

DIRECTIVA 2003/126/CE DA COMISSÃO
de 23 de Dezembro de 2003

relativa ao método analítico para a determinação de constituintes de origem animal no quadro do controlo oficial dos alimentos para animais

(Texto relevante para efeitos do EEE)

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade 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 ⁽¹⁾, e, nomeadamente, o seu artigo 2.º,

Considerando o seguinte:

- (1) A Directiva 70/373/CEE estabelece que o controlo oficial dos alimentos para animais destinado a verificar a observância das condições estabelecidas pelas disposições legislativas, regulamentares e administrativas que regulam a qualidade e composição desses produtos seja efectuada fazendo uso de modos de colheita de amostras e métodos de análise comunitários.
- (2) As disposições relativas à rotulagem dos alimentos para animais e as condições de proibição da utilização de certos tipos de proteínas animais em alimentos para animais destinados a determinadas categorias de animais exigem que se disponha de métodos analíticos fiáveis para detectar a presença e, se for caso disso, a percentagem dessas proteínas.
- (3) O método descrito na Directiva 98/88/CE da Comissão, de 13 de Novembro de 1998, que estabelece linhas de orientação para a identificação e quantificação por estimativa dos constituintes de origem animal por exame microscópico, no quadro do controlo oficial dos alimentos para animais ⁽²⁾ é, actualmente, o único método validado para o controlo da presença, em alimentos para animais, de proteínas animais, incluindo estas proteínas tratadas a 133 °C e 3 bar durante 20 minutos.
- (4) Um estudo comparativo da determinação de proteínas animais transformadas revelou recentemente que as variações que se verificam na aplicação dos exames microscópicos estabelecidos na Directiva 98/88/CE são responsáveis por diferenças significativas de sensibilidade, especificidade e exactidão do método. Para harmonizar e melhorar a determinação de proteínas animais transformadas as disposições relativas ao método de exame microscópico devem ser especificadas com maior pormenor e passar a ser obrigatórias. É necessário garantir que os analistas que executem o método tenham recebido formação adequada, pois os resultados dependem da perícia do analista.
- (5) A Directiva 98/88/CE deve, portanto, ser substituída.

- (6) As medidas previstas na presente directiva estão em conformidade com o parecer do Comité Permanente da Cadeia Alimentar e da Saúde Animal,

ADOPTOU A PRESENTE DIRECTIVA:

Artigo 1.º

Os Estados-Membros velarão por que, quando, no quadro do programa coordenado de controlo no domínio da alimentação animal previsto na Directiva 95/53/CE do Conselho ⁽³⁾, for realizada uma análise oficial de alimentos para animais para um controlo oficial destinado a detectar a presença, identificar e/ou estimar a quantidade de constituintes de origem animal em alimentos para animais, tal seja realizado em conformidade com o anexo da presente directiva.

Artigo 2.º

Os Estados-Membros assegurarão que os laboratórios que efectuarem o controlo oficial da presença de constituintes de origem animal em alimentos para animais participem periodicamente em testes de proficiência nos métodos analíticos e que o pessoal de laboratório que efectuar as análises receba a formação adequada.

Artigo 3.º

É revogada a Directiva 98/88/CE.

As referências à directiva revogada passam a ser entendidas como referências à presente directiva.

Artigo 4.º

1. Os Estados-Membros porão em vigor, o mais tardar em 1 de Julho de 2004, as disposições legislativas, regulamentares e administrativas necessárias para dar cumprimento à presente directiva. Os Estados-Membros comunicarão imediatamente à Comissão o texto das referidas disposições, bem como um quadro de correspondência entre essas disposições e a presente directiva.

Quando 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.

2. Os Estados-Membros comunicarão à Comissão o texto das disposições de direito interno que adoptarem no domínio regido pela presente directiva.

⁽¹⁾ JO L 170 de 3.8.1970, p. 2. Directiva com a última redacção que lhe foi dada pelo Regulamento (CE) n.º 807/2003 (JO L 122 de 16.5.2003, p. 36).

⁽²⁾ JO L 318 de 27.11.1998, p. 45.

⁽³⁾ JO L 265 de 8.11.1995, p. 17. Directiva com a última redacção que lhe foi dada pela Directiva 2001/46/CE (JO L 234 de 1.9.2001, p. 55).

