

8.ANNEXOS

8.1. Entrevistes i enquesta

8.1.1. MODEL D'ENTREVISTA FETA ALS EXPERTS

1. Coneix els pinsos vegetarians per a gos i gat?
2. Coneix alguna marca en concret que els comercialitzi? Quina?
3. Per què creu que les grans marques comercials no en venen?
4. Sap si a Espanya hi ha un consum significatiu d'aquests pinsos?
5. Creu que és ètic alimentar un gos o un gat amb pinso vegetarià sense cap motiu mèdic?
6. Sap d'algun cas en el que seria recomanable la prescripció d'aquest pinso?
7. En aquests casos, existeixen alternatives al pinso vegetarià?
8. Veient les taules de composició dels pinsos vegetarians, considera que es tracta d'un aliment complet? Cobriria les necessitats bàsiques de l'animal?

AMI DOG, PINSO VEGETARIÀ PER A GOS

Ingredients: Cereals, extractes de proteïnes vegetals, subproductes d'origen vegetal, olis i greixos, llevats, substàncies minerals, preservat amb vitamina E. També conté àcid linoleic (4,24%).

Anàlisi recomanat:

Humitat.....	8,00%
Proteïna bruta	26,58%
Matèries grasses brutes ...	10,44%
Cel·lulosa bruta	3,18%
Cendres brutes	6,73%
Calci	1,29%
Fòsfor	0,75%

Aportament mineral i vitamínic (per Kg d'aliment):

Vitamina A	18000 U.I.
Vitamina D3	1350 U.I.
Vitamina E (alfa tocoferol).....	215 mg
Vitamina B1	8 mg
Vitamina B2	14 mg
Vitamina B6	5 mg
Àcid D Pantotènic	15 mg
Vitamina H (biotina)	0,24 mg
Vitamina K (sodi bisulfit)	1,5 mg
Vitamina PP	45 mg
Vitamina B12	0,08 mg
Àcid Fòlic	1,3 mg
Clorur de Colina	2500 mg
Ferro (carbonat ferrós)	150 mg
Iode (iodur de potassi)	2,5 mg
Manganès (òxid manganès).....	35 mg
Courea (sulfat de courea)	20 mg
Seleni (selenit de sodi)	0,12 mg
Zinc (òxid de zinc)	120 mg

AMI CAT, PINSO VEGETARIÀ PER A GAT

Ingredients: Extractes de proteïnes vegetals, cereals, olis i greixos, subproductes d'origen vegetal, llevats, substàncies minerals, preservat amb vitamina E. També conté àcid linoleic (4.53 %) i Taurina.

Anàlisi recomanat:

Humitat	8,00%
Proteïna bruta	33,20%
Matèries grasses brutes	11,19%
Cel·lulosa bruta	2,38%
Cendres brutes	6,76%
Calci	0,96%
Fòsfor	0,86%

Aportament vitamínic i mineral:

Vitamina A	19000 U.I.
Vitamina D3	1250 U.I.
Vitamina E (alfa tocoferol)	210 mg
Vitamina B1	17 mg
Vitamina B2	5 mg
Vitamina B6	6 mg
Acido D Pantotènic	8 mg
Vitamina H (biotina)	0,1 mg
Vitamina K (sodi bisulfit)	0,5 mg

Vitamina PP	80 mg
Vitamina B12	0,025 mg
Àcid Fòlic	1,2 mg
Clorur de Colina	1500 mg
Hierro (carbonato ferrós)	80 mg
Iode (iodur de potassi)	0,4 mg
Manganès (òxid del manganès)....	7,5 mg
Coure (sulfat de coure).....	5 mg
Seleni (selenit de sodi)	0,1 mg
Zinc (òxid de zinc)	75 mg

9. Existeix legislació que reguli l'alimentació dels animals de companyia?
10. La taurina està acceptada com a additiu nutricional?
11. És igual d'eficaç la taurina d'origen animal que la d'origen vegetal?

8.1.2. MODEL D'ENQUESTA FETA A LA POBLACIÓ

12. Sexe: Home / Dona
13. Edat:
 - a. Menys de 18 anys
 - b. 18-35 anys
 - c. 36-50 anys
 - d. 51-70 anys
 - e. Més de 70 anys
14. Estudis (opcional):
 - a. Bàsics
 - b. Mitjans
 - c. Universitaris
15. Sap què vol dir ser vegetarià?
 - a. Dieta basada en productes vegetals, amb exclusió de productes càrnics, peix i marisc (pot incloure llet, ous...)
 - b. Dieta basada exclusivament en productes vegetals, que exclou qualsevol producte provinent dels animals
 - c. No sé què vol dir
16. Sap què vol dir ser vegà?
 - a. Dieta basada en productes vegetals, amb exclusió de productes càrnics, peix i marisc (pot incloure llet, ous...)

- b. Dieta basada exclusivament en productes vegetals, que exclou qualsevol producte provinent dels animals
 - c. No sé què vol dir
- 17. És vegetarià o vegà?
 - a. Vegetarià
 - b. Vegà
 - c. Cap de les dues
- 18. Té o ha tingut algun gos o gat?
 - a. Gos
 - b. Gat
 - c. Ambdós
 - d. No
- 19. Coneix quines són les necessitats alimentàries d'un gos? I d'un gat?
 - a. Sí
 - b. Conec les del gos
 - c. Conec les del gat
 - d. No les conec
- 20. Un gos és un animal:
 - a. Herbívor
 - b. Omnívor
 - c. Carnívor
- 21. Un gat és un animal:
 - a. Herbívor
 - b. Omnívor
 - c. Carnívor
- 22. Sabia que existeix alimentació vegetariana per a gos i gat? Sí / No
- 23. Si ho sabia, com va conèixer aquesta opció?
 - a. Amics, familiars o coneguts
 - b. Botiga d'animals
 - c. Veterinari
 - d. Internet
 - e. Altres

24. Li dóna alimentació vegetariana al seu gos o gat? Per què?
25. Quin tipus d'alimentació li dóna?
 - a. Pinso comercial:
 - b. Menjar casolà:
 - c. Altres:
26. Què opina d'alimentar amb menjar vegetarià un gos o un gat?
27. Què opina d'alimentar amb menjar vegetarià un gos o un gat si és per indicació del veterinari?
28. D'altres comentaris:

8.1.3. RESPOSTES REPRESENTATIVES DE LES PREGUNTES D'OPINIÓ OBERTA

Relació de les respostes més significatives de les respostes d'opinió oberta.

