

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA (PPGBIOTEC)

Indicadores de segurança e eficácia do extrato de guaraná e castanha do Brasil transportados em nanopartículas de coenzima Q10: evidências de células imunes humanas e de minhocas vermelhas

VITÓRIA FARINA AZZOLIN

MANAUS-AM 2024

Indicadores de segurança e eficácia do extrato de guaraná e castanha do Brasil transportados em nanopartículas de coenzima Q10: evidências de células imunes humanas e de minhocas vermelhas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de mestra em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Rita de Cassia Saraiva Nunomura

Coorientadora: Dra. Ivana Beatrice Manica da Cruz

MANAUS-AM 2024

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A999i Azzolin, Vitória Farina
Indicadores de segurança e eficácia do extrato de guaraná e castanha do Brasil transportados em nanopartículas de coenzima Q10: evidências de células imunes humanas e de minhocas vermelhas / Vitória Farina Azzolin . 2024
82 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Rita de Cássia Saraiva Nunomura
Coorientadora: Ivana Beatrice Manica da Cruz
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Nanopartícula. 2. Paullinia cupana. 3. Coenzima Q10. 4. Bertholletia excelsa. 5. Oxiflamatório. I. Nunomura, Rita de Cássia Saraiva. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por sempre me conceder a sabedoria e persistência nas minhas escolhas.

Aos meus pais, Valdenir e Geneci, agradeço pelos ensinamentos e apoio de não deixar eu desistir nos momentos mais difíceis. Agradeço pela paciência, amor e carinho e por serem sempre presentes em minha caminhada. Amo vocês.

Agradeço também a minha segunda mãe a Zana, por estar sempre pronta para estar comigo nos momentos que mais precisei, onde sempre estava de braços abertos para me acolher e estimular a não desistir nunca, com a sua fala " tudo vai se ajeitar calma". Te amo Zana.

Agradeço principalmente a minha irmã que sempre esteve presente nessa trajetória, me ajudando e incentivando para que continuasse os estudos e nunca desistisse dos meus sonhos. Por ser meu braço direito e esquerdo em todas as decisões da vida, por estar comigo nos momentos de alegria e choro e acima de tudo pela paciência em dizer "mana espera que vai dar tudo certo". Mana é difícil achar palavras para lhe agradecer. Te amo mana.

Ao meu companheiro Léo, que foi uma pessoa que me acolheu em outro estado onde não conhecia nada e que participou de todos os momentos bons e ruins dessa nossa trajetória. Muito obrigada por sempre estar com aquela mensagem positiva que vai dar tudo certo mesmo nos momentos mais difíceis em que pensava em desistir e voltar embora. Por me apoiar na decisão de vir para o estado do Amazonas para fazer meu mestrado. Te amo Vida.

A minha orientadora professora Rita de Cassia Saraiva Nunomura, por me proporcionar essa experiência que é fazer o mestrado, por sempre estar disponível mesmo com a distância. Muito obrigada pela oportunidade prof.

A minha coorientadora professora Ivana Manica da Cruz por depositar essa confiança em mim. A senhora é um exemplo de profissional para mim por tamanha sabedoria e inteligência. Meu eterno muito obrigado.

Aos colegas do Gerontec pelo apoio, brincadeira, companheirismo, vocês são pessoas incríveis que levarei para vida.

A minha colega e amiga Railla pelo apoio e acolhimento a quem nos fez sentir-se da sua família. Minha eterno obrigada.

Ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia pela oportunidade.

A banca pela disponibilidade. Muito obrigada.

E a todos os familiares e amigos que de uma forma ou de outra estiveram presentes nesse momento da minha vida. Meu muito obrigada.

A todos meu muito obrigada! Pois sozinhos na vida não somos nada.

RESUMO

Introdução: O envelhecimento está associado a estados crônicos de oxidação e inflamação, que podem ser atenuados pelo consumo de suplementos com novas tecnologias baseadas na biodiversidade amazônica. **Objetivo:** A presente investigação descreve e caracteriza um nanossuplemento à base de coenzima Q10 contendo guaraná (*Paullinia cupana*) e castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) (G-NUT), com potencial uso para mitigar condições oxiflamatórias. **Métodos:** O G-NUT foi obtido por técnica de emulsificação. O nanossuplemento foi produzido na proporção de 1:1 de pó de guaraná, óleo de castanha-do-brasil e 10% de CoQ10, e quimicamente caracterizado pelo método de espectrometria de massa de alta resolução (HRMS). Ensaios adicionais *in vitro* e *in vivo* testaram a segurança e marcadores funcionais do G-NUT em culturas de células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs) e em células imunes (celomócitos) de minhocas vermelhas californianas (*Eisenia fetida*). As concentrações testadas de G-NUT e do suplemento livre em cultura de células foram na faixa de 0,25 a 3 mg/mL. **Resultados:** O G-NUT foi obtido contendo teobromina, teofilina, cafeína, selênio e coenzima Q10 como principais moléculas bioativas. O G-NUT não induziu eventos citotóxicos nas células PBMC, resultando em *down-regulation* na expressão de genes apoptóticos (caspases 3 e 8), redução nos níveis de oxidação lipídica e proteica, e efeito redutor nos níveis de citocinas pró-inflamatórias. No modelo de minhoca vermelha, o G-NUT não causou mortalidade, induzindo uma resposta imune mais eficiente quando os celomócitos foram expostos a uma levedura morta. **Conclusão:** O G-NUT nanotecnológico proporcionou uma resposta melhor do que o suplemento em fórmula livre, e ambos são seguros para começar os testes em seres humanos.

Palavras-chave: Nanopartícula; *Paullinia cupana*; Coenzima Q10; *Bertholletia excelsa*; oxiflamatório.

ABSTRACT

Introduction: Aging are associated with chronic oxidative and inflammatory states, that potentially could be attenuated by consumption of supplements with new technologies based on Amazonian biodiversity. **Aim:** the present investigation described and characterized a nano supplement based on coenzyme Q10 containing guarana (*Paullinia cupana*) and Brazil nuts (*Bertholletia excelsa*) (G-NUT), with potential use for mitigating oxy-inflammatory conditions.

Methods: O G-NUT was obtained by emulsification technique. Nanosupplement was produced at 1:1 ratio of guaraná powder, Brazil nut oil and 10% CoQ10, and chemically characterized by high-resolution mass spectrometry (HRMS) method. Additional in vitro and in vivo assays that tested safety and functional markers of G-NUT on human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) cultures and in immune cells (coelomocytes) of Californian red earthworms (*Eisenia fetida*). The tested concentrations of G-Nut and the free supplement in cell culture were in the range of 0.25–3 mg/mL. **Results:** G-NUT was obtained containing theobromine, theophylline, caffeine, selenium and coenzyme Q10 as main bioactive molecules. G-NUT did not induce cytotoxic events on PBMC cells, triggering *down-regulation* in the expression of apoptotic (Caspases 3 and 8) genes, reduction in lipid and protein oxidation levels and lowering effect on levels of pro-inflammatory cytokines. In the red worm model, G-NUT did not cause mortality inducing more efficient immune response when coelomocytes were exposed a dead yeast. **Conclusion:** G-NUT nanotechnological provided a better response than the free formula supplement, and both are safe to begin testing in humans.

Keywords: Nanoparticle; *Paullinia cupana*; Coenzyme Q10; *Bertholletia excelsa*; oxy-inflammatory.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Principais vias de produção de espécies reativas de oxigênio associadas com os principais mecanismos de degradação das mesmas, SOD	9
FIGURA 2 – NF-κB envolvido no desenvolvimento e progressão da inflamação	12
FIGURA 3 - Estrutura química da CoQ10	18
FIGURA 4 – Guaraná (<i>Paullinia cupana</i>), o fruto, árvore e a semente torrada	20
FIGURA 5 - Principais componentes do guaraná.....	21
FIGURA 6 – Castanha do Brasil (<i>Bertholletia excelsa</i> , árvore ouriço e frutos	24

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AG - Ácidos Graxos;

ALR - Recptor de alerta de Radar;

ANOVA - Teste Estatístico;

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária;

ATP - Adenosina Trifosfato;

bit - Bity;

CASP 3 - Caspase 3;

CASP 8 - Caspase 8;

CAT - Enzima Catalase;

cm - Centímetro;

CM - Corpo Marrom;

CMSPs - Sangue Periférico Humano;

CoQ10 - Coenzima Q10;

CRE - Creatinina;

DCNT - Doenças Crônicas Não Transmissíveis;

dL - Decilitro;

DNA - Ácido Desoxirribonucleico;

DA - Doença de Alzheimer;

DP - Doença de Parkinson;

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético;

eNETs - Armadilhas Extracelulares;

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio;

ESI+ - Eletrospray no Modo Positivo;

FUnATI - Fundação Universidade Aberta da Terceira Idade;

g - Gramas;

G-NUT - Suplemento Nanoestruturado a base de Castanha do Brasil, Guaraná e Coenzima Q10;

GERONTEC - Centro de Pesquisa, Ensino e Desenvolvimento Tecnológico;

GPX - Glutathiona Peroxidase;

GSH - Glutathiona Reduzida;

GSSG - Glutathiona Oxidada;

h - Hora;

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio;

HNO₃ - Ácido Nítrico;

HRMS - Espectroscopia de Massa;

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística;

IFN- γ - Interferon γ ;

IL 6 - Interleucina 6;

IL-10 - Interleucina 10;

IL-12 - Interleucina 12;

IL-1 β - Interleucina 1 β ;

IL-8 - Interleucina 8;

L - Litro;

LBSS – *do inglês Lumbricus Balanced Salt Solution*;

LDL - Lipoproteína de Baixa Densidade;

MAPK - *Mitogen Activated Protein Kinases*;

mg - Miligrama;

mL - Mililitro;

mm - Milímetro;

MTT - Ensaio Colorimétrico para Avaliar a Atividade Metabólica Celular;

MUFA - Ácidos Graxos Monoinsaturados;

n - Número;

NADH/NAD⁺ - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo;

NADPH/NADP⁺ - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo fosfato;

NFKB - Nuclear factor kappa B;

NIH-3T3 - Células de Fibroblastos Embrionários;

NLR - Receptor do tipo Nod;

nm - Nanômetro;

NO - Óxido Nítrico;

O₂⁻ - Radical Superóxido;

OECD - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico;

OH⁻ - Radical Hidroxila;

OMS - Organização Mundial da Saúde;

ONU - Organização das Nações Unidas;

PCR - Proteína C Reativa;

PT - Proteínas Totais;
PUFA - Ácidos Graxos Poli-insaturados
qRT-PCR - Teste de reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase;
RNA - Ácido ribonucleico;
RPMI - Meio Gibco Roswell Park Memorial Institute;
SBF - Soro Bovino Fetal;
SH-SY5Y - Células Neuronal Humanas;
SNC - Sistema Nervoso Central;
SOD - Enzima Superóxido Dismutase;
TBARS - Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico;
TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
TGF β - Fator de Crescimento β transformado;
TNF- α - Fator de Necrose Tumoral α ;
URIL - Ácido Úrico;
USD – Dólares;
UV - Ultravioleta;
VLDL - Lipoproteína de muito Baixa Densidade;
W - Watt;
 β -actina - Beta Actina;
 μ g - Micrograma;
 μ L - Microlitro;
 μ M - Micrómetro;
% - Porcentagem;
°C - Graus Celsius;
~ - Aproximadamente.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 OBJETIVO GERAL	3
2.1.1 Objetivos específicos.....	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 ENVELHECIMENTO, GLOBALIZAÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DAS DOENÇAS CRÔNICAS	4
3.2 DOENÇAS CRÔNICAS	5
3.2.1 Conceito e as principais doenças crônicas.....	5
3.2.2 Fatores de risco para as doenças crônicas.....	6
3.2.3 Patogênese das doenças crônicas.....	7
3.3 RELAÇÃO DA OXI-INFLAMAÇÃO E DOENÇAS CRÔNICAS.....	8
3.3.1 Estresse oxidativo	8
3.3.2 Inflamação	10
3.4 TRATAMENTO DAS DOENÇAS CRÔNICAS	13
3.5 UTILIZAÇÃO DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES COM NOVAS TECNOLOGIAS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS CRÔNICAS	14
3.5.1 Nanotecnologia	15
3.5.2 Coenzima Q10.....	17
3.5.3 Guaraná (Paullinia cupana)	20
3.5.4 Castanha do Brasil (Bertholletia excelsa)	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 Artigo.....	26
5. RESULTADOS.....	26
6. DISCUSSÃO.....	56
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60
8. REFERÊNCIAS.....	61

1. INTRODUÇÃO

A inflamação, embora seja uma parte fundamental da resposta imunológica do corpo a lesões e infecções, quando persiste de maneira crônica, pode contribuir para o desenvolvimento de doenças crônicas incluindo a obesidade, diabetes, arteriosclerose, câncer e distúrbios neurodegenerativos, como as doenças de Parkinson (DP) e de Alzheimer (DA), e atualmente também verificou-se o agravamento da doença da Covid-19. O desafio de encontrar estratégias eficazes para atenuar marcadores inflamatórios e oxidativos tornou-se uma prioridade nas pesquisas biomédicas (BAGATINI et al., 2017; RAGAB et al., 2020).

A dieta desempenha um papel crucial na modulação da oxi-inflamação no corpo. Alguns alimentos e padrões alimentares têm sido associados à promoção da oxi-inflamação, enquanto outros têm efeitos antioxidante e anti-inflamatório. Dietas ricas em alimentos processados, gorduras saturadas, açúcares refinados e com baixo consumo de frutas, legumes e grãos integrais tendem a aumentar a inflamação. Por outro lado, dietas ricas em antioxidantes, ácidos graxos, ômega-3, fibras e outros nutrientes específicos que se encontram principalmente em frutas e verduras, demonstraram ter um efeito protetor contra a inflamação crônica (HU et al., 2022; ASSMANN et al., 2021).

Alguns padrões alimentares, como, por exemplo, os padrões de dieta mediterrânea estão diretamente associados com menor inflamação e oxidação (SCHWINGSHACKL & HOFFMANN, 2014). Em paralelo, a dieta ocidental está associada ao aumento de componentes pró-inflamatórios e oxidativos (NETTLETON et al., 2006). O padrão de dieta mediterrânea, caracterizada por alto consumo de frutas, verduras e legumes, cereais, leguminosas, oleaginosas, peixes e vinhos, está associado inversamente com a presença de interleucina 6 (IL-6) no sangue (DAI et al., 2008). A adesão à dieta mediterrânea por quatro semanas, avaliada através de um escore derivado de um questionário de características inerentes a ela, associou-se com a redução dos leucócitos, monócitos, neutrófilos e linfócitos sanguíneos e, quando aliada a um nível médio de atividade física, reduziu em 72% os níveis de proteína C reativa (PCR) em indivíduos com obesidade abdominal (PITSAVOS et al., 2007).

A biodiversidade amazônica pode entregar uma dieta semelhante a dieta do mediterrâneo. A dieta amazônica, também conhecida como a "dieta da floresta", vem apresentando propriedades benéficas a saúde. Baseada em alimentos tradicionalmente consumidos pelas populações indígenas e ribeirinhas da região amazônica. Essa dieta é notável por sua variedade de alimentos naturais e saudáveis, como peixes, frutos, tubérculos, nozes e castanhas, os quais são considerados ricos em nutrientes antioxidantes e anti-inflamatórios como os flavonoides, xantinas, ácidos graxos, catequinas e diversos outros componentes que trazem efeitos benéficos para a saúde (RIBEIRO E CRUZ, 2012).

Nesse sentido, a ideia do presente estudo foi desenvolver um suplemento nanotecnológico, visando atenuar processos oxi-inflamatórios ajudando assim na prevenção de doenças crônicas. Considerando a hipótese de que a nanotecnologia tem sido amplamente utilizada, uma vez que os sistemas nanoestruturados podem ser capazes de controlar a estabilidade, melhorar a solubilidade, biodisponibilidade e controlar a liberação de compostos bioativos, a sua combinação com compostos poderá fornecer efeitos mais potentes do que um composto isolado sem essa tecnologia. Neste sentido, foi realizada uma vasta revisão na literatura em busca de substâncias com propriedades anti-inflamatórias e antioxidante que combinadas, pudessem fornecer potenciais benefícios contra a inflamação e oxidação (NEVES et al., 2019; TEIXEIRA et al., 2021). Os componentes escolhidos foram o guaraná (*Paullinia cupana*), a castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*) associado a um nanocarreador a coenzima Q10 (CoQ10), dando origem ao multisuplemento G-Nut.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um sistema nanoestruturado de extrato oleoso a base coenzima Q10, castanha do Brasil e guaraná (G-NUT) com propriedades biológicas voltadas a atenuação de marcadores oxi-inflamatórios

1.1.1 Objetivos Específicos

- Desenvolver um sistema nanoestruturado a base de coenzima Q10, guaraná e castanha do Brasil;
- Identificar os principais compostos químicos presentes no nanoestruturado;
- Avaliar a segurança do suplemento G-NUT com diferentes concentrações, a partir da análise do seu efeito nos seguintes indicadores:
 - Citotoxicidade e indução de apoptose em cultura de Células mononucleares do sangue periférico humano;
 - Viabilidade de minhocas vermelhas e indução de apoptose;
 - Avaliar a eficácia do suplemento G-NUT com diferentes concentrações, a partir da análise do seu efeito nos seguintes indicadores:
 - Ação antioxidante do G-NUT em cultura de Células mononucleares do sangue periférico humano;
 - Ativação do efeito anti-inflamatório do G-NUT em cultura de Células mononucleares do sangue periférico humano;
 - Ativação inflamatória das células do sistema imunológico de minhocas vermelhas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ENVELHECIMENTO, GLOBALIZAÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DAS DOENÇAS CRÔNICAS

A transição demográfica em muitos países incluindo o Brasil, é um fenômeno global que resulta do declínio da mortalidade, redução de fertilidade e posteriormente o envelhecimento populacional. De acordo com a Organização das Nações Unidas (ONU), a expectativa de vida mundial tem aumentado consistentemente, atingindo cerca de 73,3 anos em 2023. Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) mostram que no Brasil esse aumento tem sido ainda mais expressivo, com a expectativa de vida ao nascer ultrapassando os 76,2 anos em 2023 (ONU, 2022; IBGE, 2023).

O envelhecimento é um processo natural que afeta todos os seres vivos, incluindo os seres humanos. O envelhecimento se dá de diversas formas como: biológicas, psicológicas e sociais que ocorrem ao longo do tempo e que influenciam no desenvolvimento e a funcionalidade do indivíduo. Alterações celulares, diminuição da capacidade de reparo e regeneração dos tecidos, diminuição da capacidade de combate a infecções devido ao envelhecimento do sistema imunológico, além do aumento da suscetibilidade a doenças crônicas, é a caracterização do envelhecimento em âmbito biológico (LÓPEZ-OTÍN et al., 2013; KENNEDY et al., 2014).

A transição epidemiológica mundial é um fator precursor da elevação das Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT), em decorrência da queda das taxas de natalidade, da diminuição da mortalidade infantil e consequente aumento da população e expectativa de vida. A nova rotina cotidiana dos indivíduos, fruto da industrialização, urbanização, desenvolvimento econômico e globalização do mercado de alimentos, contribuíram com a transição nutricional para uma dieta rica em gordura saturada e açúcares (OMS, 2022). As DCNT são um dos maiores problemas de saúde pública. A Organização Mundial da Saúde (OMS) afirma que as DCNT são responsáveis por 71% de um total de 41 milhões de mortes ocorridas no mundo em 2021, 77% dessas mortes ocorrem em países de baixa e média renda (WHO, 2018). Dados estatísticos apontavam que em 2019, 54,7% dos óbitos registrados no Brasil foram causados por DCNT e 11,5%

por agravos. No Brasil, foram registados mais de 730 mil óbitos por DCNT em 2019. Destes, 308.511 (41,8%) ocorreram prematuramente, com destaque para doenças cardiovasculares (28%); neoplasias (18%); doenças respiratórias (6%) e diabetes (5%) (OMS, 2021).

Os fatores de risco das DCNT, representam atualmente um importante problema de saúde pública no Brasil e no mundo, um quadro sanitário em que se combinam as doenças ligadas à pobreza típicas dos países em desenvolvimento e as doenças não transmissíveis dos países mais afluentes, refletindo as contradições do processo de desenvolvimento (ZAMAI et al, 2004). Por exemplo, a obesidade representa o problema nutricional de maior ascensão entre a população observado nos últimos anos, sendo considerada uma epidemia mundial, presente tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento (WHO, 2018). As tendências de transição nutricional decorrente da urbanização e industrialização ocorridas neste século direcionam para uma dieta mais ocidentalizada, com especial destaque para o aumento da densidade energética, maior consumo de carnes, leite e derivados ricos em gorduras, e redução do consumo de frutas, cereais, verduras e legumes, a qual, aliada à diminuição progressiva da atividade física, converge para o aumento no número de casos de obesidade em todo o mundo (POPKIN et al., 2012).