Artigo 5.º

A presente directiva entra em vigor no vigésimo dia seguinte ao da sua publicação no *Jornal Oficial da União Europeia*.

Artigo 6.º

Os Estados-Membros são os destinatários da presente directiva.

Feito em Bruxelas, em 23 de Dezembro de 2003.

Pela Comissão
David BYRNE
Membro da Comissão

ANEXO

Condições para a detecção, identificação e quantificação por estimativa, por exame microscópico, de constituintes de origem animal em alimentos para animais**1. Objectivo e campo de aplicação**

As presentes condições devem ser utilizadas sempre que a detecção de constituintes de origem animal (definidos como produtos do processamento de carcaças e partes de carcaça de mamíferos, aves de capoeira e peixes) em alimentos para animais seja efectuada por exame microscópico no quadro do programa coordenado de controlo no domínio da alimentação animal previsto na Directiva 95/53/CE do Conselho. Desde que os métodos do presente anexo sejam utilizados em todos os exames oficiais, poderá ser igualmente efectuado um segundo exame, com base em variantes dos métodos ou métodos alternativos, para melhorar a detecção de determinados tipos de constituintes de origem animal ou melhor especificar a origem desses constituintes. Além disso, poderá fazer-se uso de uma variante do protocolo no exame de determinados constituintes específicos de origem animal, como o plasma ou ossos presentes no sebo (ver o ponto 9), desde que essas análises sejam efectuadas em complemento das previstas no programa coordenado de controlo.

2. Sensibilidade

Podem ser detectadas quantidades muito pequenas (inferiores a 0,1 %) de constituintes de origem animal em alimentos para animais, dependendo da natureza desses constituintes.

3. Resumo do processo

Utiliza-se na identificação uma amostra representativa, colhida de acordo com o disposto na Directiva 76/371/CEE da Comissão, de 1 de Março de 1976, que fixa as formas de recolha comunitárias de amostras para o controlo oficial dos alimentos para animais ⁽¹⁾ e preparando de modo adequado. O protocolo a seguir descrito adequa-se a alimentos para animais com baixo teor de humidade. Os alimentos para animais com teor de humidade superior a 14 % terão de ser previamente secos (ou condensado). Determinados alimentos para animais ou matérias-primas para a alimentação animal (por exemplo, óleos ou gorduras) exigem um tratamento específico (ver o ponto 9). Os constituintes de origem animal são identificados com base em características típicas detectáveis por exame microscópico (por exemplo, fibras musculares e outras partículas de carne, cartilagens, ossos, chifres, pêlos, cerdas, sangue, penas, cascas de ovos, espinhas ou escamas). Proceder-se-á à identificação na fracção peneirada (6.1) e no sedimento concentrado (6.2) da amostra.

4. Reagentes**4.1. Meios de montagem**

4.1.1. Hidrato de cloral (solução aquosa a 60 %, m/v).

4.1.2. Lixívia (solução a 2,5 %, m/v, de NaOH ou solução a 2,5 %, m/v, de KOH) para as fracções peneiradas.

4.1.3. Óleo parafínico ou glicerol (viscosidade: 68-81) para as observações microscópicas no sedimento.

4.2. Agentes de lavagem

4.2.1. Álcool a 96 %.

4.2.2. Acetona.

4.3. Agente de concentração

4.3.1. Tetracloroetileno (densidade: 1,62).

4.4. Reagentes de coloração

4.4.1. Solução de iodo/iodeto de potássio (dissolver 2 g de iodeto de potássio em 100 ml de água e adicionar 1 g de iodo, agitando com frequência).

4.4.2. Vermelho de alizarina (diluir 2,5 ml de ácido clorídrico 1 M em 100 ml de água e adicionar a esta solução 200 mg de vermelho de alizarina).

4.4.3. Reagente da cistina (2 g de acetato de chumbo, 10 g de NaOH/100 ml H₂O).

4.4.4. Solução de iodo/iodeto de potássio (dissolvida em etanol a 70 %).

⁽¹⁾ JO L 102 de 15.4.1976, p. 1.