13. Li dóna alimentació vegetariana al seu gos o gat? Per què?

- No, perquè la seva dieta ha d'incloure carn.
- No. No sabia que existís i tampoc en tinc prou informació.
- No. Trobo que, tot i que ho respecto i ho entenc perfectament en una persona, un gos o un gat necessita nodrir-se al 100%, ja que no tenen ni raó ni culpa de com funcioni l'alimentació a partir d'animals avui dia, així que trobo que no és just que un gos o gat s'alimenti de dieta vegetariana perquè només es trobaria alimentat en un nivell subòptim i no ha estat una elecció seva.
- No, em sembla absurd que un animal carnívor mengi una dieta vegetal. En primer lloc perquè no és adequat per a l'espècie i en segon lloc perquè em sembla estúpid inculcar una dieta inadequada a un animal simplement per unes raons que en la majoria dels casos tenen origen en la 'moralitat' humana, que ens creiem en el dret de decidir què està bé i què no (què hem de menjar i què no); quan aquest és un sentiment que uns animals amb orígens carnívors (i caçadors) òbviament no comparteixen amb el propietari en qüestió.
- No, perquè són animals omnívors i carnívors.
- No, perquè va en contra de les seues característiques fisiològiques, pel que fa al seu aparell digestiu.

- “Mon chien aimait quelques légumes, aussi des fruits...” (Al meu gos li agraden algunes verdures, també els fruits)
- No. No em sembla lògic donar a un animal carnívor alimentació d'herbívor.
- No. Tant el gos com el gat són carnívors, tot i que el gos gairebé es pot considerar omnívor. Opino que no hem de canviar la natura dels animals.
- No. Crec que és insuficient i desequilibrada per a cobrir els requeriments bàsiques.
- No, perquè necessiten una font important de proteïna i no estic segura que un pinso vegetarià pugui assolir les seves necessitats, en especial en el gat que és un carnívor estricte.
- No, des de sempre l'hem alimentat amb pinso normal i li ha anat bé, mai ens hem plantejat una altra opció, no perquè ens hi neguéssim, sinó perquè no érem conscients tampoc del menjar vegetarià per gossos. Però un cop acostumat al mateix pinso durant anys, potser un canvi li aniria malament. Tot es pot provar.
- No, crec que les proteïnes i altres elements essencials que li pot proporcionar la carn animal no són del mateix valor que les que li pot proporcionar una alimentació vegetariana.
- “No. Confio más en otro tipo de piensos para la salud de mis animales”
- Li dono pinso normal, el qual ja duu certs ingredients vegetals, no és que els hi faci mal, però més aviat són carnívors, i mentre dugui les vitamines y aminoàcids necessaris ja m'està bé com estan alimentats, tot i que prefereixo que duguin carn. Sobretot en gat és important donar-li taurina, ja que no la produeixen.
- No, ja que intento que tinguin una alimentació equilibrada però seguint els seus orígens ancestrals
- No, perquè l'alimento a base de pinso pels motius següents:
 - M'ho ha recomanat el veterinari
 - Té tres mesos
 - No tinc coneixements suficients per a elaborar una dieta equilibrada per a gos
 - És més còmode

- No sóc vegetariana, per tant, no estic familiaritzada amb aquesta filosofia de vida. No hi estic en contra, al contrari, ho admiro. Crec que és un acte molt bonic de respecte cap a tot tipus de vida
- No, ja que intento que tinguin una alimentació equilibrada però seguint els seus orígens ancestrals
- No, perquè ho desconeixia
- No. Li dono productes amb alt contingut en carn animal. Si es possible amb poca quantitat o cap de cereals. Perquè entenc que, en estat salvatge, caçarien animals per a alimentar-se ambdues espècies.
- No tinc gos però, si en tingués, no li donaria a priori perquè no és la seva alimentació fisiològica.
- No, a menys que m'assegurés que conté tots els requeriments que necessita la meua mascota, amb la quantitat i qualitat (absorció i assimilació) que necessita.
- No, però m'agradaria. Cap conegut ni amic meu amb gos usa aquest menjar; d'altra banda, el meu veterinari tampoc me n'ha parlat. Agrairia que algú del meu entorn m'expliqués la seva experiència directa per tal de conèixer de primera mà els beneficis d'aquesta dieta.
- Mai m'ho he plantejat.
- No, perquè el gos pertany al grup dels animals carnívors i, com a tal, la seva dieta es bàsicament carnívora, exceptuant petites ingestes de vegetals i fruita. La seva anatomia està perfectament dissenyada per a menjar carn i triturar ossos, i els seus sucus gàstrics estan perfectament preparats per aquest tipus de digestió. Els pinsos convencionals porten cereals pels quals el gos no ha estat dissenyat per menjar i digerir, portant molts problemes mèdics de diferents tipologies. Per tant, als meus gossos els dono dos tipus de menjar el sec, pinso de gama alta bàsicament càrnic i dieta tova que consisteix en verdures fresques, fruita i molta carn i ossos sense cuinar.
- Sí, li dono alimentació vegetariana.

15. Què opina d'alimentar amb menjar vegetarià un gos o un gat?

- Em sembla bé.

