**Guia** **de estudos de vida útil de alimentos**

**Anderson S. Sant’Ana**

**Glaucia Maria Pastore**

**Mario R. Marostica Junior**

**SUMÁRIO**

1. ***Introdução***
2. ***Escopo***
3. ***Mudanças que podem ocorrer com os alimentos durante o processamento e estocagem***
   1. Mudanças químicas/nutricionais
   2. Mudanças microbiológicas
   3. Mudanças sensoriais (ajustar sumário)
   4. Mudanças físicas (ajustar sumário)
4. ***Fatores intrínsecos e extrínsecos que afetam a vida útil dos alimentos***
5. ***Estudos de vida útil de alimentos***
   1. Alimentos nos quais patógenos são críticos
   2. Alimentos nos quais micro-organismos deteriorantes são críticos
   3. Alimentos nos quais compostos químicos são críticos
   4. Alimentos nos quais degradação de nutrientes são críticos (ajustar sumário)
   5. Alimentos nos quais características sensoriais são críticos
6. ***Planejamento, condução e interpretação de estudos de vida útil de alimentos***

***6.1. Métodos diretos:***

6.1.1. Métodos microbiológicos

6.1.2 Métodos químicos

6.1.3. Métodos sensoriais

6.1.4. Métodos físicos

***6.2. Métodos indiretos:***

6.2.1. Métodos microbiológicos

6.2.1.1. Modelagem preditiva

6.2.1.2. *Challenge tests*

6.2.2. Métodos acelerados

6.3 Métodos de agrupamento –

1. ***Validação e monitoramento da vida útil dos alimentos*** 
   1. Condições para validação/monitoramento da vida útil dos alimentos
   2. Modificação (redução/aumento) da vida útil dos alimentos com base no monitoramento
2. **Referências**

**1. Introdução**

De maneira geral, os alimentos e bebidas se deterioram ao longo do tempo, seja durante o processamento ou estocagem, em taxas que podem variar muito de caso para caso. Alterações em alimentos podem ser de origem física, química ou microbiológica e o impacto no produto pode ser desde uma pequena alteração sensorial, passando por perdas de nutrientes ou até gerar contaminação microbiológica, o que poderá ter impacto na saúde do consumidor. Desta forma, o comportamento de alimentos durante o armazenamento é de grande interesse às empresas e ao mercado consumidor.

**2. Escopo**

Esse guia tem o objetivo de apresentar, de uma forma concisa, critérios para a determinação do prazo de validade de um alimento com foco em seus parâmetros críticos, a saber: físico, químico, nutricional, microbiológico e sensorial. Esse guia é orientativo e não tem a pretensão de estabelecer metodologias para realização de testes e estabilidade, mas de orientar sobre critérios a serem estabelecidos para a condução de testes.

**3. Mudanças que podem ocorrer com os alimentos durante o processamento e estocagem**

**3.1. Mudanças químicas e nutricionais**

Muitas reações químicas e bioquímicas podem alterar a qualidade ou a segurança de um alimento durante o processo e a estocagem, tais como escurecimento não enzimático, escurecimento enzimático, oxidação, rancificação, interações com metais, isomerização de lipídeos, ciclização de lipídeos, isomerização cis – trans, oxidação e polimerização de lipídeos, desnaturação de proteínas, ligações cruzadas entre aminoácidos, entre outras. Algumas dessas alterações podem levar a perda vitaminas instáveis. Já minerais e, por se tratarem de nutrientes ~~estáveis~~ que não sofrerão perdas nutricionais significativas com estas transformações químicas durante a vida útil do produto. Macronutrientes podem sofrer alterações devido a reação de Maillard, condensação de Aminoácidos, oxidação lipídica e rancificação, entretanto, esses processos poderão ser perceptíveis em metodologias de análise sensorial, mas dificilmente serão detectados em métodos clássicos de análise de composição centesimal.

**3.2. Mudanças microbiológicas**

Os alimentos podem ser matrizes complexas, que junto com as embalagens e o ambiente compreendem um sistema que afeta os tipos e concentração dos micro-organismos presentes. Sendo assim, o alimento em si (parâmetros intrínsecos) e a atmosfera que envolve os alimentos (parâmetros extrínsecos), associados às condições de processamento, estocagem e distribuição, definem o comportamento microbiano.

