

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES
DE FOLHAS DE *Ipomoea asarifolia* NA RAÇÃO DE CAMUNDONGOS e
ELIMINAÇÃO DA TOXINA TREMORGÊNICA PELO LEITE.**

JOSÉ RADMÁCYO GOMES LOPES

PATOS – PB

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MEDICINA VETERINÁRIA

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES
DE FOLHAS DE *Ipomoea asarifolia* NA RAÇÃO DE CAMUNDONGOS e
ELIMINAÇÃO DA TOXINA TREMORGÊNICA PELO LEITE.**

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária
da Universidade Federal de Campina
Grande como requisito para obtenção do
título de Mestre.

Mestrando: José Radmácyo Gomes Lopes
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosane Maria Trindade de Medeiros

PATOS – PB
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSRT DA UFCG

L864e Lopes, José Radmácyo Gomes
 Efeitos da administração de diferentes concentrações de folhas de
 Ipomoea asarifolia na ração de camundongos e eliminação da toxina
 tremorgênica pelo leite. / José Radmácyo Gomes Lopes. – Patos, 2013.
 45 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal
de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2013.

“Orientação: Profa. Dra. Rosane Maria Trindade de Medeiros”

“Coorientação: Prof. Dr. Franklin Riet-Correa”

Referências.

1. *Ipomoea asarifolia*. 2. Plantas tóxicas. 3. Toxinas no leite. 4. Toxinas
tremorgênicas.

I. Título.

CDU 615.9

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES
DE FOLHAS DE *Ipomoea asarifolia* NA RAÇÃO DE CAMUNDONGOS e
ELIMINAÇÃO DA TOXINA TREMORGÊNICA PELO LEITE.**

Dissertação elaborada por:
JOSÉ RADMÁCYO GOMES LOPES

Aprovada em 29 de agosto de 2013.

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Rosane Maria Trindade de Medeiros
(Depto. de Medicina Veterinária da UFCG/CSTR – Patos/PB)
(ORIENTADORA)

Dr^a. Maria Araújo Teixeira
(Responsável Técnica pelo Biotério Central da UFMS – Campo Grande/MS)
(EXAMINADOR I)

Prof^a. Dr^a. Sara Vilar Dantas Simões
(Depto. de Medicina veterinária da UFCG/CSTR – Patos/PB)
(EXAMINADOR II)

Patos-PB

2013

SUMÁRIO

Lista de tabelas.....	4
Lista de figuras.....	5
Resumo.....	6
Abstract.....	8
Introdução.....	9
Capítulo I.....	10
Resumo.....	11
Abstract.....	11
Introdução.....	12
Material e Métodos.....	13
Resultados.....	16
Discussão.....	17
Conclusão.....	18
Referências.....	19
Capítulo II.....	26
Abstract.....	27
Resumo.....	27
Introdução.....	28
Material e Métodos.....	29
Resultados.....	30
Discussão.....	31
Referências.....	33
Conclusão.....	41
Anexos.....	42

Lista de Tabelas

Capítulo I

Tabela 1	Média dos tempos dos grupos experimentais e controle na trave elevada.....	24
Tabela 2	Média de quedas dos grupos experimentais e controle no rota rod.....	25

Capítulo II

Tabela 1	Effect of the tremorgenic toxin of <i>I. asarifolia</i> on the offspring of mice. Number of pups, latency to the start of the tremors after birth, and recovery after weaning at 21 days.....	39
----------	---	----

Lista de Figuras

Capítulo I

Figura 1	Suspensão em fio, rota rod e trave elevada.....	21
Figura 2	Média e desvios padrões do consumo de água.....	22
Figura 3	Média e desvios padrões dos pesos dos animais.....	23

RESUMO: *Ipomoea asarifolia* é uma planta tremorgênica, cujo princípio ativo ainda não está determinado e os principais sinais clínicos observados na intoxicação por essa planta em ruminantes são tremores de intenção e incoordenação. O objetivo desse trabalho foi comprovar se *I. asarifolia* é tremorgênica para camundongos e o seu efeito sobre o equilíbrio, coordenação motora e força muscular e demonstrar se a toxina tremorgênica era eliminada pelo leite. No primeiro estudo, três grupos de camundongos machos adultos da linhagem Swiss receberam ração contendo 0, 20% e 30% de folhas de *I. asarifolia* por 30 dias. No dia 0 e a cada cinco dias foram mensurados o consumo de ração e água e o peso dos animais, realizando-se também testes na trave elevada, suspensão em fio e rota rod. As alterações no equilíbrio e coordenação motora observadas na trave elevada e no rota rod sugerem que a planta afete o sistema nervoso central. A intoxicação ficou evidente pela diminuição significativa no consumo de água e no peso dos animais e pela mortalidade nos grupos experimentais. Porém tremores musculares não foram observados, o que não justifica a utilização de camundongos machos adultos para estudo do princípio ativo da planta. Para demonstrar se a toxina tremorgênica de *I. asarifolia* era eliminada pelo leite, três grupos de camundongos fêmeas adultas da linhagem Swiss receberam, imediatamente após o parto e até o desmame, ração contendo 0, 20% e 30% de folhas de *I. asarifolia* seca. Todas as proles das fêmeas que receberam *I. asarifolia* apresentaram tremores 2-4 dias após o nascimento. A totalidade dos camundongos da prole das fêmeas que receberam 20% de *I. asarifolia* recuperaram-se 4-7 dias após a desmama e todos os filhotes das fêmeas que receberam 30% da planta na ração morreram antes ou até 2 dias após o desmame ainda apresentando tremores. Conclui-se que o composto tóxico tremorgênico da *I. asarifolia* é eliminado pelo leite e que camundongos lactentes podem ser utilizados para o estudo do princípio ativo da planta.

Palavras-chave: *Ipomoea asarifolia*, plantas tóxicas, toxinas no leite, toxinas tremorgênicas.

ABSTRACT: *Ipomoea asarifolia* is a tremorgenic plant whose active principle is not yet determined and the main clinical signs observed in the poisoning this plant in ruminants are intention tremors and incoordination. The aim of this study was to see if *I. asarifolia* is tremorgenic for mice and its effect on balance, coordination and muscle strength and demonstrate if the tremorgenic toxin is excreted by milk. In the first study, three groups of adult male mice of the Swiss strain received ration containing 0, 20% and 30% of the leaves of *I. asarifolia* for 30 days. On day 0 and every five days were measured feed and water intake and the weight of the animals and performed tests on the elevated bar, wire suspension and rota rod. Changes in balance and motor coordination observed in the elevated bar and the rota rod suggest that the plant affects the central nervous system. The intoxication was evident by the significant reduction in water consumption and weight of the animals and the mortality in experimental groups. However, muscle tremors were not observed, which does not justified the use of adult male mice to study the toxic compound of *I. asarifolia*. To demonstrate whether tremorgenic toxin of the *I. asarifolia* is excreted by milk, three groups of Swiss female mice received, immediately after given birth until weaning, ration containing 0, 20% and 30% of dry *I. asarifolia*. All the offsprings of the females that received *I. asarifolia* showed tremors 2-4 days after birth. The offsprings of the females that received 20% *I. asarifolia* recovered 4-7 days after weaning. The offsprings of the females that received 30% of the plant in the ration died with tremors before weaning or until two days after weaning. It is concluded that the tremorgenic compound of *I. asarifolia* is eliminated by milk and that lactating mice may be used for the determination of the toxic compound of this plant.

