

Agência Nacional de Vigilância Sanitária



**GUIA PARA DETERMINAÇÃO DE PRAZOS DE
VALIDADE DE ALIMENTOS**

VIGENTE A PARTIR DE 30/10/2018

Início do período de contribuições: 06/11/2018

Fim do período de contribuições: 05/11/2020

GUIA PARA DETERMINAÇÃO DE PRAZOS DE VALIDADE DE ALIMENTOS

Este Guia expressa o entendimento da Anvisa sobre as melhores práticas com relação a procedimentos, rotinas e métodos considerados adequados ao cumprimento de requisitos técnicos ou administrativos exigidos pela legislação. Não confere ou cria novas obrigações, devendo ser utilizado por agentes públicos e privados como referência para cumprimento legislativo. Abordagens alternativas são possíveis, de modo que sua inobservância não caracteriza infração sanitária, nem constitui motivo para indeferimento de petições, desde que atendidos os requisitos exigidos pela legislação, ainda que por meio diverso daquele previsto nesta recomendação.

As recomendações contidas neste Guia produzem efeitos a partir da data de sua publicação no Portal da Anvisa e ficam sujeitas ao recebimento de sugestões da sociedade por meio de formulário eletrônico, disponível em <https://pesquisa.anvisa.gov.br/index.php/192195?lang=pt-BR>.

As contribuições* recebidas serão avaliadas e poderão subsidiar a revisão do Guia e a publicação de uma nova versão. Independentemente da decisão da área, será publicada análise geral das contribuições e as justificativas sobre a revisão ou não do Guia.

*A fim de garantir maior transparência ao processo de elaboração dos instrumentos regulatórios editados pela Anvisa, esclarecemos que os nomes dos responsáveis pelas contribuições (pessoas físicas e jurídicas) são considerados informações públicas e serão disponibilizados de forma irrestrita nos relatórios e outros documentos gerados a partir dos resultados deste Guia. Já o e-mail e o CPF dos participantes, considerados informações sigilosas, terão seu acesso restrito aos agentes públicos legalmente autorizados e às pessoas a que se referem tais informações, conforme preconiza o artigo 31, §1º, inciso I da Lei n. 12.527, de 18 de novembro de 2011. Outras informações que venham a ser consideradas sigilosas pelos participantes poderão ser apensadas em campo específico no formulário eletrônico.



SUMÁRIO

1	ESCOPO	6
2	INTRODUÇÃO	6
3	BASE LEGAL	7
4	ALTERAÇÕES QUE PODEM OCORRER DURANTE O PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO DE ALIMENTOS	10
4.1	Fatores que afetam o prazo de validade de alimentos	10
4.1.1	Características do próprio alimento (fatores intrínsecos)	10
4.1.2	Fatores externos aos alimentos (fatores extrínsecos).....	11
4.2	Mecanismos físico-químicos de deterioração dos alimentos.....	12
4.2.1	Conteúdo de umidade, vapor de água e transferência	13
4.2.2	Temperatura	13
4.2.3	Oxigênio	14
4.2.4	Agentes de oxidação e redução.....	15
4.2.5	Luz	15
4.2.6	Hidrólise química	15
4.2.7	pH.....	16
4.2.8	Interações químicas	16
4.3	Micro-organismos em alimentos.....	17
4.3.1	Micro-organismos deteriorantes.....	17
4.3.2	Micro-organismos patogênicos ou potencialmente patogênicos	18
4.3.3	Micro-organismos que produzem metabólitos tóxicos.....	18
4.3.4	Micro-organismos adicionados deliberadamente com propósitos tecnológicos ou nutricionais	18
4.3.5	Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos	18
4.3.6	Efeito do processamento na sobrevivência de micro-organismos.....	19
4.4	Efeitos do armazenamento refrigerado ou congelado.....	24
4.5	Perdas de nutrientes ou outros componentes relevantes durante o armazenamento...	24
4.6	Segurança alimentar e processamento de alimentos	24



5	FATORES PARA A DETERMINAÇÃO DO PRAZO DE VALIDADE DE UM ALIMENTO	26
5.1	Árvores de decisão sobre os fatores que devem ser considerados na determinação do prazo de validade.....	27
5.2	Como determinar o prazo de validade de um alimento.....	31
6	DETERMINAÇÃO DO PRAZO DE VALIDADE BASEADO NA DETERIORAÇÃO DO ALIMENTO..	32
6.1	Métodos diretos para determinação do prazo de validade baseados na deterioração do alimento.....	32
6.1.1	Etapa 1: Configurando o estudo	33
6.1.2	Etapa 2: Realizando o estudo.....	34
6.1.3	Etapa 3: Definindo o prazo de validade	35
6.2	Métodos indiretos para a determinação do prazo de validade baseada na deterioração do alimento.....	36
6.2.1	Modelos preditivos	37
6.2.2	Prazo de validade dos alimentos compostos.....	37
6.2.3	Mudanças de prazo de validade em alimentos reembalados	37
7	DETERMINAÇÃO DO PRAZO DE VALIDADE BASEADO EM RAZÕES DE SEGURANÇA	39
7.1	Estudo de desafio.....	39
7.2	Modelagem preditiva de crescimento de bactérias em alimentos	40
8	DETERMINAÇÃO DO PRAZO DE VALIDADE BASEADO EM QUESTÕES DE SAÚDE	41
8.1	Estabilidade por desenho	41
8.2	Micro-organismos em estudos de estabilidade baseados em questões de saúde	42
8.3	Estabilidade física em estudos de estabilidade baseados em questões de saúde	43
8.3.1	Comprimidos.....	43
8.3.2	Cápsulas	44
8.4	Parâmetros de testes para estudos de estabilidade baseados em questões de saúde ...	45
8.4.1	Requisitos analíticos para as diferentes formas de alimentos	46
8.5	Requisitos e critérios para os estudos de estabilidade baseados em questões de saúde	47
8.5.1	Recomendações gerais	47
8.5.2	Requisitos analíticos	48
8.5.3	Amostras de produtos	48
8.5.4	Tipos de estudos de estabilidade.....	49
8.5.5	Avaliação dos dados do estudo de estabilidade.....	54
8.6	Protocolos de estudos de estabilidade baseados em questões de saúde	55



9	ANEXOS.....	59
	ANEXO I - Agrupamento e matrização.....	59
	ANEXO II - Interações químicas das vitaminas que podem afetar a estabilidade	64
	ANEXO III - Comparação da estabilidade de vitaminas	67
	ANEXO IV - Análises preditivas dos dados de estabilidade	68
10	GLOSSÁRIO.....	69
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72



1 ESCOPO

Este guia traz orientações sobre os aspectos que devem ser considerados para a determinação dos prazos de validade de alimentos. Trata-se de um documento baseado em referências internacionais, nomeadamente as publicações das autoridades reguladoras da Austrália e da Nova Zelândia e da *International Alliance of Dietary/Food Supplements Associations* (IADSA).

A determinação do prazo de validade de alimentos deve ser realizada para todos os alimentos, com exceção daqueles que estão dispensados de declarar essa informação no rótulo, conforme Resolução da Diretoria Colegiada da Anvisa – RDC n. 259, de 20 de setembro de 2002.

Atenção especial deve ser dada a determinação da validade dos alimentos destinados a indivíduos com necessidades nutricionais específicas e aos alimentos que, a depender do tempo decorrido após sua fabricação, possam oferecer riscos à saúde do consumidor.

Os princípios básicos descritos neste documento refletem o entendimento da Anvisa e têm o propósito de servirem de referência à aplicação dos requisitos previstos em legislação, no âmbito da competência da vigilância sanitária. São recomendações e exemplos que buscam auxiliar a determinação do prazo de validade dos alimentos.

2 INTRODUÇÃO

O prazo de validade é o intervalo de tempo no qual o alimento permanece seguro e adequado para consumo, desde que armazenado de acordo com as condições estabelecidas pelo fabricante. Isso significa que o alimento deve:

- Permanecer seguro para o consumo, ou seja, não causar infecções e intoxicações alimentares devido a micro-organismos patogênicos ou à produção de toxinas (bacterianas ou fúngicas) durante o armazenamento;
- Manter suas características, ou seja, não apresentar perda significativa de nenhum nutriente ou componente, considerando os requisitos de composição, como no caso dos suplementos alimentares, dos alimentos para fins especiais e dos alimentos com alegações nutricionais, e as regras de rotulagem e tolerância definidas na legislação.
- Manter sua qualidade sensorial e não se deteriorar, de maneira que tornaria o seu consumo inapropriado.



3 BASE LEGAL

Os alimentos vendidos no Brasil devem atender aos requisitos estabelecidos em Lei e nos regulamentos técnicos editados pela Anvisa ou por outros agentes públicos reguladores. A seguir são apresentados alguns marcos normativos de relevância para construção deste guia.

A Lei n. 8.078, de 11 de setembro de 1990, conhecida popularmente como Código de Defesa do Consumidor (CDC), estabelece que a oferta e apresentação de produtos devem assegurar informações corretas, claras, precisas, ostensivas e em língua portuguesa sobre os prazos de validade.

O CDC define ainda que os fornecedores devem responder solidariamente pelos vícios que tornem os produtos impróprios ao consumo, incluindo os produtos comercializados com validade vencidas.

A Resolução CISA/MA/MS n. 10, de 31 de julho de 1984, que dispõe sobre instruções para conservação nas fases de transporte, comercialização e consumo dos alimentos perecíveis, industrializados ou beneficiados, acondicionados em embalagens, exige que as validade dos alimentos sejam definidas antes da comercialização.

As regras gerais para a marcação de prazo de validade na rotulagem estão previstas na Resolução da Diretoria Colegiada da Anvisa - RDC n. 259, de 20 de setembro de 2002. Nesse sentido, os rótulos dos alimentos não podem conter nenhuma informação que possa levar o consumidor ao erro em relação à verdadeira validade do produto.

O prazo de validade começa a contar a partir do momento em que o alimento é preparado ou fabricado e deve ser informado no rótulo dos alimentos embalados observando as terminologias e regras para declaração das datas fixadas na RDC n. 259, de 2002. Essa resolução estabelece ainda uma lista de alimentos excetuados da obrigatoriedade da declaração do prazo de validade e regras relacionadas às instruções para o armazenamento do alimento, nos casos em que houver razões de saúde ou de segurança relacionadas. Essa disposição pode incluir a necessidade de fornecer instruções de armazenamento de um produto alimentar para embalagens intactas e abertas, de forma a manter o prazo de validade determinado.



LEI N. 8.078, DE 11 DE SETEMBRO DE 1990:

Art. 18. Os fornecedores de produtos de consumo duráveis ou não duráveis respondem solidariamente pelos vícios de qualidade ou quantidade que os tornem impróprios ou inadequados ao consumo a que se destinam ou lhes diminuam o valor, assim como por aqueles decorrentes da disparidade, com a indicações constantes do recipiente, da embalagem, rotulagem ou mensagem publicitária, respeitadas as variações decorrentes de sua natureza, podendo o consumidor exigir a substituição das partes viciadas.

§ 6º São impróprios ao uso e consumo:

I - os produtos cujos prazos de validade estejam vencidos;

Art. 31. A oferta e apresentação de produtos ou serviços devem assegurar **informações corretas**, claras, **precisas**, ostensivas e em língua portuguesa sobre suas características, **qualidades**, quantidade, composição, preço, garantia, **prazos de validade** e origem, entre outros dados, bem como sobre os riscos que apresentam à saúde e segurança dos consumidores.

CISA/MA/MS n. 10, DE 31 DE JULHO DE 1984:

" 7. O prazo de validade será indicado pelas empresas produtoras em função as garantias de conservação dos alimentos oferecidas pelas técnicas de industrialização por elas aplicadas e do risco de se encontrarem em desacordo com o disposto no item 3 desta Resolução, **antes de serem adquiridos para consumo.**"

RESOLUÇÃO - RDC n. 259, DE 20 DE SETEMBRO DE 2002:

6.6. Prazo de Validade

6.6.1. Caso não esteja previsto de outra maneira em um Regulamento Técnico específico, vigora a seguinte indicação do prazo de validade:

a) deve ser declarado o "prazo de validade";

b) o prazo de validade deve constar de pelo menos: o dia e o mês para produtos que tenham prazo de validade não superior a três meses; o mês e o ano para produtos que tenham prazo de validade superior a três meses. Se o mês de vencimento for dezembro, basta indicar o ano, com a expressão "fim de..... " (ano);

c) o prazo de validade deve ser declarado por meio de uma das seguintes expressões: "consumir antes de..."; "válido até..."; "validade..."; "val:..."; "vence..."; "vencimento..."; "vto:..."; "venc:...."; "consumir preferencialmente antes de..."

d) as expressões estabelecidas no item "c" devem ser acompanhadas: do prazo de validade; ou de uma indicação clara do local onde consta o prazo de validade; ou de uma impressão através de perfurações ou marcas indeléveis do dia e do mês ou do mês e do ano, conforme os critérios especificados em 6.6.1 (b). Toda informação deve ser clara e precisa;

e) o dia, o mês e o ano devem ser expressos em algarismos, em ordem numérica não codificada, com a ressalva de que o mês pode ser indicado com letras nos países onde este uso não induza o consumidor a erro. Neste último caso, é permitido abreviar o nome do mês por meio das três primeiras letras do mesmo;

f) apesar do disposto no item 6.6.1 (a), não é exigida a indicação do prazo de validade para: frutas e hortaliças frescas, incluídas as batatas não descascadas, cortadas ou tratadas de outra



forma análoga; vinhos, vinhos licorosos, vinhos espumantes, vinhos aromatizados, vinhos de frutas e vinhos espumantes de frutas; bebidas alcoólicas que contenham 10% (v/v) ou mais de álcool; produtos de panificação e confeitaria que, pela natureza de conteúdo, sejam em geral consumidos dentro de 24 horas seguintes à sua fabricação; vinagre; açúcar sólido; produtos de confeitaria à base de açúcar, aromatizados e ou coloridos, tais como: balas, caramelos, confeitos, pastilhas e similares; goma de mascar; sal de qualidade alimentar (não se aplica para sal enriquecido) alimentos isentos por Regulamentos Técnicos específicos.

6.6.2. Nos rótulos das embalagens de alimentos que exijam condições especiais para sua conservação, deve ser incluída uma legenda com caracteres bem legíveis, indicando as precauções necessárias para manter suas características normais, devendo ser indicadas as temperaturas máxima e mínima para a conservação do alimento e o tempo que o fabricante, produtor ou fracionador garante sua durabilidade nessas condições. O mesmo dispositivo é aplicado para alimentos que podem se alterar depois de abertas suas embalagens. Em particular, para os alimentos congelados, cujo prazo de validade varia segundo a temperatura de conservação, deve ser indicada esta característica. Nestes casos, pode ser indicado o prazo de validade para cada temperatura, em função dos critérios já mencionados, ou então o prazo de validade para cada temperatura, indicando o dia, o mês e o ano de fabricação. Para declarar o prazo de validade, podem ser utilizadas as seguintes expressões: "validade a - 18º C (freezer): ..." "validade a - 4º C (congelador): ..." "validade a 4º C (refrigerador): ..."

RESOLUÇÃO - RDC N. 12, DE 02 DE JANEIRO DE 2001.

"1.1 OBJETIVO: Estabelecer os Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos ... e determinar os critérios para a Conclusão e Interpretação dos Resultados das Análises Microbiológicas de Alimentos Destinados ao Consumo Humano..."



4 ALTERAÇÕES QUE PODEM OCORRER DURANTE O PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO DE ALIMENTOS

Os alimentos são perecíveis por natureza e mudanças ocorrem naturalmente durante sua manipulação e armazenamento pelo fabricante, revendedor e consumidor. As mudanças podem ser rápidas, a exemplo do que ocorre em produtos altamente perecíveis, como carnes cruas e peixes, ou ocorrer em um período de dias ou semanas, particularmente em alimentos mais processados, como no caso do pão que se torna mofado, os biscoitos que se tornam moles, e os embutidos que ficam com mau odor e viscosos.

No entanto, para alguns alimentos secos ou esterilizados, a deterioração pode não se tornar perceptível mesmo após meses ou anos de armazenamento. Esses alimentos são considerados estáveis.

4.1 Fatores que afetam o prazo de validade de alimentos

Existem muitos fatores que podem afetar o prazo de validade de um alimento. Alguns fatores relacionam-se ao próprio alimento (fatores intrínsecos), como umidade e pH, enquanto outros são externos ao produto (fatores extrínsecos), tais como condições de embalagem, materiais e condições de armazenamento. Ao entender a influência de cada um desses fatores, é possível adotar medidas para prolongar a validade do alimento.

Por outro lado, a alteração da composição, formulação, processamento ou embalagem pode, inadvertidamente, levar a uma diminuição da estabilidade ou tornar os alimentos mais suscetíveis à deterioração ou mesmo ao crescimento de micro-organismos patogênicos. Portanto, é importante avaliar quais mudanças podem ter impacto sobre o prazo de validade. Essa avaliação é especialmente importante quando a segurança de um alimento depende da interação de uma série de fatores para inibição do crescimento de micro-organismos patogênicos.

Mesmo que dois produtos pareçam semelhantes, seus prazos de validade podem ser bastante diferentes. Portanto, não é seguro extrapolar o prazo de validade de um alimento para outro. É necessário conhecer o processo de produção e entender os fatores que irão influenciar suas características de armazenamento antes de se estabelecer o prazo de validade apropriado para cada alimento.

4.1.1 Características do próprio alimento (fatores intrínsecos)

Muitos fatores intrínsecos podem influenciar significativamente o prazo de validade dos alimentos, incluindo:

- **A natureza e a qualidade das matérias-primas.** As matérias-primas de boa qualidade e com baixo número de micro-organismos ajudarão a garantir produtos com uma



validade consistentemente aceitável. Se existir a possibilidade de variações na qualidade das matérias-primas utilizadas, isso deve ser levado em consideração durante o processamento. Por exemplo, os produtos frescos colhidos em condições úmidas podem necessitar de uma lavagem adicional para atingir a mesma vida útil que os produtos frescos colhidos em um dia seco. Se o número de micro-organismos deteriorantes ou patogênicos é altamente variável, isso pode afetar o processo e conseqüentemente a validade do alimento. Neste caso, considere a definição de limites microbiológicos (especificações) para as matérias-primas e assegure-se de que os controles adotados sejam validados usando condições do pior cenário aceitável.

- **Formulação do produto.** O crescimento de fungos e bactérias pode ser inibido ou diminuído, removendo ou reduzindo a umidade e a atividade da água. Por outro lado, a remoção, substituição ou modificação de ingredientes pode permitir que os micro-organismos cresçam onde antes eram inibidos. Substituir o açúcar por um adoçante artificial, reduzir o uso de vinagre, alterar o tipo de ácido, eliminar nitratos de uma carne processada e reduzir a quantidade de sal adicionado podem acarretar na redução da eficácia do controle dos micro-organismos e, assim, alterar o prazo de validade de um alimento.
- **Estrutura do produto.** Líquidos e alimentos semissólidos geralmente possuem uma composição homogênea, mas muitos alimentos são compostos por mais de um ingrediente. A umidade e os sabores podem migrar entre camadas do alimento, enquanto os revestimentos e os tratamentos de superfície podem restringir ou aumentar o potencial de deterioração. Ervas e especiarias na superfície de um patê, por exemplo, podem levar ao crescimento de fungos. Neste caso, uma camada de aspic sobre as ervas poderá excluir o ar e evitar o crescimento de fungos. Por outro lado, quando existe o potencial para formação de “bolsas” anaeróbicas no alimento, é possível que seja criado um ambiente adequado para o crescimento de bactérias anaeróbicas. Portanto, é importante compreender a estrutura dos alimentos.
- **Disponibilidade de oxigênio e potencial redox.** A disponibilidade de oxigênio pode ter um efeito importante sobre os tipos de micro-organismos deteriorantes e patogênicos que crescerão nos alimentos. Pode afetar também as reações de oxidação-redução que causam rancidez, perda de vitaminas e resultam no sabor de alimento deteriorado. Os fungos precisam de oxigênio para crescer e geralmente são encontrados em superfícies e crescem nas fendas dos alimentos.

