



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Avaliação da qualidade microbiológica de suplementos alimentares utilizados no contexto da prática desportiva

Vanda Marina Marques Taborda

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutora Ana Palmeira de Oliveira
Co-orientador: Prof. Doutora Rita Palmeira de Oliveira

Covilhã, fevereiro de 2018

*Para as pessoas mais importantes,
Os meus pais e irmã, por todo o amor e apoio incondicional.*

Agradecimentos

Em primeiro quero agradecer à Prof. Doutora Rita Palmeira de Oliveira e à Prof. Doutora Ana Palmeira de Oliveira por terem aceite auxiliar-me nesta dissertação. Agradeço pela aprendizagem adquirida na realização deste projeto, por toda a dedicação, simpatia e confiança. Desde já também agradecer a oportunidade de realizar este projeto nas instalações do Labfit.

Agradeço à Sílvia Gonçalves por todo o auxílio prestado durante a realização prática deste projeto, pela ajuda e esclarecimento de dúvidas sempre que precisei bem como a amabilidade e simpatia.

A todas as pessoas que facultaram amostras e que contribuíram para a realização deste projeto.

Aos meus amigos que sempre me acompanharam, por todo o apoio, amizade, carinho e com quem sempre pude contar para tudo, um profundo obrigada.

Aos amigos que fiz na Covilhã, a todos os que me acompanharam durante este percurso académico, por terem partilhado comigo os bons momentos e que tornaram esta vida académica nos melhores anos da minha vida, contribuindo para a coleção de boas memórias que guardo no coração. Aos que não me deixaram ir a baixo, por todo o apoio incondicional, por toda a companhia, ajuda, amizade, carinho e risadas. Obrigada pela família que me deixaram criar e que levo desta mágica Covilhã.

Ao Ivan por todo o amor, carinho, ajuda, companhia e paciência que demonstrou comigo, não só durante esta fase mas desde sempre. Por todas as palavras de incentivo, apoio e dedicação. Obrigada!

Aos meus pais, irmã por todo o amor, apoio, incentivo, preocupação e carinho, sem eles teria sido impossível chegar até aqui. Por sempre terem acreditado em mim e apoiado as minhas escolhas. Tudo o que sou hoje devo a eles. Agradeço do fundo do coração a toda a minha família!

A todos os que direta ou indiretamente ajudaram na concretização deste objetivo.

Resumo

Uma alimentação saudável e variada consegue fornecer ao organismo os nutrientes necessários para um estado de equilíbrio. Contudo, consoante o estilo de vida pode ser necessário completar essa alimentação, através de géneros alimentícios que constituem fontes concentradas de determinadas substâncias nutrientes ou com efeito nutricional, que são os suplementos alimentares. O rendimento desportivo é muito influenciado pela alimentação, sendo frequente a adoção de estratégias nutricionais de forma a aumentar a performance e a recuperação. Existem no mercado uma vasta variedade de suplementos alimentares e com finalidades muito diferentes.

Os medicamentos e os suplementos alimentares apresentam regras e legislação diferentes. Contudo por vezes torna-se difícil estabelecer a fronteira entre estas classificações. A Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) é a autoridade competente e responsável pelo controlo dos suplementos alimentares. Estes não apresentam um controlo de qualidade tão rigoroso como o aplicado aos medicamentos, que são da responsabilidade da Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde (INFARMED).

Existem poucos estudos sobre a avaliação da qualidade e segurança dos suplementos alimentares, incluindo a análise de parâmetros microbiológicos. A presença de microrganismos patogénicos em alimentos e suplementos alimentares é um problema de saúde pública. Com o aumento do consumo de suplementos alimentares torna-se necessário proceder a um maior controlo por parte dos mesmos.

Com este estudo pretende-se avaliar a qualidade microbiológica de suplementos alimentares aplicados ao contexto desportivo e comercializados em Portugal. Pretende-se também comparar os resultados obtidos tendo em conta as especificações definidas para medicamentos.

Este estudo foi feito com base nos ensaios de qualidade microbiológica segundo a respetiva monografia da Farmacopeia Europeia 9.0. Foram analisadas 25 amostras, tendo sido divididas em 6 categorias: *gainers*, proteína, bebidas energéticas, aminoácidos, creatina e dextrose. Os resultados foram obtidos em número de unidades formadoras de colónias (UFC)/g de amostra, sendo estes resultados para aeróbios totais expressos em TAMC (contagem microbiana de aeróbios totais) e os resultados para fungos e leveduras totais expressos em TYMC (contagem combinada de fungos e leveduras totais) , tendo sido ambos comparados com os critérios de qualidade microbiológica de formas farmacêuticas não estéreis, incluindo-se as amostras deste estudo nas preparações não aquosas para uso oral.

Os resultados da análise da qualidade microbiológica das 25 amostras evidenciaram que nenhuma estava fora dos limites estipulados para aeróbios totais, contudo em 7 destas

amostras o valor limite estipulado para fungos e leveduras totais foi ultrapassado. Foi feita uma análise à rotulagem das amostras com base nos requisitos definidos por lei que revelou que 7 das 25 amostras não cumpriam a apresentação da totalidade dos requisitos. Ao contrário do que acontece com os produtos farmacêuticos, a ausência de especificações microbiológicas e das normas de Boas Práticas de Fabrico bem definidas contribui para o não cumprimento de critérios de qualidade estipulados para produtos farmacêuticos. É também importante a monitorização do cumprimento da legislação relativa aos rótulos de modo a garantir que o consumidor tem acesso a uma informação completa.

Palavras-chave

Suplementos alimentares, medicamentos, qualidade microbiológica, aeróbios totais, fungos e leveduras totais.

Abstract

A healthy and varied diet can provide the body with the necessary nutrients for a state of balance. However, depending on the lifestyle, it may be necessary to supplement this diet, through dietary supplements since they are concentrated sources of certain nutrients or nutritional effects. Sports performance is very influenced by diet and it is frequent that people adopt nutritional strategies in order to increase performance and recovery. There are a wide variety of food supplements available on the market and for very different purposes.

Medicines and dietary supplements have different rules and legislation, but it is sometimes difficult to establish the boundary between these classifications. The Directorate-General for Food and Veterinary (DGAV) is the competent authority responsible for the control of food supplements. These do not show strict control (including strict microbiological quality control specifications) as applied to medicines, which are under the responsibility of the National Authority for Medicines and Health Products (INFARMED).

There are few studies on the evaluation of the quality and safety of food supplements, including the microbiological parameters. The presence of pathogenic microorganisms in food and food supplements is a public health problem. With the increase of the consumption of food supplements it becomes necessary to carry out a greater control on the part of the same ones.

This study intends to evaluate the microbiological quality of food supplements applied to the sport context and marketed in Portugal. It is also intended to compare the results obtained with food and medicinal specifications.

This study was based on the microbiological quality assays according to the respective monograph of the European Pharmacopoeia 9.0. We analyzed 25 samples that were divided into 6 categories, gainers, protein, energy drinks, amino acids, creatine and dextrose. The results were obtained in number of colony forming units (CFU) / g of sample, these results being for total aerobes expressed in TAMC (total aerobic microbial count) and the results for fungi and total yeasts expressed in TYMC (combined counts of fungi and total yeasts), both of which were compared to microbiological quality criteria for non-sterile dosage forms, particularly for non-aqueous preparations for oral use.

Results from the microbiological quality assays of the 25 samples reveal that none were outside the stipulated limits for total aerobes, however in 7 of these samples the stipulated limit value for fungi and total yeasts was exceeded. An analysis of the labeling of the samples was carried out based on the requirements defined by law where 7 out of the 25 samples did not meet all the requirements. Unlike pharmaceuticals, the absence of well-defined

microbiological quality criteria and good manufacturing practice standards contributes to non-compliance with quality criteria stipulated for pharmaceutical products. It is also important to monitor compliance with labeling legislation to ensure that the consumer has access to complete information.

Keywords

Food supplements, medicines, microbiological quality, total aerobes, fungi and total yeasts.

Índice

Capítulo 1 – Introdução	1
Introdução	1
1.1) Suplementos alimentares	3
1.2) Consumo de suplementos alimentares em Portugal	4
1.3) Suplementos alimentares vs Medicamentos.....	5
1.4) Suplemento Alimentar vs. Alimentos para Desportistas	9
1.5) Legislação	9
1.5.1) União Europeia.....	9
1.5.2) Portugal	11
Capítulo 2 – Objetivos.....	13
Capítulo 3 – Materiais e Métodos	15
3.1) Protocolo de estudo	15
3.2) Materiais e Microrganismos	19
3.3) Validação do método.....	19
3.3.1) Interpretação dos resultados.....	21
3.4) Qualidade microbiológica das amostras	23
3.4.1) Interpretação dos resultados.....	23
Capítulo 4 – Resultados e discussão	25
4.1) Validação do método.....	25
4.2) Qualidade microbiológica	29
4.2.1) <i>Gainers</i>	29
4.2.2) Proteína.....	30

4.2.3) Bebidas energéticas	32
4.2.4) Aminoácidos.....	33
4.2.5) Creatina.....	34
4.2.6) Dextrose	34
4.3 Rotulagem	35
Capítulo 5 - Conclusão	37
Referências bibliográficas.....	39

Lista de Figuras

Figura 1 – Toma de vitaminas e/ou outros suplementos desde 2008 até julho de 2017.	4
Figura 2 – Esquematização do modelo de Homeostasia.	7
Figura 3 – Resultado da qualidade microbiológica das amostras de Proteína.	31
Figura 4 – Resultado da qualidade microbiológica das amostras de Bebidas Energéticas.	33

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Informação de rotulagem e codificação das amostras testadas.	16
Tabela 2 – Condições de incubação, meios de cultura, tempos e temperaturas de incubação e absorvâncias dos microrganismos de referência usados neste estudo.	20
Tabela 3 – Diluições necessárias para a validação do método em cada amostra.	25
Tabela 4 – Teste de toxicidade do neutralizante.	26
Tabela 5 – Valores de TAMC e TYMC para a amostra de <i>gainer</i> .	29
Tabela 6 – Valores de TAMC e TYMC para as amostras de Proteína.	30
Tabela 7 – Valores de TAMC e TYMC para as amostras de Bebidas Energéticas.	32
Tabela 8 – Valores de TAMC e TYMC para a amostra de Aminoácidos.	33
Tabela 9 – Valores de TAMC e TYMC para a amostra de Creatina.	34
Tabela 10 – Valores de TAMC e TYMC para a amostra de Dextrose.	34
Tabela 11 – Análise dos rótulos das amostras segundo a lista de menções obrigatórias para a rotulagem de géneros alimentícios.	35

Lista de Acrónimos

DGAV	Direção-Geral de Alimentação e Veterinária
TGI	Target Group Index
ASAE	Autoridade de Segurança Alimentar e Económica
INFARMED	Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde
HACCP	Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos
PNFA	Plano Nacional de Fiscalização Alimentar da ASAE
POSA	Plano Operacional de Suplementos Alimentares
Ph Eur. 9.0	Farmacopeia Europeia 9.0
g	Gramas
Kcal	Quilocaloria
KJ	Quilojoules
UFC	Unidades formadoras de colónias
ATCC	American Type Culture Collection
nm	Nanómetros
TSA	Tryptic Soy Agar
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
L	Litro
mL	Mililitro
h	Horas
°C	Grau Celsius
TAMC	Contagem microbiana de aeróbios totais
TYMC	Contagem combinada de fungos e leveduras totais

Capítulo 1 – Introdução

Introdução

Os estudos publicados sobre a avaliação da qualidade e segurança dos suplementos alimentares são atualmente escassos, incluindo os que se referem a parâmetros microbiológicos. A presença de microrganismos patogénicos em alimentos e suplementos alimentares representa um problema de saúde pública, sendo que a ingestão de produtos contaminados pode conduzir a um processo de infeção de origem alimentar. A presença de toxinas responsáveis por intoxicações alimentares representa, também, um perigo para o consumidor [1].