Key words: *Ipomoea asarifolia*, toxic plants, toxins in milk, tremorgenic toxins.

Introdução

Ipomoea asarifolia é uma planta tremorgênica que causa intoxicação em ruminantes. Em ovinos a intoxicação tem sido observada em cordeiros que permanecem encerrados, sem ingerir a planta, enquanto as ovelhas ingerem a planta no campo, sem apresentar sinais da doença, o que sugere que o princípio ativo tremorgênico, que até o momento ainda não foi identificado, é eliminado pelo leite.

Esta Dissertação, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande como parte dos requisitos para recebimento do título de Mestre em Medicina Veterinária, é composta por dois capítulos constituídos por dois artigos científicos originais enviados para publicação na revista Ciência Rural, nos quais são descritos estudos toxicológicos realizados com *Ipomoea asarifolia* em camundongos. O primeiro artigo verificou os efeitos da administração de diferentes concentrações de folhas de *I. asarifolia* na ração de camundongos, e o segundo verificou a eliminação da toxina tremorgênica de *I. asarifolia* pelo leite.

CAPÍTULO I

Efeitos da administração de diferentes concentrações de folhas de *Ipomoea asarifolia* na ração de camundongos.

Trabalho aceito para publicação na revista Ciência Rural.

Efeitos da administração de diferentes concentrações de folhas de *Ipomoea asarifolia* na ração de camundongos.

Effects of administration of different concentrations of leaves of *Ipomoea asarifolia* in feed of mice.

José Radmácyo Gomes Lopes¹ Franklin Riet-Correa¹ Marcia Alves de Medeiros¹

Francelicia Pereira Marques Dantas¹ Rosane Maria Trindade Medeiros^{1*}

RESUMO

Considerando que os principais sinais clínicos observados na intoxicação por *Ipomoea asarifolia* em ruminantes são tremores de intenção e incoordenação, o objetivo desse trabalho foi comprovar se *I. asarifolia* é tremorgênica para camundongos e o seu efeito sobre o equilíbrio, coordenação motora e força muscular. Três grupos de camundongos machos adultos da linhagem Swiss receberam ração contendo 0, 20% e 30% de folhas de *I. asarifolia* por 30 dias. No dia 0 e a cada cinco dias foram mensurados o consumo de ração e água e o peso dos animais, realizando-se também testes na trave elevada, suspensão em fio e rota rod. Foram observadas alterações no equilíbrio e na coordenação motora na trave elevada e no rota rod, o que sugere que a planta afete o sistema nervoso central; porém não ocorreram tremores musculares, pelo que não se justifica a utilização de camundongos machos adultos para estudo do princípio ativo da planta.

Palavras-chave: *Ipomoea asarifolia*, plantas tóxicas, equilíbrio, coordenação motora.

ABSTRACT

The main clinical signs observed in the poisoning in ruminants the *Ipomoea asarifolia* are intention tremors and incoordination. The aim of this study was to determine

if *I. asarifolia* is tremorgenic for mice and its effect on equilibrium, coordination and muscle strength. Three groups Swiss male mice received ration containing 0, 20% and 30% of dry *I. asarifolia* for 30 days. On day 0 and every five days feed and water intake and the weight of the animals were measured. At the same time the animals were tested equilibrium, coordination and muscle strength on the elevated bar, wire suspension and rota-rod. Changes in balance and motor coordination were observed in the elevated bar and the rota-rod, suggesting that the plant affects the central nervous system. However, muscle tremors were not observed, suggesting that the use of adult mice is not appropriate for the study of the toxic compound of *I. asarifolia*.

Key words: *Ipomoea asarifolia*, toxic plants, equilibrium, motor coordination.

INTRODUÇÃO

Ipomoea asarifolia é uma planta que causa uma síndrome tremorgênica em ovinos (DÖBEREINER et al., 1960; GUEDES et al., 2007), caprinos (DÖBEREINER et al., 1960; MEDEIROS et al., 2003; GUEDES et al., 2007; ARAÚJO et al., 2008), bovinos (DÖBEREINER et al., 1960; BARBOSA et al., 2005) e bubalinos (BARBOSA et al., 2005). A intoxicação, observada nas regiões Nordeste (MEDEIROS et al., 2003) e Norte (BARBOSA et al., 2005), caracteriza-se por tremores principalmente de cabeça e pescoço. Os tremores inicialmente são finos e discretos, com balançar de cabeça, que podem ser exacerbados quando os animais são movimentados ou assustados. Mais tarde os animais desenvolvem ataxia cerebelar com tremores severos, andar incoordenado com membros rígidos, hipermetria, balançando quando está em pé e com os membros abertos. Muitos casos não têm lesões histológicas, mas alguns com manifestações clínicas prolongadas apresentam degeneração e perda das células de Purkinje e presença de esferoides axonais na camada granular do cerebelo (GUEDES et al., 2007). Quando os animais são removidos

das pastagens, a regressão completa dos sinais clínicos ocorre em 7 – 15 dias. Até o momento ainda não se identificou o princípio tóxico da *I. asarifolia*, porém há algumas hipóteses sobre a natureza do princípio tóxico da salsa mas nenhuma confirmada. SANTOS (2001), utilizando camundongos como modelo animal, sugere que a toxina da salsa seja uma lectina de natureza glicoproteica que chamou de lectina tóxica da salsa; no entanto, os sinais observados com a administração endovenosa dessa lectina foram dispnéia, convulsões tônico-clônicas e paralisia flácida, seguida de morte, quadro que não tem relação com os sinais neurológicos observados em ruminantes. MEDEIROS et al. (2003) sugerem que o princípio tóxico da *I. asarifolia* seja uma micotoxina ou fitotoxina tremorgênica. Para o estudo da identificação do princípio tóxico da *I. asarifolia* bem como, o seu mecanismo de ação, se faz necessário ter um modelo animal, que responda satisfatoriamente à intoxicação pela planta, reproduzindo os sinais observados nos ruminantes. Em um experimento piloto de nosso grupo de pesquisa foi observado que camundongos que receberam ração contendo 20% e 30% de *I. asarifolia* apresentaram tremores discretos generalizados (DANTAS 2011, dados não publicados). Considerando que o principal sinal clínico observado nos ruminantes intoxicados por salsa é o tremor de intenção e a incoordenação, o objetivo deste trabalho foi comprovar se *I. asarifolia* é tremorgênica para camundongos. Além disso, foram estudados os efeitos da *I. asarifolia* sobre o equilíbrio, coordenação motora e a força muscular de camundongos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 21 camundongos (*Mus musculus*), machos de linhagem Swiss, com idade de 40 dias, divididos em 3 grupos homogêneos sendo 2 grupos experimentais e 1 controle. Os animais eram oriundos de cruzamentos sucessivos no Centro de Criação e Experimentação em Animais de Laboratório (CCEAL-Biotério) do Curso de Medicina