3.2 DOENÇAS CRÔNICAS

3.2.1 Conceito e as principais doenças crônicas

As DCNT são caracterizadas por um conjunto de doenças que não tem envolvimento de agentes infecciosos em sua ocorrência, multiplicidade de fatores de risco comuns, história natural prolongada, grande período de latência, longo curso assintomático com períodos de remissão e exacerbação, podendo levar ao desenvolvimento de incapacidades. As DCNT recebem também a denominação de doenças não infecciosas (BRASIL, 2008).

A organização Mundial de Saúde define como DCNT as doenças cerebrovasculares, cardiovasculares, diabetes, doenças respiratórias obstrutivas, asma e neoplasias, que compartilham diversos fatores de risco. Também inclui nas doenças crônicas os transtornos mentais, as doenças

neurológicas, bucais, ósseas e articulares, oculares e auditivas, a osteoporose e as desordens genéticas (WHO, 2018).

As DCNT demandam cuidados contínuos, complexos para algumas pessoas que necessitam de atenção em saúde especializada, como apoio ao tratamento e aos cuidados exigidos pela doença, ações de educação em saúde, apoio social e emocional a fim de proporcionar melhora na qualidade de vida (EDWARDS; GABBAY, 2007).

3.2.2 Fatores de risco para as doenças crônicas

As doenças crônicas são geralmente causadas por uma combinação de fatores de risco, incluindo predisposição genética e fatores ambientais e comportamentais. Segundo a OMS, o tabagismo, o consumo alimentar inadequado, a inatividade física e o consumo excessivo de bebidas alcoólicas são os fatores de risco que respondem pela grande maioria das mortes por DCNT (WHO, 2014).

Os fatores de risco mais importantes relacionados às condições crônicas estão ligados ao estilo de vida e podem ser sensíveis às intervenções de prevenção e promoção à saúde. Entre as estratégias para reduzir o surgimento e agravamento de algumas destas condições como o diabetes, as doenças cardiovasculares, a obesidade e vários tipos de câncer, incluem-se detecção precoce, aumento da atividade física, redução no consumo de tabaco e de álcool, bem como estímulo a uma nutrição saudável. A abordagem preventiva da população e individual revela-se eficaz para a modificação de comportamentos não saudáveis e a promoção de bons hábitos. No entanto, é necessário enfatizar a função e a responsabilidade central do paciente e de sua família nos cuidados com a saúde, já que o tratamento das condições crônicas, requer a mudança de comportamento e de estilo de vida (MOKDAD et al., 2004).

3.2.3 Patogênese das doenças crônicas

A patogênese das doenças crônicas é um processo complexo e multifatorial que envolve uma interação entre fatores genéticos, ambientais e comportamentais. Não existe uma única explicação para a patogênese de todas

as doenças crônicas, mas há alguns princípios gerais que podem ser aplicados a muitas delas. Os principais aspectos demonstram que variantes genéticas podem aumentar a probabilidade de desenvolver a doença. No entanto, a maioria das doenças crônicas é poligênica, o que significa que vários genes interagem para aumentar o risco. Além disso, a expressão genética pode ser influenciada por fatores ambientais (QUINTANILHA et al., 2017).

A exposição a fatores ambientais desempenha um papel crítico. Isso pode incluir poluição do ar, exposição a produtos químicos tóxicos, radiação, dieta e estilo de vida. O comportamento de estilo de vida desempenha um papel fundamental. Fatores de risco como o tabagismo, dieta pobre, sedentarismo e consumo excessivo de álcool estão associados a muitas doenças crônicas. Esses fatores de risco associados a estas doenças crônicas regulam positivamente processos inflamatórios. A inflamação crônica é uma característica comum em muitas doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes e doenças autoimunes que podem danificar os tecidos ao longo do tempo e contribuir para o desenvolvimento e progressão dessas doenças (PRASAD et al., 2012).

Na maioria das vezes, ocorre a interação de mais de um desses fatores de maneira complexa. Por exemplo, em doença como a obesidade pode ocorrer um processo inflamatório crônico, uma desregulação metabólica e aumento do risco de demais doenças como as doenças cardiovasculares, diabetes, o câncer, doenças neurodegenerativas dentre outras doenças crônicas (PICHÉ et al 2020).

A patogênese das doenças crônicas é altamente heterogênea e varia de uma doença para outra. Além disso, o desenvolvimento de uma doença crônica muitas vezes ocorre ao longo de anos ou décadas. Portanto, uma compreensão aprofundada dos fatores envolvidos na patogênese é fundamental para a prevenção, diagnóstico e tratamento eficaz dessas doenças. (PRASAD et al., 2012).

3.3 RELAÇÃO DA OXI-INFLAMAÇÃO E DOENÇAS CRÔNICAS

3.3.1 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo definido como um desequilíbrio entre a produção e a neutralização de espécies reativas de oxigênio (EROs). O desequilíbrio pró-produção de EROs pode ocorrer via exposição a fatores que favorecem a instauração do estresse oxidativo dos quais destacam-se: processos inflamatórios, exposição a estresse, infecções bacterianas e virais, alimentação baseada em gorduras e carboidratos, sedentarismo, ou em função da queda nas defesas antioxidantes (PERL, 2013).

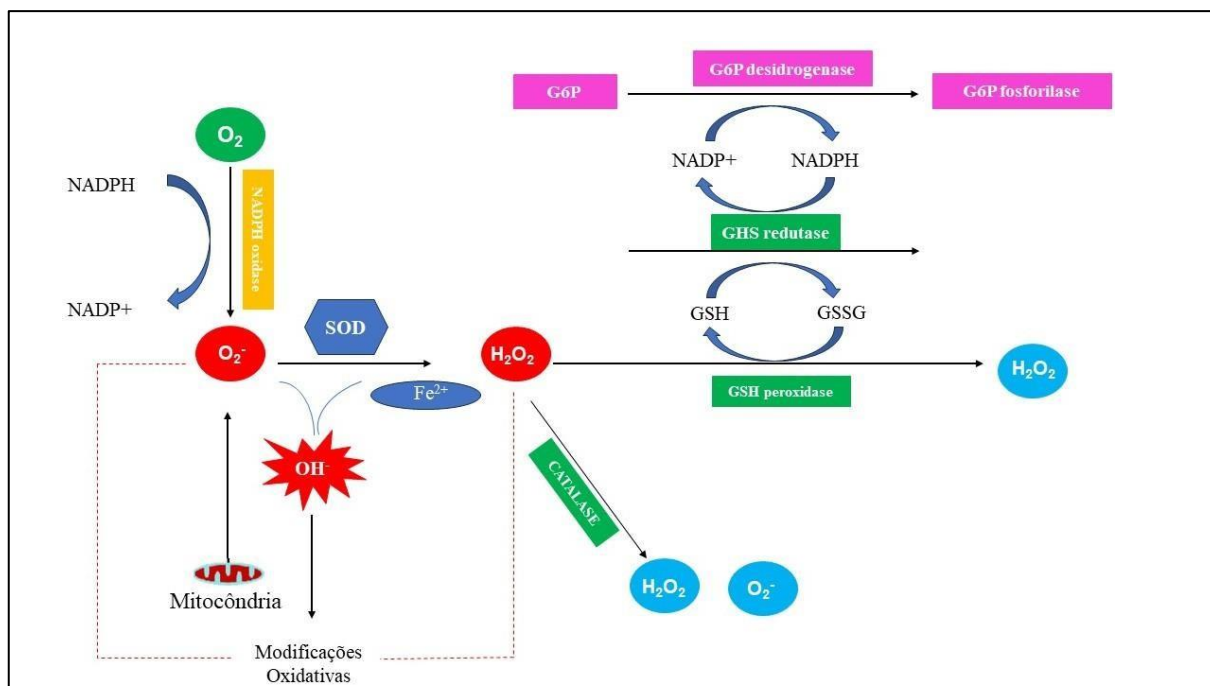
A formação EROs constitui, um processo contínuo e fisiológico, cumprindo funções biológicas relevantes. Um processo bioquímico no qual o oxigênio é utilizado para a produção de energia, principalmente a partir de hidratos de carbono, este processo também pode ser denominado metabolismo aeróbico, respiração aeróbia e respiração celular (PERL, 2013, FORMAN e Zhangl, 2021).

As espécies reativas ERs são produzidas principalmente na mitocôndria. No interior destas organelas o oxigênio passa através da cadeia transportadora de elétron gerando ATP (Adenosina Trifosfato), ou seja, energia metabólica. Entretanto, a redução do oxigênio é incompleta e conduz à geração de diferentes EROs, tais como o radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), considerado o principal contribuinte para danos oxidativos (VITALE et al., 2013). O H_2O_2 é capaz de originar outras EROs, dentre elas destaca-se o radical hidroxila (OH.), que por ter uma meia vida bastante curta, dificilmente pode ser sequestrado in vivo (figura 1). Ainda sobre o OH. este apresenta grande afinidade com o DNA. (PERL, 2013, BARBISAN, 2014).

Sendo as EROs, moléculas de grande reatividade, capazes de causar danos em células e tecidos e ocasionando doenças, o organismo ao longo da evolução desenvolveu o sistema de defesa antioxidante endógeno constituído por uma cadeia enzimática, composta pelas enzimas superóxidos dismutases (SOD1-Citosolica/SOD2- Mitocondrial/SOD3 extracelular), capazes de atuar dismutando o ânion radical superóxido em H_2O_2 , o qual pode ser detoxificado

pelas enzimas Catalase (Citosol) e ou Glutaciona Peroxidase (Mitocondrial). O organismo conta ainda com o sistema exógeno, constituído por moléculas bioativas com atividade antioxidante, obtidas a partir da alimentação rica em frutas, verduras e legumes, figura 1 (MONTAGNER, 2010).

Figura 1- Principais vias de produção de espécies reativas de oxigênio associadas com os principais mecanismos de degradação das mesmas.



Legenda: SOD: superóxido dismutase; GSH: glutaciona reduzida; GSSG: glutaciona oxidada; NADPH/NADP+: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato; NADH/NAD+: nicotinamida adenina dinucleotídeo; G6P: glicose-6-fosfato; O₂: oxigênio; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; Fe²⁺: ferro II; OH: hidroxila.

Fonte: De autoria.

Estes sistemas são vitais para o organismo, uma vez que na ausência deste, os danos oxidativos, ocasionados por estas moléculas seriam amplos e capazes de induzir a morte do organismo (HALLWELL e WHITEMAN, 2004). Vale ressaltar que níveis basais de espécies reativas são importantes para a manutenção da homeostase do organismo. Uma vez que, EROs como o H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) e o óxido nítrico (NO) atuam como sinalizadores celulares de proliferação, migração, sobrevivência e diferenciação celular (MACHADO, 2014).

A ocorrência do estresse oxidativo leva a oxidação de biomoléculas com

consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (HALLIWELL, WHITEMAN, 2004).

A cronicidade do processo em questão tem relevantes implicações sobre o processo etiológico de numerosas enfermidades crônicas não transmissíveis, entre elas a aterosclerose, diabetes, obesidade, transtornos neurodegenerativos e câncer. (GREEN et al., 2004). Estudos Ratificam que a geração de EROs desencadeia eventos patológicos que, por sua vez, estão envolvidos nos processos cardiovasculares, carcinogênicos e neurodegenerativos (FERRARI, 2004).

3.3.2 Inflamação

A inflamação é uma reação de defesa do organismo iniciada após uma infecção ou injúria. As respostas inflamatórias locais e/ou sistêmicas objetivam eliminar o estímulo que desencadeou a rota, promovendo a reparação do tecido e se for o caso estabelecendo a memória imune (FULLERTON e GILROY, 2016). Os macrófagos são as principais células no processo inflamatório, que desempenham papel fundamental na regulação de processos inflamatórios agudos e crônicos através da secreção de diversas citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (FULLERTON e GILROY, 2016, SUZUKI, et al, 2018). Estas células apresentadoras de antígeno, potencializam a ativação de linfócito T e B pela expressão de moléculas co-estimuladoras e liberam citocinas pro-inflamatórias como interleucina 1 β (IL-1 β) interleucina 6 (IL-6), interleucina 12 (IL-12) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α). Os macrófagos sintetizam ainda EROs (O $_2^-$, OH, H $_2$ O $_2$), e intermediários reativos do nitrogênio cujo principal representante é o Óxido Nitrico (NO). (CRUVINEL et al., 2010).

Fundamentais também no processo inflamatório, são os inflamossomas, complexos macromoleculares que se unem no citoplasma e ativam a proteína caspase 1. Tipicamente estes complexos consistem de um receptor do tipo Nod (NLR), um receptor de alerta de radar (ALR) e um adaptador proteico denominada proteína adaptadora associada a apoptose (ASC). Este conjunto é capaz de reconhecer e se ligar a caspase 1, que por sua vez, promove a ativação da resposta imune inata (CRUVINEL et al., 2010; FULLERTON e GILROY,

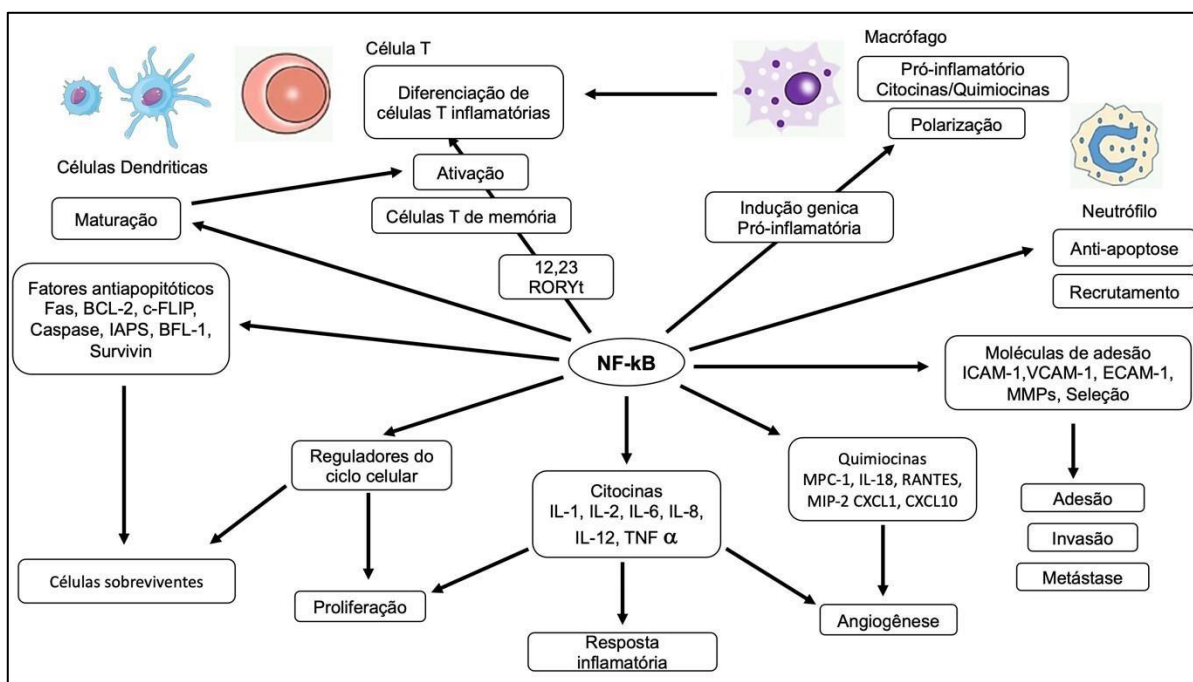
2016).

A ativação da caspase 1 tem como consequência, além de desencadear a piroptose (uma forma de morte celular programada), desencadeia a clivagem proteolítica da pró-interleucina 1 β (IL-1 β) presente no citoplasma, formando a IL-1 β madura (FULLERTON e GILROY, 2016). A IL-1 β induz o processo inflamatório pela indução da síntese pelos macrófagos e outras citocinas como IL-6, IL-8, IL-12 e TNF α , a infiltração de células inflamatórias no local através da indução da expressão de receptores (moléculas de adesão) nas células endoteliais vasculares do tipo que permitem a ligação dos monócitos as células endoteliais e posterior migração destas células para o local da inflamação (ROITT e DELVES, 2014).

Por ser extensivamente secretada e permanecer em níveis significativos como pró-IL1 β no citoplasma, esta molécula é considerada a principal citocina pró-inflamatória produzida por células como os macrófagos. Níveis baixos de IL-1 β induzem resposta inflamatória limitada. Contudo níveis elevados de IL-1 β induzem resposta inflamatória generalizada, dano tecidual e supressão imune (VORONOV et al., 2014; LACKEY e OLEFSKY, 2015).

A IL-1 β ativa rotas como NF κ B e MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*) capazes de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias adicionais como a IL-6, IL-8, IL-12 e TNF α (VORONOV et al., 2014). Em inflamações agudas ocorre à ativação da rota clássica de inflamação denominada M1, e em seguida a ativação da rota alternativa, denominada M2. Assim, os macrófagos M1 representam a via clássica e exercem atividade antiproliferativa e citotóxica, resultante particularmente da capacidade de secretar NO, EROs e as citocinas pró-inflamatórias já citadas (BRUNE et al., 2013). Já os macrófagos M2, que representam a via alternativa com capacidade de inibir as funções inflamatórias e citotóxicas de M1, induzem um aumento de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e o TGF β (*Transforming growth factor-beta*), favorecendo a angiogênese e o reparo tecidual. Os macrófagos M2 também possuem ação imunossupressora diminuindo a proliferação dos linfócitos T (BRUNE et al., 2013).

Figura 2: NF- κ B envolvido no desenvolvimento e progressão da inflamação.



Legenda: NF- κ B é um fator de transcrição induzível. Após sua ativação, ele pode ativar a transcrição de vários genes e, assim, regular a inflamação. O NF- κ B tem como alvo a inflamação não apenas diretamente aumentando a produção de citocinas inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão, mas também regulando a proliferação celular, apoptose, morfogênese e diferenciação.

Fonte: Traduzido de TING LIU, 2017.

Tanto na resposta de fase aguda quanto na crônica, mediadores inflamatórios agem de maneira local ou sistêmica, ativando outras células envolvidas com o processo inflamatório (células endoteliais, fibroblastos e células do sistema fagocítico mononuclear), ampliando, assim, a resposta inicial ao agente lesivo. Pode ser verificada a ocorrência de febre, hipotensão, leucocitose, caquexia, além de alterações no metabolismo de lipídios e lipoproteínas (aumento dos níveis de triglicérides e da secreção de VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade) e supressão da oxidação de ácidos graxos (KUMAR et al., 2004A).

Embora não existam critérios diagnósticos específicos, sabe-se que o estado de inflamação crônica subclínica provoca lesão tissular incipiente por meio da ativação a longo prazo do sistema imune inato, podendo causar posterior manifestação de doenças crônicas não transmissíveis, como as

cardiovasculares, o diabetes mellitus, a obesidade, o câncer, entre outras. O mecanismo pelo qual estes mediadores pró-inflamatórios levam à manifestação dessas doenças parece envolver a atenuação da atividade insulínica, mobilização de gorduras, disfunção endotelial e estresse oxidativo (LAHOZA e MOSTAZAA, 2007).

3.4 TRATAMENTO DAS DOENÇAS CRÔNICAS

As doenças crônicas causam grande impacto na qualidade de vida da sociedade, afetando diversos aspectos dos indivíduos que vão desde a execução das suas atividades de vida diária a fatores como: vida sexual, social, psicológico, bem-estar, imagem corporal, descontentamento com a doença, entre outros aspectos. Toda essa problemática precisa ser acompanhada e monitorada, no intuito de promover um cuidado centrado nessas pessoas e promover bem-estar dentro do seu contexto de adoecimento. A partir disso, o Brasil possui programas de controle dessas doenças e atua diariamente no controle, prevenção, promoção e recuperação da população afetada ou em risco de acometimento dessas condições. Usualmente a perspectiva do tratamento para essas condições é medicamentosa e com encorajamento a mudança do estilo de vida desses pacientes para hábitos de vida mais saudáveis (COSTA et al., 2021).

Importante destacar que uma iniciativa pouco explorada é o uso de fitoterápicos na terapêutica desses pacientes, em que a grande maioria dos tratamentos se voltam ao uso de outros tipos de fármacos, sendo a prática fitoterápica ainda pouco utilizada. O Brasil já possui políticas de encorajamento ao uso dessa classe, com repasse da União para estados e municípios que podem através de protocolos e processos rigorosos, supervisionados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) produzir esses medicamentos (BRASIL, 2018). O uso de plantas medicinais e medicamentos que utilizam essas plantas como base de sua fórmula possui vasta aceitação pelo mundo e tem comprovação científica de sua efetividade. Além disso os fitoterápicos são atrelados fortemente a cultura da população, em que estes possuem conhecimento sobre o efeito dessas plantas que foram passados entre gerações, associando a crença de cura ou controle de doenças (SOARES et al., 2020).

É válido acrescentar que a fitoterapia é caracterizada pela prática terapêutica que faz uso de plantas, seja esta de forma *in natura* ou proveniente de preparações que extraia os derivados dos vegetais, com o processo de isolamento de seus constituintes ativos, em que a finalidade é a aplicação de caráter medicinal (SAAD et al., 2014). A indicação do uso de fitoterápicos é mundial e a Organização Mundial de Saúde (OMS) encoraja a utilização de práticas integrativas e complementares pela população mundial, em que dentre estas pode-se citar o uso de plantas medicinais como práticas de cuidado que oferecem uma melhora da qualidade de vida de indivíduos com doenças crônicas (WHO, 2019).

