

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 03/10/2019.

**Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**Estudo do teor de ácido oxálico em hortaliças e
frutos, seu potencial de cristalização *in vitro* e
caracterização morfológica de cristais de
oxalato de cálcio**

Natália Cecília Sartarelli

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Alimentos e Nutrição para obtenção
do título de Mestre em Alimentos e
Nutrição.

Área de concentração: Ciência dos
alimentos

Araraquara
2018

Estudo do teor de ácido oxálico em hortaliças e frutos, seu potencial de cristalização *in vitro* e caracterização morfológica de cristais de oxalato de cálcio

Natália Cecília Sartarelli

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Área de concentração: Ciência dos alimentos

Orientador: Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento

Araraquara
2018

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

S522e

Sartarelli, Natália Cecília.

Estudo do teor de ácido oxálico em hortaliças e frutos, seu potencial de cristalização in vitro e caracterização morfológica de cristais de oxalato de cálcio / Natália Cecília Sartarelli. – Araraquara, 2018.
60 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição. Área de concentração em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Luis Vitor Silva do Sacramento.

1. Ácido oxálico. 2. Oxalato de cálcio. 3. Nefrolitíase. 4. Hortaliças. 5. Frutas.
I. Sacramento, Luis Vitor Silva do, orient. II. Título.

CAPES: 50700006



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



NATÁLIA CECÍLIA SARTARELLI

ESTUDO DO TEOR DE ÁCIDO OXÁLICO EM HORTALIÇAS E FRUTOS, SEU
POTENCIAL DE CRISTALIZAÇÃO IN VITRO E CARACTERIZAÇÃO
MORFOLÓGICA DE CRISTAIS DE OXALATO DE CÁLCIO

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade
de Ciências Farmacêuticas da Universidade
Estadual Paulista – UNESP, Câmpus de
Araraquara como requisito para a obtenção do
título de Mestra em Alimentos e Nutrição

Araraquara, 03 de Julho de 2018.

BANCA EXAMINADORA

LUIS VITOR SILVA DO SACRAMENTO

MARY ROSA RODRIGUES DE MARCHI

AMANDA MARTINS BAVIERA

AGRADECIMENTOS

Agradeço à CAPES pelo auxílio financeiro.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento pela orientação na execução deste projeto.

Agradeço à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição e, à secretaria de pós-graduação por todo suporte.

Agradeço ao Prof. Dr. Marlus Chorilli e à técnica do Laboratório de Farmacotécnica, Natália, por todo apoio técnico.

Agradeço à técnica do Laboratório de Botânica, Angélica, por toda colaboração.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Botânica, em especial ao Mateus pelo auxílio.

Agradeço aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição.

“A maior recompensa do nosso trabalho não é o que nos pagam por ele, mas aquilo em que ele nos transforma.”

John Ruskin

Resumo

Objetivos: Analisar quali e quantitativamente algumas hortaliças e frutos, quanto ao teor de ácido oxálico e avaliar o comportamento químico do ácido oxálico frente a agentes indutores e inibidores de cristalização *in vitro*.

Métodos: A análise qualitativa morfológica de cristais de oxalato de cálcio foi feita sob microscopia ótica de luz polarizada e, quantitativamente foram determinados por método espectrofotométrico, os teores de ácido oxálico após extração com água e ácido clorídrico. Foram realizados também ensaios de indução de cristalização com cloreto de cálcio e inibição com sulfato de magnésio e citrato de sódio, respectivamente. **Resultados:** Foram identificados cristais de oxalato de cálcio do tipo drusas na alface; ráfides no cará e kiwi e, na rúcula e laranja não foi possível identificar o tipo morfológico do cristal presente. No estudo quantitativo observou-se diferença significativa entre as médias obtidas nas extrações aquosa e ácida somente para o cará, sendo superior na extração ácida. Observou-se ainda significância somente para a couve no ensaio quantitativo de cristalização; o acréscimo de sulfato de magnésio como agente inibidor da cristalização não foi significativo para todas as amostras avaliadas no estudo, no entanto, com o acréscimo de citrato de sódio houve aumento do conteúdo de ácido oxálico para o cará, inhame, laranja e kiwi. No estudo qualitativo dos ensaios de cristalização com cloreto de cálcio em microscopia ótica de luz polarizada observou-se presença de arranjos cristalinos; no ensaio com sulfato de magnésio observou-se presença de cristais poliédricos no kiwi, couve e laranja e, com o acréscimo de citrato de sódio observou-se presença de cristais menores somente em alface, cará, couve e inhame. **Conclusão:** Neste contexto, os teores de oxalato nas hortaliças e frutos estudados apresentam variações próprias conforme a matriz constitucional e, podem ser modificados com o acréscimo de cálcio e citrato.