Veterinária do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos, PB. Os animais foram alojados, por grupo, em gaiolas de plástico fosco, com tampas metálicas, medindo 30x20x13cm, mantidas em salas com temperatura ambiente (22-25 °C) controlada por meio de aparelho de ar condicionado, em ciclo de luz natural. A identificação dos animais foi realizada com marcas na cauda, feitas com caneta hidrofóbica (Pilot®), renovadas semanalmente.

A ração oferecida aos animais foi preparada com folhas de *I. asarifolia* coletadas nos arredores do Hospital Veterinário da UFCG, secadas à sombra por aproximadamente 10 dias, moídas e posteriormente misturadas com ração comercial para camundongos (PRESENCE®), que também foi moída, nas proporções de 20% (Grupo 2) e 30% (Grupo 3). Essa mistura foi homogeneizada manualmente, acrescentando-se 200mL de água e 10% de amido de milho para se obter a consistência adequada, sendo em seguida peletizada artesanalmente com o uso de seringas descartáveis de 20mL. Após a fabricação, os pellets foram secados à sombra, em temperatura ambiente. Os animais do Grupo 1, controle, receberam ração comercial.

O consumo de ração e de água e o ganho de peso dos animais dos grupos experimentais e controle foram avaliados no primeiro dia de experimento, antes do início da ingestão da planta, e a cada cinco dias até o 30º dia do experimento. Nesse mesmo período, os animais foram submetidos aos testes de trave elevada, suspensão em fio e rota rod.

O teste de suspensão em fio permite detectar anormalidades neuromusculares mediante a capacidade do animal sustentar seu próprio corpo no fio, o que requer força muscular. O aparelho utilizado consistia em um fio de cobre de 2mm de diâmetro, suspenso horizontalmente entre duas barras de madeira com 40cm de altura, dispostas perpendicularmente ao chão e a 80cm de distância uma da outra. Na base do equipamento

foi colocada uma caixa plástica contendo maravalha, com o intuito de amortecer o impacto do animal no momento da queda (Figura 1A). Para o teste, o animal era conduzido pelo avaliador até o fio, para que pudesse colocar as patas dianteiras no mesmo. Media-se o tempo total que o animal permanecia no fio. O cronômetro era parado imediatamente após a queda do animal e o tempo de permanência registrado.

O rota rod é utilizado nos testes para avaliar coordenação motora e equilíbrio. É um dos testes mais utilizados para medir função motora nos roedores por ser considerado um dos mais sensíveis para isto. Foi utilizado um aparelho Rota Rod automatizado (EFF 411, Insight®), que consistia em uma caixa de acrílico com um cilindro de 8cm de diâmetro instalado transversalmente a aproximadamente 20cm do piso do equipamento, mantido em rotação através de um motor. A caixa era dividida em 4 baias, de aproximadamente 10cm de largura, permitindo a análise de quatro animais simultaneamente (Figura 1B). Para o teste, cada animal era colocado sobre o cilindro já em movimento (velocidade inicial de aproximadamente 10 rotações por minuto), e media-se o tempo que o mesmo conseguia se equilibrar até cair. Na queda, o cronômetro que verificava o tempo de equilíbrio era automaticamente parado, já que o equipamento possui um sistema instalado no piso de cada baia que detecta o impacto da queda; os animais eram reconduzidos a respectiva baia e o cronômetro reativado, contabilizando o total de quedas ao final de seis minutos (velocidade final de 25 rotações por minuto). Foi realizado treinamento prévio dos animais nos dois dias que antecederam o início do experimento. Para isso, cada animal foi colocado para caminhar sobre o cilindro giratório, em rotação mínima, por 2 minutos.

A trave elevada é um equipamento utilizado para avaliar o equilíbrio corporal. Foi usado uma trave elevada adaptada para camundongos, que era constituído por uma trave de madeira (1cm de largura e espessura, por 2m de comprimento) apoiada em duas plataformas (10cm x 10cm, cada) uma em cada extremidade, com 20cm de altura (Figura

1C). Para o teste, o animal era colocado no centro da trave elevada, cronometrando-se o tempo transcorrido até que chegasse a uma das extremidades do equipamento. Dois dias consecutivos antes do início do experimento, foi realizado um treinamento com os animais no aparelho, onde eram colocados para andar livremente sobre a trave elevada, por 5 minutos.

Os resultados obtidos após o estudo das variáveis foram submetidos à análise estatística pelo Teste ANOVA (variáveis com distribuição normal) ou Kruskal-Wallis (variáveis com distribuição não normal), utilizando-se o programa estatístico BioEstat 5.0, adotando-se 95% de intervalo de confiança.

RESULTADOS

A comparação estatística do consumo de ração entre os grupos experimentais e controle revelou não haver diferença significativa na ingestão de ração. O consumo de água entre os grupos experimentais e controle (Figura 2) apresentou diminuição significativa ($p < 0,05$) nos dois grupos experimentais quando comparado com o grupo controle. O peso foi significativamente menor ($p < 0,05$) nos animais dos grupos experimentais comparando-se com aqueles do grupo controle, a partir do 10º dia de experimento (Figura 3).

Foi observada mortalidade apenas nos grupos experimentais. No grupo 2 um animal morreu no 23º dia do experimento (14,28%) e no grupo 3 dois animais morreram sendo um no 18º dia e outro no 24º dia do experimento (28,57%).

No teste da trave elevada, dois animais do grupo 3 já apresentavam alterações de equilíbrio no primeiro teste realizado após o início do consumo de ração contendo *I. asarifolia* (5º dia experimental), caracterizadas pelo andar mais aderido à trave e pelo aumento do tempo na realização do percurso na mesma. Com o transcorrer das realizações dos testes, essas alterações aumentaram de intensidade e no número de animais afetados,

sendo que, ao final dos 30 dias, todos os animais apresentavam essas alterações de forma intensa. Já no grupo 2, as alterações de equilíbrio citadas anteriormente só foram observadas no segundo teste após o início do consumo de ração contendo *I. asarifolia* (10º dia experimental), também em dois animais, porém de forma mais branda. No 30º dia experimental, metade dos animais sobreviventes (3 animais) do grupo 2 apresentavam essas alterações, porém de forma menos acentuada que o grupo 3. As médias de tempo, em que os animais levaram para chegar do meio da trave até a base da mesma e a análise estatística apresentam-se na Tabela 1.

