**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Resíduos de romã (*Punica granatum*) na prevenção da doença de Alzheimer

Maressa Caldeira Morzelle

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2012**

Maressa Caldeira Morzelle
Engenheira de Alimentos

Resíduos de romã (*Punica granatum*) na prevenção da doença de Alzheimer

Orientadora:
Prof^ª Dr^ª **JOCELEM MASTRODI SALGADO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em
Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de
Alimentos

Piracicaba
2012

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Morzelle, Maressa Caldeira
Resíduos de romã (*Punica granatum*) na prevenção da doença de Alzheimer / Maressa
Caldeira Morzelle.- - Piracicaba, 2012.
71 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Alimentos funcionais 2. Anticolinérgicos 3. Antioxidantes 4. Doença de Alzheimer
5. Doenças neurodegenerativas 6. Microencapsulação 7. Romã I. Título

CDD 664.8
M893r

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e minha irmã, minhas maiores riquezas,
As minhas avós (Amélia e Santana) e meus avôs (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

Eu acredito que escrever uma dissertação de mestrado é como dar um presente. Passei muitas manhãs e noites escolhendo as melhores palavras, depois eu as envolvi em uma embalagem agradável e finalmente espero que seja apreciada como uma soma para a ciência, na qual eu fui uma das protagonistas. Mas só fui capaz de desenvolver esta pesquisa graças a outros presentes que recebi de muitas pessoas – e quero imensamente agradecer:

Primeiramente a Deus, por ter me feito suportar a distância e as dificuldades a fim de concluir mais esta etapa, e principalmente por me ensinar que nenhum título tem valor maior que os ensinamentos da vida e dos meus pais.

Aos meus pais, Josimar e Laura, e minha irmã Lareska, a quem devo tudo o que sou. Eles que não pouparam esforços em me apoiar e ajudar mesmo de tão longe e estiveram sempre presentes demonstrando seu carinho e amor mesmo a mil quilômetros de distância, merecem meu total agradecimento.

À minha orientadora, Dra. Jocelyne Mastrodi Salgado, por me receber tão bem em seu grupo e por toda a confiança que depositou em mim. O crescimento pessoal e profissional que tive sob sua orientação é inquestionável.

Ao Dr. Alessandro de Oliveira Rios, da UFRGS, pelos ensinamentos e ajudas durante esta dissertação. Agradeço também seus orientados Kleidson e Karla por toda a ajuda que me deram no HPLC.

A doutoranda Claudia Seidl da UFPR por me acolher de forma maravilhosa e me ensinar tanto sobre acetilcolinesterase e ao doutorando Ulysses da USP (Ribeirão Preto) por me ceder os reagentes para tal análise.

A professora Carmem Sílvia Favaro-Trindade e o mestrando Volnei da FZEA/USP pelo tempo dispensado para auxiliar no processo de atomização.

Às amigas (os) e companheiras (os) de análises, café e RUCAS: Antônio, Gabi, Fúvia, Kélin (pela ajuda nas estatísticas), Marina e Paty. Com vocês morar em Piracicaba foi bem mais fácil. Não tenho palavras para expressar a imensa gratidão que tenho por vocês. Principalmente ao considerar todas as risadas, alegrias, desafios, tristezas, conversas regadas a cafezinhos deliciosos e sonhos vividos juntos. Vocês trouxeram alegria e companheirismo a esta etapa.

Em especial, agradeço a Patrícia Bachiega, pela imensurável ajuda no laboratório (inclusive durante a madrugada) durante as análises de acetilcolinesterase. Torço pelo seu sucesso sempre. Obrigada pela ajuda quando precisei.

Agradeço a Professora Solange Guidolin Canniatti Brazaca pelas contribuições dispensadas a esta dissertação.

A professora Ellen, pelo grande incentivo dado a buscar o mestrado.

Ao GEAF, Grupo de Estudos em Alimentos Funcionais, e todas as estagiárias, em especial, Amanda e Priscila, pela ajuda na compilação de dados.

Aos funcionários do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ/USP pela, ajuda e carinho. Em especial, aos funcionários Fábio, Vana, Eliane, Helô e Débora, por toda a atenção dirigida a mim durante o mestrado.

A CAPES e CNPQ, pelas bolsas concedidas durante o mestrado.

Agradeço a toda a minha família, por parte de mãe e pai, e a família do meu noivo, pelo apoio durante mais esta etapa.

E por fim, e em especial, agradeço o meu noivo, Thiago, pelo amor, força, carinho, e incentivo para continuar nesta jornada, por mais difícil que ela me pareceu muitas vezes. E principalmente, por me fazer ver outro lado da ciência, considerando principalmente a sociedade na qual estamos inseridos e o nosso papel perante ela. Saiba que esta conquista também é sua.

A todos que porventura não mencionei, mas que transmitiram algo a mim durante esta etapa piracicabana.

"O que destrói a humanidade: A Política, sem princípios; o Prazer, sem compromisso; a Riqueza, sem trabalho; a Sabedoria, sem caráter; os negócios, sem moral; a Ciência, sem humanidade; a Oração, sem caridade."
(Mahatma Gandhi)

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 DESENVOLVIMENTO.....	17
2.1 Revisão Bibliográfica.....	17
2.1.1 Doenças neurodegenerativas.....	17
2.1.2 Doença de Alzheimer: características neuropatológicas.....	17
2.1.3 Inibidores de acetilcolinesterase: busca de novos candidatos de origem natural.....	21
2.1.4 Antioxidantes e doenças neurodegenerativas.....	24
2.1.5 Romã e doenças neurodegenerativas.....	28
2.1.6 Microencapsulação.....	31
2.1.7 Resíduos agroindustriais.....	33
2.2 Materiais e Métodos.....	35
2.2.1 Obtenção da matéria prima.....	35
2.2.2 Produção dos extratos.....	35
2.2.3 Delineamento experimental e tratamentos.....	36
2.2.4 Quantificação de compostos fenólicos.....	36
2.2.5 Screening da atividade antioxidante.....	37
2.2.5.1 Ensaio pelo método DPPH.....	37
2.2.5.2 Ensaio pelo método ABTS.....	37
2.2.6 Taninos.....	38
2.2.7 Atividade inibitória da acetilcolinesterase.....	38
2.2.8 Atomização.....	38
2.2.9 Análise de microestrutura.....	39
2.2.10 Umidade.....	39
2.2.11 Higroscopicidade.....	40

2.2.12 Solubilidade.....	40
2.2.13 Análise estatística.....	40
2.2.14 Análise sensorial.....	41
2.3 Resultados e Discussão.....	42
2.3.1 Caracterização dos extratos.....	42
2.3.1.1 Capacidade antioxidante.....	42
2.3.1.2 Compostos fenólicos.....	45
2.3.1.3 Taninos.....	46
2.3.1.4 Inibição de acetilcolinesterase.....	47
2.3.2 Correlação de Pearson.....	51
2.3.3 Caracterização das micropartículas.....	54
2.3.3.1 Atividade anticolinesterásica e antioxidante.....	54
2.3.3.2 Características tecnológicas.....	54
2.3.3.3 Microscopia de varredura eletrônica.....	55
2.3.4 Análise sensorial.....	57
3 CONCLUSÃO.....	59
REFERÊNCIAS.....	61

RESUMO

Resíduos de romã (*Punica granatum*) na prevenção da doença de Alzheimer

Os inibidores da enzima acetilcolinesterase constituem o principal tratamento da doença de Alzheimer e fontes de substâncias naturais com potencial anticolinesterásico vêm sendo amplamente estudadas. Dentre os frutos com benefícios para a saúde, a romã é evidenciada como excelente fonte de compostos antioxidantes, sendo que maior parte dos compostos se concentram em sua casca. Com base nisso, o objetivo desta pesquisa foi buscar novas substâncias naturais com potencial anticolinesterásico, através da avaliação de extratos de casca de romã. Quatro extratos com diferentes concentrações de etanol foram analisados quanto à atividade antioxidante, quantidade de compostos fenólicos, taninos e atividade anticolinesterásica. Do presente estudo foi constatado que a casca da romã apresentou elevada capacidade antioxidante, independente da concentração do solvente de extração empregado. O extrato formulado com 80% de etanol se destacou perante os demais pelo seu poder de inibição da acetilcolinesterase. Houve correlação negativa entre a atividade anticolinesterásica e a atividade antioxidante dos extratos. A atomização do extrato não acarretou mudanças em sua atividade anticolinesterásica e nem na sua capacidade antioxidante. Da mesma forma, a adição das micropartículas a um suco elaborado a partir de um preparado em pó não modificou suas características sensoriais. Diante do exposto, a elaboração de micropartículas de extrato de casca de romã constitui alternativa viável para a incorporação em diversos produtos, com a finalidade de prevenir ou reduzir risco da doença de Alzheimer.

Palavras-chave: Anticolinesterásicos; Microencapsulação; Atividade antioxidante; Doenças neurodegenerativas; Alimentos funcionais

ABSTRACT

Waste of pomegranate (*Punica granatum*) in the prevention of Alzheimer's disease

The acetylcholinesterase inhibitors are the primary treatment of Alzheimer's disease and sources of natural substances with potential anticholinesterase have been widely studied. Among the fruits with health benefits, the pomegranate is evidenced as an excellent source of antioxidant compounds, and most compounds are concentrated in its peel. Based on this, the objective of this research was to find new substances with potential anticholinesterase, through the evaluation of pomegranate peel extracts. Four extracts with different concentrations of ethanol were analyzed for their antioxidant activity, amount of phenolic compounds, tannins and anticholinesterase activity. From this study it was found that pomegranate peel showed high antioxidant capacity, independent of the concentration of the solvent extraction employed. The extract formulated with 80% ethanol in relation to other stood out by his power of acetylcholinesterase inhibition. There was a negative correlation between acetylcholinesterase activity and antioxidant activity of the extracts. Microencapsulation of extract did not cause changes in their anticholinesterase activity and antioxidant capacity. The same way, the addition of microcapsules to a powder preparation for refreshment not changed their sensory characteristics. Given the above, the preparation of microcapsules of pomegranate peel extract is a viable alternative for incorporation into various products, in order to prevent or reduce risk of Alzheimer's disease.

Keywords: Anticholinesterase; Microencapsulation; Antioxidant activity; Neurodegenerative diseases; Functional foods

1 INTRODUÇÃO

As doenças crônicas não transmissíveis, como a doença de Alzheimer, merecem crescente atenção, pois sua incidência envolve não somente problemas econômicos relacionados a gastos com saúde pública como também promove a redução da qualidade de vida e o comprometimento da saúde física e mental.

Evidências epidemiológicas têm demonstrado que existe uma forte relação inversa entre o consumo regular de frutas e hortaliças e a prevalência de algumas doenças degenerativas. Isto porque as plantas em geral são fontes de compostos bioativos de forma qualitativa e quantitativa, tornando-se uma estratégia importante para o tratamento de distúrbios neurológicos como a doença de Alzheimer.

Neste contexto, a romã (*Punica granatum*) se destaca com sua expressiva capacidade antioxidante e conteúdo de compostos bioativos, os quais estão intimamente relacionados com a prevenção de inúmeras doenças crônicas não transmissíveis. No entanto, vale ressaltar conforme resultados obtidos em trabalhos anteriores (SALGADO et. al., 2012) que sua casca apresenta maior teor de compostos bioativos do que a polpa, evidenciando o potencial de aproveitamento deste resíduo, atualmente pouco explorado.

O aumento do aproveitamento de resíduos de origem vegetal, como a casca de romã, incentivado pela expressiva presença de antioxidantes, demonstra a necessidade do desenvolvimento de novas formas de aproveitamento desses produtos, priorizando a manutenção das características funcionais e a produção de alimentos atrativos sensorialmente.

Desta forma, o desenvolvimento de novos ingredientes alimentícios e/ou alimentos deve estar cada vez mais concatenado com as necessidades do consumidor e oportunidades de mercado. Uma pesquisa envolvendo a prevenção de doenças neurodegenerativas em especial a doença de Alzheimer através da utilização de resíduos de frutas, associada à utilização de uma técnica inovadora como microencapsulação constitui uma linha de pesquisa com viabilidade social, ambiental e econômica, objeto do trabalho em questão.

O presente trabalho teve como principal objetivo avaliar o potencial anticolinesterásico e antioxidante da casca de romã submetida a diferentes tipos de extração. Posteriormente, o extrato com melhor resposta anticolinesterásica foi aplicado na elaboração de micropartículas.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Doenças neurodegenerativas

O envelhecimento populacional trouxe o aumento da incidência de doenças neurodegenerativas, caracterizadas por uma perda seletiva e progressiva de neurônios específicos que, por sua vez, ocasionam os problemas que envolvem memória, cognição, linguagem e personalidade (DICKSON, 2010).

Dentre estas doenças, a demência se caracteriza pelo declínio progressivo e global das funções cognitivas, sem comprometimento agudo do estado de consciência, suficientemente importante para interferir nas atividades sociais e ocupacionais do indivíduo. O diagnóstico de demência exige a constatação de deterioração ou declínio cognitivo em relação à condição prévia do indivíduo (COREY-BLOOM et al., 1995).

A demência se coloca como uma das maiores causas de morbidade entre idosos, sendo que, em todo o mundo, cerca de 35,6 milhões de pessoas convivem com esta doença. Este número deverá dobrar até 2030 (65,7 milhões) e mais que triplicar em 2050 (115,4 milhões). Existem 7,7 milhões de novos casos de demência a cada ano, o que implica que há um novo caso de demência em algum lugar no mundo de quatro em quatro segundos (WHO, 2012).

Em termos econômicos, o tratamento de pessoas com demência acarreta em gastos atualmente no mundo em cerca de 604 bilhões de dólares por ano. Isso inclui o custo da prestação de cuidados de saúde e social, bem como a redução ou perda de renda de pessoas com demência e seus cuidadores. Dentre as causas de demência, a doença de Alzheimer é a mais comum e, possivelmente, contribui para até 70% dos casos (WHO, 2012).

2.1.2 Doença de Alzheimer: Características neuropatológicas.

Há mais de um século atrás, o médico alemão Alois Alzheimer explanou no 37º Congresso do Sudoeste da Alemanha de Psiquiatria, na cidade de Tübingen, sobre sua pesquisa intitulada como *“Eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde”* (Uma Doença Peculiar dos Neurônios do Córtex Cerebral). Tratava-se do caso clínico de uma paciente de 51 anos que fora internada no Hospital de Frankfurt, em 1901, apresentando perda de memória progressiva, alucinações e delírios. Alzheimer enfatizou sobre a incapacidade da paciente em compreender a sua situação, definindo esta doença como sendo uma patologia neurológica ainda não descrita, mas com características associadas à demência, incluindo a incapacidade

do paciente em desenvolver atividades rotineiras, alterações comportamentais e déficit de memória. Após a morte da paciente, o médico alemão, fez uma análise cerebral identificando as principais características neuropatológicas da doença, ou seja, a presença de placas senis, de emaranhados neurofibrilares e a perda neuronal. Anos mais tarde Emil Kraepelin, na oitava edição do “*Handbook of Psychiatry*”, após estudar casos parecidos, propôs que se denominasse essa patologia como Doença de Alzheimer, em homenagem ao seu descobridor (SOUCHAY, 2007).

A Doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa caracterizada clinicamente por demência progressiva, e, neuropatologicamente, tanto pela perda de sinapses e neurônios quanto pela presença de placas amilóides e emaranhados neurofibrilares (NIZZARI et al., 2012).

Estima-se que 5,2 milhões de americanos de todas as idades sofreram com esta doença em 2008, e este número tende a chegar a 7,7 milhões em 2030. Poderá variar de 11 a 16 milhões em 2050 para indivíduos com 65 anos ou mais, caso não haja novas abordagens de tratamento para retardar a progressão ou reverter o processo da doença (ITO et al., 2010).

Sintomas relevantes como apatia, agitação e psicose, juntamente com alterações cognitivas, definem a doença clinicamente, sendo que a intensidade dos sintomas pode variar de acordo com o paciente e o grau de desenvolvimento da doença (REICHMAN, 2003; ANEKONDA; REDDY, 2005; VIEGAS et al., 2005).

A doença de Alzheimer ocorre geralmente em três estágios (PALLAS; CAMINS, 2006):

- O primeiro estágio tem início com o ataque de neurônios específicos do sistema límbico, ou localizados no hipocampo e relacionados à memória. Entretanto, somente os neurônios colinérgicos são afetados, como se a doença escolhesse somente os neurônios da memória. Neste estágio, o hipocampo perde aproximadamente 25% de seu volume. Os neurônios dessa zona são responsáveis pelo elo entre a memória de curto prazo e a memória de longo prazo. Os pacientes apresentam leves declínios na capacidade de memorização já que estes neurônios estão danificados. Dificuldades menores de comunicação e na aquisição de novas informações, bem como sinais menores de esquecimento relacionados, por exemplo, a nomes ou eventos recentes, também são características comuns deste estágio que dura geralmente de dois a quatro anos.

