



MAFALDA SOFIA DUARTE OLIVEIRA DA SILVA

Licenciada em Engenharia Agronómica

# DESENVOLVIMENTO DE UM SUPLEMENTO ALIMENTAR PARA O FORTALECIMENTO DA SAÚDE MENTAL E BEM-ESTAR EMOCIONAL

MESTRADO EM FITOTECNOLOGIA NUTRICIONAL PARA A SAÚDE  
HUMANA

Universidade NOVA de Lisboa  
novembro, 2021





**NOVA**

NOVA SCHOOL OF  
SCIENCE & TECHNOLOGY

DEPARTAMENTO DE  
CIÊNCIAS DA TERRA

MAFALDA SOFIA DUARTE OLIVEIRA DA SILVA

Licenciada em Engenharia Agrónómica

# DESENVOLVIMENTO DE UM SUPLEMENTO ALIMENTAR PARA O FORTALECIMENTO DA SAÚDE MENTAL E BEM-ESTAR EMOCIONAL

MESTRADO EM FITOTECNOLOGIA NUTRICIONAL PARA A SAÚDE  
HUMANA

Universidade NOVA de Lisboa  
novembro, 2021





# DESENVOLVIMENTO DE UM SUPLEMENTO ALIMENTAR PARA O FORTALECIMENTO DA SAÚDE MENTAL E BEM-ESTAR EMOCIONAL

**MAFALDA SOFIA DUARTE OLIVEIRA DA SILVA**

Licenciada em Engenharia Agronómica

**Orientadora:** Márcia Micaela Carvalheira Jordão Coelho,  
Mestre em Farmácia pela Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Laboratórios Nova Flora – Indústria de Nutracêuticos, S. A.

**Coorientador:** Fernando Henrique da Silva Reboredo  
Professor Associado com Agregação, NOVA School of Science & Technology, Universidade NOVA de Lisboa

**Júri:**

**Presidente:** Doutora Maria Manuela Malhado Simões Ribeiro,  
Professora Auxiliar com Agregação, NOVA School of Science & Technology, Universidade NOVA de Lisboa.

**Vogais:** Doutora Daniela Maria Barroso de Moura Cipreste Vaz, Professora Adjunta do Instituto Politécnico de Leiria.  
Mestre Márcia Micaela Carvalheira Jordão Coelho, Diretora de Laboratório na empresa Nova Flora, Indústria de Nutracêuticos, S. A.



## **Desenvolvimento De Um Suplemento Alimentar Para o Fortalecimento da Saúde Mental e Bem-Estar Emocional**

Copyright © Mafalda Sofia Duarte Oliveira da Silva, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade NOVA de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos Laboratórios Nova Flora – Indústria de Nutracêuticos, S.A. pela oportunidade que me foi dada de poder desenvolver um projeto à minha escolha e vê-lo tomar forma. Preciso de agradecer especialmente à Doutora Márcia Coelho por ter confiado e apoiado a ideia desde o início, por se ter disponibilizado para me esclarecer todas e quaisquer dúvidas e por fazer os possíveis para a concretização do projeto.

Agradeço também ao Professor Doutor Fernando Reboredo a ajuda e a orientação que me foram prestadas nos momentos mais desafiantes, bem como todo o apoio e confiança depositados em mim ao longo destes dois anos.

Ao Professor Doutor Mauro Guerra pela disponibilidade na realização das análises dos elementos minerais.

À minha família, nomeadamente aos meus pais, agradeço a motivação, o amor, a paciência e os conselhos. E ao meu irmão agradeço a boa disposição e carinho.

Quero também agradecer ao meu namorado pela companhia e por me dar alento nesta jornada.

A todos aqueles com quem me cruzei e que de alguma forma contribuíram para chegar aqui, o meu obrigado.



## RESUMO

Atualmente as perturbações mentais têm vindo a aumentar e as estimativas apontam que continuem a crescer durante as próximas décadas, juntamente com a incidência das Doenças Neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer e de Parkinson.

Nos últimos anos a microbiota tornou-se um dos tópicos principais de pesquisa, estando o seu desequilíbrio relacionado com problemas degenerativos associados à idade.

Sabe-se que o equilíbrio gastrointestinal é essencial para o bem-estar e para a boa disposição, em particular devido à comunicação bidirecional existente entre o intestino e o cérebro, uma vez que um desequilíbrio na flora intestinal pode levar a um aumento de permeabilidade e gerar uma neuroinflamação, conduzindo ao aumento do stress oxidativo e à degeneração das células.

Alguns estudos mostram que através da suplementação é possível aumentar a boa disposição, atenuar os sintomas de ansiedade e depressão presentes na sociedade moderna, e potenciar alguns tratamentos farmacológicos.

Nesse sentido o âmbito desta dissertação é o desenvolvimento de um Suplemento Alimentar que atue no eixo intestino-cérebro através do uso de probióticos, vitaminas do complexo B, triptofano, magnésio e por último, plantas que confirmam neuroproteção devido à sua ação antioxidante como é o caso da oliveira e da videira, culturas bastante valorizadas na Agricultura Portuguesa.

**Palavras-Chave:** Ansiedade; Microbiota; Neuroproteção; Suplemento Alimentar.



## ABSTRACT

Nowadays mental disorders have been increasing and these are estimated to grow during the next decades, along with neurodegenerative diseases like Alzheimer's and Parkinson's disease.

In the last years the microbiota became one of my main research topics, being his imbalance associated with degenerative problems.

It is known that gastrointestinal balance is essential for well-being and mood, in particular thanks to bidirectional communication between the gut and the brain, since intestinal flora disequilibrium can increase permeability and create neuroinflammation, leading to oxidative stress growth and cell degeneration.

Some studies show that through supplementation it is possible to increase the mood, mitigate anxiety and depression symptoms present in the modern society, and enhance pharmacological treatments.

With that aim in mind, this dissertation has as main purpose the development of a dietary supplement that act on gut-brain axis through the use of probiotics, vitamin B complex, tryptophan, magnesium and at last neuroprotective plants, in this case the olive tree and vine, duo to their antioxidative capacity and agricultural value in Portugal.

**Keywords:** Anxiety; Dietary Supplements; Microbiota; Neuroprotection.



# ÍNDICE

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>23</b>
1.1 Suplementos Alimentares .....	23
1.2 Saúde Mental.....	25
1.2.1 Microglia e Microbiota.....	26
1.2.2 Probióticos e Prebióticos .....	31
1.3 O Olival e a Vinha na Agricultura Portuguesa.....	36
1.3.1 O Olival .....	36
1.3.2 A Vinha.....	38
1.3.3 Plantas Neuroprotetoras.....	39
1.4 Aminoácidos, vitaminas e minerais .....	41
1.4.1 Magnésio.....	41
1.4.2 Triptofano .....	42
1.4.3 Vitaminas do Complexo B .....	43
1.5 Objetivos do trabalho.....	46
<b>2 METODOLOGIA .....</b>	<b>47</b>
2.1 Pesquisa bibliográfica.....	47
2.2 Formulação.....	48
2.3 Processo de Fabrico .....	50
2.4 Controlo de Qualidade.....	51
2.4.1 Análises de Elementos Minerais.....	51

2.5	Notificação do produto .....	54
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
3.1	Formulação.....	55
3.2	Análise elementar.....	60
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS.....</b>	<b>65</b>
<b>5</b>	<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>67</b>
<b>A</b>	<b>APÊNDICE.....</b>	<b>86</b>
A.1	Embalagem do produto .....	86
A.2	Resumo das características do Suplemento Alimentar.....	87
A.3	Notificação.....	92

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vitaminas e Suplementos Alimentares- Mercado Europeu (2014-2018, €B, %)	24
Figura 2. Influência da disbiose intestinal na saúde mental	31
Figura 3. Ocupação predominante das culturas permanentes (2019)	37
Figura 4. Fluxograma de produção de cápsulas de gelatinas duras	50
Figura 5. Pastilha para análise	53
Figura 6. Vectiseren e respetiva composição	59
Figura 7. Neorotrans B e respetiva composição	59



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Lista dos ingredientes do suplemento alimentar.....	48
Tabela 2. Distribuição dos ingredientes pela cápsula A e pela cápsula B.....	49
Tabela 3. Teores máximos de certos contaminantes em suplementos alimentares.....	52
Tabela 4. Dosagens de probióticos (UFC) de acordo com a bibliografia.....	55
Tabela 5. Dosagem de cada estirpe ajustada a uma cápsula do suplemento alimentar. ....	56
Tabela 6. Biodisponibilidade associada a determinadas formas de magnésio. ....	57
Tabela 7. Formulação da cápsula A e da cápsula B com as respectivas quantidades.....	60
Tabela 8. Teores médios dos elementos minerais presentes nas principais componentes da formulação do suplemento. ....	61



## ABREVIATURAS

**DA** – Doença de Alzheimer

**DDR** – Dose Diária Recomendada

**DGAV** – Direção Geral de Alimentação e Veterinária

**DP** – Doença de Parkinson

**EFSA** – Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos, do inglês "*European Food Safety Authority*"

**GI** – Gastrointestinal

**HPA** – Hipotálamo-Pituitária-Adrenal

**IL-4** – Interleucina 4

**IL-6** – Interleucina 6

**IL-10** – Interleucina 10

**INE** – Instituto Nacional de Estatística

**INFARMED** – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.

**LPS** – Lipopolissacarídeo

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**UFC** – Unidades Formadoras de Colónias

**SA** – Suplemento Alimentar

**SCFAs** – Ácidos Gordos de Cadeia Curta, do inglês "*Short-chain fatty acid*"

**SNC** – Sistema Nervoso Central



# INTRODUÇÃO

## 1.1 Suplementos Alimentares

Ainda que através de uma alimentação adequada e variada seja possível adquirir os nutrientes necessários a um bom estado de saúde, quando esta situação não se verifica devido ao estilo de vida adotado é possível adquirir essas substâncias através de Suplementos Alimentares (SA).

Estes produtos são então definidos como "*géneros alimentícios que se destinam a complementar e ou suplementar o regime alimentar normal e que constituem fontes concentradas de determinadas substâncias nutrientes ou outras com efeito nutricional ou fisiológico, estemes ou combinadas, comercializadas em forma doseada, tais como cápsulas, pastilhas, comprimidos, pílulas e outras formas semelhantes, saquetas de pó, ampolas de líquido, frascos com conta-gotas e outras formas similares de líquidos ou pós que se destinam a ser tomados em unidades medidas de quantidade reduzida.*" (Decreto de Lei n.º 118/2015 de 23 de junho).

Devido à preocupação com a saúde e bem-estar por parte da população, associada à incompatibilidade entre o estilo de vida atual e o cumprimento dos requisitos nutricionais diários, o mercado dos SA encontra-se em crescimento. Em 2020 este mercado mundial terá sido avaliado em 140,3 mil milhões de dólares e até 2028 é expectável que continue em crescimento a uma taxa anual de 8,6% (Grand View Research, 2021).

Também a pandemia causada pelo novo Coronavírus (SARS-CoV-2) teve impacto neste mercado uma vez que, de acordo com os dados de um questionário *online* levado a cabo pelo

*Council for Responsible Nutrition*, cerca de 43% dos consumidores de SA alteraram os hábitos de consumo, incrementando outros SA na sua rotina ou aumentando a frequência de toma e/ou a dosagem da suplementação habitual essencialmente para melhorar o sistema imunitário (Council for Responsible Nutrition, 2020; Grand View Research, 2021).

Na Europa a tendência de evolução deste mercado também se encontra em expansão (Figura 1). Para além das questões de saúde e bem-estar já referidas enquanto impulsionadoras para o aumento da procura, este crescimento também ocorre por questões éticas. Como exemplo disso temos a Alemanha, cujo aumento da suplementação deve-se às mudanças de alimentação para regimes de veganismo e vegetarianismo (PwC, 2021).

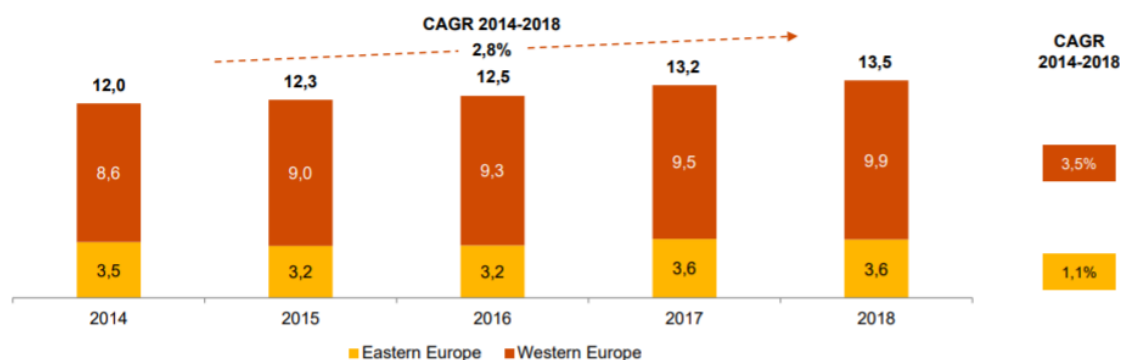


Figura 1. Vitaminas e Suplementos Alimentares- Mercado Europeu (2014-2018, €B, %). Fonte: PwC, 2021.

No entanto, das várias categorias de SA, espera-se que a indústria dos probióticos cresça a um ritmo mais acelerado do que as restantes devido à crescente importância na melhoria da imunidade e no auxílio da saúde mental, para além de coadjuvante do sistema digestivo (PwC, 2020). Segundo Kikuchi *et al.* (2020), o crescimento na área da psiquiatria nutricional permite que sejam feitas intervenções clínicas do ponto de vista nutricional em indivíduos que sofrem de ansiedade e depressão através de suplementação recorrendo ao uso de probióticos ou de L-Triptofano (L-Trp), por exemplo.

Mundialmente, do ponto de vista económico a indústria dos probióticos atingiu um valor de 49,4 mil milhões de dólares e as estimativas apontam para um crescimento podendo atingir os 69,3 mil milhões de 2023 (Statista, 2021).

As expectativas futuras a nível europeu são que, à semelhança do que se espera que aconteça no resto do mundo, a procura de suplementos continue a aumentar. As estatísticas

apontam que em 2030 a Europa Ocidental terá a segunda população mais envelhecida do mundo e é este fator demográfico que potencia o crescimento no consumo de SA, enquanto soluções preventivas para problemas de saúde (PwC, 2020).

## 1.2 Saúde Mental

Com o aumento da população idosa e com o aumento da esperança média de vida, as doenças neurodegenerativas são consideradas um problema de saúde pública (Rehman *et al.*, 2020). As estimativas apontam que em 2030 a incidência da Doença de Parkinson poderá atingir entre 8,7 a 9,3 milhões de indivíduos (Dorsey *et al.*, 2007) e em 2050 a Doença de Alzheimer poderá afetar 106,4 milhões de pessoas (Brookmeyer *et al.*, 2007).

Para além das doenças neurodegenerativas, devido ao *stress* do dia-a-dia que se encontra presente na sociedade atual (Schneiderman *et al.*, 2005) também a depressão é um problema a nível mundial, chegando a afetar 264 milhões de pessoas (GBD, 2018). A par com a depressão também a ansiedade tem vindo a ganhar destaque (Friedrich, 2017), tratando-se de desordens associadas ao aumento de citocinas pró-inflamatórias (O'Brien *et al.*, 2004).

Relativamente às doenças neurodegenerativas, a Doença de Alzheimer (DA) é a forma de demência mais comum, caracterizada pela perda gradual da memória, apatia e depressão (Ferri *et al.*, 2009). Os dados da Alzheimer Europe (2019) fazem referência a cerca de 193 500 indivíduos com demência em Portugal, sendo que em 2017 ocupávamos o 4º lugar como o país com mais casos por 100 mil habitantes (OCDE, 2017).

Um dos indicadores da Doença de Alzheimer é a deposição de placas de  $\beta$ -amilóide, capazes de induzir a ativação da microglia (McNaull *et al.*, 2009). A ativação da microglia juntamente com a libertação de citocinas pró-inflamatórias são os principais fatores responsáveis pela neuroinflamação e progressão desta doença (Mehrabadi e Sadr, 2020), sendo que a neuroinflamação crónica está associada a várias doenças neurodegenerativas do sistema nervoso central (SNC) para além da referida (Akbari *et al.*, 2016).

A Doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa progressiva mais comum (Lebouvier *et al.*, 2009) que ocorre quando existe degeneração dos neurónios dopaminérgicos na *substantia nigra*, resultando numa deficiência em dopamina responsável

pelos principais sintomas motores da doença (Kalia e Lang, 2015), e quando existe acumulação de  $\alpha$ -sinucleína no tronco cerebral, medula e córtex (Lees *et al.*, 2009).

As disfunções gastrointestinais (GI) são os sintomas não motores mais comuns desta patologia e os que ocorrem na fase inicial da mesma, contribuindo para a patogenicidade desta doença (Sun e Shen, 2018). Isto porque o trato GI é potencialmente o principal responsável pelo *stress* oxidativo (Forsyth *et al.*, 2011) e porque os agregados de  $\alpha$ -sinucleína fosforilados, resultantes de processos oxidativos e responsáveis pela perda neuronal (Braak e Del Tredici, 2008), começam por identificar-se primeiramente no sistema nervoso entérico e mais tarde no SNC (Shannon *et al.*, 2012).

Além do mais, na DP os indivíduos apresentam permeabilidade intestinal (Forsyth *et al.*, 2011) levando a uma disbiose (Keshavarzian *et al.*, 2015). Consequentemente gera-se um ambiente inflamatório e um aumento do *stress* oxidativo devido à passagem das endotoxinas (Forsyth *et al.*, 2011), que segundo Shultz (2006) é responsável pela acumulação de agregados de  $\alpha$ -sinucleína no cérebro.

Segundo Schneiderman *et al.* (2005), o *stress* é importante para a vida, evolução e para o desenvolvimento de respostas de adaptação. No entanto, quando se torna uma situação persistente, especialmente em indivíduos mais debilitados quer seja por fatores genéticos ou pela idade, o *stress* pode influenciar o desenvolvimento de doenças, entre elas as que afetam a saúde mental.