3.5 UTILIZAÇÃO DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES COM NOVAS TECNOLOGIAS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS CRÔNICAS

Considerando que os mercados mundiais de alimentos funcionais movimentaram globalmente USD 129 bilhões e está em franco crescimento, em 2019, foi registrado um crescimento de 7%, no Brasil, atingindo vendas de R\$ 6,6 bilhões. O mercado brasileiro corresponde a 30% do mercado latino-americano de suplementos dietéticos (SAATH, 2018).

Considerando a legislação brasileira, o desenvolvimento, produção e comercialização de alimentos com alegação funcional está bem estabelecido pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde. Sempre que uma empresa queira fazer este tipo de alegação, deve ser submetida à avaliação da ANVISA (Resoluções 18 e 19/99). Segundo as resoluções “as alegações de propriedade funcional utilizadas nos chamados “alimentos funcionais” estão relacionadas ao papel metabólico ou fisiológico que um nutriente (ex. fibras) ou não nutriente (ex. licopeno) tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções no organismo (BRASIL, 2018).

Isso significa que estes alimentos contêm ingredientes que podem auxiliar, por exemplo, na manutenção de níveis saudáveis de triglicerídeos, na proteção das células contra as espécies reativas, no funcionamento do intestino, na redução da absorção do colesterol, no equilíbrio da flora intestinal, entre outros, desde que seu consumo esteja associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis. É importante ressaltar que as alegações não podem

fazer referência ao tratamento, prevenção ou cura de doenças (SAATH, 2018).

Para que uma substância seja aprovada em testes de toxicidade, esta não deve ocasionar a morte celular e nem afetar suas funções. Desta forma, testes toxicológicos *in vitro* compõem a primeira etapa para a avaliação da compatibilidade biológica de qualquer substância. Através da avaliação de citotoxicidade, é possível determinar a concentração a ser empregada, fornecendo informações a respeito de eventuais danos celulares, sendo, desta forma, essencial na fase inicial de desenvolvimento de qualquer produto. Através destes testes é possível detectar a ocorrência de inibição do crescimento celular, lise das células, inflamação e apoptose que possam vir a ocorrer nas mesmas (ARAÚJO et al., 2008).

Deste modo, pode ser solicitado junto a ANVISA alegação de propriedades anti-inflamatórias e de auxílio ao sistema imunológico do suplemento nanotecnológico que será desenvolvido. A base de Guaraná (*Paullinia cupana*), Castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*) e Coenzima Q10. Após a realização dos testes pré-clínicos e demais estudos clínicos.

3.5.1 Nanotecnologia

Os avanços da fitoquímica e da fitofarmacologia, bem como das indústrias de suplementos alimentares, permitiram elucidar a composição e a atividade biológica de diversos produtos vegetais medicinais. A eficácia de muitos extratos medicinais depende do fornecimento de compostos ativos (BAYDA et al., 2019). Dessa forma os ingredientes naturais tornaram-se uma alternativa ecologicamente importante, que tem gerado inúmeras pesquisas (WANG et al, 2014).

A nanotecnologia vem sendo tratada como um dos principais recursos para o desenvolvimento científico-tecnológico nas mais diversas áreas do conhecimento. Estas nanoestruturas, aos poucos, começam a ser consideradas como sistemas tecnológicos viáveis para incorporação de substâncias ativas, resultando no surgimento de novos produtos no mercado (SCHMALTZ,

SANTOS, GUTERRES, 2005; SANTOS; FIALHO, 2008; GOMES; FAGAN,

2007). E como alternativa tecnológica, tem sido aplicada em vários campos, tais como biomédico, óptico, eletrônico, mecânico e químico, assim como, em bens de consumo, como alimentos (DOAK et al., 2012, WANG et al., 2022).

Denominam-se nanopartículas os materiais que pertençam à escala nanométrica (10^{-9}) em todas as suas dimensões, apresentando tamanhos situados entre 10 e 1000 nm e diferindo de acordo com a sua composição qualitativa e sua organização em nível molecular (MCTI, 2023). Estes sistemas nanoparticulados podem ser administrados como adjuvantes transportadores de fármacos para diagnóstico ou aplicações terapêuticas, implante de próteses e ortopedia (HALLEM,2023). Além disso, são uma alternativa promissora como vetores ativos, devido à sua capacidade de liberação de fármacos. Seu tamanho permite uma maior captação intracelular do que em outros sistemas particulados. Também podem melhorar a estabilidade das substâncias ativas e ser biocompatível com o tecido (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010, WANG et al., 2022).

Devido ao seu grande tamanho molecular, os extratos de plantas apresentam dificuldade em atravessar as membranas celulares. Desta forma, podem perder sua eficácia. Nesse sentido, combinar a nanotecnologia pode auxiliar no processo de proteção e entrega destes compostos. É por isso que alguns extratos não são usados na prática clínica, desta forma combiná-los com a nanotecnologia pode tornar os extratos vegetais mais potentes. Isso permitiria que os pacientes reduzissem a quantidade de um medicamento necessário e reduzissem os efeitos colaterais. Os tratamentos atuais não transportam adequadamente os ingredientes ativos para a zona de tratamento durante todo o tratamento. (BONIFÁCIO et al,2014).

A nanotecnologia tem sido amplamente utilizada, uma vez que os sistemas nanoestruturados podem ser capazes de controlar a estabilidade, melhorar a solubilidade, biodisponibilidade e controlar a liberação de compostos bioativos (NEVES et al, 2015). Apresenta ser uma abordagem inovadora com aplicações potenciais na investigação nutracêutica, uma vez que melhora essas características, além de melhorar a absorção de compostos bioativos, protegê-

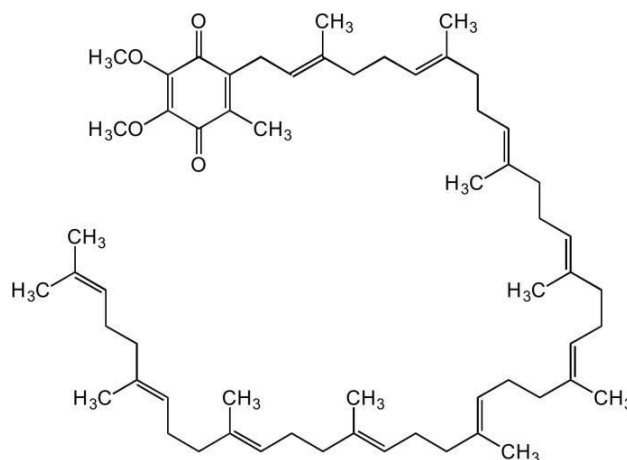
los contra a degradação prematura no organismo e prolongar o seu tempo de circulação (CODEVILLA et al, 2015).

As nanopartículas podem ser transformadas e incorporadas em diversas formas de dosagem como em líquidos, cremes, sprays, aerossóis, podendo ser administrados por via tópica, oral, intravenosa, intranasal, ocular, dentre outras (KHANI; KEYHANFAR; AMANI, 2016). Quando administrada por via oral, o tamanho nanométrico e sua capacidade de solubilizar compostos bioativos muito hidrofóbicos fornecem um caminho para aumentar drasticamente a taxa de dissolução desses compostos e, subsequentemente, a biodisponibilidade sistêmica esperada (JAMPILEK, et al, 2019).

Neste sentido, a utilização de nanocarreadores visa proteger as substâncias funcionais contra a fotodegradação, oxidação, condições degradáveis ácidas e/ou alcalinas do organismo e temperatura de armazenamento (CODEVILLA *et al.*, 2015). Diante dos benefícios e vantagens que este tipo de nanocarreador apresenta, pesquisadores investem cada vez mais na emulsificação de substâncias antioxidantes como as antocianinas, quinonas e outros, visando um aumento da estabilidade e biodisponibilidade destes compostos (CHEN e INBARAJ, 2019).

3.5.2 Coenzima Q10

A coenzima Q10 (CoQ10) é uma quinona lipossolúvel e biologicamente ativa que compreende um anel de benzoquinona com uma cadeia lateral isoprenóide. Quando isolada e caracterizada pela primeira vez esse composto, ficou estabelecido como principal função transportador de elétrons na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, figura 3 (GVOZDJÁKOVA, ANNA et al, 2013). Além de sua função principal nas mitocôndrias, a CoQ10 foi descrita como tendo múltiplas funções, como ação oxidante na geração de sinal da endomembrana e da membrana plasmática, e ajudando a controlar a estrutura da membrana e os status fosfolipídico e pode ser utilizado como um carreador de compostos sistêmicos (LENAZ et al., 1999, LÓPEZ-LLUCH et al., 1999).

Figura 3: Estrutura química da CoQ10.

Fonte: Google

Dentre todas as funções atribuídas à CoQ10, a mais importante e relevante de suas ações é a potente capacidade antioxidante de suas formas redox coexistentes (ubiquinona, semi-ubiquinona e ubiquinol), que atuam na membrana mitocondrial, bem como em outras membranas da célula e no plasma e citoplasma. Essas propriedades antioxidantes na cadeia de transporte de elétrons aumentam sua eficiência no transporte de elétrons, evitando a perda descontrolada de elétrons, ajudando a reciclar outros antioxidantes, como vitamina C ou vitamina E, e também atuam diretamente reduzindo e neutralizando radicais ou oxidantes, sendo capaz de evitar a peroxidação de fosfolípidos, proteger da oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) presentes no plasma e o DNA dos danos oxidativos (GUTIERREZ; MARISCAL, et al., 2019).

Presumivelmente, a forma reduzida da CoQ10, o ubiquinol, é o agente ativo envolvido na função antioxidante, portanto as células e tecidos devem ter mecanismos moleculares pelos quais recuperam sua forma ativa. Resumidamente, esses mecanismos incluem a ação da diidroorotato desidrogenase na membrana mitocondrial interna, que está envolvida na biossíntese de pirimidina e reduz a ubiquinona pela oxidação do diidroorotato em orotato e pelo envolvimento da CoQ10 na flavoproteína/elétron transferência de flavoproteína:ubiquinona no sistema oxidoreductase. Aqui, a CoQ10 é mantida em equilíbrio entre suas formas redox fora da mitocôndria pela ação de três enzimas: nicotinamida dinucleotídeo de adenina reduzido/nicotinamida adenina

dinucleotídeo fosfato (NADH/NADPH), reduzido oxidoredutase, NADH citocromo b5 redutase e NADPH-coenzima Q redutase (MUNIER-LEHMANN et al, 2015; WATMOUGH et al, 2010).

A CoQ10 tem uma localização onipresente e está presente em todas as membranas da célula. A principal fonte de CoQ10 provém da sua biossíntese endógena, que ocorre em todos os tecidos de um organismo, embora uma proporção menor de CoQ10 deriva de fontes alimentares como vegetais verdes, peixes, cereais e carne vermelha. Contudo, do ponto de vista clínico, é importante notar que deficiência de produção endógena tem sido relatada na fisiopatologia de diferentes doenças, e que o envelhecimento está associado a um grande nível de deterioração (SPINDLER; BEAL; HENCHCLIFFE, 2009).

Kernt e colaboradores em 2010 alegaram que a CoQ10 reduziu de forma eficaz as EROs ocasionadas pela exposição a luz UV em células epiteliais do cristalino humano, indicando sua capacidade antioxidante. No estudo de Somayajulu et al. (2005), foi investigado o efeito neuroprotetor da CoQ10, e os resultados indicaram que o tratamento precoce com a coenzima inibiu a geração de ERO e manteve o potencial da membrana mitocondrial durante o ERO. A CoQ10 é, também, utilizada no tratamento coadjuvante de doenças cardíacas, como a Insuficiência Cardíaca Crônica (SPINDLER; BEAL; HENCHCLIFFE, 2009).

Desde a sua descoberta, muitos estudos demonstraram uma associação entre baixos níveis de CoQ10 e diversas patologias e sintomas, podendo a sua suplementação ser coadjuvante em um possível tratamento. Estudos demonstram seu potencial na diminuição nos níveis de triglicerídeos, colesterol total e LDL (SAHEBKAR et al, 2016), redução da pressão arterial (MUSINI et al, 2009), proteção contra doenças neurodegenerativas principalmente na doença de Alzheimer doença, doença de Parkinson (YOUNG et al, 2007; BARNHAM et al, 2004) e na atrofia de múltiplos sistemas (NAKAMOTO et al, 2018).

3.5.3 Guaraná (*Paullinia cupana*)

O guaraná (*Paullinia cupana* Kunth var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) é uma planta nativa da região amazônica, pertencente à família Sapindaceae e conhecida por suas propriedades estimulantes e medicinais. O seu uso

doméstico é feito há muitos anos, sendo que o primeiro registo ocorreu no século XVII, por um missionário jesuíta, que relatou que os índios amazônicos Sateré-Mawé consumiam o guaraná no seu cotidiano, devido à grande energia proporcionada pela planta, além de seus efeitos na redução da febre, dor de cabeça, diarreia, cólica e como diurético (PATRICK *et al.*, 2019; TORRES *et al.*, 2022).

Figura 4: Guaraná (*Paullinia cupana*), o fruto, árvore e a semente torrada.



Fonte: Imagem cedida pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Amazônia Ocidental (Manaus, AM) - Fotógrafo Felipe Rosa.

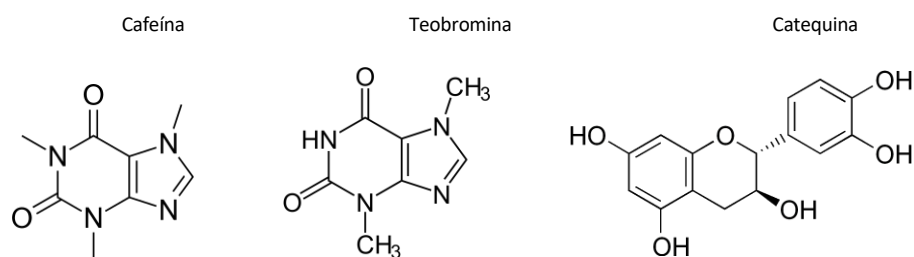
O alto teor de cafeína e outros componentes tornam a semente do guaraná comercial e para utilização científica. A cafeína (*1,3,7-trimetilxantina*) é o constituinte mais notável do guaraná, à qual são atribuídos muitos dos seus efeitos, como a propriedade estimulante do sistema nervoso central (SNC). A concentração de cafeína nas sementes varia de 2,5 a 6%, teor mais elevado do que o encontrado em outras espécies cafeinadas, como o café (*Coffea arabica* L.), chá preto e chá verde (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) e a erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) (ALVES *et al.*, 2019; PATRICK *et al.*, 2019; TORRES *et al.*, 2022).

Também estão presentes nas sementes metilxantinas, teobromina (3,7-dimetilxantina) e teofilina (1,3-dimetilxantina), em menor quantidade (ambas abaixo de 0,3%). Flavan-3-óis são encontrados em quantidades consideráveis,

com maior prevalência de catequina (3%) e epicatequina (2%). Oligômeros de flavan-3-óis, conhecidos como proantocianidinas ou taninos condensados, também compõem as sementes do guaraná, com maior predomínio das proantocianidinas B1 e B2, seguidas da A2. Saponinas também foram identificadas em baixas quantidades (PATRICK *et al.*, 2019; TORRES *et al.*, 2022).

O guaraná (sementes) é amplamente comercializado em todo o mundo, como componente de uma variedade de produtos, que incluem refrigerantes, bebidas energéticas, suplementos dietéticos (formulado sozinho ou em combinação, para diversas finalidades, como aumento de energia e concentração, estimulante, suporte para perda de peso, diurético e tônico) e, ainda, como ingrediente ativo na indústria de medicamentos (PATRICK *et al.*, 2019; TORRES *et al.*, 2022). O guaraná está incluído na lista de constituintes autorizados para uso em suplementos alimentares, estabelecida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), na Instrução Normativa nº 28, publicada em julho de 2018 (BRASIL, 2018).

Figura 5: Principais componentes do guaraná



Fonte: Google.

Os compostos bioativos do guaraná apresentam propriedades biológicas nas quais foram demonstradas cientificamente. Estas propriedades incluem atividades antimutagênica, anticarcinogênica (FUKUMASU; LATORRE; ZAIDAN-DAGLI, 2011), anti-inflamatória (KREWER *et al.*, 2014), neuroprotetora (VELOSO *et al.*, 2018), antioxidante (YONEKURA *et al.*, 2016), antifadigante (CAMPOS *et al.*, 2011), cardioprotetora e antiobesidade (KREWER *et al.*, 2011B)

e de melhora do desempenho cognitivo e do humor (HASKELL *et al.*, 2007). Dentre elas, as de maior interesse neste trabalho e que explicam a escolha do guaraná como um dos constituintes do multissuplemento G-NUT, são as suas propriedades anti-inflamatória, antioxidante e neuroprotetora.

O extrato hidroalcoólico das sementes de guaraná apresentou efeito anti-inflamatório na linhagem de células neuronais humanas (SH-SY5Y), expostas ao metilmercúrio, observaram que componentes da matriz química do guaraná (cafeína, teobromina e catequina) reduziram os níveis de marcadores oxidativos e pró-inflamatórios, desencadeados pelo antipsicótico ziprasidona, na linhagem comercial de macrófagos (RAW 264.7). O estudo realizado por Ruchel e colaboradores (2021) demonstrou o efeito do pó de guaraná na redução da inflamação causada pela lipotoxicidade, em ratos Wistar com hiperlipidemia.

Krewer e colaboradores (2014) avaliaram o efeito da suplementação do guaraná na modulação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- α , IL-1 β , IFN- γ) e da citocina anti-inflamatória IL-10 em protocolos *in vitro* e *in vivo*. No estudo *in vitro*, células mononucleares do sangue periférico humano foram expostas ao guaraná (5 mg/mL) por 6 horas, enquanto no estudo *in vivo*, 14 voluntários saudáveis foram suplementados com a dose diária de 90 mg de pó de guaraná (em cápsula), por 14 dias, analisado. Em ambos os protocolos (no sobrenadante da cultura celular *in vitro* e nas amostras sanguíneas do estudo *in vivo*), o guaraná modulou positivamente as citocinas associadas ao metabolismo inflamatório, diminuindo os níveis das citocinas pró-inflamatórias e aumentando os níveis de IL-10.

O extrato etanólico do pó das sementes de guaraná apresentou efeito antioxidante, com redução da peroxidação lipídica, após dano celular induzido por citrato férrico de amônio, na linhagem celular de pré-adipócitos 3T3-L1, em estudo realizado por Basile e colaboradores (2005). Em outro estudo, o extrato hidroalcoólico do guaraná apresentou efeito antioxidante e de reversão da toxicidade causada pelo nitroprussiato de sódio, em cultura de fibroblastos embrionários (células NIH-3T3) (BITTENCOURT *et al.*, 2013). Machado (2014) mostrou que o extrato hidroetanólico do guaraná diminuiu indicadores de estresse oxidativo em células-tronco de adipócitos senescentes, obtidas de lipoaspirados humanos.

Yonekura e colaboradores (2016) conduziram um estudo com 12 com sobrepeso, que foram submetidos a uma intervenção de 15 dias com ingestão diária de 3 g do pó de semente de guaraná, dissolvidos imediatamente antes do uso, em 300 mL de água. Foram realizadas coletas de sangue no primeiro e último dia de intervenção, em jejum e 1 hora pós-dose, e foi avaliado o efeito do consumo de guaraná sobre as catequinas plasmáticas, a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx e os níveis de biomarcadores oxidativos. No geral, o estudo demonstrou que o guaraná reduziu o estresse oxidativo dos indivíduos clinicamente saudáveis, por ação antioxidante direta dos fitoquímicos absorvidos e pelo aumento da regulação das enzimas antioxidantes/desintoxicantes.

No estudo de Oliveira e colaboradores (2022), mostram que a neuroproteção causada pelo guaraná na linhagem de células neuronais humanas (SH-SY5Y), em que o extrato dimetilsulfóxido do guaraná foi capaz de proteger estas células contra a citotoxicidade induzida por rotenona, e no estudo de Bittencourt e colaboradores (2013), em que o pó do guaraná preveniu a agregação de β -amiloide, a geração de produtos finais de glicação avançada ea citotoxicidade induzida por acroleína. O efeito neuroprotetor do extrato hidroalcoólico do guaraná também foi observado sobre as células do cérebro e do cerebelo de camundongos, expostas à quimioterápica vincristina. O estudo conduzido por Bittencourt e colaboradores (2013) demonstrou que o extrato do guaraná exerceu efeitos protetores contra a toxicidade induzida pela acroleína no SNC de ratos Wistar.

3.5.4 Castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*)

A castanheira do Brasil (*Bertholletia excelsa*) é uma das árvores- símbolo da Amazônia devido a sua importância social, ecológica e econômica para a região. Milhares de famílias de extrativistas e produtores rurais utilizam a semente da castanheira como importante fonte de renda e alimento. Dentre derivados da amêndoa obtidos estão: granulado, a “torta” resultante da prensagem para obtenção do óleo, extratos proteicos, biscoitos, farinhas e bebidas. Por apresentar um teor médio de 60% de teor lipídico da castanha do Brasil a extração do óleo tem atraído muito interesse da indústria (EMBRAPA,

2019). Nesse contexto, essa revisão trará aspectos das propriedades relativas ao óleo e sua produção.

