

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA LIPOXIGENASE NA CASTANHA DO BRASIL (*Bertholletia excelsa*)

FABIELLE NEGRÃO FERREIRA*
ELEDA MARIA PAIXÃO XAVIER**
ANDRÉA DA SILVA PINTO**
DARLY RODRIGUES POMPEU***

Para determinar as condições ótimas de atividade da lipoxigenase (LOX) presente na castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) verificou-se sua atividade em função do pH em soluções tampão (pH 4,00; 5,00; 6,00; 6,50; 7,00; 8,00 e 9,00), variando-se o tipo de substrato (ácido linoleico e linolênico) e suas concentrações (1,00; 2,50; 5,00; 10,00; 15,00; 20,00 e 40,00 mM), bem como a concentração de extrato enzimático (0,50; 1,00; 1,50; 2,00; 2,50 e 3,00%). Monitorou-se a atividade da LOX pelo acompanhamento do aumento da absorbância a 234 nm durante 240 segundos, expressos em milimolar por segundo por grama (mM/s.g). Ambos os ácidos graxos estudados mostraram picos de atividade de LOX em pH 6,5 e concentração de substrato a 1,5 mM. Aplicando-se os dados experimentais à equação de Michaelis-Menten e da linearização de Lineawer-Burk, os valores obtidos para a constante de Michaelis-Menten (K_m) e de velocidade enzimática máxima (V_{MAX}) variaram entre: 0,164 a 0,169 mM e 0,083 a 0,093 mM/s.g, respectivamente. O ácido linoleico revelou-se o melhor substrato para a enzima e foi utilizado para determinação da atividade da LOX em função da concentração de enzima, que apresentou maior atividade a 3,00%.

PALAVRAS-CHAVE: *Bertholletia excelsa*; LIPOXIGENASE; ATIVIDADE ENZIMÁTICA.

- * Tecnóloga de Alimentos, Universidade do Estado do Pará (UEPA), Cametá, PA, Brasil (e-mail: fabielle_ferreira@yahoo.com.br).
- ** Discente, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil (e-mail: eledapaixao@yahoo.com.br).
- *** Docente, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Naturais e Tecnologia, UEPA, Belém, PA, Brasil (e-mail: drpompeu@yahoo.com.br).

1 INTRODUÇÃO

A castanheira (*Bertholletia excelsa*), pertencente à família Lecythidaceae, é uma das mais importantes espécies de exploração vegetal da Amazônia e se distribui especialmente na Amazônia brasileira, peruana e boliviana (MULLER e KATO, 1995). A castanha-do-brasil encontra grande aplicação na indústria de cosméticos e de forma mais acentuada na de alimentos, devido sua composição química e nutricional (MENEZES e SOUZA, 2004).

A castanha-do-brasil é rica em ácido palmítico, esteárico, linoleico e linolênico, sendo que a fração lipídica dos ácidos graxos saturados não ultrapassa 25% de seu total. Constitui excelente fonte de selênio, único mineral antioxidant. Apesar disto, a castanha-do-brasil oxida muito facilmente em função da alta concentração de substratos oxidáveis, como os ácidos graxos insaturados (FREITAS *et al.*, 2007).

O processo de oxidação lipídica pode ocorrer de várias formas na castanha-do-brasil, sendo mais importante a oxidação enzimática. A lipoxigenase (isoenzima) catalisa a dioxigenação de ácidos graxos poliinsaturados, em especial os ácidos linoleico e linolênico (SILVA, 2004), que contém o sistema *cis,cis*-1,4-pentadieno. Como resultado há a formação de peróxidos e hidroperóxidos com duplas ligações conjugadas, que podem se envolver em diferentes reações degradativas (especialmente a oxidação lipídica) para a formação de seus respectivos derivados hidroperóxidos (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

As lipoxigenases (LOX) estão amplamente distribuídas em plantas e animais superiores e contêm ferro não heme, que é necessário para sua atividade catalítica. Os hidroperóxidos produzidos pelas LOX são responsáveis pela redução do valor nutritivo dos alimentos, influenciando a degradação de carotenoides, retinol, tocoferol, ácido ascórbico, além de proteínas e aminoácidos. A interação desses produtos da degradação com peptídeos e aminoácidos provoca escurecimento dos produtos e comprometimento do seu valor nutricional (SILVA *et al.*, 2001).