- O estágio intermediário é o mais longo, podendo durar de dois a dez anos. O sistema límbico e o hipocampo são devastados nesta etapa, ocorrendo também perda da memória de curto prazo e dificuldade de comunicação. Posteriormente, verifica-se um declínio nos níveis

da acetilcolina (ACh) de certos neurônios, dentre estes estão aqueles localizados no telencéfalo ventral, os quais em condições normais estão envolvidos no armazenamento de informações da memória de longo prazo. Durante esse estágio, a pessoa não consegue relembrar nenhuma informação nova e também apresenta mudanças de personalidade, confusão, raiva, tristeza, falta de orientação e concentração.

- No estágio avançado da doença, quando grande parte do sistema límbico já está ocupado, quase nenhuma recuperação de informação é possível. Neste ponto, a doença ataca os neurônios colinérgicos em todo o córtex cerebral destruindo as memórias ali armazenadas. A pessoa esquece seu passado, amigos e família. Além disso, perde a memória ocasional e perde totalmente a capacidade de se comunicar e trabalhar. Esta fase dura de um três anos em média e termina com a morte do paciente.

Neurologicamente, a doença de Alzheimer é caracterizada pela presença de duas alterações que podem ser observadas na Figura 1: os depósitos extracelulares do peptídeo beta amiloide ($A\beta$), denominados placas neuríticas ou placas senis, constituídas por agregados de um fragmento de 38 a 43 aminoácidos gerados pelo processamento proteolítico da proteína precursora amiloide (APP – *Amyloid Precursor Protein*); e os emaranhados neurofibrilares intracelulares compostos pela proteína *tau* (τ) hiperfosforilada (SELKOE; SCHENK, 2003).

Figura 1 - Alterações morfológicas características da Doença de Alzheimer

- a.** Placas senis constituídas por depósitos extracelulares do peptídeo $A\beta$ cercados por neuritos distróficos, astrócitos reativos e pela microglia.
- b.** Emaranhados neurofibrilares constituídos por agregados intracelulares compostos pela forma hiperfosforilada da proteína *tau*. Escala 100 μ m (adaptada de HAASS; SELKOE, 2007)

Os depósitos de agregados de proteínas, denominados placas amiloides, em regiões relacionadas com o aprendizado e a memória do sistema nervoso central são características marcantes em pacientes da doença de Alzheimer. Estes depósitos são formados pela deposição progressiva do peptídeo $A\beta$ em placas senis extracelulares. No cérebro saudável, esses fragmentos de proteínas são quebrados e eliminados. Entretanto, em cérebros

infectados, esses fragmentos se acumulam formando placas duras e insolúveis. Evidências sugerem que o acúmulo do A β é fundamental para a fisiopatologia da doença e parece ser o gatilho para todo processo neurogenerativo. O A β é constituído por 40 ou 42 aminoácidos e deriva da quebra de uma proteína integral de membrana denominada APP. A APP é quebrada enzimaticamente por três diferentes formas de proteases denominadas α -, β - e γ - secretase. As secretases são um grupo heterogêneo de proteases localizadas em várias regiões na célula. A ordem que essas proteases quebram a APP determina se o peptídeo A β será ou não formado (KIM; LEE; LEE, 2010).

Outra característica peculiar da doença é a perda das conexões celulares e a morte celular, que é resultado provavelmente do acúmulo anormal do peptídeo A β e dos emaranhados neurofibrilares. Ocorre também um processo denominado atrofia cerebral, no qual neurônios em todo o cérebro morrem e consequentemente as regiões afetadas começam a diminuir. Na fase final da doença o dano é generalizado e o tecido cerebral se encontra significativamente diminuído (SELKOE, 2004).

Perturbações nas funções colinérgicas e consequentemente nos níveis de neurotransmissores com destaque para a ACh, um transmissor cerebral liberado na fenda sináptica, também são características da doença (MUKHERJEE et al., 2007; KATALINIC et al., 2010). Outros neurotransmissores como noradrenalina, dopamina, serotonina e glutamato são afetados em menores proporções (VIEGAS JUNIOR et al., 2004).

A ACh é biossintetizada a partir da acetil-coenzima A (acetil-CoA) e colina por ação da enzima colina-acetiltransferase (VIEGAS JUNIOR et al., 2004), conforme pode ser observado na Figura 2:

Figura 2 - Reação da biossíntese de acetilcolina
Fonte: VIEGAS JUNIOR et al., 2004.

Este neurotransmissor é encontrado no cérebro e nas junções neuromusculares, compondo parte do sistema nervoso parassimpático. Seus efeitos incluem a contração dos músculos lisos, dilatação dos vasos sanguíneos e regulação da taxa de batimentos cardíacos; no cérebro está envolvido nas sinapses associadas ao controle motor, memória e cognição.

Sua atividade e permanência na fenda sináptica são reguladas por hidrólise catalisada pela acetilcolinesterase (AChE), que regenera a colina, seu precursor (VIEGAS JUNIOR et al., 2004).

A AChE é portanto uma enzima que participa da neurotransmissão colinérgica, sendo capaz de decompor a acetilcolina, encerrando o processo de neurotransmissão. Níveis elevados de acetilcolinesterase têm sido encontrados em amostras de cérebro post-mortem de doença de Alzheimer (AD) (CHAIYANA; OKONOGI, 2012).

O mecanismo de hidrólise de AChE envolve o ataque nucleofílico da serina ao carbono carbonílico da acetilcolina, gerando um intermediário tetraédrico estabilizado por ligações de hidrogênio, o qual produz colina livre e serina acetilada. Ao final, a hidrólise do grupo acetila da serina pela água recupera o sítio catalítico da enzima (VIEGAS JUNIOR et al., 2004).

2.1.3 Inibidores de acetilcolinesterase: busca de novos candidatos de origem natural

Os avanços obtidos na compreensão da evolução e das razões moleculares da doença de Alzheimer têm demonstrado que o uso de inibidores de AChE deve ser a forma mais eficiente de controle da evolução da doença (QUIK; JEYARASASINGAM, 2000).

Esta atividade enzimática pode ser inibida por uma diversidade de compostos (POHANKA et al., 2011), com destaque para os alcalóides. Abordagens promissoras para o tratamento da doença de Alzheimer visam portanto, aumentar a concentração de acetilcolina no cérebro através do uso de inibidores da acetilcolinesterase.

Neste contexto, durante a última década, inibidores sintéticos da AChE foram clinicamente avaliados (LEFEVRE et al., 2008). Estes inibidores são o primeiro grupo de agentes especificamente aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento da doença de Alzheimer. Tacrina (Cognex) foi aprovado em 1993, seguido pela aprovação de donepezil (Aricept) em 1996, a rivastigmina (Exelon) em 2000, e galantamina (Reminyl, Razadyne) em 2001 (AISEN et al., 2012). Atualmente, dentre os cinco medicamentos aprovados e comercializados para o tratamento da doença de Alzheimer quatro se baseiam na atividade anticolinesterásica.

A intensa investigação para o descobrimento de inibidores de AChE e a resposta positiva do tratamento contribuiu para o surgimento dos anticolinesterásicos no mercado (ORHAN; ORHAN; SENER, 2006). No entanto, algumas desvantagens devem ser consideradas já que nenhum destes medicamentos pode cessar a doença, apresentam custo elevado e podem ocasionar efeitos colaterais indesejáveis como pode ser verificado na Tabela

1. Consequentemente, há grande demanda na elucidação de novos compostos para o tratamento e/ou prevenção da doença de Alzheimer. Neste cenário, fontes naturais devem ser melhor estudadas para este isolamento já que cerca de 50% das drogas introduzidas no mercado nas ultimas duas décadas são derivadas de moléculas de origem natural (NEWMAN; CRAGG, 2007; CHAIYANA et al., 2010).

Tabela 1 - Drogas disponíveis no comércio aprovadas para o tratamento da doença de Alzheimer (FDA, 2007)

Genérico	Aprovado para	Efeitos colaterais	Classe
Donepezila	Todos estágios	os Náuseas, vômitos, perda de apetite e aumento dos movimentos do trato gastrointestinal.	Anticolinesterásico
Galantamina	Leve a moderada	a Náuseas, vômitos, perda de apetite e aumento dos movimentos do trato gastrointestinal.	Anticolinesterásico
Rivastigmina	Leve a moderada	a Náuseas, vômitos, perda de apetite e aumento dos movimentos do trato gastrointestinal.	Anticolinesterásico
Tacrina	Leve a moderada	a Possível dano no fígado, náusea e vômito.	Anticolinesterásico
Memantina	Moderada a severa	a Dor de cabeça, constipação, confusão e tontura.	Antagonista do receptor de glutamato

Fonte: FDA, 2007.

A tacrina, (hidroclorato de 9-amino-1,2,3,4-tetra-hidro-acridina, THA), aprovada pela US Food and Drug Administration (FDA) em 1993, foi a primeira droga para o tratamento dos níveis leve a moderado da doença de Alzheimer. Baseado na tacrina foi desenvolvida a segunda geração de inibidores de AChE da qual fazem parte a donepezila, rivastigmina, e galantamina (ORHAN et al., 2006; RACCHI et al., 2004; REICHMAN, 2003). A

galantamina, um alcaloide terciário primeiramente isolado de espécies de *Galanthus nivalis* (Amaryllidaceae) e posteriormente extraído de outras espécies desta família como *Narcissus* sp. e *Leucojum* SP, é o medicamento mais utilizado atualmente no tratamento da doença de Alzheimer (SEIDL, 2010).

A natureza pode ser considerada uma importante fonte de novos compostos químicos para o tratamento e a prevenção de várias doenças, inclusive a de Alzheimer, já que vários compostos promissores já foram testados por suas habilidades de inibir AChE (DI GIOVANNI et al., 2008).

Compostos naturais com potencial inibitório da enzima acetilcolinesterase se tornaram um suporte no tratamento da doença de Alzheimer e merecem atenção da comunidade científica (PRVULOVIC et al., 2010). Neste sentido, as plantas em geral constituem portanto fontes de compostos bioativos de forma qualitativa e quantitativa, tornando-se uma estratégia importante para o tratamento de distúrbios neurológicos como a doença de Alzheimer (CARPINELLA et al., 2009).

O estudo de plantas medicinais é incentivado pela Organização Mundial de Saúde, devido às suas implicações no setor econômico e da saúde. Práticas naturais de saúde estão se tornando cada vez mais difundidas devido à busca dos consumidores por tratamentos naturais (ALVIN, 1997). Além disso, representam alternativas em resposta aos altos custos dos medicamentos, da assistência privada à saúde e à precariedade dos serviços de saúde (SCHREINER et al., 2009).

O sistema público de saúde no Brasil não é capaz de suprir as necessidades medicamentosas da população (COSENDEY et al., 2000). Portanto, há um incentivo a trabalhos de pesquisas com plantas medicinais por parte dos órgãos públicos, já que estes originam medicamentos de maior acessibilidade, em menor tempo e custo baixo (OLIVEIRA; SIMÕES; SASSI, 2006).

Neste âmbito de adoção de práticas naturais de saúde, terapias dietéticas podem ser aplicadas em uma ampla variedade de doenças neurológicas, incluindo a doença de Alzheimer. O impulso para a utilização de dietas a fim de tratar ou pelo menos atenuar os sintomas destas desordens deriva tanto da falta de eficácia de terapias farmacológicas quanto da intenção de utilização de um tratamento mais natural e conseqüentemente menos agressivo ao paciente (STAFSTROM; RHO, 2012).

Além disso, é importante ressaltar que a dieta também pode diminuir o risco de desenvolver a doença de Alzheimer (POPE; SHUE; BECK, 2003). Neste sentido, alimentos com altos níveis de antioxidantes podem retardar a progressão da doença de Alzheimer,

possivelmente impedindo ou neutralizando os efeitos danosos dos radicais livres (POLIDORI, 2003).

A necessidade de novas substâncias preventivas para esta doença tem estimulado a pesquisa de extratos naturais que atuem como inibidores enzimáticos (COPELAND, 2005), sendo a triagem de substâncias ou compostos capazes de se ligarem à acetilcolinesterase interessante para a indústria farmacêutica.

Atualmente, extratos de plantas contendo vários constituintes bioativos têm sido usados para tratar distúrbios associados ao Sistema Nervoso Central, entre essas, espécies de *Salvia*, *Ginkgo* e noz-de-areca (ANEKONDA; REDDY, 2005).

Vários fatores adicionais demonstram que extratos de plantas podem ser excelentes veículos carreadores de substâncias bioativas, onde se incluem as substâncias inibidoras da acetilcolinesterase, a serem aplicados na prevenção e/ou tratamento de doenças neurodegenerativas (ANEKONDA; REDDY, 2005). O primeiro fator é a biodisponibilidade (MANACH et al., 2005), especialmente em extratos que apresentam os flavonoides ou outros compostos fenólicos como constituintes principais como é o caso das frutas. Essas substâncias são capazes de atravessar a barreira intestinal e penetrar no sistema circulatório. O segundo fator é a capacidade dos extratos passarem pela barreira hemato-encefálica, a qual expressa um grande número de transportadores, como a glicoproteína-P, onde as substâncias naturais atuam. O terceiro fator está relacionado aos aspectos toxicológicos e de interação droga-droga entre as substâncias naturais. Poucos estudos clínicos foram realizados com plantas medicinais, ou seus extratos, que possam garantir sua segurança e eficácia. No entanto, estudos clínicos realizados até então mostraram poucos efeitos adversos (ALCALA et al., 2005).

Evidências indicam que as substâncias responsáveis pela inibição da acetilcolinesterase podem apresentar interação com a cascata amilóide, influenciando a expressão e/ou o processamento metabólico da proteína precursora de amilóide (APP) e desta forma abrandar um dos principais passos patológicos do processo da doença (RACCHI et al., 2004).

2.1.4 Antioxidantes e doenças neurodegenerativas

Evidências apontam que o stress oxidativo em sistemas biológicos, resultante do excesso de radicais livres, acarreta em disfunções da membrana celular e danos no DNA. Diversas doenças degenerativas, cardiovasculares, câncer, diabetes e declínio do sistema imunológico envolvem este dano celular, evidenciando que a incidência destas doenças está

intimamente relacionada ao excesso destas substâncias reativas no organismo. Neste cenário, compostos antioxidantes desempenham papel crucial na prevenção destas patologias, atuando como neutralizadores de radicais livres, diminuindo assim a extensão dos danos oxidativos (RAUTER et al., 2012).

Atualmente, tem surgido crescente interesse quanto ao papel dos antioxidantes consumidos na dieta. Os compostos antioxidantes presentes em frutas e vegetais, como os compostos fenólicos, são capazes de neutralizar os radicais livres presentes no organismo, auxiliando desta forma na proteção de células e tecidos. Conseqüentemente, este mecanismo de ação contribui para a prevenção de doenças crônicas não transmissíveis como as doenças neurodegenerativas, câncer ou doenças cardiovasculares (McCUNE et al., 2011).

Os neurônios parecem ser particularmente vulneráveis ao ataque destes radicais livres, pelas seguintes razões: (1) o seu conteúdo de glutathione, um antioxidante natural importante, é baixo (CHRISTEN, 2000); (2) as suas membranas contêm alta proporção de ácidos graxos poliinsaturados (HAZEL; WILLIAMS, 1990); e (3) o metabolismo cerebral requer quantidades consideráveis de oxigênio (SMITH et al., 1995). O fato da idade ser um fator de risco crucial em doença de Alzheimer, fornece apoio para a hipótese dos radicais livres/estresse oxidativo, pois os efeitos dos ataques pelos radicais livres, particularmente aqueles produzidos por espécies reativas de oxigênio (ROS), podem se acumular ao longo dos anos (BENZI; MORETTI, 1995). Tais considerações gerais sugerem que os radicais livres estão envolvidos em muitas patologias relacionadas ao envelhecimento, especificamente em Alzheimer e outras doenças neurodegenerativas (CHRISTEN, 2000).

As pesquisas científicas atuais destacam os frutos como fontes de compostos bioativos que atuam como antioxidantes naturais, protegendo o organismo de doenças crônicas degenerativas e do envelhecimento precoce (PEREIRA et al., 2012).

A suplementação dietética com frutas ou extratos vegetais ricos em antioxidantes podem diminuir a vulnerabilidade ao estresse oxidativo, que ocorre no envelhecimento e essas reduções são expressas como melhorias no comportamento (JOSEPH; SHUKITT-HALE; WILLIS, 2009).

Os alimentos funcionais surgem neste contexto como todo alimento ou ingrediente que, além das funções metabólicas normais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica (BRASIL, 1999).