### 1.2.1 Microglia e Microbiota

A microglia são células especializadas do SNC que atuam em resposta a infeções e disfunções, isto é, com funções semelhantes aos macrófagos (Kettenmann *et al.*, 2011). A atividade da microglia é influenciada, de entre vários fatores, pelo intestino devido à comunicação bidirecional entre a microbiota e o SNC. Esta comunicação pode ocorrer via nervo vago ou através da circulação sanguínea (Abdel-Haq *et al.*, 2019).

Dependendo do ambiente envolvente as células da microglia podem passar de um estado de vigilância para um estado ativo, em que passam de uma forma ramificada para uma

forma ameboide. Essas alterações do ambiente envolvente dizem respeito à presença de patógenos, *stress* ou algum dano nos tecidos (Torres-Platas *et al.*, 2014).

Na sua forma ativa as células podem migrar para o sítio da lesão, proliferar e fagocitar. Promovem também uma resposta inflamatória através da produção de mediadores pró-inflamatórios, tais como citocinas, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico que provocam toxicidade, mas que também causam danos às células cerebrais (Glass *et al.*, 2010; Kettenmann *et al.*, 2011).

Alguns estudos mostram que a resposta inflamatória da microglia contribui para a progressão de várias doenças neurodegenerativas como a DA e a DP (Glass *et al.*, 2010). Isto porque quando o equilíbrio entre as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias se encontra alterado ou o *stress* é constante, ocorre a degradação do triptofano em substâncias neuroprotetoras e neurodegenerativas. Se a alteração for favorável às citocinas pró-inflamatórias, a via neurodegenerativa prevalece e é potenciada pelo efeito do cortisol libertado durante o *stress* (Myint e Kim, 2003).

Por outro lado, se for ativada a via anti-inflamatória é promovido o efeito neuroprotetor da microglia através da produção de citocinas anti-inflamatórias e de fatores neurotróficos, evitando o desenvolvimento de uma inflamação. Ou seja, a ativação da microglia pode ser benéfica ou tóxica para as células dependendo se foi ativado um fenótipo inflamatório ou anti-inflamatório. Por exemplo, na presença de lipopolissacarídeos (LPS) em elevadas concentrações e também de outras substâncias é ativado o fenótipo inflamatório em que se verifica então a produção de óxido nítrico e de IL-6, no entanto na presença de IL-4, de IL-10 e de LPS – numa concentração muito baixa – é ativado o fenótipo anti-inflamatório (Franco e Fernández-Suárez, 2015; Moreira *et al.*, 2012). Os LPS são os principais componentes das paredes celulares das bactérias Gram-negativas, que se podem encontrar principalmente no intestino, mas também na cavidade oral e no trato urinário sendo que em condições normais devem estar presentes numa baixa quantidade (de Punder e Pruimboom, 2015).

Em relação à microbiota intestinal, esta trata-se de uma complexa comunidade de microrganismos maioritariamente dos filos *Firmicutes* e *Bacteroides* (Ley *et al.*, 2008) alojada no trato GI com cerca de  $10^{12}$  organismos por grama do conteúdo luminal (Garrett *et al.*, 2010).

A microbiota desempenha um papel crucial na manutenção da barreira intestinal, na produção de vitaminas e nutrientes (Thursby e Juge, 2017) e a sua atividade metabólica encontra-se intimamente ligada à produção de citocinas e consequentemente à imunidade (Pierce e Alvina, 2019).

Existem cada vez mais evidências do impacto da microbiota intestinal e da sua importância para o normal funcionamento psicológico e de órgãos, especialmente o cérebro (Dinan e Cryan, 2017) devido ao impacto em diversas patologias, nomeadamente na ativação das vias das Doenças Neurodegenerativas (Piscollato *et al.*, 2016).

Uma alteração da microbiota pode ter um profundo impacto na função cerebral (Dinan e Cryan, 2017) devido à produção de espécies neurotóxicas como os LPS e as proteínas amilóides, que ao chegarem ao cérebro através do nervo vago promovem a ativação da microglia e a neuroinflamação, aumentando a produção de espécies reativas de oxigénio (Dumitrescu *et al.*, 2018). Existem vários fatores que fazem com que isto possa acontecer tais como a toma de antibióticos, stress, dieta alimentar, genética e idade (Hirschberg *et al.*, 2019).

#### **1.2.1.1 Disbiose e a Importância do Intestino**

As células do epitélio intestinal são essenciais para o sistema imunitário do intestino. Estas células apresentam recetores para padrões moleculares deixados pela microbiota (Cerf-Bensussan e Gaboriau-Routhiau, 2010), isto é, apresentam uma capacidade de reconhecer produtos ou componentes bacterianos e dar origem a uma resposta do tecido linfóide associado à mucosa (MALT), ou seja, do sistema imunitário (Adams, 2010). Então, quando estes recetores estão ativos sinalizam uma cascata de produção de substâncias anti-microbianas e de citocinas, consoante o sinal deixado pela microbiota intestinal (Cerf-Bensussan e Gaboriau-Routhiau, 2010). Em contacto com bactérias patogénicas as células do epitélio GI secretam citocinas pró-inflamatórias, em particular a interleucina 6 (IL-6), que não só é uma citocina pró-inflamatória como também regula o metabolismo dos nutrientes (Adams, 2010).

As células do epitélio também formam uma barreira físico-química que limita o acesso à superfície intestinal e limita o crescimento bacteriano (Cerf-Bensussan e Gaboriau-Routhiau, 2010). Algumas das células do epitélio, por exemplo as de Goblet, produzem glicoproteínas mucinas que formam um muco que mantém a região próxima ao epitélio protegida sem a penetração de bactérias e a camada superior desse muco com as bactérias (Johansson *et al.*, 2008), enquanto temos outras células, nomeadamente as de Paneth, que são responsáveis pela produção de zinco, lisozimas e substâncias antimicrobianas (Garrett *et al.*, 2010).

A integridade dessa barreira física é conseguida através da união das células do epitélio pelas *tight junction proteins*. Essas proteínas regulam então a permeabilidade permitindo a passagem de pequenas moléculas. No entanto, a regulação da permeabilidade depende da interação dessas proteínas com a microbiota intestinal (Allam-Ndoul *et al.*, 2020). Portanto, a manutenção da barreira intestinal por parte da microbiota evita que patógenos ou substâncias nocivas entrem na corrente sanguínea (Abdel-Haq *et al.*, 2019).

Isto significa que para garantir que as funções que competem à microbiota estão asseguradas é necessário verificar-se uma composição bacteriana estável, privilegiando os filos *Bacteroidetes*, *Firmicutes* e *Actinobacteria*. Caso se verifique uma alteração da composição da microbiota ou um aumento de outros grupos bacterianos estamos perante uma disbiose (Weiss e Hennet, 2017).

Numa disbiose regista-se um aumento de enterobactérias e uma redução dos organismos benéficos, nomeadamente uma redução das bactérias produtoras de ácidos gordos de cadeia curta (SCFAs) (Hirshberg *et al.*, 2019).

Os SCFAs – propionato, butirato e acetato – produzidos pela microbiota desempenham vários papéis, designadamente:

- Fonte de energia no metabolismo (Donohoe *et al.*, 2011).
- Promovem a integridade do epitélio intestinal através da diminuição do pH do lúmen e dessa forma controlam o crescimento de microrganismos nocivos (Adams, 2010).
- Modulação da inflamação através da regulação da produção de citocinas inflamatórias e do recrutamento de células do sistema imunitário (Li *et al.*, 2018).

- No SNC, uma vez que em alguns modelos experimentais a administração de SCFAs surte benefícios na evolução da esclerose múltipla e reduz os processos inflamatórios do SNC verificando-se uma redução da desmielinização e da perda de axónios (Hirschberg *et al.*, 2019).

Decorrente da diminuição dos SCFAs e das bactérias produtoras verifica-se a perda da integridade do epitélio intestinal e um aumento do ambiente inflamatório (Hirschberg *et al.*, 2019).

Como consequência da perda de integridade ocorre o aumento da permeabilidade intestinal permitindo a passagem de patógenos e de substâncias nocivas, como os LPS, para a corrente sanguínea. Em circulação estas substâncias desencadeiam a produção de citocinas pró-inflamatórias e contribuem para a ativação da microglia, induzindo uma neuroinflamação (Ait-Belgnaoui *et al.*, 2012; Moreira *et al.*, 2012; de Punder e Pruimboom, 2015).

Associado à disbiose podem então surgir vários problemas a diferentes níveis, como por exemplo a Doença de Crohn, Colite ulcerosa, Diabetes tipo I (Garrett *et al.*, 2010), asma e alergias (Anand e Mande, 2018), depressão, Doença de Alzheimer (Piscollato *et al.* 2016) e de Parkinson (Forsyth *et al.*, 2011).

Voltando ao impacto da microbiota no cérebro, ela também se encontra relacionada com a produção de neurotransmissores, em que diferentes estirpes produzem diferentes neurotransmissores (Cryan e Dinan, 2012). É de notar que também as citocinas influenciam os neurotransmissores na medida em que desempenham um papel inibidor da serotonina, dopamina e norepinefrina (Miller e Raison, 2016), e aumentam a atividade do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) com consequente secreção de glicocorticoides (John e Buckingham, 2003). Eixo este responsável pela regulação das emoções, disposição, estando também relacionado com as desordens de humor e de memória (Ait-Belgnaoui *et al.*, 2012; Dinan *et al.*, 2013).

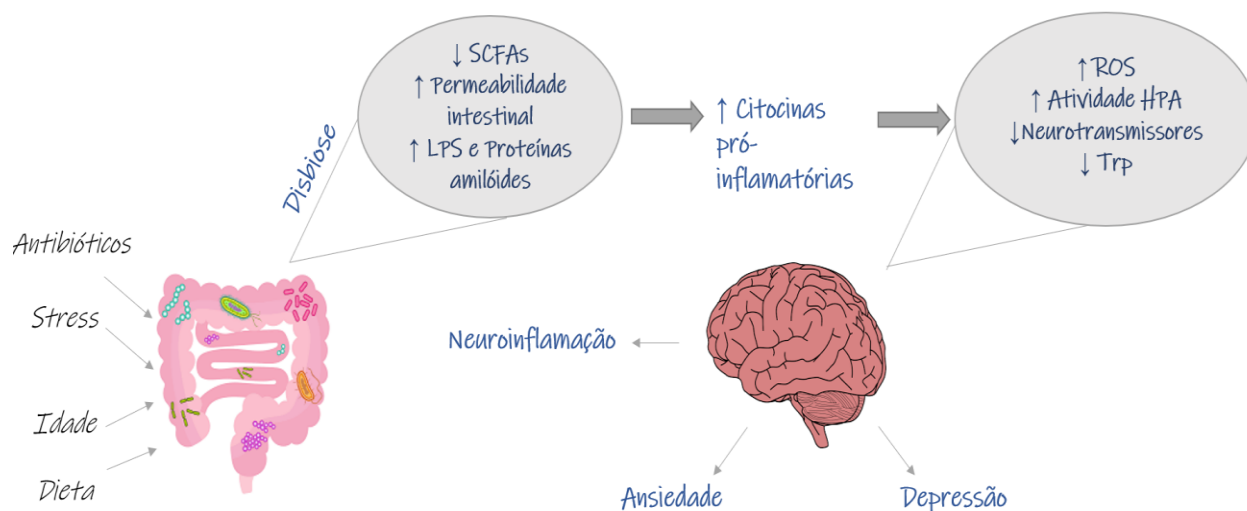


Figura 2. Influência da disbiose intestinal na saúde mental.

Então, devido a esta comunicação bidirecional verificada entre o cérebro e o intestino é possível, através da modulação da microbiota, regular o stress, a disposição, a ansiedade e a cognição, trazendo benefícios tanto para o intestino como para o cérebro (Wang *et al.*, 2016).

### 1.2.2 Probióticos e Prebióticos

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro.

Dos vários benefícios destacam-se os do trato GI como a prevenção do cancro colorretal, o tratamento e prevenção de diarreias, a erradicação da *Helicobacter pylori*, entre outros (Guarner *et al.*, 2017). No contexto atual, também os probióticos enquanto coadjuvantes apresentam efeitos benéficos em condições clínicas relacionadas com a infeção causada pelo SARS-CoV-2 (d’Ettorre *et al.*, 2020).

Segundo Wang *et al.* (2016) e Wang *et al.* (2019) o uso de probióticos especialmente os *Bifidobacterium* e os *Lactobacillus* em doses de  $10^9$  e  $10^{10}$  Unidades Formadoras de Colónias (UFC) beneficiam o SNC, sendo os efeitos verificados dependentes do tipo de estirpe. Num estudo realizado por Ni *et al.* (2019) verificou-se que em ratos as Bifidobactérias apresentam maior poder inibidor de citocinas pró-inflamatórias – comparativamente com os Lactobacilos – e inibem a inflamação induzida pelas LPS (Riedel *et al.*, 2006), enquanto os Lactobacilos apresentam uma maior capacidade antioxidante.

Para além do mais, também os probióticos têm capacidade de alterar os neurotransmissores Ácido Gama-Aminobutírico (GABA), Serotonina (5-HT) e Dopamina denominando-se "psicobióticos". Ou seja, são uma classe de probióticos que, quando administrada nas quantidades certas, são benéficos para quem sofre de distúrbios psiquiátricos devido à produção desses neurotransmissores, resultando numa redução da inflamação por inibição da atividade do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA) (Dinan *et al.*, 2013). Como exemplos de estirpes com essa capacidade temos *Lactobacillus plantarum*, *L. helveticus*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus* e *Bifidobacterium infantis* (Wang *et al.*, 2016).

No entanto, para favorecer a multiplicação das bactérias benéficas é necessário que ocorra a ingestão de prebióticos, definidos como "*ingredientes seletivamente fermentados que permitem mudanças específicas na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal, conferindo assim benefícios para a saúde do hospedeiro*". Existem várias substâncias prebióticas e a título de exemplo temos a inulina e a oligofrutose. Esta última encontra-se presente em determinadas espécies do género *Allium*, por exemplo em cebolas e alhos, no trigo, na chicória, etc., e resultante da sua fermentação no cólon registam-se vários benefícios com destaque para o aumento das bifidobactérias (Guarner *et al.*, 2017).

Ou seja, através do uso de probióticos e prebióticos é possível obter um ecossistema intestinal equilibrado (Pierce e Alvina, 2019), modular a permeabilidade intestinal e a endotoxémia (Moreira *et al.*, 2012), atenuar a resposta ao stress do eixo HPA resultando numa diminuição dos níveis de corticosteroides (Ait-Belgnaoui *et al.*, 2012) e reduzir as respostas inflamatórias.

### **1.2.2.1 *Bifidobacterium longum***

Segundo Savignac *et al.* (2014; 2015), a suplementação em ratos com  $10^9$  UFC de *Bifidobacterium longum* 1714 apresenta benefícios na redução da depressão, da ansiedade e melhora a memória. Esta mesma estirpe, com a mesma dose, em humanos também apresentou efeitos na redução do stress, no aumento da vitalidade e redução da fadiga mental (Wang *et al.*, 2019).

Existem outras estirpes de *Bifidobacterium longum* estudadas em ratos, como por exemplo a NCC3001 (Bercik *et al.*, 2011), que numa dose de  $10^{10}$  UFC normalizou o comportamento da ansiedade induzido por uma inflamação do trato GI, no entanto não alterou os valores da inflamação e são precisos mais estudos para avaliar se em humanos o efeito é semelhante.

Por fim, é importante referir que associado a outras estirpes, nomeadamente ao *B. helveticus* R0052, o *Bifidobacterium longum* R0175 reduz os valores de ansiedade e depressão em humanos numa dosagem conjunta de  $3,0 \times 10^9$  UFC, podendo ser uma medida preventiva contra patologias relacionadas com o *stress* (Messaoudi *et al.*, 2011a).

### **1.2.2.2 *Bifidobacterium infantis***

O *Bifidobacterium infantis* trata-se de uma subespécie do *B. longum*, existente predominantemente no trato GI dos recém-nascidos.

Segundo Chichlowski *et al.* (2020), a colonização com esta espécie reduz a proliferação de patógenos, reduz a permeabilidade intestinal, produz substâncias com propriedades anti-inflamatórias, como o indole-3-ácido láctico produzido a partir do triptofano (Meng *et al.*, 2020) e ácidos gordos de cadeia curta.

Num estudo feito com crianças dos 3 aos 12 meses de idade a estirpe *B. infantis* R0033 numa dose de  $3,0 \times 10^9$  UFC apresenta atividade anti-inflamatória (des Andrés *et al.*, 2018) possivelmente devido à produção do indole-3-ácido láctico (Chichlowski *et al.*, 2020).

Em ratos, a estirpe *Bifidobacterium infantis* 35624 numa dose de  $10^{10}$  UFC melhora comportamentos depressivos e alterações imunológicas causadas pelo *stress*, apontando para o papel terapêutico que os suplementos podem desempenhar (Desbonnet *et al.*, 2010).

### **1.2.2.3 *Bifidobacterium breve***

Existem várias estirpes de *Bifidobacterium breve* com diferentes efeitos terapêuticos verificados em ratos, como por exemplo o *B. breve* 1205 que numa dosagem de  $1,0 \times 10^9$  UFC é uma estirpe capaz de reduzir a ansiedade (Savignac *et al.*, 2014) e a estirpe *B. breve* NCIMB 702258 que numa dosagem de  $1,0 \times 10^9$  UFC apresenta potenciais efeitos terapêuticos na inflamação e doenças neurodegenerativas devido à interação com os ácidos gordos polinsaturados (Wall *et al.*, 2010).

Num estudo mais recente, a toma oral de  $5,0 \times 10^9$  UFC de *Bifidobacterium breve* A1 apresenta potencial na prevenção de disfunções cognitivas, como é o caso da doença de Alzheimer, devido ao efeito supressor da inflamação causada pela  $\beta$ -amilóide em ratos jovens e com idade, observando-se melhorias de memória. Esta estirpe apresenta potencialidade terapêutica em pacientes com a Doença de Alzheimer e é candidata a tratamentos de longa duração devido à segurança e possibilidade de ingestão diária (Kobayashi *et al.*, 2017).