4.1.2 Fatores externos aos alimentos (fatores extrínsecos)

Os fatores extrínsecos ao alimento também possuem um impacto em seu prazo de validade, incluindo:



- **Processamento.** É importante que a validação dos controles envolvidos na fabricação seja realizada em condições do pior cenário aceitável, pois quanto maior o número de bactérias presentes nas matérias-primas, maior o número de bactérias que sobreviverão e reduzirão o prazo de validade do alimento. Enquanto os processos de esterilização comercial podem ser usados para inativar a maioria dos organismos resistentes ao calor, processos que utilizam aquecimento mais brando irão inativar apenas algumas bactérias e uma proporção sobreviverá. Geralmente, quanto mais intenso for o processo, maior será o prazo de validade.
- **Métodos de resfriamento aplicados a produtos tratados termicamente.** Algumas deteriorações e bactérias patogênicas produzem esporos que podem não só sobreviver, mas tornarem-se ativados durante o processo de aquecimento. Se o alimento não for resfriado rapidamente após o tratamento térmico, esses esporos ativados podem levar a um aumento rápido de bactérias nos alimentos quentes e causar deterioração e, em alguns casos, intoxicação alimentar.
- **Tipo de embalagem.** A embalagem tem um papel primordial de proteger um alimento após o processamento, mas também pode ser usada para prolongar seu prazo de validade. Se o ambiente gasoso for alterado (embalagem a vácuo ou com atmosfera alterada), poderá haver o favorecimento do crescimento de certas bactérias patogênicas e bactérias de deterioração, mas haverá a inibição do crescimento de micro-organismos que requerem oxigênio (incluindo fungos).
- **Temperatura de armazenamento.** Enquanto o congelamento inibirá o crescimento da maioria dos micro-organismos, o frio só diminuirá o crescimento microbiano. Uma série de micro-organismos deterioradores e bactérias tolerantes ao frio crescerão ativamente em condições de refrigeração, mas o crescimento geralmente será mais lento do que ocorreria durante o armazenamento em temperatura ambiente.
- **Condições durante a distribuição, armazenamento, exibição no varejo e armazenamento pelo consumidor.** As condições ambientais de temperatura, luminosidade, umidade e vibrações às quais os alimentos podem ser submetidos durante a distribuição, armazenamento, exibição no varejo e armazenamento pelo consumidor podem favorecer a deterioração e, portanto, reduzir o prazo de validade.

4.2 Mecanismos físico-químicos de deterioração dos alimentos

Durante cada etapa do desenvolvimento do produto e antes de realizar qualquer tipo de teste para estabelecer a validade de um alimento, é essencial que todos os mecanismos de deterioração do produto sejam compreendidos e, sempre que possível, neutralizados.



Um alimento pode ser composto por uma mistura de muitas substâncias químicas diferentes, as quais podem afetar seu prazo de validade. Há uma série de efeitos químicos e físicos que, isoladamente e em combinação, podem afetar o prazo de validade de um alimento.

Alguns dos mecanismos de deterioração importantes são descritos a seguir. O Anexo III apresenta um resumo sobre a estabilidade de diferentes vitaminas.

4.2.1 Conteúdo de umidade, vapor de água e transferência

Muitos dos processos de deterioração dos alimentos podem ser associados ao ganho ou perda de umidade. Variações descontroladas do teor de umidade podem causar alterações físicas e químicas no produto, alterar as características sensoriais, como sabor, cor e textura, e promover o crescimento microbiano.

Para garantir a máxima estabilidade de um produto, a umidade deve ser monitorada e controlada em todas as fases da vida do produto, desde a seleção de ingredientes até o seu consumo.

A troca de vapor de água e umidade pode ocorrer entre o produto e o ambiente ou entre ingredientes de um mesmo produto. No último caso, o teor de umidade e sua origem no produto acabado tornam-se fatores críticos. Por exemplo, um alto teor de umidade em um ingrediente baseado em cereais de amido pode afetar a estabilidade de outros ingredientes.

Para os alimentos comercializados sob forma seca, como muitos dos suplementos alimentares (comprimidos, cápsulas de gel duro e pós) e fórmulas enterais e infantis em pó, o teor de umidade dos ingredientes deve estar no nível mais baixo possível, consistente com o processo de fabricação do produto. Em alguns casos, pode ser necessário selecionar lotes de ingredientes com menor teor de umidade, ou mesmo considerar a secagem adicional do ingrediente.

4.2.2 Temperatura

As variações de temperatura exercem influência sobre a natureza e a taxa de deterioração causada por outros mecanismos físicos ou químicos. De modo geral, um aumento na temperatura aumenta a taxa das reações químicas. Esse efeito constitui a base da maioria dos estudos de estabilidade, pois quanto maior a temperatura, menor será o prazo de validade do produto.

Além disto, as flutuações na temperatura de armazenamento podem afetar o produto embalado em condições moderadas e altas de umidade ambiente. Essas flutuações podem causar a condensação da umidade dentro da embalagem, gerando condições para reações químicas ou crescimento microbiológico, principalmente quando existe um grande espaço livre dentro da embalagem. Tais flutuações também



podem afetar a integridade da selagem da embalagem devido à expansão e contração térmica dos materiais de embalagem.

Grimm^{1,2} examinou dados climáticos mundiais e demonstrou a importância de se levar as diferenças em conta, propondo condições de estabilidade para as diferentes zonas climáticas. A Zona I foi definida como Temperada, a Zona II como Subtropical ou Mediterrânea, a Zona III como quente e seca e a Zona IV como quente e úmida. Este trabalho forneceu a base para que, em 1993, a *International Conference on Harmonisation* (ICH) propusesse uma abordagem unificada entre os Estados Unidos, União Europeia e Japão, todos na Zona Climática II, para que os estudos de estabilidade de longo prazo fossem realizados a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $60\% \pm 5\%$ UR.

No Brasil, as condições de temperatura correspondem à Zona IVB (quente e muito úmida), o que significa que os estudos para determinação de prazos de validade normalmente devem ser realizados a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$ UR. Cabe ressaltar que, no caso de embalagens comprovadamente impermeáveis, normalmente não é necessário utilizar condições de umidade controladas nos estudos para determinação do prazo de validade de alimentos. Ademais, no caso de produtos distribuídos e armazenados sob refrigeração, congelados ou sob temperatura controlada, as condições do estudo devem simular as condições reais de armazenamento durante a vida de prateleira.

4.2.3 Oxigênio

Em termos de estabilidade do alimento, o oxigênio é um dos fatores mais críticos, pois muitos ingredientes, como vitaminas e óleos de peixe, são suscetíveis a oxidação. Por exemplo, 1 mg de oxigênio é suficiente para oxidar 11,2 mg de ácido ascórbico (vitamina C). Para colocar isso em perspectiva, se um alimento líquido for preparado com água não desaerada (isto é, água saturada com ar), o oxigênio presente no produto é suficiente para oxidar até 75 mg de ácido ascórbico por litro.

Quando ingredientes susceptíveis à oxidação são incluídos no produto, podem ser necessárias precauções para garantir a sua estabilidade. Exemplos de tais precauções incluem minimizar o espaço livre da embalagem e usar embalagem com uma boa barreira de oxigênio ou embalagem com um gás inerte, como nitrogênio.

Um problema específico com gorduras e óleos é o ranço. A rancidez oxidativa se desenvolve pela catálise de íons metálicos ou por degradação oxidativa iniciada por enzima. Esta última envolve lipoxigenases, que são amplamente presentes em fontes vegetais e animais.

¹ Grimm W. 1986. Storage conditions for stability testing (Part 2). *Drugs Made in Germany*, 29:39–47

² Grimm W. 1998. Extension of the International Conference on Harmonisation Tripartite Guidelines for stability testing of new drug substances and products to countries of Climatic Zones III and IV. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 24:313-325



A auto-oxidação iniciada por uma enzima ou um íon metálico como o Cu^{2+} gera o intermediário hidroperóxido que, quando quebrado para formar moléculas menores, tais como aldeídos e cetonas voláteis, contribui para a formação do ranço.

4.2.4 Agentes de oxidação e redução

A presença de agentes oxidantes ou redutores fortes em um produto contendo vários componentes pode ter um efeito deletério sobre a estabilidade de uma série de ingredientes, particularmente vitaminas. Por exemplo, as vitaminas A, D e C são muito sensíveis aos oxidantes, enquanto a vitamina B12 é sensível aos agentes redutores. O íon Fe^{2+} , como o sulfato de ferro (II), é um agente redutor comum, assim como vários ácidos orgânicos. Depois de desenvolvidas as formulações, é essencial que os estudos sejam conduzidos para demonstrar que essas potenciais fontes de instabilidade não impactem na qualidade do produto ao final do prazo de validade.

4.2.5 Luz

A luz é um fator crítico na estabilidade de um alimento, particularmente o componente ultravioleta. A luz pode desempenhar vários papéis na deterioração de um produto e afetar suas propriedades sensoriais e composição. A exposição à luz pode reduzir a atividade de uma série de vitaminas, incluindo a riboflavina e as vitaminas A (como retinol ou palmitato de retinol), D e K.

Estudos têm mostrado diferenças significativas no conteúdo vitamínico de comprimidos de suplementos alimentares armazenados em frascos de vidro transparente em comparação com frascos de vidro âmbar quase idênticos. A atividade da vitamina em produtos armazenados em recipientes de vidro transparente diminui mais rapidamente se comparada à do produto armazenado em vidro âmbar.

Uma série de corantes como as clorofilas, o açafrão (cúrcuma) e a betanina também apresentam fraca estabilidade à luz. Alterações não desejadas nesses corantes podem ter um efeito tanto na aparência como em possíveis alegações do produto.

A foto-oxidação de lipídios também pode ocorrer quando um produto é exposto a uma fonte de luz enquanto está em exposição no comércio. Certos espectros de iluminação fluorescente são capazes de iniciar a foto-oxidação. Além disso, a foto-oxidação de proteínas, embora menos prevalente do que as foto-oxidações descritas acima, foi demonstrada em certas matrizes de produtos.

4.2.6 Hidrólise química

A hidrólise é uma reação química que envolve a quebra de uma molécula em presença de água. Dependendo da combinação de ingredientes do alimento, pode ocorrer hidrólise química em produtos líquidos. Por exemplo, sob certas condições de pH e temperatura, o edulcorante aspartame hidrolisará, resultando em uma redução gradual da doçura.



4.2.7 pH

O pH de uma formulação líquida pode afetar significativamente a vida útil de uma série de componentes. Por exemplo, cerca de metade das vitaminas são suscetíveis a condições de baixo pH, enquanto a outra metade é afetada pelo pH elevado. Assim, no caso de um alimento líquido multivitamínico, o pH pode precisar ser ajustado para cerca de 7 para maximizar o prazo de validade. O pH de uma formulação líquida também pode ter um efeito na estabilidade microbológica e na estabilidade de vários outros ingredientes e aditivos, como os corantes. Há também o problema de que uma série de aditivos alimentares conservadores utilizados em formulações líquidas só funcionam efetivamente dentro de faixas específicas de pH.

4.2.8 Interações químicas

As interações químicas entre ingredientes comuns podem afetar seriamente a estabilidade e a atividade fisiológica de um alimento.

Como pode ser observado a partir dos exemplos do Anexo II, interações químicas diferentes podem ocorrer em um produto durante o armazenamento. Portanto, recomenda-se que sejam realizadas pesquisas sobre os ingredientes na literatura científica, de forma a garantir que todas as interações conhecidas e estabelecidas sejam consideradas durante a formulação do produto. Por exemplo, o ácido ascórbico (vitamina C) é reativo tanto como ácido quanto como agente redutor e está envolvido em uma ampla gama de interações em alimentos.

Devido ao foco de atenção durante décadas, muitas interações foram identificadas para as vitaminas (anexo II). Para ingredientes populares mais recentes encontrados em alimentos, há menos informações disponíveis na literatura científica sobre o potencial de interações. No entanto, a partir de uma revisão do comportamento químico de algumas dessas substâncias, é possível que sejam encontradas reações semelhantes. Portanto, é importante que a possibilidade de tais interações seja considerada e que se estude a estrutura molecular e comportamento químico da substância avaliada para adição no alimento, considerando a forma e matriz deste.

Em situações em que é necessário combinar componentes que apresentam interações conhecidas ou que são suspeitos de apresentarem interações, é aconselhável, se tecnologicamente viável, usar um revestimento para um ou mais destes ingredientes ou selecionar formas alternativas dos ingredientes.

Por exemplo, se o ácido ascórbico e certos sais de ferro estiverem presentes em um suplemento alimentar, há um alto risco de interação. Tal interação pode apresentar-se como manchas pretas na superfície de um comprimido ou como um depósito preto no interior de uma cápsula. Uma solução comum é revestir o pó fonte de ferro (várias formas estão comercialmente disponíveis) ou, alternativamente, usar uma fonte de ferro menos reativa.



4.3 Micro-organismos em alimentos

Os alimentos são produzidos em uma variedade de formas físicas, incluindo formas farmacêuticas, como comprimidos e cápsulas gelatinosas utilizadas em muitos suplementos alimentares. Cada forma possui questões microbiológicas específicas que podem afetar a estabilidade do produto. Conseqüentemente, a avaliação microbiológica de um alimento deve ser projetada especificamente para sua forma física e os riscos relevantes.

Em geral, a contaminação microbiológica é um problema nos produtos que possuem água livre em quantidade suficiente para propiciar o crescimento de micro-organismos. Para alimentos desidratados, o risco microbiológico pode ser considerado relativamente baixo, desde que observados os princípios básicos das Boas Práticas de Fabricação, incluindo a seleção de ingredientes com baixas contagens microbiológicas, a desinfecção de todos os equipamentos de produção e a manipulação adequada.

Se as matérias-primas estiverem em conformidade com as especificações microbiológicas, os principais problemas que podem ocorrer são o uso de equipamentos não sanitizados e o manuseio do produto ou ingredientes por pessoal não treinado, que não possui como procedimento higienizar as mãos, usar luvas e não tossir ou espirrar sobre o alimento exposto.

A microbiologia dos alimentos pode ser classificada em quatro grupos: (a) micro-organismos deteriorantes de alimentos; (b) micro-organismos patogênicos ou potencialmente patogênicos; (c) micro-organismos que produzem metabolitos tóxicos; e (d) micro-organismos adicionados deliberadamente com finalidades tecnológicas ou nutricionais.

4.3.1 Micro-organismos deteriorantes

A principal preocupação com a maioria dos alimentos, incluindo os suplementos alimentares, é a presença de micro-organismos deteriorantes.

Os micro-organismos deteriorantes mais comuns são as leveduras e os fungos, muitos dos quais geram esporos que se depositam em superfícies ou ficam suspensos no ar de ambientes em que o ar não é filtrado.

As leveduras podem causar fermentação nos alimentos líquidos ricos em nutrientes. Uma série de espécies de bactérias também causa deterioração e, em geral, essas bactérias podem causar sérios problemas sensoriais em termos de mudanças adversas na cor, odor e sabor.

Os micro-organismos deteriorantes são um dos grupos mais importantes a ser monitorado durante os estudos conduzidos para estabelecer os prazos de validade de alimentos. Do ponto de vista da estabilidade, se agentes patogênicos não forem detectados nas amostras de teste iniciais, é improvável que a sua presença ocorra nos



estágios posteriores do estudo, caso o sistema de embalagem tenha sido desenvolvido adequadamente e os métodos analíticos empregados sejam adequados.

4.3.2 Micro-organismos patogênicos ou potencialmente patogênicos

Em geral, os micro-organismos patogênicos e potencialmente patogênicos são encontrados em alimentos quando um ou mais dos seus ingredientes tiverem sido contaminados. A contaminação, normalmente, surge de fontes animais, como roedores, moscas e práticas humanas anti-higiênicas. As rotas de contaminação pelos seres humanos incluem mãos não lavadas ou sanitizadas e tossir, cuspir ou espirrar em áreas onde o produto está exposto.

4.3.3 Micro-organismos que produzem metabólitos tóxicos

Diversos micro-organismos podem produzir metabólitos tóxicos, caso certas condições sejam atendidas. Provavelmente, a bactéria mais conhecida nesta classe é o *Clostridium botulinum*.

As micotoxinas, que são produzidas por fungos que podem estar presentes na matéria-prima de origem vegetal, têm recebido maior atenção, principalmente devido a novas evidências sobre seu potencial cancerígeno. Elas podem ser encontradas em vários vegetais utilizados em alimentos, particularmente se não forem observadas as Boas Práticas Agrícolas.

4.3.4 Micro-organismos adicionados deliberadamente com propósitos tecnológicos ou nutricionais

Durante séculos, os micro-organismos foram empregados na produção de alimentos e bebidas, como o uso de leveduras em assados e na fermentação de bebidas alcoólicas.

Além disso, tem sido relevante para a indústria de alimentos o uso de micro-organismos para fins de saúde, principalmente os probióticos.

4.3.5 Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos

A Resolução da Diretoria Colegiada - RDC n. 12, de 02 de janeiro de 2001, estabelece os padrões microbiológicos sanitários para diferentes grupos de alimentos para consumo humano, expressos por meio de uma tabela que especifica os micro-organismos a serem determinados e os valores de tolerância para fins de registro e fiscalização.

Além disso, em muitos casos os alimentos e ingredientes devem atender às especificações de contagem microbiológica definidas nas monografias de referência ou em outros regulamentos técnicos específicos.



4.3.6 Efeito do processamento na sobrevivência de micro-organismos

O processamento de um alimento pode eliminar ou reduzir o número de micro-organismos presentes. Isso ajuda a proteger os alimentos controlando as bactérias patogênicas e reduzindo o número de micro-organismos deteriorantes, o que pode ampliar o prazo de validade.

O processamento usando um tratamento térmico apropriado e validado diminuirá o número de bactérias presentes nas matérias-primas e demais ingredientes.

Os produtos que não são esterilizados comercialmente ou não recebem tratamento UHT (temperatura ultra alta) não podem ser considerados estéreis. Muitos processos aplicados em alimentos como, por exemplo, a lavagem de produtos frescos ou a pasteurização, não eliminarão todos os micro-organismos presentes.

Se as condições ambientais de armazenamento permitirem que as bactérias sobreviventes cresçam, o alimento pode se tornar inseguro para o consumo. Isso pode ocorrer mesmo quando a quantidade de bactérias nos alimentos for reduzida a um nível seguro (até mesmo abaixo do limite de detecção do método de laboratório) após o produto ser submetido a um processo com controles devidamente validados. Algumas bactérias patogênicas e de deterioração produzem esporos muito resistentes ao calor, que não podem ser eliminados durante o processamento. Se essas bactérias formadoras de esporos estiverem presentes no alimento após o processamento, isso deve ser levado em consideração ao estabelecer o prazo de validade do alimento. Esporos de fungos, por outro lado, são facilmente destruídos pelo processamento térmico.

Algumas técnicas de preservação de alimentos, como a fermentação ou a defumação, se não forem adequadamente controladas, têm o potencial de aumentar o número de bactérias patogênicas presentes, podendo reduzir a validade do alimento.

Portanto, o emprego de processamentos capazes de reduzir o número de micro-organismos presentes torna o alimento mais seguro e prolonga seu prazo de validade. No entanto, essa segurança poderá ser comprometida se ocorrer uma nova contaminação como, por exemplo, a contaminação cruzada durante o processamento.

A Tabela 1 fornece uma breve visão geral do impacto que os processos aplicados podem ter sobre a segurança microbiológica e a deterioração dos alimentos.



ALIMENTOS - GUIA n. 16, versão 1, de 5 de outubro de 2018

Tabela 1: Impacto do processamento na segurança alimentar e no prazo de validade do alimento.

