

# Efeito citotóxico do infuso aquoso de *Psidium guajava* L. (Myrtaceae)

## Cytotoxic effect of *Psidium guajava* L. (Myrtaceae)

Kelly Costa de Almeida<sup>1</sup>; Thiago Rodrigues Barbosa<sup>1</sup>; Rodrigo Nunes Rodrigues da Silva<sup>1</sup>; Deise da Silva Jacques<sup>2</sup> & Ronald Bastos Freire<sup>3</sup>

**RESUMO** – A citotoxicidade de infusos de *Psidium guajava* foi avaliada em monocamadas de macrófagos peritoniais de camundongos albinos através do ensaio de exclusão do azul de Trypan. Infusões aquosas foram preparadas e testadas tanto imediatamente, quanto 48 após estocagem a 4°C. Somente as preparações que foram estocadas mostraram-se tóxicas, matando 31,82% das células após 60 minutos de exposição.

**PALAVRAS-CHAVE** – *Psidium guajava*, efeitos tóxicos, plantas medicinais.

**SUMMARY** – The cytotoxicity of the aqueous *Psidium guajava* leaf-infusion was evaluated in monolayers of albino mice macrophages by means of Trypan blue exclusion assay. Aqueous infusions were prepared and tested immediately after preparation, as well as after 48 hours at 4°C storage. A high toxicity (31.82%) was demonstrated after 60 minutes exposure only in cells treated with the previously kept infusion.

**KEYWORDS** – *Psidium guajava*, toxic effects, medicinal plants.

## INTRODUÇÃO

Nos dias atuais, o uso de produtos naturais tem sido cada vez mais difundido, por conta da facilidade com que são obtidos (não carecem de registro ou prescrição médica) e por acreditar-se que os mesmos são inócuos e não representam riscos à saúde.

Por conta disso, o uso indiscriminado de medicamentos, independentemente da origem, tem ocasionado problemas toxicológicos de grande monta (Patel *et al*, 2004). Uma vez que as intoxicações por medicamentos são a segunda maior causa de acidentes com êxito letal, no Brasil, somente ficando atrás de acidentes causados por animais peçonhentos (De Alcântara, 1985; Cardoso *et al*, 2003), é de extremo interesse que se realizem estudos sobre o potencial tóxico de plantas popularmente consideradas como detentoras de potencial medicamentoso.

Experimentos recentes têm demonstrado que existem constituintes tóxicos presentes, ao lado de substâncias reconhecidamente benéficas em vários exemplares de plantas medicinais.

Desta forma, a origem geográfica, o ambiente, a espécie, ou mesmo as variedades de muitas das plantas medicinais poderão conter diferentes proporções de substâncias tóxicas que diminuem o potencial medicamentoso popularmente atribuído às mesmas (Daniel *et al*, 2004).

Entre as plantas amplamente utilizadas com fins terapêuticos em nosso País, destaca-se a goiabeira (*Psidium guajava*), para a qual popularmente não se atribui nenhuma contra-indicação. Existem relatos de que

esta planta, independentemente da variedade, origem geográfica, ou estação do ano, protege contra problemas diarreicos (Almeida, 1995), tais como a desenteria e a gastrenterite bacteriana. Existem sugestões de que as folhas e caules de goiabeira (guava) contém substâncias capazes de exercer efeito antimicrobiano contra *Staphylococcus*, *Shigella*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Escherichia coli*, *Clostridium*, e *Pseudomonas*, diferentes gêneros de fungos, leveduras (cândida), amebas e *Plasmodium* (Taylor, 2004).

Estudos realizados com extratos aquosos e infusos de folhas de guava reportam efeitos de bio-proteção contra radicais livres, além de efeitos cardiotônicos, analgésico, sedativo, depressor do sistema nervoso central e antitússico (Lutterodt, 1988; Jaiarj, 1999; Tona, 1998, 2000; Shaheen, 2000; Arima, 2001; Jimenez-Escrig, 2001; Garcia, 2002; Nundkumar, 2002).

