

Extração e caracterização parcial de peroxidase de folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf.

Extraction and partial characterization of peroxidase from *Copaifera langsdorffii* Desf. Leaves

Hermelinda Penha Freire MACIEL¹, Cibele Marli Cação Paiva GOUVÊA^{2*}, Gláucia Maria PASTORE¹

Resumo

Em recentes publicações têm sido descritos vários processos para obtenção de peroxidases. O propósito deste trabalho foi extrair peroxidase de folhas de *Copaifera langsdorffii* e caracterizar parcialmente a enzima usando planejamento experimental e teste univariado, para confirmação dos resultados obtidos por planejamento experimental. A atividade da peroxidase foi medida usando sistema guaiacol: peróxido de hidrogênio. A peroxidase isolada apresentou 81,6% da atividade da horseradish peroxidase e é de fácil obtenção, a partir de folhas de uma árvore abundante em todo o país. A peroxidase semi-purificada (COP) foi obtida pela precipitação do extrato bruto com acetona 65% (v.v⁻¹), produzindo o pó cetônico. A COP apresentou atividade ótima na faixa de pH 5,0 a 7,0 e temperatura de 5 a 45 °C, com atividade máxima em pH 6,0 e 35 °C. A enzima mostrou-se estável em temperaturas inferiores a 50 °C e pH entre 4,5 e 9,0, por até 24 horas. A peroxidase foi inativada após 4 horas a 80 °C e após 3 minutos a 96 °C. Esta enzima demonstra possibilidade para ser usada como reagente para diagnósticos, construção de biossensores e outros métodos analíticos em vários campos da ciência.

Palavras-chave: copaíba; enzima; extrato vegetal.

Abstract

In the literature, several processes have been described to obtain peroxidases. The purpose of this work was to obtain peroxidase from *Copaifera langsdorffii* leaves and characterize it partially using a factorial design of experiments and univariate tests, to confirm the results obtained by the factorial design of experiments. Peroxidase activity was measured using the guaiacol: hydrogen peroxide system. The isolated peroxidase presented 81.6% of horseradish peroxidase activity and was easy to obtain from leaves of an abundant tree distributed all over the country. Semi-purified peroxidase (COP) was precipitated with acetone 65% (v.v⁻¹) of the crude extract, obtaining the acetone powder. The COP optimum reaction pH values were between 5.0-7.0 and the temperatures between 5 and 45 °C, with a maximum activity at pH 6.0 and 35 °C. The enzyme was stable in temperatures below 50 °C and pH from 4.5 to 9.0 for up to 24 hours. The peroxidase was inactivated after 4 hours at 80 °C and after 3 minutes at 96 °C. This enzyme can possibly be used as a diagnostic reagent, biosensor and for other analytical methods in several fields of Sciences.

Keywords: copaiba; enzyme; vegetal extract.

1 Introdução

As peroxidases (E.C. 1.11.1.7, doador H₂O₂ oxidorreductase) catalisam a redução do peróxido de hidrogênio ou outro peróxido orgânico, enquanto um doador de elétrons é oxidado. São abundantes em vários organismos incluindo as plantas superiores, com múltiplas isoformas sintetizadas e reguladas por estímulos diversos^{8,22}. Nas últimas décadas inúmeros trabalhos têm estudado as peroxidases de plantas para determinar as funções bioquímicas das isoperoxidasas^{4,21}. Existe a possibilidade de que a medida da atividade de peroxidase em extrato de plantas não reflita sua real atividade *in vivo*⁷ e a determinação do substrato específico *in vivo* permanece como ponto crucial para estabelecer o papel fisiológico das isoperoxidasas aniônica, catiônica ou neutra^{2,10,26,33}.

Tem sido identificada a importância fisiológica da peroxidase no controle do crescimento, lignificação¹, biossíntese da parede celular^{27,31}, defesa contra patógenos e esta enzima pode

ainda causar mudanças indesejáveis no aroma, gosto, cor, textura e também a perda de nutrientes em alimentos^{14,29,30,32}.

A peroxidase tem sido utilizada em biotecnologia e várias outras áreas da ciência, para estabelecimento de diagnósticos clínicos e avaliação de processos patológicos^{6,9,11,12,16,22,25}, em análise de qualidade dos alimentos^{3,23,30,32}, na construção de biossensores para análise qualitativa e quantitativa de formulações farmacêuticas, cosméticas e outras análises que envolvam a presença ou a formação de peróxidos e outros processos enzimáticos^{5,24,28,34,35,36}.