Processos aplicados aos alimentos	Efeito sobre micro-organismos		Impacto na segurança alimentar	Impacto na validade do alimento devido à deterioração
	Bactérias vegetativas (deteriorantes ou patogênicas) e esporos de fungos e leveduras	Esporos bacterianos (causam deterioração ou intoxicação alimentar, dependendo do tipo)		
Lavagem de matérias-primas, por exemplo, material vegetal	Os números presentes são reduzidos	Os números presentes são reduzidos	Pode melhorar a segurança alimentar por meio da redução física de bactérias patogênicas. Os níveis podem aumentar se a água for de má qualidade, não for trocada com frequência ou se um volume muito grande de produtos frescos for lavado ao mesmo tempo	Variável. A lavagem pode danificar superfícies, o que permitirá o crescimento microbiano
Cozinhar, incluindo assar	Os números presentes são reduzidos a níveis muito baixos	Não há diminuição nos números e o processo pode ativar a germinação dos esporos	Bactérias patogênicas vegetativas são inativadas usando um processo com controles devidamente validados. Os esporos sobreviverão e podem germinar para tornar a comida insegura se não for consumida ou resfriada imediatamente. Algumas, mas não todas, toxinas bacterianas pré-formadas serão inativadas	Estendida (desde que o resfriamento seja gerenciado), a menos que os esporos possam germinar e crescer após cozinhar ou assar o alimento
Arrefecimento de alimentos cozidos	Redução mínima em números	Potencial de esporos para germinar e crescer se o resfriamento for lento ou descontrolado	As bactérias patogênicas formadoras de esporos germinarão se o resfriamento não for gerenciado corretamente e os alimentos podem se tornar inseguros para consumo	Reduzida se o resfriamento não for gerenciado corretamente e qualquer bactéria formadora de esporos germinar


ALIMENTOS - GUIA n. 16, versão 1, de 5 de outubro de 2018

Processos aplicados aos alimentos	Efeito sobre micro-organismos		Impacto na segurança alimentar	Impacto na validade do alimento devido à deterioração
	Bactérias vegetativas (deteriorantes ou patogênicas) e esporos de fungos e leveduras	Esporos bacterianos (causam deterioração ou intoxicação alimentar, dependendo do tipo)		
Pasteurização de líquidos ou sólidos	Os números são reduzidos a baixos níveis	Não há diminuição no número de esporos e pode ocorrer sua ativação	Melhoria significativa, desde que o tempo e a temperatura aplicados sejam adequados e o resfriamento seja gerenciado corretamente	Estendido desde que o resfriamento seja gerenciado corretamente
UHT / processamento asséptico	Inativa a maioria das bactérias vegetativas, leveduras e fungos	Inativa a maioria dos esporos, exceto de alguns tipos de deteriorantes de alimentos resistentes ao calor (no entanto, geralmente não são capazes de crescer no ambiente anaeróbio à temperatura ambiente no recipiente)	Os alimentos se tornam de baixo risco	Validade é significativamente estendida
Conservas e alimentos esterilizados comercialmente	Inativa a maioria das bactérias vegetativas e leveduras / moldes	Inativa a maioria dos esporos, exceto alguns tipos de deteriorantes resistentes ao calor (no entanto, geralmente não podem crescer no ambiente anaeróbio à temperatura ambiente)	Os alimentos tornam-se de baixo risco	Validade é significativamente estendida



ALIMENTOS - GUIA n. 16, versão 1, de 5 de outubro de 2018

Processos aplicados aos alimentos	Efeito sobre micro-organismos		Impacto na segurança alimentar	Impacto na validade do alimento devido à deterioração
	Bactérias vegetativas (deteriorantes ou patogênicas) e esporos de fungos e leveduras	Esporos bacterianos (causam deterioração ou intoxicação alimentar, dependendo do tipo)		
Múltiplos fatores, como alto teor de sal, redução do pH, nitratos, açúcar elevado, fermentações, diminuição da umidade / secagem	Efeito variável dependente dos obstáculos microbiológicos específicos aplicados	Não há diminuição nos números, mas os esporos podem ser impedidos de germinar	As combinações de obstáculos variam na capacidade de ativar ou inibir o crescimento de bactérias patogênicas	Estendida enquanto as condições permanecerem inalteradas
Adição de conservantes, algumas especiarias e ervas ³	Previne aumento de uma gama específica de micro-organismos	Não há diminuição nos números, mas os esporos podem ser impedidos de germinar	Melhora a segurança alimentar inibindo o crescimento de uma gama específica de bactérias patogênicas	Pode fornecer uma ampliação da validade, inibindo a deterioração Pode garantir a validade impedindo o crescimento de contaminantes introduzidos no produto durante o uso
Salga, secagem e picklagem	Inibirá o crescimento da maioria das bactérias patogênicas e alguns micro-organismos deteriorantes de alimentos.	Não há diminuição nos números, mas os esporos podem ser impedidos de germinar	As formas vegetativas de bactérias patogênicas podem sobreviver, mas geralmente morrem ao longo do tempo	Estendida enquanto as condições permanecerem inalteradas

³ As ervas e as especiarias utilizadas como conservantes devem estar livres de bactérias patogênicas e micro-organismos deteriorantes de alimentos ou terão um forte impacto sobre a segurança alimentar e validade dos alimentos.



ALIMENTOS - GUIA n. 16, versão 1, de 5 de outubro de 2018

Processos aplicados aos alimentos	Efeito sobre micro-organismos		Impacto na segurança alimentar	Impacto na validade do alimento devido à deterioração
	Bactérias vegetativas (deteriorantes ou patogênicas) e esporos de fungos e leveduras	Esporos bacterianos (causam deterioração ou intoxicação alimentar, dependendo do tipo)		
Embalagem e atmosfera gasosa, incluindo exclusão de ar com óleo ⁴	Inibirá o crescimento de muitas bactérias patogênicas e deteriorantes de alimentos Pode promover o crescimento se o processo não for executado corretamente	Variável - depende dos requisitos gasosos das bactérias formadoras de esporos que possam estar presentes	As bactérias patogênicas podem crescer se as condições forem adequadas. O ambiente gasoso pode favorecer a bactéria patogênica, pois pode suprimir o crescimento de micro-organismos deteriorantes que inibiriam bactérias patogênicas.	Estendida enquanto as condições permanecerem inalteradas
Temperatura de armazenamento	Refrigerado: diminui o crescimento Congelamento: interrompe o crescimento da maioria dos micro-organismos	Refrigerado: interrompe o crescimento, exceto para micro-organismos tolerantes ao frio Congelamento: interrompe a germinação e crescimento da maioria dos esporos bacterianos e pode diminuir o número de outros esporos	Refrigerado: bactérias patogênicas tolerantes ao frio é uma preocupação, se presentes Congelamento: interrompe o crescimento da maioria das bactérias patogênicas e algumas diminuirão em número ao longo do tempo	Refrigeração: estendida Congelamento: bastante estendida

⁴ O ambiente gasoso criado pode favorecer o crescimento de algumas bactérias patogênicas e micro-organismos deteriorantes de alimentos que não crescem na presença de ar ou são favorecidos por ambientes com baixo oxigênio. Especial preocupação são os esporos de *Clostridium botulinum* que podem estar presentes em alguns frutos do mar e material vegetal colhido em locais onde essa bactéria é encontrada.



4.4 Efeitos do armazenamento refrigerado ou congelado

A vida útil de muitos alimentos pode ser estendida de várias formas, incluindo pelo armazenamento refrigerado ou congelado. As baixas temperaturas retardam as mudanças químicas e o crescimento de muitos micro-organismos deteriorantes e patogênicos (bactérias, leveduras e fungos) e a produção de toxina. No entanto, algumas bactérias patogênicas podem crescer em baixas temperaturas, incluindo aquelas frequentemente usadas na refrigeração e no congelamento de alimentos.

Portanto, é possível que a temperatura e a duração do armazenamento possam fornecer as condições necessárias para que as bactérias resistentes ao frio cresçam em número suficiente para tornar o alimento inseguro para consumo. Essa situação afeta a validade, especialmente quando o alimento é comercializado pronto para o consumo e não será mais submetido a processamento que reduza ou elimine os micro-organismos nocivos.

4.5 Perdas de nutrientes ou outros componentes relevantes durante o armazenamento

Os níveis de nutrientes e outros componentes relevantes podem diminuir em um alimento ao longo do tempo. A taxa de perda dependerá da estabilidade do nutriente ou componente em particular. Se os níveis do nutriente ou do componente puderem diminuir abaixo do esperado será necessária uma data de validade para indicar o ponto no tempo em que os níveis estarão abaixo do indicado no rótulo.

A indicação de prazo de validade nesses casos é especialmente importante para os alimentos em que o perfil nutricional e a manutenção dos níveis de nutrientes ou outros componentes são críticos para a saúde do consumidor pretendido.

4.6 Segurança alimentar e processamento de alimentos

Um dos fatores a ser considerado na determinação do prazo de validade é a segurança no consumo do alimento, com relação a potencial liberação de substâncias tóxicas provenientes da degradação ou a presença de micro-organismos patogênicos. No entanto, a formação de substâncias tóxicas ou o crescimento de micro-organismos patogênicos pode não fornecer sinais visíveis de que o alimento se tornou inseguro para consumo.

É relativamente incomum que os constituintes do alimento se degradem ou se alterem de modo que sejam formadas substâncias tóxicas. A evolução das tecnologias para processamento de alimentos, ingredientes, embalagens e armazenamento vem diminuindo o potencial de toxicidade química que se desenvolve nos alimentos. Esse potencial geralmente é atenuado por: (a) adição de substâncias que reduzem o potencial de ocorrência de mudanças, como antioxidantes; (b) embalagem projetada



para reduzir a exposição à luz; e (c) instruções de armazenamento, como refrigerar ou armazenar em um local escuro.

No entanto, uma maior diversidade de alimentos com armazenamento prolongado e refrigerado aumentou o potencial de presença de bactérias patogênicas, o que enfatiza a relevância do fator segurança na determinação do prazo de validade.

Antes do início do armazenamento refrigerado e da tecnologia moderna, os alimentos eram preservados usando processos como secagem, salga, picklagem e fermentação, sozinhos ou em combinação. Esses processos permitem que os alimentos sejam armazenados à temperatura ambiente por longos períodos. Além dos alimentos serem preservados, o crescimento de micro-organismos patogênicos geralmente é inibido e os micro-organismos presentes deixam de ser viáveis ao longo do tempo.

Atualmente, são comuns formas mais suaves de processamento, de modo que os alimentos não sejam tão secos, salgados ou ácidos. Embora essas técnicas possam melhorar a aceitação do produto pelos consumidores, poderão reduzir sua vida útil em comparação a um produto tradicional.

O armazenamento refrigerado e o uso de embalagens especiais podem restringir o crescimento de agentes patogênicos e bactérias deteriorantes, mas nem sempre resultam em uma vida útil prolongada. Isso ocorre porque as condições de armazenamento podem favorecer o crescimento de alguns micro-organismos deteriorantes resistentes ao frio, micro-organismos patogênicos e aqueles que se multiplicam na ausência de oxigênio.

Alimentos produzidos em casa, normalmente, são consumidos em poucas horas. No entanto, quando são produzidos comercialmente, eles precisarão de uma vida útil prolongada, geralmente com várias semanas de duração.

O prolongamento da vida útil pode ser alcançado por uma combinação de fatores relacionados à formulação dos alimentos, ao tipo de processamento aplicado e ao armazenamento. Porém, estes podem não ser suficientes para evitar a sobrevivência e o crescimento de possíveis bactérias patogênicas. Algumas medidas podem ser adotadas, tais como:

- Reformular ou embalar o alimento para evitar o crescimento microbiano;
- Garantir que não existam bactérias patogênicas presentes, tratando o produto em sua embalagem final;
- Reduzir o prazo de validade, de forma que não haja tempo suficiente para que os agentes patogênicos cresçam em níveis inseguros;
- Reduzir a possibilidade de sobrevivência dos agentes patogênicos aumentando a eficiência do processamento, tal como substituindo a pasteurização por UHT; ou
- Adotar especificações de ingredientes mais rigorosas.



5 FATORES PARA A DETERMINAÇÃO DO PRAZO DE VALIDADE DE UM ALIMENTO

Os fabricantes de alimentos devem garantir que o prazo de validade atribuído a um alimento seja baseado em racional técnico-científico, considerando os seguintes fatores:

- **Questões de saúde.** No caso de alimentos para fins especiais, que são destinados a consumidores com necessidades nutricionais específicas, de suplementos alimentares, de alimentos enriquecidos com vitaminas e minerais e de alimentos com alegações nutricionais ou de propriedades funcionais ou de saúde, é necessário garantir que as características nutricionais e de composição do produto mantenham-se até o final do prazo de validade. Para tanto, devem ser identificados os nutrientes e outros componentes relevantes que não são estáveis e determinar por quanto tempo eles estarão presentes nos níveis declarados nos rótulos dos alimentos, considerando os valores de tolerância estabelecidos na legislação, quando aplicável.
- **Razões de Segurança.** Nos casos em que haja presença ou a possibilidade de crescimento de micro-organismos patogênicos ou de produção de quaisquer substâncias tóxicas, é necessário identificar os micro-organismos que devem ser controlados e prever por quanto tempo os alimentos podem ser considerados seguros para consumo.
- **Deterioração.** Quando não há preocupações de segurança ou de saúde envolvidas, a definição do prazo de validade pode ser justificada em função do tempo necessário para que o alimento comece a se deteriorar, ou seja, quando começam a ocorrer alterações indesejáveis nas propriedades sensoriais. Os alimentos podem deteriorar-se em função do crescimento de bactérias e fungos ou por alterações físicas, químicas e bioquímicas que podem interferir no odor, cor, textura, incluindo as mudanças de umidade no alimento, tornando-os muito secos ou muito úmidos.

Os fabricantes devem possuir justificativa documentada de como o prazo de validade foi estabelecido e registros que subsidiem essa definição, tais como avaliações técnicas, estudos de estabilidade e laudos de ensaios laboratoriais.

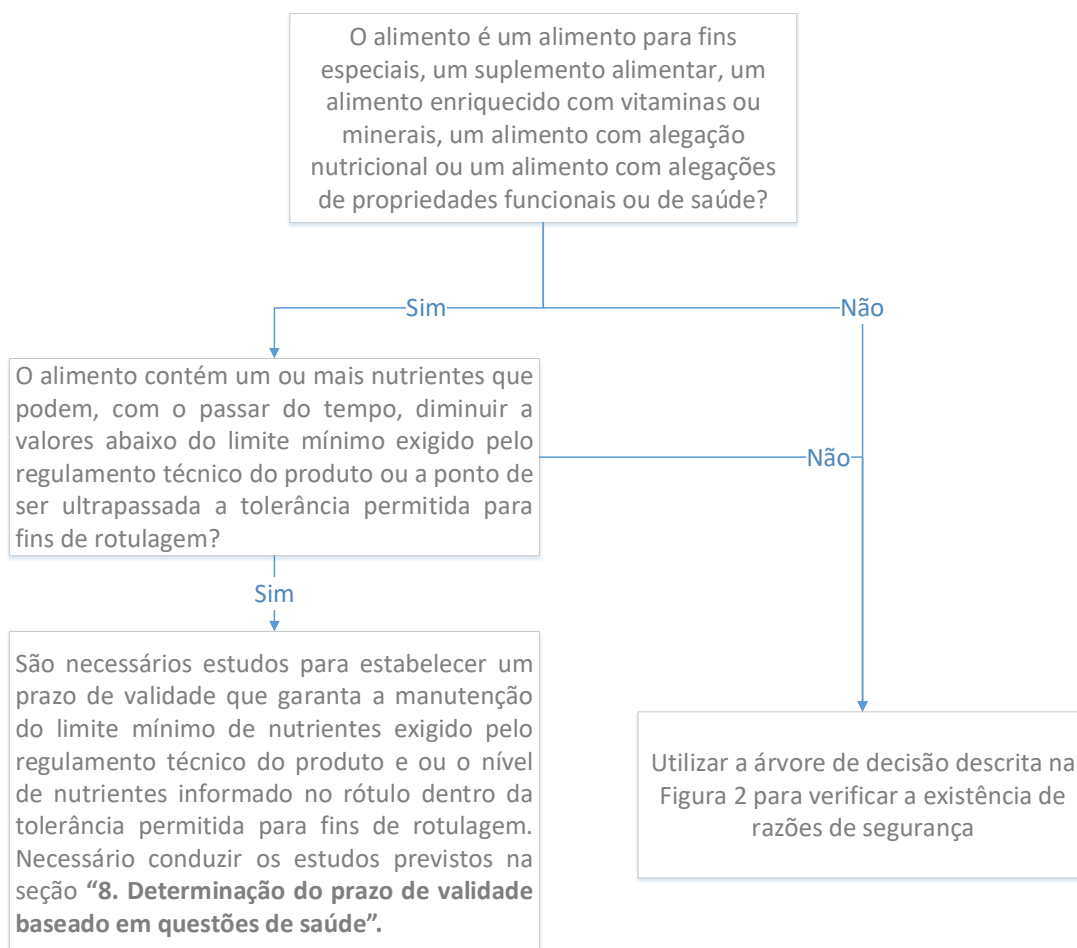


5.1 Árvores de decisão sobre os fatores que devem ser considerados na determinação do prazo de validade

Os fatores a serem considerados na determinação do prazo de validade variam, conforme as características e a finalidade de uso do alimento. Definir se a aplicação do prazo de validade se dará por questões de saúde, por razões de segurança ou por deterioração é uma das primeiras atividades para determinar a validade do alimento. As árvores de decisão exibidas na Figuras 1 e 2 apresentam orientações para essa avaliação.

Para estabelecer se existem questões de saúde a serem consideradas na determinação do prazo de validade de alimentos, recomenda-se aplicar a árvore de decisão descrita na Figura 1.

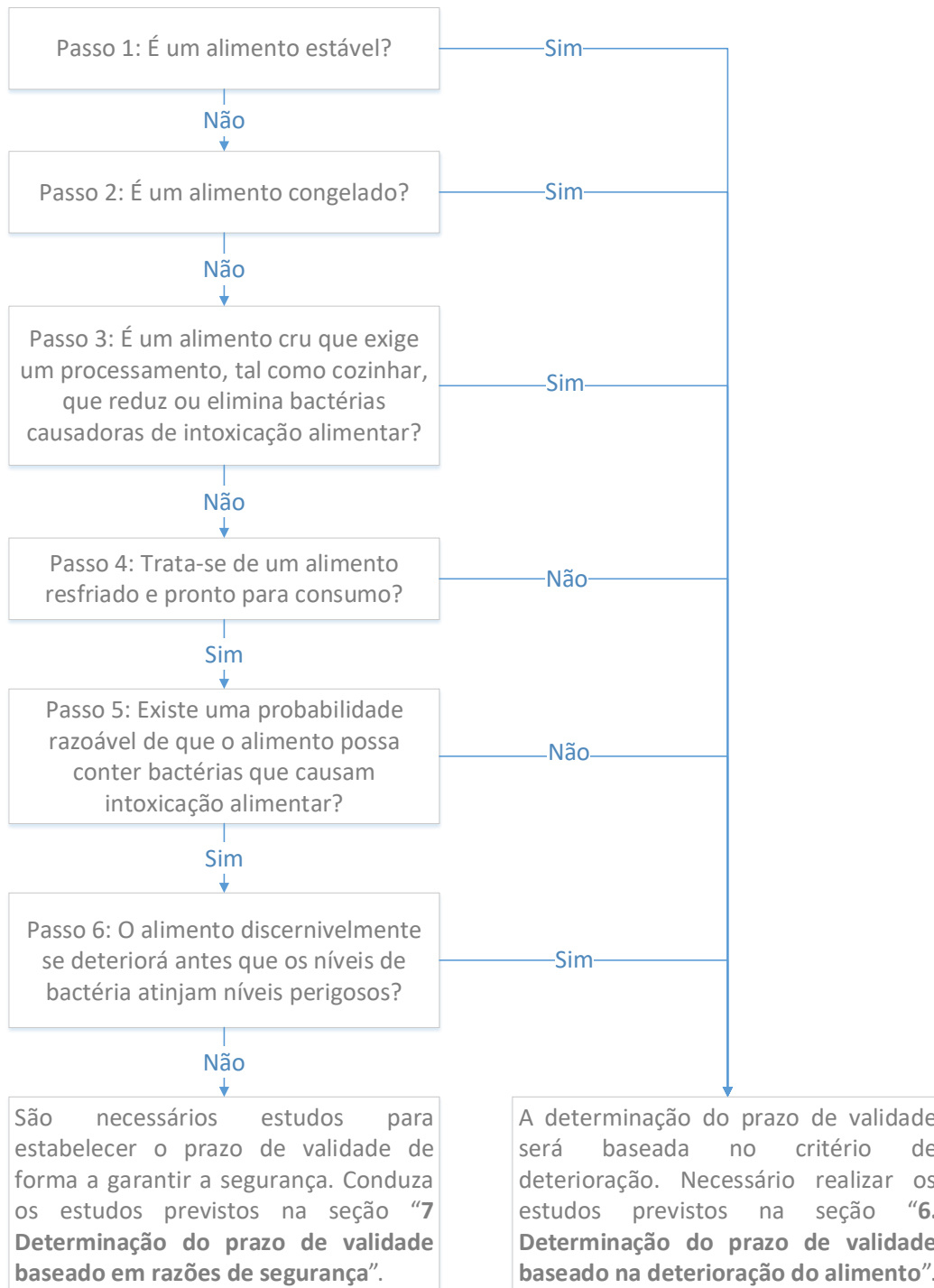
Figura 1. Árvore de decisão para aplicação do prazo de validade por questões de saúde do consumidor.





