



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**RELATÓRIO DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO (ESO),
REALIZADO NA AGROPARISTECH (INSTITUTO PARISIENSE DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DA VIDA E MEIO AMBIENTE)**

**ABORDAGEM METABONÔMICA NO ESTUDO DA TOXICIDADE DE PLANTAS
DA FAMÍLIA *CONVOLVULACEAE* CONTENDO SWAINSONINA E
CALISTEGINAS**

ANA LESSA OLIVEIRA DO NASCIMENTO

RECIFE, 2019



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

ABORDAGEM METABONÔMICA NO ESTUDO DA TOXICIDADE DE PLANTAS
DA FAMÍLIA *CONVOLVULACEAE* CONTENDO SWAINSONINA E
CALISTEGINAS

ANA LESSA OLIVEIRA DO NASCIMENTO

Relatório de Estágio Supervisionado
Obrigatório realizado como exigência parcial
para obtenção do grau de Bacharela em
Medicina Veterinária sob orientação do Prof.
Dr. Francisco de Assis Leite Souza

RECIFE, 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- N244r Nascimento, Ana Lessa Oliveira do
Relatório do Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO), realizado na Agroparistech (Instituto Parisiense de Ciência e Tecnologia da Vida e Meio Ambiente): abordagem metabonômica no estudo da toxicidade de plantas da família Convolvulaceae contendo swainsonina e calisteginas / Ana Lessa Oliveira do Nascimento. - 2019.
40 f. : il.
- Orientador: Francisco de Assis Leite Souza.
Inclui referências.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em Medicina Veterinária, Recife, 2019.
1. metabolismo. 2. toxicologia. 3. Ipomoea. 4. quimiometria. 5. metabólitos. I. Souza, Francisco de Assis Leite, orient. II. Título

CDD 636.089



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

ABORDAGEM METABONÔMICA NO ESTUDO DA TOXICIDADE DE PLANTAS
DA FAMÍLIA *CONVOLVULACEAE* CONTENDO SWAINSONINA E
CALISTEGINAS

Relatório elaborado por
ANA LESSA OLIVEIRA DO NASCIMENTO

Aprovado em 13 /12/ 2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco de Assis Leite Souza - Orientador
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE

Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto – Membro Titular
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE

Prof. Dr. Fabrício Bezerra de Sá – Membro Titular
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, por todo o apoio e trabalho ao longo da vida, que me permitiram chegar até aqui.

“É a incerteza que nos fascina. Tudo é maravilhoso entre brumas.”

Oscar Wilde

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1.	Vista frontal do prédio da AgroParisTech - Centro Claude Bernard, localizado no município de Paris, França.....	12
FIGURA 2.	Mapa de Paris, destacando em vermelho o 5º arrondissement, bairro onde estão localizados a AgroParisTech e Museu Nacional de História Natural.	13
FIGURA 3.	Sala chamada <i>Salle des thésards</i> , destinada a doutorandos, mestrandos e estagiários, primeiro andar da AgroParisTech, centro Claude Bernard em Paris.....	14
FIGURA 4.	Doença do depósito lisossômico em caprinos. (A) Paraparesia de membros pélvicos. (B) Queda por incoordenação motora e debilidade de membros pélvicos. (C) Camada de neurônios de Purkinje reduzida em tamanho e número de células. HE, obj.10x. (D) Células de Purkinje apresentando vacuolização citoplasmática e deslocamento periférico dos núcleos. HE, obj.20x.	26
FIGURA 5.	Distribuição geográfica de gêneros e algumas espécies pertencentes à família <i>Convolvulaceae</i>	27
FIGURA 6.	Representação estrutural das calisteginas e da swainsonina	27
FIGURA 7.	Fluxograma resumido das etapas que envolvem a metabonômica alvo e global.	32
FIGURA 8.	Esquema demonstrando como um campo magnético uniforme B_0 atua sobre os spins de um núcleo de valor ímpar.	33

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Descrição dos cursos acompanhados ao longo do Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) realizado na Agroparistech, Paris, França.	15
TABELA 2.	Distribuição do tempo por atividade desenvolvida ao longo do estágio supervisionado obrigatório (ESO) na Agroparistech, Paris, França.	15
TABELA 3.	Plantas tóxicas mais frequentemente reportadas como causa de intoxicação de animais no Brasil em 2003	21
TABELA 4.	Impacto das intoxicações por planta na mortalidade de diferentes espécies de animais de produção.....	22
TABELA 5.	Espécies de plantas tóxicas para animais de produção no Nordeste distribuídas de acordo com o efeito tóxico que estas provocam nos diferentes sistemas do organismo animal	28
TABELA 6.	Concentração de swainsonina em diferentes espécies de plantas tóxicas para animais de produção	29
TABELA 7.	Concentração dos diferentes tipos de calisteginas detectadas em <i>Ipomoea verbascoidea</i>	30

RESUMO

O Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) foi realizado no Instituto Parisiense de Ciência e Tecnologia da Vida e Meio Ambiente (AgroParisTech). O instituto, considerado o mais importante da França em pesquisas e desenvolvimento em ciências da vida, é dividido em oito centros distribuídos pelo país, sendo dois situados em Paris, o Centre Avenue du Maine e o Centre Claude Bernard, localizado no 5º arrondissement de Paris, um dos bairros centrais da cidade. Nele, existem 11 Unidades de Pesquisa compostas por um ou mais laboratórios e equipes de professores, técnicos, doutorandos e mestrandos, essas unidades podem ser mistas (aquelas sob cotutela de mais de uma entidade) ou próprias (tuteladas apenas pelo instituto). O ESO foi realizado na Unidade Mista de Pesquisa (UMR) Modelização Sistêmica Aplicada a Ruminantes (MoSar), que é administrada pela AgroParisTech e pelo Instituto Nacional de Pesquisa Agronômica (INRA), este tutelado pelo Ministério da Pesquisa e Ministério da Agricultura. O objetivo do estágio foi iniciar a formação em metabonômica, mostrando de que forma a metodologia pode contribuir para o estudo da intoxicação por plantas, mais precisamente para o grupo das que contém swainsonina e/ou calisteginas, e que afetam animais de produção no Brasil e no mundo, e produzir uma revisão de literatura sobre o tema alvo do estágio. A metabonômica é uma importante ferramenta de pesquisa, que permite investigar as vias metabólicas afetadas em um processo toxicológico. Quando realizada de maneira adequada e periódica ao longo um experimento e com protocolos pré-concebidos, pensados a partir de um questionamento biológico, é possível acompanhar a evolução do processo de intoxicação, identificar marcadores úteis para o estabelecimento da patogenia e de diagnóstico. Isso é possível graças à característica holística da técnica, que possibilita visualizar e quantificar mesmo as variações mais sutis nas concentrações dos metabólitos. As plantas que contém swainsonina e calisteginas são responsáveis por numerosos casos de intoxicação de animais no Brasil, principalmente caprinos na região Nordeste devido a fatores ligados a criação extensiva e semiextensiva, essas substâncias provocam um quadro neurológico grave que pode levar desde a diminuição na produtividade até a morte dos animais, o que pode acarretar prejuízos econômicos para os produtores, com consequências mais graves para os pequenos produtores, que tem muitas vezes a criação desses animais como principal fonte de renda, tornando de grande importância a elucidação dos mecanismos envolvidos no estabelecimento desse quadro, a fim de elaborar soluções para o problema.

Palavras-chaves: metabolismo; toxicologia; *Ipomoea*; quimiometria; metabólitos.

ABSTRACT

The Compulsory Supervised Internship (CSI) was held at the Parisian Institute of Science and Technology of Life and Environment (AgroParisTech). The institute, considered the most important in France on life science research and development, is divided into eight centers across the country, two of which located in Paris, Avenue du Maine Center and Claude Bernard Center, located in the 5th arrondissement of Paris. There are 11 Research Units composed of one or more laboratories and teams of teachers, technicians, doctoral students and master's students, these units can be mixed (those under the supervision of more than one entity) or their own (supervised by the institute itself). More precisely, the CSI was conducted at the Mixed Research Unit (UMR) Systemic Modeling Applied to Ruminants (MoSar), which is administered by AgroParisTech and the National Institute for Agronomic Research (INRA), which is under the Ministry of Research and Ministry of Agriculture. The aim of the internship was to start the formation in metabolomics, showing how the methodology can contribute to the study of plant poisoning, in this case to the group containing swainsonine and / or calystegines, that affect farm animals in Brazil, and to produce a literature review on the subject of the internship. Metabolomics is an important research tool that allows investigating the metabolic pathways affected in a toxicological process. When performed properly and periodically throughout an experiment and with pre-designed protocols, conceived from a biological problem, it is possible to follow the evolution of the intoxication process, identify useful markers for the establishment of pathogenesis and diagnosis, and in the case of global metabolic, that is, one can make discoveries that had not been raised in the initial biological questioning. This is possible thanks to the holistic characteristic of the technique, which makes it possible to visualize and quantify even the most subtle variations in metabolites concentrations. Plants containing swainsonine and calystegines are responsible for numerous cases of animal poisoning in Brazil, mainly goats in the Northeast due to factors related to extensive and semi-extensive breeding, these substances cause a severe neurological syndrome that can lead from decreased productivity to even death of animals, which can cause economic loss to producers, who often have animals as the main source of income, making it very important to clarify the mechanisms involved in establishing this disease in order to find solutions to the problem.

Keywords: metabolism; toxicology; *Ipomoea*; chemometry; metabolites.

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I	11
	1.1 Introdução	11
	1.2 Atividades realizadas	14
	1.3 Discussão das atividades desenvolvidas	16
2	CAPÍTULO II	17
	2.1 Introdução	19
	2.2 Importância socioeconômica	20
	2.3 Doença do depósito lisossômico	23
	2.4 Gêneros e família estudados	25
	2.5 Princípios tóxicos	27
	2.6 Metabonômica	31
	2.7 Conclusão	35
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
	REFERÊNCIAS	37

1 CAPÍTULO I

1.1 Introdução

O Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) constitui um dos requisitos para a conclusão de curso e obtenção do diploma de Bacharel em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Pernambuco (UFRPE). O curso de graduação em Medicina Veterinária ofertado pela unidade Sede da UFRPE tem duração de cinco anos e meio, sendo dez semestres de atividades teórico-práticas e um semestre reservado para a realização do ESO, cuja carga horária mínima exigida é de 420 horas.

O ESO é realizado no 11º (último) semestre do curso e tem como objetivo promover ao estudante uma vivência prática, seja em instituições públicas ou privadas, em uma ou mais das diversas áreas de atuação para um Médico Veterinário. O estudante tem a possibilidade de realizar o ESO em um ou dois estabelecimentos, não necessariamente na mesma área de atuação, o que lhe permite aprofundar conhecimentos e desenvolver as habilidades adquiridas ao longo dos 5 anos anteriores de curso teórico-prático. Dessa forma, o ESO contribui para a formação de um profissional capacitado e pronto para contribuir com a sociedade, seja qual for a área pretendida pelo estudante.