Devido à ampla utilização das peroxidases há um interesse crescente por novas fontes desta enzima. O Brasil possui ampla variedade de vegetais que podem se constituir em fonte inesgotável de enzimas^{34,35}. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo extrair e caracterizar parcialmente a peroxidase de folhas de *Copaifera langsdorffii* (COP), visando obter nova fonte de peroxidase com potencial para uso em diversas áreas.

2 Material e métodos

2.1 Tecido fonte

A peroxidase foi extraída de folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf., que foram colhidas de árvores da UNICAMP (Universidade

Recebido para publicação em 16/11/2004

Aceito para publicação em 6/7/2006 (001440)

¹ Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas - SP, Brasil

² Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714, Centro, CEP 37130-000, Alfenas - MG, Brasil,

E-mail: cibelegouvea@hotmail.com

*A quem a correspondência deve ser enviada

de Estadual de Campinas), pela manhã (até 9 horas), lavadas e em seguida utilizadas para extração enzimática.

2.2 Obtenção do extrato enzimático bruto

O extrato enzimático bruto foi obtido de acordo com procedimento descrito por JACKSON e RICARDO¹³, com modificações. As folhas de *C. langsdorffii* foram pesadas na proporção de 1 g de folha para 4 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,0 gelado (5 °C). A amostra foi colocada em liquidificador para homogeneização por 5 minutos, em baixa rotação. Em seguida foi filtrada em gaze com diâmetro reduzido através de 6 dobras, sendo o filtrado recolhido em banho de gelo e centrifugado a 11.000 g, a 5 °C, por 15 minutos.

2.3 Purificação parcial da peroxidase de folhas de *C. langsdorffii* (COP)

A COP foi obtida a partir do extrato enzimático bruto. A enzima foi extraída por precipitação com acetona 65% (v.v⁻¹) gelada, de acordo com a metodologia descrita por MARIN e CANO¹⁹. Foi testada também a precipitação da peroxidase com etanol 65% (v.v⁻¹) e com sulfato de amônio a 90% (p.v⁻¹) de saturação, segundo metodologia descrita por MOULDING et al.²⁰. Foram efetuadas extrações sequenciais, observando-se o mesmo período de coleta das folhas e procurando-se manter condições idênticas em cada extração, para obtenção da enzima semi-purificada.

2.4 Determinação da atividade da peroxidase

A atividade da peroxidase foi determinada segundo KHAN e ROBINSON¹⁵. Utilizou-se como meio de reação: 1,5 mL de guaiacol 1% (v.v⁻¹); 0,4 mL de H₂O₂ 0,3% (v.v⁻¹), 0,1 mL do extrato enzimático ou da enzima parcialmente purificada e 1,2 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,0. A reação foi acompanhada durante, 5 minutos, a 30 °C em espectrofotômetro BECKMAN UV/VIS, série DU-70. A atividade de peroxidase foi expressa em unidade (atividade capaz de alterar 0,001 de absorbância a 470 nm) por minuto (U.min⁻¹) e foi calculada usando-se dados relativos à porção linear da curva entre 0,1 e 0,7 unidades de absorbância, com leituras em triplicata.

2.5 Caracterização parcial da COP

Determinação das condições ótimas de pH e temperatura

Para determinação das condições ótimas de atividade da COP através de teste univariável, os ensaios foram realizados usando-se solução de 0,2% da COP, mantendo-se a temperatura e variando-se o pH das soluções tampão de 4,0 a 9,0, com intervalo de uma unidade em cada ensaio. As temperaturas utilizadas foram 5, 15, 25, 35, 45 e 65 °C, num total de 36 ensaios. Foram realizados também testes através de planejamento experimental, com 11 ensaios, usando-se valores de pH e temperatura propostos pelos níveis das variáveis indicadas no modelo.