Uma vez que tenham sido descartadas as razões de saúde, é recomendado usar a árvore de decisão descrita na Figura 2. Para auxiliar na interpretação dessa árvore de decisão, cada uma das etapas foi numerada e texto explicativo fornecido na sequência.

Figura 2. Árvore de decisão para aplicação do prazo de validade por razões de segurança.



**Texto explicativo da árvore de decisão descrita na Figura 2**

Passo 1. Alimentos estáveis são aqueles que não necessitam de condições especiais de armazenamento, pois não fornecem condições adequadas para o crescimento de micro-organismos por serem secos ou por possuírem alto teor de ácido, açúcar ou sal. Os alimentos preservados dessa forma acabarão por mostrar deterioração no sabor e na aparência, mas isso pode demorar muito.

Os alimentos que foram submetidos a um processo capaz de eliminar tanto as bactérias vegetativas quanto os esporos também resultarão em alimentos estáveis desde que não haja possibilidade de recontaminação após o processamento (ex. conservas e produtos esterilizados na embalagem final).

Passo 2. Não há micro-organismos patogênicos e há muito poucos micro-organismos que causam deterioração de alimentos à temperatura de congelamento, com exceção de alguns fungos que podem crescer em alimentos congelados. No entanto, se for pretendido que o alimento seja descongelado antes do consumo, avance para o passo 3, uma vez que se houver um período prolongado entre o descongelamento do alimento e o consumo sem mais cozimento, eventuais micro-organismos presentes poderão crescer em níveis prejudiciais.

Passo 3. Os alimentos que se destinam a ser cozidos pelo consumidor devem ser claramente rotulados com instruções de cozimento. Esses alimentos não estão prontos para consumo e a preparação e o armazenamento adequados devem reduzir os micro-organismos patogênicos presentes em níveis seguros.

Passo 4. Algumas bactérias patogênicas resistentes ao frio podem crescer em alimentos durante o armazenamento refrigerado, de forma a atingir níveis inseguros ou a produzir toxinas. Estas bactérias podem sobreviver ao processamento ou podem ser introduzidas no alimento após o processamento, durante o processo de embalagem.

Passo 5. Existem algumas bactérias resistentes ao frio que podem causar intoxicação alimentar, tais como esporos de *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica*. Essas bactérias são potenciais contaminantes de alimentos que são minimamente processados ou não submetidos a processos que possam reduzir o risco microbiológico. Há ainda a possibilidade de contaminação do alimento por contaminantes presentes no ambiente de produção após o seu processamento. A validade do alimento deve ser baseada na capacidade desses agentes patogênicos, se presentes, de sobreviver e crescer sob as condições de armazenamento pretendidas.

Passo 6. Se houver a possibilidade de bactérias patogênicas resistentes ao frio estarem presentes nos alimentos e crescerem durante o armazenamento, o prazo de validade deve ser determinado considerando as razões de segurança. No entanto, este seria o caso apenas se o nível dessas bactérias patogênicas pudesse tornar o alimento inseguro antes do crescimento de micro-organismos que deteriore o alimento, tornando-o



inaceitável. Nas figuras 3, 4 e 5 existem três cenários para demonstrar a definição de prazos de validade, de acordo com o crescimento de micro-organismos deteriorantes e bactérias patogênicas.

Figura 3. Cenário A: O alimento é um substrato que permite o crescimento de bactérias patogênicas e deteriorantes durante o armazenamento, sendo que as bactérias patogênicas atingem níveis inseguros antes que o alimento esteja visivelmente deteriorado. Neste caso, o prazo de validade deve ser estabelecido de forma a garantir que o alimento não seja consumido quando os níveis de patógenos podem ser inseguros.

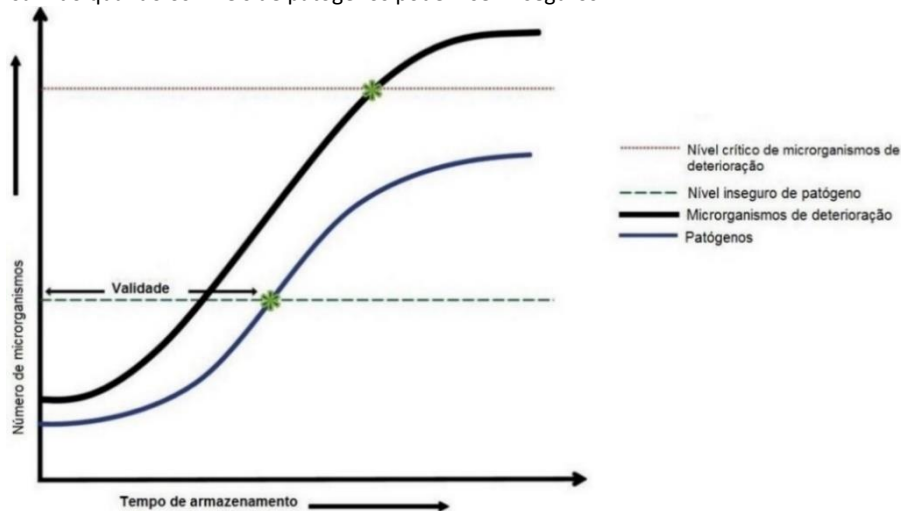


Figura 4. Cenário B: O alimento é um substrato que permite o crescimento de bactérias patogênicas e deterioradas durante o armazenamento, mas o alimento se torna visivelmente deteriorado antes que as bactérias patogênicas tenham atingido níveis inseguros. Neste caso, o prazo de validade será estabelecido com base na deterioração do alimento.

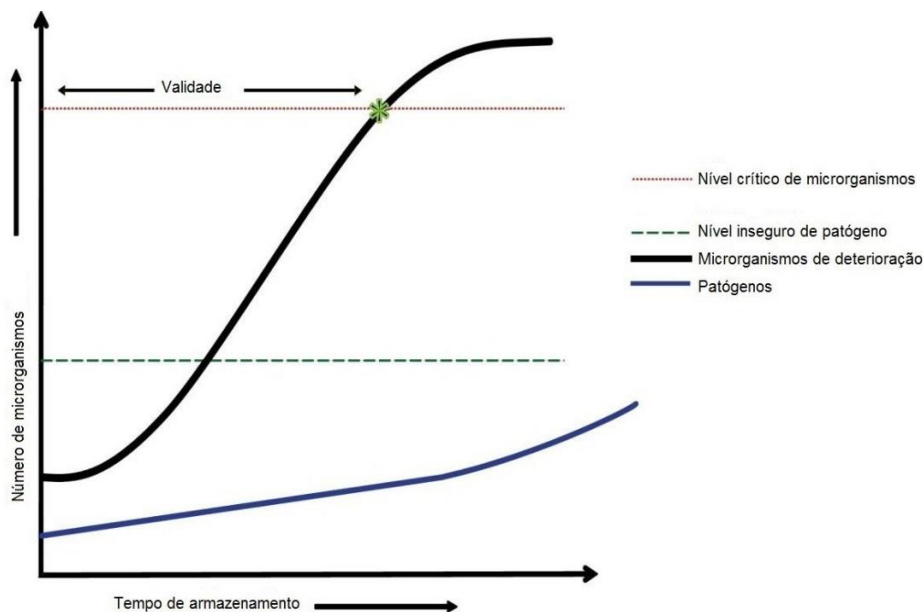
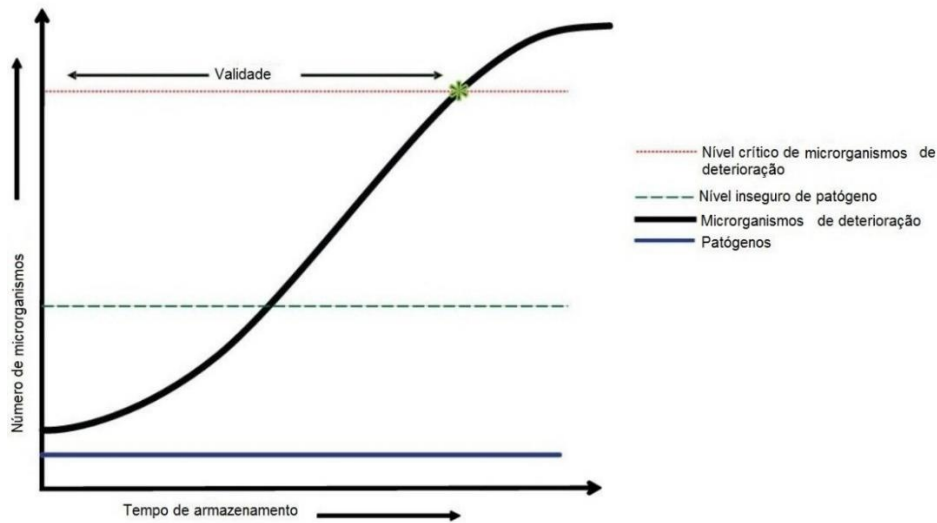




Figura 5. Cenário C: As bactérias patogênicas às vezes podem estar presentes em níveis muito baixos (seguros) e não crescerem nos alimentos. Por outro lado, as bactérias deteriorantes podem crescer e o alimento ser visivelmente deteriorado. Neste caso, o prazo de validade será estabelecido com base na deterioração do alimento.



5.2 Como determinar o prazo de validade de um alimento

É possível utilizar métodos diretos e indiretos para se estabelecer prazos de validade de alimentos. Os métodos diretos podem demorar mais tempo, mas são mais precisos, pois nesses estudos são utilizadas condições de armazenamento realistas e definidas. São exemplos de métodos diretos os estudos de estabilidade e os testes de desafio.

Nos estudos de estabilidade, os alimentos são submetidos a condições esperadas de armazenamento e distribuição por um intervalo de tempo. Isso ajuda a determinar em que ponto ocorrem mudanças químicas, físicas e deterioração do alimento. Nesse tipo de estudo, o prazo de validade é determinado em relação a essas mudanças e não com respeito ao crescimento de micro-organismo patogênico ou produção de toxinas.

Os métodos indiretos são mais rápidos, mas menos precisos, o que significa que pode haver necessidade de um ajuste na validade do alimento quando ele já estiver sendo comercializado. Os métodos indiretos incluem testes de estabilidade acelerada em que o alimento é armazenado em temperatura mais elevada do que a esperada ou através do uso de dados históricos coletados ou modelos preditivos.

Antes de empreender qualquer investigação para determinar o prazo de validade ou o crescimento de bactérias patogênicas em um alimento, é importante garantir que o processamento produz consistentemente um alimento seguro com as mesmas características, como acidez e umidade. Isso pode ser conseguido por meio de um programa de Análise de Perigo e Pontos Críticos de Controle (APPCC) e de estudos de validação dos controles adotados no processo produtivo.



6 DETERMINAÇÃO DO PRAZO DE VALIDADE BASEADO NA DETERIORAÇÃO DO ALIMENTO

6.1 Métodos diretos para determinação do prazo de validade baseados na deterioração do alimento

Os métodos diretos exigem que os alimentos sejam armazenados por um intervalo de tempo equivalente ou maior que o prazo de validade previsto, para observar, testar e registrar mudanças nas características dos produtos. A partir destas informações, o prazo de validade pode ser confirmado.

Também são conhecidos como estudos em tempo real ou estudos de longa duração. Nesse tipo de estudo, os ingredientes ou alimentos são submetidos às mesmas condições ambientais que os lotes comerciais. Portanto, tais estudos fornecem informações mais confiáveis do que os estudos acelerados.

As condições ambientais dos estudos para determinação do prazo de validade devem ser representativas das condições regionais em que o produto será vendido, desde que o produto seja armazenado à temperatura ambiente. Por exemplo, o produto destinado a uma região tropical terá maiores requisitos de temperatura e umidade do que aqueles distribuídos em climas mais temperados.

As condições de temperatura precisam ser mantidas e controladas durante todo o estudo, o que pode requer o uso de câmaras ou salas climatizadas ou salas dedicadas e controladas.

Nos estudos para determinação do prazo de validade deve-se levar em conta a possível variabilidade entre lotes de produtos e as condições de armazenamento, incluindo se o produto se destina a ser consumido durante um intervalo de tempo. Nesse último caso, o alimento deve ser submetido a uma série de flutuações de temperatura repetidas, como ciclos alternados de refrigeração e temperatura ambiente. Para alguns produtos, será importante levar em consideração condições que possam impactar desfavoravelmente durante o armazenamento e o transporte normais. Por exemplo, algumas emulsões podem ser afetadas negativamente por serem submetidas à agitação durante a distribuição.

A determinação do prazo de validade deve ser feita com o produto fabricado em condições equivalentes às comerciais normais e recomenda-se que esses estudos sejam realizados durante as etapas de desenvolvimento de novos alimentos. Assim, será possível avaliar qual o impacto de mudanças na formulação, no processamento ou na embalagem que sejam implementadas durante o estágio de desenvolvimento e se há variações inaceitáveis entre os lotes.



6.1.1 Etapa 1: Configurando o estudo

Primeiramente, é recomendado identificar os tipos de deterioração ou perda de qualidade mais comumente associados ao alimento, que podem ser fermentação, crescimento de fungos, deterioração bacteriana, alterações na textura, cheiro, sabor ou aparência. É necessário decidir qual desses é o mais importante e quais mudanças ocorrerão primeiro. Um tipo de deterioração pode ser predominante ou então vários tipos de alterações podem ser igualmente importantes.

Se o teste incluir a degustação dos alimentos, é importante que haja confiança de que o alimento não é uma fonte potencial de intoxicação alimentar. Se houver alguma dúvida a esse respeito, não faça testes de sabor.

Posteriormente, recomenda-se elaborar um protocolo do estudo indicando claramente quais avaliações e testes serão realizados, acompanhados de especificações e critérios de aceitação descritivos ou numéricos, podendo incluir:

- Testes sensoriais subjetivos, como, por exemplo, mudanças de cor e textura, cheiro e sabor; ou
- Testes laboratoriais objetivos, como, por exemplo, a contagem de bactérias e leveduras, a presença de fungos e a presença de um indicador de deterioração química, tais como D-alanina em suco de frutas, ranço, histamina em frutos do mar, etc.

O protocolo do estudo deve incluir a sequência de testes e observações. Gráficos, imagens e descrições de como serão realizadas as observações e respectivos resultados são essenciais para garantir que o estudo foi adequadamente desenvolvido. Deve-se garantir que sejam utilizadas apenas pessoas treinadas em testes altamente subjetivos, como gosto e cheiro.

Nesta etapa é necessário usar a literatura científica disponível e observar produtos similares no mercado e considerar a experiência prévia para estimar se o teste levará dias, semanas ou meses.

É necessário que sejam determinadas as condições de armazenamento para o estudo, que devem refletir as condições normais esperadas de distribuição e armazenamento do produto. As condições de armazenamento devem ser controladas de forma a garantir que sejam equivalentes em todos os testes realizados.

Nos estudos recomenda-se considerar a inclusão de condições adicionais de armazenamento se estas puderem ter um impacto na validade do produto comercializado em um mercado pretendido ou devido às ações do consumidor. As condições podem ser definidas como:



- otimizada, isto é, armazenamento conforme descrito no rótulo;
- realista, empregando repetidos períodos curtos de temperaturas elevadas ou diferentes níveis de umidade;
- pior caso (pior cenário), de forma a imitar o deslocamento do produto de um mercado temperado para um mercado tropical ou quando há um controle de temperatura pobre em uma geladeira doméstica, o efeito de luz em um produto sensível, o efeito de movimento e da vibração.

Em cada situação, pelo menos a temperatura e a umidade podem ter que ser levadas em consideração. Câmaras ou salas climatizadas devem ser usadas para fornecer um ambiente constante para armazenar as amostras de teste. Os refrigeradores ajustados a diferentes temperaturas (por exemplo, menos de 4°C ou mais de 10°C) podem fornecer informações sobre o impacto da temperatura na conservação do produto. Idealmente, recomenda-se utilizar uma gama de seis temperaturas (e não menos de três) que reflitam o alcance e os extremos aos quais o produto pode estar exposto.

Se o produto uma vez aberto puder ser armazenado por mais de alguns dias pelo consumidor, o impacto da quebra do selo da embalagem original precisa ser levado em consideração nos estudos (ex.: exposição ao ar, movimento de armazenamento refrigerado para temperatura ambiente ou de temperatura ambiente para armazenamento refrigerado).

É necessário definir o número e a frequência (ex. diariamente ou semanalmente) das observações e testes que serão feitos. Se o alimento tiver uma longa durabilidade, pode ser sensato começar com observações menos frequentes e aumentar a frequência conforme o fim do prazo de validade esperado se aproxima.

Também deve ser calculado o número total de amostras que serão necessárias para o teste. Se os testes envolvem apenas observações, serão necessárias menos amostras do que se os testes forem destrutivos.

Para produtos com expectativa de prazo de validade longo, podem ser realizados estudos acelerados, em que o produto é exposto a temperaturas elevadas para acelerar o desenvolvimento de deterioração e reduzir o tempo de duração do estudo. No entanto, tal estudo somente será útil se os padrões de deterioração permanecerem semelhantes aos esperados nas condições de armazenamento normais.

6.1.2 Etapa 2: Realizando o estudo

Alguns cuidados são recomendados durante a realização do estudo, entre eles:



ALIMENTOS - GUIA n. 16, versão 1, de 5 de outubro de 2018

- Obter amostras de produtos suficientes para o número de observações e/ou testes necessários durante o período de estudo. As amostras devem ser selecionadas aleatoriamente do lote de produto estudado e estar no formato de embalagem disponível para o consumidor.
- Rotular ou numerar as amostras para permitir uma correta e fácil identificação antes de colocá-las sob as condições de armazenamento selecionadas;
- Realizar o estudo, registrando todos os resultados obtidos e eventuais desvios.
- Analisar criticamente os resultados.
- Calcular uma validade a partir das observações feitas, tais como tempo transcorrido para o aparecimento de fungos e para que amostras testadas apresentam perda inaceitável de atributos de qualidade.

