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

Efeito neuroprotetor da casca de romã (*Punica granatum*)

Maressa Caldeira Morzelle

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

**Piracicaba
2016**

Maressa Caldeira Morzelle
Engenheira de Alimentos

Efeito neuroprotetor da casca de romã (*Punica granatum*)

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

Co-orientadora:
Prof^ª Dr^ª **TÂNIA ARAÚJO VIEL**

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

**Piracicaba
2016**

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

Morzelle, Maressa Caldeira

Efeito neuroprotetor da casca de romã (*Punica granatum*) / Maressa Caldeira Morzelle. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.
124 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Alzheimer 2. BDNF 3. Acetilcolinesterase 4. Antioxidantes 5. Punicalagina
I. Título

CDD 664.80462
M893e

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

DEDICATÓRIA

À minha mãe Laura e a minha filha Helena, que me ensinaram o que é o amor eterno e incondicional

AGRADECIMENTOS

Tenho absoluta certeza que finalizo esta etapa com um crescimento profissional e pessoal imensurável. Foi uma longa caminhada repleta de flores, escadas e pedras. Preciso agradecer às pessoas e instituições que de alguma maneira contribuíram nesta etapa e com as quais preciso dividir esta conquista.

Inicialmente agradeço a Deus pelo dom da vida.

Agradeço a minha filha Helena. Você tornou meus dias coloridos, felizes e deu sentido a minha vida. Peço desculpa pela minha ausência, só eu sei o quanto doeu. Mas prefiro deixar a você o exemplo de construção e merecimento e não de desistência em meio as dificuldades.

Ao meu grande e fiel companheiro Thiago, só tenho a agradecer. Somos a comprovação de que duas pessoas nunca se encontram por acaso. Chegamos ao final, tenha certeza que esta conquista é sua e da Helena também! Obrigada por todo o apoio, carinho e cuidado comigo. Por ser pai e mãe por muitos dias e noites. E graças à nossa união, os obstáculos foram ultrapassados e as vitórias conquistadas.

Em seguida, e de igual importância, agradeço aos meus pais Josimar e Laura. Vocês são as pessoas mais inspiradoras que conheci. O final deste doutorado é o resultado das muitas vezes que vocês se doaram e renunciaram aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus. Só consegui graças ao amor, apoio e dedicação que vocês sempre tiveram por mim e agora também pela Helena. Ensinarão-me desde pequena a agir com respeito, simplicidade, dignidade, honestidade e amor ao próximo, e sem dúvida esses são meus maiores conhecimentos. Agradeço também a minha irmã Lareska pela amizade, carinho e companheirismo de sempre; por estar sempre torcendo pelas minhas conquistas. Pelo apoio e incentivo incondicional. Obrigado!

Agradeço a minha orientadora, Prof^a Dr^a. Jocelyne Mastrodi Salgado que durante todos estes anos de estágio, mestrado e doutorado apoiou as minhas decisões e me ensinou muito. Seus ensinamentos contribuíram para a pessoa que sou hoje. Sou grata pela oportunidade e pela amizade que construímos. Hoje vemos que todo o nosso esforço e dedicação valeu a pena!

Agradeço a minha co-orientadora Prof^a. Dr^a. Tânia Viel e o Prof. Dr. Hudson Buck. Vocês foram incríveis e sem o auxílio de vocês não chegaria até aqui. Tenham certeza que me ensinaram muito e parabéns pelo exemplo de pesquisadores que são.

Agradeço a Prof^a Dr^a. Solange Brazaca, ao Prof. Dr. Severino Matias de Alencar e a técnica Adna Prado da ESALQ/USP pelo auxílio nas análises químicas; a Prof^a Dr^a. Carmen Silvia Favaro Trindade e o seu aluno Volnei Brito da FZEA/USP pelo auxílio na microencapsulação; a Prof^a. Dr^a. Sui Miu Tsai por ter cedido o criostato e o microscópio e ao Prof. Dr. Alessandro de Oliveira Rios da UFRGS pelo apoio nas análises cromatográficas.

Agradeço aos professores da comissão julgadora que contribuíram com considerações enriquecedoras ao trabalho.

Não poderia deixar de agradecer aos membros do Grupo de Estudos em Alimentos Funcionais (GEAF) de 2010 até 2016: Patricia, Gizele, Fuvia, Antonio, Jéssica Aranha, Jéssica Scatolin, Zizi, Carlos, Marina, Tânia, Kélin, Grazi, Nádia. Adorei trabalhar com vocês! Fui muito feliz aqui todos estes anos e aprendi muito.... Em especial, agradeço à minha amiga Patrícia que me auxiliou em todo o desenvolvimento do projeto: seu auxílio foi essencial, sucesso sempre a você!

Preciso também agradecer aos alunos do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo que me auxiliaram e ensinaram nas etapas do experimento animal: Ticiane, Natália, Marielza, Marília, Ariadiny, Danilo e Milena. Tenho certeza de que ganhei além de companheiras profissionais, grandes amigas. Em especial, agradeço à Marília e à Bianca que me deram um lar acolhedor e divertido em São Paulo. Minha estadia em SP não poderia ter sido melhor!

Agradeço aos funcionários do LAN e do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos que me deram suporte para a realização deste trabalho. Em especial, agradeço à Vana, secretária do LAN III, que espantou o meu sono nas inúmeras tardes piracicabanas com seu café forte e uma boa conversa.

Agradeço às professoras e colaboradoras do Centro de Convivência Infantil (CCin) da ESALQ/USP, especialmente às professoras Adriana, Suely, Rogéria e Sandra. Quem dera todos os profissionais da educação tivessem o amor que vocês têm pelo que fazem.

Agradeço à FAPESP (Processo nº 2013/08989-1) pela bolsa concedida para a realização do projeto.

Por fim, agradeço a todos os meus amigos e familiares que entenderam a minha ausência durante este período e ainda assim me incentivaram.

**“A mente que se abre a uma nova informação jamais volta
ao seu tamanho original”**
Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 DESENVOLVIMENTO	19
2.1 Revisão Bibliográfica	19
2.1.1 Dinâmica populacional mundial	19
2.1.2 Doença de Alzheimer	20
2.1.3 Proteína β -amiloide	23
2.1.4 Alterações comportamentais	26
2.1.5 Sistema colinérgico	27
2.1.6 Neuroinflamação	31
2.1.7 Estresse oxidativo	33
2.1.8 Antioxidantes	34
2.1.9 Romã	36
2.1.11 Compostos bioativos na casca da romã	42
2.2 Materiais e métodos	43
2.2.1 Aquisição de matéria prima	43
2.2.2 Separação da polpa e casca	43
2.2.3 Relação polpa e casca	44
2.2.4 Produção dos extratos	44
2.2.5 Quantificação de compostos fenólicos totais	45
2.2.6 Quantificação de flavonoides totais	45
2.2.7 Perfil de compostos não voláteis	46
2.2.8 Quantificação de punicalagina	47
2.2.9 Determinação do conteúdo e perfil de compostos fenólicos	47
2.2.10 Determinação do conteúdo e perfil de antocianinas	48
2.2.11 Limite de quantificação e detecção	49
2.2.12 <i>Screening</i> da Atividade antioxidante	49
2.2.13 <i>On line</i> HPLC–DAD–ABTS	50
2.2.14 Inibição da acetilcolinesterase	52
2.2.15 Obtenção das micropartículas	53
2.2.16 Experimento animal	53

2.2.16.1	Aquisição dos animais.....	54
2.2.16.2	Delineamento experimental.....	54
2.2.16.3	Infusão de β A	55
2.2.16.4	Tratamento	55
2.2.16.5	Consumo de água	56
2.2.16.6	Atividade motora.....	56
2.2.16.7	Teste comportamental	56
2.2.16.8	Preparo de material biológico	57
2.2.16.9	Obtenção dos cortes histológicos	58
2.2.16.10	Avaliação da densidade de placas amiloides.....	59
2.2.16.11	Quantificação de proteínas	59
2.2.16.12	Quantificação de fator neurotrófico derivado do cérebro.....	59
2.2.16.13	Avaliação da atividade da acetilcolinesterase	60
2.2.16.14	Peroxidação lipídica	60
2.2.16.15	Quantificação de SOD	61
2.2.16.16	Quantificação de TNF- α	62
2.2.16.17	Quantificação dos índices de lesão hepática.....	63
2.2.17	Análise estatística	63
2.3	Resultados e Discussão.....	64
2.3.1	Relação polpa e casca	64
2.3.2	Quantificação de compostos fenólicos totais.....	64
2.3.3	Quantificação de flavonoides totais.....	66
2.3.4	Perfil de compostos não voláteis	66
2.3.5	Quantificação de punicalagina.....	70
2.3.6	Determinação de conteúdo e perfil de compostos fenólicos.....	71
2.3.7	Determinação do conteúdo e perfil de antocianinas	72
2.3.8	<i>Screening</i> da Atividade antioxidante	72
2.3.9	<i>On line</i> HPLC-DAD-ABTS.....	75
2.3.10	Inibição de acetilcolinesterase	80
2.3.11	Experimento animal.....	82
2.3.11.1	Observações gerais.....	82
2.3.11.2	Atividade Motora	82
2.3.11.3	Teste comportamental	84
2.3.11.4	Avaliação da densidade de placas amiloides.....	87

2.3.11.5	Padronização dos experimentos de ELISA	89
2.3.11.6	Quantificação do fator neurotrófico derivado do cérebro	89
2.3.11.7	Avaliação da atividade da acetilcolinesterase	91
2.3.11.8	Peroxidação lipídica	93
2.3.11.9	Quantificação de Superóxido Dismutase	95
2.3.11.10	Quantificação de TNF- α	97
2.3.11.11	Quantificação dos índices de lesão hepática.....	98
3	CONCLUSÃO	101
	REFERENCIAS	103

RESUMO

Efeito neuroprotetor da casca de romã (*Punica granatum*)

A doença de Alzheimer é uma afecção crônica degenerativa que não possui tratamento até o momento. O uso de alimentos funcionais como a romã na prevenção e/ou tratamento de doenças neurodegenerativas têm sido amplamente pesquisados. Diante disto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a quantidade de compostos bioativos (antocianinas, compostos fenólicos e flavonoides), atividade anticolinesterásica e a capacidade antioxidante *in vitro* e *on line* dos extratos de polpa e casca de romã e posteriormente estudar o possível efeito neuroprotetor de micropartículas obtidas a partir do extrato da casca de romã em um animal submetido a infusão crônica de peptídeo β -amilóide. O extrato de casca de romã apresentou maior teor de antocianinas, compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante *in vitro* e *on line* do que o extrato da polpa. Na análise de compostos não voláteis pela técnica de GC-MS foram identificados 38 compostos no extrato da casca e 37 da polpa de romã, sendo o ácido gálico a principal substância detectada. Foram encontrados no total 13 compostos no extrato de casca e 8 no extrato de polpa de romã que apresentaram atividade antioxidante pelo método HPLC-ABTS *on line*. A punicalagina, epicatequina e ácido gálico foram os compostos determinantes para a atividade antioxidante em ambos os extratos. O extrato da casca de romã apresentou atividade anticolinesterásica superior ao da polpa. Estes resultados, em conjunto, indicaram um possível potencial da casca de romã como um agente neuroprotetor na doença de Alzheimer. Para estudar o possível efeito neuroprotetor do extrato da casca de romã foram utilizados camundongos C57BL/6 cronicamente infundidos com peptídeo βA_{1-42} e/ou veículo através de mini-bombas osmóticas durante 35 dias e foram avaliados biomarcadores e alterações comportamentais. Micropartículas de extrato de casca de romã, produzidas em *spray dryer*, foram diluídas em água e administradas na dose de 800 mg de casca de romã/kg de animal/dia. A memória espacial foi avaliada em labirinto de Barnes e uma redução no número de erros para encontrar a caixa de escape foi verificada nos animais tratados com micropartículas de casca de romã e nos animais do grupo controle, mas não nos animais do grupo βA . A atividade da acetilcolinesterase, neurotrofina BDNF, TNF- α e a enzima SOD foram avaliadas no hipocampo, córtex e soro dos animais. A peroxidação lipídica foi avaliada no fígado dos animais. Como a casca de romã não é comumente consumida foram dosados marcadores de dano isquêmico hepático. O consumo de micropartículas de casca de romã promoveu uma redução do acúmulo de placas amiloides, aumento da expressão de neurotrofinas, redução da atividade da enzima acetilcolinesterase, redução da peroxidação lipídica e da citocina pró-inflamatória TNF- α em animais infundidos com peptídeo β -amilóide. O consumo das microcápsulas de casca de romã não acarretou nenhum tipo de lesão hepática. No geral, verificou-se que os compostos presentes na casca de romã podem apresentar um efeito neuroprotetor em animais submetidos a infusão crônica de peptídeo β -amilóide.

Palavras-chave: Alzheimer; BDNF; Acetilcolinesterase; Antioxidantes; Punicalagina

ABSTRACT

Neuroprotective effect of Pomegranate (*Punica granatum*) peel

Alzheimer's disease is a chronic and degenerative condition that have no treatment until now. The research of functional foods such as pomegranate for the prevention and/or treatment of many conditions, including neurodegenerative diseases, is increasing year after year. The amount of bioactive compounds (anthocyanins, phenolic compounds and flavonoids), acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity *in vitro* and *on line* of pomegranate peel and pulp extracts were evaluated. Pomegranate peel extract has higher content of anthocyanins, phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity *in vitro* and *on line* than pulp. The analyses of the profile of non-volatile compounds identified 38 compounds in the peel and 37 in the pulp. The gallic acid was main compound detected. Pomegranate peel showed 13 compounds with antioxidant activity by the HPLC-ABTS method *online* and pulp showed eight compounds. Punicalagin, Gallic acid and epicatechin were determinants for the antioxidant capacity of the aqueous-alcoholic extract of pomegranate. Pomegranate peel extract had greater anticholinesterase activity than pulp. These results together indicated a possible potential of pomegranate peel as a neuroprotective agent in Alzheimer's disease. This research had as objective to study the possible neuroprotective effect of pomegranate peel on an animal model of the Alzheimer's disease. For that purpose, mice model of Alzheimer's disease were used and biomarkers and behavioral changes were evaluated. C57BL/6 mice were chronically infused with βA_{1-42} peptide and/or vehicle by mini - osmotic pumps during 35 days. Microparticles of pomegranate peel extract, produced by spray drying, were diluted in water and administered at a dose of 800 mg of pomegranate peel/ kg animal/day. The spatial memory was evaluated in the Barnes maze and a reduction of the errors to find the scape box was verified in animals treated with the PPE, as observed in the Control group, but not in th $A\beta$ group. The activity of acetylcholinesterase, neurotrophin BDNF, TNF- α and SOD were measured in the hippocampus, cortex and serum. Lipid peroxidation was evaluated in the liver. As the pomegranate peel is not commonly consumed, biomarkers of liver ischemic damage were measured. Pomegranate peel consumption promoted a reduction of amyloid plaques, increasing neurotrophin expression, reduction in a AChE activity, reduced lipid peroxidation and reduced TNF- α in animal models of Alzheimer's disease. The consumption of pomegranate peel did not cause liver injury. In general, pomegranate peel showed a neuroprotective effect on animal models of the Alzheimer's disease.

Keywords: Alzheimer; BDNF; Acetylcholinesterase; Antioxidants; Punicalagin

1 INTRODUÇÃO

A crescente longevidade da população mundial teve como consequência uma maior incidência de doenças neurodegenerativas, dentre as quais se destaca a doença de Alzheimer (DA). Estratégias terapêuticas para a redução dos sintomas indesejáveis causados por esta doença têm sido amplamente pesquisadas. Evidências epidemiológicas apontam uma forte relação inversa entre o consumo regular de frutas e hortaliças e a incidência destas enfermidades (FROZZA et al., 2013; MAGRONE et al., 2012), ação essa proporcionada pelos compostos biologicamente ativos presentes nestes alimentos.

Dentre os alimentos fontes de compostos bioativos, pode-se destacar a romã (*Punica granatum*), uma das frutas mais tradicionalmente consumidas, no entanto, o seu interesse tem aumentado gradativamente nos últimos anos devido aos benefícios à saúde humana, conforme a literatura. Estas propriedades biológicas têm sido atribuídas principalmente aos compostos fenólicos presentes neste alimento. Normalmente, é consumida na forma *in natura*, e, dessa forma, toda a casca é descartada como resíduo. A casca da romã corresponde a cerca de 50% do peso total da fruta, e é uma importante fonte de compostos bioativos como ácido elágico e seus derivados e elagitaninos como punicalina e punicalagina (GULLON et al., 2016).

As pesquisas têm demonstrado o papel significativo da polpa de romã como um neuroprotetor na DA (HARTMAN et al., 2006; CHOI et al., 2011; ROJANATHAMMANEE et al., 2013; SUBASH et al., 2015). Os compostos fenólicos presentes nesta polpa, especialmente punicalagina (ROJANATHAMMANEE et al., 2013), seriam os responsáveis por este efeito neuroprotetor. No entanto, em estudos preliminares detectou-se que a casca da romã apresenta uma maior concentração destes compostos ativos em relação à semente e polpa. A casca de romã apresentou uma concentração de 242,9 mg de compostos fenólicos expresso em mg de quercetina por g de casca enquanto que a polpa apresentou apenas 26 mg quercetina por g de polpa. Além disso, a casca apresentou atividade antioxidante 85 vezes superior à sua polpa, mesmo quando mensurada por diferentes métodos de análise de atividade antioxidante, o que evidencia seu potencial de exploração como fonte de compostos antioxidantes (SALGADO et al., 2012). Em estudo mais recente a casca de romã apresentou um potencial anticolinesterásico de forma dose-dependente com valor de IC₅₀ de 2,48 mg (MORZELLE, 2013).

Apesar da crescente ênfase sobre o potencial de antioxidantes provenientes da dieta na prevenção da perda de memória e como agentes preventivos em doença neurodegenerativas, estudos que investigam os efeitos cognitivos de alimentos e/ou seus componentes são raros

(BOOKHEIMER et al., 2013). Conforme descrito anteriormente, embora não existam maneiras comprovadas de se retardar o início ou proporcionar uma progressão lenta da DA, estudos sugerem que a dieta pode afetar o risco ou reduzir os sintomas indesejáveis da doença e a romã se destaca como um alimento a ser explorado para este fim. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o possível efeito de extratos e micropartículas obtidas a partir da casca de romã como um agente anticolinesterásico, anti-inflamatório e antioxidante que atue na proteção e/ou redução dos sintomas da DA, bem como quantificar os principais compostos bioativos que contribuem para esta atividade.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Dinâmica populacional mundial

O prolongamento da vida, uma aspiração mundial, só pode ser considerado uma conquista efetiva quando se agrega qualidade aos anos adicionais de vida. Os dados atuais mostram que as populações de todo o mundo, até dos países mais pobres, estão envelhecendo (WORLD POPULATION AGEING, 2013). Envelhecer não é mais privilégio de poucos, mesmo diante da distribuição não equitativa da melhora substancial dos parâmetros de saúde nos diferentes países e contextos socioeconômicos (VERAS, 2009).

A diminuição da mortalidade e a fertilidade em declínio conduzem a uma redução relativa na proporção de crianças e um aumento da porcentagem de pessoas idosas na população. A quota mundial de pessoas idosas (com 60 anos ou mais) aumentou de 9,2% em 1990 para 11,7% em 2013 e vai continuar a crescer, possivelmente atingindo 21,1%, em 2050 (WORLD POPULATION AGEING, 2013).

O Brasil apresentava até a década de 1950 e 1960 características demográficas que o classificava como um país de população jovem (KALACHE; VERAS; RAMOS, 1987). No entanto, esta dinâmica se alterou nos últimos anos. Dados atuais mostram que o número de pessoas idosas supera o número de nascimentos conforme pode ser observado na Figura 1.

Figura 1 - Proporção de crianças, jovens-adultos e idosos em relação ao total da população brasileira de 1940 a 2050. Aumento gradativo da participação da população de 60 anos ou mais em relação à população abaixo de 60 anos, demonstrando maior número de idosos na população total. Fonte: IBGE, 2008

Conforme apresentado na Figura 1, a população brasileira com mais de 60 anos cresceu significativamente nos últimos anos e as estimativas indicam que este grupo tende a crescer ainda mais.

É possível notar que o grupo etário de 60 anos ou mais pode duplicar em termos absolutos no período de 2000 a 2030, ao passar de 8,1 para 18,7 milhões de pessoas. De acordo com as projeções, em 2030, o número de idosos já irá superar o de crianças, e em 2050, os idosos corresponderão a 29,8% da população.

Atualmente, o grupo de idosos ocupa um espaço significativo na sociedade brasileira. O envelhecimento populacional torna a saúde dos idosos o foco de atenção, uma vez que o aumento da expectativa de vida está intimamente relacionado a uma maior incidência de doenças crônicas não transmissíveis, especialmente as doenças neurodegenerativas. As estimativas são alarmantes e mostram que apenas 22,6% das pessoas com 60 anos ou mais declararam não possuir doenças. Para aqueles de 75 anos ou mais, esta proporção cai para 19,7% (IBGE, 2010).

Uma vez que envelhecer é inevitável, o foco principal dos pesquisadores é que a população passe a viver por mais tempo e com uma melhor qualidade de vida. Estratégias terapêuticas, as quais incluem o consumo de alimentos funcionais associado à prática de atividade física de forma regular, tem sido estudadas com o intuito de garantir uma maior expectativa de vida sem comprometimento da saúde, tanto física quanto mental.

2.1.2 Doença de Alzheimer

O crescente envelhecimento da população, verificado nestas últimas décadas, tem como consequência uma maior incidência de doenças neurodegenerativas (MARKESBERRY, 1997).

A demência é uma das principais causas de morbidade em idosos, sendo que o número de casos, tanto em termos de incidência quanto de prevalência, apresenta-se diretamente proporcional ao aumento do número de idosos (CHARCHAT-FICHMAN et al., 2005). O quadro de demência se caracteriza pelo declínio progressivo e global das funções cognitivas o que compromete a realização de atividades sociais e ocupacionais do indivíduo. O diagnóstico é difícil, pois exige a constatação de deterioração ou declínio cognitivo em relação à condição prévia do indivíduo (COREY-BLOOM et al., 1995).

Em todo o mundo, cerca de 35,6 milhões de pessoas apresentam algum tipo de demência. Este número deverá dobrar até 2030 (65,7 milhões) e mais que triplicar em 2050

(115,4 milhões), caso não ocorram modificações na mortalidade ou estratégias terapêuticas de prevenção e/ou redução de risco. 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 gera um custo mundial em torno de 604 bilhões de dólares, por ano. Isso inclui o valor da prestação de cuidados de saúde e social, bem como a redução ou perda de renda de pessoas com demência e seus cuidadores (WHO, 2012). Os números relacionados à demência demonstram sua expressiva importância, o que a torna um dos grandes desafios atuais na saúde pública.

Dentre as causas de demência, a DA é a mais comum e, possivelmente, contribui para até 70% dos casos (WHO, 2012). Há mais de um século, em 1906, 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, com perda de memória progressiva, alucinações e delírios. Alzheimer enfatizou sobre a incapacidade da paciente em compreender a sua situação e definiu 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 onde foram identificadas 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 (DA), em homenagem ao seu descobridor (SOUCHAY, 2007).

Desde então, a incidência da doença alcançou números alarmantes constituindo um grave problema de saúde pública. Entre 2000 e 2010, a proporção de mortes resultantes de doenças cardiovasculares e câncer de próstata diminuiu 14% e 11% respectivamente, enquanto as mortes causadas pela DA aumentaram 71%, conforme pode ser observado na Figura 2 (ALZHEIMER ASSOCIATION, 2015).

Figura 2 - Causas de morte em todas as idades entre 2000 e 2013. A proporção de mortes resultantes da doença de Alzheimer sobressai as mortes relacionadas a doenças cardiovasculares e câncer de próstata. Fonte: ALZHEIMER ASSOCIATION, 2015

Atualmente, a cada 67 segundos uma pessoa é diagnosticada com a DA em algum lugar no mundo. As estimativas indicam que em 2050, um novo caso da doença irá ser diagnosticado a cada 33 segundos, gerando aproximadamente 1 milhão de novos casos por ano, com a prevalência estimada em 13,8 milhões de pessoas (ALZHEIMER ASSOCIATION, 2015).

Um relatório apresentado pela Alzheimer Association (2015) descreve que uma em cada nove pessoas com 65 anos ou mais (11% da população) tem a DA, sendo que a prevalência é maior em mulheres. Estima-se que 5,3 milhões de americanos de todas as idades foram diagnosticados com a DA em 2015. Esse número inclui uma estimativa de 5,1 milhões de pessoas com 65 anos ou mais e cerca de 200.000 indivíduos menores de 65 anos.

Os dados sobre a incidência desta doença no Brasil são escassos e limitados a pequenas áreas do país. Herrera et al. (2002) avaliaram a prevalência de demência em idosos na cidade de Catanduva-SP, Brasil. Um total de 1.656 indivíduos com 65 anos ou mais foram selecionados aleatoriamente e submetidos a um questionário de saúde, o *Mini Mental State Examination* (MMSE) e o *Pfeffer Functional Activities Questionnaire* (PFAQ). De acordo com a pontuação no PFAQ e MMSE, os indivíduos foram selecionados e submetidos à avaliação clínica, neurológica e avaliações cognitivas. Os resultados mostraram que a demência foi diagnosticada em 118 indivíduos, o que corresponde a uma prevalência de 7,1%,

sendo que o principal diagnóstico clínico foi a DA (55,1%). Adicionalmente, constatou-se que idade, sexo feminino e reduzido nível educacional foram significativamente associados com uma maior prevalência de demência.

A DA é uma desordem cerebral insidiosa, progressiva e irreversível. É uma doença de origem multifatorial, no entanto, a idade é seu principal fator de risco, sendo que a incidência dobra a cada 5 anos após os 65 anos de idade (QIAN et al., 2015).

Sintomas iniciais da doença incluem dificuldade para lembrar conversas recentes, nomes ou eventos, apatia e depressão. Posteriormente, o paciente apresenta uma comunicação prejudicada, desorientação, confusão, falta de bom senso, mudanças de comportamento e, por fim, dificuldade para falar, engolir e caminhar (ALZHEIMER ASSOCIATION, 2015).

2.1.3 Proteína β -amiloide

As anormalidades neurológicas mais comuns do encéfalo na DA são: placas senis originadas dos depósitos do peptídeo β -amiloide (β A) e presentes na parte externa dos neurônios e os emaranhados neurofibrilares compostos pela proteína *tau* (τ) hiperfosforilada que podem ocorrer no interior das células neuronais ou em segmentos axonais e dendríticos (SERRANO-POZO et al., 2011). Estas alterações podem ser observadas na Figura 3.

Figura 3 - Alterações morfológicas características da Doença de Alzheimer: Placas senis constituídas por depósitos extracelulares do peptídeo β A e emaranhados neurofibrilares constituídos por agregados intracelulares compostos pela forma hiperfosforilada da proteína *tau*. Escala 100 μ m. Fonte: Haass e Selkoe, (2007)

Os depósitos de agregados de proteínas, denominados placas senis ou amiloides, foram descritos por Alois Alzheimer em seu relatório como resultado da acumulação extracelular anormal e deposição do peptídeo β A em regiões relacionadas com o aprendizado e a memória (SERRANO-POZO et al., 2011; KIM; LEE; LEE, 2010).

No cérebro saudável, esses fragmentos de proteínas são quebrados e eliminados. Entretanto, em cérebros de pacientes da DA, esses fragmentos se acumulam formando placas duras e insolúveis. O acúmulo do βA parece ser o gatilho para todo processo neurodegenerativo (KIM; LEE; LEE, 2010).

O peptídeo βA é constituído por 40 ou 42 aminoácidos e deriva da quebra de uma proteína denominada proteína precursora de amiloide (APP, do inglês: Amyloid Precursor Protein) (KIM; LEE; LEE, 2010). O peptídeo βA_{1-42} forma núcleos de fibrilas amiloides mais rapidamente que o βA_{1-40} e os resultados de estudos bioquímicos indicam que o βA_{1-42} seja o componente-chave na formação das placas (KANDEL et al., 2014).

A APP é uma glicoproteína amplamente difundida na superfície celular de neurônios e glia. Sua clivagem e processamento podem ocorrer em duas vias: amiloidogênica e não-amiloidogênica conforme pode ser observado na Figura 4.

Figura 4 - Vias de clivagem e processamento da Proteína Precursora de Amiloide (APP) e origem do β -amiloide (βA). Na via não amiloidogênica ocorre a clivagem sequencial pela α -secretase e γ -secretase levando à liberação da $sAPP\alpha$. Na via amiloidogênica ocorre a formação do peptídeo βA pela clivagem da APP pelas β -secretase e γ -secretase. Fonte: modificado de Querfurth; LaFerla (2010)

O processamento amiloidogênico é o processo proteolítico anormal e ocorre pela ação das proteases β -secretase (BACE-1) e γ -secretase. Nesta via ocorre a produção do peptídeo β -amiloide solúvel com fragmentos amiloides de 38 a 43 aminoácidos que tendem a se aglomerar formando as placas senis características no cérebro de pacientes da DA (QUERFURTH; LAFERLA, 2010).