Durante o período de nove de setembro a 21 de novembro de 2019, de segunda à sexta-feira, das 08 às 17 horas, com uma hora de intervalo para almoço, cumprindo regime de oito horas diárias e 40 horas semanais, totalizou-se a carga horária de 424 horas de estágio, que foi realizado na UMR (Unidade Mista e Pesquisa) Modelização Sistêmica Aplicada a Ruminantes (MoSar) localizado no Centre Claude Bernard da AgroParisTech (Instituto Parisiense de Ciência e Tecnologia da Vida e Meio Ambiente), considerado o mais importante da França em ensino, pesquisa e desenvolvimento de novas tecnologias em ciências da vida.

O estágio foi executado sob supervisão da Dr^a. Céline Domange, professora e pesquisadora do instituto, que possui experiência nas áreas de nutrição e metabolismo animal, plantas tóxicas e metabonômica. Durante este período, foram realizadas participações em cursos online disponibilizados por instituições renomadas como as Universidades de Birmingham e de Lyon, além de processamento de dados de experimentos anteriores como ferramentas de aprendizado da metodologia. E ainda, um levantamento de dados a fim de entender como a aplicação da abordagem metabolômica pode contribuir para a compreensão dos mecanismos envolvidos na intoxicação por plantas que contém Swainsonina e Calisteginas.

a) Local

O estágio foi realizado no Instituto Parisiense de Ciência e Tecnologia da Vida e Meio Ambiente (AgroParisTech) localizado no município de Paris, Île-De-France, França (Figura 1). As atividades foram desenvolvidas na unidade mista de pesquisa (UMR) de modelização sistêmica aplicada à ruminantes (MoSAR).



Figura 1. Vista frontal do prédio da AgroParisTech - Centro Claude Bernard, localizado no município de Paris, França
Fonte: Nascimento (2019).

Na França as pesquisas científicas, principalmente aquelas ligadas as ciências da vida, ocorrem de forma multidisciplinar e descentralizada, isso ocorre pois com a avanço rápido das metodologias e ferramentas utilizadas nas pesquisas em grau de complexidade cresce também a demanda pelo trabalho em conjunto de profissionais e especialistas de áreas que em geral podem não interagir com muita frequência entre si, como matemáticos e biólogos por exemplo.

A partir dessa necessidade, equipes, laboratórios, fazendas experimentais e outras dependências são hoje divididos por Unidades de Pesquisa (UR), que podem estar sob tutela de uma (Unidade Própria) ou mais entidades (Unidade Mista), sejam elas públicas ou privadas, ainda que possam ocupar o espaço físico de apenas uma delas.

A UMR-MoSAR é uma das unidades mistas de pesquisa sob tutela da AgroParisTech e do INRA (Instituto Nacional de Pesquisa Agronômica) e desenvolve pesquisas nas áreas de Nutrição e Comportamento Animal, Fisiologia do Rúmen, Metabolismo Lipídico e Modelização Sistêmica. E dentre os objetivos desses estudos está descrever o fenótipo a partir da caracterização funcional de um animal ou sistema biológico, possibilitando assim, prever as

respostas dos animais e rebanhos aos desafios do seu ambiente alimentar, dentre os quais as intoxicações por plantas ocupam um lugar importante.

A unidade está situada no Centro Claude Bernard da AgroParisTech, que é um dos oito centros do instituto distribuídos pelo país. O centro alberga diversas unidades de pesquisa, que atuam em áreas como Biologia, Ciências Animais, Economia e Gestão, Ciências Sociais, Informática, Matemática e Alimentos, e está localizado no 5º arrondissement de Paris, um dos bairros mais antigos e centrais da cidade, onde se localizam diversos outros centros de pesquisa, como o Museu Nacional de História Natural (MNHN) (Figura 2), onde ocorre o pré-processamento e processamento de amostras para análise RMN (Ressonância Magnética de Prótons), além de parte do processamento de dados obtidos a partir dessas análises, em parceria com o pesquisador Alain Paris.

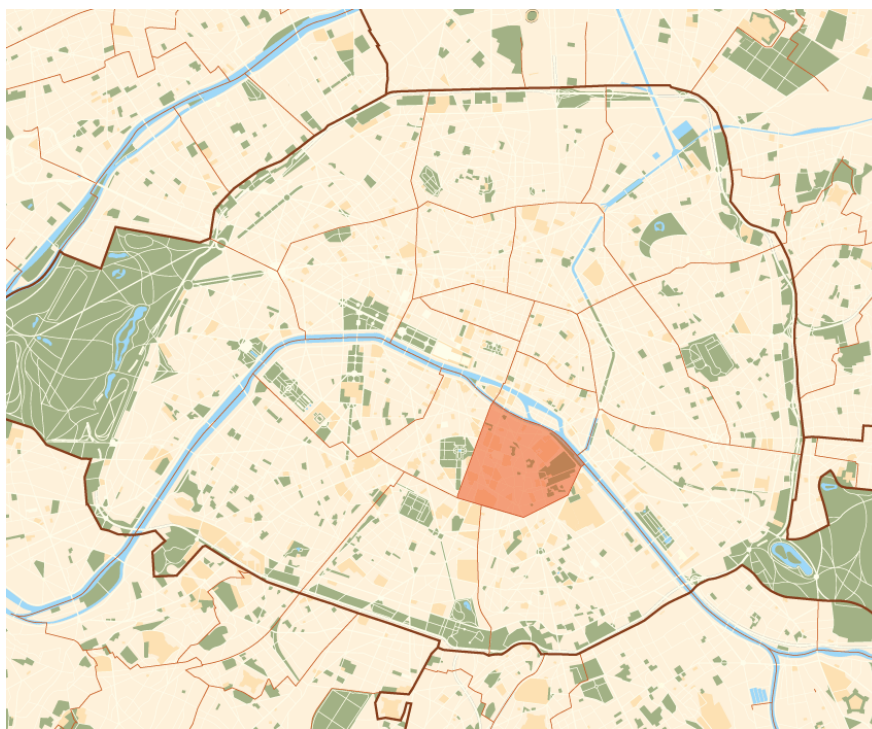


Figura 2. Mapa de Paris, destacando em vermelho o 5º arrondissement, bairro onde estão localizados a AgroParisTech e Museu Nacional de História Natural.

Fonte: <https://www.mairie5.paris.fr/>.

Dentro da AgroParisTech, a UMR-MoSAR está localizada no primeiro andar do prédio principal e conta com, entre outras instalações, laboratórios multidisciplinares, biblioteca, *salle des thésards* (sala com mesas e computadores destinadas aos estudantes que trabalham em suas monografias, dissertações e teses, cada estudante ocupando uma mesa, para utilizar durante todo o período em que estiver na instituição) (Figura 3), e um refeitório de uso comum entre professores, técnicos, funcionários e estudantes.

A equipe fixa da unidade é formada por 34 colaboradores, entre professores, pesquisadores, técnicos de laboratório e equipamentos. Além de doutorandos, mestrandos e estagiários, que trabalham no desenvolvimento de projetos em comum e enquanto desenvolvem suas teses e dissertações.



Figura 3. Sala chamada *Salle des thésards*, destinada a doutorandos, mestrandos e estagiários, primeiro andar da AgroParisTech, centro Claude Bernard em Paris.
Fonte: Nascimento (2019).

1.2 Atividades realizadas

As atividades realizadas durante o ESO incluíram levantamento de informações pertinentes para elaboração da revisão de literatura, participação em MOOCs (cursos à distância disponibilizados por importantes instituições de ensino superior, contando com a supervisão e disponibilidade para tirar dúvidas de Céline Domange e Alain Paris, além de visitas ao Museu Nacional de História Natural, para receber orientações quanto a utilização dos softwares destinados as análises estatísticas aplicadas a metabonômica.

Ao longo dos três meses de estágio foi possível realizar cursos à distância como o *Metabolomics: Understanding Metabolism in the 21st Century* disponibilizado pela Universidade de Birmingham, o *Éthique de la recherche* da Universidade de Lyon e o *Chimiometrie chapitre 1/2 : les méthodes non supervisées* promovido pelo Agreenium (Instituto Agrônômico, Veterinário e de Florestas da França). Os tópicos abordados em cada curso podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos cursos acompanhados ao longo do Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) realizado na Agroparistech, Paris, França

Curso	Tópicos abordados
Metabolomics	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Important considerations in studying the metabolome</i> - <i>Experimental design and sample preparation</i> - <i>The application of mass spectrometry in metabolomics</i> - <i>An introduction to data processing and analysis</i> - <i>Metabolite identification</i>
Étique de la recherche	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Éthique et sciences aujourd'hui</i> - <i>Qu'est-ce que l'éthique de la recherche ?</i> - <i>Pourquoi l'éthique fait-elle partie de la science ?</i> - <i>Sciences, technologies, innovation et démocratie</i> - <i>La responsabilité des chercheurs et des institutions</i> - <i>Conflits d'intérêts, conflits de valeurs</i>
Chimiometrie	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Quelques définitions et préalables, avant de commencer</i> - <i>Des notions simples de statistique</i> - <i>L'analyse en composantes principales, vue par les chimiométriciens</i> - <i>Les classifications non supervisées ;</i> - <i>Les méthodes de décomposition spectrale ;</i> - <i>Les méthodes d'analyse multitableaux.</i>

As orientações quanto a utilização dos softwares de pré-tratamento de dados, análise estatística e geradores de gráficos, foram oferecidas pelo pesquisador e professor Alain Paris do Museu Nacional de História Natural (MNHN), que atua nas áreas de toxicologia, química analítica, metabolismo xenobiótico e bioativação metabólica, biologia de sistemas e estatística multivariada. Sendo pioneiro no desenvolvimento de trabalhos em metabolômica na França.

Reuniões com a supervisora eram realizadas semanalmente, afim de monitorar o grau de retenção do conteúdo estudado nos cursos *online*, elucidar possíveis dúvidas e avaliar o andamento da elaboração da revisão de literatura.