Dado o aumento do mercado de suplementos alimentares e o facto de existirem poucos estudos sobre a qualidade e a segurança dos mesmos em Portugal pretendeu-se, com este estudo, avaliar, do ponto de vista da qualidade microbiológica, suplementos alimentares aplicados ao contexto desportivo e comercializados em Portugal. Exemplo destes estudos são o trabalho de investigação de uma Dissertação de Mestrado levada a cabo por Ana Costa em 2016, com título *Avaliação da qualidade e segurança microbiológica de suplementos alimentares comercializados no mercado Português*; e ainda o artigo de Blaise Pascale Pascale (Pascale, B. *et al*, 2015), com o título *Dietary Supplements: Knowledge and Adverse Event Reporting Among American Medical Society for Sports Medicine Physicians*, tratando-se este segundo de um caso internacional. Estes produtos estão facilmente acessíveis ao consumidor e o seu consumo tem registado um aumento no país [2].

O rendimento desportivo é bastante influenciado pela alimentação de forma a obter energia e nutrientes quer em quantidade, quer em qualidade, sendo importante para todos os que praticam desporto de uma forma regular [3]. A adoção de estratégias nutricionais adequadas antes, durante e também depois do treino permite aumentar a performance e a recuperação [4]. De acordo com um estudo realizado em Portugal com o objetivo de determinar a prevalência do uso de suplementos nutricionais, bem como o tipo de suplementos usados, o motivo da sua utilização e também a identificação da origem do aconselhamento nutricional, em atletas portuguesas com idades compreendidas entre os 12 e os 37 anos, foi possível verificar que 66% dos inquiridos consumiram suplementos nutricionais sendo que, em média, houve um consumo de quatro suplementos por atleta. Os suplementos mais consumidos são os multivitamínicos e minerais (67%), seguidos pelas bebidas desportivas (62%) e entre os mais consumidos também se encontram as proteínas. Entre as razões para a toma deste tipo de suplementos está a rápida recuperação, a melhoria da performance desportiva e também a redução da fadiga e aumento de energia [5].

1.1) Suplementos alimentares

Através de uma alimentação saudável e variada o organismo consegue obter as quantidades de nutrientes necessárias para um estado de equilíbrio. Contudo, consoante o estilo de vida, pode ser necessário complementar a alimentação para obter esses mesmos nutrientes. Esta necessidade justifica a comercialização de suplementos alimentares. Segundo o Decreto-Lei n.º 136/2003 de 28 de junho os suplementos alimentares são definidos como “géneros alimentícios que se destinam a complementar e ou suplementar o regime alimentar normal e que constituem fontes concentradas de determinadas substâncias nutrientes ou outras com efeito nutricional ou fisiológico, estemes ou combinadas, comercializadas em forma doseada, tais como cápsulas, pastilhas, comprimidos, pílulas e outras formas semelhantes, saquetas de pó, ampolas de líquido, frascos com conta-gotas e outras formas similares de líquidos ou pós que se destinam a ser tomados em unidades medidas de quantidade reduzida” [6].

As categorias usadas em suplementos alimentares não estão bem definidas, contudo podem considerar-se grupos como: vitaminas e minerais, plantas, extratos botânicos, fibras e probióticos, ácidos gordos essenciais e ainda aminoácidos e enzimas. Pode considerar-se ainda uma categoria de produtos-fronteira que inclui compostos que podem ser definidos como medicamentos e suplementos alimentares uma vez que a legislação alimentar não impossibilita o uso, em suplementos alimentares, de substâncias com atividade farmacológica (por exemplo a valeriana, melatonina, *Gingko biloba*, *Serenoa repens*, entre outros) [7]. Os produtos-fronteira suplemento alimentar/medicamento são produtos que, pelas suas características de apresentação e composição, poderiam ser comercializados ao abrigo da legislação alimentar ou da legislação aplicável aos medicamentos. Estes casos levantam problemas quer às empresas que colocam os produtos no mercado (e que são responsáveis pela sua classificação), quer às entidades regulamentares [8].

A colocação de um suplemento alimentar no mercado em Portugal, requer uma notificação à Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) sendo esta a Autoridade Competente e a responsável pela definição, execução e avaliação das políticas de segurança alimentar em Portugal [9].

O consumo de suplementos alimentares não requer o aconselhamento de um profissional de saúde cabendo apenas ao consumidor a opção de toma. Assim sendo não há uma adequação específica de um suplemento alimentar consoante as necessidades do consumo, nem a respetiva dosagem [10].

O consumo de suplementos alimentares tem sofrido um aumento nos últimos anos chegando a quase dois milhões de consumidores em 2017, representando 23.2% com mais de 15 anos, inclusive, residentes no Continente [2].

A aquisição de suplementos alimentares pode ser feita em farmácias, em ervanárias, em parafarmácias, superfícies comerciais (ex: hipermercados), em diversas plataformas online, entre outras, facilitando assim o acesso a estes produtos.

Como se trata de um tipo de produto muito abrangente existem no mercado suplementos alimentares desenhados com finalidades muito diferentes e que apresentam alegações de produto muito variadas. Existem suplementos alimentares para emagrecimento, para a prática desportiva, vitaminas e minerais, também para a fadiga física e intelectual, para o sistema digestivo, para os ossos e articulações, para o alívio de gripes e constipações entre outros.

1.2) Consumo de suplementos alimentares em Portugal

São escassos os dados disponíveis sobre o consumo de suplementos alimentares em Portugal. O estudo Target Group Index (TGI) da Marktest revelou que o número de portugueses que consomem vitaminas e outros suplementos alimentares tem sofrido um aumento nos últimos anos chegando a quase dois milhões de consumidores em 2017, representando 23.2% de indivíduos com mais de 15 anos, inclusive, residentes no Continente. Neste estudo pode ler-se que “em cada quatro portugueses, perto de um refere consumir estes produtos”. Desde 2013 tem havido um crescimento do consumo sendo que em 2017 foi alcançado o valor mais elevado. A maioria dos consumidores de vitaminas e suplementos alimentares são mulheres. Os hábitos de consumo vão aumentando com o avanço da idade apresentando uma taxa mais elevada a partir dos 65 anos, inclusive, apresentando certa de 31.9%. A figura 1 apresenta a evolução do consumo de vitaminas e suplementos alimentares desde 2008 até 2017, de acordo com este estudo [2].

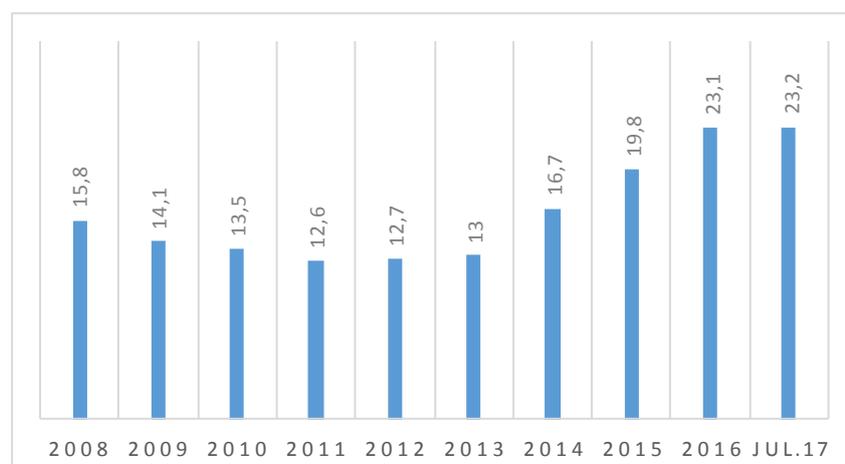


Figura 1 – Toma de vitaminas e/ou outros suplementos desde 2008 até julho de 2017. Adaptado de: Marktest, TGI [2].

1.3) Suplementos alimentares vs Medicamentos

A legislação aplicada aos suplementos alimentares não proíbe que substâncias que possuam atividade farmacológica possam ser incorporadas nos mesmos, ou seja, podem ser encontrados no mercado produtos contendo a mesma substância com atividade farmacológica mas que são produzidos e comercializados com base em requisitos diferentes, podendo respeitar a legislação aplicada aos suplementos alimentares ou a legislação aplicada aos medicamentos. Assim se compreende a dificuldade de enquadramento destes produtos que são conhecidos como produtos-fronteira suplemento alimentar/medicamento. A legislação aplicada a suplementos alimentares e a medicamentos é diferente. O suplemento alimentar é também considerado género alimentício mas com algumas especificações, como por exemplo o facto de se ter em consideração que contém nutrientes e outras substâncias de forma concentrada e é normalmente vendido de forma doseada. O suplemento alimentar deve ter efeitos fisiológicos como a manutenção, apoio e otimização [8]. O medicamento por sua vez é constituído por substâncias que podem ser usadas ou administradas no ser humano quando funções fisiológicas se encontram alteradas podendo dar origem a uma patologia, podendo ser usado para curar, modificar ou como forma de prevenção e diagnóstico [11]. Tal como anteriormente referido, a autoridade responsável pelos suplementos alimentares é a Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) e a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE) é a responsável pela fiscalização dos mesmos. Os medicamentos são regulados pela Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde (INFARMED), entidade responsável pela organização, orientação e aplicação do sistema de controlo dos medicamentos [11].

Segundo a Diretiva 2003/94/CE da comissão de 8 de outubro de 2003, os medicamentos têm de ser produzidos segundo as Boas Práticas de Fabrico que têm como objetivo garantir a qualidade que assegura que os produtos são produzidos conscientemente e controlados de acordo com as normas de qualidade apropriadas à utilização prevista [12]. Nos suplementos alimentares, por sua vez, são aplicados procedimentos baseados nos princípios de Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos (HACCP) associados às boas práticas de higiene [13]. As matérias-primas usadas na produção de medicamentos devem responder às especificações da farmacopeia aplicável, por sua vez os suplementos alimentares não obrigam a este requisito [11].

Também ao nível da rotulagem as regras são distintas. Na rotulagem e publicidade de suplementos alimentares não deve ser incluída informação que atribua aos mesmos propriedades profiláticas, de tratamento ou curativas de doenças e também devem declarar expressa ou implicitamente que não substituem um regime alimentar equilibrado e variado [6]. Os suplementos alimentares, não apresentam, na sua rotulagem, uma lista de reações

adversas ou contraindicações ao seu consumo, podendo induzir o consumidor da inexistência de efeitos adversos por parte dos mesmos [10].

Nos medicamentos as regras de rotulagem estão perfeitamente definidas, sendo proibida a publicidade de medicamentos sujeitos a receita médica, que contenham substâncias definidas como estupefacientes ou psicotrópicos ou que sejam comparticipados pelo Serviço Nacional de Saúde [14]. Os medicamentos devem conter o resumo das características do mesmo, rotulagem e folheto informativo elaborado com o objetivo de garantir a utilização segura e eficaz dos medicamentos [11].

