

**ESTUDO TOXICOLÓGICO PRÉ-CLÍNICO AGUDO E DETERMINAÇÃO DA CL<sub>50</sub> DO EXTRATO BRUTO SECO DAS FOLHAS DA *VITEX AGNUS CASTUS LINN***

***ACUTE PRE-CLINICAL TOXICOLOGICAL STUDY AND DETERMINATION OF LC<sub>50</sub> OF CRUDE DRY VITEX AGNUS CASTUS LINN LEAVES***

**Jussara Diniz Barros, Samuel Souza Filho, Valerium Castro, Vivian Mariano Torres, Jane Sheila Higino, Arquimedes Fernandes Monteiro de Melo**

***Recebido em 15/05/2010, Aceito em 24/08/2010***

**RESUMO:** A *Vitex agnus castus* Linn. é uma planta pertencente à família Verbenaceae destaca-se por seu uso na medicina popular para o tratamento de doenças reumáticas e disfunções femininas, principalmente. Também é utilizada em rituais afro-brasileiros com o objetivo afastar mau-olhado, maus espíritos, entre outros. Este trabalho teve como objetivo realizar ensaios toxicológicos pré-clínicos do extrato bruto seco (EBS) das folhas dessa planta em ratos. Inicialmente foram feitas a coleta, identificação e a obtenção do extrato. Determinou-se a CL<sub>50</sub> utilizando o microcrustáceo *Artemia salina* Leach, as quais foram expostas por 24h às diferentes concentrações do EBS. Para realização do ensaio toxicológico agudo, administrou-se uma dose única de 4 g/kg v.o. de EBS a grupos de ratos Wistar. Após um período de 14 dias, sacrificou-se os animais e coletou-se o sangue para análises bioquímicas e hematológicas. Diante dos resultados concluiu-se que esta planta não apresentou toxicidade aguda significativa para os parâmetros analisados.

**Palavras-chave:** *Vitex agnus castus* Linn., toxicologia, fitoterapia.

**ABSTRACT:** The *Vitex agnus castus* Linn. is a plant belonging to the family Verbenaceae and it is distinguished by its use in folk medicine for treating rheumatic diseases and dysfunctions in women, mostly. It is also used in Afro-Brazilian rituals, aiming to ward off the evil eye and evil spirits, among others. This study aimed to perform toxicological preclinical essays of the dry crude extract (EBS) of leaves of this plant in rats. Initially, the leaves were collected, identified, and then the extract was obtained. CL<sub>50</sub> was determined using *Artemia salina* Leach samples, which were exposed during 24 h to different concentrations of EBS. To perform the acute toxicological tests a single dose of 4 g/kg oral EBS was administered to groups of Wistar rats. After a period of 14 days the

animals were sacrificed and their blood was collected in order to perform biochemical and hematological analyses. Considering the results one may conclude that this plant did not show acute significant toxicity regarding the parameters analyzed.

**Keywords:** *Vitex agnus castus* Linn, toxicology, phytotherapy.

## INTRODUÇÃO

O Brasil tem o maior número de espécies vegetais de todo o planeta, dentre as já estudadas; parte significativa tem importância econômica, alimentar ou medicinal, e muitas têm um potencial tóxico (ANDRADE, 2001).

Comparando com animais, plantas são bioquimicamente avançadas, produzindo todas as moléculas requeridas para o seu metabolismo primário (respiração, fotossíntese, proteínas, lipídios, síntese de ácidos nucleicos). As plantas têm desenvolvido uma incrível disposição para produzir componentes secundários, que têm um papel de defesa, de armazenamento e outras funções. Para lidar com diferentes tipos de herbívoros e suas diferenças alimentares, muitas plantas têm diversificado seus arsenais químicos, produzindo mais de um tipo de toxinas ao mesmo tempo. Os alvos variam. Os componentes podem ser venenosos para sistema nervoso central, coração, fígado, podem impedir o funcionamento dos rins, perturbar a coagulação sanguínea ou causar anemia, interferir no metabolismo do iodo, causar alterações gastrintestinais, bloquear enzimas respiratórias fundamentais e atuar como carcinógenos. Em outros casos, o simples contato com a planta pode

produzir reações alérgicas severas e reações na pele (PIP, 2006).

