

Challenge testing and shelf-life studies

20 Junho 2008

Gonçalo Almeida e Tim Hogg

Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica
Portuguesa



Segurança Alimentar

Garantir que os alimentos não apresentam perigo para o consumidor quando são preparados e/ou consumidos de acordo com o uso para o qual foram destinados.

Vol.1B-1997- *Codex alimentarius*

Shelf-life

The period during which the product maintains its microbiological safety and sensory qualities at a specific storage temperature. It is based on identified hazards for the product, heat or other preservation treatments, packaging method and other hurdles or inhibiting factors that may be used.

Codex Alimentarius CAC/RCP 46 (1999)



Shelf-life

Assegurar que o produto não representa um perigo “quando são preparados e/ou consumidos de acordo com o uso para o qual foram destinados” dentro do seu shelf-life

Obrigação legal

Imperativo de negócio

Assegurar que o produto não sofre uma degrada o biológica (ou química) que, durante o seu shelf-life diminua a sua aceitabilidade pelo consumidor.

A abordagem geral para determinar ambos os tipos pode ser semelhante mas as orienta es externas e metodologias são frequentemente distintos.

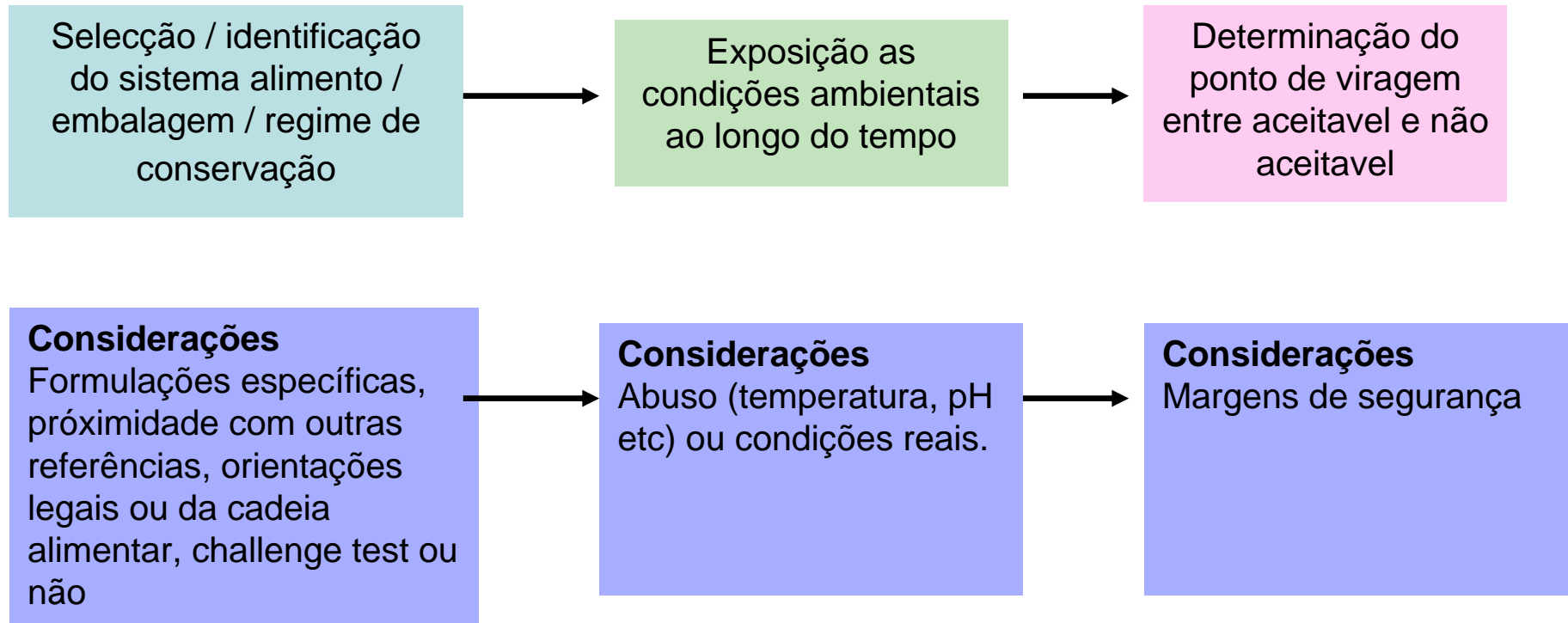


Abordagem genérica para a determinação do shelf-life

1. Utiliza sistemas virtuais, quando existem, para “balizar” estudos físicos. (Microbiologia preditiva é o exemplo mais óbvio).
2. Executar ensaios com base em “pior - cenário” recorrendo de condições de abuso quando apropriadas. (Ferramentas probabilísticas [Monte-Carlo] representam novas possibilidades).
3. No caso de segurança microbiológica Challenge-Testing é quase sempre aconselhável. No caso de critérios qualitativos, sistemas não adulterados podem servir melhor.



Shelf-life



MICROBIOLOGICAL CHALLENGE TESTING

Simular em laboratório o que ocorre num produto:

- durante o processo
- durante a distribuição
- subsequente manipulação

Envolve a inoculação do produto com microrganismos relevantes e/ou o armazenamento sob condições ambientais controladas, de modo a determinar o risco em termos de segurança do produto ou a estabelecer a estabilidade do produto.