Os fitoquímicos incluem uma gama diversificada de agrupamentos químicos, tais como polifenóis, flavonóides, esteróides e vitaminas (VASANTHI; SHRISHRIMAL; DAS, 2012).

As substâncias fenólicas que são comumente encontradas em plantas e frequentemente consumidas na dieta humana, sendo que estes compostos e seus metabólitos modulam a expressão gênica, inflamação, função antioxidante e função imunológica, exercendo forte influência na saúde humana (TOTA et al., 2010; KANG et al., 2011).

A utilização e consumo dos compostos antioxidantes podem ser limitados pela sua instabilidade no processamento e condições de armazenamento (JANASWAMY; YOUNGREN, 2012).

Tais compostos, mudam de acordo com condições pré-colheita (procedimentos de cultivo, colheita e condições climáticas) e pós-colheita (armazenamento e transporte) (McCUNE et al., 2011). Do mesmo modo, para a obtenção de extratos concentrados á base de frutas, as características do solvente utilizado, bem como as variáveis aplicadas na produção tem forte influência na natureza dos compostos extraídos.

Além disso, os diferentes subgrupos de compostos fenólicos diferem em termos de biodisponibilidade e funções fisiológicas relacionadas com a saúde humana. Tais compostos constituem um grupo de produtos naturais altamente diversificados e que contém vários subgrupos, sendo que a distribuição da diversidade e gama de polifenóis em plantas têm conduzido a diferentes formas de categorizar esses compostos naturais (TSAO, 2010).

Os compostos fenólicos tem relação intrínseca com as características sensoriais dos alimentos, tais como adstringência, cor e sabor (MOUSAVINEJAD et al., 2009).

Entre os compostos fenólicos, podemos destacar o subgrupo dos flavonóides. Os flavonóides são compostos fisiologicamente ativos com um extenso número de propriedades farmacológicas e um baixo nível de toxicidade (KHAIRULLINA; GERCHIKOVA; DENISOVA, 2010).

Alguns flavonóides, entre eles, a galangina, kaempferol, quercetina, mircetina, fisetina, apigenina, luteolina e rutina, inibiram enzimas que degradam neurotransmissores humanos. Esta potência de inibição dos flavonóides pode ser atribuída a sua estrutura química, isto é, o número de grupos OH no anel (KATALINIC et al., 2010).

Carrasco-Pozo et al., (2012) demonstraram que a quercetina (0,01 mg/mL), o resveratrol (0,1 mg/mL) e a rutina (1 mg/mL) protegeram células contra a disfunção mitocondrial, uma degradação intimamente relacionada a doenças neurodegenerativas. A quercetina foi o composto fenólico mais eficaz na proteção contra a disfunção mitocondrial, o

que poderia ser atribuído à sua capacidade de entrar nas células e acumular-se na mitocôndria. Estes achados sugerem um novo papel de proteção dos polifenóis, complementar a sua propriedade antioxidante, o que pode expandir o uso preventivo e/ou terapêutico em condições envolvendo a disfunção mitocondrial.

A modulação de cascatas de sinalização celular por polifenóis é outro mecanismo de ação que pode ajudar significativamente a explicar o papel preventivo de dietas ricas em polifenóis nas doenças neurodegenerativas (DONG et al., 2009).

Choi et al., (2012) detectaram o potencial anticolinesterásico da quercetina, e sugere que a inibição ocorre de maneira dose-dependente. Consequentemente, estes resultados demonstram que a quercetina poderia apresentar vasta gama de atividades benéficas para doenças neurodegenerativas, principalmente a doença de Alzheimer.

Devido ao padrão de hidroxilação e variações no anel, os flavonóides podem ser ainda divididas em diferentes sub-grupos, tais como antocianinas, flavan-3-óis, flavonas, flavanonas e flavonóis (TSAO, 2010).

Shih et al., (2010) analisaram o efeito de extratos de amora ricos em compostos fenólicos e antocianinas na indução de enzimas antioxidantes e na promoção da cognição em ratinhos com envelhecimento acelerado. Os camundongos foram alimentados com uma dieta basal suplementada com 0,18% e 0,9% de extrato de amora por 12 semanas consecutivas. Os resultados mostraram que os ratos alimentados com o suplemento de extrato de amora apresentaram teor significativamente menor de proteína beta amilóide, aprendizagem melhorada e capacidade de memória em testes de resposta. Os animais tratados com o extrato também apresentaram atividade mais elevada da enzima antioxidante e menor oxidação lipídica no cérebro e fígado, em comparação com os ratinhos controle. Em geral, a suplementação com extratos ricos em compostos bioativos poderá ser vantajosa para a indução de sistema de defesa antioxidante e para a melhoria da deterioração da memória de animais em envelhecimento.

O crescente interesse pelos antioxidantes provenientes da dieta, presentes principalmente em frutas e vegetais, incentivou a pesquisa também no campo de bebidas comerciais ricas em polifenóis (GONZÁLEZ-MOLINA; MORENO; GARCÍA-VIGUERA, 2009).

González-Molina, Moreno e García-viguera, (2009) produziram uma bebida rica em polifenóis a base de suco de limão e de romã em diferentes proporções (25%, 50% e 75% para ambos os sucos) e os resultados sugerem que a formulação de 75% de suco de romã e 25% de suco de limão, tem um potencial para o desenvolvimento de novas bebidas funcionais,

ênfatisado pela sua elevada capacidade antioxidante. No entanto, não foi realizada análise sensorial a fim de detectar a aceitabilidade deste produto.

Na forma de uma bioterapia inovadora, os alimentos funcionais são atualmente investigados por suas atividades neuroprotetoras. A vitamina D e os compostos fenólicos são indicados como promissoras ferramentas terapêuticas para inibir a formação de espécies reativas de oxigênio e a neuroinflamação na doença de Alzheimer (MAGRONE; MARZULLI; JIRILLO, 2012).

2.1.5 Romã e doenças neurodegenerativas

A romã é uma fruta originária do Oriente Médio, que se estende por toda a área do Mediterrâneo, a leste da China e da Índia, e pelo sudoeste americano, Califórnia e México. A árvore da romã prospera sob condições climáticas áridas e semi-áridas, e tem sido usada há séculos em culturas antigas na medicina popular (ROBERT et al., 2010).

A romã (*Punica granatum*), bem como seus sucos e extratos, estão sendo amplamente promovidos, com ou sem apoio científico, para os consumidores como um dos superalimentos novos, capazes de enfrentar variedade de doenças. Esta fruta, que tem sido consumida e utilizada como um alimento funcional no Médio Oriente há milhares de anos, ganhou popularidade recentemente nos Estados Unidos (JOHANNINGSMEIER; HARRIS, 2011).

A romã é mundialmente conhecida pelo seu elevado potencial antioxidante devido à presença de compostos fenólicos, os quais são responsáveis pela prevenção de doenças (SALGADO et al., 2012). Entre os principais compostos fenólicos da romã pode-se destacar as punicalaginas A e B, ácido gálico e o ácido elágico (QU et al., 2012). Dikmen, Ozturk e Ozturk (2011) descrevem o ácido elágico como principal composto fenólico presente na romã, sendo que o ácido elágico é metabolizado pela microflora humana e contribui para benefícios à saúde como composto antioxidante.

A elevada atividade antioxidante *in vitro* dos produtos de romã tem estimulado estudos de seus efeitos na saúde relativos a elevado número de doenças crônicas relacionadas ao estresse oxidativo. Em vários estudos, frutas e sucos de romã demonstraram propriedades antioxidantes superiores a alimentos considerados de alta atividade antioxidante com valores três vezes superiores aos obtidos para o vinho tinto e o chá verde (GIL et al., 2000; JOHANNINGSMEIER; HARRIS, 2011).

O subproduto da romã é chamado de bagaço e contém 78% de casca e 22% de sementes, com base no peso úmido (QU et al., 2010). Salgado et al., (2012) ao analisarem as diferentes porções da fruta verificaram que a casca de romã se destaca quanto a atividade

antioxidante e a quantidade de compostos fenólicos em relação a polpa do fruto, demonstrando seu potencial a ser explorado como ingrediente funcional. Isto explica porque sucos comerciais fabricados por meio de um processo em que frutas inteiras são pressionadas contêm níveis abundantes de compostos bioativos, ao passo que sucos preparados somente com a polpa possuem concentrações mínimas (QU et al., 2012).

Dikmen, Ozturk e Ozturk (2011) avaliaram a atividade anti-proliferativa e apoptótica do extrato metanólico da casca da romã em células de câncer de mama humano (MCF-7) e detectaram que o extrato mostrou efeito anti-proliferativo dependente da concentração e do intervalo de incubação, demonstrando o potencial de utilização da casca da romã na prevenção do câncer de mama.

O consumo do extrato de casca de romã foi testado em ratos com obesidade associada com hipercolesterolemia e doenças inflamatórias. Os animais receberam 6 mg de extrato por dia durante um período de 4 semanas. Os resultados suportam que a romã constitui um alimento promissor no controle de perturbações aterogênicas e inflamatórias associadas com a obesidade (NEYRINCK et al., 2012).

Os aumentos tanto da inflamação sistêmica quanto do estresse oxidativo estão estabelecidos como elementos chaves não tradicionais na aterosclerose e também estão envolvidos na desregulação da imunidade de pacientes em hemodiálise. Shema-didi et al., (2012) investigaram o efeito da ingestão de suco de romã sobre o estresse oxidativo e processos inflamatórios. Realizaram estudo duplo-cego randomizado com 101 pacientes em hemodiálise recebendo suco de romã três vezes por semana durante um ano. Apresentaram como desfecho primário os níveis de estresse oxidativo e biomarcadores de inflamação. Os desfechos secundários foram hospitalizações devido a infecções e a progressão do processo aterosclerótico. Os resultados apresentados indicam que a ingestão de suco de romã por 3 meses resultou em redução significativa da oxidação de proteínas, oxidação lipídica e dos níveis de biomarcadores de inflamação. Adicionalmente, a ingestão de suco de romã resultou em uma incidência significativamente menor de internação devido a infecções. Além disso, 25% dos pacientes no grupo de suco de romã tiveram melhora e apenas 5% progressão no processo aterosclerótico, enquanto que mais de 50% dos pacientes no grupo que recebia placebo mostraram progressão e nenhum apresentou qualquer melhora. A ingestão de suco de romã por um período prolongado melhora os fatores de risco não tradicionais das doenças cardiovasculares, atenua a progressão do processo aterosclerótico, fortalece a imunidade inata e, portanto, reduz a morbidade entre os pacientes em hemodiálise (SHEMA-DIDI et al., 2012).

Inúmeros trabalhos indicam as mais diversas aplicações funcionais da romã. Neste contexto, embora não existam maneiras comprovadas de retardar o início ou proporcionar uma progressão lenta da doença de Alzheimer, estudos sugerem que a dieta pode reduzir o risco de incidência da doença. Romãs contêm níveis muito elevados de substâncias polifenólicas antioxidantes, em comparação com outras frutas e vegetais. Os polifenóis têm sido apontados como neuroprotetores em diferentes modelos experimentais. Hartman et al., (2006) verificaram se a suplementação dietética com suco de romã influenciaria o comportamento da doença de Alzheimer em um modelo de camundongo transgênico. Camundongos transgênicos (APPsw/Tg2576) receberam suco de romã ou água com açúcar como controle de 6 a 12,5 meses de idade. Camundongos tratados com suco de romã aprenderam tarefas no labirinto de água mais rapidamente e nadaram mais rápido do que os controles. Ratos tratados com suco de romã apresentaram menor deposição de amiloide no hipocampo em relação ao controle de forma significativa. Estes resultados sugerem que o suco de romã possivelmente pode ser útil na prevenção e tratamento da doença de Alzheimer.

Os cérebros dos pacientes com doença de Alzheimer estão sobre estresse oxidativo intenso. Choi et al., (2011) relataram que o extrato etanólico de romã apresentou efeitos antioxidantes e protetores em ratos através da inibição da morte de células neuronais e redução dos sintomas de deficiência de aprendizagem e memória.

Kumar, Maheshwari e Singh (2008) estudaram o papel do extrato etanólico de sementes de romã sobre o sistema nervoso central (SNC) em animais. O extrato foi administrado a ratos jovens e idosos em doses únicas de 100, 250 e 500 mg/kg. Os resultados mostraram que para todas as doses o extrato exibiu atividade ansiolítica e em doses de 250 e 500 mg/kg foi capaz de induzir uma diminuição significativa no tempo de imobilidade, semelhante a imipramina, um fármaco antidepressivo reconhecido.

Patel et al., (2008) detectaram em um estudo de toxicidade subcrônica que a administração oral de extrato de romã em níveis de até 600 mg por kg de peso corporal por dia não causou efeitos adversos em ratos machos e fêmeas.

Salgado et al., (2012) mostraram que a casca da romã apresentou maior atividade antioxidante quando comparado as sementes e a polpa. Cascas de romã liofilizadas foram utilizadas na forma de um extrato seco que foi adicionado ao suco de laranja com morango. O extrato seco foi responsável pelo aumento significativo da atividade antioxidante dos sucos, proporcional às concentrações adicionadas. No entanto, embora ambos os sabores de sucos enriquecidos apresentaram níveis elevados de antioxidantes, as amostras com uma

concentração de 2% de extrato seco apresentaram rejeição na análise sensorial devido ao sabor adstringente da casca de romã.

O extrato de casca de romã apresenta maior potencial como suplemento funcional rico em antioxidantes naturais do que o extrato da polpa. No entanto, a casca de romã merece estudos mais intensivos principalmente a fim de obter melhor aceitação sensorial pelo consumidor através da elaboração de tratamentos a fim de reduzir o gosto adstringente.

A microencapsulação pode ser uma técnica a ser explorada para a redução do gosto desagradável da casca da romã. Robert et al., (2010) encapsularam os compostos bioativos do suco e do extrato etanólico da romã (*Punica granatum*) com maltodextrina ou isolados protéico de soja por *spray drying* e aplicaram as microcápsulas no enriquecimento de iogurte. Durante o armazenamento, a maltodextrina proporcionou maior efeito protetor sobre os polifenóis e antocianinas do que o isolado proteico de soja. Em conclusão, os compostos bioativos encapsulados obtidos em condições ótimas, mostraram recuperação superior a 90% após o processo de microencapsulação. Os compostos bioativos provenientes do extrato e encapsuladas com isolado proteico de soja apresentaram comportamento semelhante aos não encapsulados, o que foi diferente para os encapsulados elaborados com maltodextrina. As microcápsulas de romã estudadas podem ser utilizadas na produção de alimentos funcionais. No entanto, não foi realizada análise sensorial do produto enriquecido a fim de detectar se a adição de microcápsulas acarreta alteração sensorial do produto.

Desta forma, a casca de romã apresenta potencial a ser explorado na indústria de alimentos funcionais por apresentar elevado teor de compostos bioativos, no entanto, a forma de aplicação desta casca deve ser melhor explorada.

2.1.6 Microencapsulação

A produção industrial de alimentos requer a adição de substâncias específicas para adequar as características sensoriais e/ou visando a preservação de diversas propriedades. Durante décadas, foi comum a aplicação de substâncias sintéticas conhecidas por aditivos para a obtenção de determinado benefício. No entanto, estas aplicações geraram inúmeros questionamento quanto a saudabilidade destes compostos. Neste cenário, é crescente a inclusão de ingredientes com potenciais benefícios para a saúde, tais como antioxidantes naturais, visando preencher esta lacuna (BORGOGNA et al., 2010).

O mercado de alimentos funcionais lida com um desafio: o controle da estabilidade compostos bioativos durante o processamento e armazenamento (BORGOGNA et al., 2010).

Ao tratar-se de antioxidantes este desafio ganha ênfase ainda maior. Neste sentido, técnicas inovadoras de proteção destes compostos devem ser amplamente analisadas.

A microencapsulação é uma poderosa ferramenta comumente aplicada para a proteção de uma vasta gama de biomoléculas. Esta técnica é baseada na incorporação de uma matriz polimérica, criando um microambiente na cápsula capaz de controlar as interações entre a parte interna e externa (BORGOGNA et al., 2010).

O processo de microencapsulação possibilita combinar na estrutura da microcápsula vários compostos simultaneamente. Isso é de fundamental relevância para a aplicação industrial, uma vez que simplifica o processo de enriquecimento de alimentos (BORGOGNA et al., 2010).

Outro desafio para a indústria de alimentos funcionais é que a adição de ingredientes bioativos não pode afetar as propriedades sensoriais dos alimentos. Dentro deste contexto, o tamanho das partículas afeta a textura, e consequentemente a adição de partículas grandes é indesejável na maioria dos casos, motivo pelo qual a microencapsulação torna-se crucial no setor alimentar. Deve ser salientado, contudo, que a indústria de alimentos é severamente limitada no que diz respeito aos compostos que podem ser utilizados para microencapsular (CHAMPAGNE; FUSTER, 2007).