Tabela 2. Distribuição do tempo por atividade desenvolvida ao longo do estágio supervisionado obrigatório (ESO) na Agroparistech, Paris, França

Atividades desenvolvidas	Distribuição do tempo por atividade	
	% da carga horária utilizada	Horas de atividade por carga horária total (horas)
Levantamento de dados e escrita	17,45	74/424
Curso <i>Metabolomics</i>	18,86	80/424
Curso <i>Étique de la recherche</i>	16,5	70/424
Curso <i>Chimiometrie</i>	18,86	80/424
Orientação com Alain Paris	9,43	40/424
Orientação com Céline	14,15	60/424
Reuniões semanais	4,7	20/424

1.3 Discussão das atividades desenvolvidas

A cada dia a ciência adquire um caráter mais multidisciplinar e global, demandando dos pesquisadores uma formação abrangente e que dialogue com diferentes áreas do conhecimento. A metabolômica, assim como as outras ciências ômicas, são exemplos dessa necessidade de profissionais capazes de interagir e transitar entre as diferentes áreas, pois essas novas metodologias unem biólogos, médicos, estatísticos, físicos, químicos e ainda programadores, que juntos foram capazes de alcançar objetivos como a descrição completa do metaboloma humano.

O trabalho desenvolvido durante a realização de um projeto de pesquisa envolve além de muito capital econômico, o capital humano, que é o conjunto de habilidades e experiências acumuladas ao longo do tempo pelos profissionais. Para que a ciência possa avançar é preciso que estudantes sejam formados continuamente em tantas competências quanto possíveis. As atividades mais práticas desempenhadas por aqueles que dedicam suas vidas profissionais à ciência possuem um valor inestimável e são imprescindíveis para o funcionamento das instituições de pesquisa. Faz-se importante lembrar também a importância das etapas pré-práticas do desenvolvimento de um projeto científico, que consistem justamente do embasamento teórico, levantamento de hipóteses e discussão entre pares.

Para buscar compreender a metodologia e justificar a aplicação da metabolômica ao estudo da intoxicação por plantas que contém swainsonina e calisteginas é que foi executado o presente Estágio Supervisionado Obrigatório, proporcionando uma breve introdução à formação teórica e prática da discente nesse método global de análise da resposta metabólica de um organismo frente a desafios exógenos ou endógenos.

2 CAPÍTULO II

ABORDAGEM METABONÔMICA NO ESTUDO DA TOXICIDADE DE PLANTAS DA FAMÍLIA *CONVOLVULACEAE* CONTENDO SWAINSONINA E CALISTEGINAS

RESUMO

O grupo de plantas tóxicas que contém swainsonina e/ou calisteginas, corresponde a um dos mais importantes para animais de produção. A espécie caprina é mais frequentemente afetada, devido a fatores facilitadores que incluem os hábitos de pastejo desses animais, bem como a áreas de ocorrência das espécies vegetais envolvidas, e o tipo de criação praticada no Brasil, geralmente extensiva, principalmente na região Nordeste. Sabe-se que as plantas pertencentes a esse grupo são capazes de provocar nos animais um quadro neurológico, que inclui sintomas como ataxia, falta de equilíbrio, marcha lateralizada, quedas e até a morte em casos crônicos de consumo. Trata-se da doença do depósito lisossômico (DDL), uma síndrome provocada pela inibição de enzimas lisossômicas, que atinge herbívoros nas regiões climáticas áridas e semi-áridas de todo o mundo, onde ocorrem as plantas dos gêneros *Astragalus*, *Oxytropis*, *Swainsona* e *Ipomoea*, que é o mais importante para a região Nordeste do Brasil em número de espécies, bem como de relatos apontando-as como causa de surtos de intoxicação. Apesar do grande impacto socioeconômico provocado pelas intoxicações por plantas que contém swainsonina e calisteginas, até o momento o papel de cada uma das moléculas não foi totalmente esclarecido, havendo divergências entre os pesquisadores principalmente quanto à influência das calisteginas no estabelecimento e agravamento do quadro neurológico. A metabonômica é uma abordagem global de análise, capaz de mensurar os níveis de concentração, bem como a presença ou ausência de determinados metabólitos no metaboloma. Associada ao conhecimento das vias metabólicas envolvidas, essa técnica é capaz de mostrar onde um estímulo, seja ele endógeno ou exógeno, fisiológico ou patológico, atua e qual seu impacto em um organismo, possibilitando a elaboração de intervenções terapêuticas e medidas preventivas. Além disso possibilita a identificação de fatores de resistência e susceptibilidade dos animais, bem como a investigações de potenciais efeitos farmacológicos benéficos desses compostos.

Palavras-chave: Metabonômica; Alcaloides; Plantas Tóxicas; Swainsonina; Calisteginas;

ABSTRACT

Plants containing swainsonine and/or calystegines is one of the most important group of poisonous plants for farm animals. Goats are most frequently affected due to facilitating factors that include the grazing habits of these animals, as well as the areas of occurrence of the plant species involved, and the type of farming practiced in Brazil, usually extensive, especially in the Northeast. Plants belonging to this group are known to be capable of provoking neurological conditions in animals, including symptoms such as ataxia, lack of balance, lateral gait, falls and even death in chronic consumption cases. It is the disease of lysosomal deposit (DDL), a syndrome caused by inhibition of lysosomal enzymes, which affects herbivores in arid and semi-arid climatic regions of the world, where plants of the genera *Astragalus*, *Oxytropis*, *Swainsona* and *Ipomoea* occur , which is the most important for the Northeast region of Brazil in number of species, as well as reports pointing them as a cause of intoxication outbreaks. Despite the great socioeconomic impact caused by plant poisoning containing swainsonine and calystegines, so far, the role of each molecule has not been fully clarified, and there is disagreement among researchers mainly regarding the influence of calystegines on the establishment and worsening of neurological status. Metabonomics is a global analysis approach capable of measuring concentration levels as well as the presence or absence of certain metabolites in the metabolome. Associated with the knowledge of the metabolic pathways involved, this technique is able to show where a stimulus, whether endogenous or exogenous, physiological or pathological, acts and what its impact on an organism, enabling the elaboration of therapeutic interventions and preventive measures. It also enables the identification of resistance and susceptibility factors of animals, as well as investigations of potential beneficial pharmacological effects of these compounds.

Keywords: Metabonomics; Alkaloids; Toxic plants; Swainsonine; Calystegines;

2.1 Introdução

A intoxicação de animais de produção por plantas que contém swainsonina e calisteginas tem se mostrado um desafio para produtores e médicos veterinários, pois é responsável por provocar perdas econômicas significativas (TOKARNIA; DOBEREINER; PEIXOTO, 2002). Segundo estudos recentes, as plantas pertencentes a este grupo, especialmente algumas espécies da família *Convolvulaceae*, tem sido reportada como causa de quadro neurológico similar as doenças do depósito lisossomal (DDL), que em humanos corresponde a um grupo de doenças provocadas por distúrbios metabólicos hereditários (WENGER; COPPOLA; LIU, 2003).

O problema tem se apresentado de maneira mais frequente na espécie caprina (BARBOSA et al., 2006; COLODEL et al., 2002; DANTAS et al., 2007; DE BALOGH et al., 1999; LIMA et al., 2013; MENDONÇA et al., 2011), embora existam relatos de surtos em outras espécies de ruminantes (BARBOSA et al., 2012, 2006; FURLAN et al., 2009), e também em equídeos (ASSIS et al., 2010; LORETTI et al., 2010). No Brasil, a região Nordeste acumula o maior número de casos em relação ao restante do país. Nessa região, o gênero mais importante em casos de DDL é *Ipomoea*. Esse quadro epidemiológico pode ser explicado pela junção de alguns fatores como os hábitos alimentares da espécie mais acometida, as características do clima da região bem como os mecanismos de adaptação e locais de ocorrência das espécies vegetais envolvidas na intoxicação, e o tipo de manejo no qual os animais são criados no Nordeste brasileiro (LIMA et al., 2005).

A doença do depósito lisossômico se caracteriza clinicamente pela manifestação de sinais como tremores de cabeça, ataxia, perda de equilíbrio, dificuldade em levantar-se, quedas, decúbito prolongado e, caso o consumo não seja interrompido, pode levar à morte (ARMIÉN et al., 2007). Sabe-se que a swainsonina e as calisteginas são alcaloides capazes de inibir enzimas lisossomais, especialmente aquelas ligadas ao metabolismo de oligossacarídeos, porém até o momento poucos estudos foram desenvolvidos para elucidar a patogenia dessa doença e descrever o papel de cada um dos compostos (STEGELMEIER et al., 2008). Até o momento não existe consenso entre os pesquisadores, pois os resultados obtidos foram divergentes quanto ao princípio ativo responsável sobre a doença. Menos ainda se sabe sobre o resultado da interação dos dois compostos quando presentes numa mesma espécie vegetal.

Dessa forma, se faz necessária a utilização de um método capaz de mapear a resposta metabólica dos animais a esses princípios tóxicos em nível molecular, de forma que seja possível identificar quais são as vias metabólicas e mecanismos biológicos envolvidos no

desenvolvimento da doença. A partir de uma análise desse tipo é possível ainda investigar possíveis utilizações terapêuticas desses compostos, identificação de marcadores de resistência e/ou susceptibilidade, e o estabelecimento de uma intervenção terapêutica para a DDL, que até o momento não tem tratamento.

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão bibliográfica sobre os principais aspectos da DDL em caprinos na região Nordeste do Brasil, bem como sobre as plantas tóxicas associadas ao seu aparecimento, e o que se conhece até hoje sobre os princípios tóxicos detectados nessas espécies e seus papéis na patogenia doença, além das definições, princípios e aplicabilidades da metodologia metabonômica em estudos toxicológicos.

2..2. Importância socioeconômica

No Brasil, o sistema de criação de gado, seja de rebanhos leiteiros ou de corte, é principalmente do tipo extensivo ou semiextensivo, o que explica por que a maior parte da alimentação animal vem de pastagens plantadas, nativas ou permanentes. Um dos principais problemas inerentes a esse modo de criação é o aumento do número de casos de intoxicação de animais por plantas. De fato, as grandes áreas de pastagem, a dificuldade de monitorar o gado pelos criadores e o controle da flora presente (apesar do uso de herbicidas), associado à predisposição de espécies vegetais para produzir metabólitos secundários para defender-se dos agressores ambientais (estresse hídrico, estresse térmico) são fatores que contribuem para o aumento de casos de intoxicação vegetal do gado (TOKARNIA; DOBEREINER; PEIXOTO, 2002)

Atualmente, não menos que 131 espécies de plantas tóxicas, divididas em 79 gêneros, já foram identificadas no país (RIET-CORREA et al., 2017). A Tabela 3 resume as espécies mais comuns que causaram intoxicação no Brasil até 2003, quando o número total de espécies descritas era de 88 em 50 gêneros (HARAGUCHI, 2003).