Em humanos, a suplementação com a estirpe A1 com  $2,0 \times 10^{10}$  UFC mostra-se eficaz e segura na melhoria da memória em pacientes com Déficit Cognitivo Ligeiro (Xiao *et al.*, 2020), e apresenta efeitos benéficos na função cognitiva de idosos com problemas de memória (Kobayashi *et al.*, 2019).

#### **1.2.2.4 *Lactobacillus helveticus***

Existem vários estudos que demonstram os benefícios dos *Lactobacillus helveticus* no foro psicológico.

Por exemplo, num estudo realizado em ratos com a associação da estirpe de *L. helveticus* R0052 e a estirpe de *Bifidobacterium longum* R0175 numa dosagem de  $10^9$  UFC, apresentou um efeito sinérgico na atenuação das hormonas do stress, permitindo uma redução das dores viscerais induzidas pelo stress crónico (Ait-Belgnaoui *et al.*, 2018).

Num outro estudo a mesma combinação de estirpes, mas numa dosagem de  $3,0 \times 10^9$  UFC apresenta propriedades ansiolíticas em ratos e, em humanos, efeitos benéficos do foro psicológico devido à diminuição do *distress* psicológico (Messaoudi *et al.*, 2011).

Uma outra estirpe administrada em ratos, o *Lactobacillus helveticus* NS8, verificou-se eficaz na modulação do eixo HPA, através da inibição da libertação de corticosterona, tratando-se de uma estirpe com efeitos ansiolíticos e antidepressivos devido ao efeito exercido no aumento dos valores de 5-HT, de norepinefrina, de citocinas anti-inflamatórias e do fator neurotrófico derivado do cérebro (Liang *et al.*, 2015).

### **1.2.2.5 *Lactobacillus plantarum***

A principal estirpe de *Lactobacillus plantarum* estudada pelos seus efeitos psicobióticos é a *L. plantarum* PS128, cuja administração crónica não apresenta efeitos adversos (Liu *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016a).

Num estudo feito em ratos, o consumo de *Lactobacillus plantarum* PS128 ( $5,0 \times 10^9$  UFC) apresenta-se seguro e sem efeitos secundários, tratando-se de uma estirpe com benefícios para comportamentos relacionados com a ansiedade devido ao aumento da dopamina e 5-HT (Liu *et al.*, 2016). A sua administração crónica apresenta efeito regulador no eixo HPA, reduzindo a libertação exacerbada de corticosterona e os comportamentos depressivos, e melhora o sistema imunitário (Liu *et al.*, 2016a).

Esta estirpe também reduz citocinas pró-inflamatórias (IL-6), que estão associadas a comportamentos depressivos, e aumenta as citocinas anti-inflamatórias (IL-10) (Liu *et al.*, 2016a). De acordo com o autor, existe a possibilidade da estirpe PS128 ter aplicações nos distúrbios psiquiátricos e de problemas neurológicos.

Tendo em conta os resultados verificados em Liu *et al.* (2016), Huang *et al.* (2019) que conduziu um estudo em atletas de alta competição, que devido ao elevado consumo de oxigénio encontram-se expostos a uma maior quantidade de espécies reativas de oxigénio (ROS), e a suplementação com *L. Plantarum* PS128 ( $5,0 \times 10^{10}$ ) melhorou a capacidade antioxidante do organismo, reduziu as citocinas inflamatórias e aumentou as que combatem a inflamação

Como exemplo temos um estudo em ratos que mostra que a suplementação com  $10^{10}$  UFC de PS128 inibe a progressão da Doença de Parkinson induzida, podendo também preveni-la devido ao efeito neuroprotetor dos neurónios dopaminérgicos e redutor da neuroinflamação, e stress oxidativo. Apresenta por esses motivos potencial de tratamento para patologias neurodegenerativas em pacientes (Liao *et al.*, 2019).

### **1.2.2.6 *Lactobacillus rhamnosus***

Num estudo de Bravo *et al.* (2011) cujo objetivo era verificar o efeito da suplementação com *Lactobacillus rhamnosus* na função cerebral, verificou-se que em animais saudáveis a estirpe de *Lactobacillus rhamnosus* JB-1 ( $10^9$  UFC) diminui a resposta do eixo HPA ao stress, altera a expressão de recetores específicos do GABA e, conseqüentemente, pode beneficiar

tratamentos de ansiedade e depressão. Estas observações potenciam o desenvolvimento de coadjuvantes baseados em microrganismos para o tratamento de desordens psiquiátricas relacionadas com o stress.

Num outro estudo foi administrada a mesma estirpe numa dosagem de  $1,7 \times 10^9$  UFC a ratos previamente expostos ao stress, constatando-se que a suplementação pode alterar comportamentos, prevenindo a progressão da ansiedade e atenua a progressão de distúrbios de humor como a depressão, devido ao efeito regulador dos parâmetros alterados pelo stress para níveis saudáveis (Kochalska *et al.*, 2020).

Existem também outras estirpes como por exemplo o *L. rhamnosus* R0011, que em associação com o *L. helveticus* R0052 numa dosagem de  $6,0 \times 10^9$  UFC, reduz a permeabilidade do cólon, previnem perdas de memória e diminuem os níveis de corticosterona (Gareau *et al.*, 2010) ou o *Lactobacillus rhamnosus* GG, que promove a manutenção das células epiteliais e normaliza a expressão das *tight junction proteins*, através da inibição da apoptose induzida por citocinas pró-inflamatórias (Allam-Ndoul *et al.*, 2020; Yan e Polk, 2002).

Num estudo realizado com mulheres grávidas a administração de  $6,0 \times 10^9$  UFC da estirpe de *L. rhamnosus* HNOO1 reduziu significativamente os níveis de ansiedade e depressão na fase de pós-parto (Slykerman *et al.*, 2017).

## 1.3 O Olival e a Vinha na Agricultura Portuguesa

### 1.3.1 O Olival

A Oliveira é uma árvore cultivada mundialmente em mais de 8 milhões de hectares, no entanto a maioria situa-se nos países do Mediterrâneo (Conde *et al.*, 2009). Tanto a oliveira como o azeite começaram a fazer parte do dia-a-dia dos povos dessa região a partir do século VI a.C. Para além de ser utilizado na alimentação, o azeite era também utilizado para a iluminação e como forma de tratamento para vários males do corpo (Reis, 2014).

Entre 1960 e 1989 Portugal entra num período de regressão a nível da produção e do consumo, havendo o incentivo ao consumo de outros óleos vegetais e margarinas. No entanto,

no início dos anos 90 o azeite é reconhecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) pelos benefícios para a saúde sendo a principal gordura da dieta mediterrânea (Reis, 2014).

Desde 1986 até aos dias de hoje, em Portugal ocorreu um aumento da superfície destinada ao cultivo do olival, perfazendo aproximadamente 360 mil hectares em 2019 (PORDATA, 2020). Paralelamente ao aumento da superfície utilizada, também a produção da azeitona se encontra em crescimento desde então, tendo atingindo as 960 mil toneladas em 2019, sendo que desse valor 916 504 toneladas destinam-se à produção de azeite (PORDATA, 2020).

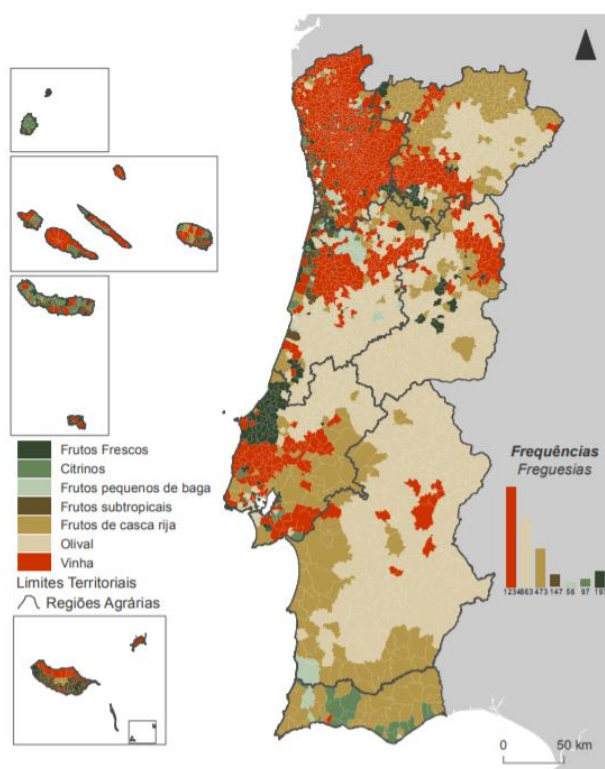


Figura 3. Ocupação predominante das culturas permanentes (2019). Fonte: INE, I. P.

Na figura 3 encontram-se distribuídas as principais culturas permanentes em território português, constatando-se o predomínio da cultura da vinha seguida pelo olival, maioritariamente no Alentejo. Estas culturas encontram-se presentes em mais de metade das explorações agrícolas nacionais, sendo a área ocupada por estas duas culturas 64,0% da superfície total das culturas permanentes (INE, 2019).

Segundo informações da DRAP (2002), a variedade de azeitona predominante no país é a Galega, no entanto devido ao baixo rendimento, têm sido feitas plantações com variedades mais produtivas como a Cobrançosa, Arbequina e Picual. Das várias cultivares, a variedade

Picual é das que apresenta um maior teor em polifenóis totais – acima dos 600 mg/kg – enquanto a Arbequina por exemplo, apresenta um valor em polifenóis inferior a 200 mg/kg (Casamenti e Stefani, 2016).

Os principais compostos fenólicos identificados nas folhas são a oleuropeína, o hidroxitirosol, a luteonina-7-glucosídeo, a apigenina-7-glucosídeo e o verbascosídeo (Benavente-García *et al.*, 2000). Apesar da elevada quantidade em compostos fenólicos antioxidantes com interesse, as folhas da oliveira são consideradas um resíduo indireto da indústria do azeite, correspondendo a cerca de 10% da matéria que chega ao lagar (Peralbo-Molina e Luque de Castro, 2013).

### 1.3.2 A Vinha

A vinha continua a ser a cultura mais disseminada em Portugal, mas contrariamente ao que se verifica no caso do olival, a superfície total destinada ao cultivo da vinha tem vindo a decrescer totalizando cerca de 179 mil hectares em 2019 (INE, 2019; PORDATA, 2020), exceto nas regiões Entre Douro e Minho e no Alentejo onde ocorreram aumentos de área (INE, 2019).

Cerca de 80% da uva que é produzida a nível mundial é utilizada para o fabrico de vinho, o que corresponde a 56 milhões de toneladas (Peralbo-Molina e Luque de Castro, 2013). Em Portugal no ano de 2019 da área total de vinha cerca de 176 805 hectares estavam destinados à produção de uva para vinho, cuja produção se traduz em aproximadamente 652 milhões de litros (PORDATA, 2020).

Dos vários resíduos da produção de vinho, as grainhas da uva são os mais estudados devido ao elevado poder antioxidante proveniente dos fenóis, nomeadamente das antocianinas (Peralbo-Molina e Luque de Castro, 2013).

Economicamente, em 2020 as produções de vinho e de azeite em Portugal apresentavam um valor de aproximadamente 853 milhões e de 86,9 milhões de euros, respetivamente (PORDATA, 2020).

### 1.3.3 Plantas Neuroprotetoras

A neuroproteção baseia-se em estratégias para proteger o SNC de danos e de desordens neurodegenerativas (Bhat *et al.*, 2017), havendo estudos que mostram o potencial que os extratos das plantas e os compostos bioativos apresentam contra alguns tipos de doenças neurodegenerativas (Rehman *et al.*, 2019).

A dieta Mediterrânea tem sido associada a uma menor incidência de doenças cardiovasculares e oncológicas, em particular devido à elevada quantidade de vitaminas, flavonoides e polifenóis (Benavente-García *et al.*, 2000).

O interesse nos polifenóis como fonte de tratamento das patologias associadas à idade tem vindo a aumentar (Casamenti e Stefani, 2016). A dieta mediterrânea possivelmente devido à presença destes compostos apresenta-se como preventiva na neurodegeneração (Féart *et al.*, 2013) baixando os marcadores de inflamação.

#### 1.3.3.1 *Olea europae* L.

Segundo Proença da Cunha *et al.* (2003) as folhas da oliveira apresentam 6% de constituintes iridóides, nomeadamente o oleoeuropeósido, derivados da colina, flavonóides, olivamarina, ácido oleanólico, saponósidos, ácidos fenólicos, sais minerais (cálcio), manitol, taninos e ceras.

Tradicionalmente as folhas das oliveiras eram utilizadas para reduzir a tensão arterial, prevenir a arteriosclerose e reumatismo (Proença da Cunha *et al.*, 2003).

Atualmente sabe-se que os efeitos benéficos na saúde cardiovascular se devem às propriedades vasodilatadoras, de anti-agregação plaquetária, anti-inflamatórias e antioxidantes da oleuropeína (Omar, 2010). No entanto também podem apresentar outras funções como a de neuroproteção (Bazoti *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2017).

Num estudo realizado em ratos verificou-se que os extratos de folhas de oliveira que contém a oleuropeína são eficazes na redução da deposição de placas de  $\beta$ -amiloide, tendo-se verificado uma redução da neurotoxicidade, das perdas de memória e uma neutralização da neuroinflamação, protegendo também contra a perda de neurónios dopaminérgicos do SNC de ratos. Podendo por isso ser um método preventivo para as doenças neurodegenerativas, como a DA e a DP (Grossi *et al.*, 2013; Luccarini *et al.*, 2014; Omar *et al.*, 2019; Sarbishengi *et al.*, 2013).

Segundo Omar *et al.* (2019), desempenha também um papel de neuroproteção contra a toxicidade induzida pelos tratamentos com L-Dopa.

O consumo diário permite reduzir danos do stress oxidativo e capturar radicais livres devido ao aumento da atividade de enzimas antioxidantes (Sarbishengi *et al.*, 2013).

De acordo com a EFSA (2011), os polifenóis presentes no extrato da *Olea europea* apresentam propriedades antioxidantes com potencial de aplicação na proteção do organismo garantindo uma ação contra a oxidação e ajudando na prevenção de danos oxidativos dos tecidos. Auxilia também a limpeza das células através da remoção dos radicais livres e, por último, conferem proteção contra a oxidação do colesterol LDL e dos lípidos. Esta substância deve ser administrada até 200 mg por dia.

### **1.3.3.2 *Vitis vinifera* L.**

A videira é uma planta rica em compostos fenólicos, pertencente à família das Vitáceas nativa da Europa Meridional e Ásia Ocidental, em que as suas folhas apresentam na sua constituição taninos, flavonoides, antocianidinas, resveratrol e viniferinas. Tradicionalmente era uma planta utilizada no tratamento de afeções venosas, problemas de microcirculação, edemas, hemorroidas e externamente em varizes (Proença da Cunha *et al.*, 2003).

Também os extratos da grainha da uva e as cascas apresentam na sua constituição vários compostos fenólicos nomeadamente a rutina, ácido gálico, catequinas, epicatequinas e estilbenos (Youssef *et al.*, 2019). Estas substâncias apresentam uma atividade antioxidante superior aos antioxidantes mais comuns (como a vitamina C e a vitamina E) protegendo contra espécies reativas de oxigénio (Ali *et al.*, 2010; Pazos-Tomas *et al.*, 2020).

Essa atividade antioxidante desempenha um papel bastante importante no sistema nervoso uma vez que, as protoantocianidinas presentes na grainha da uva tendem a reduzir a oxidação a nível neuronal e a melhorar os danos cognitivos (Sun *et al.*, 2019). Alguns estudos mostram que a utilização desses extratos pode ser um agente neuroprotetor natural e promissor na prevenção da DP e candidato a um novo tratamento para a DA (Sun *et al.*, 2019; Youssef *et al.*, 2019).

Os compostos fenólicos apresentam também uma atividade anti-inflamatória (Youssef *et al.*, 2019). De acordo com Fujishita *et al.* (2009) o extrato de grainha de uva previne a morte neuronal induzida pelo stress oxidativo, através da regulação da produção das citocinas pró-inflamatórias (IL-6). Segundo Loureiro *et al.* (2017) os extratos também apresentam uma atividade inibidora da formação de  $\beta$ -amiloide com uma eficácia superior comparativamente ao uso puro do resveratrol.

Para além dos efeitos no sistema nervoso, o extrato de grainha de uva apresenta outras vantagens designadamente na manutenção da elasticidade vascular e da normal pressão arterial (Odai *et al.*, 2019).

## 1.4 Aminoácidos, vitaminas e minerais

### 1.4.1 Magnésio

O magnésio é um dos elementos mais importantes do corpo humano responsável por inúmeras funções, entre elas o efeito modulador do SNC (Serefko *et al.*, 2016).

A concentração celular deste elemento é influenciada pelas hormonas libertadas durante o stress, como os corticosteroides e as catecolaminas, verificando-se uma redução da concentração intracelular do magnésio e um aumento da excreção pela urina. Consequentemente, a própria concentração reduzida de magnésio estimula a produção das hormonas supracitadas, levando a um agravamento da deficiência e uma redução da resistência ao stress (Seelig, 1994). Também a idade é um dos fatores relacionados com uma deficiência deste mineral (Institute of Medicine, 1997).

Associada à deficiência deste composto podem ocorrer sintomas cardíacos e neurológicos (EFSA, 2015) verificando-se uma maior incidência de acidentes vasculares cerebrais, hipertensão, enxaquecas, Doença de Alzheimer (Reddy e Edwards, 2017), bem como comportamentos depressivos e ansiedade (Singewald *et al.*, 2004), entre outros.

Através da suplementação é possível atenuar a ansiedade devido ao efeito modulador no eixo HPA (Boyle *et al.*, 2017) e pode ter efeitos preventivos na DA (Chui *et al.*, 2011). Segundo Cardoso *et al.* (2009) para além do efeito antidepressivo, a toma de magnésio também apresenta um efeito sinérgico com a administração de fármacos antidepressivos.