MICROBIOLOGICAL CHALLENGE TESTING

- Serve para;
- determinar a capacidade que um alimento tem para suportar o crescimento de microrganismos deteriorantes ou patogénicos
- Determinar se um processo de inactivação microbiológica está a cumprir com os objectivos p.e. Na validação de um ponto crítico num plano de HACCP.
- Determinar o tempo de vida útil de alimentos armazenados sob as condições ambientais pretendidas..
- Validar modelos predictivos



1. Selecção de microrganismos

- Histórico do alimento. Associação a toxinfecções alimentares.
Ex. *Cl. botulinum* e atmosferas modificadas
S. aureus em produtos com a_w baixa
- O microrganismo “ideal” seria o isolado de uma formulação semelhante.
- Utilização de um “cocktail” de estirpes do mesmo organismo.
- Verificar a possibilidade de antagonismo de estirpes antes de proceder ao estudo.
- A preparação da suspensão do microrganismo deve ser feita de uma forma padronizada.
- Utilização de microrganismos geneticamente marcados
- Utilização de microrganismos testemunhas em vez de patogénicos.
Ex. *Cl. sporogenes* em vez de *Cl. botulinum*
L. innocua em vez de *L. monocytogenes*



Tipo de alimento	Organismo
Molhos para saladas	Salmonella, S.aureus
MAP (vegetais, carnes, pescado, aves)	Clostridium botulinum (proteolitico e não proteolitico e outros: Salmonella, L. monocytogenes, E. coli enterohemorrágica
Produtos de confeitaria	Salmonella, S.aureus
Molhos temperatura ambiente	Salmonella, S.aureus
Produtos lácticos	Salmonella, S.aureus, Cl. botulinum, L.monocytogenes
Fórmulas com novos aditivos	Salmonella, S.aureus, Cl. botulinum, L.monocytogenes



pH	a_w	Organismo
> 4,6	> 0,85	Staphylococcus aureus
> 5,0	> 0,93	Bacillus cereus
> 4,6	> 0,94	Salmonella spp
> 4,6	> 0,95	Escherichia coli O157
> 4,6	> 0,92	Listeria monocytogenes
> 5,5	> 0,93	Clostridium perfringens



2. Inóculo

Depende do objectivo do estudo:

- $10^2 - 10^3$ células/g para a estabilidade do produto.
- $10^6 - 10^7$ células/g para validar processos de redução do número de microrganismos.