Figura 6: Castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*), árvore, os ouriços e o fruto.



Fonte: Google.

As nozes de árvores estão presentes em dietas em todo o mundo. Algumas possuem propriedades clínicas com efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e potencialmente antitumorais e melhoram a expectativa de vida do consumidor (RUSU *et al*, 2019). São alimentos ricos em calorias, densos em nutrientes, principalmente devido ao seu alto teor lipídicos (40 - 80%) dependendo de espécies e variedades (MOESTRI *et al*, 2020).

Dentre as nozes de árvores, a castanha do Brasil é uma matriz complexa, rica em substâncias bioativas, como selênio, α e γ -tocoferóis, compostos fenólicos, folato, magnésio, cálcio, proteínas, ácidos graxos (AG) monoinsaturados (MUFA) e ácidos graxos poli-insaturados (PUFA). O alto conteúdo de MUFA e PUFA (ácidos graxos poli-insaturados) nos alimentos potencialmente benéfico para a saúde cardiovascular, principalmente quando comparado às dietas ricas em ácidos graxos essenciais, de acordo com as diretrizes alimentares (COSTA e SILVA *et al*, 2020). Muitos mecanismos sugerem que os PUFA têm efeitos na modulação de vias que podem influenciar o perfil lipídico. Por exemplo, os PUFA podem diminuir a síntese de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), devido ao maior catabolismo desses AG nos

peroxissomos e à sua interferência nos receptores nucleares. (COSTA & SILVA *et al*, 2020).

Óleo da castanha é comumente utilizado como óleo comestível, produto farmacêutico e de cuidados com a pele (GOMES *et al*, 2019). Com a diversificação de produtos derivados da castanha-do-Brasil, o óleo pode ser encontrado no varejo com diversas marcas comerciais. Estudo de Cicero e colaboradores em 2018, demonstrou que amostras comercializadas de óleo de castanha-do-Brasil continha expressiva quantidade de esqualeno, abaixo somente do azeite de oliva. O esqualeno é o componente mais representativo da fração não saponificável do azeite extravirgem, bem como um de seus marcadores de qualidade mais relevantes (CICERO *et al*, 2018).

Por fim, com base nas informações a respeito da patogênese das doenças crônicas e nas propriedades biológicas do guaraná, do óleo de castanha e da CoQ10 em um único suplemento com nanotecnologia, é pressuposto, no presente estudo, que a combinação destes compostos no multissuplemento G-NUT possa proporcionar resultados benéficos no tratamento e na prevenção de doenças crônicas, através da atenuação dos processos inflamatórios e oxidativos. Porém, antes de ser testado em humanos, é necessário esse tipo de estudo para analisar a segurança do G-NUT.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ARTIGO (MANUSCRITO SUBMETIDO)

Este artigo foi submetido na revista *Food and Chemical Toxicology* e a metodologia empregada está descrita na íntegra, a partir da página 27 desta dissertação.

5 RESULTADOS

Os resultados estão descritos na forma de manuscrito, submetido para a revista *Food and Chemical Toxicology*, fator de impacto 5.5, Qualis Capes A2 no quadriênio 2017- 2020. Estão descritos na íntegra, a partir da página 27 desta dissertação. A formatação do manuscrito está conforme o guia de autores da revista.

MANUSCRITO**Safety and efficacy indicators of Guarana and Brazil Nut extract Carried in Nanoparticles of Coenzyme Q10: Evidence from human and red earthworm immune cells.**

Vitória Farina Azzolin^a, Verônica Farina Azzolin^b, Railla da Silva Maia^b, Moises Henrique Mastella^c, Juliane Santiago Sasso^d, Fernanda Barbisan^d, Gustavo Rossato Bitencourt^e, Paola de Azevedo Mello^e, Ednea Maia Aguiar Ribeiro^b, Euler Esteves Ribeiro^b, Ivana Beatrice Manica da Cruz^d, Rita de Cassia Saraiva Nunomura^a

^a Graduate Program in Biotechnology - Federal University of Amazonas, AM.

^b Open University for the Third Age Foundation, Manaus, AM.

^c São Paulo State University, Botucatu, SP.

^d Biogenomics Laboratory - Federal University of Santa Maria, RS.

^e Graduate Program in Chemistry, Federal University of Santa Maria, RS.

Corresponding author to Verônica Farina Azzolin, E-mail address: azzolinveronica@hotmail.com, address: Gerontec Research, Teaching and Technological Development Center, Open University Foundation for Third Ages, Avenida Brasil, s/n, Santo Antonio, 69029-040, Manaus - AM, Brazil.

Abstract

Introduction: Aging are associated with chronic oxidative and inflammatory states, that potentially could be attenuated by consumption of supplements with new technologies based on Amazonian biodiversity. **Aim:** The present investigation described and characterized a nano supplement based on coenzyme Q10 containing guarana (*Paullinia cupana*) and Brazil nuts (*Bertholletia excelsa*) (G-NUT), with potential use for mitigating oxy-inflammatory conditions. **Methods:** O G-Nut was obtained by emulsification technique. Nanosupplement was produced at 1:1 ratio of guarana powder, Brazil nut oil and 10% CoQ10, and chemically characterized by high-resolution mass spectrometry (HRMS) method. Additional *in vitro* and *in vivo* assays that tested safety and functional markers of G-NUT on human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) cultures and in immune cells (coelomocytes) of Californian red earthworms (*Eisenia fetida*). The tested concentrations of G-Nut and the free supplement in cell culture were in the range of 0.25–3 mg/mL. **Results:** G-NUT was obtained containing theobromine, theophylline, caffeine, selenium and coenzyme Q10 as main bioactive molecules. G-NUT did not induce cytotoxic events on PBMC cells, triggering down-regulation in the expression of apoptotic (Caspases 3 and 8) genes, reduction in lipid and protein oxidation levels and lowering effect on levels of pro-inflammatory cytokines. In the red worm model, G-NUT did not cause mortality inducing more efficient immune response when coelomocytes were exposed a dead yeast. **Conclusion:** G-NUT nanotechnological provided a better response than the free formula supplement, and both are safe to begin testing in humans.

Keywords: Nanoparticle; *Paullinia cupana*; Coenzyme Q10; *Bertholletia excelsa*; oxy-inflammatory.

1. Introduction

Aging, and non-communicable chronic diseases (NCDs) are associated with chronic oxidative and inflammatory states, contributing to the development of clinical symptoms. Therefore, a reduction in oxidative stress and chronic inflammation can be relevant for attenuating and delaying the progression of chronic diseases and controlling clinical symptoms. The treatment of chronic diseases generally involves a multidisciplinary approach and can vary depending on the type of disease and the severity of symptoms. These treatments range from lifestyle changes to the use of drugs to minimize symptoms to physical and rehabilitation therapies, among others and are treatments that need to be continuous (He et al., 2015; Pérez-Torres et al., 2017).

Evidence suggested that diet plays a crucial role in modulating oxidative inflammation in the body. Some foods and dietary patterns have been associated with promoting oxidative inflammation, while others have antioxidant and anti-inflammatory effects. Some foods have been tested for reducing oxidative stress and inflammation in other clinical conditions (HU, 2002; Assmann et al., 2021; Pitsavos et al., 2007). This is the case of several fruits used in the Amazonian diet, such as guarana (*Paullinia cupana*) and Brazilian nut (*Bertholetia excelsa*). Guarana seed toasted presents highest concentration of xanthines (especially caffeine) and catechins (Da Costa et al., 2014; Veloso et al., 2018; Yonekura et al., 2016) been safe for human consumption (Patrick et al., 2019). Brazil nut is a fruit richest in selenium and fatty acids such as omega 3, 6, and 9 with clinical properties with antioxidant, anti-inflammatory, and potentially antitumor effects, and it improves the consumer's life expectancy (Rusu et al., 2019; Hou et al., 2021; Quitian-Useche et al., 2021).

Teixeira and colleagues' study found that a multi-component formulation based on guarana, L-carnitine, and selenium demonstrated an oxi-inflammatory effect (Teixeira et al., 2021; Teixeira et al., 2023). Therefore, it is suggested that the use of multiple compounds associated with nanotechnology, as an important means of improving the incorporation of active substances, the stability of these substances, and their better bioavailability in tissues and cells (Mora-Huertas et al., 2010; Schmaltz et al., 2005; Santos et al., 2008; Gomes and Fagan, 2007), may be more effective in attenuating chronic oxidative and inflammatory processes.

The collective results indicated that, particularly guarana and Brazil nut could be utilized for the development of nano formulations to be potentially used by the older adults or patients with (NCDs) associated to chronic oxi-inflammatory conditions. Therefore, the present investigation describes the development of a nano supplement (G-Nut) produced with guarana, Brazil nut oil and coenzyme Q10, Gutierrez-Mariscal et al., 2019; Madamanchi and Runge, 2007). Furthermore, G-Nut potential safety and functional indicators were tested using human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and Californian red earthworms (*Eisenia fetida*) as *in vitro* and *in vivo* experimental models.

2. Material and methods

2.1 Development and identificacion of G-Nut and experimental design

The first stage of the study involved the development of G-Nut using guarana powder obtained directly from Embrapa Amazônica Ocidental in Maués, AM, and Brazil nuts purchased at the municipal market in Manaus-AM. The nut oil was produced as described by Kluczkovsk et al 2021. Initially, the nuts were cleaned with 70% alcohol, and then 1000 mg of fresh Brazil nuts were extracted in 200 mL of hexane. The extraction method used was the Soxhlet extraction, in which the samples were extracted with a nonpolar solvent using the steam distillation technique with a boiling point of up to 70°C. An increase in this temperature can be responsible for the formation of free fatty acids (FFAs) due to the breaking of bonds between FFAs and glycerol. The total concentration of Brazil nut oil was 5 mg/mL. To reduce the size of this supplement to the nanoscale, the emulsification technique was employed in the presence of a nanocarrier containing coenzyme Q10 (CoQ10) at a concentration of 50 mg/mL, and 10 nm thickness, commercially obtained from Herbamed Nutraceutical Laboratory Ltda (São Paulo, Brazil).

To develop the nanosupplement, a 1:1 ratio of guaraná powder, Brazil nut oil (50 mg/50 mg) and 10% CoQ10 (5mg) were used, resulting in a final concentration of approximately 100 mg/mL of supplement. G-Nut was developed using the emulsification technique described by Capek, (2004). The components (guarana, Brazil nut, and CoQ10) were placed in hexane solution and stirred in

ultrasonic equipment with heating for 2 hours.

The solution was then filtered through a simple white filter membrane (Durapore, 0.22 μm , 47 mm) using abundant distilled water abundantly. After filtration, the solution underwent the lyophilization process to dehydrate the product. Once the lyophilization process was completed, the G-Nut powder was placed in amber containers and stored, protected from direct light at a temperature of -8°C . A control extract without the nanocarrier was used to compare the effectiveness of the nanotechnology supplement. This was prepared using the same emulsification technique but containing only 50 mg of guarana and 50 mg of Brazil nut oil.

For the characterization of G-Nut, high-resolution mass spectrometry (HRMS) was used to provide a comparative analysis of the results obtained with the nanostructure compound and the non-nanostructured compound, an XEVO G2 Q-TOF time-of-flight mass spectrometer (Waters, Milford, MA, USA) was employed for HRMS analysis. The samples were solubilized in a 1:1 mixture of acetonitrile and methanol, producing a heterogeneous mixture. Subsequently, the liquid portion was diluted in a 1:1 mixture of acetonitrile and H_2O with 0.1% formic acid. The solutions obtained in this manner were analyzed through direct infusion with electrospray ionization in positive mode (ESI+). Control and data acquisition were performed using Mass Lynx V 4.1 software (Beltrán et al., 2013). The second phase involved an experimental *in vitro* and *in vivo* study to assess the safety and efficacy of G-Nut. For the *in vitro* protocol, samples of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from healthy volunteers were exposed to different concentrations of G-Nut (3, 2.25, 1.75, 0.75, and 0.25 mg/mL). During this phase, safety indicators (cytotoxicity and cell apoptosis) and efficacy indicators (potential anti-inflammatory and antioxidant effects) of G-Nut were evaluated compared to the extract without the presence of the carrier.

The *in vivo* study was conducted using the experimental animal model of *Eisenia fetid*. It's important to note that, as invertebrate animals, earthworms do not have an ethics committee, as stipulated in Brazil. Nevertheless, in adherence to ethical guidelines for animal research, all experiments were carried out following the European Guidelines for Animal Experimentation (2010) (European Parliament and the Council of the European Union, 2010). Furthermore, the experimental assays were conducted in accordance with prior studies (Alves et

al., 2019; Jung et al., 2021; Teixeira et al., 2021). The analysis in this model focused on mortality indicators and immune system immunomodulators provided by the G-Nut supplement in comparison to the extract without the carrier.

2.2. *In vitro protocol-based experiment with human leucocytes*

The procedures used in this study adhered to the ethical principles of the Declaration of Helsinki and its subsequent amendments. The potential toxicity and efficacy of G-Nut were assessed in samples of human peripheral blood mononuclear cells obtained from four healthy adult non-smoking volunteers with an age of (26 ± 6 years and processed as previously described by Teixeira et al., 2021). Blood donors participated in a project investigating the biological properties of supplements containing Amazonian fruits, which was approved by the Ethics Committee (CAE 0146.0.243.000-07) at the Federal University of Santa Maria-UFSM.

Blood samples (20 mL) were collected via venous puncture using ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) vials and then transferred to tubes containing Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich - 10771) for density gradient cell separation (2:1). The tubes were centrifuged for 20 minutes at 252×g, and the mononuclear cells were collected, transferred to a new tube, washed once with

14 mL of PBS (pH 7.4), and centrifuged again (10 minutes at 252×g). The mononuclear cells were transferred to 1 mL of RPMI 1640 culture medium containing 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin/streptomycin, and 1% amphotericin B at a final concentration of 1×10^5 cells/mL. The cells were distributed in 6 or 96-well plates, depending on the test, and were incubated at 37 °C, 5% CO₂, and under controlled humidity conditions for 24 hours before conducting the experiments (Teixeira et al., 2021). These cells were treated for 24 hours with different concentrations of the G-Nut supplement and the carrier-free extract for cytotoxicity, apoptotic, and oxidative marker analysis.

Inflammatory analyses were also performed under the same initial conditions of cell collection and cultivation, where PBMCs were activated by exposure to phytohemagglutinin (125 µg/mL), which is a natural antigen that triggers an inflammatory response in these cells. Simultaneously, these cells were exposed to different concentrations of G-Nut and the carrier-free extract to assess their anti-inflammatory effect after 72 hours of exposure by analyzing the levels of pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α , as well as the anti-inflammatory cytokine IL-10 (Teixeira et al., 2021). All analyses were conducted in independent triplicates with a minimum of three repetitions.

2.2.1 *Laboratory Analysis*

Cytotoxicity analysis was performed by assessing the cytotoxicity of G-Nut and carrier-free extracts using the MTT assay, as described by Assmann and colleagues. This assay evaluates cell viability through the reagent 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) at a concentration of 5 mg/mL, diluted in phosphate buffer at pH 7.4. MTT has the ability to enter mitochondria, forming intracellular formazan crystals with a blue/purple coloration (Assmann et al., 2018).

Cell apoptosis evaluation was performed by analyzing the gene expression of Bcl-2 associated with BAX and caspases (CASP 3 and 8), which were modulated by G-Nut in human leukocytes. This analysis was conducted using real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). In summary, after the treatments, cellular RNA was extracted using Trizol® reagent (Thermo Fisher-15586026). Subsequently, the RNA was quantified using a NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer System® (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) and converted to cDNA using the QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen-205311). Gene expression analysis in real-time was carried out using SYBR® Green Master Mix and 1 µM of each specific primer, in the Rotor Gene 5 plex instrument (Qiagen-Germany). The thermocycling conditions were as follows: 5 minutes at 95°C, followed by 40 cycles of 5 seconds at 95°C and 30 seconds at 60°C. A melt curve was generated from 50°C to 90°C in 1°C increments every 5 seconds. The beta-actin gene was used as the housekeeping gene, and the primer sequences used were: beta-actin 5' TGTGGATCAGCAAGCAGGAGTA 3' and

3' TGC GCAAGTTAGGTTTTGTCA 5'; BAX 5' CCCTTTTCTACTTTGCCAGCAA 3' and 3' CCCGGAGGAAGTCCAATGT 5'; BCL-2 5' GAGGATTGTGGCCTTCTTTGAGT 3' and 3' AGTCATCCACAGGATGT 5'; CASP 3 5' TTTGAGCCTGAGCAGAGACATG 3' and 3' TACCAGTGCGTATGGAGAAATGG 5' ; CASP 8 5' AAGGAGCTGCTCTTCCGAATT 3' and 3' CCCTGCCTGGTGTCTGAAGT 5' (Azzolin et al., 2017).

The analysis of inflammatory markers, including the cytokines IL-1 α , TNF α , and IL-10, was conducted according to the manufacturer's instructions for the Quantikine Human Caspase Immunoassay kit (Thermo Fisher Scientific, USA), using the immunoassay ELISA test.

The oxidative markers were analyzed by determining the levels of nitric oxide (NO), measured indirectly through spectrophotometry detection of organic nitrite in the sample using the Griess Reagent, as per (Choi et al., 2012). Evaluation of lipid peroxidation, based on the spectrophotometry TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) technique, following the methodology described by (Jentzsch et al., 1996) and analysis of protein carbonylation, used for the detection and quantification of protein oxidation, following (Levine et al., 1994).

2.3. *Red earthworm protocol-based experiment*

2.3.1 *Cultivation conditions*

This protocol was carried out using the *Eisenia fetida* model. The earthworms were raised following procedures similar to those described in previous studies conducted by our research group (Alves et al., 2019; Jung et al., 2021; Teixeira et al., 2021; Mastella et al., 2023). In summary, approximately 200 animals were commercially acquired and then transferred and acclimated at the Research, Teaching, and Technological Development Center (Gerontec) of the Open University for the Third Age (FUnATI) in Manaus, Amazonas. During the acclimation period, which lasted for 7 days, the animals were kept under controlled conditions of temperature (20°C \pm 1°C) and humidity (~80%) in commercially sourced soil free of xenobiotics and other invertebrates in a 1:1 ratio

of soil to humus. Prior to the start of the experiments, the earthworms were placed in polystyrene containers (18.5 cm × 18.5 cm × 6.5 cm), protected from light, and kept on damp paper (~90%) with water for approximately 4 hours for external cleaning and cleaning of the gastrointestinal tract. All experiments were conducted in triplicate and used clitellate animals.

2.3.2 *Preparation of treatments*

The acute assays (up to 3 days of exposure) were conducted following the guidelines recommended by the OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) (OECD, 1984), and as previously described by Mastella and colleagues (Mastella et al., 2023). In summary, acrylic Petri dishes were prepared in advance, with labeling and lining, both on the lid and on the dish itself, and filter paper with a porosity of 14 µm corresponding to the circumference of the dish so that the fit between the paper and the dish was precise. Then, 1 mL of solutions containing the nanostructure formulations (G-Nut) and the freeformulation were added to each filter paper, totaling 2 mL per dish. Earthworms were recognized as ecotoxicity models due to their high sensitivity. Therefore, this procedure is essential since earthworms are extremely sensitive to changes in the environment. The prior drying of the treatment and its impregnation on the filter paper ensure that the coelom is not eliminated immediately. After the papers had dried, they were moistened with LBSS (Lumbricus Balanced Salt Solution) in the same volume used during impregnation. The earthworms were then added to the dishes (n = 3 per dish) in triplicate and kept for 24 hours, 48 hours, and 72 hours to assess mortality in response to exposure to G-Nut and the free formulation, with a total exposure period of 72 hours for the tests.

2.3.3 *Extraction of coelomocytes and carrying out laboratory analyzes*

The coelomic fluid is primarily composed of amoebocytes and eleocytes, cells present in the coelomic fluid. Earthworms eliminate coelomic fluid in response to harmful environments as a defense mechanism, which can serve as a means to neutralize harmful molecules and microorganisms (Mastella et al., 2023). Ethyl ether is a volatile and irritating compound that, upon contact with the

earthworms, triggers the extrusion of coelomic cells in the animals, allowing the assessment of cytofunctional markers and immune metabolism, either in the cells themselves or in the supernatant.

