

Avaliação da qualidade e segurança microbiológica de suplementos alimentares comercializados no mercado Português

Ana Cláudia Ventura Costa

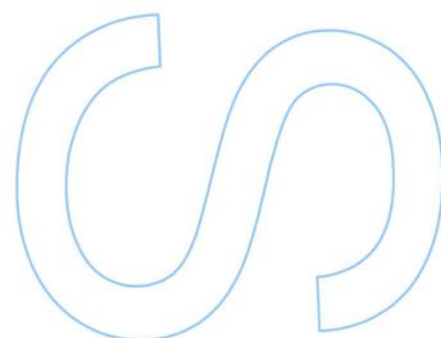
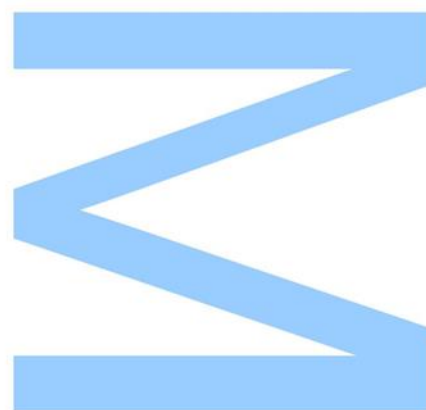
Mestrado em Ciências do Consumo e da Nutrição
Departamento de Geociências, Ambiente e Ordenamento de Território
2016

Orientador:

Doutora Patrícia Antunes, Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências da
Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto

Coorientador:

Doutora Luísa Peixe, Professora Associada com agregação da
Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto





Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____

3

5

6

Agradecimentos

Com o aproximar do final de uma etapa tão importante na minha vida, é fundamental agradecer a todos que me acompanharam e ajudaram neste percurso.

Primeiramente quero agradecer à professora Doutora Patrícia Antunes, enquanto orientadora deste trabalho, pela oportunidade que me concedeu de desenvolver este projeto bem como por todo o seu delineamento. Por todos os ensinamentos que me transmitiu, pelo espírito de rigor e excelência que me incutiu e por toda a dedicação, paciência, apoio e incansável orientação durante esta fase. Um sincero obrigado.

À Doutora Luísa Peixe, enquanto coorientadora deste trabalho e responsável pelo grupo de investigação de Microbiologia do UCIBIO/REQUIMTE no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, por me ter permitido integrar o seu grupo.

A todos os colegas de trabalho e funcionários do laboratório por me acolherem e ajudarem sempre que necessário, em particular à Joana Campos por toda a paciência, apoio e ajuda durante todo o trabalho laboratorial, e à professora Doutora Carla Novais pela partilha de conhecimentos e à professora Doutora Nazaré Pestana pela partilha de conhecimentos.

Aos meus pais, aos quais devo tudo o que sou hoje. Por todo o apoio, incentivo, amor e carinho e por acreditarem que seria capaz. Sem eles teria sido impossível chegar até aqui.

Ao Gustavo, por toda a paciência, ajuda, força, carinho, amor e dedicação. Por todas as palavras de apoio e incentivo essenciais para me ajudar a concluir esta fase.

Às minhas colegas de curso e amigas Telma Silva, Joana Pinto e Tânia Pinheiro pela amizade, por todas as conversas e desabafos que tornaram esta jornada muito mais fácil.

À minha amiga Andreia Rodrigues pelo apoio, incentivo e amizade ao longo destes anos.

À minha amiga de sempre e maninha, Rita Alves, pela amizade de longa data, que me tem ensinado o verdadeiro significado de amizade.

O meu mais sincero agradecimento a todos!

Este trabalho foi financiado por:

- Projeto com a referência UID/MULTI/04378/2013 – POCI/01/0145/FEDER/007728 com o apoio financeiro da FCT/MEC (Fundação para a Ciência e a Tecnologia / Ministério da Educação e Ciência) através de fundos nacionais e cofinanciado pelo FEDER, no âmbito do Acordo de Parceria PT2020.

- Projeto FOODnanoHEALTH - Qualidade e Segurança Alimentar – uma abordagem nano (tecnológica) com a referência NORTE-01-0145-FEDER-000011, Comissão de Coordenação e Desenvolvimento Regional do Norte (CCDR-N) / NORTE2020 / Portugal 2020.

- Colaboração com a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE) que cedeu parte das amostras analisadas neste estudo.

Resumo

A crescente procura e interesse dos consumidores por uma alimentação equilibrada, inserida num estilo de vida saudável, tem sido associada a uma generalização e aumento da utilização de suplementos alimentares, alguns de venda livre, para diversos fins, incluindo para auxiliar na perda de peso. No entanto, estes produtos poderão representar um perigo microbiológico para os consumidores, nomeadamente por conterem ingredientes de diversas origens (ex. plantas e extratos de plantas) e/ou serem produzidos em países externos à União Europeia. Assim, foi objetivo deste estudo analisar a qualidade e segurança microbiológica de suplementos alimentares para emagrecimento comercializados no mercado Português. Foram recolhidas 20 amostras de suplementos alimentares (n=8-com extratos secos de plantas; n=8-com extratos secos de plantas + fonte de cafeína; n=4-algas) disponíveis em 10 locais de venda (ervanárias, superfícies comerciais e centros dietéticos) de Lisboa e Porto. A qualidade e segurança microbiológica dos suplementos foi determinada de acordo com métodos de referência internacionais para a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, contagem e pesquisa de *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus coagulase positivo*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes* e pesquisa de *Salmonella* e *Enterococcus*.

Todas as amostras analisadas apresentaram qualidade microbiológica aceitável para a maioria dos parâmetros, verificando-se ausência de bactérias indicadoras de contaminação fecal como *E. coli* e de bactérias patogénicas como *Salmonella*, *L. monocytogenes* e *Staphylococcus coagulase positivo*. No entanto, os suplementos com algas apresentaram-se com má qualidade microbiológica para pelo um dos parâmetros estudados, nomeadamente contagem de microrganismos aeróbios mesófilos (n=1) e de *Enterobacteriaceae* (n=1) e pesquisa de *Enterococcus* (n=2) e de *B. cereus* (n=3). Nas amostras com extratos de plantas também se detetou má qualidade microbiológica devido à presença de *Enterococcus* (n=2) e/ou de *B. cereus* (n=2).

Apesar de globalmente se terem evidenciado baixos níveis de contaminação, este estudo alerta para a possibilidade de contaminações de origem fecal e/ou ambiental que podem comprometer a qualidade e a segurança dos suplementos alimentares. Estes dados reforçam a necessidade de controlo ao longo da cadeia de produção, de um reforço na fiscalização e ainda de mais estudos que verifiquem a qualidade e segurança microbiológica dos suplementos alimentares comercializados em Portugal.

Palavras-chave: suplementos alimentares, emagrecimento, plantas, segurança alimentar, qualidade microbiológica.

Abstract

The growing demand and interest of consumers for a balanced diet included in a healthy lifestyle has been linked to the widespread and increased consumption of food supplements, some over-the-counter, for various purposes, including to aid in weight loss. However, these products may represent a microbiological hazard to consumers, since they can contain ingredients from several sources (e.g. plants and plant extracts) and/or being produced in countries outside the European Union. The aim of this study was to analyze the microbiological quality and safety of food supplements for weight loss sold in the Portuguese market. Twenty samples from food supplements (n=8-with dry extracts of plants; n=8-with dry extracts of plants + caffeine source; n=4-algae) were collected in 10 stores (health food stores, commercial surfaces and dietary centers) from Lisbon and Porto.

The microbiological quality and safety analysis of food supplements was determined according to international standard methods for enumeration of mesophilic aerobic microorganisms, enumeration and detection of *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, coagulase-positive *Staphylococcus*, *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes* as well as detection of *Salmonella* and *Enterococcus*.

All analyzed samples presented an acceptable microbiological quality for most of the microbiological parameters, with an absence of indicator bacteria of fecal contamination such *E.coli* and absence of pathogenic bacteria such as *Salmonella*, *L. monocytogenes* and coagulase-positive *Staphylococcus*. However, the algae supplements presented poor microbiological quality for at least one of the studied parameters, enumeration of mesophilic aerobic bacteria (n=1) and *Enterobacteriaceae* (n=1) and detection of *Enterococcus* (n=2) and *B. cereus* (n=3). In samples with plant extracts, a poor microbiological quality was also detected due to the presence of *Enterococcus* (n=2) and/or *B. cereus* (n=2).

Although globally low levels of contamination were present in our samples, this study alert for the possibility of fecal and/or environmental contamination which can compromise the quality and safety of food supplements. These data also reinforce the need for control along the food chain, strengthening surveillance and further studies to verify the microbiological quality and safety of food supplements sold in Portugal.

Keywords: Dietary supplements, weight loss, plants, food safety, microbiological quality.

Índice

Lista de Abreviaturas.....	vii
Lista de tabelas	viii
Lista de figuras.....	ix
1. Introdução	1
1.2 Enquadramento legal	3
1.2.1 União Europeia	3
1.2.2 Portugal	6
1.3 Consumo de suplementos alimentares	8
1.3.1 Consumo a nível global.....	8
1.3.2 Consumo na Europa	11
1.3.3 Consumo em Portugal	12
1.4 Contaminação microbiológica de suplementos alimentares	14
2. Objetivos	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos	17
3. Material e métodos	18
3.1 Plano de amostragem	18
3.2 Preparação das amostras	19
3.3 Parâmetros microbiológicos	19
3.3.1 Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos	20
3.3.2 Contagem e pesquisa de <i>Enterobacteriaceae</i>	20
3.3.3 Contagem e pesquisa de <i>Escherichia coli</i>	21
3.3.4 Pesquisa de <i>Enterococcus</i>	21
3.3.5 Contagem e pesquisa de <i>Staphylococcus Coagulase Positivo</i>	21
3.3.6 Contagem e pesquisa de <i>Bacillus cereus</i>	22
3.3.7 Pesquisa e contagem de <i>Listeria monocytogenes</i>	22
3.3.8 Pesquisa de <i>Salmonella</i>	23

3.4	Critérios microbiológicos	23
3.5	Ensaio Piloto	24
4.	Resultados e Discussão	25
4.1	Indicadores de qualidade	28
4.2	Bioindicadores/indicadores de higiene	30
4.3	Indicadores de Segurança	33
5.	Conclusões.....	39
6.	Referências Bibliográficas	40

Lista de Abreviaturas

EU – União Europeia

DGAV – Direção Geral de Alimentação e Veterinária

ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

EFSA – European Food Safety Authority

OMS/WHO – Organização Mundial de Saúde / World Health Organization

FCUP – Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

FCNAUP - Faculdade de Ciências do Consumo e da Nutrição da Universidade do Porto

Lista de tabelas

TABELA 1: FREQUÊNCIA DE AMOSTRAS CLASSIFICADAS EM ACEITÁVEIS E NÃO ACEITÁVEIS, POR PARÂMETRO MICROBIOLÓGICO E TIPO DE AMOSTRA	27
--	----

Lista de figuras

FIG. 1: MERCADO GLOBAL DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES VS MERCADO FARMACÊUTICO. FONTE: EUROMONITOR INTERNATIONAL : TRENDS AND INSIGHTS IN THE GLOBAL CONSUMER HEALTH MARKET	8
FIG. 2: CATEGORIAS PRINCIPAIS DOS SUPLEMENTOS ALIMENTARES RELATIVAMENTE A PROBLEMA DE SAÚDE.....	9
FIG. 3: VALOR DO MERCADO DOS SUPLEMENTOS ALIMENTARES POR ESCALÕES DE VALOR, EM 2013	9
FIG. 4: CRESCIMENTO GLOBAL DE VENDAS DOS SUPLEMENTOS ALIMENTARES	10
FIG. 5: PREVISÃO DE CRESCIMENTO DE VENDAS DOS SUPLEMENTOS À BASE DE PLANTAS ATÉ 2025	10
FIG. 6: CRESCIMENTO DO MERCADO DOS SUPLEMENTOS NA EUROPA.	12
FIG. 7: ESTIMATIVA DE VENDAS DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES: 2011-2016. FONTE: EUROMONITOR _ CONSUMER HEALTH IN PORTUGAL	13
FIG. 8: FREQUÊNCIA DE AMOSTRAS CLASSIFICADAS EM ACEITÁVEIS E NÃO ACEITÁVEIS, POR PARÂMETRO MICROBIOLÓGICO E TIPO DE AMOSTRA.	26
FIG. 9: FREQUÊNCIA DE AMOSTRAS CLASSIFICADAS EM ACEITÁVEL E NÃO ACEITÁVEL PARA O PARÂMETRO CONTAGEM DE MICRORGANISMOS AERÓBIOS MESÓFILOS POR CATEGORIA DO SUPLEMENTO	28
FIG. 10: FREQUÊNCIA DE AMOSTRAS CLASSIFICADAS EM ACEITÁVEL E NÃO ACEITÁVEL PARA O PARÂMETRO CONTAGEM DE <i>E. COLI</i> POR CATEGORIA DO SUPLEMENTO.	30
FIG. 11: FREQUÊNCIA DE AMOSTRAS CLASSIFICADAS EM ACEITÁVEL E NÃO ACEITÁVEL PARA O PARÂMETRO PESQUISA DE <i>ENTEROCOCCUS</i> POR CATEGORIA DO SUPLEMENTO	32
FIG. 12: FREQUÊNCIA DE AMOSTRAS CLASSIFICADAS EM ACEITÁVEL E NÃO ACEITÁVEL PARA O PARÂMETRO CONTAGEM DE <i>ENTEROBACTERIACEAE</i> POR CATEGORIA DO SUPLEMENTO	32
FIG. 13: FREQUÊNCIA DE AMOSTRAS CLASSIFICADAS EM ACEITÁVEL E NÃO ACEITÁVEL PARA O PARÂMETRO CONTAGEM DE <i>STAPHYLOCOCCUS</i> COAGULASE POSITIVO POR CATEGORIA DO SUPLEMENTO.	34
FIG. 14: FREQUÊNCIA DE AMOSTRAS CLASSIFICADAS EM ACEITÁVEL E NÃO ACEITÁVEL PARA O PARÂMETRO PESQUISA DE <i>SALMONELLA</i> POR CATEGORIA DO SUPLEMENTO.	35
FIG. 15: FREQUÊNCIA DE AMOSTRAS CLASSIFICADAS EM ACEITÁVEL E NÃO ACEITÁVEL PARA O PARÂMETRO PESQUISA DE <i>L. MONOCYTOGENES</i> POR CATEGORIA DO SUPLEMENTO	36

FIG. 16: FREQUÊNCIA DE AMOSTRAS CLASSIFICADAS EM ACEITÁVEL E NÃO ACEITÁVEL PARA
O PARÂMETRO PESQUISA DE *B. CEREUS* POR CATEGORIA DO SUPLEMENTO. 38

1. Introdução

Uma alimentação adequada e variada fornece, por norma, os nutrientes necessários para um adequado desenvolvimento, bem-estar e manutenção da saúde dos humanos. No entanto, o acesso a uma alimentação saudável poderá estar comprometido, quer pelos diferentes estilos de vida atuais (ex. falta de tempo, falta de acesso a alimentos saudáveis, stress e excesso de trabalho), quer por diferentes condições socioeconómicas da população mundial (Campos et al. 2012). Ao longo dos últimos anos tem-se verificado um aumento da ingestão total diária de calorias, níveis decrescentes de atividade física e o aumento do consumo de alimentos pobres nutricionalmente, estando estes fatores relacionados com o aumento de doenças crónicas como a obesidade, hipertensão e doenças cardiovasculares, níveis de colesterol elevados e diabetes (Bastien et al. 2014, Ng et al. 2014). Estima-se que em todo o mundo, mais de mil milhões de adultos têm excesso de peso e que pelo menos 300 milhões de pessoas são consideradas obesas, verificando-se que a obesidade tem atingido proporções epidémicas a nível global (WHO 2013).