As atividades medicinais dos extratos aquosos de folhas de guava são atribuídas à presença de flavonóides, tais como a quercetina, o kaempferol e a miricetina (Taylor, 2004).

Popularmente, prepara-se o chá a partir de folhas ainda verdes e guarda-se na geladeira para que o mesmo possa ser ingerido, de forma continuada, até que os sintomas diarreicos deixem de existir.

Apesar disso, existem experimentos que demonstram que esses flavonóides podem ser tóxicos para células de mamíferos em concentrações bastante reduzidas.

Canada e colaboradores (1989), observou que a viabilidade de enterócitos de cobaias expostos a 0,45mM de quercetina e miricetina caiu entre 12 e 60%, com

Recebido em 11/5/2006

<sup>1</sup>Bolsista de Iniciação Científica pelo CNPq; <sup>2</sup>Bolsista de Doutorado - CAPES, Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias;

<sup>3</sup>Autor Correspondente - Imunotoxicologia- DBA- IB-UFRJ/BR - BR 465 Km 7, Seropédica, RJ - CEP 23 890 000 e. mail. rbfreire@ufrj.br

desestruturação de 60-70% das membranas celulares em 3 horas de exposição, pela geração de peróxido de lipídeos. Esses autores sugeriram que esses efeitos tóxicos sobre as células intestinais, seriam os responsáveis pela paralisação do metabolismo intestinal que determina os efeitos antidiarréicos e neurodepressivos etnologicamente observados após a ingestão de infusões de folhas de *P. guajava*.

De outro modo, tais efeitos justificam contra-indicações ao uso continuado de folhas de *P. guajava*, com risco para pacientes cardíacos, por conta de efeitos aditivos que potencializam medicamentos dirigidos a arritmias cardíacas. Além disso, os potentes efeitos hipoglicemiantes de extratos dessa planta contraindicam-na para aqueles que sofrem de hipoglicemia (diabéticos não compensados, por exemplo) que podem desenvolver hipoxia cerebral e coma (Roman-Ramos *et al*, 1995).

O presente trabalho foi realizado com o intuito de verificar os efeitos imunotóxicos de infusos de folhas de *P. guajava* sobre macrófagos peritoneais de camundongos albinos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Folhas de *P. guajava* foram colhidas no Campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), no mês de setembro de 2004. As folhas foram lavadas com água destilada, secas entre folhas de papel absorvente. Foram pesadas 100 gramas de folhas verdes, sobre as quais adicionaram-se de 1000mL de água recém destilada previamente aquecida (80-90°C). O chá (infuso a 10%) foi deixado em repouso à temperatura ambiente, sendo, em seguida, esterelizado por filtração através de membrana Millipore 0,22 $\mu$ m e estocado a -20°C para uso posterior.

Lavados peritoneais, obtidos a partir de camundongos albinos (SW), machos, pesando em torno de 15g, foram convenientemente processados de forma a originar macrófagos peritoneais, de acordo com a metodologia descrita por Hercowitz e colaboradores (1981). Cultivos contendo 10<sup>-6</sup> macrófagos peritoniais por mL de meio TC199 (Difco, Inglaterra), foram adicionados de 100 $\mu$ l do infuso, na diluição final de 1,0g (p/v), em meio de cultivo, e mantidos a 37°C.

Em intervalos entre zero e 120 minutos, foram retiradas alíquotas para a realização do ensaio de viabilidade celular, pelo método de exclusão do azul de Trypan de acordo com a metodologia descrita por Gad (2000).

As alíquotas foram adicionadas de azul de Trypan (6mM/mL) a 0,1% e observadas ao microscópio óptico comum.

A morte celular foi estabelecida através de contagem hemocitométrica, com base nas diluições do extrato realizadas, em relação aos controles não adicionados de extrato.

O experimento foi repetido, partindo-se de infusos mantidos a uma temperatura de  $\pm$  4°C, por 48 horas, com a finalidade de estudar possíveis efeitos tóxicos decorrentes da oxidação e geração de derivados tóxicos decorrentes da provável instabilidade das substâncias presentes nos infusos.

