

ESTUDO DO EXTRATO DE *RHIZOPHORA MANGLE* E SEUS EFEITOS *IN VITRO* SOBRE A ATIVIDADE DA 7-ETOXIRESORUFINA-O-DESETILASE (EROD) MICROSSOMAL HEPÁTICA EM RATOS

Luis Eduardo Estellita Félix dos Santos¹

Bruno Almeida da Silva²

João Bosco de Salles³

Catharina Eccard Fingolo⁴

Resumo

O ecossistema manguezal é muito extenso no Brasil, tendo grande variedade de espécies, incluindo plantas com atividades biológicas que ainda não foram totalmente elucidadas. Uma delas é a *Rhizophora mangle*, conhecida popularmente como mangue vermelho, é usada na medicina popular para o tratamento de úlceras, inflamação, diabetes, tumor e dores. As plantas de mangue vivem em condições de estresse ambiental (salinidade, temperatura, flutuação das marés e solo anóxico), estando adaptadas, morfológicamente e fisiologicamente, a este ambiente, e podem ser fontes potenciais de componentes biologicamente ativos, com ampla aplicação. Extratos de diversas plantas medicinais podem modular a atividade de enzimas responsáveis pela biotransformação, aumentando assim, a possibilidade de ocorrer interações entre fármacos quando administrados concomitantemente. Com isso, a utilização inadequada de um produto natural pode induzir alterações nas concentrações plasmáticas dos fármacos alopáticos e de seus derivados e, conseqüentemente, mudanças na sua eficácia e segurança. O objetivo deste trabalho foi investigar os possíveis efeitos *in vitro* de extratos metanólicos de folhas de *R. mangle* sobre a atividade da 7-etoxiresorufina-O-desetilase (EROD), enzima da classe das CYPs, responsável pela metabolização de diversas substâncias. Este estudo foi realizado com extratos de *R. mangle* obtidos a partir de folhas coletadas em 3 regiões diferentes do mangue: franja, bacia e transição. Os extratos metanólicos, nas concentrações de 25 e 50 µg/ml, reduziram significativamente a atividade de EROD, quando comparados ao controle; já na concentração de 2,5 µg/ml, teve pouco efeito na modulação da atividade desta enzima.

Palavras chave: 7-etoxiresorufina-O-desetilase. *Rhizophora mangle*. CYP. Mangue.

¹Graduado em Farmácia pelo UEZO.

²Mestre em Química Biológica pelo UFRJ. Laboratorista no UEZO.

³Doutor em Bioquímica pelo UERJ. Professor Adjunto no UEZO.

⁴Doutora em Química de Produtos Naturais pelo UFRJ. Professora Adjunta no UEZO.

RHIZOPHORA MANGLE EXTRACT STUDY AND ITS EFFECTS ON THE ACTIVITY OF HEPATIC MICROSOMAL 7- ETOXYRESORUFFINE-DISETILASE (EROD) IN RATS

Abstract

The mangrove ecosystem is very extensive in Brazil, having a great variety of species, including plants with biological activities. One of them is the *Rhizophora mangle*, popularly known as red mangrove, due to its coloration; is very rich in phenolic substances, especially tannins. Mangrove plants live in conditions of environmental stress (salinity, temperature, tidal fluctuation and anoxic soil), being morphologically and physiologically adapted to this environment, and may be potential sources of biologically active components. Extracts from various medicinal plants may modulate the activity of biotransformation enzymes, CYPs (cytochrome P-450), thus increasing the possibility of interactions between drugs when administered concomitantly. Thus, inadequate use of a natural product may induce changes in the plasma concentrations of allopathic drugs and their derivatives and, consequently, changes in their efficacy and safety. The objective of this work was to investigate the possible *in vitro* effects of methanolic extracts of *R. mangle* leaves on the activity of 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD), an enzyme of the CYPs class, which are responsible for the metabolism of various substances. This study was carried out with extracts of *R. mangle* obtained from leaves collected in 3 different regions of the fringe, basin and transition mangrove. These areas have different levels of salinity and flooding. The methanolic extracts, at concentrations of 25 and 50 µg/ml, reduced the EROD activity when compared to the control; already at the concentration of 2.5 µg/ml, had little effect on the modulation of EROD activity.

Keywords: 7-ethoxyresorufin-O-deethylase. *Rhizophora mangle*. CYP. Mangrove.

Introdução

O manguezal é um ecossistema localizado em áreas intermarés nas regiões tropicais e subtropicais do globo. As regiões costeiras brasileiras detêm uma gama de ecossistemas: dunas, estuários, lagoas, manguezais, pântanos, recifes de corais e as restingas. Os manguezais abrangem cerca de 1.225.444 hectares em quase todo o litoral brasileiro constituindo zonas de elevada produtividade biológica.