Palavras-chave: ácido oxálico; oxalato de cálcio; nefrolitíase; hortaliças; frutas.

Abstract

Objectives: Analyze qualitatively and quantitatively some vegetables and fruits, regarding in the content of oxalic acid and evaluate the chemical behavior of the oxalic acid against inducers and inhibitors agents of the in vitro crystallization. **Methods:** The qualitative morphological analysis of calcium oxalate crystals was done under optical microscopy of polarized light and, quantitatively, the values of oxalic acid after extraction with water and hydrochloric acid were determined by spectrophotometric method. Tests inducing the crystallization with calcium chloride and inhibition with magnesium sulphate and sodium citrate, respectively, were also performed.

Results: Druses calcium oxalate crystals were identified in lettuce; raphides in yam and kiwifruit; and in the arugula and orange it was not possible to identify the morphological type of the present crystal. In the quantitative study a significant difference was observed between the averages obtained in the aqueous and acid extractions only for the yam, being superior in the acid extraction. It was also observed a significance only for the wild cabbage in quantitative crystallization test. The addition of magnesium sulphate as a crystallization inhibitor was not significant for all the samples evaluated in the study. However, with the addition of sodium citrate there was an increase in the content of oxalic acid for yam, taro, orange and kiwifruit. Crystalline arrangements were observed in the qualitative study of crystallization tests with calcium chloride under optical microscopy of polarized light; in the test with magnesium sulphate it was noticed the presence of polyhedral crystals in kiwifruit, wild cabbage and orange and, with the addition of sodium citrate, small crystals were present only in lettuce, taro, wild cabbage and yam. **Conclusion:** In this context, oxalate contents in the vegetables and fruits that were studied have their own variations according to the constitutional matrix and, the oxalate content can be modified with the addition of calcium and citrate.

Key-words: oxalic acid; calcium oxalate; nephrolithiasis; vegetables; fruits.

Sumário

	Página
1 Introdução	8
2 Revisão de Literatura	11
2.1 Nefrolitíase	11
2.1.1 Litogênese e inibidores	12
2.2 Ocorrência de oxalato nos vegetais	14
2.3 Ingestão dietética e metabolismo do oxalato em humanos	17
2.4 Terapias na nefrolitíase	20
2.5 Métodos extrativos e de quantificação de ácido oxálico	21
3. Objetivos	24
3.1 Objetivo geral	24
3.2 Objetivos específicos	24
4 Material e Métodos	25
4.1 Obtenção dos materiais vegetais	25
4.1.1 Secagem, moagem e tamisação	26
4.2 Determinação da perda por dessecação em balança com infravermelho (INFRATEST)	26
4.3 Estudo qualitativo	26
4.3.1 Caracterização morfológica de cristais de oxalato de cálcio	26
4.4 Estudo químico	27
4.4.1 Obtenção do conteúdo de oxalato solúvel e total	27
4.4.1.1 Oxalato solúvel	27
4.4.1.2 Oxalato total	28
4.5 Quantificação de ácido oxálico	28
4.6 Ensaio de cristalização e inibição da cristalização	31
4.6.1 Extração aquosa e quantificação de ácido oxálico	31
4.6.2 Ensaio com agentes indutores e inibidores da cristalização	32
4.6.3 Análise microscópica	32
4.7 Estudo estatístico	33
5. Resultados e Discussão	33
6 Conclusões	49
7 Referências	50
Apêndice 1	59

1 Introdução

A litíase renal, também conhecida como urolitíase, nefrolitíase, pedras nos rins, nefrocalcinose (1) é caracterizada por uma combinação de fatores relacionados à composição urinária e morfoanatômicas dos rins (2). Acomete cerca de 5 a 15% da população mundial em algum momento da vida, apresentando elevadas taxas de recorrência (3,4) - 40-50% nos próximos 5 anos e 50-60% nos próximos 10 anos após o primeiro diagnóstico (5) - o que sugere haver equívocos na sua abordagem preventiva (6).

