



Challenge tests para avaliar o período de vida útil secundário em fiambre fatiado pré-embalado

Challenge tests to evaluate secondary shelf-life of pre-packed sliced ham

André Sousa, Conceição Costa Bonito, Isabel Sousa, Maria Manuel Toscano, Isabel Bastos Moura, Teresa Teixeira Lopes, Cláudia Pena, Isabel Campos Cunha, Margarida Saraiva, Maria Antónia Calhau

margarida.saraiva@insa.min-saude.pt

Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto/Lisboa, Portugal.

_Resumo

O período de vida útil de um género alimentício corresponde ao intervalo de tempo em que, respeitando as condições de conservação e manipulação, os atributos de segurança e qualidade do produto se mantêm. O período de vida útil secundário é o período de tempo durante o qual, após abertura da embalagem de origem, o produto se mantém conforme. Realizou-se a avaliação do período de vida útil secundário em duas marcas de fiambre fatiado pré-embalado, 1 lote da marca A e 1 lote da marca B, aplicando *Challenge Tests*, através do cálculo do potencial de crescimento (δ) de *Listeria* spp. em diferentes momentos do seu período de vida útil primário. Após a abertura das embalagens, os produtos foram inoculados com baixas concentrações de *Listeria* spp. ($2 \log_{10}$ ufc/g) e conservados a uma temperatura de refrigeração abusiva, 12 ± 1 °C, durante 3 dias. Aproximadamente a um mês do fim do seu período de vida útil e no fim deste, o fiambre da marca A não permitiu o crescimento de *Listeria* spp. ($\delta < 0,5 \log_{10}$ ufc/g). Assim, para este produto, o período de vida útil secundário de três dias foi validado. Um mês antes do seu período de vida útil primário expirar, o fiambre da marca B apresentou um $\delta > 0,5 \log_{10}$ ufc/g, 24 horas após abertura da sua embalagem, pelo que o período de vida útil secundário de três dias não é válido, se conservado a uma temperatura de refrigeração de 12 ± 1 °C. As bactérias ácido-láticas representaram a flora dominante do fiambre nas duas marcas. As elevadas concentrações de bactérias ácido-láticas ($> 7 \log_{10}$ ufc/g), no fiambre da marca A, a um mês do fim do prazo de validade e no fim do período de vida útil primário do fiambre da marca B, podem ter sido a causa da ausência de desenvolvimento de *Listeria* spp. O cumprimento da temperatura de conservação é fundamental para a manutenção da qualidade e segurança microbiológica dos géneros alimentícios, ao longo dos seus períodos de vida útil.

_Abstract

A food product shelf-life is the period over time during which a food product maintains its safety and quality under well-defined storage and manipulation conditions. Secondary shelf-life is defined as the period after package opening during which a food product maintains an acceptable quality level. Challenge tests assessing *Listeria* spp. growth potential (δ) were performed on two brands of pre-packed ready-to-eat sliced ham (1 batch of brand A and 1 batch of brand B) in order to evaluate its secondary shelf-life at different stages of its primary shelf-life. After pack opening, the products were inoculated with low levels of *Listeria* spp. ($2 \log_{10}$ cfu/g) and stored under an abusive refrigeration temperature, 12 ± 1 °C, during 3 days. About a month before

the end of the shelf-life and at the end of it, the brand A sliced ham did not support the growth of *Listeria* spp. at both stages of the study ($\delta < 0,5 \log_{10}$ cfu/g). For this product, the secondary shelf-life of 3 days was validated. One month before the primary shelf-life expires, brand B sliced ham showed a $\delta > 0,5 \log_{10}$ cfu/g, 24 hours after pack opening. The 3 days secondary shelf-life could not be validated if stored at temperature of 12 ± 1 °C. Lactic acid bacteria were the dominant microflora of the sliced ham. High numbers of lactic acid bacteria ($> 7 \log_{10}$ cfu/g) may have been the cause for the inhibition of *Listeria* spp. growth in brand A sliced ham and in brand B sliced ham at the end of its primary shelf-life. The fulfilment of storage temperature is a fundamental condition for the maintenance of the food products microbiological quality and safety, during their shelf-life periods.

_Introdução

O período de vida útil de um género alimentício corresponde ao intervalo de tempo em que, respeitando as condições de conservação e manipulação, os atributos físicos, químicos, microbiológicos e sensoriais do produto se mantêm (1). O período de vida útil secundário é o período de tempo durante o qual, após a abertura da embalagem de origem, o produto se mantém conforme.

Após a abertura da embalagem, alterações ambientais (atmosfera e humidade), erros de manipulação e modificação da temperatura de conservação, podem comprometer a segurança do produto, especialmente quando se trata de géneros alimentícios prontos para consumo perecíveis (2). Neste sentido, os consumidores devem ser informados das condições de conservação e do prazo de utilização dos géneros alimentícios, após a abertura das embalagens (3).