Rhizophora mangle (Rhizophoraceae), conhecida popularmente como mangue vermelho, é rica em substâncias fenólicas e possui indicações etnofarmacológicas e etnobotânicas. A literatura descreve uma série de propriedades farmacológicas para esta espécie.

Segundo Schaeffer-Novelli (1995), seis espécies de plantas de mangue são bem adaptadas às condições de elevadas taxas de salinidade na região do litoral do Brasil. As mesmas estão distribuídas no país em forma decrescente até as altas latitudes, contendo apenas uma espécie no território de Laguna (SC), tendo então seu limite latitudinal. Três dessas estão presentes no Estado do Rio de Janeiro (*Avicennia schaueriana*, *Laguncularia racemosa* e *Rhizophora mangle*) com considerável adaptação às condições próximas ao mar, tais como altas taxas de salinidade.

As enzimas citocromos P450 foram descritas primeiramente por Klingenberg em 1959, através de um pigmento microssomal, quando reduzido através da ligação de monóxido de carbono (Klingenberg, 1958). Após isso, foi revelada por Omura e Sato (1962) a natureza hemoprotéica do pigmento batizando a proteína com o nome de citocromo 450. Em 1963, foi demonstrado que essas proteínas estão diretamente ligadas com a hidroxilação no carbono 21 da 17-hidroxi-progesterona e também pela oxidação de diversas substâncias (Estabrook *et al.*, 1963).

As CYP's são caracterizadas por catalisarem a monooxigenação de uma gama de substratos orgânicos, com significância para a saúde e para o funcionamento do organismo em geral (Stegeman, Livingstone, 1998). Essas proteínas são expressas em todas as fases do desenvolvimento e em basicamente todos os tecidos dos organismos em geral, sendo no tecido hepático o local de maior expressão. Em outros órgãos, como rins e tecido epitelial da traqueia e faringe, também se nota uma grande expressão destas proteínas (Ding, Kaminsky, 2003).

As diferentes isoformas da enzima P-450 da subfamília 1 A (CYP1A) são encontradas e expressas principalmente em hepatócitos. Observa-se que um significativo aumento na expressão dessas enzimas pode indicar a exposição a determinados tipos de substâncias como, por exemplo, os xenobióticos (Goksøyr, Förlin, 1992).

A 7-etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) presente em animais vertebrados e invertebrados transforma substâncias de difícil excreção em componentes mais facilmente excretados. Como todo metabólito, alguns são extremamente reativos e podem causar sérios danos à saúde e até mesmo ao DNA, podendo em casos extremos promover até mesmo a carcinogênese (Goldstone, Stegeman, 2006).

A biotransformação ou desintoxicação de xenobióticos se dá normalmente em duas fases. A fase I consiste em reações de oxidação, redução ou hidrólise e os produtos formados são frequentemente mais reativos que os iniciais. A fase II consiste na conjugação destas substâncias reativas, provenientes da fase I, a fim de serem eliminadas do organismo como substâncias inertes (Siroká, Drastichová 2004).

Em princípio, as substâncias mais lipofílicas, aquelas que exibem alto coeficiente de partição lipídeo:água, tendem a permanecer e acumular no organismo, uma vez que os meios comuns de eliminação (urina e fezes) são fundamentalmente aquosos. Assim, embora os xenobióticos mais hidrossolúveis possam ser eliminados de forma inalterada, a depuração das substâncias mais lipofílicas absorvidas pelo organismo depende essencialmente dos processos de biotransformação (Pacheco et al., 2005).

O citocromo P450 (CYP450) representa a principal via metabólica de biotransformação da Fase I, através de suas mais de 500 isoenzimas, e faz parte do sistema de oxidases de função mista (MFO) (Lin, Lu, 1998). Tais monooxigenases participam tanto da biossíntese como da degradação de substâncias endógenas, e inúmeros tipos de xenobióticos. Essas reações ocorrem, principalmente, no fígado; contudo, existe expressão em menor grau por todo o organismo, incluindo intestino, pulmão e rim, entre outros (Nebert 1991). A subfamília CYP1A é responsável pela desintoxicação de diversas substâncias poluentes, tais como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. As enzimas do sistema de MFO são constituídas pelos seguintes componentes: NADPH e a enzima NADPH citocromo P450 redutase; citocromo b5 e a enzima citocromo b5 redutase, além do próprio CYP450 (Bucheli, Fent 1995).

Após uma contaminação de um ambiente por xenobióticos, os níveis de EROD dos seres que ali habitam tendem a aumentar, observando a necessidade da descoberta de algum facilitador da excreção dos xenobióticos (Cajaraville, 2000). Segundo Pollino, Holdway (2003) os níveis de EROD tendem a subir quando o organismo for submetido a uma exposição maior de xenobióticos.