A intoxicação por plantas é uma das principais causas de mortalidade animal no Brasil, com perdas econômicas tão grandes quanto a raiva e o botulismo para a pecuária. Estima-se que a raiva mate pelo menos 850.000 bovinos por ano (LIMA et al., 2005), surtos de botulismo representaram até 23,8% da mortalidade bovina no estado brasileiro de Minas Gerais e 16,67% entre 2008 e 2012 em Mato Grosso do Sul. Na tabela 4 é possível observar a estimativa do impacto das plantas tóxicas sobre os animais de produção realizada por Pessoa et al. em 2013.

Tabela 3. Plantas tóxicas mais frequentemente reportadas como causa de intoxicação de animais no Brasil em 2003

Espécie de planta	Nome popular	Regiões	Dose Tóxica	Patologia	Princípio Tóxico
<i>Palicourea marcgravii</i> St. Hill	Erva do rato, cafezinho	N, NE, CO e SE	>0,6 g/kg (bovinos)	Morte subita	Ác. Monofluoroacético
<i>Arrabidaea bilabiata</i> (Sprague) Sandwith	Gibata, Chibata	N	2,5 g/kg (bovinos)	Morte subita	Esteróides cardioativos
<i>Mascagnia pubiflora</i> (A.Juss.) Griseb	Corona, cipó-prata	CO e SE	5 g/kg (período de seca) 20 g/kg (período chuvoso)	Morte subita	Chromonos
<i>Pteridium aquilinum</i> (L) Kuhn	Samambaia	Todo o Brasil	>10 g/kg/d/3 semaines (syndrome aigu) <10 g/kg/d/1an (hématurie enzootique)	Hematúria enzoótica e tumores no trato digestivo	Ptaquilosida
<i>Senecio brasiliensis</i> (Spreng.) Less	Flor das almas	S	0,6 a 5 g/kg/j (1 à 8 mois)	Hepatotoxicidade	Pirrolizidínico
<i>Nierembergia veitchii</i> Hook		S		Calcificação sistêmica	Calcitriol
<i>Ateleia glazioviana</i> Baill	Timbó, Maria preta	S		Aborto e fibrose cardíaca	
<i>Brachiaria decumbens</i> Stapf		N, CO e SE		Fotosensibilização	
<i>Cestrum laevigatum</i> Schltld.	Coerana	NE et SE		Hepatotoxicidade	Saponinas
<i>Baccharis coridifolia</i> DC.	Mio-mio	S	0,25 a 0,5 g/kg (bovins)	Lesões no tubo digestivo	Tricoteceno
<i>Ricinus communis</i> L.	Mamona	Todo o Brasil	20 g/kg (feuilles) 2 g/kg (graines)	Sintomas neurológicos e gastroenterite	Ricina
<i>Lantana spp.</i> L.		Todo o Brasil		Fotosensibilização	Lantandeno
<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Mandioca	N et NE	2 a 4 mg HCN/kg/heure	Morte por convulsão e parada respiratória	Linamarina e lotaustralina

Fonte: Haraguchi (2003).

Tabela 4 – Impacto das intoxicações por planta na mortalidade de diferentes espécies de animais de produção

	Bovinos	Ovinos	Caprinos	Equídeos
Cabeças	820.761 à 1.755.763	399.800 à 445.309	52.675 à 63.292	38.559
Percentual	7,4% a 15,83%	11,46% a 13,8%	6,4% a 7,69%	14%

Fonte: Pessoa; Medeiros; Riet-Correa (2013).

Esses números provavelmente são ainda mais altos, dados os casos não relatados e a dificuldade de monitorar a pecuária brasileira por agências de pesquisa como o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), devido às significativas dimensões territoriais do país, número e tamanho de fazendas e métodos extensivos de produção aplicados.

Sabe-se que as plantas produzem substâncias que reduzem sua palatabilidade aos animais que as ingerem, como mecanismo de defesa, para limitar seu consumo pelos herbívoros, mas em algumas situações os animais podem ignorar o sabor desagradável gerado por essas substâncias e consumir a planta levando a casos esporádicos de intoxicação (MAZID; KHAN; MOHAMMAD, 2011). Mas então, como explicar um número tão grande de casos?

Se resumirmos, existem muitos fatores que contribuem para o envenenamento de animais de produção, principalmente no que diz respeito às fazendas de caprinos na região nordeste do Brasil, entre as quais podemos mencionar:

- a) Palatabilidade. Propriedade de um alimento proporcionar uma sensação agradável durante o consumo. Pode estar relacionada à quantidade de açúcares presentes nas espécies vegetais, bem como ao uso de certos herbicidas, que os tornam mais palatáveis (PESSOA et al., 2013);
- b) Possíveis efeitos viciantes. No gênero *Ipomoea*, alguns casos relatados de intoxicação mostram que os animais preferiram comer as folhas desta planta, mesmo depois de já terem expressado os primeiros sinais de intoxicação, inclusive sinais neurológicos e motores que dificultam a locomoção. Isso implicaria que mecanismos de dependência possam estar presentes (REDDY et al., 2016);
- c) Rebrotas após as primeiras chuvas. Geralmente, no início da estação das chuvas, após a seca, as plantas nativas tendem a germinar mais rapidamente, ao contrário de outras. *Ipomoea sericosepala* J.R.I. Wood & Scotland (anteriormente chamada *Turbina cordata* Choisy) é uma das espécies responsáveis por muitos envenenamentos no Nordeste durante esse período (PESSOA et al., 2013);
- d) Escassez de água e alimento. A falta de alimento durante a estação seca leva os animais a procurar fontes de energia na rara vegetação disponível, geralmente composta por espécies nativas tóxicas, como *Tephrosia cinerea* (L.) Pers., no

nordeste do Brasil (PESSOA et al., 2013). Além disso, ao ingerir água após longos períodos de seca, a seletividade alimentar dos animais diminui, o que os leva a consumir mesmo as espécies menos palatáveis (SCHUSTER, 1978);

- e) Facilitação social. Foi observado que, em situações de estresse, alguns animais ingerem espécies de plantas que normalmente não consumiriam. Esses indivíduos gradualmente incitam outros animais a adotar o mesmo comportamento, levando a verdadeiras epidemias de envenenamento. (BARBOSA et al., 2006; DANTAS et al., 2007; BARBOSA et al., 2007);
- f) Variabilidade de doses tóxicas. A quantidade de material vegetal necessário e suficiente para o envenenamento do gado varia de uma espécie para outra, bem como dentro de uma única espécie, dependendo do estágio de desenvolvimento da planta, da parte da planta mais consumida, duração da ingestão (toxicidade aguda vs toxicidade crônica) (PESSOA et al., 2013). Ademais, como já mencionado, uma concentração de princípios ativos pode ocorrer em resposta a agressões ambientais, como estresse hídrico e/ou calor, porque algumas espécies se tornam muito mais tóxicas logo após esses períodos de desafio ambiental. (JEAN-BLAIN & GRISVARD, 1973).

2.3 Doença do depósito lisossômico

Na medicina humana, o termo "doenças de armazenamento ou depósito lisossômico" refere-se a um grupo de mais de 50 doenças genéticas diferentes. Geralmente, são causadas por disfunção ou deficiência de hidrolases lisossômicas, embora disfunções proteicas relacionadas ao transporte vesicular e à síntese de lisossomos também tenham sido descritas (WILCOX, 2004). Um dos primeiros a ser estudado em maior profundidade é talvez a doença de Pompe. Em 1993, o investigador homônimo associou um acúmulo significativo de glicogênio nas vesículas da membrana dos cardiomiócitos em um paciente de 7 meses de idade a sua morte por complicações cardíacas.

Posteriormente, com o conhecimento das vias metabólicas do glicogênio (Cori GT.) e a descoberta dos lisossomos (De duve), tornou-se possível explicar o acúmulo de glicogênio em pacientes com doença de Pompe por uma deficiência da enzima lisossômica, α -D-glucosidase (Hers). A confirmação dessa relação estabeleceu um precedente para compreender outras doenças de depósito lisossômico que também seriam explicadas por déficits enzimáticos específicos.

Jolly & Walkley (1997), em uma revisão, compilaram todas as doenças causadas por disfunções lisossômicas, que ocorrem em diferentes espécies animais. Nestas, a esfingolipidose é encontrada em cães e gatos; doenças relacionadas à deposição de ésteres de colesterol em cães; mucopolissacaridose em gatos, cães e ratos; mucolipidose em gatos e roedores; armazenamento de glicogênio em cães, gatos, codorna, ovelha e gado; e animais de produção, as glicoproteinoses.

Destes, a α -manosidose genética, embora rara em humanos, é a doença de armazenamento lisossômico mais importante economicamente em animais de criação e tem sido relatada em rebanhos de Angus criados em diferentes regiões, como América do Norte, Argentina, Austrália, Nova Zelândia e Escócia.

A α -manosidose adquirida está presente em herbívoros em todo o mundo em regiões climáticas áridas e semi-áridas, onde são encontradas espécies de plantas pertencentes aos gêneros *Astragalus*, *Ipomoea*, *Oxytropis* e *Swainsona*, grupo conhecido como plantas que contêm swainsinina e calisteginas.

Devido a semelhança em termos de distúrbios neurológicos e de patogenia com o conjunto de doenças de armazenamento manifestadas em humanos, hoje a α -manosidose vem sendo chamada também de Doença do Depósito Lisossômico, diferindo apenas no quesito etiológico.

O consumo crônico de espécies pertencentes a esse grupo (3-4 semanas ou mais) induz o aparecimento de sinais clínicos, principalmente neurológicos, relacionados a distúrbios do cerebelo, podendo também variar de acordo com a concentração dessas moléculas na planta (OLIVEIRA JÚNIOR; RIET-CORREA; RIET-CORREA, 2013). Quando a ingestão da planta continua após o aparecimento dos sinais clínicos, por um período superior a 20 a 30 dias, os distúrbios tornam-se irreversíveis (ARMIÉN et al., 2007; BARBOSA et al., 2006; OLIVEIRA JÚNIOR; RIET-CORREA; RIET-CORREA, 2013).

De fato, a maioria dos neurônios é classificada como células pós-mitóticas, ou seja, em células maduras diferenciadas, incapazes de sofrer mitose e sofrendo de apoptose em resposta à reativação do ciclo celular e que, portanto, não se regenera (ARANDA-ANZALDO, 2012). Embora estudos ainda mais recentes tenham demonstrado que certos neurônios, sob condições específicas, podem potencialmente proliferar, reativando os ciclos celulares sem necessariamente sofrer apoptose (FRADE; OVEJERO-BENITO, 2015).

Durante a ingestão crônica, outros distúrbios na função reprodutiva e no desenvolvimento perinatal podem ocorrer em adição aos neurológicos (OLIVEIRA JÚNIOR et

al., 2011). Eles incluem abortos, infertilidade e recém-nascidos fracos (HUEZA et al., 2007; SCHWARZ et al., 2003).