Aproximadamente 80% dos cálculos renais são compostos por oxalato de cálcio (4), 1 a 10% são cálculos de fosfato de cálcio, 10% são cálculos de estruvita (fosfato triplo amoníaco magnésiano), 9% são cálculos de ácido úrico e 1% são cálculos de cistina, uratos ou relacionados à fármacos (3,7,8).

A tendência de formação dos cálculos de oxalato de cálcio está diretamente relacionada com as concentrações urinárias de cálcio, oxalato e urato e, inversamente relacionada, com as concentrações de magnésio e citrato (4). A fisiopatologia da litogênese envolve, inicialmente, a formação de cristais urinários em decorrência de uma supersaturação urinária de origem endógena ou exógena (9) somados ao desequilíbrio entre sais litogênicos e substâncias consideradas inibidoras do processo de cristalização (10) como magnésio, citrato, pirofosfato, glicosaminoglicanas dentre outras (5,11); que podem atuar inibindo a nucleação ou inibindo o crescimento do cristal (12).

A supersaturação urinária em oxalato, influenciada significativamente pelo oxalato dietético, e também pela produção endógena, é um fator importante na formação dos cálculos. Não há uma terapia estabelecida que diminua a concentração urinária de oxalato, neste caso, os pacientes são orientados a evitar o consumo de alimentos ricos em oxalato (13).

O oxalato é encontrado em muitos alimentos vegetais em associação com sódio ou potássio, formando oxalato de sódio e oxalato de potássio, respectivamente; associado com magnésio, formando oxalato de magnésio, pouco solúvel em água; associado com cálcio, formando o oxalato de cálcio (14), com solubilidade em água de apenas 6 mg L^{-1} à 18°C , sendo considerado insolúvel em água (15). No entanto, a contribuição do oxalato de magnésio na fração insolúvel não é muito bem clara. Essas formas podem ser analisadas nos alimentos utilizando extração aquosa, obtendo o conteúdo de oxalato solúvel, utilizando extração ácida, obtendo o conteúdo de oxalato total (solúvel e insolúvel) dos alimentos. A fração insolúvel, que presume ser de oxalato de cálcio é calculada pela diferença entre o conteúdo total de oxalato e o conteúdo da fração solúvel (14); no entanto, a sua quantificação analítica tem sido muito desafiadora (16).

Vegetais são frequentemente utilizados e consumidos como matéria-prima para o preparo de sucos, como o espinafre, que por possuir altas concentrações de ácido oxálico, se consumido regularmente, pode levar a formação de cálculos renais. No entanto, a combinação de alimentos ricos em ácido oxálico associado com veiculadores de cálcio parece ter um potencial redutor da biodisponibilidade de ácido oxálico (17).

A hipocitratúria é uma das alterações metabólicas presentes na nefrolitíase e o aumento da ingestão de alimentos fonte de citrato está associado com o aumento do citrato e pH urinário; por se ligar ao cálcio, reduz a concentração de cálcio livre, diminuindo a supersaturação urinária, etapa inicial para a formação do cálculo renal (18).

Neste contexto, o aconselhamento dietético da nefrolitíase requer o conhecimento do conteúdo de oxalato presente nos alimentos (19), visto que modificações dietéticas são intervenções acessíveis a fim de reduzir os riscos de nefrolitíase, bem como o conhecimento do perfil de oxalato no alimento, torna possível uma previsão da biodisponibilidade do oxalato no organismo. Além de fornecer subsídios para algumas possíveis associações dietéticas de alimentos fonte de cálcio, magnésio e citrato com alimentos ricos em oxalato poderiam ser úteis na dietoterapia renal. Pelo exposto, e devido a elevada taxa de incidência e recorrência da nefrolitíase; heterogeneidade no conteúdo de oxalato de alguns alimentos quando disponíveis na literatura, para auxiliar na dietoterapia da nefrolitíase e nos seus casos de recorrência, além da ascendência do estilo de vida vegetariano, têm se a necessidade de estudos que forneçam embasamento para as condutas nutricionais, justificando assim este estudo.