Adicionalmente, os compostos fenólicos apresentam sabor desagradável, o que também limita a sua aplicação. A utilização de polifenóis encapsulados, em vez de compostos livres, pode efetivamente aliviar esta deficiência (FANG; BHANDARI, 2010).

Na indústria de alimentos, o processo de microencapsulação pode ser aplicado por uma variedade de razões, os quais foram sintetizados por Desai e Park (2005):

- (i) Proteção do material do núcleo da degradação,
- (ii) Redução da taxa de evaporação ou de transferência do material do núcleo para o ambiente externo,
- (iii) Modificação das características físicas do material original para permitir uma melhor manipulação,
- (iv) Liberação controlada do material do núcleo,
- (v) Eliminação de sabor indesejável ou sabor característico do material do núcleo;
- (vi) Diluição do material do núcleo, quando apenas pequenas quantidades são necessárias,
- (vii) Separação de componentes da mistura evitando interações indesejáveis.

Carboidratos como amido modificado, maltodextrina ou ciclodextrina são hidratados e utilizados como materiais de parede. O material do núcleo, no caso o composto bioativo, é homogeneizado com os materiais de parede antes do início do processo (FANG; BHANDARI, 2010).

Diversas metodologias podem ser aplicadas para a microencapsulação de substâncias alimentícias. Entre elas, a microencapsulação em *spray drying*, utilizada na indústria alimentícia desde os anos 1950, é um método econômico, de funcionamento flexível e capaz de produzir partículas de boa qualidade. Diante do exposto, é a técnica de produção de microcápsulas mais amplamente utilizada na indústria de alimentos, sendo normalmente aplicada na preparação de aditivos alimentares estáveis (DESAI; PARK, 2005).

A produção de um pó a base de frutas requer calor para evaporar a água e um mecanismo de moagem para converter o produto a uma forma de pó, e comumente acarretam na degradação de compostos bioativos sensíveis. A secagem em *spray drying* é um método de transformação único para a produção de pó que com a aplicação de um material de parede provoca conservação de grande parte dos compostos de interesse (MITZI MA; DOLAN, 2011).

O *spray drying* permite a transformação de um fluido em partículas secas por uma secagem a quente. A alimentação pode ser uma solução, suspensão, dispersão ou emulsão e o produto seco final pode estar na forma de pós, grânulos ou aglomerados, dependendo das propriedades físicas e químicas do produto alimentado, o dimensionamento do secador e as propriedades desejadas no pó final (PATEL; PATEL; SUTHAR, 2009).

O *spray drying* produz partículas do tipo matriz, com núcleo múltiplo, ou seja, onde o material do núcleo é disperso por todo o material da parede. A área central é ocupada pelo vazio resultante da expansão das partículas durante as fases de secagem (JAFARI et al., 2008).

2.1.7 Resíduos agroindustriais

Atualmente, observa-se tendência clara do consumidor para ingredientes naturais que apresentem alguma relação com a saúde. Adicionalmente, a produção de ingredientes naturais a partir de fontes sustentáveis como os resíduos agroindustriais constitui nova direção a ser explorada pela indústria de alimentos.

Resíduos sólidos diferenciam-se do termo lixo porque, enquanto este último não possui nenhum tipo de valor e devem apenas ser descartados. Os resíduos possuem valor econômico agregado, por possibilitarem o reaproveitamento (DERMAJORIVIC, 1995).

Além dos problemas ambientais gerados, os resíduos representam perdas de matérias primas e energia, exigindo investimentos significativos em tratamentos para controlar a poluição (PELIZER et al., 2007).

Diversos estudos sobre a composição de resíduos agroindustriais brasileiros têm sido realizados com o intuito de que estes sejam adequadamente aproveitados. Os resíduos agroindustriais possuem quantidade considerável de substâncias bioativas, reconhecidas por suas propriedades promotoras de saúde e aplicações tecnológicas como antioxidantes, algumas também como corantes alimentares (STOCKHAMMER et al., 2009).

2.2 Materiais e métodos

2.2.1 Obtenção da matéria prima

Frutos de romã (*Punica granatum* L.), adquiridos da Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais do Estado de São Paulo (CEAGESP), foram transportados até o laboratório em caixas de poliestireno expandido de modo a manter suas características bioativas inalteradas.

As frutas, *in natura*, foram selecionadas manualmente considerando a uniformidade no estágio de maturação e a ausência de injúrias, e posteriormente, foram lavadas com água corrente; higienizadas por 15 minutos em solução de hipoclorito de sódio 20 ppm e enxaguadas com água destilada, a fim de remover sujidades e reduzir a carga microbiana.

A separação das cascas foi realizada manualmente e as mesmas permaneceram armazenadas em embalagens plásticas a 4°C até o momento da extração, conforme pode ser observado na Figura 3.

Figura 3 - Ilustração do processamento da romã em casca e semente + polpa
(1) romãs cortadas ao meio, (2) despolpamento, (3) armazenamento da polpa e semente e (4) armazenamento da casca de romã destinadas a produção do extrato

2.2.2 Produção dos extratos

A produção dos extratos foi realizada em condições de baixa luminosidade e um curto tempo para evitar possível degradação e oxidação dos compostos bioativos. Quando o foco da pesquisa envolve atividade antioxidante e métodos que utilizam o binômio radical livre e

antioxidante, com reações rápidas e de acentuada instabilidade, a luminosidade e a temperatura nas quais as amostras são submetidas se tornam parâmetros críticos para assegurar confiabilidade nos valores encontrados.

Os extratos foram preparados através da percolação das cascas moídas com soluções de etanol-água, em diferentes concentrações, na proporção 1:50 (casca [g]:solvente [mL]) (QU et al., 2010). A escolha do etanol como solvente se justifica pela sua baixa toxicidade quando comparado ao metanol e/ou acetona. A extração foi realizada em mesa agitadora (Modelo ET-1401, Tecnal, Brasil), protegida da iluminação, à temperatura ambiente ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) durante 24 horas e o extrato resultante foi centrifugado a 1956,2 g em centrífuga (Modelo NT 825, Nova Técnica, Brasil). Em seguida, o sobrenadante foi concentrado em rotaevaporador a 35°C (Modelo 801, Fisatom, Brasil), sob vácuo até secagem completa. Para garantir que todo o solvente fosse retirado da amostra, uma vez que estes extratos foram utilizados para a elaboração das microcápsulas e posterior consumo, foi realizada a aplicação de nitrogênio líquido (Marca White Martins). Os extratos permaneceram congelados em embalagem protegida da luz e congelados a -80°C até o momento das análises.

Os extratos produzidos a partir da casca de romã foram denominados: extrato aquoso (100% de água), extrato 60% (60% de etanol e 40% de água), extrato 80% (80% de etanol e 20% de água) e extrato 100% (100% de etanol).

2.2.3 Delineamento experimental e tratamentos

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e quatro repetições.

Os tratamentos corresponderam às diferentes concentrações de etanol-água, respectivamente, como solventes de extração: 0-100, 60-40, 80-20, 100-0.

Finalizada esta etapa, o tratamento que apresentou valores mais satisfatórios na inibição da acetilcolinesterase foi aplicado na produção de uma microcápsula.

2.2.4 Quantificação de compostos fenólicos

O conteúdo de compostos fenólicos no extrato foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu de acordo com a metodologia proposta por Swain e Hillis (1959). Para a análise foi adotada diluição do extrato em metanol na ordem de 1/50 e um controle também foi preparado contendo 50 mL de metanol. A leitura da absorbância foi realizada a 660 nm em espectrofotômetro (modelo Unico® 2800 UV/VIS – Interprise Brasil) e os resultados foram expressos em mg equivalente de catequina/g.

As concentrações de catequina na curva padrão para compostos fenólicos foram: 0,0; 0,04; 0,08; 0,12; 0,16 mg/mL.

2.2.5 Screening da atividade antioxidante

Metodologias com base no sequestro do radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical e 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic (ABTS) foram usados para determinar a atividade antioxidante dos extratos analisados.

2.2.5.1 Ensaio pelo método DPPH

O método adotado descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) fundamenta-se em avaliar a atividade antioxidante de alimentos ou extratos, através do seqüestro do radical DPPH. Este método foi utilizado para avaliar a atividade antioxidante tanto dos extratos quanto das microcápsulas de casca de romã. Uma alíquota de 0,1 mL da diluição adotada (1:500) tanto dos extratos quanto das microcápsulas reagiu com 3,9 mL do radical DPPH. Para os extratos a diluição foi realizada em etanol, no entanto, para as microcápsulas diluição foi feita em metanol, pois este solvente precipita a maltodextrina, tornando os compostos bioativos disponíveis para a análise.

As absorbâncias foram lidas a 517nm em espectrofotômetro (modelo Unico® 2800 UV/VIS – Interprise Brasil). Os resultados foram expressos em μM Trolox g^{-1} extrato e os valores calculados segundo equivalência a curva padrão de trolox.

2.2.5.2 Ensaio pelo método ABTS

A atividade antioxidante pelo método ABTS foi feita segundo metodologia descrita pela EMBRAPA, (2007). O radical ABTS^{++} foi formado pela reação de ABTS 7 mM com persulfato de potássio 140 mM. Para este método, uma alíquota de 20 μL da diluição adotada para o extrato (1:10) reagiu com 2,0 mL do radical ABTS. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (modelo Unico® 2800 UV/VIS – Interprise Brasil) a 734 nm e para a construção da curva padrão foi utilizado o antioxidante Trolox, nas concentrações de 100 – 2000 μM . Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em μM de equivalentes ao Trolox por g de extrato.

2.2.6 Taninos

A quantificação de taninos foi realizada segundo a metodologia descrita por Price, Hagerman e Butler, (1980). A curva padrão foi construída utilizando catequina e os resultados foram expressos em mg equivalente de catequina por grama de extrato.

As concentrações de catequina na curva padrão para taninos foram: 0,0; 0,0002; 0,0004; 0,0006; 0,0008; 0,001 mg/mL.

2.2.7 Atividade inibitória da acetilcolinesterase

Foi adotado método fotométrico para a determinação da atividade anticolinesterásica descrito por Ellman et al., (1961). O método se baseia na medida da taxa de produção de tiocolina à medida que a acetilcolina é hidrolisada pela AChE. Isto ocorre pela continuação da reação da tiocolina com reagente de Ellman, produzindo o ânion amarelo. A taxa de produção do composto colorido é mensurada em espectrofotômetro UV/VIS em 412 ou 405 nm. Este método fotométrico exige elevada solubilidade em água de todos os reagentes e principalmente das amostras uma vez que os tampões e as soluções estão em meio aquoso.

A atividade inibitória da AChE foi medida em microescala através de um leitor de microplacas de 96 poços (Thermo Scientific).

O extrato puro foi utilizado como a solução mãe e as diluições posteriores foram feitas utilizando etanol (30; 25; 20; 15; 10; 8; 5; 3 e 1 mg mL⁻¹).

A fisostigmina na concentração 1 mg mL⁻¹ foi aplicada como controle positivo.

As taxas das reações foram calculadas utilizando software apropriado (GraphPad Prism versão 5.0). Qualquer aumento da absorbância antes da adição da enzima devido à hidrólise espontânea do substrato foi corretamente corrigido subtraindo-se a taxa da reação antes da adição da enzima da taxa obtida após a adição da enzima.

As porcentagens de inibição foram calculadas comparando-se as taxas das reações das amostras com a taxa de reação do controle (solvente utilizado para solubilizar cada amostra) através da fórmula: % inibição = 100 (taxa da reação amostra/taxa da reação controle x 100).

Os valores de IC₅₀ foram determinados através da equação da reta do gráfico “concentração versus porcentagem de inibição”. Cada concentração de cada amostra foi analisada em cinco repetições e os resultados obtidos através de média ± desvio padrão.

2.2.8 Atomização

O extrato com maior potencial anticolinesterásico foi submetido a atomização para a elaboração de micropartículas. As micropartículas de extrato de romã foram obtidas por

atomização em aparelho *spray dryer* modelo LM-MSD 1.0 (Labmaq do Brasil Ltda) de acordo as melhores condições de secagem encontradas por Vardin e Yasar, (2012), com modificação, o grau de dextrose equivalente da maltodextrina.

Como agente carreador foi utilizado a maltodextrina (Maltogill 20), gentilmente cedida pela Cargill Agrícola SA (São Paulo-SP, Brasil), um produto obtido pela conversão enzimática do amido com grau de dextrose equivalente 20.

O agente de parede foi adicionado ao extrato na proporção 1:1 (VARDIN; YASAR, 2012), sendo esta mistura mantida em agitação até a completa homogeneização. Durante o processo de microencapsulação a solução foi mantida sobre agitação, em agitador mecânico (modelo 752, Fisatom, São Paulo- Brasil) com barra magnética, à temperatura ambiente (23 a 25°C).

As condições operacionais utilizadas no *spray dryer* foram: diâmetro do bico atomizador de 0,7 mm, vazão do ar de secagem 30 L min⁻¹, vazão de líquido 10,0 mL/min e temperaturas de entrada e saída do ar de 120±10 e 94±1°C, respectivamente.

2.2.9 Análise de microestrutura

O estudo da morfologia das partículas foi realizado através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) de acordo com Kitajima e Leite, (1999). As microcápsulas de romã e a maltodextrina pura seca em *spray dryer* foram fixadas em porta-espécimens metálicos (*stubs*) de 12 mm de diâmetro e 10 mm de altura. A fixação foi realizada através do uso de fita adesiva de dupla face, a qual foi previamente aplicada no *stub* e pressionada para eliminar as rugosidades. Em seguida, as amostras foram coladas na parte superior da fita. Foi realizada a metalização das amostras (*sputtering*) e em seguida as mesmas foram cobertas com ouro. Para isso, foi utilizado o processo de evaporação do ouro com utilização de vácuo no metalizador *Sputter Coater* Balzers SCD050. Para a metalização, foi aplicada uma corrente de 40 mA durante 180 segundos, tendo como gás de arraste o argônio a um vácuo de 0,05 mbar.

O microscópio eletrônico de varredura utilizado para visualização das amostras foi o MEV JSM – 5800LV – JEOL. As imagens foram capturadas na forma digital.

2.2.10 Umidade

A umidade do extrato e das micropartículas foi determinada em analisador de umidade com uma lâmpada halógena MB 35 (Ohaus, USA). Este equipamento apresenta uma balança de precisão e uma unidade de secagem.

Uma amostra de massa 0,5g foi colocada na balança e pesada, com o início do teste, a lâmpada halógena foi ativada e forneceu calor á unidade de secagem até que se atingiu a temperatura de 105°C e a balança de precisão executou pesagens sucessivas da amostra até que fosse atingida uma massa constante. O teor de umidade, obtido por termogravimetria, foi fornecido em porcentagem.

2.2.11 Higroscopicidade

O grau de higroscopicidade das micropartículas foi mensurado segundo Cai e Corke, (2000) com modificações. As amostras (cerca de 0,2 g) de micropartículas foram distribuídas em placas de Petri a 25 ° C e armazenadas em um recipiente hermeticamente fechado, neste caso adotou-se o dessecador, o qual continha solução saturada de cloreto de sódio. Após sete dias, a umidade higroscópica (higroscopicidade) foi calculada com base no peso anterior e atual e expressa como g de água absorvida por 100 g de sólidos secos ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$).

2.2.12 Solubilidade

A análise de solubilidade foi realizada segundo Cano-Chauca et al., (2005). As micropartículas (cerca de 0,5 g) foram cuidadosamente adicionadas a 50 mL de água destilada a temperatura ambiente, em seguida a solução permaneceu em mesa agitadora a 100-120 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 3000 g durante 5 minutos. Uma alíquota de 25 mL do sobrenadante foi transferido para placas de Petri previamente secas e pesadas e as placas foram imediatamente colocadas em estufa a 105°C durante 5 h. Em seguida, a solubilidade (%) foi calculada pela diferença de peso.

2.2.13 Análise estatística

Após constatação da normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk e da homogeneidade das variâncias pelo teste de Box-Cox, os dados obtidos para os extratos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando o software SAS (SAS/STAT, 2003) e as características que apresentaram médias com diferença significativa pelo teste F ($p < 0,05$) em resposta às diferentes concentrações de extrato foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Para avaliar o grau de associação entre as características foram estimados coeficientes de correlação de Pearson, para cada par de características, com os níveis de significância obtidos pelo teste t (1 e 5%), utilizando o programa estatístico SAS (SAS/STAT, 2003).

A partir destes resultados, obteve-se a melhor concentração de extrato, o qual foi selecionado para a atomização. O método utilizado para a avaliação dos dados obtidos nas análises da micropartícula foi à estatística descritiva, por meio de porcentagens, média e desvio padrão.

