

REGULAMENTO (CE) N.º 121/2008 DA COMISSÃO**de 11 de Fevereiro de 2008****que estabelece o método de análise para a determinação do teor de amido em preparações dos tipos utilizados na alimentação de animais (código NC 2309)**

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

ADOPTOU O PRESENTE REGULAMENTO:

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Europeia,

*Artigo 1.º*Tendo em conta o Regulamento (CEE) n.º 2658/87 do Conselho, de 23 de Julho de 1987, relativo à nomenclatura pautal e estatística e à Pauta Aduaneira Comum ⁽¹⁾, nomeadamente o n.º 1, alínea a), do artigo 9.º,

Em derrogação do artigo 1.º da Directiva 72/199/CEE, o teor ponderal de amido das preparações dos tipos utilizados na alimentação de animais na aceção do código NC 2309 deve ser determinado pelo método analítico enzimático estabelecido no anexo do presente regulamento, nos casos em que se encontrem presentes, em quantidades significativas, as seguintes matérias-primas para alimentação animal:

Considerando o seguinte:

(1) Com vista a assegurar um tratamento uniforme aquando da importação na Comunidade de preparações dos tipos utilizados na alimentação de animais (NC 2309), é necessário que, ao estabelecer os métodos analíticos, seja tida em conta a sua evolução científica e tecnológica.

a) Produtos derivados da beterraba (sacarina), nomeadamente polpa de beterraba (sacarina), melaço de beterraba (sacarina), polpa de beterraba (sacarina) melaçada, vinassa de beterraba (sacarina), açúcar (de beterraba);

(2) Nos termos da Terceira Directiva 72/199/CEE da Comissão, de 27 de Abril de 1972, que fixa os métodos de análise comunitários para o controlo dos alimentos para animais ⁽²⁾, para a determinação do teor de amido em preparações dos tipos utilizados na alimentação de animais deverá aplicar-se o método polarimétrico (também chamado método de Ewers modificado), descrito no ponto 1 do anexo I da mesma directiva.

b) Polpa de citrinos;

c) Sementes de linho; bagaço de linho, obtido por pressão; bagaço de linho, obtido por extracção;

(3) Atendendo aos estudos efectuados pelos peritos dos laboratórios aduaneiros dos Estados-Membros, é necessário determinar que, nos casos em que o método polarimétrico descrito na Directiva 72/199/CEE não possa ser utilizado na determinação do teor de amido das referidas preparações, deve utilizar-se um método analítico enzimático. Importa, pois, especificar o modo de execução deste método.

d) Colza; bagaço de colza, obtido por pressão; bagaço de colza, obtido por extracção; cascas de colza;

e) Sementes de girassol; bagaço de girassol, obtido por extracção; bagaço de girassol, parcialmente descascado, obtido por extracção;

(4) As medidas previstas no presente regulamento estão em conformidade com o parecer da secção «nomenclatura pautal e estatística» do Comité do Código Aduaneiro,

f) Bagaço de copra (coco), obtido por pressão; bagaço de copra (coco), obtido por extracção;

g) Polpa de batata;

h) Leveduras desidratadas;

i) Produtos ricos em inulina (por exemplo, lascas e farinha de tupinambos);

j) Torresmos.

⁽¹⁾ JO L 256 de 7.9.1987, p. 1. Regulamento com a última redacção que lhe foi dada pelo Regulamento (CE) n.º 1352/2007 da Comissão (JO L 303 de 21.11.2007, p. 3).

⁽²⁾ JO L 123 de 29.5.1972, p. 6. Directiva com a última redacção que lhe foi dada pela Directiva 1999/79/CE (JO L 209 de 7.8.1999, p. 23).

*Artigo 2.º*O presente regulamento entra em vigor no vigésimo dia seguinte ao da sua publicação no *Jornal Oficial da União Europeia*.

O presente regulamento é obrigatório em todos os seus elementos e directamente aplicável em todos os Estados-Membros.

Feito em Bruxelas, em 11 de Fevereiro de 2008.