Metodologia

As folhas foram coletadas em janeiro de 2017 ao sul do Estado do Rio de Janeiro, na Reserva Biológica Estadual de Guaratiba, que abriga uma das principais florestas de mangue do Estado e o principal remanescente de manguezais do município do Rio de Janeiro. A espécie escolhida para estudo foi coletada de acordo com cada região do ecossistema Manguezal ao longo do litoral fluminense. As coletas foram realizadas mensalmente por meio de projetos de monitoramento existentes às margens das baías de Sepetiba, pelo grupo de pesquisa do professor/pesquisador Filipe de Oliveira Chaves, Núcleo de Estudos em Manguezais, Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ).

O material vegetal foi coletado em três regiões diferentes: franja, bacia e transição. Para o preparo do extrato metanólico, as folhas foram secas a 60°C e fragmentadas com auxílio de moinho de jarros. Os extratos brutos metanólicos obtidos foram concentrados sob pressão reduzida, utilizando rotaevaporador Büchi, equipado com banho aquecedor a 40°C. Depois de extrair todo o solvente, os extratos foram congelados e liofilizados para garantir a retirada total de água e de metanol.

Ratos Wistar machos foram mantidos em condições adequadas e alimentados com ração de roedores e água ad libitum. O uso de animais neste projeto foi aprovado pela CEUA da UEZO (referência 005 – 2-15). A eutanásia foi realizada em câmara de CO₂ e os fígados foram retirados, acondicionados e armazenados em nitrogênio líquido para posterior preparo do microssoma. O

preparo da fração microsomal hepática dos ratos ocorreu, basicamente, conforme descrito por Ribeiro Pinto et al. (2001). Para o preparo do microsoma os fígados congelados foram retirados do reservatório de nitrogênio líquido, descongelados, fragmentados e pesados (3,5 g) em balança semi analítica (marca Bel). Em seguida, os fígados foram homogeneizados em homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem, com 10 mL de solução tampão gelada (fosfato de potássio 0,1 M, de pH 7,0, contendo 0,25 M de sacarose). Foram realizados ciclos de movimentos ascendentes e descendentes, até que fosse constatada visualmente a homogeneização do tecido. Logo após foram adicionados mais 4mL do mesmo tampão. Os homogeneizados hepáticos foram centrifugados a 33.000 g por 45 min a 4°C em ultracentrífuga HITACH. Os sobrenadantes desta primeira centrifugação foram transferidos para outros tubos e novamente centrifugados em ultracentrífuga (marca Hitachi modelo Himac cp 80wx), a 100.000 g por 1h e 30 min a 4°C. Após este tempo, o sobrenadante foi desprezado e os pellets contendo a fração microsomal foram ressuspensos utilizando a mesma solução tampão utilizada anteriormente e re-homogeneizados manualmente. A partir do momento em que foi constatada visualmente a homogeneização dos pellets, a fração microsomal assim obtida foi dividida em alíquotas, distribuídas em criotubos devidamente identificados, e armazenada em nitrogênio líquido.

A atividade da 7-etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) foi determinada conforme Burke et al. (1985). Em cubeta de quartzo, posicionada dentro do espectrofluorímetro (com temperatura controlada a 37°C por um banho-maria com circulação de água), foram pipetados o tampão fosfato de K⁺ 0,1M de pH 7,8 (q.s.p. 2,0 mL), 10 µL MgCl₂ 1,0 M em água destilada (5 mM final), o substrato dissolvido em DMSO (5,0 µM final), 10 µL de extrato metanólico de *R. mangle* em diferentes concentrações (2,5 µg/ml; 25,0 µg/ml e 50 µg/ml) e 200 µg microsoma hepático (diluído na hora do uso em tampão de homogeneização). Após 8 minutos de pré-incubação, a reação foi disparada com a adição de 20 µL de NADPH 25 mM em água (0,25 mM final). A velocidade da reação foi determinada em tempo real pelo aumento da fluorescência causada pelo acúmulo de resorufina. A fluorescência foi

lida continuamente por 60 segundos em um espectrofluorímetro (marca ISS modelo pc1), com excitação a 550 nm e emissão a 582 nm, com fendas 1/1.