Para a comparação entre a atividade antioxidante e o potencial anticolinesterásico da micropartícula e do extrato utilizado para sua elaboração foi aplicado o teste T a 5% ou 1% de probabilidade para amostras pareadas com o auxílio do programa SAS (SAS/STAT, 2003).

2.2.14 Análise sensorial

Para avaliar se a adição de micropartículas ao suco provocou diferença sensorial, foi aplicado o teste triangular de acordo com os padrões estabelecidos pelo Instituto Adolfo Lutz. Para tal, foram distribuídas três amostras de suco de uva elaboradas a partir do preparado em pó de marca comercial, sendo duas iguais e uma diferente. As amostras foram codificadas aleatoriamente com três dígitos e servidas aos julgadores. As amostras foram apresentadas em duas séries, com seis arranjos balanceados (AAB, ABA, BAA, BBA, BAB, ABB), variando sua ordem de apresentação.

As amostras testadas foram:

- Amostra A - suco elaborado com preparado em pó nas condições indicadas no verso do produto;
- Amostra B - suco elaborado com preparado em pó nas condições indicadas no verso do produto enriquecido com 4% (p/p) de micropartículas de romã.

Os julgadores deveriam provar as amostras da esquerda para a direita, treinando assim sua memória sensorial, e deveriam detectar a amostra como diferente das demais.

Participaram deste teste 44 julgadores. O objetivo do teste era verificar se os 44 provadores que participaram da análise conseguiriam detectar diferença entre amostras de suco convencional e suco enriquecido com micropartículas.

Os provadores foram solicitados a utilizar a ficha sensorial para teste triangular e identificar a amostra diferente. Entre cada amostra, foi solicitada a ingestão de água para limpeza do palato.

Na análise dos resultados, foi utilizada a tabela com número mínimo de respostas corretas para estabelecer diferença significativa entre amostras, em vários níveis de significância (5%, 1% e 0,1%).

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Caracterização dos extratos

Os extratos produzidos a partir das cascas de romã apresentaram coloração alaranjada forte. O extrato 100% apresentou precipitado branco não encontrado nos demais, conforme pode ser observado na Figura 4.

Figura 4 - Extrato 100% de casca de romã.

2.3.1.1 Capacidade antioxidante

A quantidade de compostos fenólicos, taninos e a capacidade antioxidante, dos extratos de casca de romã mensurada por dois métodos, estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 - Compostos fenólicos totais, taninos e capacidade antioxidante de diferentes extratos de casca de romã

	DPPH Trolox extrato)	(μm g^{-1}	ABTS Trolox extrato)	(μm g^{-1}	Compostos Fenólicos (mg g^{-1} extrato)	Taninos (μg g^{-1} amostra)
Extrato Aquoso	1203,73 ^{a, b}		9328,79 ^{a, b}		618,04 ^b	18,58 ^c
Extrato 60%	1244,57 ^a		9779,39 ^a		1099,43 ^a	83,23 ^a
Extrato 80%	1157,65 ^{b, c}		9221,76 ^b		600,10 ^b	73,51 ^a
Extrato 100%	1109,48 ^c		9382,82 ^{a, b}		563,21 ^b	28,99 ^b

*Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si a 5% de significância.

Em vários estudos utilizando ensaios múltiplos de análise da atividade antioxidante, frutas e sucos de romã demonstraram propriedades antioxidantes semelhantes ou superiores do que outros alimentos considerados de alto poder antioxidante, incluindo o vinho tinto e chá verde (JOHANNINGSMEIER; HARRIS, 2011). Sucos comerciais de romã apresentam

atividade antioxidante (18-20 TEAC) três vezes superior ao vinho tinto e o chá verde (6-8 TEAC) (GIL et al., 2000).

Pesquisas têm mostrado que a atividade antioxidante e o teor de compostos fenólicos totais da casca de romã (68,3% de redução DPPH em 10 ppm e 242,9 mg de compostos fenólicos por ml de extrato, respectivamente) foram maiores do que as de sua semente (0,2% de redução DPPH em 10 ppm e 62 mg de compostos fenólicos por ml de extrato) e de sua polpa (0,8% de redução DPPH em 10 ppm e 26,2 mg de compostos fenólicos por ml de extrato), demonstrando que, assim como grande parte dos vegetais consumidos, a fração vegetal de maior bioatividade é descartada durante o consumo (FISCHER; REINHOLD CARLE; KAMMERER, 2011; SALGADO et al., 2012).

Os resultados obtidos nesta análise indicaram que o extrato de casca de romã em questão pode ser considerado fonte de compostos com atividade antioxidante e trazer possíveis benefícios à saúde como, por exemplo, a prevenção de doenças neurodegenerativas.

Existem vários métodos para determinação da atividade antioxidante. A complexidade química dos extratos, constituídos por dezenas de compostos com diferentes grupos funcionais, polaridade e comportamento químico, pode levar a resultados contraditórios, dependendo do teste utilizado. Portanto, a adoção de mais de um ensaio para avaliar o potencial antioxidante dos extratos é uma ferramenta bem mais informativa e até mesmo indispensável (OZTURK, 2012).

O método ABTS mede a capacidade antioxidante determinada pela descoloração do ABTS através da medida da redução do radical com a inibição percentual de absorbância a 734 nm. Adicionalmente, no método DPPH, a medida é dada pelo decréscimo da absorbância a 515nm através da captura do radical livre pelos compostos antioxidantes presentes na amostra.

Na análise pelo DPPH, as maiores atividades antioxidantes foram encontradas para o extrato 60% que não diferiu significativamente do extrato aquoso. Qu et al., (2010) também relatam a eficiência da água como solvente para a extração de antioxidantes de bagaço de romã. O extrato aquoso, por sua vez, não apresentou diferença significativa do extrato 80%, que também não diferiu do extrato 100%. É possível verificar que os solventes não são capazes de destruir a capacidade antioxidante dos extratos de romã, mas possivelmente modificam a natureza dos compostos fenólicos extraídos (KULKARNI; ARADHYA; DIVAKAR, 2004), acarretando em modificações quantitativas na capacidade antioxidantes dos diferentes extratos.

Na análise de ABTS, os extratos apresentaram menores diferenças entre si do que na análise por DPPH. O extrato aquoso, 60% e 100% não diferiram entre si a 5% de significância, do mesmo modo, o extrato aquoso, 80% e 100% também não apresentaram diferença significativa ao mesmo nível. O extrato 80% apresentou os menores valores de capacidade antioxidante, diferentemente do resultado da metodologia de DPPH, no entanto, não houve diferença significativa com o extrato 100%, o qual apresentou os menores teores de capacidade antioxidante por DPPH.

Embora os dois ensaios apresentem o mesmo princípio, o ABTS apresenta maior capacidade para avaliar a atividade antioxidante uma vez que considera os compostos tanto lipofílicos quanto hidrofílicos, enquanto o DPPH apresenta problemas relacionados a solubilidade para avaliar ambos os tipos de compostos, o que pode explicar a diferença numérica dos resultados entre os métodos (DASTMALCHI et al., 2011).

Muller, Fröhlich e Böhm, (2011) defendem que alguns compostos não reagem frente ao radical livre DPPH por serem lipofílicos. Portanto, devido à sensibilidade de cada método utilizado para a determinação da capacidade antioxidante, os resultados produzidos podem ser divergentes.

Substâncias polares e apolares são frequentemente utilizadas para o isolamento de antioxidantes e tanto o rendimento de extração quanto a atividade antioxidante dos extratos é fortemente dependente do solvente adotado, devido às diferentes polaridades e solubilidades apresentadas pelos compostos antioxidantes (DUTRA; LEITE; BARBOSA, 2008). Os compostos antioxidantes específicos podem responder de uma forma diferente para variadas fontes de radicais e conseqüentemente para diferentes metodologias de medida de atividade antioxidante.

Diversos métodos e solventes vêm sendo utilizados para a extração de compostos biologicamente ativos de materiais vegetais. Encontrar um único método que seja adequado para a extração de bioativos é importante, porém não é uma tarefa simples devido à diversidade de estruturas químicas e variações de sensibilidade dos compostos às condições de extração. Não existe um sistema de solvente que seja adequado para extrair todos os compostos bioativos de uma matriz. Li et al., (2006) afirmam que a mistura de solventes é mais eficaz na recuperação de antioxidantes do que o uso de solventes individuais conforme foi constatado nos resultados obtidos (Tabela 1).

A polaridade do solvente pode afetar a extração dos compostos com atividade antioxidante, bem como a presença de compostos não antioxidantes também podem afetar os resultados.

Para a obtenção de produtos antioxidantes para a indústria de alimentos, as extrações geralmente são realizadas utilizando água, alcoóis ou uma mistura deles. Isto porque embora o uso de solventes orgânicos na elaboração de extratos vegetais seja convencional, seu emprego implica em questões relativas à toxicidade ambiental e farmacológica, além da periculosidade existente ao manipulá-los. Assim, a substituição de solventes orgânicos por misturas com água, como os extratos apresentados neste estudo, é de grande interesse pelo menor impacto ambiental, custo operacional, periculosidade e toxicidade.

Independente das diferenças de resultados entre as metodologias adotadas verificou-se que a elaboração de extratos com uma mistura etanol: água, mais especificamente na proporção 60:40, acarretou em excelente extração de compostos com capacidade antioxidante. Desta forma, a utilização da casca de romã na elaboração de extratos etanólicos ricos em compostos bioativos é uma alternativa viável, podendo ser amplamente explorada tanto na indústria de ingredientes, como na de alimentos.

2.3.1.2 Compostos Fenólicos

O extrato da casca de romã se destaca pela sua riqueza em compostos fenólicos, evidenciando potencial a ser explorado.

Quanto à otimização do solvente de extração, é possível verificar que o extrato 60% foi o mais eficiente na extração de tais compostos. Os demais extratos não diferiram significativamente a 5% quanto ao teor de compostos fenólicos, conforme pode ser observado na tabela 1.

O extrato 60% também se destacou pela maior atividade antioxidante, o que possivelmente relaciona que os compostos fenólicos são os principais constituintes que contribuem para esta capacidade nos extratos da casca de romã.

Rababah et al., (2010) também detectaram uma forte influência do solvente na extração dos compostos fenólicos em romã. A influencia de diferentes solventes na extração de compostos fenólicos totais é resultado das diferenças de polaridade e de solubilidade entre os diferentes componentes fenólicos presentes nas plantas (HAYOUNI et al., 2007).

A otimização do método de extração é uma etapa importante para a obtenção de maior eficiência e rentabilidade do processo, atributos essenciais para a indústria.

Pesquisadores sugerem que a ingestão mínima total de fenólicos em um dia seja de 1g, o que corresponde a aproximadamente 1 g de extrato, demonstrando o potencial a ser explorado do extrato de casca de romã como fonte de compostos de interesse (SILBERBERG et al., 2006).

Salgado et al., (2012) encontrou valores inferiores de compostos fenólicos para a casca de romã *in natura* (242,9 mg/ml) quando comparado aos encontrados nos extratos em questão. Estes dados comprovam que o extrato concentrou os compostos fenólicos presentes no resíduo.

2.3.1.3 Taninos

Os taninos são as principais substâncias responsáveis pelo sabor adstringente de muitas frutas e vegetais (DE JESUS et al., 2012). A casca da romã é altamente conhecida pelo seu sabor adstringente, sendo este um problema para a inclusão deste produto em alimentos, já que provoca rejeição sensorial.

Sucos comerciais de romã possuem sabor adstringente com teores de taninos em torno de 417-539 mg L⁻¹ (GIL et al., 2000), enquanto em sucos sem romã as médias variaram em 320 mg L⁻¹ (MOUSAVINEJAD et al., 2009). O extrato aquoso apresentou menor teor de taninos (18,58 µg g⁻¹), seguido do extrato 100% (28,99 µg g⁻¹). Os extratos 60% (83,23 µg g⁻¹) e 80% (73,51 µg g⁻¹) foram eficazes na extração dos taninos da casca de romã, e não diferiram de forma significativa a 5%.

O extrato 60% apresentou a maior quantidade de taninos, bem como de fenólicos e capacidade antioxidante, o que evidencia que esta proporção entre etanol e água seria a mais eficiente na extração de compostos bioativos na casca de romã.

Existem espécies em que somente a água é utilizada na extração de taninos; em outras espécies, para melhorar a extração e a qualidade dos taninos, são adicionados à água diferentes concentrações de outros solventes (PIZZI, 1994). Os resultados para a casca de romã indicam que a mistura de solventes é mais eficaz na extração de taninos do que a utilização de apenas um solvente como água e o etanol.

O conceito de antioxidantes assim como seu estudo avançou e taninos, antigamente considerados apenas compostos antinutricionais que traziam inúmeros malefícios quando consumidos como parte da dieta, hoje são também investigados pelo seu potencial antioxidante e consequentemente benéfico à saúde.

Chung, Wei e Johnson, (1998) defendem que os taninos têm duplo efeito devido sua atuação contra carcinogênese ou como antimicrobiano e aos efeitos carcinogênico, hepatotóxico ou antinutricionais, variando de acordo com a dose ingerida. Neste sentido, Chung, Wei e Johnson, (1998) relatam que nozes contendo 25% de taninos podem ser responsáveis pela alta incidência de câncer de esôfago em determinada localidade dos Estados Unidos, onde pessoas comumente as consomem após o almoço. Os valores de taninos

encontrados nos extratos da casca de romã se encontram abaixo daqueles que segundo a literatura (25%) estão associados a danos a saúde (CHUNG; WEI; JOHNSON, 1998).

Segundo Martinez e Moyano, (2003) há comprometimento do aproveitamento do ferro e proteínas quando os níveis de taninos totais são superiores ao intervalo de 10 a 50 mg g⁻¹. Sendo assim, como os extratos testados apresentaram níveis inferiores a este intervalo (máximo de 83,23 µg g⁻¹) pode-se inferir que os teores de taninos presentes nos extratos não serão suficientes para ocasionar deficiências nutricionais aos seres humanos.

2.3.1.4 Inibição de acetilcolinesterase

Os resultados de inibição de AChE encontrados para os extratos de casca de romã estão apresentados nos Gráficos 1, 2, 3 e 4:

Gráfico 1 – Concentração, em miligramas, de extrato aquoso de casca de romã versus inibição de acetilcolinesterase

Gráfico 2 - Concentração, em miligramas, de extrato 60% de casca de romã versus inibição de acetilcolinesterase

Gráfico 3 - Concentração, em miligramas, de extrato 80% de casca de romã versus inibição de acetilcolinesterase

Gráfico 4 - Concentração, em miligramas, de extrato 100% de casca de romã versus inibição de acetilcolinesterase

No método de espectrofotometria descrito por Ellman et al., (1961), o extrato de casca de romã inibiu a enzima AChE de forma dose-dependente conforme pode ser observado nos gráficos 1, 2, 3 e 4.

A partir da equação da reta foi realizado o cálculo do IC₅₀, ou seja, da quantidade de extrato necessária para reduzir em 50% a quantidade da enzima AChE no ensaio que está apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 – Atividade anticolinesterásica, expressa em IC₅₀, de extrato de casca de romã

Extrato	IC ₅₀ (mg)
Aquoso	2,62 c
60%	2,73 b
80%	2,48 d
100%	5,20 a

No estudo de alimentos ou seus extratos no papel inibitório de AChE, encontram-se maiores valores de IC₅₀ quando comparado ao estudo de compostos sintéticos ou alcalóides isolados. Isto ocorre devido ao alimento ser um sistema complexo, onde se têm outras

substâncias que podem potencializar ou prejudicar a inibição. Adicionalmente, deve ser considerado que a quantidade de ingestão de alimento de forma segura é superior a de compostos sintéticos ou alcaloides isolados.

Além disso, o solvente de extração exerceu forte influencia na inibição, possivelmente porque a polaridade da solução pode interferir na extração dos compostos responsáveis por esta atividade. O extrato 80% apresentou menor valor de IC₅₀, sendo considerado o melhor extrato na inibição da AChE e conseqüentemente na possível prevenção da doença de Alzheimer. Isto porque o aumento da concentração de acetilcolina no cérebro é alcançado com a inibição da atividade da AChE, impedindo a quebra da acetilcolina, levando a acréscimo de comunicação entre as células nervosas que usam acetilcolina como mensageiro químico. Esta ação tem sido comumente usada para melhorar temporariamente ou estabilizar os sintomas da doença de Alzheimer (MUKHERJEE et al., 2007).

Neste caso, a ingestão de 2,48 mg de extrato 80% seria capaz de inibir 50% da AChE. O consumo deste extrato de forma regular iria evitar o acúmulo excessivo de AChE no organismo.