A colocação de suplementos alimentares no mercado não requer uma avaliação de segurança visto que, de acordo com o Regulamento (CE) n.º 178/2002, um alimento é considerado seguro. Compete à DGAV assegurar que as reações adversas são registadas e devidamente processadas [15]. Por outro lado no que diz respeito aos medicamentos a sua introdução no mercado requer que os elementos e documentos apensos aos pedidos de autorização, estejam em conformidade com os requisitos aprovados pelo INFARMED, quanto aos ensaios clínicos efetuados no território nacional devem respeitar os requisitos da lei, devendo ser realizados em conformidade com os princípios éticos refletidos, por exemplo, na Declaração de Helsínquia [11]. O INFARMED é a entidade responsável pelo sistema nacional de farmacovigilância, adotando medidas adequadas para incentivar as notificações de suspeitas de reações adversas a medicamentos, por parte dos doentes e também dos profissionais de saúde [11].

Apesar de estas categorias aparentarem evidente diferenciação, na prática é frequentemente difícil estabelecer a fronteira entre estas classificações visto que os suplementos alimentares e alguns medicamentos partilham a forma de apresentação (por exemplo comprimidos ou cápsulas, soluções ou suspensões orais) e, por vezes, a sua composição qualitativa é passível de enquadramento em ambas as classificações [8].

Devido à dificuldade em enquadrar estes produtos, conhecidos como produtos-fronteira entre suplementos e medicamentos, o Concelho da Europa, em 2008, emitiu um documento em que é abordado o conceito de homeostasia: “*Homeostasis, a practical tool to distinguish between foods (including food supplements) and medicinal products*”, de forma a apoiar a sua diferenciação. A homeostasia é referida como “estatuto de uma pessoa na qual os parâmetros das funções fisiológicas se apresentam dentro de limites considerados normais” [8].

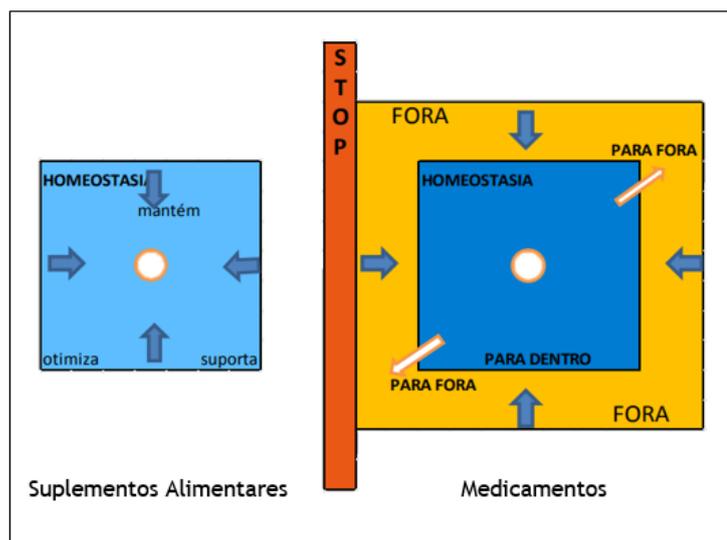


Figura 2 – Esquemática do modelo de Homeostasia. O quadrado azul representa os limites normais dos processos fisiológicos, enquanto o quadrado amarelo representa os processos fisiológicos que estão fora da normalidade. O círculo branco representa a situação ótima, ou seja, o objetivo que se quer alcançar. Adaptado de: [8].

De acordo com o esquema representado na figura 2, os suplementos alimentares ajudam a alcançar o objetivo, considerado como “zona ótima”, desenvolvendo-se dentro dos parâmetros fisiológicos normais enquanto os medicamentos, têm por objetivo corrigir parâmetros que se encontram fora da normalidade e também atingir a zona ótima [8].

1.4) Suplemento Alimentar vs. Alimentos para Desportistas

O Regulamento (UE) nº 609/2013 de 12 de Junho refere os alimentos que correspondem a géneros alimentícios destinados a uma alimentação especial pertencentes à categoria de “alimentos adaptados a um esforço muscular intenso, sobretudo para desportistas”, não apresentam disposições específicas para assegurar o seu consumo, deixando também de estar incluídos em subcategorias de alimentos [16]. Este tipo de alimentos designados vulgarmente de “alimentos para desportistas” não necessitam de notificar a DGAV para a sua colocação no mercado [17].

Por norma são apresentados comercialmente em grandes embalagens de pó, contendo na maioria hidratos de carbono e/ou proteínas, sendo também vendidos de forma doseada. Na ausência de legislação, a DGAV considera, que uma “unidade de medida de quantidade reduzida” correspondente a um valor superior a 25g ou 25 mL e um valor energético superior a 200 KJ (50 Kcal) por dia enquadra-os como género alimentício comum. Existem alimentos para desportistas que continuarão a enquadrar-se como suplementos alimentares, sendo da responsabilidade do operador económico definir qual é o enquadramento do produto que vai comercializar. Alimentos para desportistas que podem enquadrar-se como suplementos alimentares apresentam necessariamente uma forma doseada, que se destinem a consumos reduzidos, no máximo, 25g ou 25 mL, podendo haver várias tomas ao dia mas que não passem o valor indicado, e o valor energético total tem um valor máximo de 50 Kcal [17].

1.5) Legislação

1.5.1) União Europeia

O aumento de comercialização de suplementos alimentares evidenciou a necessidade de se adotarem regras comunitárias de forma a evitar as desigualdades de estado-membro para estado-membro. Os estados-membros têm em consideração as regras previstas pela Diretiva 2002/46/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 10 de junho de 2002, de forma a criar-se uma harmonia quanto à legislação relativa aos suplementos. Nesta diretiva está referenciada a lista, no anexo I, de vitaminas e minerais que podem ser utilizadas como ingredientes em suplementos alimentares e também as formas de fabrico, no anexo II, para segurança do consumidor, sendo que a comercialização de suplementos alimentares que contenham vitaminas ou minerais não referidos no anexo I ou que não respeitem as formas referidas no anexo II, pode ser proibida. Todas as substâncias que estão referenciadas no anexo II devem cumprir os requisitos em relação à pureza que estão previstos na legislação em vigor [18]. De forma a poderem ser incluídas mais substâncias, as listas foram alteradas pela Diretiva 2006/37/CE da Comissão de 30 de março, que posteriormente foi alterada pelo

Regulamento (CE) n.º 1170/2009 da Comissão de 30 de novembro, Regulamento (UE) n.º 1161/2011 da Comissão de 14 de novembro, Regulamento (UE) n.º 119/2014 da Comissão de 7 de fevereiro e mais recentemente, o Regulamento (UE) n.º 2015/414 da Comissão de 12 de março [19].

A diretiva 2002/46/CE de 10 de junho também estabelece requisitos de rotulagem, sendo que no Regulamento (UE) n.º 1169/2011 de 25 de outubro se encontra a rotulagem específica para géneros alimentícios. A indicação das seguintes referências é obrigatória: “a) A denominação do género alimentício; b) A lista de ingredientes; c) A indicação de todos os ingredientes ou auxiliares tecnológicos enumerados no anexo II ou derivados de uma substância ou produto enumerados no anexo II que provoquem alergias ou intolerâncias, utilizados no fabrico ou na preparação de um género alimentício e que continuem presentes no produto acabado, mesmo sob uma forma alterada; d) A quantidade de determinados ingredientes ou categorias de ingredientes; e) A quantidade líquida do género alimentício; f) A data de durabilidade mínima ou a data-limite de consumo; g) As condições especiais de conservação e/ou as condições de utilização; h) O nome ou a firma e o endereço do operador da empresa do sector alimentar referido no artigo 8.º, nº 1; i) O país de origem ou o local de proveniência quando previsto no artigo 26.º; j) O modo de emprego, quando a sua omissão dificultar uma utilização adequada do género alimentício; k) Relativamente às bebidas com um título alcoométrico volúmico superior a 1,2 %, o título alcoométrico volúmico adquirido; l) Uma declaração nutricional.” [20].

O Regulamento (CE) n.º 178/2002 de 28 de janeiro “que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios”. É necessário haver uma base com medidas que regem os géneros alimentícios que sejam comuns nos estados membros, de forma a garantir a proteção do consumidor e evitar que sejam colocados no mercado géneros alimentícios não seguros [21].

A introdução no mercado de novos alimentos ou ingredientes alimentares é agora regulada segundo o Regulamento (UE) n.º 2015/2283 de 25 de novembro relativo a novos alimentos que vem revogar o Regulamento (CE) n.º 258/97 de 27 de janeiro [22].

Relativamente às alegações nutricionais e de saúde sobre os alimentos foi criado o Regulamento (CE) n.º 1924/2006 de 20 de dezembro que foi posteriormente modificado pelo Regulamento (UE) N° 1047/2012 de 8 de novembro [23,24].

Segundo o Regulamento (CE) n.º 2073/2005 a utilização de critérios microbiológicos aplicáveis a géneros alimentícios deve fazer parte da aplicação de procedimentos baseados no sistema HACCP e outras medidas de controlo de higiene. Os géneros alimentícios não deverão ter microrganismos ou toxinas e metabolitos em quantidades que possam constituir risco para a saúde humana [25]. No entanto, não estão descritos limites microbiológicos para aprovação

da qualidade de suplementos alimentares, ao contrário do que acontece com os produtos farmacêuticos, cujas especificações microbiológicas e procedimentos laboratoriais para a sua determinação estão perfeitamente definidos na Farmacopeia Europeia 9.0 (e Farmacopeias nacionais decorrentes da sua adaptação nos Estados-Membros).

1.5.2) Portugal

O Decreto-Lei n.º 136/2003, de 28 de junho, foi alterado pelo Decreto-Lei n.º 118/2015 de 23 de junho, sendo que neste encontra-se a definição legal de suplementos alimentares [9].

As normas em relação ao fabrico e também à comercialização de suplementos alimentares encontram-se fixadas na Diretiva n.º 2002/46/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 10 de junho, assim sendo deve-se também obedecer aos regulamentos referenciados no tópico 1.5.1. O Decreto-Lei n.º 118/2015 não é aplicável a medicamentos, sendo que esses são definidos no Decreto-Lei n.º 72/91, de 8 de fevereiro tendo sido alterado pelo Decreto-Lei n.º 242/2000, de 26 de setembro relativamente a medicamentos para uso humano [6].

Os estados-membros podem decidir o esquema de controlo que querem colocar para controlo dos suplementos alimentares, podendo exigir, que a colocação no mercado no seu território seja informada à autoridade competente dessa comercialização [18].

Em Portugal a Autoridade Competente é a Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), sendo responsável pela definição, execução e avaliação das políticas de segurança alimentar. A DGAV foi criada pelo Decreto-Lei n.º 7/2012 de 17 de janeiro de 2012 [26].

A ASAE, criada em 2005 pelo Decreto-Lei n.º 237/2005 de 30 de dezembro, por sua vez tem como objetivo o controlo da segurança alimentar e da fiscalização económica, sendo responsável pela avaliação e comunicação dos riscos alimentares e também pelo controlo das atividades económicas nos setores alimentares e não alimentares [27].

O Plano Nacional de Fiscalização Alimentar da ASAE (PNFA) segue as normas referidas no regulamento (CE) n.º 882/2004, de 29 de abril, de forma a organizar os procedimentos feitos pela ASAE em relação ao controlo oficial dos géneros alimentícios e dos alimentos, ao longo de toda a cadeia alimentar. O Plano Operacional de Suplementos Alimentares (POSA) faz parte do PNFA, tem como objetivo que seja uniforme a aplicação de princípios geral e controlo em relação aos géneros alimentícios [28].