- No m'ho he plantejat mai.
- No crec que siga beneficiós per a l'animal, ja que li estaríem privant de part dels nutrients que com a carnívor necessita en la seua dieta i que no es trobarien a aquests pinsos.
- Trobo que és anar en contra de la fisiologia de l'animal.
- Si no es adequat per a l'animal, no hi estic d'acord, sigui quines siguin les creences del amo.
- Penso que és alterar el seu hàbit alimentari i que pot portar-li problemes a la llarga.
- “Teniendo en cuenta que los gatos son supuestamente carnívoros estrictos por su neofobia alimenticia, me parece un poco... raro”.
- Una irresponsabilitat.
- Em sembla totalment incoherent, ja que son carnívors.
- No sabia que existia, però em sembla que no ho duria a terme. Són animals carnívors (el gos una mica omnívor), la seva alimentació no es pot basar en vegetals.
- Bé, sempre i quan tingui garanteixi una bona salut per a l'animal.
- Crec que és anar en contra de la seva naturalesa, en contra de la seva voluntat. Seria com una espècie de maltractament animal.
- Crec que possiblement, sigui més saludable, perquè els orígens i qualitat de la carn del pinso i menjars comercials son molt "indefinits".
- Jo no ho faria perquè són carnívors, i els carnívors mengen carn. No crec que el menjar vegetarià els hi pugui proporcionar una dieta equilibrada i que s'adapti a les seves necessitats metabòliques.
- “No se si sería beneficioso o perjudicial a la larga. Creo que les faltaría algun aporte que no daría el pienso vegetariano”.
- El mateix que per a humà. Ho respecto, però és una mica absurd. Cadascú s'ha d'alimentar amb el que millor li escau al seu organisme. És difícil suplir les necessitats amb tan sols menjar vegetarià, has de menjar més quantitats d'alguns aliments per a adquirir la mateixa proporció de proteïnes que adquiriries amb un sol tall de carn. S'ha de ser molt conscient i responsable a

l'hora de dur a terme la teva dieta. En un animal és difícil controlar-ho, i difícilment li pots explicar "mira, tu menges això, perquè no vull que mengis altres animals perquè pateixen en la producció"...

- Que no és el normal a la seva alimentació. Un gos o gat sans necessiten proteïna animal, davant certes patologies com hepàtica o renal la proteïna animal pot estar restringida, però considero que el gos o gat perquè estiguin saludables necessiten l'aportació de tots els aminoàcids essencials.
- Crec que es una parida, l'humà decideix ser vegetariana perquè vol o perquè en un determinat moment ha hagut de fer-se'n a la la força. No entenc perquè un animal que no entén èticament els valors del vegetarians hauria de fer-se vegetarianà.
- Em sembla propi d'una societat ostentosa.
- Una “pijada” dels postmoderns!
- Trobo que un animal sa no té perquè seguir aquesta alimentació, la seva dieta és una altra. A més, crec que no hem d'intentar humanitzar tant als animals. Ells no poden decidir per si sols i no trobo bé que nosaltres ho fem per ells.
- No estic en contra de que hi hagi persones que hi alimentin els seus animals, sempre i quan s'assegurin el menjà sigui complet. No es tracta de fer-nos tots vegetarians, sinó de reduir el consum de carn i fer-ne una producció sana i sostenible.
- Desconec l'anatomia i fisiologia del sistema digestiu d'un gos o gat per poder recolzar la meva opinió. Hi ha alguna teoria que relaciona la dentició amb el tipus d'alimentació, que segons aquesta es pot concloure de que l'alimentació d'un gos o gat hauria de ser predominantment carnívora, ja que majoritàriament en la seva dentadura trobem peces dentals de tipus canins, els quals tenen la funció de "desgarrar". En els humans els canins estan dotats d'una gran potència i possiblement deu ser igual en els gossos o gats. Per altra banda crec que si el seu sistema digestiu li permet l'absorció i assimilació de tots els nutrients necessaris, independentment de si són aliments de procedència animal o vegetal, seria totalment vàlida una alimentació vegetariana. Una alimentació vegetariana amb gran varietat de llegums, vegetals, cereals integrals, làctics i ous

no té perquè ser ni molt menys una alimentació desequilibrada. En els humans es coneixen els efectes perjudicials d'una dieta altament rica en proteïnes d'origen animal. Pot passar el mateix en gossos i gats!

- Molt bona idea. De fet, jo mateixa he intentat iniciar una dieta vegetariana i conec algunes iniciatives veganes (campanyes de conscienciació vers el maltractament animal, santuaris d'animals, etc.) que em resulten molt interessants, però per un problema de salut concret (tinc hipotiroidisme) hauria de fer-me un estudi exhaustiu abans d'iniciar-me a qualsevol de les dues dietes (vegetariana o vegana). D'altra banda, per motius ètics, considero que tots hauríem de plantejar-nos l'opció de ser vegetarians o vegans.
- Crec que la naturalesa de gossos o gats no és ser vegetarià, i per tant, malgrat que sigui possible aquesta possibilitat mitjançant suplements o pinso especial, no crec que sigui el més adient. Sobretot en cas dels gats.
- No hi estic d'acord, ja que crec que als animals de companyia se'ls ha d'intentar tenir en les condicions que més s'assemblin a les seves naturals (en la mesura que es pugui) no només per qüestions ètiques, sinó també per a cobrir les seves necessitats.
- Per a les persones crec que aquesta opció és molt encertada, i de fet me l'he plantejat en algunes ocasions. Però pel que fa als animals no crec que siga una bona opció, ja que cada animal ha de menjar allò que necessita, i no considere que excloure la carn de la dieta de gossos i gats siga adequat, és més, considere que pot arribar a ser una mica perillós o perjudicial per a l'animal. I que en cas que es fera, hauria de realitzar-se un acurat seguiment de l'animal amb revisions periòdiques per part del veterinari per veure si realment el seu organisme té tot allò que necessita seguint aquest tipus de dieta, i en cas contrari mirar de compensar-ho d'alguna altra manera.
- Doncs supose que com a qualsevol mamífer, la dieta vegetariana pura i estricta pot tindre algun inconvenient a l'hora d'aportar vitamines i minerals com el calci, ferro, zinc o com la vitamina B12. Per altra banda, la qualitat de les proteïnes que s'aporten dels cereals està disminuïda, el que pot causar una falta en el mamífer. D'altra banda, estos dèficits nutricionals poden causar malalties en el desenvolupament normal del mamífer com l'anèmia, degeneració dels nervis,

raquitisme, etc. En la meua opinió, la dieta vegetariana estricta no és bona per a cap mamífer, sempre hi ha dèficits i carències nutricionals.

- Trobo que és portar el vegetarianisme cap a un absurd. No li trobo lògica. Per què no pot menjar carn un gat o un gos?
- Una despesa innecessària.