Conforme já descrito anteriormente e apresentado na Figura 4, o processamento amiloidogênico que ocorre através das enzimas β -secretase (BACE-1) e γ -secretase, gera o peptídeo β A enquanto o processamento não amiloidogênico mediado pelas enzimas α -secretase e γ -secretase, não produz tal peptídeo (QUERFURTH; LAFERLA, 2010).

Inicialmente, os peptídeos β A se aglomeram para formar sequencialmente dímeros, trímeros e, posteriormente, oligômeros. Os oligômeros se aglomeram para formar as fibrilas, que posteriormente se agregam dando origem às placas senis conforme pode ser observado na Figura 5 (HAAS et al., 1992; HERZ; BEFFERT, 2000).

Figura 5 - Processamento de APP e acumulação de placas senis. Reações de agregação do peptídeo β A que levam a formação de oligômeros e placas senis. Fonte: modificado de Gandy (2005)

O peptídeo β A no seu estado monomérico parece não apresentar efeito tóxico, no entanto, este mesmo composto quando presente no organismo na forma oligomérica possui um elevado potencial neurotóxico, sendo capaz de prejudicar a plasticidade sináptica, ao bloquear os potenciais de longa duração e consequentemente as vias de sinalização celular (GANDY, 2005). As fibrilas insolúveis que formam as placas são praticamente inativas, mas as placas senis possuem um papel na degeneração neuronal progressiva (HOPPE, 2013).

Desta forma, o β A tem sido considerado um dos principais responsáveis pelos processos de comprometimento sináptico, morte neuronal e redução do desempenho cognitivo dos pacientes com a DA (NASLUND et al., 2000; CREWS; MASLIAH, 2010).

2.1.4 Alterações comportamentais

A DA é amplamente conhecida pelo prejuízo cognitivo causado ao paciente, sendo o principal a perda gradual de memória. A Figura 6 demonstra uma representação esquemática das alterações no desempenho cognitivo com o envelhecimento.

Figura 6 - Alterações da função cognitiva com o avanço da idade, na presença ou não da Doença de Alzheimer. A doença de Alzheimer (AD) promove um comprometimento da cognição que tende a se agravar com o aumento do tempo de vida do paciente. Em menor proporção, a função cognitiva do idoso com comprometimento cognitivo leve (MCI) também é comprometida em relação ao envelhecimento na ausência destas doenças. Fonte: modificado de Kandel et al., (2014)

O declínio normal da memória com o envelhecimento não prejudica as capacidades cognitivas. Já a demência acarreta em uma perda acelerada e grave do desempenho cognitivo comprometendo a qualidade de vida do paciente (KANDEL et al., 2014).

Na DA ocorre uma notável deficiência seletiva na memória declarativa. Com o avançar da doença, a memória é perdida junto com capacidades cognitivas que incluem a capacidade de resolver problemas, linguagem, o cálculo e a percepção visuoespacial. Estas perdas podem levar a outras alterações comportamentais como sintomas psicóticos, como alucinações e delírios (KANDEL et al., 2014).

As anormalidades características da DA afetam regiões específicas do cérebro. As alterações no hipocampo e no córtex entorrinal provocam os problemas na memória declarativa que são os primeiros sintomas. Alterações no sistema colinérgico do prosencéfalo basal contribuem para as deficiências cognitivas e déficits de atenção (KANDEL et al., 2014).

Normalmente, os termos aprendizado, cognição e memória são usados como sinônimos. No entanto, o aprendizado pode ser definido como a mudança no comportamento

provocada pela aquisição de conhecimento acerca do mundo, enquanto a memória diz respeito ao processo pelo qual o conhecimento acerca do mundo é codificado, armazenado e posteriormente evocado (KANDEL et al., 2014). Por sua vez, a cognição é um termo amplo que envolve processos como memória, associação, linguagem, atenção, formação de conceitos e resolução de problemas (SHARMA et al., 2010).

As estruturas neurais envolvidas nos processos de memória incluem lobos temporais mediais (hipocampo, amígdala e córtex entorrinal), córtex pré-frontal, cerebelo, septo medial, entre outras (GAZZANIGA; HEATHERTON, 2005; IZQUIERDO, 2002; LENT, 2004; ALBUQUERQUE, 2013). É preciso ressaltar que as memórias não permanecem armazenadas em localizações específicas do cérebro e, sim, em várias regiões, conectadas por circuitos de memórias (GAZZANIGA; HEATHERTON, 2005).

No processamento da memória espacial e aprendizado as estruturas do cérebro envolvidas são o hipocampo, córtex temporal, tálamo e córtex parietal posterior (BACHEVALIER et al., 1999; ZOLA-MORGAN et al., 1989; ALEXINSKY, 2001). Estudos envolvendo macacos e ratos indicaram que lesões ou alterações relacionadas à idade no hipocampo causam um comprometimento do aprendizado e da memória espacial (SHARMA et al., 2010). Sabe-se, portanto, que o hipocampo, uma das áreas mais afetadas na DA, apresenta uma relação com a memória espacial e o aprendizado.

2.1.5 Sistema colinérgico

O cérebro de um adulto saudável apresenta cerca de 100 bilhões de neurônios, cada um com longas ramificações que os permitem formar conexões com outros neurônios. Nessas conexões, denominadas sinapses, os fluxos de informações fluem à medida que determinadas substâncias químicas conhecidas como neurotransmissores são liberados por um neurônio e detectadas pelo neurônio receptor. O cérebro possui cerca de 100 trilhões de sinapses, criando a base celular de memórias, pensamentos, sensações, emoções, movimentos e habilidades (ALZHEIMER ASSOCIATION, 2014). Neurotransmissores como acetilcolina (ACh), glutamato, ácido gama-aminobutírico (GABA), dopamina e serotonina são os responsáveis pela comunicação entre os neurônios e garantem os processos de aquisição, consolidação e evocação das informações. Diante do exposto, é notável que o sistema colinérgico apresente uma importante função na modulação dos processos de aprendizagem e memória (KANDEL et al., 2014).

Evidências científicas apontam que perturbações no sistema colinérgico e redução do nível de neurotransmissores, com destaque para a acetilcolina (ACh), são características do envelhecimento e da DA (WINKLER et al., 1998; MOHAPEL et al., 2005; BLOKLAND, 1995, GOLD, 2003). A acetilcolina (ACh) desempenha um papel crucial em processos fisiológicos como a aprendizagem e a memória. Essas evidências sustentam a “hipótese colinérgica” para a DA e justificam a utilização de anticolinesterásicos no tratamento desta desordem.

A acetilcolina é um neurotransmissor tipo amina de baixo peso molecular que não é um aminoácido (KANDEL et al., 2014). É sintetizada no corpo celular de neurônios através da ação catalítica da enzima colina acetiltransferase (ChAT, do inglês: choline acetyltransferase), que transfere o grupo acetil da molécula acetil-coenzima A à colina, recaptada nos terminais axonais conforme pode ser observado na Figura 7 (RANG et al., 2008; ALBUQUERQUE, 2013).

Figura 7 - Reação da biossíntese de acetilcolina. Fonte: Viegas Junior et al. (2004)

A ACh é liberada nas junções neuromusculares dos vertebrados por neurônios motores espinhais (KANDEL et al., 2014). É armazenada em vesículas e liberada em resposta ao influxo de cálcio extracelular. O cálcio ativa proteínas de tráfego, que por sua vez direcionam as vesículas para o terminal pré sináptico. Então, as vesículas se fundem à membrana, liberando ACh para a fenda sináptica (RANG et al., 2008; ALBUQUERQUE, 2013).

A atividade e permanência da ACh na fenda sináptica são reguladas por hidrólise catalisada pela enzima acetilcolinesterase (AChE). A Figura 8 ilustra o processo de encerramento da sinalização celular que ocorre com a metabolização da acetilcolina aos produtos inativos colina e acetato pela AChE localizada na fenda sináptica (KANDEL et al., 2014).

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).

Figura 8 - Metabolização da acetilcolina. O processo colinérgico finaliza com a degradação da acetilcolina (ACh) aos produtos inativos colina (Co) e acetato promovida pela acetilcolinesterase (AChE) localizada na fenda sináptica. O transportador de colina (CHT) transporta a colina de volta para o terminal sináptico. A colina-acetiltransferase (CoAT) catalisa a reação de acetilação da colina para novamente formar ACh. O transportador vesicular de acetilcolina (VACHT) transporta a acetilcolina para o interior da vesícula. Fonte: Kandel et al. (2014)

Níveis elevados de acetilcolinesterase têm sido encontrados em amostras de cérebro post-mortem de pessoas com DA (CHAIYANA; OKONOGI, 2012). Os avanços obtidos na compreensão da evolução e das razões moleculares da doença têm demonstrado que o uso de inibidores de AChE constituem a forma mais eficiente de redução da perda de memória na doença (QUIK; JEYARASASINGAM, 2000). Abordagens promissoras para o tratamento da DA visam, portanto, manter e/ou aumentar a concentração de acetilcolina no cérebro através do uso de inibidores da acetilcolinesterase (LEFEVRE et al., 2008).

Os anticolinesterásicos foram o primeiro grupo de agentes especificamente aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento da DA. 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 quatro medicamentos mais comercializados para o tratamento da DA três se baseiam na atividade anticolinesterásica. O surgimento destes anticolinesterásicos constituiu um fato marcante na doença. No entanto, algumas desvantagens devem ser

consideradas já que nenhum destes medicamentos pode cessar a doença, apresentam custo elevado além de poderem ocasionar efeitos colaterais indesejáveis, conforme observado na Tabela 1.

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

Genérico	Estágio	Efeitos colaterais	Classe
Donepezila	Todos os estágios	Náuseas, vômitos, perda de apetite e aumento dos movimentos do trato gastrointestinal.	Anticolinesterásico
Galantamina	Leve a moderada	Náuseas, vômitos, perda de apetite e aumento dos movimentos do trato gastrointestinal.	Anticolinesterásico
Rivastigmina	Leve a moderada	Náuseas, vômitos, perda de apetite e aumento dos movimentos do trato gastrointestinal.	Anticolinesterásico
Memantina	Moderada a severa	Dor de cabeça, constipação, confusão e tontura.	Antagonista do receptor de glutamato

Compostos naturais com potencial inibitório da enzima acetilcolinesterase se tornaram um suporte na redução dos sintomas da DA e tem despertado a atenção da comunidade científica (PRVULOVIC et al., 2010). A necessidade de novas substâncias que atuem para reduzir os sintomas da 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 - extremamente interessante para a saúde humana.

O impulso para a utilização de dietas a fim de tratar ou pelo menos atenuar os sintomas destas desordens deriva da intenção de utilização de um tratamento mais natural e consequentemente menos agressivo ao paciente (STAFSTROM; RHO, 2012). Neste contexto surgem os chamados alimentos funcionais. Estes alimentos apresentam em sua estrutura compostos biologicamente ativos que atuam reduzindo o risco ou os sintomas indesejáveis de inúmeras doenças crônicas não transmissíveis como a DA.

Nanasombat et al. (2015), baseados no atual interesse do consumidor por alimentos com atividades neuroprotetoras, estudaram o desenvolvimento de dez diferentes bebidas contendo alimentos com propriedades antioxidantes e anticolinesterásicas já bem conhecidas como a uva e algumas outras plantas como *Phyllanthus emblica*, *Terminalia chebula*, *Kaempferia parviflora*, *Centella asiatica*, *Nelumbo nucifera*, *Rauvolfia serpentina*, *Ginkgo*

biloba, *Crocus sativus*, *Clitoria ternatea*. As bebidas desenvolvidas eram ricas em compostos fenólicos, flavonoides e taninos e com elevada atividade antioxidante e anticolinesterásica. Possivelmente, seria uma possibilidade de inserção de alimentos capazes de contribuir com benefícios à saúde uma vez que quando consumidas regularmente poderiam possivelmente auxiliar na melhoria da função cognitiva e impedir a formação excessiva de espécies reativas de oxigênio.

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

Bekir et al., (2013) avaliaram o potencial anticolinesterásico de extratos obtidos a partir de folhas de *Punica granatum* com diferentes polaridades (hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol e metanol). Os resultados indicaram que os extratos de folha de romã apresentaram atividade anticolinesterásica, sendo que as maiores atividade de inibição de acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) foram obtidas para o extrato etanólico. As atividades biológicas encontradas são importantes e mostram que as folhas podem ser uma fonte potencial de moléculas ativas destinadas a aplicações na indústria farmacêutica.

É bem conhecido que estes agentes terapêuticos só podem aliviar os sintomas da DA, mas não são capazes de interromper sua progressão. A DA é de fato um transtorno complexo resultante de múltiplas anormalidades moleculares, e não de um defeito em um alvo ou gene único (SEIDL, 2014).

2.1.6 Neuroinflamação

Evidências científicas apontam a neuroinflamação como importante marcador da DA (DAULATZAI, 2016; AKIYAMA, et al, 2000; WYSS-CORAY, 2006; HEPPNER; RANSOHOFF; BECHER, 2015).

As citocinas são substâncias multifuncionais que estão intimamente envolvidas no processo inflamatório. O sistema nervoso central (SNC) é intimamente influenciado pelas citocinas (HOPPE, 2013). Estas substâncias podem ser classificadas em pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias, dependendo da sua ação diante do processo inflamatório (HOPKINS, 2003). As citocinas pró-inflamatórias, que incluem a IL-1B; IL-6; IL-19 e TNF- α , estão relacionadas a iniciação e amplificação do processo inflamatório. Em contraposição, as citocinas anti-

inflamatórias como IL-10 e TGF-1b podem proteger contra a neuroinflamação (DINARELLO, 2000; OPAL; DEPALO, 2010).

As citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e a interleucina-6 (IL-6), cujos receptores estão altamente concentrados em regiões associadas a aprendizagem e memória como o hipocampo (MATTSON; MAGNUS, 2006; BELARBI et al., 2012; TAKAO et al, 1992; GADIENT; OTTEN, 1994) provocam déficits comportamentais em testes de memória e aprendizado mediados pelo hipocampo (PUGH et al., 1998, ARAI et al., 2001; SHAW et al., 2001; SPARKMAN et al., 2006).

O TNF- α é uma das citocinas mais estudadas na DA. Estudos indicam que os déficits cognitivos ocasionados por processos neuroinflamatórios parecem estar intimamente relacionados a ativação desta citocina (BELARBI et al., 2012; HOPPE, 2013).

As evidências científicas indicam que o processo neuroinflamatório envolve uma redução de neurotrofinas com paralelo aumento de mediadores pró-inflamatórios, mais especificamente das citocinas, conforme pode ser observado na Figura 9.

Figura 9 - Processo inflamatório: participação de neurotrofinas e citocinas. A inflamação induz alterações na estrutura e função neuronal tornando os neurônios vulneráveis a danos e à atrofia. A inflamação excessiva ou prolongada, evidenciada pelo aumento dos níveis de citocinas como interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral α (TNF- α), é resultado do aumento da ativação microglial e poderia contribuir para danos neuronais, bem como perda de neurotrofinas como fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e fator de crescimento neuronal (NGF). Os neurônios danificados não controlam a reatividade microglial. Ao longo do tempo, pode ocorrer a ativação microglial persistente e perda da integridade neuronal, resultando em neuroinflamação crônica e alterações comportamentais. Fonte: modificado de Jurgens & Johnson (2012)

2.1.7 Estresse oxidativo

O oxigênio é de vital importância para o organismo humano e sob condições controladas o oxigênio geralmente é utilizado com um propósito metabólico. Em circunstâncias normais uma pequena porcentagem dos elétrons que passam através das cadeias de transporte de elétrons extravasam para fora das mitocôndrias, se combinam com o oxigênio molecular e formam as conhecidas espécies reativas ao oxigênio (ROS) (VALKO et al., 2007). Estes radicais são nocivos ao organismo, podem causar danos celulares. Para evitar este dano, a célula contém enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT), as quais são capazes de fornecer proteção nestes compartimentos (NIEDERLÄNDER et al., 2008).

No entanto, fatores externos como doenças, drogas, poluição e ausência de hábitos alimentares saudáveis podem contribuir com a produção de ROS, o que conduz a condição biológica conhecida como estresse oxidativo.

A condição de estresse oxidativo causada pela prevalência de ROS e espécies reativas de nitrogênio (ERN) é prejudicial às funções celulares, uma vez que estes compostos podem interagir negativamente com proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (BRIGELIUS-FLOHE, 1999; CARDOSO, 2014). Diversas doenças degenerativas, cardiovasculares, câncer, diabetes e declínio do sistema imunológico envolvem o dano celular promovido pelo estresse oxidativo, evidenciando que a incidência destas doenças está intimamente relacionada à prevalência destas substâncias reativas no organismo (RAUTER et al., 2012).

A hipótese do “estresse oxidativo” defende que a prevalência de radicais livres é uma das principais causas da neurotoxicidade do peptídeo β A na DA (SUBASH et al., 2015).

Adicionalmente, o sistema nervoso central é particularmente vulnerável ao ataque destes radicais livres, pelas seguintes razões: (1) níveis reduzidos de enzimas antioxidante quando comparado a outros tecidos (CHRISTEN, 2000; BRAINS; SHAW, 1997; BOURDEL-MARCHASSON et al., 2001; KEENEY et al., 2011); (2) o cérebro contém alta proporção de ácidos graxos poli-insaturados (HAZEL; WILLIAMS, 1990); e (3) o metabolismo cerebral requer quantidades consideráveis de oxigênio (SMITH et al., 1995). O fato de a idade ser um fator de risco crucial em DA, fornece apoio para a hipótese dos radicais livres/estresse oxidativo, pois os efeitos dos ataques pelos radicais livres, particularmente aqueles produzidos por espécies reativas ao 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 DA e outras doenças neurodegenerativas (CHRISTEN, 2000).

Nunomura et al., (2006) sustentam que as lesões causadas pelos radicais livres oriundos do estresse oxidativo são precedentes da deposição amiloide no cérebro, o que levanta a hipótese de que possivelmente tal estresse seria o *start* para a amiloidogênese. Mattson (2004) defende que os radicais livres estão intimamente relacionados a uma disfunção sináptica, cascatas de apoptose, hiperfosforilação da proteína *tau*, o que causa assim um comprometimento da capacidade cognitiva.

Neste cenário, compostos antioxidantes desempenham papel crucial na prevenção e/ou redução do risco destas doenças, podem atuar como neutralizadores de radicais livres para diminuir assim a extensão e incidência dos danos oxidativos.

2.1.8 Antioxidantes

Diante dos fatos expostos anteriormente, é crescente o interesse quanto ao papel dos antioxidantes presentes nos alimentos na saúde humana. Os compostos antioxidantes presentes principalmente em frutas são capazes de neutralizar os radicais livres presentes no organismo, auxiliando desta forma na proteção de células e tecidos. Consequentemente, este mecanismo de ação contribui para a prevenção do envelhecimento e da incidência de doenças crônicas não transmissíveis como as doenças neurodegenerativas, câncer ou doenças cardiovasculares (McCUNE et al., 2011; PEREIRA et al., 2012).

As substâncias fenólicas, também conhecidas como compostos fenólicos ou polifenóis são os principais compostos bioativos com atividade antioxidante presentes em frutas. Em geral estes compostos são formados quimicamente por um anel aromático contendo um ou mais grupos hidroxilas. Os vegetais contêm diversos tipos de compostos fenólicos como ácidos fenólicos, antocianinas, derivados do ácido cinâmico e flavonoides. Todas as classes apresentam os requisitos estruturais de sequestrantes de radicais livres que os tornam antioxidantes, embora suas atividades sejam diversificadas (SIASOS et al., 2013).

Estudos epidemiológicos fornecem evidências sugerindo efeitos benéficos de compostos fenólicos em déficits cognitivos em idosos ou pacientes com demência (HASSAAN et al., 2014; JANG, 2010; GILLETTE et al., 2007; LETENNEU et al., 2007; COMMENGES et al., 2000).

Os flavonoides constituem o grupo mais comum e amplamente distribuído de compostos fenólicos em plantas. São produtos do metabolismo de plantas, responsáveis por

funções que englobam desde a regulação de enzimas metabólicas até a defesa contra xenobióticos. Consequentemente, não são sintetizados por seres humanos e animais, sendo consumidos como parte da dieta (SPAGNUOLO et al., 2012).

Quimicamente, os flavonoides são substâncias com 15 átomos de carbono em seu esqueleto básico, os quais estão divididos em dois anéis aromáticos (A, B) ligados por três átomos de carbono para formar um heterociclo oxigenado (C). O número de modificações possíveis na estrutura de flavonoides gerou mais de 6.000 compostos diferentes desta classe até o final do século passado, e este número continua a aumentar (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

Estes compostos apresentam atividade fisiológica com um extenso número de propriedades farmacológicas e um baixo nível de toxicidade (KHAIRULLINA; GERCHIKOVA; DENISOVA, 2010). Flavonoides, como a galangina, kaempferol, quercetina, mircetina, fisetina, apigenina, luteolina e rutina tem se mostrado eficientes na manutenção das funções cognitivas. Esta potência é normalmente atribuída à sua estrutura química, isto é, ao número de hidroxilas no anel B (KATALINIC et al., 2010).

Carrasco-Pozo et al. (2012) demonstraram que a quercetina ($0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$), o resveratrol ($0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$) e a rutina (1 mg.mL^{-1}) 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 que envolvem a disfunção mitocondrial.

Letenneur et al. (2007) em um estudo denominado PAQUID desenvolvido na França, examinaram a ingestão de flavonoides em relação ao declínio da função cognitiva entre os indivíduos com 65 anos ou mais ($n = 1.640$), livres de demência, durante 10 anos. Os resultados da avaliação da função cognitiva por testes psicométricos indicaram que a ingestão de flavonoides foi associada a um melhor desempenho cognitivo no início do estudo ($p = 0,019$) e a uma melhor evolução do desempenho ao longo do tempo ($p = 0,046$). Após os 10 anos de duração do estudo, os indivíduos com menor ingestão de flavonoides haviam perdido, em média, 2,1 pontos no Mini Exame do Estado Mental, ao passo que os indivíduos com maior consumo tinham perdido apenas 1,2 pontos. Este estudo levanta a possibilidade de que a ingestão de flavonoides na dieta está associada a uma melhoria na evolução cognitiva.

Commenges et al. (2002) também avaliaram se a ingestão de flavonoides pode ser associada a uma menor incidência de demência em um estudo envolvendo 1367 indivíduos acima de 65 anos de idade. Um questionário foi utilizado para avaliar a ingestão de flavonoides e os indivíduos foram acompanhados por 5 anos entre 1991 e 1996. Durante este período foram observados 66 casos incidentes de demência. Os resultados demonstraram que a ingestão de flavonoides está inversamente relacionada com o risco de incidência de demência.

Especificamente em relação à DA, Engelhart et al. (2002) avaliaram se a ingestão de antioxidantes através da dieta estava relacionada a um menor risco do desenvolvimento da doença. Este estudo foi realizado na Holanda com 5395 participantes, com mais de 55 anos e livres de demência. Depois de 6 anos de estudo, 197 participantes desenvolveram algum tipo de demência, sendo em 146 a DA. Os resultados indicaram que o elevado consumo de antioxidantes (compostos fenólicos, vitamina C e E) está associado a um baixo risco da DA.

Shih et al. (2010) analisaram o efeito de extratos de amora com alto teor de compostos fenólicos e antocianinas na indução de enzimas antioxidantes e na promoção da cognição em camundongos 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 animais alimentados com o suplemento de extrato de amora apresentaram teor significativamente menor de proteína β A e uma melhoria na aprendizagem e memória em testes comportamentais. 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 animais 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.

2.1.9 Romã

A romã se destaca entre os alimentos fontes de antioxidantes, sendo utilizada na medicina popular desde os tempos antigos. Esta espécie foi descrita por Linnaeus em 1758, que sugeriu a seguinte classificação: Reino: Plantae, Ordem: Myrtales, Família: Lythraceae, Genero: Punica Espécie: *Punica granatum*. É fruta comestível de 5-12 cm de diâmetro com um formato arredondado e casca grossa, geralmente rosa ou vermelha que corresponde a cerca de 50% do peso total da fruta. O interior da fruta tem um tecido esponjoso branco que

cria espaços cheios de sacos comestíveis, conhecidos como arilos (Figura 10) (CHRISTAKI et al., 2011).

Figura 10 - Frutas de romã (*Punica granatum*). Fonte: Acervo pessoal

A Romã (*Punica granatum* L.) foi uma das primeiras frutas domesticadas. Atualmente, é cultivada em mais de 100 países, incluindo o Irã, Espanha, Itália, Afeganistão, Estados Unidos, Índia, China, Rússia, Uzbequistão, Marrocos e Grécia (SHAYGANNIA et al., 2015).

Na América, a árvore de romã foi introduzida pelos espanhóis e a área plantada tem se expandido nos últimos 20 anos (MORENO, 2010). A árvore da romã prospera sob condições climáticas áridas e semi-áridas (ROBERT et al., 2010). Portanto, ao aportar no Brasil, a cultura encontrou condições favoráveis para o crescimento vegetativo, florescimento, frutificação e produção de frutas de primeira qualidade. No entanto, dados de área plantada e de produção no Brasil ainda são escassos.

Em 2010, a procura por frutas de romã aumentou em 30% em relação ao ano anterior e com isso a produção de romã no Brasil foi impulsionada (CEAGESP, 2010). Houve um salto de produção passando de, aproximadamente, 37.000 caixas em 2001 para 406.000 caixas em 2011 (IBRAF, 2012). O Brasil apresentou uma média de 2,03 mil toneladas de romãs frescas comercializadas em 2011 (IBRAF, 2012).

A produção de romã no Brasil apresenta crescimento ascendente, principalmente na região semi-árida. O Nordeste brasileiro apresenta condições ideais para o cultivo. Um dos maiores produtores de romã das variedades ‘Molar’ e ‘Wonderful’, com cerca de 70 hectares, encontra-se na cidade de Sousa (PB). Com o aumento da demanda pelo produto, por parte das indústrias de alimentos, farmacêutica e de cosméticos, a área cultivada no Brasil vem se expandido (CARDOSO et al. 2011; MOREIRA et al., 2015).

O aumento da demanda pelo produto está relacionado à elevada quantidade de compostos bioativos e à comprovação científica dos seus inúmeros benefícios à saúde humana (YANG et al., 2016; AKHTAR et al., 2015) como a prevenção e/ou redução do risco de doenças como câncer (HERTOG et al., 1997), aterosclerose (AL-JARALLAH et al., 2013) e Alzheimer (SUBASH et al., 2015).

O papel biológico da romã tem sido atribuído à propriedade antioxidante apresentada pelos compostos fenólicos como ácido gálico, ácido elágico e punicalagina (α e β), dois polifenóis únicos da romã (JOHANNINGSMEIER; HARRIS, 2011) (Figura 11).

Figura 11 - Estrutura química dos compostos antioxidantes presentes na romã. Fonte: modificado de Viladomiu et al. (2013)

Estes compostos antioxidantes podem influenciar a cognição através da atividade antioxidante, anti-inflamatória e aumento da expressão de neurotrofinas, especialmente o BDNF. O BDNF é uma neurotrofina conhecida por sua influência na manutenção, sobrevivência, crescimento e diferenciação de neurônios, auxiliando na reversão da atrofia neuronal e déficits comportamentais (GOMEZ-PINILLA; NGUYEN, 2012), conforme pode ser observado na Figura 12.

Figura 12 - Relação entre metabolismo energético e cognição. Constituintes da dieta podem afetar a atividade metabólica celular, a plasticidade neuronal e os processos cognitivos. É possível que o trifosfato de adenosina (ATP) produzido pelo metabolismo ative o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e aumente a plasticidade sináptica. Por outro lado, a produção de energia através do metabolismo também gera subprodutos oxidativos, conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ROS), que em quantidades excessivas podem levar ao estresse oxidativo. O estresse oxidativo enfraquece a plasticidade sináptica e a função cognitiva. Fonte: modificado de Gomez-Pinilla e Nguyen (2012)

Os polifenóis apresentam também a capacidade de interagir com peptídeos e proteínas, sendo que tal interação pode revelar-se útil em nível biológico, em geral, e especialmente na DA que é caracterizada pela deposição extracelular de proteína βA (RIVIERE et al., 2007). A inibição da formação de oligômeros de βA é um alvo terapêutico eficaz para a DA e evidências científicas demonstram que alguns polifenóis têm atividades anti-amiloidogênicas potentes e possivelmente podem proteger contra a neurotoxicidade provocada pelo peptídeo.

2.1.10 Romã e cognição

A romã se mostrou eficaz na reversão de déficits cognitivos em diversos trabalhos científicos que serão relatados a seguir.

