

EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA AO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ruta Graveolens* (L.) EM FÊMEAS CAMUNDONGOS

Subchronic exposure to the essential oil of *Ruta graveolens* (L.)
in female mice

Juliana Ribeiro¹; Janaina Belusso²; Rogério Luis Cansian³ Elisabete Maria Zanin⁴;
Silvane Souza Roman⁵.

¹Acadêmica do curso de Farmácia. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI Erechim.

²Graduada em Farmácia. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI Erechim.

³ Professor Titular do Departamento de Ciências Agrárias - Laboratório de Biotecnologia - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI Erechim.

⁴ Professora Titular do Departamento de Ciências Biológicas - Laboratório de Botânica - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI Erechim.

⁵ Professora Titular do Departamento de Ciências da Saúde - Laboratório de Histologia - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI Erechim. *E-mail* roman@uri.com.br

Data do recebimento: 01/11/2016 - Data do aceite: 08/03/2018

RESUMO: *Ruta graveolens* (L.), conhecida popularmente como arruda-doméstica, é uma espécie perene pertencente à família Rutaceae. Possui propriedades antimicrobiana, fungicida, anti-inflamatória e abortiva. O trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade subcrônica do óleo essencial de *Ruta graveolens* (L.) na dose de 200 mg/kg em camundongos fêmeas. Utilizou-se 16 animais, divididos em grupo controle e experimental, tratados diariamente, 1x/dia, durante 14 dias. No 15º dia de tratamento os animais foram eutanasiados e os órgãos foram coletados e pesados. O peso corporal, consumo de água e ração e sinais clínicos de toxicidade foram analisados no decorrer do experimento. Sangue, fígado e rim foram coletados para análise dos parâmetros histológicos, bioquímicos e enzimáticos. Nenhum sinal clínico ou consumo de água e ração foi alterado no grupo experimental em relação ao controle, o que demonstra ausência de toxicidade causada pelo óleo essencial de arruda. Em relação aos parâmetros bioquímicos e análise histológica, não houve alterações significativas do grupo experimental em relação ao contro-

le. Pôde-se verificar que o óleo essencial de *Ruta graveolens* (L.) na dose de 200mg/kg não apresenta toxicidade subcrônica em fêmeas de camundongos.

Palavras-chave: Toxicidade. *Ruta graveolens* (L.). Histologia.

ABSTRACT: *Ruta graveolens* (L.) popularly known as domestic rue, is a perennial species belonging to the Rutaceae family. It has antimicrobial, fungicidal, anti-inflammatory and abortive properties. The aim of this study was to assess the subchronic toxicity of essential oil of *Ruta graveolens* (L.) at a dose of 200 mg/kg in female mice. 16 animals divided into control and experimental groups treated daily were used, once a day for 14 days. On the 15th day of treatment the animals were euthanized and the organs were collected and weighed. Body weight, food and water consumption and clinical signs of toxicity were analyzed during the experiment. Blood, liver and kidney were collected for histological, biochemical and enzymatic parameters analysis. No clinical signs or water and food consumption were altered in the experimental group compared to the control one, which demonstrates absence of toxicity caused by rue essential oil. Regarding the biochemical parameters and the histological analysis there were no significant changes in the experimental group compared to the control group. It was verified that the essential oil from *Ruta graveolens* (L.) at a dose of 200 mg/kg does not present subchronic toxicity in female mice.

Keyword: Toxicity. *Ruta graveolens* (L.). Histology.

Introdução

O Brasil abriga uma grande biodiversidade do planeta, apresentando grande potencial para geração de pesquisas, desenvolvimento e inovações de produtos originários de plantas medicinais. Neste sentido, o uso da fitoterapia faz parte da cultura de diferentes grupos da população, sendo utilizada e difundida por muitas gerações (ASSIS et al. 2015). Assim, as plantas medicinais podem ter as ações terapêuticas conhecidas para serem posteriormente comprovadas cientificamente (OLIVEIRA; MENINI NETO, 2012).

