades de taro comumente cultivadas na região central do Vietnã	Decocção	Cromatográfico/ HPLC	Oxalato total: 433.8 ± 7.9 a 835.4 ± 7.7 Oxalato solúvel 147.8 ± 4.5 a 339.7 ± 7.3
NGUYỄN, LÊ, SAVAGE , (2018)	Nova Zelândia	Identificar os efeitos da maturação, secagem e da fermentação do cacau no conteúdo total de oxalato	Maceração	Cromatográfico / HPLC	Oxalato total: $2 \pm 0,0 - 640,2 \pm 21.2$ Oxalato solúvel: n/d – 431.3 ± 5.3
SÁ <i>et al.</i> , 2019A	Brasil	Realizar um estudo anatômico e histoquímico das folhas de			Oxalato total: $5450 \pm 0.28 - 5920 \pm 0.47$ Oxalato solúvel: $3380 \pm 0.11 - 4870 \pm 0.11$

		<i>Averrhoa bilimbi</i> e <i>Averrhoa carambola</i> , além de determinar o conteúdo de ácido oxálico	Decocção	Titulometria	
SÁ <i>et al.</i> , 2019B	Brasil	Realizar a caracterização anatômica, histoquímica e determinar o teor de ácido oxálico das lâminas foliares das espécies <i>Annona muricata</i> L. e <i>Annonas quamosa</i> L.	Decocção	Titulometria	Oxalato total: 5640 ± 0.28 - 6270 ± 0.24 4.17 Oxalato solúvel: 4170 ± 0.27 - 4650 ± 0.09
SAVAGE , VANHA NEN (2019)	Nova Zelândia	Investigar as composições de oxalato de folhas cruas e cozidas de galinha gorda colhida na Nova Zelândia	Decocção	Cromatográfico / HPLC	Oxalato total: 100.75 ± 3.94 - 1112.40 ± 19.00 Oxalato solúvel: 58.50 ± 1.44 - 866.31 ± 14.87
SHIRAI (2019)	Japão	Determinar o teor de ácidos orgânicos de chás verde comerciais para melhorar sua qualidade.	ND	Cromatográfico/ GC	Oxalato total: 800 – 1300 Oxalato solúvel: ND
SRIKAN TH <i>et al.</i> , (2019)	Índia	Investigar os efeitos das temperaturas de secagem por ar quente convectiva e pré-tratamentos nas características de secagem e reidratação, bem como nos parâmetros de qualidade (cor, textura e oxalato de cálcio)	Decocção	Titulométrico	Oxalato total: 27 ± 0 – 120 ± 0 Oxalato solúvel: ND

GHOOR A, BABU, SRIVIDY A, (2020)	Índia	Relatar a classificação nutricional de microgreens com base nos níveis de doze nutrientes e oxalato.	ND	Espectrofotométrico / Enzimático	Oxalato total: ND Oxalato solúvel: 14.3±4.0 - 28.2±1.6
HUYNH <i>et al.</i> , (2020)	Vietnã	Testar duas abordagens separadas para reduzir o oxalato solúvel em pó de cacau: pela adição de cálcio na forma de sais	Decocção	Cromatográfico / HPLC	Oxalato Total: ND Oxalato Solúvel: 35.31 ± 2.56 - 616.05 ± 0.45
ROCHA <i>et al.</i> , (2020)	Brasil	Desenvolver um método para determinar o oxalato em amostras de chás.	Infusão	Espectrofotométrico/Método SPANDS	Oxalato total: ND Oxalato solúvel: 231±4.7 - 439±9.3 (mg/L)
SIENER <i>ET AL.</i> , (2020)	Alemanha	Determinar as concentrações de oxalato total e solúvel de plantas das famílias Fabaceae, Convolvulaceae e Malvaceae para o desenvolvimento de recomendações dietéticas para pacientes com cálculo de oxalato de cálcio	Maceração	Cromatográfico / HPLC	Oxalato total 467.3-523.9 Oxalato solúvel: 68.0 – 85.4

Abreviação: ND: Não descrito; n/d: Não detectado; GC: Cromatografia Gasosa; HPLC: Cromatografia Líquida de Alta eficiência;

Como mostrado na Tabela 1, apesar de menos usada, a titulometria levou aos maiores níveis de ácido oxálico e/ou CaOx encontrados. Esses níveis elevados podem estar relacionados ao uso de espécies vegetais ricas em ácido oxálico e/ou CaOx ou com o uso de processos de preparo da amostra que pré-concentram esses compostos orgânicos em etapas anteriores a análise. Ainda, de acordo com Naik *et al.*, (2014), métodos titulométricos são largamente usados na determinação de ácido oxálico e/ou CaOx em matrizes vegetais devido a sua simplicidade, rapidez e baixo custo; embora careçam de seletividade.

A validação é imprescindível no desenvolvimento de um método analítico para garantir que ele seja adequado para o propósito pretendido, capaz de gerar dados analíticos altamente confiáveis e reprodutíveis (ICH,1995). A validação inclui analisar uma série de procedimentos (como seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação, limite de detecção e robustez) padronizados por várias agências reguladoras como a Food and Drug Administration e a Anvisa (FDA, 1994; BRASIL,2017) e associações como o International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH, 1994) que são aplicados a cada método analítico de forma flexível e variável, a depender do propósito da análise (LAL *et al.*, 2019). De acordo com o quadro 3, apenas 1 estudo validou a metodologia desenvolvida (MERUSI *et al.*, 2020). De acordo com Ravichandran *et al.*, (2010), a não validação do método analítico compromete a qualidade dos analíticos obtidos. A ausência de um sistema de garantia de qualidade nos métodos de análise de ácido oxálico e/ou CaOx em matrizes vegetais somada à porcentagem de estudos qualitativos experimentais (13,3 %) que foram excluídos dessa revisão integrativa por descrição insuficiente da metodologia é preocupante, expõe fragilidades e vieses analíticos que põe em risco a confiabilidade e interpretação analítica aos dados obtidos.

Quadro 3: Detalhamento metodológico dos estudos selecionados.

Referência	Condição de extração	Condição de análise	Validação
MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS			
HONOW <i>et al.</i> , (2010)	Oxalato solúvel: Extração aquosa com água destilada (Aquecimento a 90 °C por 5 ou 10 min)	Fase estacionária: Coluna de Troca iônica com reator enzimático (oxalato oxidase) Detecção UV-VIS Fase móvel: solução aquosa de EDTA (2,0 g / L) ajustada para pH 5,0 com NaOH	Não validado
DAS GHOSH, SAVAGE (2013)	Oxalato total: Extração Ácida com HCl 0,2M Oxalato solúvel: Extração Aquosa com água nanopura (Aquecimento em banho-maria a 80 °C por 15 min)	Fase Estacionária: Coluna de Troca iônica Detecção UV-VIS: 210nm Fase móvel: ácido sulfúrico 25 mM	Não validado
NGUYỄN, SAVAGE (2013)	Oxalato total Extração Ácida com HCl 0,2M Oxalato solúvel Extração aquosa com água nanopura (Incubação a 21 °C por 20 min.)	Fase Estacionária: Coluna de Troca iônica Detecção UV-VIS: 210nm Fase móvel: ácido sulfúrico 25 mM	Não validado
SIENER <i>et al</i> (2015)	Oxalato total: Extração Ácida com HCl 2M Oxalato solúvel: Extração aquosa com água nanopura (Tempo de extrações: 15 min)	Fase estacionária: Coluna de troca iônica Detecção por supressão iônica Fase móvel: KOH 0,2mM	Não validado
SIENER <i>et al.</i> , (2016)	Oxalato total: Extração ácida com HCL 0,5M (Filtração das bebidas com posterior extração)	Fase estacionária: Coluna de Troca iônica com reator enzimático (oxalato oxidase) Detecção UV-VIS Fase móvel: solução aquosa de EDTA (2,0 g / L) ajustada para pH 5,0 com NaOH	Não validado
WILLIAMS <i>et al.</i> , (2016)	Oxalato total: Extração Ácida com HCl 25% Oxalato solúvel: Extração Aquosa com água deionizada (Incubação em forno a 80°C)	Fase estacionária: Coluna C18 Detecção: UV/VIS em 214 nm. Fase móvel: tampão de fosfato de potássio 20 mM, pH 2,4	Não validado
DU THANH <i>et al.</i> , (2017)	Oxalato total: Extração Ácida: HCl 0,2M Oxalato solúvel: Extração aquosa: Água nanopura (Banho-maria 80 °C por 20 min.)	Fase Estacionária: Coluna de Troca iônica Detecção UV-VIS: 210nm Fase móvel: ácido sulfúrico 25 mM	Não validado
NGUYNLLN <i>et al.</i> , (2018)	Oxalato total: Extração Ácida com HCl 0,2M Oxalato solúvel: Extração aquosa com Água nanopura (Incubação a 21 °C por 20 min.)	Fase estacionária: Coluna de troca iônica Detecção: ND Fase móvel: ácido sulfúrico 25 mM	Não validado
		Fase estacionária: Coluna Sílica compactada 30 m × 0,25 mm	Não validado

SHIRAI (2019)	ND	Gás de arraste: Hélio Detector: Ionização Rampa de Temperatura: 170 °C a 10 °C / min - 225 °C a 2,5 °C / min.	
SAVAGE, VANHANEN (2019)	Oxalato total: Extração Ácida: HCl 0,2M Oxalato solúvel: Extração aquosa: Água nanopura (Banho-maria 80 °C por 20 min.)	Fase Estacionária: Coluna de Troca iônica Detecção UV-VIS: 210nm Fase móvel: ácido sulfúrico 25 mM	Não validado
HUYNH <i>et al.</i> , (2020)	Oxalato solúvel: Extração aquosa com água nanopura, solução CaCl ₂ ou sonicação. (Incubação por 20 min a 80 °C)	Fase estacionária: Coluna de troca iônica Detecção: UV-VIS: 210 nm Fase móvel: Ácido sulfúrico 25mM	Não validado
SINER <i>et al.</i> , (2020)	Oxalato total: Extração Ácida com HCl 2M Oxalato solúvel: Extração aquosa com Água nanopura (Incubação a 21 °C por 15 min.)	Fase estacionária: Coluna de Troca iônica com reator enzimático (oxalato oxidase) Detecção UV-VIS Fase móvel: solução aquosa de EDTA (2,0 g / L) ajustada para pH 5,0 com NaOH	Não validado
MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO			
MERUSI <i>et al.</i> , (2010)	Oxalato total: Extração Ácida com HCl 2N Oxalato solúvel: Extração Aquosa com água destilada (Aquecimento a 100 °C por 15 min sob agitação)	Tensão de operação: 25 kV Separação analítica: capilar de sílica fundida (eletroforese capilar) Detecção: UV-VIS 214 nm.	Estudo validado segundo protocolo EURACHEM (Precisão, linearidade, recuperação, efeito matriz, limite de detecção e quantificação)
KORUS <i>et al.</i> (2011)	Oxalato total: Extração Ácida com HCl 2M Oxalato solúvel: Extração Aquosa com Água destilada Aquecimento em banho de água com agitação 80 °C por 15 min.	Kit de oxalato para determinação quantitativa, utilizado de acordo com procedimento nº 591 (Trinity Biotech, 2008). Detecção: UV-VIS 590nm	Não validado
RUAN <i>et al.</i> , (2013)	Oxalato total: Extração Ácida com HCl 0/5M em banho maria fervente por 20 min.	Kit enzimático para determinação de oxalato. Incubação por 90 min Detecção UV-VIS 555 nm	Não validado
GHOORA <i>et al.</i> , (2020)	ND	Kit enzimático para determinação de oxalato. Incubação da reação por 10 Detecção: UV-VIS em 450 nm	Não Validado
ROCHA <i>et al.</i> , (2020)	ND	Método SPADNS que consistiu na determinação espectrofotométrica de oxalato foi construída com três	Não validado

		microbombas solenóides de 10 (P1), 20 (P2) ou 40 μ L (P3) por pulso.	
MÉTODO TITULOMÉTRICO			
BRZEZICHA - CIROCKA, GR EMBECKA, SZEFER, (2016)	Oxalato solúvel: Extração aquosa: Água destilada (infusão por 5 min)	Precipitação do oxalato com solução de CaCl_2 5% e acetona. O precipitado foi solubilizado com Ácido Sulfúrico e titulado com Permanganato de potássio a 0,02mol/L	Não Validado
SRIKANTH <i>ET AL.</i> , (2019)	Oxalato total: Extração ácida com HCl 6 mol/L + 190 mL água ultrapura (Aquecimento a 100°C por 60 min.)	Precipitação do oxalato com solução de CaCl_2 5%. O precipitado foi solubilizado com Ácido Sulfúrico e titulado com Permanganato de potássio a 0,05 mol/L	Não Validado
SÁ <i>et al.</i> , (2019A)	Oxalato total: Extração ácida: HCl 2N Oxalato solúvel: Extração aquosa: água destilada Aquecimento em banho maria a 80 °C por 30 min	Titulação direta com Permanganato de potássio a 0,02 mol/L Adição de Ácido Sulfúrico nos extratos aquosos.	Não validado
SÁ <i>et al.</i> , (2019B)	Oxalato total: Extração ácida com HCl 2N Oxalato solúvel: Extração aquosa com água destilada (Aquecimento em banho maria a 80 °C por 30 min)	Titulação direta com Permanganato de potássio a 0,02 mol/L Adição de Ácido Sulfúrico nos extratos aquosos.	Não validado

Abreviação: ND: Não descrito.

As espécies vegetais são consideradas matrizes complexas (ZYGMUNT, NAMIESNIK, 2003). Na determinação de seus metabólitos primários ou secundários, a máxima extração desses componentes orgânicos e mínima extração dos demais componentes endógenos da matriz vegetal são importantes para o processo analítico, pois baixos níveis dos compostos de interesse e a presença de componentes endógenos da matriz vegetal podem interferir negativamente com a medida dos parâmetros analíticos. Nos métodos cromatográficos os interferentes endógenos também contribuem com um maior desgaste do instrumento analítico e podem ser co-eluídos juntamente com o analito de interesse, interferindo na análise.

Na literatura há uma variedade de métodos usados para extrair/isolar compostos orgânicos e inorgânicos, não voláteis, semi-voláteis e voláteis em uma série de matrizes (AHMED, SAROSI, 2019; SOUSA *et al*, 2019; ROFIEE, YUSOF, KEK, 2020). Entre os métodos mais usados para a extração de metabólitos primários e secundários de matrizes vegetais, podemos citar: maceração, infusão, percolação, decocção, extração contínua quente (Soxhlet), extração em contra-corrente, extração assistida por microondas, banho ultrassônico, fluido supercrítico e turbólise, além disso, a escolha do método de extração, entre outros aspectos, depende do composto de interesse, da amostra e do instrumento analítico (ZHANG *ET AL.*, 2018). Entre os estudos selecionados, 57,8% usaram decocção, 26% maceração e 5,2% infusão e 15,7% dos estudos não descreveram o método ou mesmo o tipo de extração usado (Tabela 1). O método analítico engloba desde a coleta da amostra até o seu descarte, incluindo, o preparo da amostra e análise instrumental. A ausência de descrição minuciosa de todas as etapas analíticas compromete o uso desses métodos quantitativos experimentais por outros grupos de pesquisa interessados na determinação de ácido oxálico e/ou CaOx em matrizes vegetais.

De acordo com Nakata (2012), nas espécies vegetais, os cristais de CaOx são obtidos pela conversão do ácido ascórbico a ácido oxálico (produto final do metabolismo vegetal) com posterior conjugação com o cálcio intracelular nos vacúolos dos idioblastos. Quimicamente, o ácido oxálico tem solubilidade em água cerca de 4 vezes maior que o CaOx, praticamente insolúvel em meio aquoso (PRASAD, SHIVAY, 2017). Por outro lado, os sais de CaOx são facilmente solubilizados em meio acidificado (pH 2 - 4,5). Assim, para quantificar o ácido oxálico não conjugado (oxalato solúvel), a extração aquosa é a mais indicada. Em contrapartida, o ácido oxálico conjugado ou CaOx total são melhor quantificados após uma extração acidificada. Ambas condições são observadas no quadro 2. Na extração acidificada, é conveniente a utilização de HCl para quantificar

o teor de oxalato total. A utilização de HCl corrobora a um teste bastante empregado na caracterização de cristais de CaOx na microscopia óptica, no qual pequenas quantidades de HCl são adicionadas na amostra sob a lamínula e é verificada a solubilização do cristal de oxalato (SÁ; SANTANA; RANDAU, 2016; SOUZA *et al.*, 2018).