Loren et al. (2005) determinaram se a proteção neonatal contra a encefalopatia hipóxico-isquêmica poderia ser alcançada através da suplementação da dieta materna com o suco de romã. A encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal constitui uma importante causa de morbidade e mortalidade, necessitando de terapias eficazes para a prevenção e tratamento. Os resultados indicaram que a suplementação materna com suco de romã resultou em uma redução da perda de tecido cerebral (> 60%) no estriado, hipocampo e córtex dos filhotes, além da diminuição da ativação da caspase-3, essencial na apoptose celular, em 84% no hipocampo e 64% no córtex. O estudo indica que a suplementação da dieta materna com suco de romã possivelmente apresenta um efeito neuroprotetor para o cérebro neonatal.

As doenças neurodegenerativas geram o acúmulo de proteínas específicas, tais como prions PrPSc na Doença de Creutzfeldt Jacob ou β A na DA, e compartilham características comuns como morte neuronal e dano oxidativo. Mizhari et al. (2014) testaram se a redução na oxidação através do consumo de antioxidantes naturais provenientes da semente de romã altera a manifestação da doença de Creutzfeldt Jacob em camundongos transgênicos. O óleo de semente de romã contém significativas concentrações de um ácido graxo poli-insaturado, conhecido como ácido punico, considerado um dos mais fortes antioxidantes naturais. A administração do óleo de semente de romã retardou significativamente o surgimento da doença, quando administrado a animais assintomáticos e adiou o agravamento do problema em animais induzidos à doença. O tratamento reduziu a oxidação lipídica e perda neuronal, o que indica um forte efeito neuroprotetor. Desta forma, o trabalho propõe que formulações a base de antioxidantes provenientes da romã podem ser benéficas se administradas por longos anos a indivíduos em situação de risco ou em indivíduos já afetados por doenças neurodegenerativas.

Bookheimer et al., (2013) realizaram um teste randomizado controlado com placebo para avaliar se a administração de suco de romã em indivíduos idosos com queixas de perda de memória associadas à idade traria benefícios cognitivos. Trinta e dois indivíduos consumiram oito taças de suco de romã ou placebo durante 4 semanas. Os indivíduos foram submetidos a testes de memória, exames de ressonância magnética durante as tarefas cognitivas e exame de biomarcadores no sangue antes e após a intervenção. Após 4 semanas, apenas o grupo que consumiu o suco de romã mostrou uma melhoria significativa no teste de lembrança seletiva de memória verbal e um aumento significativo da capacidade antioxidante no plasma.

Braidý et al., (2013) analisaram o papel neuroprotetor de diferentes variedades de romã em modelo *in vitro* da doença de Parkinson. Os resultados indicaram que o suco extraído da polpa da romã apresentou propriedades interessantes no sentido de retardar a neurodegeneração relacionada à idade. Os mecanismos de proteção podem estar relacionados com sua atividade antioxidante e a presença de compostos fenólicos.

Hartman et al. (2006); Choi et al. (2011); Rojanathammanee et al. (2013) e Subash et al. (2015) estudaram o papel neuroprotetor da polpa de romã em diferentes animais modelos da DA. O consumo de suco de romã promoveu benefícios, tanto do ponto de vista comportamental quanto neurológico, em camundongos transgênicos ($APP_{sw}/Tg2576$) modelos da DA (HARTMAN et al., 2006). Nesse estudo, detectaram que o consumo de 5 mL.dia⁻¹ do suco pelos animais dos 6 aos 12,5 meses de idade ocasionou uma redução de 50%

na deposição de peptídeo β A no hipocampo. Além disso, os animais que consumiram o suco de romã obtiveram um desempenho superior nos testes comportamentais em comparação ao controle. O estudo sugere que os responsáveis por esta atividade possivelmente são os compostos fenólicos.

O potencial protetor de uma dieta contendo extrato natural de polpa de *Punica granatum* em camundongos induzidos a DA pela injeção aguda (410 pmol) de peptídeo β A foi analisado por Choi et al. (2011). Os resultados mostraram que o consumo de extrato aquoso-alcoolico da polpa de romã em doses de 800 mg/kg/dia durante 30 dias foi eficaz para a melhoria dos biomarcadores da DA.

Rojanathammanee et al. (2013) estudaram o efeito do consumo de extrato aquoso de polpa de romã durante 3 meses em camundongos transgênicos (APP/PS1) modelos da DA. O consumo de extrato de polpa de romã causou um efeito anti-inflamatório no cérebro que possivelmente poderia atenuar a progressão da DA. Os compostos fenólicos presentes no extrato foram testados de forma isolada em culturas de células e os resultados mostraram que os compostos ativos foram a punicalagina e o ácido elágico.

Recentemente, Subash et al. (2015) estudaram se a suplementação de ratos transgênicos da DA (APPsw/Tg2576) com romã durante 15 meses afetaria memória, ansiedade e aprendizado. A memória e comportamento foram analisados através do Labirinto aquático de Morris, equipamento Rota Rod, teste de labirinto em cruz elevada e teste em campo aberto. No experimento, os animais a partir de 4 meses receberam uma dieta contendo 4% de romã inserida diretamente na ração (pellets) até completarem 19 meses. Os resultados sugerem que a suplementação dietética com romã retardou a progressão das alterações cognitivas e comportamentais na DA.

O ácido elágico, um dos principais polifenóis presente na casca e polpa de romã possivelmente apresenta um potencial neuroprotetor na DA, uma vez que foi capaz de reduzir significativamente a neurotoxicidade induzida por β A₁₋₄₂ em uma linhagem celular humana (SH-SY5Y) (FENG et al., 2009).

Não obstante, o composto fenólico quercetina 3-O- glicuronídeo, também encontrado na romã, reduziu significativamente a produção de peptídeo β A em culturas neuronais primárias geradas a partir de um animal modelo da DA (HO et al., 2013). Outro estudo indica que o pré-tratamento de culturas primárias de hipocampo com quercetina atenuou significativamente a citotoxicidade induzida por β A₁₋₄₂ (ANSARI et al., 2009).

Embora estes estudos utilizem apenas a polpa da romã, pode-se observar que as propriedades bioativas da romã não estão limitadas à polpa da fruta. Várias pesquisas

mostraram que a casca, considerada como resíduo, apresenta quantidades superiores de compostos biologicamente ativos em comparação com a polpa (GULLON et al., 2016; SALGADO et al., 2012).

2.1.11 Compostos bioativos na casca da romã

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).

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.

O subproduto da romã, chamado de bagaço, é constituído de 78% de casca e 22% de sementes com base no peso úmido (QU et al., 2010). Salgado et al. (2012) analisaram as diferentes porções da fruta e verificaram que a casca de romã apresenta atividade antioxidante e quantidade de compostos fenólicos superior à polpa, o que demonstra seu potencial a ser explorado como ingrediente funcional. Estes dados corroboram os obtidos por Gullon et al. (2016) e Madrigal-Carballo et al. (2009). Isto explica porque sucos comerciais fabricados por meio de processo em que frutas inteiras são prensadas contêm níveis abundantes de compostos bioativos (QU et al., 2012).

Cascas de romã liofilizadas foram utilizadas na forma de um extrato seco adicionado à suco de laranja com morango. O extrato seco foi responsável pelo aumento significativo da atividade antioxidante dos sucos, sendo esse aumento proporcional às concentrações adicionadas. No entanto, embora os sucos enriquecidos apresentem níveis elevados de antioxidantes, as amostras com uma concentração de 2% de extrato foram rejeitadas na análise sensorial devido ao forte sabor adstringente da casca de romã (SALGADO et al., 2012).

Com base nisso, chegou-se a conclusão que alternativas tecnológicas precisavam ser desenvolvidas com o intuito de viabilizar sensorialmente a utilização da casca de romã, proporcionando o reaproveitamento de um resíduo industrial de grande valor biológico.

2.2 Materiais e métodos

2.2.1 Aquisição de matéria prima

Foram adquiridos da Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais do Estado de São Paulo (CEAGESP), frutas de romã (*Punica granatum* L.) da cultivar *Wonderful* provenientes dos Estados Unidos importadas pelo grupo Importação de Frutos Othil. As frutas foram transportados até o laboratório em caixas de poliestireno expandido. Em seguida, foram selecionados manualmente considerando a uniformidade no estágio de maturação e a ausência de injúrias, lavados com água corrente, higienizados por 15 minutos em solução de hipoclorito de sódio 20 ppm e enxaguados com água destilada, a fim de remover sujidades. As frutas adquiridas para o experimento podem ser observados na Figura 13:

Figura 13 - Frutas de romã (*Punica granatum*) utilizados no experimento. Fonte: Acervo pessoal

2.2.2 Separação da polpa e casca

A separação das cascas e polpa foi realizada manualmente. Em seguida, as cascas e polpas foram pesadas e armazenadas em embalagens plásticas de polietileno protegidas da luminosidade a 4°C até o momento da extração conforme pode ser observado nas Figuras 14 e 15. Estes procedimentos foram realizados em condições de baixa luminosidade e curto período de tempo para evitar possível degradação e oxidação dos compostos bioativos.

Figura 14 - Separação entre polpa e casca. Fonte: Acervo pessoal

Figura 15 - Polpa e casca de romã (*Punica granatum*) separados. Fonte: Acervo pessoal

2.2.3 Relação polpa e casca

Após a separação, a polpa e a casca da romã foram pesadas separadamente. Foram utilizados cinco frutos para o cálculo da relação polpa e casca.

O cálculo da porcentagem referente a casca (% R) foi realizado utilizando a seguinte fórmula:

$$\% R = (\text{Peso da casca} \times 100) \times (\text{Peso total do fruta})^{-1}$$

2.2.4 Produção dos extratos

Os extratos foram preparados através do contato da casca e/ou polpa triturados com uma solução etanol 80% na proporção 1:10 de casca:solvente (p/v) em mesa agitadora (Modelo ET-1401, Tecnal, Brasil), protegido contra a iluminação, à temperatura ambiente ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) por 24 horas. Em seguida, o extrato resultante foi centrifugado a 1956,2 G em centrífuga (Modelo NT 825, Nova Técnica, Brasil). Após a centrifugação, os extratos foram concentrados em rotaevaporador a 50°C (Modelo 801, Fisatom, Brasil) sob vácuo até peso

constante com rendimento de aproximadamente 10% p/p. Esta proporção de etanol:água, agitação e tempo de extração foram adotada com base em testes preliminares realizados. A otimização da concentração de etanol foi baseada na extração de compostos bioativos com potencial anticolinesterásico (MORZELLE, 2013). A adoção de uma extração aquoso-alcoólico visava uma futura aplicação no processo de microencapsulação e posterior enriquecimento de alimentos.

2.2.5 Quantificação de compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais (CF) dos extratos de polpa e casca de romã foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteu utilizando como padrão o ácido gálico de acordo com a metodologia proposta por Woisky e Salatino (1998). O reagente de Folin-Ciocateau consiste de mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstístico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6+ porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras.

Os extratos brutos iniciais foram diluídos (polpa 1:20, casca 1:400) e, uma alíquota de 0,5 mL da diluição foi adicionada de 2,5 mL do reagente Folin-Ciocateau diluído em água na proporção 1:10. A mistura foi colocada por 8 minutos em repouso e posteriormente adicionou-se 2 mL de carbonato de sódio 4%. Os tubos foram colocados novamente em repouso em local sem luminosidade por 2 horas. Em seguida, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (modelo Unico® 2800 UV/VIS – Interprise Brasil) a 740 nm. Os resultados dos compostos fenólicos totais foram expressos em mg de ácido gálico 100 g⁻¹ extrato, com base em uma curva de calibração de ácido gálico ($y = 0,0105 x - 0,0072$; $R^2 = 0,9998$) com concentrações variando de 10 a 100 µg mL⁻¹.

2.2.6 Quantificação de flavonoides totais

A quantificação de flavonoides totais (FLA) foi realizada segundo metodologia descrita por Xu & Chang, (2007). Em tubos de ensaio foram adicionados 250 µL de extrato diluído na proporção 1/200 para casca e 1/1 para polpa, 1500 µL de água destilada e 75 µL de nitrato de sódio 5%. Após agitação, a mistura ficou em repouso por 6 minutos. Em seguida, foram adicionados 150 µL de cloreto de alumínio 10%. Novamente a mistura foi agitada e

permaneceu em repouso por 5 minutos. Ao final, adicionou-se 500 μL de hidróxido de sódio 1 M e realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 510 nm. A curva padrão foi construída com solução de catequina nas concentrações de 0,020 a 0,10 mg.mL^{-1} .

2.2.7 Perfil de compostos não voláteis

Os compostos fenólicos, ácidos fenólicos e derivados foram identificados através de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM) por comparação com dados obtidos de tempo de retenção e fragmentação iônica de padrões autênticos Extrasynthese Co. (resveratrol, ácido sirínico, miricetina, kaempferol, luteolina, liquiritigenina, isoliquiritigenina, quercetina, miricetina, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, catequina, epicatequina) e com a biblioteca Wiley 8.

Para a eliminação de interferentes nesta análise foi aplicada como método de tratamento de amostras a extração em fase sólida (SPE). Antes da passagem da amostra, os cartuchos de SPE DSC-18 foram condicionados com 8 mL de metanol e, em seguida, 8 mL de água ácida (pH 2). Os extratos foram rediluídos em água até o volume original e acidificados até o pH 2 e posteriormente 7 mL dos extratos foram aplicados aos cartuchos. Em seguida, os cartuchos foram lavados com 15 mL de água ácida e com metanol para eluição da fração de interesse que foi coletada, evaporada com gás nitrogênio em vial e posteriormente o processo de derivatização da amostra para a formação de derivados do trimetilsilil foi realizado. Para a realização da derivatização das amostras toda a vidraria envolvida no processo passou pelo processo de silanização com DMS (dimetil dicloro silano) 10% diluído em tolueno. Em seguida, adicionou-se 100 μL do reagente derivatizante N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamina (MSTFA) na massa das frações recuperadas do cartucho SPE. A mistura foi homogeneizada e levada em estufa a 60°C durante 10 minutos para que ocorresse a derivatização da amostra. Após este período, o reagente derivatizante foi evaporado sob fluxo de nitrogênio e os produtos da derivatização rediluídos em hexano.

A amostra foi homogeneizada e utilizada para a injeção no CG-EM, o mesmo procedimento foi realizado para padrões autênticos. As amostras foram separadas em coluna capilar (RTX5MS 30m x 0,25 mm x 0,25 μm), utilizando hélio como gás de arraste. A temperatura do injetor foi de 280°C e adicionou-se 0,6 μL no modo *splitless*. A programação de temperatura da coluna iniciou em 80°C (1 minuto), alcançou 200°C (1 minuto), passou a 250°C (8 minutos), a 300°C (5 minutos) e a 320°C (10 minutos), totalizando 25 minutos de

análise. A interface foi mantida a 280°C e o detector operou em modo scanning (m/z 40-800). A integração foi feita por meio do software LabSolutions-CG/EM.

2.2.8 Quantificação de punicalagina

A quantificação de punicalagina nos extratos de polpa e casca de romã foi realizada em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) com detector UV/Vis segundo metodologia descrita por Santiago et al., (2014).

A separação da punicalagina foi realizada em coluna Waters Spherisorb® C18 ODS2 (250 mm x 4,6 mm; 5 μ m) com temperatura do forno a 40°C, em um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Shimadzu 20A), volume de injeção de 10 μ L para a curva padrão e polpa e de 1 μ L para casca, fluxo de 1 mL.min⁻¹ e leituras no comprimento de onda de 260 nm. A fase móvel foi constituída por acetonitrila (solução A) e ácido fórmico a 1% em água (solução B) e foi utilizada na forma de gradiente na sequência: 0-5 min, 97-95%B; 5-10 min, 95-85%B; 10-16 min, 85-70%B; 16-18 min, 70- 97%B; 18-30 min, 97%B.

A identificação e quantificação de punicalagina (α e β) nos extratos foram realizadas através de padronização externa. Para a quantificação foi construída uma curva analítica com concentrações de 1 mg.mL⁻¹ a 0,1 mg.mL⁻¹ com o padrão de punicalagina (mistura de isômeros) da marca Sigma-Aldrich® (P0023, Lote WXBB7163V). Tanto as amostras quanto os pontos da curva padrão foram injetados em triplicata.

2.2.9 Determinação do conteúdo e perfil de compostos fenólicos

A quantificação de compostos fenólicos foi realizada em triplicata em um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Shimadzu 20A), equipado com sistema de bombeamento (LC-20 AT), injetor automático (SIL-20AHT), forno de coluna (CTO-20A), comunicador (CBM-20A) e detector UV/Vis (SPD-20A).

Extratos de romã (10 μ L para extratos da polpa e 5 μ L para extratos da casca) foram injetados em uma coluna Waters Spherisorb® ODS-C18 (4.6 $\times$ 250 mm e 5 μ m de tamanho de partícula) mantida a 35°C. O sistema era operado pelo software Windows NT-based ChemStation© (Agilent Technologies), que foi usado para o processamento e análise dos dados. O fluxo da fase móvel foi fixado em 0,7 mL.min⁻¹. A fase móvel era constituída de dois solventes: 1% (v/v) ácido fórmico:água (A) e metanol (B). A detecção UV dos compostos fenólicos analisados foi realizada em 280 nm e 370 nm. As condições de gradiente

do solvente foram as seguintes: 0–60% B durante 45 min, 60–100% B até 50 min; 100–0% B até 60 min (HE et al., 2011).

A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos tempos de retenção de cada composto com o respectivo padrão analítico injetado nas mesmas condições. Os compostos foram quantificados através das curvas de calibração constuidas a partir dos padrões analíticos.

A construção da curva padrão foi realizada a partir dos padrões de ácido gálico (20,6-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), epicatequina (2,5-50 $\mu\text{g mL}^{-1}$), rutina (2,5-50 $\mu\text{g mL}^{-1}$), ácido sinápico (2,5-5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$), quercetina (2,5-50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e ácido p-cumárico (2,5-50 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os resultados foram expressos em $\mu\text{g mL}^{-1}$ de extrato.

2.2.10 Determinação do conteúdo e perfil de antocianinas

Antocianinas foram quantificadas em sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Agilent series 1100, Santa Clara, CA, USA) com bomba quaternária, injetor automático e coluna C18 Shim-pak CLC-ODS (5 μm , 250 x 4.6 mm) mantida a 25 °C. Os dados foram adquiridos e processados através do software CHEMSTATION®. Os pigmentos foram separados usando gradiente de eluição linear com uma solução de água-ácido fosfórico (4%):metanol passando da proporção 85:15 para 20:80 (v/v) em 25 minutos, seguido por uma eluição isocrática por 15 minutos. O fluxo da fase móvel foi de 1,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (ZANATTA et al., 2005), e para detecção das antocianinas utilizou-se comprimento de onda de 520 nm. Os pigmentos foram identificados pela comparação do tempo de retenção com padrões injetados nas mesmas condições.

A construção da curva padrão foi realizada a partir dos padrões de cianidina 3-5-di-glucosídio (17 to 84 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), delphinidina 3-b-D-glucosídio (7 to 120 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), pelargonidina 3-5-di-glucosídio (39 to 98 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), cianidina 3-glucosídio (38 to 380 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), malvidina 3-5-di-glucosídio (19 to 310 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), pelargonidina 3-glucosídio (5 to 49 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), malvidina 3-glucosídio (15 to 107 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), delphinidina (5 to 28 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), cianidina (4 to 21 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), pelargonidina (6 to 73 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), malvidina (3 to 37 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e peonidina (3 to 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

2.2.11 Limite de quantificação e detecção

O limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) foram calculados a partir das seguintes equações, respectivamente: $LOD=(3.3 \times s)/S$ e $LOQ=(10 \times s)/S$, onde s é o desvio padrão estimado do coeficiente linear da equação e S é o slope da curva analítica (MELO et al., 2015).

2.2.12 *Screening* da Atividade antioxidante

Diversos métodos são frequentemente utilizados para determinar a atividade antioxidante em frutas incluindo ABTS, DPPH, ORAC e FRAP. A complexidade da matriz alimentícia, constituída por dezenas de compostos com diferentes grupos funcionais, polaridade e comportamento químico, justifica a adoção de mais de um ensaio para avaliar este potencial.

Os extratos de polpa e casca de romã foram avaliados quanto à atividade antioxidante por quatro diferentes métodos.

A atividade antioxidante foi avaliada segundo método descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) e fundamenta-se em avaliar a atividade antioxidante de alimentos ou extratos, através do sequestro do radical DPPH. Este método se baseia na diminuição da absorbância quando o radical DPPH, de coloração violeta, é reduzido por antioxidantes, tornando o meio da reação amarelo. A curva padrão foi construída utilizando o antioxidante Trolox, nas concentrações de 0 – 200 μM e a variação colorimétrica foi mensurada em espectrofotômetro a 517 nm. Os resultados estão expressos em μM de equivalentes ao Trolox. g^{-1} de amostra.

A determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS foi realizada segundo metodologia descrita pela EMBRAPA (2007). O radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$ (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) é formado pela reação de ABTS 7 mM com persulfato de potássio 140 mM. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (modelo Unico® 2800 UV/VIS – Interprise Brasil) a 734 nm e para a construção da curva padrão utilizou-se o antioxidante Trolox, nas concentrações de 0 – 2000 μM . Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em μM de equivalentes ao Trolox. g^{-1} de amostra.

O poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) foi estimado de acordo com o procedimento descrito por Rufino et al. (2006). O método se baseia na determinação da redução do ferro em fluidos biológicos, soluções aquosas de compostos puros e extratos de

alimentos e bebidas. A curva padrão foi construída utilizando o sulfato ferroso na concentração de 0 a 2000 μM e os resultados foram expressos em μM sulfato ferroso. g^{-1} de amostra.

A capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC) foi mensurada de acordo com a metodologia descrita por Melo et al. (2014). Os extratos de polpa e casca de romã foram diluídos em tampão fosfato de potássio 75 mM com pH 7,4 nas concentrações de 1/200 e 1/5000 respectivamente. Para a análise foram adicionados 30 μL dos extratos brutos diluídos, 60 μL da solução de fluoresceína 508,25 mM e 110 μL da solução de trabalho AAPH 76 mM. Foi preparado um branco contendo apenas tampão fosfato (200 μL). Após a adição dos reagentes, as microplacas foram incubadas em um leitor de microplacas (SpectraMax M3, Molecular Devices) a 37°C, e submetidos a uma cinética por 2 horas com leituras sendo efetuadas com intervalos de 1 minuto, utilizando-se emissão de 528 nm e excitação de 485 nm. Os radicais peroxila reagem de modo a formar um produto não fluorescente, o qual pode ser facilmente quantificado por fluorescência. A capacidade antioxidante é determinada por uma diminuição da taxa e quantidade de produto formado ao longo do tempo. A curva padrão foi construída utilizando Trolox nas concentrações de 12,5 a 400 μM . Os resultados da atividade antioxidante serão expressos em μmol de equivalentes ao Trolox. mg^{-1} de amostra.

2.2.13 On line HPLC–DAD–ABTS

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detecção da captura de radicais livres por compostos individuais pós-coluna baseado nos sistemas modelos de oxidação têm sido aplicada em diversos estudos científicos (HE et al., 2011; HE et al., 2012; BORGES et al., 2010; SANTIAGO et al., 2014; GULLON et al., 2016). Constitui um método sensível e relativamente simples para análise da capacidade antioxidante individual dos compostos, tendo sido aplicado para uma análise rápida e eficiente de matrizes complexas como extratos de plantas e de alimentos (PELLEGRINI et al., 2003; NUENGCHAMNONGETAL et al., 2005; BANDONIEN e MURKOVIC, 2002; HE et al., 2011).

Os extratos de polpa e casca de romã foram avaliados quanto a atividade antioxidante individual dos compostos usando um sistema HPLC com detecção antioxidante on line, baseada na eliminação de radicais pelo ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6- sulfônico (ABTS).

Uma solução estoque contendo persulfato de potássio 140 nM e ABTS 7 mM foi preparada e mantida a 25°C no escuro *overnight* para estabilização do radical. Posteriormente foi preparado o radical para uso na análise através da diluição da solução estoque em metanol até alcançar uma absorbância de $0,700 \pm 0,020$ a 734 nm.

O funcionamento do equipamento utilizado para a análise está ilustrado na Figura 16.

Figura 16 - Funcionamento do HPLC para determinação simultânea de compostos fenólicos e atividade antioxidante on line. Fonte: Tremocoldi (2015)

Primeiramente os compostos, separados na coluna do cromatógrafo, foram detectados através de um detector de díodos (DAD). Em seguida, no pós coluna, a solução do radical livre ABTS reagiu com os compostos que foram separados na coluna por aproximadamente 1 minuto. A vazão do reagente ABTS foi de $0,7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e a intensidade de cor foi detectada por meio de picos negativos a 734 nm. Os resultados foram expressos em atividade antioxidante equivalente a Trolox (TEAC).

A análise foi realizada em cromatógrafo Shimadzu equipado com ODS-A (coluna C18, tamanho da coluna 4,6 x 250 mm, tamanho de partícula 5µm), detector de fotodíodos (DAD) (SPD-M10AVp, Shimadzu Co., Kyoto, Japão) e detector UV-Vis (SPD-20AV, Shimadzu). Os extratos foram filtrados através de um filtro de 0,22 µm (Millipore) antes da injeção de uma alíquota de 10 µL e 5 µL para casca e 10 µL para a polpa. A fase móvel foi constituída por uma mistura de dois solventes: (A) Solução de ácido fórmico em água a 1% e (B) Metanol. A vazão da fase móvel foi de $0,7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e o gradiente foi iniciado em 0% do solvente B passando a 60% de B em 45 minutos, 100% de B em 50 minutos e retornando

novamente a 0% do solvente B a 60 minutos (HE et al., 2011). As amostras e os pontos da curva padrão de Trolox foram avaliadas em três repetições.

Os compostos foram identificados pelo espectro de absorção na região ultravioleta, utilizando os recursos do detector de arranjo de fotodiodos, pela comparação de tempo de retenção e uso de padrões externos.

2.2.14 Inibição da acetilcolinesterase

A atividade anticolinesterásica foi determinada através do método fotométrico descrito por Ellman et al., (1961). O método se baseia na quantificação da produção de tiocolina à medida que a acetiltiocolina é hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase. Neste método a tiocolina interage com o reagente de Ellman (DTNB) produzindo um ânion amarelo. A taxa de produção deste composto colorido é mensurada em microescala através de um leitor de microplacas de 96 poços (Thermo Scientific) com UV/VIS em 412 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 fisostigmina na concentração $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ foi aplicada como controle positivo e o solvente utilizado na elaboração dos extratos como controle negativo. 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 negativo (solvente utilizado para solubilizar cada amostra) através da fórmula: % inibição = $100 \times (\text{taxa da reação amostra} / \text{taxa da reação controle})$.

As concentrações de cada amostra foram analisadas em cinco repetições (cinco placas, sendo que em cada placa utilizavam-se oito poços por concentração totalizando 40 leituras para cada concentração e/ou controle) e os resultados obtidos através de média $\pm$ desvio padrão. Em cada placa eram analisados um controle positivo (fisostigmina $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$), controle negativo (etanol 80%) e as diferentes concentrações do extrato a ser avaliado.

2.2.15 Obtenção das micropartículas

Os extratos de polpa e casca de romã foram submetidos à atomização para a elaboração de micropartículas. As micropartículas 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).

Como agente carreador foi utilizado a maltodextrina (Maltogill 20), 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 sob agitação, em agitador mecânico (modelo 752, Fisatom, São Paulo- Brasil) com barra magnética, à temperatura ambiente (23 a 25°C) durante o processo de atomização.

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 (MORZELLE, 2013).

2.2.16 Experimento animal

Os procedimentos experimentais utilizados nesta pesquisa estão de acordo com os “Princípios Éticos para Uso de Animais de Laboratório” descritos pela Sociedade Brasileira em Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL, antigo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, COBEA) e de acordo com a Lei Arouca, aprovada em 2008. Inicialmente, esse projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (Projeto nº 005/14), onde toda a etapa de experimentação animal foi realizada. Todos os procedimentos foram realizados visando utilizar o menor número de animais possível e reduzir ao máximo o nível de sofrimento. O protocolo experimental utilizado está apresentado na Figura 17.

Figura 17 - Protocolo experimental utilizado na pesquisa

2.2.16.1 Aquisição dos animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) isogênicos da linhagem C57BL/6, machos, com 3 meses de idade (com peso aproximado de 30 g), fornecidos pelo biotério do Instituto Nacional de Farmacologia (INFAR) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, em caixas de dimensões 40 cm x 34 cm x 17 cm e os experimentos foram iniciados somente após um período de habituação ao biotério de trinta dias. As caixas foram forradas por serragem de sabugo de milho e renovadas de dois em dois dias.

Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12/12 horas, com temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e umidade controladas, com água e ração para roedores (NutriLab) a vontade, em mini-isoladores armazenados em racks ventilados (Alesco, Monte Mor, SP, Brasil).

2.2.16.2 Delineamento experimental

Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais descritos a seguir, sendo que cada grupo foi constituído por 12 animais, totalizando 36 animais. O número de animais por grupo foi determinado pela experiência prévia da equipe em estudos comportamentais e também com base em evidências científicas que relatam a grande variabilidade normalmente encontrada nesse tipo de estudo. O tecido cerebral dos animais foi utilizado em várias análises e considerando que apenas uma pequena quantidade de amostra foi gerada por animal a utilização de um menor número de indivíduos poderia comprometer a realização destas análises.