4.5. *Reagente descolorante*

4.5.1. Solução comercial de hipoclorito de sódio (9,6 % de cloro activo).

5. **Equipamento e acessórios**

- 5.1. Balança analítica (aproximação de 0,01 g; no caso do sedimento concentrado: 0,001 g).
- 5.2. Meios de moagem (moinho ou almofariz, em especial no caso dos alimentos para animais com teor de matéria gorda em análise superior a 15 %).
- 5.3. Peneira com rede de orifícios quadrados de lado não superior a 0,50 mm.
- 5.4. Ampola de decantação ou vaso de decantação de fundo cónico.
- 5.5. Microscópio estereoscópico (ampliação mínima: 40 vezes).
- 5.6. Microscópio composto (ampliação mínima: 400 vezes), de luz transmitida ou luz polarizada.
- 5.7. Material de vidro de laboratório de uso corrente.

O equipamento deve apresentar-se perfeitamente limpo. As ampolas de decantação e o restante material de vidro devem ser lavados em máquina de lavar. As peneiras devem ser limpas com uma escova rija.

6. **Técnica**

Os alimentos para animais em granulado podem ser previamente peneirados, se ambas as fracções forem analisadas como amostras distintas.

Serão tratados pelo menos 50 g de amostra [moer com precaução, utilizando, se necessário, os meios de moagem adequados (5.2) para obter uma estrutura apropriada]. Tomar duas partes representativas da matéria moída, uma para a peneiração (pelo menos 5 g) (6.1) e outra para a concentração do sedimento (pelo menos 5 g) (6.2). Para facilitar a identificação podem utilizar-se ainda reagentes de coloração (6.3).

Para indicar a natureza das proteínas animais e a origem das partículas, pode recorrer-se a um sistema de apoio à decisão (como o ARIES) e a amostras de referência.

6.1. *Identificação de constituintes de origem animal nas fracções peneiradas*

Peneirar (5.3), em duas fracções, uma quantidade mínima de 5 g da amostra.

Depositar a fracção (ou as várias partes em que seja dividida a fracção) de maior granulometria, ou uma porção representativa da mesma, em camada fina, num suporte adequado e pesquisar, de modo sistemático, ao microscópio estereoscópico (5.5), a diversas ampliações, a presença de constituintes de origem animal.

Pesquisar, de modo sistemático, ao microscópio composto (5.6), a diversas ampliações, a presença de constituintes de origem animal em lâminas preparadas com a fracção peneirada de menor granulometria.

6.2. *Identificação de constituintes de origem animal no sedimento concentrado*

Depositar uma quantidade mínima de 5 g (aproximação de 0,01 g) da amostra numa ampola de decantação ou vaso de decantação de fundo cónico e adicionar pelo menos 50 ml de tetracloroetileno (4.3.1). Agitar a mistura diversas vezes.

— Se se utilizar uma ampola de decantação fechada, deixar decantar o sedimento durante tempo suficiente (pelo menos 3 minutos) antes de o separar. Agitar de novo e voltar a deixar decantar o sedimento durante pelo menos 3 minutos. Voltar a separar o sedimento.

— Se se utilizar um vaso aberto, deixar decantar o sedimento durante pelo menos 5 minutos antes de o separar.

Secar e depois pesar (aproximação de 0,001 g) o sedimento total. A pesagem só é necessária caso se pretenda efectuar uma quantificação por estimativa. Se o sedimento for constituído por muitas partículas grandes poderá ser separado em duas fracções por peneiração (5.3). Pesquisa-se a presença de constituintes ósseos no sedimento seco ao microscópio estereoscópico (5.5) e ao microscópio composto (5.6).

6.3. Utilização de meios de montagem e reagentes de coloração

A identificação microscópica dos constituintes de origem animal pode ser facilitada pelo recurso a meios de montagem e reagentes de coloração especiais.