Como o magnésio é pouco absorvido a biodisponibilidade é um parâmetro importante num suplemento, podendo ser melhorada com a toma de vitamina B6 (Reddy e Edwards, 2017).

De acordo com o DL n.º 167/2004 a Dose Diária Recomendada (DDR) de magnésio é de 375 mg, sendo o limite máximo da ingestão diária recomendada através da suplementação para ambos os sexos de 250 mg (EFSA, 2006). Esta aparente discrepância de valores pode ser explicada devido à biodisponibilidade do magnésio.

### 1.4.2 Triptofano

O L-Triptofano (L-Trp) é um aminoácido essencial precursor da de vários compostos como a serotonina, a vitamina B6, melatonina, 3-hidroxiquinurenina, triptamina, quinurenina, entre outros (Friedman, 2018). É utilizado em suplementos alimentares com efeitos na melhoria dos sintomas depressivos (Kikuchi *et al.*, 2020; Murphy *et al.*, 2006), desempenhando também um papel protetor no intestino por melhorar a expressão das proteínas de junções apertadas e consequentemente reduzir a permeabilidade intestinal (Liu *et al.*, 2017).

O stress psicológico leva a uma depleção deste aminoácido e alterações no humor. Quando se trata de um stress psicológico crónico ou físico, aumentam as citocinas pró-inflamatórias que vão estimular as enzimas que participam no catabolismo do triptofano, reduzindo a sua disponibilidade para se converter em serotonina (Myint e Kim, 2003).

A serotonina é um elemento-chave no eixo intestino-cérebro porque atua como neurotransmissor no SNC e na parede no intestino (Jenkins *et al.*, 2016) e desempenha um papel no processamento das emoções e informações, na memória, atenção (Riedel *et al.*, 2003), ansiedade, agressão, sono, apetite e função sexual (Bell *et al.*, 2001).

Associado ao défice deste aminoácido pode também surgir um agravamento das funções cognitivas na Doença de Alzheimer (Bell *et al.*, 2001).

De acordo com o Parecer conjunto do Infarmed e DGAV publicado em 2017, os suplementos alimentares não podem ter doses unitárias superiores a 25 mg de 5-hidroxitriptofano e a toma diária não pode exceder os 50 mg.

No entanto, segundo a EFSA (2011a) sob a forma de aminoácido, o L-Trp numa dosagem até 3g diárias é aconselhado para a saúde mental no sentido em que é o precursor natural da serotonina, ajuda a manter uma boa disposição e função cognitiva, contribui para o relaxamento mental e físico, e por último contribui para um sono saudável.

### 1.4.3 Vitaminas do Complexo B

#### 1.4.3.1 Vitamina B3

A niacina ou vitamina B3 é a denominação geral que se dá ao ácido nicotínico, nicotinamida e nicotinamida ribosoide, precursores das coenzimas NAD e NADP das reações redox (LPI, 2021).

A ingestão desta vitamina contribui para o normal metabolismo produtor de energia, para o normal funcionamento do sistema nervoso, para uma normal função psicológica e ainda contribui para reduzir o cansaço e da fadiga (Regulamento (UE) n.º 432/2012).

A nicotinamida reduz a degradação do triptofano em tecidos periféricos, mostrando efeitos antidepressivos juntamente com esse aminoácido (Tsuji *et al.*, 2019). Um défice destes compostos reflete-se em vários sintomas no SNC como a demência, depressão e outros sintomas de doenças neurodegenerativas (Gasperi *et al.*, 2019).

Para melhor perceber o efeito desta vitamina foram realizados estudos *in vitro* cujos resultados mostram que a suplementação desta vitamina afeta a neurogénese e promove a diferenciação de células em neurónios produtores de GABA (Griffin *et al.*, 2017), num outro estudo a vitamina B3 aparenta ter um papel protetor na DA e no declínio cognitivo associado à idade (Morris *et al.*, 2004), apresenta um efeito na prevenção e alívio de alguns sintomas da DP (Gasperi *et al.*, 2019) e uma vez que níveis adequados desta vitamina são importantes para a formação de NADPH, também tem um papel na redução do stress oxidativo e da neuroinflamação (Zhou *et al.*, 2018).

A forma desta vitamina mais utilizada na suplementação é sob a forma de nicotinamida e o limite máximo da ingestão diária com idade superior a 18 anos é de 900 mg, excluindo grávidas e lactantes (EFSA, 2006).

### 1.4.3.2 Vitamina B6

A vitamina B6, ou piridoxina, desempenha um papel de coenzima em várias reações metabólicas no organismo (Institute of Medicine, 1998), após a sua conversão em piridoxal-5-fosfato. O piridoxal desempenha um papel importante na síntese de neurotransmissores como a noradrenalina, dopamina, serotonina, glicina, D-serina, glutamato, GABA e histamina, bem como participa na síntese de esfingosina das bainhas de mielina (Marjan Farma, 2019).

Ao contribuir também para o normal funcionamento do sistema nervoso, para o normal metabolismo da homocisteína, para a normal função psicológica, para a redução do cansaço e da fadiga (Regulamento (UE) n.º 432/2012), desempenha um papel protetor juntamente com as outras vitaminas do complexo B na DP, em que os tratamentos com dosagens mais elevadas de L-Dopa diminuem os níveis de B6, B12 e aumentam a homocisteína (Romagnolo *et al.*, 2018).

Segundo Pouteau *et al.* (2018), em condições de stress extremo a vitamina B6 associada ao magnésio permite reduzir o stress com maior eficácia comparativamente ao uso isolado do magnésio. Esta associação numa proporção de 10:1 mostra-se benéfica em adultos com stress severo. O limite máximo diário para adultos é de 25 mg (EFSA, 2006).

### 1.4.3.3 Vitamina B9

A vitamina B9 ou ácido fólico trata-se de um micronutriente essencial que contribui para a normal função psicológica, para o normal funcionamento do sistema imunitário e para a redução do cansaço e da fadiga (Regulamento (UE) n.º 432/2012).

Um défice em ácido fólico pode originar anemia megaloblástica ou potenciar defeitos ao nível do tundo neuronal (EFSA, 2006). Além disso, esta vitamina participa na regulação da síntese da serotonina, da dopamina e da noradrenalina. Assim quando se verifica um défice em L-metilfolato podem surgir défices em monoaminas (Martone, 2018).

Consequentemente e, associado ao défice em folatos, ocorre uma diminuição da absorção de vitamina B12 o que pode levar a um estado inflamatório e um aumento do risco da DA (Chen *et al.*, 2016). Associado a estas vitaminas baixas o valor da homocisteína encontra-se

elevado exercendo toxicidade nos neurónios, contribuindo para a DA e para a DP para além do impacto nas doenças cardiovasculares (Xie *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2001).

Através da suplementação em ácido fólico ocorre uma melhoria dos marcadores inflamatórios e da função cognitiva (Chen *et al.*, 2016), desempenhando um papel protetor na prevenção de disfunções cognitivas associadas à idade (Scaglione e Panzavolta, 2014). Num estudo realizado em idosos com depressão, a suplementação com a vitamina B9 mostrou-se eficaz na melhoria dos sintomas depressivos (Guaraldi *et al.*, 1993).

É de notar que o ácido fólico só apresenta atividade biológica após ser convertido em folatos (Institute of Medicine, 1998), sendo o 5-metiltetrahidrofolato, ou L-metilfolato, a forma biológica ativa predominante no plasma sanguíneo.

O limite máximo da ingestão diária recomendada de ácido fólico para indivíduos com a idade superior a 18 anos é de 1 mg (EFSA, 2006).

#### **1.4.3.4 Vitamina B12**

Cobalamina é a designação dada à vitamina B12 cuja importância no organismo prende-se com a sua contribuição para o normal funcionamento do sistema nervoso, para o normal metabolismo da homocisteína, para uma normal função psicológica, para a formação de glóbulos vermelhos, sistema imunitário, redução da fadiga (Regulamento (UE) n.º 432/2012) e apresenta um papel antioxidante e de neuroproteção (Rehman *et al.*, 2019).

Nesse sentido a deficiência em cobalamina, para além dos efeitos negativos a nível hematológico e cardíaco, também está associada a problemas do foro psicológico como perdas de memória, irritabilidade, demência, depressão, parestesias e desmielinização do trato corticoespinal (Oh e Brown, 2003). Segundo Fuso *et al.* (2005), um défice em B12 e em folato leva ao aumento da produção de beta-amilóide.

Por isso a suplementação desta vitamina, juntamente com o folato, apresenta vários benefícios tais como, permite diminuir os níveis de homocisteína nos doentes de Parkinson (Xie *et al.*, 2017) e pode melhorar o efeito dos antidepressivos e retardar os sintomas da depressão (Sangle *et al.*, 2020).

Esta vitamina não apresenta limite máximo devido à ausência de efeitos secundários, no entanto os suplementos disponíveis no mercado apresentam dosagens que variam entre 1 µg a 5 µg, podendo chegar a doses mais elevadas como 50 µg (EFSA, 2006).

## 1.5 Objetivos do trabalho

O trabalho desenvolvido visa produzir um suplemento alimentar destinado ao bem-estar mental de uma população demograficamente envelhecida e sob o *stress* da sociedade atual.

Por um lado, pretende integrar uma categoria de SA com um potencial de crescimento superior às restantes categorias, os probióticos.

Por outro lado, tem como objetivo valorizar do ponto de vista nutricional as duas culturas agrícolas permanentes mais disseminadas pelo continente e características da zona Mediterrânea– a vinha e a oliveira. Os extratos utilizados segundo a literatura são subprodutos das indústrias do vinho e do azeite, ou seja, ainda existe o potencial de acrescentar valor a estas indústrias.

Relativamente à formulação, esta foi projetada para atingir o trato GI e a função cognitiva, tendo como objetivo o equilíbrio a flora intestinal de modo a evitar a ocorrência de disbioses e os cenários associados, nomeadamente o aumento da permeabilidade intestinal, a secreção de LPS e consequente criação de um ambiente inflamatório e oxidativo.

Concomitantemente, os polifenóis presentes nos extratos de grainha de uva e de folha de oliveira vão atuar também na prevenção desse ambiente oxidativo, que é potencialmente nefasto para o desenvolvimento de patologias depressivas e degenerativas

A incorporação dos restantes ingredientes pertencentes às categorias de aminoácidos, vitaminas e minerais tem como objetivo acrescentar valor nutricional e obter-se um efeito sinérgico na gestão do *stress* e ansiedade.

## METODOLOGIA

### 2.1 Pesquisa bibliográfica

Para desenvolver este suplemento alimentar a maioria da pesquisa bibliográfica foi feita online através de várias fontes como por exemplo o PubMed, em que foram utilizadas palavras-chave como “ansiedade”, “Alzheimer”, “depressão”, “microbiota”, “probióticos”, “inflamação”, “saúde mental”, “suplementação”. No entanto também houve recurso a outras ferramentas como o PORDATA e o INE para recolha de dados estatísticos, e a EFSA juntamente com o INFARMED para recolher dados sobre os compostos utilizados.

Foram também consultados os seguintes Regulamentos e Decretos de Lei:

- Decreto-Lei (DL) n.o 118/2015 de 23 de junho.
- Decreto-Lei (DL) n.o 54/2010 de 28 de maio.
- Regulamento (CE) n.o 1170/2009 da Comissão de 30 de novembro de 2009 que altera a Diretiva 2002/46/CE do Parlamento Europeu e do Conselho e o Regulamento (CE) n.o 1925/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho no que se refere às listas de vitaminas, minerais e respetivas formas e que podem ser adicionados aos alimentos, incluindo suplementos alimentares.
- Regulamento (UE) n.o 432/2012 da Comissão, de 16 de maio de 2012 que estabelece uma lista de alegações de saúde permitidas relativamente a alimentos que não referem a redução de um risco de doença ou o desenvolvimento e a saúde das crianças.

## 2.2 Formulação

O suplemento alimentar formulado tem como objetivo o fortalecimento da saúde mental e bem-estar emocional em adultos com idade superior a 18 anos graças à incorporação de vitaminas do complexo B, de triptofano, de magnésio, de antioxidantes presentes nos extratos de folha de oliveira e de grainha de uva e graças ao uso de probióticos, cujo objetivo é equilibrar a flora intestinal de modo a reduzir a inflamação e regular a produção dos neurotransmissores. A lista dos ingredientes a serem utilizados encontram-se na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1. Lista dos ingredientes do suplemento alimentar.

<b>Ingredientes</b>	<b>Descrição</b>
Magnésio	Mineral sob a forma de Bisglicinato de Magnésio
Extrato seco de folha de oliveira	Extrato de folha de oliveira, padronizado a 40% de oleuropeína
Extrato seco de grainha de uva	Extrato de grainha de uva, padronizado a 95 % protoantocianidinas
L-Triptofano	Aminoácido sob a forma de L-Triptofano
Vitamina B6	Vitamina sob a forma de Cloridrato de Piridoxina
Vitamina B3	Vitamina sob a forma de nicotinamida
Vitamina B12	Vitamina sob a forma de Cianocobalamina
Vitamina B9	Vitamina sob a forma de L-metilfolato de cálcio
<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>B. longum</i> R0175
<i>Bifidobacterium infantis</i>	<i>B. infantis</i> R0033
<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>B. breve</i> A1
<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>L. helveticus</i> R0052
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>L. plantarum</i> PS128
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i> HN001

Este suplemento foi formulado de modo a ser administrado em duas cápsulas de tamanho 00. Os ingredientes encontram-se distribuídos por duas cápsulas de toma diária – Cápsula A e Cápsula B – conforme consta na tabela 2. As cápsulas terão um invólucro com um pigmento distinto de modo a facilitar a toma, por exemplo através da toma de uma cápsula branca durante o dia e uma cápsula azul e branca à noite, evitando equívocos relativamente à de toma do suplemento em questão.

Tabela 2. Distribuição dos ingredientes pela cápsula A e pela cápsula B.

	<b>Ingredientes</b>	<b>Descrição</b>
C á p s u l i a  A	Magnésio	Mineral sob a forma de Bisglicinato de Magnésio
	Extrato seco de folha de oliveira	Extrato de folha de oliveira, padronizado a 40% de oleuropeína
	Extrato seco de grainha de uva	Extrato de grainha de uva, padronizado a 95 % protoantocianidinas
	L-Triptofano	Aminoácido sob a forma de L-Triptofano
	Vitamina B6	Vitamina sob a forma de Cloridrato de Piridoxina
	Vitamina B3	Vitamina sob a forma de nicotinamida
	Vitamina B12	Vitamina sob a forma de Cianocobalamina
	Vitamina B9	Vitamina sob a forma de L-metilfolato de cálcio
C á p s u l i a  B	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>B. longum</i> R0175
	<i>Bifidobacterium infantis</i>	<i>B. infantis</i> R0033
	<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>B. breve</i> A1
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>L. helveticus</i> R0052
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>L. plantarum</i> PS128
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i> HN001

## 2.3 Processo de Fabrico

O fabrico deste suplemento foi realizado na empresa Laboratórios Nova Flora- Indústria de Nutracêuticos, S.A. localizada em Rio de Mouro, no distrito de Lisboa. Trata-se de uma empresa dedicada à produção de suplementos alimentares sob diversas formas, como cápsulas, ampolas, xaropes e outros produtos. A empresa em questão ficou encarregada de obter as matérias-primas necessárias e de proceder à formulação estabelecida neste trabalho. A produção do suplemento alimentar segue o fluxograma de fabrico estipulado pela empresa e descrito na figura 4.

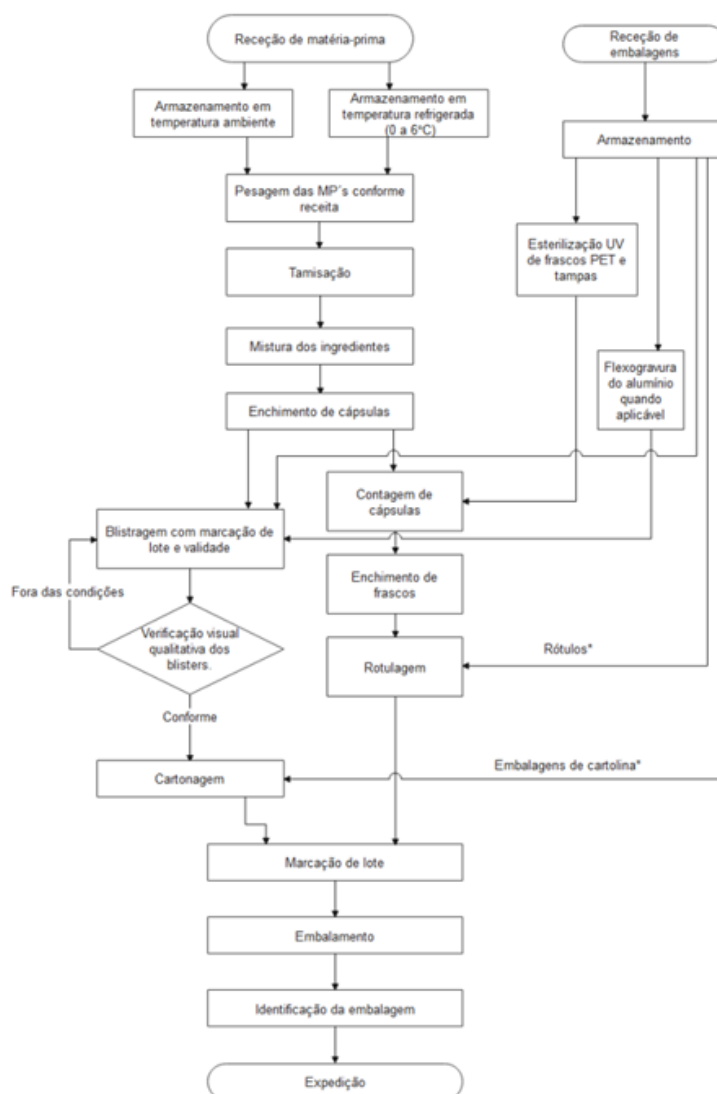


Figura 4. Fluxograma de produção de cápsulas de gelatinas duras

## 2.4 Controlo de Qualidade

Segundo Vaclavik *et al.* (2014), com o aumento e a globalização dos mercados dos SA a qualidade dos ingredientes, as doses recomendadas, a rotulagem e o fabrico desses produtos são alvo de maior controlo.