Pela Comissão
László KOVÁCS
Membro da Comissão

ANEXO

MÉTODO ENZIMÁTICO PARA A DETERMINAÇÃO DO TEOR DE AMIDO EM PREPARAÇÕES UTILIZADAS NA ALIMENTAÇÃO DE ANIMAIS POR CRÓMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)**1. Âmbito**

O presente método descreve a determinação enzimática do teor de amido em alimentos para animais. O teor de amido é obtido com base na determinação quantitativa da glucose decorrente da decomposição enzimática do amido. Considera-se que toda a glucose determinada provém do amido presente na amostra.

2. Definições

O presente método permite determinar o teor de amido e dos seus produtos de degradação de elevada massa molecular e insolúveis em etanol a 40 %. O teor de amido é expresso em % (m/m).

3. Princípio

As amostras são homogeneizadas por moagem. Cada amostra é lavada com etanol a 40 %, com o objectivo de eliminar os açúcares solúveis e os produtos solúveis da decomposição do amido.

Adiciona-se à suspensão uma enzima (alfa-amilase termoestável). A 100 °C, esta enzima decompõe o amido em cadeias mais curtas, quer ele se encontre completamente dissolvido ou não. Dado que a decomposição dos bocados de amido de grandes dimensões é bastante lenta, importa que as amostras estejam totalmente dissolvidas ou na forma de uma suspensão com partículas sólidas de dimensão muito pequena.

Posteriormente, adiciona-se uma segunda enzima (amiloglucosidase), que hidrolisa, a 60 °C, as cadeias glicosídicas resultantes da decomposição do amido, de forma a obter glucose.

Após clarificação do líquido, eliminando, por filtração, as proteínas, gorduras e resíduos, obtém-se uma solução límpida, a utilizar para HPLC.

A separação dos açúcares presentes é efectuada por HPLC.

4. Reagentes e outros materiais

Utilizar reagentes de qualidade analítica reconhecida e água desmineralizada.

4.1. Etanol a 40 % (vol.) em água

4.2. Glucose de pureza mínima 99 %

4.3. Solução de amiloglucosidase (1,4-alfa-D-Glucan-glucohidrolase) de *Aspergillus niger* (actividade enzimática > 5 000 U/ml). Armazenagem a cerca de 4 °C

Em alternativa, pode utilizar se também amiloglucosidase em pó.

4.4. Alfa-amilase (1,4-alfa-D-Glucan-glucohidrolase) termoestável. Armazenagem a cerca de 4 °C

4.5. Acetato de zinco dihidratado, p.a.

4.6. Hexacianoferrato de potássio (II) ($K_4[Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O]$), de pureza extra

4.7. Acetato de sódio anidro, p.a.

4.8. Ácido acético glacial a 100 % (v/v)

4.9. Tampão de acetato de sódio (0,2 mol/l)

Pesar 16,4 g de acetato de sódio (4.7) num copo de vidro. Dissolver em água e transferir para um balão volumétrico de 1 000 ml. Perfazer o volume com água e ajustar o pH para 4,7 com ácido acético, com o auxílio de um medidor de pH (5.11). Esta solução pode ser utilizada por um máximo de 6 meses, com armazenagem a 4 °C.

4.10. Solução de amiloglucosidase (actividade enzimática > 250 U/ml)

Preparar uma solução de 5 ml de amiloglucosidase em solução (4.3) ou dissolver 660 mg de amiloglucosidase em pó, para um volume final de 100 ml, utilizando o tampão de acetato de sódio (4.9). Preparar no momento.

4.11. Solução de referência

Preparar soluções de glucose em água da forma convencional para utilização em análise por HPLC.

4.12. Reagente de clarificação (Carrez I)

Dissolver, num copo de vidro, 219,5 g de acetato de zinco (4.5) em água. Transferir para um balão volumétrico de 1 000 ml e adicionar 30 ml de ácido acético (4.8). Homogeneizar e perfazer com água. Esta solução pode ser utilizada por um máximo de 6 meses, com armazenagem à temperatura ambiente.

Podem utilizar-se outros reagentes de clarificação equivalentes à solução de Carrez.

4.13. Reagente de clarificação (Carrez II)

Dissolver, num copo de vidro, 106,0 g de hexacianoferrato (II) de potássio (4.6) em água. Transferir para um balão volumétrico de 1 000 ml. Homogeneizar e perfazer o volume com água. Esta solução pode ser utilizada por um máximo de 6 meses, com armazenagem à temperatura ambiente.