Axelrod, Cheesbrough e Laasko (1981) demonstraram a presença de três isoenzimas da LOX na soja, chamadas de LOX-1, LOX-2 e LOX-3. Essas isoenzimas apresentam condições de atividade diferentes, como pH ótimo 9,50, 6,50, e 5,00 – 9,00 e ponto isoelétrico 5,68, 6,25, 6,15, respectivamente. Também há diferença em relação ao substrato, pois a LOX-1 tem alta afinidade por ácidos graxos ionizados, enquanto a LOX-2 e a LOX-3 apresentam afinidade pelo ácido graxo não ionizado (LANNA, 1995).

A existência de determinada enzima num alimento, ou sua diferenciação de outras enzimas nele presentes, somente pode ser demonstrada por métodos indiretos através da medida de sua atividade catalítica. Por essa razão, torna-se necessário efetuar análises dos parâmetros que influenciam a velocidade de cada reação enzimática (BELITZ e GROSCH, 1997). A análise quantitativa do efeito de cada um dos fatores que influenciam a atividade enzimática é avaliada pelo aumento ou redução da velocidade da reação catalisada, utilizando-se mecanismos matemáticos como a equação de Michaelis-Menten. Essa equação possibilita relacionar quantitativamente a velocidade inicial (V_0), a velocidade inicial máxima (V_{MAX}) e a concentração inicial de substratos (NELSON e COX, 1995).

Apesar de se conhecer bem o mecanismo de atuação da LOX, suas condições ótimas de atividade sobre a castanha-do-brasil são quase desconhecidas. Este trabalho teve como objetivo determinar as condições ótimas de atividade da LOX da castanha-do-brasil (*B. excelsa*). Para isso, estudou-se o efeito do pH, o tipo e a concentração do substrato (ácido linoleico e ácido linolênico), a concentração de enzima, bem como foram determinados os valores de K_M e V_{MAX} .

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

As amêndoas da castanha-do-brasil foram adquiridas na feira do Ver-o-Peso em Belém (PA) e transportadas para a Usina de Alimentos do Laboratório de Engenharia Química e de Alimentos da Universidade Federal do Pará. As amêndoas foram devidamente higienizadas com água clorada e descascadas manualmente com a utilização de facas estéreis e luvas. A obtenção do extrato enzimático foi feita de acordo com Silva, Borges e Ferreira (1999) com algumas modificações.

Pesaram-se 50 g de castanha-do-brasil, as quais foram trituradas, maceradas, homogeneizadas com 100 mL de água ultra pura e filtradas a vácuo. A solução obtida foi centrifugada a 3.700 g durante 20 minutos a 4°C. Em seguida, separou-se o sobrenadante que foi utilizado como fonte de enzima. O extrato enzimático foi saturado com N₂ e refrigerado até a realização das análises, sendo sempre preparado no mesmo dia.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Determinação da atividade da lipoxigenase em função do pH

Para determinação das condições ótimas de pH foram testados os tampões pH: 4,00 (ácido cítrico / citrato de sódio), 5,00 (ácido cítrico / fosfato de sódio dibásico anidro), 6,00 (fosfato de potássio dibásico / fosfato de potássio monobásico), 6,50 (potássio dibásico / fosfato de potássio monobásico), 7,00 (fosfato de potássio dibásico / fosfato de potássio monobásico), 8,00 (dihidrogeno fosfato / HCl) e 9,00 (ácido bórico / borato de sódio na concentração 0,05 M). Em todos os casos, as soluções de ácido linoleico e linolênico (10 mM) foram utilizadas como substrato (AXELROD, CHEESBROUGH e LAASKO, 1981; OLIVEIRA *et al.*, 2002). Em cubetas de quartzo foram adicionados 1.750 µL de solução tampão, 200 µL de solução de substrato (10 mM) e 50 µL de extrato enzimático (1:3; m:v). A mistura foi homogeneizada levemente e colocada em espectrofotômetro Ultravioleta/Visível PHAMACIA BIOTECH, modelo Ultrospec 2000 (Cambridge, Inglaterra) para o acompanhamento da cinética enzimática durante 6 min a 234 nm. Com base nas absorbâncias obtidas determinou-se a atividade enzimática de acordo com Silva Borges e Ferreira (1999). Os resultados foram expressos em milimolar por grama de extrato por segundo (mM/gs). Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.2.2 Determinação da atividade de lipoxigenase em função da concentração de substrato