6 Conclusões

No estudo qualitativo (morfológico) foi possível a caracterização de cristais de oxalato de cálcio nas amostras, exceto para couve e inhame, sugerindo ausência de formação e predominância de oxalato solúvel.

Os métodos de extração aquosa e ácida não diferiram para alface, rúcula, couve, inhame, laranja e kiwi; para o cará verifica-se teor maior para a extração ácida, porém com indícios de interferentes, tais como condições da matriz (presença de amido entumecido e modificado pelo aquecimento, formando uma rede de gel).

A adição de cloreto de cálcio aos extratos não provocou cristalização do ácido oxálico em solução; a adição do sulfato de magnésio não inibiu a ação de cristalização do cloreto de cálcio, porém a ação do citrato de sódio acrescentado foi percebida em quatro das sete espécies estudadas, sobretudo para laranja e kiwi, que apresentaram os maiores teores de ácido oxálico.

Em diferentes condições químicas os teores de oxalato apresentaram variações em função da matriz alimentícia e, os teores de oxalato em solução estão sujeitos a modificações com o acréscimo de cálcio e citrato; sendo necessários estudos futuros sobre métodos extrativos e de determinação química para níveis de oxalato em alimentos.

7 Referências

1. Kirkali Z, Rasooly R, Star RA, Rodgers GP. Urinary stone disease: progress, status, and needs. *Urology*. 2015;86(4):651–3.
2. Grases F, Prieto RM, Fernandez-Cabot RA, Costa-Bauzá A, Tur F, Torres JJ. Effects of polyphenols from grape seeds on renal lithiasis. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;194:812-9.
3. Lieske JC, Peña de la Vega LS, Slezak JM, Bergstralh EJ, Leibson CL, Ho KL, et al. Renal stone epidemiology in Rochester, Minnesota: An update. *Kidney Int*. 2006;69(4):760–4.
4. Prezioso D, Strazzullo P, Lotti T, Bianchi G, Borghi L, Caione P, et al. Dietary treatment of urinary risk factors for renal stone formation. A review of CLU working group. *Arch Ital di Urol e Androl*. 2015;87(2):105–20.
5. Worcester EM, Coe FL. Nephrolithiasis. *Prim Care*. 2008;35(2):369–91.
6. Gul Z, Monga M. Medical and dietary therapy for kidney stone prevention. *Korean J Urol*. 2014;55(12):775–9.
7. Coe FL, Evan A, Worcester E. Kidney stone disease. *J Clin Invest*. 2005;115:2598–608.
8. Hughes P. Kidney stones epidemiology. *Nephrology*. 2007;12; 26–30.
9. Courbebaisse M, Prot-Bertoye C, Bertocchio JP, Baron S, Maruani G, Briand S, et al. Lithiase rénale de l'adulte : des mécanismes au traitement médical préventif. *Rev Med Interne*. 2017;38(1):44–52.
10. Trinchieri A, Lizzano R, Marchesotti F, Zanetti G. Effect of potential

- renal acid load of foods on urinary citrate excretion in calcium renal stone formers. *Urol Res.* 2006;34(1):1–7.
11. Basavaraj DR, Biyani CS, Browning AJ, Cartledge JJ. The role of urinary kidney stone inhibitors and promoters in the pathogenesis of calcium containing renal stones. *EAU-EBU Updat Ser.* 2007;5(3):126–36.
 12. Grases F, Conte A, Genestar C, Costa-Bauzá A. Inhibitors of calcium-oxalate crystallization and urolithiasis. *Urol Int.* 1992;48(4):409–14.
 13. Holmes RP, Goodman HO, Assimos DG. Contribution of dietary oxalate to urinary oxalate excretion. *Kidney Int.* 2001;59(1):270–6.
 14. Liebman M, Al-Wahsh IA. Probiotics and other key determinants of dietary oxalate absorption. *Adv Nutr.* 2011;2(8):254–60.
 15. Libert B, Franceschi VR. Oxalate in Crop Plants. *J Agric Food Chem.* 1987;35(6):926–38.
 16. Hatch M, Freel RW. Intestinal transport of an obdurate anion: oxalate. *Urol Res.* 2005;33(1):1–16.
 17. Bong WC, Vanhanen LP, Savage GP. Addition of calcium compounds to reduce soluble oxalate in a high oxalate food system. *Food Chem.* 2017;221:54–7.
 18. Penniston, KL; Nakada, SY; Holmes, RP; Assimos D. Quantitative assessment of citric acid in lemon juice, lime juice, and commercially-available fruit juice products. *J Endourol.* 2008;22(3):567–70.
 19. Massey LK. Food Oxalate: factors affecting measurement, biological variation, and bioavailability. *J Am Diet Assoc.* 2007;107(7):1191–4.