De fato, as principais mudanças que ocorrem com os micro-organismos nos alimentos são sobrevivência, morte e multiplicação. A sobrevivência pode ocorrer quando a contagem microbiana está acima do limite do processo de causar a inativação dos micro-organismos no nível requerido para se assegurar sua estabilidade ou segurança. Além disso, alguns micro-organismos possuem a capacidade de formar esporos e, por serem estruturas com elevada resistência física e química, permitem que micro-organismos esporulados sobrevivam ao processamento e posteriormente germinem e se multipliquem durante a estocagem, distribuição e/ou consumo dos alimentos. Sendo assim, fica evidente que o fenômeno microbiológico de maior importância que concorre para a redução da vida útil da maioria dos alimentos é a multiplicação. Todavia, a morte dos micro-organismos pode limitar a vida útil de determinadas categorias de alimentos, tais como aqueles adicionados de probióticos. Em virtude da multiplicação, os micro-organismos deterioradores podem atingir contagens suficientes para alterar a aparência, sabor/odor, cor e textura dos alimentos. Já os patógenos podem atingir contagens suficientes que poderão comprometer a segurança alimentar quando do consumo do alimento.

Assim, como comportamento microbiano nos alimentos é muito dinâmico, torna-se fundamental quantificar o impacto individual e combinado dos fatores intrínsecos e extrínsecos para otimização de formulações e/ou para determinação precisa da vida útil dos alimentos.

**3.3. Mudanças sensoriais**

Com o decorrer do tempo os alimentos e bebidas, podem apresentar mudanças de seus aspectos sensoriais, como aparência, textura, sabor e odor, em decorrência de alterações físicas, microbiológicas, reações químicas e bioquímicas, impactando na vida de prateleira.

A exposição à luz, por exemplo, pode levar à oxidação e hidrólise de lipídeos e degradação de vitaminas resultando em *off-flavors* e rancidez.

Outras reações de oxidação podem resultar no escurecimento de produtos cárneos e sucos vegetais. A sedimentação e o escurecimento enzimático ou não enzimático podem resultar, respectivamente em separação de fases e em alterações de cor, além de outros aspectos. Essas alterações sensoriais, mesmo que não sejam nocivas à saúde, podem gerar a percepção de perda da qualidade do produto, impactando na sua aceitação por parte do mercado consumidor.

Algumas alterações, como a hidrólise e oxidação de lipídeos podem levar a *off-flavors* e rancidez, exposição à luz pode levar ao desenvolvimento de *off-flavor*, outras reações de oxidação podem levar ao escurecimento em determinados alimentos, sedimentação pode levar à separação de fases, escurecimento enzimático ou não enzimático pode levar a alterações na cor, além de outras alterações nas características sensoriais.

Tais parâmetros são fatores chave de decisão para a definição do prazo de validade.

**Fatores intrínsecos e extrínsecos que afetam a vida útil dos alimentos**

Muitos fatores podem interferir na vida de prateleira de um alimento, sendo que os mesmos são classificados em duas grandes categorias, conforme a Tabela 1 abaixo. A combinação desses fatores em um alimento o tornará mais ou menos susceptível às alterações durante o processamento e armazenamento.

Tabela 1. Fatores intrínsecos e extrínsecos em alimentos

|  |  |
| --- | --- |
| *Fatores intrínsecos* | *Fatores extrínsecos* |
| * Atividade de água * presença de O2 * pH * acidez * potencial redox * composição * presença de micro-organismos e enzimas * uso de conservantes * estado físico (sólido, líquido) | * Binômio tempo x temperatura (processamento térmico) * Controle das condições durante o armazenamento (tempo e temperatura) * Umidade relativa do ambiente (processamento e armazenamento) * Exposição à luz * Tipo de embalagem\* * Atmosfera \*\* * Danos físicos |

**\*detalhe sobre o tipo de embalagem:** O tipo de embalagem deve ser criteriosamente escolhido levando em consideração as barreiras e hermeticidade.

\*\* Utilização de gás nas embalagens é permitida em alguns casos de algumas categorias de produtos, conforme a legislação vigente.

**5. Estudos de vida útil de alimentos**

O estudo da vida útil de alimentos deve levar em consideração os aspectos microbiológicos, nutricionais, físico-químicos e sensoriais. Dessa forma, considera-se que o tipo de alimento pode ser categorizado frente aos seus pontos críticos característicos.

**5.1. Alimentos nos quais patógenos são críticos**

A composição do alimento, intensidade do processamento, sistema de embalagem, condições de estocagem e uso pretendido são os principais fatores que vão concorrer para tornar a multiplicação das bactérias patogênicas como fator limitante da vida útil dos alimentos. Na prática, tal afirmação indica que uma bactéria patogênica é capaz de atingir uma concentração de microorganismos em um alimento, capaz de trazer danos ao consumidor, antes que os aspectos sensoriais sejam percebidos.