16. Què opina d'alimentar amb menjar vegetarià un gos o un gat si és per indicació del veterinari?

- Si es per indicació del veterinari serà el millor per a l'animal i em sembla bé.
- Quin tipus d'indicació en un gos o gat ha de tenir una dieta vegetariana? Jo no en conec cap, així que penso exactament igual, que no és correcte.
- Si és destinat a un tractament d'una malaltia específica, potser si que és convenient proporcionar-li aquest tipus d'alimentació, sempre durant un període determinat, fins que es recuperi.
- Si fos per prescripció veterinària i no hi hagués més opció, acceptaria, però no per caprici humà.
- No m'ho creuria.
- Es pot donar el cas de que el veterinari digui que mengin vegetarià? Em sorprèn la pregunta.
- Si és el millor per l'animal perquè pateix alguna patologia, doncs perfecte.
- “Normalmente suelo hacerles caso, pero me debería argumentar la decisión y los beneficios que tiene para mis animales. No creo que tuviera inconveniente si es en beneficio de ellos, pero también habría que valorar el tema económico junto con las ventajas del cambio”.
- Tot dependria de l'afecció/malaltia/trastorn que tingués l'animal. I de si realment el nou "aliment" supleix correctament les necessitats de l'organisme.
- Si l'especialista ho considera oportú per alguna motiu en concret doncs probablement li faria cas.
- Que si és per prescripció mèdica llavors em plantejaria el tipus d'alimentació, però d'entrada, intentaria mantenir una dieta equilibrada basada en pinsos comercials, però de qualitat.

- Em sembla bé si és per prescripció mèdica, sempre que sigui el mateix veterinari que controli l'animal amb analítiques periòdiques.
- Com a propietari d'una mascota he de refiar-me del criteri del veterinari. Si ell creu que és convenient fer un canvi de dieta per motius de salut ho trobo bé.
- Per molts éssers humans una dieta vegetariana és més que no menjar productes d'origen animal. És un estil de vida. Una persona vegetariana no acceptaria sacrificar a un animal per al seu consum. Si l'amo o mestressa de l'animal té un estil de vida naturista, acceptarà sense cap problema una dieta vegetariana pel seu gos o gat. Passarà tot al contrari en persones que no segueixin un criteri naturista en elles mateixes. En aquest cas no crec que acceptin un menjar vegetarià per al seu gos o gat.
- Et veterinari s'equivoca.
- En el cas d'al·lèrgies alimentàries o qualsevol patologia intestinal, sí que trobo correcte el fet de donar una dieta vegetariana.

17. D'altres comentaris:

- No sabia que l'alimentació vegetariana s'apliqués en gossos i gats.
- No hauria de ser tan costós econòmicament tenir gos, gat... Això fa que molts animals estiguin descuidats i mal alimentats. S'hauria d'informar bé a la gen abans de deixar que adquireixin un animal. No són joguines ni la font d'enriquiment de ningú. Són éssers que mereixen més respecte de tots.
- En els mitjans de comunicació s'informa poc sobre aquesta alternativa per als propietaris d'animals. Jo vaig tenir coneixement per primer cop d'experiències vegetarianes o veganes a partir de la lectura de l'assaig "El filòsof i el llop", que recomano amb entusiasme!
- Pense que per molt internet, llibres, etc., no estem assabentats de tota la informació necessària perquè moltes vegades no volem.
- No m'agrada que s'humanitzin els animals.

8.2. Legislació completa d'alimentació animal

Pel que fa a llista d'additius, només s'inclouen les pàgines on consta la taurina

I

(Actos cuya publicación es una condición para su aplicabilidad)

REGLAMENTO (CE) N° 183/2005 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO**de 12 de enero de 2005****por el que se fijan requisitos en materia de higiene de los piensos****(Texto pertinente a efectos del EEE)**

EL PARLAMENTO EUROPEO Y EL CONSEJO DE LA UNIÓN EUROPEA,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea y, en particular, el apartado 2 de su artículo 37 y la letra b) del apartado 4 de su artículo 152,

Vista la propuesta de la Comisión,

Visto el dictamen del Comité Económico y Social Europeo ⁽¹⁾,

Previa consulta al Comité de las Regiones,

De conformidad con el procedimiento establecido en el artículo 251 del Tratado ⁽²⁾,

Considerando lo siguiente:

(1) La producción animal ocupa un lugar muy importante en el sector agrícola de la Comunidad. La obtención de resultados satisfactorios en esta actividad depende en gran medida de la utilización de piensos inocuos y de buena calidad.

(2) La consecución de un elevado nivel de protección de la salud humana y animal constituye uno de los objetivos fundamentales de la legislación alimentaria, tal y como se establece en el Reglamento (CE) n° 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria ⁽³⁾. En ese Reglamento se fijan asimismo otros principios y definiciones comunes para la legislación alimentaria nacional y comunitaria, incluido el objetivo de garantizar la libre circulación de los piensos dentro de la Comunidad.

(3) La Directiva 95/69/CE del Consejo ⁽⁴⁾ estableció los requisitos y normas aplicables a determinadas categorías de establecimientos e intermediarios del sector de la alimentación animal en el ejercicio de sus actividades. La experiencia ha demostrado que estos requisitos y estas normas constituyen una base sólida para garantizar la seguridad de los piensos. Esta Directiva también estableció requisitos para la autorización de los establecimientos que producen ciertas sustancias enumeradas en la Directiva 82/471/CEE del Consejo, de 30 de junio de 1982, relativa a determinados productos utilizados en la alimentación animal ⁽⁵⁾.

(4) La Directiva 98/51/CE de la Comisión, de 9 de julio de 1998, relativa a determinadas disposiciones de aplicación de la Directiva 95/69/CE del Consejo por la que se establecen los requisitos y las normas aplicables a la autorización y el registro de determinados establecimientos e intermediarios del sector de la alimentación animal ⁽⁶⁾, estableció determinadas disposiciones que incluían normas relativas a las importaciones procedentes de terceros países.

(5) La experiencia ha demostrado igualmente que es necesario velar por que todas las empresas de piensos, incluida la acuicultura, actúen de conformidad con requisitos de seguridad armonizados, y proceder a una revisión general para tener en cuenta la necesidad de garantizar un nivel más elevado de protección de la salud humana y animal y del medio ambiente.