20. Trinchieri A. Epidemiology of urolithiasis: an update. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2008;5(2):101–6.
21. Trinchieri A. Epidemiology of urolithiasis. *Arch Ital Urol.* 1996;68(4):203–50.
22. Johnson CM, Wilson DM, O’Fallon WM, Malek RS, Kurland LT. Renal stone epidemiology: a 25-year study in Rochester, Minnesota. *Kidney Int.* 1979;16(5):624–31.
23. Costa-Bauzá A, Ramis M, Montesinos V, Grases F, Conte A, Pizá P, et al. Type of renal calculi: Variation with age and sex. *World J Urol.* 2007;25(4):415–21.
24. Moe OW. Kidney stones: Pathophysiology and medical management. *Lancet.* 2006;367(9507):333–44.
25. Ayusso LL, Schor N. Avaliação de pacientes com litíase renal em região de clima quente. *J Bras Nefrol.* 2001;23(4):205–12.
26. Peres ALB. Investigação metabólica de 578 pacientes com litíase urinária no Oeste do Paraná. *J Bras Nefrol.* 2005;27(4):196-200.
27. Kirejczyk JK, Porowski T, Filonowicz R, Kazberuk A, Stefanowicz M, Wasilewska A, et al. An association between kidney stone composition and urinary metabolic disturbances in children. *J Pediatr Urol.* 2014;10(1):130–5.
28. Silva SFR, Matos DC, Silva SL, Daher EF, Campos H H, Silva CAB. Chemical and morphological analysis of kidney stones: a double-blind comparative study. *Acta Cir Bras.* 2010;25(5):444–8.
29. Amaro CR, Goldberg J, Amaro JL, Padovani CR. Metabolic

- assessment in patients with urinary lithiasis. *Int Braz J Urol.* 2005;31(1):29–33.
30. Siener R, Schade N, Nicolay C, Von Unruh GE, Hesse A. The efficacy of dietary intervention on urinary risk factors for stone formation in recurrent calcium oxalate stone patients. *J Urol.* 2005;173(5):1601–5.
 31. Worcester EM, Coe FL. Clinical practice calcium kidney stones. *N Engl J Med.* 2011;363(10):954–63.
 32. Sohnel O, Grases F. Calcium oxalate monohydrate renal calculi. Formation and development mechanism. *Adv Colloid Interface Sci.* 1995;59:1–17.
 33. Fleisch H. Inhibitors and promoters of stone formation. *Kidney Int.* 1978;13(5):361–71.
 34. Massey L. Magnesium therapy for nephrolithiasis. *Magnes Res.* 2005;18(2):123–6.
 35. Seltzer MA, Low RK, McDonald M, Shami GS, Stoller ML. Dietary manipulation with lemonade to treat hypocitraturic calcium nephrolithiasis. *J Urol.* 1996;156(3):907–9.
 36. Yilmaz E, Batislam E, Basar M, Tuglu D, Erguder I. Citrate levels in fresh tomato juice: a possible dietary alternative to traditional citrate supplementation in stone-forming patients. *Urology.* 2008;71(3):379–83.
 37. Noonan SC. Oxalate content of foods and its effect on humans. *Asia Pac J Clin Nutr.* 1999;8(1):64–74.
 38. Appezzato-da-Glória B, Carmello-Gerreiro SM. *Anatomia Vegetal.* Vol.

