

**DIRECTIVA 93/28/CEE DA COMISSÃO**

de 4 de Junho de 1993

**que altera o anexo I da Terceira Directiva 72/199/CEE que estabelece métodos de análise comunitários para o controlo oficial dos alimentos para animais**

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Económica Europeia,

Tendo em conta a Directiva 70/373/CEE do Conselho, de 20 de Julho de 1970, relativa à introdução de modos de colheita de amostras e de métodos de análise comunitários para o controlo oficial dos alimentos para animais <sup>(1)</sup>, com a última redacção que lhe foi dada pelo Acto de Adesão de Espanha e de Portugal <sup>(2)</sup>, e, nomeadamente, o seu artigo 2º,

Considerando que a Terceira Directiva 72/199/CEE da Comissão, de 27 de Abril de 1972, que estabelece métodos de análise comunitários para o controlo oficial dos alimentos para animais <sup>(3)</sup>, com a última redacção que lhe foi dada pela Directiva 84/4/CEE <sup>(4)</sup>, fixa o método a utilizar na dosagem de proteína bruta;

Considerando que é conveniente adaptar esse método à evolução dos conhecimentos científicos e técnicos; que, em especial, é necessário atender às disposições da Directiva 80/1107/CEE do Conselho, de 27 de Novembro de 1980, relativa à protecção dos trabalhadores contra os riscos ligados à exposição a agentes químicos, físicos e biológicos durante o trabalho <sup>(5)</sup>, alterada pela Directiva 88/642/CEE <sup>(6)</sup>, e, nomeadamente, às medidas adoptadas para evitar a exposição ao mercúrio e seus compostos;

Considerando que, por conseguinte, é necessário suprimir o mercúrio e o óxido de mercúrio da lista dos catalizadores que podem ser utilizados na aplicação do método de dosagem da proteína bruta;

Considerando que as medidas previstas na presente directiva estão em conformidade com o parecer do Comité permanente dos alimentos para animais,

ADOPTOU A PRESENTE DIRECTIVA:

*Artigo 1º*

O anexo I da Directiva 72/199/CEE é alterado em conformidade com o anexo da presente directiva.

*Artigo 2º*

Os Estados-membros porão em vigor as disposições legislativas, regulamentares e administrativas necessárias para dar cumprimento ao disposto no artigo 1º o mais tardar em 1 de Julho de 1994. Do facto informarão imediatamente a Comissão.

Sempre que os Estados-membros adoptarem tais disposições, estas devem incluir uma referência à presente directiva ou ser acompanhadas dessa referência aquando da sua publicação oficial. As modalidades dessa referência serão adoptadas pelos Estados-membros.

*Artigo 3º*

Os Estados-membros são os destinatários da presente directiva.

Feito em Bruxelas, em 4 de Junho de 1993.

*Pela Comissão*

René STEICHEN

*Membro da Comissão*

<sup>(1)</sup> JO nº L 170 de 3. 8. 1970, p. 2.

<sup>(2)</sup> JO nº L 302 de 15. 11. 1985, p. 23.

<sup>(3)</sup> JO nº L 123 de 29. 5. 1972, p. 6.

<sup>(4)</sup> JO nº L 15 de 18. 1. 1984, p. 28.

<sup>(5)</sup> JO nº L 327 de 3. 12. 1980, p. 8.

<sup>(6)</sup> JO nº L 356 de 24. 12. 1988, p. 74.

## ANEXO

O ponto 2 do anexo I « DETERMINAÇÃO DE TEOR DE PROTEÍNA BRUTA » passa a ter a seguinte redacção :

**2. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNA BRUTA****1. Objectivo e campo de aplicação**

O presente método permite determinar o teor de proteína bruta dos alimentos para animais com base no teor de azoto, determinado pelo método de Kjeldahl.

**2. Princípio**

A amostra é digerida com ácido sulfúrico, na presença de um catalisador. A solução ácida é tornada alcalina por adição de uma solução de hidróxido de sódio. A amónia é destilada e recolhida numa quantidade determinada de ácido sulfúrico, cujo excesso é titulado com uma solução-padrão de hidróxido de sódio.

**3. Reagentes**

- 3.1. Sulfato de potássio.
- 3.2. Catalisador : óxido de cobre (II), CuO, ou sulfato de cobre (II) penta-hidratado,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .
- 3.3. Zinco granulado.
- 3.4. Ácido sulfúrico,  $\rho_{20} = 1,84 \text{ g/ml}$ .
- 3.5. Ácido sulfúrico,  $c(\frac{1}{2}\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,5 \text{ mol/l}$ .
- 3.6. Ácido sulfúrico,  $c(\frac{1}{2}\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,1 \text{ mol/l}$ .
- 3.7. Indicador de vermelho de metilo : dissolver 300 mg de vermelho de metilo em 100 ml de etanol,  $\sigma = 95-96 \%$  (v/v).
- 3.8. Solução de hidróxido de sódio (pode-se utilizar uma solução de pureza técnica),  $\delta = 40 \text{ g/100 ml}$  (m/v : 40 %).
- 3.9. Solução de hidróxido de sódio,  $c = 0,25 \text{ mol/l}$ .
- 3.10. Solução de hidróxido de sódio,  $c = 0,1 \text{ mol/l}$ .
- 3.11. Pedra-pomes finamente fragmentada, lavada em ácido clorídrico e inflamada.
- 3.12. Acetanilida (p.f. = 114 °C, N = 10,36 %).
- 3.13. Sacarose (isenta de azoto).