O consumidor atual, com mais acesso a informação e com maior esperança de vida, apresenta cada vez mais preocupação por seguir uma alimentação equilibrada inserida num estilo de vida saudável (Medeiros 2008). Desta forma, as preocupações atuais com a melhoria e manutenção da saúde, com a beleza física, qualidade de vida e bem-estar são apontadas como causas principais para a procura e o consumo de suplementos alimentares para diversos fins (Bailey *et al.* 2013). Por exemplo, a utilização de suplementos alimentares é procurada por providenciar nutrientes em falta numa determinada dieta, para melhorar a performance física dos desportistas e também para potenciar benefícios na perda/controlo de peso (Wing *et al.* 2005). De facto, tem-se verificado o uso generalizado de suplementos alimentares, quer para melhorar a qualidade de vida (ex. controlo do peso), quer para prevenir doenças (ex. constipações, doenças cardiovasculares, stress), sendo o seu uso generalizado por grande parte pela população dos países desenvolvidos (Getman 2011, Campos *et al.* 2012). Dentro das diversas categorias de suplementos alimentares, destacam-se os suplementos para a saúde osteoarticular, para fortalecer o sistema imunitário e suplementos para a saúde em geral onde se inserem os suplementos alimentares para emagrecimento (Euromonitor 2014).

Atualmente, a utilização de suplementos alimentares para emagrecimento é comum entre a população, sendo usados como forma de diminuir o apetite e bloquear a

absorção de gorduras e dos hidratos de carbono (Hackett *et al.* 2012). Além disso, a sua utilização sem aconselhamento médico/nutricional tem sido cada vez mais frequente, podendo ter consequências para a saúde (Blanck *et al.* 2007). Muitos destes suplementos alimentares para emagrecimento têm ingredientes de diversas origens, incluindo plantas ou extratos de plantas, tais como a alcachofra (ação estimulante e diurética), a centelha asiática (propriedades diuréticas), o fucus (ação estimulante e de regulação do trânsito intestinal) e o sene (propriedades laxativas) (Verdi *et al.* 2013). Desta forma, os suplementos alimentares são utilizados na redução do peso, pois fornecem nutrientes em dietas que sejam restritas em calorias, estimulam ou aumentam a percentagem de perda de peso através de mecanismos como a diminuição do apetite ou contribuindo para a aceleração do metabolismo (Dwyer *et al.* 2005).

Adicionalmente, estes produtos são muito diversificados, podendo ter ingredientes com origem em diversas regiões geográficas, e de fácil acesso (podendo ser adquiridos sem receita médica), estando disponíveis para venda em diversos locais (ex. farmácias e parafarmácias, ervanárias e superfícies comerciais, ginásios e através da internet) e são apresentados em forma de chás, óleos, comprimidos e cápsulas (Brudnak 2002). Os ingredientes incluem diversas fontes de nutrientes (ex. vitaminas, minerais, aminoácidos), mas também podem constar vários tipos de plantas, nomeadamente extratos secos ou até mesmo partes da planta tais como folhas, raízes, flores e sementes (Sanzini *et al.* 2011).

1.2 Enquadramento legal

1.2.1 União Europeia

A crescente procura por suplementos alimentares tem motivado a criação de legislação, de modo a definir as características base destes produtos, tais como os ingredientes e quantidades permitidas, métodos de fabrico e registo para a introdução no mercado (Petroczi *et al.* 2011). Sendo estes produtos um conceito de género alimentício recente, ainda é necessário melhorar alguns pontos relativos à legislação em vigor e harmonização conceitual. De facto, só após o lançamento do livro branco sobre segurança alimentar, que reúne um conjunto de ações necessárias para complementar e modernizar a legislação na União Europeia no domínio da alimentação, se conseguiu começar a harmonizar a lei respetiva a estes alimentos (Coppens *et al.* 2014). Desde 2002, a União Europeia (EU) tem trabalhado no sentido de harmonizar a legislação relativa aos suplementos alimentares para que as mesmas se apliquem em todos os Estados Membros (Coppens *et al.* 2014).

Na União Europeia, existem várias diretivas e regulamentos para os suplementos alimentares. Esta diversidade está relacionada com a existência de uma grande variedade de categorias e constituintes. Desta forma, relativamente à categoria em que se inserem, este tipo de produtos são regulamentados de acordo com os seguintes regulamentos e diretivas: i) Regulamento (CE) n.º 178/2002 para constituintes derivados de alimentos; ii) Diretiva 2002/46/EC que regula todos os suplementos que contenham maioritariamente vitaminas ou minerais; iii) Regulamento (CE) n.º 1170/2009 relativamente a vitaminas e minerais e respetivas quantidades que constem nos suplementos; iv) Regulamento (CE) n.º 258/97 que regula os novos alimentos e todos os ingredientes alimentares, bem como os ingredientes alimentares com novas moléculas ou moléculas cuja estrutura primária foi intencionalmente modificada.

O Regulamento (CE) n.º 178/2002 é a base da lei alimentar europeia, tendo como objetivo garantir a proteção e segurança alimentar, assim como os interesses dos consumidores em relação aos alimentos. Aplica-se a todos os géneros alimentícios definindo alimento (ou género alimentício) como “substância ou produto, transformado, parcialmente transformado ou não transformado, passível de ser consumido pelos humanos” (Coppens *et al.* 2014). Este regulamento estabelece os requisitos principais da legislação alimentar com o objetivo de fornecer a base para garantir um elevado nível de proteção da saúde humana. Neste regulamento, salientam-se alguns artigos

mais relevantes para a segurança dos suplementos alimentares. Assim, o Art.º 14º refere quais os requisitos de segurança dos géneros alimentícios, o Art.º 17º regula as responsabilidades dos produtores, de modo a que os produtos cumpram a lei, o Art.º 18 é referente à obrigatoriedade da existência de um sistema de rastreabilidade dos produtos e o Art.º 19º é sobre a obrigação da possibilidade de retirada imediata do mercado de um género alimentício que não cumpra as especificações, assim como a obrigação da comunicação às autoridades locais. Uma vez que esta legislação se aplica a todos os géneros alimentícios, inclui também os suplementos alimentares (Coppens *et al.* 2014, Anadón *et al.* 2016).

A Diretiva 2002/46/EC, que surgiu em 10 de junho de 2002, é umas mais importantes legislações da EU relativamente a suplementos alimentares. É esta Diretiva que estabelece regras harmonizadas para a definição de suplementos e introduz regras específicas sobre vitaminas e minerais nestes produtos. Nesta diretiva, os suplementos alimentares são definidos “como géneros alimentícios, sendo fontes concentradas de nutrientes (vitaminas e sais minerais) e substâncias com efeito nutricional e/ou fisiológico que se destinam a complementar a dieta”. Estes produtos podem apresentar-se no mercado em forma de comprimidos, cápsulas, saquetas e até mesmo em forma líquida (Pravst 2015, Anadón *et al.* 2016).

Além das vitaminas e sais minerais, os suplementos podem ainda ter na sua constituição outras substâncias com efeito nutricional ou fisiológico, tais como aminoácidos, ácidos gordos essenciais, fibras, plantas e extratos de plantas (Andrez 2015). A lista de vitaminas e minerais autorizados e que podem ser incorporados nos suplementos alimentares está presente no anexo I do Regulamento (CE) n.º1170/2009(Andrez 2015)(Andrez 2015)(Andrez 2015)(Andrez 2015) De todos os ingredientes, os nutrientes ou substâncias que tenham efeito nutricional ou fisiológico presente nos suplementos, devem apresentar-se numericamente. Relativamente às vitaminas e minerais devem constar as quantidades especificadas nos anexos I e II do Regulamento (CE) n.º 1170/2009, da Comissão de 30 de novembro de 2009 (Andrez 2015). Cada rótulo deverá conter:

- Designação das categorias de nutrientes ou substâncias que caracterizam o produto ou uma referência específica à sua natureza;
- Toma diária recomendada;
- Advertência para não exceder a toma diária recomendada;
- Advertência para manter o produto fora do alcance das crianças;

- Advertência para que os suplementos alimentares não substituam um plano alimentar variado.

Relativamente a outras substâncias que não vitaminas e minerais, para serem utilizadas como ingredientes de suplementos alimentares, têm de cumprir os requisitos do Regulamento (CE) n.º 258/97. Este regulamento estabelece regras para a introdução de novos alimentos e ingredientes alimentares. Os novos alimentos e ingredientes podem ser apresentados em 4 categorias: (i) alimentos que apresentem novas moléculas ou moléculas cuja estrutura primária tenha sido intencionalmente modificada; (ii) que contenham ingredientes isolados a partir de microrganismos como fungos e algas; (iii) consistam em ingredientes obtidos a partir de novas plantas ou animais, exceto os alimentos e ingredientes alimentares obtidos por meio tradicional; (iv) alimentos que tenham sofrido alterações no valor nutricional (Anadón *et al.* 2016).

Para os suplementos alimentares que contenham plantas ou extratos de plantas ainda não existe legislação específica na EU, além da legislação geral alimentar do Regulamento (CE) n.º 178/2002. Neste Regulamento, foi estabelecida a *European Food Safety Authority* (EFSA) em 2002, como uma entidade independente que produz pareceres científicos e opiniões que depois são utilizadas pela Comissão Europeia para criar e adotar legislação na área alimentar (Anadón *et al.* 2016). Assim, em 2009, a EFSA publicou um compêndio de substâncias botânicas, contendo todas as substâncias que podem trazer malefícios para a saúde quando utilizadas em suplementos alimentares. Este compêndio teve como objetivo facilitar a avaliação da segurança de produtos botânicos, simplificando a sua identificação e os perigos e também sinalizando as plantas e extratos de plantas que possam colocar em causa a saúde humana (Anadón *et al.* 2016).

Em relação à rotulagem, são ainda permitidas alegações nutricionais e de saúde que cumpram as disposições do Regulamento (CE) n.º 1924/2006, modificados pelos Regulamentos n.º 107/2008 e 109/2008 e pelos Regulamento n.º 1169/2011 (relativo à informação ao consumidor), e Regulamento n.º 1047/2012. O Regulamento (CE) n.º 1924/2006 define então alegação de saúde como “qualquer alegação que declare, sugira ou implique uma relação entre uma categoria de alimentos e a saúde”, sendo que todas as alegações devem estar autorizadas e incluídas na lista de alegações autorizadas. As quantidades necessárias de consumo para obter o efeito benéfico indicado devem constar na rotulagem, sendo que estes alimentos devem ser ingeridos numa dieta variada e equilibrada (Pravst 2015). Ainda neste regulamento, são referidas 3 categorias relativamente às alegações nutricionais e de saúde: (i) alimentos que desempenhem uma função relativamente à sensação de fome e saciedade; (ii)

alegações que indiquem que o consumo de um determinado alimento reduza significativamente o fator de risco e desenvolvimento de uma doença; (iii) alegações relativas à saúde e desenvolvimento das crianças (Pravst 2015).

Para serem comercializados, os suplementos têm de ser legislados também de acordo com a Diretiva 2002/46/CE onde se considera que, no caso de se tratar da primeira comercialização na União Europeia, o produtor, no caso em que o produto tenha origem num dos Estados-Membros, ou o importador, se a origem do produto for de outro país, notifica a autoridade competente, de acordo com o processo previsto no Artigo 9.º-A. Da mesma forma, se a comercialização do suplemento alimentar for recorrente na União Europeia, o produtor ou o importador devem seguir o processo de notificação que consta no mesmo artigo e notificar a autoridade competente da identidade da autoridade destinatária da primeira notificação de comercialização (Andrez 2015).

1.2.2 Portugal

Em Portugal, enquanto estado membro da EU, a base legislativa nacional referente aos suplementos alimentares é o Decreto-Lei n.º 118/2015 de 23 de Junho, que veio alterar o Decreto-Lei n.º 136/2003 de 28 de Junho (transposição da Diretiva comunitária 2002/46/CE). Neste documento (Decreto-Lei n.º 118/2015) consta a definição legal de suplementos alimentares: "Suplementos alimentares, são 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".

A legislação aplicada em Portugal é comum aos restantes estados membros da União Europeia e desta forma a lista de vitaminas e minerais presentes nos suplementos alimentares, de acordo com o Decreto – Lei n.º 118/2015, têm de estar evidenciadas no anexo I e pelo anexo II do Regulamento (CE) n.º 1170/2009. Todas as substâncias que constem no anexo II devem cumprir os requisitos de pureza previstos na legislação em vigor. Relativamente a alegações nutricionais e de saúde, devem estar de acordo com as regras presentes no Regulamento (CE) n.º 1924/2006, alterado pelos Regulamentos n.º 107/2008 e 109/2008 e também pelo Regulamento

n.º 1169/2011 e 1047/2012. Os nutrientes ou substâncias que tenham efeito nutricional ou fisiológico devem ser enunciados de forma numérica e as vitaminas e minerais devem ser apresentados de acordo com as especificações presentes nos anexos I e II do Regulamento (CE) n.º 1170/2009. Para a comercialização de suplementos alimentares em Portugal, tal como se verifica na União Europeia, deve ser cumprida a legislação segundo a Diretiva 2002/46/CE já evidenciado acima.

Em Portugal, a Direção Geral da Alimentação e Veterinária (DGAV) é a entidade competente para assegurar o registo das notificações da comercialização dos suplementos alimentares, de acordo com o Decreto-Lei n.º 118/2015 (DGAV 2016). Segundo o Regulamento (CE) n.º 178/2002, a fiscalização dos suplementos é da competência da Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE), que deverá garantir o cumprimento de todas as normas legislativas em vigor.

Relativamente aos critérios microbiológicos aplicáveis a géneros alimentícios, segundo o Regulamento n.º 2073/2005, os géneros alimentícios não devem conter microrganismos nem as suas toxinas e metabolitos em quantidades que representem um risco inaceitável para a saúde humana. Neste regulamento apenas é referido um critério específico para *L. monocytogenes* em “alimentos prontos a comer destinados a fins medicinais específicos”, sendo que só é aceitável a ausência desta bactéria.

1.3 Consumo de suplementos alimentares

1.3.1 Consumo a nível global

Tem-se verificado um aumento global no consumo de suplementos alimentares (Rovira *et al.* 2013). De acordo com os dados da *Euromonitor*, o mercado de suplementos alimentares é muito dinâmico. Assim, na **Figura 1** verifica-se que apesar do mercado dos medicamentos sem receita médica ser superior ao dos suplementos alimentares, quer em volume de vendas a retalho, quer em percentagem da taxa de crescimento, este mostra uma tendência positiva (Stoimenova 2010).

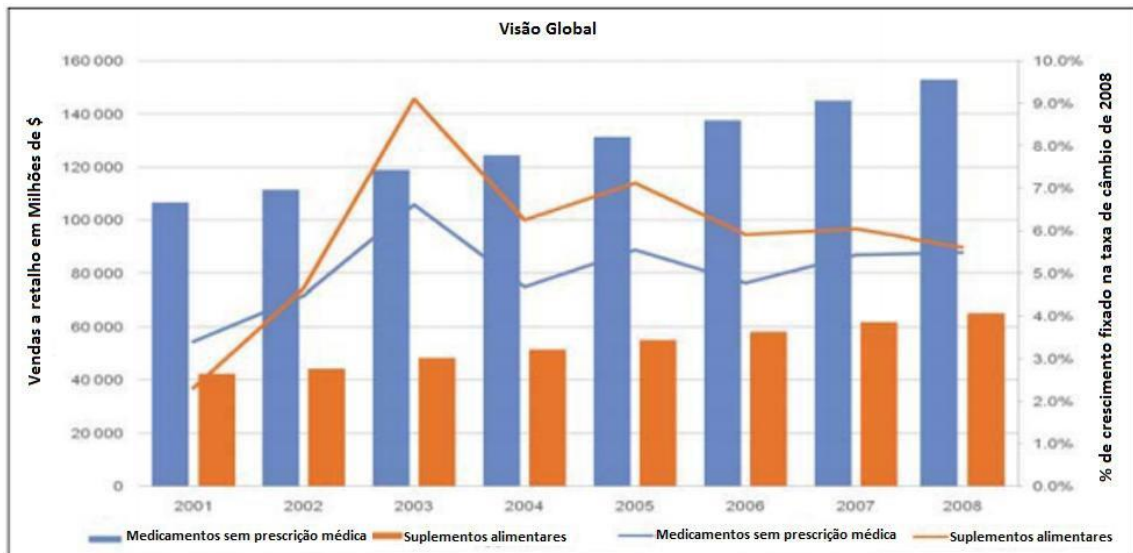


Fig. 1: Mercado global de suplementos alimentares vs mercado farmacêutico. Fonte: Euromonitor International : Trends and Insights in The Global Consumer Health Market

As principais categorias de suplementos alimentares (**Figura 2**) que evidenciam um maior número de vendas a retalho a nível mundial são: suplementos para a saúde em geral (22%), onde se incluem os suplementos alimentares para emagrecimento, os suplementos para a saúde osteoarticular e também os suplementos que fortalecem o sistema imunitário (Euromonitor 2014).