- 1, 2006.439 p.
39. Franceschi VR, Nakata PA. Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annu Rev Plant Biol.* 2005;56(1):41–71.
 40. Konyar ST, Öztürk N, Dane F. Occurrence, types and distribution of calcium oxalate crystals in leaves and stems of some species of poisonous plants. *Bot Stud.* 2014;55(1):1–9.
 41. Chakraborty N, Ghosh R, Ghosh S, Narula K, Tayal R, Datta A, et al. Reduction of oxalate levels in tomato fruit and consequent metabolic remodeling following overexpression of a fungal oxalate decarboxylase. *Plant Physiol.* 2013;162(1):364–78.
 42. Tooulakou G, Giannopoulos A, Nikolopoulos D, Bresta P, Dotsika E, Orkoulas MG, et al. Reevaluation of the plant “gemstones”: calcium oxalate crystals sustain photosynthesis under drought conditions. *Plant Signal Behav.* 2016;11(9):e1215793.
 43. Tooulakou G, Giannopoulos A, Nikolopoulos D, Bresta P, Dotsika E, Orkoulas MG, et al. “Alarm photosynthesis”: calcium oxalate crystals as an internal CO₂ source in plants. *Plant Physiol.* 2016;171:2577-2585.
 44. Hönow R, Hesse A. Comparison of extraction methods for the determination of soluble and total oxalate in foods by HPLC-enzyme-reactor. *Food Chem.* 2002;78(4):511–21.
 45. Siener R, Hönow R, Seidler A, Voss S, Hesse A. Oxalate contents of species of the Polygonaceae, Amaranthaceae and Chenopodiaceae families. *Food Chem.* 2006;98(2):220–4.
 46. Freidig AK, Goldman IL. Variation in oxalic acid content among

- commercial table beet cultivars and related crops. *J Am Soc Hortic Sci.* 2011;136(1):54–60.
47. Hang DT, Vanhanen L, Savage G. Effect of simple processing methods on oxalate content of taro petioles and leaves grown in central Viet Nam. *Food Sci Technol.* 2013;50(1):259–63.
48. Savage GP, Vanhanen L, Mason SM, Ross AB. Effect of cooking on the soluble and insoluble oxalate content of some New Zealand foods. *J Food Compos Anal.* 2000;13(3):201–6.
49. Gad SS, El-Zalaki ME, Mohamed MS, Mohasseb SZ. Oxalate content of some leafy vegetables and dry legumes consumed widely in Egypt. *Food Chem.* 1982;8(3):169–77.
50. Holmes RP, Assimos DG. Glyoxylate synthesis, and its modulation and influence on oxalate synthesis. *J Urol.* 1998;160(5):1617–24.
51. Atkins GL, Dean BM, Griffin WJ, Watts RWE. Quantitative aspects of ascorbic acid metabolism in man. *J Biol Chem.* 1964;239(9):2975–80.
52. Salido E, Pey AL, Rodriguez R, Lorenzo V. Primary hyperoxalurias: Disorders of glyoxylate detoxification. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2012;1822(9):1453–64.
53. Robijn S, Hoppe B, Vervaet BA, D'Haese PC, Verhulst A. Hyperoxaluria: a gut-kidney axis. *Kidney Int.* 2011;80(11):1146–58.
54. Danpure C, Jennings P. Peroxisomal alanine:glyoxylate aminotransferase deficiency in primary hyperoxaluria type I. *Febs Lett.* 1986;201(1):20–4.
55. Coulter-Mackie MB. 4-Hydroxyproline metabolism and glyoxylate