Os animais acometidos podem apresentar nistagmo (fenômeno espontâneo ou provocado, congênito ou adquirido, caracterizado por movimentos involuntários e bruscos dos olhos, de pequena amplitude, geralmente horizontal, mas às vezes vertical ou circular), sonolência, perda de peso, diminuição da ingestão de alimentos, dificuldade em engolir, cabeça inclinada para o lado e cabelos costurados e de má qualidade. Tremores da cabeça e pescoço, ataxia (desordem da coordenação dos movimentos, de origem neurológica), perda de equilíbrio e / ou possíveis quedas, dismetria (execução de movimentos sem medição ao longo do tempo e no espaço, com um movimento muito longo, ou hipométrico, ou muito curto, chamado hipométrico e está geralmente associado a distúrbios cerebelares), marcha lateralizada, diminuição do tônus muscular dos lábios e da língua, membro rígidos e dificuldade em se levantar são alguns dos outros sinais neurológicos que podem ser observados, principalmente quando os animais estão estressados e /ou são estimulados se deslocar. O principal achado histopatológico da doença é a vacuolização citoplasmática dos neurônios, de forma mais acentuada nas células de Purkinje (MENDONÇA et al., 2018; OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2011; SILVEIRA, 2018) (Figura 4).

2.4 Gêneros e família estudados

A família das Convolvuláceas foi descrita pela primeira vez em 1789 por Antoine-Laurent De Jussieu, botânico de Lyon que estudou a classificação de plantas com flores em seu livro *Genera Plantarum*. O texto resume o método de classificação natural das plantas. De Jussieu descreveu 15 classes, 100 famílias e cerca de 400 tipos de plantas (ALLORGE; IKOR, 2003).

Considerada uma família monofilética (grupo de espécies, incluindo todas as espécies derivadas de um ancestral comum, e o próprio ancestral), a família *Convolvulaceae* não sofreu grandes alterações desde sua primeira descrição e é estimada em 55 gêneros e 1.930 espécies (JUDD et al., 2007). São plantas herbáceas, apresentando, na maioria das vezes, um porte volúvel ou rastejante, geralmente na forma de lianas, mais raramente na forma de árvores ou arbustos.

A família está presente em todo o mundo, embora 90% das espécies ocorram nos trópicos e subtropicais (Figura 5). O gênero *Ipomoea* apresenta sua maior diversidade de espécies na região tropical do continente americano, como o México, sudeste do Brasil,

Paraguai e norte do Chile, embora algumas espécies possam estar presentes na África e na Ásia. (YADAV; HEMKE; UMEKAR, 2018).

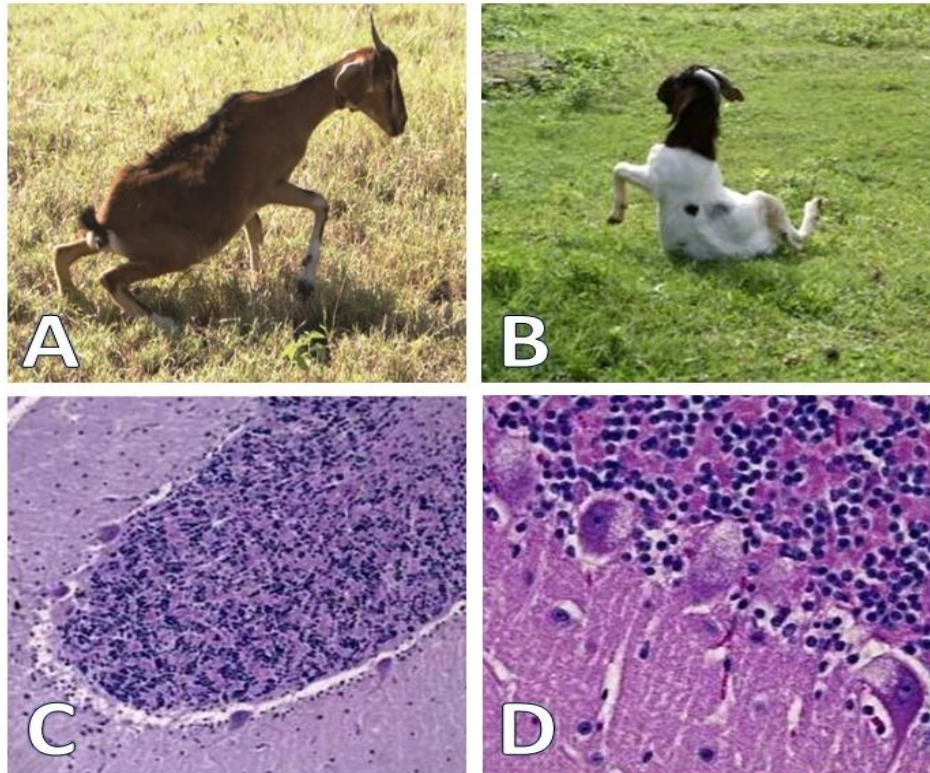


Figura 4. Doença do depósito lisossômico em caprinos. (A) Paraparesia de membros pélvicos. Fonte: (MENDONÇA et al., 2012); (B) Queda por incoordenação motora e debilidade de membros pélvicos. (C) Camada de neurônios de Purkinje reduzida em tamanho e número de células. HE, obj.10x. (D) Células de Purkinje apresentando vacuolização citoplasmática e deslocamento periférico dos núcleos. HE, obj.20x. Fonte: (LIMA et al., 2013).

Atualmente, no Brasil, foram identificados 22 gêneros da família *Convolvulaceae*, dentre os quais *Ipomoea* é o mais representativo, pois contém entre 600 e 700 espécies. (AUSTIN; STAPLES; SIMÃO-BIANCHINI, 2015; FERREIRA; MIOTTO, 2009). No continente americano, foram identificados 339 táxons de *Ipomoea* (AUSTIN & HUÁMAN, 1996), sendo 140 espécies confirmadas no Brasil.

Na região nordeste do Brasil, *Ipomoea* é o principal gênero no grupo de plantas tóxicas que atuam no sistema nervoso (Tabela 2).

Na família *Convolvulaceae*, espécies do gênero *Ipomoea* estão entre as plantas que contêm swainsonina e/ou calisteginas, e sua ingestão tem sido associada a condições neurológicas em ruminantes (GUEDES et al., 2007), sendo a espécie caprina a mais frequentemente afetada (BARBOSA et al., 2006; COLODEL et al., 2002; DANTAS et al., 2007; DE BALOGH et al., 1999; LIMA et al., 2013; MENDONÇA et al., 2011).

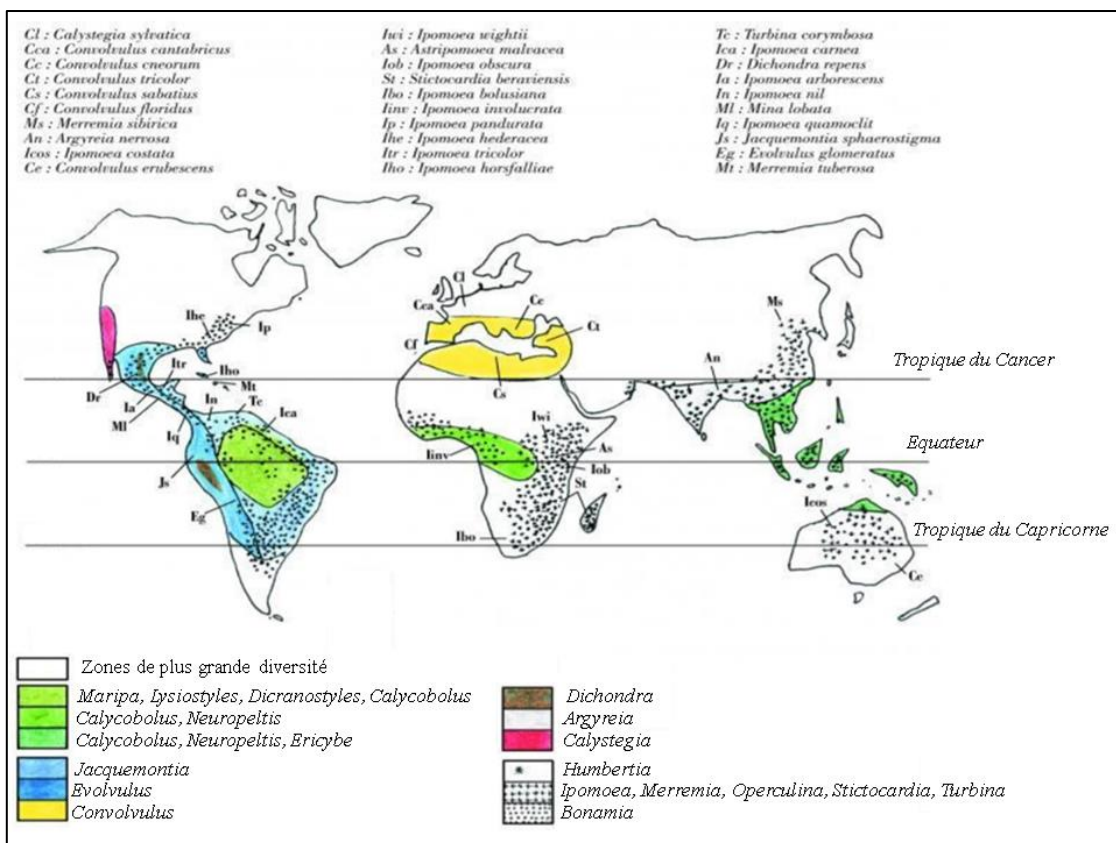


Figura 5. Distribuição geográfica de gêneros e algumas espécies pertencentes à família *Convolvulaceae*.
 Fonte: Yadav; Hemke; Umekar (2018).

2.5 Princípios tóxicos

A swainsonina e as 15 calisteginas descritas até o momento fazem parte dos alcalóides. Estes, são substâncias alcalinas reativas (daí o nome), com um ou mais átomos de carbono, geralmente de estrutura cíclica (Figura 6). Eles possuem atividades farmacológicas notáveis e outras aplicações muito diversas, que podem variar desde a analgesia temporária das papilas gustativas como é o caso da piperina presente em *Piper nigrum* até uma analgesia muito mais forte como a provocada pela morfina, e que pode ser encontrada em *Papaver somniferum*.