Fig. 2: Categorias principais dos suplementos alimentares relativamente a problema de saúde

Fonte: Euromonitor International (2014). Trends and Insights in The Global Consumer Health Market

Ainda de acordo com a *Euromonitor*, os dados referem que em 2013, os EUA, China, Japão, Coreia do Sul, Itália e Rússia, revelaram ser os principais mercados de suplementos alimentares, apresentando valores de consumo superiores a \$ 5000 milhões de dólares para os três primeiros países mencionados e entre \$1500 – 5000 milhões de dólares para os restantes (**Figura 3**) (Euromonitor 2015).

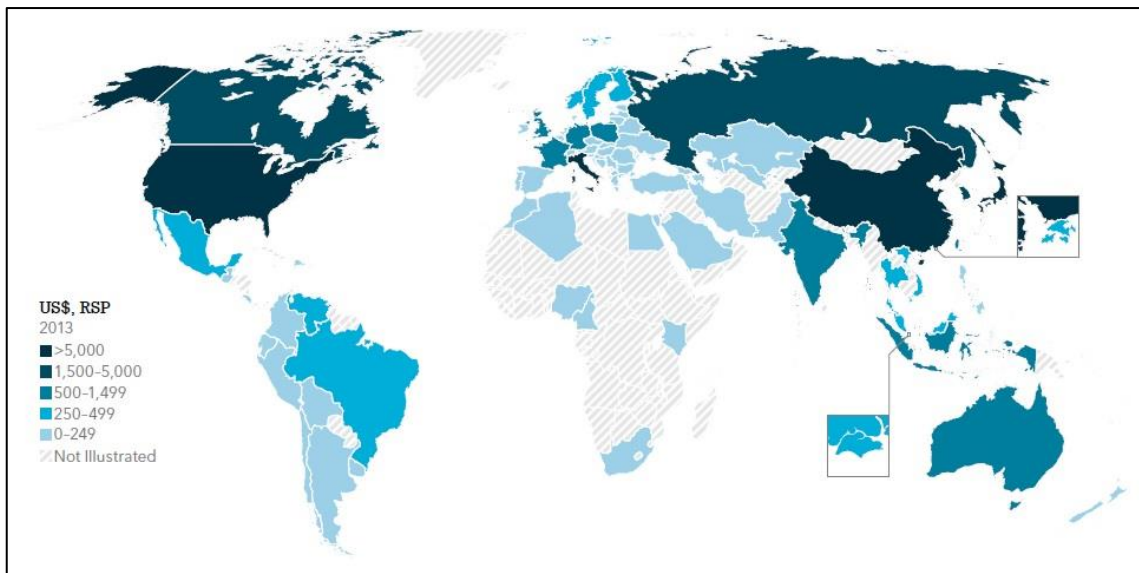


Fig. 3: Valor do mercado dos suplementos alimentares por escalões de valor, em 2013

Adaptado de: http://www.euromonitor.com/medialibrary/PDF/pdf_dietarySupplements-v1.1.pdf

Relativamente a projeções de vendas globais para os próximos anos (**Figura 4**), verifica-se uma projeção positiva para 2018, onde se espera que estes produtos excedam os \$60 000 milhões de dólares (Euromonitor 2014).

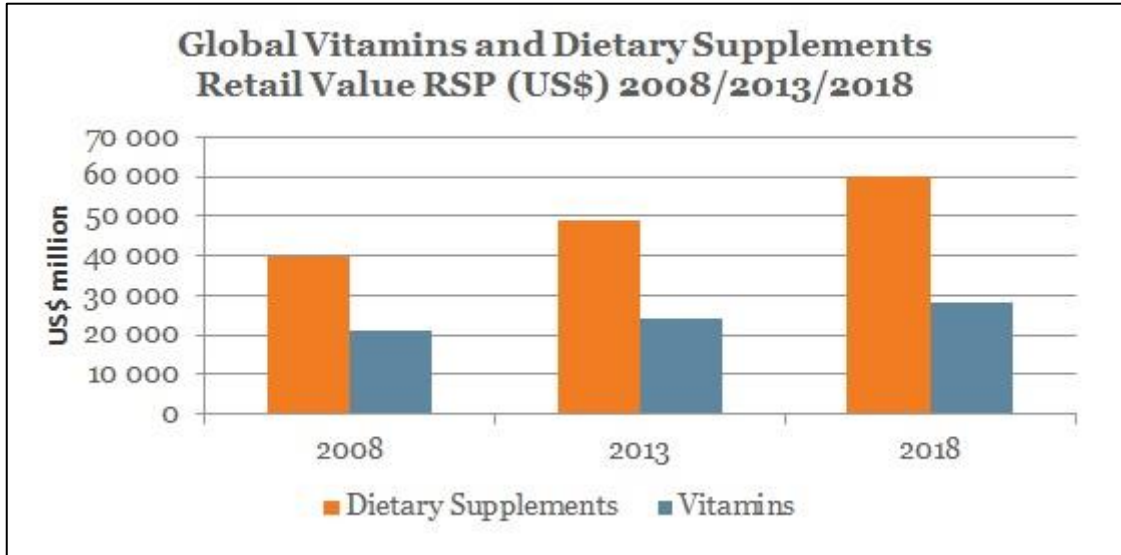


Fig. 4: Crescimento global de vendas dos suplementos alimentares

Adaptado de: Euromonitor International (2014). Trends and Insights in The Global Consumer Health Market

Em relação ao mercado de suplementos alimentares à base de extratos de plantas, está previsto um aumento do crescimento, estimando-se que no ano de 2025 este mercado atinja um valor de aproximadamente \$76 mil milhões de dólares (**Figura 5**)

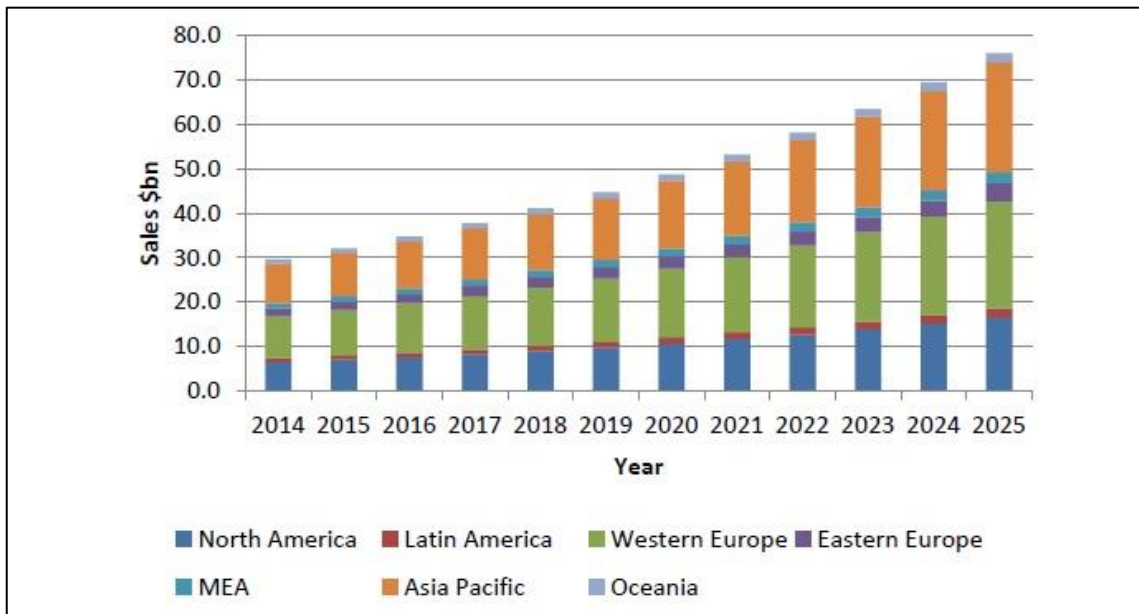


Fig. 5: Previsão de crescimento de vendas dos suplementos à base de plantas até 2025

Adaptado de: (Visiongain 2014) Functional foods & Nutraceuticals Market Forecast 2015-2025

1.3.2 Consumo na Europa

Na Europa, no ano de 2012, verificou-se uma maior percentagem de vendas de suplementos alimentares para a categoria vitaminas e minerais. Este consumo representava cerca de 50-55% do mercado total de vendas dos suplementos alimentares, contabilizando-se entre €4.1 a €4.73 mil milhões de euros (Nicoletti 2012). A partir do ano de 2000 e no início da década atual, verificou-se algum declínio no consumo dos suplementos alimentares, devido principalmente à crise económica vivenciada na maioria dos países europeus (Euromonitor 2015). Por exemplo, na Europa Ocidental, em 2012, verificou-se um decréscimo das vendas destes produtos em cerca de 3,18%. Este valor foi obtido comparando o valor das vendas dos suplementos, sendo que em 2008 se verificou um total de 6363,2 milhões de euros e em 2012 6160,3 milhões de euros (Euromonitor 2015). Apesar de alguma diminuição nas vendas dos suplementos, em países como o Reino Unido e a Irlanda já se tem verificado um retorno do crescimento deste setor. No Reino Unido, entre 2010 e 2012, verificou-se um valor de mercado de 727 milhões de euros que contrasta com o valor apresentado no período entre 2008 e 2010 de 673,4 milhões de euros. Na Irlanda verificou-se um crescimento menor, tendo-se verificado um aumento de 52,8 milhões de euros para 53 milhões de euros entre 2010 e 2012. De toda a Europa, o mercado mais próspero para os suplementos alimentares é o mercado Italiano apresentando um valor de 1527,9 mil milhões de euros em vendas no ano de 2013 (Euromonitor 2015).

Apesar do setor dos suplementos alimentares ter sido afetado pela crise económica dos últimos anos, podemos considerar que, de um modo geral, a tendência de crescimento na Europa foi positiva, apresentando um valor de CAGR (taxa de crescimento anual composta) de 5,07. Este crescimento pode ser justificado pelo aumento da procura de suplementos à base de plantas e/ou com extratos de plantas (ex. presentes em suplementos para perda de peso/emagrecimento) (**Figura 6**) (Felício 2006).

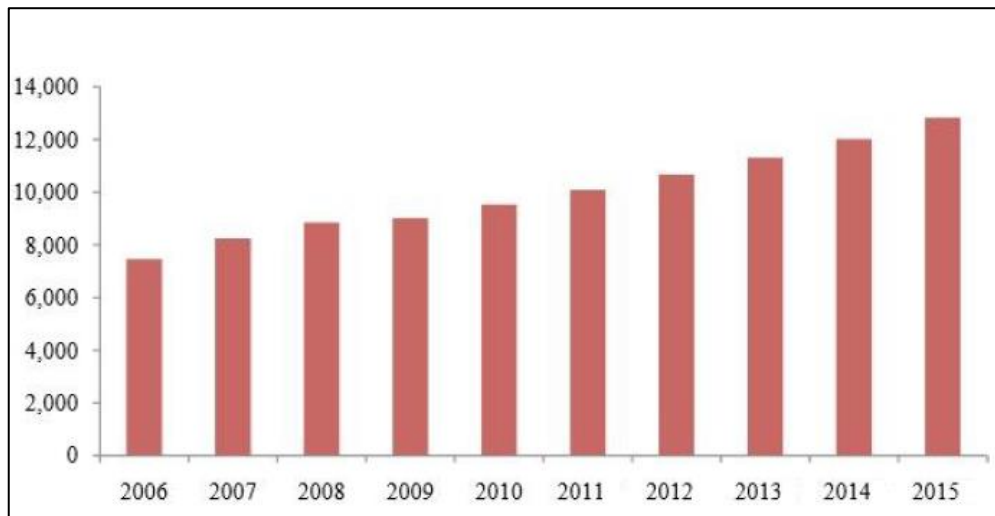


Fig. 6: Crescimento do mercado dos suplementos na Europa.

Adaptado de: AM Mindpower Solutions (2011).

1.3.3 Consumo em Portugal

Tal como se tem observado a nível mundial, o consumo de suplementos alimentares em Portugal também tem apresentado uma tendência de consumo crescente nas últimas décadas (Felício 2006). Por exemplo, no estudo de Felício (2006), 65% da população afirmou consumir suplementos alimentares, sendo que os mais consumidos foram as vitaminas (65%) e minerais (52%), seguido dos suplementos à base de plantas (38%) e suplementos energéticos (34%). Verificou-se uma maior prevalência de consumo nas mulheres (63%), sendo que os motivos mais apontados para a toma destes produtos estavam relacionados com a fadiga e dificuldades de concentração (26%), fortalecimento e prevenção de doenças (24%), saúde (22%) e estética (10%). Mais recentemente, em 2013, estimou-se que 12,7% dos Portugueses inquiridos consumiam suplementos alimentares (ex. vitaminas, óleo de fígado de bacalhau e/ou outros) (Marktest 2013). Destes dados verificou-se que as mulheres apresentam uma percentagem maior de consumo destes produtos (15%) face aos homens (10.1%).

Em 2014, este segmento de mercado teve mesmo um crescimento apresentando uma cota de mercado de cerca de 50% em relação ao ano anterior, correspondendo um crescimento de 2% durante o ano mencionado (Euromonitor 2015). Adicionalmente, até ao ano de 2019 estima-se que este mercado atinja os € 59 milhões de euros em Portugal (Euromonitor 2015). Este crescimento poderá estar relacionado com alguma recuperação económica de Portugal, mas também com a

crecente consciência da importância da adoção de um estilo de vida saudável por parte da população, assim como com o seu envelhecimento. Por outro lado, esta tendência poderá também ser incentivada pelo recurso à automedicação e utilização de suplementos alimentares por preocupações com a saúde e prevenção de doenças (Euromonitor 2012). Relativamente aos suplementos alimentares à base de plantas, dados do *Euromonitor* estimam que em 2016 a sua venda resultará numa receita de 13.8 milhões de euros comparativamente com as de suplementos não à base de plantas que corresponderão a cerca de 9,7 milhões de euros (**Figura 7**) (Euromonitor 2012).



Fig. 7: Estimativa de vendas de suplementos alimentares: 2011-2016. Fonte: Euromonitor _ Consumer health in Portugal

1.4 Contaminação microbiológica de suplementos alimentares

Os suplementos alimentares, incluindo os utilizados para perda de peso/emagrecimento são compostos por diversos ingredientes, sendo frequente a presença de diversos tipos de plantas, tais como a alcachofra (*Cynara scolymus L.*), a centelha asiática (*Hydrocotyle asiatica L.*) e o sene (*Cassia acutifolia Delile*) e/ou extratos de plantas, que podem ser obtidos de diversas regiões geográficas (Sanzini *et al.* 2011, Verdi *et al.* 2013).