Divisão dos grupos experimentais:

Ctrl → Camundongos com infusão de veículo e consumindo água;

βA → Camundongos com infusão de β -amiloide e consumindo água;

$\beta\text{A} + \text{PPE}$ → Camundongos com infusão de β -amiloide e consumindo micropartículas da casca de romã.

2.2.16.3 Infusão de β A

A infusão do peptídeo β -amiloide foi realizada utilizando-se uma mini-bomba osmótica (modelo 1004, Alzet, Cupertino, CA, EUA), seguindo método descrito anteriormente por Viel et al. (2008) e Amaral et al. (2010).

As mini-bombas foram preenchidas com veículo [198 μ L HEPES (4 mM, pH 7) + 2,3 μ L e-64 (Sigma #E3132)] para o grupo 1 ou peptídeo β -amiloide1-42 (Sigma #A9810) com veículo (192 μ L HEPES + 2,3 μ L e-64 + 6,0 μ L β A1-42) para os grupos 2 e 3. Foi administrado aos animais atropina via intraperitoneal aproximadamente trinta minutos antes do início da cirurgia. Posteriormente, foram anestesiados com Ketamina (0,03 – 0,035%) e Xilazina (0,03 – 0,035%) via intraperitoneal. Para o implante, a cabeça do animal foi imobilizada com cuidado e uma cânula de aço inoxidável (Brain kit 3, Alzet, Cupertino, CA, EUA) foi implantada no ventrículo lateral do animal usando um instrumento de estereotaxia seguindo as coordenadas: 0,8 mm ântero-posterior, 1,0 mm mediolateral em relação ao bregma e 2,0 mm na direção dorsoventral ao crânio (FRANKLIN; PAXINOS, 2007). A outra extremidade da cânula foi conectada a um cateter de polivinilcloro (DE = 1,14 mm, DI = 0,69 mm) ligado a uma mini-bomba osmótica que permaneceu na região subcutânea, no pescoço do animal. O conteúdo da mini-bomba osmótica foi liberado em um fluxo de 0,11 μ L/h durante 35 dias, de acordo com as instruções do fabricante.

Após o implante, o corte foi suturado e o animal permaneceu em manta aquecida a 25°C em observação até o início de sua recuperação da anestesia (movimentação espontânea). Posteriormente, o animal foi transferido para uma gaiola individual (também mantida a 25°C) até a sua total recuperação.

2.2.16.4 Tratamento

A casca de romã foi administrada na forma de micropartículas na dose correspondente a 800 mg de casca de romã/kg animal/dia de acordo com Choi et al. (2011). A administração das micropartículas foi feita através da ingestão *ad libitum* de água. Para o cálculo da concentração necessária do material na água dos animais, foi acompanhado anteriormente por 8 semanas a ingestão de água de animais do biotério.

Durante 35 dias, o grupo β A + PPE recebeu as micropartículas de extrato de casca de romã, diluída em água, nas quantidades correspondentes a 800 mg de casca de romã/kg de animal/dia.

2.2.16.5 Consumo de água

O consumo de água e de micropartículas de romã foram monitorados semanalmente pesando-se a garrafa de água das caixas dos animais. Como os animais estavam em caixas individuais foi possível verificar o consumo de cada animal separadamente. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão.

2.2.16.6 Atividade motora

Os testes comportamentais dependem de uma adequada atividade motora dos animais para a exploração do local. Desta forma, no início e ao final do experimento foram realizados teste de atividade motora com o intuito de verificar se as respostas comportamentais não ocorreram devido a alterações na locomoção. Este teste foi realizado em Caixa de Atividade Motora Hugo Basili 7420, equipamento constituído por uma caixa de Perspex transparente (35 cm x 23 cm x 20 cm) dotada com um conjunto de sensores de infra-vermelho horizontais que registram a atividade locomotora e um conjunto de sensores verticais para registrar a exploração vertical. Os resultados são simultaneamente impressos via Impressora multifuncional 2600. Neste período, o tempo de imobilidade e *grooming* (limpeza) também foram registrados. Cada animal foi colocado individualmente na caixa e a deambulação foi registrada durante um período de 5 minutos.

2.2.16.7 Teste comportamental

A memória espacial e o aprendizado foram avaliados pelo “Labirinto de Barnes”. Este método se baseia na tendência de roedores em evitar superfícies iluminadas e abertas, buscando abrigo em locais fechados e escuro. Uma vantagem é que este teste não requer alterações na dieta e/ou emissão de choques e também o animal não precisa nadar, sendo menos estressante para o animal (BARNES, 1979).

O protocolo do Labirinto de Barnes inclui uma fase de habituação, na qual o animal é introduzido no ambiente onde a tarefa será realizada, uma fase de aprendizado onde o animal realiza numerosos ensaios para aprender a tarefa, e finalmente, uma fase teste na qual o animal é testado para se lembrar do que tinha sido previamente aprendido. A aquisição na fase de aprendizado é tipicamente avaliada através da diminuição na latência e no número erros antes de encontrar o furo alvo pela primeira vez (ATTAR et al., 2013).

No experimento foi utilizado uma prancha circular branca com 31 buracos distribuídos radialmente, circundada por uma parede escura onde quatro símbolos (cruz, quadrado, círculo e triângulo) amarelos estavam dispostos em sequência. Uma caixa preta com maravalha denominada como caixa de escape foi colocada embaixo de um dos buracos (sempre o mesmo para cada animal e diferente entre os animais). O tamanho dos buracos e o tamanho da caixa de escape eram específicos para camundongos.

O animal foi colocado no centro da prancha, onde permaneceu por 1 minuto em uma caixa de acrílico para reconhecer o ambiente a sua volta. Sobre a prancha foi colocada uma luz (70 W) considerada estímulo incômodo para o roedor. Em seguida, ele foi solto e teve, no máximo, cinco minutos (300 segundos) para encontrar a caixa de escape, onde foi deixado por mais um minuto, com as luzes da sala apagadas e a caixa fechada. Os animais realizavam duas provas por dia, com intervalo de três horas entre cada uma, durante cinco dias. O teste foi realizado no início (aprendizagem da tarefa) e após o período da infusão com o objetivo de analisar se a memória espacial e o aprendizado dos animais foram afetados com o tratamento e também se a ingestão das micropartículas do extrato da casca de romã poderia promover uma melhoria.

Os parâmetros observados no Labirinto de Barnes foram: latência, em segundos, para o animal encontrar a caixa de escape pela primeira vez (tempo inicial); latência, em segundos, para que o animal entre na caixa de escape (tempo final) e número de vezes que o animal introduz a cabeça até o nível das orelhas nos buracos em que não está a caixa de escape antes de encontrar a caixa pela primeira vez (erro inicial).

Adicionalmente também foram analisados: a distância percorrida pelos animais durante o tempo do experimento e o tempo de permanência no quadrante da caixa de escape. Para isto, os testes foram filmados em videocâmera JVC Everio e posteriormente analisados em Smart Software, versão 2.5.21, Panlab Harvard Apparatus localizado no Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Medicina da Santa Casa de São Paulo.

2.2.16.8 Preparo de material biológico

Após 35 dias de tratamento, os animais foram anestesiados com inalação de isoflurano e, em seguida, decapitados para extração do cérebro, sangue, rins e fígado.

As amostras de sangue foram coletadas sem anticoagulante e, após 30 minutos em temperatura ambiente, foram centrifugadas a 2973 G, por 15 minutos a 4°C para coleta do soro.

As amostras de cérebros, rim e fígados foram removidas e imediatamente congeladas em dimetilbutano resfriado em gelo seco (-45°C a -50°C) e armazenadas a -80°C até a data de preparo dos cortes histológicos e análises posteriores.

As áreas cerebrais relacionadas à memória (córtex e hipocampo) de seis animais por tratamento foram separadas e homogeneizadas em tampão de lise contendo 20 mM de Tris-HCl (pH 8), 137 mM NaCl, 10% glicerol, 1% de Triton X-100 e um tablete de coquetel de inibidores de proteases e fosfatases. Os homogenatos foram centrifugados a 2973 G, por 15 minutos, a 4°C e os sobrenadantes foram separados e armazenados a -80°C .

2.2.16.9 Obtenção dos cortes histológicos

Os cortes histológicos congelados ($20\ \mu\text{m}$) dos hemisférios cerebrais foram obtidos em um criostato (Leica CM1850). Para cada tratamento foram utilizados 3 hemisférios direitos e 3 hemisférios esquerdos de diferentes animais. Os cortes transversais seriados, abrangendo toda a extensão no sentido rostro-caudal, foram coletados diretamente em lâminas lisas de vidro (Microscope Slides, $26 \times 76\ \text{mm}$, K5-7105, Kasvi) que haviam sido previamente gelatinadas para melhor aderência dos cortes. Os conjuntos de cortes histológicos foram mantidos a -80°C até a data de uso. A forma de coleta dos cortes histológicos do cérebro está apresentada na Figura 18.

Figura 18 - Esquema representando a forma de coleta dos cortes histológicos do cérebro. Cada coluna (J1 a J7) representa um conjunto de lâminas para uma preparação histológica, contendo amostras de toda a extensão rostro-caudal do cérebro. O número de lâminas mostra a sequência de deposição dos cortes nas lâminas até o término da amostra

2.2.16.10 Avaliação da densidade de placas amiloides

As lâminas armazenadas congeladas, obtidas conforme descrito acima, foram colocadas a temperatura ambiente (22°C) durante 5–10 min. A quantificação de placas amiloides foi realizada segundo Nunes et al., (2015). Lâminas foram lavadas com PBS 5 vezes e incubadas em solução de tioflavina S 0,1% em PBS, contendo 0,1% de Triton, durante 5 minutos. Após isto, as seções foram lavadas duas vezes com PBS, incubadas com etanol 70% durante 5 minutos e lavadas novamente com PBS por mais 2 vezes. Ao término os cortes foram cobertos com lamínula utilizando-se Fluoromount + DAPI (Fluoroshield with DAP, Sigma). Todo o processo foi realizado no escuro (penumbra). A análise foi feita com microscópio ótico (LEICA M7000) localizado no Laboratório de Biologia Celular e Molecular no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) e as placas fotografadas logo após a coloração. As placas foram contadas manualmente, duas lâminas por animal e analisadas dividindo o número de placas pelo número de cortes analisados.

2.2.16.11 Quantificação de proteínas

A partir do sobrenadante do homogenato das áreas cerebrais e do soro foi feita a dosagem da concentração de proteínas utilizando-se o método de Bradford (1976).

2.2.16.12 Quantificação de fator neurotrófico derivado do cérebro

Diante da importância do BDNF (*fator neurotrófico derivado do cérebro*) para a DA, foi realizada a quantificação desta neurotrofina no hipocampo e córtex dos animais. A análise foi realizada no Laboratório de Imagens do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo utilizando-se kit comercial BDNF Emax® ImmunoAssay System (PROMEGA/ref G7611), para detecção sensível e específica de BDNF maduro nas amostras.

As amostras foram diluídas em tampão de bloqueio (“block and sample 1x”, fornecido pelo kit). Inicialmente, uma placa de 96 poços foi revestida com anticorpo anti-BDNF monoclonal (mAb) para ligar o BDNF solúvel ao fundo da placa. Posteriormente, a placa foi preenchida com tampão de bloqueio para bloquear as ligações não específicas. Em seguida, foi preparada uma curva padrão, com o padrão de BDNF fornecido pelo kit, com

concentrações variando entre 7,8 e 500 pg.mL⁻¹. Após aplicar as concentrações do padrão e as amostras teciduais, foi adicionado o anticorpo policlonal de BDNF (pAb) a placa. Então, a placa foi lavada e foram adicionados o anticorpo anti-IgY e o substrato cromogênico tetrametilbenzidina (TMB). A quantidade de BDNF na amostra analítica é proporcional à intensidade de cor gerada na reação de oxidação-redução. A reação foi interrompida com ácido clorídrico 1N e as leituras da absorbância realizadas a 450 nm em leitora de placa Biotek Eon, com software Gen 5 2.0.

2.2.16.13 Avaliação da atividade da acetilcolinesterase

A atividade da AChE foi avaliada no Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo pelo método de ELISA (Abcam-ab138871) com homogenatos de hipocampo e córtex.

O método em questão se baseia na detecção da atividade da AChE que ocorre pela ligação do reagente de Ellman (DTNB) com a tiocolina, reação produzida pela hidrólise da acetilcolina pela enzima AChE. Na realização da análise, em uma placa de 96 poços foi feita a curva padrão com concentrações de AChE de 1 a 1000 um.mL⁻¹ e as amostras teciduais previamente diluídas. Em seguida, foram adicionadas as soluções de acetilcolina e DTNB. As placas foram incubadas a 30 minutos, à temperatura ambiente, e posteriormente, a leitura da atividade da AChE foi realizada em leitora de placas Biotek Eon, com software Gen 5 2.0 a 410 nm.

2.2.16.14 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi mensurada através da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A quantificação dos níveis de TBARS no fígado dos camundongos foi realizada segundo a metodologia de Sorensen e Jorgensen (1996) com modificações defendidas por Ohkawa et al. (1979) referentes ao pH na extração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Ohkawa et al. (1979) observaram que a maior quantidade de MDA detectada pelo método TBARS está no fígado dos animais, por isto, esta área foi aplicada na análise.

Os lipoperóxidos do fígado foram hidrolisados com ácido tricloroacético 20% (Sigma Aldrich), na proporção de 1 g para 5 mL e pH 3,5. O homogenato obtido foi centrifugado a

743,46 G por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante deste homogenato foi utilizado para determinar os níveis de TBARS. Foram pipetados: 5 mL do sobrenadante e 5 mL do TBA (0,02 M). A mistura foi incubada a 99°C por 40 minutos e posteriormente colocada no banho ultrassônico por 10 minutos para eliminação das bolhas. A absorbância das amostras foi lida a 532 e a 600 nm em espectrofotômetro. A curva padrão utilizada foi a de tetraetoxipropano (TEP) nas concentrações de 0 a 1,0068 μmol de TEP e o experimento foi realizado em triplicata. Os resultados foram expressos em μmol malonaldeído (MDA).g⁻¹.

2.2.16.15 Quantificação de SOD

A atividade da enzima SOD foi avaliada em soro, córtex e hipocampo dos camundongos através de kit comercial Cayman's Superoxide Dismutase Assay Kit (Item nº 7066002) - Cayman Chemical Company®.

O kit em questão utiliza o sal tetrazólio para detecção de radicais superóxidos gerados pela xantina oxidase e hipoxantina. A atividade de de três tipos de SOD (Cu/Zn, Mn e FeSOD) foi avaliada pelo kit.

A curva padrão foi construída através do padrão analítico SOD, disponível no kit, diluído de 0 a 0,050 U SOD.mL⁻¹.

Para a realização da análise, 200 μL do "Radical Detector" e 10 μL do padrão analítico e/ou amostras foram pipetados em cada poço. Em seguida, as reações se iniciaram com a adição de 20 μL de xantina oxidase. As placas permaneceram sob agitação (Biomixer, MODELO: TS-2000^a) por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, foram realizadas leituras das absorbâncias a 440 nm.

Os resultados foram calculados com base no cálculo da *Taxa Linear* (LR). Construiu-se um gráfico com a Taxa Linear (LR) do padrão da SOD em função da atividade de SOD (U.mL⁻¹). A atividade da SOD (U.mL⁻¹) das amostras foi calculada usando o *Slope* obtido da regressão linear da curva padrão substituindo o LR obtido para cada amostra. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzimas necessárias para promover 50% da dismutação do radical superóxido.

2.2.16.16 Quantificação de TNF- α

A quantidade de TNF- α no soro, córtex e hipocampo dos camundongos foi avaliada em kit comercial (Biolegend, Mouse TNF- α ELISA MAX Standard Set, Cat. Nº 430901, Lote B192414, San Diego, USA).

As amostras e concentrações da curva padrão foram diluídas em tampão de bloqueio (“Assay Diluent”, fornecido pelo kit). Inicialmente, uma placa de 96 poços foi revestida com anticorpo 100 μ L do anticorpo de captura (Mouse TNF- α ELISA MAX Capture Antibody). Esta microplaca permaneceu incubada entre 2°C e 8°C *overnight*. No dia seguinte, entre cada procedimento, a placa foi lavada 4 vezes consecutivas com solução de lavagem (300 μ L por poço) contendo Tween 20 a 0,05% em PBS (pH 7,4) em uma lavadora de microplacas (BioteK ELx50). Após a primeira lavagem, adicionou-se 200 μ L de Albumina Bovina (BSA 1% em PBS pH 7,4) a cada poço e a placa foi incubada por 60 minutos em um Agitador Kline (Biomixer, MODELO: TS-2000^a) a temperatura ambiente. Em seguida, houve adição de 100 μ L de soluções da curva padrão e/ou amostras, respectivamente. Foi preparada uma curva padrão, com o padrão de TNF- α fornecido pelo kit, com concentrações variando entre 7,8 e 1000 pg/mL. Após aplicar as concentrações do padrão e as amostras teciduais, as placas foram incubadas por 120 minutos a temperatura ambiente e constante agitação (Biomixer, MODELO: TS-2000^a).

Após mais uma sessão de lavagem das placas, os poços receberam 100 μ L do anticorpo de detecção (“Detection Antibody”, fornecido pelo kit) e permaneceram incubadas por mais 60 minutos a temperatura ambiente e constante agitação. Em seguida, adicionou-se a solução de avidina-HRP e incubou-se por mais 60 minutos sob agitação e a temperatura ambiente.

Nesta última etapa foi realizada uma lavagem de cinco vezes consecutivas e posterior adição da solução de substrato de TMB para o desenvolvimento da coloração. As placas foram incubadas no escuro por 30 minutos ou até o desenvolvimento completo da cor. Adicionou-se 100 μ L de uma solução de H₂SO₄ para finalizar a reação. A leitura da absorbância foi realizada a 450 nm e 570 nm dentro dos 15 minutos seguintes em leitor de microplacas.

2.2.16.17 Quantificação dos índices de lesão hepática

A casca de romã é um resíduo agroindustrial que não é comumente consumida pela população. Desta forma, tornou-se necessária a realização de dosagens de marcadores de dano hepático com intuito de verificar se o consumo de compostos presentes na casca de romã durante o período experimental não ocasionou lesão hepática nos animais.

A avaliação hepática mede as respostas às alterações anatomicas ou bioquímicas do fígado (YEN et al., 2005). Dentre os testes utilizados para esta avaliação, pode-se incluir as dosagens de transaminase pirúvica (TGP) e transaminase oxalacética (TGO). Quando o processo de lesão hepática se instala no organismo ocorre um aumento abundante nos níveis plasmáticos de TGP. Por sua vez, a TGO está presente no citoplasma e nas mitocôndrias, portanto sua elevação indica um comprometimento celular ainda mais profundo (SCHUMANN et al., 2002).

A dosagem de marcadores de dano isquêmico hepático, transaminase oxalacética (TGO) e transaminase pirúvica (TGP), foi realizada pelo ensaio enzimático colorimétrico utilizando kit comercial da LaborLab®. Foi realizada a dosagem no soro de todos os animais dos três grupos. Primeiramente, foi adicionada ao soro uma solução de reação, disponível no kit. Posteriormente, os tubos foram incubados a 37°C por 30 minutos para TGP e 60 minutos para TGO. Em seguida, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (modelo Unico® 2800 UV/VIS – Interprise Brasil) a 505 nm.

2.2.17 Análise estatística

As análises químicas dos extratos de polpa e casca de romã foram realizadas em quadruplicata e os resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão. 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 de polpa e casca foram submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando o software SAS (SAS, 2003). Foi verificado se as médias referentes à casca e polpa eram diferentes significativamente pelo teste F ($P < 0,05$).

Os dados do experimento animal foram analisados pelos testes de Variância de duas vias ANOVA (ANOVA), pós-teste de Bonferroni executados pelo software SAS (SAS, 2003). Os dados estão expressos em média $\pm$ S.E.M.

Na elaboração dos gráficos foi utilizado o GraphPad Prism versão 5.01.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Relação polpa e casca

As frutas de romã utilizados apresentaram peso médio de $494,04 \pm 18,01$ g, sendo que a polpa corresponde a $56,87 \pm 4,07\%$ do peso da fruta enquanto a casca a $43,13 \pm 3,64\%$. A casca representa uma porção significativa da fruta e atualmente é descartada pelos consumidores e pela indústria de alimentos.

A comunidade científica tem estudado a composição de resíduos agroindustriais brasileiros com o intuito de que estes sejam adequadamente aproveitados (MELO et al., 2015; GÓMEZ et al., 2016). É válido ressaltar que os resíduos agroindustriais possuem quantidades consideráveis de substâncias bioativas, reconhecidas por suas propriedades promotoras de saúde e aplicações tecnológicas como antioxidantes sendo que algumas também são utilizadas como corantes alimentares (STOCKHAMMER et al., 2009). Além disso, atualmente existe uma tendência do consumidor para ingredientes naturais que apresentem alguma relação com a saúde e também têm certa preferência para a produção de ingredientes a partir de fontes sustentáveis.

Gulon et al. (2015) defendem que a cada 100 kg de romã processados são gerados 37 kg de resíduos, sendo 23 kg referentes a casca e 14 kg a semente e, a partir destes resíduos, podem ser recuperados 180 g de fenólicos microencapsulados para cada 23 kg de casca e 2 kg de óleo para cada 14 kg de semente.

2.3.2 Quantificação de compostos fenólicos totais

Os extratos aquoso-alcoólicos (20:80 v/v), apresentados na Figura 19, representaram uma alternativa viável de extração de compostos fenólicos presentes na romã.

Figura 19 - Extratos de polpa (A) e casca (B) de romã

O extrato da casca da romã apresentou uma quantidade significativamente ($P < 0,0001$) superior de compostos fenólicos totais ($21,25 \pm 0,16$ mg de ácido gálico. g^{-1}) em relação ao extrato da polpa ($1,04 \pm 0,01$ mg de ácido gálico. g^{-1}). Inúmeros estudos relatam que as cascas de frutas apresentam maior quantidade de compostos fenólicos em relação às polpas (TEHRANIFAR et al., 2011; YEDDES et al., 2014; MADEIRA; MACEDO, 2015). Possivelmente isto ocorre porque os compostos fenólicos são metabólitos secundários que estão envolvidos na defesa da planta contra a radiação ultravioleta ou agressão por agentes patogênicos e ficam mais concentrados na casca das frutas (CAZARIN et al., 2014; DÍAZ-DE-CERIO et al., 2016).

Artik et al., (1999) avaliaram o teor de compostos fenólicos no suco extraído da polpa de sete variedades de romã e constataram valores que variaram de 1,864 a 3,803mg de ácido gálico. mL^{-1} de suco. Não obstante, Gómez-Caravaca et al. (2013) descreveram que o conteúdo de fenólicos quantificados na polpa de 12 variedades de romã oscilaram entre 0,580 mg. mL^{-1} e 2,551 mg. mL^{-1} . Os resultados obtidos para a polpa de romã no presente trabalho estão dentro destes intervalos descritos anteriormente.

Vários trabalhos ao compararem o conteúdo de compostos fenólicos na polpa e casca de romã também observaram que a casca apresenta uma quantidade de compostos fenólicos entre 10 a 20 vezes superior à polpa (SALGADO et al., 2012; LI et al., 2006; GUO et al., 2013; ROSENBLAT et al., 2006).

Li et al. (2006) defendem que, apesar da diferença, a polpa da romã ainda pode ser considerada um alimento rico em compostos fenólicos e, conseqüentemente, com expressiva capacidade antioxidante.

Na última década, a romã têm sido estudada pelos seus efeitos protetores em inúmeras doenças crônicas como Alzheimer, câncer, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (AKHTAR et al., 2015). Estes efeitos preventivos possivelmente são desencadeados pela elevada atividade antioxidante da fruta, sendo os compostos fenólicos os principais responsáveis por esta atividade (OZGEN et al., 2008; BOROCHOV-NEORI et al., 2009; CHANDRASEKARA; SHAHIDI, 2011).

A quantidade de compostos fenólicos dos extratos de frutas normalmente está diretamente relacionada à sua atividade antioxidante, uma vez que os compostos fenólicos costumam ser os principais responsáveis pela atividade antioxidante. No entanto, isto não é uma equivalência, pois outros compostos de característica estrutural não fenólica podem contribuir significativamente com a atividade antioxidante dos extratos.

Desta forma, a quantificação de compostos fenólicos totais demonstrou que as cascas de romã apresentam quantidades significativas destas substâncias, o que sugere grande potencial de utilização destes resíduos.

2.3.3 Quantificação de flavonoides totais

Conforme já era esperado, o extrato da polpa apresentou quantidade significativamente ($P < 0,0001$) inferior de flavonoides ($0,12 \pm 0,02$ mg quercetina g^{-1}) em relação à casca ($7,60 \pm 0,12$ mg quercetina g^{-1}). Estes dados confirmam os resultados já obtidos para compostos fenólicos totais, mostrando que os flavonoides, principais compostos fenólicos em frutas, também estão em maior quantidade na casca.

2.3.4 Perfil de compostos não voláteis

A romã tem se mostrado uma excelente fonte de compostos bioativos. O uso da Cromatografia Gasosa acoplada com Espectrometria de Massas (CG-EM) permite a obtenção de informações sobre o peso molecular e características estruturais dos compostos presentes nas amostras, tornando-se uma ferramenta essencial na determinação do perfil químico das diferentes frações da romã. A técnica CG-EM têm sido muito empregada na análise de componentes como ácidos fenólicos e flavonoides, conforme mostrado nos trabalhos feitos por Steingass et al. (2015); Othman et al. (2015); Zadernowski et al. (2005) e Zuo et al. (2002).

A análise em CG-EM possibilitou a identificação de 19 compostos, dentre os 38 detectados na casca de romã. Na polpa, foram identificados 17 dos 37 compostos detectados.

Os cromatogramas obtidos dos extratos de casca e polpa de romã estão apresentados nas Figuras 20 e 21.

Figura 20 - Perfil cromatográfico da casca de romã obtido em CG-EM

Figura 21 - Perfil cromatográfico da polpa de romã obtido em CG-EM

Os compostos identificados nos extratos de casca e polpa de romã estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Tempo de Retenção (TR), Área do pico e relação m/z dos principais íons detectados na análise de compostos não voláteis encontrados no extrato de casca e polpa de romã analisados por CG-EM

Pico	Composto	TR (min)	AREA (%)	Íon (m/z)
Casca				
3	Ácido pelargônico	13,58	0,07	117; 215; 129; 41
4	Ácido palmitoleico	14,32	0,19	55; 83; 69; 41; 43; 111
7	Ácido adípico	17,25	0,50	111; 75; 141; 147; 217; 275
8	Ácido piroglutâmico	17,76	0,37	156; 147; 45; 258; 230; 239
11	Ácido benzóico	20,06	0,61	223; 267; 193; 129; 268; 269; 282; 283
13	Ácido manônico	21,19	1,45	217; 147; 129; 75; 219; 271; 378
18	Ácido tereftálico	23,62	0,47	295; 103; 251; 221; 73
19	Ácido azelaico	23,70	0,45	149; 55; 117; 129; 217; 225; 317
20	Ácido mirístico	24,65	0,30	117; 73; 285; 132; 145
23	Ácido <i>p</i> -cumárico	26,74	0,45	293; 219; 249; 117; 308
24	Ácido gálico	27,39	23,98	281; 458; 460; 45; 443; 503; 355; 399
26	Ácido palmítico	28,82	3,02	117; 313; 132; 145; 269; 285; 309; 328
27	Ácido ferúlico	29,44	0,27	149; 71; 43; 55; 237
29	Ácido linoleico	32,05	1,05	81; 55; 129; 117
30	Ácido oleico	32,14	2,58	117; 129; 55; 339
31	Ácido esteárico	32,61	0,67	117; 341; 129; 145
32	Ácido cítrico	33,04	0,20	185; 129; 259; 43; 57
35	Epicatequina	46,62	7,54	368; 267; 650; 179
38	β -sitosterol	53,27	3,83	207; 129; 281; 396
Polpa				
3	Ácido fosfórico	11,67	2,76	299; 73; 147; 314; 45
5	Ácido tiomálico	17,01	0,12	73; 147; 233; 133; 55
6	Ácido adípico	17,24	0,31	73; 111; 141; 55; 83
7	Ácido piroglutâmico	17,75	0,75	156; 73; 147; 45; 258
10	Ácido manônico	21,18	0,96	73; 217; 147; 75; 129
14	Ácido fitálico	23,61	0,14	295; 73; 103; 251; 221
15	Ácido azelaico	23,69	0,45	73; 149; 55; 317; 117
18	Ácido mirístico	24,65	0,20	73; 117; 285; 132; 217
19	Ácido <i>p</i> -cumárico	26,73	0,40	73; 293; 219; 305; 249
20	Ácido gálico	27,37	6,06	281; 147; 73; 458; 460
21	Ácido palmitelaídico	28,30	0,14	117; 75; 96; 84; 129

Embora seja uma análise qualitativa, é possível perceber a diversidade em compostos fenólicos e derivados tanto na polpa, quanto na casca da romã. O método e o solvente usado para a elaboração dos extratos se limitava a isolar compostos fenólicos e derivados, no entanto, inúmeros compostos hidrofóbicos como ácido oleico, linoleico e o β -sitosterol foram identificados nos extratos de polpa e casca de romã.