The toxicity analyses were conducted using the neutral red uptake assay, performed as described by Reppeto and colleagues (2008) with some adaptations as recommended by Mastella and colleagues (2023). In summary, a portion of the sample (n=3) was transferred to 15 mL Falcon tubes previously labeled and containing 1 mL of LBSS solution supplemented with 5 mM EDTA to prevent coelomic cell aggregation. In response to extrusion, coelomic cells quickly initiate the process of forming extracellular traps (eNETs) to neutralize harmful particles present in the environment. The use of EDTA prevents this event. Then, the Falcon tubes were sealed with cotton and immersed in 2 mL of ethyl ether for a total exposure of 2 minutes. After removing the cotton and the animals, they were immediately euthanized with 70% alcohol. The coelomic fluid obtained was centrifuged for 10 minutes at 1500 rpm. After extraction and centrifugation, the coelomic cell pellet was suspended in LBSS, and 100 μ L were added to 96-well plates in triplicate. Subsequently, 100 μ L of Neutral Red reagent (concentration of 50 μ g/mL) was added, and the plate was covered with aluminum foil and incubated for 3 hours at 37°C.

After the incubation period, the supernatant was gently removed to avoid disturbing the cell layer. Then, 100 μ L of the desorption solution (ethanol, distilled water, and acetic acid – 5:4:1) were added, and the measurement was carried out using an ELISA plate reader (DR-200BS-NM-BI, Kasuaki) at a wavelength of 550 nm.

To assess the immune metabolism and the ability to form eNETs, a solution containing inactivated *Saccharomyces cerevisiae* yeast was prepared. Then, for a final volume of 2 mL, 40 μ L of inactivated yeast was added to RPMI 1640 medium. Yeast-free solutions were also prepared. The preparation of these solutions was carried out in separate 2 mL Eppendorf tubes for each treatment. The animals were then rinsed with distilled water, and excess water was removed. Afterward, the worms were placed in 6-well plates with one animal per well, totaling 3 wells per treatment to maintain the analysis in triplicate. The lid of each plate was covered with cotton and impregnated with 2 mL of ether. The worms were exposed to the plate sealed with ether for 1 minute, allowing the

extrusion of the celom directly into the well. Immediately after exposure, the animals were removed and euthanized with 70% alcohol.

The treatment solution of RPMI 1640 medium, previously prepared or not, was gently poured into the wells to a final volume of 2 mL. The plates were incubated for 2 hours at 25°C. Afterward, the supernatant was gently removed, and staining was performed using the Panotic Kit, with a final wash using distilled water (1 mL for all steps). The plates were air-dried overnight. Once dried, the plates were examined under an inverted microscope at 4x magnification. The final product of eNETs is the formation of a component known as the brown body (BB).

BBs are structures containing extracellular nucleic material entwined with the particles that triggered the celomic extrusion response. Subsequently, these bodies undergo a process of melanization, detach, and begin to float in the environment. In the animal's body, they are located in the posterior region of the body, where, eventually, the autotomy process (voluntary tail excision) will occur (Mastella et al., 2023).

The wells were divided into five quadrants, four lateral and one central, so that a single photograph was captured in each of them. To assess the efficiency of immune metabolism, it was chosen to use only plates containing inactivated yeast due to the greater intensity of CM formation and, consequently, the immune response. Thus, after capturing the quadrants in each well, the images were transferred to ImageJ software version 1.46j (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA), which allows manual measurements. The area configuration was designed according to the microphotograph's own scale (μm), followed by the adoption of an 8-bit grayscale, with subsequent binary classification by thresholding.

The manual identification of the brown bodies was performed, and the total area will be measured in μm^2 . Although pixel classification is also possible, the average of the area from the five microphotographs was used, as the efficiency of immune metabolism in each treatment can increase or decrease the speed, and thus the size, of brown body formation. Thus, manual counting was performed only on fully formed BBs, and initial or intermediate processes that make up eNETs and not BBs were not considered in the count.

2.4 Statistical analysis

For the in vitro and in vivo analyses, GraphPad Prism software (version 8.02, 2019) was used. All data were compared to the control treatment and considered statistically significant when $p < 0.05$. Two-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test and Tukey's post hoc test were used for the analyses.

3. Results

3.1 Analysis and Identification of G-Nut and Free Formula

Using the high-resolution mass spectrometry (HRMS) method, it was possible to identify 13 compounds in the G-Nut supplement, composed of (guarana powder, Brazil nut oil and the transport coenzyme Q10, and 25 compounds in the formula free, which is composed of (guarana powder and Brazil nut oil), as shown in Figure 1A and 1B. This demonstrates the ability of the nanotechnological supplement to group compounds, thus reducing the size of the molecule. In tables 1A and 1B, we identify the main compounds detected in G-Nut (theobromine, theophylline, caffeine, based on the patent (PIANOWSKI, Luiz Francisco; CALIXTO, João Batista; GIGLIO, Auro Del. WO 2012/129629 A1, 2012) selenium and coenzyme Q10), and in the formula free the same compounds were present, except coenzyme Q10.

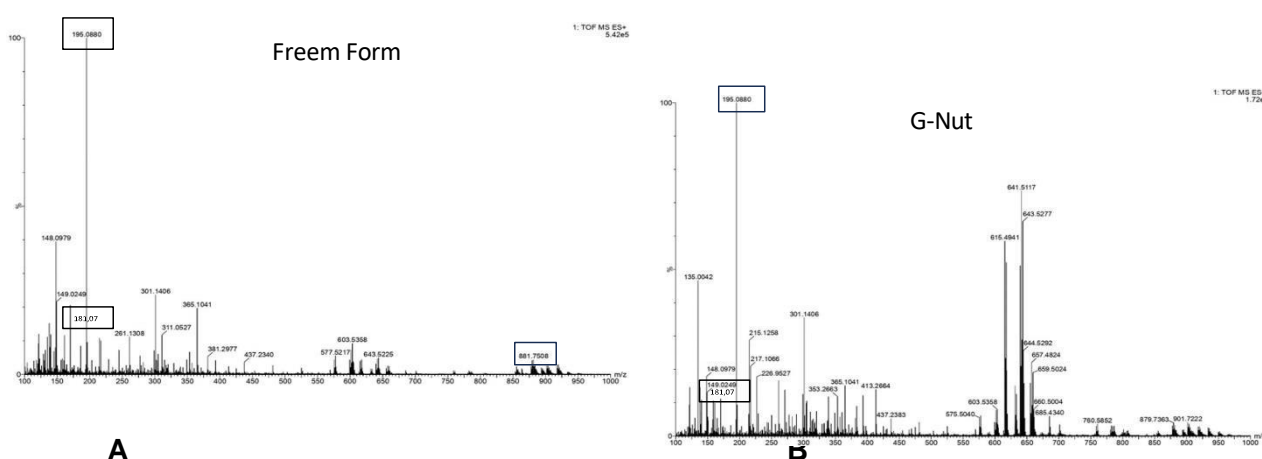


Figure 1: Identification of compounds by HRMS of G-Nut and the free formula.

Table 1A: The main bioactive compounds present in G-Nut and in free form.

Compounds	G-Nut [M]+ ±SE	Free Form [M]+ ±SE
Theobromine and theophylline (C ₇ H ₈ N ₄ O ₂)	181,0726 +2,2 ppm	181,0726 +2,2 ppm
Caffeine (C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂)	195,0882 -1,0 ppm	195,0882 -1,0 ppm
Coenzyme Q10 (C ₅₉ H ₉₀ O ₄)	863,6917 -1,0 ppm	NI
Benzoic Acid (C ₇ H ₆ O ₂)	121,0283 -5,79 ppm	121,0283 - -5,79ppm
Lauric Acid (C ₁₂ H ₂₄ O ₂)	199,1712 +7,02 ppm	199,1712 – +7,02 ppm
Myristic Acid (C ₁₄ H ₂₈ O ₂)	227,2014 +1,32 ppm	227,2014 +1,32 ppm
Palmitoleic Acid (C ₁₆ H ₃₀ O ₂)	253,2158 +1,32 ppm	253,2158 +1,32 ppm
Palmitic Acid (C ₁₆ H ₃₂ O ₂)	255,2323 -0,40 ppm	255,2323 -0,40 ppm
Linoleic Acid (C ₁₈ H ₃₂ O ₂)	279,2326 +0,72 ppm	279,2326 +0,72 ppm
Oleic Acid (C ₁₈ H ₃₄ O ₂)	281,2470 -3,55 ppm	281,2470 -3,55 ppm
Stearic Acid (C ₁₈ H ₃₆ O ₂)	283,2652 +5,29 ppm	283,2652 +5,29 ppm
Catechin and/or Epicatechin (C ₁₅ H ₁₄ O ₆)	289,0707 -1,72 ppm	289,0707 -1,72 ppm
Sucrose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	341,1067 -4,98 ppm	341,1067 -4,98 ppm

* NI-Not identified

Table 1B: Amount of selenium present in the samples (G-Nut and free formula).

Sample	Selenium
Free Form	< 9.4 µg/g
G-Nut	< 9.4 µg/g

3.2 Effect of G-Nut on Leukocyte Cytotoxicity, Apoptosis, and Oxidative Markers

The effect of different concentrations of G-Nut and the free formula on the cytotoxicity and apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in humans was

assessed. As seen in Figure 2A and B, regardless of the concentration, both in the free formula and G-Nut, there was no decrease in cell viability. Furthermore, all concentrations of G-Nut showed a downregulation in the gene expression of caspases 3 and 8 compared to the control. In the BAX/Bcl-2 ratio (Figure 2C), there was no significant alteration. Microscopy (Figure 2D) demonstrates that G-Nut did not trigger extensive cell mortality at any of its concentrations.

The effect of G-Nut on oxidative markers was also analyzed. The higher concentrations of G-Nut (3, 2.25, and 1.5 mg/mL) led to a decrease in nitric oxide levels in the cells (Figure 3A). All concentrations of G-Nut reduced protein carbonylation levels (Figure 3B), while lipid peroxidation levels decreased at intermediate and lower concentrations (Figure 3C).

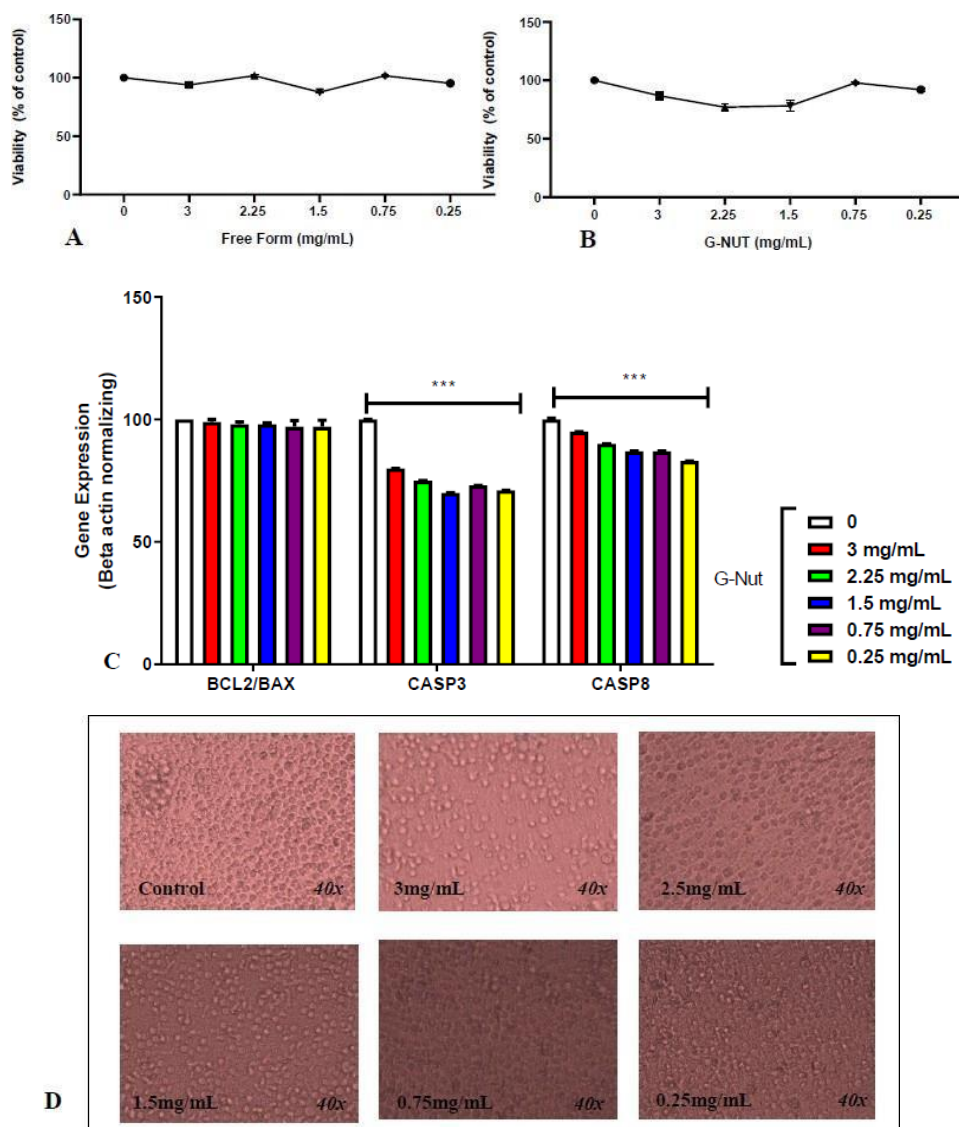


Figure 2: Effect of G-Nut multi-supplement based on guarana, Brazil nut oil and coenzyme Q10 in different concentrations on the viability of PBMCs. Viability in PBMCs exposed to the supplement-free formula (A), PBMCs exposed to G-Nut (B). Expression of apoptotic genes in PBMCs exposed to G-Nut (C). Microscopic analysis of PBMC cell viability against G-Nut. The results are described as mean percentage of control \pm standard deviation (SD). Statistical comparison was performed by analysis of variance followed by Tukey's post hoc test. Different asterisks identified significant differences at $p < 0.05$ between treatments. The assays were performed in triplicate.

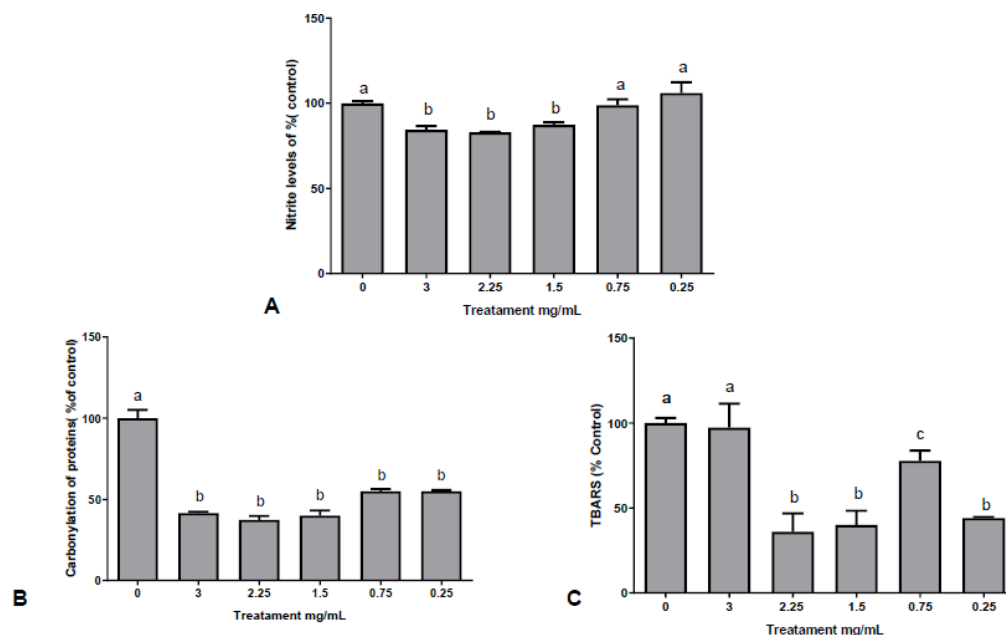


Figure 3: Effect of the G-Nut multi-supplement based on guarana, Brazil nut oil and coenzyme Q10 in different concentrations on oxidative stress in nitric oxide (A), protein carbonylation (B) and lipoperoxidation (C). The results are described as mean percentage of control \pm standard deviation (SD). Statistical comparison was performed by analysis of variance followed by Tukey's post hoc test. Different letters identified significant differences at $p < 0.05$ between treatments. The assays were performed in triplicate.

3.3 Effect of G-Nut on Leukocyte Inflammatory Profile

In Figure 4, the levels of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α are significantly elevated in the PHA-treated group compared to the control group. However, they decreased significantly at all G-Nut concentrations compared to the PHA-treated group, with the free formula showing a concentration-dependent decrease. For IL-10, there was a decrease in the PHA group compared to the control. However, at concentrations of 1.5 and 0.25 mg/mL of G-Nut, there was

an increase in relation to PHA, while in the free formula, this increase occurred at all concentrations. Evidence of the inflammatory model can be seen in Figure 4D with the elongation and clustering of PHA-treated cells compared to control.

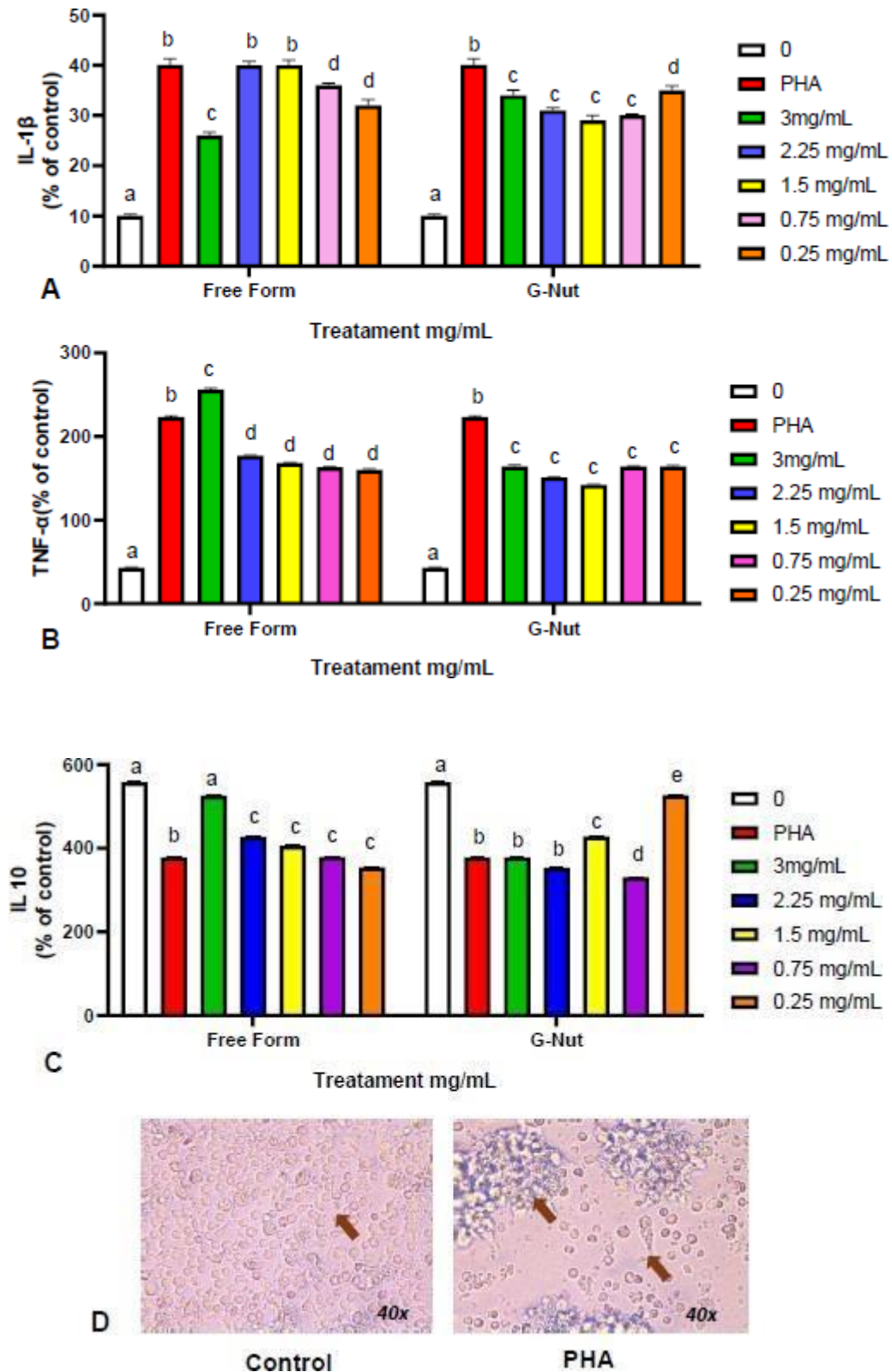


Figure 4: Effect of the G-Nut multi-supplement based on guarana, Brazil nut oil and coenzyme Q 10 in different concentrations on inflammatory markers. Interleukin IL-1 β (A), TNF- α (B), IL-10 (C). Cell scattering image: control and PHA (D). The results are described as mean \pm standard deviation (SD). Statistical comparison was performed by analysis of variance followed by Tukey's post hoc test. Different letters identified significant differences at $p < 0.05$ between treatments. The assays were performed in triplicate.

3.4 Effects of G-Nut on the Toxicity and Immunomodulation of Red Earthworms

Overall, G-Nut did not induce an increase in earthworm mortality after 24, 48, and 72 hours of exposure compared to the control. The mortality protocol aims to verify the percentage of surviving animals during the total exposure period (72h).