De acordo com o relatório de 2019 do Sistema de Alerta Rápido para os Géneros Alimentícios e para Animais (RASFF), que tem como objetivo notificar os riscos para a saúde humana provenientes dos géneros alimentícios, a categoria dos SA encontrava-se em terceiro lugar com 345 notificações, o correspondente a 8,4% da totalidade das notificações.

Por isso, de modo a salvaguardar a saúde e o bem-estar da população é imprescindível realizar controlos de qualidade das matérias-primas e garantir que estão nos conformes da legislação.

### 2.4.1 Análises de Elementos Minerais

Para definir os teores máximos legais de contaminantes em suplementos alimentares tal como são vendidos foram consultados os seguintes regulamentos que vêm alterar o Regulamento (CE) n.º 1881/2006 da Comissão de 19 de dezembro de 2006, que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios, nomeadamente em relação ao chumbo, cádmio e mercúrio, respetivamente:

- Regulamento (UE) n.º 2015/1005 da Comissão, de 25 de junho de 2015, que altera o Regulamento (CE) n.º 1881/2006 no que diz respeito aos teores máximos de chumbo em certos géneros alimentícios

- Regulamento (UE) n.º 488/2014 da Comissão, de 12 de maio de 2014, que altera o Regulamento (CE) n.º 1881/2006 no que diz respeito aos teores máximos de cádmio nos géneros alimentícios.

- Regulamento (CE) n.º 629/2008 da Comissão, de 2 de julho de 2008, que altera o Regulamento (CE) n.º 1881/2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios.

Tabela 3. Teores máximos de certos contaminantes em suplementos alimentares<sup>1</sup>.

Elemento Mineral	Teor máximo legal
Chumbo	3,0 mg/kg
Cádmio	1,0 mg/kg
Mercúrio	0,10 µg/kg

As análises aos elementos foram feitas com recurso ao equipamento presente no laboratório do Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

#### 2.4.1.1 Análise elementar por Fluorescência de Raio-X

Os conteúdos elementares da folha de oliveira e da grainha de uva (em pó) bem como das cápsulas A e B foram determinados através de fluorescência de raios-X por energia dispersiva (EDXRF), com recurso ao Modelo M4 Tornado da Bruker.

Este aparelho encontra-se equipado com um alvo de ródio como ânodo do tubo de raios-X. A sua ótica policapilar de raios-X foca a radiação do tubo em áreas muito pequenas, gerando pontos focais de radiação de elevada intensidade numa superfície de cerca de 25 µm de diâmetro. As elevadas intensidades da radiação combinada com uma excelente resolução espacial conferem a este aparelho a capacidade de executar medições rápidas e com grande detalhe.

Para análise do conteúdo mineral, as amostras foram previamente reduzidas a pó e pressionadas por uma força equivalente a 10 toneladas e transformados em pastilhas de 2 cm de diâmetro e 1 mm de espessura, conforme a figura 5, com um peso de aproximadamente 0,3 mg, foi colocada num filme de Mylar e inserida no respetivo slide.

---

<sup>1</sup> Os teores máximos que constam na tabela foram consultados nos regulamentos referidos anteriormente.



Figura 5. Pastilha para análise

Seguidamente procedeu-se à colocação do slide diretamente em frente do feixe de raios-X para determinação elementar. A quantificação dos vários elementos foi realizada com o método dos parâmetros fundamentais. Esse método foi validado através da comparação das concentrações obtidas com concentrações conhecidas presentes em materiais de referência padrão, como por exemplo as folhas de pomar (NBS 1571) e as folhas de Choupo (GBW 07604). Estes materiais contêm matrizes orgânicas leves com várias concentrações dos elementos de interesse, o que permite a avaliação deste método para diferentes regimes de concentração.

Em XRF o limite de deteção, que corresponde à quantidade de massa ou concentração mínima que é possível detetar/quantificar numa amostra, sendo diferente para cada elemento listado abaixo, como referido por Santos *et al.* (2014):

- Potássio: 60 mg/kg.
- Cálcio: 35 mg/kg.
- Arsénio: 3 mg/kg.
- Cobre: 3 mg/kg.
- Ferro: 6 mg/kg.
- Manganês: 9 mg/kg.
- Chumbo: 8 mg/kg.
- Zinco: 3 mg/kg.

Os restantes elementos passíveis de serem detetados apresentam limites de deteção próximos de 3 mg/kg.

Para verificar se os teores dos elementos minerais eram estaticamente diferentes entre si procedeu-se à análise dos dados obtidos recorrendo-se à análise de variância (ANOVA) de fator único ( $p \leq 0,05$ ).

## 2.5 Notificação do produto

Findada a etapa da formulação e das análises realizou-se a notificação à Autoridade competente (DGAV) cujo objetivo é homologação, para posterior colocação deste suplemento alimentar no mercado português a partir de fevereiro de 2022. A notificação realizada encontrando-se em anexo no Apêndice, cumprindo assim o que está disposto no artigo 9º do Decreto de Lei n.º 118/2015 de 23 de junho, relativo à Comercialização e notificação.

Após a aprovação por parte da DGAV a comercialização será feita por uma empresa de distribuição de Suplementos alimentares e medicamentos para uso humano, sendo a empresa Laboratórios Nova Flora a responsável pelo contacto da mesma.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Formulação

- Probióticos

Relativamente aos probióticos, a quantidade a administrar varia consoante a estirpe sendo que normalmente a dose varia até 10 biliões de UFC por dose. No entanto, a dose deve ser baseada em estudos com seres humanos que mostram benefícios (Guarner *et al.*, 2017).

De acordo com os vários estudos consultados, nomeadamente em Messaoudi *et al.* (2011a), des Andrés *et al.* (2018), Xiao *et al.* (2020), Messaoudi *et al.* (2011), Huang *et al.* (2019) e em Slykerman *et al.* (2017), as dosagens de probióticos administradas com efeitos benéficos para a saúde encontram-se sistematizadas na tabela 3.

Tabela 4. Dosagens de probióticos (UFC) de acordo com a bibliografia.

Ingredientes	Descrição	Quantidades
<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>B. longum</i> R0175	1,5×10 <sup>9</sup> UFC
<i>Bifidobacterium infantis</i>	<i>B. infantis</i> R0033	3,0×10 <sup>9</sup> UFC
<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>B. breve</i> A1	2,0×10 <sup>10</sup> UFC
<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>L. helveticus</i> R0052	1,5×10 <sup>9</sup> UFC
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>L. plantarum</i> PS128	5,0×10 <sup>10</sup> UFC
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i> HN001	6,0×10 <sup>9</sup> UFC

Para adaptar as dosagens da tabela 3 a uma cápsula tamanho 00, com uma capacidade aproximada de 500 mg, foram efetuados cálculos recorrendo ao esquema abaixo referido. Tomando como exemplo o caso prático do *Bifidobacterium longum* temos:

$$\frac{1 \text{ UFC}}{1,5 * 10^9 \text{ UFC}} = \frac{75 \text{ mg}}{1000 \text{ mg}}$$

Assim sendo, na tabela 4 temos as dosagens de probióticos a ser utilizadas de acordo com o ajuste efetuado ao tamanho da cápsula.

Tabela 5. Dosagem de cada estirpe ajustada a uma cápsula do suplemento alimentar.

Ingredientes	Descrição	Quantidades
<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>B. longum</i> R0175	2,0x10 <sup>10</sup> UFC
<i>Bifidobacterium infantis</i>	<i>B. infantis</i> R0033	4,0x10 <sup>10</sup> UFC
<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>B. breve</i> A1	2,7x10 <sup>11</sup> UFC
<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>L. helveticus</i> R0052	2,0x10 <sup>10</sup> UFC
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>L. plantarum</i> PS128	6,7x10 <sup>11</sup> UFC
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i> HN001	8,0x10 <sup>10</sup> UFC

No entanto, para além da estirpe, a eficácia de um probiótico depende dos níveis de vitamina D do paciente, uma vez que baixos níveis de vitamina D impedem a tradução dos efeitos do probiótico no sistema imunitário (Romijn *et al.*, 2017).

Também é importante referir que aliado a este suplemento deveria ser proposta a toma de algum prebiótico, isto porque de acordo com a Organização Mundial de Gastroenterologia (2017), os prebióticos afetam a quantidade e a qualidade da microbiota, favorecendo em número as bactérias benéficas e reduzindo os patogênicos.

- Magnésio

Em relação ao elemento mineral, a suplementação com magnésio difere em termos do tipo de magnésio e da biodisponibilidade associada (Tabela 5), sendo o óxido de magnésio a forma de suplementação mais utilizada, no entanto é mais suscetível de causar diarreias (Reddy e Edwards, 2017).

Tabela 6. Biodisponibilidade associada a determinadas formas de magnésio<sup>2</sup>.

Sal de magnésio	Biodisponibilidade
Citrato	29,67 %
Óxido	22,8 %
Cloridrato	19,68 %
Gluconato	19,25 %
Glicinato	23,5 %

O magnésio a ser incorporado sob a forma de bisglicinato de magnésio apresenta vantagens uma vez que a glicina, para além de fazer parte da constituição de diversas proteínas enquanto aminoácido não essencial, é um neurotransmissor inibidor do SNC. Desempenha também um papel anti-inflamatório e antioxidante devido ao efeito inibidor na ativação de processos inflamatórios e previne a formação de espécies reativas de oxigénio (Zhong *et al.*, 2003).

- Vitaminas B

No que concerne às vitaminas do complexo B, as dosagens em B9 e B12 foram baseadas no artigo de Coppen e Bolander-Gouaille (2005) que sugerem 800 µg e 1 mg diários, respetivamente, no combate à depressão. Relativamente à niacina, num estudo conduzido durante 6 anos por Morris *et al.* (2004) concluiu-se que a toma de vitamina B3 apresenta um efeito protetor na incidência de Doença de Alzheimer. Verificou-se que com o aumento da dosagem de vitamina, o risco de desenvolver a patologia diminuiu, em que a toma de 12,6 mg

<sup>2</sup> Tabela baseada em Gene, B. (2013). *Magnesium: A mineral with multiple Applications*. Supplement Science.

por dia reduz em 70% o risco da DA e numa dosagem de 22,4 mg diário a redução do risco aumenta para o 80%.

A escolha das formas vitamínicas utilizadas para o efeito teve em consideração o Regulamento (CE) nº 1170/2009 da Comissão de 30 de novembro de 2009.

Começando pela B12, a forma da vitamina utilizada foi a cianocobalamina. A escolha foi baseada num estudo que comparava a cianocobalamina com a hidroxocobalamina, sendo a primeira forma a mais eficaz a elevar os valores de B12 no plasma (Greibe *et al.*, 2019).

A forma de B9 utilizada (L-metilfolato) já se encontra biologicamente ativa. Esta forma química apresenta vantagens comparativamente ao uso de ácido fólico sintético porque é bem absorvida mesmo quando há desequilíbrios de pH no trato GI ou quando existem problemas metabólicos (Scaglione e Panzavolta, 2014).

A vitamina B3 utilizada sob a forma de nicotinamida é a forma mais utilizada na suplementação (EFSA, 2016) e a vitamina B6 sob a forma de cloridrato de piridoxina é também a forma mais usual.

- Triptofano

De acordo com Kikuchi (2020) a toma de 1 a 3 g de L-Trp por dia após as refeições apresenta benefícios. A conversão de triptofano em serotonina é mais eficiente quando este é tomado fora das refeições, para que não haja competição na absorção com outros aminoácidos (Tsujita *et al.*, 2019).

Tendo em conta que não existem limites definidos para a suplementação de triptofano sob a forma do aminoácido L-Trp foi feita uma pesquisa dos suplementos que se encontram no mercado e que contém este aminoácido na sua composição (Figuras 6 e 7).



- Por cápsula:
- L-triptofano - 220 mg;
  - Extrato de Rodiola - 33 mg;
  - Inositol - 50 mg;
  - Magnésio - 57 mg (15% VRN);
  - Zinco - 2 mg (20% VRN);
  - Crômio - 20 µg (50% VRN);
  - Vitamina C - 27 mg (33% VRN);
  - Vitamina B1 - 0,37 mg (33% VRN);
  - Vitamina B2 - 0,47 mg (33% VRN);
  - Niacina (Vit. B3) - 5,3 mg (33% VRN);
  - Vitamina B5 - 2 mg (33% VRN);
  - Vitamina B6 - 0,47 mg (33% VRN);
  - Vitamina B8 - 16 µg (33% VRN);
  - Ácido fólico (Vit. B9) - 67 µg (33% VRN)

Figura 6. Vectiseren e respetiva composição. Fonte: Nutribio, Consultado a 10/06/2021.



- Composição:**  
 Por 2 cápsulas:
- L-triptofano - 500mg;
  - SAM-E (S-adenosilmetionina) - 300mg;
  - L-glutamina - 200mg;
  - Vitamina C (ác. L-ascórbico) - 200mg (250% VRN\*);
  - Ácido L-aspártico - 100mg;
  - Juba de leão exto. seco (Heridium erinaceus, 20% polissacarídeos) - 100mg;
  - Vitamina B6 (cloridrato de piridoxina) - 22,8mg (1629% VRN\*);
  - Vitamina B9 (ácido pteroilmonoglutâmico) - 1000µg (500% VRN\*);
  - Vitamina B12 (cianocobalamina) - 10µg (400% DDR\*);

\* Valor de Referência do Nutriente

Figura 7. Neurotrans B e respetiva composição. Fonte: Loja Girassol. Consultado a 10/06/2021.

Constata-se que a quantidade de L-Trp utilizado por cápsula é de 220 mg e 250 mg, respetivamente.

No entanto, considerando o Parecer conjunto do Infarmed e DGAV que limita o uso de 5-HTP (substância sintetizada a partir do aminoácido triptofano) a 50 mg diários em suplementos alimentares, e de modo a salvaguardar a viabilidade deste projeto, apenas será administrada essa dosagem de L-Trp.

- Extratos de Plantas

O objetivo principal dos extratos de plantas utilizados é a atividade antioxidante, no entanto ambos apresentam benefícios ao nível do sistema cardiovascular. Em relação ao

extrato da folha de oliveira, estudos mostram que dosagens em oleuropeína de 136 mg e superiores apresentam efeitos hipotensores (Lockyer *et al.*, 2017). Como este suplemento não tem como público-alvo indivíduos hipertensos, foi escolhida uma dosagem de extrato de folha de oliveira que fornecesse menos de 51mg de oleuropeína. uma vez que segundo de Bock *et al.* (2013), a suplementação com 51mg de oleuropeína não afeta os valores da pressão arterial.

Tabela 7. Formulação da cápsula A e da cápsula B com as respectivas quantidades.

	Ingredientes	Descrição	Quantidades	% VRN*
C á p s u l i a  A	Magnésio	Mineral sob a forma de Bisglicinato de Magnésio	300 mg (60 mg Mg)	16
	Extrato seco de folha de oliveira	Extrato de folha de oliveira, padronizado a 40% de oleuropeína	50 mg	**
	Extrato seco de grainha de uva	Extrato de grainha de uva, padronizado a 95 % protoantocianidinas	50 mg	**
	L-Triptofano	Aminoácido sob a forma de L-Triptofano	50 mg	**
	Vitamina B6	Vitamina sob a forma de Cloridrato de Piridoxina	25 mg	1786
	Vitamina B3	Vitamina sob a forma de nicotinamida	22 mg	138
	Vitamina B12	Vitamina sob a forma de Cianocobalamina	1000 µg	40000
	Vitamina B9	Vitamina sob a forma de L-metilfolato de cálcio	800 µg	400
C á p s u l i a  B	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>B. longum</i> R0175	2,0x10 <sup>10</sup> UFC	**
	<i>Bifidobacterium infantis</i>	<i>B. infantis</i> R0033	4,0x10 <sup>10</sup> UFC	**
	<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>B. breve</i> A1	2,7x10 <sup>11</sup> UFC	**
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>L. helveticus</i> R0052	2,0x10 <sup>10</sup> UFC	**
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>L. plantarum</i> PS128	6,7x10 <sup>11</sup> UFC	**
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i> HN001	8,0x10 <sup>10</sup> UFC	**

\* VRN= Valores de Referência do Nutriente. Regulamento (UE) nº 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de outubro de 2011.

\*\*VRN não estabelecido.

## 3.2 Análise elementar

Os resultados obtidos nas análises sobre a composição elementar encontram-se na Tabela 8.

Devido a problemas no desalfandegamento do extrato de folha de oliveira com origem internacional foi utilizado um extrato semelhante com origem nacional, para que se possa avaliar a composição elementar sendo certo que não podemos inferir que os resultados sejam idênticos porque como se sabe as condições edafoclimáticas podem alterar em maior ou menor grau a composição das folhas. Contudo, para efeitos de comercialização o extrato a utilizar não será o que foi analisado, mas o inicialmente previsto.

Tabela 8. Teores médios dos elementos minerais presentes nas principais componentes da formulação do suplemento.

<b>Amostras</b> <b>Elementos</b>	<b>Cápsula A</b>	<b>Cápsula B</b>	<b>Grainha de uva</b>	<b>Folha de Oliveira</b>
<b>Bromo</b>	40,1 ± 1,7 a	**	**	22,4 ± 0,3 b
<b>Cálcio</b>	778 ± 125 b	272 ± 11,9 c	665 ± 24,7 b	13924 ± 1988 a
<b>Cloro</b>	3273 ± 733 a	**	715 ± 140 b	3107 ± 214 a
<b>Cobre</b>	7,1 ± 2,2 b	3,0 ± 0,3 c	6,7 ± 0,2 b	39,6 ± 6 a
<b>Estrôncio</b>	6,3 ± 1,5 b	**	**	31,3 ± 2,8 a
<b>Ferro</b>	99,0 ± 74,0 b	6,9 ± 0,9 d	23,3 ± 1,6 c	2105,1 ± 299,0 a
<b>Fósforo</b>	**	**	2879 ± 868 a	**
<b>Manganês</b>	7,8 ± 2,3 b	57,0 ± 4,2 a	4,4 ± 1,2 b	52,1 ± 5,5 a
<b>Potássio</b>	2146 ± 82 c	1955 ± 134 c	19865 ± 34 a	14130 ± 975 b
<b>Rubídio</b>	6,4 ± 0,5 c	**	17,3 ± 0,5 b	35,5 ± 3 a
<b>Titânio</b>	37,0 ± 8,6 b	28,6 ± 11,4 b	39,2 ± 4,8 b	135 ± 13,5 a
<b>Zinco</b>	12,6 ± 2,9 b	11,4 ± 0,7 b	11,9 ± 0,6 b	86,9 ± 13,4 a

Os teores médios apresentados são expressos em mg/kg ± desvio padrão; n=3.