No teste de suspensão em fio não se verificou diferença significativa na força muscular entre os grupos controle e experimentais. No teste do rota rod observou-se aumento significativo ($p < 0,05$) no número de quedas nos animais do grupo 3 em relação ao grupo controle (Tabela 2).

DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que as rações contendo 20% e 30% de folhas de *I. asarifolia* foram tóxicas para camundongos adultos, uma vez que foram observadas alterações do equilíbrio e coordenação motora no rota rod e na trave elevada, o que sugere que a planta afeta o sistema nervoso central. No entanto, não foram identificadas alterações na força muscular, o que é evidenciado pelos resultados semelhantes observados entre os grupos no teste da suspensão em fio. Além disso, a toxicidade da planta ficou evidenciada pela diminuição significativa no consumo de água e no peso e pela mortalidade nos grupos experimentais. Por outro lado, não foram observados tremores musculares, que é o principal sinal clínico dos ruminantes intoxicados pela planta. Estes resultados foram diferentes dos obtidos em um experimento piloto de nosso grupo de pesquisa, no qual quatro camundongos alimentados com 20% e 30% de *I. asarifolia* na ração apresentaram

tremores discretos a partir do terceiro dia de administração (DANTAS 2011, dados não publicados).

Esses resultados, no seu conjunto mostram que apesar de que camundongos são susceptíveis a intoxicação por *I. asarifolia*, o aparecimento de tremores é inconstante, pelo que não se justifica a utilização deste modelo para estudos do princípio ativo da planta. No entanto outros protocolos poderão ser testados em camundongos ou em outras espécies, como por exemplo, a utilização de extratos administrados por vias digestiva ou intraperitoneal. A inoculação de penitren A, substância tremorgênica presente em *Lolium perene*, causa tremores em ratos quando inoculado pela via intraperitoneal (CAVANAGH et al., 1998; LU et al., 2008).

CONCLUSÃO

Conclui-se que *Ipomoea asarifolia* é tóxica para camundongos adultos causando alterações motoras e do equilíbrio; porém não causa tremores consistentemente, pelo que não se recomenda este modelo para o estudo do princípio ativo da planta.

COMITÊ DE ÉTICA

Este estudo foi realizado de acordo com os princípios éticos na experimentação animal e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFCG, protocolo CEP n.69-2013.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) Para o Controle das Intoxicações por Plantas, Processo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) 573534/2008-0.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, J.A.S. et al. Intoxicação experimental por *Ipomoea asarifolia* (**Convolvulaceae**) em caprinos e ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.28, n.10, p.488-494, 2008. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2008001000008 >

Acesso em: 24 jul. 2013. doi: 10.1590/S0100-736X2008001000008

BARBOSA, J.D. et al. Intoxicação experimental e natural por *Ipomoea asarifolia* (**Convolvulaceae**) em búfalos e outros ruminantes. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.25, n.4, p.231-234, 2005. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2005000400008&script=sci_arttext > Acesso em: 20 jul. 2013. doi: 10.1590/S0100-736X2005000400008

CAVANAGH, J.B. et al. The Effects of the Tremorgenic Mycotoxin Penitrem A on the Rat Cerebellum. **Veterinary Pathology**. v.35, p.53-63, 1998. doi: 10.1177/030098589803500105

DÖBEREINER, J. et al.. Intoxicação experimental pela “salsa” (*Ipomoea asarifolia* R. et Schult.) em ruminantes. **Arquivos do Instituto Biológico Animal**. v.3, p.39-57, 1960.

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.29-30, 2007. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2007000100006 >

Acesso em: 21 jul. 2013. doi: 10.1590/S0100-736X2007000100006

LU, H. et al. Toxin-produced Purkinje cell death: A model for neural stem cell transplantation studies. **Brain Research**. v.1207, p.207–213, 2008. doi: 10.1016/j.brainres.2008.02.034

MEDEIROS, R.M.T. et al. Tremorgenic syndrome in goats caused by, *Ipomoea asarifolia* in northeastern Brazil. **Toxicon**. v.41, p.933-935, 2003. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010103000448> > Acesso em: 28 jul. 2013. doi: 10.1016/S0041-0101(03)00044-8

SANTOS, L. F. L. **Toxina da salsa (*Ipomoea asarifolia* R. et Schult.): aspectos bioquímicos, estruturais, funcionais e potencial biotecnológico**. 2001. 142f. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Ceará.



Figura 1 - A: suspensão em fio; B: rota rod; C: trave elevada.

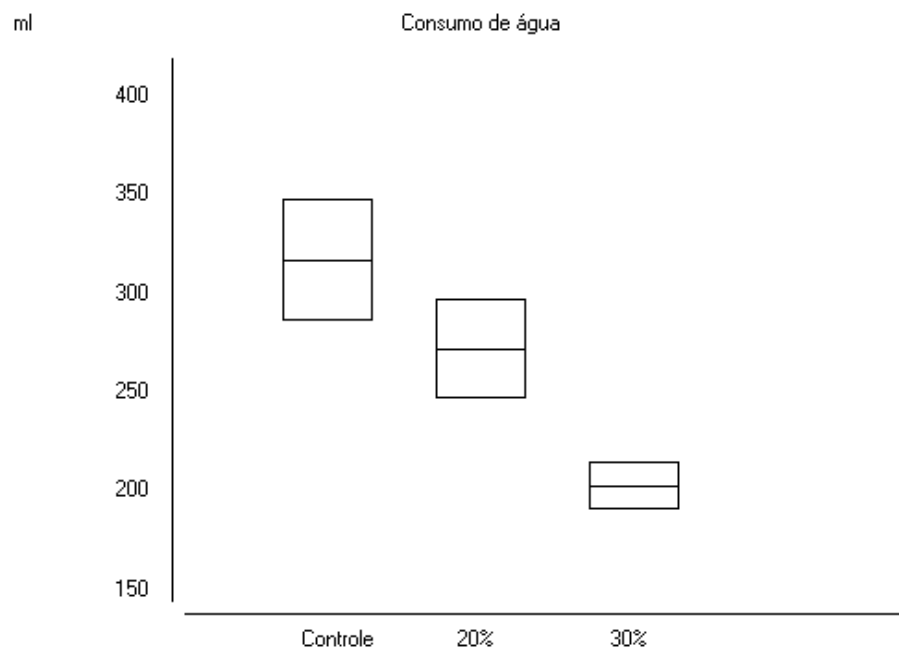


Figura 2- Médias e desvios padrões do consumo de água.