Hidrato de cloral (4.1.1):	Aquecendo cuidadosamente, é possível observar mais claramente as estruturas celulares, pois os grãos de amido sofrem gelatinização e os conteúdos indesejados são removidos das células.
Lixívia (4.1.2):	O hidróxido de sódio e o hidróxido de potássio clarificam as matérias constituintes do alimento para animais, ajudando na detecção de fibras musculares e de pêlos e outras estruturas queratínicas.
Óleo parafínico e glicerol (4.1.3):	Os constituintes ósseos podem ser bem identificados neste meio de montagem, pois, na sua maioria, as lacunas permanecem cheias de ar e surgem como buracos negros de 5-15 µm.
Solução de iodo/iodeto de potássio (4.4.1):	É utilizada na detecção de amido (cor azul violácea) e de proteínas (cor amarelo alaranjado). Se necessário, as soluções podem ser diluídas.
Solução de vermelho de alizarina (4.4.2):	Coloração vermelha/rosa dos ossos, espinhas e escamas. Antes de secar o sedimento (6.2), transferir o sedimento total para um tubo de ensaio de vidro e lavar duas vezes com aproximadamente 5 ml de álcool (4.2.1) (utilizar um agitador de vórtex em cada lavagem e deixar o solvente em repouso durante cerca de um minuto antes de o decantar). Antes de utilizar este reagente de coloração, decorar o sedimento com pelo menos 1 ml de solução de hipoclorito de sódio (4.5.1). Deixar reagir durante 10 minutos. Encher o tubo com água, deixar depositar o sedimento durante 2-3 minutos e decantar a água e as partículas em suspensão. Lavar mais duas vezes o sedimento com cerca de 10 ml de água (utilizar um agitador de vórtex, deixar em repouso e decantar a água de cada vez). Adicionar duas a dez ou mais gotas (dependendo da quantidade de resíduo) de solução de vermelho de alizarina. Agitar a mistura e deixar reagir durante alguns segundos. Lavar duas vezes o sedimento corado com aproximadamente 5 ml de álcool (4.2.1) e, em seguida, uma vez com acetona (4.2.2) (utilizar um agitador de vórtex e deixar o solvente em repouso durante cerca de um minuto antes de o decantar). O sedimento estará pronto para a secagem.
Reagente da cistina (4.4.3):	Aquecendo cuidadosamente, os constituintes com cistina (pêlos, penas, etc.) ficam castanho escuro.

6.4. Exame de alimentos para animais que eventualmente contenham farinhas de peixe

Examinar ao microscópio composto (6.1 e 6.2) pelo menos uma lâmina da fracção peneirada de menor granulometria e da fracção fina do sedimento.

Se a rotulagem incluir farinhas de peixe nos ingredientes ou se suspeitar da presença de farinhas de peixe ou esta tiver sido detectada no exame inicial, devem examinar-se pelo menos mais duas lâminas da fracção de menor granulometria da amostra inicial e também a fracção sedimento total.

7. Cálculos e avaliação

Os Estados-Membros assegurarão a aplicação dos procedimentos descritos neste ponto quando for efectuada uma análise oficial com o intuito de estimar a quantidade (e não apenas a presença) de constituintes de origem animal.

Os cálculos só podem ser efectuados se os constituintes de origem animal contiverem fragmentos ósseos.

Com base nas lacunas características que apresentam, os fragmentos de ossos de animais terrestres de sangue quente (mamíferos e aves) são distinguíveis dos diversos tipos de espinhas de peixe na lâmina de observação microscópica. A proporção de constituintes de origem animal na amostra pode ser estimada tendo em conta:

- a proporção estimada (percentagem ponderal) de fragmentos ósseos no sedimento concentrado,
- proporção (percentagem ponderal) de ossos nos constituintes de origem animal.

A estimativa deve basear-se na observação de pelo menos (se possível) três lâminas e de um mínimo de cinco campos por lâmina. Nos alimentos compostos para animais, o sedimento concentrado contém, em geral, não apenas fragmentos de ossos de animais terrestres e de espinhas de peixes, mas também outras partículas de massa específica elevada, nomeadamente minerais, areia, fragmentos lenhificados de plantas, etc.

7.1. Estimativa da percentagem de fragmentos ósseos

Percentagem de fragmentos de ossos de animais terrestres = $(S \times c)/W$

Percentagem de fragmentos de espinhas e escamas de peixes = $(S \times d)/W$

[[S = massa de sedimento (mg); c = factor de correcção (%) correspondente à estimativa de fragmentos de ossos de animais terrestres no sedimento; d = factor de correcção (%) correspondente à estimativa de fragmentos de espinhas e escamas de peixes no sedimento; W = massa da amostra para sedimentação (mg)].