Médias seguidas por letras iguais não são significativamente diferentes a um nível de significância de 95% ( $p \leq 0,05$ ); \*\* Abaixo do Limite de Detecção

Relativamente à presença dos contaminantes referidos na tabela 3, tanto o cádmio como o chumbo e o mercúrio, não foram detetados pelo EDXRF encontrando-se por isso inexistentes ou abaixo do limite de deteção do aparelho, não constituindo, por isso, um risco para a saúde pública.

Em relação aos outros elementos é de notar que existe fósforo no extrato de grainha de uva, mas que não se encontra presente na cápsula A. Isto pode ser resultado do fator de diluição, encontrando-se os valores do fósforo abaixo do limite de deteção do equipamento.

Na sequência do raciocínio relativo ao fator de diluição, no caso do bromo a concentração da cápsula A é superior ao valor verificado no extrato da folha de oliveira o que significa que algum dos restantes componentes da cápsula apresenta uma elevada quantidade deste mineral na sua composição.

É importante referir que apenas foram realizadas amostras isoladas aos extratos secos das plantas uma vez que são matérias-primas produzidas ao ar livre sujeitas a contaminações do solo decorrentes de práticas agrícolas. Um possível exemplo disso é o caso do titânio.

Segundo Wallace *et al.* (1977) as administrações de baixas quantidades de titânio às culturas agrícolas afetam de forma positiva o seu crescimento, pelo que não é de estranhar a presença do elemento em muitas espécies vegetais. Obviamente que a absorção deste e de outros elementos é fortemente influenciada por características do solo, em particular o seu pH, para além de fatores inerentes à espécie vegetal em questão (Lyu *et al.*, 2017).

Para além do titânio existem outros elementos, como o bromo, que são adicionados ao solo sob a forma de adubos sintéticos. Em relação a este elemento suspeita-se que pode ser essencial para o organismo, sendo por isso necessários mais estudos para confirmar benefícios nutricionais (Chellan e Sadler, 2015).

Em relação ao estrôncio e ao rubídio, o estrôncio apresenta um comportamento semelhante ao cálcio, aparentando ser benéfico no fortalecimento do esmalte dos dentes e na proteção contra cáries (Surdacka *et al.*, 2007) e o rubídio encontra-se presente nos tecidos musculares, nos glóbulos vermelhos e nas vísceras (Relman, 1956).

Convém também referir as concentrações elevadas de Ca, Cl, Cu e Fe, Mn e Zn da folha de oliveira por comparação com os teores encontrados na grainha das uvas. Aliás, para além do fósforo, como já referido anteriormente, apenas a concentração de K é superior ao teor observado nas folhas de oliveira. Porém, como os valores são expressos em mg/kg, ainda que maioritariamente tenham sido detetados elementos com interesse nutricional, o consumo deste suplemento não vai ter grande impacto na Dose Diária de Referência do nutriente. Exemplificando, neste caso o potássio é o elemento com um valor mais elevado em cada

cápsula e na toma das duas cápsulas diárias são ingeridos 4101 mg deste nutriente, o que corresponde a 0,2% da DDR.



## CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

Após a leitura dos vários estudos utilizados para consulta bibliográfica é nítido que a microbiota intestinal desempenha um papel fundamental na regulação de vários processos quer a nível GI, do sistema imunitário e do sistema nervoso, motivo pelo qual está a ser cada vez mais estudada. Muitos desses estudos sugerem que a pesquisa nesta área pode levar a um aproveitamento do potencial da microbiota para um melhor entendimento da saúde mental e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas visando as desordens que afetam o cérebro.

Nesse sentido e tendo em conta a informação existente até à data, este trabalho pretende fazer um aproveitamento dos probióticos para modular o eixo intestino-cérebro, tendo como objetivo final o bem-estar da saúde mental do consumidor.

Em virtude da escassez de produtos que conciliam o equilíbrio da flora intestinal e do sistema nervoso no mercado nacional, verifica-se que se trata de uma necessidade para a área em questão. Não sendo por isso de estranhar que exista uma empresa interessada em fazer a comercialização deste suplemento, estando a decorrer a fase de homologação que irá dar início a esse processo.

Tendo em conta que é expectável que a indústria dos suplementos continue a expandir durante a próxima década é importante continuar a avaliar as necessidades que vão surgindo na população para continuar a inovar em termos de produtos no mercado.

Uma forma de inovar e criar valor tanto na indústria dos suplementos como na agricultura é tentar fazer um aproveitamento das matérias-primas e dos subprodutos mais abundantes na região. Neste caso a escolha tanto da vinha como da oliveira tem como objetivo abrir portas

para a valorização dos subprodutos das indústrias agrícolas em Portugal, uma vez que a maioria das matérias-primas utilizadas nos suplementos alimentares é importada.

Futuramente seria interessante tentar perceber o nível de aceitação do produto e avaliar o impacto da sua toma na saúde mental do consumidor através de ensaios clínicos.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] Abdel-Haq R, Schlachetzki JCM, Glass CK, Mazmanian SK. (2019). *Microbiome-microglia connections via the gut-brain axis*. Journal of Experimental Medicine. **216**(1): 41-59.
- [2] Adams C. A. (2010). *The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers*. Nutrition research reviews. **23**(1): 37–46.
- [3] Ait-Belgnaoui, A., Durand, H., Cartier, C., Chaumaz, G., Eutamene, H., Ferrier, L., Houdeau, E., Fioramonti, J., Bueno, L., Theodorou, V. (2012). *Prevention of gut leakiness by a probiotic treatment leads to attenuated HPA response to an acute psychological stress in rats*. Psychoneuroendocrinology. **37**(11): 1885–1895.
- [4] Ait-Belgnaoui, A., Payard, I., Rolland, C., Harkat, C., Braniste, V., Théodorou, V., Tompkins, T. A. (2018). *Bifidobacterium longum and Lactobacillus helveticus Synergistically Suppress Stress-related Visceral Hypersensitivity Through Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Modulation*. Journal of neurogastroenterology and motility. **24**(1): 138–146.
- [5] Akbari, E., Asemi, Z., Daneshvar Kakhaki, R., Bahmani, F., Kouchaki, E., Tamtaji, O. R., Hamidi, G. A., Salami, M. (2016). *Effect of Probiotic Supplementation on Cognitive Function and Metabolic Status in Alzheimer's Disease: A Randomized, Double-Blind and Controlled Trial*. Frontiers in aging neuroscience. **8**(256).

- [6] Ali, K., Maltese, F., Choi, Y. H., Verpoorte, R. (2010). *Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products*. *Phytochemistry reviews: proceedings of the Phytochemical Society of Europe*, **9**(3): 357–378.
- [8] Allam-Ndoul, B., Castonguay-Paradis, S., Veilleux, A. (2020). *Gut Microbiota and Intestinal Trans-Epithelial Permeability*. *International journal of molecular sciences*. **21**(17), 6402.
- [8] Alzheimer Europe. (2019). *Dementia in Europe Yearbook 2019: Estimating the prevalence of dementia in Europe*.
- [9] Anand, S., Mande, S. S. (2018). *Diet, Microbiota and Gut-Lung Connection*. *Frontiers in microbiology*. **9**, 2147.
- [10] De Andrés, J., Manzano, S., García, C., Rodríguez, J. M., Espinosa-Martos, I., Jiménez, E. (2018). *Modulatory effect of three probiotic strains on infants' gut microbial composition and immunological parameters on a placebo-controlled, double-blind, randomised study*. *Beneficial microbes*. **9**(4): 573–584.
- [11] Bazoti, F. N., Bergquist, J., Markides, K. E., Tsaibopoulos, A. (2006). *Noncovalent interaction between amyloid- $\beta$ -peptide (1–40) and oleuropein studied by electrospray ionization mass spectrometry*. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. **17**(4): 568–575.
- [12] Bell, C., Abrams, J., Nutt, D. (2001). *Tryptophan depletion and its implications for psychiatry*. *British Journal of Psychiatry*. **178**(5): 399-405.
- [13] Benavente-García, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuno, A., Del Rio, J.A. (2000). *Antioxidant activity of phenolic extracted from olea europaea L. leaves*. *Food Chemistry*. **68**: 457-562.
- [14] Bercik, P., Park, A. J., Sinclair, D., Khoshdel, A., Lu, J., Huang, X., Deng, Y., Blennerhassett, P. A., Fahnestock, M., Moine, D., Berger, B., Huizinga, J. D., Kunze, W., McLean, P. G., Bergonzelli, G. E., Collins, S. M., Verdu, E. F. (2011). *The anxiolytic effect of Bifidobacterium longum NCC3001 involves vagal pathways for gut-brain communication*. *Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*. **23**(12): 1132–1139.

- [15] Bhat, S.A.; Kamal, M.A.; Yarla, N.S.; Ashraf, G.M. (2017). *Synopsis on management strategies for neurodegenerative disorders: Challenges from bench to bedside in successful drug discovery and development*. Current Topics in Medicinal Chemistry. **17**(12): 1371-1378.
- [16] de Bock, M., Derraik, J. G., Brennan, C. M., Biggs, J. B., Morgan, P. E., Hodgkinson, S. C., Hofman, P. L., Cutfield, W. S. (2013). Olive (*Olea europaea* L.) leaf polyphenols improve insulin sensitivity in middle-aged overweight men: a randomized, placebo-controlled, crossover trial. PloS one, **8**(3).
- [17] Boyle, N.B., Lawton, C., Dye, L. (2017). *The Effects of Magnesium Supplementation on Subjective Anxiety and Stress—A Systematic Review*. Nutrients. **9**, 429.
- [18] Bravo, J.A., Forsythe, P., Chew, M.V., Escaravage, E., Savignac, H.M., Dinan, T.G., *et al.* (2011). *Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve*. Proceedings of the National Academy of Sciences. **108**: 16050–16055.
- [19] Braak, H., Del Tredici, K. (2008). *Invited Article: Nervous system pathology in sporadic Parkinson disease*. Neurology. **70**(20): 1916–1925.
- [20] Brookmeyer, R., Johnson, E., Ziegler-Graham, K., Arrighi, H.M. (2007). *Forecasting the global burden of Alzheimer's disease*. Alzheimer's and Dementia. **3**(3): 186-191.
- [21] Cardoso, C.C., Lobato, K. R., Binfaré, R.W., Ferreira, P.K., Rosa, A.O., Santos, A.R., Rodrigues, A.L. (2009). *Evidence for the involvement of the monoaminergic system in the antidepressant-like effect of magnesium*. Progress in neuro-psychopharmacology and biological psychiatry. **33**(2): 235–242.
- [22] Casamenti, F. e Stefani, M. (2016). *Olive polyphenols: new promising agents to combat aging-associated neurodegeneration*. Expert Review of Neurotherapeutics. **17**(4): 345–358.
- [23] Cerf-Bensussan, N., Gaboriau-Routhiau, V. (2010). *The immune system and the gut microbiota: friends or foes?* Nature Reviews Immunology. **10**(10): 735–744.
- [24] Chellan, P. e Sadler, P. J. (2015). *The elements of life and medicines*. Philosophical Transactions of the Royal Society A. **373**: 20140182.

- [25] Chen, H., Liu, S., Ji, L., Wu, T., Ji, Y., Zhou, Y., Zheng, M., Zhang, M., Xu, W., Huang, G. (2016). *Folic Acid Supplementation Mitigates Alzheimer's Disease by Reducing Inflammation: A Randomized Controlled Trial*. *Mediators of inflammation*. **2016**.
- [26] Chichlowski, M., Shah, N., Wampler, J. L., Wu, S. S., Vanderhoof, J. A. (2020). *Bifidobacterium longum Subspecies infantis (B. infantis) in Pediatric Nutrition: Current State of Knowledge*. *Nutrients*. **12**(6).
- [27] Chui, D., Chen, Z., Yu, J., Zhang, H., Wang, W., Song, Y., Yang, H., Liang Zhou. (2011). *Magnesium in the central nervous system: magnesium in Alzheimer's disease*. University of Adelaide Press: Robert Vink e Mihai Nechifor.
- [28] Conde, E., Cara, C., Moure, A., Ruiz, E., Castro, E., Domínguez, H. (2009). *Antioxidant activity of the phenolic compounds released by hydrothermal treatments of olive tree pruning*. *Food Chemistry*. **114**(3): 806–812.
- [29] Council for Responsible Nutrition. (2020). *Dietary Supplements Usage Up Dramatically During Pandemic, New Ipsos- CRN Survey Shows*. Pode ser consultado em: <https://www.crnusa.org/newsroom/dietary-supplement-usage-dramatically-during-pandemic-new-ipsos-crn-survey-shows>. Acedido a 08/05/2021.
- [30] Cryan, J.F., Dinan, T.G. (2012). *Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour*. *Nature Reviews Neuroscience*. **13**(10): 701–712.
- [31] Desbonnet L, Garrett L, Clarke G, Kiely B, Cryan JF, Dinan TG. (2010). *Effects of the probiotic Bifidobacterium infantis in the maternal separation model of depression*. *Neuroscience*. **170**: 1179–1188.
- [32] Dinan, T. G., Cryan, J. F. (2017). *The Microbiome-Gut-Brain Axis in Health and Disease*. *Gastroenterology Clinics of North America*. **46**(1): 77–89.
- [33] Dinan, T. G., Stanton, C., Cryan, J. F. (2013). *Psychobiotics: A Novel Class of Psychotropic*. *Biological Psychiatry*. **74**: 720-726.

- [34] Direção Regional de Agricultura e Pescas (DRAP). (2002). *A cultura da oliveira*. Pode ser consultado através do link: <https://www.drapc.gov.pt/base/documentos/olivicultura.htm> (13/04/2021).
- [35] Donohoe D.R., Garge N., Zhang X., Sun W., O'Connell T.M., Bunker M.K., Bultman S.J. (2011). *The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon*. *Cell Metabolism*, **13**: 517–526. doi: 10.1016/j.cmet.2011.02.018.
- [36] Dorsey, E.R., Constantinescu, R., Thompson, J.P., Biglan, K.M., Holloway, R.G., Kieburtz, K., Marshall, F.J., Ravina, B.M., Schifitto, G., Siderowf, A., Tanner, C.M. (2007). *Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030*. *American Academy of Neurology*. **68**(5).
- [37] Dumitrescu, L., Popescu-Olaru, I., Cozma, L., Tulbă, D., Hinescu, M. E., Ceafalan, L. C., Gherghiceanu, M., Popescu, B. O. (2018). *Oxidative Stress and the Microbiota-Gut-Brain Axis*. *Oxidative medicine and cellular longevity*. **2018**.
- [38] EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). (2006). *Tolerable upper intake levels for vitamins and minerals*. *EFSA Journal*.
- [39] EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). (2015). *Scientific Opinion on Dietary Reference Values for magnesium*. *EFSA Journal*. **13**(7): 4186.
- [40] EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). (2011). *Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865), maintenance of normal blood HDL-cholesterol concentrations (ID 1639), maintenance of normal blood pressure (ID 3781), "anti-inflammatory properties" (ID 1882), "contributes to the upper respiratory tract health" (ID 3468), "can help to maintain a normal function of gastrointestinal tract" (3779), and "contributes to body defences against external agents" (ID 3467) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006*. *EFSA Journal*. **9**(4): 2033. doi:10.2903/j.efsa.2011.2033.
- [41] EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). (2011a). *Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to L-tryptophan and maintenance of normal sleep (ID 596, 1671), enhancement of mood (ID 596), contribution to normal cognitive function (ID 596), and contribution to the maintenance or achievement of a normal body weight (ID*

604) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. EFSA Journal. **9**(4):2073. doi: 10.2903/j.efsa.2011.2073

[42] d'Ettoire, G., Ceccarelli, G., Marazzato, M., Campagna, G., Pinacchio, C., Alessandri, F., Ruberto, F., Rossi, G., Celani, L., Scagnolari, C., Mastropietro, C., Trinchieri, V., Recchia, G. E., Mauro, V., Antonelli, G., Pugliese, F., Mastroianni, C. M. (2020). *Challenges in the Management of SARS-CoV2 Infection: The Role of Oral Bacteriotherapy as Complementary Therapeutic Strategy to Avoid the Progression of COVID-19*. *Frontiers in medicine*. **7**: 389.

[43] Féart, C., Samieri, C., Allès, B., & Barberger-Gateau, P. (2013). *Potential benefits of adherence to the Mediterranean diet on cognitive health*. *The Proceedings of the Nutrition Society*, **72**(1): 140–152.

[44] Ferri, C. P., Sousa, R., Albanese, E., Ribeiro, W. S., Honyashiki, M. (2009). *World Alzheimer Report 2009 - Executive Summary*. In Prince, M. and Jackson, J. (Eds.). *Alzheimer's Disease International*, London: 1-22.

[45] Forsyth, C. B., Shannon, K. M., Kordower, J. H., Voigt, R. M., Shaikh, M., Jaglin, J. A., Estes, J. D., Dodiya, H. B., Keshavarzian, A. (2011). *Increased intestinal permeability correlates with sigmoid mucosa alpha-synuclein staining and endotoxin exposure markers in early Parkinson's disease*. *PloS one*. **6**(12).

[46] Franco, R., e Fernández-Suárez, D. (2015). *Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system*. *Progress in neurobiology*, **131**: 65–86.

[47] Friedman, M. (2018). *Analysis, Nutrition, and Health Benefits of Tryptophan*. *International Journal of Tryptophan Research*, **11**: 1-12.