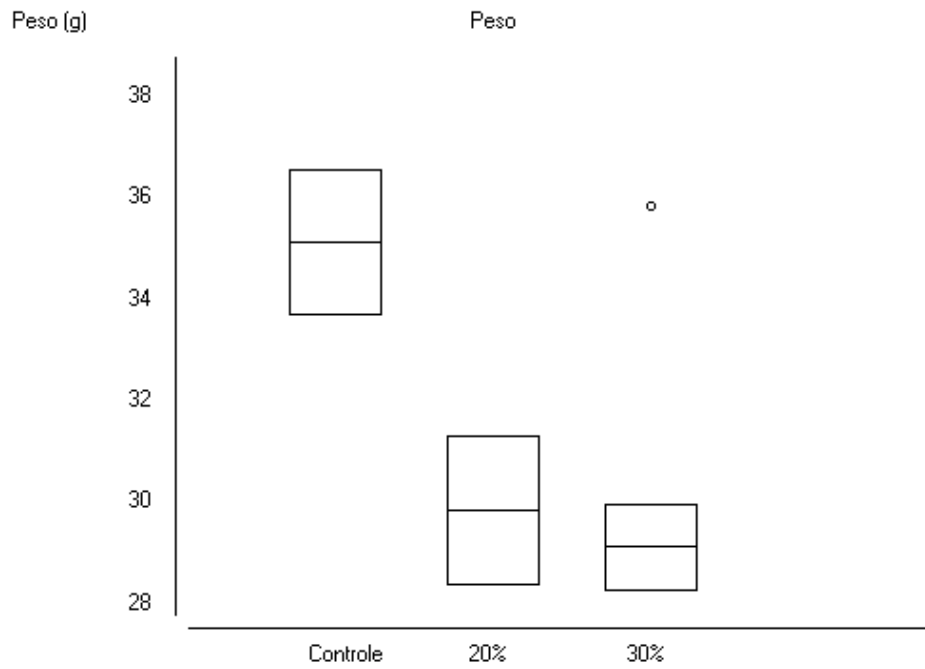


Figura 3: Médias e desvios padrões dos pesos dos animais.

Tabela 1 - Média dos tempos dos grupos experimentais e controle na trave elevada.

	Controle	20%	30%
0	9,60±1,51a	8,90±2,25a	14,27±4,30b
5°	6,68±2,06a	13,06±6,68ab	18,51±5,38b
10°	5,37±1,96a	12,44±14,95a	22,94±10,04b
15°	5,04±1,05a	11,45±7,91ab	24,69±29,51b
20°	5,12±3,13a	8,06±3,27ab	13,22±5,44b
25°	3,82±1,02a	11,24±5,74b	13,95±5,62b
30°	4,56±1,06a	8,01±4,02ab	13,05±4,63b

Letras diferentes na mesma linha significa diferença estatística ($p < 0,05$).

Tabela 2: Média de quedas dos grupos experimentais e controle no rota rod.

	Controle	20%	30%
Dia 0	0,42±0,78a	2,42±2,29a	4,14±3,97a
5° dia	0,71±1,11a	3,42±4,03ab	10,28±5,46b
10° dia	1,28±0,95a	4,42±4,96ab	12,28±8,75b
15° dia	2,85±2,34a	5,71±7,82ab	14,57±10,62b
20° dia	1,42±1,9a	7±7,95ab	14,5±12,47b
25° dia	1,42±1,61a	3,66±6.65a	22±27a
30° dia	1,42±81a	3±6,41a	18,4±21,78a

Letras diferentes na mesma linha significa diferença estatística ($p < 0,05$).

CAPÍTULO II

Eliminação da toxina tremorgênica de *Ipomoea asarifolia* pelo leite.

Trabalho enviado para publicação na revista Ciência rural.

Elimination of the tremorgenic toxin of *Ipomoea asarifolia* by milk

Eliminação da toxina tremorgênica de *Ipomoea asarifolia* pelo leite

José Radmácyo G. Lopes^a, Franklin Riet-Correa^{a1}, Daniel Cook^b, James A. Pfister^b and
Rosane M. T. Medeiros^a

ABSTRACT

With the aim to determine if the tremorgenic toxin of *Ipomoea asarifolia* is eliminated in milk, three groups of Swiss female mice received, immediately after giving birth until weaning, a ration containing 0, 20% and 30% of dry *I. asarifolia*. All the offspring of the females that received 20% and 30% *I. asarifolia* showed tremors 2-4 days after birth. The offspring of the females that received 20% *I. asarifolia* recovered 4-7 days after weaning. The offspring of the females that received 30% of the plant in the ration died while showing tremors before weaning or up to two days after weaning. It is concluded that the tremorgenic compound of *I. asarifolia* is eliminated in milk, and that lactating mice may be used as a model for the determination of the toxic compound(s) in this plant.

Key words: *Ipomoea asarifolia*, tremorgenic toxins, toxins in milk, toxic plants.

RESUMO

Com o objetivo de determinar se a toxina tremorgênica de *Ipomoea asarifolia* é eliminada pelo leite, três grupos de camundongos fêmeas da linhagem Swiss receberam,

^aVeterinary Hospital, Federal University of Campina Grande, Patos, CEP 58700-310 Paraíba, Brazil.

^bPoisonous Plant Research Laboratory, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, 1150 E. 1400 N., Logan, UT 84341, USA.

¹ Corresponding author. Tel.: þ55 83 34239734; fax: þ55 83 34239537. E-mail addresses: franklin.riet@pq.cnpq.br, rmtmed@uol.com.br (F.Riet-Correa).

imediatamente após o parto e até o desmame, ração contendo 0, 20% e 30% de folhas secas de *I. asarifolia*. Todos os filhotes das fêmeas que receberam 20% e 30% de *I. asarifolia* na ração apresentaram tremores 2-4 dias após o nascimento. As proles das fêmeas que receberam 20% de *I. asarifolia* recuperaram-se 4-7 dias após o desmame. As proles das fêmeas que receberam 30% da planta na ração morreram, ainda apresentando tremores, antes ou até dois dias após o desmame. Concluindo que a toxina tremorgênica de *I. asarifolia* é eliminada pelo leite, e que camundongos lactentes podem ser usados como modelo para se determinar o(s) componente(s) tóxico(s) dessa planta.

Palavras-chave: *Ipomoea asarifolia*, toxinas tremorgênicas, toxinas no leite, plantas tóxicas.