No que concerne à composição do alimento, os principais parâmetros que podem tornar os alimentos susceptíveis à multiplicação de patógenos são o pH e atividade de água. Quanto maior o pH de equilíbrio final (>4,6) e/ou atividade de água (>0,85) do alimento em questão, maiores as chances de um ou mais patógenos se multiplicarem, se o processo aplicado e material de embalagem não garantirem a estabilidade comercial do produto. Um alimento com pH (>4,6) e/ou atividade de água (>0,85) se torna ainda mais crítico para a multiplicação de patógenos, se necessitar controle de temperatura durante a comercialização e se for um produto pronto para o consumo. Se ambos, pH e/ou atividade de água forem, respectivamente, menores que 4,6 e 0,85, bactérias patogênicas não serão críticas para a vida útil deste alimento. Este também será o caso de alimentos cujo pH e atividade de água forem, respectivamente, maiores que 4,6 e 0,85, porém submetidos a processos térmicos e embalados sob condições assépticas que não demandam controle de temperatura durante a estocagem.

Fatores como matérias-primas, intensidade e tipo de processamento, composição da formulação, sistema de embalagem, condições de estocagem e uso pretendido do produto devem ser considerados na definição do patógeno crítico para cada produto.

**5.2. Alimentos nos quais micro-organismos deteriorantes são críticos**

Definição de alimentos críticos quanto à deterioração microbiana é mais complexa quando comparada a patógenos, pois existem bactérias, fungos filamentosos e leveduras adaptados à multiplicação numa ampla faixa de parâmetros intrínsecos e extrínsecos e suas combinações. Todavia, a atividade de água tem um papel preponderante, e quanto maior, mais competitivas serão as bactérias frente a fungos filamentosos e leveduras. Em produtos com alta atividade de água (>0,95), porém com pH<4,6, as leveduras são mais competitivas. Com a queda do pH e da atividade de água, os fungos filamentosos tendem a ser os micro-organismos que limitam a vida útil dos alimentos.

Sabe-se que existem grupos de micro-organismos específicos que dominam a microbiota e são os principais responsáveis pela deterioração dos alimentos. Estes micro-organismos são frequentemente denominados *organismos deteriorantes específicos* (no inglês *specific spoilage organisms – SSOs*). A dominância de um *organismo deteriorante específico* é função da combinação da composição do alimento, intensidade do processamento, sistema de embalagem e condições de estocagem.

**5. 3. Alimentos nos quais compostos químicos e as degradações de nutrientes são críticos**

O processamento pode modificar macro e micronutrientes em alimentos. Para os macronutrientes essa alteração não será perceptível em termos de sua composição, pois raramente os métodos analíticos utilizados apontarão mudanças sensíveis que terão impacto na informação nutricional do alimento. Entretanto, para vitaminas as alterações são sensíveis e podem gerar mudanças consideráveis no seu conteúdo. Alguns alimentos podem ser mais críticos com relação às reações químicas e alterações nutricionais, principalmente devido à sua composição. O conhecimento da composição química/nutricional dos alimentos a serem avaliados é de fundamental importância para determinar se esses fatores podem ser críticos nesses alimentos.

Dependendo da natureza dos produtos, várias propriedades ou índices de qualidade devem ser monitorados experimentalmente. Para tanto, um desenho experimental deve ser elaborado levando-se em consideração as variáveis críticas.

No caso de alimentos a degradação de nutriente é crítica. A condução de teste de estabilidade (acelerada ou não) deve monitorar os parâmetros pertinentes, que serão determinados pelo próprio fabricante em função do conhecimento da composição do produto. Geralmente para alimentos, as vitaminas são conhecidas como os nutrientes mais sensíveis em relação à degradação. Já para macronutrientes, quando há degradação, é mínima, sem impacto nutricional, podendo ser detectada por análise sensorial. Os detalhes sobre níveis e métodos analíticos para cada nutriente/composto e para cada tipo de produto devem ser adequados para demonstrar o atendimento à legislação vigente, a qual deve ser consultada antes de se iniciar um teste de estabilidade.

**5.5. Alimentos nos quais características sensoriais são críticas**

É amplamente conhecido que a aceitação de alimentos e bebidas por parte dos consumidores está intimamente relacionada aos seus aspectos sensoriais. Durante o processamento e armazenamento de alimentos, fatores como aparência, cor, sabor, odor, textura, além de outros, são susceptíveis a mudanças e podem ser motivo de rejeição de um produto por parte do consumidor ou provocar a percepção de perda de qualidade do produto.

No caso de alimentos nos quais as características sensoriais são críticas, a condução de teste de estabilidade (acelerada ou não) deve monitorar aquelas que são críticas ou pertinentes, as quais serão determinadas pelo próprio fabricante em função de seu conhecimento em relação ao comportamento esperado do produto. O tipo de teste sensorial deve ser escolhido em função das características a serem monitoradas, do tipo de produto e do tipo de alteração mais característica no produto em questão. A leitura da legislação específica para cada produto é fundamental antes de se iniciar um teste de estabilidade para alimentos nos quais as características sensoriais são críticas.