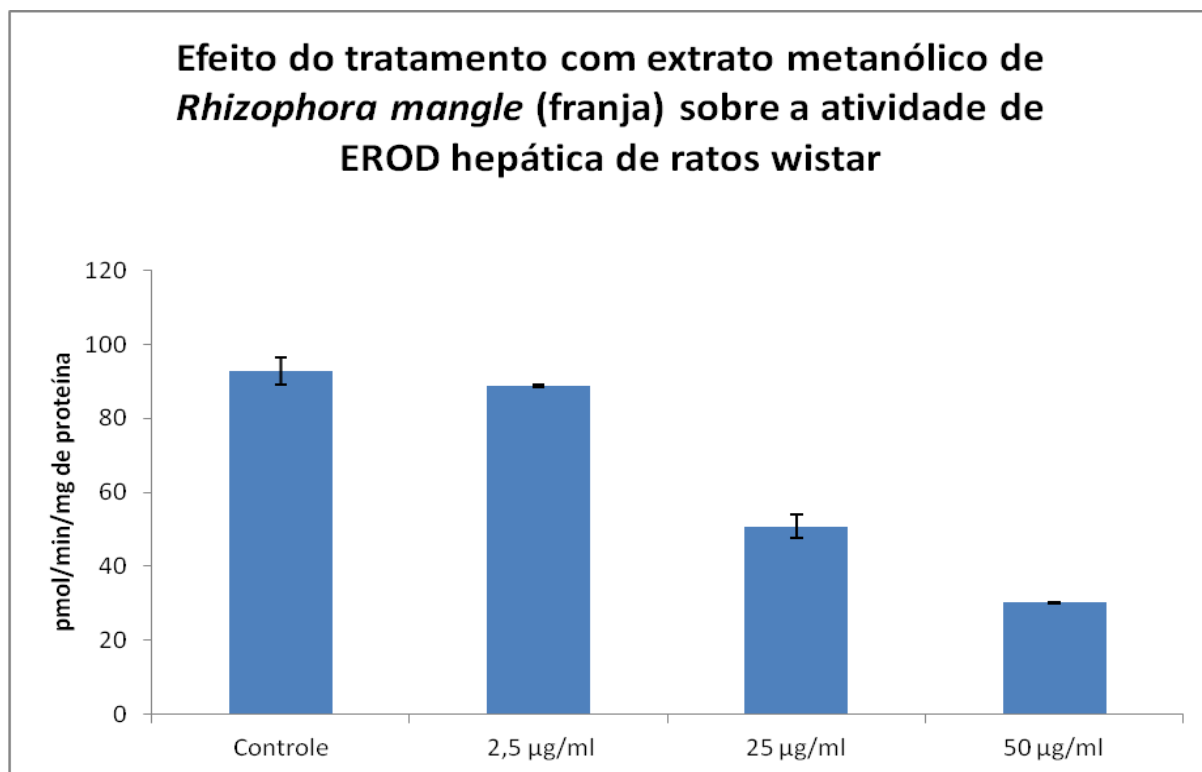
Resultados e Discussão

A maioria dos estudos relacionados à ação de plantas medicinais consiste na averiguação da sabedoria popular, o que contribui para elucidar a atividade das mesmas, facilitando o uso adequado e a orientação de profissionais capacitados, visando sempre o benefício do paciente e a descoberta de substâncias com potencial farmacológico. Entretanto, as informações técnicas a respeito de plantas ainda são insuficientes na maioria dos casos, para garantir a qualidade, a eficácia e a segurança de seu uso (NICOLLETTI, 2007).

Para avaliar a atividade da enzima EROD microsomal hepática em ratos, foi realizado o tratamento *in vitro* do microsoma com o extrato metanólico de *R. mangle* nas concentrações de 2,5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml. Com o intuito de observar um possível efeito da zonação de *R. mangle* na atividade de EROD, a espécie foi coletada em três regiões, representando pontos com diferentes frequências de inundação pelas mares: floresta de franja, ou seja, mais próximo ao rio; floresta de bacia; e floresta de transição, caracterizado por árvores de porte menos denso e maior distância do rio Piracão.

Na Figura 1 é possível observar que houve uma redução de cerca de 5% na atividade de EROD no tratamento com 2,5 µg/ml de extrato quando comparada ao controle, uma redução de 45 % com 25,0 µg/ml e para a concentração de 50 µg/ml do extrato a redução foi aproximadamente 68%. Obteve-se uma média de $92,82 \pm 3,73$ pmols de resorufina.min⁻¹.mg⁻¹ no controle; $88,90 \pm 0,30$ no tratamento com 2,5 µg/ml do extrato; $50,80 \pm 3,20$ para 25,0 µg/ml e de $30,09 \pm 0,30$ para o tratamento com 50 µg/ml.