(6) El objetivo principal de las nuevas normas en materia de higiene establecidas en el presente Reglamento es asegurar un elevado nivel de protección de los consumidores por lo que respecta a la seguridad de los alimentos y los piensos, teniendo en cuenta especialmente los siguientes principios:

a) el hecho de que los explotadores de empresas del sector son los principales responsables de la seguridad de los piensos;

⁽¹⁾ DO C 32 de 5.2.2004, p. 97.

⁽²⁾ Dictamen del Parlamento Europeo de 31 de marzo de 2004 (no publicado aún en el Diario Oficial) y Decisión del Consejo de 21 de diciembre de 2004.

⁽³⁾ DO L 31 de 1.2.2002, p. 1. Reglamento modificado por el Reglamento (CE) n° 1642/2003 (DO L 245 de 29.9.2003, p. 4).

⁽⁴⁾ DO L 332 de 30.12.1995, p. 15. Directiva cuya última modificación la constituye el Reglamento (CE) n° 806/2003 (DO L 122 de 16.5.2003, p. 1).

⁽⁵⁾ DO L 213 de 21.7.1982, p. 8. Directiva cuya última modificación la constituye el Reglamento (CE) n° 1882/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo (DO L 284 de 31.10.2003, p. 1).

⁽⁶⁾ DO L 208 de 24.7.1998, p. 43.

- b) la necesidad de garantizar la seguridad de los piensos a lo largo de toda la cadena alimentaria, desde la producción primaria de piensos hasta la alimentación de animales destinados a la producción de alimentos;
 - c) la aplicación generalizada de procedimientos basados en los principios del sistema de análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP) que, junto con la aplicación de buenas prácticas en materia de higiene, debe reforzar la responsabilidad de los explotadores de empresas de piensos;
 - d) el hecho de que las guías de buenas prácticas constituyen un valioso instrumento para ayudar a los explotadores de empresas del sector, a todos los niveles de la cadena de la alimentación animal, a cumplir las normas en materia de higiene de los piensos y a aplicar los principios HACCP;
 - e) la definición de criterios microbiológicos basados en criterios de riesgo científicos;
 - f) la necesidad de garantizar que los piensos importados tengan, como mínimo, un nivel equivalente al de los piensos producidos en la Comunidad.
- (7) Con objeto de lograr la plena aplicación del sistema de registro y autorización a todos los explotadores de empresas de piensos y, en consecuencia, garantizar la plena trazabilidad, conviene velar por que obtengan y utilicen piensos procedentes únicamente de establecimientos registrados y/o autorizados de conformidad con el presente Reglamento.
- (8) Se requiere un planteamiento integrado para garantizar la seguridad de los piensos desde la producción primaria de los piensos hasta su comercialización o exportación. La producción primaria de los piensos incluye los productos que se someten únicamente a tratamientos meramente físicos como la limpieza, el embalaje, el almacenamiento, el secado natural o el ensilado.
- (9) De conformidad con los principios de proporcionalidad y subsidiariedad, las normas comunitarias no deben aplicarse a ciertos casos de producción doméstica privada de piensos y alimentación de ciertos animales, ni al suministro directo, a escala local, de pequeñas cantidades de producción primaria de piensos por el productor a explotaciones agrícolas locales o a la venta al por menor de piensos para animales de compañía.
- (10) Para garantizar la consecución de los objetivos establecidos en el presente Reglamento, es preciso identificar y controlar adecuadamente los factores de peligro presentes en la producción primaria de piensos. Por consiguiente, los principios fundamentales de las normas recogidas en el presente Reglamento deben aplicarse a las explotaciones agrícolas que fabrican piensos destinados únicamente a las necesidades de su propia producción, así como a las explotaciones agrícolas que los comercializan. Es necesario tomar en consideración el hecho de que el riesgo es menor si los piensos se producen y utilizan para alimentar animales que sirven únicamente para el consumo doméstico o para animales que no se utilizan para la producción de alimentos. El comercio de pequeñas cantidades de productos de pienso a nivel local y la venta al por menor de alimentos para animales de compañía recibirán un trato especial en el marco del presente Reglamento.
- (11) La aplicación de los principios HACCP a la producción primaria de piensos es el objetivo a medio plazo de la legislación europea en materia de higiene. Sin embargo, las guías de buenas prácticas deben fomentar ya desde ahora el uso de requisitos apropiados en materia de higiene.
- (12) La seguridad de los piensos depende de diversos factores. La legislación debe fijar requisitos mínimos en materia de higiene y deben ponerse a punto controles oficiales para comprobar su cumplimiento por parte de los explotadores de empresas del sector. Además, éstos deben adoptar medidas o procedimientos que permitan alcanzar un nivel elevado de seguridad de los piensos.
- (13) Los principios HACCP pueden ayudar a los explotadores de empresas del sector a alcanzar un nivel más elevado de seguridad de los piensos. Estos principios no deben considerarse un mecanismo de autorregulación y no sustituyen a los controles oficiales.
- (14) La aplicación de los principios HACCP requiere la cooperación y el compromiso plenos de los trabajadores de las empresas de piensos.
- (15) A la hora de aplicar los principios HACCP a la producción de piensos deben tenerse en cuenta los principios establecidos en el *Codex Alimentarius*, previendo al mismo tiempo un margen de flexibilidad suficiente que permita su aplicación en cualquier tipo de situación. En ciertas empresas del sector no es posible identificar puntos críticos de control y, en algunos casos, el seguimiento de buenas prácticas puede reemplazar a la supervisión de estos puntos. Del mismo modo, el requisito de establecer «límites críticos», tal como está establecido en el *Codex Alimentarius*, no requiere que se fije un límite numérico en todos los casos. El requisito de conservar documentos, como está establecido en el mismo Código, debe aplicarse con cierta flexibilidad a fin de evitar cargas innecesarias para las empresas muy pequeñas. Se debe garantizar que las operaciones realizadas por una empresa de piensos en la producción primaria de piensos, incluidas las operaciones conexas y la mezcla de los piensos con piensos complementarios, exclusivamente para las necesidades de su explotación, no se vean obligadas a atenerse a los principios HACCP.