Capítulo 2 – Objetivos

Este trabalho tem como objetivo testar suplementos alimentares habitualmente utilizados no contexto da prática desportiva, no que respeita à sua qualidade microbiológica de acordo com as metodologias da Farmacopeia Europeia 9.0 (Ph Eur. 9.0). Pretendendo-se ainda analisar criticamente os resultados obtidos tendo em conta as especificações em vigor para alimentos e para medicamentos, bem como a análise da rotulagem dos produtos em teste à luz da legislação atual.

Capítulo 3 – Materiais e Métodos

3.1) Protocolo de estudo

Neste estudo foram incluídas 25 amostras adquiridas comercialmente, via internet, na plataforma Prozis (www.prozis.com), reconhecida como referência em praticantes de desporto, apresentando uma interessante diversidade de produtos de diferentes marcas e preços; ou fornecidas por consumidores deste tipo de suplementos, pelo que algumas das amostras já se encontravam previamente abertas (em uso). As informações detalhadas sobre as amostras analisadas estão descritas na tabela 1 e completadas na tabela A do anexo I.

Foram seleccionadas amostras de marcas de referência, algumas entre as que são consideradas as melhores marcas deste tipo de suplementos alimentares e também foram seleccionadas amostras de “marca branca”.

Entre maio e novembro de 2017 foram realizados os ensaios laboratoriais para determinar a qualidade microbiológica das amostras obtidas. Essas amostras foram divididas em 6 categorias: *gainers* (“ganho de massa” - produtos usados para o aumento de peso e de massa muscular), proteína, bebidas energéticas, aminoácidos, creatina e dextrose, consoante a sua caracterização. Esta classificação foi feita com base no fabricante e pela designação também do distribuidor.

A codificação atribuída às amostras foi a seguinte: G (*gainers*), W (amostras de proteína), E (bebidas energéticas), B (aminoácidos), C (creatina) e D (dextrose).

As amostras que são da mesma marca e com a mesma fórmula, mas com sabores distintos, foram codificadas com o mesmo número diferindo apenas numa letra apostá (a, b, c,...), enquanto às amostras iguais, com a mesma marca, fórmula e sabor mas que fora disponibilizados para análise por utilizadores diferentes são classificadas com o mesmo número diferindo apenas num segundo número (1.1,1.2,1.3...).

As amostras foram analisadas no laboratório de microbiologia em ambiente estéril e todos os meios e reagentes usados nos ensaios foram testados relativamente à sua esterilidade, de acordo com as boas práticas estabelecidas para estes procedimentos laboratoriais.

Todas as amostras analisadas encontravam-se dentro da validade determinada pelo fabricante.

Para cada amostra foi efetuada a validação do método e ensaio de qualidade microbiológica segundo a respetiva monografia da Farmacopeia Europeia 9.0, especificadas adiante.

Tabela 1 – Informação de rotulagem e codificação das amostras testadas.

Categoria	Código da Amostra	Composição qualitativa	Sabor	Estado
Gainer	G1	Maltodextrina, proteínas concentradas do soro de leite, leite magro, cacau em pó, frutose, proteína isolada de soja, amido de arroz, bicarbonato de potássio, fosfato monossódico, caseinato de cálcio, aroma de Chocolate, triglicéridos de cadeia média, espessante (goma guar), cloreto de sódio, edulcorante (sucralose), D-alfa tocoferol, ácido ascórbico, nicotinamida, citrato de zinco, cloridrato de piridoxina, cianocobalamina.	Chocolate	Aberta
Proteína	W1	Iso Whey Zero Blend 92% [isolado de proteína de soro de leite, L-glutamina, BCAA-s (L-leucina, L-isoleucina, L-valina)], aromas, café instantâneo, óleo de coco (contém leite) totalmente e parcialmente hidrogenado, emulsionante (lecitina de soja), espessante (carboximetilcelulose de sódio), sal, canela, vanilina, edulcorantes (sucralose, glicosídeos de esteviol).	Tiramisú	Aberta
	W2	Concentrado Proteico de Soro (de Leite, Emulsionante: Lecitina de Soja) contendo frações proteicas de lactoglobulina, lactoferrina, lactalbumina e imunoglobulina; Taurina, Aromas (Requeijão, logurte, Limão), Requeijão em Pó (de Leite), Cloreto de Sódio, logurte em Pó (de Leite), L-Glutamina, Edulcorantes (Acessulfame K, Sucralose), L-Leucina, Espessante (Goma Xantana), Isolado de Proteína de Soro (de Leite, Emulsionante: Lecitina de Soja), Dextrose, Bromelaína extraída de Ananas comosus (1200 UDG/g), Papaína extraída de Carica papaya (1,5 FIP U/mg).	Cheesecake e de limão	Fechada
	W3.1	Concentrado de proteína do soro de leite (contém emulsionante (lecitina de soja)), matriz de aminoácidos (monohidrato de creatina, glicina, taurina, BCAAs 2:1:1 (L-Leucina, L-Isoleucina, L-valina), L-Glutamina), complexo multienzimático DigeZyme® (Alfa-amilase, protease neutra, celulase, lactase, lipase).	Natural	Aberta
	W3.2		Natural	Aberta
	W3.3		Natural	Aberta
	W6	Proteína, hidratos de carbono, gorduras, L-Leucina, L-Isoleucina, L-valina, L-Glutamina, L-lisina, L- treonina, L-metionina, L-fenilalanina, L-tirosina, L- alanina, L-arginina, ácido L-aspártico, L-glicina, L-histidina, L-prolina, L-serina, L-triptofano, beta-lactoglobulina, alfa-lactoalbumina, albumina sérica, imunoglobulinas, lactoferrina, outras.	Baunilha	Fechada
	W7a	Farinha de aveia (73%), concentrado de proteína do soro de leite (25%), aroma, espessantes (Goma de guar, goma xantana), Cloreto de sódio, Edulcorante (Sucralose).	Baunilha	Fechada
	W7b	Farinha de aveia (70%), concentrado de proteína do soro de leite (24%), cacau em pó, espessantes (Goma de guar, goma xantana), aroma, Cloreto de sódio, Edulcorante (Sucralose).	Chocolate	Fechada
	W8a	Concentrado de proteína do soro de leite (contém emulsionante (lecitina de soja)), matriz de aminoácidos (monohidrato de creatina, glicina, taurina, BCAAs 2:1:1 (L-Leucina, L-Isoleucina, L-valina), L-Glutamina), complexo multienzimático DigeZyme® (Alfa-amilase, protease neutra, celulase, lactase, lipase), aroma, creamer (leite), espessantes (goma de guar, goma xantana), edulcorantes (acesulfame k, sucralose), acidificante (ácido cítrico), corante (vermelho de beterraba).	Framboesa	Fechada
	W8b	Concentrado de proteína do soro de leite (contém emulsionante (lecitina de soja)), matriz de aminoácidos (monohidrato de creatina, glicina, taurina, BCAAs 2:1:1 (L-Leucina, L-Isoleucina, L-valina), L-Glutamina), cacau magro em pó, complexo multienzimático DigeZyme® (Alfa-amilase, protease neutra, celulase, lactase, lipase), aroma, creamer (leite), espessantes (goma de guar, goma xantana), edulcorantes (acesulfame k, sucralose).	Chocolate e manteiga de amendoim	Fechada

	W9a	Isolado de proteína de soro de leite CFM e concentrado, beta-lactoglobulina, alfa-lactoglobulina, imunoglobulinas, glicomacropéptidos, lactoferrina e fatores de crescimento IGF1 e IGF2 (beta 1 e beta 2), matriz de aminoácidos (L-glutamina, BCAAs Rácio 4:1:1 (L-leucina, L-isoleucina, L-valina), lecitina de soja, complexo multivitamínico e mineral, aromas e sucralose.	Côco	Fechada
	W9b	Isolado de proteína de soro de leite CFM e concentrado, beta-lactoglobulina, alfa-lactoglobulina, imunoglobulinas, glicomacropéptido, lactoferrina e fatores de crescimento IGF1 e IGF2 (beta 1 e beta 2), matriz de aminoácido (L- glutamina, BCAAs Rácio 4:1:1 (L-leucina, L-Isoleucina e L-Valina), lecitina de soja, cacau em pó, complexo multivitamínico e mineral, aromas, sucralose.	Chocolate de leite	Fechada
	W9c	Isolado de proteínas de soro de leite, concentrado de proteínas de soro de leite, cacau em pó, L-glutamina, emulsionante (lecitina de soja), L-leucina, aroma, L-isoleucina, L-valina, acidificante E330, carbonato de cálcio, sulfato de magnésio, vitamina C (ácido L-ascórbico), fumarato ferroso, óxido de zinco, cloreto de potássio, vitamina B3 (nicotinamida), vitamina E (acetato dl-alfa-tocoferilo), gluconato de manganês, ácido pantotênico (d-pantotenado cálcico), gluconato de cobre, vitamina A (acetato de retinilo), beta-caroteno, vitamina B1 (cloridrato de tiamina), vitamina B2 (riboflavina), vitamina B6 (cloridrato de piridoxina), vitamina K (fitoquinona), ácido fólico) ácido pteroilmonoglutâmico), iodeto de potássio, picolinato de crômio, d-biotina, selenito de sódio, adoçante E955, E954.	Chocolate de laranja	Fechada
	W10	Isolado de proteína do soro de leite (94%), cacau magro em pó, aroma, emulsionante (lecitina de soja), edulcorantes (acesulfame K, sucralose), complexo multienzimático dizezyme (alfa-amilase, protéase neutra, celulase, lactase, lipase).	Chocolate	Fechada
	W11	Mistura de proteína de soro de leite (isolado de proteína de soro de leite de fluxo cruzado microfiltrado, soro de leite concentrado e ultrafiltrado (leite)), cacau, aromatizantes naturais e artificiais, goma de celulose, goma xantana, carragenina, lecitina de soja, cloreto de sódio, acesulfame de potássio, sucralose, mistura de enzimas digestivas (papaina e Bromelaína).	Chocolate	Fechada
Bebidas Energéticas	E1	Dextrose, Maltodextrina, Proteínas isoladas do soro de leite, Frutose, Proteína concentrado do soro de leite, Citrato de cálcio, Carbonato de magnésio, Cloreto de sódio, Gluconato de zinco, Cloreto de crômio, Fructooligosacáridos, Ácido cítrico, Glutamina, Leucina, Beta-caroteno, Aromatizante, Isoleucina, Valina, Ácido ascórbico, Ácido nicotínico, Acetato de tocoferol, Cálcio-d-ácido pantotênico, Piridoxina HCL, Riboflavina, Tiamina mononitrato, Retinil acetato, Ácido fólico, Biotina, Cianocobalamina, Lecitina de soja, Sucralose, Grainha de uva (0,05%), Ginkgo biloba (0,03%), Ácido alfa lipóico (0,03%).	Laranja	Fechada
	E2	Dextrose, Frutose, L-Leucina, Aroma, Ácido cítrico, PeptoPro® (caseína hidrolisada da proteína do leite), Citrato de magnésio, L-Valina, L-Isoleucina, Citrato de sódio, Dióxido de silício, Cloreto de sódio, DL-Ácido málico, extracto de beterraba em pó (frutos silvestres), Monofosfato de potássio, Ácido ascórbico, Sucralose, Corante: E102/E133 (limão).	Limão	Fechada
	E3	Maltodextrina, frutose (32%), acidificante (ácido cítrico, Ácidomálico), reguladores de acidez (citrato trisódico, citrato de potássio), aromas naturais (lima-limão), sal marinho.	Cítrico	Fechada
	E4	Amido, rugador de acidez (E-330), citrato de tri-sódico, gluconato de cálcio, gluconato de magnésio, aromas, gluconato de potássio, edulcorantes (E950, E951), corante (beta-caroteno).	Cítrico	Fechada