7.2. Estimativa da percentagem de constituintes de origem animal

A proporção óssea pode variar grandemente nos produtos de origem animal. A percentagem de ossos é de 50-60 % no caso das farinhas de ossos e de 20-30 % no caso das farinhas de carne; no caso das farinhas de peixe, a proporção de espinhas e escamas varia em função da categoria e origem da farinha, sendo, normalmente, da ordem de 10-20 %.

Se o tipo de farinha de origem animal presente na amostra for conhecido, será possível efectuar as seguintes estimativas:

Proporção estimada de constituintes originários de animais terrestres (%) = $(S \times c)/(W \times f) \times 100$

Proporção estimada de constituintes originários de peixe (%) = $(S \times d)/(W \times f) \times 100$

[S = massa de sedimento (mg); c = factor de correcção (%) correspondente à estimativa de fragmentos de ossos de animais terrestres no sedimento; d = factor de correcção (%) correspondente à estimativa de fragmentos de espinhas e escamas de peixes no sedimento; f = factor de correcção correspondente à proporção de ossos nos constituintes de origem animal da amostra examinada; W = massa da amostra para sedimentação (mg)].

8. Expressão dos resultados do exame

O relatório deve conter, no mínimo, informações sobre a presença de constituintes originários de animais terrestres ou de farinhas de peixe. Os diversos casos possíveis serão descritos do seguinte modo:

8.1. Quanto à presença de constituintes originários de animais terrestres:

- o exame microscópico da amostra apresentada não permitiu detectar constituintes originários de animais terrestres, ou
- o exame microscópico da amostra apresentada permitiu detectar constituintes originários de animais terrestres.

8.2. Quanto à presença de farinhas de peixe:

- o exame microscópico da amostra apresentada não permitiu detectar constituintes originários de farinhas de peixe, ou
- o exame microscópico da amostra apresentada permitiu detectar constituintes originários de farinhas de peixe.

Se forem detectados constituintes originários de peixe ou de animais terrestres, o relatório do resultado do exame pode, se necessário, apresentar ainda uma estimativa da quantidade de constituintes detectada (x %, < 0,1 %, 0,1-0,5 %, 0,5-5 % ou > 5 %) e especificar o tipo de animal terrestre, se possível, e os constituintes de origem animal (fibras musculares, cartilagem, ossos, chifres, pêlos, cerdas, penas, sangue, cascas de ovos, espinhas, escamas) identificados.

Se for estimada uma quantidade de ingredientes de origem animal, deve ser indicado o factor de correcção f utilizado.

Se forem identificados constituintes ósseos provenientes de animais terrestres, o relatório deverá incluir a seguinte frase:

«Não é de excluir a possibilidade de estes constituintes serem originários de mamíferos.».

Esta frase suplementar não será necessária se tiver sido especificado tratar-se de fragmentos ósseos de animais terrestres provenientes de aves de capoeira ou de mamíferos.

9. **Protocolo facultativo para a análise de óleos ou gorduras**

Na análise de óleos ou gorduras pode recorrer-se ao seguinte protocolo:

- Se a gordura se apresentar no estado sólido, deve ser aquecida (por exemplo, num forno de microondas) até fundir.
 - Com uma pipeta, transferir 40 ml de gordura da base da amostra para um tubo de centrifugação.
 - Centrifugar a 4 000 rpm durante 10 minutos.
 - Se a gordura se apresentar no estado sólido depois da centrifugação, deve ser aquecida de novo num forno até fundir. Voltar a centrifugar a 4 000 rpm durante 5 minutos.
 - Com uma pequena colher ou espátula, transferir metade das impurezas decantadas para uma pequena placa de Petri ou uma lâmina de microscópio, para a identificação ao microscópio da eventual presença de constituintes de origem animal (fibras de carne, penas, fragmentos ósseos, etc., ...). Para a observação ao microscópio, é recomendada a utilização de óleo parafínico ou de glicerol como meio de montagem.
 - As restantes impurezas serão utilizadas na sedimentação descrita em 6.2.
-