Para géneros alimentícios prontos para consumo suscetíveis de permitir o crescimento de *Listeria monocytogenes*, o



Regulamento (CE) n.º 2073/2005 determina a ausência de *L. monocytogenes* em 25 g, antes da sua colocação no mercado e o limite de 100 ufc/g durante o seu período de vida útil. Com o objetivo de garantir o cumprimento dos critérios microbiológicos de segurança ao longo de todo o período de vida útil de um género alimentício, o artigo 3º do referido regulamento prevê a realização de testes destinados a determinar a capacidade de um microrganismo alvo, devidamente inoculado, crescer ou sobreviver nesse produto em condições de armazenamento razoavelmente previsíveis – *Challenge Tests* (4).

_Objetivo

Avaliar o período de vida útil secundário em fiambre fatiado pré-embalado, em condições de conservação semelhantes às que o consumidor sujeita este género alimentício (5), através do cálculo do potencial de crescimento (δ) de *Listeria* spp., aplicando *Challenge Tests*.

_Materiais e métodos

Um lote de cada uma das duas diferentes marcas (A e B) de fiambre fatiado pré-embalado foi adquirido em estabelecimentos comerciais e conservado a 3 ± 2 °C para realização de *Challenge Tests*: aproximadamente a um mês do fim do seu período de vida útil e no fim do mesmo.

Inicialmente, foi verificada a ausência de *L. monocytogenes* em 25 g nos lotes analisados, de acordo com a ISO 11290-2:1998/Amd 1:2004 (5).

Posteriormente, foram preparadas subunidades de 10 g de cada amostra. Realizou-se a contaminação de uma parte das subunidades, tendo outras, não inoculadas, constituído subunidades controlo. A contaminação das subunidades da amostra foi efetuada através da inoculação por espalhamento à superfície de 1µl de um inóculo com $3 \log_{10}$ ufc de *Listeria* spp., constituído por 2 estirpes de *L. monocytogenes* e 1 estirpe de *L. innocua*. Os ensaios foram iniciados em 3 subunidades de cada amostra imediatamente após a inoculação (T0).

As subunidades inoculadas não analisadas foram mantidas a 12 ± 1 °C, até ser realizada a contagem de *Listeria* spp. de acordo com a ISO 11290-2:1998/Amd 1:2004. Este ensaio foi efetuado diariamente, em subunidades selecionadas, durante um período máximo de 3 dias (T1, T2, T3). Nas subunidades controlo, conservadas de forma idêntica às inoculadas, foi realizada a contagem de microrganismos totais a 30 °C (ISO 4833: 2002), bactérias ácido-láticas (ISO 15214: 1998) e bolores e leveduras (ISO 21527-1: 2008).

O potencial de crescimento microbiano (δ) foi calculado através da diferença entre a mediana da contagem de *Listeria* spp., no início e no fim do estudo (5).

_Resultados e discussão

Nas duas fases do estudo, o fiambre fatiado da marca A apresentou um $\delta < 0,5 \log_{10}$ ufc/g de *Listeria* spp. durante o período de 3 dias de conservação (tabelas 1 e 3).

Um mês antes do período de vida útil primário expirar, o fiambre fatiado da marca B permitiu o crescimento de *Listeria* spp. ($\delta > 0,5 \log_{10}$ ufc/g), 24h após a abertura da embalagem. Apresentou ainda contagens iniciais de microrganismos totais e bactérias ácido-láticas inferiores a $5 \log_{10}$ ufc/g, valores inferiores aos encontrados no fiambre fatiado da marca A. No fim do seu período de vida útil, o fiambre fatiado da marca B também não apresentou crescimento de *Listeria* spp. (tabelas 2 e 3).

As subunidades controlo de ambos os fiambres, submetidas a ensaios microbiológicos a um mês do fim do período de vida útil, apresentaram um crescimento exponencial de aproximadamente $3 \log_{10}$ ufc/g de microrganismos totais a 30 °C, bactérias ácido-láticas e leveduras, sugerindo uma taxa de deterioração rápida destes produtos, após abertura das suas embalagens (tabelas 1 e 2).



Tabela 1: Resultados dos ensaios realizados no fiambre fatiado da marca A.

Dia do ensaio (T) (após inoculação com <i>Listeria</i> spp.)	Subunidades inoculadas (n=3)*	Subunidades controlo (n=1)*			
	<i>Listeria</i> spp. (log ₁₀ ufc/g)	Microrganismos totais a 30 °C (log ₁₀ ufc/g)	Bactérias ácido-láticas (log ₁₀ ufc/g)	Leveduras (log ₁₀ ufc/g)	Bolores (log ₁₀ ufc/g)
A um mês do fim do período de vida útil					
T0	2,23 ± 0,14	5,94	5,00	1,70	Presente <1,60
T1	2,25 ± 0,24	> 7	> 7	2,08	Presente <1,60
T2	2,42 ± 0,19	> 7	> 7	3,76	<1
T3	2,48 ± 0,03	8,57	8,66	4,49	<1
No fim do período de vida útil					
T0	2,54 ± 0,04	8,69	7,46	Presente <1,60	<1
T1	2,19 ± 0,16	8,69	8,04	1,90	<1
T2	2,29 ± 0,18	8,49	8,34	2,46	<1

* n=número de subunidades analisadas.