Rosenblat et al. (2013) detectaram a presença de 115 µg de β-sitosterol por g de suco de romã concentrado. Promprom et al. (2010) também detectaram o composto β-sitosterol no perfil químico de extrato de romã analisado em CG-EM.

Os principais compostos fenólicos encontrados no extrato de casca e de polpa de romã foram: ácido p-cumárico, ácido gálico, ácido ferúlico e epicatequina. O perfil cromatográfico dos extratos não apresentou diferença quanto aos compostos elucidados, no entanto, é possível verificar que a casca de romã apresenta uma quantidade superior da maioria destes compostos em relação à polpa.

Conforme pode ser observado ao comparar os cromatogramas obtidos, a casca de romã apresentou um elevado teor de ácido gálico (pico 24) em relação à polpa (pico 20). Liu et al. (2013) relataram que o ácido gálico foi o componente mais ativo do extrato de semente de uva na inibição da formação de placas senis.

Ao analisar os cromatogramas obtidos dos extratos de casca e polpa de romã, nota-se que ambas as amostras apresentaram picos proeminentes do flavonoide epicatequina. Este composto é determinante na expressão da atividade antioxidante das amostras analisadas.

A atividade antioxidante de um composto é influenciada pelo número de grupos hidroxila e seu arranjo na molécula. A epicatequina possui cinco hidroxilas distribuídas em uma estrutura orto-dihidroxil (catecol no anel B) que contribui para o deslocamento de elétrons, o que confere alta estabilidade a molécula e torna a estrutura mais ativa em doar átomos de hidrogênio para os radicais livres (LAFKA; SINANOGLU; LAZOS, 2007). A epicatequina caracteriza-se, assim, por ser uma substância de significativo poder antioxidante.

Os compostos separados e não identificados na análise por CG-EM correspondem a uma elevada porcentagem da área relativa. Diante disto, estudos mais aprofundados de elucidação estrutural e identificação precisam ser realizados, pois estes compostos podem contribuir significativamente com a atividade antioxidante e/ou serem compostos fenólicos.

Na análise por CG-EM, diferente do esperado, os compostos fenólicos não foram as principais moléculas identificadas. Esta informação demonstra, de certa forma, que para os extratos de polpa e casca de romã a etapa de purificação dos extratos por SPE possivelmente não foi seletiva e eficaz na concentração destes compostos. No entanto, ainda que tenham ocorrido estas limitações, o emprego de CG-EM foi útil para a identificação do perfil químico dos extratos e para determinação das análises posteriores.

2.3.5 Quantificação de punicalagina

Os taninos, principalmente a punicalagina, representam uma classe de compostos bioativos da romã, concentrando-se em maior parte na casca. A punicalagina é um tanino hidrolisável (elagitanino), peculiar da fruta de romã, com reconhecidas atividades antioxidante, anti-inflamatória e antiproliferativa (SEERAM et al., 2005).

A quantificação de punicalagina nos extratos de polpa e casca de romã foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência e as variáveis encontradas e calculadas a partir das curvas padrões estão apresentadas na Tabela 3 e 4.

Tabela 3 - Valores de Tempo de retenção (TR), comprimento de onda (λ), limite de quantificação (LOQ), limite de detecção (LOD), equação e linearidade (R^2) do padrão analítico de punicalagina

	TR Min	λ nm	LOD mg	LOQ mg	Equação	R^2
Punicalagina α	12,76	260	$6,25 \cdot 10^{-6}$	$1,89 \cdot 10^{-5}$	$y = 2 \cdot 10^9 x - 495492$	0,992
Punicalagina β	14,33	260	$1,51 \cdot 10^{-4}$	$4,59 \cdot 10^{-4}$	$y = 4 \cdot 10^9 x - 1 \cdot 10^6$	0,988

Na separação e identificação por cromatografia a punicalagina se apresenta com dois picos, sendo um semelhante ao outro em relação ao espectro na região de UV. Este fato indica que os compostos são isolados sob a forma de anômeros (punicalaginas α e β), portanto os dois picos são pertencentes a uma única substância. As concentrações de punicalagina (α e β) nos extratos de polpa e casca de romã estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Conteúdo de punicalagina nos extratos de polpa e casca de romã

Punicalagina α			
	TR	Area	Conteúdo (mg g ⁻¹)
Polpa	12,81	1044973	0,06±0,002
Casca	12,70	14905312	7,50±0,11
Punicalagina β			
	TR	Area	Conteúdo (mg g ⁻¹)
Polpa	14,38	2012680	0,060±0,0036
Casca	14,29	30019010	6,24±0,0072
Punicalagina total ($\alpha + \beta$) (mg g⁻¹)			
Casca			13,74
Polpa			0,12
F-test			P < 0,0001

A punicalagina apresentou-se em uma concentração em torno de 100 vezes superior na casca da romã em relação à polpa. Esta diferença na concentração possivelmente contribuiu para a elevada capacidade antioxidante apresentada pela casca em relação a polpa.

A identificação e quantificação de punicalagina por cromatografia mostrou-se um método eficaz e satisfatório para extratos de casca e polpa de romã.

2.3.6 Determinação de conteúdo e perfil de compostos fenólicos

Os compostos fenólicos identificados e quantificados por cromatografia estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Quantificação de compostos fenólicos nos extratos de polpa e casca de romã

Compostos	Conteúdo		Parametros de validação				
	Polpa	Casca	TR (min)	λ (nm)	LOD (mg)	LOQ (mg)	R ²
<i>Ácidos hidroxibenzoicos</i> (mg.100 mL ⁻¹)							
Gálico	18,63	94,86	4,38	280	2,24.10 ⁻⁶	6,80.10 ⁻⁶	0,9997
Rutina	0,87	13,30	39,43	280	6,48.10 ⁻⁶	1,96.10 ⁻⁵	0,9994
p-cumárico	0,62	2,17	31,36	280	1,39.10 ⁻⁵	4,22.10 ⁻⁵	0,9965
Ferúlico	1,28	9,64	34,23	280	3,49.10 ⁻⁷	1,06.10 ⁻⁶	1
Sinápico	n.d.	n.d.	35,48	280	6,26.10 ⁻⁶	1,90.10 ⁻⁵	0,9992
<i>Flavan-3-ol</i> (mg.100 mL ⁻¹)							
Epicatequina	1,79	18,54	25,70	370	5,53.10 ⁻⁶	1,67.10 ⁻⁵	0,9866
<i>Antocianinas</i> (mg.100 mL ⁻¹)							
Cianidina-3,5-diglucosideo	5,59	23,58	3.0	520	0,178	0,594	0,9983
Delfinidina 3-glucosideo	9,43	50,65	3.9	520	1,160	3,867	0,9944
Pelargonidina 3,5-diglucosideo	0,87	8,08	4.4	520	0,422	1,408	0,9937
Cianidina 3-glucosideo	0,75	22,83	4.9	520	0,169	0,565	0,9987
Pelargonidina 3-glucosideo	0,17	10,72	5.3	520	0,047	0,157	0,9923

Os resultados obtidos confirmam que a casca de romã, em geral, apresentou uma quantidade superior de compostos fenólicos em relação à polpa.

Os principais compostos fenólicos encontrados nos extratos foram ácido gálico, epicatequina e rutina. A capacidade antioxidante de um composto é influenciada pelo número

de grupos hidroxila e sua distribuição na molécula. A epicatequina apresenta cinco agrupamentos hidroxila distribuídos em uma estrutura orto, o que contribui para uma expressiva atividade antioxidante (LAFKA, SINANOGLU; LAZOS, 2007).

O conhecimento do perfil de compostos fenólicos dos extratos é essencial, pois possibilita identificar quais os compostos que possivelmente contribuem de modo significativo para a atividade biológica destes alimentos.

2.3.7 Determinação do conteúdo e perfil de antocianinas

A concentração das principais antocianinas está descrita na Tabela 5. Os extratos analisados apresentaram elevadas concentrações de antocianinas. As antocianinas são potentes agentes antioxidantes e anti-inflamatórios que podem auxiliar na prevenção e/ou redução de risco de inúmeras doenças crônicas não transmissíveis como a DA (REHMAN et al., 2016), cardiovascular (WALLACE; SLAVIN; FRANKENFELD, 2016), depressão (NABAVI et al., 2015) e câncer (SEERAM et al., 2006).

Dentre os compostos identificados e quantificados, a delfinidina-3-glicosídeo está presente em maior quantidade em relação as outras antocianinas. As delfinidinas são as antocianinas com maior poder antioxidante devido ao elevado número de grupos hidroxila no anel B (WATSON; SCHONLAU, 2015; LEE et al., 2015).

Os benefícios ao organismo das antocianinas presentes na romã podem ser associados ao seu efeito antioxidante. Cianidina e delfinidina apresentam atividade antioxidante superior à vitamina C (KIM; LEE, 2004).

O perfil de antocianinas encontrado nos extratos foi semelhante aos dados publicados anteriormente por Alighourchi e Barzegar 2009.

2.3.8 *Screening* da Atividade antioxidante

Devido às elevadas concentrações de antioxidantes nos extratos analisados, várias diluições foram desenvolvidas para ajustar os resultados na faixa da absorbância da curva de calibração para a quantificação da amostra. Para a análise de DPPH, ABTS, ORAC e FRAP as diluições do extrato de casca de romã foram: 1/1500; 1/500, 1/5000 e 1/500 respectivamente. As diluições para o extrato de polpa de romã nos ensaios de DPPH, ABTS, ORAC e FRAP foram: 1/100; 1/10, 1/200 e 1/50 respectivamente.

A capacidade antioxidante dos extratos de casca e polpa de romã avaliada por diferentes métodos analíticos estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Atividade antioxidante de extrato de polpa e casca de romã

Extratos	DPPH ($\mu\text{M Trolox.g}^{-1}$)	ABTS ($\mu\text{M Trolox.g}^{-1}$)	FRAP ($\mu\text{M Sulfato Ferroso.g}^{-1}$)	ORAC ($\mu\text{M Trolox.g}^{-1}$)
Polpa	108,34 $\pm$ 5,95 ^a	91,42 $\pm$ 4,22 ^a	323,8 $\pm$ 10,28 ^a	2,47 $\pm$ 0,12 ^a
Casca	2371,64 $\pm$ 30,47 ^b	4438 $\pm$ 33,24 ^b	7423 $\pm$ 180,44 ^b	56,51 $\pm$ 5,90 ^b

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

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 tem sido amplamente recomendado (OZTURK, 2012; BACHIEGA et al., 2016).

Compostos antioxidantes específicos podem responder de uma forma diferente para variadas fontes de radicais e consequentemente para diferentes metodologias de medida de atividade antioxidante. Embora os dois ensaios apresentem o mesmo princípio, os estudos apontam que 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 à 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).

Thaipong et al., (2006) estimaram a atividade antioxidante em frutas de goiaba utilizando quatros métodos de avaliação da atividade antioxidante (DPPH, ABTS, FRAP e ORAC). Os resultados indicaram que a metodologia FRAP foi mais reprodutível, simples e rápida. No entanto, a técnica ORAC é mais relevante uma vez que utiliza um radical livre comum do corpo humano.

Conforme pode ser observado na Tabela 6, a atividade antioxidante da casca de romã foi superior a da sua polpa em todas as metodologias aplicadas, demonstrando que, assim como grande parte dos vegetais consumidos, a fração vegetal de maior bioatividade é descartada durante o consumo.

Outras pesquisas também mostraram que a atividade antioxidante da casca de romã (68,3% de redução DPPH em 10 ppm) foi maior do que as de suas sementes (0,2% de redução DPPH em 10 ppm) e de sua polpa (0,8% de redução DPPH em 10 ppm) (SALGADO et al.,

2012). Guo et al. (2003) analisaram a atividade antioxidante de diferentes frações (sementes, polpas e cascas) de 28 frutas comumente consumidas na China através do método FRAP. Os resultados indicaram que a casca de romã teve a maior atividade antioxidante entre os 28 tipos de frutas. A elevada atividade antioxidante de casca de romã mensurada pelos métodos de ABTS e FRAP também foi reportada por Fisher et al. (2011). A casca de romã é uma rica fonte de antioxidantes naturais e são necessários estudos mais aprofundados que visem aproveitar este potencial.

Os dados da atividade antioxidante são consistentes com a quantidade elevada de compostos fenólicos presentes na casca da romã, 95% superior ao total encontrado na polpa. Os dados obtidos para punicalagina, ácido gálico e epicatequina e antocianinas também podem justificar esta diferença.

O elevado teor de compostos antioxidantes reflete um grande potencial desta fruta, principalmente da sua casca, na prevenção de doenças crônicas não transmissíveis, uma vez que as evidências científicas apontam que o estresse oxidativo em sistemas biológicos, resultante da prevalência 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, o que evidencia que a incidência destas doenças está intimamente relacionada à prevalência destas substâncias reativas no organismo. Neste cenário, compostos antioxidantes desempenham papel crucial na prevenção e/ou redução de risco dessas doenças, atuando como neutralizadores de radicais livres, para diminuir assim a extensão dos danos oxidativos (RAUTER et al., 2012; SHAIDI; ZHONG, 2015).

Adicionalmente, a expressiva atividade antioxidante da casca de romã a torna um ingrediente natural interessante para a indústria de alimentos. Ismail et al., (2014) utilizaram a casca de romã como ingrediente para enriquecer nutricionalmente cookies. A suplementação dos cookies com casca de romã aumentou o teor de fibra alimentar, fenóis totais e minerais (Ca, K, Fe e Zn). Os compostos fenólicos da casca de romã contribuíram na redução da degradação oxidativa durante os quatro meses de armazenamento. Por fim, o estudo sugere a suplementação de produtos de panificação com casca de romã como uma fonte potencial de micro e macronutrientes.

2.3.9 *On line* HPLC-DAD-ABTS

Inúmeros testes foram realizados a fim de melhorar a separação dos compostos nos extratos de casca e polpa da romã. A utilização de maior quantidade de ácido fórmico, utilizado por Gullon et al. (2016), promoveu melhor separação dos compostos no cromatograma, no entanto, nos testes foi possível verificar que o ácido fórmico a 4,5% interagiu negativamente com o ABTS causando alteração nos resultados da análise de atividade antioxidante.

Os extratos de polpa e casca de romã foram avaliados através da técnica HPLC-DAD-ABTS e os resultados estão apresentados nas Figuras 22 e 23 e Tabela 7.

Figura 22 - Cromatogramas obtidos do extrato bruto da casca de romã (A) 370 nm (B) 280 nm e (C) 734 nm

Figura 23 - Cromatogramas obtidos do extrato bruto da polpa de romã (A) 370 nm (B) 280 nm e (C) 734 nm

Tabela 7 - Atividade antioxidante HPLC-ABTS on line da casca e polpa de romã

Sample	Pico	TR (min.)	Área	Atividade antioxidante ($\mu\text{mol Trolox/g}$)	Atividade antioxidante (%)
<i>Casca</i>					
	1	6,79	1030682	$164,85 \pm 16,29^{e,f}$	3,39
	2	7,54	317835	$64,22 \pm 4,60^g$	1,30
	3	9,28	52803	$78,28 \pm 6,56^g$	1,60
	4	10,87	348504	$59,03 \pm 8,35^g$	1,19
	5	13,26	592749	$104,96 \pm 2,01^{f,g}$	2,15
	6	14,90	1342863	$210,72 \pm 19,10^e$	4,34
	7	16,73	5449118	$860,62 \pm 20,24^c$	17,87
	8	19,61	6675222	$1129,73 \pm 43,90^b$	23,47
	9	21,5	3167331	$545,53 \pm 23,17^d$	11,31
	10	22,81	8007970	$1324,98 \pm 49,59^a$	27,53
	11	25,62	513839	$103,34 \pm 12,04^{f,g}$	2,11
	12	30,56	58383	$124,19 \pm 8,20^{f,g}$	2,54
	13	44,93	304462	$65,14 \pm 4,73^g$	1,31
<i>Polpa</i>					
	1	15,25	1509235	$124,04 \pm 3,28^c$	14,73
	2	15,98	316421	$31,61 \pm 1,48^{e,f}$	3,63
	3	17,05	375364	$35,31 \pm 1,24^e$	4,19
	4	18,31	911987	$78,62 \pm 1,55^d$	9,18
	5	19,20	288373	$29,38 \pm 0,57^f$	3,38
	6	21,01	3662238,5	$299,09 \pm 0,86^a$	34,76
	7	23,36	1413852,3	$119,59 \pm 1,34^c$	13,85
	8	24,62	1676833	$140,04 \pm 2,33^b$	16,28

Na casca de romã, 13 compostos contribuíram para a atividade antioxidante mensurada pela técnica HPLC-ABTS. Os compostos 7, 8, 9 e 10 apresentaram elevada capacidade de sequestro do radical ABTS, e os picos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 11, 12 e 13 exibiram baixa capacidade de absorção do radical livre conforme pode ser observado na Figura 24.

Figura 24 - Capacidade antioxidante ($\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$) dos picos separados no extrato de casca de romã por HPLC-DAD-ABTS *on line*

O composto 10 ($T_r = 22,81$) apresentou maior área no pico cromatográfico a 734 nm e consequentemente maior atividade antioxidante ($1324,98 \pm 49,60 \mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$), sendo responsável por 27,57% da atividade antioxidante total calculada. Com a utilização de padrão analítico, este composto foi identificado como punicalagina β .

O composto 8 ($T_r=19,61$) também apresentou elevada capacidade antioxidante ($1129,73 \pm 43,90 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$) e corresponde a punicalagina α . Este composto apresenta absorção máxima a 370 nm, o comprimento de onda máximo para punicalagina (Santiago et al., 2014).

Borges, Mullen e Crozier (2010) avaliaram a capacidade antioxidante de um suco de romã pelo sistema HPLC-DAD-ABTS *on line* e também descrevem a punicalagina (isômeros α e β) como as principais responsáveis pela atividade antioxidante.

Shirode et al. (2015) observaram que os elagitaninos são os polifenóis mais bioativos da romã, sendo que a punicalagina é o principal deles. Este composto é responsável por mais de metade da capacidade antioxidante total do suco (JOHANNINGSMEIER;

HARRIS, 2011; GIL et al., 2000). Os extratos analisados de polpa e casca de romã, conforme já apresentado anteriormente, são fontes de punicalagina com teores $0,12 \text{ mg g}^{-1}$ e $14,60 \text{ mg g}^{-1}$, respectivamente.

No entanto, a punicalagina é um composto instável e altamente susceptível a hidrólise espontânea e enzimática que não é absorvido na sua forma intacta, mas sim hidrolisado a outros compostos. Trata-se de um elagitanino de alto peso molecular (MW maior que 1000 Da) que é normalmente hidrolisado para compostos estruturalmente relacionados, tais como punicalina (MW de 782 Da), ácido galágico (MW de 638 Da), ácido gálico (MW de 170 Da) e ácido elágico (MW de 302 Da). Por isto, estes metabolitos são comumente encontrados em extratos e sucos a base de romã, mas em concentrações em torno de 10 vezes mais baixas que a punicalagina. (SEERAM et al., 2005). Possivelmente estes compostos correspondem aos picos pequenos e de baixa atividade antioxidante apresentados nos cromatogramas.

O composto 7 ($T_r = 16,73$) também contribuiu significativamente com a atividade antioxidante, sendo responsável por 17,87% da atividade antioxidante total calculada. Este pico corresponde ao ácido gálico.

O pico 9 ($T_r = 21,5$), correspondente ao composto fenólico epicatequina, foi responsável por cerca de 11,31% da atividade antioxidante total calculada. A epicatequina tem sido amplamente estudada devido ao seu elevado potencial antioxidante.

Nos extratos de polpa de romã a análise de atividade antioxidante pelo sistema *on line* identificou 8 picos com atividade de sequestro do radical livre ABTS. Dentre estes compostos, foi possível notar que os picos 2, 3, 4 e 5 não apresentaram expressiva capacidade antioxidante enquanto os compostos correspondentes aos picos 1, 6, 7 e 8 foram os principais responsáveis pela atividade de sequestro de radicais livres da polpa conforme pode ser observado na Figura 25.

Figura 25 - Capacidade antioxidante ($\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$) dos picos separados no extrato de polpa de romã em HPLC-DAD-ABTS

O composto 6 ($T_r = 21,01$) apresentou maior área no pico cromatográfico a 734 nm e consequentemente maior atividade antioxidante ($298,98 \mu\text{mol Trolox/g}$), sendo responsável por 34,76% da atividade antioxidante total calculada. No entanto, este composto não é o que apresenta maior área a 370 nm. Sabe-se que a participação dos compostos de forma individual na atividade antioxidante total da amostra está relacionada não somente à quantidade, mas principalmente à estrutura química do composto, mais especificamente ao número de hidroxilas. Desta forma, alguns compostos podem estar presentes em maiores quantidades e apresentarem composição antioxidante inferior aos outros que estão em menores quantidades no alimento. Este composto foi identificado como a punicalagina β .

O composto 8 ($T_r = 24,62$) foi identificado como punicalagina α e contribuiu significativamente com a atividade antioxidante total da polpa de romã, perfazendo cerca de 16,3% da atividade total.

O pico 1 ($T_r = 15,25$) contribuiu significativamente (14,73%) com a capacidade antioxidante total e foi identificado como ácido gálico. O composto que correspondia ao pico 7 era a epicatequina. Não diferindo significativamente do pico 1, o pico 7 foi responsável por cerca de 13,85% da atividade antioxidante total.

Os compostos que contribuíram significativamente com a atividade antioxidante da polpa e da casca foram a punicalagina, ácido gálico e epicatequina. Estes compostos são

excelentes antioxidantes e apresentam inúmeras benefícios a saúde (DENG et al., 2013; LUO et al., 2014).

Os resultados obtidos demonstram também que a casca apresenta uma maior capacidade antioxidante em relação à polpa devido a uma elevada quantidade de compostos fenólicos, especialmente punicalagina, ácido gálico e epicatequina, confirmando os dados já obtidos nos ensaios de avaliação da capacidade antioxidante *in vitro*. Os dados encontrados reforçam a hipótese de que a casca de romã precisa ser melhor explorada quanto à atividade biológica destes compostos nas determinadas doenças crônicas, especialmente a DA.

2.3.10 Inibição de acetilcolinesterase

Para o extrato da polpa da romã foram testadas as seguintes diluições: 1000 mg.mL⁻¹, 900 mg.mL⁻¹, 800 mg.mL⁻¹, 700 mg.mL⁻¹, 600 mg.mL⁻¹, 500 mg.mL⁻¹, 400 mg.mL⁻¹, 200 mg.mL⁻¹ e 100 mg.mL⁻¹.

A curva de inibição foi traçada a partir das porcentagens de inibição encontradas para as diluições testadas plotando a % de inibição *versus* a concentração do extrato inibidor presente nas soluções do ensaio. A partir do gráfico de inibição, a equação da reta foi determinada ($y = 0,0505x + 2,8448$) e o valor de IC₅₀ 933,76 mg/mL obtido para o extrato de polpa de romã. Os resultados indicaram que o extrato de polpa de romã apresentou atividade anticolinesterásica de forma dose-dependente. No entanto, a atividade pode ser considerada relativamente baixa (ADSERSEN et al., 2006).

Para o extrato de casca de romã foram preparadas as seguintes diluições: 50 mg mL⁻¹; 40 mg mL⁻¹; 30 mg mL⁻¹, 20 mg mL⁻¹, 10 mg mL⁻¹, 5 mg mL⁻¹, 3 mg mL⁻¹ e 1 mg mL⁻¹.

A partir das porcentagens de inibição para as diferentes concentrações de extrato de casca de romã encontradas foi obtida a curva de inibição plotando a % de inibição *versus* a concentração do extrato inibidor presente nas soluções do ensaio. A equação da reta referente ao extrato de casca de romã foi determinada ($y = 0,9386x + 30,429$) e o valor de IC₅₀ 20,85 mg.mL⁻¹ foi obtido. O extrato de casca de romã apresentou uma expressiva atividade anticolinesterásica de forma dose-dependente, o que desperta o interesse como um agente anticolinesterásica a ser utilizado na possível prevenção e/ou redução de risco da DA.

Extratos vegetais com potencial anticolinesterásico descritos como altos são aqueles que apresentam porcentagens de inibição maiores do que 50%, enquanto os com atividade baixa a moderada apresentam porcentagens de inibição entre 15 a 50%. Atividades até 15%

podem ser considerados resultados falso-positivos (ADSERSEN et al., 2006; INGGANINAN et al., 2003; KHALID et al., 2004; ORHAN et al., 2004, TREVISAN et al., 2003). Neste sentido, o extrato de casca de romã apresentou até 75% de inibição na concentração de 50 mg mL⁻¹ e pode ser considerado um potencial agente anticolinesterásico.

A ingestão de 20,85 mg de extrato de casca de romã seria capaz de inibir 50% da atividade da enzima AChE, fato que indica que o consumo deste extrato de forma regular possivelmente evitaria o acúmulo excessivo de AChE no organismo.

Inúmeras pesquisas têm explorado diferentes alimentos e extratos vegetais quanto à sua atividade anticolinesterásica. Bekir et al., (2013) avaliaram o potencial anticolinesterásico de extratos com diferentes polaridades (hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol e metanol) obtidos a partir de folhas de *Punica granatum*. Os resultados indicaram que os extratos de folha de romã apresentaram atividade anticolinesterásica, sendo que as maiores atividade de inibição de acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE) foram obtidos para o extrato de etanol, o mesmo solvente aplicado neste trabalho. As atividades biológicas encontradas são importantes e mostraram que as folhas podem ser uma fonte potencial de moléculas ativas destinadas a aplicações na indústria farmacêutica. No entanto, experimentos *in vivo* ainda são necessários.

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 de casca e polpa de romã.

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. Estes valores de IC₅₀ são superiores aos encontrados para os extratos a base de romã.

Alguns compostos específicos, com destaque para os flavonoides e os alcaloides, têm apresentado atividade anticolinesterásica comprovada e, possivelmente, são os responsáveis pela atividade detectada.

Os resultados indicaram que a casca de romã apresenta potencialidade na inibição de AChE e consequentemente pode atuar como um agente terapêutico na prevenção da DA.

A utilização de alimentos com atividade anticolinesterásica como parte da dieta usual para a prevenção da DA é interessante, uma vez que os medicamentos utilizados no tratamento da doença com este princípio apresentam custo elevado, problemas relacionados à

biodisponibilidade e efeitos colaterais como distúrbios gastrointestinais (MUKHERJEE et al., 2007; SCHULZ, 2003).

2.3.11 Experimento animal

2.3.11.1 Observações gerais

A fim de confirmar os resultados satisfatórios apresentados nos ensaios *in vitro* pela casca de romã, realizou-se um ensaio *in vivo* no qual foram avaliados o comportamento e marcadores moleculares relacionados à DA.

O consumo de água com ou sem micropartículas de extrato da casca de romã foi registrado semanalmente e expresso em média $\pm$ SEM. Não houve diferença significativa ($P = 0,13$) quanto a quantidade média de água total consumida durante as quatro semanas entre os grupos Ctrl ($47,66\pm 1,70$ mL), β A ($47,76\pm 1,48$ mL) e β A+PPE ($48,61\pm 1,84$ mL). Não foi detectada diferença significativa ($P = 0,88$) também no consumo de água por dia entre os grupos. Os animais do grupo Ctrl, β A e β A+PPE consumiram por dia aproximadamente $6,80\pm 0,24$ mL, $6,82\pm 0,21$ mL e $6,94\pm 0,26$ mL de água, respectivamente.

Os resultados demonstraram que as micropartículas foram consumidas sem rejeição pelos animais. O processo de microencapsulação da romã possivelmente foi eficaz para reduzir e/ou eliminar o sabor adstringente desagradável promovido pelos taninos presentes na casca da romã corroborando os resultados já obtidos em estudos preliminares envolvendo análise sensorial com seres humanos (MORZELLE, 2013).

Em relação ao peso, não foi detectada diferença significativa entre os grupos de animais quanto ao peso total do animal ($P = 0,3599$) e peso do fígado ($P = 0,6749$). O consumo regular de micropartículas à base de casca de romã e a infusão de β A não acarretaram perda de peso total e alterações no peso do fígado.

2.3.11.2 Atividade Motora

Os testes comportamentais adotados neste experimento dependem de uma boa atividade motora. Os animais precisam estar aptos a explorar os ambientes e equipamentos para que o comportamento seja avaliado. A fim de verificar se possuíam alguma limitação motora, os animais foram submetidos ao actômetro, no início e ao final do experimento, e os resultados estão apresentados na Figura 26 e 27.