Dentro da grande variedade de espécies de plantas comercializadas na EU para utilização em suplementos alimentares, poucas são cultivadas em produção intensiva/industrial, sendo que a maioria é recolhida diretamente da natureza, o que dificulta o controlo de qualidade dos produtos (Sanzini *et al.* 2011). A qualidade microbiológica e química dos produtos irá depender das condições de cultivo (ex. qualidade do solo e da água), condições durante a fase da colheita (ex. menos controladas quando colhidas diretamente na natureza), país de origem da planta, e condições de armazenamento e transporte (Araújo *et al.* 2012). Assim, algumas práticas comumente adotadas na produção destes ingredientes à base de plantas podem permitir a ocorrência de contaminações por bactérias, quer de origem ambiental, quer mesmo de origem fecal (ex. uso de fertilizantes orgânicos) (Veprikova *et al.* 2015). Para além da matéria-prima (ex. plantas, algas) e da fórmula, o processo de fabrico, assim como as condições de armazenamento e transporte podem estar na base da contaminação dos suplementos alimentares (Sanzini *et al.* 2011, Guinot *et al.* 2014). Adicionalmente, os suplementos alimentares que contenham ingredientes à base de plantas ou algas não podem ser sujeitos a processamentos muito agressivos, de modo a evitar a destruição das propriedades benéficas naturalmente presentes nalguns destes ingredientes (Rossi *et al.* 2010). O único método para estabilizar microbiologicamente os suplementos alimentares à base de plantas é através da adição de conservantes (ex. ácido sórbico, benzoato de sódio e ésteres metílicos), pelo que quando estes compostos estão ausentes podem surgir problemas relacionados com a segurança dos produtos (Kneifel *et al.* 2002).

Atualmente, ainda existem poucos estudos sobre a qualidade e segurança de suplementos alimentares, nomeadamente a nível microbiológico envolvendo parâmetros de qualidade, de higiene e particularmente de segurança. O maior perigo de contaminação microbiológica para os consumidores ocorre quando os microrganismos contaminantes são agentes patogénicos que podem causar infeções

de origem alimentar ou quando estão presentes toxinas responsáveis por intoxicações alimentares (Soares 2007). De facto, dados da EFSA e da OMS continuam a mostrar que as doenças de origem alimentar são um problema importante de saúde pública (Veiga *et al.* 2009). Segundo dados recentes da OMS, com o objetivo de estimar globalmente as doenças de origem alimentar, verificaram-se 600 milhões de casos de doenças provocadas pelo consumo de alimentos e 420 mil mortes. Este estudo revelou ainda que os principais agentes são os vírus e bactérias como *E. coli* e *Salmonella* (WHO 2015). De modo a prevenir as doenças de origem alimentar é necessário adotar os procedimentos corretos ao longo de toda a cadeia produtiva dos alimentos, ou seja, desde os produtores até aos consumidores finais. Torna-se então essencial conhecer quais são as principais formas de contaminação microbiana dos suplementos alimentares, de forma a garantir a sua qualidade e a segurança dos consumidores.

Nos últimos anos, os alertas de saúde pública (ex. portal RASFF) e os estudos efetuados a estes produtos têm aumentado, particularmente em suplementos alimentares contendo plantas/extratos de plantas (Guinot *et al.* 2014, Lee 2014, Noor *et al.* 2014, Di Lorenzo *et al.* 2015, Veprikova *et al.* 2015). Por exemplo, alguns estudos recentes demonstraram contaminações microbiológicas em suplementos alimentares, incluindo com bactérias patogénicas. A presença de bactérias patogénicas causadoras de intoxicações alimentares como *Staphylococcus aureus* foi observada em suplementos contendo plantas (Rossi *et al.* 2010, Stević *et al.* 2012). Também bactérias patogénicas responsáveis por infeções de origem alimentar, nomeadamente *Escherichia coli* (Stević *et al.* 2012) e *Salmonella* (Abba *et al.* 2009) (Aljaloud *et al.* 2013) foram detetadas em suplementos alimentares. Por outro lado, outros estudos têm detetado a presença de diversos contaminantes bacterianos em amostras de suplementos alimentares, colocando em causa a sua qualidade microbiológica. Assim, no estudo de Tournas *et al.* (2006) identificaram a presença em grande número de bactérias do género *Bacillus* que formam endósporos altamente resistentes aos processamentos, não sendo facilmente eliminados pelas habituais técnicas de descontaminação destes produtos.

Assim, sendo o mercado dos suplementos alimentares um mercado em expansão e uma vez que não existem estudos sobre a sua qualidade e segurança em Portugal, apesar de algumas evidências de contaminação microbiológica em produtos disponíveis em diversas regiões geográficas, pretendeu-se com este estudo avaliar suplementos alimentares comercializados no mercado nacional. O facto de os suplementos alimentares utilizados para perda de peso/emagrecimento serem

produtos disponíveis em diferentes locais de venda livre e utilizados por diferentes grupos da população justifica a importância de se conhecer a situação atual relativamente à sua qualidade e segurança microbiológicas.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar a qualidade e segurança microbiológica de suplementos alimentares utilizados para emagrecimento comercializados em Portugal.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a presença de microrganismos indicadores de qualidade (microrganismos aeróbios mesófilos) e de bioindicadores de higiene (*Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli* e *Enterococcus*);
2. Avaliar a presença de bactérias patogénicas (*Staphylococcus coagulase positivo*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*).

3. Material e métodos

3.1 Plano de amostragem

Para averiguar quais os estabelecimentos que comercializam suplementos alimentares para emagrecimento em Portugal, foi efetuada uma pesquisa para posterior seleção das amostras e locais de venda. A pesquisa restringiu-se à área do Grande Porto e Lisboa e incidiu em locais de venda de produtos naturais, nomeadamente ervanárias, superfícies comerciais e centros dietéticos. Na área de Lisboa, selecionaram-se amostras (n=9) que estavam à venda em superfícies comerciais (ex. hipermercados, comércio tradicional), centros dietéticos e ervanárias. Na zona do Grande Porto, as amostras (n=11) foram adquiridas em ervanárias.

As amostras foram obtidas entre julho de 2015 e abril de 2016, perfazendo um total de 20 amostras de suplementos alimentares para emagrecimento (designadas arbitrariamente por letras do alfabeto de A a T), de 16 marcas obtidas em 10 locais de venda. Após aquisição, as amostras foram mantidas dentro da embalagem original e seladas dentro de um saco, de forma a impedir contaminações durante o transporte e até à análise microbiológica em laboratório.

A partir da análise da composição presente no rótulo das amostras recolhidas foi possível a classificação em 3 categorias relativamente aos ingredientes presentes em maior quantidade: i) suplementos que continham algas (n=4); ii) suplementos que continham extratos secos de plantas/frutos (n=8); iii) suplementos que continham extratos secos de plantas/frutos e fontes de cafeína (n=8). Relativamente à apresentação dos suplementos foram obtidas amostras de dois tipos: comprimidos (n=8) e cápsulas (n=12; 10 com pó e 2 com líquido).

3.2 Preparação das amostras

Para a preparação das amostras foram seguidos procedimentos específicos para produtos considerados muito duros, desidratados e com substâncias inibidoras do crescimento microbiano, de acordo com a norma ISO 6887-4:2003/Cor.1:2004. Primeiro todo o conteúdo da embalagem foi transferido para saco estéril (triplo ensacamento para prevenir rutura do saco), em condições de assepsia, para que os comprimidos/cápsulas fossem quebrados em pedaços mais pequenos com a utilização de um martelo.

Posteriormente, procedeu-se à preparação da suspensão-mãe que consiste em juntar uma parte da amostra teste a 9 partes de diluente adequado ao tipo de amostras em análise. Uma vez que os suplementos alimentares em análise estavam desidratados e continham substâncias inibidoras (ex. chá, café, pimentas) foi necessário adicionar ao diluente *Água Peptonada Tamponada-APT (bioMérieux)* uma concentração de 0,5 % de K_2SO_3 (*Sigma-Aldrich*), de forma a diminuir a atividade antimicrobiana (ISO 6887-4:2003/Cor.1:2004). Assim, procedeu-se à pesagem, em balança digital, de 1 toma de 27,77 g de amostra à qual se adicionou 250 ml de $APT+K_2SO_3$ (suspensão-mãe utilizada para efetuar todos os parâmetros de contagens e as pesquisas, incluindo a pesquisa de *Salmonella* em 25g) e de 1 toma de 25 g à qual se adicionou 225 ml de caldo *Half-fraser broth (bioMérieux)* (para a pesquisa de *Listeria monocytogenes*), de acordo com os procedimentos microbiológicos referidos no capítulo 3.3. Ambas as tomas foram seguidamente homogeneizadas em aparelho “*Stomacher*” pelo período de 1 min. Sendo produtos desidratados recomenda-se uma etapa de ressuscitação (ISO 6887-4:2003/Cor.1:2004) que consistiu em deixar as suspensões à temperatura ambiente durante 1 hora antes de efetuar as diluições decimais e as sementeiras. Foram realizadas diluições decimais em tubos com 9 ml de diluente $APT+K_2SO_3$ até 10^{-3} para os parâmetros microbiológicos que envolveram contagens e para alguns parâmetros de pesquisa.

3.3 Parâmetros microbiológicos

Os parâmetros microbiológicos analisados incluíram a contagem de microrganismos totais a 30°C como indicadores de qualidade e a contagem e pesquisa de microrganismos bioindicadores/indicadores de higiene e de microrganismos

patogénicos. Relativamente aos indicadores de higiene efetuou-se a contagem e pesquisa de *Enterobacteriaceae* e de *Escherichia coli* e a pesquisa de *Enterococcus*. Para avaliação de indicadores de segurança incluiu-se a contagem e pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positivo, a contagem e pesquisa de *Bacillus cereus*, a pesquisa e contagem de *Listeria monocytogenes* e a pesquisa de *Salmonella*. De salientar que em todos os ensaios foram efetuados controlos negativos e positivos, de forma a validar as placas dos diversos meios de cultura seletivos utilizados em cada parâmetro.

No caso dos parâmetros microbiológicos que envolveram contagens foi seguida a norma ISO 7218:2007/Amd 1:2013 para os cálculos e expressão dos resultados, sendo os resultados apresentados em Unidades Formadoras de Colónias (UFC) por grama de amostra. Relativamente aos resultados das pesquisas foram apresentados como “Ausência” ou “Presença” por quantidade de amostra analisada.

3.3.1 Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos

Neste parâmetro procedeu-se à inoculação de 1 mL da suspensão-mãe (10^{-1}) e das diluições decimais (10^{-2} a 10^{-3}) em meio *Plate Count Agar* (PCA) (*Liofilchem*) através de sementeira por incorporação. Posteriormente, as placas foram colocadas a incubar durante 72h a 30 °C, de acordo com a norma ISO 4833-1:2013(ISO)(ISO).

3.3.2 Contagem e pesquisa de *Enterobacteriaceae*

Para realizar a contagem procedeu-se à inoculação de 1 mL da suspensão-mãe (10^{-1}) e das diluições decimais (10^{-2} a 10^{-3}) em meio *Violet Red Bile Glucose Agar medium* (VRBG) (*Biogerm*) através de sementeira por incorporação. Após sementeira, as placas foram incubadas durante 24h a 37 °C, de acordo com a norma ISO 21528-2:2004(ISO)(ISO). Para a pesquisa foi utilizado o enriquecimento em *Água Peptonada Tamponada* (APT+K₂SO₃) efetuado por um período de 24h a 37 °C. Após este período, inoculou-se 0,1 mL da suspensão-mãe e da diluição decimal 10⁻² em meio VRBG por técnica de esgotamento e incubação de 24h a 37 °C.

Para confirmação das colónias suspeitas de *Enterobacteriaceae*, obtidas na contagem e/ou pesquisa, foram selecionadas 5 colónias para a realização da prova das oxidases e da prova da fermentação da glicose (meio *OF-glucose*).

3.3.3 Contagem e pesquisa de *Escherichia coli*

Para a contagem de *E. coli* inoculou-se 1 mL da suspensão-mãe (10^{-1}) e das diluições decimais (10^{-2} a 10^{-3}) em meio cromogénico *Tryptone-bile-glucuronic médium* (TBX) (*Biogerm*) através de sementeira por incorporação.

Após sementeira, as placas foram colocadas a incubar durante 18 a 24 h a 44 °C, tal como descrito na norma ISO 16649-2:2001(ISO)(ISO). Para a pesquisa foi utilizado o enriquecimento em *Água Peptonada Tamponada* (APT+K₂SO₃) efetuado por um período de 24h a 37 °C. Após este período, inoculou-se 0,1 mL da suspensão-mãe e da diluição decimal 10^{-2} em meio TBX por técnica de esgotamento e incubação de 18 a 24h a 44 °C. Esta técnica permitiu detetar e contar as colónias β-glucuronidase positivas (coloração azul) características dos isolados de *E. coli*.

3.3.4 Pesquisa de *Enterococcus*

Para efetuar a pesquisa de *Enterococcus* foi utilizado o enriquecimento em *Água Peptonada Tamponada* (APT+K₂SO₃) efetuado por um período de 24h a 37 °C. Após este período, inoculou-se 0,1 mL da suspensão-mãe (10^{-1}) e da diluição decimal 10^{-2} em meio *Slanetz and Bartley agar* (*Liofilchem*) por técnica de esgotamento, sendo posteriormente incubado por um período de 24 a 48h a 37 °C.

3.3.5 Contagem e pesquisa de *Staphylococcus* Coagulase Positivo

Para a contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo, inoculou-se 1 mL da suspensão-mãe (10^{-1}) por espalhamento à superfície em três placas de meio *Baird Parker Agar* (BPA) (*Biogerm*), para a deteção de baixa carga microbiana. Foi também inoculado 0,1 mL da suspensão-mãe por espalhamento à superfície numa placa de BPA. De seguida, as placas foram colocadas a incubar durante 24 a 48h, a 37 °C, tal como descrito na norma ISO 6888-1:1999;2003. Para a pesquisa foi utilizado o enriquecimento em *Água Peptonada Tamponada* (APT+K₂SO₃) efetuado por um período de 24 h a 37 °C. Findo este período inoculou-se 0,1 mL da suspensão-mãe (10^{-1}) e da diluição decimal 10^{-2} em meio BPA por técnica de esgotamento e incubou-se a 37 °C por 24 a 48h.

Para confirmação das colónias suspeitas de *Staphylococcus coagulase positivo*, obtidas na contagem e/ou pesquisa, foram selecionadas 5 colónias suspeitas para caldo nutritivo *Brain Heart Infusion* (BHI) (*Liofilchem*) que foi incubado durante 24h a 37 °C. Após este período foi efetuada a cada cultura em BHI a prova da coagulase (tubos preparados a partir de plasma de coelho liofilizado) durante um mínimo de 4 a 6 h e até um período máximo de 24 h a 37 °C.

3.3.6 Contagem e pesquisa de *Bacillus cereus*

Para a contagem de *Bacillus cereus*, inoculou-se 0,1 mL da suspensão-mãe (10^{-1}) por espalhamento à superfície numa placa de meio cromogénico *Bacara* agar (*bioMérieux*). De seguida colocou-se a incubar durante 24 a 48h a 37°C, de acordo com o protocolo validado pela *Biomérieux* (www.biomerieux-industry.com/food/bacillus-cereus-culture-media). Para a pesquisa foi utilizado o enriquecimento em *Água Peptonada Tamponada* (APT+K₂SO₃) efetuado por um período de 24h a 37 °C. Após este período inoculou-se 0,1 mL da suspensão-mãe (10^{-1}) e da diluição decimal 10^{-2} em meio *Bacara* e incubou-se durante 24h a 37 °C. Apesar de não ser obrigatório, efetuou-se confirmação das colónias suspeitas de *B. cereus* no meio *Bacara* através da prova da hemólise em gelose sangue.

3.3.7 Pesquisa e contagem de *Listeria monocytogenes*

A pesquisa de *Listeria monocytogenes* segundo a norma ISO 11290-1:2004(ISO)(ISO) pressupõe a realização de 4 etapas. Primeiramente efetuou-se um pré-enriquecimento de 25g de amostra em 225ml de meio *Half Fraser broth* (*biomérieux*) que foi incubado durante 24h a 30 °C. Após as 24h, procedeu-se a um enriquecimento de 0,1 ml em meio *Fraser broth* (*biomérieux*) que incubou durante 48h a 37 °C. Ambos os enriquecimentos (0,1 ml) foram inoculados pela técnica de esgotamento em placas de *Agar Listeria Ottaviani Agosti medium* (ALOA) (*biogerm*) e de *Oxford agar medium* (*biogerm*) incubando-se ambas durante 24 a 48h a 37 °C.

Para a contagem de *L. monocytogenes* e de acordo com a norma ISO 11290-2:1998 procedeu-se à inoculação de 1mL da suspensão-mãe (10^{-1}) por espalhamento à superfície em três placas de ALOA que incubaram a 37 °C durante 24h.