Independentemente do método de extração, uma série de fatores da amostra afetam sua eficácia. Entre eles, podemos citar: origem, parte do material vegetal, processamento e tamanho de partícula. Além das variáveis da amostra, vários parâmetros experimentais afetam a eficiência dos principais métodos de extração, como solvente extrator, tempo, potencial hidrogeniônico e temperatura de extração, (TIWARI *et al.*, 2011). Apesar da importância desses fatores na otimização do processo de extração, nenhum estudo avaliou a influência de diferentes variáveis na eficiência da extração. Assim como observado em nosso estudo, Hennion *et al.*, (1998), menciona que a otimização dos parâmetros de extração, ou sua minuciosa descrição, é negligenciada em uma série de estudos quantitativos experimentais, o que pode acarretar no prejuízo no método de quantificação dos compostos de interesse, com perda na seletividade, sensibilidade, precisão e exatidão analítica.

CONCLUSÃO

Uma vez que o consumo de ácido oxálico está correlacionado como peça-chave no surgimento ou agravamento de problemas renais, evidencia-se uma preocupação em relação à temática, principalmente no que diz respeito ao teor de ácido oxálico contido em espécies vegetais consumidas pela população, acarretando em produção científica de estudos primários. Entretanto, esta revisão observou que grande parte dos estudos são conduzidos com insuficiente descrição metodológica, desqualificando-os.

Além disso, é imperativo a utilização de procedimentos que deem confiabilidade aos resultados expostos, como a validação metodológica, que foi escassamente utilizada nos estudos agregados a esta revisão, diminuindo, assim, a confiança em relação aos dados obtidos. Entretanto, acreditamos que os dados aqui expostos são de fundamental importância para a comunidade médica e científica, na medida em que podem contribuir como subsídio para decisões na área médica, bem como para dar continuidade e embasamento na realização de posteriores estudos primários que visem explorar mais a temática.

REFERÊNCIAS

- ABEYSEKERA, R. A. *et al.* Star fruit toxicity : a cause of both acute kidney injury and chronic kidney disease : a report of two cases. **BMC Research Notes**, p. 1–4, 2015.
- ADEMILUYI, A. O. *et al.* A comparative study on antihypertensive and antioxidant properties of phenolic extracts from fruit and leaf of some guava (*Psidium guajava* L.) varieties. **Comparative Clinical Pathology**, v. 25, n. 2, p. 363–374, 2016.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada, RDC N° 166, 24/07/2017. **Guia para validação de métodos analíticos**, 2017
- BAKUL, G. *et al.* Acute oxalate nephropathy due to ‘ Averrhoa bilimbi ’ fruit juice ingestion. **Indian J Nephrol** v. 23, n. 4, p. 297–301, 2013.
- BOYD, C. *et al.* The influence of metabolic syndrome and its components on the development of nephrolithiasis. **Asian Journal of Urology**, v. 5, n. 4, p. 215–222, 2018.
- BRZEZICHA, J.; MAŁGORZATA, C.; PIOTR, G. Oxalate , magnesium and calcium content in selected kinds of tea : impact on human health. **European Food Research and Technology**, v. 242, n. 3, p. 383–389, 2016.
- CAMERON, M. A. *et al.* Urine Composition in Type 2 Diabetes : Predisposition to Uric Acid Nephrolithiasis. **J Am Soc Nephrol**. v. 17, p.1422–1428, 2006.
- CHAUHAN, N. *et al.* Immobilization of barley oxalate oxidase onto gold–nanoparticle-porous CaCO₃ microsphere hybrid for amperometric determination of oxalate in biological materials. **Clin. Biochem**. v. 35, p. 253-258, 2012.
- COSKUN, O. Separation techniques: Chromatography. [North Clin Istanbul](#) v. 3, n. 2, p. 156–160, 2016.
- DONG, M. W. Perspectives in Modern HPLC. v. 31, n. 6, p. 2–8, 2013.
- FDA. U.S. Food and Drug Administration. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. Disponível em: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf> Acesso em: 10 de dezembro 2020.
- FRANCESCHI, V. R.; NAKATA, P. A. Calcium oxalate in plants: formation and function. **Annu Rev. Plant Biol**. v. 56, n. 1, p. 41-71, 2005.
- GHOORA, M. D.; BABU, D. R.; SRIVIDYA, N. Nutrient composition, oxalate content and nutritional ranking of ten culinary microgreens. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 91, n. March, p. 103495, 2020.
- GHOSH DAS, S.; SAVAGE, G. P. Oxalate content of Indian spinach dishes cooked in a wok. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 30, n. 2, p. 125–129, 2013.

- GU, K. R. Oxalate content of green tea of different origin , quality , preparation and time of harvest. p. 377–381, 2010. Oxalate Content of Taro Leaves Grown in. p. 1–7, [s.d.].
- HE, H. *et al.* Physiological and ecological significance of biomineralization in plants. **Trends in Plant Science**. v. 19, n. 3, p. 166-174, mar. 2014.
- HIGASHIJIMA, N. S. *et al.* Fatores antinutricionais na alimentação humana. **Segur. Aliment. Nutr.** Campinas, SP. v. 27, p. 1-16, 2020.
- HUYNH, N. K.; NGUYEN, D. H. M.; NGUYEN, H. V. H. Journal of Food Composition and Analysis Reduction of soluble oxalate in cocoa powder by the addition of calcium and ultrasonication. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 93, n. July, p. 103593, 2020.
- ICH. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. ICH - Q2(R1) Validation of analytical procedures: text and methodology, 1994
- IHLI, J. *et al.* Precipitation of amorphous calcium oxalate in aqueous solution. **Chemistry of Materials**, v. 27, n. 11, p. 3999–4007, 2015.
- KINUPP, V.F; LORENZI, H. Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) no Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas. 1 ed. **Nova Odessa**: Plantarum, 2014.
- KORUS, A. *et al.* Retention of oxalates in frozen products of three brassica species depending on the methods of freezing and preparation for consumption. **International Journal of Refrigeration**, v. 34, n. 6, p. 1527–1534, 2011.
- LAL, B.; KAPOOR, D.; JAIMINI, M. A review on analytical method validation and its regulatory perspectives **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**. v. 9, n. 2, p. 501–506, 2019.
- MALVIYA, R.; SHARMA, P. Journal of Global Pharma Technology. n. June 2010, 2014.
- AHMED, H. M.;
- MARTINS, A.G, *et al.* Levantamento etnobotânico de plantas medicinais, alimentares e tóxicas da Ilha do Combu: Município de Belém, Estado do Pará, Brasil. **Rev. Bras. Farm**, v. 86, p, 21–30, 2010.
- MAZZUCCHI, E.; SROUGI, M. O que há de novo no diagnóstico e tratamento da litíase urinária? **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 55, n. 6, p. 723–728, 2009.
- MERUSI, C. *et al.* Determination of nitrates, nitrites and oxalates in food products by capillary electrophoresis with pH-dependent electroosmotic flow reversal. **Food Chemistry**, v. 120, n. 2, p. 615–620, 2010.
- MORITA, A. *et al.* Tea plant (*Camellia sinensis* L.) roots secrete oxalic acid and caffeine into medium containing aluminum. **Soil Sci Plant Nutr**. v. 57, p. 796-802, 2011.

- MUHAMMAD, N. *et al.* Application of a simple column-switching ion chromatography technique for removal of matrix interferences and sensitive fluorescence determination of acidic compounds (pharmaceutical drugs) in complex samples. **Journal of Chromatography A**, 2017.
- NAIK, V. V *et al.* Methodology in determination of oxalic acid in planta tissue: a comparative approach. **Journal of Global Trends in Pharmaceutical Sciences** v.5, n.2, p.1662-1672, 2014
- NAPPI, G.; CUNHA, M.; COELHO, J.; JOKL Validação de métodos para determinação dos ácidos fítico e oxálico em multimistura. Campinas: **Ciência e Tecnologia Alimentar**, v. 26, n. 4, 2006.
- NASH, K. M. SHAH, Z. A. Current Perspectives on the Beneficial Role of Ginkgo biloba in Neurological and Cerebrovascular Disorders. **Integ Med Insights**, v. 10, p. 1-9, 2015
- NGUYỄN, H. V. H. H.; LÊ, H. M.; SAVAGE, G. P. Effects of maturity at harvesting and primary processing of cocoa beans on oxalate contents of cocoa powder. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 67, p. 86–90, 2018.
- OLIVEIRA, E. S. M., AGUIAR, A. S. Why eating star fruit is prohibited for patients with chronic kidney disease? **Brazilian J Neph**, v. 37, n. 2, p. 241-247, 2015.
- OLIVEIRA, G.L., OLIVEIRA, A.F.M., ANDRADE, L.H.C., Plantas medicinais utilizadas na comunidade urbana de Muribeca, Nordeste do Brasil. **Acta Bot. Bras**, v. 24, p. 571–577, 2010
- PALMIERI, F. *et al.* Oxalic acid, a molecule at the crossroads of bacterial-fungal interactions. **Adv. Appl. Microbiol.** v. 106, p. 49-77, 2018.
- PEREIRA, R. J., CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **J. Biotec. Biodivers.** v. 3, n. 4, p. 146-152, nov. 2012.
- PRASAD, R., SHIVAY, Y. S. Oxalic acid/oxalates in plants: from self-defence to phytoremediation. **Current Science**. v. 112, n. 8, p. 1665-1667, abr. 2017.
- RAO, T. N. Validation of Analytical Methods Validation of Analytical Methods. [s.d.].
- RATKALKAR, V. N.; KLEINMAN, J. G. Mechanisms of stone formation. **Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism**. v. 9, n. 3–4, p. 187–197, 2011.
- RAVICHANDRAN, V. *et al.* Validation of Analytical Methods -Strategies and Importance. **International Journal of Pharm Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 3, 2010.
- ROCHA, D. P. *et al.* A multi-pumping flow system for spectrophotometric determination of oxalate in tea. **Microchemical Journal**, v. 157, 2020.
- ROCHA, D. P. *et al.* A multi-pumping flow system for spectrophotometric determination of oxalate in tea. **Microchemical Journal**, v. 157, n. March, p. 104938, 2020.
- ROCKENBACH, A. T. *et al.* Interferência entre plantas daninhas e a cultura: alterações no metabolismo secundário. **Rev. Bras. Herb.** v. 17, n. 1, p. 59-70, jan-mar. 2018.

- RUAN, Q. Y. *et al.* Determination of total oxalate contents of a great variety of foods commonly available in Southern China using an oxalate oxidase prepared from wheat bran. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 32, n. 1, p. 6–11, 2013.
- RUSSELL, C. An overview of the integrative research review. *Prog Transplantation*, v. 15, n.1, p. 8-13, 2005.
- SÁ, D. R.; SANTANA, A. S. C. O.; RANDAU, P. L. Caracterização anatômica e histoquímica das folhas de *Eugenia uniflora* L. **Journal of Environmental Analysis and Progress**. v. 01, n. 01, p. 96-105, 2016.
- SÁ, R. D. *et al.* Anatomical and histochemical analysis of *dypshania ambrosioides* supported by light electron microscopy. **Brazilian journal of pharmacognosy**. v. 26, p. 533-543, 2016.
- SÁ, R. D. *et al.* Anatomy, histochemistry and oxalic acid content of the leaflets of *Averrhoa bilimbi* and *Averrhoa carambola*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 29, n. 1, p. 11–16, 2019.
- SÁ, R. D. *et al.* Oxalic acid content and pharmacobotany study of the leaf blades of two species of *Annona* (Annonaceae). **Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 253, p. 10–16, 2019.
- SAVAGE, G. P. *et al.* Effect of Cooking on the Soluble and Insoluble Oxalate Content of Some New Zealand Foods. p. 201–206, 2000.
- SAVAGE, G. VANHANEN, L. Oxalate Contents of Raw, Boiled, Wok-Fried and Pesto and Juice Made from Fat Hen (*Chenopodium album*). **Foods**, v. 8, n. 2, p. 2-8, 2019.
- SCARDELATO, J. A., LEGRAMANDI, V. H. P., SACRAMENTO, L. V. S. Ocorrência de cristais em plantas medicinais utilizadas no tratamento da nefrolitíase: paradoxo?. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**. v. 34, n. 2, p. 161-168, 2013.
- SHIRAI, N. Gas chromatographic analysis of organic acids in Japanese green tea leaves. **Journal of Oleo Science**, v. 68, n. 12, p. 1271–1277, 2019.
- SIENER *et al.*, 2016. Determination of Oxalate Content in Herbal Remedies and Dietary Supplements Based on Plant Extracts. **J Meed Food**, v. 00, n. 0, p. 1–6, 2015.
- SIENER, R *et al.* Determination of Oxalate Content in Herbal Remedies and Dietary Supplements Based on Plant Extracts. **Journal of medicinal food**, v.19, n.2, p.205-210, 2016.
- SIENER, R. *et al.* Dietary hyperoxaluria is not reduced by treatment with lactic acid bacteria. **Journal of Translational Medicine**, v. 11, n. 306, p. 1–7, 2013.
- SIENER, R. *et al.* Journal of Food Composition and Analysis The oxalate content of fruit and vegetable juices , nectars and drinks. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 45, p. 108–112, 2016.
- SIENER, R.; SEIDLER, A.; HÖNOW, R. Oxalate-rich foods. v. 2061, p. 1–5, 2020.

- SNYDER, H. Literature review as a research methodology: An overview and guidelines. *Journal of Business Research*, v. 104, p. 333-339, 2019.
- SONG, P. *et al.* Synthesis of graphene nanosheets via oxalic acid-induced chemical reduction of exfoliated graphite oxide. *RSC Adv.* Londres. v. 2, p. 1168-1173, 2012
- SONG, P. *et al.* Paired Electrochemical Synthesis of Ethylene and Oxalic Acid from Acetylene. *Int. J. Electrochem. Sci.* v. 8, p. 6566–6573, 2013
- SOUSA, T. B. *et al.* Quantification of Tannins from Curupay Bark. v. 26, n. 1, p. 1–7, 2019.
- SOUZA *et al.* Anatomical, phytochemical and histochemical study of *Solidago chilensis* Meyen. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 90, p. 2107-2120, 2018.
- SOUZA, C. G. *et al.* Fatores anti-nutricionais de importância na nutrição animal: Estratégias de diminuição dos efeitos anti-nutricionais. *Pubvet*. Londrina, PR. v. 13, n. 5, p. 50-28, mai. 2019.
- SRIKANTH, K. S. *et al.* LWT - Food Science and Technology Convective drying and quality attributes of elephant foot yam (*Amorphophallus paeoniifolius*). *LWT - Food Science and Technology*, v. 99, n. September 2018, p. 8–16, 2019.
- TAVASZI-SAROSI, S. Sulaimani Polytechnic University , Slemani , Kurdistan Regional Government / Iraq. *Food Chemistry*, 2018.
- TAYLOR, E. R. I. C. N. T.; STAMPFER, M. E. I. R. J. S.; CURHAN, G. A. R. Y. C. C. Diabetes mellitus and the risk of nephrolithiasis. *Kidney internacional*. v. 68, p. 1230–1235, 2005.
- TOOLAKOU *et al.* Alarm Photosynthesis: Calcium Oxalate Crystals as an Internal CO₂ Source in Plants. *Plant Physiol*, v. 171, n. 4, p. 2577-2585, 2016.
- WILLIAMS, D. J. *et al.* Organic acids in Kakadu plum (*Terminalia ferdinandiana*): The good (ellagic), the bad (oxalic) and the uncertain (ascorbic). *Food Research International*, v. 89, p. 237–244, 2016.
- WITTEMORE R, KNAFL K. The integrative review: updated methodology. *J Adv Nurs.*, 52(5):546-53, 2005.
- YE, M. *et al.* Determination of inorganic anions in weak acids by using ion exclusion chromatography – Capillary ion chromatography switching column technique. *Journal of Chromatography A*, v. 1588, p. 169–173, 2019.
- ZENI, A. L. B. *et al.* Utilização de plantas medicinais como remédio caseiro na Atenção Primária em Blumenau, Santa Catarina, Brasil. *Ciência e Saúde Coletiva*, v. 22, n. 8, p. 2703–2712, 2017.