Figura 26 – Infusão com peptídeo β -amiloide e tratamento com casca de romã não interfere na atividade exploratória dos animais. Não houve diferença significativa na exploração horizontal dos grupos controle (Ctrl), infundidos com β -amiloide (β A) e infundidos com β -amiloide e tratados com micropartículas de casca de romã (β A + PPE) no início (A) e ao final do experimento (B). Dados expostos como média $\pm$ SEM em unidades de deambulação. * $P < 0.05$

Figura 27 - Infusão com peptídeo β -amiloide e tratamento com casca de romã não interfere na atividade motora dos animais. Não houve diferença significativa na exploração vertical dos grupos controle (Ctrl), infundidos com β -amiloide (β A) e infundidos com β -amiloide e tratados com micropartículas de casca de romã (β A + PPE) no início (A) e ao final do experimento (B). Dados expostos como média $\pm$ SEM em unidades de deambulação. * $P < 0.05$

Não houve diferença significativa ($P < 0,05$) na exploração horizontal e vertical entre os grupos tanto no início quanto no final do experimento (Figura 31 e 32). A infusão com o peptídeo β -amiloide e o tratamento com romã não influenciaram a atividade motora dos animais. Dessa forma, é possível sugerir que os resultados comportamentais não podem ser atribuídos a alterações motoras.

Conforme pode ser observado, independente do grupo, após o tratamento houve uma redução geral da atividade motora entre o início e o final do experimento que pode ser atribuída à habituação do animal ao ambiente.

2.3.11.3 Teste comportamental

A memória espacial e o aprendizado foram avaliados em “Labirinto de Barnes”. Os erros iniciais cometidos pelos animais na fase de aprendizagem da tarefa e após o tratamento estão apresentados na Figura 28.

Figura 28 - Erros cometidos na fase de aprendizagem da tarefa (A) e após o tratamento (B) no Labirinto de Barnes pelos animais do grupo controle (Ctrl), infundidos com β -amiloide (β A) e infundidos com β -amiloide e tratados com micropartículas de casca de romã (β A + PPE). Na fase de aprendizagem da tarefa (A) todos os animais, independente do grupo, apresentaram uma redução significativa nos erros iniciais considerando a primeira e a última sessão de teste, demonstrando que todos aprenderam a tarefa. Após o tempo de infusão e tratamento (B), β A apresentou um número maior de erros para achar a caixa de escape em relação aos animais do Ctrl. Animais do grupo β A+PPE também apresentaram menor número de erros para achar a caixa de escape em relação ao β A, porém sem diferença significativa. Os símbolos e barras verticais são média $\pm$ erros padrão. * $P < 0,05$

Todos os animais, independente do grupo, apresentaram uma redução significativa ($P < 0,05$) nos erros cometidos para encontrar a caixa de escape entre o 1º (Ctrl: $14,64 \pm 3,10$; β A: $12,30 \pm 2,12$ e β A+PPE: $13,67 \pm 2,25$) e o 4º dia (Ctrl: $3,63 \pm 0,65$; β A: $4,70 \pm 1,09$ e β A+PPE: $4,44 \pm 1,60$), mostrando que todos os animais aprenderam a tarefa (Figura 28, A, B e C).

Após o tempo de infusão e tratamento, os animais foram submetidos novamente ao protocolo (apresentado como 29º dia). Animais Ctrl e β A+PPE apresentaram um número de erros similar aos observados antes do período de infusão (Figura 28, A e C), enquanto o grupo β A mostrou um aumento não significativo no número de erros para encontrar a caixa de escape no dia 29, quando comparado ao dia 4 (Figura 28, B).

Considerando o número de erros cometidos pelos três grupos no dia 29, os animais do grupo β A apresentaram um aumento significativo ($7,70 \pm 1,98$, $P < 0,05$) quando comparado ao grupo Ctrl ($2,45 \pm 1,05$), sugerindo uma redução na retenção da memória espacial. O número de erros para encontrar a caixa de escape do grupo β A+PPE também foi reduzido ($4,33 \pm 1,48$), no entanto não há diferença estatística quando comparado aos outros grupos (Figura 28, D). Estes resultados sugerem que o tratamento com micropartículas de extrato de casca de romã reduziu a perda da memória observada nos animais não tratados e infundidos com β A.

É possível descrever que esta queda na memória, evidenciada pelo aumento do número de erros para encontrar a caixa de escape cometidos pelo grupo β A, está relacionada a infusão crônica do peptídeo β A que causa neurodegeneração no córtex e hipocampo (IORES-MARÇAL et al., 2006; FRAUSTCHY, 1998), bem como a formação de placas senis nestas áreas conforme descrito por Viel et al. (2008). Amaral et al. (2010) descreveram que esta forma de infusão crônica de peptídeo β A promoveu uma queda de 54,7% na memória dos animais após 35 dias de infusão.

O hipocampo e algumas áreas do cortex cerebral são as responsáveis pela formação e recuperação da memória espacial. Neste sentido, animais com lesões no hipocampo provocadas pelo acúmulo de β A apresentam uma menor performance no labirinto de Barnes (FOX et al., 1998). Além disso, o hipocampo é uma das áreas mais comprometidas na DA (SMALL et al., 2000; KANDEL et al., 2014).

Com relação aos outros parâmetros observados neste protocolo [tempo inicial (TI), tempo total (TT), tempo no quadrante alvo (TQ), erro total (ET) e distância percorrida (DP)], não houve diferença significativa entre os grupos. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Parâmetros comportamentais de avaliação da memória espacial no Labirinto de Barnes dos animais do grupo controle (Ctrl), infundidos com β -amiloide (β A) e infundidos com β -amiloide e tratados com micropartículas de casca de romã (β A + PPE)

	TI	TT	TQ	DP
Ctrl	40,17 $\pm$ 12,68 ^a	183,10 $\pm$ 34,90 ^a	44,54 $\pm$ 5,79 ^a	2591,00 $\pm$ 507,20 ^a
βA	49,08 $\pm$ 14,68 ^a	211,20 $\pm$ 30,87 ^a	33,00 $\pm$ 7,86 ^a	983,80 $\pm$ 455,00 ^a
βA+PPE	27,42 $\pm$ 4,64 ^a	170,40 $\pm$ 33,28 ^a	37,80 $\pm$ 6,96 ^a	1679,00 $\pm$ 408,70 ^a
P	0,95	0,73	0,81	0,089

TI: Tempo inicial; TT: tempo total; TQ: tempo no quadrante alvo e DP: distância percorrida

Os animais, independente do grupo, apresentaram redução significativa dos erros iniciais com o passar das sessões de teste, mostrando que o reaprendizado não foi afetado com a infusão de peptídeo β A.

O extrato de casca de romã possivelmente apresenta um potencial superior de manutenção da memória espacial quando comparado ao extrato da polpa. Após três meses de tratamento com 6.25 mL L⁻¹ do extrato da polpa diluído em água, animais transgênicos da DA (APP/PS1) não apresentaram diferença significativa no número de erros ou no tempo gasto para encontrar a caixa de escape no Labirinto de Barnes. Neste sentido, com o extrato da polpa, a memória espacial dos animais não foi mantida (Rojanathammanee et al., 2013).

Durante os dias de teste foi possível verificar que os animais utilizam diferentes padrões de procura. Os principais padrões de procura, estabelecidos por Barnes (1979), são: padrão randômico, padrão de procura em série e padrão de procura espacial.

O padrão randômico é aquele no qual o animal investiga muitos buracos retornando ao centro do labirinto constantemente após fazer uma investigação na borda.

O padrão de procura em série, adotado principalmente nos dias 3 e 4 dos testes, caracteriza-se como aquele em que os animais já possuem mais experiência no labirinto e, conseqüentemente, fazem investigações de buraco a buraco sistematicamente até chegar ao buraco alvo. Nesse padrão, o animal passa a maior parte do tempo na periferia do labirinto e não cruza o centro com tanta frequência.

O padrão de procura espacial era comum no último dia do teste. Neste padrão o animal utiliza as dicas espaciais e dirige-se diretamente ao buraco alvo ou a uma região muito próxima a esse.

Durante a realização dos testes de comportamento no Labirinto de Barnes foi possível detectar que todos os padrões foram observados em cada um dos grupos.

Rego, (2014) ilustra na Figura 29 os tipos de padrões de procura utilizados pelos animais durante o teste:

Figura 29 - Representação dos tipos de padrões de procura utilizados pelos animais durante a realização do teste no Labirinto de Barnes. (A) padrão de procura randômico, (B) padrão de procura em série, (C) padrão de procura espacial. Fonte: RÊGO, 2014

2.3.11.4 Avaliação da densidade de placas amiloides

A neuroproteção exercida pela casca da romã também foi verificada através do potencial de inibição da formação de placas senis, uma das principais características da DA.

A densidade de placas senis foi avaliada nas seções cerebrais dos animais ao final do experimento e os resultados estão apresentados na Figura 30. As fotos de imagens ao microscópio de placas amiloides coradas pelo método de fluorescência com Tioflavina-S em seções cerebrais estão apresentadas na Figura 31.

Figura 30 – Avaliação do número de placas amiloides por fluorescência com Tioflavina-S em seções cerebrais dos animais do grupo controle (Ctrl), infundidos com β -amiloide (β A) e infundidos com β -amiloide e tratados com micropartículas de casca de romã (β A + PPE). O grupo Ctrl não apresentou placas amiloides. O grupo β A+PPE apresentou quantidade significativamente inferior de placas amiloides quando comparadas com os animais do grupo β A. Dados expostos como média $\pm$ SEM em número de placas/animal. * $P < 0.05$

Figura 31 - Fotos de imagens ao microscópio de placas amiloides coradas pelo método de fluorescência com Tioflavina-S em seções cerebrais dos animais do grupo A) controle (Ctrl), B) infundidos com β -amiloide (β A) e C) infundidos com β -amiloide e tratados com micropartículas de casca de romã (β A + PPE)

Os animais Ctrl não apresentaram placas senis e os animais infundidos com β A desenvolveram placas amiloides conforme já era esperado.

Foi observada uma redução significativa ($P < 0,0001$) de 11,2% na densidade de placas amiloides nos animais do grupo β A+PPE ($24,66 \pm 0,52$ placas/corte/animal) quando comparadas com os animais do grupo β A ($27,77 \pm 0,39$ placas/corte/animal) (Figura 30). A redução do acúmulo de placas amiloides pode estar relacionada à presença de dois inibidores específicos de β -secretase (BACE-1) na casca da romã: o ácido elágico ($IC_{50} = 3,9.10^{-6}$ M) e a punicalagina ($IC_{50} = 4,1.10^{-7}$ M) (KWAK et al., 2005). Ahmed et al. (2014) mostraram redução dos níveis de βA_{1-42} ao avaliarem os efeitos neuroprotetores do suco de romã (100 e 200 mg.kg⁻¹) em animais transgênicos (idade 24-30 meses) da DA e atribuíram a propriedade antiamiloidogênica a modificação da atividade da enzima γ -secretase.

Os resultados reforçam o papel neuroprotetor da casca da romã contra a neurodegeneração característica observada na DA. A inibição da formação das placas amiloides é essencial para a manutenção da memória e da função cognitiva.

Evidências científicas demonstram que alimentos com altos níveis de antioxidantes e polifenóis são capazes de reduzir a deposição de placas amiloides em animais. Estudos já demonstraram o mesmo comportamento neuroprotetor de redução de placas com a administração crônica de vitamina E (MORRIS et al., 2005), curcumina comumente encontrada em especiarias (LIM et al., 2001), epigallocatequina galato presente no chá verde (REZAI-ZADEH et al., 2005) e também com o ácido tânico, comumente encontrado em chás, e o resveratrol, proveniente das uvas (ONO et al., 2004; MARAMBAUD et al., 2005).

2.3.11.5 Padronização dos experimentos de ELISA

Com o intuito de determinar a diluição adequada das amostras a serem utilizadas nos experimentos de ELISA (dosagem de AChE e BDNF), foram realizados testes a fim de padronizar a diluição ideal das amostras. A partir destes testes, determinou-se que para a dosagem de BDNF as amostras de córtex e hipocampo seriam diluídas na proporção 1:40 e no ensaio da AChE as amostras de córtex e hipocampo na proporção 1:50.

2.3.11.6 Quantificação do fator neurotrófico derivado do cérebro

Neurotrofinas são um grupo de proteínas que de uma forma geral provocam mudanças fisiológicas e estruturais, sendo essenciais para o desenvolvimento, diferenciação e sobrevivência dos neurônios. Neste grupo de substâncias temos o chamado fator neurotrófico derivado do cérebro ou *brain derived neurotrophic fator*, BDNF. O BDNF é uma neurotrofina altamente expressa e amplamente distribuídos em todo o sistema nervoso central, especialmente no hipocampo e no córtex cerebral (PHILLIPS et al., 1990; WETMORE et al., 1990).

O BDNF atua na sobrevivência e função de neurônios dopaminérgicos e colinérgicos do hipocampo e do córtex (GHOSH et al., 1994; LINKHOLM et al., 1996; ALDERSON et al., 1990; HYMAN et al., 1991). Além de manter estes vários grupos neuronais, o BDNF é uma molécula chave na plasticidade sináptica pois aumenta a arborização dendrítica e o contato entre neurônios (ALLEN et al., 2011).

A depleção de neurotrofinas acelera a progressão da DA e, por conseguinte, o aumento da expressão dessas neurotrofinas pode ser um tratamento potencial para a doença neurodegenerativa (VENKATESAN; JI; KIM, 2015).

Os níveis de BDNF detectados no córtex e hipocampo dos animais estão apresentados na Figura 32.

Figura 32 – Concentração de BDNF no (A) córtex e (B) hipocampo dos animais do grupo controle (Ctrl), infundidos com β -amiloide (β A) e infundidos com β -amiloide e tratados com micropartículas de casca de romã (β A + PPE). Não houve diferença significativa no nível de BDNF, tanto o material medido no córtex quanto no hipocampo, entre o grupo Ctrl e β A. O grupo β A+PPE apresentou uma quantidade significativamente superior dessa neurotrofina. Dados expostos como média $\pm$ SEM. * P < 0.05

Não houve diferença significativa no nível de BDNF, tanto no material medido no córtex quanto no hipocampo, entre o grupo Ctrl ($7,23 \pm 2,19$ pg.mL⁻¹ no córtex e $4,27 \pm 0,62$ pg.mL⁻¹ no hipocampo) e β A ($7,12 \pm 2,05$ pg.mL⁻¹ no córtex e $8,80 \pm 3,22$ pg.mL⁻¹ no hipocampo). No entanto, o grupo β A+PPE apresentou uma quantidade superior ($19,60 \pm 4,87$ pg.mL⁻¹ no córtex e $25,21 \pm 3,98$ pg.mL⁻¹ no hipocampo) dessa neurotrofina. Desta forma, é possível sugerir que a casca de romã promove aumento da expressão de BDNF, o que pode contribuir para a ação neuroprotetora desse alimento funcional em situação de neurodegeneração.

Estratégias de manutenção dos níveis de BDNF ou aumento de sua expressão estão sendo amplamente estudadas pela comunidade científica. Gomez-Pinilla e Nguyen (2012) descreveram o papel de determinados compostos fenólicos presentes nos alimentos, especialmente nas frutas, no aumento da expressão de BDNF e consequentemente na melhora cognitiva.

Compostos fenólicos presentes na casca de romã podem mediar vias de sinalização envolvendo neuroproteção, especificamente pelo aumento da expressão de neurotrofinas

mediada pelos receptores Trk e p75 (VENKATESAN; JI; KIM, 2015). Os receptores TrkA, TrkB e TrkC mostram alta afinidade para NGF, BDNF e NT 4/5 e NT-3, respectivamente (BARBACID, 1994). Estes fatores neurotróficos podem proteger os neurônios de danos. Por conseguinte, são capazes de reverter a neurodegeneração interagindo com o receptor Trk e promovendo a sobrevivência, crescimento, diferenciação e manutenção de neurônios (LEVI-MONTALCINI, 1987).

Ácido gálico, rutina, quercetina e antocianinas foram detectadas na análise do extrato de romã. Estes bioativos são amplamente estudados em doenças neurodegenerativas pela sua capacidade de penetrar a barreira hematoencefálica. A propriedade destes compostos bioativos na melhoria de quadros de declínio cognitivo é comumente atribuída a indução da expressão de neurotrofinas pela via de sinalização TrkB no hipocampo (SPENCER, VAUZOUR & RENDEIRO, 2009).

2.3.11.7 Avaliação da atividade da acetilcolinesterase

Uma vez que já foi verificada a atividade anticolinesterásica *in vitro* do extrato, foi avaliado se os extratos também poderiam reduzir a atividade da acetilcolinesterase *in vivo*. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 33.

Figura 33 - Dosagem de acetilcolinesterase (AChE) no (A) córtex e (B) hipocampo dos animais do grupo controle (Ctrl), infundidos com β -amiloide (β A) e infundidos com β -amiloide e tratados com micropartículas de casca de romã (β A + PPE). Os animais do β A + PPE apresentaram uma redução significativa da AChE em relação ao Ctrl e ao β A. Não foi detectada diferença significativa entre os animais do grupo Ctrl e β A. Dados expostos como média $\pm$ SEM. * $P < 0.05$

Com relação à atividade da AChE, medida no córtex e hipocampo, os animais do β A + PPE ($1,10 \pm 0,10$ U/mL no córtex e $5,42 \pm 0,70$ U/mL no hipocampo) apresentaram uma redução

significativa ($P < 0,05$) de 78% no córtex e 60% no hipocampo em relação ao Ctrl ($5,32 \pm 0,41$ U/mL e $13,85 \pm 1,13$ U/mL, respectivamente) e 77% no córtex e 66% no hipocampo em relação ao β A ($7,45 \pm 1,26$ U/mL no córtex; $12,52 \pm 1,17$ U/mL no hipocampo).

Não foi detectada diferença significativa ($P < 0,05$) entre os animais do grupo Ctrl e β A. O tempo de desenvolvimento da neurodegeneração nesse modelo experimental (35 dias) provavelmente não foi suficientemente longo para promover uma alteração periférica da atividade da enzima.

Evidências apontam uma forte relação entre extratos de plantas com elevado conteúdo em compostos fenólicos e a inibição da enzima acetilcolinesterase, sugerindo que possivelmente a capacidade anticolinesterásica da romã poderia ser atribuída aos compostos fenólicos presentes na matriz (BENAMAR et al., 2010).

Inúmeros compostos fenólicos têm sido relatados como agentes anticolinesterásicos. Szwajgier (2014) avaliou a capacidade anticolinesterásica de 24 compostos fenólicos nas concentrações de 0.2 mmol.L^{-1} e 1 mmol.L^{-1} e os resultados mostraram que os compostos com maior atividade anticolinesterásica dentre os testados foram as antocianinas (delfinidina, pelargonidina e cianidina), as flavonas (apigenina e luteolina) e os flavonóis (quercetina, mircetina e kaempferol). Outros estudos testaram extratos de frutas e também descreveram as antocianinas como substâncias com possível potencial anticolinesterásico (PERVIN et al., 2014; RYU et al., 2012).

O ácido ferulico, um composto fenólico detectado nos extratos de polpa e casca de romã na análise em CG-EM, apresentou capacidade de inibição da acetilcolinesterase conforme trabalho realizado por Shahwar et al. (2010).

Szwajgier (2014) descreveu que as atividades inibitórias mais baixas foram exercidas pelos compostos do grupo flavan-3-óis ou flavanóis que incluem as catequinas. O autor defendeu que, possivelmente, a atividade inibidora foi diminuída pela presença de um grupo hidroxila na posição 3. Diante dos resultados obtidos para os demais compostos estudados, é possível notar que a quantidade de grupos hidroxila nas moléculas e a posição das hidroxilas, exceto a posição 3, não desempenhou um papel significativo na inibição, diferente do que acontece com a atividade antioxidante. Os dados indicam que possivelmente a atividade antioxidante dos compostos não tem relação direta com a capacidade anticolinesterásica, o que também foi descrito em um trabalho anterior por Morzelle, (2011).

É preciso considerar que estes compostos fenólicos foram testados na forma isolada e o alimento é uma matriz complexa, onde a heterogeneidade e complexidade dos extratos podem reduzir a atividade anticolinesterásica ou estes compostos podem agir em sinergismo.

No geral, estes resultados mostraram que compostos fenólicos desempenham um papel na neuroproteção. No grande grupo dos compostos fenólicos, os flavonoides são descritos como os principais compostos com atividade neuroprotetiva (REZNICHENCKO et al., 2005). Flavonoides presentes no chá verde (HAQUE et al., 2006), blueberries (JOSEPH et al., 2009) e romã (HARTMAN et al., 2006) melhoram a memória e a plasticidade sináptica (MAHER et al., 2006). Fitoquímicos que inibem AChE podem regular a sinalização intracelular e prevenir a degradação da função cognitiva em pacientes com DA pela regulação de neurotransmissores no ambiente sináptico (HASSAN et al., 2013).

Dados que confirmem o potencial anticolinesterásico da casca de romã *in vivo* são limitados.

Os inibidores de acetilcolinesterase (AChEIs) atenuam o comprometimento colinérgico provocado pela disfunção cognitiva e neuropsiquiátrica em pacientes com doenças neurodegenerativas. Então, a inibição de AChE no cérebro tem sido descrita como o maior alvo terapêutico nas estratégias de tratamento da DA e inúmeros medicamentos sintéticos baseados no potencial anticolinesterásico tem sido utilizados na DA. No entanto, estes compostos apresentam efeitos colaterais como distúrbios gastrointestinais e problemas associados a biodisponibilidade, sendo necessário uma busca por inibidores naturais de AChE mais eficientes e facilmente encontrados em fontes naturais (OH et al., 2004; SCHULZ, 2003) como as frutas.

Ao fim, verificou-se que o extrato aquoso-alcoólico da casca da romã, assim como nos preliminares testes *in vitro*, apresentou capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase *in vivo* atuando como um possível agente anticolinesterásico. No entanto, o mecanismo de ação anticolinesterásica da casca de romã, bem como os compostos responsáveis por esta atividade, precisam ser mais profundamente investigados.

2.3.11.8 Peroxidação lipídica

Assim como para a atividade anticolinesterásica, foi avaliada também a atividade antioxidante *in vivo* proporcionado pelo consumo do extrato de casca de romã microencapsulado por animais infundidos com peptídeo β -amiloide.

A peroxidação lipídica é normalmente mensurada pela quantificação dos produtos oriundos da reação de oxidação, principalmente as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), entre as quais o malonaldeído (MDA) é o principal. A quantificação de MDA vem

sendo relatada em trabalhos científicos para determinar o grau de peroxidação lipídica em amostras biológicas (ANTUNES NETO et al., 2008; SUBASH et al., 2015).

A relação entre o estresse oxidativo e a DA tem sido amplamente estabelecida (SCHRAG et al., 2013). Evidências científicas indicam que a peroxidação lipídica, possivelmente causada pela geração de radicais livres durante o depósito de β A, está envolvida na DA. Estes eventos oxidativos anormais podem levar as células neuronais à morte e contribuir com o declínio cognitivo em pacientes com a DA (VALKO et al., 2007; LYRAS et al., 1997). Desta forma, alguns autores descrevem o MDA, um indicador de peroxidação lipídica, como um biomarcador relacionado à DA (VALKO et al., 2007).

Ohkawa et al. (1979) afirmaram que a maior quantidade de MDA detectada pelo método TBARS está no fígado dos animais, e recomendaram que esta área seja utilizada para a análise.

A quantidade de MDA ($\mu\text{g MDA.g}^{-1}$ fígado) nos grupos Ctrl, β A e β A + PPE estão apresentadas na Figura 34.

Figura 34 – Peroxidação lipídica medida pela concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em tecidos hepáticos dos animais do grupo controle (Ctrl), infundidos com β -amiloide (β A) e infundidos com β -amiloide e tratados com micropartículas de casca de romã (β A + PPE). O grupo β A+PPE e Ctrl apresentaram as menores concentrações e não diferiram significativamente. O grupo Ctrl também não diferiu significativamente do grupo β A. Dados expostos como média $\pm$ SEM. * $P < 0.05$

Não foram detectadas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre o grupo Ctrl e β A e/ou entre o grupo Ctrl e β A+PPE.

O grupo β A+PPE, tratado com casca de romã, apresentou o menor teor de MDA, não diferindo significativamente do grupo Ctrl, mas diferindo significativamente do β A, infundido com β A.

O consumo de casca de romã exerceu efeito benéfico sobre a peroxidação lipídica em tecido hepático, uma vez que, proporcionou redução significativa ($P < 0,05$) na quantidade de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico formadas. O consumo de extrato de casca de romã poderia contribuir como um antioxidante atuando na reversão de um possível quadro de instalação de estresse oxidativo. Este efeito antioxidante está relacionado ao elevado teor de compostos fenólicos, especialmente punicalagina e ácido gálico que são os principais compostos responsáveis pela atividade antioxidante do extrato da casca de romã.

Corroborando esses dados, Subash et al. (2015) avaliaram a influência do consumo de romã (4% p/p da dieta) por 15 meses nos níveis de estresse oxidativo em camundongos transgênicos modelos da DA. Os resultados indicaram que, assim como no presente trabalho, o estresse oxidativo, medido pelos níveis de peroxidação lipídica, foi atenuado com o consumo de romã. O possível mecanismo de ação pelo qual o extrato de casca de romã reduziu a peroxidação lipídica pode ser relacionado à capacidade de sequestro de radical OH (ADEMOSUN; OBOH, 2012).

A diferença não significativa entre o Ctrl e β A possivelmente ocorreu devido ao período de infusão de β A de 35 dias. Observou-se um aumento da produção de MDA nos animais infundidos com β A em relação ao controle ainda que não significativo.

Os resultados demonstraram que a suplementação com a casca de romã inibiu a acumulação de MDA, demonstrando que o extrato da fruta tem efeitos antioxidantes também *in vivo*.

2.3.11.9 Quantificação de Superóxido Dismutase

A Figura 35 apresenta os resultados para a análise da atividade da enzima antioxidante SOD no soro, cortex e hipocampo dos animais.

Figura 35 - Níveis da enzima superóxido dismutase no soro (A), cortex (B) e hipocampo (C) de animais do grupo controle (Ctrl), infundidos com β -amiloide (β A) e infundidos com β -amiloide e tratados com micropartículas de casca de romã (β A + PPE). Não houve diferença significativa no nível de SOD no hipocampo e córtex dos animais do grupo Ctrl e β A ou Ctrl e β A + PPE. No soro, animais infundidos com peptídeo β -amiloide apresentaram níveis superiores de SOD em relação aos animais Ctrl. Dados expostos como média $\pm$ SEM. * $P < 0.05$

Os resultados obtidos para a quantificação da enzima SOD foram contraditórios e inconclusivos, uma vez que se acreditava que com o processo de infusão de β A a SOD seria reduzida no grupo β A em relação ao Ctrl.

Detectou-se um aumento da quantidade de enzima SOD no soro dos animais infundidos com β A que consumiram ou não o extrato da romã. No entanto, o aumento no grupo β A não foi significativamente diferente ($P < 0,05$) do Ctrl. No córtex e hipocampo os resultados foram diferentes. O grupo tratado com romã (β A+PPE) apresentou níveis reduzidos de SOD no córtex, não diferindo significativamente do controle (Ctrl) enquanto o grupo β A apresentou níveis elevados da enzima.

Avaliações bioquímicas da atividade de enzimas antioxidantes como a SOD na DA não apresentam resultados consistentes (ZEMLAN et al., 1989). Inúmeros autores descrevem níveis elevados de SOD em distintas áreas do cérebro dos pacientes da DA (ZHANG et al., 2016; MARKESBERY, 1997; OZCANKAYA; DELIBAS, 2002), conforme também foi observado neste trabalho, enquanto outros não encontram alterações nos níveis da atividade da enzima no cérebro (LOVELL et al., 1995; BALAZS; LEON, 1994). Adicionalmente,

trabalhos ainda demonstram uma possível redução de 25-35% da atividade da enzima SOD no córtex, hipocampo e cerebelo de pacientes da doença (RICHARDSON, 1993).

No presente estudo, os dados anteriores mostraram que a casca de romã apresentou um efeito benéfico ao reduzir a peroxidação lipídica no fígado dos animais. No entanto, não aumentou a expressão da enzima SOD nos animais, indicando que o efeito antioxidante da casca de romã possivelmente foi independente da capacidade antioxidante endógena.

2.3.11.10 Quantificação de TNF- α

Extratos de romã têm apresentado consideráveis efeitos anti-inflamatórias em modelos experimentais (AHMED et al., 2014). Diante disto, a quantidade de TNF- α , uma citocina relacionada ao processo inflamatório, foi mensurada no soro, córtex e hipocampo dos animais e os resultados estão apresentados na Figura 36.

Figura 36 - Efeitos da infusão de peptídeo β -amiloide e tratamento com micropartícula de casca de romã nos níveis de citocina TNF- α no córtex (A) e soro (B) de animais do grupo controle (Ctrl), infundidos com peptídeo β -amiloide (BA) and infundidos com peptídeo β -amiloide e tratados com casca de romã (BA + PPE). Não houve diferença entre a concentração de TNF- α no soro dos animais Ctrl, BA and BA + PPE. No córtex, o grupo BA + PPE apresentou o menor teor de citocinas em relação ao grupo Ctrl e BA. Dados expostos como média $\pm$ SEM. * $P < 0.05$

No hipocampo os níveis da citocina avaliada foram indetectáveis (< 0.01 pg/mL). No soro, os níveis de TNF- α foram reduzidos e não foi detectada diferença entre os grupos (Figura 37).