Para confirmação das colónias suspeitas de *Listeria* e de *L. monocytogenes* foram efetuadas diversas provas bioquímicas. Para tal, foram selecionadas 5 colónias por

placa de meio seletivo, sendo efetuado primeiro o seu reisolamento em meio *Columbia 5% sangue carneiro (biogerm)*. Nos casos em que se verificou presença de β -hemólise, as colónias foram identificadas através do sistema miniaturizado *API Listeria (bioMérieux)*. Adicionalmente, as colónias suspeitas de *Listeria* foram caracterizadas pela prova da catálase, coloração de Gram e avaliação da mobilidade. Para a prova da catálase selecionou-se uma colónia isolada e suspendeu-se numa gota de peróxido de hidrogénio, sendo que o resultado positivo consistiu na formação de bolhas. Através da coloração de Gram foi possível visualizar a morfologia das bactérias ao microscópio, sendo que os membros do género *Listeria* são bacilos Gram positivo de pequena dimensão. O teste da mobilidade foi feito através da visualização ao microscópio das bactérias previamente incubadas em meio TSY a 25 °C durante 24h.

3.3.8 Pesquisa de *Salmonella*

Para a pesquisa de *Salmonella* e de acordo com a norma ISO 6579:2002 foi efetuado um pré-enriquecimento de 25 g de amostra em 225 ml de *Água Peptonada Tamponada (APT+K₂SO₃)* incubado durante 18h a 37 °C. Após este período, procedeu-se a um enriquecimento seletivo em *Rappaport-Vassiliadis medium with Soya broth (RVS) (bioMérieux)* e *Mueller-Kauffmann tetrathionate-novobiocin broth (MKTTn) (bioMérieux)* e incubou-se a 41.5 °C e 37 °C durante 24h, respetivamente. Por fim, inoculou-se 0,1 mL de cada um dos dois caldos de enriquecimento em placas de *Xylose lysine deoxycholate agar medium (XLD)* e de meio cromogénico *CHROMagar Salmonella (CHROMagar)* por técnica de esgotamento. Após incubação das placas durante 24h a uma temperatura de 37 °C, as colónias suspeitas foram confirmadas através de provas bioquímicas e serológicas.

3.4 Critérios microbiológicos

Após obtenção dos resultados das pesquisas e conversão das contagens em UFC/g a qualidade microbiológica das amostras foi classificada como “Aceitável” ou “Não Aceitável”, com base nos limites propostos para os diversos parâmetros microbiológicos propostos pela *NSF International Standard for Dietary Supplements (USA)(NSF 2008)* (contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, contagem de *Enterobacteriaceae*, contagem de *E. coli*, contagem e pesquisa de *Staphylococcus coagulase positivo*), pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA (Brasil)

(ANVISA 2001) para suplementos alimentares (contagem de *B. cereus* e pesquisa de *Salmonella*) e segundo o Regulamento (CE) N° 2073/2005 da comissão de 15 de Novembro de 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios (pesquisa e contagem de *Listeria monocytogenes*). No caso da pesquisa de *Enterococcus* e *B. cereus*, uma vez que não existem valores guia publicados para a interpretação das análises, foi considerado neste estudo como aceitável, a “Ausência” de *Enterococcus* e de *B. cereus*.

3.5 Ensaio Piloto

Para verificar se as condições de preparação de amostras de géneros alimentícios com as características dos suplementos alimentares (desidratados e com substâncias antimicrobianas) permitiam a deteção e contagem dos parâmetros microbiológicos propostos neste estudo foi efetuado um ensaio piloto com uma das amostras. Primeiramente preparou-se uma suspensão das bactérias *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus coagulase positivo*, *Bacillus cereus* e *Enterococcus* em caldo nutritivo *Tryptic Soy Broth* (TSB) que incubou em banho a 37 °C, com agitação, durante 2 a 3h. Após este período acertou-se a densidade de cada suspensão às mesmas unidades de McFarland e adicionou-se 0,1 mL de cada tubo ao saco da suspensão-mãe preparado previamente com 25g de amostra e 225 ml de *Água Peptonada Tamponada* (APT). Seguidamente, efetuou-se a etapa de ressuscitação durante 1h à temperatura ambiente e procedeu-se à realização dos procedimentos microbiológicos descritos no capítulo 3.3. Através deste ensaio verificou-se que todos os bioindicadores de higiene e de segurança foram recuperados pelas técnicas de pesquisa e contagem propostas neste trabalho.

4. Resultados e Discussão

Neste estudo, observou-se que todas as amostras de diversos tipos e marcas de suplementos alimentares (n=20), adquiridas em 10 estabelecimentos comerciais, apresentaram qualidade microbiológica “Aceitável” em quatro dos parâmetros analisados: *E. coli* e *Staphylococcus coagulase* segundo os critérios microbiológicos propostos pela *NSF International Standard for Dietary Supplements* (USA) (NSF 2008), *Salmonella* segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA (Brasil) (ANVISA 2001) e *L. monocytogenes*, segundo o regulamento (CE) N° 2073/2005. Relativamente aos suplementos que continham algas (n=4), verificou-se qualidade microbiológica “não aceitável” em todas as amostras analisadas, para pelo menos um dos parâmetros estudados, nomeadamente *B. cereus* (n=3/4), microrganismos aeróbios mesófilos (n=1/4), *Enterobacteriaceae* (n=1/4) e *Enterococcus* (n=2/4), segundo os critérios microbiológicos propostos pela NSF e ANVISA. Em contraste, nas outras duas categorias de suplementos, contendo extrato seco de plantas/frutos com/sem cafeína (n=16) verificou-se qualidade microbiológica “Não aceitável” apenas em algumas das amostras analisadas e para os parâmetros de pesquisa de *Enterococcus* (n=2/16) e pesquisa de *B. cereus* (n=2/16), segundo os critérios adotados neste estudo. Globalmente, estes resultados ficam a dever-se a parâmetros relacionados com a qualidade microbiológica (contagem de aeróbios mesófilos), indicadores de higiene (contagem e pesquisa de *Enterobacteriaceae* e pesquisa de *Enterococcus*) e também à presença de bactérias patogénicas (*B. cereus*) (Figura 8, Tabela 1).

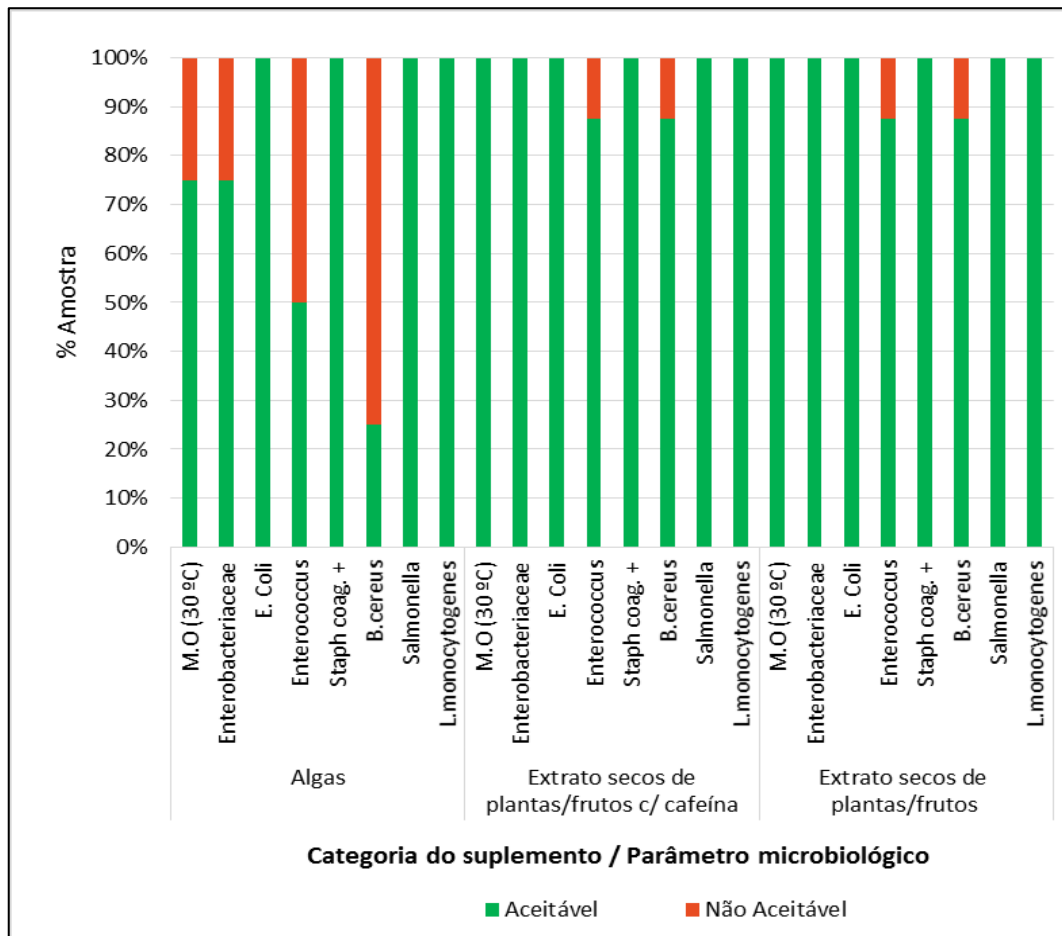


Fig. 8: Frequência de amostras classificadas em aceitáveis e não aceitáveis, por parâmetro microbiológico e tipo de amostra.

- (1) Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, contagem de *Enterobacteriaceae* e contagem de *E. coli* classificados de acordo com os critérios microbiológicos *NSF International Standard for Dietary Supplements* (NSF 2008) e pesquisa de *Salmonella* classificados de acordo com os critérios microbiológicos da ANVISA (ANVISA 2001).
- (2) Pesquisa e contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo classificados de acordo com os critérios microbiológicos da NSF (NSF 2008); Pesquisa de *Enterococcus* e pesquisa de *B.cereus* classificados de acordo com os critérios definidos por este estudo (aceitável = "ausência").
- (3) Contagem e pesquisa de *Listeria monocytogenes* classificados de acordo com os critérios microbiológicos do regulamento (CE) N° 2073/2005 da comissão de 15 de novembro de 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios.

Tabela 1: Frequência de amostras classificadas em aceitáveis e não aceitáveis, por parâmetro microbiológico e tipo de amostra

Amostra	Categoria	<i>M.O (30 °C)</i>		<i>Enterobacteriaceae</i>		<i>E. coli</i>		<i>Enterococcus</i>	<i>Staph coag. +</i>		<i>B.cereus</i>		<i>Salmonella</i>	<i>L.monocytogenes</i>					
		Contagem		Contagem	Pesquisa	Contagem	Pesquisa	Pesquisa	Contagem	Pesquisa	Contagem	Pesquisa	Pesquisa	Contagem	Pesquisa				
A	Algas	A	N= 7,8x10 ²	A	<10	(-)	A	<10	(-)	(-)	A	<10	(-)	A	<10	(-) ⁽²⁾			
B		A	N= 85x10 ³	A	<10	(-)	A	<10	(-)	(-)	A ⁽¹⁾	<10	(-)	A	<10	(-)			
C		A	N= 4,6x10 ³	A	<10	(-)	A	<10	(-)	(+)	A ⁽¹⁾	<10	(-)	A	<10	(-) ⁽³⁾			
D		NA	N= 2,6x10 ⁵	NA	N= 7,8x10 ²	(-)	A	<10	(-)	(+)	A	<10	(-)	A	N= 1,3x10 ²	(+)	(-)	A	<10
E	Extrato secos de plantas/frutos c/ cafeína	A	NE= 70	A	<10	(-)	A	<10	(-)	(-)	A	<10	(-)	A	<10	(-)			
F		A	NE= 40	A	<10	(-)	A	<10	(-)	(-)	A	<10	(-)	A	<10	(-)			
G		A	<10	A	<10	(-)	A	<10	(-)	(-)	A	<10	(-)	A	<10	(-)			
H		A	N= 3x10 ³	A	<10	(-)	A	<10	(-)	(-)	A ⁽¹⁾	<10	(-)	A	<10	(-)			
I		A	N= 1,1x10 ²	A	<10	(-)	A	<10	(-)	(-)	A	<10	(-)	A	<10	(-)			
J		A	N= 2,1x10 ²	A	<10	(-)	A	<10	(-)	(+)	A	<10	(-)	A	<10	(-)			
K		A	<10	A	<10	(-)	A	<10	(-)	(-)	A	<10	(-)	A	<10	(-)			
L		A	<10	A	<10	(-)	A	<10	(-)	(-)	A	<10	(-)	A	<10	(-)			
M	Extrato secos de plantas/frutos	A	<10	A	<10	(-)	A	<10	(-)	(-)	A ⁽¹⁾	<10	(-)	A	<10	(-)			
N		A	N= 2,8x10 ²	A	<10	(-)	A	<10	(-)	(-)	A	<10	(-)	A	<10	(-) ⁽³⁾			
O		A	NE= <40	A	<10	(-)	A	<10	(-)	(-)	A	<10	(-)	A	<10	(-)			
P		A	N= 6,3x10 ²	A	<10	(-)	A	<10	(-)	(+)	A	<10	(-)	A	<10	(-)			
Q		A	<10	A	<10	(-)	A	<10	(-)	(-)	A	<10	(-)	A	<10	(-)			
R		A	<10	A	<10	(-)	A	<10	(-)	(-)	A	<10	(-)	A	<10	(-) ⁽³⁾			
S		A	<10	A	<10	(-)	A	<10	(-)	(-)	A	<10	(-)	A	<10	(-)			
T		A	N= 4,1x10 ²	A	<10	(-)	A	<10	(-)	(-)	A	<10	(-)	A	<10	(-) ⁽³⁾			

(1) Presença de *Staphylococcus* coagulase negativo

(2) Presença de *Listeria welshimeri/innocua*

(3) Presença de bacilos Gram positivo esporulados

NE : número estimado; A : aceitável; NA : não aceitável ; contagens em UFC/g

Nota: Amostras B, C e D são da mesma marca comercial; amostras K, R, S são da mesma marca comercial

4.1 Indicadores de qualidade

Em 95% das amostras (n= 19/20) dos suplementos alimentares analisados verificou-se que o número de microrganismos aeróbios mesófilos foi inferior a 10^4 UFC/g (**Tabela 1**), sendo classificadas como “aceitáveis” de acordo com os critérios microbiológicos estabelecidos pela NSF (NSF 2008) (**Figura 9**). A maioria das amostras (n=10/16) de suplementos contendo extrato seco de plantas/frutos com/sem cafeína apresentaram valores muito baixos de carga microbiana (entre <10 UFC/g e 10^2 UFC/g) (**Tabela 1**). Num estudo realizado em Itália em 2010 para avaliar a presença de microrganismos em suplementos alimentares contendo extratos de plantas também se verificaram baixas cargas de microrganismos aeróbios mesófilos (Rossi *et al.* (2010). Estes resultados, também corroborados pelo nosso estudo, poderão ser justificados pelas condições de sobrevivência e crescimento desfavoráveis presentes neste tipo de géneros alimentícios. Por exemplo, os conservantes (ex. sorbato de potássio, benzoato de sódio e parabens) presentes, a baixa atividade da água (cerca de $a_w=0,87$) e a presença de substâncias inibidoras de crescimento microbiano (ex. polifenóis presentes nas plantas) podem estar na origem da baixa carga microbiana detetada (Rossi *et al.* 2010).