	E5	Glucose, reguladores de acidez (ácido cítrico), citrato trisódico, fosfato de cálcio, cloreto de potássio, carbonato de magnésio, edulcorantes (E950), extrato de ginseng, aroma, vitaminas (vitamina B1, vitaminas B2, niacina, ácido pantoténico, vitamina B6, vitamina B7 (biotina), ácido fólico, vitamina B12), corantes (E104 (limão, aroma a laranja), E124 (Ginja, aroma de toranja), E110 (toranja, aroma a laranja)	Limão	Fechada
	E6	Cafeína anidra	Sem Sabor	Aberta
Aminoácidos	B1	BCAAs (L-leucina, L-isoleucina, L-valina)	Natural	Fechada
Creatina	C1	Monohidrato de creatina	Sem sabor	Fechada
Dextrose	D1	Glucose, regulador de acidez (ácido cítrico), aromas, corantes (E104 (limão, aroma a laranja), E110 (toranja, aroma a laranja).	Limão	Fechada

3.2) Materiais e Microrganismos

Neste estudo foram utilizados dois meios de cultura diferentes preparados de acordo com as instruções do fabricante: Tryptic Soy Agar (TSA) e Sabouraud Dextrose Agar (SDA), ambos fornecidos pela VWR [29].

Foi utilizada uma solução neutralizante de modo a neutralizar qualquer efeito conservante da formulação previamente à contagem microbiana, permitindo que os microrganismos existentes fossem recuperados e contados no meio de ágar. Para isso, preparou-se uma água peptonada tamponada aditivada de polisorbato 80 a 30 g/L, saponinas a 30 g/L, lecitina de soja a 3 g/L e TritonX100 a 1 g/L. Os compostos do neutralizante, foram todos adquiridos à VWR. Esta mistura corresponde a uma solução otimizada, na Labfit, com base nas recomendações da Ph Eur. 9.0.

Usou-se água peptonada tamponada (pH = 7) como solução diluente para a preparação das suspensões de microrganismos. Esta solução foi preparada de acordo com as instruções do fabricante, e foi fornecida pela VWR [29].

Para a validação do método foi incluída uma coleção de cinco estirpes, correspondendo a três bactérias (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* ATCC 6633) e dois fungos (*Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404), de acordo com as especificações da Ph Eur. 9.0 [29].

A água ultra-pura utilizada nas preparações foi obtida através de um sistema Millipore (Merck). Todos os restantes reagentes utilizados são de grau analítico ou equivalente.

3.3) Validação do método

A validação do método visa o estudo e seleção da mistura de compostos que permitam a neutralização de conservantes existentes nas formulações visto que estes têm como função impedir a multiplicação de microrganismos. Visto que o ensaio laboratorial para a determinação da qualidade microbiológica avalia a recuperação da população microbiana a partir da amostra em estudo, é importante garantir que a função conservante de compostos existentes nesses produtos seja previamente neutralizada, de modo a impedir o seu papel inibidor da multiplicação microbiana. O ensaio de validação é realizado com base na avaliação da recuperação de UFC (unidades formadoras de colónias) de microrganismos padrão intencionalmente inoculados na amostra, depois de dissolvida na solução de neutralizante, e numa concentração conhecida. Segundo a Ph Eur. 9.0, a validação da

neutralização é testada na primeira diluição da amostra em neutralizante e após uma segunda diluição desta mistura em neutralizante, numa proporção de 1:10.

Neste estudo foi utilizada uma mistura de compostos com função neutralizante, otimizada pela Labfit, com base na sua vasta experiência de avaliação de produtos farmacêuticos. O neutralizante é testado de modo a garantir que também não apresenta toxicidade para os microrganismos em teste. Os microrganismos utilizados para o estudo de validação do método foram adquiridos a repositórios de culturas de coleção (ATCC). As condições de cultivo e incubação dos microrganismos estão descritas na tabela 2 [29].

Tabela 2 – Condições de incubação, meios de cultura, tempos e temperaturas de incubação e absorvâncias dos microrganismos de referência usados neste estudo [29].

Microrganismos	Absorvância 600 nm	Condições de incubação das placas que foram repicadas	Condições de incubação das placas com amostra	
			Aeróbios totais	Fungos e Leveduras totais
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	0.080	TSA 30-35 °C 18-24h	TSA 30-35 °C ≤ 3 dias	—————
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	0.075			
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0.200			
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0.750	SDA 20-25 °C 2-3 dias	—————	SDA 20-25 °C ≤ 5 dias
<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	1.250	SDA 20-25 °C 5-7 dias, ou até que se obtenha boa esporulação		

Na preparação das suspensões de bactérias e fungos foram usados tubos de falcon de 15 mL com 9 mL de diluente onde, com a ajuda de uma ansa, se ressuspenderam os microrganismos provenientes das culturas de microrganismos que tinham sido previamente repicados para as placas. O tubo foi colocado no vórtex para homogeneizar a suspensão, posteriormente foi feito um branco só com água peptonada e depois foi observada a absorvância da suspensão. Sempre que os valores das absorvâncias eram superiores ao requerido foram feitas diluições (em água peptonada) até obter a absorvância correta, de acordo com o indicado na Tabela 2. A partir desta suspensão inicial foram feitas diluições de 1:10 (em água peptonada) até obter uma diluição de 10^{-4} para bactérias e de 10^{-3} para os fungos.

Num tubo de falcon com 9 mL de neutralizante foi adicionado 1g de amostra, obtendo-se assim uma diluição 10^{-1} , a partir da qual foi feita uma diluição sucessiva 10^{-2} , antes da inoculação com os microrganismos. O seguinte procedimento é feito de igual forma para ambas as diluições. Foram preparados 5 tubos por cada amostra, correspondendo a cada microrganismo. Cada tubo foi inoculado com a suspensão de cada um dos microrganismos, de modo a obter um inóculo não superior a 100 UFC. O controlo foi feito em 5 tubos de falcon, um por cada microrganismo, com apenas 10 mL de neutralizante e inoculado com a mesma quantidade de microrganismos que foi feito nos tubos com neutralizante e amostra. Antes de inocular, as preparações foram agitadas (em vórtex) e posteriormente pipetou-se 1 mL da preparação para placas de petri, usadas em duplicado, e procedeu-se à incorporação com o meio específico para cada microrganismo bem como à incubação segundo as condições descritas na tabela 2.

Para demonstrar a ausência de toxicidade do neutralizante foi feito um procedimento semelhante ao referido anteriormente, diferindo apenas no facto de os microrganismos serem inoculados num tubo de falcon contendo apenas 10 mL de diluente, para ser comparado com a recuperação obtida no neutralizante [29].

Após incubação as placas foram observadas e foi feita a contagem de colónias em meio sólido, sendo representada essa contagem por UFCs.

3.3.1) Interpretação dos resultados

Foi calculada a média das UFCs das placas em duplicado de forma a obter os resultados.

Para que o método seja considerado validado é necessário que a média do número de UFCs do inóculo com amostra seja pelo menos 50% da média do número de UFCs do controlo. A validação pode ser conseguida na primeira diluição (10^{-1}) ou na segunda (10^{-2}) [29].

Para que o neutralizante seja considerado inócuo para os microrganismos, o número de UFC obtido no controlo com neutralizante (ausência de amostra) deve ser semelhante ao número de UFC obtido no tubo contendo apenas diluente [29].

3.4) Qualidade microbiológica das amostras

Para efetuar a qualidade microbiológica foram adicionados 10 g de amostra a um frasco de vidro com 90 mL de neutralizante, obtendo-se assim uma proporção de 1:10 (diluição 10^{-1}). A mistura foi deixada à temperatura ambiente, para ocorrer a neutralização, durante 30 ± 15 minutos. Posteriormente foi retirado 1 mL desta diluição inicial, que foi adicionado a 9 mL de neutralizante num tubo de falcon, fazendo a diluição 10^{-2} .

Ambas as diluições foram homogeneizadas no vórtex e posteriormente foi pipetado 1 mL, de cada diluição 10^{-1} e 10^{-2} , para placas de Petri em duplicado. De seguida foi feita incorporação com o meio respetivo: TSA para aeróbios totais e SDA para fungos e leveduras totais, e as placas foram incubadas segundo as condições da tabela 2 [29].

3.4.1) Interpretação dos resultados

No final da incubação foi feita a contagem do número de UFC de cada placa, e foram calculadas as médias dos duplicados de modo a obter o resultado final.

Após a leitura do número de UFC é necessário ter em conta o fator de diluição onde foi feita a validação do método, sendo que a média das placas é multiplicada pelo fator de diluição correspondente. As contagens em TSA referem-se aos aeróbios totais, apresentando o resultado em TAMC (contagem microbiana de aeróbios totais) e as contagens feitas em SDA referem-se a fungos e leveduras totais apresentando o resultado em TYMC (contagem combinada de fungos e leveduras totais).

O resultado final é expresso em TAMC e TYMC como número de UFC/g de amostra [29].

Os resultados são comparados com os critérios de qualidade microbiológica de formas farmacêuticas não estéreis, incluindo-se as amostras deste estudo nas preparações não aquosas para uso oral. Esse valor é de 10^3 UFC, sendo que o máximo de contagem aceitável é 2000 e para TAMC é de 10^2 UFC, com o valor máximo de contagem de 200, para TYMC segundo a monografia da Farmacopeia Europeia 9.0 [30].

Capítulo 4 – Resultados e discussão

4.1) Validação do método

Os resultados revelam que o neutralizante utilizado foi eficaz na inativação do conservante das amostras (exceto num caso), sendo que em 8 das 25 amostras testadas a validação foi conseguida na 1ª diluição, como se pode verificar na tabela 3 [29].

Tabela 3 – Diluições necessárias para a validação do método em cada amostra. A denominação de *Cont* refere-se a Contaminação enquanto *NN* se refere Não Neutralizável.

Amostras	<i>S.aureus</i> ATCC 6538	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16406
G1	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹
W1	Cont	Cont	Cont	10 ⁻¹	10 ⁻¹
W2	Cont	Cont	Cont	10 ⁻¹	10 ⁻¹
W3.1	Cont	Cont	Cont	10 ⁻¹	10 ⁻¹
W3.2	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻²
W3.3	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻²
W6	Cont	Cont	Cont	10 ⁻¹	10 ⁻¹
W7a	Cont	Cont	Cont	10 ⁻¹	10 ⁻¹
W7b	Cont	Cont	Cont	10 ⁻¹	10 ⁻¹
W8a	Cont	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻¹	10 ⁻¹
W8b	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹
W9a	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻¹	10 ⁻¹
W9b	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻¹	10 ⁻¹
W9c	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹
W10	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹
W11	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹
E1	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹
E2	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻¹	10 ⁻¹
E3	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹
E4	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻¹	10 ⁻¹
E5	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹
E6	10 ⁻¹	NN	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻²
B1	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹
C1	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻¹
D1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻¹	10 ⁻¹

Tabela 4 – Teste de toxicidade do neutralizante.