INTRODUCTION

Ipomoea asarifolia R. et Schult. (common name: salsa), family Convolvulaceae, is a plant native to South and Central America. In Brazil it is very common in the Amazon region, in the Northeast, and along the coast, from northern Brazil to the southern states of Rio de Janeiro and São Paulo (KISSMANN & GROTH, 1992). *I. asarifolia* is a tremorgenic plant that causes poisoning in sheep (DÖBEREINER et al., 1960; GUEDES et al., 2007), goats (DÖBEREINER et al., 1960; MEDEIROS et al., 2003; GUEDES et al., 2007), cattle (DÖBEREINER et al., 1960; BARBOSA et al., 2005) and buffalo (BARBOSA et al., 2005). Clinical signs caused by *I. asarifolia* are similar than those caused by the indole-diterpene mycotoxins produced by different fungi (DI MENNA et al., 2012; CAWDELL-SMITH et al., 2010), but the tremorgenic toxin of the plant is unknown.

In an experiment with rats *I. asarifolia* was administrated to females during pregnancy and lactation; the dams showed no alterations, but the pups presented behavioral changes, however tremors were not observed (SILVA et al., 2012). Behaviour changes

without tremors were also observed in weaned of mice ingesting *I. asarifolia* (LOPES, 2013). In sheep the poisoning has been observed in nursing lambs that remain confined, without ingesting the plant, while their mothers ingested the plant while grazing without showing signs of disease (ARAÚJO et al., 2008; FREITAS et al., 2011). These observations suggest that the tremorgenic compound of the plant is eliminated in milk. However, this hypothesis was not confirmed in experiments in sheep (ARAÚJO et al., 2008) and goats (FREITAS et al., 2011) that ingested *I. asarifolia* before and/or after lambing without causing clinical signs in the offspring.

This experiment was performed to determine if the tremorgenic toxin of *I. asarifolia* is eliminated through the milk in lactating mice, causing tremors in the offspring.

MATERIALS AND METHODS

Fifteen Swiss mice *Mus musculus*, 12 females and 3 males, aged 40 days were housed in plastic cages with metal lids, measuring 30x20x13cm. All cages were kept in rooms with controlled temperature of 22-25 °C, using a natural light cycle, from approximately 5:00am to 5:45pm. The animals were housed in cages with four females and one male per cage. After confirmation of pregnancy, by the increasing abdominal size and weight gain in females, they were transferred to individual cages. After parturition the females were kept with their offspring until 21 days post parturition.

The ration given to the animals was prepared with the leaves of *I. asarifolia* collected in a place (S 07° 04' 00.9" and W 037° 16' 48.8") in the municipality of Patos, Paraíba state. A voucher specimen of the plant was authenticated and deposited in the Center for Health and Rural Technology herbarium (CSTR #4756) of the Federal University of Campina Grande. The plant material was dried in the shade for about 10

days, milled through a 1-mm screen, and mixed with milled commercial feed for mice (PRESENCE®) in the proportions of 20% (Group 2) and 30% (Group 3). This mixture was mixed with 200 mL of water and 10% corn starch to obtain proper consistency, and then pellets were manually made using disposable 20 mL syringes. The pellets were dried in the shade at room temperature. Control mice of Group 1 received only the commercial ration which was also milled and prepared in the same manner.

Food and water intake of the dams and weight of the dams and offspring were determined on the day of birth and every 5 days until weaning, at 21 days. Statistical analysis was performed by using a one-way ANOVA with a significance of $P < 0.05$. Each morning the pups were observed for the presence of tremors; the pups were not handled in any way during this observation period. After the end of the experiment the surviving animals were euthanized with isoflurane.

RESULTS

Food and water intake and weight of dams and offspring showed no significant differences ($P > 0.05$) between groups.

All pups of the two experimental groups showed tremors 2-4 days after birth (Table 1). The tremors, manifested mainly by lateral continuous movements of the head and with less intensity in the front legs, were observed when the pups were moving, but not when they were at rest (E-component/supplementary material). From the 12th - 15th day of life, when the pups started walking, tremors, mainly in the head and tail, were observed as they walked, but not at rest. The offspring of group 2 recovered 4-7 days after weaning, while the offspring of group 3 died before or after weaning (Table 1). No clinical signs were observed in the dams. No significant lesions were observed in the pups at necropsies nor histologically using Hematoxylin-Eosin stained sections of the central nervous system.

DISCUSSION

The results obtained in this study with *I. asarifolia* suggest that the tremorgenic toxin of this plant is excreted by milk. The presence of clinical signs of toxicity in the offspring, but not in their mothers, is probably due to higher resistance of the adults compared with the newborns. With penitren A, the main tremorgenic toxin of *Lolium perenne*, it was demonstrated that 1-3-day-old mice dosed intraperitoneally were more susceptible than 11-week-old mice (LU et al., 2008). In a previous work, it was observed that dry *I. asarifolia* mixed 20-30% in the food of 40-day-old mice causes changes in equilibrium and motor coordination, but without tremors (LOPES, 2013). These results also suggest that newborn mice can be used as an experimental model to study the tremorgenic compound of *I. asarifolia*. The cause of death of the pups from Group 3, that ingest the highest amount of plant (30% in the food), was not determined, but the fact that all offspring of each dam died in the same day suggest that the death was due to the toxin present in the milk.

The tremorgenic compounds toxic to livestock include indole-diterpenes comprising the penitren A, B and C produced in *Lolium perenne* by the endophyte *Neothyrphodium lolii* (DI MENNA et al., 2012) and by various species of *Penicillium* (BOTHAS et al., 1996), paxilline produced also by *Neothyrphodium lolii* (DI MENNA et al., 2012), and paspalitrem and paspaline produced by *Claviceps* spp. (CAWDELL-SMITH et al., 2010). Other tremorgenic substances produced by fungi include verruculogen produced by *Aspergillus fumigatus* and *Penicillium* spp., roquefortine produced by *Penicillium roqueforti*, fumitremorgen A and B produced by *Aspergillus fumigatus*, and flavostremorgen produced by *Aspergillus flavus* (RADOSTITS et al., 2007). However, there are no references reporting the elimination of these tremorgenic substances in milk by lactating animals. The tremorgenic substance that is eliminated by milk is tremetol,

present in snakeroot, which causes milk sickness characterized by trembling, vomiting, and severe intestinal pain that affects individuals who ingest milk from cows that has fed with this plant (RADOSTITS et al., 2007). Further work is needed to identify the tremorgenic substance present in *I. asarifolia*. There is also a possibility that the milk may represent a detoxication mechanism, and that the dams are unaffected because they have excreted the toxin.