O emprego de plantas no combate a enfermidades é uma tradição que tem uma longa história, remontando aos períodos mais longínquos da humanidade. A fitoterapia empírica esteve sempre ligada a sociedades primitivas, vinculando-se a sistemas religiosos e a ritos mágicos (MATOS, 1982; ELISABETSKY, 1997; ALBUQUERQUE, 1997; ALBUQUERQUE; CHIAPPETA, 1994).

No Brasil, é comum a existência de feiras livres que comercializam produtos feitos com ervas e extratos naturais (com composição não padronizada), o que, associado à suscetibilidade dos indivíduos, agrava o quadro de acidentes por plantas tóxicas.<sup>1</sup> Para comprovação e avaliação das plantas utilizadas na medicina popular, instituições de ensino e pesquisa têm realizado ensaios farmacológicos e toxicológicos. No Brasil, as normas para a realização de ensaios toxicológicos estão contidas na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n. 48/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e na Resolução Específica (RE) n. 90/2004, que padroniza os ensaios toxicológicos pré-clínicos (ANVISA, 2004a, 2004b).

*Vitex agnus castus* L. é um arbusto bastante ramificado com folhas fortemente aromáticas, digitadas, opostas e flores labiadas, violáceas, em cachos terminais. Floresce no verão e desenvolve frutos de coloração marrom, quase preta, com cerca de 3,5 mm de diâmetro. Pode alcançar de 2 a 3 metros de altura. Os frutos têm aroma e sabor semelhantes à pimenta quando maduros e secos. Pertence à ordem *Lamiales*, à família *Verbenaceae*, que possui aproximadamente 100 gêneros e 2.600 espécies; o gênero *Vitex* possui aproximadamente 250 espécies. São naturais da região do Mediterrâneo e da Crimeia, sendo encontradas também em regiões quentes da Ásia, África e Américas (MAIA et al., 2001).

A maioria dos estudos clínicos com *Vitex agnus castus* foram realizados com a tintura obtida a partir dos frutos. Os textos médicos e monografias da Europa citam essa preparação como "ativa farmacologicamente". Essa é uma indicação de que a atividade medicinal do fruto foi examinada como um todo, e que compostos ativos específicos ainda não foram isolados (AMANN, 1982; FERREIRA, 1998; LAURITZEN et al., 1997; LOCH; SELLE; BOBLITZ, 2000; LUCKS; SORENSEN. VEAL, 2002; OHYAMA et al., 2003; ZWAVING ; BOS, 1996; WUTTKE et al., 2003). Postula-se que a *Vitex agnus castus* seja eficaz no tratamento de mastalgia cíclica inibindo a liberação excessiva de prolactina por bloqueio do receptor dopaminérgico tipo-

2 na hipófise (CARMICHAEL, 2010). Na China, a *vitex* é utilizada com sucesso na prevenção e tratamento de TPM (tensão pré-menstrual) moderada a severa (HE et al., 2009). O extrato aquoso e em diclorometano também apresenta potencial atividade antioxidante haja vista a elevada concentração de compostos fenólicos e flavonoides, respectivamente (SARIKURKCU et al., 2009).

Este trabalho se propõe a realizar uma avaliação da toxicidade do extrato bruto seco da *Vitex agnus castus*, com o objetivo de gerar dados que permitam uma análise dos riscos do uso popular.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **1 Material vegetal e seu extrato bruto**

Coletaram-se folhas da planta *Vitex agnus castus* Linn., no bairro de cidade universitária, Recife, Pernambuco as quais foram encaminhadas ao Herbário do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco para serem identificadas e catalogadas sob o número de cadastro 44487. O material foi seco a sombra em temperatura ambiente durante oito dias. Em seguida foram colocadas em estufa de fluxo de ar forçado a 40°C, para secagem. Posteriormente, foram trituradas até atingirem baixa granulometria. O pó foi submetido a uma infusão em um litro de água destilada, após a fervura (100°C) foi vertido o líquido sobre um béquer contendo 20 g

de pó da planta, e feita homogeneização. Cobriu-se com papel alumínio, e a solução permaneceu em repouso até chegar à temperatura ambiente (25°C). Após esse período, filtrou-se o sobrenadante em papel filtro do tipo coador descartável. O filtrado foi colocado em rotaevaporador a 50°C até a secura. O extrato seco foi transferido para um dissecador contendo cristais de sílica ativada. Obtendo-se um extrato seco com rendimento de 99,5% sobre o peso seco da planta processada (MALES, 1998; HALASKA et al., 1999; LOCH; SELLE; BOBLITZ, 2000).