ZHANG, Q. W.; LIN, L. G.; YE, W. C. Techniques for extraction and isolation of natural products : a comprehensive review. **Chinese Medicine**, p. 1–26, 2018.

ZYGMUNT, B.; NAMIESNIK, J. Preparation of Samples of Plant Material for Chromatographic Analysis. v. 41, n. March, p. 109–116, 2003.

4 CAPÍTULO II

4.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO

4.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO

4.2 METODOLOGIA

MATERIAIS E REAGENTES

Reagentes

Água ultrapura, grau HPLC. Ácido oxálico 99,90 %, ácido málico 99 %, ácido tartárico 99,90 %, ácido ascórbico 99,00 % e ácido cítrico 99,90 %, todos obtidos da Merck® (Merck®, Brasil). Ácido fosfórico 85,00 % e ácido clorídrico 37,00 %, ambos fornecidos pela Dinâmica (Dinâmica®, Brasil). Outros reagentes usados foram o ácido trifluoroacético (Sigma Aldrich®, Brasil), ácido acético glacial e ácido fórmico 85,00 %, ambos fornecidos pela Synth®, Brasil, metanol, grau HPLC (Merck®, Brasil) e hidróxido de sódio, grau P.A. obtida da Fisher®, Brasil.

Instrumentação

Balança analítica (AD200), com resolução 0,10 mg da empresa Marte®, Brasil; As análises foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) da Shimadzu Corp. (Quioto, Japão) equipado com degaseificador modelo DGU-20A3, duas bombas de alta pressão modelo LC-20AD, injetor automático modelo SIL-20ACHT, controlador modelo CBM-20A e um detector de arranjo de fotodiodos modelo SPD-M20A; Coluna cromatográfica (Merck®, Brasil) LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) 250-4.6 (250 mm x 4,6mm; 5µm); Coluna de guarda ou pré-coluna LiChroCART® 4-4 (Merck®, Brasil) agitador mecânico SL-91 (Solab®, Brasil); e pHmetro PHS-3E (IonLab®, Brasil). espectrofotômetro UV/Vis (Global trade technology – UV-5100). A aquisição, a integração e o processamento dos dados foram realizados utilizando o programa LabSolutions versão 5.54.

Material auxiliar

Material de pesagem (espátula e pesa); balões volumétricos de 10 mL, 50 mL e 100 mL; pçipetas volumétricas de 1, 5, 10, 20 mL; pipetas automáticas 100-1000 µL; vials e septos para HPLC (≈1,5 mL); filtros para seringas com membrana Nylon VWR 0,45 µm; erlenmeyer de 10 a 200 mL); purificador de água – Direct Pure – (Rephile®, USA); SPE Discovery-DSC-SAX (Merck®, Brasil).

COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Inicialmente, a coleta do material (*pool* de folhas com $n=5$) vegetal foi realizada em Recife (PE) em maio de 2020 com posterior confecção das exsiccatas e identificação em herbário que gerou um número de tombamento de 91181 para *Artocarpus altilis* (parkinson) fosberg., (também conhecido como jaca). Em seguida, as lâminas foliares foram secas em estufa por 48 horas a 60°C. O material seco foi triturado, tamisado e acondicionado em recipientes específicos até o momento da análise.

CARACTERIZAÇÃO DOS CRISTAL

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Amostras de lâminas foliares foram fixadas com solução contendo glutaraldeído 2,50 % e tampão cacodilato 0,1 M e pós-fixadas em solução de ósmio 31 2% e tampão cacodilato 0,10 mol. L⁻¹. Após desidratação em série etílica (uma série de soluções alcoólicas em concentrações diferentes, chegando até o álcool 100%), o material foi submetido à secagem em ponto crítico (Bal-Tec CPD 030). Em seguida, as amostras foram acondicionadas em *stubbs*, metalizadas com ouro (HADDAD *et al.*, 1998) e analisadas em microscópio eletrônico de varredura (Quanta 200 FEG) no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), localizado em Recife-PE.

Análise da composição química elementar

Secções transversais de lâminas foliares foram processadas de acordo com a metodologia descrita acima para as análises em MEV. Microanálises químicas por Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) foram realizadas com emprego de um detector de raios X acoplado a um microscópio eletrônico de varredura (Zeiss EVO-LS15).

DESENVOLVIMENTO CROMATOGRÁFICO

Determinação do comprimento de onda ideal ($\lambda_{\text{máx}}$)

A determinação do comprimento de onda ideal ($\lambda_{\text{máx}}$) para a análise foi obtido por varredura espectral, entre 200 e 900 nm, de uma mistura de 1,5 mol. L⁻¹ H₃PO₄ e solução padrão de 1 mg. mL⁻¹ ácido oxálico, pH 2,5 (denominada de Solução de Leitura, SL) empregando um

espectrofotômetro UV/Vis (Global trade technology – UV-5100) sem adição da solução padrão foi usado para zerar inicialmente a leitura

Planejamento unifatorial para otimização das condições cromatográficas

A otimização dos principais parâmetros experimentais seguiu um planejamento fatorial univariado. Nesse caso, cada uma das variáveis foi avaliada individualmente em diferentes níveis, fixando um nível para os demais parâmetros experimentais e, por conveniência, modificando os níveis de cada variável sob investigação de modo a identificar aquele que proporcionou a máxima resposta analítica. Na análise cromatográfica foram variados os componentes da fase móvel e outros fatores que afetam o desempenho analítico, como, por exemplo, o potencial hidrogeniônico (pH). Em uma investigação preliminar, a partir de uma metodologia pré-definida, a influência dos parâmetros experimentais que influenciam o processo de separação do analito foi medida a partir das respostas cromatográficas para cada uma das variáveis investigadas (proporção de modificador orgânico, tipo de ácido adicionado a fase aquosa e pH da fase móvel) (Quadro 4)

Quadro 4 – Variáveis estudadas para otimizar fase móvel.

Níveis	Fase aquosa	pH
n=6	Ácido fósfórico 1,50 mol. L ⁻¹ (H ₃ PO ₄)	2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5
	Ácido clorídrico 1,50 mol. L ⁻¹ (HCl)	
	Ácido trifluoroacético 1,50 mol. L ⁻¹ (TFA)	
	Tampão Fosfato de sódio 0,02 mol. L ⁻¹	
	Ácido Acético 1,50 mol. L ⁻¹ (CH ₃ COOH)	
	Ácido Fórmico 1,50 mol. L ⁻¹ (CH ₂ O ₂)	

Para investigar a influência dos diferentes tipos de ácido adicionado a fase aquosa, quantidades suficientes de cada ácido ou solução tampão foram adicionadas à água ultrapura sob agitação constante, enquanto os níveis de pH e metanol foram fixados em 2,5 e 0,5%, respectivamente. Em seguida, o agente acidificante ideal foi fixado e a influência do pH da fase móvel foi investigada em diferentes valores de pH (de 2 a 4,5, com variação de 0,5 entre os níveis). Por fim, a influência do modificador orgânico foi investigada adicionando diferentes proporções de metanol na fase móvel (1 %, 2 %, 4 % e 8 %), fixando o pH da fase móvel em 2,0 e acidificando a fase aquosa com ácido fosfórico 1,5 mol. L⁻¹. As análises foram realizadas de forma cumulativa, ou seja, o resultado da primeira análise era agregado nas etapas sucessivas. Os resultados foram

avaliados e comparados em termos de área absoluta a partir dos cromatogramas obtidos em cada análise.

Essas condições otimizadas foram usadas em uma análise cromatográfica comparativa (em triplicata, $n=3$) entre as soluções padrão de diferentes ácidos, em metanol, comumente encontrados nas espécies vegetais de interesse, e que poderiam interferir com a seletividade do método analítico, e uma solução padrão do ácido oxálico, em metanol. Os possíveis interferentes analisados foram ácido tartárico, ácido málico, ácido ascórbico e ácido cítrico. Todas as soluções padrão foram preparadas a $200 \mu\text{g. mL}^{-1}$ a partir das soluções padrão de trabalho (SQT). SQT foram preparadas diariamente.

METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO

Preparo do extrato

O oxalato total foi extraído suspendendo 1,0 g do amostras (lâmina foliar) homogeneizadas (trituras) da espécie vegetal (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg. com 20 mL de HCl 2 mol. L^{-1} , a 21°C , por 15 min (Adaptado – Siener *et al.*, 2006). O extrato foi centrifugado e o sobrenadante foi filtrado em filtro seringa de $0,45 \mu\text{m}$. Os extratos foram feitos no mesmo dia em que foram realizados os experimentos ou a análise com o intuito de preservar as características físico-químicas.

Desenvolvimento de metodologia de *clean up* com SPE de Troca iônica

A metodologia de *clean up* é extremamente indicada antes da injeção de amostras complexas. Essa etapa visa eliminar a interferência da matriz na resposta obtida, bem como minimizar os riscos de danificação ao instrumento analítico

Planejamento unifatorial dessorvente

A escolha do dessorvente (agente que irá realizar a eluição na SPE) foi feita seguindo um modelo de planejamento fatorial univariado. Para tanto, foram investigadas soluções padrão de ácido sulfúrico, ácido clorídrico e ácido nítrico, todas na concentração de $0,2 \text{ mol. L}^{-1}$. As demais condições experimentais foram mantidas constantes (volume do dessorvente: 2 mL; condicionante:

3 mL de metanol, seguida de 3 mL de água; solvente de limpeza: 6 mL de água ultrapura; pH da amostra: 4). O fator de diluição adotado nesse estudo foi igual a 2.

A partir do extrato obtido anteriormente, uma alíquota de 5 mL foi centrifugada, filtrada em filtro de seringa de 0,45 μm e diluído 1:1 com uma solução padrão de ácido oxálico 450 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Por fim, o pH foi ajustado para 4 com hidróxido de sódio (NaOH) 6 mol. L^{-1} . O volume da amostra foi de 1 mL e ao fim, o eluato foi diluído com a fase móvel (1:1). Os resultados de área absoluta foram comparadas através do programa *Prism – GraphPad* e os cromatogramas foram obtidos utilizando o programa *Originlab 7*.

Planejamento unifatorial do condicionante

Após a escolha do dessorvente, um modelo de planejamento fatorial univariado também foi seguido para a escolha do condicionante. O condicionante A foi constituído de 3 de metanol, seguido de 3 de água ultrapura e o B de NaOH 0,1 mol. L^{-1} . Os demais fatores não foram variados (dessorvente: H_2SO_4 0,2 mol. L^{-1} ; volume do dessorvente: 2 mL; solvente de limpeza: 6 mL de água ultrapura; pH da amostra: 4). Os resultados de área absoluta foram comparadas através do programa *Prism – GraphPad* e os cromatogramas foram obtidos utilizando o programa *Originlab* versão 7.

Planejamento fatorial completo

A influência dos fatores (i) volume do dessorvente, (ii) concentração do dessorvente, (iii) pH da amostra e (iv) volume do condicionante na intensidade da área dos picos cromatográficos dos analitos de interesse foi investigada por meio de um modelo de planejamento fatorial 2^4 completos constituído de 16 experimentos mais um ponto intermediário em triplicata ($n=3$), o que confere um total de 19 experimentos. Na Tabela 2 os valores dos níveis de cada fator são apresentados, os quais foram estabelecidos de acordo com dados da literatura e em experimentos prévios, considerando as limitações do sistema experimental. Os experimentos foram efetuados de maneira randômica e a análise estatística dos resultados foi feita usando o programa *STATISTICA* versão 10.0 (STATSOFT, 2010).

Tabela 2 - planejamento fatorial 2^4 completo com ponto central para otimização dos parâmetros da extração em fase sólida por troca iônica (SPE de Troca iônica)

Fatores	Níveis		
	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)
Dessorvente (mL)	1,0 mL	2,0 mL	3,0 mL
Dessorvente (mol. L ⁻¹)	0,20 mol. L ⁻¹	0,30 mol. L ⁻¹	0,40 mol. L ⁻¹
Volume condicionante	2,0 mL	4 mL	6,0 mL
pH da amostra	4,0	5,50	7,0

Uma solução de 450 µg. mL⁻¹ e ácido oxálico foi preparada e usada como fortificador. O fator de diluição variou entre 2 e 6.

VALIDAÇÃO

Linearidade

A fim de estabelecer a linearidade do método, curvas analíticas foram preparadas usando cinco pontos em triplicata (n=3) de amostras do extrato de *Artocarpus altilis* L. fortificadas com padrão analítico de ácido oxálico em uma concentração final de 5; 15, 25, 35 e 45 µg. mL⁻¹. Curvas de calibração com coeficiente de variação menor que 15 % foram aceitos. A análise estatística dos dados foi obtida pelo método de regressão linear dos mínimos quadrados e expressa pela seguinte equação de primeira ordem:

$$y = ax + b \quad (1)$$

onde, (a) corresponde ao coeficiente angular, dado pela inclinação da reta e (b) corresponde ao coeficiente linear, dado pelo ponto de interseção da reta com o eixo das ordenadas. A faixa linear foi calculada utilizando o coeficiente de correlação (r). Curvas de calibração com o coeficiente de correlação igual ou maior que 0,99 foram consideradas lineares. O modelo estatístico de regressão foi avaliado também através do teste de falte de ajuste do modelo de regressão e pelo gráfico de dispersão de resíduos.

Limite inferior de quantificação

O resultado do limite inferior de quantificação (LQ) foi calculado a partir de 3 curvas de calibração das amostras fortificadas com padrão analítico de oxalato de cálcio pela fórmula:

$$LQ = \frac{10x \sigma}{IC} \quad (2)$$

Em que: IC é a inclinação da curva de calibração, σ é o desvio padrão.

Efeito matriz

As curvas foram estabelecidas da mesma forma que na linearidade para os mesmos níveis de concentração em triplicata ($n=3$). Soluções do padrão analítico de ácido oxálico nas concentrações de 5; 15, 25, 35 e 45 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ foram preparados e, em seguida, outras 5 soluções também foram preparadas nas mesmas concentrações; porém estas foram contaminadas com o extrato vegetal. A avaliação do paralelismo foi realizada pela análise estatística do coeficiente angular entre as 2 curvas.

Precisão e exatidão intra-ensaio

A precisão e a exatidão intra-ensaio foram avaliadas através da análise de amostras do extrato vegetal enriquecidas com padrão analítico de ácido oxálico na concentração final de 15, 25 e 35 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ($n = 3$ para cada concentração).

Precisão e exatidão inter-ensaio

A precisão e a exatidão foram avaliadas através da análise de amostras do extrato vegetal enriquecidas com padrão analítico de ácido oxálico na concentração final de 15, 25 e 35 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ($n = 3$ para cada concentração). As 9 amostras foram preparadas (baixa, média e alta concentração) de forma independente, por 2 operadores e em 2 dias diferentes.

Robustez

Os parâmetros avaliados na robustez foram: pH da fase móvel (2,10; 2,30 e 2,50), proporção de metanol (2%, 4% e 5%) e fabricante de metanol (Lichrosolv[®] e Honeywell[®]). O ensaio foi realizado em triplicata ($n=3$) e os resultados obtidos foram avaliados a partir da média e desvio padrão (desvio padrão relativo).