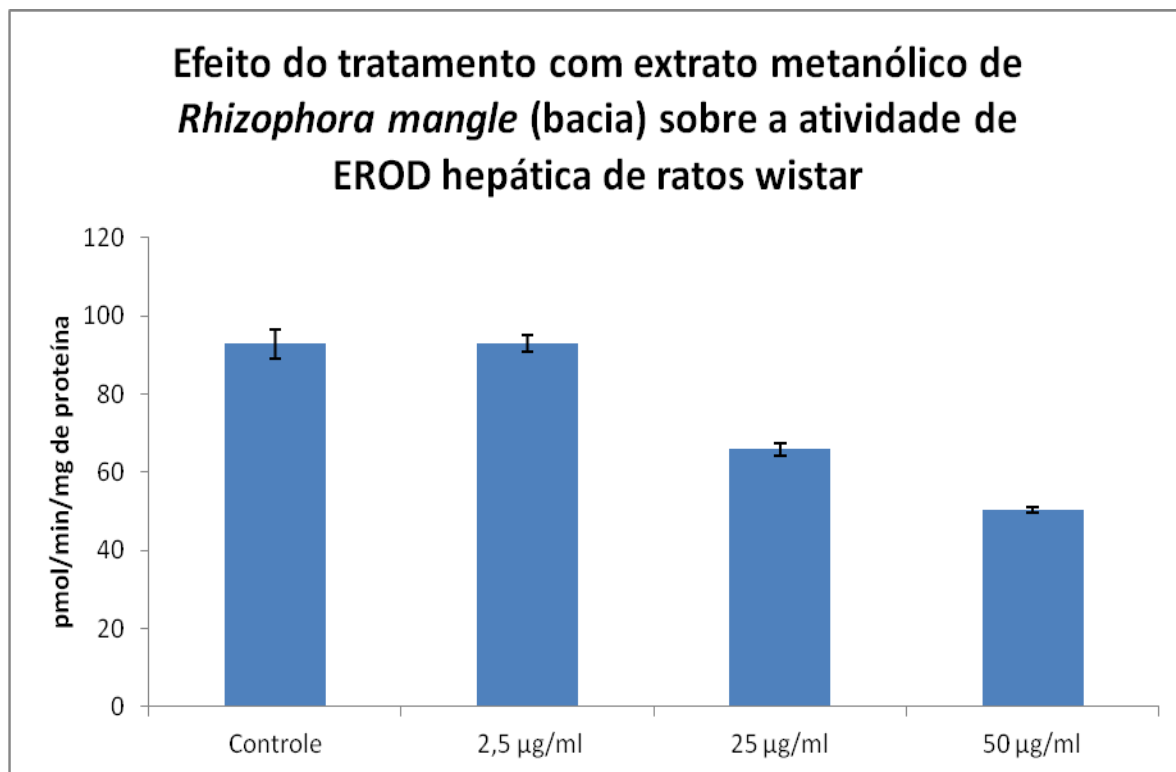
Figura 1. Efeito do extrato metanólico de folhas de *Rhizophora mangle* coletadas na região de franja



Fonte: Pesquisa do Autor

A Figura 1 relata o efeito do extrato metanólico de folhas de *Rhizophora mangle* coletadas na região de franja durante o mês de janeiro do ano de 2017 sobre a atividade de EROD microssomal hepática de ratos Wistar. Todo o experimento foi feito em duplicata. Na Figura 2 é possível observar que não houve alteração na atividade de EROD no tratamento com 2,5 µg/ml de extrato obtido a partir de folhas coletadas na região de bacia, quando comparada ao controle. Obteve-se uma redução de 29% com 25,0 µg/ml e para a concentração de 50 µg/ml do extrato a redução foi aproximadamente 46%. O controle apresentou uma média de $92,82 \pm 3,73$ pmols de resorufina. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$; $93,02 \pm 1,99$ no tratamento com 2,5 µg/ml do extrato metanólico; $65,99 \pm 1,61$ para 25,0 µg/ml e de $50,51 \pm 0,64$ para o tratamento com 50 µg/ml.

Figura 2. Efeito do extrato metanólico de folhas de *Rhizophora mangle* coletadas na região de bacia.