[48] Friedrich, M. J. (2017). *Depression is the leading cause of disability around the world*. *JAMA*, **317**(15). <https://doi.org/10.1001/jama.2017.3826>

[49] Fujishita, K., Ozawa, T., Shibata, K., Tanabe, S., Sato, Y., Hisamoto, M., Okuda, T., Koizumi, S. (2009). *Grape seed extract acting on astrocytes reveals neuronal protection against oxidative stress via interleukin-6-mediated mechanisms*. *Cellular and molecular neurobiology*, **29**(8): 1121–1129.

- [50] Fuso, A., Seminara, L., Cavallaro, R. A., D'Anselmi, F., Scarpa, S. (2005). *S-adenosylmethionine/homocysteine cycle alterations modify DNA methylation status with consequent deregulation of PS1 and BACE and beta-amyloid production*. *Molecular and cellular neurosciences*, **28**(1): 195–204.
- [51] Gareau, M. G., Wine, E., Rodrigues, D. M., Cho, J. H., Whary, M. T., Philpott, D. J., McQueen, G., Sherman, P. M. (2010). *Bacterial infection causes stress-induced memory dysfunction in mice*. *Gut*, **60**(3): 307–317.
- [52] Garrett, W. S., Gordon, J. I., Glimcher, L. H. (2010). *Homeostasis and inflammation in the intestine*. *Cell*, **140**(6): 859–870.
- [53] Gasperi, V., Sibilano, M., Savini, I., Catani, M. V. (2019). *Niacin in the Central Nervous System: An Update of Biological Aspects and Clinical Applications*. *International journal of molecular sciences*, **20**(4), 974.
- [54] GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. (2018). *Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017*. *The Lancet*.
- [55] Glass, C. K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M. C., Gage, F. H. (2010). *Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration*. *Cell*, **140**(6): 918–934.
- [56] Grand View Research. (2021). *Dietary Supplements Market Size, Share & Trends Analysis Report by Ingredient (Vitamins, Proteins & Amino Acids), By Form, By Application, By End User, By Distribution Channel, and Segment Forecasts, 2021-2028*. Pode ser consultado em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/dietary-supplements-market>, aceso em 08/05/2021.
- [57] Greibe, E., Mahalle, N., Bhide, V., Fedosov, S., Heegaard, C. W., Naik, S., Nexø, E. (2019). *Effect of 8-week oral supplementation with 3- $\mu$ g cyano-B12 or hydroxo-B12 in a vitamin B12-deficient population*. *European journal of nutrition*, **58**(1): 261–270.
- [58] Griffin, S. M., Pickard, M. R., Orme, R. P., Hawkins, C. P., Williams, A. C., Fricker, R. A. (2017). *Nicotinamide alone accelerates the conversion of mouse embryonic stem cells into mature neuronal populations*. *PloS one*, **12**(8).

- [59] Grossi C, Rigacci S, Ambrosini S, Ed Dami T, Luccarini I, Traini C, et al. (2013). *The Polyphenol Oleuropein Aglycone Protects TgCRND8 Mice against A $\beta$  Plaque Pathology*. PLoS ONE **8**(8).
- [60] Guaraldi GP, Fava M, Mazzi F, et al. (1993). *An open trial of methyltetrahydrofolate in elderly depressed patients*. Annals of Clinical Psychiatry. **5**(2): 101–105.
- [61] Guarner et al. (2017). *Probióticos e Prebióticos*. Diretrizes Mundiais da Organização Mundial da Gastroenterologia.
- [62] Hirschberg, S., Gisevius, B., Duscha, A., Haghikia, A. (2019). *Implications of Diet and The Gut Microbiome in Neuroinflammatory and Neurodegenerative Diseases*. International journal of molecular sciences, **20**(12).
- [63] Huang, W. C., Wei, C. C., Huang, C. C., Chen, W. L., Huang, H. Y. (2019). *The Beneficial Effects of Lactobacillus plantarum PS128 on High-Intensity, Exercise-Induced Oxidative Stress, Inflammation, and Performance in Triathletes*. Nutrients, **11**(2), 353.
- [64] Infarmed. (2017). Definição de fronteiras entre medicamentos e suplementos alimentares- Parecer 5-hidroxitriptofano.
- [65] Instituto Nacional de Estatística (INE). Recenseamento Agrícola – Análise dos principais resultados- 2019. Lisboa: INE, 2021. Disponível em <https://www.ine.pt/xurl/pub/437178558> (13/04/2021).
- [66] Institute of Medicine (US) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. (1997). *Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride*. National Academies Press (US).
- [67] Institute of Medicine. (1998). *Dietary Reference Intake for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin and Choline*. Pode ser consultado em <https://www.nap.edu/catalog/6015/dietary-reference-intakes-for-thiamin-riboflavin-niacin-vitamin-b6-folate-vitamin-b12-pantothenic-acid-biotin-and-choline>.

- [68] Jenkins, T. A., Nguyen, J. C., Polglaze, K. E., Bertrand, P. P. (2016). *Influence of Tryptophan and Serotonin on Mood and Cognition with a Possible Role of the Gut-Brain Axis*. *Nutrients*, **8**(1), 56.
- [69] Johansson, M.E., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., Hansson, G.C. (2008). *The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**(39): 15064–15069.
- [70] John, C.D., Buckingham, J.C. (2003). *Cytokines: regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis*. *Current opinion in pharmacology*, **3**(1): 78–84.
- [71] Kalia, L.V., Lang, A.E. (2015). *Parkinson Disease*. *Lancet*, **386**: 896-912.
- [72] Keshavarzian, A., Green, S. J., Engen, P. A., Voigt, R. M., Naqib, A., Forsyth, C. B., Mutlu, E., Shannon, K. M. (2015). *Colonic bacterial composition in Parkinson's disease*. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, **30**(10): 1351–1360.
- [73] Kettenmann, H., Hanisch, U. K., Noda, M., Verkhratsky, A. (2011). *Physiology of microglia*. *Physiological reviews*, **91**(2): 461–553.
- [74] Kikuchi, A. M., Tanabe, A., Iwahori, Y. (2020). *A systematic review of the effect of L-tryptophan supplementation on mood and emotional functioning*. *Journal of Dietary Supplements*: 1–18.
- [75] Kobayashi, Y., Kuhara, T., Oki, M., Xiao, J. Z. (2019). *Effects of Bifidobacterium breve A1 on the cognitive function of older adults with memory complaints: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial*. *Beneficial microbes*, **10**(5): 511–520.
- [76] Kobayashi, Y., Sugahara, H., Shimada, K., Mitsuyama, E., Kuhara, T., Yasuoka, A., Kondo, T., Abe, K., Xiao, J. Z. (2017). *Therapeutic potential of Bifidobacterium breve strain A1 for preventing cognitive impairment in Alzheimer's disease*. *Scientific reports*, **7**(1).
- [77] Kochalska, K., Oakden, W., Słowik, T., Chudzik, A., Pankowska, A., Łazarczyk, A., Koziół, P., Andres-Mach, M., Pietura, R., Rola, R., Stanisław, G. J., Orzyłowska, A. (2020). *Dietary supplementation with Lactobacillus rhamnosus JB-1 restores brain neurochemical balance and*

*mitigates the progression of mood disorder in a rat model of chronic unpredictable mild stress.* Nutrition research, **2**: 44–57.

[78] Lebouvier, T., Chaumette, T., Paillusson, S., Duyckaerts, C., Bruley des Varannes, S., Neunlist, M., Derkinderen, P. (2009). *The second brain and Parkinson's disease.* The European journal of neuroscience, **30**(5): 735–741.

[79] Lees, A. J., Hardy, J., Revesz, T. (2009). *Parkinson's disease.* Lancet, **373**(9680): 2055–2066.

[80] Ley, R. E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P. J., Ramey, R. R., Bircher, J. S., Schlegel, M. L., Tucker, T. A., Schrenzel, M. D., Knight, R., Gordon, J. I. (2008). *Evolution of mammals and their gut microbes.* Science, **320**(5883): 1647–1651.

[81] Li, M., van Esch, B., Wagenaar, G., Garssen, J., Folkerts, G., Henricks, P. (2018). *Pro- and anti-inflammatory effects of short chain fatty acids on immune and endothelial cells.* European journal of pharmacology, **831**: 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.05.003>

[82] Liang S, Wang T, Hu X, *et al.* (2015). *Administration of Lactobacillus helveticus NS8 improves behavioral, cognitive, and biochemical aberrations caused by chronic restraint stress.* Neuroscience, **310**: 561–577.

[83] Liao, J. F., Cheng, Y. F., You, S. T., Kuo, W. C., Huang, C. W., Chiou, J. J., Hsu, C. C., Hsieh-Li, H. M., Wang, S., Tsai, Y. C. (2020). *Lactobacillus plantarum PS128 alleviates neurodegenerative progression in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced mouse models of Parkinson's disease.* Brain, behavior, and immunity, **90**: 26–46.

[84] Linus Pauling Intitute (LPI). (2021). Pode ser consultado em <https://lpi.oregonstate.edu/mic/vitamins/>, acedido a 16 de março de 2021.

[85] Liu, W.H., Chuang, H.L., Huang, Y.T., *et al.* (2016). *Alteration of behavior and monoamine levels attributable to Lactobacillus plantarumPS128 in germfree mice.* Behavioural Brain Research, **298**(Pt B): 202–9.

- [86] Liu, W., S. Mi, Z. Ruan, J. Li, X. Shu, K. Yao, M. Jiang, Z. Deng. (2017). *Dietary Tryptophan Enhanced the Expression of Tight Junction Protein ZO-1 in Intestine*. Journal of Food Science. **82**: 562–567.
- [87] Liu, Y.W., Liu, W.H., Wu, C.C., *et al.* (2016a). *Psychotropic effects of Lactobacillus plantarum PS128 in early life-stressed and naive adult mice*. Brain Research, **1631**: 1–12.
- [88] Lockyer, S., Rowland, I., Spencer, J., Yaqoob, P., Stonehouse, W. (2017). *Impact of phenolic-rich olive leaf extract on blood pressure, plasma lipids and inflammatory markers: a randomised controlled trial*. European journal of nutrition, **56**(4): 1421–1432.
- [89] Loja Girassol. <http://www.girassol.com/20-sistema-nervoso/4432-neorotrans-b-60-capsulas.htm>. Consultado a 10/06/2021.
- [90] Loureiro, J. A., Andrade, S., Duarte, A., Neves, A. R., Queiroz, J. F., Nunes, C., Sevin, E., Fenart, L., Gosselet, F., Coelho, M. A., Pereira, M. C. (2017). *Resveratrol and Grape Extract-loaded Solid Lipid Nanoparticles for the Treatment of Alzheimer's Disease*. Molecules, **22**(2): 277.
- [91] Luccarini, I., Ed Dami, T., Grossi, C., Rigacci, S., Stefani, M., Casamenti, F. (2014). *Oleuropein aglycone counteracts A $\beta$ 42 toxicity in the rat brain*. Neuroscience Letters, **558**: 67–72.
- [92] Lyu, S., Wei, X., Chen, J., Wang, C., Wang, X., Pan, D. (2017). *Titanium as a Beneficial Element for Crop Production*. Frontiers in plant science, **8**, 597. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00597>
- [93] Martone, G. (2018). *Enhancement of recovery from mental illness with L-methylfolate supplementation*. Perspectives in Psychiatric Care. **54**: 331– 334.
- [94] McNaull, B. B., Todd, S., McGuinness, B., Passmore, A. P. (2010). *Inflammation and anti-inflammatory strategies for Alzheimer's disease– a mini-review*. Gerontology, **56**(1): 3–14.
- [95] Mehrabadi, S., Sadr, S. S. (2020). *Assessment of Probiotics Mixture on Memory Function, Inflammation Markers, and Oxidative Stress in an Alzheimer's Disease Model of Rats*. Iranian Biomedical Journal, **24**(4): 220-228.
- [96] Meng, D., Sommella, E., Salviati, E., Campiglia, P., Ganguli, K., Djebali, K., Zhu, W., Walker, W. A. (2020). *Indole-3-lactic acid, a metabolite of tryptophan, secreted by Bifidobacterium longum subspecies infantis is anti-inflammatory in the immature intestine*. Pediatric research, **88**(2): 209–217.

- [97] Messaoudi, M., Lalonde, R., Violle, N., Javelot, H., Desor, D., Nejdi, A., et al. (2011). *Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (Lactobacillus helveticus R0052 and Bifidobacterium longum R0175) in rats and human subjects*. British Journal of Nutrition, **105**(5): 755-764.
- [98] Messaoudi, M., Violle, N., Bisson, J. F., Desor, D., Javelot, H., Rougeot, C. (2011a). *Beneficial psychological effects of a probiotic formulation (Lactobacillus helveticus R0052 and Bifidobacterium longum R0175) in healthy human volunteers*. Gut microbes, **2**(4): 256–261.
- [99] Miller, A. H., Raison, C. L. (2016). *The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target*. Nature Reviews Immunology, **16**(1): 22–34.
- [100] Moreira, A., Texeira, T., Ferreira, A., Do Carmo Gouveia Peluzio, M., De Cássia Gonçalves Alfenas, R. (2012). *Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia*. British Journal of Nutrition, **108**(5): 801-809.
- [101] Morris, M. C., Evans, D. A., Bienias, J. L., Scherr, P. A., Tangney, C. C., Hebert, L. E., Bennett, D. A., Wilson, R. S., Aggarwal, N. (2004). *Dietary niacin and the risk of incident Alzheimer's disease and of cognitive decline*. Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry, **75**(8): 1093–1099.
- [102] Murphy, S.E., Longhitano, C., Ayres, R.E., Cowen, P.J., Harmer, C.J. (2006). *Tryptophan supplementation induces a positive bias in the processing of emotional material in healthy female volunteers*. Psychopharmacology. **187**: 121–130.
- [103] Myint, A. M., Kim, Y. K. (2003). *Cytokine-serotonin interaction through IDO: a neurodegeneration hypothesis of depression*. Medical hypotheses, **61**(5-6), 519–525.
- [104] Ni, Y., Yang, X., Zheng, L., Wang, Z., Wu, L., Jiang, J., Yang, T., Ma, L., Fu, Z. (2019). *Lactobacillus and Bifidobacterium Improves Physiological Function and Cognitive Ability in Aged Mice by the Regulation of Gut Microbiota*. Molecular Nutrition and Food Research, **63**.
- [105] Nutribio. <https://nutribio.pt/loja/vectiseren-60-capsulas-nutergia/>. Consultado a 10/06/2021.

- [106] O'Brien, S. M., Scott, L. V., Dinan, T. G. (2004). *Cytokines: abnormalities in major depression and implications for pharmacological treatment*. Human psychopharmacology, **19**(6): 397–403.
- [107] OCDE. (2017). *Dementia prevalence*. Health at a Glance 2017: OECD Indicators, OCDE Publishing, Paris.
- [108] Odai, T., Terauchi, M., Kato, K., Hirose, A., Miyasaka, N. (2019). *Effects of Grape Seed Proanthocyanidin Extract on Vascular Endothelial Function in Participants with Prehypertension: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study*. Nutrients, **11**(12): 2844.
- [109] Oh, R., Brown, D. L. (2003). *Vitamin B12 deficiency*. American family physician, **67**(5): 979–986.
- [110] Omar, S.H. (2010). *Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive*. Saudi Pharmaceutical Journal, **18**: 111-121.
- [111] Omar, S. H., Scott, C. J., Hamlin, A. S., Obied, H. K. (2018). *Olive Biophenols Reduces Alzheimer's Pathology in SH-SY5Y Cells and APP<sup>sw</sup> Mice*. International Journal of Molecular Sciences, **20**(1): 125.
- [112] Pazos-Tomas, C. C., Cruz-Venegas, A., Pérez-Santiago, A. D., Sánchez-Medina, M. A., Matías-Pérez, D., García-Montalvo, I. A. (2020). *Vitis vinifera: An Alternative for the Prevention of Neurodegenerative Diseases*. Journal of Oleo Science, **69**(10): 1147–1161.
- [113] Peralbo-Molina, Á., Luque de Castro, M. D. (2013). *Potential of residues from the Mediterranean agriculture and agrifood industry*. Trends in Food Science & Technology, **32**(1): 16–24.
- [114] Pierce, JM e Alviña, K. (2019). *The role of inflammation and the gut microbiome in depression and anxiety*. Journal of Neuroscience Research. **97**: 1223-1241.
- [115] Piscollato, F., Sumalla Cano, S., Elio, I., Masias Vergara, M., Giampieri, F., Battino, M. (2016). *Role of gut microbiota and nutrients in amyloid formation and pathogenesis of Alzheimer disease*. Nutrition reviews, **74**(10): 624–634.

- [116] Pouteau E, Kabir-Ahmadi M, Noah L, Mazur A, Dye L, Hellhammer J, et al. (2018). *Superiority of magnesium and vitamin B6 over magnesium alone on severe stress in healthy adults with low magnesemia: A randomized, single-blind clinical trial*. PLoS ONE, **13**(12).
- [117] PORDATA. (2020). *Agricultura e Pescas*. Pode ser consultado através do link: <https://www.pordata.pt/Portugal/Superf%c3%adcie+das+principais+culturas+agr%c3%adcolas-3352> (13/04/2021)
- [118] Proença da Cunha, A., Pereira da Silva, A., Roque, O. R. (2003). *Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- [119] de Punder, K., Pruijboom, L. (2015). *Stress induces endotoxemia and low-grade inflammation by increasing barrier permeability*. Frontiers of Immunology, **6**:223.
- [120] PwC. (2020). *Vitamins And Dietary Supplements Market trends- Overview*. Pode ser consultado em: <https://www.pwc.com/it/it/publications/assets/docs/Vitamins-Dietary-Supplements-Market-Overview.pdf>. Acedido a 08/05/2021.
- [121] RASFF — The Rapid Alert System for Food and Feed — Annual Report 2019. (2020). Luxembourg: Publications Office of the European Union.
- [122] Reddy, P., Edwards, L. R. (2017). *Magnesium Supplementation in Vitamin D Deficiency*. American Journal of Therapeutics, **1**.
- [123] Rehman, M. U., Wali, A. F., Ahmad, A., Shakeel, S., Rasool, S., Ali, R., Rashid, S. M., Madkhali, H., Ganaie, M. A., Khan, R. (2019). *Neuroprotective Strategies for Neurological Disorders by Natural Products: An update*. Current neuropharmacology, **17**(3): 247–267.
- [124] Reis, P. (2014). *O Olival em Portugal: Dinâmicas, tecnologias e relação com o desenvolvimento rural*. ANIMAR, Lisboa.
- [125] Relman, A.S. (1956). *The physiological behavior of rubidium and cesium in relation to that of potassium*. Yale Journal of Biology and Medicine, **29**: 248–262.