Os ácidos linoleico e linolênico foram usados como substrato a fim de se avaliar a atividade de lipoxigenase da castanha-do-brasil em função da concentração desses ácidos poliinsaturados em tampão fosfato de sódio pH 6,50. As concentrações das soluções de substrato, adaptadas de Buco *et al.* (2006), foram: 1,00 ; 2,50 ; 5,00 ; 10,00 ; 15,00 ; 20,00 e 40,00 mM. Foram adicionados 1.750 µL de solução tampão, 200 µL de solução de substrato e 50 µL de extrato enzimático (1:3; m:v). A mistura foi homogeneizada levemente por 2 segundos e colocada em espectrofotômetro UV/Visível (PHAMACIA BIOTECH, modelo Ultrospec 2000) para o acompanhamento da cinética enzimática durante 6 min a 234 nm.

2.2.3 Determinação da atividade de lipoxigenase em função da concentração de enzima

Utilizou-se o ácido linoleico como substrato em tampão fosfato de sódio pH 6,50, com as seguintes concentrações de enzima (solução de castanha-do-brasil na relação massa:volume; m:v): 6,70%, 13,30%, 20%, 26,70%, 33% e 40%. Essas proporções foram adaptadas de Mazzuchetti e Vineis (2005). Foram adicionados 1.750 µL de solução tampão, 200 µL de ácido linoléico (15 mM) e 50 µL de extrato enzimático. A mistura foi homogeneizada levemente por 2 segundos e colocada em espectrofotômetro UV/Visível (PHAMACIA BIOTECH, modelo Ultrospec 2000) para o acompanhamento da cinética enzimática durante 6 min a 234 nm.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 EFEITO DO pH SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LIPOXIGENASE NA CASTANHA-DO-BRASIL

De acordo com a Figura 1 houve crescimento da atividade enzimática em função do pH até valores de, aproximadamente, 6,50 para os dois substratos, seguido de acentuado decréscimo da atividade em valores de pH superiores a 6,50.

Os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com Bobbio e Bobbio (2003) que relataram que a maioria das enzimas apresenta atividade ótima em valores de pH entre 4,50

e 8,00. Buranasompob *et al.* (2006), utilizando ácido linoleico como substrato de lipoxigenase de nozes e amêndoas, encontraram pH ótimo de atividade enzimática entre 5,50 e 7,50, porém com maior pico de atividade em pH 7,00. Mosqueira, Galan e Fernandez (1993) relataram que o pH ótimo de atividade da lipoxigenase do pimentão foi 5,00. Koch *et al.* (1992) determinaram que o pH ótimo da atividade de lipoxigenase em folhas de tomate inoculadas com *Pseudomonas syringae* está entre 6,40 e 7,20. Lanna *et al.* (1996) obtiveram valores de atividade ótima entre pH 6,00 e 7,00 para folhas de soja.

A atividade de lipoxigenase em função do pH, utilizando-se ácido linolênico como substrato apresentou picos em pH 5,00 e 6,50, enquanto que o pico para o ácido linoleico ocorreu em pH 6,50. A partir desse resultado verificou-se a presença de LOX na castanha-do-brasil, supondo-se que as isoenzimas sejam do tipo LOX 2 e/ou LOX 3. De acordo com Lanna (1995), tais enzimas atuam na faixa de pH ótimo encontrada para as lipoxigenases da castanha-do-brasil, sendo que a atividade ótima de pH na LOX-2 se restringe a 6,50 e a LOX- 3 alcança altos níveis de atividade na faixa de pH entre 5,00 a 9,00.