Aplicação do método

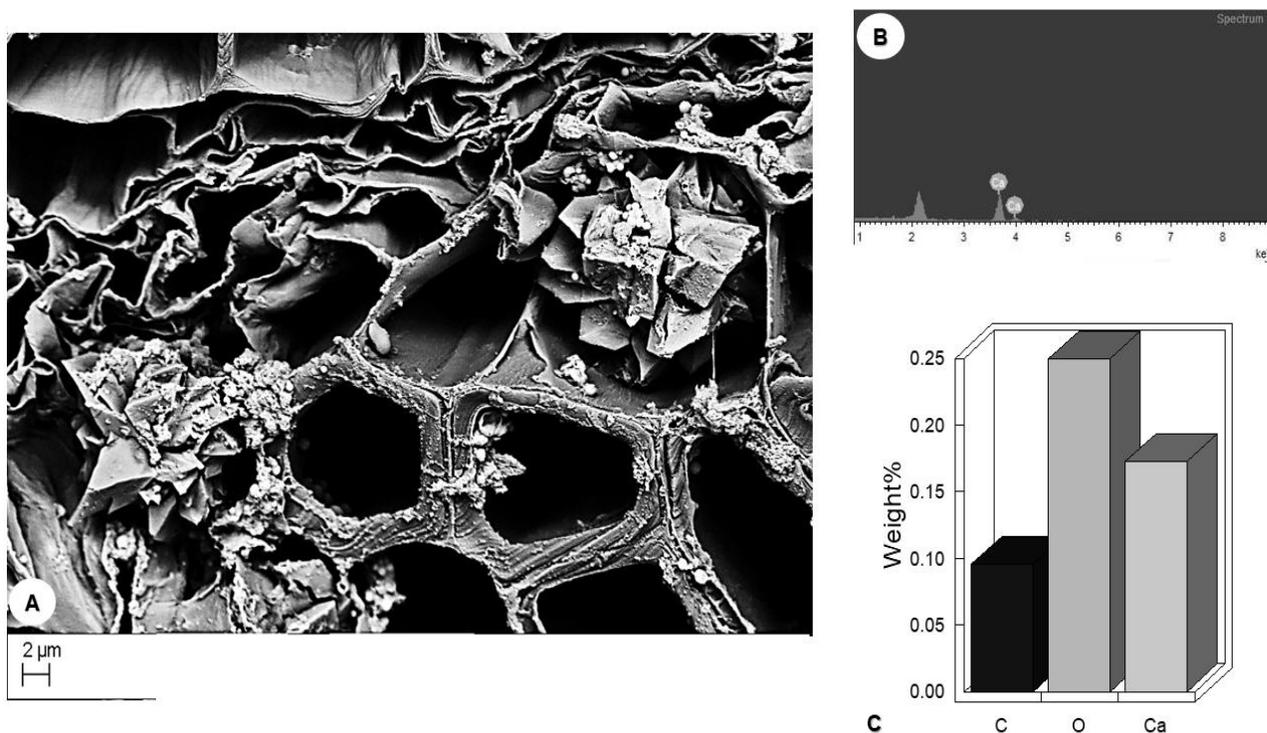
Amostras do extrato de *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg. foram analisadas em duplicata de acordo com o método desenvolvido e validado. Os picos cromatográficos foram confirmados como sendo de ácido oxálico após comparação com os picos cromatográficos das soluções-padrões.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA ELEMENTAR DOS CRISTAIS

Através da análise via MEV-EDS foi possível identificar que a composição química dos cristais presente em *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg. é de CaOx (Figuras 3 e 4).

Figura 3 - Microscopia eletrônica de varredura e composição química elementar dos cristais na lâmina foliar de *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg.



A: drusa; B: difratograma; C: percentual de peso dos constituintes químicos do cristal.
Abreviaturas: dr: drusa. Barra = 2 µm. Fonte: Autor próprio.

Figure 4 - Microscopia eletrônica de varredura e composição química elementar dos cristais na lâmina foliar de *Artocarpus altilis* (parkinson) fosberg

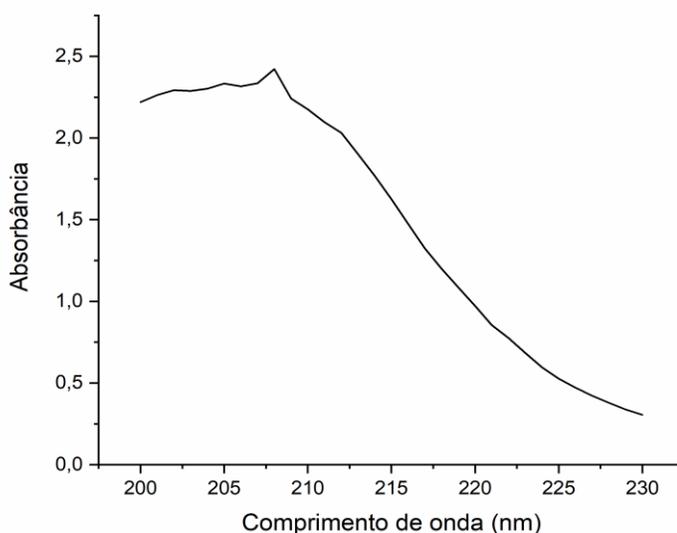
A: drusa; B: difratograma; C: percentual de peso dos constituintes químicos do cristal.
Abreviaturas:: A = 1 µm. Fonte: Autor próprio.

DESENVOLVIMENTO CROMATOGRÁFICO

Seleção do comprimento de onda

Após análise do espectro de absorção do ácido oxálico na amplitude de 200 a 900 nm, foi verificado que a absorbância diminui acima de 230 nm. Desta forma, um novo espectro de varredura foi realizado entre 200 e 230 nm (Figura 5). O ácido oxálico tem absorção máxima em 208 nm, todavia, diversos outros componentes na amostra ou as próprias soluções de composição da fase móvel podem absorver na faixa de 190 a 210 (BUENO *et al.*, 2012). Além disso, é esperado uma grande concentração de ácido oxálico nas amostras, já que os cristais CaOx constitui grande parte do peso das folhas das espécies vegetais (LIBERT; FRANCESCHI, 1987; HORNER, *et al.*, 1997). Desta forma, foi escolhido o comprimento de 220 nm para leitura nas análises subsequentes.

Figure 4 – Espectro de varredura do ácido oxálico solubilizado em H₃PO₄ e metanol (99:1) e pH 2,0 (200-230nm)



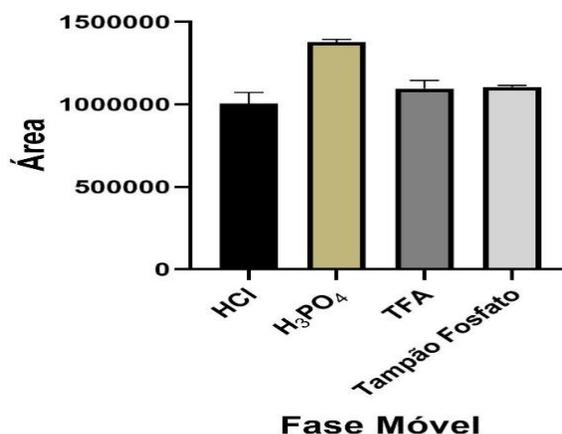
Fonte: autor próprio.

Otimização da fase móvel (Solvente aquoso)

Para favorecer as espécies mais apolares do ácido oxálico, a maior parte dos estudos que utilizam cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em fase reversa (WANG *et al.*, 2016; WILLIAMS *et al.*, 2016), adicionam diferentes ácidos para manter o pH da fase aquosa < 2,5.

Nesse sentido, diferentes ácidos/tampão (ácido clorídrico 1 mol. L⁻¹, ácido trifluoroacético 1 mol. L⁻¹, ácido fórmico 1 mol. L⁻¹, ácido fosfórico 1 mol. L⁻¹ e tampão fosfato 20 mM pH 2,0) foram adicionados a fase aquosa (sob condições que mantinham o pH \geq 2,0 para não comprometer a integridade da fase estacionária) e a máxima eficiência foi medida considerando o perfil simétrico dos picos cromatográficos e as áreas absolutas correspondentes as análises cromatográficas após adição dos diferentes ácidos (Figura 6).

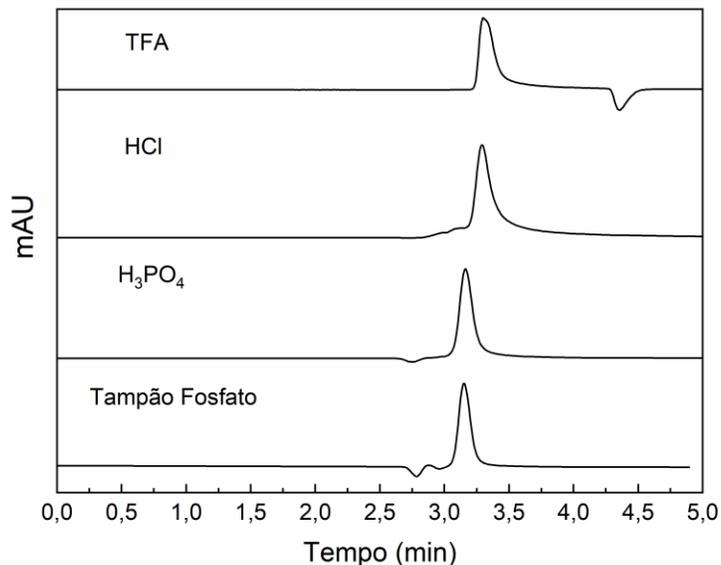
Figura 5 - Áreas absolutas dos sinais analíticos de uma mesma amostra (ácido oxálico 200 μ g. mL⁻¹) frente a diferentes acidificantes da fase móvel.



Condição cromatográfica: Fase móvel: pH: 2,5; fluxo: 1 mL.min⁻¹; 0,50% metanol. Fonte: autor próprio.

Como pode ser observado na Figura 6 H₃PO₄ como agente acidificante contribuiu com o maior quantitativo absoluto em área. Em um estudo realizado por Wang *et al* (2014), os autores utilizam HPLC em fase reversa (C18) para quantificação de ácidos orgânicos em uma espécie vegetal e discutem que é adequada a utilização de ácido fosfórico como acidificante da fase móvel. Além disso, de acordo com a Figura 7 os sinais cromatográficos correspondentes a cada tipo de ácido apresentavam similar simetria, tempos de retenção muito próximos. Todavia, o ácido fosfórico foi escolhido como acidificante da fase móvel, pois além de apresentar uma maior recuperação em área absoluta, é um reagente de menor custo em comparação ao TFA e menos danoso ao sistema cromatográfico e à coluna cromatográfica que o HCl e o tampão fosfato. O ácido fórmico e o ácido acético não apresentaram resposta adequada, por isso foram descartados do estudo.

Figura 6 - Cromatogramas de uma mesma amostra (ácido oxálico 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) frente a diferentes acidificantes da fase móvel

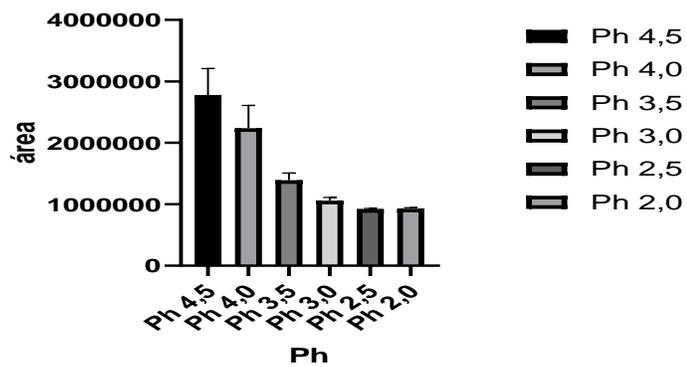


Condição cromatográfica: Fase móvel: pH: 2,5; fluxo: 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 0,50% metanol. Fonte: autor próprio.

Otimização da fase móvel (pH)

Após escolha do acidificante da fase móvel, foi realizado a otimização do pH, analisando uma faixa de 6 níveis, de 2 a 4,5 com variação de 0,5 no valor. A Figura 8 mostra que com pH 4,5 há um maior valor em área absoluta.

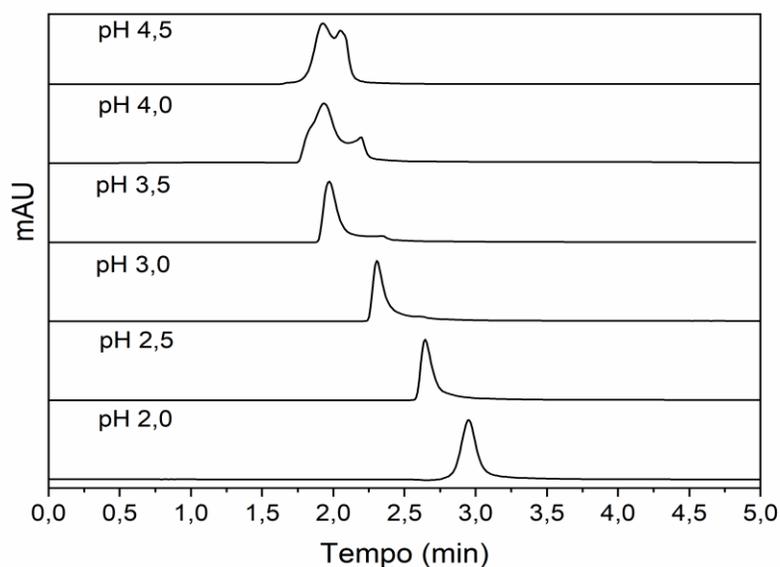
Figura 7 - Áreas absolutas dos sinais analíticos de uma mesma amostra (ácido oxálico 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) frente a diferentes pHs da fase móvel.



Condição cromatográfica: Fase móvel: Água ultrapura acidificada com H_3PO_4 :Metanol (99,5:0,50); fluxo: 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; Fonte: autor próprio.

Entretanto, o cromatograma comparativo entre os picos correspondentes a cada ponto de pH (Figura 9) indica que há uma diminuição no tempo de retenção do ácido oxálico conforme o aumento do pH. Esse comportamento evidencia uma menor interação do ácido oxálico com a fase estacionária (C18) provavelmente relacionado a formação de íons. Além disso, há uma gradativa perda na simetria dos picos à medida que há um aumento no pH da fase móvel, ficando mais evidente com o surgimento de um segundo sinal analítico que também pode ser justificado pela formação de espécies iônicas em equilíbrio químico ou degradação do analito.

Figure 8 - Cromatogramas de uma mesma amostra (ácido oxálico $200 \mu\text{g. mL}^{-1}$) frente a diferentes pHs da fase móvel ($\text{H}_2\text{O} + \text{H}_3\text{PO}_4$).



Condição cromatográfica: Fase móvel: Água ultrapura acidificada com H_3PO_4 :Metanol (99,5:0,50); fluxo: $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; pH: 2-4,5. Fonte: autor próprio.

Figuras de mérito

O fator de retenção, k , (Tabela 3) descreve a taxa de migração de um analito em uma coluna. Seu valor deve estar entre 0,50 e 20, pois em valores muito baixos, a eluição é tão rápida que se torna muito difícil determinar com exatidão o tempo de retenção e em valores muito altos, a eluição exige muito tempo de análise (POOLE, 2003).

Tabela 3 - Parâmetros cromatográficos obtidos em diversos pHs para o ácido oxálico

pH	Tr	K	N
2,0	2,94	0,49	1400
2,5	2,69	0,31	880
3,0	2,45	0,13	490
3,5	2,25	0,09	290
4,0	x	x	x
4,5	x	x	x

O fator de retenção pode ser calculado pela equação 3.

$$k = \frac{tr - tm}{tm} \quad (3)$$

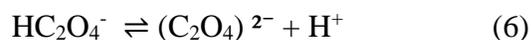
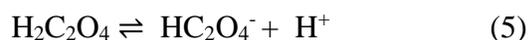
Onde, tr corresponde ao tempo de retenção do composto de interesse e Tm ao tempo morto. O número de pratos teóricos (N) (Tabela 3) é uma medida indireta da largura do pico a um dado tempo de retenção. Colunas com um número alto de pratos teóricos são consideradas mais eficientes e apresentarão picos mais estreitos e pode ser calculado a partir da equação 4.

$$N = 16(Tr/Wb)^2 \quad (4)$$

Onde, Tr corresponde ao tempo de retenção do composto de interesse e Wb à largura da base do pico. Para o ácido oxálico, N foi igual a 880,8. De acordo com a FDA (1997), o número de pratos teóricos deve ser superior a 2000. O baixo número encontrado para N é devido ao baixo tempo de retenção do ácido oxálico, todavia, não havendo interferente que coelua com o analito de interesse, o método atente ao objetivo proposto.