Tabela 2: Resultados dos ensaios realizados no fiambre fatiado da marca B.

Dia do ensaio (T) (após inoculação com <i>Listeria</i> spp.)	Subunidades inoculadas (n=3)*	Subunidades controlo (n=1)*			
	<i>Listeria</i> spp. (log ₁₀ ufc/g)	Microrganismos totais a 30 °C (log ₁₀ ufc/g)	Bactérias ácido-láticas (log ₁₀ ufc/g)	Leveduras (log ₁₀ ufc/g)	Bolores (log ₁₀ ufc/g)
A um mês do fim do período de vida útil					
T0	2,10 ± 0,21	4,43	3,08	Presente <1,60	<1
T1	3,01 ± 0,18	5,99	5,04	2,11	<1
T2	3,62 ± 0,26	> 7	> 7	3,69	<1
No fim do período de vida útil					
T0	2,63 ± 0,04	7,65	7,87	<1	<1
T1	2,62 ± 0,12	8,00	8,04	<1	<1
T2	2,56 ± 0,01	8,32	8,62	<1	<1

* n=número de subunidades analisadas.

Tabela 3: Potencial de crescimento de (δ) *Listeria* spp.

Fase do estudo	δ <i>Listeria</i> spp. (log ₁₀ ufc/g)	
	Fiambre fatiado da marca A	Fiambre fatiado da marca B
A um mês do fim do período de vida útil	0,20 ^a	0,91 ^c
No fim do período de vida útil	-0,14 ^b	-0,08 ^b

a) δ calculado ao fim de 3 dias; b) δ calculado ao fim de 2 dias; c) δ calculado ao fim de 1 dia.



_Conclusão

Quando conservado a uma temperatura de refrigeração abusiva, $12 \pm 1^\circ\text{C}$, o fiambre fatiado da marca A nas duas fases do estudo apresentou um período de vida útil secundário de 3 dias, quanto ao potencial de crescimento de *Listeria* spp., válido. O período de vida útil secundário de 3 dias indicado no rótulo não é válido se conservado a $12 \pm 1^\circ\text{C}$ para o fiambre fatiado da marca B a um mês do fim do seu período de vida útil, devendo este produto ser consumido num prazo máximo de 24 horas, após abertura da sua embalagem. No entanto, no fim do seu período de vida útil, o fiambre da marca B é seguro relativamente ao potencial de crescimento de *Listeria* spp..

As bactérias ácido-láticas representaram a flora dominante nos dois produtos. A capacidade destes microrganismos se desenvolverem numa ampla gama de temperaturas, de promoverem uma redução de pH (resultante da produção de ácido láctico) e de algumas estirpes produzirem bacteriocinas, tem sido relacionada com um efeito inibitório no desenvolvimento de microrganismos patogénicos (6). Concentrações iniciais de bactérias ácido-láticas superiores a $7 \log_{10}$ ufc/g podem ser indicadoras de que estes produtos já se encontravam deteriorados, podendo também ser a causa da ausência de desenvolvimento de *Listeria* spp. no fiambre fatiado da marca A e no fiambre fatiado da marca B, no fim do seu período de vida útil primário.

A temperatura de conservação selecionada ($12 \pm 1^\circ\text{C}$) representa uma temperatura de conservação refrigerada com abusos de temperatura, passível de ser praticada pelo consumidor (5,7). O cumprimento da temperatura de conservação, 5°C , indicada pelos fabricantes de ambos os fiambres deverá ser fundamental para a manutenção da sua qualidade e segurança microbiológica, ao longo do seu período de vida útil.

Referências bibliográficas:

- (1) Man D. Shelf Life. 2nd ed. Chichester, West Sussex; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2015.
- (2) Nicolci MC (ed). Shelf life assessment of food. Boca Raton, FL: CRC Press, 2012.
- (3) Regulamento (UE) n.º 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de outubro de 2011, relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios. JO. 22.11.2011: L 304/18-63. <http://data.europa.eu/eli/reg/2011/1169/oj>
- (4) Regulamento (CE) n.º 2073/2005 da Comissão de 15 de novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. JO. 22.12.2005:L 338/1-26. <http://data.europa.eu/eli/reg/2005/2073/oj>
- (5) European Union Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes* Anses-Food Safety Laboratory. EURL Lm Technical Guidance Document for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods (Version 3). Maisons-Alfort, France, 2014. <https://eurl-listeria.anses.fr/en/minisite/listeria/eurl-lm-technical-guidance-document-conducting-shelf-life-studies-listeria>
- (6) NACMCF Executive Secretariat, US Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science. Parameters for Determining Inoculated Pack/Challenge Study Protocols (adopted 20 March 2009), Washington, D.C. National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/3b52f9c0-0585-4c0a-abf2-b4fc89a9668c/NACMCF_Inoculated_Pack_2009F.pdf?MOD=AJPERES
- (7) Azevedo I, Regalo M, Mena C, et al. Incidence of *Listeria* spp. in domestic refrigerators in Portugal. Food Control. 2005;16:121-4.