Microrganismos	Controlo de inocuidade				Controlo do neutralizante			
	UFC		Média	50% UFC	UFC		Média	50% UFC
<i>S.aureus</i> ATCC 6538	47	50	48.5	24.25	31	91	61	30.5
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	26	19	22.5	11.25	22	25	23.5	11.75
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	37	69	53	26.5	56	36	46	23
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	111	80	95.5	47.75	98	94	96	48
<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16406	58	60	59	29.5	71	73	72	36

O neutralizante usado na validação do método, foi também usado na qualidade microbiológica. O teste da toxicidade do neutralizante evidenciou que o crescimento dos 5 microrganismos incluídos no estudo na presença da mistura é comparável ao seu crescimento na ausência do neutralizante, cumprindo o critério descrito para a sua validação (>50% de UFC do controlo). Estes resultados estão presentes na tabela 4.

No estudo da validação do método verificaram-se alguns desvios consequentes da qualidade microbiológica das amostras, especificamente para as amostras W1, W2, W3.1, W6, W7a, W7b. Nestes casos não foi possível determinar a contagem exata de UFC dos microrganismos *S.aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* uma vez que a amostra se apresentava contaminada dificultando a distinção das colónias específicas destes três microrganismos das dos microrganismos contaminantes. No entanto, foi possível verificar o crescimento de colónias típicas destes microrganismos indicando que o neutralizante teria sido eficaz na sua função. O mesmo aconteceu também na amostra W8a relativamente a *S.aureus*, devido à presença de colónias contaminantes de grandes dimensões. Contudo foi possível a contagem de *P. aeruginosa*, *B. subtilis* na segunda diluição uma vez que nestas a contaminação não era tão elevada, sendo possível distinguir os microrganismos específicos.

No caso das amostras W9b e E2 a validação do método para a recuperação de *S.aureus* foi comprovada apenas na segunda diluição da amostra em neutralizante, tendo o mesmo ocorrido para as amostras W8a, W8b, W9b, E2 e D1, relativamente a *P. aeruginosa*, nas amostras W8a, W9a, W9b, E2, E4 e D1 para *B. subtilis*, na amostra C1 para *C. albicans* e nas amostras W3.2, W3.3 e E6 para *A. brasiliensis*. Estes resultados evidenciam que o(s) conservante(s) presentes nestes produtos apresenta(m) uma bioatividade mais evidente para os microrganismos referidos.

Na amostra E6 relativamente à bactéria *P. aeruginosa* foi repetido o método de validação, utilizando o mesmo neutralizante, para verificar, se não tinha sido apenas um erro de pipetagem nos resultados obtidos na primeira vez, onde não houve o crescimento de colónias suficientes para se conseguir a validação. Ainda assim, não se conseguiu obter a contagem de colónias suficientes para a validação na repetição do procedimento, possivelmente devido à presença de algum tipo de composto que impossibilite o seu crescimento. Esta amostra não foi neutralizável pela mistura de compostos neutralizantes utilizada apresentando possivelmente uma proteção intrínseca contra o crescimento desta bactéria.

4.2) Qualidade microbiológica

Os resultados, número de UFC/g de amostra, para aeróbios totais são apresentados em TAMC e para os fungos e leveduras totais são apresentados em TYMC. Esses resultados são comparados com os critérios de qualidade microbiológica de formas farmacêuticas não estéreis, incluindo-se as amostras deste estudo nas preparações não aquosas para uso oral. Esse valor é de 10^3 UFC, sendo que o máximo de contagem aceitável é 2000 e para TAMC é de 10^2 UFC, com o valor máximo de contagem de 200, para TYMC segundo a monografia da Farmacopeia Europeia 9.0 [30].

4.2.1) *Gainers*

Nesta categoria foi analisada apenas 1 amostra, obtendo-se os resultados apresentados na tabela 5.

Tabela 5 – Valores de TAMC e TYMC para a amostra de *gainer*.

Amostras	UFC/g	TAMC	TYMC
G1		50	10

Com base nos resultados obtidos pode-se verificar que quer para TAMC quer para TYMC os valores microbiológicos obtidos nesta amostra de *gainer* demonstram que a mesma está dentro dos limites microbiológicos, embora se trate de uma amostra que foi incluída no estudo em embalagem previamente aberta. Este resultado parece evidenciar que a fórmula apresenta perfil conservante equilibrado e eficaz contra a proliferação microbiana durante o período de utilização do produto.

4.2.2) Proteína

A qualidade microbiológica desta categoria incide sobre 15 amostras obtidas e todas incluídas dentro desta categoria, os resultados obtidos encontram-se na tabela 6.

Tabela 6 – Valores de TAMC e TYMC para as amostras de Proteína.

Amostras	UFC/g	TAMC	TYMC
W1		320	50
W2		1130	910
W3.1		330	492
W3.2		140	180
W3.3		75	0
W6		520	395
W7a		140	235
W7b		800	130
W8a		0	15
W8b		75	5
W9a		240	285
W9b		650	425
W9c		495	460
W10		20	0
W11		865	130

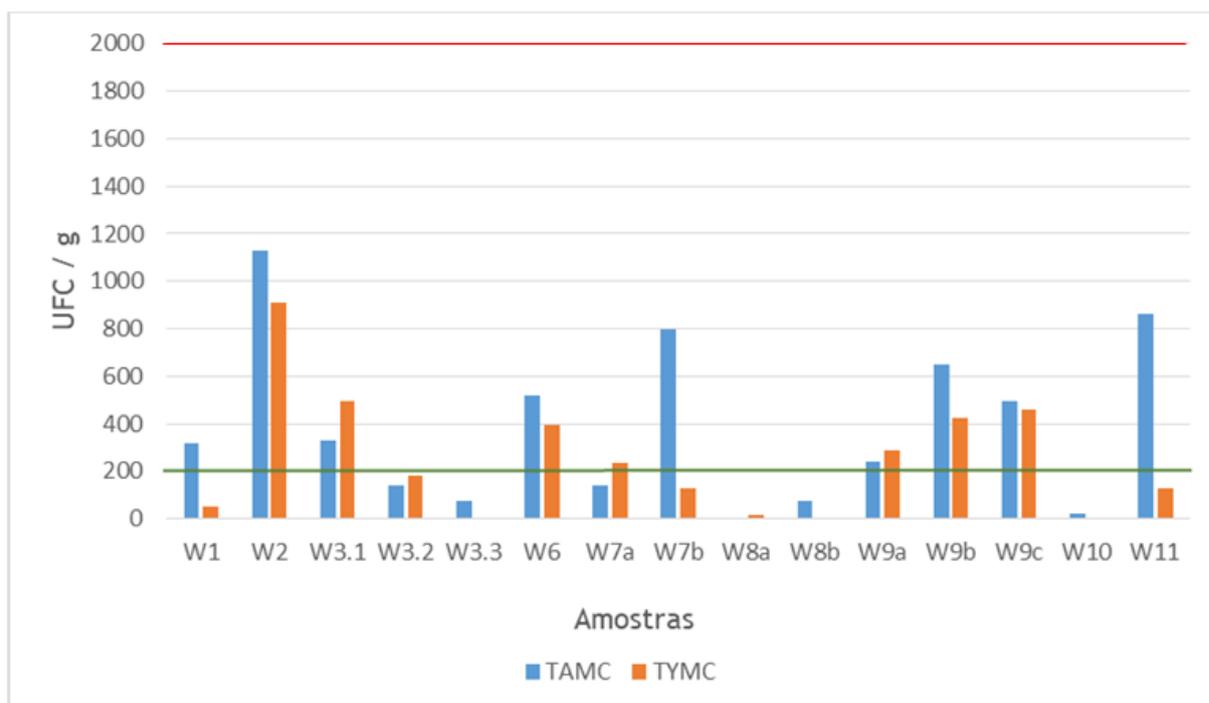


Figura 3 – Resultado da qualidade microbiológica das amostras de Proteína, sendo que as barras representam os valores obtido em TAMC e TYMC. Os valores limite para TYMC são representados pela linha verde enquanto o valor limite para TAMC está representado pela linha vermelha.

Como se pode verificar na figura 3, todas as amostras estão dentro dos limites microbiológicos definidos pela Ph. Eur. 9.0 para TAMC. Porém, existem amostras nas quais é ultrapassado o valor limite para TYMC, essas amostras são a W2, W3.1, W6, W7a, W9a, W9b e W9c. Contudo para algumas amostras as contagens de microrganismos foram mesmo inferiores ao limite de quantificação como é o caso dos TYMC das amostra W10 e W3.3, e para TAMC na amostra W8a.

Deste grupo de amostras a que apresenta maior nível de contaminação é a W2 e a menos contaminada é a W8a. Ambas as amostras referidas encontravam-se fechadas tendo sido abertas apenas em condições de esterilidade pelo que a diferença de resultados obtida não é explicada pela utilização do produto e manipulação das embalagens.

As amostras W3.1, W3.2 e W3.3 são iguais porém apresentam valores muito variados de níveis microbiológicos. Uma vez que todas foram fornecidas para análise já estando abertas (em uso), pode-se inferir que os produtos apresentariam no momento da produção níveis de contaminação diferentes, que o tipo de armazenamento ou condições de manipulação do produto poderão ter sido diferentes ou, ainda, que a abertura da embalagem também pode ter sido feita mais cedo para aquelas amostras que apresentam maior contagem de microrganismos. Tal como referido na secção de materiais e métodos, todas as amostras analisadas encontravam-se dentro da validade determinada pelo fabricante.

As amostras W7a e W7b são iguais diferindo apenas no sabor, sendo que apresentam valores diferentes e inclusive a amostra W7a apresenta valores fora dos limites de TYMC, estas amostras encontravam-se ambas fechadas. A amostra W7b tem como um dos ingredientes, cacau em pó. O cacau contém compostos fenólicos que apresentam capacidade antimicrobiana, o que pode ser uma possível justificação para o melhor comportamento demonstrado no que respeita aos fungos. Contudo seria expectável que este perfil fosse também observado no caso das bactérias, entre as duas amostras, o que não se verificou visto que a W7b apresenta maiores contagens de TAMC do que a W7a. É possível que as propriedades descritas para este ingrediente estejam relacionadas com maiores concentrações ou tipos de extrato diferentes do utilizado como aromatizante [31].

As amostras W8a e W8b são iguais apresentando apenas sabores diferentes. Ambas apresentam baixos valores microbiológicos sendo que a primeira não apresenta valores de TAMC possivelmente devida à presença de ácido cítrico na amostra, uma vez que este possui um efeito antimicrobiano devido ao baixo pH sendo, por isso, utilizado como conservante [32].

As amostras W9a, W9b e W9c são iguais diferindo apenas no sabor, sendo que todas apresentam valores de TYMC fora dos limites estabelecidos, contudo cada uma apresenta valores microbiológicos diferentes.

4.2.3) Bebidas energéticas

Nesta categoria foram analisadas 6 amostras, sendo que os resultados obtidos se encontram na tabela 7.

Tabela 7 – Valores de TAMC e TYMC para as amostras de Bebidas Energéticas.