Pode-se observar que há uma gradativa diminuição nos valores de k a cada aumento na faixa de pH. k máximo foi obtido em pH 2,0 e mesmo em pH extremo, o ácido oxálico ainda interage pouco com a fase estacionária. Com o surgimento de um segundo sinal analítico, não foi possível determinar o tempo de retenção e os demais parâmetros cromatográficos nos pHs de 4,0 e 4,50. Ademais, como consequência da baixa interação do analito com a fase estacionária, o número de pratos teóricos também diminui de valor, todavia, os sinais apresentam-se simétricos até pH de 3,0.

Por ser um ácido diprótico, o ácido oxálico pode se comportar de maneira diferente em diferentes faixas de pH. Isso se deve ao fato de que compostos ácidos, em decorrência de suas características físico-químicas (grau de ionização) podem se tornar mais ou menos solúveis (KETTLER; WESOLOWSKI; PALMER; 1998). De acordo com a constante de dissociação do ácido oxálico, é possível inferir que quanto menos prótons (H^+), ou seja, quanto maior o pH, mais o equilíbrio é deslocado para a formação do oxalato ($(C_2O_4)^{2-}$) (ATKINS; PAULA, 2006).



Ademais, o ácido oxálico apresenta 2 constantes de dissociação: $pK_{a1} = 1,46$ e $pK_{a2} = 4,40$ (PUBCHEM, 2020). Isso significa dizer que quando em solução com pH de 1,46 o ácido oxálico se encontra 50% na forma de $H_2C_2O_4$ e 50% na forma de $HC_2O_4^-$ e quando em pH 4,40, encontra-se 50% na forma $HC_2O_4^-$ e 50% na forma de $(C_2O_4)^{2-}$. Em outras palavras, o pH da solução interfere diretamente na separação cromatográfica uma vez que os diferentes graus de ionização do ácido oxálico interferem diretamente na polaridade da molécula.

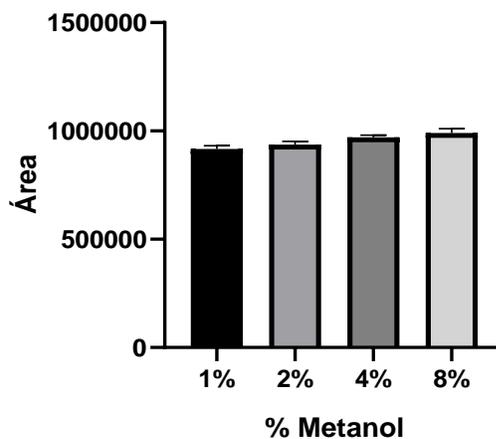
Na forma aniônica, devido as cargas residuais negativas, o oxalato pode facilmente se conjugar a metais presentes no meio e se precipitar, acarretando em entupimentos no sistema e na coluna cromatográfica. Por outro lado, embora a diminuição do pH da fase móvel favoreça a forma molecular do ácido oxálico ($H_2C_2O_4$), o baixo pH pode diminuir o tempo de vida útil da coluna cromatográfica que apresenta um limite mínimo de pH em 2,0. Todavia, optou-se pela utilização do pH limite inferior tendo em vista o baixo tempo de retenção obtida em pH maiores.

Otimização da fase móvel (% metanol)

Nesta etapa, procurou-se ajustar uma proporção mínima de metanol com o intuito de preservar as características da fase estacionária (coluna cromatográfica) ao longo das análises. O ácido oxálico apresenta baixa solubilidade em solventes apolares, podendo ocorrer cristalizações, contudo, apresenta moderada solubilidade em metanol (HUSSAIN, KHAN SHARBER, 2012),

assim, o metanol foi utilizado na condução desse experimento nas proporções de 0,1%, 2%, 4% e 8% (Figura 10).

Figure 9- Áreas absolutas dos sinais analíticos de uma mesma amostra (ácido oxálico 200 µg/mL) frente a diferentes proporções de metanol da fase móvel.

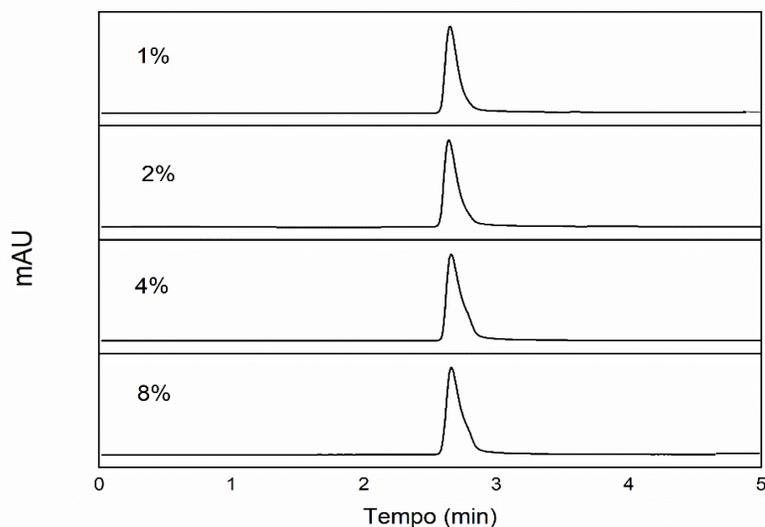


Condição cromatográfica: Fase móvel: Água ultrapura acidificada com H₃PO₄:Metanol (92-99:1-8); fluxo: 1 mL.min⁻¹; pH: 2,0. Fonte: autor próprio.

1

Os valores de área absoluta aumentaram conforme houve o aumento de proporção de metanol na fase móvel (Figura 10) todavia, esse aumento pode estar relacionado com perda de simetria do pico, evidenciado pelo ao alargamento de pico. Além disso, há uma ligeira diminuição no tempo de retenção em proporções maiores de metanol, o que pode ser explicado pelo aumento da fase orgânica, que aumenta a força de eluição cromatográfica e diminui o tempo de retenção do analito. A utilização de fases 100% aquosas pode diminuir o tempo de vida útil da coluna cromatográfica a longo prazo, pois aumenta a taxa de perda dos grupos silanos devido à hidrólise da ligação siloxano que liga o silano ao suporte na coluna cromatográfica (COLINS *et al.*, 2016), portanto, foi escolhido a proporção de 1%. Destaque-se aqui que os parâmetros cromatográficos calculados na sessão anterior, não se alteraram para proporção de 1% em metanol.

Figure 10- Cromatogramas de uma mesma amostra (ácido oxálico 200 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) frente a diferentes proporções de metanol da fase móvel.



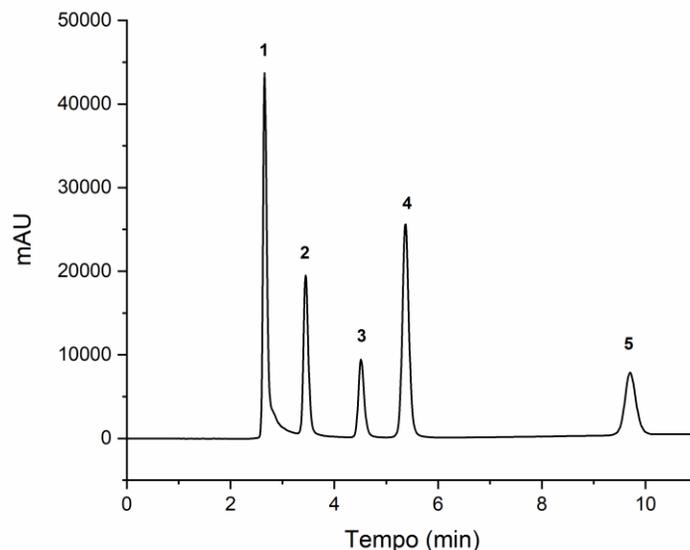
Condição cromatográfica: Fase móvel: Água ultrapura acidificada com H_3PO_4 :Metanol (92-99:1-8); fluxo: 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; pH: 2,0. Fonte: autor próprio.

Condições cromatográficas otimizadas

Fase estacionária C18; fase móvel composta por água acidificada com H_3PO_4 (1,5 mol. L^{-1}) e Metanol (99:1); pH 2,0; fluxo de 0,6 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e comprimento de onda em 220 nm.

Este método foi aplicado na análise cromatográfica de uma amostra com possíveis ácidos interferentes: Ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico e ácido ascórbico. Esses ácidos orgânicos de cadeia curta estão presentes na maior parte das espécies vegetais (BUCIO *et al.*, 2001) e têm características físico-químicas semelhantes ao analito de interesse (ácido oxálico). O cromatograma descrito na Figura 11 sugere que houve boa separação de todos os ácidos da amostra utilizando o método proposto. O perfil de eluição e separação foi bastante parecido com os resultados oriundos do estudo realizado por Wang *et al.*, (2014), no qual os autores utilizam condições cromatográficas semelhantes para análise de ácidos orgânicos de cadeia curta em matrizes vegetais.

Figura 11- Cromatograma do ácido oxálico; ácido tartárico, ácido málico; ácido ascórbico e ácido cítrico obtido utilizando o método cromatográfico desenvolvido.



Legenda: 1: ácido oxálico; 2: ácido tartárico; 3: ácido málico; 4: ácido ascórbico; 5: ácido cítrico.
 Condição cromatográfica: Fase móvel: Água ultrapura acidificada com H₃PO₄:Metanol (99:1); fluxo: 1 mL. min⁻¹; pH: 2,0. Fonte: autor próprio.

A resolução dos picos cromatográficos (parâmetro que serve para avaliar a separação cromatográfica de sinais adjacentes) foi calculada entre o sinal do ácido oxálico e do ácido tartárico a partir da equação 5.

$$R_s = 2 \frac{Tr_2 - Tr_1}{W_1 + W_2} \quad (7)$$

onde, Tr₂ corresponde ao tempo de retenção do composto mais retido e Tr₁ do menos retido. W₁ e W₂ correspondem às larguras dos picos do composto menos retido e do mais retido, respectivamente. O valor da R_s entre os sinais 1 e 2 foi de 2,2, evidenciando uma boa separação cromatográfica. Uma resolução entre sinais cromatográficos de 1,0 significa somente 2,3% de sobreposição, para resolução igual a 1,5, somente 0,1% e nenhuma sobreposição a partir de resolução superior a 1,8 (CASS; DEGANI, 2001; FERRAZ, 2001).

Ao fim, a condição cromatográfica desenvolvida consistiu em uma fase móvel 99:1 (água:metanol); pH da fase móvel em 2,0 (acidificada com H₃PO₄ 1,5 mol. L⁻¹) e fluxo em 0,6 mL.min⁻¹.

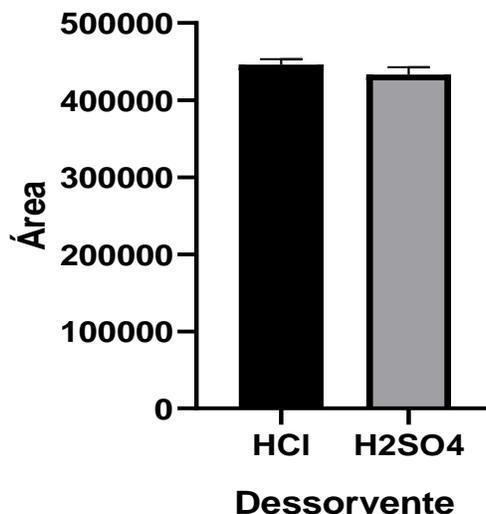
4.3.1 Desenvolvimento de metodologia *clean up* com *spe-troca* iônica

De forma geral, a otimização do método extrativo baseou-se em utilizar uma etapa de *clean-up* (com SPE- troca iônica) do extrato vegetal com o intuito de minimizar os riscos de entupimento da coluna decorrente de precipitações, uma vez que a utilização de pré-colunas pode não ser suficiente para reter todos os possíveis interferentes do extrato vegetal bruto e que podem vir a precipitar no sistema cromatográfico (Gama, Chaves, 2019). Os métodos de otimização univariada estão presentes em diversos estudos, entretanto é uma metodologia que vem sendo pouco aplicada nos desenvolvimentos e otimização de métodos, uma vez que no planejamento unifatorial não há uma análise na interação entre as variáveis, o resultado obtido não necessariamente corresponde às condições que levam ao “ótimo verdadeiro” (Zamora *et al.*, 2004, Kowalski *et al.*, 2013). Desta forma, os estudos univariados ficam basicamente restritos a etapas preliminares de estudos mais complexos, como os planejamentos multifatoriais (Grigolo *et al.*, 2018).

Análise unifatorial (dessorvente)

Inicialmente, observou-se, a partir do cromatograma, que a utilização do ácido nítrico ocasionava o surgimento de um sinal analítico interferente de alta intensidade muito próximo ao sinal do ácido oxálico. Desta forma, o ácido nítrico foi descartado. A Figura 13 mostra que os valores absolutos de área para o HCL e H₂SO₄ foram muito próximos, todavia, com o H₂SO₄ o sinal analítico mostrou maior simetria.

Figura 12 - Áreas absolutas dos sinais analíticos obtidos após extração por SPE-troca iônica, utilizando como dessorvente o HCl ou H₂SO₄.



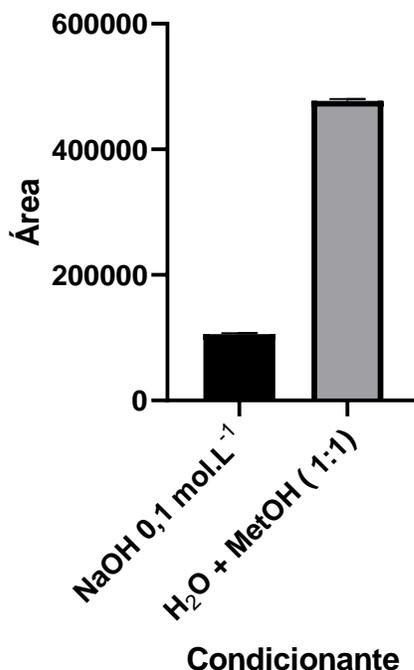
Condição cromatográfica: Fase móvel: Água ultrapura acidificada com H₃PO₄:Metanol (99:1); fluxo: 0,6 mL. min⁻¹; pH: 2,0. Fonte: autor próprio.

Luque al., 2002 desenvolveram um método extrativo por SPE-troca iônica para determinação de ácidos carboxílicos de cadeia curta em amostras de mel. Nesse estudo, os autores escolheram o H₂SO₄ como dessorvente e obtiveram bons resultados. Desta forma, o ácido sulfúrico foi escolhido como dessorvente e utilizado nas etapas posteriores.

Análise unifatorial (Condicionante)

Definido o dessorvente, prosseguiu-se com a escolha do condicionante. A escolha do tipo de condicionante assim como o do dessorvente, foi baseado na análise de estudos prévios que analisaram o teor de ácido oxálico e utilizaram SPE como método extrativo (RODRIGUES *ET AL.*, 2006; GUILHERME, RODRIGUES, PINTO, 2008; LUQUE *ET AL.*, 2012, TRUJIRO-VARGAS *ET AL.*, 2019). De acordo com a Figura 13, com a utilização de água e metanol como solvente condicionante foi possível obter uma maior área absoluta em comparação ao NaOH.

Figura 13- Áreas absolutas dos sinais analíticos obtidos após extração por SPE-troca iônica, utilizando como condicionante o NaOH ou H₂O + MetOH (1:1).



Condição cromatográfica: Fase móvel: água ultrapura acidificada com H₃PO₄:metanol (99:1); fluxo: 0,6 mL. min⁻¹; pH: 2,0. Fonte: Autor próprio.

Diversos estudos obtiverem bons resultados utilizando água: metanol como solvente condicionante (Rodrigues *et al.*, 2006; Guilherme, Rodrigues, Pinto, 2008), todavia, Luque *et al.*, 2012, durante a otimização do seu método SPE-Troca iônica, observou que o NaOH 0,1 mol. L⁻¹ foi o solvente condicionante que obteve os melhores resultados, porém, em nosso estudo, o uso desse solvente não proporcionou boa eficácia ou boa área do sinal analítico, pois a retenção do ácido oxálico na fase sólida foi muito inferior quando o condicionante usado era água:metanol. Desta forma água: metanol foi escolhido como solvente condicionante e usado nas próximas etapas.