The evaluation of lysosomal activity in coelomocytes after 72 hours of exposure to the G-Nut nanoformulation and the free formula was carried out. The viability of coelomocytes was assessed using the red neutrophil staining assay after coelom extrusion using ether exposure, reflecting their metabolic activity and membrane integrity. Results show that both G-Nut and the free extract formula did not decrease the viability/metabolism of red earthworm neutrophils (Figure 5).

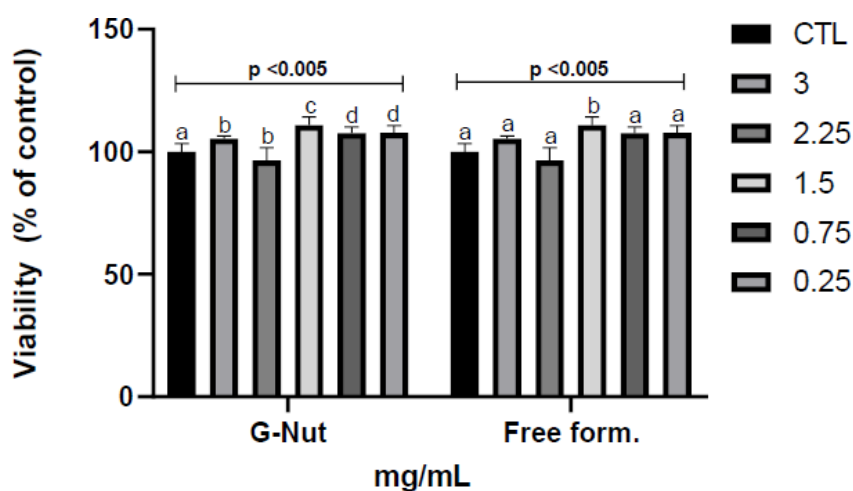


Figure 5: Evaluation of coelomocytes lysosomal activity after 72-hour exposure to G-Nut nanoformulation and free formulation (Free form.) in a 5-point concentration-effect curve. Earthworms were exposed to concentrations of 3, 2.25, 1.5, 0.75, and 0.25 mg/mL. The LBSS (Lumbricus Balanced Salt Solution) buffer exposition was used as the control. Coelomocytes viability was assessed using the neutrophil red stain assay after extrusion using ether exposition.

The neutrophil red stain assay measures the uptake and retention of neutral red dye by neutrophils, reflecting their metabolic activity and membrane integrity. The results from this assay provide insights into the effects of G-Nut nanoformulation on neutrophil viability compared to the free formulation and the control. Statistical comparison was performed by analysis of variance followed by Tukey's post hoc test. Different letters identified significant differences at $p < 0.05$ between treatments. The assays were performed in triplicate.

Microscopic analysis of coelomocytes exposed to inactivated yeasts and treated with different concentrations of G-Nut and the free formula revealed various stages of cell clustering, culminating in the formation of brown bodies (BB) (Fig. 6A, 6B). In the microphotographs, it was possible to identify more extensive trap formation of NETs in the coelomic fluid obtained from earthworms treated with G-Nut and the free formula than in the controls (Figure 6C).

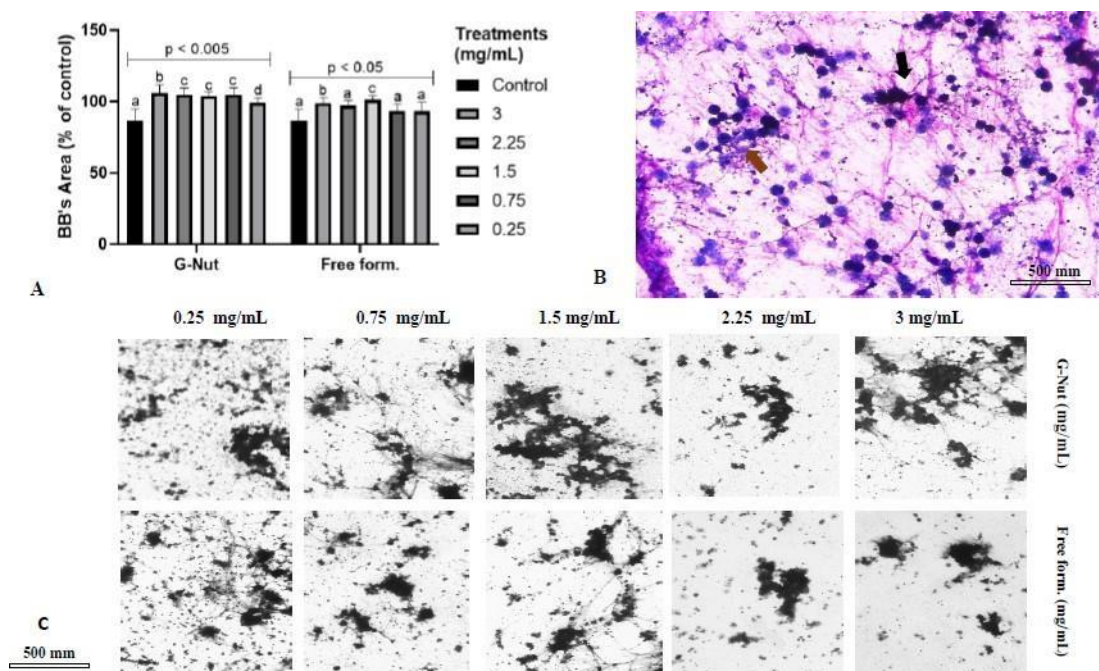


Figure 6: Analysis of the efficiency of immune metabolism in *Ensenia fetida* earthworms via the formation of brown bodies (CM) in μm after exposure to inactivated yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). (A) Area of BB formation in percentage compared to the control treatment (LBSS) calculated through the average of microphotographs evaluated in 5 five quadrants (4x magnification). Two-way ANOVA was used to test the null hypothesis that there are no significant differences in the means of the dependent variables between the groups, followed by Tukey's post hoc test to determine which groups are different from each other. Different letters represent statistical differences when $p < 0.05$. (B) Microphotograph of the control group undergoing CM formation through the formation of extracellular traps (eNETs) stained via the Panótica kit (4x

magnification). Brown Arrow: initial CM formation via eNET. Black arrow: advanced CM training. (C) Microphotographs of the quadrants evaluated to calculate the CM formation area at different concentrations (0.25, 0.75, 1.5, 2.25 and 3 mg/mL) in nanoformulation (G-Nut) and free compounds (Free form.). Despite staining via the Panóptica kit, an 8-bit gray scale was adopted, followed by binary classification by thresholding, which allows the correct identification of CM and their margins via manual measurement in ImageJ software.

4. Discussion

In this study, we investigated the safety and efficacy of a nanotechnology supplement called G-Nut using *in vitro* and *in vivo* experimental protocols.

The results showed that the G-Nut supplement and its free formula, without the nanocarrier, provided a daily dose of each of its components that was lower than the recommended intake doses by regulatory agencies for this type of supplementation in Brazil. For instance, the recommended daily dose for guarana ranges from 100 to 500 mg/day; for Brazil nuts, we considered the daily dose of its major component, selenium, to be from 30 to 55 µg/day, and for the CoQ10 carrier, the recommended dose is 50 mg/day (Anvisa, 2020). Considering that G-Nut and the free formula we developed contained approximately 100 mg/mL, with 50 mg of guarana and 50 mg of Brazil nut oil, resulting in a selenium content of

9.4 µg and a minimum concentration of 0.5 mg of CoQ10. Studies show that the mini concentrations used to achieve these effects is 300-500 mg (Hou et al., 2023). This is kept that the effects presented by G-NUT are from the supplementation of Guarana and Brazil nuts and coenzyme Q10 being only one nanocarreador.

Based on these findings, the results demonstrate that G-Nut did not exhibit cytotoxicity in leukocytes and did not cause mortality in the red earthworm model. Even at low concentrations, it positively modulated the oxidative and immune metabolism of PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) and immune cells in the red earthworms.

The cytotoxicity tests were initially conducted on PBMCs because the components of G-Nut circulate in the plasma after absorption, and they are in direct contact with all blood cells, especially with PBMCs, which are key cells in our immune system. This experimental model has been mainly used to test the effects of nutritional elements on the environment (Algarve et al., 2013, Teixeira

et al., 2021, Alves et al., 2019). Although we tested lower concentrations than the recommended concentrations for each individual compound within G-Nut, it's worth considering that it is a nanoparticulate compound. This means its molecules are reduced to nanoscale sizes, enhancing absorption and bioavailability compared to non-nanoparticulate compounds (Carlucci, 2009). It's also important to note that the compounds are not isolated but in combination, which can result in a synergistic toxic effect. However, we observed that the multivitamin supplement did not induce cytotoxicity or apoptosis in the tested cells, making it safe to consider.

It's worth noting that the multivitamin supplement G-Nut demonstrated a protective effect against the formation of reactive species that can damage cell lipid and protein membranes, as well as DNA. The results show that G-Nut was able to reduce the levels of thiobarbituric acid, protein carbonylation, and the formation of nitric oxide radicals. This protective effect can be associated with the antioxidant properties of the compounds in G-Nut. This aligns with previous studies that demonstrate the antioxidant action of guarana (Peixoto et al., 2017; Okwudili et al., 2017; Bittencourt et al., 2013, Yonekura et al., 2016). Brazil nuts (Kume et al., 2021; Strunz et al., 2008; Ibiapina et al., 2022).

To verify whether G-Nut exhibited anti-inflammatory activities, two experimental protocols were conducted, one with PBMCs and the other with the immune cells of red earthworms. The results showed that the multivitamin supplement had the ability to reduce pro-inflammatory cytokines like IL-1 β and TNF- α and also positively modulated the anti-inflammatory cytokine IL-10. In the *in vivo* assay using red earthworms, it was also indicated that both the nanoparticulate and free forms of the supplement induced a strong immune response when exposed to inactivated yeast cells. There was an increase in BB compared to the control and an increase in the formation of NETs in all concentrations of the multivitamin supplement compared to the control. This formation of NETs also occurs with human neutrophils, as described by Alves et al., 2019, which showed that caffeine-containing beverages can enhance the efficiency of the inflammatory process through the response of mononuclear and granulocytic cells in red earthworms. This contribution appears to create a kind of "immune reserve" that, in the presence of antigens, can produce a more efficient immune response against pathogenic infections.

It's important to note that the experiment conducted with red earthworms here was different from the one carried out by Teixeira et al., 2021. Their study showed that the presence of a multivitamin supplement based on guarana, L-carnitine, and selenium in high concentrations caused an increase in BBs and NETs even without cells being exposed to an antigen, indicating that at high doses, this supplement had a pro-inflammatory effect (Teixeira et al., 2021).

Indeed, several studies have demonstrated the anti-inflammatory activity of bioactive compounds from plants such as acai (De Souza et al., 2022; Fernandes et al., 2021), tucuma (Cabral et al., 2020), Brazil nuts (Colpo et al., 2014), camu camu (Inoue et al., 2008), guarana (Maldaner et al., 2019; Tseuguem et al., 2019) buriti (Amorim et al., 2021), cocoa (Román et al., 2019), cupuacu (Taylor et al., 2016), and others. This anti-inflammatory activity is often associated with compounds like flavonoids, anthocyanins, alkaloids, xanthines, methylxanthines, and various other compounds (Maleki et al., 2019; Łysiak et al., 2022; Li et al., 2021; Smelcerovic et al., 2015).

These results, along with other studies, highlight the crucial role of diet in modulating oxidative inflammation in the body. Some foods and dietary patterns have been associated with promoting oxidative inflammation (Pitsavos et al., 2007; Smelcerovic et al., 2015), while others have antioxidant and anti-inflammatory effects (Assmann et al., 2021). Diets rich in processed foods, saturated fats, refined sugars, and low in fruits, vegetables, and whole grains tend to increase inflammatory processes (Festenstein et al., 1955). Conversely, diets rich in antioxidants, omega-3 fatty acids, fiber, and other specific nutrients primarily found in fruits and vegetables have shown a protective effect against chronic inflammation (Hu et al., 2002; Assmann et al., 2021).

A healthy dietary pattern contributes to disease prevention and the mitigation of chronic disease symptoms. Therefore, studies like this one that develop and test the safety and efficacy of a nanotechnology-based multisupplement, which enhances the utilization of bioactive compounds from plants, improving their stability, absorption, and bioavailability, are of great relevance to human health.

5. Conclusion

Despite the methodological limitations of an *in vitro* and *in vivo* study, the results suggest that G-Nut is safe for human cells and in an animal model of red earthworms, and it has a modulating effect on oxidative and immune metabolism in human cells and in the animal model presented here. This study can serve as a basis for future clinical studies with this supplement in alleviating symptoms of chronic diseases.

6. References

1. Algarve, T. D., Barbisan, F., Ribeiro, E. E., Duarte, M. M. M. F., Mânica Cattani, M. F., Mostardeiro, C. P., Lenz, A. F., da Cruz, I. B. M. (2013). In vitro effects of Ala16Val manganese superoxide dismutase gene polymorphism on human white blood cells exposed to methylmercury. *Genetic and Molecular Research*, 12, 5134–5144. <https://doi.org/10.4238/2013.October.29.7>.
2. Alves, A. O., Weis, G. C. C., Unfer, T. C., Assmann, C. E., Barbisan, F., Azzolin, V. F., Chitolina, B., Duarte, T., et al. (2019). Caffeinated beverages contribute to a more efficient inflammatory response: Evidence from human and earthworm immune cells. *Food and Chemical Toxicology*, 134, 110809.
3. Amorim, V. R., Rodrigues, D. C. D. N., Silva, J. D. N., Ramos, C. L. S., Almeida, L. M. N., Almeida, A. A. C., Ferreira, P. M. P. (2021). Anti-inflammatory mechanisms of fruits and by-products from *Mauritia flexuosa*, an exotic plant with functional benefits. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 84(11), 441-457. <https://doi.org/10.1080/15287394.2021.1881672>.
4. Anvisa, Agência Nacional de Vigilância Sanitária Resolução N° 656, DE 15 de Junho de, 2020. Dispõe sobre a prescrição dietética, pelo nutricionista, de suplementos alimentares e d´a outras providências. Acesso em. Available online: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-n-656-de-15-de-outubro-de-2023-262145306>.
5. Assmann, C. E., Cadoná, F. C., Bonadiman, B. D. S. R., Dornelles, E. B., Trevisan, G., & Cruz, I. B. M. D. (2018). Tea tree oil presents in vitro antitumor activity on breast cancer cells without cytotoxic effects on fibroblasts and on peripheral blood mononuclear cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 103, 1253- 1261. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.096>.
6. Assmann, C. E., Weis, G. C. C., da Rosa, J. R., Bonadiman, B. D. S. R., Alves, A. O., Schetinger, M. R. C., ... da Cruz, I. B. M. (2021). Amazon-derived nutraceuticals: Promises to mitigate chronic inflammatory states and neuroinflammation. *Neurochemistry International*, 148, 105085. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105085>.
7. Azzolin, V. F., Barbisan, F., Lenz, L. S., Teixeira, C. F., Fortuna, M., Duarte, T., Duarte, M. M. F. M., & da Cruz, I. B. M. (2017). Effects of pyridostigmine bromide on SH-SY5Y cells: An in vitro neuroblastoma neurotoxicity model. *Mutation Research/Genetic*

Toxicology and Environmental Mutagenesis, 823, 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2017.08.003>.

8. Beltrán, E., Ibáñez, M., Portolés, T., Ripollés, C., Sancho, J. V., Yusà, V., Hernández, F. (2013). Development of sensitive and rapid analytical methodology for food analysis of 18 mycotoxins included in a total diet study. *Analytica Chimica Acta*, 783, 39–48.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.04.043>.

9. Bittencourt, L. S., Machado, D. C., Machado, M. M., Dos Santos, G. F. F., Algarve, T. D., Marinowic, D. R., Ribeiro, E. E., Soares, F. A. A., Barbisan, F., Athayde, M. L., & Cruz, I. B. M. (2013). The protective effects of guaraná extract (*Paullinia cupana*) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodium nitroprusside. *Food and Chemical Toxicology*, 53, 119–125.

10. Cabral, F. L., Bernardes, V. M., Passos, D. F., de Oliveira, J. S., Doleski, P. H., Silveira, K. L., Horvarth, M. C., Bremm, J. M., Barbisan, F., Azzolin, V. F., Teixeira, C. F., de Andrade, C. M., da Cruz, I. B. M., Ribeiro, E. E., & Leal, D. B. R. (2020). *Astrocaryum aculeatum* fruit improves inflammation and redox balance in phytohemagglutinin-stimulated macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, 247, 112274. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112274>.

11. Carlucci, A. M., & Bregni, C. (2009). Productos Nanotecnológicos de Aplicación en Farmacoterapia. *Latin American Journal of Pharmacy*, 03, 470-477.

12. Capek, I. (2004). "Preparation of metal nanoparticles in water-in-oil (w/o) microemulsions." *Advances in Colloid and Interface Science*, 110, 49-74. doi: 10.1016/j.cis.2004.02.003

13. Choi, W. S., Shin, P. G., Lee, J. H., & Kim, G. D. (2012). The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells. *Cellular Immunology*, 280, 164–170.

14. Colpo, E., Dalton, D. A., Vilanova, C., Reetz, L. G. B., Duarte, M. M. M. F., Farias, I. L. G., da Rocha, J. B. T. (2014). Brazilian nut consumption by healthy volunteers improves inflammatory parameters. *Nutrition*, 30, 459–465.

15. Da Costa Krewer, C., Suleiman, L., Duarte, M. M. M. F., Ribeiro, E. E., Mostardeiro, C. P., Montano, M. A. E., da Cruz, I. B. M. (2014). Guaraná, a supplement rich in caffeine and catechin, modulates cytokines: evidence from human in vitro and in vivo protocols. *European Food Research and Technology*, 239, 49–57. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2182-3>.

16. De Souza Silva, A. P., de Camargo, A. C., Lazarini, J. G., Franchin, M., Sardi, J. C. O., Rosalen, P. L., & de Alencar, S. M. (2022). Phenolic Profile and the Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Antimicrobial Properties of Açaí (*Euterpe oleracea*) Meal: A Prospective Study. *Foods*, 12(1), 86. <https://doi.org/10.3390/foods12010086>. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.11.041>. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.12.007>. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.10.005>. 50

17. European Parliament and the Council of the European Union. (2010) Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the Protection of Animals used for Scientific Purposes OJ L276/33. *Off. J. Eur. Union* 276.

18. Fernandes MS, Machado AK, Assmann CE, Andrade EN, Azzolin VF, Duarte MMMF,

Prado-Lima PASD, Riffel RT, Maia-Ribeiro EA, Cadoná FC, Praia R, Barbisan F, Cruz IBMD. (2021) Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) reduces the inflammatory response triggered in vitro by the antipsychotic drug olanzapine in RAW 264.7 macrophage cells. *Acta Sci Pol Technol Aliment.* Apr-Jun;20(2):149- 163. doi: 10.17306/J.AFS.0857.

19. Festenstein, G.N. Heaton, F.W. Lowe, J.S. Morton, R.A. (1955) A constituent of the unsaponifiable portion of animal tissue lipids (λ max. 272 m μ). *Biochem. J.* 59, 558–566.

20. Gomes, A. S. F.; Fagan, S. B. (2007) Functionalization of Carbon Nanotubes. *New Chemistry.* 30, 1695-1793.

21. Gutierrez-Mariscal, FM; Yubero-Serrano, EM. Villalba, JM. Lopez Miranda, J. (2019) Coenzyme Q10: From bench to clinic in aging diseases, a translational review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 59(14), 2240-2257. doi: 10.1080/10408398.2018.1442316.

22. He, Y., Yue, Y., Zheng, X., Zhang, K., Chen, S., & Du, Z. (2015). Curcumin, inflammation, and chronic diseases: how are they linked? *Molecules*, 20, 9183- 9213. <https://doi.org/10.3390/molecules20059183>

23. Hou, L., Rashid, M., Chhabra, M., Chandrasekhar, B., Amirthalingam, P., Ray, S., Li, Z. (2021). "The effect of *Bertholletia excelsa* on body weight, cholesterol, and C-reactive protein: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials." *Complementary Therapies in Medicine*, 57, 102636. doi: 10.1016/j.ctim.2020.102636

24. Hou, S., Tian, Z., Zhao, D., Liang, Y., Dai, S., Ji, Q., Fan, Z., Liu, Z., Liu, M., Yang, Y. (2023). "Efficacy and Optimal Dose of Coenzyme Q10 Supplementation on Inflammation-Related Biomarkers: A GRADE-Assessed Systematic Review and Updated Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials." *Molecular Nutrition & Food Research*, 67(13), e2200800. doi: 10.1002/mnfr.202200800

25. Hu, F.B. (2002). "Dietary pattern analysis: a new direction in nutritional epidemiology." *Current Opinion in Lipidology*, 13(1), 3-9. doi: 10.1097/00041433-200202000-00002

26. Ibiapina, A., Gualberto, L. D. S., Dias, B. B., Freitas, B. C. B., Martins, G. A. S., & Melo Filho, A. A. (2022). "Essential and fixed oils from Amazonian fruits: properties and applications." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(32), 8842-8854. doi: 10.1080/10408398.2021.1935702

27. Inoue, T., Komoda, H., Uchida, T., & Node, K. (2008). "Tropical fruit camu camu (*Myrciaria dubia*) has anti-oxidative and anti-inflammatory properties." *Journal of Cardiology*, 52(2), 127-132. doi: 10.1016/j.jjcc.2008.06.004.