Determinação da estabilidade da COP

Foi utilizada solução de 0,2% da COP em ensaios através de teste univariável com períodos de incubação da enzima de 3, 6, 9 e 24 horas, variando-se o pH dos tampões de 3,0 a 9,0 com intervalos de uma e meia unidades e temperaturas de 8, 20, 50 e 65 °C, num total de 96 experimentos. Utilizou-se também o planejamento experimental, com 44 ensaios, com valores de pH e temperatura propostos pelos níveis das variáveis indicadas no modelo. Foi ainda observado o comportamento da COP a 80 °C e em ebulição (96 °C).

Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada através de software STATISTICA, utilizando-se Experimental Design.

3 Resultados e discussão

3.1 Purificação parcial da COP

Os resultados da purificação parcial da peroxidase de folhas de *C. langsdorffii* (COP) demonstraram que o sulfato de amônio foi o agente precipitante mais eficiente, seguido da acetona e etanol (Tabela 1). A acetona foi escolhida como agente precipitante, por ser mais eficiente que o etanol e apresentar eficiência semelhante a do sulfato de amônio. A acetona apresenta vantagem sobre o sulfato de amônio, pois o precipitado não necessita de diálise e concentração por liofilização. Isto é importante pois reduz o tempo e custo dos experimentos e ainda o risco da diminuição da atividade da peroxidase.

A COP, peroxidase semi-purificada por precipitação com acetona, mostrou atividade de 81,6% da horseradish peroxidase, nas mesmas condições experimentais.

Tabela 1. Influência do agente precipitante sobre a atividade e recuperação da COP

Amostra	Atividade (U.mL ⁻¹ .10 ³)	Recuperação	
		Perda (%)	
Extrato bruto	65,32	100	0
Etanol	11,18	17	83
Acetona	50,11	77	23
Sulfato de amônio	53,67	82	18

3.2 Influência do pH e temperatura sobre a atividade da COP

A COP mostrou atividade ótima em pH de 4,0 a 7,0 e temperatura de 5 a 45 °C, com atividade máxima em pH 6,0 e 35 °C. A enzima ainda mostrou atividade em pH 4,0 a 45 °C e diminuição da atividade em temperatura acima de 50 °C (Tabela 2). WRIGHT e NICELL³⁶ encontraram atividade ótima em pH 6,4 para peroxidase de soja e segundo LIN et al.¹⁸ o pH ótimo da peroxidase de folhas de *Ipomoea cairica* foi 6,0 e a temperatura 50 °C.

O planejamento experimental tem como objetivo reduzir o número de experimentos a serem realizados, sem prejuízo da confiabilidade dos resultados. Assim neste trabalho com-

pararam-se os resultados obtidos por meio de teste univariado (Tabela 2) e de planejamento experimental (Tabela 3), para validação do uso do planejamento experimental para a COP, que tem sua primeira descrição neste trabalho. Os resultados foram similares, indicando que o planejamento experimental é aplicável ao estudo da COP.

3.3 Influência do pH, temperatura e tempo de incubação sobre a estabilidade da COP

Os resultados obtidos por teste univariado estão descritos na Tabela 4. A COP mostrou-se estável em pH de 4,5 a 9,0, temperaturas até 50 °C por um período de 24 horas. A COP

foi inativada após 4 horas a 80 °C e após 3 minutos a 96 °C. Os dados obtidos por planejamento experimental (Tabela 5) também mostraram inativação da COP a 80 e a 92,3 °C e estabilidade da enzima em pH de 4,5 a 8,5 e temperatura até 50 °C. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por teste univariado.

Observando-se os resultados é possível verificar que a COP apresenta estabilidade semelhante a outras peroxidases como a de folhas de *Ipomoea cairica*, a HRP¹⁸ e a peroxidase de folhas de *Vitis pseudoreticulata*¹⁷.

A estabilidade de peroxidases é muito importante para sua utilização em diversas áreas da ciência, quanto maior a

Tabela 2. Influência do pH e temperatura sobre a atividade* da COP (U.mL⁻¹.10³).