No córtex, a presença de TNF- α foi superior ao soro e houve diferença significativa na quantidade de TNF- α entre os grupos. Isto possivelmente ocorreu devido a presença da cânula que estava ligada a mini-bomba osmótica. Foi detectado um aumento de 18.45% nos

níveis de TNF- α nos animais do grupo β A quando comparado ao grupo Ctrl (1.01 ± 0.10 pg/mL, $P < 0.05$). Esta quantidade superior pode ser um reflexo das alterações inflamatórias ativas que caracterizam uma resposta à deposição de placas senis no cérebro dos animais através da infusão do peptídeo β A (ROJANATHAMMANEE et al., 2013; ESSA et al., 2015). Os animais do β A+PPE apresentaram significativa redução da quantidade de TNF- α de 36,36% quando comparado ao grupo Ctrl (1.01 ± 0.10 pg/mL, $P < 0.001$) e 48,10% quando comparado ao grupo β A (1.24 ± 0.07 pg/mL, $P < 0.001$). Este resultado indica que os compostos da casca de romã possivelmente influenciaram no processo inflamatório mediado por citocinas. O mecanismo de ação anti-inflamatória do extrato de romã pode incluir a supressão da ciclo-oxigenase e lipoxigenase da matriz (SCHUBERT et al., 1999; AHMED et al., 2005).

Rojanathammanee et al. (2013) verificaram que o consumo de extrato de polpa de romã ($0,625\text{mL.L}^{-1}$) durante 3 meses promoveu uma redução da expressão de TNF- α no cérebro de camundongos transgênicos modelos da DA (APP/PS1). Com base nestes resultados, os autores avaliaram se a punicalagina e/ou ácido elágico seriam os compostos responsáveis por atenuar o TNF- α *in vitro*. Os resultados mostraram estes compostos foram capazes de inibir a secreção estimulada de TNF- α e possivelmente seriam os compostos responsáveis pela atividade anti-inflamatória da romã na DA.

Os resultados demonstram que a casca de romã apresenta um efeito anti-inflamatório devido a atenuação da expressão da citocina TNF- α no cérebro dos animais.

2.3.11.11 Quantificação dos índices de lesão hepática

Os resultados obtidos na dosagem de marcadores de dano isquêmico hepático (TGO e TGP) no soro dos animais do grupo Ctrl, β A e β A +PPE estão apresentados na Figura 37.

Figura 37 - Dosagem enzimática de (A) transaminase oxalacética (TGO) e (B) transaminase pirúvica (TGP) em do grupo controle (Ctrl), infundidos com peptídeo β -amiloide (BA) and infundidos com peptídeo β -amiloide e tratados com casca de romã (BA + PPE). Não houve diferença significativa nos níveis de TGO e TGP entre os grupos. Dados expostos como média $\pm$ SEM. * $P < 0.05$

Nas dosagens de TGO, não houve diferença significativa ($p = 0,07$) entre os grupos Ctrl, β A e β A + PPE. Não obstante, na dosagem de TGP também não foram detectadas diferenças significativas ($p = 0,22$).

Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa entre os grupos, o que indica que o consumo de casca de romã não trouxe nenhum tipo de lesão hepática.

3 CONCLUSÃO

Do presente trabalho ficam as seguintes conclusões:

Casca de romã apresenta quantidade superior de compostos fenólicos e atividade antioxidante, mensurada *in vitro* e *on line*, em relação à polpa;

Punicalagina (α e β), ácido gálico e epicatequina são os compostos que contribuem mais significativamente com a atividade antioxidante da romã;

In vivo o consumo de casca de romã promoveu:

redução no número de erros para encontrar a caixa de escape na avaliação da memória espacial,

redução do acúmulo de placas amiloides,

aumento da expressão de neurotrofina,

redução da atividade da enzima acetilcolinesterase,

redução da peroxidação lipídica

redução da citocina pró-inflamatória TNF- α em animais infundidos com peptídeo β -amiloide.

Os resultados dessa pesquisa mostram que a casca de romã apresenta efeito neuroprotetor em animais submetidos a infusão crônica de peptídeo β -amiloide.

REFERENCIAS

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 Rochelle, v. 15, n. 5, p. 428–434, 2012.

ADSERSEN, A.; GAUGUIN, B.; GUDIENSEN, L.; JAGER, A.K. Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholinesterase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 104, n. 3, p. 418-422, 2006.

AHMED, S.; WANG, N.; HAFEEZ, B.B.; CHERUVU, V.K.; HAQQI, T.M. Punica granatum L. extract inhibits IL-1 β -induced expression of matrix metalloproteinases by inhibiting the activation of MAP kinases and NF- κ B in human chondrocytes in vitro. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 135, p. 2096–102, 2005.

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, 2012.

AKHTAR, S.; ISMAIL, T.; FRATERNALE, T.; SESTILI, P. Pomegranate peel and peel extracts: chemistry and food features. **Food Chemistry**, Barking, v. 174, p. 417-425, 2015.

AKIYAMA, H. BARGER, S.; BARNUM, S.; BRADT, B.; BAUER, J.; COLE, G.M.; COOPER, N.R.; EIKELBOOM, P.; EMMERLING, M.; FIEBICH, B.L.; FINCH, C.E.; FRAUTSCHY, S.; GRIFFIN, W.S.; HAMPEL, H.; HULL, M.; LANDRETH, G.; LUE, L.; MRAK, R.; MACKENZIE, I.R.; MCGEER, P.L.; O'BANION, M.K.; PACHTER, J.; PASINETTI, G.; PLATA-SALAMAN, C.; ROGERS, J.; RYDEL, R.; SHEN, Y.; STREIT, W.; STROHMEYER, R.; TOOYOMA, I.; VAN MUISWINKEL, F.L.; VEERHUIS, R.; WALKER, D.; WEBSTER, S.; WEGRZYNIAK, B.; WENK, G.; WYSS-CORAY, T. Inflammation and Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, New York, v. 21, p. 383–421, 2000.

ALBUQUERQUE, M. S. **Caracterização da memória e de marcadores colinérgicos ao longo do envelhecimento de ratos**. 2013. 64p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

ALDERSON, R. F.; ALTERMAN, A. L.; BARDE, Y. A.; LINDSAY, R. M. Brain-derived neurotrophic factor increases survival and differentiated functions of rat septal cholinergic neurons in culture. **Neuron**, Cambridge, v. 5, n. 3, p. 297–306, 1990.

ALEXINSKY, T. Differential effect of thalamic and cortical lesions on memory systems in the rat. **Behaviour Brain Research**, New York, v. 122, n. 2, p. 175-191, 2001.

ALIGHOURCHI, H.; BARZEGAR, M. Some physicochemical characteristics and degradation kinetic of anthocyanin of reconstituted pomegranate juice during storage. **Journal of Food Engineering**, London, v. 90, p. 179–185, 2009.

AL-JARALLAH, A.; IGDOURA, F.; ZHANG, Y.; TENEDERO, C. B.; WHITE, E. J.; MACDONALD, M. E. The effect of pomegranate extract on coronary artery atherosclerosis

in SR-BI/APOE double knockout mice. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 228, p. 80–89, 2013.

ALLEN, S. J.; WATSON, J. J.; DAWBARN, D. The Neurotrophins and Their Role in Alzheimer's Disease. **Current Neuropharmacology**, San Francisco, v. 9, p. 559-573, 2011.
ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2015 Alzheimer's Disease Facts and Figures. **Alzheimer's & Dementia**, Orlando, v. 11, n. 3, p. 332-84, 2015.

AMARAL, F.A.; LEMOS, M.T.R.; DONG, K.E.; BITTERCOURT, M.F.Q.P.; CAETANO, A.L.; PESQUERO, J.B.; VIEL, T.A.; BUCK, H.S. Participation Of Kinin Receptors On Memory Impairment After Chronic Infusion Of Human Amyloid-B 1-40 Peptide In Mice. **Neuropeptides**, Edinburgh, v. 44, n. 2, p. 93-97, 2010.

ANSARI, M. A.; ABDUL, H. M.; JOSHI, G.; OPII, W. O.; BUTTERFIELD, D. A. Protective effect of quercetin in primary neurons against Abeta(1-42): relevance to Alzheimer's disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 20, n. 4, p. 269–275, 2009.

ANTUNES NETO, J. M. F.; RIVERA, R. J. B.; CALVI, R. G.; RAFFA, M. F.; DONADON, C. C.; PEREIRA, A. G.; MELO, P. S. Níveis Comparativos de Estresse Oxidativo em Camundongos em Duas Situações do Limite Orgânico: Overreaching Induzido por Treinamento de Natação e Câncer. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, São Paulo, v. 14, n. 6, 2008.

ARAI, K.; MATSUKI, N.; IKEGAYA, Y.; NISHIYAMA, N. Deterioration of spatial learning performances in lipopolysaccharide-treated mice. **Japanese Journal of Pharmacology**, Tokyo, v. 87, p. 195–201, 2001.

ARTIK, N. Determination of phenolic compounds in pomegranate juice by using HPLC. **Fruit Processing**, London, v.12, p. 492-499, 1999.

ATTAR, A.; LIU, T.; CHAN, W.T.C.; HAYES, J.; NEJAD, M.; LEI, K. A Shortened Barnes Maze Protocol Reveals Memory Deficits at 4-Months of Age in the Triple-Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. **Plos ONE**, San Francisco, v. 8, n. 11, p. e80355, 2013.

BACHEVALIER, J.; ALVARADO, M. C.; MALKOVA, L. Memory and socioemotional behavior in monkeys after hippocampal damage incurred in infancy or in adulthood. **Biological Psychiatry**, New York, v. 46, n. 3, p. 329-339, 1999.

BACHIEGA, P.; SALGADO, J.M.; DE CARVALHO, J.E.; RUIZ, A.L.T.G. SCHWARZ, K.; TEZOTTO, T.; MORZELLE, M.C. Antioxidant and antiproliferative activities in different maturation stages of broccoli (*Brassica oleracea* Italica) biofortified with selenium. **Food Chemistry**, Barking, v. 190, p. 771-776, 2016.

BALAZS, L.; LEON, M. Evidence of an oxidative challenge in the Alzheimer's brain. **Neurochemical Research**, New York, v. 19, p. 1131-1137, 1994.

BANDONIEN, D.; MURKOVIC, M.; PFANNHAUSER, W.; VENSKUTONIS, P.R.; GRUZDIE, D. Detection and activity evaluation of radical scavenging compounds by using DPPH free radical and on-line HPLC-DPPH methods. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 214, p.143–147, 2002.

BARBACID, M. The Trk family of neurotrophin receptors, **Journal of Neurobiology**, New York, v. 25, n. 11, p. 1386–1403, 1994.

BARNES, C. A. Memory Deficits Associated With Senescence: A Neurophysiological and Behavioral Study in the Rat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, Washington, v. 93, n. 1, p.74-104, 1979.

BEKIR, J.; MARS, M.; SOUCHARD, J. P.; BOUAJILA, J. Assessment of antioxidant, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and cytotoxic activities of pomegranate (*Punica granatum*) leaves. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.55, p. 470–475, 2013.

BELARBI, K.; JOPSON, T.; TWEEDIE, D.; ARELLANO, C.; LUO, W.; GREIG, N. H.; ROSI, S. TNF- α protein synthesis inhibitor restores neuronal function and reverses cognitive deficits induced by chronic neuroinflammation. **Journal of Neuroinflammation**, London, v. 9, p. 23, 2012.

BENAMAR, H.; RACHED, W.; DERDOUR, A.; MAROUF, A. Screening of Algerian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. **International Journal of Biological Sciences**, Washington, v. 10, p. 100–109, 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, 1995.

BLOKLAND, A. Review Article. Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? **Brain Research Reviews**, Amsterdam, v. 21, p. 285–300, 1995.

BOOKHEIMER, S. Y.; RENNER, B. A.; EKSTROM, A.; LI, Z.; HENNING, S. M.; BROWN, J. A.; JONES, M.; MOODY, T.; SMALL, G. W. Pomegranate Juice Augments Memory and Fmri Activity in Middle-Aged and Older Adults with Mild Memory Complaints. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, v. 2013, Article ID 946298, p. 14, 2013.

BORGES, G.; MULLEN, W.; CROZIER, A. Comparison of the polyphenolic composition and antioxidant activity of European commercial fruit juices. **Food Function**, Cambridge, v. 1, p. 73-83, 2010.

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, 2010.

BOROCHOV-NEORI, H.; JUDEINSTEIN, S.; TRIPLER, E.; HARARI, M.; GREENBERG, A.; SHOMER, I. Seasonal and cultivar variations in antioxidant and sensory quality of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 22, n. 3, p. 189-195, 2009.

BOURDEL-MARCHASSON, I. DELMAS-BEAUVIEWUX, M. C.; PEUCHANT, E.; RICHARD-HARSTON, S.; DECAMPS, A.; REIGNIER, B.; EMERIAU, J. P.; RAINFRAY, M. Antioxidant defences and Oxidative stress markers in erythrocytes and plasma from normally nourished elderly Alzheimer patients. **Age Ageing**, London, v. 30, p. 235-241, 2001.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAIDY, N.; SELVARAJU, S.; MOHAMED, M.; VAISHNAV, R.; AL-ADAWI, S.; AL-ASMI, A.; AL-SENAWI, H.; ALOBAIDY, A. A. A.; LAKHTAKIA, R.; GUILLEMIN, G. J. Neuroprotective Effects of a Variety of Pomegranate Juice Extracts against MPTP-Induced Cytotoxicity and Oxidative Stress in Human Primary Neurons. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, New York, v. 2013, p 1-12, 2013.

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, 1995.

BRIGÉLIUS-FLOHÉ, R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. **Journal of free radicals in biology and medicine**, New York, v. 27, n. 9/10, p. 951-965, 1999.

CALON, F., LIM, G.P., YANG, F., MORIHARA, T., TETER, B., UBEDA, O., ROSTAING, P., TRILLER, A., SALEM JR., N., ASHE, K.H., FRAUTSCHY, S.A., COLE, G.M., Docosahexaenoic acid protects from dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model. **Neuron**, Cambridge, v. 43, p. 633-645, 2004.

CARDOSO, B. R. **Efeitos do consumo de castanha do brasil (*Bertholetia excelsa* H. B. K.) sobre o estresse oxidativo em pacientes com comprometimento cognitivo leve e a relação com variações em genes de selenoproteínas**. 2014. 112 p. Tese (Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

CARDOSO, J. E.; SILVA, J. L.; MARTINS, M. V. V.; MOREIRA, R. C.; VIANA, F. M. P.; CHAVES, L. G.; ALVEZ, E. S.; LIMA, F. A.; VIDAL, D. **Ocorrência e controle químico da antracnose em plantio comercial da romãzeira no Estado do Ceará**. Fortaleza: Embrapa, 2011. (Comunicado técnico, 165).

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.

CAZARIN, C. B. B.; SILVA, J. K.; COLOMEU, T. C.; ZOLLNER, R. L.; JUNIOR, M. R. M. Capacidade antioxidante e composição química da casca de maracujá (*Passiflora edulis*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 9, p. 1699-1704, 2014.

CEAGESP. Disponível em: <<http://www.ceagesp.gov.br>>. Acesso em: 23 maio 2012.

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

CHANDRASEKARA, A.; SHAHIDI, F. Antiproliferative potential and DNA scission inhibitory activity of phenolics from whole millet grains. **Journal of Functional Foods**, Saint John's, v. 3, p. 159–170, 2011.

CHARCHAT-FICHMAN, H. et al. Decline of cognitive capacity during aging. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 79-82.

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, 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 Rochelle, v. 14, n. 7-8, p. 695–701, 2011.

CHRISTAKI, E. V.; BONOS, E. M.; FLOROU-PANERI, P. C. Dietary benefits of pomegranates in humans and animals. **Journal of Food, Agricultural & Environment**, Helsinki, v. 9, n. 1, p. 124-144, 2011.

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

COMMENGES, D.; SCOTET, V.; RENAUD, S.; JACQMIN-GADDA, H.; BARBERGER-GATEAU, P.; DARTIGUES, J.F. Intake of flavonoids and risk of dementia. **European Journal of Epidemiology**, Rome, v. 16, n. 4, p. 357–363, 2000.

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**, New York, v. 45, p. 211-8, 1995.

CREWS L.; MASLIAH E. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Human molecular genetics**, Oxford, v. 19, p. R12–R20, 2010.

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.

DAULATZAI, M.A. Fundamental role of pan-inflammation and oxidative-nitrosative pathways in neuropathogenesis of Alzheimer's disease. **American journal of neurodegenerative disease**, Florida, v. 5, n. 1, p. 1-28, 2016.

DENG, C.F.; LIN, X.; XU, X. R.; GAO, L.L.; XIE, J.F.; LI, H.B. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 vegetables. **Journal of Functional Foods**, Saint John's, v. 5, p. 260–266, 2013.

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

DÍAZ-DE-CERIO, E.; GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; VERARDO, V.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; SEGURA-CARRETERO, A. Determination of guava (*Psidium guajava* L.) leaf phenolic compounds using HPLC-DAD-QTOF-MS. **Journal of Functional Foods**, Saint John's, v. 22, p. 376–388, 2016.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines. **Cjest**, Chicago, v. 118, p. 503-8, 2000.
ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 7, n. 2, p. 88-95, 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, 2010.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Alzheimer's Disease: FDA's Role In New Product Development. U.S. Food and drug administration, 2007. Disponível em: <<http://www.fda.gov/NewsEvents/Testimony/ucm110879.htm>> Acesso em: 4 mai 2012.

FENG, Y.; YANG, S. G.; DU, X. T. Ellagic acid promotes Abeta42 fibrillization and inhibits Abeta42-induced neurotoxicity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 390, n. 4, p. 1250–1254, 2009.

FISCHER, U. A.; 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, p. 807–821, 2011.

FRANKLIN, K. J. B.; PAXINOS, G. **The mouse brain in Stereotaxic Coordinates**, 3^a ed., Academic Press, San Diego, 2007. 360 p.

FRAUTSCHY, S.A.; HORN, D.L.; SIGEL, J.J.; HARRIS-WHITE, M.E.; MENDOZA, J.J.; YANG, F.; SAIDO, T.C.; COLE, G.M. Protease inhibitor coinfusion with amyloid beta-protein results in enhanced deposition and toxicity in rat brain. **Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 18, n. 20, p. 8311-21, 1998.

FROZZA, R. L.; BERNARDI, A.; HOPPE, J. B.; MENEGHETTI, A. B.; MATTÉ, A.; BATTASTINI, A. M. O.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; SALBEGO, C. Neuroprotective Effects of Resveratrol Against A β Administration in Rats are Improved by Lipid-Core Nanocapsules. **Molecular Neurobiology**, New York, v. 47, p. 1066-1080, 2013.

GADIENT, R.A.; OTTEN, U. Identification of interleukin-6 (IL-6) expressing neurons in the cerebellum and hippocampus of normal adult rats. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v. 182, p. 243–246, 1994.

GANDY, S. The role of cerebral amyloid β accumulation in common forms of Alzheimer disease. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 115, p. 1121–1129, 2005.

GAZZANIGA, M. S.; HEATHERTON, T. F. **Ciência psicológica: mente, cérebro e comportamento**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 624 p.

GHOSH, A.; CARNAHAN, J.; GREENBERG, M. E. Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. **Science**, Washington, v. 263, n. 5153, p. 1618–1623, 1994.

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, 2000.

GILLETTE GUYONNET, S.; ABELLAN VAN KAN, G.; ANDRIEU, S.; BARBERGER GATEAU, P.; BERR, C.; BONNEFOY, M.; DARTIGUES, J.F.; DE GROOT, L.; FERRY, M.; GALAN, P.; HERCBERG, S.; JEANDEL, C.; MORRIS, M.C.; NOURHASHEMI, F.; PAYETTE, H.; POULAIN, J.P.; PORTET, F.; ROUSSEL, A.M.; RITZ, P.; ROLLAND, Y.; VELLAS, B. IANA task force on nutrition and cognitive decline with aging. **Journal of Nutrition, Health & Aging**, New York, v. 11, n. 2, p. 132–152, 2007.

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, 2012.

GOLD, P. E. Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory. **Neurobiology of learning and memory: an interdisciplinary journal**, Orlando, v. 80, p. 194–210, 2003.

GÓMEZ, B.; GULLÓN, B.; YÁÑEZ, R.; SCHOLS, H.; ALONSO, J. L. Prebiotic potential of pectins and pectic oligosaccharides derived from lemon peel wastes and sugar beet pulp: A comparative evaluation. **Journal of Functional Foods**, Saint John's, v. 20, p. 108–121, 2016.

GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; VERARDO, V.; TOSELLI, M.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; CABON, M. F. Determination of the Major Phenolic Compounds in Pomegranate Juices by HPLC–DAD–ESI-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 61, p. 5328–5337, 2013.

GOMEZ-PINILLA, F.; NGUYEN, T. T. J. Natural mood foods: the actions of polyphenols against psychiatric and cognitive disorders. **Nutritional Neuroscience**, Amsterdam, v. 15, n. 3, p. 127–133, 2012.

GULLON, B.; PINTADO, M. E.; PEREZ-ALVAREZ, J. A.; VIUDA-MARTOS, M. Assessment of polyphenolic profile and antibacterial activity of pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from co-product of juice extraction. **Food Control**, Vurrey, v.59, p. 94–98, 2016.

GUO, C.J.; YANG, J.J.; WEI, J.Y.; LI, Y.F.; XU, J.; JIANG, Y.G. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. **Nutrition Research**, New York, v. 23, p. 1719–1726, 2003.

HAASS, C.; SELKOE, D.J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: Lessons from the Alzheimer's amyloid b-peptide. **Nature reviews - Molecular cell biology**, London, v. 8, p. 101–112, 2007.

HAASS, C.; SCHLOSSMACHER, M. G.; HUNG, A. Y.; VIGO-PELFREY, C.; MELLON, A.; OSTASZEWSKI, B. L. LIEBERBURG, I.; KOO, E. H.; SCHENK, D.; TELOW, D.B. SELKOE, D. J. Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. **Nature**, London, v. 359, p. 322-325, 1992.

HAQUE, A.M.; HASHIMOTO, M.; KATAKURA, M.; TANABE, Y.; HARA, Y.; SHIDO, O. Long-term administration of green tea catechins improves spatial cognition learning ability in rats. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 136, p. 1043–1047, 2006.

HARBONE, J. B.; Williams, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, Oxford, v. 55, n. 6, p. 481-504, 2000.

HARTMAN, R. E.; SHAH, A.; FAGON, 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**, Orlando, v. 24, n. 3, p. 506-515, 2006.

HASSAAN, Y.; HANDOUSSA, H.; EL-KHATIB, A. H.; LINSCHIED, M. W.; EL SAYED, N.; AYOUB, N. Evaluation of Plant Phenolic Metabolites as a Source of Alzheimer's Drug Leads. **Biomedical Research International**, New York, v. 2014, 10 p.

HASSAN, S.H.; FRY, J.R.; BAKAR, A. Phytochemicals content, antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibition properties of indigenous *Garcinia parvifolia* fruit. **Biomedical Research International**, v. 2013, p. 138950, 2013.

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**, Oxford, v. 29, n. 3, p. 167-227, 1990.

HE, L.; XU, H.; LIU, X.; HE, W.; YUAN, F.; HOU, Z.; GAO, Y. Identification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) seed residues and investigation into their antioxidant capacities by HPLC–ABTS+ assay. **Food Research International**, Essex, v. 44, p. 1161–1167, 2011.

HE, L.; ZHANG, X.; XU, H.; XU, C.; YUAN, F.; KNEZ, Z. E.; NOVAK, Z.; GAO, Y. Subcritical water extraction of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) seed residues and investigation into their antioxidant activities with HPLC–ABTS+ assay. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 215-223, 2012.

HEPPNER, F. L.; RANSOHOFF, R. M.; BECHER, B. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. **Nature Reviews Neuroscience**, London, v. 16, p. 358–372, 2015.

HERRERA, E.J.; CARAMELLI, P.; SILVEIRA, A.A.S.; NITRINI, R. Epidemiologic survey of dementia in a community-dwelling Brazilian population. **Alzheimer disease and associated disorders**, Hagerstown, v.16, n.2, p. 103-8, 2002.

HERTOG, M.G.L, SWEETNAM, P.M., FEHILY, A.M, ELWOOD, P. C., KROMBOUT, D. (1997). Antioxidant flavanols and ischaemic heart disease in a welsh population of men. The carphilly study. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 65, p. 1489–1494, 1997.

HERZ, J.; BEFFERT, U. Apolipoprotein E receptors: linking brain development and Alzheimer's disease. **Nature Neuroscience**, New York, v. 1, p. 51-58, 2000.

HO, L.; FERRUZZI, M. G.; JANLE, E.M. Identification of brain targeted bioactive dietary quercetin-3-O-glucuronide as a novel intervention for Alzheimer's disease. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 27, n. 2, p. 769–781, 2013.

HOPKINS, S. J. The pathophysiological role of cytokines. **Legal Medicine**, Tokyo, v. 5, p. S45-S57, 2003.

HOPPE, J. B. **Metabolismos Celulares e Moleculares envolvidos no efeito neuroprotetor da curcumina em modelos experimentais da doença de Alzheimer**. 2013. 217 p. Tese (Pós graduação em Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

HU, Y.; RUSSEK, S.J. BDNF and the diseased nervous system: a delicate balance between adaptive and pathological processes of gene regulation. **Journal of Neurochemistry**, Oxford, v. 105, n. 1, p. 1-17, 2008.

HYMAN C, HOFER M, BARDE Y A, JUHASZ M, YANCOPOULOS G D, SQUINTO S P, LINDSAY R M. BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. **Nature**, London, v. 350, n. 6315, p. 230–232, 1991.

IBRAF INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. Disponível em: <<http://www.ibraf.org.br>>. Acesso em: 04 jan. 2016.

INGKANINAN, K.; TEMKITTHAWON, P.; CHUENCHOM, K.; YUYAEM, T.; THONGNOI, W. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 89, p. 261-264, 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA [boletim na internet]. Projeção da População do Brasil por sexo e idade: 1980-2050 - Revisão 2008. Disponível:www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/projecao_da_populacao/2008/metodologia.pdf. Acesso em: 10 jan. 2016.

_____. Síntese de indicadores sociais —Uma análise das condições de vida da população brasileira. Rio de Janeiro: IBGE, 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>. Acesso em: 12 jan 2016.

IORES-MARÇAL, L. M.; VIEL, T. A.; BUCK, H. S.; NUNES, V. A.; GOZZO, A. J.; CRUZ-SILVA, I.; MIRANDA, A.; SHIMAMOTO, K.; URA, N.; ARAUJO, M. S. Bradykinin release and inactivation in brain of rats submitted to na experimental model of Alzheimer's disease. **Peptides**, New York, v. 27, n. 12, p. 3363-3369, 2006.

ISMAIL, T.; AKHTAR, S.; RIAZ, M.; ISMAIL, A. Effect of pomegranate peel supplementation on nutritional, organoleptic and stability properties of cookies. **International Journal of Food Science and Nutrition**, Oxford, v. 65, n. 6, p. 661-666, 2014.

IZQUIERDO, I. **Memória**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 96 p.

JANG, S.; JOHNSON, R. W. Can Consuming Flavonoids Restore Old Microglia to their Youthful State? **Nutrition Reviews**, New York, v. 68, n. 12, p. 719–728, 2010.

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, 2011.

JOSEPH, J.A.; SHUKITT-HALE, B.; DENISOVA, N.A.; BIELINSKI, D.; MARTIN, A.; MCEWEN, J.J.; BICKFORD, P.C. Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation. **Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 19, p. 8114–8121, 1999.

JURGENS, H. A.; JOHNSON, R.W. Dysregulated neuronal-microglial cross-talk during aging, stress and inflammation. **Experimental Neurology**, New York, v. 233, p. 40-48, 2012.

KALACHE, A.; VERAS, R.; RAMOS, L. R. O envelhecimento da população mundial. Um desafio novo. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 21, p. 200-10, 1987.

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, 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, 2010.

KHALID, A.; ZAHEER-UL-HAQ; GHAYUR, M.N.; FERROZ, F.; ATTA-UR-RAHMAN; GILANI, A.H.; CHOUDHARY, M. I. Cholinesterase inhibitory and spasmolytic potential of steroidal alkaloids. **Journal of Steroid Biochemistry**, Oxford, v. 92, p. 477–484, 2004.

KIM, D.O.; LEE, C.Y. Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship. **Critical Reviews of Food Science and Nutrition**, New York, v. 44, p. 253–27, 2004.

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

KOTKIN, C. **Pomegranates on parade**. Wine News, 2006. Disponível em: <www.thewinenews.com/decjan0506/cuisine.asp>. Acesso em: 13 de set. 2013.