## 2 Animais

Empregaram-se ratos Wistar, albinos (*Rattus norvegicus*), adultos, machos e fêmeas (núlpara e não grávidas), pesando entre 200 e 300 gramas para o teste toxicológico agudo, adquiridos do Biotério do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco com 70 dias de vida. Todos foram agrupados em gaiola de polietileno, contendo seis animais cada, mantidos em condições controladas de temperatura (22°C ± 2°C), ciclo claro-escuro de 12 h, tendo acesso a comida tipo *pellets* de ração Purina e água potável em garrafas graduadas de polietileno. O Biotério mantém cadastro no COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), apresenta veterinário como responsável técnico pelo setor. O protocolo experimental foi

aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE, processo n. 23076.009417/2008-15.

## 3 Toxicidade aguda

Os protocolos experimentais foram orientados pelas normas vigentes no país e por obras de referência (BARROS; DAVINO, 2003; ANVISA, 2004a, 2004b). Quatro grupos de animais (n=24) foram utilizados. Os grupos A e B receberam o EBS dissolvido com soro fisiológico, por via oral, por meio de cânula, na dose de 4 g/kg de peso. Os grupos C e D, grupos controle, receberam apenas o veículo, soro fisiológico. Os ratos (*Rattus norvegicus*) foram observados durante 48 h, e, no fim desse período, foi registrada a mortalidade de cada grupo.

Após 14 (quatorze) dias da administração da dose de 4 g/Kg, todos os animais foram previamente anestesiados com Ketamina e Xilasina e sacrificados; então, foram examinados macroscopicamente, com ressecção e pesagem consecutiva de baço, coração, fígado e rins (seccionados por incisão sagital). As secções teciduais dos órgãos excisados, fixados em formalina tamponada, após 24 h, foram resseccionados para processamento histopatológico: desidratação com séries crescentes de álcool (70° a 100°), a diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina, segundo métodos habituais. Em micrótomo, aos fragmentos tissulares foram seccionados em espessura de 3,0 µm e

subseqüentemente submetidos à coloração hematoxilina-eosina e tricômico de Masson, e examinados ao microscópio óptico.

#### **4 Determinação da CL<sub>50</sub> com *Artemia salina* Leach**

Determinou-se a Concentração Letal para 50% da população (CL<sub>50</sub>) utilizando o microcrustáceo *Artemia salina* Leach. Os metanúplios da *Artemia salina* Leach foram obtidos por meio da eclosão em água do mar de 25 mg de cistos incubados sob luz. Foram preparadas em triplicatas as seguintes concentrações de EBS: 1.000 µg/ml, 750 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 100 µg/ml e 50 µg/ml. Em cada tubo colocou-se 10 a 12 *Artemia salina* Leach. Após 24 h de exposição, fez-se a leitura de quantas morreram por tubo e os valores foram lançados no programa PROBITOS que, por meio de uma equação  $Y = ax + b$ , fornece a CL<sub>50</sub>.

#### **5 Avaliação laboratorial do sangue**

Após 14 dias da administração da dose de 4 g/kg, foram coletadas amostras de sangue intraventricular de todos os animais, machos e fêmeas, dos grupos tratados com EBS e dos grupos controle. O sangue foi coletado em tubos contendo anticoagulante EDTA, para avaliação de parâmetros hematológicos (hemograma completo e contagem de plaquetas) e em tubos contendo gel separador, que foram centrifugados por 10 minutos a 3.500 rpm, para obtenção

do soro, destinado a análise bioquímica (glicose, ureia, creatinina, transaminases AST e ALT, colesterol, triglicerídios, ácido úrico, fosfatase alcalina, proteínas totais e frações, sódio, potássio, magnésio).

#### **6 Microscopia óptica**

A citologia sanguínea é geralmente estudada em esfregaços preparados pelo espalhamento de uma gota de sangue sobre uma lâmina. Dessa forma, as células ficam estiradas, o que facilita a observação de sua estrutura. Após a fixação, os esfregaços sanguíneos foram submetidos à coloração do tipo Romanowsky.

#### **7 Análise estatística**

Os resultados numéricos foram expressos em média aritmética ( $\pm$  erro padrão). As diferenças entre grupos foram determinadas por meio do Teste t. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ .

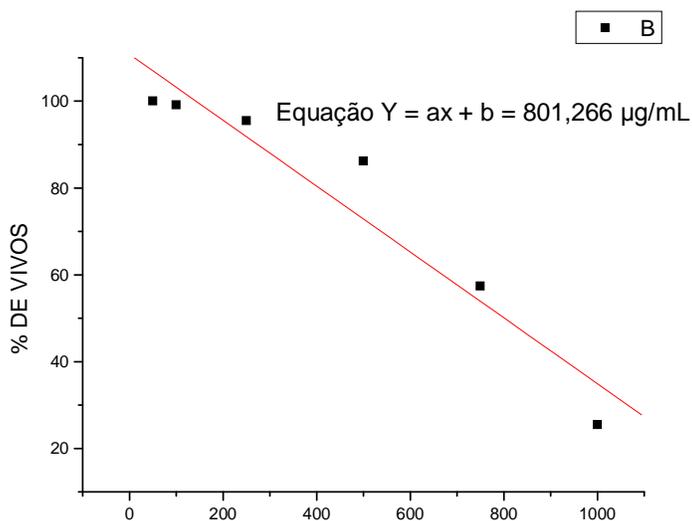
## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **1 Determinação da CL<sub>50</sub> com *Artemia salina* Leach**

A determinação da CL<sub>50</sub> que é realizada por meio do uso de metanúplios de *Artemia salina* Leach, fornece um indicativo do nível de toxicidade de uma determinada substância. A literatura refere-se que uma CL<sub>50</sub> inferior a 1.000 µg/mL, apresenta uma potencial toxicidade para os organismos que possam ser expostos

a ela. Esta metodologia que utiliza *Artemia salina* Leach forneceu uma  $CL_{50}$  de 801,266  $\mu\text{g/mL}$  para *Vitex agnus castus* Linn. Os valores obtidos são

próximos a 1.000  $\mu\text{g/mL}$ , indicando uma baixa toxicidade para esta planta (Figura 1).



**Figura 1:** Curva CONCENTRAÇÃO  $\mu\text{g/mL}$  Concentração-Resposta da toxicidade do extrato aquoso de *Vitex agnus castus* Linné sobre *Artemia salina* Leach.

## 2 Determinação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos

Após 14 dias de administração do EBS da *Vitex agnus castus* Linn, dissolvido em água destilada (4 g/kg) foram feitos os exames hematológicos (Tabela 1), cujas comparações com os

animais controle não mostraram mudanças significativas para nenhum item considerado. Mesmo observando valores diferenciados em alguns itens como plaquetas e linfócitos, ambos não apresentaram significância estatística. Considerando os resultados obtidos na

avaliação dos parâmetros bioquímicos (Tabela 2), podemos observar que também não houve alterações significativas relacionadas ao grupo controle excetuando-se a AST (aspartato transaminase) o que indica uma alteração hepática. As transaminases existem em concentrações muito pequenas no sangue e são liberadas pelos hepatócitos quando estes sofrem algum tipo de injúria. Os aumentos nos níveis plasmáticos de ALT observados em nosso estudo foram estatisticamente significativos em relação ao grupo controle. Porém, a alteração da AST apresentou aumento estatisticamente significativo para as fêmeas. Devido ao

fato de a AST ser essencialmente mitocondrial e não somente hepática como a ALT, a alteração nos seus níveis pode sugerir alterações em outros órgãos como rins, pulmões e coração. Contudo, o resultado já era esperado, pois a dose aplicada foi extremamente elevada, chegando a 150 vezes a dose usual. Isso é preconizado pela legislação, já que essa fase aguda é chamada fase de segurança e temos que testar a relação dose-efeito tóxico. Considerando que a dose administrada foi elevadíssima, fez-se desnecessária a administração de outras doses para o ensaio agudo, salvo se houvesse dano ou morte nos animais expostos.

**Tabela.1 – Efeito do EBS da *Vitex agnus castus* Linn. (4 g/kg) por via oral sobre os parâmetros hematológicos em ratos Wistar adultos tratados com dose única**