Recomenda-se que o estudo seja repetido de forma a identificar a variabilidade dentro e entre os lotes. Se houver uma grande variabilidade dentro ou entre lotes, é necessário investigar e descobrir como reduzir a variabilidade, que pode ser devido a:

- O processo de fabricação do produto;
- A composição dos alimentos;
- O tipo de embalagem;
- A higiene do ambiente de processamento;
- A qualidade dos ingredientes.

6.1.3 Etapa 3: Definindo o prazo de validade

O prazo de validade do alimento não deve ser superior ao intervalo de tempo observado na etapa 2, além de prover uma margem de segurança. O tamanho da margem de segurança precisa levar em conta a possibilidade de o prazo de validade ser comprometido por condições piores do que as consideradas ideais para armazenamento, distribuição e uso.

Uma vez que a produção começa, amostras de retenção necessitam ser mantidas, idealmente de cada lote de produto. Essas amostras devem ser verificadas no final do prazo de validade para confirmar se o prazo foi definido apropriadamente. No caso de queixas de clientes de que o produto tenha estragado antes do final do prazo



de validade, as amostras retidas podem ser examinadas para ver se a queixa é justificada e para prover uma resposta apropriada.

É necessário revisar regularmente as tendências e a evidência de falhas no prazo de validade, como por exemplo o impacto das condições sazonais, efeitos da cadeia de distribuição, varejistas, etc.

Os estudos deverão ser repetidos sempre que houver mudanças importantes na composição, ingredientes, processamento ou embalagem do produto para garantir que o prazo de validade não tenha sido comprometido pelas mudanças.

6.2 Métodos indiretos para a determinação do prazo de validade baseada na deterioração do alimento

A realização de estudos para determinação de prazos de validade pelos métodos diretos pode demorar muito para alguns produtos e pode também ser dispendiosa. Uma alternativa é usar métodos indiretos, como os estudos acelerados ou modelos preditivos para prever a estabilidade. Essa informação pode ser usada em paralelo com a observação contínua de como o produto funciona no mercado e a natureza das queixas dos clientes.

Os testes acelerados consideram que, em geral, a taxa de uma reação química dobra com o aumento de aproximadamente 10°C de temperatura. Portanto, estudos acelerados envolvem o armazenamento do produto a temperaturas maiores do que o armazenamento ambiental esperado no mercado. Assim, se a temperatura média ambiente for de 30°C, o armazenamento acelerado deve estar a temperaturas de 40°C ou acima.

Recomenda-se que, quando apropriado, os estudos acelerados sejam realizados em dois ou mais pontos de temperatura elevados, particularmente quando é necessária uma vida útil prolongada. Um estudo em que há apenas um ponto de temperatura a 10°C acima da temperatura ambiente pode, em alguns casos, apenas dar confiança de 2 vezes o tempo de armazenamento acelerado. Ou seja, se o tempo de armazenamento acelerado para certos produtos é de 6 meses, a confiança para o prazo de validade é de apenas 12 meses.

Os estudos acelerados também podem ser usados para avaliar o efeito de breves excursões fora das condições de armazenamento desejadas, por exemplo, durante o transporte, quando o produto pode estar sujeito a temperaturas extremas maiores.

A vantagem dos estudos acelerados é que eles fornecem dados preliminares de validade em um intervalo de tempo relativamente curto; no entanto, os dados dos estudos acelerados devem ser confirmados através de estudos de longa duração, uma vez que os pressupostos envolvidos nem sempre são confiáveis.



No entanto, é importante ressaltar que o teste acelerado pode ser pouco confiável quando as condições adversas causam mudanças físicas no alimento, tais como derretimento, suavização, fissuração ou separação de fases ou quando o produto contiver ingredientes sensíveis à temperatura, como, por exemplo, a maioria dos probióticos.

6.2.1 Modelos preditivos

Modelos e cálculos preditivos podem ser usados para prever a estabilidade de alguns tipos de produtos alimentares, tais como picles e molhos. No entanto, são necessários conhecimentos técnicos para que tais modelos sejam aplicados corretamente e, por conseguinte, especialistas devem ser consultados.

Os modelos preditivos podem ser usados para prever o crescimento, sobrevivência e inativação não-térmica de micro-organismos. Muitos desses modelos são aplicados para bactérias patogênicas, mas existem alguns modelos para problemas específicos de deterioração. A limitação é que as condições do alimento devem ser iguais às do modelo, caso contrário não serão aplicáveis. Os modelos exigem um conhecimento detalhado de fatores de composição, como pH e atividade da água, que afetam o crescimento de micro-organismos.

6.2.2 Prazo de validade dos alimentos compostos

Ao calcular o prazo de validade de um produto que é constituído por dois ou mais componentes individuais de alimentos separados, como torta com uma camada de calda de fruta ou uma refeição pronta, a validade de cada alimento deve ser levada em consideração ao atribuir um prazo de validade ao alimento composto. O prazo de validade do alimento composto não deve exceder o valor mais curto dentre as validades dos componentes.

Quando alimentos são misturados, a validade dos alimentos compostos será afetada pelas características dos componentes individuais. Se os componentes tiverem características semelhantes, como vários tipos de misturas de cereais, a validade dos alimentos compostos geralmente reflete o componente com a validade mais curta. No entanto, se os componentes são muito diferentes, como uma salada com molho, a validade dos componentes individuais não é mais relevante e é necessário estabelecer um prazo de validade para este novo alimento.

6.2.3 Mudanças de prazo de validade em alimentos reembalados

O prazo de validade de um alimento pode mudar se ele for retirado da embalagem original. Existe a possibilidade de o produto se contaminar durante o manuseio (ex. corte, porcionamento, reembalagem) e o alimento ser exposto a condições de temperaturas e umidade mais elevadas e proporcionar o crescimento microbiano.



O prazo de validade aplicado por um fabricante de alimentos leva em consideração a embalagem utilizada e as condições de armazenamento previstas para o produto.

Se o alimento for removido de sua embalagem original, é muito baixa a probabilidade que seja mantido o prazo de validade fornecido originalmente pelo fabricante. É provável que o prazo de validade seja mais curto (e muito pouco provável que seja estendido) uma vez que a embalagem protetora original foi removida.

Exemplos disso são os produtos a granel que são divididos em frações menores, tal como acontece em alimentos fatiados (alimentos reembalados).



7 DETERMINAÇÃO DO PRAZO DE VALIDADE BASEADO EM RAZÕES DE SEGURANÇA

7.1 Estudo de desafio

Existem métodos microbiológicos padrão projetados para avaliar a eficácia dos conservantes em suplementos e alimentos, uma técnica geralmente conhecida como teste de desafio microbiológico.

Um teste de desafio pode ser definido como uma avaliação microbiológica da capacidade de um produto para inativar ou prevenir o crescimento de micro-organismos durante um intervalo de tempo relativamente longo.

Se houver a possibilidade de que os micro-organismos patogênicos presentes em níveis baixos no produto aumentem durante o prazo de validade, é importante investigar o quão rápido é o crescimento e sua magnitude. As melhores informações sobre o crescimento são obtidas por meio de estudos de desafio em que o alimento é inoculado com cepas de micro-organismos patogênicos e depois testado em intervalos regulares para avaliar possível aumento numérico desses micro-organismos. Isso estabelecerá uma curva de crescimento (veja as Figuras 3, 4 e 5).

Se os níveis de patógenos puderem atingir níveis inseguros antes que o alimento mostre uma deterioração significativa que impeça o seu consumo, é essencial que o prazo de validade garanta que o alimento não seja consumido após atingir níveis inseguros (Consulte a Figura 3, cenário A).

O teste de desafio microbiológico envolve quatro etapas: (1) um protocolo experimental apropriado para o produto e a validade requerida; (2) um procedimento de inoculação com os micro-organismos de teste; (3) o procedimento de teste; e (4) interpretação dos resultados.

O teste deve ser realizado durante as fases de desenvolvimento de produtos suscetíveis a contaminação microbiológica. As diretrizes para a realização de testes de desafio microbiológico estão disponíveis em vários guias e na literatura científica.

Os pontos importantes que devem ser incluídos ao projetar um estudo de desafio são:

- Os alimentos testados devem ser iguais aos fornecidos ao consumo;
- O nível de inoculação deve refletir o objetivo do estudo, ou seja, quando um alimento pronto para o consumo estiver contaminado com um pequeno número de agentes patogênicos, eles podem crescer para níveis inseguros durante o prazo de validade



esperado dos alimentos e a aplicação das informações obtidas neste estudo devem ser consideradas para definição de um prazo de validade apropriado;

- O método de inoculação do alimento com a bactéria deve refletir a maneira como a contaminação é provável de acontecer (ex. contaminação cruzada de alimentos);
- Os alimentos inoculados devem então ser embalados como destinados à venda. Alternativamente, o próprio produto embalado pode ser inoculado, desde que seja garantido o não comprometimento da integridade da embalagem;
- As temperaturas de incubação devem refletir a amplitude prevista das condições de temperatura e a possível temperatura à qual o alimento será exposto pelo consumidor;
- Em se tratando de alimentos em que é possível a presença de micro-organismos deteriorantes ou outras bactérias, pode ser de grande utilidade monitorar seus níveis, uma vez que elas impactam no crescimento de micro-organismos patogênicos; e
- Devem ser documentados todos os aspectos e detalhes do estudo desafio.

7.2 Modelagem preditiva de crescimento de bactérias em alimentos

Uma alternativa aos estudos de desafio é usar modelos preditivos do crescimento de bactérias. Nesses estudos é necessário aplicar as características dos alimentos em modelo preditivo que fornecerá a probabilidade de crescimento ou uma curva de crescimento. Embora vários desses modelos tenham sido aperfeiçoados nos últimos anos, sempre será recomendado que um estudo de desafio também seja realizado para confirmar que o modelo reflete o produto com precisão.



8 DETERMINAÇÃO DO PRAZO DE VALIDADE BASEADO EM QUESTÕES DE SAÚDE

No caso de alimentos destinados a consumidores com necessidades nutricionais específicas, suplementos alimentares, alimentos enriquecidos com vitaminas ou minerais ou um alimento com alegações nutricionais ou de propriedades funcionais ou de saúde relativa a nutrientes destinados a consumidores com necessidades nutricionais específicas, o foco do estudo deve ser a característica de preocupação. Ou seja, o tempo necessário para que o nível de uma vitamina ou outro nutriente ou componente atinja um nível abaixo do indicado no rótulo. É importante que estes estudos reúnam as condições de armazenamento, distribuição e comercialização do produto.

O estudo de estabilidade pode ser dispendioso, tanto no sentido financeiro como no tempo gasto. Portanto, é importante que sejam considerados todos os fatores que podem afetar a estabilidade e a validade antes de se iniciar os estudos.

O estudo deve ser a confirmação final de que o produto, em uma embalagem específica, permanecerá estável durante todo o período de validade proposto. Isso exige que todas as possíveis fontes de instabilidade em termos da formulação, processamento e embalagem tenham sido avaliadas e as ações necessárias sejam tomadas antes que quaisquer testes de estabilidade sejam realizados. Isso pode requerer que estudos menores e seletivos sejam realizados antes que a formulação seja finalmente aprovada, para verificar possíveis fontes de instabilidade, como interações entre ingredientes.

Da mesma forma, testes em escala menor podem ser necessários para garantir que a embalagem selecionada seja adequada para a formulação em termos de barreiras de oxigênio, umidade e luz.

De forma a compensar as perdas durante o armazenamento e permitir que a validade seja prolongada, os fabricantes podem optar por reformular os produtos aumentando a quantidade de nutriente adicionado (sobredosagem), desde que as doses diárias toleráveis ou os níveis máximos permitidos não sejam excedidos.

8.1 Estabilidade por desenho

Os princípios de "Qualidade por Desenho" podem ser aplicados para os alimentos. Durante o desenvolvimento de um produto, recomenda-se que a formulação proposta seja revisada criticamente para avaliar o impacto sobre a sua estabilidade considerando:

- a combinação dos componentes propostos em termos de níveis de umidade;



- as interações conhecidas entre certos ingredientes;
- os possíveis efeitos sobre a estabilidade se os ingredientes forem usados onde os parâmetros críticos (por exemplo, a umidade) estão nos extremos de sua faixa de especificação;
- possíveis interações químicas entre componentes na mesma matriz de produto;
- o manuseio do produto em todas as operações de fabricação e embalagem, incluindo os períodos em que o produto pode ser exposto a condições climáticas ambientais, como por exemplo o período entre as etapas de fabricação e embalagem;
- as propriedades de barreira da embalagem proposta em termos de porosidade do material para o ar (oxigênio) e umidade, integridade da selagem, espaço livre dentro da embalagem, propriedades de barreira em termos de transmissão de luz ultravioleta e potencial de migração de substâncias (por exemplo, solventes de cola de rótulos);
- as condições de armazenamento durante a distribuição, incluindo o transporte e comércio no varejo. Se o produto for exportado do país de origem, as condições ambientais nos países receptores devem ser levadas em consideração; e
- a quantidade de ingrediente adicional (sobredose) necessária para garantir que a quantidade rotulada ainda esteja presente no final da vida útil.

Não considerar todos os itens acima em uma fase precoce do desenvolvimento pode potencialmente levar a falha nos estudos práticos posteriores que devem ser realizados para determinação do prazo de validade ou mesmo a necessidade da retirada do alimento do mercado ou a redução significativa na sua validade.

8.2 Micro-organismos em estudos de estabilidade baseados em questões de saúde

Em termos de estudos de estabilidade para determinação de prazo de validade de alimentos, os micro-organismos deteriorantes são tão relevantes quanto os agentes patogênicos.

Em geral, a qualidade microbiológica dos ingredientes é determinante para a garantia da qualidade do produto acabado e da sua estabilidade. Se forem seguidos os princípios de BPF, a condição microbiológica dos ingredientes suscetíveis deve ser verificada antes da fabricação do produto.



Entretanto, além dos ingredientes atenderem aos parâmetros microbiológicos, é necessário considerar se outros fatores, tais como o processamento subsequente, as práticas na fabricação e a forma de conservação do produto são suficientes para manter o alimento dentro dos padrões exigidos.

A análise microbiológica em alimentos deve ser realizada de acordo com os protocolos reconhecidos para alimentos ou a partir de metodologias validadas.

As empresas podem definir critérios microbiológicos próprios, mais restritivos do que aqueles definidos no padrão legal (RDC 12/01) ou baseado em indicadores, de forma a garantir que os produtos nunca atinjam níveis que possam comprometer sua segurança e qualidade.

A presença de organismos patogênicos e potencialmente patogênicos deve ser investigada no início e no final do estudo, mas normalmente não é necessária em cada ponto do estudo. Se os patógenos não forem detectados no primeiro teste, é improvável que sejam detectados em exames subsequentes, a menos que o produto não seja homogêneo ou tenha sido posteriormente contaminado. Caso haja a possibilidade de crescimento de micro-organismos patogênicos, é necessário realizar estudo de desafio, conforme recomendações da seção 7.

8.3 Estabilidade física em estudos de estabilidade baseados em questões de saúde

Um aspecto da estabilidade que também precisa ser considerado durante o início do desenvolvimento de um produto são as suas características físicas. Cápsulas e comprimidos são alguns exemplos de formas físicas que, apesar de não convencionais para alimentos, são muito usadas em suplementos alimentares. Nas próximas subseções serão discutidas algumas características dessas duas formas.

8.3.1 Comprimidos

A dureza e a friabilidade de um comprimido podem mudar significativamente durante o armazenamento e, em muitos casos, essas mudanças estão relacionadas à composição da formulação, particularmente o uso de veículos e aditivos que são inadequados para a combinação particular de ingredientes. A escolha de veículo/comprimido inerte pode afetar as características físicas a longo prazo de um comprimido. Por exemplo, algumas combinações de sais inorgânicos (como fosfatos) contribui para aumentar a dureza com o tempo. Em casos extremos, isso pode chegar a um ponto em que o comprimido não se desintegra.

Em outros casos, os altos níveis de umidade nos ingredientes e no espaço livre da embalagem podem levar a um amolecimento e aumento da friabilidade do



comprimido. A interação de ingredientes com revestimentos também pode causar a extensão dos tempos de desintegração e/ou a descoloração.

Para comprimidos de liberação modificada, o perfil de dissolução pode mudar ao longo do tempo e é importante incluir um teste apropriado em um estudo de estabilidade para este tipo de produto.

8.3.2 Cápsulas

Um problema físico-químico que muitas vezes é subestimado é a reticulação da gelatina em cápsulas de gelatina duras e moles. A gelatina reticulada pode aumentar consideravelmente o tempo de dissolução de uma cápsula e, em casos mais extremos, impede que a cápsula se dissolva no intestino humano.

A reticulação surge da polimerização da gelatina. Esta reação pode ser facilitada por alta temperatura, alta umidade, radiação ultravioleta e uma variedade de substâncias que podem estar presentes na cápsula ou, mais comumente, no preenchimento da cápsula.

A reticulação de gelatina pode ser catalisada por uma série de substâncias químicas encontradas nos ingredientes da cápsula ou presentes como impurezas dos componentes. Os grupos químicos comuns são os aldeídos e as cetonas, que podem ser encontrados em vários vegetais e óleos marinhos concentrados usados em suplementos.

Demonstrou-se que muitos compostos frequentemente utilizados em cápsulas de suplementos tais como polietilenoglicóis, polissorbatos e ésteres de ácidos graxos insaturados podem sofrer auto-oxidação para formar aldeídos de maior peso molecular. Estes podem reagir com a gelatina da cápsula, particularmente em cápsulas gelatinosas moles e resultar em um produto com fraca dissolução/desintegração.

Verificou-se que uma série de corantes alimentares de uso comum interagem com a gelatina por meio de ligação hidrofóbica e de hidrogênio.

Além disso, cápsulas com vazamento em função de condições de fabricação precárias (por exemplo, secagem excessiva ou formulação inadequada) podem ser um problema para a estabilidade física de cápsulas gelatinosas moles.

É importante que todas as novas formulações usando cápsulas de gelatina sejam cuidadosamente avaliadas quanto ao potencial dos componentes para induzir a reticulação da cápsula ou outros defeitos físicos. Adicionalmente, a especificação e a pureza dos ingredientes devem ser avaliadas quanto a possíveis componentes ou contaminantes que possam causar reações.



Também é importante que os testes de dissolução/desintegração sejam realizados em cápsulas durante estudos de estabilidade acelerada e de longa duração e em amostras retidas de lotes de produção.

8.4 Parâmetros de testes para estudos de estabilidade baseados em questões de saúde

Ao projetar um estudo de estabilidade, é essencial que todos os parâmetros testados sejam apropriados para a forma do produto (comprimido, cápsula, líquido, semissólido ou pó) e sejam uma medida qualitativa ou quantitativa da estabilidade do produto. Todos os parâmetros selecionados devem ser capazes de detectar mudanças nas características físicas, químicas e microbiológicas do produto durante o período de armazenamento.

A seleção dos parâmetros dependerá do tipo de estudo que esteja sendo realizado, sendo que nem todos os parâmetros podem ser necessários para um alimento em particular. Além disso, nem todos os parâmetros precisam ser testados em todos os momentos em um estudo. Por exemplo, para muitas formulações, o risco de crescimento microbológico é muito baixo (ex. produtos que possuem atividade da água menor que 0,5) e os testes podem ser realizados somente no início e no final do estudo ou mesmo não serem necessários. Em contrapartida, certos alimentos líquidos podem exigir testes microbiológicos em todos os tempos.