**6. Planejamento, condução e interpretação de estudos de vida útil de alimentos**

**6.1. Métodos diretos:**

**6.1.1. Métodos microbiológicos – estudos de durabilidade**

Métodos diretos de determinação da vida útil se baseiam na exposição dos alimentos, não inoculados intencionalmente, às condições de comercialização, distribuição e consumo. Métodos diretos de determinação da vida útil podem ser usados quando a vida útil do alimento for limitada por multiplicação bacteriana e/ou fúngica, resultando em sua deterioração. Quando a multiplicação de patógenos for esperada, os testes-desafios devem ser usados (seção 6.1.2). Dependendo do alimento e do micro-organismo deteriorante que limita sua vida útil (fungos xerofílicos em alimentos de baixa umidade, por exemplo), este teste pode requerer um período de estocagem maior do que a vida útil esperada. Apesar disso, fornecem resultados mais precisos que os métodos indiretos, mas normalmente demandam longos períodos de testes (se a vida útil do produto for longa). Métodos diretos de determinação da vida útil também tendem a apresentar um custo elevado devido às demandas por espaço, controle estrito das condições normais/simuladas de estocagem e insumos para análises microbiológicas. Enquanto os testes acelerados encontram grande aplicação para avaliar as alterações físico-químicas, para estudos microbiológicos têm aplicação limitada.

Para condução de testes microbiológicos diretos de avaliação da vida útil é primordial:

1. *Conhecer os possíveis contaminantes microbianos que poderão deteriorar o produto para definição de frequência e quantidade de amostras a serem analisadas ao longo da vida útil e para seleção de meios de cultura e condições de incubação apropriadas para sua enumeração;*
2. *Definir o limite a partir do qual se indica que o alimento não é mais aceitável para o consumo, e encontra-se deteriorado do ponto de vista microbiológico. Este limite pode ser direto (aparecimento de micélio fúngico) ou indireto (estufamento do produto pela presença de gás ou alteração de odor/cor);*
3. *Planejar a condução dos testes em condições ótimas, reais e de abuso dos fatores críticos que fazem com que os micro-organismos possam se multiplicar e deteriorar o produto em questão;*
4. *Conduzir os testes usando a embalagem com as mesmas propriedades de barreiras aos fatores extrínsecos àquelas que serão disponibilizadas ao consumidor;*
5. *Planejar a condução dos testes considerando o comportamento do micro-organismo que limita a vida útil do produto se o produto puder ser estocado sob determinadas condições após a abertura da embalagem;*
6. *Replicar os testes com diferentes lotes e com diferentes embalagens de um mesmo lote) pode ser útil para avaliar como a variabilidade de composição e de processamento impactam na vida de prateleira do produto. Se a variabilidade for inaceitável, deverá ser reduzida através de ajustes nos ingredientes, produto e/ou processo ou a vida de prateleira do produto deve ser reduzida;*
7. *Estimar a vida útil do produto, diretamente através do cálculo do número de dias a partir do qual se observou que a multiplicação microbiana resultou em deterioração do produto. Ferramentas estatísticas tais como análise de sobrevida, dentre outras, também podem ser usadas para estimativa do tempo para que 10%, 30% ou 50% das embalagens apresentem sinal de deterioração;*

*h. Indicar a vida útil do produto (data de validade), considerando uma margem de segurança, estabelecida com base nos resultados dos testes conduzidos. Os testes devem ser conduzidos em condições que representem a realidade de estocagem e distribuição recomendadas para o produto.*

Alguns cuidados específicos relacionados aos testes diretos de vida útil sob o ponto de vista microbiológico:

* *Evitar provar alimentos, dando-se preferência a utilização de índices químicos ou físicos que indiquem a deterioração do alimento. Se provar o alimento for estritamente requerido, isto só deve ser feito após confirmação da ausência de patógenos e/ou toxinas microbianas;*
* *O teste de determinação da vida útil deve ser repetido quando: houver mudanças significativas na composição do produto (alteração de pH, atividade de água, quantidade e tipo de conservantes, ingredientes, material de embalagem, condições de processamento, dentre outros);*
* *Deve ser de responsabilidade da empresa avaliar a necessidade de repetição do teste direto de determinação da vida útil.*

**6.1.2. Métodos químicos**

Para a condução de testes diretos de avaliação de estabilidade em alimentos nos quais o decaimento de nutrientes é crítica , deve-se planejar o estudo de tal forma a se monitorar as possíveis variações de suas concentrações de modo que, ao final do estudo, o fabricante tenha ferramentas para garantir que a concentração dos nutrientes estejam de acordo com os valores declarados no rótulo

No caso da detecção de perdas de nutrientes declarados no rótulo, durante o estudo de estabilidade, a sobredosagem pode ser um recurso para o atendimento aos requisitos da legislação específica do alimento em questão. **Critérios:**

Alguns critérios podem ser indicados para a condução de um teste de estabilidade visando determinação de possíveis alterações de nutrientes ou outros compostos de interesse:

1. Análises a serem realizadas para determinação dos compostos de interesse.
2. Duração do estudo
3. Número de amostras
4. Temperatura do teste
5. ​Para o estudo de estabilidade, os fatores críticos (aqueles escolhidos pelo fabricante na tabela 1) podem ser determinados, de forma geral, nos seguintes tempos, no mínimo(a):

- tempo inicial (T0)

- tempo final (Tf)

(a) Nutrientes quimicamente estáveis podem ser avaliados apenas no tempo inicial.