The ergot alkaloids have been reported to be present in a number of morning glory species including *I. asarifolia* (HOFFMAN & TSCHERTER, 1961; EICH, 2008). Research has shown that a clavicipitaceous epibiotic fungal symbiont, *Periglandula*, is associated with the Convolvulaceae that produce ergot alkaloids including *I. asarifolia* (KUCHT et al., 2004; MARKERT et al., 2008; STEINER et al., 2011). More recently, it was shown that *I. asarifolia* contains the indole-diterpenes and that the *Periglandula* species associated with it contains the biosynthetic genes for both the ergot alkaloids as well as the indole diterpenes (SCHARDL et al., 2013). These reports demonstrating the presence of the ergot alkaloids and the indole diterpenes suggest that they may be responsible for the tremorgenic syndrome in animals poisoned by *I. asarifolia*. However other reports have suggested that a leaf lectin may be responsible for the observed toxicity of *I. asarifolia* (SALLES et al., 2011). More research is needed to determine the tremorgenic compounds in *I. asarifolia*.

The presence of a tremorgenic toxin in *I. asarifolia* which is excreted in milk is also a concern for public health, because in northeastern Brazil the cattle and goat dairy industry is very important. The risk of consuming milk contaminated by the toxin of the *I. asarifolia* is likely much greater on small farms, which are very common in northeastern Brazil, in which milk is produced mainly for household consumption.

In conclusion, the results suggest that the tremorgenic toxin of *I. asarifolia* is excreted in the milk of lactating mice, causing tremors in the offspring. This finding suggests that there may be a risk also for humans consuming contaminated milk from lactating cattle or goats that consume *I. asarifolia*. Further work will be necessary to verify this finding in mice, and to determine the toxic compounds in milk.

Ethical Committee

The experiment was approved by the ethical committee on animal experimentation of the UFCG, process CEP 69-2013.

Acknowledgments

This work was supported by the National Institute for Science and Technology for the Control of Plant Poisonings, CNPq, grant 573534/2008-0.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

REFERENCES

ARAÚJO, J.A.S. et al. Intoxicação experimental por *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae) em caprinos e ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.28(10), p.488-494, 2008. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2008001000008 > Acesso em: 24 jul. 2013. doi: 10.1590/S0100-736X2008001000008

BARBOSA, J.D. et al. Intoxicação experimental e natural por *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae) em búfalos e outros ruminantes. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.25(4), p.231-234, 2005. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2005000400008&script=sci_arttext > Acesso em: 20 jul. 2013. doi: 10.1590/S0100-736X2005000400008

BOTHA, C.J. et al. A tremorgenic mycotoxicosis in cattle caused by *Paspalum distichum* (L.) infected by *Claviceps paspali*. **Journal of the South African Veterinary Association**. v.67(1), p.36-37, 1996. Disponível em: < [http://www.researchgate.net/publication/14415639_A_tremorgenic_mycotoxicosis_in_cattle_caused_by_Paspalum_distichum_\(L.\)_infected_by_Claviceps_paspali](http://www.researchgate.net/publication/14415639_A_tremorgenic_mycotoxicosis_in_cattle_caused_by_Paspalum_distichum_(L.)_infected_by_Claviceps_paspali) > Acesso em: 23 jul. 2013.

CAWDELL-SMITH, A.J. et al. Staggers in horses grazing paspalum infected with *Claviceps paspali*. **Australian Veterinary Journal**. v.88, p.393–395, 2010. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1751-0813.2010.00624.x/abstract> > Acesso em: 23 jul. 2013. doi: 10.1111/j.1751-0813.2010.00624.x

DI MENNA, M.E. et al. A review of the *Neotyphodium lolii* / *Lolium perenne* symbiosis and its associated effects on animal and plant health, with particular emphasis on ryegrass staggers. **New Zealand Veterinary Journal**. v.60(6), p.315-328, 2012. Disponível em: < http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00480169.2012.697429?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed&#.UxneNz-8AXU > Acesso em: 20 jul. 2013. doi: 10.1080/00480169.2012.697429

DÖBEREINER, J. et al. Intoxicação experimental pela “salsa” (*Ipomoea asarifolia* R. et Schult.) em ruminantes. **Arquivos do Instituto Biológico Animal**. v.3, p.39-57, 1960. Disponível em: <
<http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/busca?b=ad&id=789600&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22DOBEREINER,%20J.%22&qFacets=autoria:%22DOBEREINER,%20J.%22&sort=&paginacao=t&paginaAtual=17> > Acesso em: 24 jul. 2013.

EICH, E. **Solanaceae and Convolvulaceae: Secondary Metabolites: Biosynthesis, Chemotaxonomy, Biological and Economic Significance**. *Tryptophan-derived Alkaloids*. Springer-Verlag: Berlin; 213-259, 2008.

FREITAS, F.J.C. et al. Surtos de intoxicação por *Ipomoea asarifolia* (salsa) em cordeiros e cabritos lactentes. **Veterinária e Zootecnia**. v.18(4), p.548-551, 2011. Disponível em: <
[http://www.researchgate.net/publication/233884242_SURTOS_DE_INTOXICAO_POR_Ipomoea_asarifolia_\(SALSA\)_EM_CORDEIROS_E_CABRITOS_LACTENTES](http://www.researchgate.net/publication/233884242_SURTOS_DE_INTOXICAO_POR_Ipomoea_asarifolia_(SALSA)_EM_CORDEIROS_E_CABRITOS_LACTENTES) >
Acesso em: 22 jul. 2013.

GUEDES, K.M.R. et al. Doenças do sistema nervoso central em caprinos e ovinos no semi-árido. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.27(1), p.29-30, 2007. Disponível em: <
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2007000100006 >
Acesso em: 21 jul. 2013. doi: 10.1590/S0100-736X2007000100006

HOFMANN, A.; TSCHERTER, H. Isolierung Von Lysergsaure-Alkaloiden aus der Mexikanischen Zauberdroge Ololiuqui (*Rivea corymbosa* (L.) Hall-F). **Experientia**. v.16,

p.414, 1960. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007%2F02178840> >

Acesso em: 25 jul. 2013. doi: 10.1007/BF02178840

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas Infestantes e Nocivas**. BASF Brasileira S.A: São Paulo. 1992

KUCHT, S. et al. Elimination of ergoline alkaloids following treatment of *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae) with fungicides. **Planta**. v.219, p.619-625, 2004. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007/s00425-004-1261-2> > Acesso em: 20 jul. 2013. doi: 10.1007/s00425-004-1261-2

LOPES, J.R.G. **Efeitos da administração de diferentes concentrações de folhas de *Ipomoea asarifolia* na ração de camundongos e eliminação da toxina tremorgênica pelo leite**. 2013. p.45. Dissertação – Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande.