Planejamento Multifatorial

Procedimentos envolvendo a otimização multivariada, como o planejamento fatorial completo, vêm sendo largamente utilizados no desenvolvimento de métodos analíticos (FERNÁNDEZ *et al.*, 2014; TAHERI *et al.*, 2015) por serem mais econômicos e efetivos. Eles

permitem a avaliação dos efeitos de interação e a otimização de mais de uma variável simultaneamente. Isso é alcançado com um menor número de ensaios, menor custo operacional e menor tempo gasto para obter as condições ótimas do método de extração (STALIKAS *et al.*, 2009). Neste estudo foram necessários 19 experimentos, realizados de forma aleatória em um único dia.

O quadro 7 descreve a matriz com os parâmetros reais e codificados e as respostas para todos os analitos. É possível verificar que as áreas de maior valor foram obtidas no experimento 2 e 8. Destaca-se que não há na literatura matrizes de planejamento multifatorial para o desenvolvimento de métodos extrativos por SPE-Troca iônica.

Quadro 7 - Matriz com valores não codificados e respostas.

ensaio	Volume dessorvente (mL)	Dessorvente mol. L ⁻¹	Volume condicionante (mL)	pH da amostra	Área do Sinal analítico
1	1	0,2	2	4	22698
2	3	0,2	2	4	2856726
3	1	0,4	2	4	104672
4	3	0,4	2	4	1121723
5	1	0,2	6	4	83781
6	3	0,2	6	4	1427281
7	1	0,4	6	4	56464
8	3	0,4	6	4	3832054
9	1	0,2	2	7	123099
10	3	0,2	2	7	1722235
11	1	0,4	2	7	169506
12	3	0,4	2	7	1844707
13	1	0,2	6	7	171865
14	3	0,2	6	7	1806067
15	1	0,4	6	7	154805
16	1	0,4	6	7	1286833
17	2	0,3	4	5,5	1450441
18	2	0,3	4	5,5	1068404
19	2	0,3	4	5,5	1181007

A Tabela 4 mostra os efeitos dos parâmetros isoladamente e de suas interações. Valores positivos indicam que a resposta aumentará quando uma variável passa do nível inferior para o nível superior e valores negativos, o inverso. Para as interações, valores positivos indicam que a resposta aumentará se as duas variáveis forem em direção ao mesmo nível e valores negativos indicam um aumento na resposta se as variáveis forem em direções contrárias. As replicatas no ponto central foram utilizadas para estimar o erro puro, o erro padrão dos efeitos, a variância

experimental e a curvatura entre os níveis escolhidos para cada uma das variáveis, os quais podem ser visualizados na Tabela 4. De acordo com os resultados, não houve curvatura significativa.

Tabela 2 - Efeitos dos parâmetros e suas interações na área dos picos.

	Efeito	Erro	T(2)	P	-95%	+95%
Principal/Interações	1066546	19051.90	55.9811	0.000319	984572	1148519
Curvatura	221837	104496.4	2.1229	0.167758	-227775	671449
(1) Dessorvente (mL)	1876342	41522.66	45.1884	0.000489	1697684	2055000
(2) Dessorvente (mol. L⁻¹)	44627	41522.66	1.0748	0.394935	-134031	223284
(3) Condicionante (mL)	106723	41522.66	2.5702	0.123868	-71935	285381
(4) pH	-278285	41522.66	-6.7020	0.021546	-456943	-99628
1 e 2	23626	41522.66	0.5690	0.626748	-155032	202283
1 e 3	94988	41522.66	2.2876	0.149414	-83670	273646
1 e 4	-366200	41522.66	-8.8193	0.012614	-544858	-187543
2 e 3	415664	41522.66	10.0105	0.009832	237006	594322
2 e 4	-136480	41522.66	-3.2869	0.081417	-315138	42177
3 e 4	-216717	41522.66	-5.2193	0.034805	-395375	-38060
1*2*3	458854	41522.66	11.0507	0.008090	280196	637511
1*2*4	-130153	41522.66	-3.1345	0.088480	-308810	48505
1*3*4	-222015	41522.66	-5.3468	0.033244	-400672	-43357

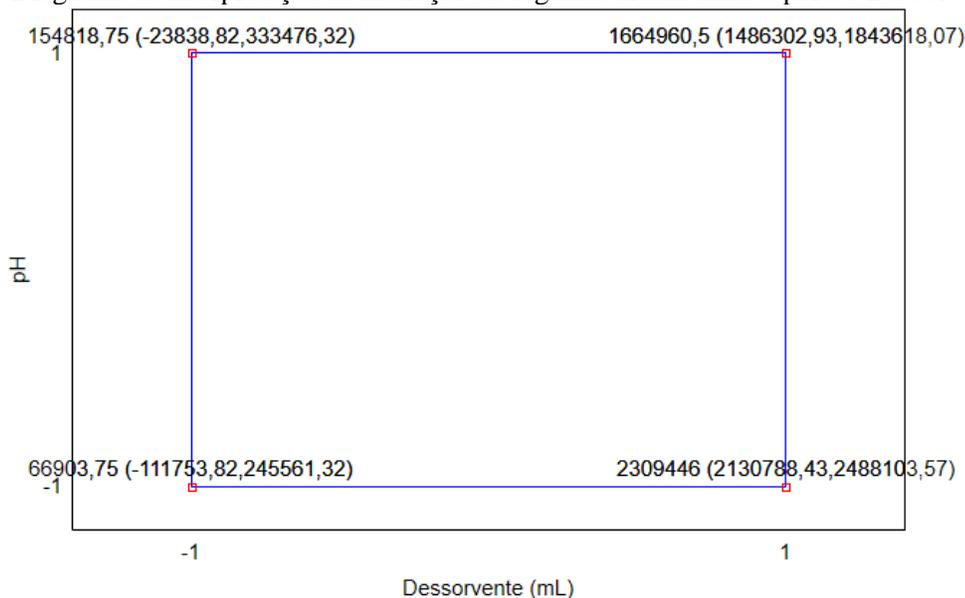
*em vermelho estão os valores significativos. T(2): T(2) = Efeito/ erro

Primeiramente é necessário destacar que não há dados na literatura científica sobre otimização multivariada de extração de ácidos orgânicos de cadeia curta por SPE-Troca iônica, o que dificulta a comparação dos dados obtidos nessa pesquisa. De acordo com a tabela 4 é possível verificar que houve efeitos de primeira, segunda e terceira ordem. Conforme há uma diminuição no pH da amostra, há um aumento na área do sinal analítico. Quimicamente, pode haver uma explicação do porquê no menor nível de pH foi possível obter uma melhor resposta. Em pH acima de 4,5 o ácido oxálico encontra-se predominantemente em sua forma aniônica totalmente desprotonada ($(C_2O_4)^{2-}$). O íon oxalato nesse estado pode ter uma ligação eletrostática mais forte com íon quaternário de amônio presente na fase estacionária dos cartuchos de SPE, necessitando de maiores volumes de dessorvente ou um aumento na concentração do mesmo. Essa hipótese pode ser verificada quando é analisado o efeito principal do volume do dessorvente, indicando que quando maior o volume, maior a área do sinal analítico.

O valor de pH mais baixo vai de encontro ao método utilizado por Trujiro-Vargas *et al.*, 2019, no qual utilizam um pH da amostra entre 9-10. Rodrigues *et al.*, 2007 desenvolveram uma metodologia de extração para determinação de ácidos orgânicos com estruturas e propriedades semelhantes ao ácido oxálico (ácido málico, succínico pirúvico). Os autores utilizaram um pH da amostra em torno de 7, o que também vai de encontro aos resultados encontrados nesse estudo. Todavia, ambos os estudos anteriores não realizaram nenhum tipo de otimização experimental, logo, não haviam como concluir que aquele pH estabelecido era o ideal.

Ainda de acordo com a tabela 4, é possível verificar que houve uma interação negativa de segunda ordem entre o Dessorvente (mL) e o pH. A Figura 14 mostra claramente que o valor da área aumenta quando as variáveis caminham em direções opostas. A maior parte dos estudos que utilizam SPE-troca iônica, utilizam volumes de dessorvente que variaram de 2 a 5 mL, a depender da concentração do dessorvente e do volume de amostra (variando de 1 a 10 mL) (GUILHERME, RODRIGUES, PINTO, 2008; LUQUE *et al.*, 2012, TRUJIRO-VARGAS *et al.*, 2019). Uma exceção foi observada no estudo de Xiao *et al.*, (2006), no qual utilizam um volume de dessorvente de 50 mL, porém o volume de amostra foi de 100 mL, o que proporcionalmente daria 0,5 mL para cada mL de amostra. De uma forma geral, os estudos utilizam um baixo volume de dessorvente, todavia, novamente, nenhum estudo realizou nenhum tipo de otimização experimental, portanto, não há indícios de que os volumes de dessorvente utilizados naqueles casos era o ideal.

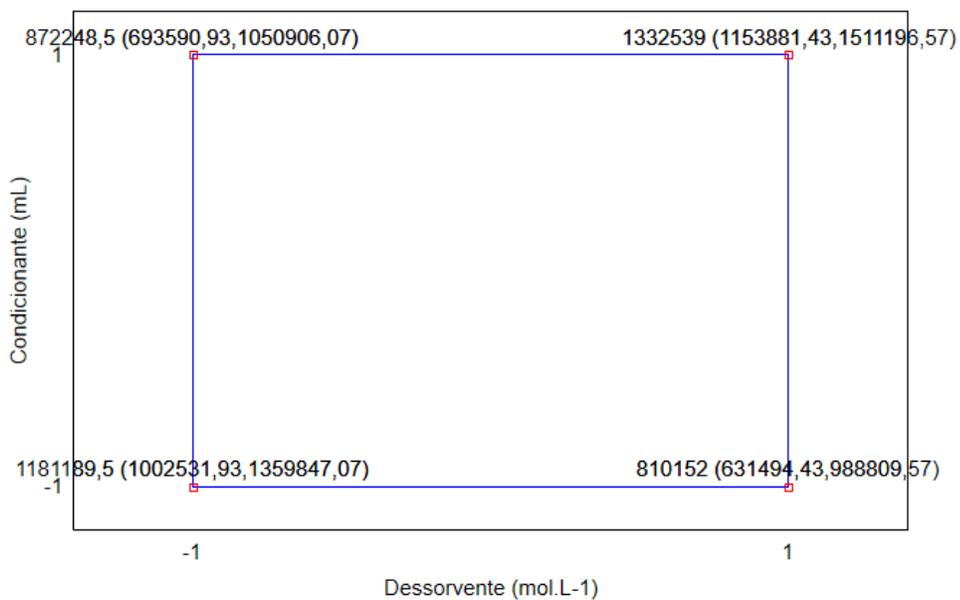
Figura 14 -Diagrama de interpretação de interação de segunda ordem entre o pH e o Dessorvente (mL).



Fonte: Autor próprio.

A Figura 15 representa a interação entre o dessorvente (mol. L^{-1}) e o condicionante (mL). Essa interação foi significativa e positiva, ou seja, os valores de área aumentam conforme os fatores caminham para a mesma direção. É possível verificar que a área do sinal analítico foi maior quando o condicionante (mL) estava no nível +1 e o dessorvente (mol. L^{-1}) também estava no nível +1.

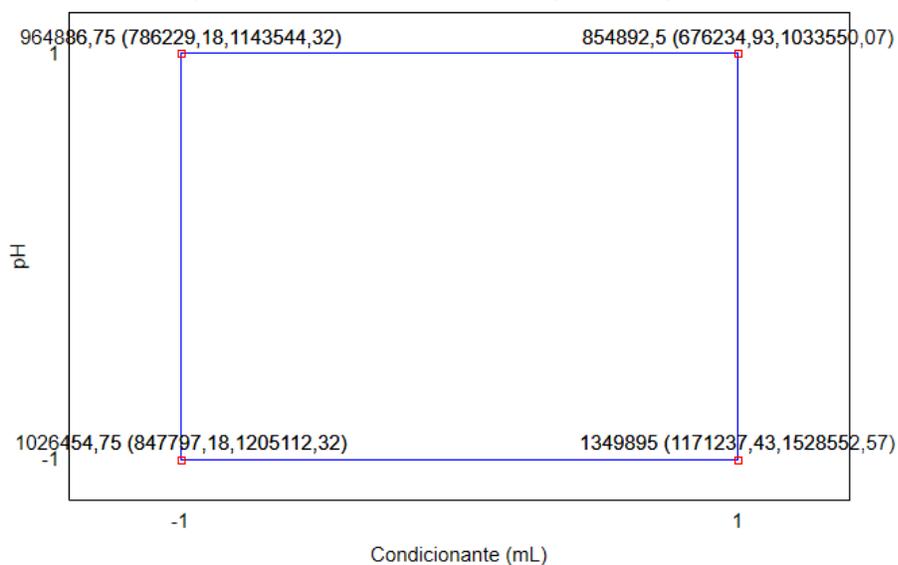
Figura 15 - Diagrama de interpretação conjunta de interação de segunda ordem entre o Condicionante (mL) e o Dessorvente (mol.L^{-1})



Fonte: Autor próprio.

Também foi verificado uma interação negativa significativa de segunda ordem entre o condicionante (mL) e o pH. A figura 16 mostra que os valores de área aumentam quando as variáveis caminham em direções opostas. É possível verificar que o valor da área do sinal analítico é maior com o pH no nível -1 e o condicionante (mL) no nível +1.

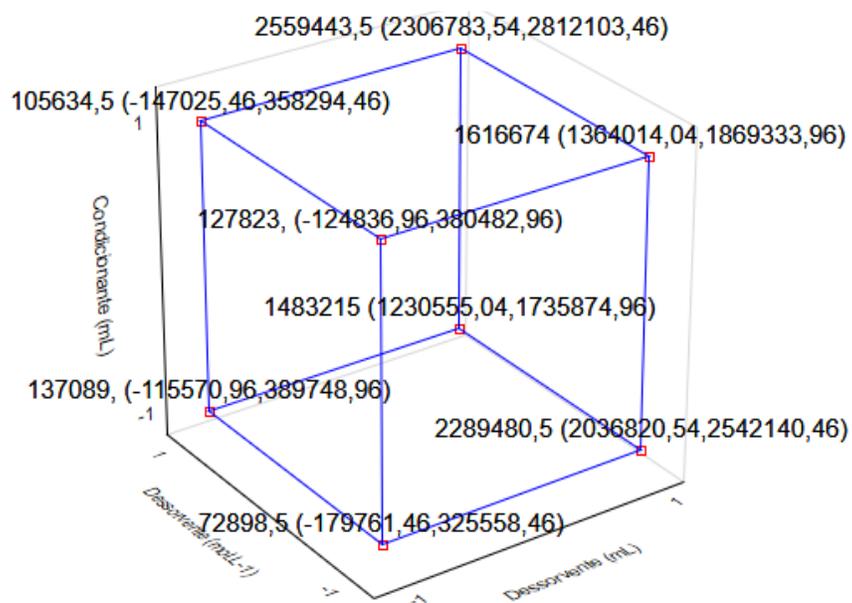
Figura 16- Diagrama de interpretação conjunta de interação de segunda ordem entre o pH e o Condicionante (mL)



Fonte: Autor próprio.

Interações de 3 ordem são mais raras de acontecer, porém, foi possível observar 3 interações significativas. Pela Figura 17 é possível verificar uma interação positiva entre Dessorvente mol.L⁻¹, dessorvente (mL) e Condicionante (mL). O valor da área do sinal analítico aumentou quando todos fatores estavam no nível +1.