Todos os ensaios foram realizados com 10 repetições. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  o erro padrão (SEM). Os valores médios dos resultados foram analisados estatisticamente pela análise unidi-

dimensional de variâncias (one-way ANOVA). Os dados foram correlacionados de modo binominal, através do coeficiente de Tuckey ( $p < 0,5$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A adição do infuso, logo após seu preparo, originou 10% de células mortas, não sendo, portanto significativamente mais tóxico que o veículo (RPMI-1640), cujo índice de letalidade foi de 6,98%.

De outro modo, após armazenamento por 48 horas, o mesmo infuso mostrou-se tóxico para 31,82% das células expostas por 60 minutos.

Após 48 horas, observou-se uma letalidade equivalente a 76,18% após 60 minutos de exposição (Figura 1).

O extrato aquoso bruto, obtido por infusão de folhas verdes de *P. guajava* apresentou grandes quantidades de substâncias aromáticas e termolábeis, entre elas saponinas. Provavelmente, a presença de substâncias oxidadas decorrentes da produção de radicais livres tenha originado derivados tóxicos que não estariam presentes no chá recém-preparado.

As substâncias aromáticas, mesmo que inativadas pelo aquecimento, podem originar derivados tóxicos em decorrência dos processos enzimáticos de degradação crescente que as mesmas sofrem em decorrência do tempo de estocagem (Canada *et al*, 1989).

Isto explicaria a razão pela qual, outros pesquisadores testando diferentes concentrações de extratos foliares de *P. guajava*, não conseguiram determinar uma dose tóxica para extratos foliares aquosos recém preparados (Martomez *et al*, 2001).

Esses dados corroboram com achados anteriores (Canada *et al*, 1989; Ruiz-Martinez *et al*, 1995), e sugerem que os efeitos biológicos observados seriam decorrentes da oxidação de flavonóides, com a geração de derivados capazes de originar radicais livres e, com isso, causar os efeitos tóxicos observados.

A presença de derivados, ou a formação de complexos moleculares com princípios ativos vegetais levando a efeitos indesejáveis, parece ser uma constante em relação a diversas plantas medicinais.

O ginseng, por exemplo, é considerado uma panacéia, mas pode conter ginsenosídeos tóxicos que, igualmente, o contra-indicam para grávidas, diabéticos e cardíacos (Daniel *et al*, 2004).

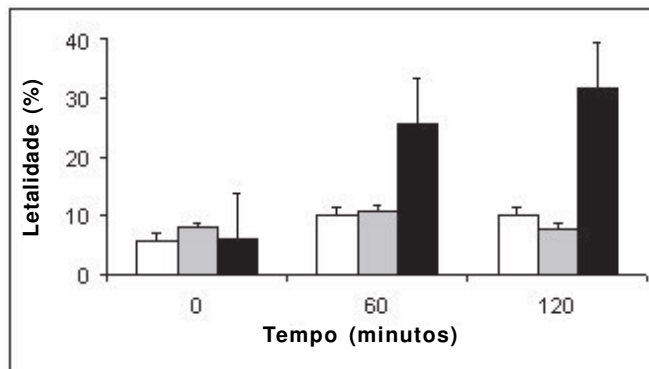


FIG. 1 - Efeito do tempo de estocagem em na toxicidade de 100 $\mu$ g de infusão de *P. guajava* sobre 10<sup>6</sup> macrófagos peritoniais de camundongos Suíço Albinos em diferentes intervalos de tempo. As barras brancas representam o controle não tratado; as barras cinzas representam os tratamentos efetuados com o chá recém preparado; as barras negras representam os tratamentos efetuados com o chá após estocagem por 48 horas a 4  $\pm$  1°C. Os resultados são a média de 10 repetições  $\pm$  erro padrão.  $P < 0,05$ .