- (16) También es preciso prever un cierto grado de flexibilidad a fin de satisfacer las necesidades específicas de las empresas de piensos situadas en regiones con limitaciones geográficas especiales o por lo que se refiere al cumplimiento de requisitos estructurales. Sin embargo, esta flexibilidad no debe poner en peligro la consecución de los objetivos marcados en materia de higiene de los piensos. Se debe prever la posibilidad de celebrar debates, cuando proceda, en el Comité permanente de la cadena alimentaria y de sanidad animal.
- (17) Un sistema de registro y autorización de todas las empresas de piensos por parte de las autoridades competentes de los Estados miembros es apropiado para garantizar la trazabilidad de los productos desde el fabricante hasta el usuario final y facilitar la realización de controles oficiales eficaces. Con objeto de poner en marcha y de llevar a la práctica el sistema establecido en el presente Reglamento, la autoridad competente de los Estados miembros podrá utilizar los sistemas actuales para la recogida de datos relativos a las empresas de piensos.
- (18) Es conveniente que se mantenga un sistema de autorización de las empresas del sector para aquellas actividades que puedan entrañar un riesgo más elevado en la fabricación de piensos. Se deben prever procedimientos que permitan ampliar el actual ámbito de aplicación del sistema de autorización previsto actualmente en la Directiva 95/69/CE.
- (19) Como requisito previo a su autorización o registro, las empresas de piensos deben cumplir una serie de condiciones correspondientes a sus operaciones por lo que respecta a las instalaciones, el equipo, el personal, la producción, el control de la calidad, el almacenamiento y la documentación, a fin de garantizar tanto la inocuidad de los piensos como la trazabilidad de los productos. Debe preverse que dichas condiciones varíen para adecuarse a los diversos tipos de empresas de piensos. Se debe permitir que los Estados miembros concedan autorizaciones condicionales si en la inspección sobre el terreno se pone de manifiesto que el establecimiento cumple todos los requisitos de infraestructura y equipamiento. No obstante, también es adecuado fijar un plazo máximo de dicha autorización condicional.
- (20) Deben preverse disposiciones que permitan la suspensión temporal, la modificación o la revocación del registro o de la autorización en caso de que los establecimientos modifiquen o pongan fin a sus actividades, o dejen de cumplir las condiciones aplicables a estas.
- (21) La trazabilidad de los piensos y de sus ingredientes a lo largo de la cadena de la alimentación animal es un factor esencial para garantizar su inocuidad. El Reglamento (CE) n° 178/2002 contiene normas destinadas a garantizar la trazabilidad de los piensos y de sus ingredientes y prevé un procedimiento para la adopción de normas de ejecución aplicables a sectores específicos.
- (22) Sucesivas crisis relacionadas con los piensos han puesto de manifiesto que un fallo en cualquiera de las fases de la cadena de la alimentación animal puede tener consecuencias económicas importantes. Las características de la producción de piensos y la complejidad inherente al circuito de distribución de éstos implican que sea difícil la retirada de los piensos del mercado. El coste que supone reparar los daños económicos ocasionados a lo largo de la cadena de la alimentación humana y animal se sufraga a menudo con cargo a fondos públicos. Se podrían reparar mejor estas consecuencias económicas, a bajo coste para la sociedad, haciendo recaer la responsabilidad económica en el explotador cuya actividad cause un daño económico en el sector de la alimentación animal. Sin embargo, puede no resultar viable o adecuado establecer un sistema general obligatorio de responsabilidad económica y de garantía financiera, por ejemplo mediante seguros, que se aplique a todos los explotadores de empresas de piensos. Por lo tanto, la Comisión debe estudiar esta cuestión con mayor detenimiento, teniendo en cuenta las disposiciones de la legislación actual respecto de la responsabilidad en otros ámbitos, así como los sistemas y las prácticas existentes en los Estados miembros. Con este fin, la Comisión debe presentar un informe, acompañado en su caso de propuestas legislativas.
- (23) Los piensos importados en la Comunidad deben cumplir los requisitos generales establecidos en el Reglamento (CE) n° 178/2002 y las condiciones de importación establecidas en el Reglamento (CE) n° 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, sobre los controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales ⁽¹⁾. Con objeto de evitar perturbaciones del mercado, es adecuado que, hasta que se lleven a término las medidas de aplicación, sigan autorizándose las importaciones en las condiciones establecidas en la Directiva 98/51/CE.
- (24) Los productos comunitarios exportados a terceros países deben cumplir los requisitos generales establecidos en el Reglamento (CE) n° 178/2002.
- (25) Conviene hacer extensivo el ámbito de aplicación del sistema de alerta rápida para alimentos y piensos establecido por el Reglamento (CE) n° 178/2002 a los riesgos para la salud animal o el medio ambiente derivados de piensos utilizados para animales no destinados a la producción de alimentos.
- (26) La legislación comunitaria en materia de higiene de los piensos debe sustentarse en consideraciones científicas. A tal fin, debe consultarse a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria siempre que sea necesario.
- (27) Para poder tener en cuenta los avances técnicos y científicos, la Comisión y los Estados miembros deben cooperar estrecha y eficazmente en el Comité permanente de la cadena alimentaria y de sanidad animal.

⁽¹⁾ DO L 165 de 30.4.2004, p. 1 (corregido en el DO L 191 de 28.5.2004, p. 1).

- (28) El presente Reglamento tiene en cuenta las obligaciones internacionales establecidas en el Acuerdo sobre medidas sanitarias y fitosanitarias de la OMC y las normas internacionales de seguridad alimentaria que figuran en el *Codex Alimentarius*.
- (29) Los Estados miembros deben establecer reglas sobre las sanciones aplicables en caso de incumplimiento de las disposiciones del presente Reglamento y velar por su ejecución. Estas sanciones deben ser eficaces, proporcionadas y disuasorias.
- (30) Procede aprobar las medidas necesarias para la aplicación del presente Reglamento con arreglo a la Decisión 1999/468/CE del Consejo, de 28 de junio de 1999, por la que se establecen los procedimientos para el ejercicio de las competencias de ejecución atribuidas a la Comisión ⁽¹⁾,
- (31) Conviene aplazar la fecha de aplicación del Reglamento para dar a las empresas de piensos afectadas tiempo suficiente para adaptarse al mismo.
- (32) Por las razones señaladas deben derogarse las Directivas 95/69/CE y 98/51/CE.