Observações:

1) nutrientes estáveis em alimentos, sob as condições de processo e armazenamento, poderão apresentar apenas as justificativas técnicas para comprovação de sua composição nutricional.

2)O fabricante pode realizar a determinação em apenas um lote de produtos, o que deve acompanhar justificativa técnica de que o processo está devidamente controlado, reprodutível, mediante comprovação de informações sobre garantia da qualidade.

É responsabilidade da empresa determinar quais são os parâmetros necessários para iniciar um novo estudo de estabilidade do alimento.

4) As condições do estudo de estabilidade (como temperatura, tempos, umidade) devem ser determinadas e justificadas pelo fabricante frente às condições que simulem àquelas a que o produto será exposto após sua fabricação, como armazenamento e

transporte.

5) Estudos sobre a curva de degradação de vitaminas, considerando tempos intermediários de análise podem ser ferramentas úteis para validação da informação nutricional declarada para nutrientes sensíveis e justificativa a respeito da sobredosagem adotada para alguns nutrientes.

6) Considera-se como sobredosagem a quantidade aumentada de um nutriente em relação ao valor declarado na rotulagem, tendo em vista o decaimento desse nutriente durante o durante o processo produtivo e/ou prazo de validade. Assim, um produto recém-produzido com sobredosagem de nutrientes apresentará níveis superiores ao declarado na rotulagem e ao final do prazo de validade apresentará níveis mais próximosaos presentes na rotulagem.

7) Considerando os diversos fatores intrínsecos e extrínsecos que podem afetar o decaimento das vitaminas a um percentual variável no alimento, a empresa deve garantir que a quantidade das vitaminas atendam aos requisitos da categoria do produto conforme estabelecido pela legislação e que ao final do prazo de validade cumpra com as quantidades e os limites declarados no rótulo do produto.

**6.1.3. Métodos sensoriais**

Para a condução de testes de estabilidade em alimentos nos quais as características sensoriais são críticas, deve-se planejar o estudo de forma a se monitorar as possíveis variações dessas características de tal modo que, ao final do estudo, o fabricante tenha ferramentas para garantir que a qualidade sensorial do produto esteja de acordo com o esperado.

Os testes sensoriais podem ser classificados em 3 categorias: discriminativo, descritivo e afetivo. Cada um deles responde a uma pergunta de interesse diferente e possui particularidades nas aplicações dos testes e na caracterização dos provadores. O fabricante deve escolher aquele teste ou aqueles testes que melhor se adequem aos objetivos de seu estudo sensorial para determinação das possíveis alterações sensoriais nos produtos.

Com relação ao desenvolvimento do teste da estabilidade em produtos cujas características sensoriais são críticas, os mesmos critérios descritos no item **Métodos Químicos** podem ser utilizados.

Para interpretação dos resultados, entende-se que todos os fatores intrínsecos e extrínsecos podem levar a alterações das características sensoriais de alimentos e bebidas, de modo que a triagem daqueles críticos deve ser conhecida pelo fabricante.

**6.2.1 Métodos microbiológicos – testes desafio**

Os chamados testes-desafio (“*challenge tests*”, em inglês) envolvem a inoculação intencional de micro-organismo-alvo, seguindo-se avaliação do seu comportamento numa formulação e/ou condição específica de processo ou estocagem. O micro-organismo-alvo é enumerado em diversos períodos ao longo da estocagem para verificar se houve multiplicação e a extensão da multiplicação. Os testes-desafio, servem portanto, para avaliar se uma formulação de um alimento ou bebida permite a multiplicação de um micro-organismo durante a estocagem e comercialização. Podem também ser usados para determinar se uma etapa ou processo produtivo é capaz de causar a inativação de um micro-organismo-alvo (letalidade requerida). Todavia, para efeito deste guia, o enfoque será dado no uso dos testes-desafio para avaliar se um micro-organismo-alvo pode ou não se multiplicar durante a estocagem e comercialização de um produto. A condução de testes-desafio objetivando-se validar etapas letais da cadeia produtiva dos alimentos requer abordagem específica e não necessariamente está diretamente relacionada a determinação da vida útil de alimentos e bebidas.