As listas a seguir, apesar de não exaustivas, são uma indicação de parâmetros que podem ser considerados para cada forma física dos produtos.

a) Comprimidos:

- Aparência, cor, odor, sabor e/ou textura;
- Teor (ingredientes declarados na rotulagem);
- Produtos de degradação dos ingredientes, se houver a possibilidade de formação de substâncias potencialmente tóxicas;
- Dureza e friabilidade;
- Desintegração e dissolução;
- Teor de umidade ou perda por dessecação;
- Oxidação da gordura, se aplicável; e
- Análise microbiológica.

b) Cápsulas gelatinosas (duras e moles):

- Aparência, cor, odor, sabor e/ou textura;
- Teor (ingredientes declarados na rotulagem);
- Produtos de degradação dos ingredientes, se houver a possibilidade de formação de substâncias potencialmente tóxicas;



- Dissolução;
 - Integridade da cápsula, como fragilidade ou vazamento;
 - Teor de umidade ou perda por dessecação;
 - Oxidação da gordura, se aplicável; e
 - Análise microbiológica.
- c) Líquidos e semissólidos:
- Aparência, cor, odor, sabor e/ou textura;
 - Teor (ingredientes declarados na rotulagem);
 - Produtos de degradação dos ingredientes, se houver a possibilidade de formação de substâncias potencialmente tóxicas;
 - pH;
 - Viscosidade;
 - Teor de umidade e/ou atividade da água;
 - Análise microbiológica;
 - Teor de conservantes;
 - Oxidação da gordura, se aplicável;
 - Estabilidade da emulsão, se aplicável;
 - Precipitação; e
 - Separação de fases.
- d) Pós
- Aparência, cor, odor e sabor;
 - Teor (ingredientes declarados na rotulagem);
 - Produtos de degradação dos ingredientes, se houver a possibilidade de formação de substâncias potencialmente tóxicas;
 - Teor de umidade e/ou atividade da água;
 - Oxidação da gordura, se aplicável;
 - Higroscopicidade;
 - Análise microbiológica;
 - Distribuição de tamanho de partícula;
 - Fluxo do pó/propriedades de adesão.

8.4.1 Requisitos analíticos para as diferentes formas de alimentos

Na análise de formulações líquidas, semissólidas e em pó podem ser empregados métodos padrão para análise microbiológica de alimentos.

As formulações na forma de comprimidos podem introduzir problemas na análise, dependendo da sua composição, uma vez que algumas fórmulas podem conter



uma maior proporção de ingredientes que não são solúveis em água. Nesses casos, os comprimidos precisam ser triturados sob condições estéreis em um pó fino, e devem ser mantidos suspensos no diluente durante a pipetagem.

As formulações na forma de cápsulas, tanto gelatinosas moles quanto duras, podem ser tratadas como uma única unidade ou como dois componentes distintos, a cápsula e o preenchimento. Se alguma contaminação microbiológica for detectada na cápsula, muitas vezes é útil testar os componentes separadamente para descobrir a fonte. Quando isso for necessário, as cápsulas devem ser cortadas assepticamente com um bisturi estéril e os conteúdos esvaziados. Tanto a cápsula como o seu conteúdo devem ser testados separadamente. Uma vantagem desta abordagem é que ela pode identificar mais facilmente a contaminação da superfície da cápsula proveniente do manuseio pós-produção.

8.5 Requisitos e critérios para os estudos de estabilidade baseados em questões de saúde

O requisito primário de um estudo de estabilidade é confirmar que o produto pode sustentar uma validade comercialmente realista. Em outras palavras, deve confirmar que a composição do rótulo pode ser atendida no final da validade e que não haja mudanças sensoriais inaceitáveis durante o prazo de validade do produto.

8.5.1 Recomendações gerais

Os estudos de estabilidade devem ser realizados na embalagem final proposta. Sempre que possível, o processamento e a embalagem das amostras de teste devem simular as condições reais da produção comercial do produto.

Os estudos de estabilidade devem ser bem projetados antes do seu início e devem ser personalizados para atender às necessidades específicas da matriz e do conteúdo do produto.

As propriedades e os parâmetros selecionados para testes durante um estudo de estabilidade devem incluir as características que podem estar sujeitas a alterações durante o armazenamento e que podem afetar o teor declarado na rotulagem, a qualidade do produto, a segurança e/ou a eficácia.

Idealmente devem ser testados todos os nutrientes declarados na rotulagem em todos os tempos do estudo, a menos que existam evidências documentadas de que seja improvável que ocorram alterações significativas de certos ingredientes nas condições de armazenamento. Por exemplo, a maioria das fontes de minerais e oligoelementos são relativamente estáveis, enquanto que em muitas circunstâncias as vitaminas podem ser consideradas inerentemente instáveis. Neste



caso, pode-se selecionar indicadores de estabilidade, ou seja, substâncias conhecidamente menos estáveis (ex. Vitaminas A, C, E e tiamina), para serem quantificadas nos tempos intermediários do estudo.

No entanto, é importante ressaltar que, a depender da qualidade das matérias-primas utilizadas, das condições de processo, do envase elegido, das características da matriz (pH, umidade etc.) e do armazenamento, os indicadores podem variar. Assim, os indicadores utilizados para um produto podem não ser representativos para outros.

A análise de todos os nutrientes no tempo final do estudo de estabilidade de longo prazo vai confirmar se os indicadores selecionados para os tempos intermediários foram adequados e estes resultados serão utilizados para o planejamento dos estudos de estabilidade de acompanhamento.

8.5.2 Requisitos analíticos

Após a seleção dos parâmetros de teste, é essencial garantir que os métodos analíticos sejam apropriados para a matriz do produto em particular. Os métodos devem ser verificados nas condições do laboratório e quando necessário, validados, conforme prevê a RDC 11/12 e a RDC 12/01.

É importante que todos os procedimentos analíticos sejam revisados criticamente no contexto da composição do produto, para garantir que nenhum dos ingredientes tenha potencial para interferir nos resultados, que a variabilidade do método seja aceitável e que o método seja adequadamente implementado no laboratório responsável pela análise.

8.5.3 Amostras de produtos

Antes de prosseguir com a seleção de amostras para um estudo de estabilidade, o produto deve primeiro ser verificado para confirmar que os lotes atendem às especificações esperadas. Idealmente, as análises devem ser feitas em amostras de três lotes consecutivos.

As amostras de produtos selecionadas para um estudo de estabilidade devem ser retiradas do(s) lote(s) que são considerados equivalentes daqueles vendidos comercialmente. Os lotes não devem ser seletivamente escolhidos com base em parâmetros específicos. As amostras também devem ser verificadas para garantir a distribuição homogênea dos ingredientes na formulação.

A embalagem utilizada para as amostras no estudo deve ser idêntica à que será usada para o produto comercial em termos de volume interno, barreira e propriedades de migração e integridade da selagem.



Quando os produtos possuírem mais de um tamanho de embalagem, a menor e a maior embalagem devem ser testadas, ou deve ser adotada outra abordagem cientificamente justificada. Isso é necessário, pois as embalagens maiores podem ter um maior espaço vazio relativo ou área de superfície de embalagem, fatores que podem afetar a estabilidade.

Em estudos de estabilidade e, particularmente, estudos acelerados de produtos contendo diversos ingredientes, é aconselhável um maior número de ensaios. Também é aconselhável colocar quantidades adicionais de amostras do produto em estudo (amostras de reserva) para que uma amostra extra possa ser removida em cada tempo do estudo para ser armazenada a baixa temperatura (cerca de 0°C) para, se necessário, permitir o reteste futuro no caso de eventuais desvios nos resultados obtidos.

8.5.4 Tipos de estudos de estabilidade

Existem vários tipos de estudos de estabilidade e recomenda-se que o fabricante selecione o(s) mais adequado(s) aos resultados exigidos. Os estudos podem enquadrar-se nas categorias listadas abaixo e os seus princípios estão detalhados nas subseções a seguir.

- Estudo de estresse, para determinar a susceptibilidade à degradação de um ingrediente ou combinação de ingredientes.
- Estudos acelerados, onde as condições de armazenamento são intensificadas para acelerar a taxa de qualquer mudança e para reduzir o tempo de estudo.
- Estudo de longa duração, onde o tempo de armazenamento é igual ou maior à validade prevista. Isso também é conhecido como estudo "em tempo real".
- Estudo de acompanhamento, realizado após o início da comercialização do alimento, com o objetivo de monitorar e confirmar o prazo de validade previamente estabelecido.
- Estudo de uso, que é usado para simular a estabilidade do produto após a abertura e durante o uso pelo consumidor.
- Estudo de transporte, que é usado para simular as condições de transporte e armazenamento durante a distribuição do produto.
- Testes de desafio microbiológico.



8.5.4.1 Estudos acelerados

Como parte dos estudos de estabilidade, é necessário que a físico-química e a termocinética dos principais ingredientes sejam compreendidas. Por exemplo, a degradação da maioria das vitaminas segue a cinética de "primeira ordem" ou "ordem zero". Este conhecimento permite a utilização de modelos estatísticos preditivos, como aqueles baseados na Equação de Arrhenius (vide Anexo IV).

A compreensão da cinética é particularmente importante ao interpretar os dados de estudos de estabilidade em curto prazo, tais como estudos acelerados, onde a validade deve ser baseada em uma extrapolação de tendências identificadas em períodos relativamente curtos (ou seja, 3 a 6 meses). A falta de utilização de modelos estatísticos adequados pode levar a extrapolações inválidas. A precisão de um modelo estatístico está relacionada ao número de temperaturas de armazenamento que podem ser utilizadas para o estudo acelerado e o número de amostras que podem ser retiradas de cada temperatura em cada ponto do tempo. Idealmente, pelo menos três temperaturas a incrementos de 5oC ou 10oC devem ser usadas para um estudo de 24 semanas em um produto com vários ingredientes que possua validade de 2 a 3 anos.

Tal estudo, quando conduzido corretamente, pode fornecer dados suficientes para permitir a análise usando a equação de Arrhenius, possibilitando que as previsões da validade sejam feitas para os ingredientes individualmente e que se estime a sobredose necessária para os ingredientes menos estáveis. Também pode ajudar a identificar potenciais problemas de estabilidade.

Embora a técnica possa ter algumas limitações, a experiência mostrou que, se todos os controles experimentais forem mantidos, podem ser obtidas previsões úteis da estabilidade do produto.

No entanto, é importante ressaltar que o teste acelerado pode ser pouco confiável quando as condições adversas causam mudanças físicas no produto, tais como derretimento, suavização, fissuração ou separação de fases ou para ingredientes sensíveis à temperatura, como, por exemplo, os probióticos.

Em se tratando de produtos registrados na Anvisa, poderá ser concedido um prazo de validade provisório de até 24 meses se aprovado o relatório de estudo de estabilidade de longa duração de 12 meses ou relatório de estudo de estabilidade acelerado de 6 meses acompanhado dos resultados preliminares do estudo de longa duração. Nesses casos, os estudos acelerados devem contar com análises em amostras do produto submetidas a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $75\% \text{ UR} \pm 5\%$ em pelo menos 3 tempos (ex.: 0, 3 e 6 meses). O relatório deve conter os resultados obtidos e deve ser feita avaliação das tendências de degradação por meio de gráficos e de discussões dos resultados. Caso os resultados finais do estudo de estabilidade não confirmem o prazo de validade



provisório, é necessário que a empresa tome as medidas cabíveis e solicite à Anvisa a alteração do prazo de validade.

8.5.4.2 Estudos de longa duração

Para determinação do prazo de produtos estáveis baseado em questões de saúde, recomenda-se a análise de amostras em tempos regulares, tais como 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 meses. Caso o prazo de validade seja inferior a 24 meses, não é necessário que o estudo seja conduzido por todo esse período.

As condições de temperatura e umidade às quais as amostras testadas são submetidas devem ser correspondentes à zona climática para a qual o produto é destinado. No caso do Brasil, a zona climática tem sido enquadrada como IVb ($30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $75\% \text{UR} \pm 5\% \text{UR}$).

8.5.4.3 Estudo de acompanhamento

Os estudos de estabilidade de acompanhamento são realizados após o início da comercialização do produto e tem por objetivo monitorar e confirmar o prazo de validade previamente estabelecido. É útil para avaliar se pequenas mudanças intencionais ou não afetam as características do alimento.

Através deste estudo é possível verificar se houve alguma mudança voluntária ou involuntária introduzida na formulação⁵ ou no processo de produção que possa interferir adversamente na estabilidade do produto.

Os protocolos de estudos de estabilidade de acompanhamento podem ser diferentes dos estudos iniciais de longa duração, incluindo a possibilidade da redução da frequência de testes, caso tenha sido demonstrado nos estudos prévios de acompanhamento e de longa duração que um determinado parâmetro não é crítico.

Se resultado fora de especificação ocorrer em ensaios no estudo de estabilidade de acompanhamento, a empresa deverá investigar os motivos e se necessário, realizar novo estudo de estabilidade de longa duração ou justificar tecnicamente. O impacto desse resultado fora de especificação em produtos que já estão sendo comercializados deve ser avaliado e quando necessário, medidas adicionais devem ser adotadas.

⁵ Podem ser consideradas pequenas mudanças intencionais na formulação do produto aquelas em que as diferenças se relacionam com componentes menos relevantes, como corantes e aromatizantes ou pequenas variações quantitativas de ingredientes. Quando forem implementadas mudanças significativas (uso de diferentes ingredientes e aditivos ou proporções dos componentes muito diferentes) devem ser realizados testes prévios a comercialização do produto.



8.5.4.4 Estudo de estresse

O teste de estresse é usado para determinar a susceptibilidade de um material à degradação causada por condições elevadas de temperatura, umidade, luz, condições ácidas ou básicas e/ou substâncias oxidantes ou redutoras.

Um procedimento comum é armazenar o material em recipientes abertos sob uma variedade de regimes de temperatura e umidade, por exemplo, com aumento de temperatura em incrementos de 10°C acima de 40°C e aumento da umidade acima de 75% de umidade relativa. Este tipo de teste é chamado de estudo de "prato aberto" e serve como o pior caso porque o recipiente aberto fornece pouca ou nenhuma proteção do meio ambiente.

Outro procedimento comum é armazenar porções do material em solução ou suspensão em uma ampla gama de valores de pH, ou combinados com uma variedade de substâncias oxidantes ou redutoras conhecidas para avaliar os efeitos de ácidos, bases, oxidantes e redutores no material.

O teste de estresse normalmente é realizado em curtos períodos variando de dias a algumas semanas. O teste de estresse é normalmente realizado em ingredientes, ao invés do produto acabado, e é útil para decidir a melhor forma de formular, embalar e rotular produtos contendo o ingrediente testado.

O teste de estresse normalmente não produz resultados que podem ser extrapolados para estabelecer uma validade adequada para o produto acabado, exceto nos casos em que as instruções de formulação, embalagem e armazenamento do produto sejam escolhidas para garantir que todas as fontes de degradação identificadas durante o teste de estresse serão estritamente evitadas.

8.5.4.5 Estudo de uso

Os estudos de uso são úteis para avaliar, por exemplo, a estabilidade de um alimento em embalagem de dose múltipla após a sua abertura. A abertura e o fechamento repetidos da embalagem aumentam a exposição do alimento ao oxigênio, à umidade e aos micro-organismos que podem causar alterações importantes durante o intervalo de tempo em que o produto está sendo usado.

Recomenda-se que pelo menos dois lotes sejam estudados, sendo um testado no fim de seu prazo de validade. Se o produto for vendido em diferentes concentrações ou tamanhos de embalagens, o estudo deve ser realizado na configuração da embalagem em que mudanças mais significativas são mais prováveis, como por exemplo, na maior embalagem de uma gama de tamanhos disponíveis.



O estudo destina-se a simular as condições reais de uso do produto, incluindo as condições ambientais normais de armazenamento, a redução contínua no nível de enchimento durante o uso e qualquer diluição ou reconstituição que ocorra antes do uso. As especificações físicas, químicas, microbiológicas ou outras adequadas são examinadas no início e no final do uso, bem como em pontos de tempo intermediários apropriados.

Quando é esperado ou se sabe que o produto é suscetível ao crescimento microbiológico, é aconselhável também realizar testes de desafio microbiológico utilizando micro-organismos contaminantes em potencial.

Cabe ressaltar a relevância dos estudos de uso para alimentos administrados via sonda (tubos), nomeadamente as fórmulas enterais. Para esses produtos, é necessário que o fabricante realize testes para garantir que recomendações precisas para administração das fórmulas sejam adequadamente fornecidas aos interessados. Dentre outros, devem ser realizados testes sobre a forma de preparação, o tempo máximo de uso permitido e a forma de acondicionamento da fórmula após preparação, além dos cuidados a serem adotados no momento de administração da dieta, tal como agitação do frasco, retirada do volume a ser administrado e estabilidade física, química e microbiológica.

Ademais, para o planejamento do estudo deve ser considerada a taxa de infusão da fórmula, que depende da tolerância do paciente. Além disso, recomenda-se que o teste seja realizado em sonda com escoamento gravitacional e com baixa taxa de infusão, pois representam o pior caso. A utilização de bombas de alimentação pode não ser representativa da realidade, visto que na prática estes equipamentos podem não estar disponíveis no local onde serão administrados estes produtos.

Recomenda-se a realização de dois ensaios em temperatura ambiente: um com a válvula da sonda totalmente aberta, com a finalidade de observar possíveis entupimentos, paradas, formação de grumos ou incrustações que dificultem ou impossibilitem a administração via tubo; e outro com a válvula parcialmente aberta (gotejamento), a fim de simular as condições de administração, com base na taxa de infusão. Recomenda-se que os ensaios sejam repetidos pelo menos nos tempos inicial e final da validade do produto, de maneira a garantir que este seja adequado para escoamento em tubo durante toda a vida de prateleira.

Alternativamente, para a realização de testes de uso, podem ser utilizados protocolos da prática clínica publicados em referências nacionais ou internacionais. No entanto, a simples mensuração de parâmetros reológicos do fluido (por exemplo, viscosidade), como indicativo de que o produto está apto para escoamento em tubo não é uma prática aceitável. Isto porque existem diversas variáveis que afetam o escoamento de um fluido, como o comportamento viscoelástico, a temperatura, a



diferença de pressão entre as extremidades, o material do tubo etc. Além disso, esta abordagem não possibilita a observação da formação de grumos e entupimentos, fatores que podem inviabilizar a administração via tubo e ocasionar complicações clínicas no estado de saúde do paciente.

8.5.4.6 Estudo de transporte

O estudo de transporte ou teste de excursão investiga os possíveis efeitos das condições ambientais introduzidas durante a distribuição e transporte no produto. Este estudo é particularmente importante nas situações em que o alimento será transportado de um continente ao outro.

Um estudo de transporte visa simular as condições extremas, como temperatura e umidade, que o produto deve encontrar no momento da distribuição. As temperaturas ambientes e as umidades dos países e regiões para os quais, e através dos quais, o produto é transportado devem ser levadas em consideração.

O estudo de transporte usa os procedimentos normais de teste de estabilidade, mas com o ciclo das condições ambientais para simular as condições de distribuição o mais próximo possível.

8.5.5 Avaliação dos dados do estudo de estabilidade

A validade de um produto é determinada pela estabilidade do ingrediente mais instável no contexto da formulação selecionada, a embalagem utilizada e as condições de armazenamento previstas.

Um dos elementos mais importantes de um estudo de estabilidade é a avaliação científica dos dados gerados pelo estudo, utilizando técnicas estatísticas aplicáveis.

8.5.5.1 Análises dos dados de estabilidade

O protocolo do estudo de estabilidade deve ser desenhado de forma a fornecer dados no formato e quantidade que permitam uma análise estatística realista. Isso exige que se adote uma abordagem sistemática na apresentação e avaliação da informação derivada do estudo. A totalidade da informação deve ser considerada e deve incluir, quando apropriado, resultados de testes físicos, químicos e microbiológicos, incluindo testes relacionados a atributos particulares da forma do alimento.

Os dados gerados a partir dos estudos devem ser avaliados para determinar os atributos críticos que podem influenciar a qualidade do produto durante a validade prevista. Cada atributo deve ser avaliado separadamente e, em seguida, uma avaliação



geral de todos os dados deve ser realizada antes da definição do prazo de validade. A validade proposta não deve exceder a prevista para qualquer atributo.