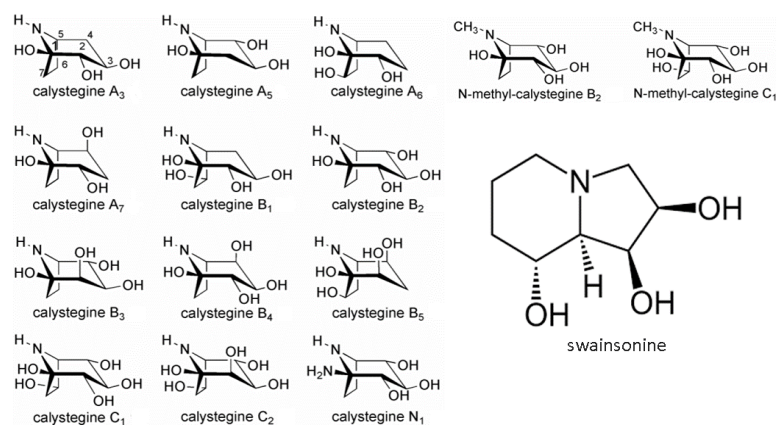


Figura 6. Representação estrutural das calisteginas e da swainsonina.
 Fonte: Dräger (2004).

Tabela 5. Espécies de plantas tóxicas para animais de produção no Nordeste distribuídas de acordo com o efeito tóxico que estas provocam nos diferentes sistemas do organismo animal

Efeito tóxico	Espécies (nomes populares)
Morte súbita	<i>Palicourea marcgravii</i> St. Hill (erva de rato); <i>Palicourea aeneofusca</i> (Müll.Arg.) Standl; <i>Mascagnia rigida</i> (A.Juss.) Griseb. (tinguí); <i>Mascagnia elegans</i>
Problemas gastro-intestinais	<i>Enterolofium contortisiliquum</i> (tambor, orelha de macaco, timbaúba); <i>Stryphnodendron coriaceum</i> (barbatimão do Nordeste); <i>Ricinus communis</i> (mamona, carrapateira); <i>Plumbago scandens</i> (louco); <i>Centratherum brachylepis</i> (perpétua)
Hepatotoxicidade	<i>Crotalaria retusa</i> (feijão de guizo, chocalho de cobra, gergelim bravo); <i>Tephrosia cinerea</i> (anil, falso anil); <i>Cestrum laevigatum</i> ; <i>Copernicia prunifera</i> (carnaúba)
Nefrotoxicidade	<i>Thiloa glaucocarpa</i> (sipaúba, vaqueta)
Afetam o sistema nervoso central	<i>Ipomea carnea</i> susp <i>fistulosa</i> (algodão bravo, canudo, mata bode ou “tue bouc” en traduction libre), <i>Ipomea asarifolia</i> (salsa), <i>Ipomoea riedelii</i> (anicão), <i>Ipomoea sericophylla</i> (jetirana), <i>Marsdenia spp</i> (mata calado), <i>Ricinus communis</i> (mamona, carrapateira), <i>Prosopis juliflora</i> (algaroba), <i>Anacardium spp</i> (caju)
Fotossensibilizantes	<i>Floehlichia ulbotiana</i> (ervanço), <i>Lantana spp</i> (chumbinho), <i>Brachiaria spp</i> (braquiária)
Radiomiméticas	<i>Pteridium aquilinum</i> (samambaia do campo)
Anemia hemolítica	<i>Brachiaria radicans</i> (tannergrass), <i>Ditaxis desertorum</i> , <i>Indigofera suffruticosa</i> (anil)
Cianogênicas	<i>Manihot esculenta</i> (mandioca, macaxeira), <i>Manihot spp</i> (maniçobas), <i>Piptadenia marcrocarpa</i> (angico), <i>Piptadenia viriflora</i> (angico), <i>Sorgum vulgare</i> (sorgo)
Acúmulo de nitrato e nitrito	<i>Echinochloa polystachya</i> (capim mandante), <i>Pennisetum purpureum</i> (capim elefante)
Induzem problemas reprodutivos	<i>Aspidosperma pyrifolium</i> (pereiro), <i>Mimosa tenuiflora</i> (jurema preta)
Afetam pele e anexos	<i>Leucaena leucocephala</i> (leucena)
Plantas pneumotóxicas	<i>Ipomoea batatas</i> + <i>Fusarium solani</i> (batata doce mofada)

Fonte: Barbosa et al. (2007).

A swainsonina (1,2,8-tri-hidroxi-octo-hidroindolizidina) é o principal alcaloide encontrado em espécies vegetais responsáveis pela doença de armazenamento lisossômico, acredita-se que ela provoque perda de função e morte celular por inibição de enzimas lisossômicas. Esta molécula atua como um potente inibidor da α -manosidase lisossômica e da α -manosidase II do complexo de Golgi. Ela é sintetizada por fungos endofíticos (COOK et al., 2013; GRUM et al., 2013), o que explica a variação da concentração entre as espécies vegetais. Os fungos endófitos não causam sintomas nos hospedeiros vegetais (Tabela 6). Eles desenvolvem uma relação simbiótica com a planta, esta última fornece nutrientes e os fungos contribuem para sua resistência a agressores, como nematóides, insetos e animais herbívoros em geral, bem como ao crescimento de plantas através produção de fitohormônio (KAUL et al., 2012).

Tabela 6. Concentração de swainsonina em diferentes espécies de plantas tóxicas para animais de produção

Espécie vegetal	Concentração swainsonina	Autores
<i>Ipomoea riedelii</i>	0,01%	(BARBOSA et al., 2006)
<i>I. sericophylla</i>	0,05%	(BARBOSA et al., 2006)
<i>S. carpinifolia</i>	0,006%	(COLODEL et al., 2002)
<i>I. carnea</i> subsp. <i>fistulosa</i>	0,0029%	(HARAGUCHI, 2003)
<i>I. sericosepala</i>	0,001 à 0,14%	(DANTAS et al., 2007)

A inibição da α -manosidase lisossômica resulta no acúmulo de oligossacarídeos não transformados nos lisossomos e na perda da função celular, seguida pela morte. A inibição da α -manosidase II causa alterações na síntese, processamento e transporte de glicoproteínas, resultando em disfunção da adesão celular a moléculas, hormônios e vários receptores de membrana. A ação conjunta dessas duas inibições é responsável pelas alterações neurológicas observadas. Além dos distúrbios neurológicos, podem ocorrer alterações nas vias metabólicas endócrinas e nos sistemas reprodutivo, imunológico, genético e gastrointestinal. (STEGELMEIER et al., 1995).

As calisteginas são alcaloides nor-tropanicos polihidroxilados, de estrutura similar a dos glicídios, classificadas de acordo com o número de hidroxilas: três grupos hidroxila (A), quatro grupos hidroxila (B) e cinco grupos hidroxila (C)(ASANO et al., 2001), até o momento são 15 descritas (Figura 4).

A concentração do composto varia de acordo com as espécies de plantas onde se encontram, e em qual grupo se enquadram, e diferentemente da swainsonina, eles são

metabólitos secundários produzidos pelas plantas das famílias *Solanaceae* e *Convolvulaceae* (WATSON et al., 2001), podendo a mesma espécie vegetal conter diferentes concentrações de diferentes calisteginas (Tabela 7). As mais frequentes são A3, B1, B2 et B3. A calistegina B2 está presente em quase todas as espécies que contém calisteginas.

Tabela 7 – Concentração dos diferentes tipos de calisteginas detectadas em *Ipomoea verbascoidea*

Espécie vegetal	Calystegynas		
	B1	B2	C1
<i>Ipomoea verbascoidea</i>	0,017%	0,05%	0,34%

Fonte: Mendonça et al. (2012).

Elas possuem uma atividade inibitória sobre as enzimas β -glicosidase, α e β -galactosidase e β -xylosidase, por possuem uma estrutura semelhante à dos carboidratos (ASANO et al., 1997).

A capacidade de inibir glicosidases e manosidases torna a swainsonina e a calistegina uma ferramenta importante para o estudo de agentes anticancerígenos, antiproliferativos e antimetastáticos (NEMR, 2001). Segundo Watson (2001), em baixas concentrações essas moléculas seriam capazes de inibir o desenvolvimento de células cancerígenas, sem provocar efeito tóxico.

Quanto ao papel da swainsonina e das calisteginas no desenvolvimento da intoxicação, há divergências entre os resultados encontrados. De fato, quadros de intoxicação semelhantes vêm sendo provocados por diferentes espécies de *Ipomoea*, nas quais a presença/ausência e também as concentrações de swainsonina e calisteginas variam muito.

Para alguns as calisteginas seriam capazes de exacerbar a ação da swainsonina, devido a inibição competitiva das glicosidases (DRÄGER, 2004).

Hueza et al. (2007), após experimento com ratos inoculados com os princípios isolados de *Ipomoea carnea*, observou que apenas aqueles tratados com swainsonina desenvolveram vacuolização celular, enquanto a calistegina não produziu efeito tóxico. Em um estudo ainda mais recente, foi demonstrado que espécies de *Ipomoea* contendo apenas calisteginas foram capazes de provocar sinais neurológicos nos animais (SALINAS et al., 2019).

Dessa forma, sabe-se que as calisteginas são inibidores da glicosidase, mas a sua capacidade de gerar sinais clínicos na intoxicação por plantas permanece pouca esclarecida, tornando pertinente a adição de metodologia capaz de responder a esse questionamento.

2.6 Metabonômica

Para o estudo desta intoxicação, propõe-se a utilização de uma metodologia complementar aos estudos toxicológicos clássicos já realizados sobre esse grupo de plantas até o momento, que incluem avaliação clínica, histopatológica, exames bioquímicos clássicos, entre outras análises), a metabonômica.

A metabonômica faz partes das ciências ditas ômicas. Trata-se das abordagens que tem como objetivo por objetivo estudar o funcionamento e modificações dos organismos e sistemas biológicos em respostas ou não a certas perturbações endógenas e/ou exógenas. A genômica estuda as respostas dos genes, a transcriptômica se ocupa da resposta dos transcritos, a proteômica estuda a resposta do organismo a partir da avaliação das proteínas, e a metabonômica por sua vez, estuda o metaboloma, ou mais precisamente, realiza uma análise quantitativa das discretas variações nas concentrações de metabólitos, que são o produto intermediário ou final das reações químicas em um sistema biológico.

Os termos metabonômica e metabolômica muitas vezes são utilizados como sinônimos, embora existam definições diferentes para cada um deles, e também existem diferenças de autor para autor. Uma primeira diferenciação seria: Metabolômica se refere ao estudo do metabolismo em escala celular, e a metabonômica envolveria uma escala maior, incluindo as vias metabólicas de um órgão e até de um organismo em sua totalidade. Outra definição, proposta por Nicholson et al. (1999) é a de que a metabonômica consiste na mensuração quantitativa da resposta metabólica de um sistema biológico após exposição a estímulos fisiopatológicos ou a modificações genéticas, enquanto a metabolômica seria a análise completa e quantitativa do metaboloma de um sistema biológico, tendo este termo sido introduzido por Oliver Fiehn (2001).