Amostras \ UFC/g	TAMC	TYMC
E1	70	30
E2	0	0
E3	0	0
E4	0	10
E5	0	0
E6	10	0

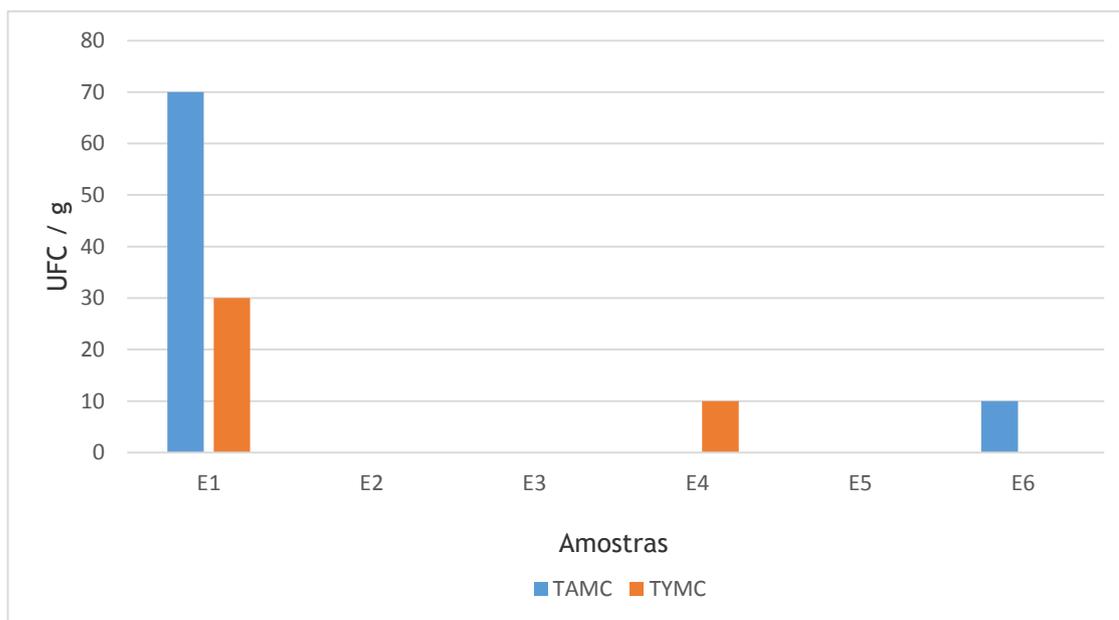


Figura 4 – Resultado da qualidade microbiológica das amostras de Bebidas Energéticas, sendo que as barras representam os valores obtido em TAMC e TYMC.

Os resultados das qualidades microbiológicas que se podem observar na figura 4, demonstram que todas as amostras presentes nesta categoria se encontram dentro dos limites microbiológicos, quer em TAMC quer em TYMC. Pode-se verificar até mesmo a presença de 3 amostras nas quais não se verificou qualquer tipo de contaminação, corresponde às amostras E2, E3 e E5. Na amostra E4 não houve valores de TAMC, enquanto na E6 não se obteve valores TYMC.

4.2.4) Aminoácidos

Nesta categoria encontra-se apenas uma amostra, sendo que os resultados obtido encontram-se na tabela 8.

Tabela 8 – Valores de TAMC e TYMC para a amostra de Aminoácidos.

Amostras \ UFC/g	TAMC	TYMC
B1	290	155

De acordo com os resultados obtidos a amostra de aminoácidos analisada está dentro dos limites microbiológicos, cumprido assim os requisitos, embora o valor não esteja muito afastado do limite.

4.2.5) Creatina

Para esta categoria foi também analisada apenas uma amostra e os resultados obtidos encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9 – Valores de TAMC e TYMC para a amostra de Creatina.

Amostras \ UFC/g	TAMC	TYMC
C1	0	5

Nesta amostra é visível a inexistência da presença de aeróbios totais. Os valores obtidos de TYMC estão também dentro dos limites, apresentando valores reduzidos.

4.2.6) Dextrose

Nesta categoria foi analisada apenas 1 amostra, sendo que os resultados obtidos se encontram na Tabela 10.

Tabela 10 –Valores de TAMC e TYMC para a amostra de Dextrose.

Amostras \ UFC/g	TAMC	TYMC
D1	5	0

Os resultados obtidos para esta amostra também comprovam que a mesma se encontra dentro dos valores limite quer para TAMC quer para TYMC, sendo que para este último não foram obtidos valores, ou seja, há a ausência da presença de fungos e leveduras totais.

4.3 Rotulagem

Foi realizada a análise crítica dos rótulos das amostras obtidas, segundo a legislação em vigor referente à rotulagem específica para géneros alimentícios.

Essa análise foi feita com base na lista de menções obrigatórias presentes no capítulo IV, artigo 9.º, do Regulamento (UE) n.º 1169/2011 de 25 de outubro [20].

Tabela 11 – Análise dos rótulos das amostras segundo a lista de menções obrigatórias para a rotulagem de géneros alimentícios: a) denominação do género alimentício; b) lista de ingredientes; c) ingredientes ou compostos potencialmente alérgenos ou indutores de intolerâncias; d) quantidade de determinados ingredientes ou categorias de ingredientes; e) quantidade líquida; f) data de durabilidade mínima ou a data-limite de consumo; g) condições especiais de conservação e/ou as condições de utilização; h) nome ou a firma e o endereço do operador da empresa do sector alimentar; i) país de origem ou o local de proveniência; j) modo de emprego; k) título alcoométrico; l) declaração nutricional. Na simbologia da tabela o ✓ significa que está presente a informação; * indica a inexistência dessa informação e - informação não aplicável/não recolhida. [20].

	a)	b)	c)	d)	e)	f)	g)	h)	i)	j)	k)	l)
G1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓
W1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	*	✓	✓	✓	-	✓
W3.1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓
W3.2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓
W3.3	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓
W6	✓	*	*	*	*	*	*	✓	✓	*	-	✓
W7a	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓
W7b	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓
W8a	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓
W8b	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓
W9a	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓
W9b	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓
W9c	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓
W10	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓
W11	*	✓	*	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓
E1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓
E2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓
E3	✓	✓	*	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓
E4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓
E5	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓
E6	✓	✓	*	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓
B1	✓	✓	*	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓
C1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓
D1	*	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓

Como referido na introdução, existem requisitos de rotulagem, sendo obrigatória a indicação de referências específicas. É com base na análise destas referências que é feita a tabela 11.

Na maioria das amostras observou-se o cumprimento dos requisitos obrigatórios de rotulagem previstos na lei. Das amostras analisadas, a W6 é a que apresenta mais falhas no cumprimento dos requisitos de rotulagem, apresentando apenas a informação do género alimentício, o nome ou a firma e o endereço do operador da empresa do setor alimentar, o país de origem ou o local de proveniência e uma declaração nutricional. A amostra W11 é a segunda com mais falha no cumprimento destes requisitos.

A amostra W6, W11, E6 e B1 não apresentam a indicação de ingredientes ou auxiliares tecnológicos que possam provocar alergias ou intolerâncias, sendo este o item que apresenta mais falhas, podendo induzir o consumidor em erro uma vez que não revela esta informação importante.

Nas amostras W2 e a W6 não estavam presentes as condições de conservação e/ou as condições de utilização. A denominação de género alimentício não está presente em apenas duas amostras, sendo elas a W11 e a D1.

O requisito relativo às bebidas com um título alcoométrico não foi aplicáveis a estas amostras.

Para a amostra W1 não foi possível ter acesso à rotulagem concreta desta amostra uma vez que esta foi facultada para análise por um consumidor, tendo sido recolhida num frasco estéril.

Capítulo 5 - Conclusão

Este estudo visou a avaliação da qualidade microbiológica de produtos considerados como suplementos alimentares ou alimentos para desportistas, sendo que foi também realizada uma avaliação do cumprimento da rotulagem, de acordo com o descrito no Regulamento (UE) n.º 1169/2011 de 25 de outubro. Na ausência de critérios de avaliação da qualidade microbiológica deste tipo de produtos, foi considerado para efeito deste estudo, o critério definido na Farmacopeia Europeia 9.0 para produtos cuja apresentação (forma farmacêutica) é equivalente à apresentada pelos produtos em teste (formas farmacêuticas não estéreis, incluindo-se as amostras deste estudo nas preparações não aquosas para uso oral). Das 25 amostras analisadas todas apresentaram valores dentro dos limites estipulados para os aeróbios totais. Em relação aos fungos e leveduras totais foi ultrapassado o valor limite estipulado em 7 amostras. Quanto ao cumprimento dos requisitos de rotulagem, das 25 amostras, apenas 7 não apresentam a indicação dos requisitos obrigatórios. Duas das amostras não cumprem os requisitos de rotulagem e ao mesmo tempo não cumprem os requisitos microbiológicos.

Ao contrário do que acontece para os produtos farmacêuticos, a ausência de normas de boas práticas de fabrico bem definidas, contribuirá para estes perfis de não cumprimento com os critérios de qualidade.

Embora os valores obtidos de TAMC sejam inferiores ao limite para todas as amostras seria interessante realizar a pesquisa de microrganismos específicos e patogénicos cuja presença apresenta um risco para a saúde pública. Num estudo feito por Ana Costa em 2016, com título *Avaliação da qualidade e segurança microbiológica de suplementos alimentares comercializados no mercado Português*, foi feita a avaliação da presença de microrganismos indicadores de qualidade e de bioindicadores de higiene, bem como a avaliação da presença de bactérias patogénicas. Neste estudo verificou-se que a possibilidade de ocorrência de contaminações que podem comprometer a qualidade e a segurança dos suplementos alimentares é uma realidade [33].

A aplicação de Boas Práticas de Fabrico orientadas para a indústria dos suplementos alimentares poderiam ser uma ferramenta útil como garantia da qualidade microbiológica deste tipo de produtos disponíveis no mercado global.

Este estudo realizado em alimentos para desportistas evidencia a importância da definição de critérios de qualidade microbiológica para estes produtos e a monitorização do cumprimento da legislação relativa aos rótulos de modo a garantir que a informação disponível para o consumidor se encontra sempre completa. A fronteira, por vezes ténue, entre suplementos alimentares e medicamentos poderá, no futuro, conduzir a uma alteração regulamentar no

sentido de aumentar a exigência dos critérios de qualidade, incluindo os microbiológicos, aplicáveis aos suplementos alimentares aproximando-os dos medicamentos.

Como perspectiva futura, poderia ser aplicado este procedimento para as mesmas amostras, do mesmo lote, mas estando uma fechada e outra já em uso, para se poder ter um termo de comparação dos resultados e avaliação da ação do conservante após a abertura da embalagem, permitindo a avaliação da qualidade microbiológica, em uso, destas preparações. Seria também interessante realizar a pesquisa de microrganismos específicos nestas amostras.