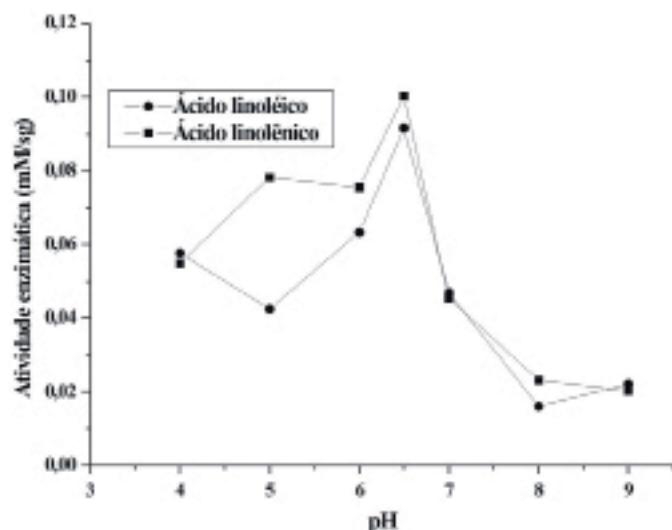


FIGURA 1 - EFEITO DO pH SOBRE A ATIVIDADE DA LIPOXIGENASE DA CASTANHA-DO-BRASIL COM DIFERENTES SUBSTRATOS (ÁCIDO LINOLEICO E ÁCIDO LINOLÊNICO)

3.2 ATIVIDADE DA LIPOXIGENASE EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO

A fim de determinar os valores de K_m e V_{MAX} elaboraram-se os gráficos da concentração do substrato (ácidos linoleico e linolênico) em função da atividade enzimática, expressa em mM/sg. Determinou-se também qual substrato é o mais indicado para quantificação da atividade enzimática da lipoxigenase de castanha-do-brasil. Nessa etapa do trabalho utilizou-se o pH do tampão que apresentou maior atividade enzimática no passo anterior, tampão fosfato de sódio pH 6,50 (0,05 M).

De acordo com a Figura 2, a atividade enzimática da LOX da castanha-do-brasil aumenta em função de maiores concentrações dos ácidos linoleico e linolênico. Os maiores valores de atividade enzimática acontecem, em ambos os casos, na concentração de 1,50 mM de substrato. Verificou-se a estabilização da atividade a partir desses níveis de concentração.

Sawazaki Teixeira e Miranda (1987) obtiveram atividade enzimática máxima da lipoxigenase utilizando ácido linoleico em concentrações variando de 0,178 a 0,267 mM. Em concentrações de substrato acima de 0,891 mM houve inibição da atividade enzimática, possivelmente em razão da ligação dos substratos a determinados grupos não catalíticos da enzima, que acabam modificando a conformação ativa da mesma diminuindo sua atividade catalítica. Bucco *et al.* (2006), utilizando substrato de *Enzimas Lipozyme*, observaram que a velocidade da reação aumenta com a elevação

da concentração inicial do substrato, atingindo valor máximo de 0,011 mol L⁻¹ min⁻¹ em concentração inicial de 0,65 mol.L⁻¹.

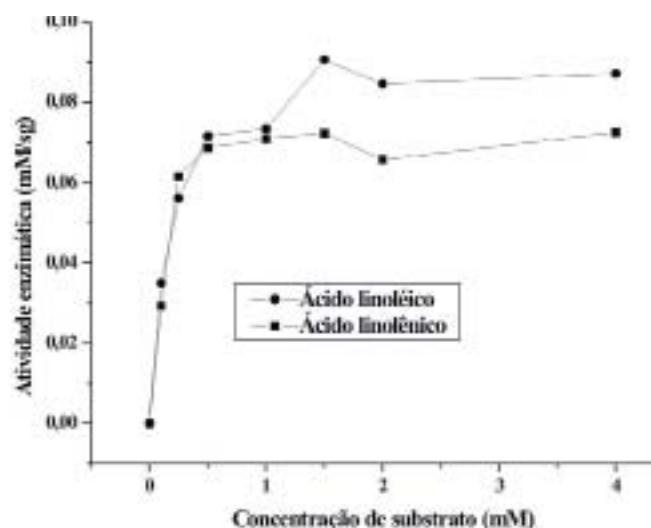


FIGURA 2 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO (ÁCIDO LINOLEICO E ÁCIDO LINOLÊNICO) NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LIPOXIGENASE DA CASTANHA-DO-BRASIL