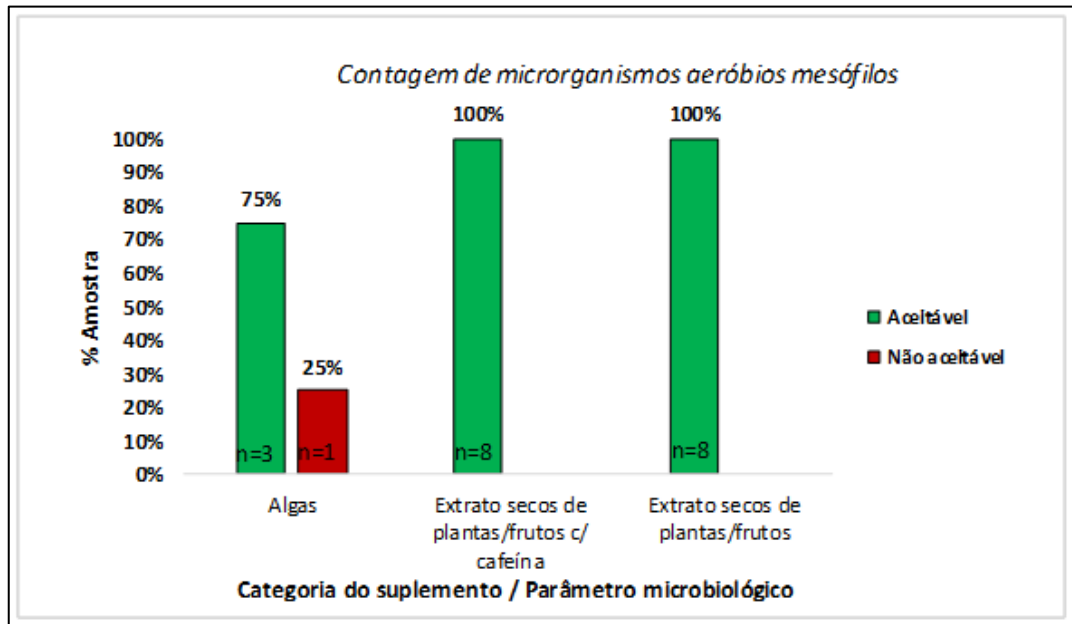


Fig. 9: Frequência de amostras classificadas em aceitável e não aceitável para o parâmetro contagem de microrganismos aeróbios mesófilos por categoria do suplemento

Em contraste, na categoria dos suplementos contendo algas as cargas microbianas foram sempre acima de 10^2 UFC/g, sendo que numa das amostras (amostra D) os valores foram de $2,6 \times 10^5$ UFC/g (**Tabela 1**), sendo considerada “não aceitável” (**Figura 9**). Estes resultados foram semelhantes a um estudo efetuado na Alemanha em 2009 em suplementos alimentares à base de algas, nomeadamente *Chlorella*, onde também se detetou elevada carga microbiana, nomeadamente superior a 10^6 UFC/g em 12 das 19 amostras estudadas (Görs *et al.* 2010). Estes autores sugerem que estes valores mais elevados de carga microbiana se podem dever ao facto dos produtos com algas não poderem ser sujeitos a processamentos muito agressivos, de forma a preservar as suas substâncias benéficas características (Görs *et al.* 2010). Também outros estudos em diversos tipos de suplementos à base de outros ingredientes (ex. ginseng, outras plantas) disponíveis em países desenvolvidos evidenciaram a presença de microrganismos aeróbios mesófilos em grande parte das amostras em níveis elevados, com valores superiores a 10^5 UFC/g (Tournas *et al.* 2006; Tournas *et al.*, 2009). Segundo estes autores, estes valores foram indicativos da falta de condições ambientais devidamente controladas durante o processamento e embalagem dos produtos à base de plantas, sugerindo também a possibilidade destas bactérias poderem resistir aos diversos tipos de processamentos aplicados aos suplementos (Tournas *et al.* 2006). Num estudo mais recente realizado no Bangladesh em 2013 também identificaram a presença de microrganismos aeróbios mesófilos em suplementos alimentares à base de plantas em níveis superiores a 10^5 UFC/g (Noor *et al.* 2014). Uma vez que os microrganismos estão naturalmente presentes nas plantas cultivadas ao ar livre, para ser possível a sua redução nos produtos finais será imprescindível a adoção de boas práticas de manipulação, processamento e armazenamento ao longo de toda a cadeia alimentar e de um maior controlo microbiano destes produtos, nomeadamente análises microbiológicas para que o produto final seja de qualidade e seguro para o consumidor (Tournas *et al.* 2006).

Apesar de este parâmetro ser considerado um indicador de qualidade e não de segurança (não contribui diretamente para a avaliação da segurança dos alimentos), fornece informações úteis acerca da qualidade geral de um alimento, nomeadamente a qualidade dos ingredientes utilizados (e que no caso dos suplementos analisados são de diversas origens e tipos), se foram adotadas práticas adequadas de processamento, manuseamento e armazenamento do alimento, nomeadamente de géneros alimentícios prontos a comer, e até o seu tempo de vida útil (Agency 2009).

4.2 Bioindicadores/indicadores de higiene

Em relação aos indicadores de higiene verificou-se que todas as amostras de suplementos alimentares (n=20) se encontravam com valores abaixo do limite de deteção do método, <math><10\text{ UFC/g}</math> (Tabela 1, Figura 10), para *E. coli*, sendo classificadas como “aceitáveis” de acordo com os critérios microbiológicos propostos pela NSF (NSF 2008). Adicionalmente, salienta-se que após a etapa de enriquecimento, todas as amostras analisadas apresentaram pesquisa negativa de *E. coli*. Este microrganismo é um importante bioindicador de higiene, uma vez que sendo uma bactéria habitante normal do trato intestinal do Homem e dos animais é um bom indicador de contaminação fecal dos alimentos. Por outro lado, sendo esta bactéria eliminada pelos processamentos térmicos utilizados na produção de alimentos, incluindo os suplementos alimentares, também é um bom indicador de contaminação fecal que poderá ocorrer pós-processamento (Agency 2009).

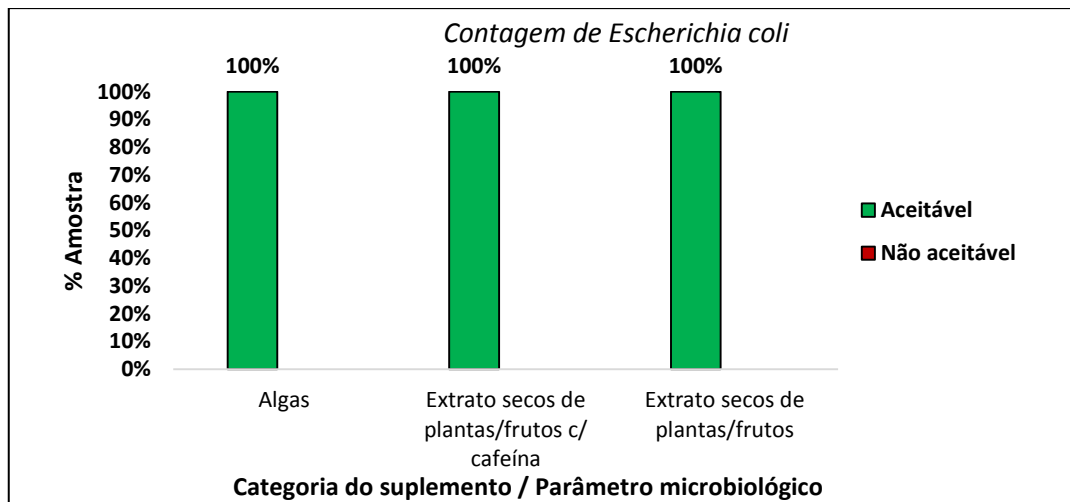


Fig. 10: Frequência de amostras classificadas em aceitável e não aceitável para o parâmetro contagem de *E. coli* por categoria do suplemento.

Embora no nosso estudo não se tenha verificado a presença de *E. coli*, outros estudos recentes em suplementos alimentares disponíveis em diferentes países detetaram a presença deste indicador de higiene em algumas amostras (Stević *et al.* 2012; Ratajczak *et al.* 2015; Aljaloud *et al.* 2013). Por exemplo, num estudo em suplementos alimentares comercializados na Arábia Saudita detetaram-se 8 em 80 amostras contaminadas com *E. coli* (Aljaloud *et al.* 2013). Também num estudo efetuado na Sérvia em 2012 detetaram a presença deste indicador de higiene numa

grande diversidade de suplementos alimentares à base de ervas, nomeadamente suplementos contendo tomilho, folhas de hortelã, erva cavalinha, folhas de urtiga, sabugueiro e folhas de limão (Stević *et al.* 2012). Neste estudo, os autores justificam a presença de *E. coli* pela contaminação das ervas utilizadas para o fabrico dos suplementos com urina ou fezes de animais e/ou pela falta de higiene dos trabalhadores (Stević *et al.* 2012). Num outro estudo realizado na Polónia em 2015 também foi detetada a presença de *E. coli* em suplementos alimentares, sendo estes 6 amostras com ingredientes à base de plantas e extratos de plantas (Ratajczak *et al.* 2015). Estes resultados poderão estar relacionados com contaminantes presentes no meio ambiente, nomeadamente na água e no solo, mas também com a contaminação das plantas usadas como ingredientes nos suplementos com fertilizantes orgânicos (ex. fezes dos ruminantes) (Ratajczak *et al.* 2015).

No parâmetro da contagem e pesquisa de *Enterobacteriaceae*, ambas as categorias de suplementos com extratos secos de plantas/frutos com e sem cafeína apresentaram resultados “Aceitáveis” (**Figura 12**). Relativamente às amostras de suplementos contendo algas, apenas uma (amostra D) foi considerada “não aceitável” para *Enterobacteriaceae* apresentando um valor de $7,8 \times 10^2$ UFC/g (**Tabela 1**), que segundo os critérios microbiológicos da NSF (NSF 2008) para este parâmetro devem ser inferiores a 10^2 UFC/g. Adicionalmente, verificou-se que duas das quatro amostras do grupo das algas (amostra C e D) apresentaram um resultado positivo para outro grupo de bioindicadores, ou seja, na pesquisa de *Enterococcus* (**Figura 11, Tabela 1**). Na categoria de suplementos contendo extrato seco de plantas/frutos com/sem cafeína verificou-se também a presença de *Enterococcus* em duas amostras (amostra H e amostra N) (**Figura 11, Tabela 1**).

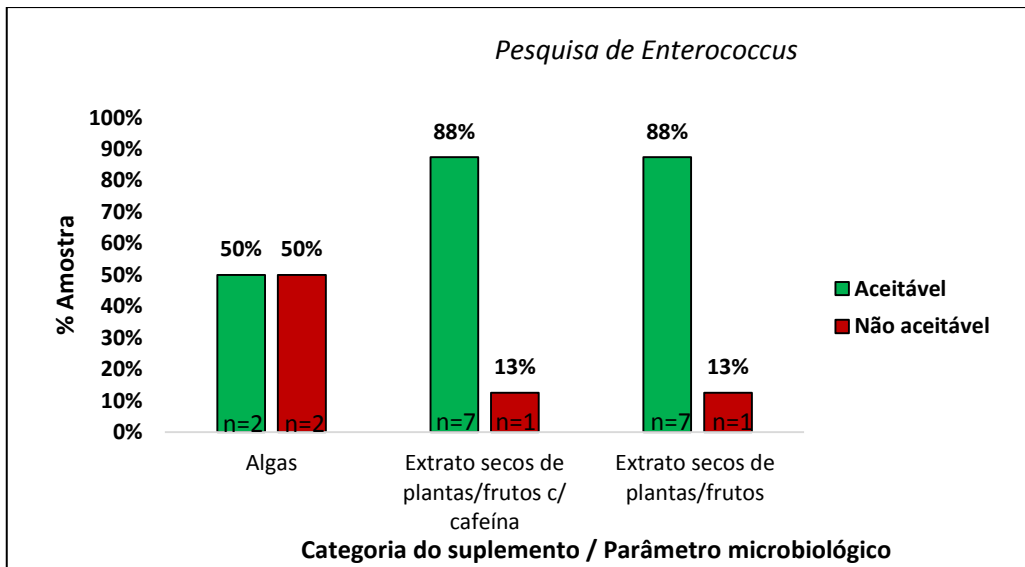


Fig. 11: Frequência de amostras classificadas em aceitável e não aceitável para o parâmetro pesquisa de *Enterococcus* por categoria do suplemento

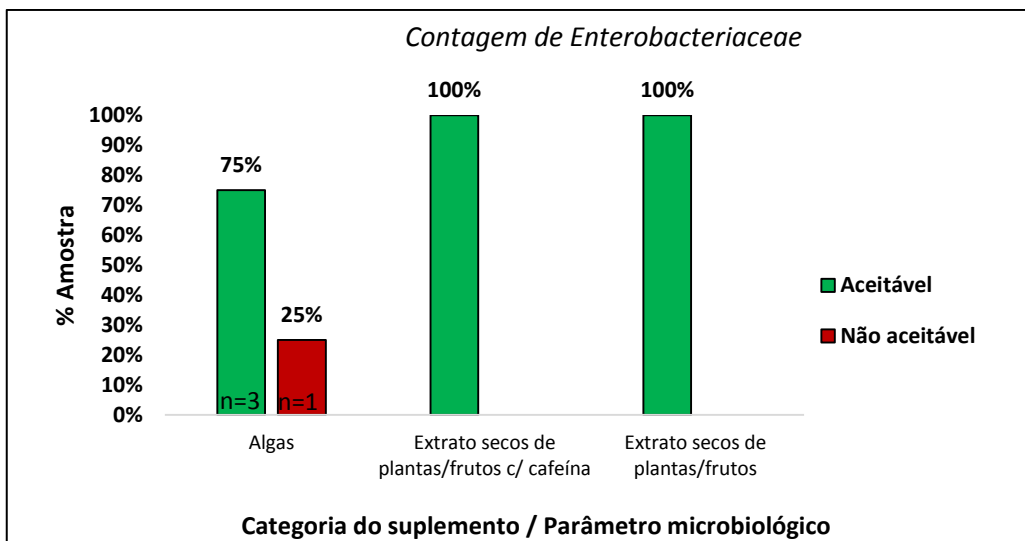


Fig. 12: Frequência de amostras classificadas em aceitável e não aceitável para o parâmetro contagem de *Enterobacteriaceae* por categoria do suplemento

À semelhança do presente estudo, também o estudo de Ratajczak *et al* (2015) identificou a presença de *Enterobacteriaceae* e *Enterococcus* em quantidades superiores aos limites estabelecidos para suplementos à base de plantas. Estas contaminações dos suplementos alimentares à base de plantas estão muitas vezes relacionadas com o ambiente, nomeadamente a qualidade da água e do solo em que as plantas se encontram ou ainda pela contaminação indireta através de fertilizantes orgânicos (Ratajczak *et al.* 2015).

Os microrganismos bioindicadores de higiene permitem-nos avaliar o estado geral de higiene de um alimento e incluem maioritariamente microrganismos que fazem

parte da microbiota intestinal dos humanos e animais, podendo também ser encontrados no meio ambiente. Por norma, estes microrganismos são eliminados durante os processos térmicos utilizados na produção de alimentos, por isso, caso sejam detetados no produto final, estamos perante um caso de inadequado processamento térmico ou contaminação após processamento (Agency 2009, Halkman *et al.* 2014). As *Enterobacteriaceae* são bactérias Gram negativo, não esporuladas e anaeróbias facultativas que podem estar naturalmente presentes, e em altas quantidades, em alguns vegetais e até na água (Sandle 2014, Singh *et al.* 2015), pelo que não são indicadores de contaminação fecal tão específicos como *E. coli*. Além disso, a adoção de práticas adequadas de sanitização pode reduzir, mas não eliminar totalmente estes microrganismos, pelo que se torna importante incluir diversos grupos de bioindicadores de higiene, nomeadamente *E. coli* (Agency 2009). De qualquer modo, o grupo das *Enterobacteriaceae* permite determinar rapidamente potenciais fontes de contaminação, tais como águas e solos contaminados por fertilizantes orgânicos, incluindo fezes de animais (Halkman *et al.* 2014). Relativamente aos *Enterococcus* são bactérias Gram positivo e que tal como as *Enterobacteriaceae* também estão presentes naturalmente no meio ambiente e habitam o trato intestinal dos humanos e animais. Diferem do grupo das bactérias coliformes uma vez que são capazes de crescer/sobreviver em ambientes com condições de maior stress (ex. concentrações de 6,5% de NaCl, temperaturas de congelação). Por exemplo, algumas espécies de *Enterococcus* tais como *E. faecalis* e *E. faecium* apresentam resistência ao calor, podendo permanecer nas linhas de processamento durante um longo período de tempo, conseguindo sobreviver a temperaturas de pasteurização, sendo deste modo indicadores importantes para a deteção de práticas incorretas de fabrico, o que torna importante a sua inclusão como bioindicadores (Halkman *et al.* 2014).

