

CIRCULAR TÉCNICA

n. 363 - dezembro 2021

ISSN 0103-4413

Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
Departamento de Informação Tecnológica
Av. José Cândido da Silveira, 1647 - União - 31170-495
Belo Horizonte - MG - www.epamig.br - Tel. (31) 3489-5000



AGRICULTURA,
PECUÁRIA E
ABASTECIMENTO



MINAS
GERAIS

GOVERNO
DIFERENTE.
ESTADO
EFICIENTE.

Metodologia adaptada para determinação de ácidos oxálicos totais em hortaliças¹

Elizabeth Pereira Barbosa²
Marinalva Woods Pedrosa³
Bruna Maria Santos de Oliveira⁴
Marialva Alvarenga Moreira⁵

INTRODUÇÃO

A população tem buscado cada vez mais por alimentos saudáveis e nutritivos, contribuindo para a manutenção de bons padrões alimentares e para a segurança alimentar. Nos últimos anos têm sido realizado o trabalho de resgate das chamadas hortaliças não convencionais ou plantas alimentícias não convencionais (Pancs) – hortaliças Panc, trazendo diversidade de sabores para a mesa (BRASIL, 2010). Estas hortaliças são espécies consumidas de forma mais regionalizada e, por essa razão, não são amplamente conhecidas e estudadas.

Neste contexto, a avaliação do estado nutricional e o conhecimento da presença de fatores antinutricionais e/ou tóxicos nessas espécies são importantes para a busca de alternativas seguras de consumo e sua correta divulgação.

Um exemplo de hortaliças Panc é a taioba (*Xanthosoma sagittifolium* L.), cujas folhas (limbo foliar e pecíolo) são consumidas como hábito ligado a costumes regionais. Pinto *et al.* (2001) analisaram o valor nutricional da folha de taioba e encontraram elevados teores de proteína, fibras, vitamina C, cálcio (Ca) e ferro (Fe), em proporções similares às demais hortaliças caracterizadas como ricas nesses nutrientes, e detectaram também a presença de oxalatos.

Assim, embora a taioba tenha valor nutricional e potencial alimentar, a planta pode conter fatores antinutricionais que reduzem seu consumo (PINTO *et al.*, 2001). As aráceas, de modo geral, apresentam grande capacidade de acumular Ca em suas estruturas (folha e rizomas) (SOUZA *et al.*, 2016). Esse acúmulo de Ca, como oxalato de cálcio, causa irritação da mucosa na garganta, coceira e a sensação de asfixia (PEDROSA *et al.*, 2012), e podem formar cristais insolúveis na urina, levando à formação de cálculos renais no organismo (ANDRADE *et al.*, 2015).

O Ca desempenha diversas funções na planta, participando na constituição estrutural e em funções fisiológicas. Outras funções dos cristais de Ca como proteção contra herbivoria, balanço iônico e suporte estrutural da planta têm sido relatadas por Messerli *et al.* (2000) e Holdaway-Clarke *et al.* (2003). Os conteúdos de oxalatos nas plantas variam em função de diversos fatores, em geral são mais altos nas folhas e em plantas jovens.

A permanganometria é a técnica em que se utiliza o permanganato de potássio (KMnO₄), um forte agente oxidante, sendo um dos mais importantes métodos volumétricos de oxidorredução. Embora o método de Moir (1953) tenha sofrido alterações desde a sua proposição, este consiste basicamente nas

¹Circular Técnica produzida pela EPAMIG Centro-Oeste, (31) 97102-1541, epamigcentrooeste@epamig.br.

²Bióloga, Técn. EPAMIG Centro-Oeste - CESR, Prudente de Morais, MG, elizabeth.barbosa@epamig.br.

³Eng. Agrônoma, D.Sc., Pesq. EPAMIG Centro-Oeste - CESR, Prudente de Morais, MG, marinalva@epamig.br.

⁴Técn. Agrícola, Técn. EPAMIG Centro-Oeste - CESR, Prudente de Morais, MG, bruna.oliveira@epamig.br.

⁵Eng. Agrônoma, D.Sc., Pesq. EPAMIG Centro-Oeste - CESR, Prudente de Morais, MG, marialva.moreira@epamig.br.

etapas de: extração de ácido oxálico da matriz vegetal, filtragem, precipitação, centrifugação, diluição e titulação com KMnO_4 e quantificação de ácidos oxálicos totais.