Temp. (°C)	pH					
	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0
5	19,20 ± 0,12 ^a	20,21 ± 0,54 ^a	23,52 ± 0,23 ^a	19,60 ± 0,39 ^a	14,60 ± 0,32 ^a	11,40 ± 0,59 ^a
15	20,07 ± 0,22 ^a	22,30 ± 0,36 ^b	27,40 ± 0,13 ^b	25,80 ± 0,78 ^b	17,20 ± 0,56 ^b	12,45 ± 0,26 ^a
25	23,02 ± 0,52 ^b	25,08 ± 0,76 ^c	29,62 ± 0,45 ^b	27,90 ± 0,56 ^c	18,10 ± 0,12 ^b	17,60 ± 0,34 ^b
35	25,11 ± 0,35 ^c	29,10 ± 0,55 ^d	39,10 ± 0,17 ^c	29,90 ± 0,41 ^d	20,07 ± 0,45 ^c	18,20 ± 0,37 ^b
45	20,02 ± 0,95 ^a	21,00 ± 0,19 ^b	31,20 ± 0,47 ^b	26,70 ± 0,23 ^c	20,00 ± 0,78 ^c	18,12 ± 0,38 ^b
65	0,78 ± 0,12 ^d	0,86 ± 0,31 ^e	12,40 ± 0,26 ^d	0,99 ± 0,25 ^e	0,89 ± 0,13 ^d	1,70 ± 0,45 ^c

*Valores médios de três repetições ± desvio padrão, obtidos por teste univariado; e Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p < 0,05) pelo teste de Tukey.

Tabela 3. Influência do pH e temperatura sobre a atividade da COP

Ensaio	x	y	pH	Temp. (°C)	Atividade (U.mL ⁻¹ .10 ³)
1	-1	-1	4,6	30	33,52 ± 0,95 ^a
2	1	-1	7,0	30	27,37 ± 0,54 ^b
3	-1	1	5,0	40	32,69 ± 0,78 ^a
4	1	1	7,0	40	24,48 ± 0,59 ^c
5	-α	0	4,6	35	31,91 ± 0,85 ^a
6	α	0	7,4	35	17,45 ± 0,99 ^d
7	0	-α	6,0	28	30,94 ± 1,01 ^a
8	0	α	6,0	42	28,64 ± 0,78 ^b
9 (c)	0	0	6,0	35	36,49 ± 0,91 ^e

*Valores médios de três repetições ± desvio padrão, obtidos por planejamento experimental; (c) valor central; e Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p < 0,05) pelo teste de Tukey.

Tabela 4. Influência do pH, da temperatura e do tempo de incubação sobre a estabilidade* (U.mL⁻¹.10³) da COP

Temp. (°C)	Tempo (hora)	pH					
		3,0	4,5	6,0	7,5	8,5	9,0
8	3	13,68 ± 1,01 ^a	29,23 ± 1,15 ^a	30,21 ± 0,78 ^a	32,01 ± 0,36 ^a	28,99 ± 0,98 ^a	32,03 ± 0,75 ^a
	6	10,80 ± 0,95 ^b	29,50 ± 1,12 ^a	30,50 ± 0,98 ^a	31,50 ± 0,69 ^a	29,40 ± 0,56 ^a	31,80 ± 0,89 ^a
	9	18,27 ± 0,87 ^c	25,98 ± 1,11 ^b	30,90 ± 0,85 ^a	29,50 ± 0,58 ^a	26,78 ± 0,26 ^b	30,76 ± 0,78 ^a
	24	12,30 ± 0,99 ^a	30,00 ± 1,00 ^a	31,50 ± 0,069 ^a	30,20 ± 0,56 ^a	29,70 ± 0,45 ^a	30,50 ± 0,87 ^a
20	3	16,96 ± 0,78 ^b	27,29 ± 0,98 ^b	33,54 ± 0,79 ^b	31,80 ± 0,35 ^a	30,93 ± 0,26 ^a	29,94 ± 0,59 ^a
	6	5,74 ± 0,54 ^d	27,45 ± 0,69 ^b	32,10 ± 0,75 ^b	31,91 ± 0,58 ^a	29,02 ± 0,36 ^a	30,16 ± 0,58 ^a
	9	4,10 ± 0,26 ^d	30,12 ± 0,78 ^a	31,29 ± 0,49 ^a	31,39 ± 0,24 ^a	28,04 ± 0,33 ^a	28,93 ± 0,69 ^b
	24	4,36 ± 0,23 ^d	25,98 ± 0,95 ^b	34,44 ± 1,02 ^b	31,56 ± 0,78 ^a	24,69 ± 0,54 ^b	30,06 ± 0,96 ^a
50	3	1,90 ± 0,15 ^e	26,59 ± 0,36 ^b	32,49 ± 0,99 ^b	26,76 ± 0,45 ^b	28,38 ± 0,59 ^a	30,06 ± 0,54 ^a
	6	0,00 ± 0,00 ^f	26,44 ± 0,25 ^b	30,65 ± 0,69 ^a	22,89 ± 0,98 ^c	25,34 ± 0,55 ^b	27,75 ± 0,99 ^b
	9	0,00 ± 0,00 ^f	27,52 ± 0,35 ^b	30,51 ± 0,39 ^a	23,13 ± 0,78 ^c	24,54 ± 1,03 ^b	25,98 ± 0,89 ^c
	24	0,00 ± 0,00 ^f	29,22 ± 0,62 ^a	32,94 ± 0,56 ^a	13,53 ± 0,77 ^d	22,48 ± 0,45 ^c	24,91 ± 0,95 ^c
65	3	0,00 ± 0,00 ^f	3,11 ± 0,31 ^c	21,58 ± 0,95 ^c	2,61 ± 0,56 ^e	2,70 ± 0,56 ^d	1,27 ± 0,37 ^d
	6	0,00 ± 0,00 ^f	2,20 ± 0,25 ^c	19,48 ± 0,36 ^c	0,21 ± 0,12 ^f	0,00 ± 0,00 ^e	0,00 ± 0,00 ^e
	9	0,00 ± 0,00 ^f	0,00 ± 0,00 ^c	13,03 ± 0,25 ^d	0,00 ± 0,00 ^f	0,00 ± 0,00 ^e	0,00 ± 0,00 ^e
	24	0,00 ± 0,00 ^f	0,00 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^e	0,00 ± 0,00 ^f	0,00 ± 0,00 ^e	0,00 ± 0,00 ^e