3. Duração do estudo

- Deverá ser conduzido, pelo menos, durante o tempo de vida do produto.
- É desejável prolongar o estudo para além do prazo de validade do produto, permitindo a verificação das consequências do abuso pelo consumidor.
 - Algumas agências requerem estudos com uma duração do prazo de validade mais pelo menos um terço.
- O estudo deverá ser feito, no caso dos produtos refrigerados, à temperatura de refrigeração e sob temperaturas de “abuso”.
- A frequência do teste deve ser diária, se o prazo de validade é dado em dias.
- A recolha de dados deverá ser entre 5 e 7 pontos iniciando-se sempre ao “tempo zero”



3. Duração do estudo

Duração	Pontos	Intervalo
24h – 5 dias	1 –5	Cada 24h iniciando-se ao tempo 0
6 – 14 dias	5	Cada 1-3 dias iniciando-se ao tempo 0
15 – 21 dias	6	Cada 3-4 dias iniciando-se ao tempo 0
22 – 31 dias	7 – 10	Cada 3 dias iniciando-se ao tempo 0
32 –40 dias	8 –10	Cada 4 dias iniciando-se ao tempo 0



3. Formulação

- Quando se avalia uma formulação deverão considerar-se os factores que influenciam a estabilidade microbiológica.
- Factores intrínsecos (pH, aw ou aditivos) podem ser chave na prevenção do crescimento microbiano.

Exemplos:

O pH alvo é $4,8 \pm 0,2$. É importante realizar o teste a pH 5,0.

O ácido sórbico é usado na concentração de $0,15 \pm 0,05\%$. O teste deverá realizar-se com 0,10%.



4. Condições de armazenamento

Se o produto vai ser comercializado sob condições específicas (p.e. atmosfera modificada ou vácuo) as amostras utilizadas para o estudo deverão estar acondicionadas da mesma forma.

As temperaturas utilizadas durante o estudo deverão ser as mesmas que durante a distribuição, armazenamento e exposição.

Um produto refrigerado poderá estar sujeito a “temperaturas de abuso”. O estudo deverá contemplar temperaturas representativas desse abuso.



5. Interpretação dos resultados

- Na análise de dados verifica-se o comportamento do microrganismo. Morreu, permanece estável, aumentou o número?
- No fim do período não deverá ser detectada toxina bacteriana, no caso de microrganismos produtores de toxinas.
- Quando utilizado na validação de um ponto do processo, os dados recolhidos deverão demonstrar se a redução microbiana esperada foi alcançada.



Recomendações

- *Bacillus cereus*

O critério preferido é a ausência de toxina.

Um aumento de 3 log indica a necessidade de um controlo tempo/temperatura.

Inóculo inicial: 1000 UFC/g

Arroz e batatas estão associados a intoxicações.



Recomendações

- *Campylobacter* spp e *Shigella* spp

Estes microrganismos têm vias de contaminação semelhantes à *Salmonella*.

Como requerem condições fastidiosas de crescimento não é relevante usar em Challenge testing.



Recomendações

- *Clostridium botulinum*

O requerido é a ausência da toxina.

Deverá ser realizado o challenge testing com este microrganismo em produtos com história de causar toxinfecções, Sous vide, vácuo e MAP.



Recomendações

- *Clostridium perfringens*

Inóculo inicial: 100 UFC/g

Um aumento de 3 log implica perda do controlo do perigo.

É necessária uma dose $> 10^5$ UFC/g para causar doença.



Recomendações

- *Listeria monocytogenes*

Um nível de 100 UFC/g no momento do consumo é suficiente para a protecção do consumidor. Os alimentos que permitem o crescimento de *L.monocytogenes* representam alto risco.

O aumento de 1 log é indicação de perda do controlo do microrganismo.



Recomendações

- *Salmonella*

O crescimento da população de *Salmonella* deve ser inferior a 1 log.

O mesmo aplica-se a *E.coli* enterohemorrágica



Recomendações

- *Staphylococcus aureus*

Não deve ocorrer a formação da toxina durante o estudo.

Pode-se efectuar o estudo considerando como limitante um crescimento $< 3 \log$.

Inóculo inicial: 1000 UFC/g

É recomendado fazer o estudo com *S.aureus* em alimentos que sofram muita manipulação humana.