O extrato 100% foi o que apresentou maior valor de IC₅₀, sendo necessária maior quantidade deste extrato para alcançar a redução de 50% da atividade enzimática, o que não é interessante. Isto ocorreu possivelmente porque o solvente puro não foi capaz de extrair os compostos que apresentam tal atividade.

Ademosun e Oboh, (2012) caracterizaram os efeitos de alguns sucos de frutas cítricas (grapefruit, limão, laranja e tangerina) sobre a atividade da AChE *in vitro*. Neste estudo, a atividade da AChE foi inibida pelos sucos de uma forma dependente da dose, como também foi verificado para o extrato da casca da romã.

Benamar et al., (2010) mostraram que alguns extratos de plantas com conteúdo fenólico expressivo inibiu a atividade da AChE in “vitro”, e que poderia, portanto, ser sugerido que a inibição da AChE pela casca de romã teria relação com seus compostos fenólicos. No entanto, com a correlação é possível perceber que a quantidade de fenólicos não está fortemente relacionada à inibição da AChE, demonstrando que possivelmente os fenólicos exercem influência na inibição, mas deve ser considerada a natureza dos compostos fenólicos e não apenas sua quantidade.

Gironeś-Vilaplana et al., (2012) relataram que o suco de limão apresentou um IC₅₀ de 13,18 mL, enquanto o suco de açaí apresentou IC₅₀ de 21,14 mL. Diante do potencial anticolinesterásico apresentado pelos sucos, foi desenvolvido um *blend* que era mistura dos dois sucos, o qual apresentou IC₅₀ de 8,83 mL, a ser adotado na dieta visando principalmente

a prevenção de doenças neurodegenerativas, sendo que estes valores são superiores aos encontrados (Tabela 3).

Adicionalmente, o Projeto Kame realizados com japoneses e americanos entre 1992 e 2001, concluiu que indivíduos com maior ingestão de sucos de frutas e legumes tinham incidência reduzida da doença de Alzheimer, demonstrando que algum composto ou o conjunto de compostos presentes nestes alimentos seria responsável por esta redução (DAÍ et al., 2006).

Uma grande variedade de compostos de plantas, com atividade inibidora da AChE, foi encontrada em pesquisas científicas. Os estudos disponíveis estão focados em alcalóides, xantonas, quercetina e taninos, entre outros (MUKHERJEE et al., 2007; PEREIRA et al., 2010; BRÜHLMANN et al., 2004; KHAN et al., 2009; YOON et al., 2009).

Alguns compostos específicos, com destaque para os flavonóides e os alcalóides, têm apresentado atividade anticolinesterásica comprovada, por exemplo, Jung e Parker, (2007) relatam que a quercetina apresenta significativo efeito inibitório AChE, com um IC₅₀ em torno de 19,8 µM. Fato este que pode estar relacionado à atividade inibitória da casca de romã em questão.

Os resultados indicam que os extratos de casca de romã estudados apresentam potencialidade na inibição de AChE e conseqüentemente podem atuar na prevenção da doença de Alzheimer. A utilização de alimentos com atividade anticolinesterásica como parte da dieta usual para a prevenção da doença de Alzheimer é interessante, uma vez que os medicamentos utilizados no tratamento da doença com este princípio apresentam custo elevado e efeitos colaterais.

Estes resultados são de interesse para o desenvolvimento de produtos alimentares naturais para intervenção dietética sobre colinesterases usando o extrato da casca de romã. Estudos posteriores devem ser realizados a fim de detectar os compostos específicos na casca de romã que são responsáveis por este mecanismo e o impacto desta fruta em outras vias biológicas relacionadas à doença de Alzheimer.

2.3.2 Correlação de Pearson

Na Tabela 4 estão apresentados os coeficientes de correlação de Pearson para os pares de variáveis analisados neste estudo.

Tabela 4 - Matriz de correlação entre os métodos de capacidade antioxidante, inibição de acetilcolinesterase, compostos fenólicos totais e taninos em extratos de cascas de romã

	ABTS	DPPH	Taninos	Fenólicos
IC 50	-0,45 ^{ns}	-0,69 ^{**}	-0,47 ^{ns}	-0,28 ^{ns}
ABTS		0,50 ^{ns}	0,55 [*]	0,62 ^{**}
DPPH			0,36 ^{ns}	0,71 ^{**}
Taninos				0,61 [*]

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$)

ns - não significativo ($p \geq 0,05$)

Os compostos fenólicos apresentaram forte correlação positiva com os métodos de capacidade antioxidante (ABTS=0,62 e DPPH=0,71), isto pode ser explicado pelo fato de que os fenólicos são os principais compostos responsáveis por tal atividade.

No entanto, vale ressaltar que a ação antioxidante não está relacionada apenas a quantidade de compostos fenólicos. A composição e a estrutura química do componente ativo do extrato são fatores importantes que influenciam a eficácia do antioxidante natural. A posição e o número de hidroxilas presentes na molécula dos fenólicos é um fator relevante. Acredita-se que a orto-dihidroilação contribui marcadamente para a atividade antioxidante do composto. Assim, a ação antioxidante de um extrato vegetal não pode ser explicada apenas com base em seu teor de fenólicos totais, sendo necessário também a caracterização da estrutura do composto ativo (HEINONEN; LEHTONEN; HOPIA, 1998). Outros compostos não inseridos na categoria de compostos fenólicos também podem contribuir para a atividade antioxidante dos extratos.

Atividade antioxidante significativa da casca de romã também já foi reportada por Fisher et al. (2011)., Nesse estudo a atividade medida pelo método ABTS correlaciona-se positivamente com o conteúdo de fenólicos totais presentes na amostra, tendência também observada neste trabalho.

O método DPPH apresentou correlação não significativa com o ABTS. Tais metodologias são utilizadas para mensurar a atividade antioxidante das amostras, no entanto, os antioxidantes podem responder de uma forma diferente para diferentes formas de radicais (DPPH e ABTS) e consequentemente para diferentes metodologias de medida de atividade antioxidante.

Os taninos apresentaram moderada correlação positiva com o conteúdo de compostos fenólicos ($r = 0,61$). Os taninos constituem uma classe de polifenóis e estão intimamente

relacionados ao aumento da quantidade destes compostos nos alimentos, sendo um dos principais constituintes da romã (OSZMIANSKI et al. 2007).

Por serem parte dos compostos fenólicos, os taninos também contribuem para a atividade antioxidante do extrato. Desta forma, foi observada correlação positiva entre taninos e ABTS ($r = 0,55$) a 5% de significância. No entanto, não foi encontrada correlação significativa entre taninos e DPPH ($r = 0,36$). Em diferentes metodologias de mensuração da capacidade antioxidante deve-se considerar que o mesmo composto contribui de forma diferente para a atividade antioxidante total mensurada por método específico, uma vez que ele reage de forma diferente perante cada radical aplicado.

A inibição de AChE demonstrou correlação negativa significativa a 1% com a atividade antioxidante mensurada pelo método DPPH ($r = -0,69$). O aumento da atividade antioxidante acarreta a redução da inibição da enzima, demonstrando que possivelmente os compostos responsáveis pela inibição da AChE não contribuem de forma significativa para a atividade antioxidante. As hipóteses de que frutos com elevada capacidade antioxidante obrigatoriamente apresentam efeitos colinérgicos devem ser reavaliadas perante esta correlação.

Sharififar et al., (2012) estudaram a capacidade anticolinesterásica e a atividade antioxidante de três plantas medicinais (*Trigonella foenum-graecum*, *Glycine max* e *Sesamum indicum*) e também detectaram que não existe correlação positiva entre a inibição de AChE e a capacidade antioxidante mensurada pelo método DPPH.

Ozturk, (2012) ao analisar a atividade antioxidante e o potencial anticolinesterásico do óleo essencial e do extrato metanólico de *Satureja thymbra* também não encontrou correlação positiva entre a atividade antioxidante, mensurada por diferentes métodos, e a inibição da enzima, realizada pelo Método de Ellman. Uma correlação negativa entre ABTS e IC50 ($r = -0,45$) também foi encontrada, no entanto os valores não foram significativos a nível de 5%.

Não foram encontradas correlações negativas significantes entre a atividade anticolinesterásica e o conteúdo de fenólicos ($r = -0,28$) e de taninos ($r = -0,47$). Possivelmente, não foram estes os compostos que contribuíram de forma significativa para tal atividade, ou ainda, a atividade não pode ser atribuída a um composto isolado e sim a relação de sinergismo entre eles.

Ademosun e Oboh, (2012) ao estudarem os efeitos de alguns sucos de frutas cítricas (grapefruit, limão, laranja e tangerina) sobre a atividade da AChE *in vitro* também verificaram correlação negativa não significativa entre a quantidade de compostos fenólicos e a inibição de acetilcolinesterase.

2.3.3 Caracterização das micropartículas

2.3.3.1 Atividade anticolinesterásica e antioxidante

A fim de verificar se a atomização iria afetar o efeito anticolinesterásico do extrato, foram realizadas análise de inibição de acetilcolinesterase com as micropartículas.

Em relação à inibição AChE, o IC₅₀ encontrado para as micropartículas foi de 6 mg de micropartículas. Esta quantidade apresenta apenas 3,0 mg de extrato de casca de romã, sendo o restante correspondente a maltodextrina, o que justifica o maior valor encontrado em relação ao extrato. Houve diferença significativa pelo teste T a 1% entre a micropartículas e o extrato utilizado para sua elaboração. A atomização afetou a capacidade anticolinesterásica do extrato, no entanto, promoveu um aumento da aceitabilidade sensorial. Desta forma, esta técnica se torna uma ferramenta eficaz a ser utilizada para resolver sabores desagradáveis.

Não obstante, a fim de detectar o efeito da secagem sobre a ação antioxidante do extrato, foi realizada a análise por DPPH nas micropartículas. Para as micropartículas, a atividade antioxidante mensurada por DPPH apresentou valores de 587,37 µm Trolox/ g extrato. Com base nos resultados obtidos foi possível verificar que não houve interferência na capacidade antioxidante do extrato com a atomização de acordo com o teste T a 1% de significância.

O processo de secagem não afeta significativamente a atividade de antioxidantes e o conteúdo de compostos bioativos da casca de romã. Qu et al., (2010) defendem, com base nos resultados de testes de Tukey, que não houve diferença significativa a 5% nos conteúdos de fenólicos totais e atividade antioxidante mensurada pelo método DPPH entre a casca de romã *in natura* e a submetida a secagem a 40°C em um secador de bandejas.

2.3.3.2 Características tecnológicas

Na microencapsulação algumas variáveis tecnológicas devem ser analisadas a fim de verificar a viabilidade de utilização, entre elas pode-se destacar a higroscopicidade, solubilidade e umidade.

Tabela 5 – Características tecnológicas das microcápsulas

Análises	Resultados
Higroscopicidade (g de água absorvida/100g de matéria seca)	11,43
Solubilidade (%)	99,54
Umidade da micropartícula (%)	3,21
Umidade do extrato (%)	40,18

A micropartícula apresentou elevada solubilidade (99,54%). A solubilidade constitui fator importante na aplicabilidade e desempenho de pós-alimentícios, já que a baixa solubilidade pode dificultar a formulação, provocando baixa biodisponibilidade, o que exige muitas vezes a utilização de quantidades elevadas de micropartículas.

O uso de temperaturas elevadas (geralmente acima de 100°C) implica em maior diferença de temperaturas entre o produto atomizado e o ar de secagem, acarretando maior transferência de calor e, conseqüentemente, maior evaporação de água do produto, resultando em umidades mais baixas como a observada no produto em questão.

Valores reduzidos de umidade são interessantes ao se considerar à conservação do produto. Vardin e Yasar, (2012) também detectaram valores reduzidos, em torno de 3%, de umidade ao secarem suco de romã em *spray drying*.

Entende-se higroscopicidade como a capacidade do pó alimentício de absorver água a partir de um ambiente de alta umidade relativa superior à de equilíbrio (JAYA; DAS, 2004). Vardin e Yasar, (2012) relatam que altas concentrações de maltodextrina resultam em pós menos higroscópicos. Isso se deve ao fato da maltodextrina ser um material com baixa higroscopicidade e confirma a eficiência de seu uso como agente carreador, no sentido de reduzir a higroscopicidade de produtos desidratados em *spray dryer*.

As micropartículas de extrato de casca de romã apresentaram valores reduzidos para higroscopicidade (11,43 g de água absorvida por 100 g de microcápsula seca) e este valor pode estar relacionado à elevada quantidade de maltodextrina utilizada na elaboração de micropartículas (50%).

2.3.3.3 Microscopia de varredura eletrônica

As imagens de microestruturas obtidas pela microscopia de varredura eletrônica das micropartículas estão apresentadas na Figura 5.

Figura 5 - Fotomicrografia de micropartículas de extrato de casca de romã com um aumento de (1) 560 vezes, (2) 640 vezes, (3) 700 vezes

De modo geral, quanto a sua microestrutura as micropartículas de extrato de casca de romã são partículas esféricas de diâmetro variado, o que é característico em partículas produzidas pelo processo de *spray drying* (VEHRING, 2008).

De acordo com Cano-Chauca et al., (2005), a presença de poucas fendas ou poros superficiais e a forte aderência das partículas menores em torno das maiores demonstram ausência de superfícies cristalinas e é característica de produtos amorfos.

As esferas apresentam, em sua maioria, superfície lisa, e apenas algumas apresentaram depressões em sua extensão. Segundo Thies, (2001) as depressões que aparecem na superfície das micropartículas são formadas devido à contração das partículas durante a secagem e o resfriamento. Além disso, a extensão das depressões observadas em micropartículas produzidas por *spray drying* é função da natureza do agente carreador utilizado, sendo significativa naquelas que possuem cobertura de polissacarídeos.

As micropartículas, em sua maioria, estavam integras, com ausência de rachaduras ou fragmentos. No entanto foi possível observar uma micropartícula fragmentada e sua parede é compacta e homogênea (Figura 5). Segundo Rocha et al., (2012) características como rachaduras ou interrupções em paredes externas são indesejáveis, uma vez que possibilitam maior permeabilidade de oxigênio e consequentemente comprometem a proteção e retenção dos compostos bioativos de interesse.

As micropartículas apresentaram elevada diversidade de tamanhos. De acordo com Tonon, Brabeti e Hubinger, (2008), a presença de partículas maiores pode ser atribuída a um início do processo de aglomeração, aonde a formação de pontes de ligação conduz a produção de partículas com maior tamanho.

2.3.4 Análise sensorial

Foram realizados quarenta e quatro julgamentos, entre os quais nove foram corretos. Analisando a tabela de resultados para o teste triangular unilateral (Instituto Adolfo Lutz), o valor tabelado é vinte e seis para 0,1% de nível de probabilidade. Verificou-se, portanto, que não houve diferença sensorial significativa com a adição de micropartículas ao suco. A adição de microcápsulas de extrato de casca de romã a 80% não causou implicações sensoriais ao produto, diferente dos estudos em que se aplica a casca de romã *in natura* ou na forma de extratos. Na atomização foi utilizado um polímero altamente solúvel em água, o que garante que a micropartícula se dissolve e libera o princípio ativo quando adicionada ao suco.

Salgado et al., (2012) utilizaram um extrato seco de casca de romã no enriquecimento de suco de laranja com morango a fim de aumentar sua capacidade antioxidante. O extrato seco foi responsável por aumento significativo da atividade antioxidante do suco, de forma proporcional às concentrações adicionadas. No entanto, embora o suco enriquecido tenha apresentado níveis elevados de antioxidantes, a amostra com maior concentração de extrato seco recebeu as notas mais baixas dos participantes de análise sensorial devido ao sabor adstringente característico de cascas de romã, provocado principalmente pelos taninos. Portanto, para obter maior aceitação no mercado consumidor, o estudo concluiu que a adição máxima de extrato de cascas secas de romã é de 0,5% em suco de laranja com morangos.

Barros (2011) descreveu que a adição de 0,7% de casca de romã liofilizada ao suco de goiaba não afetou os parâmetros sensoriais do produto quando comparados a uma amostra controle (sem adição de casca de romã), sendo viável, do ponto de vista sensorial, sua aplicação como fonte de antioxidantes. No entanto, em testes prévios foi verificado que esta seria a quantidade limite para o enriquecimento com a casca de romã liofilizada sem que houvesse modificações sensoriais.

A microencapsulação constituiu uma importante ferramenta para disponibilizar este extrato na forma de um produto sensorialmente agradável, diferente do que é comumente relatado para extratos de casca de romã graças ao seu elevado teor de taninos. Mesmo que a microencapsulação agregue certo valor ao extrato, pesquisas mostraram que os consumidores estão dispostos a pagar um preço até 70% maior em produtos relacionados à promoção da saúde (DEFRANCESCO; TRESTINI, 2008).