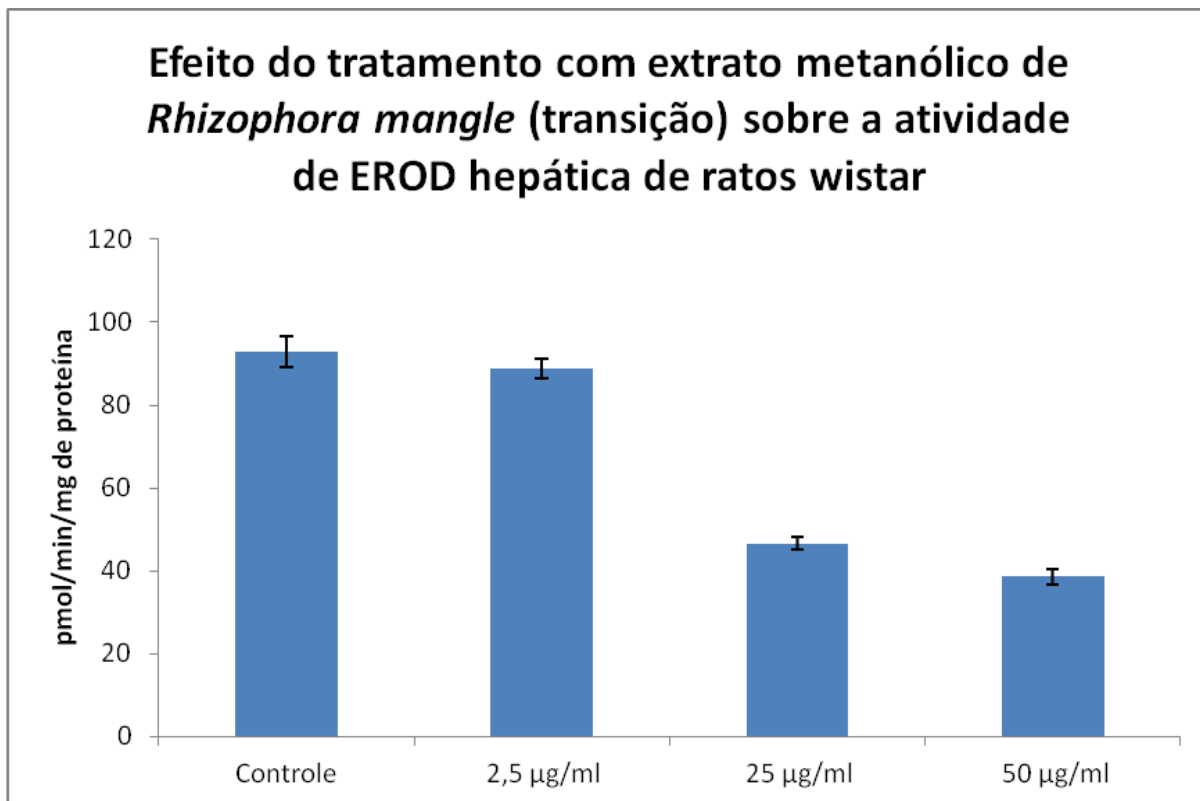


Fonte: Pesquisa do Autor

A Figura 2 relata o efeito do extrato metanólico de folhas de *Rhizophora mangle* coletadas na região de bacia sobre a atividade de EROD microsossomal hepática de ratos. O experimento foi feito em duplicata. Ao utilizar o extrato metanólico de folhas de *R. mangle* coletadas na região de transição (Figura 3), obteve-se uma média de $92,82 \pm 3,73$ pmols de resorufina. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$; $88,70 \pm 2,32$ no tratamento com $2,5 \mu\text{g/ml}$ do extrato metanólico; $46,52 \pm 1,58$ para $25,0 \mu\text{g/ml}$ e de $38,54 \pm 1,90$ para o tratamento com $50 \mu\text{g/ml}$.

Visto esses dados, foi possível observar a redução da atividade de EROD em todas as concentrações de extratos usadas, sendo em torno de 5% para a concentração de $2,5 \mu\text{g/ml}$, de 49 % na concentração de $25 \mu\text{g/ml}$ e de 59% na concentração de $50 \mu\text{g/ml}$ quando comparadas ao controle.

Figura 3. O Efeito do extrato metanólico de folhas de *Rhizophora mangle* coletadas na região de transição sobre a atividade de EROD microsossomal hepática de ratos.