O mercado farmacêutico nacional e internacional tem valorizado e ampliado a pesquisa e o desenvolvimento de medicamentos oriundos de plantas. Esta motivação ocorre

pelo fato da produção de medicamentos apresentar melhor relação custo/benefício quando comparada aos produtos sintéticos, por apresentar boa ação biológica, baixa toxicidade e menos efeitos adversos. Também é levado em consideração o menor custo de produção e por poder ser comercializado com preços mais acessíveis. Ainda cabe destacar a busca por hábitos mais saudáveis de vida e a valorização do meio ambiente pela sociedade através do consumo de produtos naturais (ETHUR et al., 2011; OLIVEIRA, GILBERT, BÔAS, 2013; CORRÊA JR., 2014).

Nativa da região do Mediterrâneo e sudoeste da Ásia, a *Ruta graveolens* (L.) pertence à família Rutaceae, é uma planta perene, e vem sendo utilizada na medicina da Europa e da Ásia há mais de 1500 anos (HORNOK,

1992). É uma planta de existência longa, que se renova a cada primavera. Suas folhas, verde-claras, têm odor característico, forte, e sabor ligeiramente picante, porém, mascarado pelo seu odor amargo (OLIVEIRA, 2006). É um arbusto perene de até um metro de altura. As folhas são pequenas, profundamente divididas, pinadas e glandulares pontilhadas. Os caules são muito ramificados. Suas flores são pequenas e amarelas (ZARGARI, 1990).

Ensaio farmacológicos comprovaram seu efeito como febrífugo, antiparasitária, espasmolítica, fotossensibilizante, cicatrizante, anti-inflamatória, antirreumática, antiulcerogênica, anti-helmíntica e sudorífera (YAMASHITA et al., 2009). De acordo com MEJRI et al. (2010), a arruda também é indicada para a normalização do ciclo menstrual, como repelente, vermífuga, tratamento da leishmaniose e vermes.

Toda substância, segundo os estudos toxicológicos, pode ser considerada um agente tóxico, dependendo das condições de exposição, como dose administrada ou absorvida, tempo e frequência de exposição e vias pelas quais é administrada (OGA, 2003). Os efeitos tóxicos variam desde os considerados leves, como a irritação dos olhos, até respostas mais sérias, como o dano hepático ou renal, podendo ser tão graves quanto incapacitação permanente de um órgão, como cirrose ou câncer (OGA, 2008). Os principais objetivos dos testes de toxicidade subcrônica são estabelecer os níveis nos quais não se observam os efeitos tóxicos, identificar e caracterizar os órgãos afetados e a severidade após exposições repetidas (OGA, 2008).

Embora existam estudos toxicológicos de *Ruta graveolens* (L.), são ainda poucos encontrados na literatura sobre o óleo essencial, para que se possa realizar o uso racional da planta. Frente a isso, objetivou-se avaliar a toxicidade subcrônica do óleo essencial de *Ruta graveolens* (L.) na dose de 200mg/Kg em camundongos Swiss fêmeas.

Materiais e Métodos

Coleta e Identificação da Planta

A planta foi coletada no distrito de Capo-erê longitude 27° 45'00.17"S e latitude 52° 16'00.06" O, próximo à cidade de Erechim, no período de agosto de 2011, em diferentes pontos de coleta para obtenção de um volume razoável a fim de possibilitar a extração do óleo essencial. Após foi identificada por um Biólogo e uma exsicata foi registrada no Herbário Padre Balduino Rambo da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões sob número HPBR 11.576. Foram utilizadas no estudo todas as partes do material vegetal, exceto as raízes.

Obtenção do Óleo Essencial

O material vegetal coletado foi seco em estufa de circulação de ar até peso constante e após moído em moinho de facas para a obtenção do pó. O óleo essencial foi extraído por hidrodestilação em aparelho de Clevenger no laboratório de Biotecnologia Vegetal da URI Erechim. Foram utilizadas 100g do pó obtido, submerso em dois litros de água destilada. Como o material vegetal fica submerso na água, na hidrodestilação os compostos voláteis e semivoláteis, por possuírem tensão de vapor mais elevada que a água, são arrastados (SEFIDKON et al., 2007) e coletados na forma de óleo essencial. Durante a extração foi obtido o rendimento total do óleo para cada 100 gramas de pó em mL (% p/v). Após extraído, o óleo foi transferido para um recipiente de vidro (tipo âmbar) e mantido a temperatura de -20°C para posterior utilização.