28. Jentzsch, A. M., Bachmann, H., Fürst, P., & Biesalski, H. K. (1996). "Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids." *Biology and Medicine*, 20, 251-256.

29. Jung, I. E. D. C., Assmann, C. E., Mastella, M. H., Barbisan, F., Ruaro, R. A. S., Roggia, I., & Chitolina, B. et al. (2021). "Superoxide-anion triggers impairments of immune efficiency and stress response behaviors of *Eisenia fetida* earthworms." *Chemosphere*, 269, 128712. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.128712.

30. Kernt, M., Hirneiss, C., Neubauer, A. S., Ulbig, M. W., & Kampik, A. (2010). "Coenzyme Q10 prevents human lens epithelial cells from light-induced apoptotic cell

death by reducing oxidative stress and stabilizing BAX/Bcl-2 ratio." *Ophthalmol*, 88(3), e78-86. doi: 10.1111/j.1755-3768.2010.01875.x.

31. Kluczkovsk, A. M., de Oliveira, L. B., Maciel, B. J., & Kluczkovski-Junior, A. (2021). "Characterization and extraction of Brazil nut: a review." *Food Science and Technology*, 3, 391-402. doi: 10.37885/210203177.

32. Kume, W. T., de Jesus Porto, E. P., de Lara Spada, E. C., Lisboa, D. R., Stachack, F. F. F., Terezo, A. J., ... de França Lemes, S. A. (2021). "Acute supplementation of growing rats with Brazil nut flour increases hepatic lipid content but prevents oxidative damage in the liver." *Journal of Food Biochemistry*. Advance online publication. doi: 10.1111/jfbc.13834.

33. Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. R., & Shacter, E. (1994). "Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins." *Enzymology*, 233, 346–357.

34. Li, J. C., Dai, W. F., Liu, D., Zhang, Z. J., Jiang, M. Y., Rao, K. R., Li, R. T., & Li, H. M. (2021). "Quinolizidine alkaloids from *Sophora alopecuroides* with anti-inflammatory and anti-tumor properties." *Bioorganic Chemistry*, 110, 104781. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104781>.

35. Łysiak, G. P. (2022). "Ornamental Flowers Grown in Human Surroundings as a Source of Anthocyanins with High Anti-Inflammatory Properties." 11(7), 948. <https://doi.org/10.3390/foods11070948>. *Advances in Free Radical* doi: 10.1016/0891-5849(95)02043-8. *Methods in* [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33040-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33040-9).

36. Madamanchi, N. R., & Runge, M. S. (2007). "Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis." <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000258450.44413.96>. (4), 460-473.

37. Maldaner, D. R., Pellenz, N. L., Barbisan, F., Azzolin, V. F., Mastella, M. H., Teixeira, C. F., ... Duarte, M. M. M. F. (2020). "Interaction between low-level laser therapy and Guarana (*Paullinia cupana*) extract induces antioxidant, anti inflammatory, and anti-apoptotic effects and promotes proliferation in dermal fibroblasts." <https://doi.org/10.1111/jocd.13055>. 19(3), 629-637.

38. Maleki, S. J., Crespo, J. F., & Cabanillas, B. (2019). "Anti-inflammatory effects of flavonoids." <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125124>. 299, 125124.

39. Mastella, M. H., Roggia, I., Turra, B. O., et al. (2023). "The Protective Effect of Lithium Against Rotenone may be Evolutionarily Conserved: Evidence from *Eisenia fetida*, a Primitive Animal with a Ganglionic Brain." *Neurochem Res*.

40. Mora-Huertas, C. E., Fessi, H., Elaissari, A. (2010). "Polymer-based nanocapsules for drug delivery." *Int J Pharm*, 385, 113-142. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.10.018>.

41. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Sect. 2: Effects on Biotic Systems (1984) Test No. 207: Earthworm, Acute Toxicity Tests.

42. Okwudili OS, Chimaobi NG, Ikechukwu EM, Ndukaku OY. Antidiabetic and in vitro antioxidant effects of hydromethanol extract of *Paullinia pinnata* root bark in alloxan-induced diabetic rat. <https://doi.org/10.1515/jcim-2015-0017>. PMID: 29148978. 2017 Nov. 17;15(2).

43. Patrick, M., Kim, H.A., Oketch-Rabah, H., Marles, R.J., Roe, A.L., Calderón, A.I.

Safety of guarana seed as a dietary ingredient: a review. 67, (2019). 11281–11287.

44. Peixoto H, Roxo M, Röhrig T, Richling E, Wang X, Wink M. Anti-Aging and Antioxidant Potential of var. sorbilis: Findings in Indicate a New Utilization for Roasted Seeds of Guarana. 2017 Aug. 15;4(3):61. <https://doi.org/10.3390/medicines4030061>.

45. Pérez-Torres I, Guarner-Lans V, Rubio-Ruiz ME. Reductive Stress in Inflammation-Associated Diseases and the Pro-Oxidant Effect of Antioxidant Agents. 2017. 18(10):2098. <https://doi.org/10.3390/ijms18102098>.

46. Pitsavos C, Panagiotakos DB, Tzima N, Lentzas Y, Chrysohoou C, Das UN, Stefanadis C. Diet, exercise, and C-reactive protein levels in people with <https://doi.org/10.1007/s11064-023-04001-y>. <https://doi.org/10.1787/9789264070042-en>. (Basel). *elegans Caenorhabditis Food Chem*.

47. Quitian-Useche YF, Sánchez-Ortiz BL, Borges SF, Ramos B, de Souza GC, Batista MA, da Silva Hage Melim LI, Ferreira IM, Carvalho JCT, Borges RS. Fatty ethanolamide of *Bertholletia excelsa* triglycerides (Brazil nuts): anti inflammatory action and acute toxicity evaluation in Zebrafish (*Danio rerio*). 2021.29(5):1519-1537. doi: 10.1007/s10787-021- 00867-y.

48. Reppeto G, Del Peso A, Zurita J. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. 10.1038/nprot.2008.75. 2008. 3:1125-1131.

49. Roman GC, Jackson RE, Gadhia R, Roman AN, Reis J. Mediterranean diet: The role of long-chain ω -3 fatty acids in fish; polyphenols in fruits, vegetables, cereals, coffee, tea, cacao and wine; probiotics and vitamins in prevention of stroke, age-related cognitive decline, and Alzheimer disease. 2019 Dec. 175(10):724-741. doi: 10.1016/j.neurol.2019.08.005.

50. Rusu ME, Mocan A, Ferreira ICFR, Popa DS (2019). "Health Benefits of Nut Consumption in Middle-Aged and Elderly Population." *Antioxidants (Basel)*, 8(8), 302. DOI: 10.3390/antiox8080302.

51. Santos, R. M. M.; Fialho, S. L. (2008). "Nanoparticles: An alternative for the administration of biopharmaceuticals." *Development*, 37, 52-59.

52. Schmaltz, C; Santos, J. V; Guterres, S. S. (2005). "Nanocapsules as a promising trend in the cosmetic field: the immense potential of this small, great resource." *Pharmacia Brasileira*, 16, 80-85.

53. Smelcerovic Z, Veljkovic A, Kocic G, Yancheva D, Petronijevic Z, Anderluh M, Smelcerovic A. (2015). "Xanthine oxidase inhibitory properties and anti inflammatory activity of 2-amino-5-alkylidene-thiazol-4-ones." 229:73-81. doi: 10.1016/j.cbi.2015.01.022.

54. Somayajulu M, McCarthy S, Hung M, Sikorska M, Borowy-Borowski H, Pandey S. (2005). "Role of mitochondria in neuronal cell death induced by oxidative stress; neuroprotection by Coenzyme Q10." 27. doi: 10.1016/j.nbd.2004.10.021. 18(3):618-

55. Strunz CC, Oliveira TV, Vinagre JC, Lima A, Cozzolino S, Maranhão RC. (2008). "Brazil nut ingestion increased plasma selenium but had minimal effects on lipids, apolipoproteins, and high-density lipoprotein function in human *Neurobiol Dis*. *Neurol (Paris)*. *Nat Protoc. Inflammopharmacology. Angiology*.

56. Taylor L, Mumford P, Roberts M, Hayward S, Mullins J, Urbina S, Wilborn C. (2016).

"Safety of TeaCrine®, a non-habituating, naturally-occurring purine alkaloid over eight weeks of continuous use." 10.1186/s12970-016-0113-3. 13:2. doi:

57. Teixeira C. F., Azzolin V. F., Rodrigues Dos Passos G, Turra B. O., Alves A O, Bressanim A. C. M., Canton L. E. L., Vieira Dos Santos A. C., Mastella M. H., Barbisan F, Ribeiro E. E., Duarte T, Duarte MMMF, Bonotto NCA, Sato DK, da Cruz IBM. (2023) "A coffee enriched with guarana, selenium, and l-carnitine (GSC) has nutrigenomic effects on oxi-inflammatory markers of relapsing remitting multiple sclerosis patients: A pilot study." 71:104515. doi: 10.1016/j.msard.2023.104515.

58. Teixeira C. F, da Cruz I. B. M. , Ribeiro E. E., Pillar D. M., Turra B.O., Praia R. S. , Barbisan F, Alves A. O., Sato D. K., Assmann C. E., Palma T. V., Barcelos R. P., Barbosa I. M., Azzolin V. F. (2021) "Safety indicators of a novel multi supplement based on guarana, selenium, and L-carnitine: Evidence from human and red earthworm immune cells." 10.1016/j.fct.2021.112066. 150:112066. doi:

59. Tseuguem P. P., Nguenefack T. B., Piégang B. N., Mbankou Ngassam S. (2019) "Aqueous and Methanol Extracts of Paullinia pinnata (Sapindaceae) Improve Monosodium Urate-Induced Gouty Arthritis in Rat: Analgesic, Anti Inflammatory, and Antioxidant Effects." 2019:5946291. doi: 10.1155/2019/5946291.

60. Veloso, C.F., Machado, A.K., Cadon´a, F.C., Azzolin, V.F., Cruz, I.B.M., Silveira, A.F. (2018) "Neuroprotective effects of guarana (against vincristine in vitro." 10.14283/jpad.2017.45. Mart.) 5:65–70.

61. Yonekura, L., Martins, C.A., Sampaio, G.R., Monteiro, M.P., C´esar, L.A.M., Mito, B.M., Mori, C.S., Mendes, T.M.N., Ribeiro, M.L., Arçari, D.P., Torres, E.A.F.S. (2016) "Bioavailability of catechins from guaraná (Paullinia cupana) and its effect on antioxidant enzymes and other oxidative stress markers in healthy human subjects." 7:2970–2978. doi: 10.1039/c6fo00513f.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, investigamos a segurança e eficácia de um suplemento nanotecnológico o G-Nut usando experimentos baseados em protocolo *in vitro* e *in vivo*.

Os resultados mostraram que o suplemento G-Nut e sua fórmula livre, sem o nanocarreador, forneceram dose diária de cada um de seus componentes inferior às doses de ingestão recomendadas pelas agências reguladoras para esse tipo de suplementação no Brasil. Por exemplo, a dose diária recomendada de guaraná varia de 100 a 500 mg/dia; para a castanha do Brasil, consideramos a dose diária do seu principal componente, o selênio, de 30 a 55 µg/dia, e para o carreador CoQ10, a dose recomendada é de 50 mg/dia (BRASIL, 2018). Considerando que o G-Nut e a fórmula livre que desenvolvemos continham aproximadamente 100 mg/mL, com 50 mg de guaraná e 50 mg de óleo de castanha do Brasil, resultando em um teor de selênio de 9,4 µg e concentração mínima de 10 mg de CoQ10. É importante ressaltar que após uma vasta pesquisa na literatura a concentração utilizada da coenzima Q10 no estudo, ela não possui efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios nas células humanas. Estudos mostram que as mini concentrações utilizadas para atingir esses efeitos são de 300-500 mg (HOU, et al, 2023). Portanto, os efeitos apresentados pelo G-NUT são provenientes da suplementação de Guaraná e Castanha do Brasil e sendo a coenzima Q10 apenas um nanocarreador.

Mediante o exposto os resultados demonstram que o G-Nut não apresentou citotoxicidade em leucócitos e não causou mortalidade no modelo de minhocas vermelhas, e ainda mesmo em baixas concentrações modulou positivamente o metabolismo oxidativo e imune das PBMCs e células imunes das minhocas vermelhas.

Os testes de citotoxicidade foram inicialmente realizados em PBMCs, considerando que os componentes do G-Nut circulam no plasma após sua absorção e, portanto, estão em contato direto com todas as células sanguíneas, mas principalmente com os PBMCs as principais células no nosso sistema de defesa. Este modelo experimental tem sido usado principalmente para testar os efeitos dos elementos nutricionais no ambiente (ALGARVE et al, 2013; TEIXEIRA et al; 2021; ALVES et al. 2019). Embora tenhamos testado

concentrações mais baixas do que as concentrações recomendadas para cada composto em isolado do G-Nut vale considerar que é um composto nanoparticulado, o qual, tem suas moléculas reduzidas a tamanhos nanométricos, fazendo com que o mesmo tenha melhor capacidade de absorção e biodisponibilidade que um composto não nanoparticulado (CARLUCCI & BREGNI, 2009) deve também considerar que os compostos não são isolados e sim em associação podendo causar um efeito sinérgico tóxico. No entanto, observamos que o multisuplemento não causou citotoxicidade e nem apoptose nas células testadas, podendo ser considerado seguro.

Vale ressaltar que o multisuplemento G-Nut apresentou efeito protetor contra a formação de espécies reativas que podem causar danos as membranas lipídicas e proteicas das células, bem como ao DNA. Os resultados mostram que o G-NUT teve a capacidade de diminuir níveis de ácido tiobarbitúrico, carbolinização de proteínas e a formação de radical óxido nítrico. Esse efeito protetivo pode ser associado ao efeito antioxidante que os compostos do G-Nut apresentam. Corroborando com estudos anteriores que demonstram a ação antioxidante do guaraná (PEIXOTO et al, 2017; OKWUDILI et al, 2017; BITTENCOURT et al., 2013; MACHADO, 2014; YONEKURA et al, 2016), da castanha do Brasil e esse efeito pode ter sido reforçado com a presença do nanocarreador a CoQ10, pois sua principal ação é a potente capacidade antioxidante de suas formas redox coexistentes (ubiquinona, semi-ubiquinona e ubiquinol) (GUTIERREZ et al, 2019; KERNT et al, 2010; SOMAYAJULU et al, 2005).

Para verificar se o G-Nut apresentou atividades anti-inflamatórias foi conduzido dois protocolos experimentais um com as células PBMCs e com as células do sistema imune de minhocas vermelhas. Os resultados mostraram que o multisuplemento teve a capacidade de diminuir citocinas pró-inflamatórias como a IL1 β e o TNF- α e também modulou positivamente a citocina anti-inflamatória IL-10. No ensaio *in vivo* usando minhocas vermelhas também indicaram que o suplemento, tanto nanoparticulado quanto em sua forma sem o nanoestruturado induziram uma forte resposta imunológica frente as células expostas a leveduras inativas. Observa-se o aumento dos BB em relação ao controle e o aumento da formação das armadilhas NETs em todas as concentrações do multisuplemento em relação ao controle. Essa formação de

armadilhas NETs ocorre também com os neutrófilos humanos conforme descrito por Alves e colaboradores e 2019, que mostrou que bebidas cafeinadas podem melhorar a eficiência do processo inflamatório através da resposta de células mononucleares e granulocíticas de minhocas vermelhas. Esta contribuição parece criar uma espécie de “reserva imunológica” que, na presença de antígenos, pode produzir uma resposta imune mais eficiente contra infecções patogênicas.

É importante notar que o experimento realizado com minhocas vermelhas aqui foi diferente do realizado por Teixeira et al, 2021, onde mostrou que a presença de um multisuplemento a base de guaraná, L-carnitina e selênio em altas concentrações causando um aumento de BB e NETs mesmo sem as células terem sido expostas a um antígeno o que mostrou em doses altas desse suplemento apresentou um efeito pró-inflamatório (TEIXEIRA et al, 2021).

No entanto diversos estudos demonstram atividade anti-inflamatória de compostos bioativos de plantas como açaí (DE SOUZA et al, 2022), tucumã (CABRAL F. L. et al, 2020), castanha do Brasil (COLPO E. et al, 2014), camu-camu (INOUE T. et al, 2008), guaraná (MALDANER DR et al, 2019; TSEUGUEM P. P. et al, 2019), buriti (AMORIM V. R. et al, 2021), cacau (ROMÁN G. C. et al, 2019), cupuaçu (TAYLOR L. et al, 2016), entre outras. Essa atividade anti-inflamatória está na maioria das vezes associada a compostos como flavonoides, antocianinas, alcaloides, xantinas, metilxantinas entre outros compostos (MALEKI, CRESPO, CABANILLAS, 2019; L.I., et al, 2021; SMELCEROVIC., et al, 2015).

Com esses resultados e de demais estudos observa-se, que a dieta desempenha um papel crucial na modulação da oxi-inflamação no corpo. Alguns alimentos e padrões alimentares têm sido associados à promoção da oxi-inflamação (PITSAVOS, et al, 2007; FESTENSTEIN, et al, 1995), enquanto outros têm efeitos antioxidante e anti-inflamatório (ASSMANN, et al, 2021). Dietas ricas em alimentos processados, gorduras saturadas, açúcares refinados e com baixo consumo de frutas, legumes e grãos integrais tendem a aumentar a processos inflamatórios (ASSMANN, et al, 2021). Por outro lado, dietas ricas em antioxidantes, ácidos graxos, ômega-3, fibras e outros nutrientes específicos que se encontram principalmente em frutas e verduras, demonstraram ter um efeito protetor contra a inflamação crônica (HU, et al, 2022).

Um padrão alimentar saudável contribui para a prevenção de doenças e na atenuação de sintomas de doenças crônicas. Portanto estudos como esse que desenvolve e testa a segurança e eficácia de um multisuplemento nanotecnológico que tem assim uma melhor capacidade de aproveitamento de compostos bioativo de plantas melhorando sua estabilidade, absorção e biodisponibilidade é de grande relevância para a saúde humana.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar das limitações metodológicas de um estudo *in vitro* e *in vivo*, os resultados sugerem que o G-Nut é seguro para células humanas e em modelo animal de minhocas vermelhas, e tem efeito modulador do metabolismo oxidativo e imunológico em células humanas e em o modelo animal aqui apresentado. Este estudo pode servir de base para futuros estudos clínicos com este suplemento, saudável, contribuindo para a prevenção de doenças e a mitigação dos sintomas e alívio de doenças crônicas.

8. REFERÊNCIAS

ALGARVE, T.D. *et al.* **In vitro effects of Ala16Val manganese superoxide dismutase gene polymorphism on human white blood cells exposed to methylmercury.** Genet. Mol. Res., p. 5134–5144, 2013.

ALVES, A. O. *et al.* **Caffeinated beverages contribute to a more efficient inflammatory response: Evidence from human and earthworm immune cells.** Food and Chemical Toxicology, England, v. 134, p. 110809, 2019.

AMORIM VR. *et al.* **Anti-inflammatory mechanisms of fruits and by-products from *Mauritia flexuosa*, an exotic plant with functional benefits.** J Toxicol Environ Health A. v. 84, p. 441-457, 2021.

ARAÚJO, S. A. C. *et al.* **Avaliação *in vitro* da atividade citotóxica de drogas antivirais em fibroblastos caprinos.** Ciência Animal, v.18, n.1, p.25-31, 2008.

ASSMANN, Charles Elias *et al.* **Aluminum-induced alterations in purinergic system parameters of BV-2 brain microglial cells.** Journal of Immunology Research, v. 2021, p. 1-10, 2021.

BAGATINI MD. *et al.* **Immune System and Chronic Diseases.** J Immunol Res., 2017.

BARBISAN, Fernanda *et al.* **Methotrexate-related response on human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism.** PLoS One. v. 9, n. 10, p. e107299, 2014.

BARNHAM, K.J.; MASTERS, C.L.; BUSH, A.I. **Neurodegenerative diseases and oxidative stress.** Nat. Rev. Drug Discov. v. 3, p. 205–214, 2004.

BITTENCOURT, L.S. *et al.* **The protective effects of guarana extract (*Paullinia cupana*) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodium nitroprusside.** Food Chem. Toxicol. v. 53, p. 119–125, 2013.

BONIFACIO, Bruna Vidal *et al.* **Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review.** International journal of nanomedicine. p. 1-15, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa – IN nº 28, de 26 de julho de 2018. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, ed. 144, s. 1, p. 141, 2018. Disponível em:

https://www.in.gov.br/materia//asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/i/34380639/do1-2018-07-27-instrucao-normativa-in-n-28-de-26-de-julho-de-2018-34380550. Acesso em: 12 mai. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Diretrizes e recomendações para o cuidado**

integral de doenças crônicas não-transmissíveis. Volume 08. Brasília, 2008. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_recomendacoes_cuidado_doencas_cronicas.pdf. Acesso em 29 out.2023.