Na Figura 3 pode-se observar a linearização da equação de Michaelis-Menten, o chamado gráfico de duplos recíprocos ou simplesmente equação de Lineweaver-Burk para a lipoxigenase da castanha-do-brasil. Essa linearização permitiu a determinação das constantes (Tabela 1) K_M e V_{MAX} que representam, respectivamente, a constante de Michaelis-Mentem e a velocidade máxima de atividade enzimática. Segundo Nelson e Cox (1995), K_M reflete o ambiente celular, a concentração do substrato normalmente encontrada *in vivo* pela enzima, e a química da reação que está sendo catalisada. V_{MAX} constitui parâmetro cinético que depende da constante catalítica e da concentração da enzima no experimento.

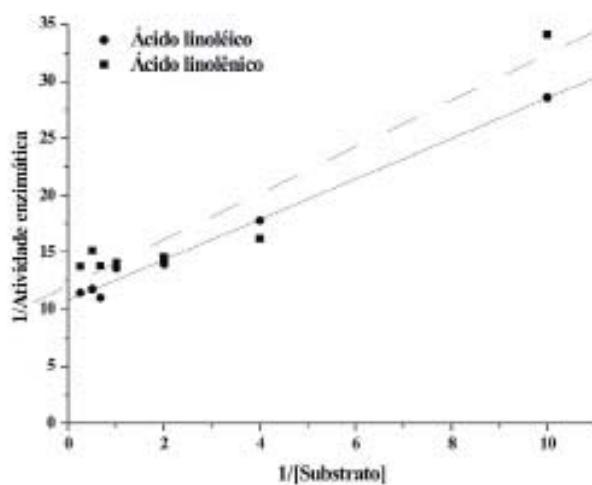


FIGURA 3 - LINEARIZAÇÃO DA EQUAÇÃO DE MICHAELIS-MENTEN (EQUAÇÃO DE LINEWEAVER-BURK) PARA A LIPOXIGENASE DA CASTANHA-DO-BRASIL

A constante de Michaelis-Menten indica a adequação relativa de substratos alternativos para determinada enzima, ou seja, o substrato com o valor mais baixo de K_m tem aparentemente maior afinidade com a enzima (NELSON e COX, 1995). A partir da avaliação do comportamento da lipoxigenase da castanha-do-brasil em função da concentração e do tipo de substrato pôde-se observar que a referida enzima tem maior capacidade de reagir com o ácido linoleico na concentração de 2 mM, não havendo aumento aparente na atividade enzimática para valores superiores a essa concentração.

TABELA 1 - VALORES DE K_m E V_{MAX} DOS ÁCIDOS LINOLEICO E LINOLÊNICO PARA A LIPOXIGENASE DA CASTANHA-DO-BRASIL

Substrato	V_{MAX}	K_m
Ácido Linoleico	$0,093 \pm 0,002$	$0,16 \pm 0,003$
Ácido linolênico	$0,083 \pm 0,005$	$0,169 \pm 0,001$

3.3 ATIVIDADE DA LIPOXIGENASE EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO ENZIMÁTICA

A fim de determinar a concentração de enzima para se obter a atividade ótima da lipoxigenase da castanha-do-brasil foram realizados ensaios com as concentrações de extrato de enzima de 0,50, 1,00, 1,50, 2,00, 2,50 e 3,00% de amostra (essas concentrações se referem as concentrações na cubeta), escolhidas com base em análises anteriores.

A Figura 4 apresenta o efeito da concentração de extrato de enzima na atividade da lipoxigenase da castanha-do-brasil. Observou-se linearidade da atividade enzimática em concentrações próximas a 2,50%, ocorrendo a partir de 2,50 – 3,00% sua estabilização. Tal fato revela que os produtos da reação estão sendo formados mais rapidamente, devido ao aumento na concentração de enzima. Quanto maior a concentração de enzima, mais rápido o complexo enzimático será formado e o produto da reação também.