As ciências ômicas podem ser utilizadas para responder uma ou várias perguntas relativas a um problema biológico. As etapas de delimitação de um perímetro do estudo, a escolha do sistema utilizado e os fatores de variação a serem estudados, e até a escolha do protocolo são fundamentais para uma análise estatística adequada, e conseqüentemente uma boa interpretação dos dados a fim de responder ao questionamento inicial.

No estabelecimento do protocolo, a escolha do tipo das amostras a serem coletadas (fluidos biológicos, tecidos ou células) e o número de amostras por grupo devem ser coletados a montante e determinarão a natureza das ferramentas estatísticas a serem usadas.

Além disso, o processamento de dados brutos dependerá da questão biológica inicial e, em particular, da escolha da análise direcionada (*Targeted*) ou não (*Untargeted*), também

chamada de abordagem global (Figura 7). Uma análise direcionada é definida como a análise quantitativa de um ou mais metabólitos pré-selecionados de uma determinada classe química ou associada a vias metabólicas específicas, enquanto uma análise não direcionada se baseia na análise qualitativa do maior número possível de metabólitos, pertencentes a várias classes químicas, contidos no sistema biológico estudado.

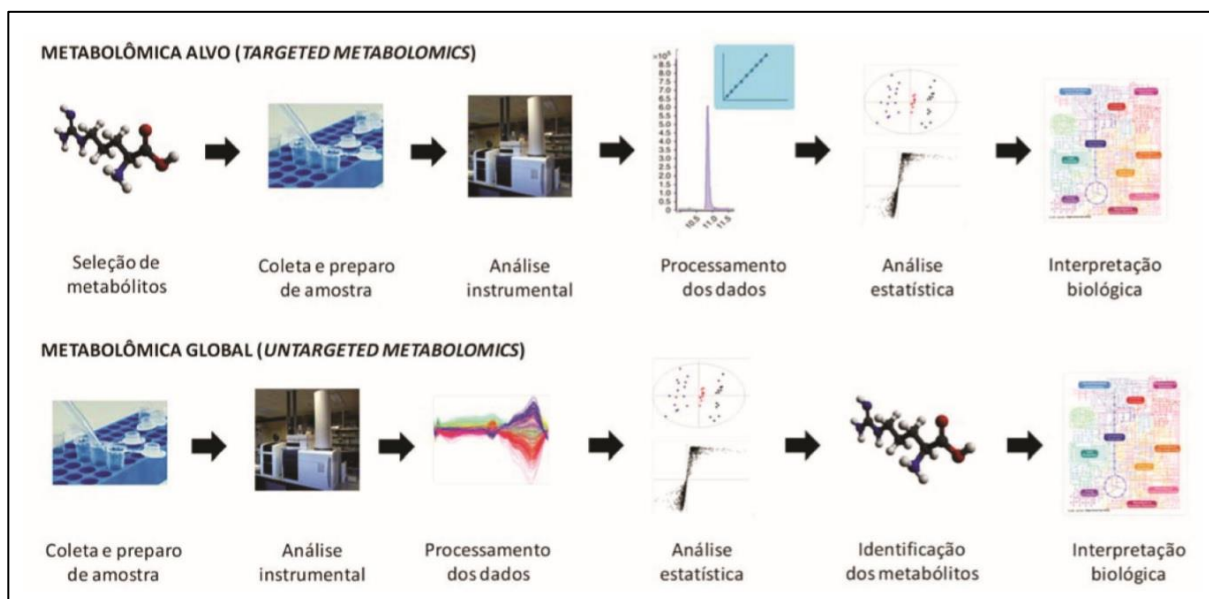


Figura 7. Fluxograma resumido das etapas que envolvem a metabonomica alvo e global.
Fonte: Canuto et al. (2017).

Deve-se notar que essas abordagens sempre se referem a medições comparativas entre grupos de amostras. Ou seja, as interpretações são sempre realizadas pela comparação do metaboloma de um grupo sujeito a alterações ambientais ou genéticas, um alimento, um tratamento terapêutico, etc. (grupo teste), com um grupo de indivíduos inalterados (grupo controle).

A partir deste ponto abordaremos apenas os pontos que dizem respeito a metabonomica global (não direcionada), pois trata-se da técnica proposta para este estudo. O fato de estudarmos o metabolismo de um organismo na sua totalidade nos traz inúmeras vantagens, dentre elas a possibilidade de obter mais informação do que nas abordagens direcionadas, que costumam responder apenas sim ou não à perguntas específicas, enquanto a análise global permite observar certas alterações metabólicas até então desconhecidas, ou tão sutis que não são capazes de serem identificadas por outras formas de análise.

2.6.1 Técnicas utilizadas para a geração de dados

Existem diferentes ferramentas permitem a obtenção de dados de em metabonômica, entre eles os mais usados são a espectroscopia de massa e a espectroscopia por RMN (Ressonância Magnética Nuclear).

A RMN é uma técnica robusta e completa, que demanda pouca ou nenhuma preparação das amostras, permitindo que elas sejam analisadas de forma intacta, ou seja, sem ou com alterações pouco significativas provocadas por diluentes ou fixadores. A quantidade de amostra necessária também é um facilitador, pois são necessários apenas 200µl aproximadamente, da amostra fluida a ser analisada, e não há destruição desta alíquota após o procedimento.

A técnica se baseia no fato de que todo átomo possui um núcleo com uma carga elétrica e uma massa, e aqueles cujo número atômico ou número de massa é ímpar, como 1H, 13C, 15N, 31P, têm uma propriedade chamada *spin*. Essa característica faz com que, na presença de um campo magnético, os átomos realizem um movimento chamado “movimento precessional” que é similar ao de um peão em torno de um eixo (Figura 8).

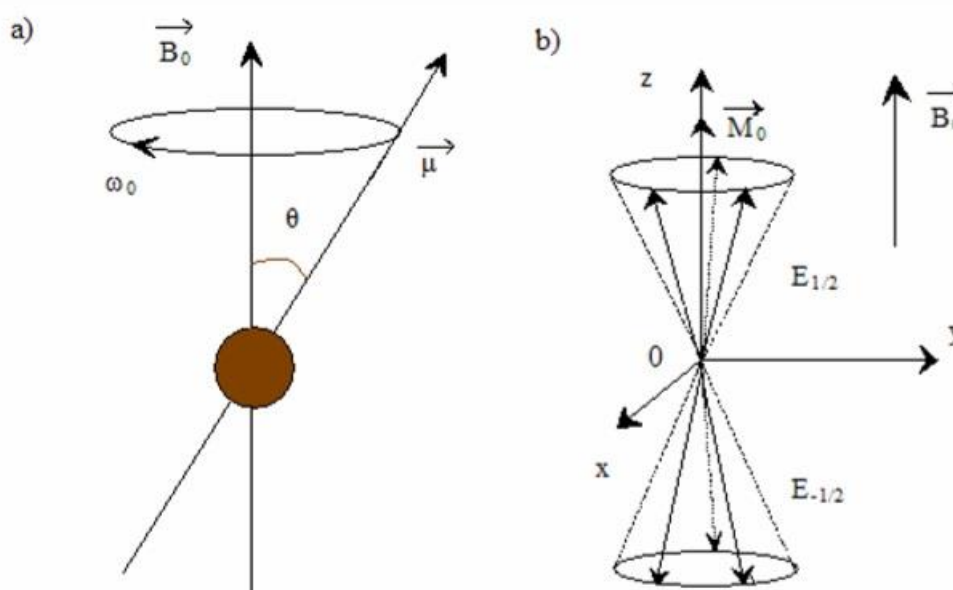


Figura 8. Esquema demonstrando como um campo magnético uniforme B_0 atua sobre os spins de um núcleo de valor ímpar.

Fonte: (Domange, 2008)

Ressonância é o nome dado a mudança que ocorre no spin após a aplicação de um campo eletromagnético. Ela pode ser medida, pela absorção ou emissão de um fóton, esse valor é chamado de frequência de Larmor.

O campo magnético B_0 é produzido por um ímã que deve ser homogêneo e estável ao longo do tempo para obter resultados reproduzíveis. O ímã supercondutor é atualmente o tipo

mais comum de ímã. Ao redor deste ímã, existem 3 bobinas X, Y e Z, cuja função é variar o campo magnético ao longo de eixos específicos, principalmente para selecionar planos de corte.

A introdução de um organismo ou amostra no ímã pode variar a homogeneidade do campo. Corretores ou "calços", placas ferromagnéticas ou bobinas supercondutoras permitem ajustar, mais ou menos pela primeira vez, mais finamente pelos segundos, a homogeneidade do campo. E as antenas são dispositivos de bobina localizados na periferia ao redor do organismo ou amostra a ser analisada. Eles possibilitam produzir ou captar um sinal de radiofrequência e podem responder à frequência de precessão dos prótons, ou seja, sua mudança de direção ao redor do eixo.

Quando utilizamos técnicas de alta definição, como a RMN por exemplo, para analisar uma amostra biológica, milhares de sinais são gerados correspondendo também às moléculas endógenas daquele organismo estudado. Ao conjunto de sinais gerados dá-se o nome de espectro. Para extrair do espectro as informações pertinentes ao que se está investigando, ou seja, a resposta do indivíduo frente ao estímulo (genético, ambiental, alimentação, doença) faz-se necessária a utilização de ferramentas de modelização matemática.

Essa complexidade, associada à presença de variações biológicas intrínsecas entre indivíduos e amostras, torna, portanto, necessário o uso de métodos estatísticos concomitantes, permitindo a redução de dados e a representação desses dados, facilitando o acesso a informações bioquímicas ali presentes. Isso é particularmente necessário em situações em que a matriz de dados é construída em um número maior de variáveis que as amostras. Após a remoção dos sinais redundantes, a análise dos dados iniciais permite representar as amostras de acordo com sua composição bioquímica. Amostras de indivíduos com o mesmo estado fisiopatológico são geralmente similares em sua composição. Graças a ferramentas estatísticas multivariadas, como Análise de Componentes Principais (PCA) ou Análise de Fatores Discriminantes (DFA), podemos comparar esses ajustes de perfis metabólicos entre indivíduos controle e tratados e, assim, definir um fenótipo metabólico. ou "perfil metabólico". Esses métodos permitem reduzir o tamanho de bancos de dados complexos por meio de procedimentos de mapeamento bidimensional ou tridimensional, facilitando a visualização da estrutura intrínseca da matriz. O objetivo é identificar os metabólitos mais correlacionados com o aparecimento de uma doença ou processo tóxico.