Finalmente, podemos concluir que os usos indiscriminados de infusos de *P. guajava*, baseados unicamente na indicação popular para o consumo consecutivo de chás oriundos de folhas verdes, são potencialmente tóxicos e podem causar prejuízos a crianças, gestantes, lactentes, diabéticos, cardíacos e indivíduos que apresentem debilidade metabólica, carecendo de controle e indicação profissional especializada e regulamentação por parte das autoridades sanitárias nas localidades onde esta planta é utilizada.

*Psidium guajava* não se trata de uma planta que apresente toxidez quando preparada para um simples chá: porém, seu armazenamento para uso posterior, pode representar risco de intoxicação, o que a torna contra-indicada para uso doméstico. Estudos mais detalhados fazem-se necessários para que os fatores que determinam a presença de indutores de radicais livres e toxidez sejam determinados para que se possa garantir a segurança de seu emprego medicinal.

### REFERÊNCIAS

1. Alcântara, H.R. *Toxicologia clínica e forense*. Rio de Janeiro: Editora Andrey, 1985, 427 p.
2. Almeida, C. E. "Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine." *Rev. Saude Publica*. 1995, v. 29, n. 6, p. 428-33.
3. Arima, H. "Isolation of antimicrobial compounds from guava (*Psidium guajava* L.) and their structural elucidation." *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2002; 66(8): p.1727-30.
4. Canada A. T., Watkins W. D. And Nguyen T. D. The toxicity of flavonoids to guinea pig enterocytes *Toxicology and Applied Pharmacology* 1989, v. , p. 357- 61 .
5. Cardoso, J. L.C., França, F.O.S., Wen, F.H., Malaque, C.M.S., Haddaad-Junior, V. *Animais peçonhentos no Brasil*. São Paulo: Editora Sarvier, 2003, 468 p.
6. Gad, S.C. *In vitro toxicology*. 2<sup>nd</sup> ed., New York: Taylor & Francis, 2000, 410p.
7. Garcia, S. "Inhibition of growth, enterotoxin production, and spore formation of *Clostridium perfringens* by extracts of medicinal plants." *J. Food Prot.* 2002, v. 65, n.10, p. 1667-9.
8. Hercowitz, H.V., Holden, H.T., Bellanti, J.A., Ghaffar, A. *Manual of macrophage methodology: collection, characterization and function*. New York: Marcel Dekker, INC., 1981, 531 p.
9. Jaiarj, P. "Anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* Linn. leaf extract." *J. Ethnopharmacol.* 1999, v. 67, n.2, p.203-12.
10. Jimenez-Escrig, A. "Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber." *J Agric. Food Chem.* 2001; v. 49, n. 11, p. 5489-93.
11. Lutterodt, G. D. "Effects on mice locomotor activity of a narcotic-like principle from *Psidium guajava* leaves." *J. Ethnopharmacol.* 1988, v.24, n. 2-3, p. 219-31.
12. Nundkumar, N. "Studies on the antiplasmodial properties of some South African medicinal plants used as antimalarial remedies in Zulu folk medicine." *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.* 2002, v. 24, n. 7, p. 397- 01.
13. Patel R. J., Saylor T., Williams S. R. and Clark R. F. Prevalence of autonomic signs and symptoms. *Journal of Emergency Medicine*. 2004, v 26, n. 1, p. 89-94.
14. Roman-Ramos R., Flores-Saenz J. L. and Alarcon-Aguilar F. J. 1995. Anti-hyperglycemic effect of some edible plants. *J. Ethnopharmacol.* , v. 48, n. 1, p.219-231.
15. Shaheen, H. M. "Effect of *Psidium guajava* leaves on some aspects of the central nervous system in mice." *Phytother. Res.* 2000, v. 14, n.2, p.107-11.
16. Tona, L. "Antiamoebic and spasmolytic activities of extracts from some antidiarrhoeal traditional preparations used in Kinshasa, Congo." *Phytomedicine* 2000, v. 7, n.1, p.31-8.
17. Tona, L. "Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants." *J. Ethnopharmacol.* 1998, v. 61, n. 1, p. 57-65.