Esta Circular Técnica tem por objetivo descrever de forma clara as etapas para a execução da metodologia adaptada para determinar ácidos oxálicos em hortaliças.

METODOLOGIA PARA DETERMINAR ÁCIDOS OXÁLICOS

O ácido oxálico ou ácido etanodioico é um ácido forte parcialmente solúvel em água, etanol e outros solventes que reage com bases formando oxalatos (sais ou ésteres do ácido oxálico). A metodologia proposta e adaptada de Moir (1953) baseia-se nessas características e propriedades.

Etapa 1 - Extração de ácido oxálico da matriz vegetal

Para a extração é necessário seguir os passos:

- secar a amostra de tecido vegetal em estufa de circulação forçada de ar a 55-60 °C;
- moer a amostra do tecido vegetal em moinho de facas tipo Willey, com peneira de 1 mm, posteriormente homogeneizar a amostra e acondicioná-la em frasco de vidro âmbar hermeticamente fechado;
- pesar 1,0 g da amostra do tecido vegetal seco e moído em Erlenmeyer de 125 mL (Fig. 1A);
- adicionar 90 mL de ácido clorídrico (HCl) 0,25N (Fig. 1B);
- aquecer o Erlenmeyer contendo o tecido vegetal e HCl em banho-maria a 70 °C por 1 hora (Fig. 1C);
- retirar o Erlenmeyer contendo o tecido vegetal e HCl do banho-maria e deixar esfriar em temperatura ambiente, por 1 hora;
- filtrar o extrato vegetal, em papel de filtro quantitativo Whatman nº 42 ou similar (Fig. 2A), completar o volume do balão volumétrico de 100 mL com solução de HCl 0,25N (Fig. 2B), e homogeneizar invertendo várias vezes o balão volumétrico;
- pipetar 5 mL do filtrado para o tubo de polipropileno do tipo Falcon de 15 mL.

Figura 1 - Início da extração de ácido oxálico do tecido vegetal



Nota: A - Pesagem das amostras; B - Adição do ácido clorídrico 0,25N; C - Aquecimento da amostra no banho-maria.

Figura 2 - Filtragem e adição do ácido clorídrico no extrato vegetal



Nota: A - Filtragem do extrato vegetal; B - Adição do ácido clorídrico 0,25N.

Etapa 2 - Precipitação

Após a extração (Etapa 1), adicionar 1 mL da solução precipitante em cada amostra do tecido vegetal (Fig. 3A).

O preparo da solução precipitante deverá conter:

- solução A: 96,5 g de acetato de sódio anidro são dissolvidos por aquecimento em

água destilada e completa-se o volume para 250 mL;

- solução B: 18 g de acetato de cálcio anidro são dissolvidos em ácido acético aquoso a 50% e completa-se o volume para 250 mL.

Após o preparo das soluções precipitantes (solução A + solução B), deve-se transferir a solução A e a solução B para o balão volumétrico e homogeneizar, invertendo várias vezes o balão volumétrico para formar a solução precipitante. Levar a solução precipitante à geladeira a $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) por 48 horas. Após esse período, filtrar. Esta solução pode ser armazenada em geladeira a $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) por tempo indeterminado.

Depois de adicionar à solução precipitante, homogeneizar os tubos em agitador tipo Vortex (Fig. 3B) e levar à geladeira por 12 horas, para que ocorra a precipitação do ácido oxálico.

Etapa 3 - Centrifugação

Executar a centrifugação na ordem a seguir:

- centrifugar o oxalato precipitado a 2.500 rotações por minuto (rpm) por 5 minutos, dissociando a parte líquida da parte sólida (analito);
- após a centrifugação, retirar o sobrenadante com auxílio de uma pipeta, restando apenas a parte sólida (Fig. 4A);
- em seguida, adicionar à parte sólida 2,5 mL de solução de HCl 0,25N e 2,5 mL de solução de lavagem (álcool e amônia 2:1 v/v) (Fig. 4B).

O preparo da solução de lavagem deve ser feito da seguinte forma:

- adicionar 240 mL de álcool etílico (96%) e 125 mL de solução concentrada de hidróxido de amônia, em balão volumétrico de 500 mL, completar o volume com água deionizada;
- homogeneizar os tubos em agitador tipo Vortex e centrifugar novamente a 2.500 rpm por 5 minutos (Fig. 4C);
- mais uma vez a parte sólida é separada da parte líquida, retirando-se a porção sobrenadante;
- os tubos com o analito (parte sólida que sobrou no tubo) são colocados em estufa a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos para secagem.