8.5.5.2 Extrapolação dos dados de estabilidade

A extrapolação é a prática de usar dados conhecidos para prever ou inferir dados futuros, particularmente em termos de tendências.

O princípio da extrapolação constitui a base do estudo acelerado, na medida em que os dados obtidos a partir de um teste de 3 ou 6 meses são usados para prever o comportamento do produto ao longo de dois ou três anos.

A extrapolação de dados de estabilidade pode ser apropriada para o produto dependendo da extensão da informação disponível sobre o padrão de mudança no mesmo, do modelo matemático e a existência de dados de suporte relevantes (por exemplo, a partir de estudos sobre produtos similares ou da literatura científica).

Uma extrapolação pressupõe que todos os padrões de mudança identificados nos estudos acelerados continuarão a ser aplicados até o final da validade prevista, desde que as condições externas (temperatura, umidade, oxigênio, luz etc.) permaneçam dentro de um intervalo aceitável.

Um prazo de validade definido com base na extrapolação de dados deve sempre ser verificado por dados adicionais de estabilidade de longo prazo, assim que tais dados estejam disponíveis.

8.6 Protocolos de estudos de estabilidade baseados em questões de saúde

O objetivo de um estudo de estabilidade de longa duração é simular as condições às quais o produto, em circunstâncias normais, será submetido entre a fabricação e a venda no varejo, considerando que a embalagem se mantém íntegra ao longo desse período. Os dados obtidos no estudo permitem que o fabricante defina ou confirme o prazo de validade do produto. Os protocolos de estudos de estabilidade de longa duração devem prever que o estudo tenha duração de, no mínimo, a validade prevista para o produto ou, preferencialmente, por um tempo maior que a validade prevista.

O objetivo de um estudo de estabilidade acelerado é sujeitar o produto ao estresse sob a forma de alta temperatura e alta umidade, de modo a induzir potenciais reações e interações em um curto intervalo de tempo. Com estudos acelerados, uma série de premissas devem ser levantadas a partir dos dados disponíveis, que são limitados. As condições de armazenamento a serem utilizadas para o estudo devem refletir as condições de temperatura e umidade em todos os mercados pretendidos.



Por exemplo, para o mercado do norte da Europa, a temperatura ambiente aceita para fins do estudo é de 25°C e uma umidade ambiente de 60%. Para os mercados de climas tropicais, e particularmente aqueles em que uma grande proporção de lojas de varejo não tem armazenamento com ar condicionado, temperatura e umidade devem ser aumentadas para representar as condições ambientais mais altas. No Brasil, que possui clima considerado quente e muito úmido, a temperatura recomendada para os estudos de estabilidade de longa duração é de 30°C e 75% de umidade (zona IVb).

Como regra geral, quanto maior a temperatura ambiente ao qual o produto está exposto, menor o prazo de validade em potencial. No entanto, não se pode presumir que existe uma relação linear entre a temperatura e a validade de um produto. No caso de produtos multivitamínicos, por exemplo, algumas vitaminas apresentam diferentes padrões de degradação.

8.6.1.1 Desenvolvimento dos protocolos

Existem vários protocolos reconhecidos internacionalmente para a realização de estudos de estabilidade. No entanto, muitos deles têm suas origens na indústria de medicamentos e têm objetivos e requisitos diferentes do que aqueles para alimentos. Recomenda-se que o protocolo do estudo de estabilidade seja definido antes do início do estudo e detalhe, entre outras, as informações a seguir:

- Nome e endereço da empresa responsável pela execução do estudo;
- Nome, concentração e quantidade na embalagem de cada produto incluído no estudo;
- Tipo, tamanho e composição de cada embalagem e sistema de fechamento;
- Número total de frascos do produto necessários para cada tamanho de embalagem para completar o estudo (incluindo amostras de reserva em caso de reteste);
- Procedimentos para confirmar a integridade da vedação da embalagem;
- Informação de que o alimento está sendo testado em embalagem equivalente e sistema de fechamento nos quais será comercializado;
- Formulação do produto;
- Número, tamanho e data de fabricação dos lotes incluídos;
- Data do início do estudo;



- Tamanho da amostra e intervalos de teste (por exemplo, frequência de teste de amostra) para cada atributo;
- Condições de armazenamento das amostras mantidas para teste;
- Parâmetros de teste;
- Critérios de aceitação/valores críticos;
- Uso de métodos de teste confiáveis, significativos e específicos. Os métodos devem ser verificados nas condições do laboratório e quando necessário, validados de acordo com a RDC 11/12;
- Método de avaliação dos dados, incluindo qualquer análise estatística utilizada para estabelecer a validade do produto.

Embora o local de armazenamento para realização de estudos de estabilidade possa ser de vários tipos e tamanhos, desde câmaras até salas, o local deve ser capaz de fornecer as condições de armazenamento (temperatura e umidade) controladas dentro dos intervalos especificados no protocolo para o estudo. O local de armazenamento deve ser qualificados em relação à uniformidade das condições de armazenamento em toda a sala ou câmara.

Deve ser providenciado o monitoramento da temperatura, umidade e, quando aplicável, níveis de luz ao longo do período de armazenamento. Esses registros devem ser mantidos e documentados.

Também devem ser desenvolvidos procedimentos para lidar com episódios inesperados, como falhas nos equipamentos ou falhas de energia, devendo-se estabelecer um tempo máximo permitido para uma falha. Todos esses episódios devem ser descritos no relatório do estudo e deve ser avaliado seu efeito potencial sobre o resultado do estudo.

O protocolo deve incluir requisitos e controles relacionados ao manuseio, armazenamento intermediário e ensaio das amostras de teste após a remoção da câmara/sala de armazenamento.

8.6.1.2 Antes da formulação do produto

A literatura científica contém informações importantes e dados sobre a estabilidade das vitaminas, tanto individualmente como em combinação com outras vitaminas, e sobre a estabilidade das vitaminas em diferentes matrizes de alimentos.



Essa informação pode ser útil para determinar potenciais sobredosagens (vide Anexo III).

Ao formular um novo produto, é importante que as interações potenciais entre os ingredientes sejam pesquisadas, pois podem ter um efeito muito significativo sobre a estabilidade e a vida útil de um produto (vide anexo II).

Nas situações em que é possível escolher entre diferentes formas de um ingrediente, como por exemplo, diferentes sais de um mesmo composto, é prudente investigar a estabilidade relativa dessas formas. Há uma série de artigos científicos disponíveis publicamente que discutem a estabilidade relativa das diferentes formas de ingredientes.

8.6.1.3 Antes dos testes de estabilidade no produto

A pesquisa de literatura pode auxiliar em dois aspectos principais no desenvolvimento de um protocolo de estudo de estabilidade:

- Nem todos os métodos de análise para os componentes em alimentos aplicam-se sem modificação em todas as matrizes dos produtos. O uso de um método analítico inapropriado pode invalidar os resultados de um estudo. Por exemplo, a modificação dos procedimentos de extração de vitaminas pode ser necessária para algumas matrizes de comprimidos.
- Os métodos estatísticos a serem utilizados para avaliar os resultados do estudo de estabilidade devem ser apropriados para o estudo que está sendo realizado.



9 ANEXOS

ANEXO I - Agrupamento e matrização

As técnicas de agrupamento e matrização foram desenvolvidas para permitir o uso de um plano de amostragem reduzido para estudos de determinação do prazo de validade sem prejudicar o valor científico do estudo.

Agrupamento

Agrupamento é um procedimento pelo qual o estudo é projetado de tal forma que somente os extremos dos parâmetros selecionados são testados em todos os pontos de tempo.

É um procedimento adequado para a avaliação da estabilidade de diferentes potências de um ingrediente em uma matriz de alimento, ou onde o mesmo produto será comercializado em diferentes tamanhos de embalagens ou mesmo diferentes quantidades em embalagem do mesmo tamanho.

O agrupamento não é apropriado se as amostras a serem testadas não representam os extremos.

Uso de agrupamento para formulações semelhantes

O agrupamento pode ser potencialmente utilizado em estudos de alimentos com formulações bastante semelhantes, tais como aquelas em que as diferenças se relacionam apenas com componentes menos relevantes, como corantes e aromatizantes. O uso de agrupamento é inadequado se as diferenças de formulação forem significativas, por exemplo, diferentes ingredientes ou aditivos ou proporções dos componentes muito diferentes.

A Tabela 2 mostra um exemplo de agrupamento para um estudo sobre um comprimido de vitamina C com as seguintes informações:

- Será comercializado em três potências: 100mg, 250mg e 500mg;
- As três potências possuem uma matriz de mesmos ingredientes e aditivos;
- As três potências serão destinadas a serem comercializadas em três tamanhos de embalagem de 30, 60 e 120 comprimidos.



Neste exemplo, apenas os extremos de cada parâmetro podem ser testados, reduzindo assim os requisitos de teste de um potencial de nove amostras para apenas quatro amostras.

Tabela 2. Exemplo de agrupamento para um estudo com comprimidos de vitamina C.

Quantidade de comprimidos no	Conteúdo de vitamina C		
	100mg	250mg	500mg
30	T		T
60			
120	T		T

Uso de agrupamento para avaliar sistemas de embalagem e selagem

O agrupamento é uma ferramenta útil para avaliar a estabilidade de um produto em diferentes embalagens e sistemas de selagem, particularmente onde o tamanho e preenchimento da embalagem podem variar.

A fim de avaliar o efeito sobre a estabilidade de diferentes embalagens ou sistemas de selagem, devem ser selecionados os extremos das seguintes características:

- Relação entre a área da superfície e o volume do frasco;
- Relação entre o espaço livre e o volume do frasco;
- Existência de atmosfera modificada para preenchimento do espaço livre;
- Espaço livre por forma (por exemplo, mL/comprimido ou mL/cápsula gelatinosa mole);
- Composição do frasco e espessura da parede;
- Taxa de permeação do vapor de água;
- Taxa de permeação do oxigênio;
- Geometria de fechamento e integridade.

Matrização

A matrização é definida como o projeto de um estudo de estabilidade, de tal forma que um subconjunto selecionado do número total de amostras possíveis seria



testado para parâmetros relevantes em um ponto de tempo específico. No ponto de tempo subsequente, outro subconjunto de amostras de todas as combinações de fatores seria testado.

A matrização pressupõe que a estabilidade de cada subconjunto de amostras testadas adequadamente representa a estabilidade de todas as amostras em um determinado ponto de tempo.

Aplicação e desenho da matrização

Para o uso efetivo da matrização, as diferentes potências do produto devem:

- Ter formulações idênticas ou intimamente relacionadas;
- Ser de lotes fabricados com o mesmo processo e equipamentos; e
- Ser embalado com o mesmo tamanho de frasco e com o mesmo sistema de envase e fechamento.

O desenho de uma matrização deve ser tal que cada combinação de parâmetros seja testada na mesma extensão ao longo da duração do estudo. Os valores de ponto inicial e final devem ser obtidos para todas as amostras para todos os parâmetros que estão sendo testados.

Outros fatores a considerar

Ao aplicar uma redução na amostragem através da matrização, uma série de fatores devem ser considerados, incluindo:

- A estabilidade esperada do produto;
- Conhecimento prévio da variabilidade dos dados;
- Possíveis diferenças de estabilidade no produto; e
- A disponibilidade de dados de suporte.

Estudos acelerados

Além da consideração dos fatores acima, para permitir uma análise válida dos dados de estabilidade, pelo menos três pontos de tempo são necessários para estudos acelerados. O desenho da matrização deve permitir a detecção de diferenças de estabilidade dentro dos parâmetros e entre os parâmetros.



Quando considerar o uso da matrização

A matrização pode potencialmente ser considerada se os dados de suporte, conforme descrito acima, indicam uma provável estabilidade do produto e pouca variabilidade.

A matrização não deve ser considerada se os dados de suporte indicarem a possibilidade de grandes variabilidades.

Além disso, quando a matrização é aplicada, a redução na quantidade de testes quando comparada com um estudo completo, depende do número de parâmetros e combinações de parâmetros que estão sendo avaliados.

A matrização é mais aplicável aos estudos de estabilidade de longa duração e pode resultar em uma redução de um terço até a metade da quantidade de testes.

A Tabela 3 mostra um exemplo de um plano de matrização em que apenas três ou quatro dos seis pontos de tempo do segundo ao penúltimo ponto são testados. Em todos os casos, todas as amostras devem ser testadas nos primeiros e últimos pontos de tempo.

Tabela 3. Exemplo de matrização com os tempos para um produto de vitamina C com duas potências.

Tempos (meses)		0	3	6	9	12	18	24	36	
Potências dos produtos	100mg	Lote	T	T		T	T		T	T
		Lote	T	T		T	T	T		T
		Lote	T		T		T	T		T
	250mg	Lote	T		T		T		T	T
		Lote	T	T		T	T	T		T
		Lote	T		T		T		T	T

Cuidados

Embora o agrupamento e a matrização permitam a economia de custos pela redução do número de testes analíticos realizados, eles também possuem limitações.

Por exemplo, um resultado insatisfatório ou uma indicação de baixa estabilidade em uma ou mais condições ou pontos de tempo podem colocar em dúvida a validade do estudo reduzido. Nesses casos, todo o estudo pode ter que ser reexecutado, levando a atrasos e custos significativos.



Como precaução contra tal eventualidade, é possível trabalhar com um protocolo em que se armazena amostras para um estudo completo, mas somente os testes identificados no plano de amostragem do agrupamento/matrização são realizados inicialmente. As amostras intermediárias que não são testadas devem ser removidas do armazenamento controlado de temperatura/umidade no ponto de tempo relevante e armazenadas a cerca de 0°C até a conclusão do estudo.

O agrupamento e seu procedimento complementar, matrização, são procedimentos reconhecidos internacionalmente para reduzir o plano de amostragem nos estudos de estabilidade.

Diferentemente de um protocolo completo de estudo de estabilidade, em que as amostras para cada combinação de todos os fatores são testadas em todos os pontos de tempo, um protocolo reduzido permite a redução desses testes, podendo ser uma alternativa válida quando corretamente desenhado, possuindo a capacidade de fornecer dados para prever adequadamente a validade do produto.



ANEXO II - Interações químicas das vitaminas que podem afetar a estabilidade

Abaixo estão descritos alguns exemplos bem estabelecidos de interações de vitaminas com outras vitaminas, minerais ou conservantes que podem afetar a estabilidade dos alimentos. A lista não é exaustiva e outras interações podem surgir com maior conhecimento ao longo do tempo.

Algumas interações que foram observadas em estudos experimentais, mas que não foram verificadas em produtos finais também foram incluídas.

i) Vitamina – Interações entre vitaminas

- **Ácido ascórbico e folato:** a clivagem de moléculas de ácido fólico pode ocorrer em alimentos líquidos, onde o ácido ascórbico também está presente. Isso é devido ao efeito redutor do ácido ascórbico. Esse efeito é mais rápido na faixa de pH 3,0 - 3,3 e mais lento a pH 6,5 - 6,7.
- **Ácido ascórbico e vitamina B12:** a vitamina B12 (como cianocobalamina) mostrou-se instável na presença de ácido ascórbico em solução aquosa. A instabilidade mostrou-se dependente do pH.
- **Tiamina e ácido fólico:** a estabilidade do ácido fólico pode ser significativamente afetada na presença de tiamina, particularmente em soluções na faixa de pH de 5,9 a 7,0. Verificou-se também que a decomposição de tiamina em soluções pode afetar a taxa de degradação do ácido fólico, que é acelerada na presença dos produtos de degradação da tiamina, particularmente o sulfeto de hidrogênio.
- **Tiamina e vitamina B12:** a decomposição de tiamina pode aumentar a taxa de degradação da cianocobalamina devido a substâncias formadas durante a clivagem da tiamina.
- **Riboflavina e Tiamina:** a riboflavina pode exercer uma ação oxidativa sobre a tiamina, levando à formação e precipitação do tiocromo. Essa reação parece ser específica para soluções contendo as vitaminas B e não é vista em soluções que contenham riboflavina, tiamina e ácido ascórbico.
- **Riboflavina e ácido fólico:** a estabilidade do ácido fólico pode ser afetada pelas ações combinadas da riboflavina e da luz, que podem produzir uma reação oxidativa que resulta na clivagem do ácido fólico. Esse efeito ocorre mais rapidamente a pH 6,5 e pode ser reduzido, mas não eliminado, por desaeração.



- Riboflavina e ácido ascórbico: a oxidação do ácido ascórbico exposto à luz pode ser catalisada pela presença de riboflavina, que atua como um receptor de energia luminosa.
- Riboflavina e Niacinamida: Embora não seja tão aplicável à estabilidade, observou-se que a presença de niacinamida em concentrações superiores a 1% em solução aquosa pode aumentar a solubilidade da riboflavina. Isto é possivelmente devido à formação de um complexo entre as duas vitaminas.
- Niacinamida e ácido ascórbico: um complexo de niacinamida-ácido ascórbico, contendo uma molécula de cada, forma-se prontamente em solução pelo que parece ser uma reação de transferência de carga. A pré-formação deste complexo pode evitar dificuldades com o espessamento e endurecimento das misturas empregadas em cápsulas gelatinosas moles.
- Niacinamida e Ácido Fólico: Embora não seja tão aplicável à estabilidade, observou-se que a niacinamida atua como solubilizante do ácido fólico. Uma solução a 10% de niacinamida pode manter uma concentração de 5 mg/ml de ácido fólico a um pH 5,6, enquanto a solubilidade normal do ácido fólico a pH 6,0 é de 2 mg/ml.

ii) Interações Vitamina – Sal Mineral

- Ácido ascórbico e íons metálicos: traços de uma série de íons metálicos podem catalisar a degradação do ácido ascórbico. Estudos demonstraram que a ordem de eficácia dos íons metálicos principais é $Cu^{+2} > Fe^{+2} > Zn^{+2}$ e que a presença de íons de cobre a 0,85ppm (mg/kg) foi suficiente para catalisar a oxidação do ácido ascórbico.
- Ácido ascórbico e sais de ferro: a presença de ácido ascórbico e sais de ferro em formulações de comprimidos e cápsulas pode resultar em manchas pretas aparecendo no produto. Isso pode ser evitado com o revestimento da fonte de ferro.
- Retinol e traços de minerais: A oxidação do retinol e seus ésteres é catalisada pela presença de traços de minerais nas formulações.
- Tiamina e íons de cobre: a estabilidade da tiamina pode ser prejudicada pela presença de íons de cobre. Isso parece ocorrer principalmente quando o cobre é capaz de formar ânions complexos com outros constituintes da matriz.



iii) Interações vitamina - conservantes

- Tiamina e sulfitos: a tiamina é muito sensível aos sulfitos e bisulfitos, que clivam a tiamina. A presença de sulfitos em xarope de glicose, glicose em pó e sucos de frutas ou concentrados utilizados como aromatizantes pode ser suficiente para que essa reação ocorra.
- Ácido ascórbico e benzoatos: a presença de ácido ascórbico e benzoatos em produtos líquidos pode resultar na produção de benzeno, substância de alta toxicidade.

iv) Outras interações vitamínicas observadas em estudos experimentais

- Niacinamida, Riboflavina-5'-fosfato sódico e ácido ascórbico: Niacinamida adicionada a uma solução de riboflavina-5'-fosfato sódico e ácido ascórbico aumentou significativamente a perda de riboflavina-5'-fosfato durante a fotólise, enquanto o triptofano adicionado estabilizou as duas vitaminas.
- Piridoxal-5-fosfato e tiamina, difosfato de tiamina, riboflavina-5-fosfato, cobamamida, piridoxal ou piridoxina: a estabilidade do piridoxal-5-fosfato é pobre a pH 6 em solução aquosa. Um aumento da taxa de degradação pode ser causado por tiamina, difosfato de tiamina, riboflavina-5-fosfato, cobamamida, piridoxal ou piridoxina.
- Ergocalciferol e ácido ascórbico, ácido fólico, cloridrato de tiamina ou Cloridrato de piridoxina: o Ergocalciferol em preparações em pó pode ser facilmente isomerizado por ácido ascórbico, ácido fólico, cloridrato de tiamina ou cloridrato de piridoxina.