HAN ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

CAPÍTULO I

OBJETO, ÁMBITO DE APLICACIÓN Y DEFINICIONES

Artículo 1

Objeto

En el presente Reglamento se establecen:

- a) normas generales en materia de higiene de los piensos;
- b) condiciones y mecanismos que garanticen la trazabilidad de los piensos;
- c) condiciones y mecanismos para el registro y la autorización de los establecimientos.

Artículo 2

Ámbito de aplicación

- 1. El presente Reglamento se aplicará a:
 - a) las actividades de los explotadores de empresas de piensos en todas las etapas del proceso, desde la producción primaria de piensos hasta su comercialización;

⁽¹⁾ DO L 184 de 17.7.1999, p. 23.

- b) la alimentación de los animales destinados a la producción de alimentos;
- c) las importaciones y las exportaciones de piensos procedentes de y destinados a terceros países.

2. El presente Reglamento no se aplicará a:

- a) la producción doméstica de piensos para su utilización en la alimentación de:
 - i) animales destinados a la producción de alimentos para consumo propio,
 - y
 - ii) animales no destinados a la producción de alimentos;
- b) la alimentación de animales destinados a la producción de alimentos para consumo propio o a las actividades mencionadas en la letra c) del apartado 2 del artículo 1 del Reglamento (CE) n° 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios ⁽²⁾;

- c) la alimentación de animales no destinados a la producción de alimentos;
- d) el suministro directo, a nivel local, de pequeñas cantidades de producción primaria de piensos por el productor a explotaciones agrícolas locales para su utilización en dichas explotaciones agrícolas;
- e) la venta al por menor de piensos para animales de compañía.

- 3. Los Estados miembros podrán establecer normas y directrices para regular las actividades consideradas en el apartado 2. Estas normas y directrices nacionales garantizarán la consecución de los objetivos del presente Reglamento.

Artículo 3

Definiciones

A efectos del presente Reglamento, se aplicarán las definiciones que figuran en el Reglamento (CE) n° 178/2002, a reserva de las definiciones específicas siguientes:

- a) «higiene de los piensos»: las medidas y condiciones necesarias para controlar los peligros y garantizar la aptitud para el consumo animal de un pienso, teniendo en cuenta su utilización prevista;

⁽²⁾ DO L 139 de 30.4.2004, p. 1 (corregido en el DO L 226 de 25.6.2004, p. 3).

- b) «explotador de empresa de piensos»: la persona física o jurídica responsable de asegurar el cumplimiento de los requisitos del presente Reglamento en la empresa de piensos bajo su control;
- c) «aditivos para piensos»: las sustancias o los microorganismos autorizados en virtud del Reglamento (CE) n° 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003, sobre los aditivos en la alimentación animal ⁽¹⁾;
- d) «establecimiento»: cualquier unidad de una empresa de piensos;
- e) «autoridad competente»: la autoridad de un Estado miembro o de un país tercero designada para llevar a cabo controles oficiales;
- f) «producción primaria de piensos»: la producción de productos agrícolas, incluido, en particular, el cultivo, la cosecha, el ordeño y la cría de animales (antes de ser sacrificados) o la actividad pesquera, que únicamente den como resultado productos que no se sometan a ninguna otra operación tras su cosecha, recogida o captura, exceptuando el tratamiento meramente físico.

CAPÍTULO II

OBLIGACIONES

Artículo 4

Obligaciones generales

1. Los explotadores de empresas de piensos garantizarán que todas las etapas de producción, transformación y distribución que tienen lugar bajo su control se lleven a cabo de conformidad con la legislación comunitaria, la legislación nacional compatible con ella y las buenas prácticas, y en particular garantizarán que cumplan los requisitos pertinentes en materia de higiene que establece el presente Reglamento.
2. Al alimentar animales destinados a la producción de alimentos, los agricultores deberán adoptar medidas y procedimientos para mantener al nivel más bajo que pueda alcanzarse razonablemente el riesgo de contaminación biológica, química y física de los piensos, los animales y los productos de origen animal.

Artículo 5

Obligaciones específicas

1. Para las operaciones en el ámbito de la producción primaria de piensos y las siguientes operaciones asociadas:

- a) el transporte, el almacenamiento y la manipulación de productos primarios en el lugar de producción,
- b) las operaciones de transporte para entregar los productos primarios del lugar de producción a un establecimiento;
- c) la mezcla de piensos exclusivamente para las necesidades de su explotación sin utilizar aditivos ni premezclas de aditivos con excepción de los aditivos de ensilado,

los explotadores de empresas de piensos deberán cumplir las disposiciones del anexo I cuando sean pertinentes para las operaciones que se lleven a cabo.

2. Para las operaciones no consideradas en el apartado 1, incluida la mezcla de piensos exclusivamente para las necesidades de su explotación cuando se utilicen aditivos o premezclas de aditivos con excepción de los aditivos de ensilado, los explotadores de empresas de piensos deberán cumplir las disposiciones del anexo II cuando sean pertinentes para las operaciones que se lleven a cabo.

3. Los explotadores de empresas de piensos deberán:

- a) cumplir criterios microbiológicos específicos;
- b) adoptar las medidas o los procedimientos necesarios para alcanzar objetivos específicos.

Los criterios y los objetivos específicos mencionados en las letras a) y b) se adoptarán de conformidad con el procedimiento previsto en el apartado 2 del artículo 31.

4. Los explotadores de empresas de piensos podrán utilizar las guías a las que se hace referencia en el capítulo III como ayuda con vistas al cumplimiento de las obligaciones que les incumben en virtud del presente Reglamento.

5. Al alimentar animales destinados a la producción de alimentos, los agricultores deberán cumplir las disposiciones del anexo III.

⁽¹⁾ DO L 268 de 18.10.2003, p. 29.

6. Los explotadores de empresas de piensos y agricultores deberán obtener y utilizar únicamente los piensos procedentes de los establecimientos registrados y/o autorizados con arreglo al presente Reglamento.