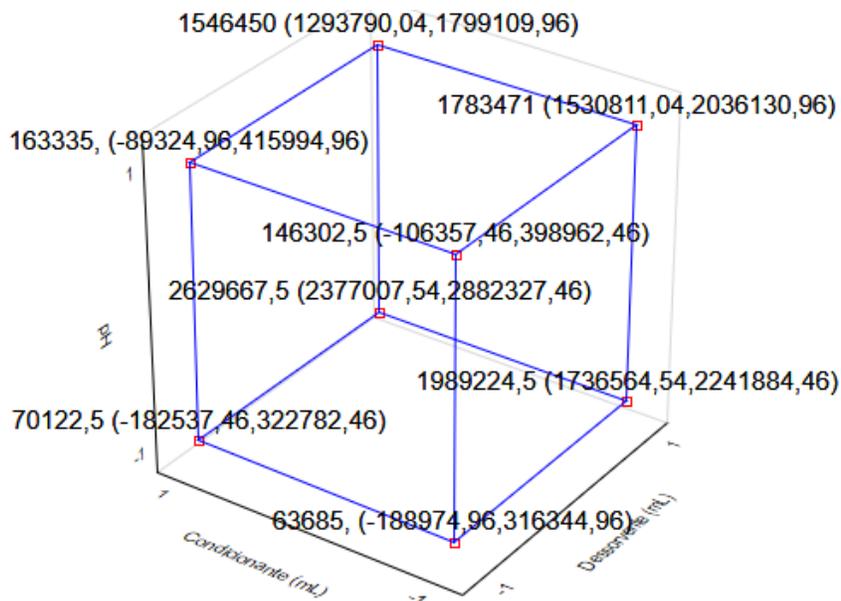
Figura 17- Diagrama de interpretação conjunta de interação de terceira ordem entre o Condicionante (mL), Dessorvente (mol. L^{-1}) e Dessorvente (mL).



Fonte: Autor próprio.

Outra interação significativa de terceira ordem foi observada entre Dessorvente (mL), Condicionante (mL) e pH. Conforme a Figura 18 é possível verificar uma interação negativa em que o maior valor de área do sinal analítico ocorreu quando os fatores estavam nos níveis +1, +1 e -1, respectivamente.

Figura 18 - Diagrama de interpretação de interação conjunta de terceira ordem entre o Condicionante (mL), pH e Dessorvente (mL).



Fonte: Autor próprio.

Quadro 5 - Condições otimizadas para a extração dos analitos por SPE-Troca iônica

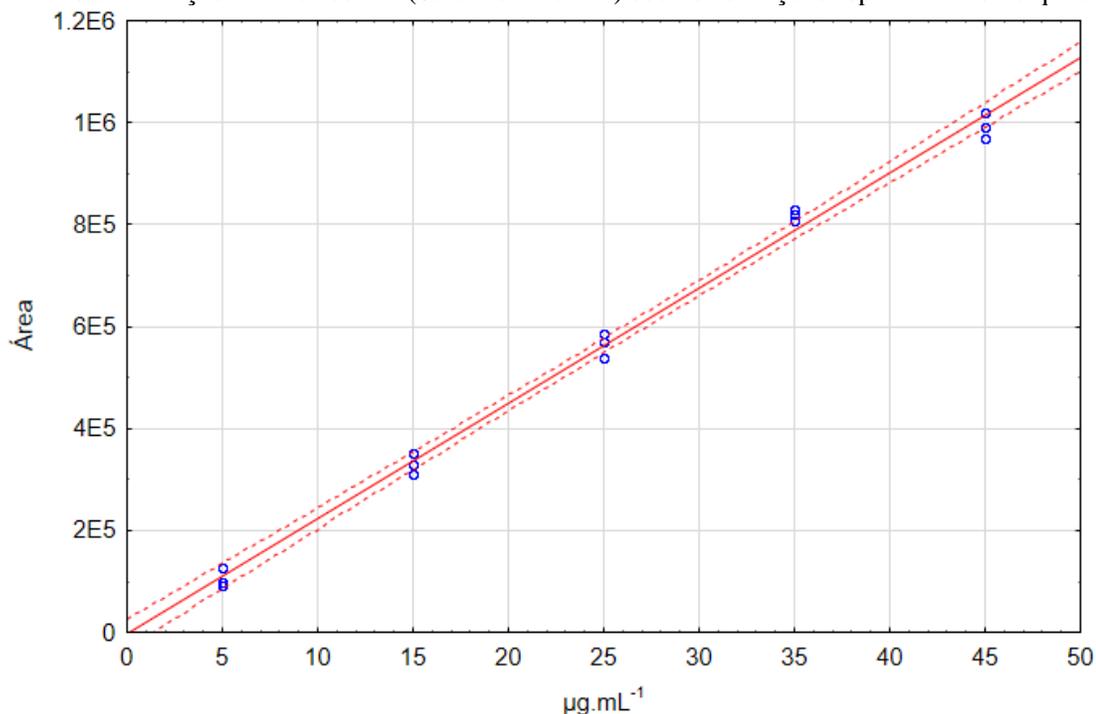
Parâmetros	Condições otimizadas
Tipo de dessorvente	Ácido sulfúrico
Tipo de condicionante	Água ultrapura: Metanol
Dessorvente (mL)	3
Dessorvente (mol. L ⁻¹)	0,4
Condicionante (mL)	6
pH	4

4.3.2 Validação

Linearidade

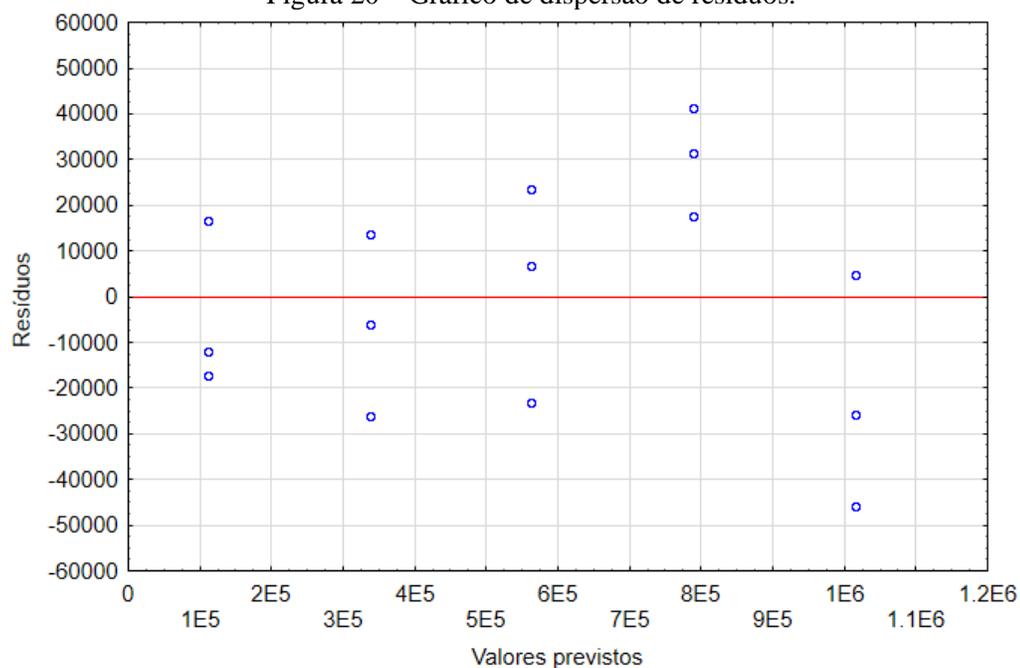
A linearidade fornece a relação de proporcionalidade entre a resposta do instrumento e a concentração do analito. Esta resposta deve ser reprodutível e obtida a partir da curva analítica. Os resultados obtidos a partir da análise de regressão linear descritos na Figura 19, 20 e Tabela 5 comprovaram que o analito apresenta linearidade nas faixas de concentrações estudadas, como preconizado pela legislação. A partir do gráfico de resíduos é possível verificar a aleatoriedade e homoscedasticidade, ou seja, a variação em Y é muito próxima em qualquer valor de X.

Figura 19 – Curva analítica do ácido oxálico (padrão) no intervalo de concentração de 5 – 45 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ obtida através da extração em fase sólida (SPE-troca iônica) sob as condições especificadas no quadro 8.



Condição cromatográfica: Fase móvel: Água ultrapura acidificada com H_3PO_4 :Metanol (99:1); fluxo: 0,6 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; pH: 2,0. Fonte: Autor próprio.

Figura 20 – Gráfico de dispersão de resíduos.



Fonte: Autor próprio.

Os coeficientes de determinação foram superiores a 0,99, indicando que mais de 99% dos dados podem ser explicados pelos modelos obtidos nas metodologias, comprovando a relação linear entre o aumento da concentração do analito e a resposta de área. Além disso, a falta de ajuste foi calculada e há evidência de que o modelo de regressão está bem ajustado no nível de confiança de 95%.

Tabela 5 – Regressão linear e teste de falta de ajuste da curva analítica.

Regressão Linear					
	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	1535598118385	1535598118385	3685	7,29
Resíduo	13	8563274742	658713441		
Total		1,544161393127			
Modelo		Y = -2446.55+22624,4567*x			
R²		0,994			
Falta de ajuste					
	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Resíduo	13	8563274742	658713441		
Erro puro	10	4166353566	416635356	3.5	7,7
Falta de ajuste	3	4396921175	1465640391		

Limite inferior de quantificação.

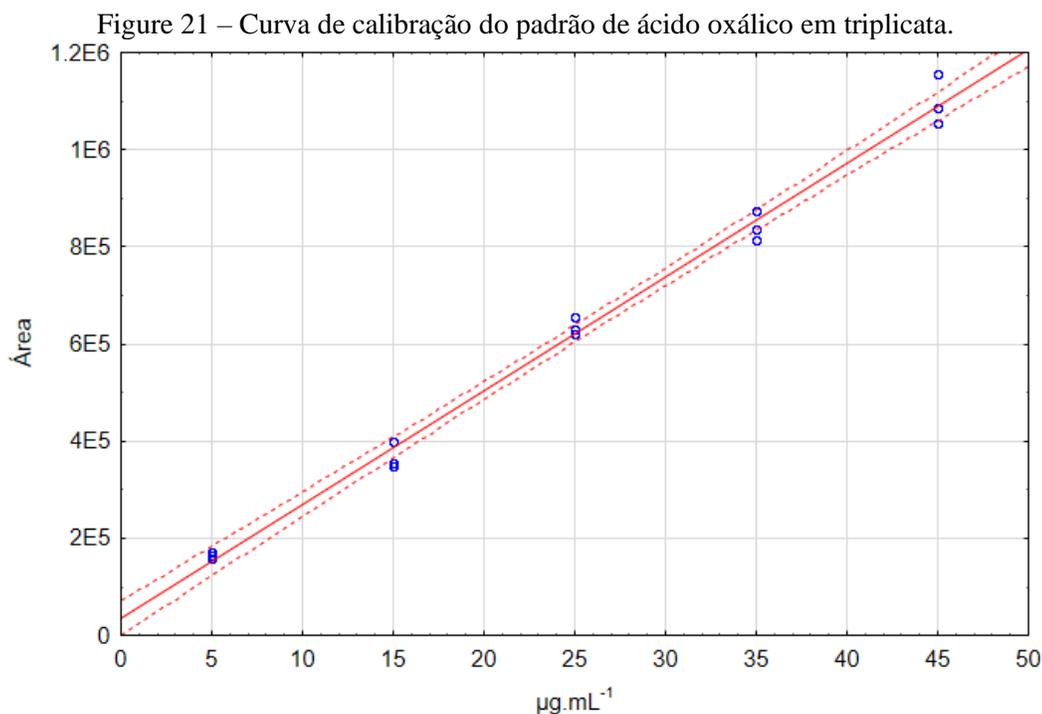
O resultado do limite inferior de quantificação (LQ) foi calculado a partir de 3 curvas de calibração de amostras enriquecidas com padrão pela fórmula (Equação 8)

$$LQ = \frac{10x \sigma}{IC} \quad (8)$$

Em que: IC é a inclinação da curva de calibração, σ é o desvio padrão. Portanto, o LQ estabelecido foi de $4,9 \mu\text{g. mL}^{-1}$.

Efeito matriz

A curva de calibração obtida com soluções padrões não contaminadas pela matriz (Figura 23) teve como equação da reta $Y = -3373.0667 + 23109,76 \cdot x$ e coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,992.



Condição cromatográfica: Fase móvel: Água ultrapura acidificada com H_3PO_4 :Metanol (99:1); fluxo: $0,6 \text{ mL. min}^{-1}$; pH: 2,0. Fonte: Autor próprio.

Para avaliação do paralelismo entre a curva padrão a curva padrão da matriz (linearidade), foi realizado um teste T (95% de confiança) sobre as médias dos coeficientes angulares de cada curva. O valor de p obtido foi de 0,91, ou seja, não há diferença estatisticamente significativa entre

as médias amostrais dos coeficientes angulares da curva padrão e da curva padrão da matriz (linearidade) (Tabela 6).

Tabela 6 – Resultados da avaliação do efeito matriz.

Coefficiente angular	
Curva padrão da matriz	Curva padrão
22624	23109
21840	22043
21928	21024
Média = 22058 ±1042	Média = 22130 ± 429
p	0,91

Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão são parâmetros muito importantes na avaliação do desempenho de um método analítico, pois determinam a extensão do erro nas análises realizadas (PENG; CHIOU, 1990). A FDA e a ANVISA subdividem o parâmetro precisão em intra e intercorrida. A precisão intraensaio representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição. A precisão intercorrida indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como dias ou analistas diferentes. A precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada (FDA, 2013; BRASIL, 2017; RIBANI *et al.*, 2004). Segundo a RDC166 da Anvisa (BRASIL, 2017), a exatidão corresponde a proximidade dos resultados obtidos pelo método analítico em estudo em relação ao valor verdadeiro e deve ser expressão em relação à recuperação analítica.

Na Tabela 7, são mostrados os valores do CV e do ER calculados nos testes de precisão e exatidão, respectivamente

Tabela 7 - Precisão e exatidão intraensaio e intercorrida da análise do ácido oxálico em extrato de *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg empregando SPE-troca iônica

Analito	Exatidão (%) / DPR% n=3						Precisão (DPR%) n=3					
	Intraensaio			Intercorrida			Intraensaio			Intercorrida		
	Baixa*	Média*	Alta*	Baixa*	Média*	Alta*	Baixa*	Média*	Alta*	Baixa*	Média*	Alta*
Ácido oxálico	61,36/ 9,21	76,16 / 5,74	80,64 / 2,12	63,68 / 6,63	75,92 / 4,93	81,43 / 4,62	4,39	3,52	4,0	6,17	4,85	1,86

*Concentração baixa é equivalente a 15 ug. mL⁻¹; Concentração média é equivalente a 25 ug.mL⁻¹; Concentração alta é equivalente a 35 ug. mL⁻¹ ácido oxálico. Resultados obtidos através da extração em fase sólida (SPE-troca iônica) sob as condições especificadas no quadro 8 e da análise cromatográfica sob as condições especificadas no quadro 5.

A RDC 166 de 2017 da Anvisa, não estipula critérios de aceitação para os parâmetros de precisão e exatidão, porém, de acordo com o art. 39 da referida resolução, os critérios de aceitação para esses parâmetros devem observar: I - objetivo do método; II - variabilidade intrínseca do método; III - concentração de trabalho; e IV - concentração do analito na amostra. De acordo com a tabela 7 tanto a precisão intra e intercorrida obteve baixos DPR (<5%), exceto para a concentração baixa na precisão intercorrida (6,17%). Em relação a exatidão, baixos percentuais de recuperação foram obtidos na concentração baixa da exatidão intraensaio a (6,31%) e na concentração baixa da exatidão intercorrida (63,68%). Todavia, levando em consideração o propósito do método desenvolvido, pode-se concluir que o método foi suficientemente preciso e exato.

Robustez

Todos as alterações realizadas (temperatura, fluxo, fabricante de solvente) não afetaram significativamente os resultados das áreas encontradas, apresentando DPR menor que 5%, indicando que o método proposto foi capaz de resistir as diferentes condições experimentais (Tabela 8). Além disso, a recuperação em todas as alterações realizadas foi superior a 85%. Com isso o método mostrou-se robusto.