*Valores médios de três repetições ± desvio padrão, obtidos por teste univariado; e Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p < 0,05) pelo teste de Tukey.

Tabela 5. Influência do pH, da temperatura e do tempo de incubação sobre a estabilidade* (U.mL⁻¹.10³) da COP

Ensaio	x	y	pH	Temp. (°C)	Tempo (hora)			
					2	4	8	16
1	-1	-1	4,5	20	30,28 ± 0,98 ^a	28,60 ± 0,62 ^a	29,08 ± 0,54 ^a	32,11 ± 0,87 ^a
2	1	-1	8,5	20	31,56 ± 1,015 ^a	31,50 ± 0,58 ^b	33,75 ± 0,14 ^b	34,17 ± 0,54 ^a
3	-1	1	4,5	80	1,97 ± 0,35 ^b	0,58 ± 0,13 ^c	0,00 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^b
4	1	1	8,5	80	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^b
5	-α	0	3,7	50	28,59 ± 1,01 ^a	28,47 ± 0,85 ^a	29,24 ± 0,69 ^a	30,02 ± 0,57 ^a
6	α	0	9,3	50	27,45 ± 0,69 ^a	26,83 ± 0,89 ^a	26,84 ± 0,54 ^a	25,96 ± 0,35 ^c
7	0	-α	6,5	7,7	22,10 ± 0,15 ^c	31,11 ± 0,87 ^b	32,14 ± 0,78 ^b	31,53 ± 0,96 ^a
8	0	α	6,5	92,3	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^b
9 (c)	0	0	6,5	50	34,53 ± 0,67 ^d	30,80 ± 0,82 ^b	34,72 ± 0,73 ^b	34,96 ± 0,61 ^a

*Valores médios de três repetições ± desvio padrão, obtidos por planejamento experimental; (c) valor central; e Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p < 0,05) pelo teste de Tukey.

estabilidade e a atividade enzimática, melhor a capacidade de aplicação da enzima em métodos diversos.

4 Conclusões

A COP apresentou atividade ótima na faixa de pH 5,0 a 7,0 e temperatura de 5 a 45 °C, com atividade máxima em pH 6,0 e 35 °C. A enzima mostrou-se estável em temperaturas inferiores a 50 °C e pH entre 4,5 e 9,0, por até 24 horas. A peroxidase foi inativada após 4 horas a 80 °C e após 3 minutos a 96 °C. Os resultados obtidos indicam que a folha de *Copaifera langsdorffii* pode ser uma nova fonte de peroxidase (COP) com atividade comparável à horseradish peroxidase. Os métodos de extração e obtenção da enzima semi-purificada, propostos neste trabalho, são simples e economicamente viáveis, possibilitando contribuir para a obtenção de peroxidase em alta escala e baixo custo. Esta enzima demonstra possibilidade de ser usada como reagente para diagnósticos, construção de biossensores e outros métodos em vários campos da ciência.