No que concerne aos micro-organismos, tanto patógenos quanto deterioradores, podem ser inoculados nos alimentos e bebidas para condução dos testes-desafio. Para se definir se um teste-desafio é necessário e para se escolher o micro-organismo-alvo é primordial o conhecimento prévio do produto em questão e de suas condições de estocagem e comercialização. O desenho e condução de testes-desafio é complexo e requer conhecimento do produto, processo produtivo e distribuição, além de sólidos conhecimentos sobre microbiologia dos alimentos. Alguns fatores são críticos e devem ser considerados no desenho e condução de testes-desafio em alimentos, tais como critério de aceitação/rejeição, seleção do micro-organismo-alvo, preparo do inóculo e método de inoculação, concentração do inóculo, número de embalagens e lotes a serem testados, enumeração do micro-organismo-alvo, duração do teste, condições de estocagem e interpretação dos resultados.

Os testes-desafio podem ser utilizados com dois propósitos principais:

* *Determinar o potencial de multiplicação do micro-organismo-alvo* para validar a vida útil de um alimento sob condições esperadas de comercialização, distribuição e consumo, com o objetivo de verificar se o produto atende critérios microbiológicos específicos. Pode também ser usado para verificar se o produto permite a multiplicação do micro-organismo-alvo em condições específicas de comercialização, distribuição e consumo. O termo *potencial de multiplicação* pode ser definido como a diferença entre a maior contagem do micro-organismo-alvo (em log UFC/g ou mL) e sua contagem inicial (em log UFC/g ou mL);
* *Determinar os parâmetros cinéticos de multiplicação (tempo de lag e taxa de multiplicação)* *do micro-organismo-alvo* para quantificar o efeito de parâmetros intrínsecos e extrínsecos. Estes dados, podem posteriormente, serem usados para o desenvolvimento de modelos preditivos visando-se a simulação do comportamento microbiano em função de mudanças nos parâmetros intrínsecos e extrínsecos, inclusive para verificar se critérios microbiológicos serão atendidos sob determinadas condições de comercialização, distribuição e consumo.

Para condução de testes-desafio reitera-se a importância de sólidos conhecimentos do produto, processo e micro-organismo-alvo. Além disso, o uso de protocolos padronizados e reconhecidos internacionalmente é fundamental para garantir confiabilidade e comparabilidade de resultados. A ISO (*the International Organization for Standardization*) dispõe de guia para condução de testes-desafio em alimentos: *ISO 20976-1 Microbiology of the food chain — Requirements and guidelines for conducting challenge tests of food and feed products — Part 1: Challenge tests to study growth potential, lag time and maximum growth rate*.

**6.2. Métodos indiretos:**

**6.2.1. Métodos microbiológicos – Uso de modelos preditivos**

A microbiologia preditiva combina microbiologia, estatística e matemática para quantificar o comportamento microbiano em função de parâmetros intrínsecos e/ou extrínsecos. Após a coleta de dados e construção das equações e de sua validação, os modelos preditivos são usados para *predizer* respostas microbianas. Esta predição só poderá ser feita dentro da faixa de variação dos parâmetros intrínsecos e/ou extrínsecos usados na construção do modelo. Através de modelos preditivos, pode-se determinar a multiplicação, morte e probabilidade de sobrevivência dos micro-organismos.

Os modelos preditivos podem ser usados tanto durante o desenvolvimento de formulações, quanto na determinação da vida útil de alimentos em condições reais ou cenários de estocagem, distribuição e consumo. A grande vantagem da microbiologia preditiva para o estudo de vida útil dos alimentos é que um modelo preditivo permite a rápida tomada de decisões, sem demandar a condução de testes adicionais: apenas substituindo-se termos numa equação e procedendo-se aos cálculos. Além disso, os modelos preditivos podem ser usados para otimização e desenvolvimento de formulações mais robustas. Uma limitação da microbiologia preditiva reside no fato de demandar pessoal treinado para desenho, condução, tratamento e interpretação/aplicação dos resultados. Todavia, uma vez que um modelo é desenvolvido, e não havendo mudanças na formulação, tem-se como consequência direta a redução de custos e ganho de competividade, dentre outros.

Os modelos cinéticos e probabilísticos encontram grande aplicação no estudo da vida útil dos alimentos. A partir dos modelos cinéticos são obtidos parâmetros tais como o tempo de adaptação (tempo de lag), taxa de multiplicação e população máxima de um micro-organismo. Estes parâmetros possuem aplicação direta na estimativa da vida útil dos alimentos. Já os modelos probabilísticos são usados para estimar a probabilidade de ocorrência de um evento (deterioração de um alimento percebida pelo aparecimento de fungo em sua superfície, por exemplo). Os modelos probabilísticos encontram grande aplicação na etapa de desenvolvimento de formulações, permitindo a racionalização, e portanto, redução de trabalho e custos para a obtenção de formulações mais robustas. Os modelos preditivos também podem ser usados na resolução de problemas de deterioração, já que permitem avaliar inúmeros cenários de maneira rápida.