2.7 Conclusão

Apesar da grande importância econômica das intoxicações por plantas que contêm swainsonina e/ou calisteginas para produtores de todo o mundo, poucos estudos foram desenvolvidos para entender melhor os mecanismos que envolvem o desenvolvimento da doença. No caso da doença de armazenamento lisossômico, a principal questão não respondida é qual o papel das calisteginas e sua interação com a swainsonina na patogênese da doença?

Experimentos em animais têm a vantagem de reduzir consideravelmente a influência de fatores externos, controlando certas variáveis que podem interferir, atenuando, intensificando ou modificando o efeito dos ingredientes ativos. Além disso, a partir das dosagens e / ou do isolamento de cada princípio em cada espécie de planta, é possível acompanhar as etapas da intoxicação, testar os efeitos de cada princípio separadamente e o resultado da interação desses princípios.

Com base nisso, é possível combinar técnicas toxicológicas tradicionais com abordagens mais sofisticadas, como a metabonômica. Através da identificação das vias metabólicas afetadas, é possível identificar os marcadores de suscetibilidade e resistência, estabelecer o papel de cada ingrediente ativo, explorando os efeitos deletérios de cada molécula. A partir daí, torna-se possível desenvolver métodos mais eficazes de prevenção, intervenção e tratamento da doença, bem como explorar o potencial farmacoterapêutico dessas espécies vegetais e seus princípios ativos.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A existência do ESO enquanto requisito para a formação no curso de Medicina Veterinária, proporcionou o desenvolvimento de habilidades, o aprendizado de uma metodologia e o estabelecimento de uma importante parceria para futuros projetos de pesquisa entre o Laboratório de Diagnóstico Animal (LDA-UFRPE) e a AgroParisTech, uma grande instituição de ensino e desenvolvimento científico na área das ciências agrárias.

Todo o conhecimento prático e teórico adquirido ao longo do ESO foi de grande valor para o estabelecimento dessa parceria, além da elaboração de relatórios e apresentação aberta exercerem um papel na divulgação científica da metodologia abordada, despertando curiosidade em colegas alunos e também professores, por se tratar de uma técnica ainda pouco utilizada quando comparada aos procedimentos de rotina vistos na Universidade, o que eleva ainda mais as possibilidades de projetos futuros serem desenvolvidos entre pesquisadores da UFRPE e da AgroParisTech.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLORGE, L.; IKOR, O. **La fabuleuse odyssee des plantes : Les botanistes voyageurs, les Jardins des plantes, les Herbiers**. Paris: JC Lattès. 2003.

ARANDA-ANZALDO, A. The post-mitotic state in neurons correlates with a stable nuclear higher-order structure. **Communicative & Integrative Biology**, v. 5, n. 2, p. 134–139, 1 mar. 2012.

ARMIÉN, A. G. et al. Spontaneous and experimental glycoprotein storage disease of goats induced by *Ipomoea carnea* subsp *fistulosa* (Convolvulaceae). **Veterinary Pathology**, v. 44, n. 2, p. 170–184, mar. 2007.

ASSIS, T. S. et al. Intoxicações por plantas diagnosticadas em ruminantes e equinos e estimativa das perdas econômicas na Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 1, p. 13–20, jan. 2010.

AUSTIN, D. F.; STAPLES, G. W.; SIMÃO-BIANCHINI, R. A synopsis of *Ipomoea* (Convolvulaceae) in the Americas: Further corrections, changes, and additions. **Taxon**, v. 64, n. 3, p. 625–633, 25 jun. 2015.

BARBOSA, J. D. et al. Intoxicação natural por *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae) em búfalos na Ilha de Marajó, Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 9, p. 869–871, set. 2012.

BARBOSA, R. C. et al. Intoxication by *Ipomoea sericophylla* and *Ipomoea riedelii* in goats in the state of Paraíba, Northeastern Brazil. **Toxicon**, v. 47, n. 4, p. 371–379, mar. 2006.

BARBOSA, R. R. et al. Plantas tóxicas de interesse pecuário: importância e formas de estudo. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 1, n. 1, p. 1–7, 23 maio 2007.

CANUTO, G. et al. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Química Nova**, 2017.

COLODEL, E. M. et al. Aspectos clínicos e patológicos da intoxicação por *Sida carpinifolia* (Malvaceae) em caprinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, n. 2, p. 51–57, abr. 2002.

COOK, D. et al. Production of the alkaloid swainsonine by a fungal endosymbiont of the Ascomycete Order Chaetothyriales in the host *Ipomoea carnea*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 16, p. 3797–3803, 24 abr. 2013.

DANTAS, A. F. M. et al. Swainsonine-induced lysosomal storage disease in goats caused by the ingestion of *Turbina cordata* in Northeastern Brazil. **Toxicon**, v. 49, n. 1, p. 111–116, jan. 2007.

DE BALOGH, K. K. I. M. et al. A lysosomal storage disease induced by *Ipomoea Carnea* in goats in Mozambique. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, n. 3, p. 266–273, maio 1999.

DOMANGE, C. **Etude des disruptions métaboliques provoquées chez le modèle murin par l'ingestion d'*Hypochoeris radicata* (L.), plante toxique pour l'espèce équine : validation de l'approche métabonomique par des études comportementales et par imagerie cérébrale.** 2008.

DRÄGER, B. Chemistry and biology of calystegines. **Natural Product Reports**, v. 21, n. 2, p. 211–223, 2004.

FERREIRA, P. P. A.; MIOTTO, S. T. S. Flora ilustrada do rio grande do sul - Sinopse das espécies de *Ipomoea* L. (Convolvulaceae) ocorrentes no Rio Grande do Sul, Brasil. v. 7, n. 4, p. 14, 2009.

FRADE, J. M.; OVEJERO-BENITO, M. C. Neuronal cell cycle: the neuron itself and its circumstances. **Cell Cycle**, v. 14, n. 5, p. 712–720, 15 jan. 2015.

FURLAN, F. H. et al. Spontaneous lysosomal storage disease caused by *Sida carpinifolia* (Malvaceae) poisoning in cattle. **Veterinary Pathology**, v. 46, n.2, p. 343-347, 2009.

GRUM, D. S. et al. Production of the alkaloid swainsonine by a fungal endophyte in the host *Swainsona canescens*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 10, p. 1984–1988, 25 out. 2013.

GUEDES, K. M. R. et al. Doenças do sistema nervoso central em caprinos e ovinos no semi-árido. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 1, p. 29–38, jan. 2007.

HARAGUCHI, M. **Plantas tóxicas de interesse na pecuária.** São Paulo, p. 3, 2003.

HUEZA, I. M. et al. Assessment of the perinatal effects of maternal ingestion of *Ipomoea carnea* in rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 58, n. 6, p. 439–446, ago. 2007.

JUDD, W. S. et al. **Plant systematics: A phylogenetic approach**. 3. ed. Sunderland: Sinauer Associates, Inc., 2007.

LIMA, D. D. C. C. et al. Doença de depósito lisossomal induzida pelo consumo de *Ipomoea verbascoidea* (Convolvulaceae) em caprinos no semiárido de Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 7, p. 867–872, jul. 2013.

LIMA, E. F. et al. Sinais clínicos, distribuição das lesões no sistema nervoso e epidemiologia da raiva em herbívoros na região Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 4, p. 250–264, dez. 2005.

LORETTI, A. P. et al. Lysosomal storage disease in *Sida carpinifolia* toxicosis: an induced mannosidosis in horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 35, n. 5, p. 434–438, 5 jan. 2010.

MAZID, N.; KHAN, T.; MOHAMMAD, F. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. **Biology and Medicine**, v. 3, n. 2, p. 232–249, 2011.

MENDONÇA, F. DE S. et al. Spontaneous poisoning of goats by the plant *Ipomoea sericophylla* (Convolvulaceae) in Brazil – a case report. **Acta Veterinaria Brno**, v. 80, n. 2, p. 235–239, 2011.

MENDONÇA, F. S. et al. Alpha-mannosidosis in goats caused by the swainsonine-containing plant *Ipomoea verbascoidea*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, n. 1, p. 90–95, jan. 2012.

MENDONÇA, F. S. et al. Detection of swainsonine and calystegines in Convolvulaceae species from the semiarid region of Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 11, p. 2044–2051, nov. 2018.

OLIVEIRA JÚNIOR, C. A. et al. Sinais clínicos, lesões e alterações produtivas e reprodutivas em caprinos intoxicados por *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa* (Convolvulaceae) que deixaram de ingerir a planta. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 11, p. 953–960, nov. 2011.

OLIVEIRA JÚNIOR, C. A. DE; RIET-CORREA, G.; RIET-CORREA, F. Intoxicação por plantas que contêm swainsonina no Brasil. **Ciência Rural**, v. 43, n. 4, p. 653–661, abr. 2013.

PESSOA, C. R. M.; MEDEIROS, R. M. T.; RIET-CORREA, F. Importância econômica, epidemiologia e controle das intoxicações por plantas no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 6, p. 752–758, jun. 2013.

RIET-CORREA, F. et al. Toxic plants affecting the nervous system of ruminants and horses in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 12, p. 1357–1368, dez. 2017.

SALINAS, L. M. et al. Neurological syndrome in goats associated with *Ipomoea trifida* and *Ipomoea carnea* containing calystegines. **Toxicon**, v. 157, p. 8–11, jan. 2019.

SCHWARZ, A. et al. Effects of *Ipomoea carnea* aqueous fraction intake by dams during pregnancy on the physical and neurobehavioral development of rat offspring. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 25, n. 5, p. 615–626, set. 2003.

SILVEIRA, M. D. M. **Deteção de swainsonina e calisteginas em espécies de convolvulaceae do Semiárido de Pernambuco**. Recife, 2018. 64p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal Tropical), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2018.

STEGELMEIER, B. L. et al. The comparative pathology of the glycosidase inhibitors swainsonine, castanospermine, and calystegines A3, B2, and C1 in mice. **Toxicologic Pathology**, v. 36, n. 5, p. 651–659, jul. 2008.

TOKARNIA, C. H.; DOBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. Poisonous plants affecting livestock in Brazil. **Toxicon**, v. 40, n. 12, p. 1635-1660, 2002.

WENGER, D. A.; COPPOLA, S.; LIU, S.-L. Insights into the diagnosis and treatment of lysosomal storage diseases. **Archives of Neurology**, v. 60, n. 3, p. 322–328, 1 mar. 2003.

WILCOX, W. R. Lysosomal storage disorders: the need for better pediatric recognition and comprehensive care. **The Journal of Pediatrics**, v. 144, n. 5, p. S3–S14, maio 2004.

YADAV, S.; HEMKE, A.; UMEKAR, M. Convolvulaceae: A Morning Glory Plant Review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 51, n. 1, p. 103-117, 2018.