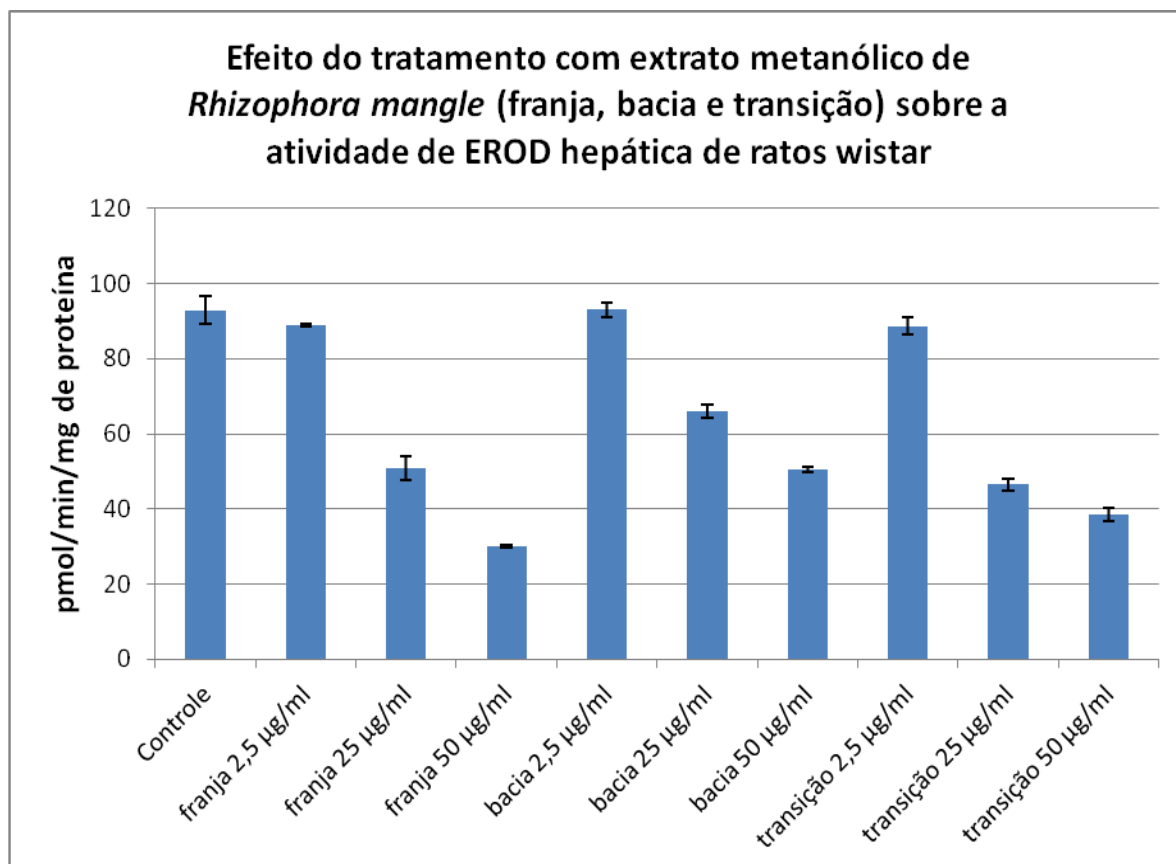


Fonte: Pesquisa do Autor

A figura 3 sobre o efeito do extrato metanólico de folhas de *Rhizophora mangle* coletadas na região de transição sobre a atividade de EROD microsossomal hepática de ratos. O experimento foi feito em duplicata.

Para melhor comparação de nossos resultados, os efeitos dos extratos de folhas de *R. mangle* coletadas nas regiões de franja, bacia e transição sobre a atividade de EROD foram apresentados conjuntamente na Figura 4. Como pode ser claramente observado, os três extratos analisados promoveram significativa inibição da enzima EROD, de maneira dose dependente. Sendo as inibições mais destacadas nas doses mais elevadas. Como observado, o extrato de folhas de *R. mangle* coletadas nas regiões de franja promoveu inibição maior que extratos dos outros dois fragmentos de mangue.

Figura 4. Efeito comparativo do extrato metanólico de folhas de *Rhizophora mangle* coletadas nas regiões de franja, bacia e transição sobre a atividade de EROD microsossomal hepática de ratos.



Fonte: Pesquisa do Autor

A Figura 4 aborda o efeito comparativo do extrato metanólico de folhas de *Rhizophora mangle* coletadas nas regiões de franja, bacia e transição sobre a atividade de EROD microsossomal hepática de ratos. O experimento foi feito em duplicata. Baseado em estudos já publicados, podemos inferir que o efeito inibitório dos extratos metanólicos de folhas de *Rhizophora mangle* sobre a atividade de EROD é decorrente da presença de taninos nestes extratos. Segundo Monteiro et al. (2005) os taninos são constituintes fenólicos presentes na maioria das plantas, que podem ter sua concentração variando de acordo com os tecidos vegetais, bem como em função da idade e tamanho da planta, da parte coletada, da época ou, ainda, do local de coleta. As variações encontradas entre os extratos, possivelmente, são

decorrentes dos níveis de taninos que variam de acordo com a idade e tamanho da planta e o local/área em que foi coletada. Os taninos possuem grande afinidade por proteínas e enzimas, ocorrendo então a ligação nas mesmas vindo a gerar inativação/redução de atividade.

O estudo de Tavares *et al.* (2014) demonstra a interação entre o tanino presente em frutas e a ação de enzimas da classe das citocromo P-450, conferindo ao tanino o efeito redutor de atividade, o que corrobora com os estudos anteriormente citados e embasa a teoria de inibição de EROD através da interação com os mesmos.

É importante observar que independente do local de coleta das folhas, todos os extratos tiveram taxa de inibição considerável, justificando uma redução de atividade maior para os extratos obtidos a partir de coletas nas regiões de franja e de transição.

Considerações Finais

Este estudo foi de grande relevância quando se compara os resultados obtidos e verifica-se a inibição de forma acentuada em todos os pontos de coleta para concentrações de 25,0 µg/ml e 50 µg/ml. Vale ressaltar que a inibição de uma enzima como EROD está diretamente ligada com a menor excreção de xenobióticos e conseqüentemente possíveis futuros danos à saúde do usuário, chamando a atenção principalmente para o uso prolongado de *R. mangle* como planta medicinal sem a devida prescrição.