Referências bibliográficas

- 1 – Soares, E. (2007). Doenças de origem alimentar: infecções e intoxicações. *Segurança e qualidade alimentar*, nº2, (6-8).
- 2 – Grupo Marktest. (2017). Disponível em: www.marktest.com/wap/a/n/id-22e3.aspx. Consultado em 16 de janeiro de 2018.
- 3 – Sousa, M., Teixeira, V. H., Graça, P. (2016). Nutrição no Desporto. *Direção Geral de Saúde. Programa Nacional para a Promoção da Alimentação Saudável*. Disponível em: http://www.alimentacaosaudavel.dgs.pt/activeapp/wp-content/files_mf/1464872937Nutric%CC%A7a%CC%83onodesporto.pdf. Consultado em 22 de janeiro de 2018.
- 4 – Taylor and Francis Group. (2011). IOC consensus statement on sports nutrition 2010. *Journal of Sports Sciences*. 29(S1), (S3-S4).
- 5 – Sousa, M., Fernandes, M. J., Moreira, P., Teixeira, V. H. (2013) Nutritional supplements usage by portuguese athletes. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. V83, (48-58).
- 6 – Decreto-Lei n.º 136/2003 de 28 de junho do Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e Pescas (2003). Diário da República: Série I-A, N.º 147.
- 7 – INFARMED. (2017). Suplementos alimentares: O que são e como notificar reações adversas. *Boletim de Farmacovigilância*. v21.
- 8 – INFARMED. (2016). Produtos-fronteira entre Suplementos Alimentares e Medicamentos. (1-10).
- 9 – Decreto-Lei n.º 118/2015 de 23 de junho do Ministério da Agricultura e do Mar (2015). Diário da República: Série I, N.º 120.
- 10 – Fernandes, P. (2009) Comportamento do consumidor face aos suplementos alimentares. *Segurança e Qualidade Alimentar*. nº6, 12-13
- 11 – Decreto-Lei n.º 176/2006 de 30 de agosto do Ministério da Saúde (2006). Diário da República: Série I, N.º 167.
- 12 – Directiva 2003/94/CE da Comissão de 8 de outubro (2003). Jornal Oficial da União Europeia n.º L 262.
- 13 – Regulamento (CE) n.º 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril (2004). Jornal Oficial da União Europeia n.º L 139.
- 14 – Decreto-Lei n.º 101/94 de 19 de abril do Ministério da Saúde (1994). Diário da República: Série I-A, N.º 91.
- 15 – DGAV (2018). Notificação de reações adversas. Disponível em: <http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?generico=10128953&cboui=10128953>. Consultado em 30 de janeiro de 2018.
- 16 – Regulamento (UE) n.º 609/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho de 12 de junho (2013). Jornal Oficial da União Europeia n.º L 181.

- 17 – DSNA/DAH. (2016). Produtos fronteira entre suplementos alimentares e alimentos para desportistas.
- 18 – Directiva 2002/46/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 10 de junho (2002). Jornal Oficial das Comunidades Europeias n.º L 183.
- 19 – European Commission (2018). Food supplements. Disponível em: http://ec.europa.eu/food/safety/labelling_nutrition/supplements_en. Consultado em 30 de janeiro de 2018.
- 20 – Regulamento (UE) n.º 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de outubro (2011). Jornal Oficial da União Europeia n.º L 304.
- 21 – Regulamento (CE) n.º 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho de 28 de janeiro (2002). Jornal Oficial das Comunidades Europeias n.º L 31.
- 22 – Regulamento (UE) 2015/2283 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de novembro (2015). Jornal Oficial da União Europeia n.º L 327.
- 23 – DGAV (2017). Alegações nutricionais e de saúde. Disponível em: <http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?generico=5924898&cboui=5924898>. Consultado em 30 de janeiro de 2018.
- 24 – Regulamento (UE) n.º 1047/2012 da Comissão de 8 de novembro (2012). Jornal Oficial da União Europeia n.º L 310.
- 25 – Regulamento (CE) n.º 2073/2005 da Comissão de 15 de novembro (2005). Jornal Oficial da União Europeia n.º L 338.
- 26 – DGAV (2018). Orgânica, missão e competências. Disponível em: <http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?actualmenu=59989&generico=3630726&cboui=3630726>. Consultado em 30 de janeiro de 2018.
- 27 – Decreto-Lei n.º 237/2005 de 30 de dezembro do Ministério da Saúde (2005). Diário da República: Série I-A, N.º 250.
- 28 – ASAE (2016). Plano Operacional Suplementos Alimentares. *Plano Nacional Fiscalização Alimentar da ASAE*.
- 29 – Eur. P. Monograph 2.6.12-Microbiological Examination of Non-Sterile Products: Microbial Enumeration Tests. (2017). European Pharmacopoeia 9.0.
- 30 – Eur. P. Monograph 5.1.4 - Microbiological quality of non-sterile pharmaceutical preparations and substances for pharmaceutical use. (2017). European Pharmacopoeia 9.0.
- 31 – EFRAIM, P., ALVES, A. B., JARDIM, D. C. P. (2011). Revisão: Polifenóis em cacau e derivados: teores, fatores de variação e efeitos na saúde. *Brazilian Journal of Food Technology*. v14. (181-201)
- 32 – Wang, S. (2009). Emerging Technologies for Food Processing. *Trends in Food Science*. v20, p.394.
- 33 – Costa, A. (2016). *Avaliação da qualidade e segurança microbiológica de suplementos alimentares comercializados no mercado Português*. Tese de Mestrado pela Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação, Porto.

Anexos

Anexo I

Tabela A - Informação de rotulagem e codificação das amostras testadas.

Categoria	Código da Amostra	Alegações de produto
Gainer	G1	Fórmula especialmente concebida para promover o máximo aumento do peso corporal e o ganho de massa, podendo ser utilizado também como reforço alimentar em indivíduos com dificuldades de alimentação ou falta de apetite. Esta fórmula, de baixo teor de gorduras, combina proteínas de absorção rápida (soro do leite) e absorção lenta (caseínas) permitindo uma síntese proteica eficaz a nível muscular, com hidratos de carbono de fácil digestão e alto índice glicémico.
Proteína	W1	Isolado de proteína de soro de leite de alta qualidade, sem lactose e glúten, reforçado com aminoácidos.
	W2	Mistura de proteína de soro de excelente qualidade proveniente de concentrado de soro e isolado de proteína de soro. Contribui para aumentar e conservar a massa muscular e também para manter os ossos em condições normais. Reforçada com aminoácidos essenciais e enzimas digestivas adicionais.
	W3.1	Enriquecida com creatina, BCAA e glutamina para conseguir impulsionar os processos de construção de músculo.
	W3.2	
	W3.3	
	W6	Proteína que aumenta o desempenho atlético enriquecida com aminoácidos que são usados na produção de tecido muscular e na reparação de tecido danificado.
	W7a	É um batido para beber pela manhã que combina aveia e proteína do soro de leite, elementos fundamentais para um pequeno-almoço saudável.
	W7b	É um batido para beber pela manhã que combina aveia e proteína do soro de leite, elementos fundamentais para um pequeno-almoço saudável.
	W8a	Enriquecida com creatina, BCAA e glutamina para conseguir impulsionar os processos de construção de músculo.
	W8b	Enriquecida com creatina, BCAA e glutamina para conseguir impulsionar os processos de construção de músculo.
	W9a	Fórmula avançada de proteína para desportistas de alto nível que desejam uma proteína de alta concentração e pureza, para ajudar na recuperação, e na proteção e desenvolvimento da sua massa muscular. É obtida através de processos naturais pelo que as suas frações proteicas ativas não são desnaturalizadas. Surge, assim, uma proteína limpa e praticamente livre de gorduras, colesterol e lactose.
	W9b	Fórmula avançada de proteína para desportistas de alto nível que desejam uma proteína de alta concentração e pureza, para ajudar na recuperação, e na proteção e desenvolvimento da sua massa muscular. É obtida através de processos naturais pelo que as suas frações proteicas ativas não são desnaturalizadas. Surge, assim, uma proteína limpa e praticamente livre de gorduras, colesterol e lactose.
	W9c	Fórmula avançada de proteína para desportistas de alto nível que desejam uma proteína de alta concentração e pureza, para ajudar na recuperação, e na proteção e desenvolvimento da sua massa muscular. É obtida através de processos naturais pelo que as suas frações proteicas ativas não são desnaturalizadas. Surge, assim, uma proteína limpa e praticamente livre de gorduras, colesterol e lactose.

	W10	Proteína <i>whey</i> ultrafiltrada, que fornece uma quantidade mais elevada de proteína por dose com um baixo teor de gorduras e sem açúcares – ideal para dietas de restrição calórica. É principalmente útil para pessoas que seguem uma dieta de restrição calórica para perder peso, pois permite-lhes manter a massa muscular e o défice de energia de que necessitam, graças à sua fórmula baixa em gorduras e sem açúcares.
	W11	Mistura de proteína rica em isolado de proteína <i>whey</i> de alta qualidade e enriquecida com papaína, bromelina e enzimas digestivas adicionadas para melhorar a absorção e a digestibilidade.
Bebidas Energéticas	E1	Bebida de recuperação, composta pelos nutrientes mais específicos para repor as reservas de energia muscular, favorecer a síntese de massa muscular e maximizar a recuperação, motivo pelo qual é o parceiro ideal de todo o tipo de atividades desportivas. É composto também por proteínas de alto valor biológico e de rápida absorção, um complexo de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs) e uma dose eficaz de hidratos de carbono de alto índice glicémico (absorção rápida), sendo praticamente, isento de gordura.
	E2	Bebida isotónica e de recuperação com uma composição inovadora na área da nutrição desportiva. A sua fórmula combina glucose e frutose, electrólitos, magnésio, aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs) e PeptoPro® (pequenas frações proteicas). O consumo de proteína juntamente com os hidratos de carbono, durante e após o treino, promove a absorção de água e a hidratação, acelera a regeneração das reservas de energia musculares, pode aumentar a performance física, protege os músculos durante o exercício, pode aumentar o tempo para se atingir a fadiga e acelerar a recuperação.
	E3	É uma bebida energética cientificamente elaborada com hidratos de carbono e electrólitos, para beber durante o exercício.
	E4	É uma bebida energética à base de hidratos de carbono, concebida especialmente para atletas de elite, que fornece a quantidade suficiente de energia muscular (glicogénio). Foi enriquecida com minerais para uma função isotónica e remineralizante, contribuindo, assim, para a reposição dos fosfatos perdidos em sessões de treino longas e intensas.
	E5	É constituído por hidratos de carbono, minerais e vitaminas do grupo B, que asseguram o equilíbrio de electrólitos e líquidos no organismo durante o exercício. Compensa a perda de água, fornecendo os electrólitos mais essenciais: sódio, potássio, cloretos, cálcio e magnésio. As vitaminas do grupo B estimulam a utilização dos hidratos de carbono no processo digestivo.
	E6	Com o dobro da cafeína de uma chávena de café normal, irá fornecer-lhe a energia de um dos estimulantes do SNC mais populares.
Aminoácidos	B1	É uma fórmula em pó de alta pureza de Leucina, Isoleucina e Valina numa proporção de 2:1:1. Este suplemento de BCAAs é rapidamente absorvido pela corrente sanguínea, aumentando imediatamente os níveis de aminoácidos no sangue.
Creatina	C1	Ajuda a fornecer energia às células, principalmente às musculares, aumentando a formação de Adenosina Trifosfato (ATP), que funciona como uma reserva de energia das células e também apoia as contrações musculares. O consumo diário creatina melhora o desempenho em séries de exercícios curtos e de alta intensidade, como treino com pesos e cardio intervalado.
Dextrose	D1	É um composto de produção de energia fundamental para o organismo. É um hidrato de carbono de fácil assimilação. A dextrose aumenta os níveis de açúcar na corrente sanguínea e estimula a secreção de insulina no pâncreas. A insulina transporta as partículas de glicose até aos músculos e ao fígado, onde são armazenadas na forma de glicogénio. Juntamente com os hidratos de carbono, a insulina abastece os músculos com creatina e aminoácidos.