4.3 Indicadores de Segurança

Relativamente aos microrganismos patogénicos analisados neste estudo, todas as amostras de suplementos foram consideradas “Aceitáveis” para a contagem e pesquisa das bactérias *Staphylococcus* coagulase positivo, pesquisa de *Salmonella* e contagem e pesquisa de *Listeria monocytogenes*, segundo os critérios *NSF International Standard for Dietary Supplements* (NSF 2008), Agência Nacional de

Vigilância Sanitária-ANVISA (ANVISA 2001) ou Regulamento (CE) N° 2073/2005(Regulamento)(Regulamento)(Regulamento) (**Tabela 1**).

No caso de *Staphylococcus* coagulase positivo todas as amostras apresentaram valores <10 UFC/g e a pesquisa após enriquecimento foi negativa (**Figura 13, Tabela 1**), tal como sugerido nos critérios da NSF (NSF, 2008) para as amostras serem aceitáveis. Contrariamente a este estudo, já foram identificadas espécies de *Staphylococcus* coagulase positivo num estudo em 2010 em Itália, nomeadamente *Staphylococcus aureus* produtores de enterotoxinas (uma estirpe), em suplementos alimentares à base de ervas e extrato de ervas, tendo sido este o microrganismo presente em maior percentagem nas amostras de suplementos analisadas (Rossi *et al.* 2010).

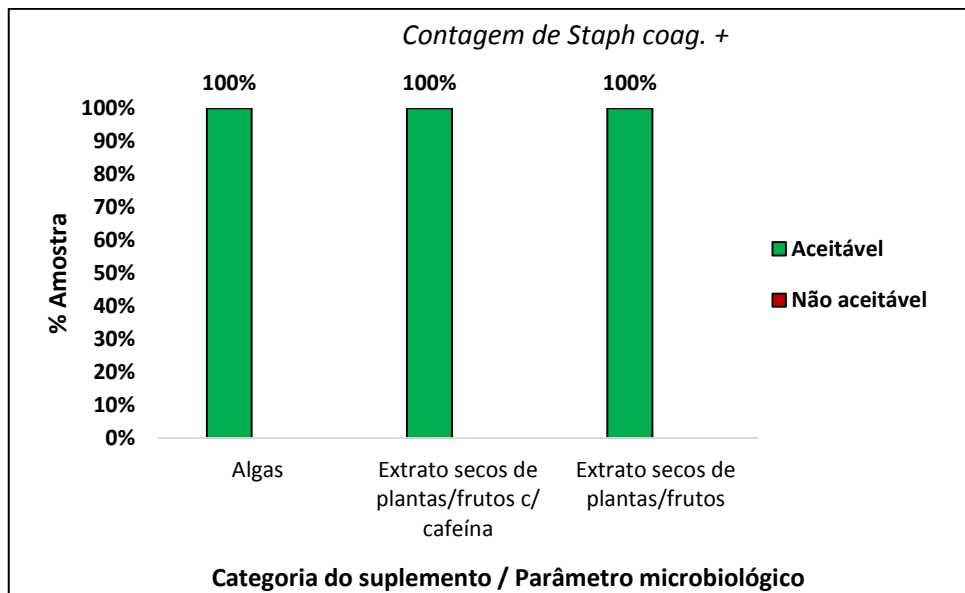


Fig. 13: Frequência de amostras classificadas em aceitável e não aceitável para o parâmetro contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo por categoria do suplemento.

Adicionalmente, é importante referir que no nosso estudo se detetaram *Staphylococcus* coagulase negativo em 4 das 20 amostras analisadas. Na categoria dos suplementos contendo algas detetaram-se em duas das amostras (B e C) e na categoria de suplementos contendo extratos secos de plantas/frutos com/sem cafeína em duas amostras (H e M) (**Tabela 1**). Os *Staphylococcus* coagulase negativo são geralmente descritos como inofensivos para os humanos e não são considerados patogénicos de origem alimentar, contrariamente às espécies de *Staphylococcus* produtoras de coagulase. No entanto, existem alguns registos/evidências de poderem estar associados à produção de enterotoxinas e assim poderem causar intoxicações alimentares no Homem (Podkowik *et al.* 2013).

Em relação a *Salmonella*, todas as amostras apresentaram ausência em 25g (Figura 14), estando dentro dos limites propostos pelos critérios microbiológicos da ANVISA para suplementos (ANVISA 2001). Estes resultados são corroborados por outros estudos em suplementos alimentares à venda em diferentes continentes (Ratajczak *et al.*, 2015; Bugno *et al.* 2005, Noor *et al.*,2014). Assim, tanto no estudo realizado na Polónia (Ratajczak *et al.* 2015) onde foram analisadas 1165 amostras, tal como no estudo do Brasil (Bugno *et al.* 2005) com 91 amostras e num estudo realizado no Bangladesh (Noor *et al.* 2014) com 85 amostras não foi detetada a presença de *Salmonella*. Contrariamente a estes resultados, num estudo realizado em 2013 para avaliar a qualidade microbiológica de suplementos alimentares à venda na Arábia Saudita, 33% das 80 amostras analisadas revelaram estar contaminadas com *Salmonella* (Aljaloud *et al.* 2013). Num outro estudo realizado em 2008 na Nigéria, também se detetou a presença de *Salmonella* em 70 das 150 amostras analisadas de suplementos alimentares (Abba *et al.* 2009). De referir ainda que ao longo dos últimos anos se tem verificado diversas retiradas do mercado de suplementos alimentares devido a presença de *Salmonella*. Por exemplo, em 2013 verificou-se a retirada do mercado do Reino Unido de um suplemento alimentar à base de *Chlorella* e já em 2016 foi retirado do mercado da Alemanha um suplemento alimentar de Moringa (planta de origem tropical) (RASFF 2015).

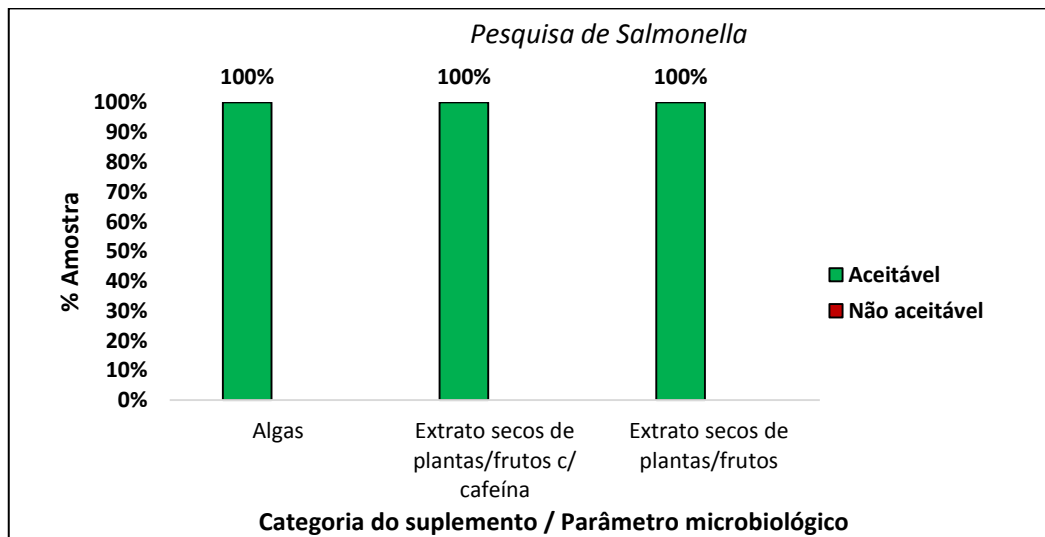


Fig. 14: Frequência de amostras classificadas em aceitável e não aceitável para o parâmetro pesquisa de *Salmonella* por categoria do suplemento.

Relativamente à bactéria patogénica *Listeria monocytogenes*, todas as amostras apresentaram valores <10 UFC/g na contagem e a pesquisa após enriquecimento foi negativa (**Tabela 1; Figura 15**). Estes resultados estão de acordo com o Regulamento (CE) Nº 2073/2005 da comissão de 15 de Novembro de 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, nomeadamente “alimentos prontos para consumo destinados a fins medicinais específicos”.

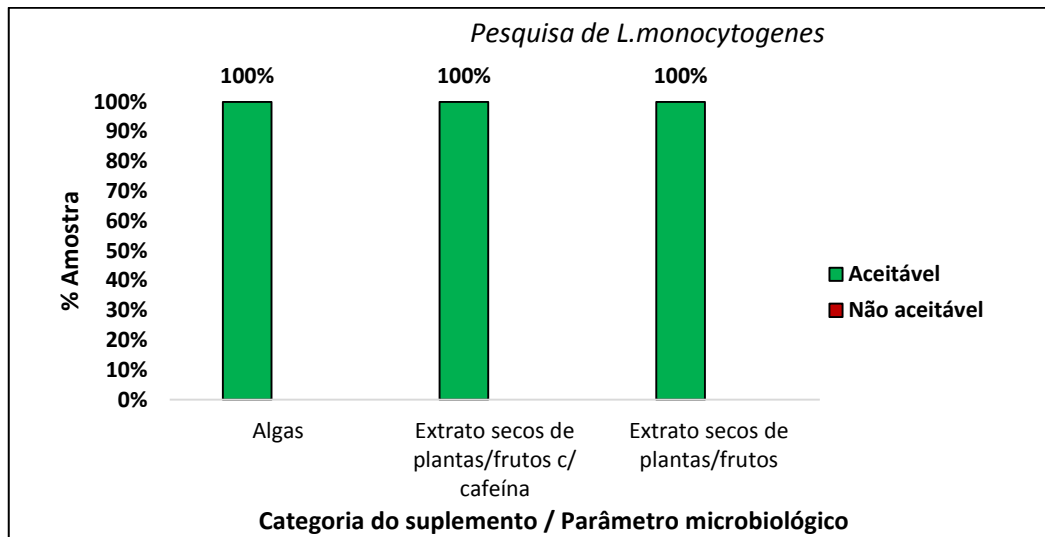


Fig. 15: Frequência de amostras classificadas em aceitável e não aceitável para o parâmetro pesquisa de *L. monocytogenes* por categoria do suplemento

Adicionalmente, apesar de não se ter verificado a presença de *L. monocytogenes* foi possível isolar outra bactéria do mesmo género, cuja identificação bioquímica não conseguiu distinguir (*Listeria welshimeri/innocua*) numa amostra da categoria de suplementos contendo algas (amostra A). Em contraste com *L. monocytogenes*, responsável por uma doença de origem alimentar grave em humanos (listerose), tanto *L. welshimeri* como *L. innocua* são bactérias consideradas não patogénicas, mas pertencem ao género *Listeria* spp, atualmente proposto e utilizado como grupo de indicadores de contaminação ambiental por diversas entidades (ex. INSA, HPA) para alimentos prontos a comer (Troxler *et al.* 2000). Além disso, as bactérias do género *Listeria* são capazes de crescer em temperaturas de refrigeração, mas não sobrevivem a temperaturas superiores a 70 °C, pelo que a sua presença em alimentos pode ser indicador de processamento inadequado ou contaminações após o processamento (Agency 2009).

Relativamente aos ensaios efetuados no âmbito da pesquisa de *L. monocytogenes* é de evidenciar que se detetaram “falsos positivos” para *L. monocytogenes* em 5 amostras de suplementos alimentares (C, D, N, R e T). Este facto significou que se

obteve crescimento de colónias de bactérias que apresentavam as mesmas características do isolado utilizado como controlo positivo (*L. monocytogenes*) nos meios seletivos propostos pela norma ISO 11290-1:2004, nomeadamente o meio (ISO)(ISO)(ISO)(ISO)ALOA agar, mas que após confirmação revelaram características distintas. Estas bactérias formaram colónias azuis esverdeadas e com presença de halo em meio ALOA, tal como descrito para *L. monocytogenes* neste meio, porém após provas de confirmação revelaram ser bacilos Gram positivo esporulados (**Tabela 1**). De facto, um estudo realizado recentemente comprovou que para além de isolados de espécies de *Listeria* não patogénicas poderem crescer no meio seletivo ALOA apresentando as mesmas características de *L. monocytogenes* (colónias azuis-esverdeadas e halo), também 12 outras espécies de bactérias de outros géneros (ex. *Bacillus* spp, *Cellulosimicrobium* spp., *Enterococcus* spp., *Kocuria* spp., *Marinilactibacillus* spp., *Rothia* spp., e *Staphylococcus* spp) foram capazes de crescer neste meio seletivo (Angelidis *et al.* 2015). Os resultados deste estudo, juntamente com os nossos resultados, sugerem então que há necessidade de pesquisas futuras relativamente à formulação dos meios seletivos para bactérias do género *Listeria*, de forma a eliminar ou minimizar o crescimento de outras bactérias, nomeadamente bactérias β -D-glucosidase-positiva e de bactérias Gram positivo (Angelidis *et al.* 2015). Os autores referem ainda a importância da introdução de testes adicionais para confirmação de *Listeria*, para além dos já propostos na norma (Angelidis *et al.* 2015).

Ainda no grupo dos indicadores de segurança utilizados neste estudo, apesar da contagem de *B. cereus* (todas as amostras $<10^2$ UFC/g e uma com $1,3 \times 10^2$ UFC/g) se encontrar dentro dos limites propostos pela ANVISA, foi possível detetar esta bactéria através do parâmetro de pesquisa. No caso da pesquisa, foi considerado para este estudo “não aceitável” a presença de *B. cereus*. Assim, foi na pesquisa de *B. cereus* que se verificou a maior parte dos resultados “não aceitáveis” (**Figura 16**) deste estudo em suplementos alimentares, incluindo 3 amostras (A, B e D) da categoria de suplementos contendo algas e 2 amostras das categorias de suplementos com extratos secos de plantas/frutos com/sem cafeína (J e P) (**Tabela 1 e Figura 16**).

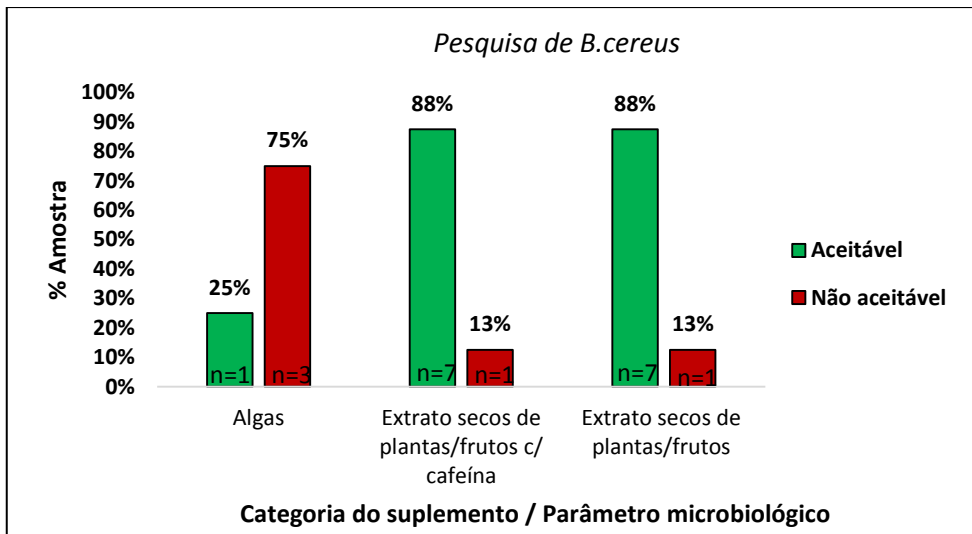


Fig. 16: Frequência de amostras classificadas em aceitável e não aceitável para o parâmetro pesquisa de *B. cereus* por categoria do suplemento.