KWAK, H.M.; JEON, S.Y.; SOHNG, B.H.; KIM, J.G.; LEE, J.M.; LEE, K.B.; JEONG, H.H.; HUR, J.M.; KANG, Y.H.; SONG, K.S. Beta-Secretase (BACE1) inhibitors from pomegranate (*Punica granatum*) husk. **Archives of Pharmacal Research**, London, v. 28, p. 1328–1332, 2005.

LAFKA, T. I.; SINANOGLU, V.; LAZOS, E. S. On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. **Food Chemistry**, Barking, v. 104, p. 1206-1214, 2007.

LEE, S. G.; VANCE, T. M.; NAM, T. G.; KIM, D. O.; KOO, S. I.; CHUN, O. K. Contribution of Anthocyanin Composition to Total Antioxidant Capacity of Berries. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 70, p. 427–432, 2015.

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**, Stamford, v. 48, n. 2, p. 246-252, 2008.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociências**. São Paulo: Ed Atheneu, 2004. 698 p.

LETENNEUR, L.; PROUST-LIMA, C.; LE GOUGE, A.; DARTIGUES, J.F.; BARBERGER GATEAU, P. Flavonoid intake and cognitive decline over a 10-year period. **American journal of epidemiology**, Baltimore v. 165, n. 12, p. 1364–1371, 2007.

LEVI-MONTALCINI, R. The nerve growth factor: thirty-five years later. **Bioscience Reports**, New York, v. 7, n. 9, p. 681-99, 1987.

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, p. 254-260, 2006.

LIM, G.P.; CALON, F.; MORIHARA, T.; YANG, F.; TETER, B.; UBEDA, O.; SALEM JR., N.; FRAUTSCHY, S.A.; COLE, G.M. A diet enriched with the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid reduces amyloid burden in an aged Alzheimer mouse model. **Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 25, p. 3032–3040, 2005.

- LIM, G.P., CHU, T., YANG, F., BEECH, W., FRAUTSCHY, S.A., COLE, G.M. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. **Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 21, p. 8370–8377, 2001.
- LINKHOLM, D.; CARROLL, P.; TZIMAGIOGIS, G.; THOENEN, H. Autocrine-paracrine regulation of hippocampal neuron survival by IGF-1 and the neurotrophins BDNF, NT-3 and NT-4. **European Journal of Neuroscience**, Oxford, v. 8, n. 7, p. 1452–1460, 1996.
- LOREN, D. J.; SEERAM, N. P.; SCHULMAN, R. N.; HOLTZMAN, D. M. Maternal Dietary Supplementation with Pomegranate Juice Is Neuroprotective in an Animal Model of Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury. **Pediatric Research**, Baltimore v. 57, n. 6, p. 858-864, 2005.
- LOVELL, M.A.; EHMANN, W.D.; BUTLER, S.M.; MARKESBERY, W.R. Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. **Neurology**, New York, v. 45, p. 1594-601, 1995.
- LUO, F.; FUB, Y.; XIANGA, Y.; YAN, S.; HU, G.; HUANG, X.; HUANG, G.; SUN, C.; LI, X.; CHEN, K. Identification and quantification of gallotannins in mango (*Mangifera indica* L.) kernel and peel and their antiproliferative activities. **Journal of Functional Foods**, Saint John's, v. 8, p. 282–291, 2014.
- LYRAS, L.; CAIRNS, N.J.; JENNER, A.; JENNER, P.; HALLIWELL, B. An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**, Oxford, v. 68, n. 5, p. 2061-9, 1997.
- MADEIRA, J.V. JR.; MACEDO, G.A. Simultaneous extraction and biotransformation process to obtain high bioactivity phenolic compounds from brazilian citrus residues. **Biotechnology Progress**, New York, v. 31, n. 5, p. 1273-1279, 2015.
- MADRIGAL-CARBALLO, S.; RODRIGUEZ, G.; KRUEGER, C.G.; DREHER, M.; REED, J.D. Pomegranate (*Punica granatum*) supplements: Authenticity, antioxidant and polyphenol composition. **Journal of Functional Foods**, Saint John's, v. 1, p. 324-329, 2009.
- MAGRONE, T.; MARZULLI, G.; JIRILLO, E. Immunopathogenesis of neurodegenerative diseases: current therapeutic models of neuroprotection with special reference to natural products. **Current Pharmaceutical Design**, v.18, n.1, p. 34-42, 2012.
- MAHER, P.; AKAISHI, T.; ABE, K. Flavonoid fisetin promotes ERKdependent long-term potentiation and enhances memory. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v. 103, p. 16568 –16573, 2006.
- MARAMBAUD, P.; ZHAO, H.; DAVIES, P. Resveratrol promotes clearance of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. **Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 280, n. 45, p. 37377–37382, 2005.
- MARKESBERY, W.R. Oxidative Stress Hypothesis in Alzheimer disease. **Journal of free radicals in biology and medicine**, New York, v. 23, p. 134-47, 1997.
- MATTSON, M. P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. **Nature**, London, v. 430, p. 631-639, 2004.

MATTSON, M. P.; MAGNUS, T. Ageing and neuronal vulnerability. **Nature Review Neuroscience**, London, v. 7, p. 278-294, 2006.

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, 2011.

MELO, P.S.; MASSARIOLI, A.P.; DENNY, C.; SANTOS, L.F.; FRANCHIN, M.; PEREIRA, G.E.; VIEIRA, T.M.F.S.; ROSALEN, P.L.; ALENCAR, S.M. Winery by-products: Extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive species. **Food Chemistry**, Barking, v. 181, p. 160-169, 2015.

MIZRAHI, M.; FRIEDMAN-LEVI, Y.; LARUSH, L.; FRID, K.; BINYAMIN, O.; DORI, D.; FAINSTEIN, N.; OVADIA, H.; BEN-HUR, T.; MAGDASSI, S.; GABIZON, R. Pomegranate seed oil nanoemulsions for the prevention and treatment of neurodegenerative diseases: the case of genetic CJD. **Nanomedicine**, New York, v. 10, n. 6, p. 1353-1363, 2014.

MOHAPEL, P.; LEANZA, G.; KOKAIA, M.; LINDVALL, O. Forebrain acetylcholine regulates adult hippocampal neurogenesis and learning. **Neurobiology of Aging**, New York, v. 26, p. 939-946, 2005.

MOREIRA, I. S.; ROCHA, R. H. C.; PAIVA, E. P.; SILVA, H. S.; SOUSA, F. A. Biometria e componentes físico-químicos de romã armazenada sob refrigeração. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 45, n. 2, p. 209-215, 2015.

MORENO P. M. **El granado, su problemática y usos**. En: I Jornadas nacionales sobre el granado, 7-27 Octubre 2010, Elche, España (CD-ROM).

MORRIS, M.C., EVANS, D.A., TANGNEY, C.C., BIENIAS, J.L., WILSON, R.S., AGGARWAL, N.T.; SCHERR, P.A. Relation of the tocopherol forms to incident Alzheimer disease and to cognitive change. **American journal of clinical nutrition**, Bethesda, v. 81, p. 508-514, 2005.

MORZELLE, M. C. **Resíduos de romã (Punica granatum) na prevenção da doença de Alzheimer**. 2013. 71 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

MUKHERJEE, P.K.; KUMAR, V.; MAL, M.; HOUGHTON, P.J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 14, n. 4, p. 289-300, 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 peroxyl radical scavenging assay. **Food Chemistry**, Barking, v. 129, n. 1, p. 139-148, 2011.

NABAVI, S.M.; DAGLIA, M.; BRAIDY, N.; NABAVI, S.F. Natural products, micronutrients, and nutraceuticals for the treatment of depression: A short review. **Nutritional Neuroscience**, Amsterdam, 2015.

Nanasombat, S.; Thonglong, J.; Jitlakha, J. Formulation and characterization of novel functional beverages with antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities. **Functional Foods in Health and Disease**, London, v. 5, n. 1, p. 1-16, 2015.

NÄSLUND, J.; HAROUTUNIAN, V.; MOHS, R.; DAVIS, K.L.; DAVIES, P.; GREENGARD, P.; BUXBAUM, J.D. Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. **JAMA**, Rio de Janeiro, v. 283, n. 12, p. 1571-7, 2000.

NIEDERLÄNDER, H.A.; VAN BEEK, T.A.; BARTASIUTE, A.; KOLEVA, I.I. Antioxidant activity assays on-line with liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, New York, v. 1210, n. 2, p. 121-134, 2008.

NUENGCHAMNONG, N.; DE JONG, C.F.; BRUYNEEL, B.; NIESSEN, W.M.A.; IRTH, H.; INGKANINAN, K. HPLC coupled on-line to ESI-MS and a DPPH-based assay for the rapid identification of anti-oxidants in *Butea superba*. **Phytochemical Analysis: PCA**, Chichester, v. 16, p. 422–428, 2005.

NUNES, M.A.; SCHÖWE, N.M.; MONTEIRO-SILVA, K.C.; BARALDI-TORNISIELO, T.; SOUZA, S.I.G.; BALTHAZAR, J. ALBUQUERQUE, M. S.; CAETANO, A. L.; VIEL, T. A.; BUCK, H. S. Chronic Microdose Lithium Treatment Prevented Memory Loss and Neurohistopathological Changes in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 10, n. 11, p. e0142267, 2015.

NUNOMURA, A.; CASTELLANI, R.J.; XIONGWEI, Z.; MOREIRA, P.I.; PERRY, G.; SMITH, M. A. Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, Baltimore, v. 65, p. 631-641, 2006.

OH, M.H.; HOUGHTON, P.J.; WHANG, W.K.; CHO, J.H. Screening of Korean herbal medicines used to improve cognitive function for anti-cholinesterase activity. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 11, n. 6. p. 544-8, 2004.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 95, n. 2, p. 351-8, 1979.

ONO, K.; HASEGAWA, K.; NAIKI, H.; YAMADA, M. Anti-amyloidogenic activity of tannic acid and its activity to destabilize Alzheimer's β amyloid fibrils in vitro. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v. 1690, p. 193–202, 2004.

OPAL, S. M.; DEPALO, V.A. Anti-inflammatory cytokines. **Cjest**, Chicago, v. 117, p. 1162:1172, 2000.

ORHAN, I.; SENER, B.; CHOUDHARY, M.I.; KHALID, A. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 91, p. 57-60, 2004.

- OTHMAN, A.R.; ABDULLAH, N.; AHMAD, S.; ISMAIL, I.S.; ZAKARIA, M.P. Elucidation of in-vitro anti-inflammatory bioactive compounds isolated from *Jatropha curcas* L. plant root. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 15, p. 11, 2015.
- OZCANKAYA, R.; DELIBAS, N. Malondialdehyde, Superoxide Dismutase, Melatonin, Iron, Copper, and Zinc Blood Concentrations in Patients with Alzheimer Disease: Cross-sectional Study. **Croatian Medical Journal**, Zagreb, v. 43, n. 1, p. 28-32, 2002.
- OZGEN, M.; DURGAÇ, C.; SERÇE, S.; KAYA, C. Chemical and antioxidant properties of pomegranate cultivars grown in the Mediterranean region of Turkey. **Food Chemistry**, Barking, v. 111, n. 3, p. 703–706, 2008.
- OZTURK, M. Anticholinesterase and antioxidant activities of Savoury (*Satureja thymbra* L.) with identified major terpenes of the essential oil. **Food Chemistry**, Barking, v. 134, p. 48–54, 2012.
- 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, 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, 2007.
- PELLEGRINI, N.; SERAFINI, M.; COLOMBI, B.; DEL RIO, D.; SALVATORE, S.; BIANCHI, M.; BRIGHENTI, F. Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different In Vitro Assays. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 133, n. 9, p. 2812-2819, 2003.
- PEREIRA, M.C.; STEFFENS, R.S.; JABLONSKI, A.; HERTZ, P.F.; RIOS, A. DE O.; I OTTO, M. RES, 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, 2012.
- PERVIN, M.; ABUL HASNAT, MD.; LEE, Y. M.; KIM, D. H.; JO, J. E.; LIM, B. O. Antioxidant Activity and Acetylcholinesterase Inhibition of Grape Skin Anthocyanin (GSA). **Molecules**, Basel, v. 19, p. 9403-9418, 2014.
- PHILLIPS, H.S.; HAINS, J. M.; LARAMEE, G. R.; ROSENTHAL, A.; WINSLOW, J. W. Widespread expression of BDNF but not NT3 by target areas of basal forebrain cholinergic neurons. **Science**, Washington v. 250, n. 4978, p. 290–294, 1990.
- PRADO, V.F.; MARTINS-SILVA, C.; CASTRO, B.M.; LIMA, R.F.; BARROS, D.M.; AMARAL, E.; RAMSEY, A.J.; SOTNIKOVA, T.D.; RAMIREZ, M.R.; KIM, H. G.; ROSSATO, J. I.; KOENEN, J.; QUAN, H.; COTA, V.R.; MORAES, M.F.D.; GOMEZ, M.V.; GUATIMOSIN, C.; WESTEL, W.C.; KUSHMERICK, C.; PEREIRA, G.S.; GAINETDINOV, R.R.; IZQUIERDO, I.; CARON, M.G.; PRADO, M.. Mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter are myasthenic and have deficits in object and social recognition. **Neuron**, Cambridge, v. 51, p. 601–612, 2006.

PROMPROM, W.; KUPITTAYANANT, P.; INDRAPICHATE, K.; WRAY, S.; KUPITTAYANANT, S. The effects of pomegranate seed extract and β -sitosterol on rat uterine contractions. **Reproductive Sciences**, Thousand Oaks, v. 17, p. 288-96, 2010.

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

PUGH, C.R.; KUMAGAWA, K.; FLESHNER, M.; WATKINS, L.R.; MAIER, S.F.; RUDY, J.W. Selective effects of peripheral lipopolysaccharide administration on contextual and auditory-cue fear conditioning. **Brain, behavior, and immunity**, San Diego, v. 12. P. 212-229, 1998.

QIAN, X.; HAMAD, B.; DIAS-LALCACA, G. The Alzheimer disease Market. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 14, p. 675-676, 2015.

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, 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, 2010.

QUERFURTH, H.W.; LAFERLA, F.M. Alzheimer's disease. **New England journal of medicine**, Boston, v. 362, p. 329-344, 2010.

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

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia**. 6. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 848 p.

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, 2012.

REGO, D. G. **Estudo das relações entre idade, parâmetros cognitivos espaciais e atividade do sistema serotoninérgico no hipocampo de ratos**. 2014. 103 p. Dissertação (Pós-graduação em Neurociências) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

REHMAN, S.U., SHAH, S.A., ALI, T., CHUNG, J.I., KIM, M.O. (2016). Anthocyanins Reversed D-Galactose-Induced Oxidative Stress and Neuroinflammation Mediated Cognitive Impairment in Adult Rats. **Molecular Neurobiology**, New York, p. 1-17, 2016.

REZAI-ZADEH, K.; SHYTLE, D.; SUN, N.; MORI, T.; HOU, H.; JEANNITON, D.; EHRHART, J.; TOWNSEND, K.; ZENG, J.; MORGAN, D.; HARDY, J.; TOWN, T.; TAN,

J. Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) modulates amyloid precursor protein cleavage and reduces cerebral amyloidosis in Alzheimer transgenic mice. **Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 25, p. 8807–8814, 2005.

REZNICHENKO, L.; AMIT, T.; YODIM, M.B.; MANDEL, S. Green tea polyphenol ()-epigallocatechin-3-gallate induces neurorescue of long-term serum-deprived PC12 cells and promotes neurite outgrowth. **Journal of Neurochemistry**, Oxford, v. 93, p. 1157–1167, 2005.

RICHARDSON, J.S. Free radicals in the genesis of Alzheimer's disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, Cidade, v. 695, p. 73-6, 1993.

RIVIERE, C.; RICHARD, T.; QUENTIN, L.; KRISA, S.; MERILLON, J.; MONTI, J. Inhibitory activity of stilbenes on Alzheimer's β - amyloid fibrils in vitro. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, Oxford v. 15, n. 2, p. 1160–1167, 2007.

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, 2010.

ROJANATHAMMANEE, L.; PUIG, K.L.; COMBS, C.K. Pomegranate polyphenols and extract inhibit nuclear factor of activated T-cell activity and microglial activation in vitro and in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 143, n. 5, p. 597-605, 2013.

ROSENBLAT, G.; MERETSKI, S.; SEGAL, J.; TARSHIS, M.; SCHROEDER, A.; ZANINSHOROV, A.; LION, G.; INGBER, A.; HOCHBERG, M. Polyhydroxylated fatty alcohols derived from avocado suppress inflammatory response and provide non-sunscreen protection against UV-induced damage in skin cells. **Archives of Dermatological Research**, Berlin, v. 303, n. 4, p. 239-246, 2011.

RUFINO, M.S.M., ALVES, R.E., BRITO, E.S., MORAIS, S.M., SAMPAIO, C.G., JIMEZES-PEREZ, J., SAURA-CALIXTO, F.D., 2006. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP)**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 4 pp.

RYU, H.W.; CURTIS-LONG, M.J.; JUNG, S.; JEONG I.Y.; KIM, D.S.; KANG, K.Y.; PARK, K.H. Anticholinesterase potential of flavonols from paper mulberry (*Broussonetia papyrifera*) and their kinetic studies. **Food Chemistry**, Barking, v. 132, p. 1244–1250, 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. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 67, n. 1, p. 39-43, 2012.

SANTIAGO, M. C. P. de A.; et al. **Determinação de Punicalagina em Romã (*Punica granatum* L.) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2014. (Embrapa Agroindústria de Alimentos. Comunicado técnico, 204).

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

SCHRAG, M.; MUELLER, C.; ZABEL, M.; CROFTON, A.; KIRSCH, W. M.; GHRIBI, O.; SQUITTI, R.; PERRY, G. Oxidative stress in blood in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: A meta-analysis. **Neurobiology of Disease**, Orlando, v. 59, p. 100–110, 2013.

SCHUBERT, S.Y.; LANSKY, E.P.; NEEMAN, I. Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 66, p. 11–7, 1999.

SCHULZ V. Ginkgo extract or cholinesterase inhibitors in patients with dementia: what clinical trials and guidelines fail to consider. **Phytomedicine**. Stuttgart, v. 10, n. 4, p. 74-9, 2003.

SCHUMANN, G.; BONORA, R.; CERIOTTI, F.; FÉRARD, G.; FERRERO, C. A.; FRANCK, P. F. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 6. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of gamma-glutamyltransferase. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, Berlin, v. 40, n. 7, p. 734-738, 2002.

SEERAM N, LEE R, HARDY M, HEBER D. Rapid large scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry. **Separation and Purification Technology**, Cidade, v. 41, n. 1, p. 49–55, 2005.

SEIDL, C. **Efeitos da uleína em alvos relacionados com a doença de Alzheimer e estudos enzimáticos on-line com a enzima beta-secretase imobilizada**. 2014. 122 p. Tese (Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

SERRANO-POZO, A.; FROSCH, M.P.; MASLIAH, E.; HYMAN, B.T. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, New York, v. 1, n. 1, p. a006189, 2011.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, Saint John's, v. 18, p. 757–78, 2015.

SHAHWAR, D.; REHMAN, S.R.; RAZA, M.A. Acetyl cholinesterase inhibition potential and antioxidant activities of ferulic acid isolated from *Impatiens bicolor* Linn. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, p. 260-266, 2010.

SHARMA, S.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. A pyrazole curcumin derivative restores membrane homeostasis disrupted after brain trauma. **Experimental Neurology**, New York, v. 226, p. 191–199, 2010.

SHAW, K.N.; COMMINS, S.; O'MARA, S.M. Lipopolysaccharide causes deficits in spatial learning in the watermaze but not in BDNF expression in the rat dentate gyrus. **Behaviour Brain Research**, New York, v. 124, p. 47–54, 2001.

SHAYGANNIA, E.; BAHMANI, M.; ZAMANZAD, B.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. A Review Study on *Punica granatum* L. **Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine**, Thousand Oaks, 2015.

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, 2010.

SHIRODE, A.B.; BHARALI, D.J.; NALLANTHIGHAL, S.; COON, J.K.; MOUSA, S.A.; RELIENE, R. Nanoencapsulation of pomegranate bioactive compounds for breast cancer chemoprevention. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 10, p. 475-84, 2015.

SIASOS, G.; TOUSOULIS, D.; TSIGKOU, V.; KOKKOU, E.; OIKONOMOU, E.; VAVURANAKIS, M.; BASDRA, E.K.; PAPAVALASSILIOU, A.G.; STEFANADIS, C. Flavonoids in atherosclerosis: an overview of their mechanisms of action. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 20, n. 21, p. 2641-60, 2013.

SMITH, M.A.; SAYRE, L.M.; MONNIER, V.M.; PERRY, G. Radical ageing in Alzheimer's disease. **Trends Neuroscience**, Chicago, v. 18, n. 4, p. 172-6, 1995.

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

SPAGNUOLO, C. et al. Dietary polyphenols in cancer prevention: the example of the flavonoid quercetin in leukemia. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1259, p. 95-103, 2012.

SPARKMAN, N. L.; BUCHANAN, J. B.; HEYEN, J. R.R.; CHEN, J.; BEVERLY, J. L.; JOHNSON, R. W. Interleukin-6 Facilitates Lipopolysaccharide-Induced Disruption in Working Memory and Expression of Other Proinflammatory Cytokines in Hippocampal Neuronal Cell Layers. **Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 26, n. 42, p. 10709-10716, 2006.

SPENCER, J.P.; VAUZOUR, D.; RENDEIRO, C. Flavonoids and cognition: the molecular mechanisms underlying their behavioural effects. **Archives of biochemistry and biophysics**, New York, v. 492, n. 1-2, p. 1-9, 2009.

STAFSTROM, C.E.; RHO, J.M. The ketogenic diet as a treatment paradigm for diverse neurological disorders. **Frontiers in Pharmacology**, New York, v. 3, n. 59, 2012.

STEINGASS, C.B.; GLOCK, M.P.; SCHWEIGGERT, R.M.; CARLE, R. Studies into the phenolic patterns of different tissues of pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.) infructescence by HPLC-DAD-ESI-MS (n) and GC-MS analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 407, p. 6463-79, 2015.

STOCKHAMMER, S.; STOLZE, K.; ROHR-UDILOVA, N.; CHIZZOLA, R.; ZITTERL-EGLSEER, K.; FRANZ, C. Antioxidant activity of phylogenous 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, 2009.

STOCKHAMMER, S.; STOLZE, K.; ROHR-UDILOVA, N.; CHIZZOLA, R.; ZITTERL-EGLSEER, K.; FRANZ, C. Antioxidant activity of phylogenous 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.

SUBASH, S.; BRAIDY, N.; ESSA, M. M.; ZAYANA, A.; RAGINI, V.; AL-ADAWI, S.; AL-ASMI, A.; GUILLEMIN, G. J. Long-term (15 mo) dietary supplementation with pomegranates from Oman attenuates cognitive and behavioral deficits in a transgenic mice model of Alzheimer's disease. **Nutrition**, Paris, v. 31, p. 223-229, 2015.

SZWAJGIER, D. Anticholinesterase activities of selected polyphenols — a short report. **Polish Journal Of Food And Nutrition Sciences**, Olsztyn, v. 64, p. 59-64, 2014.

TAKAO, T.; CULP, S.G.; NEWTON, R.C.; DE SOUZA, E.B. Type I interleukin-1 receptors in the mouse brain-endocrine-immune axis labelled with [125I] recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. **Journal of Neuroimmunology**, Amsterdam, v. 41, n. 1, p. 51-60, 1992.

TEHRANIFAR, A.; SELAHVARZI, Y.; KHARRAZI, M.; BAKHSH, V. J. High potential of agro-industrial by-products of pomegranate (*Punica granatum*) as the powerful antifungal and antioxidant substances. **Industrial crops and Products**, New York, v. 34, n. 3, p. 1523-1527, 2011.

THAIPONGA, K.; BOONPRAKOPA, U.; CROSBYB, K.; CISNEROS-ZEVALLOSC, L.; BYRNEC, D. H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 19, p. 669-675, 2006.

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, 2010.

TREMOCOLDI, M. A. **Caracterização, isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de abacates das cultivares Hass e Fuerte**. 2015. 116 p. Teste (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2015.

TREVISAN, M.T.S.; MACEDO, F.V.V.; VAN DE MEENT, M.; RHEE, I.K.; VERPOORTE, R. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. **Química Nova**, São Paulo, v.26, p. 301-304, 2003.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

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, 2012.

VENKATESAN, R.; JI, E.; KIM, S. Y. Phytochemicals That Regulate Neurodegenerative Disease by Targeting Neurotrophins: A Comprehensive Review. **Biomedical Research International**, New York, 2015.

VERAS, R. Envelhecimento populacional contemporâneo: demandas, desafios e inovações. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 548-554, 2009.

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, 2004.

VIEL, T.A.; CAETANO, A.L.; NASELLO, A.G.; LANCELOTTI, C.L.; NUNES, V.A.; ARAUJO, M.S.; BUCK, H.S. Increases Of Kinin B1 And B2 Receptors Binding Sites After Brain Infusion Of Amyloid-Beta 1-40 Peptide In Rats. **Neurobiology of Aging**, New York, v. 29, n. 12, p.1805-1814, 2008.

VILADOMIU, M.; HONTECILLAS, R.; LU, P.; BASSAGANYA-RIERA, J. Preventive and Prophylactic Mechanisms of Action of Pomegranate Bioactive Constituents. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, London, 2013.

WALLACE, T.C., SLAVIN, M., FRANKENFELD, C.L. Systematic Review of Anthocyanins and Markers of Cardiovascular Disease. **Nutrients**, Beijing, v. 8, p. E32, 2016.

WATSON, R.R.; SCHÖNLAU, F. Nutraceutical and antioxidant effects of a delphinidin-rich maqui berry extract Delphinol®: a review. **Minerva Cardioangiology**, Bologna, v. 63, p. 1-12, 2015.

WETMORE, C.; ERNFORS, P.; PERSSON, H.; OLSON, L. Localization of brain-derived neurotrophic factor mRNA to neurons in the brain by in situ hybridization. **Experimental Neurology**, New York, v. 109, n. 2, p. 141–152, 1990.

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.

WINKLER, J.; THAL, L. J.; GAGE, F.H.; FISHER, L.J. Cholinergic strategies for Alzheimer's disease. **Journal of molecular medicine**, Heidelberg, v. 76, p. 555–567, 1998.

WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, New York, v. 37, p. 99–105, 1998.

WYSS-CORAY, T. Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? **Nature medicine**, New York, v. 12, p. 1005–1015, 2006.

- XU, B. J.; CHANG, S. K. C. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. **Journal of Food Science**, Malden, v. 72, n. 2, p. 159-166, 2007.
- YANG, J.; LEE, R.; HENNING, S.M.; THAMES, G.; HSU, M.; MANLAM, H.; HEBER, D.; LI, Z. Soy protein isolate does not affect ellagitannin bioavailability and urolithin formation when mixed with pomegranate juice in humans. **Food Chemistry**, Barking, v. 194, p. 1300-303, 2016.
- YEDDES, N.; CHÉRIF, J.K.; TRABELSI, M. Comparative study of antioxidant power, polyphenols, flavonoids and betacyanins of peel and pulp of three Tunisian *Opuntia* forms. **Antioxidants**, Larchmont, v. 2, p. 37-51, 2013.
- YEN, M. H.; WENG, T. C.; LIU, S. Y.; CHAI, C. Y.; LIN, C. C. The hepatoprotective effect of *Bupleurum kaioi*, and endemic plant to Taiwan, against dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 28, n. 3, p. 442-448, 2005.
- ZADERNOWSKI, R.; NACZK, M.; NESTEROWICA, J. Phenolic acid profiles in some small berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 53, p. 2118-2124, 2005.
- ZANATTA, C. F.; CUEVAS, E.; BOBBIO, F. O.; WINTERHALTER, P.; MERCADANTE, A. Z. Determination of anthocyanins from camu-camu (*Myrciaria dubia*) by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 53, p. 9531-9535, 2005.
- ZEMLAN, F.P.; THIENHAUS, O.J.; BOSMANN, H.B. Superoxide dismutase activity in Alzheimer's disease: possible mechanism for paired helical filament formation. **Brain Research**, New York, v. 476, n. 1, p. 160-2, 1989.
- ZHANGA, J. S.; ZHOUA, S. F.; WANGA, Q.; GUOA, J. N.; LIANGA, H. M.; DENG, J. B.; HE, W. Y. Gastrodin suppresses BACE1 expression under oxidative stress condition via inhibition of the PKR/eIF2 α pathway in Alzheimer's disease. **Neuroscience**. Available online 14 March 2016.
- ZOLA-MORGAN, S.; SQUIRE, L. R.; AMARAL, D.G.; SUZUKI, W.A. Lesions of perirhinal and parahippocampal cortex that spare the amygdala and hippocampal formation produce severe memory impairment. **Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 9, n. 12, p. 4355-4370, 1989.
- ZUO, Y.; WANG, C.; ZHANG, J. Separation, characterization and quantification of benzoic and phenolic antioxidants in American cranberry fruit by GC-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 50, p. 3789-3794, 2002.