LU, H. et al. Toxin-produced Purkinje cell death: A model for neural stem cell transplantation studies. **Brain Research**. v.1207, p.207–213, 2008. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899308003648> > Acesso em: 24 jul 2013. doi: 10.1016/j.brainres.2008.02.034

MARKERT, A. et al. Biosynthesis and accumulation of ergoline alkaloids in a mutualistic association between *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae) and a clavicipitalean fungus. **Plant Physiology**. v.147, p.296-305, 2008. Disponível em: <

<http://www.plantphysiol.org/content/147/1/296.long> > Acesso em: 26 jul. 2013. doi: 10.1104/pp.108.116699

MEDEIROS, R.M.T. et al. Tremorgenic syndrome in goats caused by, *Ipomoea asarifolia* in northeastern Brazil. **Toxicon**. v.41, p.933-935, 2003. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010103000448> > Acesso em: 28 jul. 2013. doi: 10.1016/S0041-0101(03)00044-8

RADOSTITS, O.M. et al. **Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. W.B. Saunders: London, 2007. ed 10.

SALLES, H.O. et al. Towards a better understanding of *Ipomoea asarifolia* toxicity: evidence of the involvement of a leaf lectin. **Toxicon**. v.58, p.502-508, 2011. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010111002595> > Acesso em: 28 jul. 2013. doi: 10.1016/j.toxicon.2011.08.011

SCHARDL, C.L. et al. Plant symbiotic fungi as chemical engineers: multi genome analysis of the Clavicipitaceae reveals dynamics of alkaloid loci. **PLoS Genetics**. v.9, p.1-26, 2013. Disponível em: < <http://www.plosgenetics.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pgen.1003323> > Acesso em: 27 jul. 2013. doi: 10.1371/journal.pgen.1003323

SILVA, A.F. et al. Behavioral effects of *Ipomoea asarifolia* (salsa) on wistar pups that had their mothers treated during pregnancy and lactation. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. v.35, p.177-178, 2012. Disponível em: <

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jvp.12007/pdf> > Acesso em: 20 jul. 2013. doi:
10.1111/jvp.12007

STEINER, U. et al. *Periglandula*, a new fungal genus within the Clavicipitaceae and its association with Convolvulaceae. **Mycologia**. v.103, p.1133-1145, 2011. Disponível em:
< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21558502> > Acesso em: 25 jul. 2013. doi:
10.3852/11-031

Table 1. Effect of the tremorgenic toxin of *I. asarifolia* on the offspring of mice. Number of pups, latency to the start of the tremors after birth, and recovery after weaning at 21 days.

Groups	Number of the female	Number of pups	Onset of tremors after birth	End of tremors after weaning
1 (Control)	I	7	NT ^a	NT
	II	7	NT	NT
	III	6	NT	NT
	IV	7	NT	NT
2 (20% <i>I. asarifolia</i>)	I	5	3 days	6 days
	II	6	4 days	7 days
	III	5	2 days	5 days
	IV	5	2 days	4 days
3 (30% <i>I. asarifolia</i>)	I	2	3 days	Death ^b
	II	3	2 days	Death ^c
	III	7	2 days	Death ^d
	IV	6	3 days	Death ^e

^aNT=No tremors;

^bAll offspring died 1 day after weaning, still showing tremors;

^cAll offspring died at 7 days after birth;

^dAll offspring died at 4 days after birth;

^eAll offspring died 2 days after weaning, still showing tremors.

Supplementary data

In the film, at right, severe tremors are observed in a 5-days-old mouse, from a dam ingesting 30% of *I. asarifolia* in the food. The mouse at left, with the same age, is from a control dam.

Conclusão

Os resultados obtidos no estudo com *Ipomoea asarifolia* confirmam sua toxicidade para camundongos adultos, uma vez que foram observadas alterações no equilíbrio e coordenação motora na trave elevada e no rota rod, evidenciada também pela mortalidade nos grupos experimentais. No entanto, a utilização de camundongos não se mostrou um bom modelo para se estudar os tremores musculares observados na intoxicação pela salsa em ruminantes, uma vez que não foram observados tremores.

Conclui-se também que a toxina tremorgênica da *Ipomoea asarifolia* é eliminada pelo leite, afetando os lactentes de fêmeas que ingerem a planta. A presença de sinais clínicos da intoxicação na prole e não nas mães ocorre, provavelmente, por que animais jovens são mais sensíveis que os adultos à toxina.

ANEXOS

Normas para publicação

1. CIÊNCIA RURAL - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias, que deverão ser destinados com exclusividade.

2. Os artigos científicos, revisões e notas devem ser encaminhados via eletrônica e editados em idioma Português ou Inglês. Todas as linhas deverão ser numeradas e paginadas no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm com, no máximo, 25 linhas por página em espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman e tamanho 12. **O máximo de páginas será 15 para artigo científico, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras.** Figuras, gráficos e tabelas devem ser disponibilizados ao final do texto e individualmente por página, sendo que **não poderão ultrapassar as margens e nem estar com apresentação paisagem.**

3. O artigo científico deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão e Referências; Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição; Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão** (Modelo .doc, .pdf).

4. A revisão bibliográfica deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; e Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão** (Modelo .doc, .pdf).

5. A nota deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** (Modelo .doc, .pdf).

6. Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista www.scielo.br/cr.

7. Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês e português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave, resumo e demais seções quando necessários.

8. As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

9. As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

9.1. Citação de livro:

JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery**. Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.

TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus : INPA, 1979. 95p.

9.2. Capítulo de livro com autoria:

GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. **The thyroid**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

9.3. Capítulo de livro sem autoria:

COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: _____. **Sampling techniques**. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90.

TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: _____. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.

9.4. Artigo

completo:

O autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers), conforme exemplos abaixo:

MEWIS, I.; ULRICH, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests **Tribolium confusum** (Coleoptera: Tenebrionidae), **Tenebrio molitor** (Coleoptera: Tenebrionidae), **Sitophilus granarius** (Coleoptera: Curculionidae) and **Plodia interpunctella** (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Product Research**, Amsterdam (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Acesso em: 20 nov. 2008. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Resposta de **Sitophilus oryzae** (L.), **Cryptolestes ferrugineus** (Stephens) e **Oryzaephilus surinamensis** (L.) a diferentes concentrações de terra de diatomácea em trigo armazenado a granel. **Ciência Rural**, Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, p.2103-2108, nov. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 25 nov. 2008. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

9.5. Resumos:

RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236.

9.6. Tese, dissertação:

COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad)**. 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.

9.7. Boletim:

ROGIK, F.A. **Indústria da lactose**. São Paulo : Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20).

9.8. Informação verbal:

Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

9.9. Documentos eletrônicos:

MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico.** São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD.

GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow dysplasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. **Proceedings...** Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Acessado em 12 fev. 2007. Online. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>

UFRGS. **Transgênicos.** Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.zh.com.br/especial/index.htm>

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas**, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: [http://www. Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm](http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm)

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC.

10. Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos figuras e gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos 300 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

11. Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

12. Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser utilizado.

13. Lista de verificação (Checklist .doc, .pdf).

14. Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

15. Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.

16. Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.