A indústria de alimentos, para manter-se competitiva, é desafiada a desenvolver produtos que venham de encontro a estas necessidades e também considerando atributos como praticidade no consumo, atratividade ao paladar e saudabilidade. No entanto, o

processamento de alimentos pode degradar os compostos funcionais, naturalmente presentes ou adicionados, prejudicando sua biodisponibilidade no organismo,

Uma forma de minimizar estes efeitos é o emprego da microencapsulação de substâncias, que se baseia na retenção destas em estruturas que permitam separá-las do ambiente, evitando efeitos que sejam danosos a elas ou ao produto ou corrigindo problemas relacionados ao sabor de determinadas frações de alimentos, como foi o caso da casca da romã.

3 CONCLUSÃO

Do presente trabalho foram sugeridas as seguintes conclusões:

A casca de romã é fonte potencial de compostos antioxidante, indiferente da metodologia de extração adotada.

O extrato com 60% de etanol se destacou quanto a capacidade antioxidante, conteúdo de fenólicos e taninos.

O extrato com 80% de etanol apresenta maior atividade anticolinesterásica em comparação aos demais.

Há correlação negativa entre a atividade anticolinesterásica e a atividade antioxidante dos extratos.

Atomização do extrato de casca de romã elaborado com 80% de etanol não afetou sua capacidade antioxidante.

Adição das microcápsulas em sucos de uva não alterou suas características sensoriais normais.

Desta forma, verifica-se o potencial para a indústria do emprego das micropartículas a base do extrato casca de romã como ingrediente alimentício.

REFERÊNCIAS

- ADEMOSUN, A. O.; OBOH, G. Inhibition of Acetylcholinesterase Activity and Fe²⁺-Induced Lipid Peroxidation in Rat Brain In Vitro by Some Citrus Fruit Juices. **Journal of Medicinal Food**, New York, v. 15, n. 5, p. 428–434, May 2012.
- AISEN, P. S.; CUMMINGS, J.; SCHNEIDER, L. S. Symptomatic and Nonamyloid/Tau Based Pharmacologic Treatment for Alzheimer Disease. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, New York, v. 2, n. 3, p. a006395, Mar. 2012.
- ALCALA, M.M.; MADERUELO, A.; VIVAS, N.M.; CAMPS, P.; MUNOZ-TORRERO, D.; CLOS, M.V.; BADIA, A. Effects of (+/-)-huprine Y and (+/-)-huprine Z, two new anticholinesterasic drugs, on muscarinic receptors. **Neuroscience Letters**, Maryland Heights, v. 379, n. 2, p. 106-109, May 2005.
- ALVIN, N.A. Enfermagem e as práticas naturais de saúde: um estudo de representações docentes. 10 ed. Rio de Janeiro: Graffline, 1997. 190 p.
- ANEKONDA, T.S.; REDDY, P.H. Can herbs provide a new generation of drugs for treating Alzheimer's disease? **Brain Research Review**, Maryland Heights, v. 50, n. 2, p. 361-376, Dec. 2005.
- BARROS, Z. M. P. **Cascas de frutas tropicais como fonte de antioxidantes para enriquecimento de suco pronto**. 2011. 84 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.
- BENAMAR, H.; RACHED, W.; DERDOUR, A.; MAROUF, A. Screening of Algerian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. **Journal of Biological Sciences**, New York, v. 10, n. 1, p. 1-9, Jan. 2010.
- BENZI, G.; MORETTI, A. Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease? **Neurobiology of Aging**, New York, v. 16, n. 4, p. 661-674, Jul/Aug. 1995.
- BORGOGNA, M.; BELLICH, B.; ZORZIN, L.; LAPASIN, R.; CESÀRO, A. Food microencapsulation of bioactive compounds: Rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. **Food Chemistry**, Barking, v. 122, n. 2, p. 416–423, Sept. 2010.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, London, v. 28, n. 1, p. 25-30, July 1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 18, de 30 de Abril de 1999. Diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/18_99.htm>. Acesso em: 02 maio 2012.

BRÜHLMANN, C.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K.; CARRUPT, P. A.; TESTA, B. Screening of non-alkaloidal natural compounds as acetylcholinesterase inhibitors. **Chemistry & Biodiversity**, Zürich, v. 1, n. 6, p. 819–829, June 2004.

CAI, Y. Z.; CORKE, H. Production and properties of spray-dried *Amaranthus* Betacyanin Pigments. **Journal of Food Science**, Malden, v. 65, n. 7, p. 1248-1252, July 2000.

CANO-CHAUCA, M.; STRINGHETA, P.C.; RAMOS, A. M.; CAL-VIDAL, J. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Oxford, v. 6, n. 4, p. 420-428, Dec. 2005.

CARPINELLA, M.C.; ANDRIONE, D.G.; RUIZ, G.; PALACIOS, S.M. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plant extracts from Argentina. **Phytotherapy Research**, Malden, v. 24, n. 3, p. 259–263, Feb. 2009.

CARRASCO-POZO, C.; MIZGIER, M.L.; SPEISKY, H.; GOTTELAND, M. Differential protective effects of quercetin, resveratrol, rutin and epigallocatechin gallate against mitochondrial dysfunction induced by indomethacin in Caco-2 cells. **Chemico- Biological Interactions**, Konstanz, v. 195, n. 3, p. 199–205, Feb. 2012.

CHAIYANA, W.; OKONOGI, S. Inhibition of cholinesterase by essential oil from food plant. **Phytomedicine**, Oxford, v. 19, n. 8-9, p. 836-839, Apr. 2012.

CHAIYANAA, W.; SAEIOA, K.; HENNINK, W. E.; OKONOGI, S. Characterization of potent anticholinesterase plant oil based microemulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, London, v. 401, n. 1-2, p. 32–40, Nov. 2010.

CHAMPAGNE, C. P.; FUSTIER, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 18, n. 2, p. 184–190, Apr. 2007.

CHOI, G. N.; KIM, J. H.; KWAK, J. H.; JEONG, C. H.; JEONG, H. R.; LEE, U.; HEO, H. J. Effect of quercetin on learning and memory performance in ICR mice under neurotoxic trimethyltin exposure. **Food Chemistry**, Barking, v. 132, n. 2, p. 1019–1024, May 2012.

CHOI, S. J.; LEE, J. H.; HEO, H. J.; CHO, H. Y.; KIM, H. K.; KIM, C. J.; KIM, M. O.; SUH, S. H.; SHIN, D. H. *Punica granatum* Protects Against Oxidative Stress in PC12 Cells and Oxidative Stress Induced Alzheimer's Symptoms in Mice. **Journal of Medicinal Food**, New York, v. 14, n. 7-8, p. 695–701, Jul./Aug. 2011.

CHRISTEN, Y. Oxidative stress and Alzheimer disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 71, n. 2, p. 621S-629S, Feb. 2000.

CHUNG, K.; WEI, C.; JOHNSON, M.G. Are tannins a double-edged sword in biology and health? **Trends in Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 9, n. 4, p. 168-175, Apr. 1998.

COPELAND, R. A. **Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery**: a guide for medicinal Chemists and Pharmacologists. New Jersey: Wiley, 2005. 300 p.

COREY-BLOOM, J.; THAL, L.; GALASKO, D.; FOLSTEIN, M.; DRACHMAN, D.; RASKIND, M.; LANSKA, D.J. - Diagnosis and evaluation of dementia. **Neurology**, San Diego, v. 45, n. 2, p. 211-218, Feb. 1995.

COSENDEY, M.A.E.; BERMUDEZ, J.A.Z.; REIS, A.L.A.; SILVA, H.F.; OLIVEIRA, M.A.; LUIZA, V.L. Assistência farmacêutica na atenção básica de saúde: a experiência de três estados brasileiros. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 1, p. 171-182, Jan./Mar. 2000.

DAI, Q.; BORENSTEIN, A.R.; WU, Y.; JACKSON, J.C.; LARSON, E.B. Fruit and vegetable juices and Alzheimer's disease: the Kame Project. **American Journal of Medicine**, Alexandria, v.119, n. 9, p. 751-759, Sept. 2006.

DASTMALCHI, K.; FLORES, G.; PETROVA, V.; PEDRAZA-PENALOSA, P.; KENNELLY, E.J. Edible Neotropical Blueberries: Antioxidant and Compositional Fingerprint Analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 59, n. 7, p. 3020-3026, Mar. 2011.

DE JESUS, N. Z. T.; FALCÃO, H. DE S.; GOMES, I. F.; LEITE, T. J. DE A.; LIMA, G. R. DE M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S. DA; ATHAYDE-FILHO, P. F. DE; BATISTA, L. M. Tannins, Peptic Ulcers and Related Mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 13, n. 3, p. 3203-3228, Mar. 2012.

DEFRANCESCO, E.; TRESTINI, S. Consumers' willingness to pay for the health promoting properties of organic fresh tomato. **Rivista di Economia Agraria**, Buenos Aires, v. 63, n. 4, p. 517-545, Nov. 2008.

DEMAJORIVIC, J. Da política tradicional de tratamento do lixo à política de gestão de resíduos sólidos: as novas prioridades. **Revista de Administração de Empresas**, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 88-93, Maio/Jun. 1995.

DESAI, K.G.H.; PARK, H.J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, Philadelphia, v. 23, n. 7, p. 1361-1394, Feb. 2005.

DI GIOVANNI, S.; BORLOZ, A.; URBAIN, A.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K.; CARRUPT, P.A.; REIST, M. *In vitro* screening assays to identify natural or synthetic acetylcholinesterase inhibitors: thin layer chromatography versus microplate methods. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Odense, v. 33, n. 2, p. 109-119, Feb. 2008.

DICKSON, D.W. Neuropathology of non-Alzheimer degenerative disorders. **International journal of clinical and experimental pathology**, Madison, v. 3, n. 1, p. 1-23, Aug. 2010.

DIKMEN, M.; OZTURK, N.; OZTURK, Y. The Antioxidant Potency of *Punica granatum* L. Fruit Peel Reduces Cell Proliferation and Induces Apoptosis on Breast Cancer. **Journal of Medicinal Food**, New York, v.14, n. 12, p. 1-9, Dec. 2011.

DONG, Z.; SURH, Y.-J.; PACKER, L.; CADENAS, E. **Dietary Modulation of Cell Signaling Pathways**. 25 Ed. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2009. 504 p.

DUTRA, R.; LEITE, M.; BARBOSA, N. Quantification of phenolic constituents and antioxidant activity of *Pterodon emarginatus* Vogel seeds. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 9, n. 4, p. 606–614, Apr. 2008.

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, Kansas, v. 7, n. 2, p. 88-95, July 1961.

EMBRAPA. **Metodologia científica**: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. Fortaleza, 2007. 4p. Disponível em: <www.cnpat.embrapa.br/cnpat/down/index.php?pub/Cot_128.pdf>. Acesso em: 20 out. 2011.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols - a review. **Trends in Food Science & Technology**, London, v. 21, n. 10, p. 510-523, Oct. 2010.

FDA (2007). Alzheimer's Disease: FDA's Role In New Product Development. U.S. Food and drug administration. Disponível em: <<http://www.fda.gov/NewsEvents/Testimony/ucm110879.htm>> Acesso em: 4 maio 2012.

FISCHER, U.A.; REINHOLD CARLE, R.; KAMMERER, D.R. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD–ESI/MSn. **Food Chemistry**, Barking, v. 127, n. 2, p. 807-821, Jan. 2011.

GIL, F.A.; TOMAS-BARBERAN, B.; HESS-PIERCE, D.M.; HOLCROFT, A.A. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 48, n. 10, p. 4581-4589, Oct. 2000.

GIRONÉS-VILAPLANA, A.; VALENTÃO, P.; MORENO, D.A.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C.; ANDRADE, P.B. New Beverages of Lemon Juice Enriched with the Exotic Berries Maqui, Açaí, and Blackthorn: Bioactive Components and in Vitro Biological Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 60, n. 26, p. 6571-6580, Jul. 2012.

GONZÁLEZ-MOLINA, E.; MORENO, D. A.; GARCÍA-VIGUERA, C. A new drink rich in healthy bioactives combining lemon and pomegranate juices. **Food Chemistry**, Barking, v. 115, n. 4, p. 1364–1372, Aug. 2009.

HAASS, C.; SELKOE, D.J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 8, n. 2, p.111-112, Feb. 2007.

HAYOUNI, E.; ABEDRABBA, M.; BOUIX, M.; HAMADI, M. The effects of solvents and extraction methods on the phenolic contents and biological activities in vitro of *Tunisian Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. **Food Chemistry**, Barking, v. 105, n. 3, p. 1126–1134, Oct. 2007.

HAZEL, J.R.; WILLIAMS, E.E. The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. **Progress in Lipid Research**, Graz, v. 29, n. 3, p. 167-227, Jan. 1990.

HEINONEN, M.; LEHTONEN, P.J.; HOPIA, A.I. Antioxidative activity of Berry and fruit wines and liquor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 46, n. 1, p. 25-31, Jan. 1998.

ITO, K.; AHADIEH, S.; CORRIGAN, B.; FRENCH, J.; FULLERTON, T.; TENSFELDT, T. Disease progression meta-analysis model in Alzheimer`s disease. **Alzheimer`s & Dementia**, Kansas, v.6, n. 1, p.39-53, Jan. 2010.

JAFARI, S. M.; ASSADPOOR, E.; HE, Y.; BHANDARI, B. Encapsulation efficiency of flavours and oils during spray drying. **Drying technology**, London, v. 28, n. 7, p. 816-835, Oct. 2008.

JANASWAMY, S.; YOUNGREN, S.R. Hydrocolloid-based nutraceutical delivery systems. **Food Function**, Cambridge, v. 3, n. 5, p. 503-507, May 2012.

JAYA, S.; DAS, H. Effect of maltodextrin, glycerol monostearate and tricalcium phosphate on vacuum dried mango powders properties. **Journal of Food Engineering**, Davis, v. 63, n. 2, p. 125-134, June 2004.

JOHANNINGSMEIER, S.D.; HARRIS, G. K. Pomegranate as a Functional Food and Nutraceutical Source. **Annual Reviews of Food Science and Technology**, Palo Alto, v. 2, p. 181-201, Nov. 2011.

JOSEPH, J.A.; SHUKITT-HALE, B.; WILLIS, L.M. Grape Juice, Berries, and Walnuts Affect Brain Aging and Behavior. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 139, n. 9, p. 1813S-1817S, Sept. 2009.

JUNG, M.; PARK, M. Acetylcholinesterase inhibition by Flavonoids from *Agrimonia Pilosa*. **Molecules**, Basel, v. 12, n. 9, p. 2130-2139, Sept. 2007.

JYOTHI, N.V.N.; PRASANNA, P.M.; SAKARKAR, S.N.; PRABHA, K.S.; RAMAIAH, P.S.; SRAWAN, G.Y. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. **Journal of Microencapsulation**, London, v. 27, n. 3, p. 187–197, May 2010.

HARTMAN, R. E.; SHAH, A.; FAGAN, A. M.; SCHWETYE, K. E.; PARSADANIAN, M.; SCHULMAN, R. N.; FINN, M. B.; HOLTZMAN, D. M. Pomegranate juice decreases amyloid load and improves behavior in a mouse model of Alzheimer's disease. **Neurobiology of Disease**, Pittsburgh, v. 24, n. 3, p. 506–515, Sept. 2006

KANG, N.J.; SHIN, S.H.; LEE, H.J.; LEE, K.W. Polyphenols as small molecular inhibitors of signaling cascades in carcinogenesis. **Pharmacology & Therapeutics**, Kansas, v. 130, n. 3, p. 310–324, Jun. 2011.

KATALINIĆ, M.; RUSAK, G.; DOMAĆINOVIĆ, B. J.; SINKO, G.; JELIĆ, D.; ANTOLOVIĆ, R.; KOVARIK, Z. Structural aspects of flavonoids as inhibitors of human butyrylcholinesterase. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 45, n. 1, p. 186–192, Jan. 2010.

KHAIRULLINA, V. R.; GERCHIKOVA, A. Y.; DENISOVA, S. B. Comparative Study of the Antioxidant Properties of Selected Flavonols and Flavanones. **Kinetika and Cataliz**, Moscow, v. 51, n. 2, p. 234–239, Apr. 2010.

KHAN, M. T. H.; ORHAN, I.; ŞENOL, F. S.; KARTAL, M.; ŞENER, B.; DVORSKÁ, M.; ŠMEJKAL, K.; ŠLAPETOVÁ, T. Cholinesterase inhibitory activities of some flavonoid derivatives and chosen xanthone and their molecular docking studies. **Chemico-biological interactions**, Konstanz, v. 181, n. 3, p. 383–389, Oct. 2009.

KIM, J.; LEE, H.J.; LEE, K.W. Naturally occurring phytochemicals for the prevention of Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**, Philadelphia, v. 112, n. 6, p. 1415–1430, Mar. 2010.