Os modelos preditivos são ainda classificados em primários, secundários e terciários. Os modelos primários descrevem mudanças relacionadas aos micro-organismos em função do tempo. Por exemplo, tempo de lag, taxa de multiplicação e população máxima de um micro-organismo são parâmetros obtidos de modelos primários. Já os modelos secundários descrevem como os parâmetros dos modelos primários mudam em função da variação de um ou mais fatores ambientais (pH, temperatura, dentre outros). Os modelos terciários são programas/ferramentas computacionais ou aplicativos que contém os modelos primários e/ou secundários numa interface amigável, para facilitar o uso dos modelos preditivos.

As etapas de desenvolvimento de modelos preditivos são:

1. **Planejamento:** demanda conhecimento do problema a ser estudado (micro-organismo e características do alimento);
2. **Geração e análise dos dados**: demanda conhecimento do produto, processo e micro-organismo, além de modelagem preditiva, para que o desenho experimental e coleta de dados permitam o ajuste do modelo preditivo e seu uso pretendido;
3. **Ajuste do modelo**: através de diversos procedimentos matemáticos e/ou da utilização de programas computacionais ou protocolos, faz-se o ajuste da equação aos dados e a partir daí, obtém-se os parâmetros relacionados ao comportamento microbiano;
4. **Validação do modelo**: um modelo preditivo deve ser validado internamente, utilizando-se dados obtidos em condições diferentes das quais foi desenvolvido e, preferencialmente, também validado com dados externos. Os modelos preditivos só devem ser usados após validação, confirmada pelo cálculo de índices estatísticos apropriados a cada caso.

Para o desenvolvimento e uso destes modelos requerem-se sólidos conhecimentos do produto, processo, micro-organismo-alvo e de modelagem preditiva. Para garantir o seu desenvolvimento e uso adequados, deve-se buscar auxílio de profissionais com experiência no desenvolvimento e aplicação de modelos preditivos para estudo do comportamento microbiano.

**6.2.2. Métodos químicos – testes acelerados**

A indústria tem grande necessidade de determinar a validade de um alimento em um tempo relativamente curto. Desta forma, métodos acelerados podem ser uma ferramenta útil para abreviar o tempo da estimativa da vida de prateleira de alimentos.

Os métodos acelerados podem ser utilizados para um processo de deterioração químico que possa ser quantitativamente expresso por um modelo validado. Esse modelo deve seguir as mudanças na vida de prateleira expressando o valor de uma determinada deterioração ou a falha na extensão da vida de prateleira de um produto sob uma determinada condição.

O método mais comum para estabilidade acelerada é aumentar a temperatura para acelerar processos de deterioração. A determinação da temperatura usada no teste é crucial para o seu desenvolvimento e deve ser escolhida com critério e de maneira justificada. De maneira geral, para os testes de estabilidade acelerada, a temperatura sugerida é 10ºC acima daquela à qual o produto está geralmente exposto durante o armazenamento, pois, via de regra, a velocidade das reações dobra com aumento de 10°C na temperatura. Entretanto, para casos em que a variável escolhida para acelerar as degradações não seja somente a temperatura, ou seja, um teste com uso de múltiplas variáveis para aceleração das degradações, as relações entre as diversas variáveis escolhidas devem ser bem conhecidas, bem como deve-se levar em consideração as características do produto e embalagem empregadas nos testes. A literatura técnica específica deve ser consultada.

Com relação ao desenvolvimento do teste da estabilidade acelerada, os mesmos critérios descritos no item **Métodos Químicos** podem ser utilizados.

**6.3. Métodos de agrupamento**

O agrupamento de produtos, de uma mesma empresa, com composição química e nutricional e processados e estocados em condições similares, pode ser realizado desde que se apresente justificativa técnica de que os compostos presentes não sofram alterações que afetem sua estabilidade. Este agrupamento não deve ser utilizado para determinação da vida útil de alimentos cujo fator limitante sejam micro-organismos.

Critérios para agrupar os produtos podem ser:

1. Composição química
2. Estado físico
3. Nutrientes a serem declarados no rótulo
4. Formulação
5. Processamento
6. Atividade de água
7. pH
8. Acidez total
9. Embalagem

7. Validação e monitoramento da vida útil dos alimentos

Como forma de validação da vida de prateleira do produto, o fabricante deve apresentar dados de monitoramento de parâmetros que são críticos, e que, portanto, limitam sua vida útil, tais como físicos, químicos, nutricionais, microbiológicos e sensoriais. Os parâmetros a serem monitorados deverão ser levantados pelo fabricante frente às características do produto.