Animais de Experimentação e Cuidados Éticos

Para todos os testes foram utilizados camundongos Swiss fêmeas, com 50 a 60 dias

de idade, e não foi considerado o ciclo reprodutivo, oriundas do Laboratório de Experimentação Animal da URI Erechim. Os animais foram acondicionados em caixas separadas, sob condições de temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e um ciclo de 12h luz/12h escuro, com acesso à água e alimentação à vontade. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da URI Erechim sob número 094/PIA/11. No fim do experimento os animais foram eutanasiados em câmara de CO_2 . As carcaças dos animais foram incineradas.

Delineamento Experimental

Foram utilizados 16 camundongos fêmeas Swiss. Os animais foram divididos em grupo controle e grupo experimental. O grupo experimental recebeu o óleo essencial de *Ruta graveolens* (L.) na dose de 200 mg/Kg/dia, durante 14 dias, e o grupo controle recebeu água destilada, (veículo), na mesma proporção e período. A escolha da dose foi baseada em estudos anteriores com a dose de 100mg/kg, a qual não demonstrou efeitos tóxicos nos animais testados. A administração foi por sonda gástrica. Foram observados e registrados, diariamente, os dados fisiológicos (peso corporal, consumo de água e consumo de ração), sinais clínicos de toxicidade como piloereção, diarreia e irritabilidade (KHERA, 1984) e alterações comportamentais anormais durante todo o estudo.

No 15º dia, os animais experimentais e controles foram eutanasiados em câmara de CO_2 . O abdômen foi incisado para a coleta e peso do fígado, rins, cérebro e baço, a fim de verificar a possível toxicidade.

Análise Histológica

Os órgãos de metabolização e excreção fígado e rins foram processados histologicamente segundo a técnica rotineira em

parafina, corados em hematoxilina e eosina e analisados em microscópio óptico. A avaliação das alterações teciduais e do grau de dano hepático e renal foram numeradas gradualmente, seguindo escores que vão de 0 a 3, sendo que 0 indica ausência de dano, 1 indica dano baixo, 2 indica dano moderado e 3 dano intenso. Para fígado os parâmetros seguidos foram: necrose, congestão vascular, megalocitose, infiltração celular, eosinofilia, vacualização citoplasmática, hiperchromatismo, dilatação sinusoidal. Os rins foram avaliados quanto a tumefação celular, vacualização citoplasmática, congestão vascular, dilatação tubular, células apoptóticas e espaço de filtração glomerular. Os dados foram avaliados estatisticamente e distribuídos em tabelas para análise.

Ensaio Bioquímicos Enzimáticos e Não Enzimáticos

Os biomarcadores séricos foram medidos utilizando as atividades das enzimas alanina aminotransferase (AST) e aspartato aminotransferase (ALT), que foram analisados. Para tal, foram obtidas amostras de sangue da artéria abdominal com auxílio de uma seringa de 5 ml, através do emprego de uma agulha de calibre 25×7. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm, por 15 minutos, a uma temperatura de 4°C . Em seguida, foram separadas amostras de soro para determinar as atividades enzimáticas (ALT, AST), as quais foram realizadas de acordo com a metodologia descrita nos Kits labtest®.

Para avaliação dos níveis de peroxidação lipídica, espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram determinadas de acordo com a Ohkawa et al. (1979), em que o malondialdeído (MDA), um produto final da peroxidação de ácidos graxos, reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar um complexo colorido. A quantidade de TBARS

produzido foi medido em espectrofotômetro, a 532 nm e os resultados foram apresentados como proteína nmol mg MDA.

Análise Estatística

O tratamento estatístico dos dados de toxicidade e análise bioquímica foi no programa estatístico Statistical Biostat utilizando-se o teste de análise de variância (ANOVA). A existência de diferença significativa entre dois grupos foi estabelecida pelo teste de Duncan. A análise estatística dos dados referentes à histologia foram realizados pelo teste de distribuição não paramétrica Kruskal Wallis do Bioestat, seguido do teste Student-Newman-Keuls. Os dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

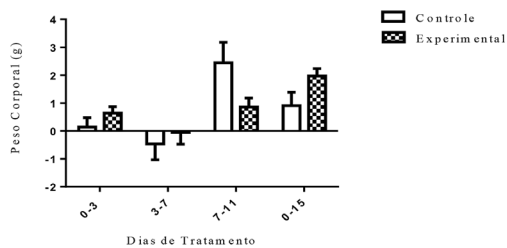
Resultados

Sinais Clínicos e Peso Corporal

Durante os 14 dias de tratamento com o óleo essencial de arruda não houve nenhuma morte. Além disso, as fêmeas que receberam o óleo essencial não apresentaram diarreia. A piloereção foi observada nos primeiros dias (0-3) de tratamento.