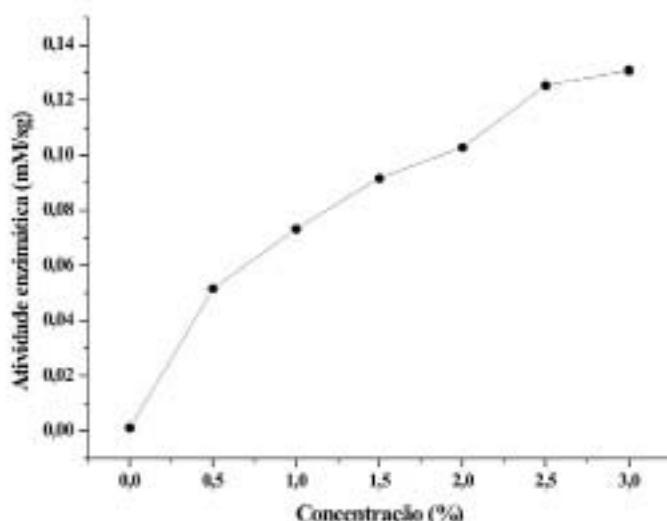


FIGURA 4 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA SOBRE A ATIVIDADE DA LIPOXIGENASE DA CASTANHA-DO-BRASIL, UTILIZANDO-SE O ÁCIDO LINOLEICO COMO SUBSTRATO

4 CONCLUSÃO

Constatou-se, pelas análises realizadas, a presença de lipoxygenase em castanha-do-brasil, supostamente do tipo LOX 2 e/ou LOX 3. As condições ótimas para determinação da atividade enzimática para lipoxygenase da castanha-do-brasil foram pH 6,50 e ácido linoleico como substrato na concentração de 1,50 mM. A escolha do substrato ocorreu em função dos valores de K_m e V_{MAX} determinados para os dois substratos utilizados (ácido linoleico e ácido linolênico). Com as condições de determinação da lipoxygenase da castanha-do-brasil conhecida, trabalhos futuros são necessários no sentido de desnaturar/inativar a referida enzima para minimizar seus efeitos de oxidação.

ABSTRACT

EVALUATION OF LIPOXYGENASE ACTIVITY OF THE BRAZIL NUT (*Bertholletia excelsa*)

To determine the optimum conditions of lipoxygenase activity (LOX) of the Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) was considered the activity according to pH in buffer solutions (pH 4.00, 5.00, 6.00, 6.50, 7.00, 8.00 and 9.00), varying the substrates type (linoleic acid and linolenic acid) and its concentration (0.10, 0.25, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00 and 4.00 mM) as well as the concentration of enzyme extract (0.50, 1.00, 1.50, 2.00, 2.50 and 3.00%). The activity of LOX was monitored by absorbance increase at 234 nm during 240 s, expressed in millimolar per second per gram (mM/sg). Both fatty acids studied showed peak LOX activity: at pH 6.50 and substrate concentration of 1.5 mM. Experimental data obtained by Michaelis-Menten equation and Lineawer-Burk linearization presented Michaelis-Menten constant (KM) and the maximum velocity of enzyme (VMAX) values ranged from: 0.164 to 0.169 mM and 0.083 to 0.093 mM/sg, respectively. Linoleic acid proved to be the best substrate for the enzyme, and was used to determine the LOX activity considering the enzyme concentration. The most active enzyme concentration was 3.00%.

KEY-WORDS: *Bertholletia excelsa*; LIPOXYGENASE; ENZYMATIC ACTIVITY.