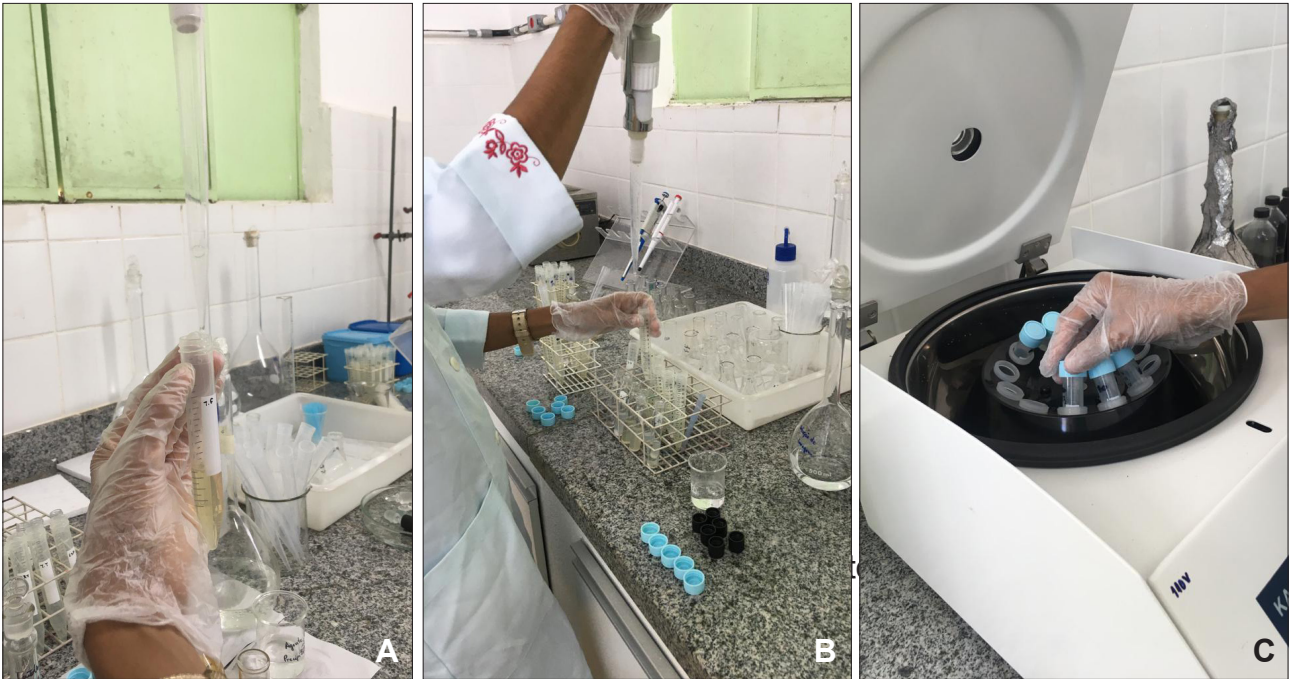
Figura 3 - Solução precipitante



Fotos: Elizabeth Pereira Barbosa

Nota: A - Adição da solução precipitante; B - Homogeneização dos tubos no agitador tipo Vortex para precipitação do ácido oxálico.

Figura 4 - Etapas da centrifugação



Fotos: Elizabeth Pereira Barbosa

Nota: A - Precipitado; B - Retirada do sobrenadante; C - Colocação dos tubos na centrífuga.