O peso corporal das fêmeas tratadas com o óleo essencial durante o período de 14 dias de exposição não diferiu estatisticamente com o peso dos animais do grupo controle (Figura 1).

Figura 1 - Peso corporal (g) de fêmeas tratadas com o óleo essencial de *Ruta graveolens* (L.) na dose de 200mg/kg e do controle durante 14 dias.



Os resultados estão expressos como média ± DP.

Peso Absoluto e Relativo dos Órgãos

A Tabela I está demonstrando que não houve diferença significativa no peso relativo e absoluto dos órgãos do grupo experimental quando comparado com o grupo controle.

Consumo de Água e Ração

Consumo de Água

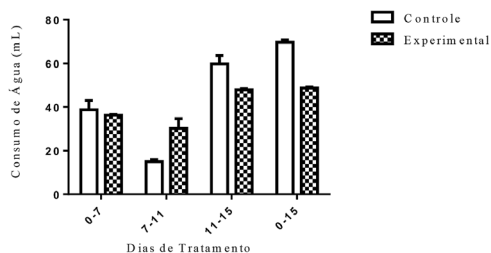
Conforme a Figura 2, podemos observar o consumo de água do grupo experimental, o qual foi maior significativamente durante o período de tratamento (7-11), quando comparado ao grupo experimental. No fim do experimento (11-15) os animais do grupo experimental apresentaram uma redução significativa em relação ao grupo controle. Durante todo o tratamento (0-15) os animais do grupo experimental apresentaram redução do consumo de água quando comparados ao grupo controle.

Tabela I - Peso dos órgãos das fêmeas tratadas com o óleo essencial de *Ruta graveolens* (L.) na dose de 200mg/kg e do controle durante 14 dias.

ÓRGÃOS/GRUPO	Fígado	Rim	Baço	Cérebro
Absoluto (g)				
Experimental	1,53±1,54	0,32±0,04	0,11±0,11	0,32±0,33
Controle	1,58±1,60	0,34±0,04	0,12±0,12	0,38±0,39
Relativo (%)				
Experimental	4,95±0,43	1,04±1,03	0,35±0,33	1,05±1,10
Controle	5,26±0,84	1,14±1,15	0,40±0,39	1,26±1,25

Os resultados estão expressos como média ± DP.

Figura 2 - Consumo de água (mL) das fêmeas tratadas com o óleo essencial de *Ruta graveolens* (L.) na dose de 200mg/kg e do controle durante 14 dias.



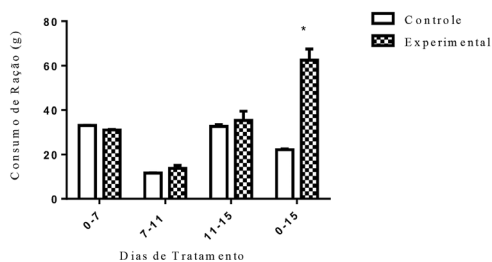
Os resultados estão expressos como média ± DP.

Diferença significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,05$.

Consumo de Ração

Na Figura 3, as fêmeas do grupo experimental apresentaram um maior consumo significativo da ração ao longo do tratamento, ou seja, entre os dias 0-15. Os demais dias de tratamento não influenciaram o consumo de ração de ambos os grupos.

Figura 3 - Consumo de ração (g) de fêmeas tratadas com o óleo essencial de *Ruta graveolens* (L.) na dose de 200mg/kg e do controle durante 14 dias.



Os resultados estão expressos como média ± DP.

Diferença significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,05$.