REFERÊNCIAS

- 1 AXELROD, B.; CHEESBROUGH, T.M.; LAASKO, S. Lipoxygenases from soybeans. **Methods in Enzymology**, v.71, p. 441-451, 1981.
- 2 BELITZ, H.D.; GROSCH, W. **Química de los alimentos**. 2.ed. rev. Zaragoza: Acribia, 1997. 840 p.
- 3 BOBBIO, F.O; BOBBIO, P.A. **Introdução a química de alimentos**. 3. ed. rev. São Paulo: Livraria Varela, 2003. 223 p.
- 4 BUCCO, S.; BONETTI, T. M.; SKORONSKI, E.; KLUG, M.; JOAO, J. J. Influência da concentração inicial de substratos sobre a velocidade inicial da reação de formação de ésteres (aromas) catalisada por enzimas lipozyme. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2006, 29., Aguas de Lindóia-SP. **Anais...** Aguas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 2006. 1092 p.
- 5 BURANASOMPOB, A.; TANG, J.; POWERS, J. R.; REYES, J.; CLARK, S.; SWANSON, B. G. Lipoxygenase activity in walnuts and almonds. **Food Science and Technology - LWT**, v. 40, p. 893-899, 2006.
- 6 FREITAS, S. P.; SILVA, O. F.; MIRANDA, I. C.; COELHO, M. A. Z. Extração e fracionamento simultâneo do óleo da castanha-do-Brasil com etanol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 14-17, 2007.
- 7 KOCH, E.; MEIER, B.M.; EIBEN, H.G.; SLUSARENKO, A. A lipoxygenase from leaves of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) is induced in response to plant pathogenic *Pseudomonas*. **Plant Physiology**, v. 9, p.571-576, 1992.
- 8 LANNA, A.C. **Caracterização cinética do sistema lipoxygenase de folhas de soja de genótipos com e sem lipoxygenases nas sementes**. 1995. 79 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1995.
- 9 LANNA, A.C.; OLIVEIRA, M.G.A.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Kinetic parameters of leaf lipoxygenase pools from normal soybean genotypes and a line devoid of seed lipoxygenases. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 8, p. 87-92, 1996.

- 10 MAZZUCHETTI, G.; VINEIS, C. Study of the enzyme treatments effect on the pilling behaviour of knitted wool fabrics. **AUTEX Research Journal**, v. 5, p.1-5, 2005.
- 11 MENEZES, H. C.; SOUZA, M. L. Processamentos de amêndoas e torta de castanha-do-brasil e farinha de mandioca: parâmetros de qualidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 1, p. 120-128, 2004.
- 12 MOSQUEIRA, M. I. M.; GALAN, M J.; FERNANDEZ, J G. Lipoxygenase activity during pepper ripening and processing of paprika. **Phytochemistry**, v. 32, p. 1103-1108, 1993.
- 13 MÜLLER, C.H; KATO, A.K. **A cultura da castanha-do-brasil**. Brasília: Serviço de Produção de Informação, 1995.
- 14 NELSON, D.L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2. ed. rev. São Paulo: Sarvier, 1995. 869 p.
- 15 OLIVEIRA, G.; OLIVEIRA, M. G. A.; PIRES, C. V.; BATISTA, R. B.; PIOVESAN, N. D.; GOMES, M. R. A.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Efeito de ácido jasmônico na atividade de lipoxigenases de plantas de soja [*Glycine max* (L.) Merrill]. **Ciência Agrotécnica**, Lavras. v. 26, n. 6, p. 1143-1151, 2002.
- 16 SAWAZAKI, H. E; TEIXEIRA, J. P. F.; MIRANDA, M. A. C. Avaliação da atividade da lipoxigenase em linhagens de soja. **Bragantia**, Campinas, v. 46, n. 2, p. 371-380, 1987.
- 17 SILVA, L. B. C. **Identificação de lipoxigenases em sementes de soja (*Glycine max* L.) de diferentes linhagens**. 2004. 68 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- 18 SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.
- 19 SILVA, M. D.; OLIVEIRA, M. G.; LANNA, A. C.; PIRES, C. V.; PIOVERSAN, N. D.; JOSÉ, I. C.; BATISTA, R. B.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Caracterização da via das lipoxigenases em plantas de soja resistentes e susceptíveis a *Diaphorophyllum phaseolorum* F. sp Meridionalis, agente causal do cancro-de-haste. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, n. 3, p. 316-328, 2001.