KITAJIMA, E.W.; LEITE, B. **Curso introdutório de microscopia eletrônica de varredura**. 2.ed. Piracicaba: Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária/ESALQ, 1999. 60p.

KULKARNI, A.P.; ARADHYA, S.M.; DIVAKAR, S. Isolation and identification and a radical scavenging antioxidant-punicalagin from pith and carpellary membrane of pomegranate fruit. **Food Chemistry**, Barking, v. 87, n. 4, p. 551–557, Oct. 2004.

KUMAR, S.; MAHESHWARI, K.K.; SINGH, V. Central nervous system activity of acute administration of ethanol extract of *Punica granatum* L. seeds in mice. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 46, n. 12, p. 811–816, Dec. 2008.

LEFEVRE, G.; POMMIER, F.; SEDEK, G.; ALLISON, M.; HUANG, H.L.; KIESE, B.; HO, Y.Y.; APPEL-DINGEMANSE, S. Pharmacokinetics and bioavailability of the novel Rivastigmine transdermal patch versus Rivastigmine oral solution in healthy elderly subjects. **The Journal of Clinical Pharmacology**, London, v. 48, n. 2, p. 246–252, Feb. 2008.

LI, Y.; GUO, C.; YANG, J.; WEI, J.; XU, J.; CHENG, S. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. **Food Chemistry**, Barking, v. 96, n. 2, 254–260, May 2006.

MARTINEZ, T. F.; MOYANO, F. J. Effect of tannic acid on in vitro enzymatic hydrolysis of some protein sources. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Sussex, v. 83, n. 5, p. 456–464, Apr. 2003.

MAGRONE, T.; MARZULLI, G.; JIRILLO, E. Immunopathogenesis of neurodegenerative diseases: current therapeutic models of neuroprotection with special reference to natural products. **Current Pharmaceutical Design**, Schiphol, v.18, n.1, p. 34–42, Jan. 2012.

MANACH, C.; WILLIAMSON, G.; MORAND, C.; SCALBERT, A.; REMESY, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. Review of bioavailability studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Houston, v. 81, n. 1, p. 230–242, Jan. 2005.

MARTÍNEZ, C.; ROS, G.; PERIAGO, M.J.; LOPEZ, G.; ORTUÑO J.; RINCÓN, F. El ácido fítico em la alimentación humana. **Food Science and Technology International**, Switzerland, v. 2, n. 4, p. 201-209, Jan. 1996.

McCUNE, L.M.; KUBOTA, C.; STENDELL-HOLLIS, N.R.; THOMSON, C.A. Cherries and health: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 51, n. 1, p. 1-12, Jan. 2011.

MITZI MA, K.L.; DOLAN, K.D. Effects of Spray Drying on Antioxidant Capacity and Anthocyanidin Content of Blueberry By-Products. **Journal of Food Science**, Malden, v. 76, n. 7, p. 156-164, Sep. 2011.

MOUSAVINEJAD, G.; EMAM-DJOMEH, Z.; REZAEI, K.; HOSSEIN, M.; KHODAPARAST, H. Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on antioxidant activity in pomegranate juices of eight iranian cultivars. **Food Chemistry**, Barking, v. 115, n. 4, p. 1274–1278, Aug. 2009.

MUKHERJEE, P.K.; KUMAR, V.; MAL, M.; HOUGHTON, P.J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. **Phytomedicine**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 289–300, Apr. 2007

MÜLLER, L.; FRÖHLICH, K.; BÖHM, V. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (aTEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. **Food Chemistry**, Barking, v. 129, n. 1, p. 139-148, Nov. 2011.

NAIR, V.; DAI, Z.; KHAN, M.; CIOLINO, H.P. Pomegranate extract induces cell cycle arrest and alters cellular phenotype of human pancreatic cancer cells. **Anticancer Research**, Athens, v. 31, n. 9, p. 2699–2704, Sept. 2011.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, Columbus, v. 70, n. 3, p. 461-477, Feb. 2007.

NEYRINCK, A. M.; VAN HEE, V. F.; BINDELS, L.B.; DE BACKER, F.; CANI, P.D.; DELZENNE, N.M. Polyphenol-rich extract of pomegranate peel alleviates tissue inflammation and hypercholesterolaemia in high-fat diet-induced obese mice: potential implication of the gut microbiota. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 7, n.1, p. 1-8, Jun. 2012.

NIZZARI, M.; THELLUNG, S.; CORSARO, A.; VILLA, V.; PAGANO, A.; PORCILE, C.; RUSSO, C.; FLORIO, T. Neurodegeneration in Alzheimer Disease: Role of Amyloid Precursor Protein and Presenilin1 Intracellular Signaling. **Journal of Toxicology**, Nasr, v.2012, Artigo ID 187297, p.13, 2012.

OLIVEIRA, M. J. R.; SIMÕES, M. J. S.; SASSI, C. R. R. Fitoterapia no Sistema de Saúde Pública (SUS) no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 2, p. 39-41, Jun. 2006.

ORHAN, G.; ORHAN, I.; SENER, B. Recent developments in natural and synthetic drug research for Alzheimer's disease. **Letters in Drug Design & Discovery**, Cambridge, v. 3, n. 4, p. 268-274, May 2006.

PALLAS, M.; CAMINS, A. Molecular and biochemical features in Alzheimer's disease. **Current Pharmaceutical Design**, Schiphol, v. 12, n. 33, p. 4389-4408, Nov. 2006.

PATEL, R.P.; PATEL, M.P.; SUTHAR, A.M. Spray drying technology: an overview. **Indian Journal of Science and Technology**, Adyar, v. 2, n. 10, p. 44-47, Oct. 2009.

PELIZER, L.H.; PONTIERI, M.H.; MORAES, I.O. Utilização de Resíduos Agroindustriais em Processos Biotecnológicos como Perspectiva de Redução do Impacto Ambiental. **Journal of Technology Management e Innovation**, Santiago, v. 2, n. 1, p. 118-127, Mar. 2007.

PEREIRA, D. M.; FERRERES, F.; OLIVEIRA, J. M. A.; GASPAR, L.; FARIA, J.; VALENTÃO, P.; SOTTOMAYOR, M.; ANDRADE, P. B. Pharmacological effects of Catharanthus roseus root alkaloids in acetylcholinesterase inhibition and cholinergic neurotransmission. **Phytomedicine**, Oxford, v. 17, n. 8-9, p. 646-652, Jul. 2010.

PEREIRA, M.C.; STEFFENS, R.S.; JABLONSKI, A.; HERTZ, P.F.; RIOS, A. DE O.; VIZZOTTO, M.; FLÔRES, S. H. Characterization and Antioxidant Potential of Brazilian Fruits from the Myrtaceae Family. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 60, n. 12, p. 3061-3067, Mar. 2012.

PIZZI, A. Natural phenolic adhesives I: tannin. In: PIZZI, A.; MITTAL, K.L. **Handbook of adhesive technology**. New York: Marcel Dekker, 1994. p. 467-479.

POHANKA, M.; HRABINOVA, M.; KUCA, K.; SIMONATO, J.P. Assessment of Acetylcholinesterase Activity Using Indoxylacetate and Comparison with the Standard Ellman's Method. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 12, n. 4, p. 2631-2640, Apr. 2011.

POLIDORI, M.C. Antioxidant micronutrients in the prevention of age-related diseases. **Journal of Postgraduate Medicine**, Mumbai, v. 49, n. 3, p. 229-235, Jul/Sep 2003.

POPE, S.K.; SHUE, V.M.; BECK, C. Will a healthy lifestyle help prevent Alzheimer's disease? **Annual Review Public Health**, Palo Alto, v. 24, p. 111-132, Nov. 2003.

PRICE, M.L.; HAGERMAN, A.E.; BUTLER, L.G. Tannin content of cowpeas, chickpeas, pigeonpeas and mung beans. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Easton, v.28, n.2, p.459-461, 1980.

PRVULOVIC, D.; HAMPEL, H.; PANTEL, J. Galantamine for Alzheimer's disease. **Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology**, Kansas, v. 6, n. 3, p. 345-354, Mar. 2010.

QU, W.; BREKSA, A. P.; PAN, Z.; MA, H.; MCHUGH, T. H. Storage Stability of Sterilized Liquid Extracts from Pomegranate Peel. **Journal of Food Science**, Malden, v. 77, n. 7, p. 765-772, Jul. 2012.

QU, W.J.; PAN, Z.L.; ZHANG, R.H.; MA, H.L.; CHEN, X.G.; ZHU, B.N.; WANG, Z.B.; ATUNGULU, G.G. Integrated extraction and anaerobic digestion process for recovery of nutraceuticals and biogas from pomegranate marc. **Transactions of the ASABE**, Saint Joseph, v. 52, n. 6, p. 1997–2006, Dec. 2010.

QUIK, M.; JEYARASASINGAM, G. Nicotinic receptors and Parkinson's disease. **European Journal of Pharmacology**, Utrecht, v. 393, n. 1-3, p. 223-230, Mar. 2000.

RABABAH, T.M.; BANAT, F.; RABABAH, A.; EREIFEJ, K.; YANG, W. Optimization of Extraction Conditions of Total Phenolics, Antioxidant Activities, and Anthocyanin of Oregano, Thyme, Terebinth, and Pomegranate. **Journal of Food Science**, Malden, v. 75, n. 7, p. 626-632, Sept. 2010.

RACCHI, M., MAZZUCHELLI, M., PORRELLO, E., LANNI, C.X., GOVONI S. Acetylcholinesterase inhibitor: novel activities of old molecules. **Pharmacological Research**, Madrid, v. 50, n. 4, p. 441-451, Oct. 2004

RAUTER, A.P.; DIAS, C.; MARTINS, A.; BRANCO, I.; NENG, N.R.; NOGUEIRA, J. M.; GOULART, M.; SILVA, F.V.M.; JUSTINO, J.; TREVITT, C.; WALTHO, J.P. Non-toxic *Salvia sclareoides* Brot. extracts as a source of functional food ingredients: Phenolic profile, antioxidant activity and prion binding properties. **Food Chemistry**, Barking, v. 132, n. 4, p. 1930–1935, Jun. 2012.

REICHMAN, W.E. Current pharmacologic options for patients with Alzheimer's disease. **Annals of General Hospital Psychiatry**, London, v. 2, n. 1, p. 1-14, Jan. 2003.

ROBERT, P.; GORENA, T.; ROMERO, N.; SEPULVEDA, E.; CHAVEZ, J. Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.45, n.7, p. 1386–1394, Jun. 2010.

ROCHA, G. A.; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Microencapsulation of lycopene by spray drying: Characterization, stability and application of microcapsules. **Food and Bioproducts Process**, London, v. 90, n. 1, p. 37-42, Jan. 2012.

SALGADO, J. M.; FERREIRA, T. R. B.; BIAZOTTO, F. O.; DIAS, C. T. S. Increased Antioxidant Content in Juice Enriched with Dried Extract of Pomegranate (*Punica granatum*) Peel. **Plants Food for Human Nutrition**, New York, v.67, n. 1, p. 39-43, Mar. 2012.

SAS INSTITUTE. **SAS/Stat 9.1.3 Service Pack 2**. Cary, 2003. 1 DVD-ROM.

SCHREINER, F.; RETZLAFF, G.; SIQUEIRA, M.F.R.; REZENDE, E.C.; SIMÃO, L.C.; KOZLOWSKI-JUNIOR, V.A.; SANTOS, E.B. Uso do chá de punica granatum (romã) no controle da aderência de bactérias orais em ligaduras ortodônticas. **Robrac**, Goiânia, v. 18, n. 45, p. 56-61, Jan. 2009.

SHARIFIFAR, F.; MOSHAFFI, M. H.; SHAFAZAND, E.; KOOHPAYEH, A. Acetyl cholinesterase inhibitory, antioxidant and cytotoxic activity of three dietary medicinal plants. **Food Chemistry**, Barking, v.130, n.1, p. 20-23, Jan. 2012.

SELKOE, D. J. Cell biology of protein misfolding: The examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Nature Cell Biology**, London, v. 6, n.11, p. 1054-1061, Nov. 2004.

SELKOE, D.J.; SCHENK, D. Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid based therapeutics. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v.43, n.1, p. 545-584, Jan. 2003.

SHEMA-DIDI, L.; SELA, S.; ORE, L.; SHAPIRO, G.; GERON, R.; MOSHE, G.; KRISTAL, B. One year of pomegranate juice intake decreases oxidative stress, inflammation, and incidence of infections in hemodialysis patients: A randomized placebo-controlled trial. **Free Radical Biology and Medicine**, Los Angeles, v. 53, n. 2, p. 297-304, Jul. 2012.

SHIH, P.H.; CHAN, Y.C.; LIAO, J.W.; WANG, M.F.; YEN, G.C. Antioxidant and cognitive promotion effects of anthocyanin-rich mulberry (*Morus atropurpurea* L.) on senescence-accelerated mice and prevention of Alzheimer's disease. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Lexington, v. 21, n. 7, p. 598-605, Jul. 2010.

SILBERBERG, M.; MORAND, C.; MATHEVON, T.; BESSON, C.; MANACH, C.; SCALBERT, A.; REMESY, C. The bioavailability of polyphenols is highly governed by capacity of the intestine and of the liver to secrete conjugated metabolites. **European Journal of Nutrition**, Heidelberg, v. 45, n. 2, p. 88-96, Mar. 2006.

SMITH, M.A.; SAYRE, L.M.; MONNIER, V.M.; PERRY, G. Radical ageing in Alzheimer's disease. **Trends Neuroscience**, New York, v. 18, n. 4, p. 172-176, Apr. 1995.

SOUCHAY, C. Metamemory in Alzheimer's disease. **Cortex**, New York, v. 43, n. 7, p. 987-1003, Oct. 2007.

STAFSTROM, C.E.; RHO, J.M. The ketogenic diet as a treatment paradigm for diverse neurological disorders. **Frontiers in Pharmacology**, Kansas, v. 3, n. 59, p. 1-8, Apr. 2012.

STOCKHAMMER, S.; STOLZE, K.; ROHR-UDILOVA, N.; CHIZZOLA, R.; ZITTERLEGLSEER, K.; FRANZ, C. Antioxidant activity of phytoenous industrial waste and derived extracts for the production of feed and food additives. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 44, n. 4, p. 702-710, Apr. 2009.

SWAIN, T.; HILLIS, W.T. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 10, n. 1, p. 63-68, Jan. 1959.

THIES, C. **How to make microcapsules**. St Louis, Missouri: Lecture and Laboratory, 1995.

TONON, R.V.; BRABET, C.; HUBINGER, M.D. Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. **Journal of Food Engineering**, Davis, v. 88, n. 3, p. 411-418, Oct. 2008.

TOTA, S.; AWASTHI, H.; KAMAT, P. K.; NATH, C.; HANIF, K. Protective effect of quercetin against intracerebral streptozotocin induced reduction in cerebral blood flow and impairment of memory in mice. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 209, n. 1, p. 73–79, May 2010.

TSAO, R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. **Nutrients**, Basel, v. 2, n. 12, p. 1231–1246, Dec. 2010.

VARDIN, H.; YASAR, M. Optimisation of pomegranate (*Punica Granatum* L.) juice spray-drying as affected by temperature and maltodextrin content. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 47, n. 1, p. 167–176, Oct. 2012.

VASANTHI, H.R.; SHRISHRIMAL, N.; DAS, D.K. Phytochemicals from plants to combat cardiovascular disease. **Current Medicinal Chemistry**, San Francisco, v. 19, n. 14, p. 2242–2251, May 2012.

VEHRING, R. Pharmaceutical particle engineering via spray drying. **Pharmaceutical Research**, Berlin, v. 25, n. 5, p. 999–1022, May 2008.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. DA S.; FURLAN, M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E.J. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de alzheimer. **Química nova**, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 655–660, July/Aug. 2004.

VIEGAS, C.; BOLZANI, V.D.; BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. New anti-Alzheimer drugs from biodiversity: The role of the natural acetylcholinesterase inhibitors. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, Kansas, v. 5, n.10, p. 915–926, Oct. 2005.

WHO - World Health Organization. 2012. **Dementia cases set to triple by 2050 but still largely ignored**. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2012/dementia_20120411/en/>. Acesso em: 01 set. 2012.

YOON, N. Y.; LEE, S. H.; YONG, L.; KIM, S. K. Phlorotannins from *Ishige okamurae* and their acetyl and butyrylcholinesterase inhibitory effects. **Journal of Functional Foods**, Saint John's, v. 1, n. 4, p. 331–335, Oct. 2009.

ZHANG, L.H.; LI, L.L.; LI, Y.X.; ZHANG, Y.H. In vitro antioxidant activities of fruits and leaves of pomegranate. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 765, n. 1, p. 31–34, Jan. 2008.