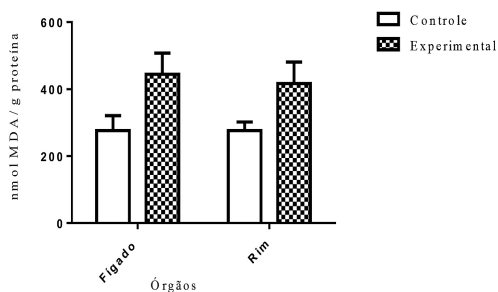
Ensaio Bioquímico Não Enzimático e Enzimático

Parâmetros Bioquímicos Não Enzimáticos

Avaliando os níveis de TBARS em fígado e rins dos grupos controle e experimental, não

se observou nenhuma alteração significativa conforme mostra a Figura 4.

Figura 4 - Parâmetros enzimáticos de fêmeas tratadas com o óleo essencial de *Ruta graveolens* (L.) e controle, durante 14 dias.

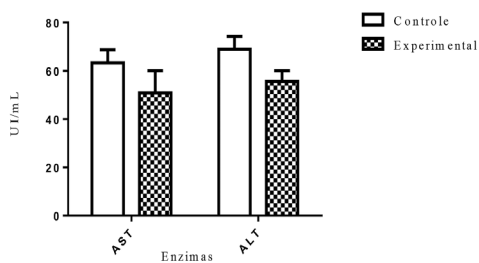


Os resultados estão expressos como média ± DP.

Parâmetros Bioquímicos Enzimáticos

Os resultados apresentados na Figura 5 representam a análise das enzimas AST e ALT em fêmeas dos grupos controle e experimental. Observa-se que não houve alteração na atividade das enzimas AST e ALT no tecido hepático e renal das fêmeas do grupo experimental quando comparado ao grupo controle (Figura 5).

Figura 5 - Parâmetros não enzimáticos de fêmeas tratadas com o óleo essencial de *Ruta graveolens* (L.) e controle, durante 14 dias.



Os resultados estão expressos como média ± DP.

Análise Histológica

Avaliando os diferentes parâmetros histológicos renais e hepáticos das fêmeas tratadas com o óleo essencial de *Ruta graveolens* (L.) e comparando com os resultados do grupo

Tabela II - Análise histológica do tecido renal dos grupos controle e experimental tratados com o óleo essencial de *Ruta graveolens* (L.), durante 14 dias.

GRUPOS/ PARÂMETROS	CTL				EXP				Valor de p
	0	1	2	3	0	1	2	3	
Espaço de filtração	4	0	0	0	2	1	0	0	0,207
Tumefação Celular Cortical	0	1	1	2	3	0	0	0	0,325
Vacuolização	4	0	0	0	3	0	0	0	0,325
Células Eosinofílicas Medular	4	0	0	0	3	0	0	0	0,325
Congestão vascular	4	0	0	0	3	0	0	0	0,325
Dilatação do Túbulo contorcido distal	1	1	2	0	2	1	0	0	0,207

Os dados estão distribuídos quanto ao número de animais que apresentaram o escore de 0 a 3.

Tabela III - Análise histológica do tecido hepático dos grupos controle e experimental tratados com o óleo essencial de arruda, durante 14 dias.

GRUPOS/ PARÂMETROS	CTL				EXP				Valor de p
	0	1	2	3	0	1	2	3	
Espaço de filtração	4	0	0	0	2	1	0	0	0,207
Tumefação Celular Cortical	0	1	1	2	3	0	0	0	0,325
Vacuolização	4	0	0	0	3	0	0	0	0,325
Células Eosinofílicas Medular	4	0	0	0	3	0	0	0	0,325
Congestão vascular	4	0	0	0	3	0	0	0	0,325
Dilatação do Túbulo contorcido distal	1	1	2	0	2	1	0	0	0,207

Os dados estão distribuídos quanto ao número de animais que apresentaram o escore de 0 a 3.

controle, não foram encontradas alterações significativas (Tabelas II e III), o que demonstra ausência de danos causados pelo óleo essencial na dose de 200mg/Kg.

Discussão

A massa corporal do animal é um indicador fundamental para indicar a toxicidade de uma substância (JAHN; GÜNZEL, 1997). Entretanto, foram utilizados alguns parâmetros com a finalidade de avaliar a toxicidade, dentre elas, o consumo de ração e água, controle do peso corporal, e ocorrência de morte animal, e também peso de órgãos como fígado e rins. Com os resultados obtidos foi possível observar que quando se trata de indicativo de peso os animais se mostraram resistentes, já que não apresentaram alterações de peso corporal durante o experimento.