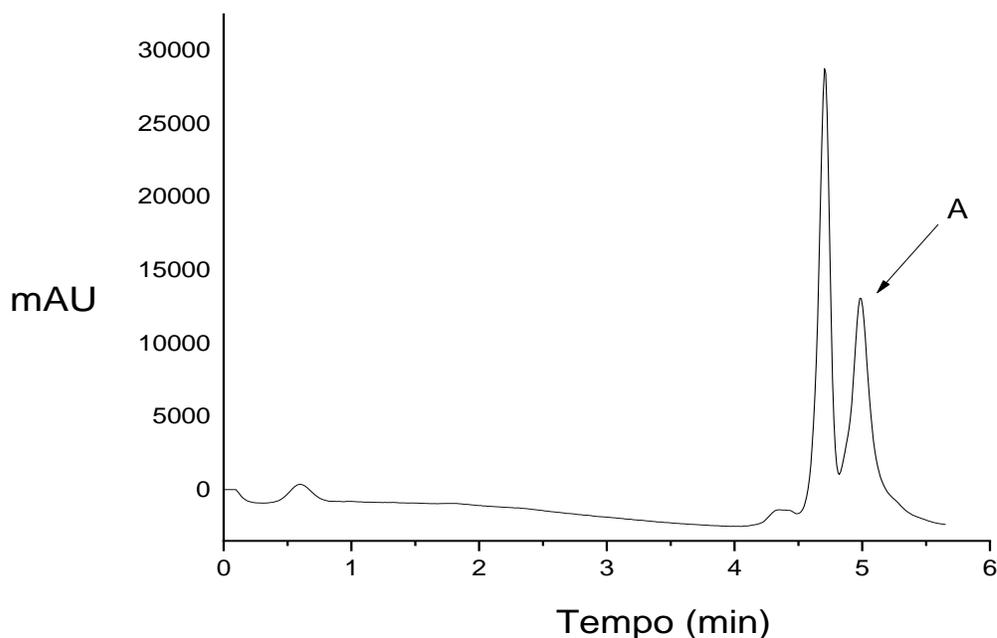
Tabela 8 – Resultados obtidos a partir do estudo da robustez.

Parâmetros	Variação	Recuperação (%)	DPR%
pH fase móvel	2,1	98,78	2,74
	2,3	98,87	0,75
	2,5	94,90	0,61
Proporção metanol da fase móvel	2%	93,74	0,38
	4%	89,72	0,61
	6%	85,37	0,46
Metanol (Fabricante)	LinChosolv	99,13	4,67
	Supelco	99,02	1,01

APLICAÇÃO DO MÉTODO

Para avaliar a viabilidade do método proposto para quantificação de ácido oxálico em folhas de *Artocarpus altilis*, o método desenvolvido e validado foi utilizado para a análise de amostras de folhas dessa espécie (n=3). O cromatograma da amostra do extrato é mostrado na figura 22.

Figura 22 – Cromatograma obtido a partir da análise de extratos de *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg após desenvolvimento e validação do método.



Legenda: A: Sinal referente ao ácido oxálico. Condição cromatográfica: Fase móvel: Água ultrapura acidificada com H₃PO₄:Metanol (99:1); fluxo: 0,6 mL.min⁻¹; pH: 2,0. Fonte: Autor próprio.

A quantidade de ácido oxálico encontrada foi de $1,06 \text{ mg.g}^{-1} \pm 0,09$ de droga vegetal ou $106,32 \text{ mg.100 g}^{-1} \pm 0,09$ de droga vegetal. Nenhum outro estudo realizou a quantificação de ácido oxálico em folhas de *Artocarpus altilis* por HPLC, todavia, . Isso pode ser explicado pelo fato de que na titulação há uma determinação não específica do ácido oxálico, quantificando, dessa forma, outros ácidos orgânicos na matriz (NAIK *et al.*, 2014). Além disso, o teor de ácido oxálico encontrado nessa espécie em g/100 g é próximo ao teor encontrado em outros vegetais utilizados pela população em estudos que utilizaram HPLC como método de determinação: *Theobroma cacao* L. (210 mg.100g^{-1}), *Colocasia esculenta* (433 mg.100g^{-1}), *Spinacia oleracea* L (290 mg/100g) (DU THANH *et al.*, 2017; DAS GHOSH, SAVAGE, 2013; HUYNH *et al.*, 2020);

Ademais, sabe-se que o consumo de ácido oxálico em concentrações superiores a 600mg/dia podem levar a um quadro de hiperoxalúria, o que predispõe ao surgimento de problemas renais (SIENER, 2016). Problemas renais também são verificados quando a quantidade de ácido oxálico e/ou CaOx ingerida gerar uma concentração plasmática $\geq 0,8-2,5 \mu\text{mol. L}^{-1}$ e uma concentração urinária $\geq 20-30 \text{ mg.24h}^{-1}$ (CHAUHAN *et al.*, 2012).

CONCLUSÃO

Neste trabalho foi apresentado o desenvolvimento, a validação e a aplicação de um novo método analítico para a determinação de ácido oxálico em amostra de *Artocarpus Altilis* (Parkison) Fosberg empregando como técnica de preparo de amostra a extração em fase sólida (SPE)-troca iônica e como técnica de análise a HPLC-DAD. Este método foi desenvolvido com sucesso e em relação à técnica de separação por HPLC-DAD, o método demonstrou ser adequado para a finalidade proposta,

A validação foi concluída e os resultados mostraram que este método oferece boa linearidade, precisão e exatidão dentro do intervalo de concentração investigado. Ainda, o método foi aplicado em uma amostra de *Artocarpus Altilis* (parkison) Fosberg para quantificação do ácido oxálico. Este trabalho que foi o primeiro a combinar o uso de SPE para determinação de ácido oxálico em matriz vegetal e, portanto, espera-se contribuir para o aprimoramento ou desenvolvimento de outros métodos de investigação de ácido oxálico em espécies vegetais consumíveis. Ainda, espera-se que os dados sobre o teor de ácido oxálico em *Artocarpus Altilis* possam contribuir como alerta para profissionais prescritores de plantas medicinais.

REFERÊNCIAS

- ABEYSEKERA, R. A. *et al.* Star fruit toxicity: a cause of both acute kidney injury and chronic kidney disease: a report of two cases. **BMC Research Notes**, v. 8, p. 1–4, 2015.
- AHMED, H. M.; TAVASZI-SAROSI, S. Sulaimani Polytechnic University , Slemani , Kurdistan Regional Government / Iraq. **Food Chemistry**, 2018.
- AL-WAHSH. I. A, WU. Y. LIEBMAN, M. A Comparison of Two Extraction Methods for Food Oxalate Assessment. **Journal of Food Research**, v.1, n.2, p. 233-239, 2012.
- ARTICLE, R. Phytochemical screening and Extraction: A Review. v. 1, n. 1, 2011. IHLLI, J. *et al.* Precipitation of amorphous calcium oxalate in aqueous solution. **Chemistry of Materials**, v. 27, n. 11, p. 3999–4007, 2015.
- BAHMANI, M. *et al.* Medicinal plants and secondary metabolites for diabetes mellitus control. **Asian Pac J Trop Dis**, v. 4, n. 2, p. 687-692, 2014.
- BIWORO, A. *et al.* Antidiabetic and Antioxidant Activity of Jackfruit (*Artocarpus Heterophyllus*) Extract. **Journal of Medical and Bioengineering**, v. 4, n. 4, p. 318–323, 2015.
- BRITO, M. R.; DE SENNA-VALLE, L. Plantas medicinais utilizadas na comunidade caiçara da Praia do Sono, Paraty, Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n. 2, p. 363–372, 2011.
- BOYD, C. *et al.* The influence of metabolic syndrome and its components on the development of nephrolithiasis. **Asian Journal of Urology**, v. 5, n. 4, p. 215–222, 2018
- BUCIO, J. L. Organic acid metabolism in plants: From adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. **Plant Science**, v. 160, n.1, p. 1-13, 2001.
- BUENO, F. G., *et al.* Development of a UV/Vis spectrophotometric method for analysis of total polyphenols from *Caesalpinia peltophoroides* Benth. **Química nova**, v. 35, n.4, 2012
- CAMERON, M. A. *et al.* Urine Composition in Type 2 Diabetes: Predisposition to Uric Acid Nephrolithiasis. **J Am Soc Nephrol**, v. 17, p. 1422–1428, 2006
- CARTAXO, S.L., SOUZA, M. A., ALBUQUERQUE, U.P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern. **Brazil. J Ethnopharmacol**, v. 131, p. 326-342. 2010.
- CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: Fundamentos, estratégias e validação**. Ed. UFSCar. Universidade Federal de São Carlos, Série apontamentos, São Paulo: 2001.
- COSKUN, O. Separation techniques: **Chromatography**. v. 3, n. 2, p. 156–160, 2016.
- COLINS *et al.* **Fundamentos de Cromatografia**. 4 ed. Editora Unicamp. São Paulo, 2011.

DONG, M. W. Perspectives in Modern HPLC. v. 31, n. 6, p. 2–8, 2013.

FERRAZ, V. **Cromatografia líquida de alta eficiência**. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2001. 32p.

FERNÁNDEZ, P.; REGENJO, M.; BERMEJO, A. M.; FERNÁNDEZ, A. M.; LORENZO, R. A.; CARRO, A. M. Analysis of drugs of abuse in human plasma by dispersive liquid–liquid microextraction and high-performance liquid chromatography. *J Appl Toxicol*. v.35, n.4, 418-425, 2014.

FRANCESCHI, V. R.; NAKATA, P. A. Calcium oxalate in plants: Formation and function. **Annual Review of Plant Biology**, v. 56, p. 41–71, 2005.

FONTANELLA, F. *et al.* Conhecimento, acesso e aceitação das práticas integrativas e complementares em saúde por uma comunidade usuária do Sistema Único de Saúde na cidade de Tubarão – SC. **ArqCatarin Med**, v. 36, n. 2, p. 69-74, 2007.

GAMA, R. G. M., CHAVES, M. H. C. Good practices for high performance liquid chromatography: an approach to pharmaceutical quality control. *Scientia Chromatographica*, v. 11, n. 3, p. 108-125, 2019

GRIGOLO, S. *et al.* Implications of univariate and multivariate analyses on the dissimilarity of common bean accessions. **Revista de Ciências Agroveterinarias**, v. 17, n. 3, p. 351–360, 2018.

GUILHERME, A. A.; PINTO, G. A. S.; RODRIGUES, S. Optimization of Trace Metals Concentration on Citric Acid Production by *Aspergillus niger* NRRL 2001. **Food Bioprocess Technol**, p. 246–253, 2008.

HADDAD, A. *et al.* **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1998.

HORNER, H. T. ILARSAN, H. PALMER, R. G. CALCIUM OXALATE CRYSTALS IN DEVELOPING SOYBEAN SEEDS. **Scanning Microscopy International**, v. 13, n. 2-3, p. 321-339, 1997.

HÖNOW, R.; HESSE, A. Comparison of extraction methods for the determination of soluble and total oxalate in foods by HPLC-enzyme-reactor. **Food Chemistry**, v. 78, n. 4, p. 511–521, 2002.

KAPOOR, D.; JAIMINI, M. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. v. 9, n. 2, p. 501–506, 2019.

KOWALSKI, C. H.; AUGUSTO, F.; GODOY, H. T. Extração De Bifenilas Policloradas De Amostras De Leite Materno: Otimização Univariada Versus Planejamento Experimental. **Química Nova**, v. 36, n. 3, p. 468–473, 2013.

- KOTOWAROO, M. I. *et al.* Screening of traditional antidiabetic medicinal plants of Mauritius for possible α -amylase inhibitory effects in vitro. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 3, p. 228–231, 2006.
- LIBERT, B.; FRANCESCHI, V. R. Oxalate in Crop Plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 35, n. 6, p. 926–938, 1987.
- LIU, Y. *et al.* Extraction and determination of total and soluble oxalate in pulping and papermaking raw materials. **BioResources**, v. 10, n. 3, p. 4580–4587, 2015.
- MALVIYA, R.; SHARMA, P. *Journal of Global Pharma Technology*. n. June 2010, 2014.
- MARINHO, M.G.V, *et al.* Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em área de caatinga no município de São José de Espinharas, Paraíba, Brasil. **Rev Bras Plantas Med**, v. 13, n.2, p. 170-182, 2001.2011
- MARQUES, S. *et al.* Teaching Case A Case of Oxalate Nephropathy: When a Single Cause Is Not Crystal Clear. **American Journal Kidney Diseases**, v. 70, p. 722–724, 2017.
- MUHAMMAD, N. *et al.* Application of a simple column-switching ion chromatography technique for removal of matrix interferences and sensitive fluorescence determination of acidic compounds (pharmaceutical drugs) in complex samples. **Journal of Chromatography A**, 2017.
- MAZZUCCHI, E.; SROUGI, M. O que há de novo no diagnóstico e tratamento da litíase urinária? **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 55, n. 6, p. 723–728, 2009
- NAKATA P. A. Plant calcium oxalate crystal formation, function, and its impact on human health. **Front Biol**, v. 7, p. 254–266, 2012.
- NAIK, V. V *et al.* Methodology in determination of oxalic acid in planta tissue: a comparative approach. **Journal of Global Trends in Pharmaceutical Sciences** v.5, n.2, p.1662-1672, 2014
- NETO GALVÃO M, VILLAS BÔAS GK, MACHADO M, SILVA MFO, *et al.* Ethnobotany applied to the selection of medicinal plants for agroecological crops in rural communities in the Southern End of Bahia, Brazil. **Rev Fitos**. Rio de Janeiro. 2021; 15(1): 40-57.
- PRASAD, R.; SHIVAY, Y. S. Oxalic acid/oxalates in plants: From self-defence to phytoremediation. **Current Science**, v. 112, n. 8, p. 1665–1667, 2017.
- RAVICHANDRAN, V. *et al.* Validation of analytical methods - Strategies & importance *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. n. July, 2010.
- RODRIGUES, C. *et al.* Application of solid-phase extraction to brewed coffee caffeine and organic acid determination by UV / HPLC. **journal of food composition and analysis** v. 20, p. 440–448, 2007.

- SAVAGE, G. P. *et al.* Effect of Cooking on the Soluble and Insoluble Oxalate Content of Some New Zealand Foods. p. 201–206, 2000.
- SIENER, R.; SEIDLER, A.; HÖNOW, R. Oxalate-rich foods. **Food Science and Technology** v. 2061, p. 1–5, 2020.
- SOUSA, T. B. *et al.* Quantification of Tannins from Curupay Bark. v. 26, n. 1, p. 1–7, 2019.
- SUÁREZ-LUQUE, S. *et al.* Solid-phase extraction procedure to remove organic acids from honey. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 770, n. 1–2, p. 77–82, 2002.
- STALIKAS, C.; FIAMEGOS, Y.; SAKKAS, V.; ALBANIS, T. Developments on chemometric approaches to optimize and evaluate microextraction. *J Chromatogr A*. v.1216, p.175–189, 2009.
- TRUJILLO-VARGAS, L.; RAMÍREZ-CARMONA, M. E.; VÉLEZ-SALAZAR, Y. Determination of citric and oxalic acid in fungi fermentation broth through HPLC-DAD and solid-phase extraction. **DYNA**, v. 87, n. 212, p. 26–30, 2020.
- Validation of analytical procedure: Methodology Q2B. In: ICH Harmonized Tripartite Guidelines. Geneva, Switzerland. 1996. pp. 1-8
- WILLIAMS, D. J. *et al.* Organic acids in Kakadu plum (*Terminalia ferdinandiana*): The good (ellagic), the bad (oxalic) and the uncertain (ascorbic). **Food Research International**, v. 89, p. 237–244, 2016.
- YE, M. *et al.* Determination of inorganic anions in weak acids by using ion exclusion chromatography – Capillary ion chromatography switching column technique. **Journal of Chromatography A**, v. 1588, p. 169–173, 2019.
- XIAO, J. B.; JIANG, X. Y.; CHEN, X. Q. Separation and Determination of Organic Acids and Inorganic Anions in Bayer Liquors by Ion Chromatography after Solid-Phase Extraction 1. v. 62, n. 8, p. 756–760, 2007.
- ZAMORA, P.; MORAIS, J. L. DE; NAGATA, N. Por que otimização multivariada? **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 10, n. 2, p. 106–110, 2005.
- ZHANG, Q. W.; LIN, L. G.; YE, W. C. Techniques for extraction and isolation of natural products : a comprehensive review. **Chinese Medicine**, p. 1–26, 2018. LAL, B.;
- ZYGMUNT, B.; NAMIESNIK, J. Preparation of Samples of Plant Material for Chromatographic Analysis. v. 41, n. March, p. 109