Parâmetros hematológicos	Controle		Tratados	
	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Hemácias ( $10^6/\text{mm}^3$ )	8,2 ± 0,3	7,9 ± 0,25	8,6 ± 0,44	8 ± 0,14
Hemoglobina (g/dl)	15,8 ± 0,6	15,4 ± 0,6	15,5 ± 0,7	15,6 ± 0,4
Hematócrito (%)	44,9 ± 1,8	43,5 ± 1,6	45,88 ± 2,34	43,4 ± 1,3
VCM (fL)	54,8 ± 1,14	54,5 ± 0,6	53,4 ± 0,9	53,7 ± 0,9
HCM (pg)	19,3 ± 0,5	19,3 ± 0,3	18,1 ± 0,4	19,4 ± 0,3
CHCM (g/dL)	35,2 ± 0,4	35,4 ± 0,3	35,9 ± 0,4	36,1 ± 0,7
Leucócitos ( $10^3/\text{mm}^3$ )	4,44 ± 0,87	5,82 ± 0,62	5,5 ± 0,42	3,67 ± 0,49
Neutrófilos (%)	32,25 ± 7,58	23,5 ± 4,65	30 ± 2,64	14,4 ± 4,12
Eosinófilo (%)	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
Monócitos (%)	1,4 ± 0,54	1,25 ± 0,5	6,5 ± 0,7	1,25 ± 0,5
Linfócitos (%)	74,25 ± 7,67	73,8 ± 5,8	68,25 ± 5,31	81,4 ± 3,43
Plaquetas ( $10^6/\text{mm}^3$ )	704,8 ± 57,77	761,25 ± 52,32	905,7 ± 59,4	714,7 ± 61,3

Os valores representam as médias ± e.p.m. de 6 animais. "t" de Student  $p < 0,05$  de probabilidade. VCM: Volume Corpuscular Médio; HCM:

Hemoglobina Corpuscular Médio; CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Médio.

**Tabela.2 – Efeito da *Vitex agnus castus* Linn. (4 g/kg) por via oral sobre os parâmetros bioquímicos em ratos Wistar adultos tratados com dose única**

Parâmetros Bioquímicos	Controle		Tratados	
	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Glicose (mg/dL)	156,37 ± 13	187,6 ± 11,67	148,8 ± 13,8	169,92 ± 11,75
Ureia (mg/dL)	49,8 ± 4,9	47,06 ± 6,89	44,8 ± 2,4	46,2 ± 2,35
Creatinina (mg/dL)	0,5 ± 0,06	0,52 ± 0,04	0,5 ± 0	0,52 ± 0,04
Colesterol (mg/dL)	61,76 ± 4,61	90,66 ± 9,74	59,5 ± 6,2	86,2 ± 6,9
Triglicédeos (mg/dL)	84,72 ± 27,16	44,4 ± 11,1	91,4 ± 29,2	47,7 ± 13,9
AST (U/L)	171 ± 34,78	117,5 ± 22,64	178,3 ± 30,9	159,5 ± 18,7
ALT (U/L)	70,4 ± 11,14	55,8 ± 7,85	60,3 ± 10,4	59,2 ± 7,3
Proteínas totais	6,6 ± 0,15	7,05 ± 0,17	6,45 ± 0,15	6,88 ± 0,2
Sódio (mEq/L)	146,9 ± 1,4	145,6 ± 1,4	145,3 ± 0,51	143,9 ± 0,9
Potássio (mEq/L)	4,4 ± 0,8	4,4 ± 0,8	4,3 ± 0,2	4,02 ± 0,52
Cálcio (mEq/L)	10,9 ± 1,0	11,6 ± 1,8	10,44 ± 0,31	10,2 ± 0,28
Magnésio (mEq/L)	21,6 ± 0	21,6 ± 0	21,6 ± 0	21,6 ± 0
Albumina (g/dL)	3,6 ± 0,1	3,7 ± 0,18	3,6 ± 0,1	3,8 ± 0,07

Os valores representam as médias ± e.p.m. de 6 animais. "t" de Student p<0,05 de probabilidade. AST:Aspartato aminotransferase; ALT: Alanina aminotransferase.

## CONCLUSÃO

Baseado em nossos resultados podemos concluir que o EBS da *Vitex agnus castus* Linn apresenta baixa toxicidade por via oral. De maneira geral, a sua administração aguda por essa via não produziu efeitos tóxicos sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratos de ambos os sexos. Considerando que a dose administrada foi elevadíssima (4 g/kg), fez-se desnecessária a administração de outras doses para o ensaio agudo, visto que não houve dano ou morte nos animais expostos.

Apesar de haver flutuações nos resultados bioquímicos e hematológicos não tiveram indicativo de importância clínica excetuando-se os níveis de AST em fêmeas. O estudo histopatológico não apresentou nenhuma alteração na arquitetura dos tecidos estudados que foram coração, fígado, rim e pulmão.

Dessa forma, essa planta pode se transformar em um medicamento potencial, sendo necessário outros estudos para aprofundar as potencialidades terapêuticas e tóxicas da *Vitex agnus castus* Linn.

## REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Resolução RDC n. 48/04. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 2004a.

\_\_\_\_\_. Resolução RE n. 90/04. Determina a publicação do "Guia para a Realização de Estudos de Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápicos". *Diário Oficial da União*, Brasília, 2004b.

ALBUQUERQUE UP. Etnobotânica de uma bebida cerimonial no nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Farmácia*, 1997, 78(4): 86-89.

ALBUQUERQUE UP, CHIAPPETA AA. O uso de plantas e a concepção de doença e cura nos cultos afro-brasileiros. *Ciência e Trópico*, 1994, 22(2).

AMANN W. Amenorrhea. Favorable effect of Agnus castus (Agnolyt) on amenorrhea. *ZFA*, Stuttgart, 1982, 58(4): 228-231.

ANDRADE AA, CAMPOLINA D, DIAS MB. *Toxicologia na prática clínica*. Belo Horizonte: Folium, 2001.

BARROS SBM, DAVINO SC. Avaliação da toxicidade. In: OGA, Seizi. *Fundamentos de toxicologia*. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 57-67.

CARMICHAEL AR. Can vitex agnus castus be used for the treatment of mastalgia? What is the current evidence? *eCAM*, 2008, 5(3): 247-250.

ELISABETSKY E. Etnofarmacologia de algumas tribos brasileiras. In: RIBEIRO, D. (Ed.). *Suma etnológica Brasileira*. Petrópolis: Vozes, 1997. (Coleção Etnobiologia, n. 1).

FERREIRA SH. (Org.). *Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil*. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1998.

HALASKA M et al. Treatment of cyclical mastalgia with a solution containing a Vitex agnus castus extract: results of a placebo-controlled double-blind study. *The Breast*, 1999, 8: 175-181.

HE ZHONG et al. Treatment for premenstrual syndrome with Vitex agnus castus: a prospective, randomized, multi-center placebo controlled study in China. *Maturitas*, 2009, 63(1): 99-103.

LAURITZEN C et al. Treatment of premenstrual tension syndrome with vitex agnus-castus. Controlled, double-blind study versus pyridoxine. *Phytomedicine*, 1997, 4: 183-189.

LOCH EG, SELLE H, BOBLITZ N. Treatment of premenstrual syndrome with a phytopharmaceutical formulation containing Vitex agnus-castus. *J. Womens Health Gen Based Med.*, 2000, 9: 315-320.

LUCKS BC, SORENSEN J, VEAL L. *Vitex agnus-castus* essential oil and menopausal balance: a self-care survey. *Complementary Therapies in Nursing & Midwifery*, 2002, 8: 148-154.

MAIA ACCM et al. *Vitex agnus castus* L.: Um estudo etnobotânico e etnofarmacológico, *Revista Virtual de Iniciação Acadêmica da UFPA*. 2001. Disponível em: <[http://www.ufpa.br/rcientifica/ed\\_anteriores/pdf/ed\\_02\\_accmm.pdf](http://www.ufpa.br/rcientifica/ed_anteriores/pdf/ed_02_accmm.pdf)>. Acesso em: 28 dez. 2010.

MALES Zeljan. Determination of the content of the polyphenols of *Vitex agnus castus* L. *Acta Pharm.*, 1998, 48: 215-218.

MATOS A. Aproveitamento de plantas medicinais da região Nordeste. *Rev. Bras. de Farmacologia*, 1982, 132-140.

OHYAMA K et al. Cytotoxicity and apoptotic inducibility of *vitex agnus-castus* fruit extract in cultured human normal and cancer cells and effect on growth. *Biol. Pharm. Bull.*, 2003, 26(1): 10-18.

Barros, J. D., Filho, S. S., Castro, V., Torres, V. M., Higino, J. S., Melo, A. F. M./ Revista Eletrônica de Farmácia Vol 7 (3), 62 – 71, 2010

PIP E. Toxic plants in Prairie Garden, *Prairie Garden Annual*, 2006, 133-138.

SARIKURKCU Cengiz et al. Studies on the antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of vitex agnus castus L. fruits from Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 2009, 47(10): 2479-2483.

WUTTKE W et al. Chaste tree (*Vitex agnus-castus*) – Pharmacology and clinical indications. *Phytomedicine*, 2003, 10: 348-357.

ZWAVING JH, BOS R. Composition of the essential fruit oil of *Vitex agnus castus*. *Planta Medica*, 1996, 62(1): 83-84.