Os sinais de toxicidade sistêmica são definidos a partir da redução na massa cor-

poral dos animais experimentais (TOFOVIC; JACKSON, 1999; RAZA et al., 2002; TEO et al., 2002). Outros sinais de toxicidade podem se expressar pela alteração da massa relativa dos órgãos, alterações hematológicas e bioquímicas sanguíneas (GONZALES; SILVA, 2003).

Os rins e fígado são órgãos essenciais na metabolização e excreção de substâncias presentes no organismo. Nesse contexto, os pesos relativos e absolutos dos órgãos analisados, rins e fígado, não se mostraram alterados, o que indica ausência de toxicidade em tais órgãos. Os rins exercem importante papel depurador do sangue. Desta forma, quando surgem alterações no tamanho desse órgão, estas podem ser providas de origem imunológica, inflamatória, infecciosa, neoplásica, degenerativa, congênita e hereditária, o que não foi o caso neste estudo.

Ademais, a toxicidade sistêmica pode se apresentar através da diminuição nos consumos de água e ração, alterações de

comportamento, apatia e a presença de pelos arrepiados (MELO, 2001).

No presente estudo, os animais, que receberam o óleo essencial apresentaram maior consumo de água no decorrer de todo experimento quando comparado com o grupo controle. Ao longo dos 14 dias de experimento o consumo de ração também foi maior do que o consumo do grupo controle. Esses resultados nos mostram que não houve toxicidade do óleo essencial.

Para se protegerem contra oxidações os sistemas biológicos possuem mecanismos químicos e enzimáticos. Um dos métodos para se quantificar os produtos da peroxidação lipídica é o método de análise da formação de substâncias que reagem ao ácido tio-barbitúrico (TBARS). Método o qual consiste na análise dos produtos finais da peroxidação lipídica que, ao reagirem com o ácido tio-barbitúrico (TBA), formam bases de Schiff (PRADA et al., 2004). Os resultados obtidos por meio da análise dos níveis de peroxidação lipídica não se mostraram significativos nos níveis de TBARS no fígado dos animais do grupo experimental quando comparados ao controle. Este resultado indica que o óleo essencial não causou danos na membrana celular dos tecidos, mostrando-se não tóxico.

Algumas análises bioquímicas são capazes de medir um dano hepatocelular, de forma que quantificam a presença de compostos intracelulares e extracelulares. Dentre uma dessas análises estão as determinações das aminotransferases: aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), que são capazes de indicar a integridade celular (COLICHON; TOREZAN FILHO; STRAUSS, 2001). Essas aminotransferases são sensíveis indicadores de dano hepático, essencialmente quando se trata de uma lesão

e hepatite aguda. Incluem a AST (aspartato aminotransferase) e a ALT (alanina aminotransferase). A AST pode ser encontrada em diversos tecidos, portanto é menos específica de lesão hepática comparada com a ALT, que é encontrada majoritariamente no fígado. Quando aumentadas, essas enzimas podem indicar sérias doenças hepáticas, as quais podem apresentar alterações bioquímicas e estruturais, ou até uma séria lesão hepática (GAYOTTO; VIANNA; LEITÃO; 2001). Na análise da toxicidade subcrônica dos animais não houve aumento significativo dos níveis de AST e ALT no soro dos animais expostos ao óleo essencial de *Ruta graveolens* (L.) quando comparados ao grupo controle.

O exame histopatológico dos órgãos (rim e fígado) não mostrou alterações, tanto no grupo controle quanto no grupo tratado com o óleo essencial. Nos rins, o óleo essencial não promoveu alterações histológicas. Não foram encontrados inflamação ou fibrose, congestão ou áreas de hemorragia. O lóbulo mostrou-se intacto, o córtex apresentou glomerulos regularmente distribuídos, cápsula de Bowman, com espaço de refração artefactual além de tufo capilares finos. Os túbulos contorcidos proximais e distais e o segmento de ducto coletor não apresentaram alterações. Com este resultado, pôde-se confirmar a avaliação bioquímica que não mostrou alterações metabólicas nesses órgãos.

Conclusão

A administração oral subcrônica do óleo essencial de *Ruta graveolens* (L.) na dose de 200 mg/kg não apresenta toxicidade frente à análise dos sinais clínicos, bioquímicos e histológicos analisados ao longo do experimento.