Agradecimentos

Os autores são gratos a CAPES pela bolsa de estudos de H. P. F. Maciel e pelo suporte oferecido pela UNICAMP.

Referências bibliográficas

1. BAUCHER, M.; CHRISTENSEN, J. H.; MEYERMANS, H.; CHEN, C.; VAN DOORSSLAERE, J.; LEPLÉ, J. C.; PILATE, G.; PETITCONIL, M.; JOUANIN, L.; CHABBERT, B.; MONTIES, B.; VAN MONTAGU, M.; BOERJAN, W. Applications of molecular genetics for biosynthesis of novel lignins. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, n. 1-3, p. 47-52, 1998.
2. CHURCH, D. L.; GALSTON, A. W. 4-Coumarate: Coenzyme A ligase and isoperoxidase expression in *Zinnia* mesophyll cells induced to differentiate into tracheary elements. **Plant Physiology**, v. 88, n. 3, p. 679-684, 1988.
3. CLEMENTE, E.; PASTORE, G. M. Peroxidase and polyphenoloxidase, the importance for food technology. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n. 2, p. 167-171, 1998.
4. ESPELIE, K. E.; FRANCESCHI, V. R.; KOLATTUKUDY, V. R. Immunocytochemical localization and time course of appearance of an anionic peroxidase associated with suberization in wound-healing potato tuber tissue. **Plant Physiology**, v. 81, n. 2, p. 487-492, 1986.
5. FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. C. L-ascorbic acid determination in pharmaceutical formulations using a biosensor based on carbon paste modified with crude extract of Zucchini (*Cucurbita pepo*). **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 4, p. 412-418, 2000.
6. FUCHS, J.; HUFLEJT, M.; ROTHFUSS, L.; WILSON, D.; CARCAMO, G.; PACKER, L. Impairment of enzymic and nonenzymic antioxidants in skin by UVB irradiation. **Journal Investigative Dermatology**, v. 93, n. 6, p. 769-773, 1989.
7. GASPAS, T. Integrated relationships of biochemical and physiological peroxidase activities. In: GREPPIN, H.; PENEL, C.; GASPAS, T. (eds): **Molecular and physiological aspects of plant peroxidases**. Genebra: University of Geneva, 1986. p. 455-468.
8. GASPAS, T.; PENEL, C.; THORPE, T.; GREPPIN, H. **Peroxidases 1970-1980**. A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. Genebra: Université de Genève, 1982.
9. GLAZE, W. H. Reaction products of ozone: a review. **Environmental Science and Technology**, v. 21, n. 3, p. 224-227, 1987.
10. GOLDBERG, R.; KEVERS, C.; GASPAS, T. Guaiacol and ascorbate peroxidase compartmentation and gradient along the growing mung bean hypocotyl. **Biochemical Physiology Pflanzen**, v. 184, n. 2, p. 155-161, 1989.
11. HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 57(suppl.), n. 5, p. 715S-725S, 1993.
12. IARC **Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Alkyl compounds, aldehydes, epoxides and peroxides**, IARC, Lyon, France 36, 1985.
13. JACKSON, P.; RICARDO, C. P. P. Cytochrome C aided resolution of *Lupinus albus* isoperoxidases in a cathodal polyacrylamide gel electrophoresis system. **Analytical Biochemistry**, v. 200, n. 1, p. 36-41, 1992.
14. KANNER, J. Oxidative process in meat and meat products: Quality implications. **Meat Science**, v. 36, n. 1-2, p. 169-189, 1994.
15. KHAN, A. A.; ROBINSON, D. S. Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. **Food Chemistry**, v. 49, n. 4, p. 407-410, 1994.
16. KOKÇAM, I.; NAZIROGLU, M. Antioxidants and lipid peroxidation status in the blood of patients with psoriasis. **Clinica Chimica Acta**, v. 289, n. 1-2, p. 23-31, 1999.