ALIMENTOS - GUIA n. 16, versão 1, de 5 de outubro de 2018

ANEXO III - Comparação da estabilidade de vitaminas

Abaixo estão alguns exemplos de como fatores diferentes podem afetar a estabilidade das 13 vitaminas reconhecidas e do betacaroteno. Em alguns casos, um fator pode influenciar o efeito de outro. O grau de influência dos diferentes fatores dependerá da matriz do produto.

	Temperatura	Luz (UV)	Oxigênio atmosférico	Umidade	pH < 7	pH > 7	Agentes oxidantes	Agentes redutores	Íons metálicos	Radiação Ionizante	Informação adicional
Vitamina A	◆◆	◆◆◆	◆◆	◆	◆◆	◆	◆◆◆	◆	◆	◆	Suscetível à isomerização
Betacaroteno		◆	◆		◆						
Vitamina D	◆◆	◆◆◆	◆	◆	◆◆	◆◆	◆◆◆	◆			Suscetível à isomerização
Vitamina E	◆◆	◆◆		◆	◆	◆◆	◆◆	◆		◆	Ésteres da vitamina bem estáveis
Vitamina K	◆	◆◆	◆	◆	◆	◆◆◆	◆◆	◆		◆	Suscetível à isomerização
Vitamina C	◆◆	◆◆	◆	◆◆	◆◆◆	◆◆◆	◆◆◆	◆	Cu e Fe		Instável em soluções com oxigênio
Tiamina (Vitamina B1)	◆◆◆	◆◆		◆◆	◆	◆◆◆	◆	◆		◆	Quebrado por sulfitos
Riboflavina (Vitamina B2)	◆	◆◆◆		◆	◆	◆◆◆	◆	◆◆			
Niacina	◆	◆		◆	◆	◆	◆	◆◆			Normalmente bastante estável
Vitamina B6	◆	◆◆		◆	◆◆	◆◆	◆	◆			
Ácido fólico	◆	◆◆		◆	◆◆	◆◆	◆◆◆	◆◆◆			
Vitamina B12	◆	◆◆		◆◆	◆◆◆	◆◆◆	◆	◆◆◆			
Biotina	◆	◆		◆	◆◆	◆◆	◆	◆	◆◆	◆	Inativado por avidina
Ácido pantotênico	◆◆	◆		◆◆	◆◆◆	◆◆◆	◆	◆			Ácido pantotênico livre é bastante instável

Legenda: ◆ levemente sensível; ◆◆ sensível; ◆◆◆ altamente sensível



ANEXO IV - Análises preditivas dos dados de estabilidade

Os dados gerados a partir dos estudos de estabilidade devem ser efetivamente avaliados. Ao longo dos anos, uma série de modelos estatísticos e cinéticos foram desenvolvidos, e o mais utilizado é baseado na equação de Arrhenius.

Em termos de físico-química, a degradação da maioria das vitaminas e uma série de outros ingredientes orgânicos comumente encontrados em alimentos seguem a cinética de "primeira ordem" ou "ordem zero". Como consequência, o modelo clássico de Arrhenius pode ser utilizado, o que permite que as previsões sejam feitas para a validade e sobredosagem de um produto. Estas previsões devem basear-se nos seguintes pressupostos:

- Que o modelo é válido para todas as reações estudadas;
- O mesmo mecanismo de reação ocorre na faixa de temperatura do estudo;
- A energia de ativação está em um intervalo definido; e
- Que os efeitos da umidade à temperatura ambiente sejam equivalentes a manter umidade relativa nas temperaturas mais elevadas.

Há uma série de softwares disponíveis que se baseiam na equação de Arrhenius e que ajudam a simplificar os procedimentos para a previsão de validade e estimativa de sobredosagem. Pode ser necessária uma discussão com a empresa fabricante do software para garantir que o programa selecionado seja adequado para os requisitos de estabilidade específicos da análise preditiva.



10 GLOSSÁRIO

Agente de redução - um elemento ou composto que perde (ou doa) um elétron para outra espécie química em uma reação química de oxirredução. Também chamado de redutor.

Alimento - toda substância ou mistura de substâncias, no estado sólido, líquido, pastoso ou qualquer outra forma adequada, destinadas a fornecer ao organismo humano os elementos normais à sua formação, manutenção e desenvolvimento.

Alimento estável - alimento que, devido à sua composição (baixo teor de umidade, alto teor de sal ou açúcar), não precisa ser armazenado sob refrigeração ou alimento que normalmente seria armazenado refrigerado, mas que foi processado para que possa ser armazenado de forma segura em recipiente selado à temperatura ambiente, possuindo prazo de validade longo.

Alimento perecível - É o alimento não processado ou processado que tem um curto prazo de validade à temperatura ambiente e que apresenta sinais de deterioração (muitas vezes o mofo ou crescimento bacteriano visíveis a olho nu), tais como pães pré-embalados.

Alimento refrigerado - alimento que requer armazenamento a 10°C ou menos para manter sua adequação e segurança.

Alimento semi-pronto ou pronto para o consumo - conforme definição da Resolução RDC n. 273, de 22 de setembro de 2005, é o alimento preparado ou pré-cozido ou cozido, que para o seu consumo não necessita da adição de outro(s) ingrediente(s). Pode requerer aquecimento ou cozimento complementar.

Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) - metodologia sistemática de identificação, avaliação e controle de perigos de contaminação dos alimentos.

Atividade da água - é a relação entre a pressão de vapor de água de um alimento e a pressão de vapor da água pura à mesma temperatura. No contexto de alimentos, a atividade da água é uma medida da propensão ao crescimento microbológico e às reações químicas. Quanto maior a atividade da água, mais instável o produto.

Auto-oxidação (de um ingrediente) - oxidação espontânea de um ingrediente à temperatura ambiente na presença de oxigênio.

Características/propriedades organolépticas - relacionadas com as qualidades sensoriais de uma substância, como sabor, odor, textura e cor.

Desintegração - o tempo necessário para um comprimido se quebrar em partículas de um tamanho especificado (ou menor) em uma solução sob condições específicas cuidadosamente controladas.



Dissolução - um processo pelo qual uma substância sólida como uma cápsula ou comprimido se dissolve no solvente para produzir uma solução. O tempo de dissolução é o tempo necessário para conseguir a dissolução sob determinadas condições controladas.

Embalagem - todas as operações, incluindo envase, selagem e rotulagem, que um produto a granel deve sofrer para se tornar um produto acabado.

Estabilidade - capacidade de uma substância permanecer inalterada ao longo do tempo sob as condições declaradas ou razoavelmente esperadas de armazenamento e uso.

Equação de Arrhenius – equação que relaciona a constante de velocidade de uma reação química com a temperatura. Dada pela expressão:

$$k = Ae^{\frac{-E_a}{RT}}$$

Onde k = constante de velocidade; A = constante pré-exponencial; Ea = energia de ativação; R = constante dos gases; T = temperatura.

Fabricação - o ciclo completo de produção e controle de qualidade de um alimento, incluindo a aquisição de todos os ingredientes e todas as etapas subsequentes de processamento, embalagem e armazenamento para a distribuição ou liberação do produto acabado.

Fabricante - pessoa ou empresa envolvida na fabricação de um produto acabado.

Higroscopia/higroscopicidade - a capacidade de uma substância para atrair e manter moléculas de água do ambiente circundante por absorção ou adsorção.

Homogeneidade - uniformidade em toda a sua estrutura ou composição. Quando aplicado a etapa de mistura, todas as partes de uma mistura contendo vários componentes devem ter a mesma composição.

Lote - uma quantidade de um alimento produzido durante um determinado ciclo de fabricação e de uma ordem de produção específica, com caracterização e qualidade uniformes (a essência de um lote de fabricação é a sua homogeneidade).

Material de embalagem - qualquer material, incluindo material impresso, empregado na embalagem de um alimento, tais como frascos, sacos, rótulos, selos, adesivos e fitas.

Micro-organismos - incluem fungos, leveduras e bactérias. As bactérias incluem patógenos e organismos de deterioração, bactérias formadoras de esporos e aquelas que podem causar intoxicação alimentar através da produção de toxinas.



Picklagem - processo de obtenção de pickles. Pickles são legumes, hortaliças ou frutas conservados em salmoura ou em vinagre, com ou sem fermentação láctica e com ou sem adição de açúcar ou especiarias.

Potência - no contexto de alimentos, a atividade mensurável de uma substância com efeito nutricional ou fisiológico em um peso/dose definida de um produto.

Prazo de validade - é o intervalo de tempo durante o qual o alimento permanece seguro e adequado ao consumo, desde que armazenado em embalagens intactas e de acordo com as condições estabelecidas pelo fabricante.

Produto acabado - um alimento que passou por todas as fases de fabricação.

Sobredose - quantidade de uma substância acima da declarada no rótulo que é adicionada ao alimento durante a fabricação para cobrir perdas que podem ocorrer por degradação durante o processamento e armazenamento do produto.

Suplemento alimentar: produto para ingestão oral, apresentado em formas farmacêuticas, destinado a suplementar a alimentação de indivíduos saudáveis com nutrientes, substâncias bioativas, enzimas ou probióticos, isolados ou combinados.

Termocinética (de um ingrediente) - estudo das taxas e tipos de reações durante a decomposição térmica de uma substância.

Teste de desafio microbiológico - método microbiológico padrão, projetado para avaliar a eficácia de conservantes em alimentos.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA, Resolução da Diretoria Colegiada - RDC no 259, de 20 de setembro de 2002. Regulamento Técnico sobre Rotulagem de Alimentos Embalados, **Diário Oficial da União**, 2002.

ANVISA. Orientação de Serviço no 30, de 04 de maio de 2017. Determina os trâmites para elaboração e aprovação de Guias. **Boletim de Serviço Anvisa nº 19**, p. 3, 2017a.

ANVISA. Portaria no 31, de 13 de janeiro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico referente a Alimentos Adicionados de Nutrientes Essenciais, constante do anexo desta Portaria. **Diário Oficial da União**, 1998.

ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC no 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, 2001.

ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC no 360, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. **Diário Oficial da União**, p. 9, 7 nov. 2003.

ANVISA. Resolução RDC 243, de 26 de julho de 2018 - Dispõe sobre os requisitos sanitários dos suplementos alimentares. **Diário Oficial da União**, 2018.

ANVISA. Resolução RDC nº 11, de 16 de fevereiro de 2012. Dispõe sobre o funcionamento de laboratórios analíticos que realizam análises em produtos sujeitos à Vigilância Sanitária e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, p. 1–12, 2012.

ANVISA. Resolução RDC no 24, de 14 de junho de 2011. Dispõe sobre o registro de medicamentos específicos. **Diário Oficial da União**, 2011.

ANVISA. **Temas de alimentos da Agenda Regulatório 2017/2020 da Anvisa**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/2017-2020/alimentos>>. Acesso em: 13 jun. 2018b.

AUSTRALIA NEW ZEALAND FOOD AUTHORITY. **Date Marking User Guide to Standard 1.2.5 – Date Marking of Food**. Canberra: ANZFA, 2013.

BOYLSTON, T. D. Understanding and Measuring the Shelf Life of Food. **Journal of Food Quality**, v. 28, n. 4, p. 403–404, 2005.

BRASIL. Lei no 8.078, de 11 de setembro de 1990. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 1990.



CCMAS/CODEX. CAC/GL 28-1995: Food Control Laboratory Management: Recommendations. Rev.1-1997. **CODEX**, p. 1, 1997a.

CCMAS/CODEX. CAC/GL 54-2004: Guidelines on measurement uncertainty. **CODEX**, p. 1–8, 2004.

CCMAS/CODEX. CAC/GL 65-1997: Harmonized guidelines for internal quality control in analytical chemistry laboratories. **CODEX**, p. 1, 1997b.

Chemical deterioration and physical instability of food and beverages. **Eds. Skibsted L, Risbo J and Andersen M.** Woodhead Publishing, UK. 2010.

CODEX ALIMENTARIUS. Guidelines for the validation of food safety control measures CAC/GL 69-2008. **Codex**. p. 1–10, 2008.

COMISSÃO INTERMINISTERIAL DE SAÚDE E AGRICULTURA - CISA. Resolução CISA/MA/MS nº 10, de 31 de julho de 1984. Dispõe sobre instruções para conservação nas fases de transporte, comercialização e consumo dos alimentos perecíveis, industrializados ou beneficiados, acondicionados em embalagens. **Diário Oficial da União**, 1984.

CURIALE, M. S.; VESTERGAARD, E. M. Do You Need Microbial Challenge Testing. **Food Safety Magazine**, v. April/May, n. May 2001, p. 30–53, 2001.

Food and beverage stability and shelf life. **Ed. Kilcast D.** Woodhead Publishing, UK. 2011.

Food Shelf Life Stability: Chemical, Biochemical, and Microbiological Changes. Eds. Eskin M, **Robinson DS.** CRC Press, EUA. 2000.

Grimm W. 1986. Storage conditions for stability testing (Part 2). **Drugs Made in Germany**, 29:39–47

Grimm W. 1998. Extension of the International Conference on Harmonisation Tripartite Guidelines for stability testing of new drug substances and products to countries of Climatic Zones III and IV. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 24:313-325

IADSA - **The International Alliance of Dietary / Food Supplement Associations.** *Global Guide to Good Manufacturing Practice for Supplements*. 2011, Disponível em <[http://www.iadsa.org/images/userfiles/IADSA Global GMP Guide.pdf](http://www.iadsa.org/images/userfiles/IADSA%20Global%20GMP%20Guide.pdf)>. Acesso em: 17 jun. 2018.

IADSA. Stability Testing for the Shelf Life Determination of Supplements. **The International Alliance of Dietary / Food Supplement Associations**, p. 1–84, 2016.

IFT/FDA. Evaluation and Definition of Potentially Hazardous A Report of the Institute of Food Technologists. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, n. 223, 2001.



ILSI EUROPE. **Report Series: Validation and verification of HACCP**. Bruxelas: [s.n.].

International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) **Harmonised Tripartite Guideline: Evaluation for Stability Data (Q1E)**. 2003.

International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) **Harmonised Tripartite Guideline: Bracketing And Matrixing Designs For Stability Testing Of New Drug Substances And Products (Q1D)**. 2002.

International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) **Harmonised Tripartite Guideline: stability testing of new drug substances and products Q1A (R2)**, 2003.

ISO. ISO 22000: Food safety management systems — Requirements for any organization in the food chain. **International Standard**, p. 1–48, 2018.

ISO. ISO/IEC 17025: General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. **International Standard**, v. 2017, p. 1–36, 2017.

KEARSLEY, M. W. The shelf life of foods and beverages: Proceedings of the Fourth International Flavour Conference, Rhodes, Greece, 23–26 July 1985. **Developments in Food Science** 12. Edited by George Charalambous. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1986. xviii + 828 p. **Food Chemistry**, v. 26, n. 4, p. 316–317, 1 jan. 1987.

LABUZA, T. P. Application of chemical kinetics to deterioration of foods. **Journal of Chemical Education**, v. 61, n. 4, p. 348, abr. 1984.

LABUZA, T.; RIBOH, D. Theory and Application of Arrhenius Kinetics to The Prediction of Nutrient Losses in Food. **Journal of food Technology**, p. 66–74, 1982.

MICHIELS, Y.; PUYVELDE, P.; SELS, B. Barriers and Chemistry in a Bottle: Mechanisms in Today's Oxygen Barriers for Tomorrow's Materials. **Applied Sciences**, v. 7, n. 7, p. 665, 28 jun. 2017.

MPI. How to determine the shelf life of food - Guidance document. **Ministry for Primary Industries: a New Zealand Government Department**, p. 1–43, jun. 2016.

NSF STABILITY TESTING WORKING GROUP. **Stability Testing Guideline for Dietary Supplements**. Disponível em:
<http://www.nsf.org/newsroom_pdf/Stability_Testing_Dietary_Supplements.pdf>. Acesso em: 17 jun. 2018.



OLIVEIRA, G. S.; COSTA, J. M. C. DA; AFONSO, M. R. A. Caracterização e comportamento higroscópico do pó da polpa de cajá liofilizada. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 10, p. 1059–1064, 2014.

OMS. Annex 2 - Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products. **WHO Technical Report Series**, No. 953, p. 44, 2009.

OMS. Guidelines on good manufacturing practices: validation. Appendix 7: non-sterile process validation. **WHO Technical Report Series**, n° 992, n. Annex 3, p. 75–86, 2015.

OTTAWAY, P. B. Food fortification and supplementation: **Technological, safety and regulatory aspects**. [s.l.] CRC, 2008.

Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications Volume 1: **Understanding mechanisms of oxidation and antioxidant activity**. Eds. Decker EA, Elias RJ, McClements DJ. Woodhead Publishing, UK. 2010. ISBN: 978 1 84569 648 1.

PHIMOLSIRIPOL, Y.; SUPPAKUL, P. Techniques in Shelf Life Evaluation of Food Products. In: **Reference Module in Food Science**. [s.l.] Elsevier, 2016.

PORTER, W. R. Stability by Design. **Journal of Validation Technology**, v. 17, p. 82–96, 2011.

Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices, 2nd Edition. Lawless HT, Heymann H. Springer-Verlag, EUA. 2010.

Sensory Evaluation Techniques, Fourth Edition. Meilgaard MC, Carr BT, Civille GV. CRC Press, EUA. 2006.

Shelf Life Dating of Botanical Supplement Ingredients and Products. Ed. Eisner S. **The American Herbal Products Association**, EUA. 2011.

SHERAZ, M. A. et al. Photo, thermal and chemical degradation of riboflavin. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 10, p. 1999–2012, 2014.

Stability System. Arrhenius Equation: Effect of Temperature on Reaction. 2006, **ScienTek Documents on Stability Theory**, ScienTek Software, www.StabilitySystem.com

The Stability and Shelf-life of Food. Eds. Kilcast D and Subramaniam P. Woodhead Publishing Series in **Food Science, Technology and Nutrition**, n° 48. Woodhead Publishing.

The stability of vitamins in fortified foods and supplements. Berry Ottaway P. In **Food Fortification and Supplementation** Ed. Peter Berry Ottaway. CRC Press Ltd., USA. 2008. ISBN 978 1 42007 201 3.



THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. International union of pure and applied chemistry analytical, applied and clinical chemistry divisions interdivisional working party for harmonization of quality assurance schemes for analytical laboratories. **Pure and Applied Chemistry**, v. 67, n. 2, p. 331–343, 2004.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. The International Harmonized Protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 78, n. 1, p. 145–196, 1 jan. 2006.

THOMPSON, M.; WOOD, R. Harmonized guidelines for internal quality control in analytical chemistry laboratories (Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 67, n. 4, p. 649–666, 1 jan. 1995.

UNITED STATES AGENCY FOR INTERNATIONAL DEVELOPMENT. Accelerated Shelf Life Studies: Methods and Results Relating to New and Upgraded Food Aid Products. **Food Aid Quality Review Phase II Closeout Report**. 2016.

USP. <1225> Validation of compendial procedures. **The United States Pharmacopeia (USP)**, n. c, p. 778–782, 2011.

USP. <1226> Verification of Compendial Procedures. **The United States Pharmacopeia (USP)**, n. c, p. 2014–2015, 2015.

USP. <1671> The Application of Moisture Vapor Transmission Rates for Solid Oral Dosage Forms in Plastic Packaging Systems. In: **The United States Pharmacopeia (USP)**. [s.l: s.n.].

USP. <2040> Disintegration and Dissolution of Dietary Supplements. In: **The United States Pharmacopeia (USP)**. 41° ed. Rockville (EUA): **The United States Pharmacopeia**, 2018a. p. 8178–8185.