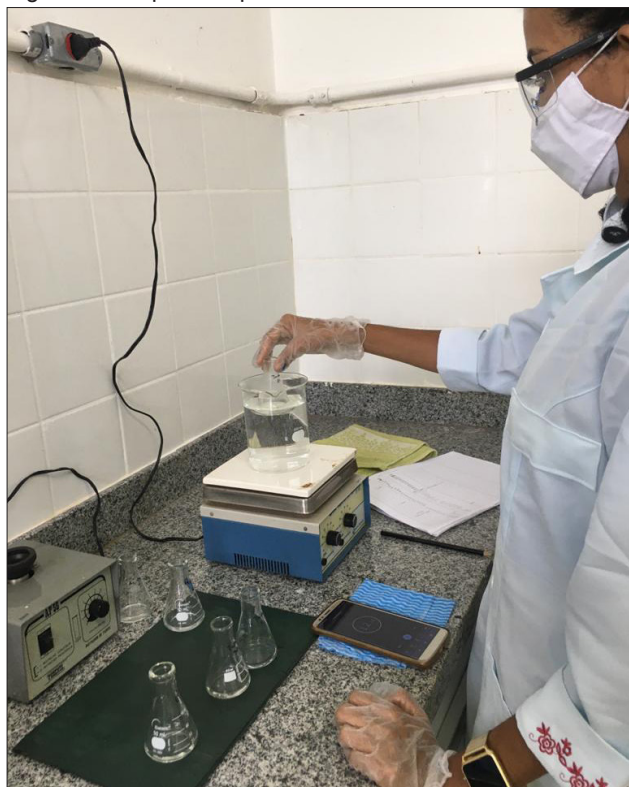
Etapa 4 - Diluição

O precipitado aquecido é transferido para Erlenmeyers de 50 mL, diluído em 5 mL de solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 2N e aquecido em banho-maria (90 °C por 50 segundos) para posterior titulação (Fig. 5).

Etapa 5 - Titulação

Com auxílio de uma microbureta, titular o precipitado diluído com solução de KMnO_4 0,02N até manter a cor rosa claro por 30 segundos (MOIR, 1953), a fim de determinar a quantidade de ácidos oxálicos (Fig. 6). Anotar o volume titulado (mL) da solução de KMnO_4 0,02N.

Figura 5 - Etapa de aquecimento a 90 °C



Elizabeth Pereira Barbosa

Figura 6 - Etapa de titulação



Elizabeth Pereira Barbosa

Sugere-se para o preparo da solução: KMnO_4 0,02N preparado antes do uso a partir da solução estoque 0,1N.

A seguir algumas considerações sobre a solução:

- padronizar a solução de KMnO_4 0,1N com solução de oxalato de sódio ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$) 0,1N;
- gerar o fator de correção da solução de KMnO_4 0,1N;
- incluir em cada grupo de amostras uma prova em branco, a fim de corrigir possíveis interferências;
- incluir as correções no cálculo final.

Etapa 6 - Quantificação de ácidos oxálicos totais

Para a determinação da porcentagem de ácidos oxálicos totais pode-se adotar a fórmula a seguir:

$$\% \text{ ácidos oxálicos totais} = (\text{volume (mL) de } \text{KMnO}_4 \text{ (amostra)} - \text{volume (mL) de } \text{KMnO}_4 \text{ (branco)}) \times 1,801 \times \text{fator de correção}$$

Os resultados são expressos com base na massa de matéria seca (MS), e a quantidade desses ácidos em g/kg de MS e mg/kg de MS.

A seguir apresenta-se a lista de equipamen-

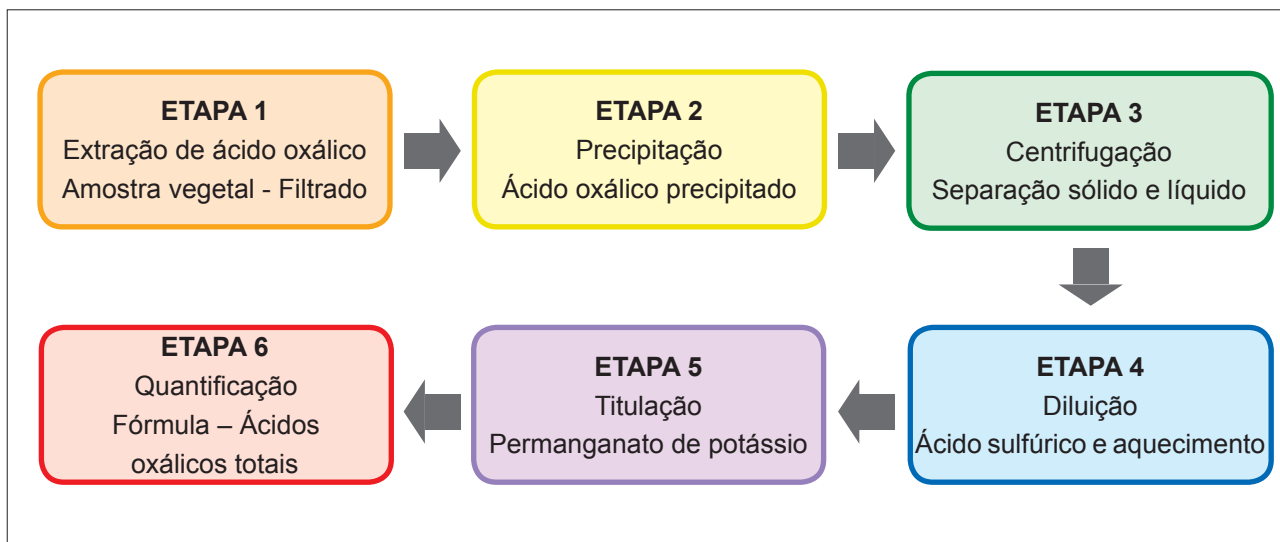
tos e materiais necessários para uso da metodologia descrita:

- balança analítica 0,0001;
- banho-maria (incubar Erlenmeyer de 250 mL ou 100 mL);
- agitador para tubos (Vortex);
- centrífuga 2.000 rpm ou 2.700 rpm;
- microbureta 0,01 mL (divisão);
- tubos tipo Falcon para centrífuga 15 mL;
- pipetas 5 mL, 1 mL;
- refrigerador;
- estufa circulação forçada de ar;
- moinho de facas;
- bureta graduada;
- água deionizada;
- ácido clorídrico;
- acetato de sódio;
- acetato de cálcio;
- ácido acético;
- permanganato de potássio;
- hidróxido de amônio;
- álcool 96%;
- ácido sulfúrico.

RESUMO DA METODOLOGIA

Na Figura 7 apresentam-se as etapas da metodologia adotada.

Figura 7 - Metodologia adotada



Fonte: Elaboração das autoras.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O acúmulo de oxalatos pelas plantas é atividade natural, própria de algumas espécies, e que pode ser influenciada pelo ambiente e pelo sistema de cultivo. A adaptação de metodologia para determinar oxalatos é ferramenta fundamental para auxiliar nos avanços da pesquisa na proposição de melhorias tanto no manejo das plantas quanto em sistemas de cultivo que proporcionem plantas com teores adequados desse componente.

AGRADECIMENTO

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) pelo financiamento do projeto.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, V.T. et al. Efeito de fatores antinutricionais encontrados nos alimentos alternativos e seu impacto na alimentação de não ruminantes: revisão. **Nutritime Revista Eletrônica**, Viçosa, MG, v.12, n.6, p.4393-4399, nov./dez. 2015. Disponível em: <https://www.nutritime.com.br/site/artigo-341-efeito-de-fatores-antinutricionais-encontrados-nos-alimentos-alternativos-e-seu-impacto-na-alimentacao-de-nao-ruminantes-revisao/>. Acesso em: 8 nov. 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. **Manual de hortaliças não convencionais**. Brasília: MAPA, 2010. 92p.

HOLDAWAY-CLARKE, T.L. et al. Effect of extracellular calcium, pH and borate on growth oscillations in *Lilium formosanum* pollen tubes. **Journal of Experimental Botany**, v.54, n.380, p.65-72, Jan. 2003.

MESSERLI, M.A. et al. Periodic increases in elongation rate precede increases in cytosolic Ca^{2+} during pollen tube growth. **Developmental Biology**, v.222, n.1, p.84-98, 2000.

MOIR, K.W. The determination of oxalic acid in plants. **Queensland Journal of Agriculture Science**, v.10, n.1, p.1-3, 1953.

PEDROSA, M.W. (coord.). **Hortaliças não convencionais**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2012. 22p. Cartilha.

PINTO, N.A.V.D. et al. Variabilidade da composição centesimal, vitamina C, ferro e cálcio de partes da folha de taioba (*Xanthosoma sagittifolium* Schott). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.7, n.3, p.205-208, set./dez. 2001.

SOUZA, M.R. de M. et al. Ora-pro-nóbis e taioba: dos quintais mineiros aos pratos da alta gastronomia. **Informe Agropecuário**. Hortaliças não convencionais folhosas, Belo Horizonte, v.37, n.295, p.41-52, 2016.