17. LIAO, X-R; ZHU, X-C; HE, P-C. A cationic peroxidase from leaves of *Vitis pseudoreticulata*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 1, p. 143-145, 1999.
18. LIN, Z-F; CHEN, L-H; ZHANG, W-Q. Peroxidase from *Ipomoea cairica* (L) SW. Isolation, purification and some properties. **Process Biochemistry**, v. 31, n. 5, p. 443-448, 1996.
19. MARIN, M. A.; CANO, M. P. Patterns of Peroxidase in Ripening Mango (*Mangifera indica*, L.) Fruits. **Journal of Food Science**, v. 57, n. 3, p. 690-692, 734, 1992.
20. MOULDING, P. H.; SINGLETON, D. E.; McLELLAN, K. M.; ROBINSON, D. S. Purification and heat stability of Cox's apple pulp peroxidase isoenzymes. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 23, n. 4, p. 343-351, 1988.
21. NAKANO, Y.; ASADA, K. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts: its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. **Plant Cell Physiology**, v. 28, n. 1, p. 131-140, 1987.
22. NAKAYAMA, T.; AMACHI, T. Fungal peroxidase: its structure, function, and application. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 6, n. 3, p. 185-198, 1999.
23. ODEBODE, A. C.; OSO, B. A. Enzyme activities during post-harvest storage of kolanut (*Cola nitida*. Schoot and Endlicher). **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung**, v. 210, n. 5, p. 555-556, 1995.
24. PODGORNİK, H.; GRGIC, I.; PERDIH, A. Decolorization rate of dyes using lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. **Chemosphere**, v. 38, n. 6, p. 1353-1359, 1999.
25. SCHALLREUTER, K.; WOOD, J. Free radical reduction in the human epidermis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 6, n. 5, p. 519-532, 1989.
26. SCHLOSS, P.; WALTER, C.; MADER, M. Basic peroxidase in isolated vacuoles of *Nicotiana tabacum* L. **Planta**, v. 170, n. 2, p. 225-229, 1987.
27. SCHNYDER, H.; SEO, S. RADEMACHER, I. F.; KÜHBAUCH, W. Spatial distribution of growth rates and of epidermal cell lengths in the elongation zone during leaf development in *Lolium perenne* L. **Planta**, v. 181, n. 3, p. 423-431, 1990.
28. SERGEYEVA, T. A.; LAVRIK, N. V.; RACHKOV, A. E.; KAZANTSEVA, Z. I.; PILETSKY, S. A.; ELSKAYA, A. V. Hydrogen peroxide-sensitive enzyme sensor based on pthalocyanine thin film. **Analytica Chimica Acta**, v. 391, n. 3, p.289-297, 1999.
29. SHIMONI, M.; REUVENI, R. Non-dialysis method of rapid and facile sample preparation for the desalting and purification of enzymes and other proteins from plant extracts. **Journal of Chromatography**, v. 646, n. 1, p. 99-105, 1993.
30. SIMIC, M. G.; KAREL, M. (Eds). **Autoxidation in Foods and Biological systems**. New York: Plenum Press, 1979.
31. TAIZ, L. Plant cell extension: regulation of cell wall mechanical properties. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 35, p. 585-657, 1984.
32. VÁMOS-VIGYÁZÓ, L. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 15, n. 1, p. 49-127, 1981.
33. VAN DEN BERG, B. M.; VAN HUYSTEE, R. B. Rapid isolation of plant peroxidase. Purification of peroxidase *a* from *Petunia*. **Plant Physiology**, v. 60, n. 3, p. 299-304, 1984.
34. VIEIRA, I. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Biosensor based on paraffin/graphite modified with sweet potato tissue for the determination of hydroquinone in cosmetic cream in organic phase. **Talanta**, v. 52, n. 4, p. 681-689, 2000.
35. VIEIRA, I. C.; FATIBELLO-FILHO, O; ANGNES, L. Zucchini crude extract-palladium-modified carbon paste electrode for the determination of hydroquinone in photographic developers. **Analytica Chimica Acta**, v. 398, n. 2-3, p. 145-151, 1999.
36. WRIGHT, H.; NICELL, A. Characterization of soybean peroxidase for the treatment of aqueous phenols. **Bioresource Technology**, v. 70, n. 1, p. 69-79, 1999.