Quando o prazo de validade for determinado por um método acelerado, o prazo de validade deve ser recomendado pelo fabricante, de acordo com as condições recomendadas de armazenamento e distribuição do produto.

7.1. Condições para validação/monitoramento da vida útil dos alimentos

No caso de um teste de validação, para determinar as condições experimentais, o fabricante precisa levantar os parâmetros sob os quais o alimento é transportado e armazenado e replicar essas condições no teste, para que seja o mais similar possível às condições reais. Parâmetros como temperatura, umidade, exposição à luz, tipo de embalagem, atmosfera, e outros que sejam pertinentes devem ser determinados e justificados pelo fabricante para realização do estudo. Os parâmetros relevantes (físicos, químicos, nutricionais, microbiológicos, sensoriais) devem ser determinados e apresentados de maneira justificada antes do início do teste. Os mesmos critérios descritos no item **Métodos Químicos** podem ser utilizados.

7.2. Modificação (redução/aumento) da vida útil dos alimentos com base no monitoramento

Os testes de estabilidade indicarão o tempo durante o qual o alimento permanecerá estável ao longo do transporte e armazenamento. Os valores encontrados nos testes de estabilidade devem ser utilizados para o fabricante estabelecer o prazo de validade de um novo produto ou para que avalie a necessidade de modificar a vida de prateleira de um produto já comercializado. Tipicamente, a vida de prateleira é determinada pela condução de estudos de estabilidade, mas não exclusivamente, pois o prazo de validade de um produto declarado em seu rótulo pode levar em conta outras condições, como aspectos comerciais associados à imagem do produto e a margem de segurança requerida.

**8. Conclusão**

São vários os parâmetros que influenciam a vida de prateleira de um alimento. Aspectos sensoriais, físico-químicos, microbiológicos e a relevância de cada um depende dos fatores intrínsecos e extrínsecos envolvidos em sua produção e armazenamento.

**9. Referências**

1. David Kilcast, and Persis Subramaniam. The stability and shelf life of vitamin-fortified foods R. Burch, Leatherhead Food Research, UK Food and Beverage Stability and Shelf Life : Food and Beverage Stability and Shelf Life, edited , , Elsevier Science & Technology, 2011. ProQuest Ebook Central.
2. *Kong F, Singh RP. Chemical deterioration and physical instability of foods and beverages, University of California, Davis, USA.* Food and Beverage Stability and Shelf Life, edited , , Elsevier Science & Technology, 2011. ProQuest Ebook Central.
3. Mizrahi, S. Accelerated shelf life testing of foods. R. Burch, Leatherhead Food Research, UK Food and Beverage Stability and Shelf Life : Food and Beverage Stability and Shelf Life, edited , , Elsevier Science & Technology, 2011. ProQuest Ebook Central.
4. Ottaway P.B. (1993) Stability of vitamins in food. In: Ottaway P.B. (eds) The Technology of Vitamins in Food. Springer, Boston, MA.
5. Leif H. Skibsted, Jens Risbo and Mogens L. Andersen. Chemical Deterioration and Physical Instability of Food and Beverages, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Elsevier, 2010.
6. Persis Subramaniam, The Stability and Shelf Life of Food. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Elsevier 2016.
7. Laurence Melton, Fereidoon Shahidi and Peter Varelis, Encyclopedia of Food Chemistry, Elsevier, 2019.
8. Lawless, HT; Heymann, H. Sensory Evaluation of Food. DOI 10.1007/978-1-4419-6488-5. Springer-Verlag New York. 1998.
9. Fanbin Kong and R. Paul Singh. Effect of Processing on Nutrients in Foods. Innovation in Healthy and Functional Foods. 2012. CRC Press.
10. FAO. <http://www.fao.org/3/t0207e/T0207E07.htm>. Acessado em 26/09/2019.
11. Jackson LS; Knize MG; Morgan JN, Impact of processing on Food Safety. Advances in Experimental Medicine and Biology. Vol. 459. 1999.
12. DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. Fennema's Food Chemistry. 4th ed. Boca Raton : CRC Press, 2008. ISBN 9780849392726.
13. BELITZ, H; GROSCH, W; SCHIEBERLE, P. Food chemistry. Berlin, Heidelberg : Springer, 2009. ISBN: 9783540699330.
14. Man CMD, Food Storage trials: an introduction. Elsevier 2011.

Food and Beverage Stability and Shelf Life : Food and Beverage Stability. Elsevier Science & Technology, 2011.

1. National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF). 2010. Parameters for determining inoculated pack/challenge study protocols. *Journal of Food Protection, 73*(1), 140-202. doi:10.4315/0362-028X-73.1.140