- [126] Riedel, C.U., Foata F., Philippe, D., Adolfsson, O., Eikmanns, B.J., Blum, S. (2006). *Anti-inflammatory effects of bifidobacteria by inhibition of LPS-induced NF- $\kappa$ B activation*. World Journal of Gastroenterology, **12**(23): 3729–3735.
- [127] Riedel WJ, Sobczak S, Schmitt JA. (2003). *Tryptophan modulation and cognition*. Advances in Experimental Medicine and Biology, **527**: 207–213.
- [128] Romagnolo, A., Merola, A., Artusi, C. A., Rizzone, M. G., Zibetti, M., Lopiano, L. (2018). *Levodopa-Induced Neuropathy: A Systematic Review*. Movement disorders clinical practice, **6**(2): 96–103.
- [129] Romijn, A. R., Rucklidge, J. J., Kuijter, R. G., Frampton, C. (2017). *A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of Lactobacillus helveticus and Bifidobacterium longum for the symptoms of depression*. Australian & New Zealand Journal of Psychiatry, **51**(8): 810–821.
- [130] Sangle, P., Sandhu, O., Aftab, Z., Anthony, A. T., Khan, S. (2020). *Vitamin B12 Supplementation: Preventing Onset and Improving Prognosis of Depression*. Cureus, **12**(10).
- [131] Santos, SCP-L, Cruz, M.E., Barroso, A.M.E., Fonseca, C.P.S., Guerra, M., Carvalho, M.L., Santos, J.P. (2014). *Elemental characterization of plants and soils in Panasqueira tungsten mining region*. Journal of Soils and Sediments, **14**: 778–784.
- [132] Sarbishegi, M., Mehraein, F., Soleimani, M. (2014). *Antioxidant role of oleuropein on midbrain and dopaminergic neurons of substantia nigra in aged rats*. Iranian biomedical journal, **18**(1): 16–22.
- [133] Savignac, H. M., Kiely, B., Dinan, T. G., Cryan, J. F. (2014). *Bifidobacteria exert strain-specific effects on stress-related behavior and physiology in BALB/c mice*. Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society, **26**(11): 1615–1627.
- [134] Scaglione, F., Panzavolta, G. (2014). *Folate, folic acid and 5-methyltetrahydrofolate are not the same thing*. Xenobiotica, **44**(5): 480–488.
- [135] Schneiderman, N., Ironson, G., Siegel, S. D. (2005). *Stress and health: psychological, behavioral, and biological determinants*. Annual review of clinical psychology, **1**: 607–628.

- [136] Seelig, M. S. (1994). *Consequences of magnesium deficiency on the enhancement of stress reactions; preventive and therapeutic implications (a review)*. Journal of the American College of Nutrition, **13**(5): 429–446.
- [137] Serefko A, Szopa A, Poleszak E. (2016). Magnesium and depression. Magnesium Research, **29**(3): 112-9.
- [138] Shannon, K. M., Keshavarzian, A., Dodiya, H. B., Jakate, S., Kordower, J. H. (2012). *Is alpha-synuclein in the colon a biomarker for premotor Parkinson's disease? Evidence from 3 cases*. Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society, **27**(6): 716–719.
- [139] Shults CW. (2006). *Lewy bodies*. Proceedings of the National Academy of Sciences, **103**: 1661-1668.
- [140] Singewald, N., Sinner, C., Hetzenauer, A., Sartori, S. B., Murck, H. (2004). *Magnesium-deficient diet alters depression- and anxiety-related behavior in mice— influence of desipramine and Hypericum perforatum extract*. Neuropharmacology, **47**(8), 1189–1197.
- [141] Slykerman, R. F., Hood, F., Wickens, K., Thompson, J., Barthow, C., Murphy, R., Kang, J., Rowden, J., Stone, P., Crane, J., Stanley, T., Abels, P., Purdie, G., Maude, R., Mitchell, E. A. (2017). *Effect of Lactobacillus rhamnosus HN001 in Pregnancy on Postpartum Symptoms of Depression and Anxiety: A Randomised Double-blind Placebo-controlled Trial*. EBioMedicine, **24**: 159–165.
- [142] Statista. (2021). *Estimated value of probiotics market worldwide from 2018 to 2023. • Global probiotics estimated market value 2018-2023* | Statista, acedido a 19 de março de 2021.
- [143] Sun, W., Frost, B., Liu, J. (2017). *Oleuropein, unexpected benefits!* Oncotarget, **8**(11).
- [144] Sun, Q., Jia, N., Li, X., Yang, J., & Chen, G. (2019). *Grape seed proanthocyanidins ameliorate neuronal oxidative damage by inhibiting GSK-3 $\beta$ -dependent mitochondrial permeability transition pore opening in an experimental model of sporadic Alzheimer's disease*. Aging, **11**(12): 4107–4124.

- [145] Sun, M. F., Shen, Y. Q. (2018). *Dysbiosis of gut microbiota and microbial metabolites in Parkinson's Disease*. Ageing research reviews, **45**: 53–61.
- [146] Surdacka A, Stopa J, Torlinski L. (2007). *In situ effect of strontium toothpaste on artificially decalcified human enamel*. Biological Trace Element Research **16**: 147–153. doi: 10.1007/BF02685927
- [147] Torres-Platas, S. G., Comeau, S., Rachalski, A., Bo, G. D., Cruceanu, C., Turecki, G., Giros, B., Mechawar, N. (2014). *Morphometric characterization of microglial phenotypes in human cerebral cortex*. Journal of neuroinflammation, **11**(12).
- [148] Tsujita, N., Akamatsu, Y., Nishida, M.M., Hayashi, T., Moritai, T. (2019). *Effect of Tryptophan, Vitamin B6, and Nicotinamide-Containing Supplement Loading between Meals on Mood and Autonomic Nervous System Activity in Young Adults with Subclinical Depression: A Randomized, Double-Blind and Placebo-Controlled Study*. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, **65**: 507-514.
- [149] Vaclavik, L., Krynitsky, A. J., Rader, J. I. (2014). *Mass spectrometric analysis of pharmaceutical adulterants in products labeled as botanical dietary supplements or herbal remedies: a review*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, **406**(27): 6767–6790.
- [150] Wall, R., Ross, R.P., Shanahan, F., O'Mahony, L., Kiely, B., Quigley, E., Dinan, T.G., Fitzgerald, G. and Stanton, C. (2010). *Impact of Administered Bifidobacterium on Murine Host Fatty Acid Composition*. Lipids, **45**: 429-436.
- [151] Wallace A., Alexander G. V., Chaudhry F. M. (1977). *Phytotoxicity of cobalt, vanadium, titanium, silver, and chromium*. Communications in Soil Science and Plant Analysis. **8**: 751–756.
- [152] Wang, H., Braun, C., Murphy, E. F., Enck, P. (2019). *Bifidobacterium longum 1714TM Strain Modulates Brain Activity of Healthy Volunteers During Social Stress*. The American Journal of Gastroenterology, **114**: 1152-1162.
- [153] Wang, H., Lee, I. S., Braun, C., Enck, P. (2016). *Effect of Probiotics on Central Nervous System Functions in Animals and Humans: A Systematic Review*. Journal of neurogastroenterology and motility, **22**(4): 589–605.

- [154] Wang, H. X., Wahlin, A., Basun, H., Fastbom, J., Winblad, B., & Fratiglioni, L. (2001). *Vitamin B(12) and folate in relation to the development of Alzheimer's disease*. *Neurology*, **56**(9): 1188–1194.
- [155] Weiss, G. A., Hennet, T. (2017). *Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **74**(16): 2959–2977.
- [156] Xiao, J., Katsumata, N., Bernier, F., Ohno, K., Yamauchi, Y., Odamaki, T., Yoshikawa, K., Ito, K., Kaneko, T. (2020). *Probiotic Bifidobacterium breve in Improving Cognitive Functions of Older Adults with Suspected Mild Cognitive Impairment: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial*. *Journal of Alzheimer's disease*, **77**(1): 139–147.
- [157] Xie, Y., Feng, H., Peng, S., Xiao, J., Zhang, J. (2017). *Association of plasma homocysteine, vitamin B12 and folate levels with cognitive function in Parkinson's disease: A meta-analysis*. *Neuroscience letters*, **636**: 190–195.
- [158] Yan, F., Polk, D. B. (2002). *Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells*. *The Journal of biological chemistry*, **277**(52): 50959–50965.
- [159] Youssef, S. B., Brisson, G., Doucet-Beaupré, H., Castonguay, A.-M., Gora, C., Amri, M., Lévesque, M. (2019). *Neuroprotective benefits of grape seed and skin extract in a mouse model of Parkinson's disease*. *Nutritional Neuroscience*, 1–15.
- [160] Zhong, Z., Wheeler, M. D., Li, X., Froh, M., Schemmer, P., Yin, M., Bunzendaul, H., Bradford, B., Lemasters, J. J. (2003). *L-Glycine: a novel antiinflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective agent*. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, **6**(2): 229–240.
- [161] Zhou, Y., Wu, J., Sheng, R., Li, M., Wang, Y., Han, R., Han, F., Chen, Z., Qin, Z. H. (2018). *Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Inhibits MPTP-Induced Neuroinflammation and Neurotoxicity*. *Neuroscience*, **391**: 140–153





## A.2 Resumo das características do Suplemento Alimentar

### 1. Identificação do Suplemento Alimentar:

FortiBrain, 30 + 30 Cápsulas

### 2. Forma Farmacêutica:

Cápsulas de Gelatina, tamanho 00

### 3. Estatuto legal:

Suplemento Alimentar, de acordo com o Decreto-Lei n.º 118/2015 de 23 de junho.

### 4. Organismo tutelar:

DGAV

### 5. Apresentação:

**Acondicionamento primário:** Blister PVC / ALU, com 15 Cápsulas

**Acondicionamento secundário:** Caixa de cartolina branca do cliente.

**Produto acabado:** Caixa cartolina branca do cliente contendo 4 blisters de 15 cápsulas.

## 6. Composição quantitativa e qualitativa:

Ingredientes – Cápsula A	Dosagem/ 1 Cápsula	TDR (1 Cáps)	% VRN*
Bisglicinato de Magnésio (Magnésio elemento: 20 %)	300 mg (60 mg Mg)	300 mg (60 mg Mg)	16 %
Extrato seco de Oliveira ( <i>Olea europaea L.</i> – Folhas, padronizado a 40 % de Oleuropeína)	50 mg	50 mg	**
Extrato seco de Videira-vermelha ( <i>Vitis vinifera L.</i> – Sementes, padronizado a 95 % de Proantocianidinas)	50 mg	50 mg	**
L-Triptofano	50 mg	50 mg	**
Vitamina B6 (sob a forma de Cloridrato de piridoxina)	25 mg	25 mg	1786 %
Vitamina B3 (sob a forma de Nicotinamida)	22 mg	22 mg	138 %
Vitamina B12 (sob a forma de Cianocobalamina)	1000 µg	1000 µg	40000 %
Vitamina B9 (sob a forma de L-metilfolato de cálcio)	800 µg	800 µg	400 %
Excipientes	Q.B.P.	Q.B.P.	**
*VRN=Valores de Referência do Nutriente: Regulamento (EU) nº 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de outubro de 2011			
** Não Estabelecido			
Ingredientes – Cápsula B	Dosagem/ 1 Cápsula	TDR (1 Cáps)	% VRN*
<i>Bifidobacterium longum</i> (2,0 x 10 <sup>10</sup> UFC)	75 mg	75 mg	**
<i>Bifidobacterium infantis</i> (4,0 x 10 <sup>11</sup> UFC)	75 mg	75 mg	**
<i>Bifidobacterium breve</i> (2,7 x 10 <sup>10</sup> UFC)	75 mg	75 mg	**
<i>Lactobacillus helveticus</i> (2,0 x 10 <sup>10</sup> UFC)	75 mg	75 mg	**
<i>Lactobacillus plantarum</i> (6,7 x 10 <sup>11</sup> UFC)	75 mg	75 mg	**
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (8,0 x 10 <sup>10</sup> UFC)	75 mg	75 mg	**
Excipientes	Q.B.P.	Q.B.P.	**
*VRN=Valores de Referência do Nutriente: Regulamento (EU) nº 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de outubro de 2011			
** Não Estabelecido			

## 7. TDR (Toma Diária Recomendada):

1 Cápsula de cada por dia.

## 8. Menções Obrigatórias na rotulagem:

**Ingredientes – Cápsula A:** Bisglicinato de Magnésio; Extrato seco de Oliveira, Extrato seco de Videira-vermelha, L-Triptofano, Cloridrato de piridoxina, Nicotinamida, Cianocobalamina, L-metilfolato de cálcio; Celulose microcristalina, Sais de magnésio de ácidos gordos; **Cápsula:** Gelatina.

**Ingredientes – Cápsula B:** *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, Celulose microcristalina; Sais de magnésio de ácidos gordos; **Cápsula:** Gelatina.

### SUPLEMENTO ALIMENTAR

Quantidade Líquida: Cápsula A – 18,65 g; Cápsula B – 17,15 g; Total: 35,80 g

Toma diária recomendada (TDR): 1 Cápsula de cada por dia.

Lote: / Consumir de preferência antes de:

Não deve ser excedida a toma diária recomendada.

Os suplementos alimentares não são substitutos de um regime alimentar variado e equilibrado, nem de um modo de vida saudável.

Não se recomenda a utilização deste produto em caso de gravidez e aleitamento.

Manter fora da vista e do alcance das crianças.

Não recomendado em caso de hipersensibilidade ou alergia a qualquer um dos constituintes da formulação.

Fabricado em Portugal.

Incluir o Nome e morada do responsável pela colocação no mercado.

## 9. Condições de transporte e armazenagem

**Transporte:** A temperatura e Humidade relativa controlada (25 °C/60%).

**Armazenagem:** Na embalagem original, bem fechada, em lugar fresco e seco ao abrigo da luz.

## 10. Validade

Indicada no acondicionamento primário e secundário (quando aplicável).

## 11. Origem dos Ingredientes:

### Cápsula A

**Bisglicinato de Magnésio** - China – Não UE

*Olea europaeae* - Europa – UE.

*Vitis vinifera* – China – Não UE.

**L-Triptofano** – China – Não UE.

**Cloridrato de piridoxina** – China – Não UE.

**Nicotinamida** – China – Não UE

**Cianocobalamina** – China – Não UE.

**L-metilfolato de cálcio** – Espanha – UE.

### Cápsula B

*Bifidobacterium longum* – Itália – UE.

*Bifidobacterium infantis* – Itália – UE.

*Bifidobacterium breve* – Itália – UE.

*Lactobacillus helveticus* – Itália – UE.

*Lactobacillus plantarum* – Itália – UE.

*Lactobacillus rhamnosus* – Itália – UE.

## 12. Alérgenos

Não contém alérgenos de acordo com o Regulamento (UE) n.º 1169/2011.

## 13. Contaminantes

Pode conter vestígios de lactose.

## 14. Alegações de Saúde:

De acordo com o REGULAMENTO (UE) n.º 432/2012 DA COMISSÃO de 16 de maio de 2012:

O folato contribui para uma normal função psicológica (EFSA Journal nº 2010;8(10):1760);

O folato contribui para a redução do cansaço e da fadiga (EFSA Journal nº 2010;8(10):1760);

O magnésio contribui para a redução do cansaço e da fadiga (EFSA Journal nº 2010;8(10):1807);

O magnésio contribui para o normal funcionamento do sistema nervoso (EFSA Journal nº 2009; 7(9):1216);

O magnésio contribui para uma normal função psicológica (EFSA Journal nº 2010; 8(10):1807);

A niacina contribui para o normal funcionamento do sistema nervoso (EFSA Journal nº 2009; 7(9):1224);

A niacina contribui para uma normal função psicológica (EFSA Journal nº 2010; 8(10):1757);

A niacina contribui para a redução do cansaço e da fadiga (EFSA Journal nº 2010; 8(10):1757);

A vitamina B12 contribui para o normal funcionamento do sistema nervoso (EFSA Journal nº 2010; 8(10):4114);

A vitamina B12 contribui para uma normal função psicológica (EFSA Journal nº 2010; 8(10):4114);

A vitamina B12 contribui para a redução do cansaço e da fadiga (EFSA Journal nº 2010; 8(10):4114);

A vitamina B6 contribui para o normal funcionamento do sistema nervoso (EFSA Journal nº 2009; 7(9):1225);

A vitamina B6 contribui para uma normal função psicológica (EFSA Journal nº 2010; 8(10):1759);

A vitamina B6 contribui para a redução do cansaço e da fadiga (EFSA Journal nº 2010; 8(10):1759);

## **15. Outras advertências:**

Em caso de administração concomitante a indivíduos medicados com anti hipertensores, aconselha-se a medição dos valores da tensão arterial no início do tratamento.

## 16. Outras menções:

Não tem outras informações adicionais.

### A.3 Notificação

#### Notificação Fortibrain Caixa de entrada x




Dep. Técnico (BIOTOP SA)   
para Notificação, Marta ▾

Exmos. Srs.

Vimos por este meio proceder à notificação do suplemento alimentar Fortibrain, 30 + 30 Cápsulas, de acordo com o DL 118/2015.

Em anexo, remetemos tabela de notificação e cópia da rotulagem, mais informamos que o mesmo não apresenta folheto de informação ao consumidor.

Dep. Técnico (BIOTOP SA)

#### 2 anexos







2021

MAFALDA SILVA

UM TÍTULO DE TFSF IMPRESSIONANTE COM UMA MUDANÇA DE INHA