BRUNE, B. *et al.* **Redox Control of inflammation in macrophagen.** *Antioxid Redox Signal.* v. 19, p. 595-637, 2013.

BAYDA, Samer *et al.* **The history of nanoscience and nanotechnology: from chemical–physical applications to nanomedicine.** *Molecules,* v. 25, p. 112, 2019.

CABRAL FL. *et al.* **Astrocaryum aculeatum fruit improves inflammation and redox balance in phytohemagglutinin-stimulated macrophages.** *J Ethnopharmacol,* v. 247, p. 112274, 2020.

CAMPOS, M. P. O. *et al.* **Guarana (*Paullinia cupana*) improves fatigue in breast cancer patients undergoing systemic chemotherapy.** *The Journal of Alternative and Complementary Medicine, United States,* v. 17, p. 505-512, 2011.

CARLUCCI, A. M.; BREGNI, C. **Productos Nanotecnológicos de Aplicación en Farmacoterapia.** *Latin American Journal of Pharmacy,* v. 03, p.470-477, 2009.

CHEN, Bing-Huei; STEPHEN INBARAJ, Baskaran. **Nanoemulsion and nanoliposome based strategies for improving anthocyanin stability and bioavailability.** *Nutrients,* v. 11, p. 1052, 2019.

CÍCERO, N *et al.* **Chemical characterization of a variety of cold-pressed gourmet oils available on the Brazilian market.** *Food Research International,* v. 109, p. 517-525, 2018.

CODEVILLA, Cristiane Franco *et al.* **Nanoestruturas contendo compostos bioativos extraídos de plantas.** *Ciência e Natura,* v. 37, p. 142-151, 2015.

COLPO E. *et al.* **Brazilian nut consumption by healthy volunteers improves inflammatory parameters.** *Nutrition,* V. 30, p. 459–465, 2014.

COSTA & SILVA, *et al.* **Comparison of the effects of brazil nut oil and soybean oil on the cardiometabolic parameters of patients with metabolic syndrome: a randomized trial.** *Nutrients,* v. 12(1), p. 46, 2020.

COSTA, A. C. S. *et al.* **Intervenção Nutricional nas Doenças Crônicas Não Transmissíveis: Uma Revisão de Literatura.** *Amazônia. Science & Health,* v. 9(1), p. 96-104. 2021.

CRUVINEL, Wilson de Melo *et al.* **Sistema Imunitário: Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória.** Revista Brasileira de Reumatologia, v. 50, p 434-447, 2010.

DAI, Shengming *et al.* **Phase I clinical trial of autologous ascites-derived exosomes combined with GM-CSF for colorectal cancer.** Molecular therapy, v. 16, p. 782-790, 2008.

DE SOUZA Silva AP. *et al.* **Phenolic Profile and the Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Antimicrobial Properties of Açaí (*Euterpe oleracea*) Meal: A Prospective Study.** Foods, v.12, p. 86, 2022.

DOAK, S. H. *et al.* **In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines.** Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 745, p. 104-111, 2012.

EDWARDS S, GABBAY. **Living and working with sickness: a qualitative study.** Chronic Illness, v. 3, p. 155-66, 2007.

EMBRAPA, 2019 Anais da XV Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental. Acesso em <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/207590/1/XV-Jornada-IC-p79a87.pdf>.

FERRARI CKB. **Functional foods, herbs and nutraceuticals: towards biochemical mechanisms of healthy aging.** Biogerontology, v. 5(5), p. 275-9, 2004.

FORMAN, Henry Jay; ZHANG, Hongqiao. **Targeting oxidative stress in disease: Promise and limitations of antioxidant therapy.** Nature Reviews Drug Discovery, v. 20, p. 689-709, 2021.

FUKUMASU, H.; LATORRE, A. O.; Z Aidan-DAGLI, M. L. ***Paullinia cupana* Mart. var. *sorbilis*, guarana, increases survival of Ehrlich ascites carcinoma (EAC) bearing mice by decreasing cyclin-D1 expression and inducing a G0/G1 cell cycle arrest in EAC cells.** Phytotherapy Research, England, v. 25, p. 11-16, 2011.

FULLERTON, James N.; GILROY, Derek W. **Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier.** Nature reviews Drug discovery, v. 15, p. 551-567, 2016.

GOMES, S. *et al.* **Microencapsulated brazil nut (*Bertholletia excelsa*) cake extract powder as an added-value functional food ingredient.** LWT, v. 116: p. 108495, 2019.

GOMES; A. S. F; FAGAN, S. B. **Funcionalização de Nanotubos de Carbono.** Quimica nova, v.30, p.1695-1793, 2007.

GREEN K, BRAND MD, MURPHY MP. **Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes.** Diabetes, v. 53(Suppl 1), p. 110-8, 2004.

GUTIERREZ-MARISCAL FM. *et al.* **Coenzyme Q10: From bench to clinic in aging diseases, a translational review.** Crit Rev Food Sci Nutr. V. 59, (14), p. 2240-2257, 2019.

GVOZDJÁKOVA, Anna *et al.* **New roles of coenzyme Q10 in cardiovascular diseases, discovered by a single group.** World Heart Journal, v. 5, p. 159, 2013.

HALLIWELL B, WHITEMAN M. **Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?** Br J Pharmacol, v. 142(2), p. 231-55, 2004.

HASKELL, Crystal F. *et al.* **A double-blind, placebo-controlled, multi-dose evaluation of the acute behavioural effects of guaraná in humans.** Journal of psychopharmacology, v. 21, n. 1, p. 65-70, 2007.

HOU S. *et al.* **Efficacy and Optimal Dose of Coenzyme Q10 Supplementation on Inflammation-Related Biomarkers: A GRADE-Assessed Systematic Review and Updated Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials.** Mol Nutr Food Res., 2023.

HU, Bo *et al.* **IFN α potentiates anti-PD-1 efficacy by remodeling glucose metabolism in the hepatocellular carcinoma microenvironment.** Cancer Discovery, v. 12, p. 1718-1741, 2022.

INOUE T. *et al.* **Tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*) has anti-oxidative and anti-inflammatory properties.** J Cardiol, v. 52, p. 127-32, 2008.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa de orçamentos familiares: POF 2002-2003.** Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: 01 agosto. 2023.

JAMPILEK, Josef; KOS, Jiri; KRALOVA, Katarina. **Potential of nanomaterial applications in dietary supplements and foods for special medical purposes.** Nanomaterials, v. 9, p. 296, 2019.

KENNEDY, Nicholas A. *et al.* **The impact of different DNA extraction kits and laboratories upon the assessment of human gut microbiota composition by 16S rRNA gene sequencing.** PloS one, v. 9, p. e88982, 2014.

KERNT M. *et al.* **Coenzyme Q10 prevents human lens epithelial cells from light-induced apoptotic cell death by reducing oxidative stress and stabilizing BAX / Bcl-2 ratio.** Acta Ophthalmol, V. 3, p. 78-86, 2010.

KHANI, Samira; KEYHANFAR, Fariborz; AMANI, Amir. **Design and evaluation of oral nanoemulsion drug delivery system of mebudipine.** Drug delivery, v. 23, p. 2035-2043, 2016.

KREWER, C. C. *et al.* **Guaraná, a supplement rich in caffeine and catechin, modulates cytokines: evidence from human *in vitro* and *in vivo* protocols.** European Food Research and Technology, Germany, v. 239, p. 49-57, 2014.

KREWER, C. C. *et al.* **Habitual intake of guaraná and metabolic morbidities: an epidemiological study of an elderly Amazonian population.** Phytotherapy Research, England, v. 25, p. 1367-1374, 2011.

KREWER, Carmen *et al.* **Effects of recetitive peripheral magnetic stimulation on upper-limb spasticity and impairment in patients with spastic hemiparesis: a randomized, double-blind, sham-controlled study.** Archives of physical medicine and rehabilitation, v. 95, p. 1039-1047, 2014.

KUMAR R *et al.* **The dynamics of acute inflammation.** J theo Biol, v. 230, p. 145-55, 2004.

KUMAR, R. Ajaya *et al.* **Anticancer and immunostimulatory compounds from *Andrographis paniculata*.** Journal of ethnopharmacology, v. 92, p. 291-295, 2004.

LACKEY, D.E.; OLEFSKY, J.M. **Regulation of metabolism by the innate immune system.** Nat. Rev. Endocrinol, v.12, p.15-28, 2015.

LAHOZA C, MOSTAZAA JM. **Atherosclerosis as a systemic disease.** rev Esp cardiol, v. 60, p. 184-95, 2007.

LENAZ, G. *et al.* **Localization and mobility of coenzyme Q in lipid bilayers and membranes.** BioFactors, v. 9, p. 87–93, 1999.

LI JC. *et al.* **Quinolizidine alkaloids from *Sophora alopecuroides* with anti-inflammatory and anti-tumor properties.** Bioorg Chem, v. 110, p. 104781, 2021.

LÓPEZ-LLUCH, G. *et al.* **Role of plasma membrane coenzyme Q on the regulation of apoptosis.** BioFactors, v. 9, p. 171–177, 1999.

LÓPEZ-OTÍN, Carlos *et al.* **The hallmarks of aging.** Cell, v. 153, p. 1194-1217, 2013.

MACHADO, A. K. **Efeito cito-genômico de peróxido de hidrogênio edo guaraná (*Paullinia cupana*) em células troncas mesequimais.** Dissertacao de Mestrado em farmacologia- UFSM, p. 95. 2014.

MALDANER DR. *et al.* **Interaction between low-level laser therapy and Guarana (*Paullinia cupana*) extract induces antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic effects and promotes proliferation in dermal fibroblasts.** J Cosmet Dermatol, v. 19, p. 629-637, 2020.

MALEKI SJ, CRESPO JF, CABANILLAS B. **Anti-inflammatory effects of flavonoids**. Food Chem., v. 299, p. 125124, 2019.

MOESTRI, D. *et al.* **Tree Nut Oils: Chemical Profiles, Extraction, Stability, and Quality Concerns**. Eur. J. Lipid Sci. Technol, v. 122, p. 19004500, 2020.
MOKDAD, Ali H. *et al.* **Actual causes of death in the United States, 2000**. Jama, v. 291, p. 1238-1245, 2004.

MONTAGNER, G F.S. **Efeito *in vitro* do polimorfismo Al16Val do gene da superóxido dismutase dependente de manganês no metabolismo oxidativo de linfócitos**. 2010. 68p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, 2010.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. **Polymer-based nanocapsules for drug delivery**. International Journal of Pharmaceutics, v.385, p.113–142, 2010.

MUNIER-LEHMANN, H. *et al.* **Original 2-(3-Alkoxy-1H-pyrazol- 1-yl) pyrimidine Derivatives as Inhibitors of Human Dihydroorotate Dehydrogenase (DHODH)**. J. Med. Chem. v. 58, p. 860–877, 2015.

MUSINI, V.M. *et al.* **Pharmacotherapy for hypertension in the elderly**. Cochrane Database Syst. Rev., 2009.

NAKAMOTO, F.K. *et al.* **The pathogenesis linked to coenzyme Q10 insu_ciency in iPSC-derived neurons from patients with multiple-system atrophy**. Sci. Rep., v. 8, p. 14215, 2018.

NETTLETON, Jennifer A. *et al.* **Dietary patterns are associated with biochemical markers of inflammation and endothelial activation in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA)**. The American journal of clinical nutrition, v. 83, p. 1369-1379, 2006.

NEVES, Maria C. *et al.* **Interaction of bile salts with lipid bilayers: An atomistic molecular dynamics study**. Frontiers in Physiology, p. 393, 2019.

NEVES, Ana Rute *et al.* **Solid lipid nanoparticles as a vehicle for brain-targeted drug delivery: two new strategies of functionalization with apolipoprotein E**. Nanotechnology, v. 26, p. 495103, 2015.

OKWUDILI OS. *et al.* **Antidiabetic and in vitro antioxidant effects of hydromethanol extract of Paullinia pinnata root bark in alloxan-induced diabetic rat**. J Complement Integr Med., v. 15(2), 2017.

OLIVEIRA SALLES, Rita Cynara *et al.* **Geographical origin of guarana seeds from untargeted UHPLC-MS and chemometrics analysis**. Food Chemistry, v. 371, p. 131068, 2022.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS (ONU). **Perspectivas da população**

mundial 2022. Acesso EM: 01 de agosto de 2023, disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/189756-popula%C3%A7%C3%A3o-mundial-chegar%C3%A1-8-bilh%C3%B5es-em-novembro-de-2022>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Expandindo nossa compreensão da condição pós-COVID-19: relatório de um webinar da OMS**, 9 de fevereiro de 2021. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/340951>. Acesso em: 25 de julho 2023.

PATRICK, M. *et al.* **Safety of guarana seed as a dietary ingredient: a review.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, United States, v. 67, p. 11281-11287, 2019.

PEIXOTO H. *et al.* **Anti-Aging and Antioxidant Potential of Paullinia cupana var. sorbilis: Findings in Caenorhabditis elegans Indicate a New Utilization for Roasted Seeds of Guarana.** Medicines (Basel), v. 15, p. 61, 2017.

PERL, Andras. **Oxidative stress in the pathology and treatment of systemic lupus erythematosus.** Nature Reviews Rheumatology, v. 9, p. 674-686, 2013.

PICHÉ ME, TCHERNOF A, DESPRÉS JP. **Obesity Phenotypes, Diabetes, and Cardiovascular Diseases.** Circ Res., v. 22, p. 1477-1500, 2020.

PITSAVOS, Christos *et al.* Association between low-grade systemic inflammation and type 2 diabetes mellitus among men and women from the ATTICA study. **The review of diabetic studies: RDS**, v. 4, p. 98, 2007.

POPKIN, B. M.; ADAIR, L. S; NG, S. W. **Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries.** Nutrition Reviews, v. 70(1), p. 3-21, 2012.

PRASAD S, SUNG B, AGGARWAL BB. **Age-associated chronic diseases require age-old medicine: role of chronic inflammation.** Prev Med., v. 54 Suppl (Suppl), p. S29-37, 2012.

QUINTANILHA BJ. *et al.* **Nutrimiromics: Role of microRNAs and Nutrition in Modulating Inflammation and Chronic Diseases.** Nutrients, v. p. 1168, 2017.

RAGAB, Dina *et al.* **The COVID-19 cytokine storm; what we know so far.** Frontiers in immunology, p. 1446, 2020.

RIBEIRO E. E.; CRUZ I. B. M. **Dieta Amazônica**, v. 1, 2012.

ROITT, I. M.; DELVES, P. J. **Fundamentos da Imunologia.** Guanabara Koogan, 12 ed., 2014.

ROMÁN GC. *et al.* **Mediterranean diet: The role of long-chain ω -3 fatty acids in fish; polyphenols in fruits, vegetables, cereals, coffee, tea, cacao and wine; probiotics and vitamins in prevention of stroke, age-related cognitive decline, and Alzheimer disease.** Rev Neurol (Paris), v. 175, p. 724-741, 2019.

RUSU, M. E. *et al.* **Benefits of tree nut consumption on aging and age-related diseases: mechanisms of actions.** Trends in food science & technology, v. 88, p. 104-120, 2019.

SAAD, G. A. *et al.* **Fitoterapia Contemporânea: tradição e ciência na prática clínica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. World Health Organization, 2014.

SAATH, Kleverton Clovis de Oliveira; FACHINELLO, Arlei Luiz. **Crescimento da demanda mundial de alimentos e restrições do fator terra no Brasil.** Revista de Economia e Sociologia Rural, v. 56, p. 195-212, 2018.

SAHEBKAR, A. *et al.* **Supplementation with coenzyme Q10 reduces plasma lipoprotein(a) concentrations but not other lipid indices: A systematic review and meta-analysis.** Pharmacol. Res., v. 105, p. 198–209, 2016.

SANTOS, R. M. M.; FIALHO, S. L. **Nanopartículas: Uma alternativa para a administração de biofármacos.** Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, p.52-59, 2008.

SCHMALTZ, C; SANTOS, J. V; GUTERRES, S. S. **Nanocápsulas como uma tendência promissora na área cosmética: a imensa potencialidade deste pequeno grande recurso.** Pharmacia Brasileira, v.16, p.80-85, 2005.

SCHWINGSHACKL, Lukas; HOFFMANN, Georg. **Dietary fatty acids in the secondary prevention of coronary heart disease: a systematic review, meta-analysis and meta-regression.** BMJ open, v. 4, p. e004487, 2014.

SMELCEROVIC Z. *et al.* **Xanthine oxidase inhibitory properties and anti-inflammatory activity of 2-amino-5-alkylidene-thiazol-4-ones.** Chem Biol Interact, v. 229, p. 73-81, 2015.

SOARES, J. A. S. *et al.* **Potencialidades da Prática da Atenção Farmacêutica no Uso de Fitoterápicos e Plantas Medicinais.** Journal of Applied pharmaceutical sciences, v. 10 (1), p. 10-21, 2020.

SOMAYAJULU M. *et al.* **Role of mitochondria in neuronal cell death induced by oxidative stress; neuroprotection by Coenzyme Q10.** Neurobiol Dis., v.3, p. 618-27, 2005.

SPINDLER M, BEAL MF, HENCHCLIFFE C. **Coenzyme Q10 effects in neurodegenerative disease.** Neuropsychiatric Disease and treatment, Albany, v. 5, p. 597-610, 2009.

SUZUKI, Ikuo K. *et al.* **Human-specific NOTCH2NL genes expand cortical neurogenesis through Delta/Notch regulation.** Cell, v. 173, n. 6, p. 1370-1384, 2018.

TAYLOR L. *et al.* **Safety of TeaCrine®, a non-habituating, naturally occurring purine alkaloid over eight weeks of continuous use.** J Int Soc Sports Nutr., v.13, p. 2, 2016.

TEIXEIRA C. F. *et al.* **Safety indicators of a novel multi supplement based on guarana, selenium, and L-carnitine: Evidence from human and red earthworm immune cells.** Food Chem Toxicol, v. 150, p. 112066, 2021.

TORRES, E. A. F. S. *et al.* **Effects of the consumption of guarana on human health: A narrative review.** Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, United States, v. 21, p. 272-295, 2022.

TSEUGUEM P. P.. *et al.* **Aqueous and Methanol Extracts of *Paullinia pinnata* (Sapindaceae) Improve Monosodium Urate-Induced Gouty Arthritis in Rat: Analgesic, Anti-Inflammatory, and Antioxidant Effects.** Evid Based Complement Alternat Med., v. 5, 2019.

VELOSO, C. F. *et al.* **Neuroprotective effects of guarana (*Paullinia cupana* Mart.) against vincristine *in vitro* exposure.** The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease. Switzerland, v. 5, p. 65-70, 2018.

VITALE. Daniela Cristina *et al.* **Isoflavones: estrogenic activity, biological effect and bioavailability.** European journal of drug metabolism and pharmacokinetics, v. 38, p. 15-25, 2013.

VORONOV, E *et al.* **The role IL-1 in tumor-mediated angiogenesis.** Front. Physiol, v. 5, p. 114-121, 2014.

WANG, Zhong Lin. **Triboelectric nanogenerators as new energy technology and self-powered sensors. Principles, problems and perspectives.** Faraday discussions, v. 176, p. 447-458, 2014.

Wang J, *et al.* **Nanomedicines in B cell-targeting therapies.** Acta Biomater, v. 1, p. 1-19. 2022.

WATMOUGH, N.J.; FRERMAN, F.E. **The electron transfer flavoprotein: Ubiquinone oxidoreductases.** Biochim. Biophys. Acta Bioenerg, v. 1797, p. 1910–1916, 2010.

WHO EXPERT COMMITTEE ON THE SELECTION; USE OF ESSENTIAL MEDICINES; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The Selection and Use of Essential Medicines: Report of the WHO Expert Committee, 2013 (including the 18th WHO Model List of Essential Medicines and the 4th WHO Model List of Essential Medicines for Children).** World Health Organization, 2014.

WHO. **Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause,** World Health Organization. **Noncommunicable diseases.** World Health Organization Fact Sheet, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION *et al.* **Meeting report: WHO technical**

consultation: nutrition-related health products and the World Health Organization model list of essential medicines—practical considerations and feasibility: Geneva, Switzerland, 20–21 September 2018. World Health Organization, 2019.

YONEKURA, L. *et al.* **Bioavailability of catechins from guaraná (*Paullinia cupana*) and its effect on antioxidant enzymes and other oxidative stress markers in healthy human subjects.** *Food & Function*. v. 7, p. 2970-2978, 2016.

YOUNG, A.J. *et al.* **Coenzyme Q10: A Review of Its Promise as a Neuroprotectant.** *CNS Spectrums*. v. 12, p. 62–68, 2007.

ZAMAI, C. A. *et al.* **Estudo do conhecimento x incidência de fatores de risco entre escolares do ensino fundamental e médio.** *Revista Movimento e Percepção*, v. 4, 2004.