Podem utilizar-se outros reagentes de clarificação equivalentes à solução de Carrez.

4.14. Fase móvel

Preparar uma fase móvel de utilização convencional na análise de açúcares por HPLC. Com uma coluna de aminopropil-silicagel, por exemplo, uma das fases móveis mais comuns é uma mistura de água de qualidade para HPLC com acetoneitrilo.

5. **Equipamento**

5.1. Material de vidro de uso laboratorial corrente

5.2. Centrifugadora com uma aceleração mínima de 1 000 g (em relação ao centro do tubo)

5.3. Tubos de centrifugadora de vidro de 100 ml

5.4. Agitador magnético

5.5. Barras magnéticas

5.6. Filtros de pregas (por exemplo, 185 mm)

5.7. Filtros de seringa de 0,45 µm, adequados a soluções aquosas

5.8. Recipientes adequados ao amostrador automático para HPLC

5.9. Balões volumétricos de 100 ml

5.10. Seringas de plástico, de 5 e 10 ml

5.11. Medidor de pH

5.12. Banho maria munido de termóstato, ajustável para 60 °C e 100 °C

5.13. Placas de aquecimento com agitação magnética

5.14. Aparelho de HPLC

5.14.1. Bomba regulável para zero pulsações

5.14.2. Amostrador automático

5.14.3. Coluna e pré coluna, adequadas à análise de açúcares

5.14.4. Forno para colunas (gama de temperaturas compreendida entre a temperatura ambiente e 40 °C)

5.14.5. Detector adequado à análise de açúcares (por exemplo, detector de índice de refração)

5.14.6. Sistema de integração

6. **Procedimento**

6.1. Generalidades

As amostras são analisadas individualmente.

6.2. Preparação da amostra a partir de diversos tipos de produtos

O produto é homogeneizado por moagem.

6.3. Produto a analisar

Estimar o teor de amido com base na lista de ingredientes. A quantidade de amostra (pesada com aproximação a 0,1 mg) pode ser estimada por recurso à seguinte fórmula:

$$\text{quantidade de amostra (g)} = \frac{\text{volume do balão volumétrico (100 ml)}}{\text{teor de amido estimado (\%)}}$$

6.4. Ensaio em branco

O ensaio em branco é efectuado através de uma análise completa (como descrito em 6.5), sem adição da amostra. O resultado dessa análise é utilizado no cálculo do teor de amido (7.1).

6.5. Análise

6.5.1. Preparação das amostras

Homogeneizar a amostra por mistura ou agitação. Pesar a toma de ensaio escolhida (6.3) num tubo de centrífuga (5.3) e adicionar 50 ml de etanol a 40 % (4.1). Agitar com um agitador magnético durante 20 minutos, à temperatura ambiente. Deixar a barra magnética no tubo e centrifugar durante cinco minutos. Aspirar cuidadosamente e remover a fase líquida (por exemplo com uma pipeta de Pasteur). Repetir o procedimento de extracção com duas porções de 25 ml de etanol (4.1). Transferir o resíduo para um balão volumétrico de 100 ml (5.9) com cerca de 70 ml de água.

Após a dissolução ou suspensão, adicionar 100 microlitros de alfa-amilase termoestável (4.4) e aquecer a 100 °C durante 1 hora, por exemplo num banho-maria (5.12). Arrefecer até 60 °C num banho-maria e adicionar 5 ml de solução de amilglucosidase (4.10). Colocar o balão durante 30 minutos num banho-maria a 60 °C. Arrefecer até à temperatura ambiente, clarificar a amostra por adição de 1 ml de solução de Carrez I (4.12), agitar e adicionar 1 ml de solução de Carrez II (4.13). As soluções de Carrez I e II podem ser adicionadas antes ou depois do arrefecimento. Perfazer o volume com água, homogeneizar e filtrar a solução com um filtro de pregas (5.6). Recolher o extracto de amostra.