**4. Equipamento**

Aparelho adequado para efectuar a digestão, destilação e titulação pelo método de Kjeldahl.

**5. Procedimento****5.1. Digestão**

Pesar 1 grama de amostra com aproximação de  $\pm 0,001$  grama e transferir para o recipiente do aparelho de digestão. Adicionar 15 gramas de sulfato de potássio (3.1), uma quantidade adequada de catalisador (3.2) [0,3 a 0,4 grama de óxido de cobre (II) ou 0,9 a 1,2 gramas de sulfato de cobre (II) penta-hidratado], 25 mililitros de ácido sulfúrico (3.4) e alguns fragmentos de pedra-pomes (3.11), misturando. Aquecer moderadamente a mistura, agitando ocasionalmente se necessário, até à carbonização completa da massa e o desaparecimento da espuma. Aquecer de um modo mais vigoroso até à ebulição ; o aquecimento é adequado quando se observar a condensação do ácido nas paredes do recipiente. Evitar o sobreaquecimento lateral e a adesão de partículas orgânicas às paredes. Quando a amostra assumir um tom verde claro, continuar a ebulição durante mais duas horas, arrefecendo da seguida.

**5.2. Destilação**

Adicionar cuidadosamente uma quantidade de água adequada para a dissolução completa dos sulfatos. Deixar arrefecer e adicionar alguns grânulos de zinco (3.3).

Colocar no recipiente de recolha do dispositivo de destilação 25 mililitros, rigorosamente medidos, de ácido sulfúrico (3.5) ou (3.6), em função de teor presumido de azoto. Adicionar algumas gotas de vermelho de metilo (3.7).

Adaptar o recipiente de digestão ao refrigerante do dispositivo de destilação, imergindo a extremidade do refrigerante no líquido contido no recipiente de recolha, até uma profundidade mínima de 1 cm (ver a observação 8.3). Juntar cuidadosamente 100 ml de solução de hidróxido de sódio (3.8) ao recipiente de digestão, evitando perdas de amoníaco (ver a observação 8.1).

Aquecer o recipiente até à destilação completa do amoníaco.

**5.3. Titulação**

Titular o excesso de ácido sulfúrico existente no recipiente de recolha com a solução de hidróxido de sódio (3.9) ou (3.10), em função da concentração de ácido sulfúrico utilizada, até atingir o ponto final.

**5.4. Ensaio em branco**

Com vista a confirmar a ausência de azoto nos reagentes, efectuar um ensaio em branco (digestão, destilação e titulação), utilizando 1 g de sacarose (3.13) em vez da amostra.

**6. Cálculo dos resultados**

O teor de proteínas totais é calculado de acordo com a seguinte fórmula :

$$\frac{(V_0 - V_1) \times c \times 0,014 \times 100 \times 6,25}{m}$$

Em que

$V_0$  = Volume, expresso em ml, de NaOH (3.9 ou 3.10) utilizado no ensaio em branco

$V_1$  = Volume, expresso em ml, de NaOH (3.9 ou 3.10) utilizado na titulação da amostra

$c$  = Concentração, expressa em mol/l, da solução de hidróxido de sódio (3.9 ou 3.10)

$m$  = Massa da amostra, expressa em gramas.

**7. Comprovação do método****7.1. Repetibilidade**

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas, efectuadas com a mesma amostra, não deve exceder :

— 0,2 %, em valor absoluto, para teores de proteína bruta inferiores a 20 %,

— 1,0 %, em valor relativo, em relação aos resultados mais elevados, para teores de proteínas totais compreendidos entre 20 % e 40 %,

— 0,4 %, em valor absoluto, para teores superiores a 40 %.

**7.2. Exactidão**

Efectuar a análise (digestão, destilação e titulação) de 1,5 a 2,0 gramas de acetanilida (3.12), na presença de 1 grama de sacarose (3.13); 1 grama de acetanilida deverá consumir 14,80 mililitros de ácido sulfúrico (3.5). A taxa de recuperação deve ser de, pelo menos, 99 %.

**8. Observações**

8.1. O aparelho a utilizar pode ser do tipo manual, semiautomático ou automático. Se for necessário efectuar uma operação de transferência entre os processos de digestão e destilação, não deverão observar-se perdas. Se o recipiente do dispositivo de destilação não se encontrar munido de uma ampola de carga, adicionar o hidróxido de sódio imediatamente antes de adaptar o recipiente ao refrigerante, vertendo o líquido cuidadosamente ao longo das paredes.

8.2. Se o resíduo da digestão solidificar, recomeçar o processo, utilizando um volume de ácido sulfúrico (3.4) superior ao especificado.

8.3. No caso de produtos com baixo teor de azoto, o volume de ácido sulfúrico (3.6) a adicionar ao recipiente de recolha pode ser reduzido, se necessário, para 10 ou 15 mililitros e diluído para 25 mililitros, com água. »