A utilização de plantas medicinais somente deve ser feita com o auxílio de um profissional capacitado para que seja solicitado o uso da mesma. A utilização sem a devida prescrição pode gerar danos severos a saúde do paciente sendo o dano direto ou indireto. Direto quando a própria planta medicinal vem a causar algum prejuízo a saúde do paciente, seja devido a dosagem ou ao intervalo de uso, e o dano pode ser indireto como mostrado neste estudo no caso do extrato de *R. mangle* que reduz consideravelmente a atividade da enzima EROD, sendo a mesma

responsável pela eliminação de xenobióticos de maneira geral e pela biotransformação, podendo esta inibição pode causar problemas graves em pacientes que fazem uso de fármacos de maneira contínua. Visto que a inibição desta enzima pode levar ao acúmulo de fármacos e outros xenobióticos no organismo, causando a sua intoxicação.

A redução da atividade de EROD pode estar relacionada com futuros problemas de saúde, visto que a enzima está diretamente ligada com a excreção de xenobióticos. Seus níveis são geralmente alterados em organismos expostos a agentes poluentes, sendo mais uma forma de orientação a pessoas que utilizem *R. mangle* como planta medicinal.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq e à FAPERJ, pelo apoio financeiro; ao NEMA/UERJ pela coleta do material botânico.

Referências

BUCHELI, T.D., FENT, K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. **Environmental Science & Technology** 25: 201-268, 1995.

BURKE, M.D., THOMPSON, S. et al. Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P-450. **Biochemical Pharmacology** 34:3337-3345, 1985.

CAJARAVILLE, M.P. et al. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **The Science of the Total Environment** 247(2- 3):295-311, 2000.

DING, X., KAMINSKY, L.S. HUMAN EXTRAHEPATIC CYTOCHROMES P450: Function in Xenobiotic Metabolism and Tissue-Selective Chemical Toxicity in the Respiratory and Gastrointestinal Tracts. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology** 43: 149–173, 2003.

ESTABROOK, R.W., COOPER, D.Y., ROSENTHAL, O. The light reversible carbon monoxide inhibition of the steroid C21-hydroxylase system of the adrenal cortex. **Biochem Z** 338: 741-755, 1963.

GOKSØYR, A., FÖRLIN, L. The cytochrome P450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. **Aquatic Toxicology** 22: 287-312, 1992.

GOLDSTONE, H.M.H., STEGEMAN, J.J. A revised evolutionary history of the CYP1A subfamily: gene duplication, gene conversion, and positive selection. **Journal of Molecular Evolution** 62: 708-717, 2006.

KLINGENBERG, M. Pigments of rat liver microsomes. **Archives Biochemistry and Biophysics** 75 (2): 376-386, 1958.

LIN, J.H., LU, A.Y.H. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. **Clinical Pharmacokinetics** 35: 361-390, 1998.

MONTEIRO, J. M. et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova** 28: 892-896, 2005.

NEBERT, D.W. Role of genetics and drug metabolism in human cancer risk. **Mutation Research** 247: 267-281, 1991.

OMURA, T., SATO, R. A new cytochrome in liver microsomes. **The Journal of Biological Chemistry** 237: 1375-1376, 1962.

PACHECO, M. et al. Biotransformation and genotoxic biomarkers in mullet species (*Liza* sp.) from a contaminated coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal). **Environmental Monitoring and Assessment** 107(1-3): 133-153, 2005.

POLLINO, C., HOLDWAY, D.A. Hydrocarbon-induced changes to metabolic and detoxification enzymes of the Australian Crimson-spotted rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*). **Environmental Toxicology**. 18: 21-28, 2003.

RIBEIRO PINTO, L.F. et al. The rat oesophageal cytochrome P450 (CYP) monooxygenase system: comparison to the liver and relevance to *N*-nitrosodiethylamine carcinogenics. **Carcinogenesis** 1877-1883, 2001.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y., CINTRÓN, G. **Guia para estudo de áreas de manguezal: estrutura, função e flora**. São Paulo: Caribbean Ecological Research, 150p., 1986.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. (Coord.). **Manguezal ecossistema entre a terra e o mar**. São Paulo: Caribbean Ecological Research, 64p., 1995.

SIROKÁ, Z., DRASTICHOVÁ, J. Biochemical markers of aquatic environment contamination: Cytochrome P450 in fish. A review. **Acta Veterinaria Brunensis** 73: 123-132, 2004.

STEGEMAN, J.J., LIVINGSTONE, D.R. Forms and functions of cytochrome P450. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Pharmacology, Toxicology & Endocrinology** 121 (1-3): 1-3. 1998.

TAVARES, C.D.C.S. **Interações frutas/vegetais-fármaco com importância clínica**. Trabalho Complementar apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de licenciado em Ciências da Nutrição, 37p., 2014.