REFERÊNCIAS

- ASSIS, C. S. D. **Avaliação dos efeitos tóxicos in vitro e in vivo do extrato hidroetanólico dos frutos de Genipa americana L.(Rubiaceae) em camundongos Swiss**. 2015. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- CAMARGO, M.; BATISTUZZO, J. **Fundamentos de toxicologia**. 3ª Edição. São Paulo. Editora Atheneu, 2008.
- COLICHON, A. et al. Métodos diagnósticos: provas de função hepática. In: GAYOTTO LCC., ALVES VAF. **Doenças do fígado e vias biliares**. Rio de Janeiro: Atheneu, p. 139-49, 2001.
- CORRÊA JÚNIOR, C.; SCHEFFER, M. C. As plantas medicinais, aromáticas e condimentares e a agricultura familiar. **Horticultura Brasileira**, v. 32, n. 3, p. 376-376, 2014.
- ETHUR, L. et al. Comércio formal e perfil de consumidores de plantas medicinais e fitoterápicos no município de Itaquí-RS. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 2, p. 121-8, 2011.
- HORNOK, L. **Cultivation and processing of medicinal plants**. John Wiley & Sons Ltd., 1992.
- JAHN, A. I.; GÜNZEL, P. K. The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment? **Reproductive toxicology**, v. 11, n. 2, p. 171-178, 1997.
- KHERA, K. et al. Vomitoxin (4-deoxynivalenol): effects on reproduction of mice and rats. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 74, n. 3, p. 345-356, 1984.
- MEJRI, J.; ABDERRABBA, M.; MEJRI, M. Chemical composition of the essential oil of *Ruta chalepensis* L: Influence of drying, hydro-distillation duration and plant parts. **Industrial Crops and Products**, v. 32, n. 3, p. 671-673, 2010.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.
- OLIVEIRA, E.; MENINI NETO, L. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais utilizadas pelos moradores do povoado de Manejo, Lima Duarte-MG. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v. 14, n. 2, p. 311-320, 2012.
- OLIVEIRA, F. Q.; GONÇALVES, L. A. Conhecimento sobre plantas medicinais e fitoterápicos e potencial de toxicidade por usuários de Belo Horizonte, Minas Gerais. **Revista eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 36-41, 2006.
- OLIVEIRA, L. F. G.; GILBERT, B.; BÔAS, G. K. V. Oportunidades para inovação no tratamento da leishmaniose usando o potencial das plantas e produtos naturais como fontes de novos fármacos. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 8, n. 1, p. 33-42, 2013.
- RAZA, M. et al. Effect of prolonged vigabatrin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. **Scientia Pharmaceutica**, v. 70, n. 2, p. 135-145, 2002.
- SALGADO, P.; OGA, S. **Em Fundamentos de toxicologia**. Oga, S, 2ª ed. Atheneu: São Paulo, 2003.
- SEFIDKON, F. et al. The effect of distillation methods and stage of plant growth on the essential oil content and composition of *Satureja rechingeri* Jamzad. **Food chemistry**, v. 100, n. 3, p. 1054-1058, 2007.

SHAHJAHAN, M. et al. Effect of *Solanum trilobatum* against carbon tetrachloride induced hepatic damage in albino rats. **Indian Journal of Medical Research**, v. 120, n. 3, p. 194, 2004. ISSN 0971-5916.

TCHAMADEU, M. et al. Acute and sub-chronic oral toxicity studies of an aqueous stem bark extract of *Pterocarpus soyauxii* Taub (Papilionaceae) in rodents. **Journal of ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 329-335, 2011.

TEO, S. et al. A 90-day oral gavage toxicity study of d-methylphenidate and d, l-methylphenidate in Sprague–Dawley rats. **Toxicology**, v. 179, n. 3, p. 183-196, 2002.

TOFOVIC, S. P.; JACKSON, E. K. Effects of long-term caffeine consumption on renal function in spontaneously hypertensive heart failure prone rats. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 33, n. 3, p. 360-366, 1999.

YAMASHITA, O. et al. Fatores que afetam a germinação de sementes e emergência de plântulas de arruda (*Ruta graveolens* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 2, p. 202-208, 2009.

ZARGARI, A. Herbal medicines. Publication of Tehran University, **Tehran**, v. 83, 1990.