6.5.2. Processamento dos extractos de amostra

Filtrar os extractos com um filtro circular (5.7), com uma seringa (5.10) previamente enxaguada com o extracto. Recolher os filtrados em recipientes adequados (5.8).

Nota: O filtro circular pode ser utilizado várias vezes. Deverá ser enxaguado com o extracto seguinte, de forma a evitar a contaminação pelo extracto anterior.

6.6. Cromatografia

Executar a HPLC do modo convencional para a análise de açúcares. Dado que as amostras são extraídas com uma mistura etanol/água, a glucose é o principal açúcar determinado. O facto de a análise por HPLC revelar vestígios de maltose poderá indicar uma decomposição incompleta do amido.

7. Cálculos e expressão dos resultados

7.1. Cálculo dos resultados de HPLC

O teor de glucose (% m/m) é calculado com base nos resultados da análise por HPLC. A solução enzimática de amilglucosidase (4.3) é estabilizada com glucose. A alfa-amilase termoestável (4.4) é estabilizada com sacarose, parcialmente convertível em glucose pela actividade de invertase da amilglucosidase. Deste modo, a concentração de glucose determinada (expressa em %, m/v) deve ser corrigida em função da concentração de glucose na amostra em branco (também expressa em %, m/v). Calcula-se então o teor de glucose (% m/m) corrigido, com base na concentração de glucose corrigida em função do resultado do ensaio em branco, da massa da amostra e dos dados de calibração com as soluções de referência (4.11).

7.2. Cálculo do teor de amido

O teor de amido (% m/m) é calculado a partir do teor de glucose (% m/m), após correcção tendo em conta os resultados do ensaio em branco.

$$\text{Teor de amido} = 0,9 * \text{Teor de glucose corrigido}$$

8. Precisão

8.1. Ensaio interlaboratorial

O ponto 8.4 inclui pormenores de um estudo interlaboratorial sobre a precisão do método.

8.2. Repetibilidade

A diferença absoluta entre dois resultados independentes, obtidos pelo mesmo método, com o mesmo material em estudo, no mesmo laboratório e pelo mesmo operador, utilizando o mesmo equipamento num curto intervalo de tempo, não deverá exceder em mais de 5 % dos casos o limite de repetibilidade de 1,1 % (m/m). Este último foi obtido com base nos resultados coligidos de um estudo interlaboratorial (ver 8.4).

8.3. Reprodutibilidade

A diferença absoluta entre dois resultados independentes, obtidos pelo mesmo método, com o mesmo material em estudo, em laboratórios diferentes, por operadores diferentes, utilizando equipamentos diferentes, não deverá exceder em mais de 5 % dos casos o limite de reprodutibilidade de 3,7 % (m/m). Este último foi obtido com base nos resultados de um estudo interlaboratorial (ver 8.4).

8.4. Resultados do estudo interlaboratorial

Foi realizado em 2005 e 2006 um estudo interlaboratorial com a participação dos laboratórios aduaneiros europeus. O estudo foi realizado de acordo com a norma ISO 5725 e o protocolo da IUPAC (W. Horwitz, *Pure and Applied Chemistry*, vol. 67, 1995, p. 331-343). Os resultados apresentam-se no quadro que se segue.

Resultados estatísticos do estudo interlaboratorial

	Amostras				
	1	2	3	4	5
Número de laboratórios após eliminação dos casos anómalos	25	26	26	25	24
Número de resultados aceites	50	52	52	50	48
Teor médio de amido (% m/m)	31,2	14,4	25,1	12,9	27,8
Desvio-padrão da repetibilidade, s_r (% m/m)	0,4	0,3	0,6	0,2	0,3
Limite de repetibilidade, r (% m/m)	1,1	0,8	1,7	0,7	0,9
Desvio-padrão da reprodutibilidade, s_R (% m/m)	1,7	0,8	1,7	0,9	1,3
Limite de reprodutibilidade, R (% m/m)	4,8	2,2	4,7	2,5	3,7

Amostras

- 1: alimento seco para cães
- 2: alimento seco para gatos
- 3: alimento seco para gatos (amostra 2) com adição de amido
- 4: alimento seco para gatos (amostra 2) com adição de polpa de beterraba
- 5: alimento comercial para animais de companhia