- production: a target for substrate depletion in primary hyperoxaluria? *Kidney Int.* 2006;70(11):1891–3.
56. Belostotsky R, Seboun E, Idelson GH, Milliner DS, Becker-Cohen R, Rinat C, et al. Mutations in DHDPSL are responsible for primary hyperoxaluria type III. *Am J Hum Genet.* 2010;87(3):392–9.
 57. Karaolanis G, Lionaki S, Moris D, Palla VV, Vernadakis S. Secondary hyperoxaluria: a risk factor for kidney stone formation and renal failure in native kidneys and renal grafts. *Transplant Ver.* 2014;28(4):182–7.
 58. Noonan, SC; Savage GP. Oxalate content of foods and its effect on humans. *Asia Pac J Clin Nutr.* 1999;8(1):64–74.
 59. Pak CYC, Peters P, Hurt G, Kadesky M, Fine M, Reisman D, et al. Is selective therapy of recurrent nephrolithiasis possible? *Am J Med.* 1981;71(4):615–22.
 60. Fargue S, Rumsby G, Danpure CJ. Multiple mechanisms of action of pyridoxine in primary hyperoxaluria type 1. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1832(10):1776–83.
 61. Sadaf H, Raza SI, Hassan SW. Role of gut microbiota against calcium oxalate. *Microb Pathog.* 2017;109:287–91.
 62. Allison MJ, Cook HM, Milne DB, Gallagher S, Clayman RV. Oxalate degradation by gastrointestinal bacteria from humans. *J Nutr.* 1986;116(3):455–60.
 63. Siener R, Bangen U, Sidhu H, Honow R, Unruh G, Hesse A. The role of *Oxalobacter formigenes* colonization in calcium oxalate stone disease. *Kidney Int.* 2013;83(6):1144–9.

64. Khan SR, Glenton PA, Byer KJ. Dietary Oxalate and Calcium Oxalate Nephrolithiasis. *J Urol*. 2007;178(5):2191–6.
65. Nguyễn HV, Savage GP. Oxalate content of New Zealand grown and imported fruits. *J Food Compos Anal*. 2013;31(2):180–4.
66. Naik VV, Patil NS, Aparadh VT, Karadge BA. Methodology in determination of oxalic acid in plant tissue: a comparative approach. *J Glob Trends Pharm Sci*. 2014;5(2):1662–72.
67. Al-Wahsh IA, Wu Y, Liebman M. A Comparison of two extraction methods for food oxalate assessment. *J Food Res*. 2012;1(2):233–9.
68. Kusuma DS, Vanhanen LP, Savage GP. Evaluation of extraction parameters for total oxalate determination in spinach using design of experiment analysis. *J Food Compos Anal*. 2016;51:9–14.
69. Chalmers AH, Cowley DM, McWhinney BC. Stability of ascorbate in urine: relevance to analyses for ascorbate and oxalate. *Clin Chem*. 1985;31(10):1703–5.
70. Liu Y, Zhang C, Li B, Li H, Zhan H. Extraction and determination of total and soluble oxalate in pulping and papermaking raw materials. *BioResources*. 2015;10(3):4580–7.
71. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Farmacopéia Brasileira*. 5ed. 2010;1:546.
72. Oliveira F, Akisue G. *Fundamentos de farmacobotânica e de morfologia vegetal*. 3ed. 2009.234 p.
73. Kulaksizoğlu S, Sofikerim M, Çevik C. In vitro effect of lemon and orange juices on calcium oxalate crystallization. *Int Urol Nephrol*.

- 2008;40(3):589–94.
74. Grases F, Rodriguez A, Costa-Bauza A. Efficacy of mixtures of magnesium, citrate and phytate as calcium oxalate crystallization inhibitors in urine. *J Urol*. 2015;194(3):812–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2015.03.099>.
 75. Zonta EP, Machado AA. Sistema de análise estatística para microcomputadores (SANEST). UFPEL. 1984.
 76. Wanasundera JPD, Ravindran G. Effects of cooking on the nutrient and antinutrient contents of yam tubers (*Dioscorea alata* and *Dioscorea esculenta*). *Food Chem*. 1992;45(4):247–50.
 77. Wanasundera JPD, Ravindran G. Nutritional assessment of yam (*Dioscorea alata*) tubers. *Plant Foods Hum Nutr*. 1994;46:33–9.
 78. Adepoju OT, Boyejo O, Adeniji PO. Nutrient and antinutrient composition of yellow yam (*Dioscorea cayenensis*) products. *Food Chem*. 2017;11:428–31.
 79. Coté GG. Diversity and distribution of idioblasts producing calcium oxalate crystals in *Dieffenbachia seguine* (Araceae). *Am J Bot*. 2009;96(7):1245–54.