Do mesmo modo, alguns estudos recentes revelaram a presença de *B. cereus* em suplementos alimentares de diversos tipos (Stević *et al.* 2012; Sánchez *et al.*, 2014, Martins *et al.* 2001). No estudo de Stevic *et al.* (2012) em suplementos alimentares à base de plantas após contagem dos microrganismos aeróbios mesófilos e identificação das bactérias em 40 amostras de suplementos alimentares, verificou-se a presença de *B. cereus* na maioria. Já no estudo de Sánchez *et al.* (2014) 70,7% das amostras (n=53) de suplementos alimentares destinados a crianças estavam contaminadas com *B. cereus*. A presença desta bactéria no nosso e outros estudos em suplementos alimentares pode ser explicada devido à produção de esporos extremamente resistentes a diversas condições de stress, incluindo processamentos severos, temperaturas elevadas e ambientes secos, o que permite a sobrevivência da bactéria por longos períodos de tempo (Stević *et al.* 2012). No entanto, caso existam condições para o seu crescimento e/ou produção de toxinas, o grupo de bactérias *Bacillus cereus* poderá causar intoxicações de origem alimentar. Estes casos estão principalmente associados aos alimentos à base de produtos vegetais (Kumari *et al.* 2016).

O estudo da presença de bactérias patogénicas como *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *Staphylococcus* coagulase positivo e *B. cereus* é um importante contributo para a avaliação da segurança dos suplementos. A presença destas bactérias representa um risco para a saúde dos consumidores, uma vez que podem estar na origem de doenças de origem alimentar, quer infeções, quer intoxicações (Agency 2009).

5. Conclusões

Todos os suplementos alimentares analisados neste estudo apresentaram uma qualidade microbiológica aceitável para a maioria dos parâmetros microbiológicos, com ausência de bactérias indicadoras de contaminação fecal como *E.coli* e de bactérias patogénicas como *Salmonella*, *L. monocytogenes* e *Staphylococcus* coagulase positivo. No entanto, os suplementos que continham algas apresentaram-se com má qualidade microbiológica para pelo menos um dos parâmetros estudados, nomeadamente de qualidade (microrganismos aeróbios mesófilos), de higiene (*Enterobacteriaceae* e *Enterococcus*) e/ou de segurança (presença de *B. cereus*).

Apesar destes resultados terem sido obtidos num número limitado de amostras e evidenciarem globalmente baixos níveis de contaminação, alertam para a possibilidade de ocorrência de contaminações de origem fecal e/ou ambiental o que poderá comprometer a qualidade e a segurança dos suplementos alimentares. Uma vez que estes produtos são constituídos maioritariamente por plantas/extratos de plantas, podemos concluir que o controlo dos níveis de contaminação dos suplementos alimentares terá que passar por estratégias que estimulem a adoção de medidas preventivas ao longo da cadeia alimentar, desde o cultivo e processamento até à obtenção do produto final. Adicionalmente, as autoridades competentes nesta matéria deverão também reforçar os seus poderes de fiscalização e controlo.

Considerando que os suplementos alimentares para emagrecimento são consumidos por diversos tipos de consumidores, incluindo de diferentes idades e estados fisiológicos, serão necessários mais estudos que verifiquem a qualidade e segurança microbiológica dos suplementos alimentares comercializados no mercado nacional.

6. Referências Bibliográficas

Abba, D., H. Inabo, S. Yakubu and O. Olonitola (2009). "Contamination of herbal medicinal products marketed in Kaduna metropolis with selected pathogenic bacteria." African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines **6**(1): 70-77.

Agency, H. P. (2009) "Guidelines for Assessing the Microbiological Safety of Ready-to-Eat Foods. London: Health Protection Agency, November 2009."

Aljaloud, S. O., S. A. Ibrahim, A. M. Fraser, T. Song and A. Shahbazi (2013). "Microbiological quality and safety of dietary supplements sold in Saudi Arabia." Emirates Journal of Food and Agriculture **25**(8): 593 - 595.

Anadón, A., M. R. Martínez-Larrañaga, I. Ares and M. A. Martínez (2016). Chapter 63 - Evaluation and Regulation of Food Supplements: European Perspective A2 - Gupta, Ramesh C. Nutraceuticals. Boston, Academic Press: 895-923.

Andrez, J. H. A. (2015). Suplementos alimentares: mercado global e estratégias de marketing. Tese de mestrado ISCS Egas Moniz.

Angelidis, A. S., M. S. Kalamaki and S. S. Georgiadou (2015). "Identification of non-Listeria spp. bacterial isolates yielding a β -d-glucosidase-positive phenotype on Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti (ALOA)." International Journal of Food Microbiology **193**: 114-129.

ANVISA (2001). ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos. **Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001**

Araújo, M. and T. Bauab (2012). "Microbial quality of medicinal plant materials." Latest Research into Quality Control. USA: Intech Open.

Bailey, R. L., J. J. Gahche, P. E. Miller, P. R. Thomas and J. T. Dwyer (2013). "Why US adults use dietary supplements." JAMA internal medicine **173**(5): 355-361.

Bastien, M., P. Poirier, I. Lemieux and J.-P. Després (2014). "Overview of Epidemiology and Contribution of Obesity to Cardiovascular Disease." Progress in Cardiovascular Diseases **56**(4): 369-381.

Blanck, H. M., M. K. Serdula, C. Gillespie, *et al.* (2007). "Use of nonprescription dietary supplements for weight loss is common among Americans." Journal of the American Dietetic Association **107**(3): 441-447.

Brudnak, M. A. (2002). "Weight-loss drugs and supplements: are there safer alternatives?" Medical Hypotheses **58**(1): 28-33.

Bugno, A., A. A. Buzzo, C. T. Nakamura, *et al.* (2005). "Avaliação da contaminação microbiana em drogas vegetais." Braz J Pharm Sci **41**(4): 491-497.

Campos, S. and M. Oliveira (2012). "Suplementos alimentares para perda de peso: serão eficazes e seguros?" Cooperação científica e Artigo 36º do Regulamento 178/2002. Riscos e Alimentos **3**: 27-39.

Coppens, P. and S. Pettman (2014). Chapter 13 - European Regulations on Food Supplements, Fortified Foods, Dietetic Foods, and Health Claims A2 - Bagchi, Debasis. Nutraceutical and Functional Food Regulations in the United States and Around the World (Second Edition). San Diego, Academic Press: 201-219.

DGAV (2016). "Direção Geral da Alimentação e Veterinária . Disponível em: <http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?generico=15124603&cboui=15124603> ."

Di Lorenzo, C., A. Ceschi, H. Kupferschmidt, *et al.* (2015). "Adverse effects of plant food supplements and botanical preparations: a systematic review with critical evaluation of causality." British Journal of Clinical Pharmacology **79**(4): 578-592.

Diretiva n.º 2002/46/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 10 de Junho, relativa à aproximação das legislações dos Estados membros respeitantes aos suplementos alimentares.

Dwyer, J. T., D. B. Allison and P. M. Coates (2005). "Dietary Supplements in Weight Reduction." Journal of the American Dietetic Association **105**(5, Supplement): 80-86.

Euromonitor (2012). "Consumer health in Portugal. London: Euromonitor International."

Euromonitor (2014). Trends and Insights in The Global Consumer Health Market. London: Euromonitor International. Disponível em : <http://pt.slideshare.net/Euromonitor/state-of-the-consumer-health-industry-in-2014>.

Euromonitor (2015). " Passport Vitamins and Dietary Supplements Global. London: Euromonitor International."

Euromonitor (2015). " Vitamins and Dietary Supplements in Portugal. Acedido a 15 Julho 2016 em <http://www.euromonitor.com/vitaminsand-dietary-supplements-in-portugal/report>."

Felício, J. (2006). "Estudo de mercado: Consumo de suplementos alimentares em Portugal." Lisboa: Centro de Estudos de Gestão do ISEG.

Getman, S. (2011). "EU Regulations on Food Supplements, Health foods, herbal medicines." USA: United States Commercial Service, United States of America Department of Commerce.

Görs, M., R. Schumann, D. Hepperle and U. Karsten (2010). "Quality analysis of commercial Chlorella products used as dietary supplement in human nutrition." Journal of Applied Phycology **22**(3): 265-276.

Guinot, P., C. Yves, S. Didier, L. Laurent and C. Denis (2014). "Suspected adulterated food supplement : Contributions of microbiology to bring out another potential risk for public health." Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé

Hackett, A. and J. Krska (2012). "Is it time to regulate over-the-counter weight-loss formulations?" International Journal of Pharmacy Practice **20**(3): 199-202.

Halkman, H. B. D. and A. K. Halkman (2014). Indicator Organisms A2 - Batt, Carl A. Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition). M. L. Tortorello. Oxford, Academic Press: 358-363.

ISO 11290-1: 2004 . Microbiology of food and animal feeding stuffs . Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* . Part 1: Detection method.

ISO 16649-2:2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs . Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* .Part 2: Colony-count technique at 44 degrees C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide.

ISO 21528-2:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs . Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae

ISO 4833-1:2013. Microbiology of the food chain . Horizontal method for the enumeration of microorganisms . Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique.

ISO 7218:2007/Amd 1:2013 . Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations AMENDMENT 1.

ISO 6887-4:2003/Cor.1:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 4: Specific rules for the preparation of products other than milk and milk products, meat and meat products, and fish and fishery products TECHNICAL CORRIGENDUM 1.

ISO 11290-2: 1998 . Microbiology of food and animal feeding stuffs . Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* . Part 2: Enumeration method.

ISO 6579:2002 . Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.

ISO 6888-1:1999;2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs . Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) . Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium.

Kneifel, W., E. Czech and B. Kopp (2002). "Microbial contamination of medicinal plants--a review." Planta Medica **68**(1): 5-15.

Kumari, S. and P. K. Sarkar (2016). "Bacillus cereus hazard and control in industrial dairy processing environment." Food Control **69**: 20-29.

Lee, J. (2014). "Marketplace analysis demonstrates quality control standards needed for black raspberry dietary supplements." Plant foods for human nutrition **69**(2): 161-167.

Markttest (2013). " Um milhão de consumidores de vitaminas e suplementos. Grupo Markttest."

Medeiros, C. (2008). Alimentos funcionais. A saúde numa embalagem. Comunicação e Cidadania. Actas do 5º Congresso da SOPCOM.

Ng, M., T. Fleming, M. Robinson, *et al.* (2014). "Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013." The Lancet **384**(9945): 766-781.

Nicoletti, M. (2012). "Nutraceuticals and botanicals: overview and perspectives." International journal of food sciences and nutrition **63**(sup1): 2-6.

Noor, R., N. Huda, F. Rahman, T. Bashar and S. Munshi (2014). "Microbial contamination in herbal medicines available in Bangladesh." Bangladesh Medical Research Council Bulletin **39**(3): 124-129.

NSF (2008). NSF International Standard for Dietary Supplements - Dietary supplements. DRAFT revision to NSF / ANSI 173 2008 ; Issue revision 2 (August 2008).

Petroczi, A., G. Taylor and D. P. Naughton (2011). "Mission impossible? Regulatory and enforcement issues to ensure safety of dietary supplements." Food and Chemical Toxicology **49**(2): 393-402.

Podkowik, M., J. Y. Park, K. S. Seo, J. Bystroń and J. Bania (2013). "Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci." International Journal of Food Microbiology **163**(1): 34-40.

Pravst, I. (2015). 1 - Dietary supplement labelling and health claims. Dietary Supplements, Woodhead Publishing: 3-24.

RASFF. (2015). "Rapid Alert System for Food and Feed. European Commission . Disponível em : <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=searchResultList>."

Ratajczak, M., M. M. Kubicka and D. KAMI—SKA (2015). "MICROBIOLOGICAL QUALITY OF FOOD SUPPLEMENTS." Acta poloniae pharmaceutica **72**(2): 383-387.

Ratajczak, M., M. M. Kubicka, D. Kamińska, P. Sawicka and J. Długaszewska (2015). "Microbiological quality of non-sterile pharmaceutical products." Saudi Pharmaceutical Journal **23**(3): 303-307.

Regulamento (CE) n.º 1170/2009 da Comissão de 30 de Novembro. Listas de vitaminas, minerais e respetivas formas em que podem ser adicionados aos alimentos, incluindo suplementos alimentares.

Regulamento "(CE) N° 2073/2005 DA COMISSÃO de 15 de Novembro de 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios."

Regulamento "(CE) n° 285/97 do Parlamento e do Conselho de 27 de Janeiro, relativo a novos alimentos e ingredientes alimentares. ."

Regulamento (CE) n.º 1924/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de Dezembro. Relativo às alegações nutricionais e de saúde sobre os alimentos.

Regulamento (UE) n.º 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de Outubro. Relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios.

Regulamento (UE) n.º 1047/2012 da Comissão de 8 de Novembro. Lista de alegações nutricionais.

Regulamento "(CE) n.º 2073/2005 da Comissão de 15 de Novembro de 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios".

Rossi, F., E. Gaio and S. Torriani (2010). "Staphylococcus aureus and Zygosaccharomyces bailii as primary microbial contaminants of a spoiled herbal food supplement and evaluation of their survival during shelf life." Food Microbiology **27**(3): 356-362.

Rovira, M.-A., M. Grau, O. Castañer, *et al.* (2013). "Dietary supplement use and health-related behaviors in a mediterranean population." Journal of nutrition education and behavior **45**(5): 386-391.

Sandle, T. (2014). Biochemical and modern identification techniques | Enterobacteriaceae, Coliforms, and Escherichia Coli A2 - Batt, Carl A. Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition). M. L. Tortorello. Oxford, Academic Press: 232-237.

Sanzini, E., M. Badea, A. Dos Santos, P. Restani and H. Sievers (2011). "Quality control of plant food supplements." Food & function **2**(12): 740-746.

Singh, J., S. Sharma and S. Nara (2015). "Evaluation of gold nanoparticle based lateral flow assays for diagnosis of enterobacteriaceae members in food and water." Food Chemistry **170**: 470-483.

Soares, E. (2007). "Doenças de origem alimentar: infecções e intoxicações." Segurança e qualidade alimentar **2**(6-8).

Stević, T., S. Pavlović, S. Stanković and K. Šavikin (2012). "Pathogenic microorganisms of medicinal herbal drugs." Archives of Biological Sciences **64**(1): 49-58.

Stoimenova, A. (2010). "Food supplements in Central and Eastern European countries. Acta Medica Bulgarica." **37**: 71-77.

Tournas, V., E. Katsoudas and E. Miracco (2006). "Moulds, yeasts and aerobic plate counts in ginseng supplements." International journal of food microbiology **108**(2): 178-181.

Troxler, R., A. von Graevenitz, G. Funke, B. Wiedemann and I. Stock (2000). "Natural antibiotic susceptibility of Listeria species: L. grayi, L. innocua, L. ivanovii, L. monocytogenes, L. seeligeri and L. welshimeri strains." Clinical Microbiology and Infection **6**(10): 525-535.

Veiga, A., A. Lopes, E. Carrilho, *et al.* (2009). "Perfil de risco dos principais alimentos consumidos em Portugal." Autoridade de Segurança Alimentar e Económica: 01-330.

Veprikova, Z., M. Zachariasova, Z. Dzuman, *et al.* (2015). "Mycotoxins in Plant-Based Dietary Supplements: Hidden Health Risk for Consumers." Journal of agricultural and food chemistry **63**(29): 6633-6643.

Verdi, S., S. Younes and C. D. Bertol (2013). "Avaliação da qualidade microbiológica de cápsulas e chás de plantas utilizadas na assistência ao tratamento da obesidade." Revista Brasileira de Plantas Mediciniais: 494-502.

Visiongain (2014). " Functional foods & Nutraceuticals Market Forecast 2015-2025, .".

WHO (2013). "World and Health Organization. Obesity and Overweight. Disponível em : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>."

WHO (2015). World Health Organization Estimates of the Global Burden of Foodborne Diseases: Foodborne Diseases Burden Epidemiology Reference Group 2007-2015, World Health Organization.

Wing, R. R. and S. Phelan (2005). "Long-term weight loss maintenance." The American journal of clinical nutrition **82**(1): 222S-225S.