Artículo 6

Sistema de análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP)

1. Los explotadores de empresas de piensos que lleven a cabo operaciones no consideradas en el apartado 1 del artículo 5 deberán poner a punto, aplicar y mantener uno o varios procedimientos escritos permanentes basados en los principios HACCP.

2. Los principios a los que se hace referencia en el apartado 1 son los siguientes:

- a) identificar cualquier peligro que deba evitarse, eliminarse o reducirse a niveles aceptables;
- b) determinar los puntos críticos de control en la etapa o etapas en las que un control sea indispensable para evitar o eliminar un peligro o reducirlo a niveles aceptables;
- c) establecer límites críticos en los puntos críticos de control que diferencien la aceptabilidad de la inaceptabilidad para la prevención, eliminación o reducción de los peligros identificados;
- d) establecer y aplicar procedimientos de supervisión eficaces en los puntos críticos de control;
- e) establecer medidas correctoras cuando de la supervisión se desprenda que un punto crítico no está controlado;
- f) establecer procedimientos para verificar que las medidas indicadas en las letras a) a e) son completas y eficaces; los procedimientos de verificación se llevarán a cabo regularmente;
- g) establecer documentos y registros en función de la naturaleza y el tamaño de las empresas de piensos a fin de demostrar la aplicación efectiva de las medidas indicadas en las letras a) a f).

3. En caso de modificación en el producto, el proceso, o cualquier etapa de producción, transformación, almacenamiento y distribución, los explotadores de empresas de piensos deberán revisar su procedimiento e introducir los cambios necesarios.

4. En el marco del sistema de procedimientos indicado en el apartado 1, los explotadores de empresas de piensos podrán utilizar guías de buenas prácticas junto con guías para la aplicación de los principios HACCP, elaboradas de conformidad con lo dispuesto en el artículo 20.

5. Podrán adoptarse medidas para facilitar la aplicación del presente artículo, también para las pequeñas empresas, de conformidad con el procedimiento previsto en el apartado 2 del artículo 31.

Artículo 7

Documentos relativos al sistema HACCP

1. Los explotadores de empresas de piensos deberán:

- a) acreditar ante la autoridad competente, en la forma que esta disponga, que cumplen lo dispuesto en el artículo 6;
- b) garantizar que todos los documentos que describen los procedimientos establecidos de conformidad con el artículo 6 estén actualizados en todo momento.

2. La autoridad competente deberá tener en cuenta la naturaleza y el tamaño de la empresa de piensos al fijar los requisitos de forma a los que se hace referencia en la letra a) del apartado 1.

3. Podrán adoptarse disposiciones detalladas para la aplicación del presente artículo con arreglo al procedimiento previsto en el apartado 2 del artículo 31. Dichas disposiciones podrían ayudar a ciertos explotadores de empresas de piensos a aplicar los principios HACCP desarrollados de conformidad con el capítulo III con vistas al cumplimiento de los requisitos establecidos en el apartado 1 del artículo 6.

Artículo 8

Garantías financieras

1. Con objeto de prepararse para un sistema eficaz de garantías financieras para los explotadores de empresas de piensos, la Comisión presentará al Parlamento Europeo y al Consejo, a más tardar el 8 de febrero de 2006, un informe sobre las garantías financieras en el sector de los piensos. Dicho informe, además de examinar las disposiciones legales, los sistemas y las prácticas nacionales existentes en materia de responsabilidad en el sector de los piensos y sectores conexos, irá acompañado en su caso de propuestas legislativas relativas a dicho sistema de garantías viable y factible a escala de la Comunidad. Estas garantías deberían cubrir todos los costes de los que los explotadores podrían ser considerados responsables como consecuencia directa de la retirada del mercado, tratamiento y/o destrucción de cualquier pienso o animal y de cualquier alimento elaborado a partir de ellos.

2. Los explotadores de empresas de piensos serán responsables de cualesquiera infracciones de la legislación pertinente en materia de seguridad de los piensos; los explotadores, en el sentido del apartado 2 del artículo 5, presentarán pruebas de que están cubiertos por las garantías financieras exigidas por las medidas legislativas comunitarias a que se refiere el apartado 1.

Artículo 9

Controles oficiales, notificación y registro

1. Los explotadores de empresas de piensos deberán cooperar con las autoridades competentes, de conformidad con las disposiciones legislativas comunitarias pertinentes y con la legislación nacional compatible con ellas.

2. Los explotadores de empresas de piensos deberán:

- a) notificar a la autoridad competente de la que dependan, en la forma requerida por ésta, todos los establecimientos bajo su control que intervengan en cualquiera de las etapas de producción, transformación, almacenamiento, transporte o distribución de piensos, con vistas a su inscripción en un registro;
- b) facilitar a la autoridad competente información actualizada sobre todos los establecimientos bajo su control indicados en la letra a), debiendo notificarle, en particular, cualquier modificación significativa de sus actividades o el cierre de cualquier establecimiento existente.

3. La autoridad competente llevará uno o varios registros de establecimientos.

Artículo 10

Autorización de establecimientos de empresas de piensos

Los explotadores de empresas de piensos garantizarán que los establecimientos bajo su control que entren en el ámbito de aplicación del presente Reglamento dispongan de una autorización otorgada por la autoridad competente, siempre que:

- 1) dichos establecimientos realicen una de las actividades siguientes:
 - a) fabricar y/o comercializar alguno de los piensos contemplados en el Reglamento (CE) n° 1831/2003 o de los productos indicados en la Directiva 82/471/CEE y a los que se hace referencia en el capítulo 1 del anexo IV del presente Reglamento;

- b) fabricar y/o comercializar premezclas que utilicen los aditivos para piensos a que se hace referencia en el capítulo 2 del anexo IV del presente Reglamento;

- c) fabricar para la comercialización o producir exclusivamente para las necesidades de su explotación piensos compuestos que utilicen aditivos para piensos o premezclas que contengan aditivos para piensos y a los que se hace referencia en el capítulo 3 del anexo IV del presente Reglamento;

- 2) así lo requiera la legislación nacional del Estado miembro en el que esté ubicado el establecimiento,

o

- 3) así lo requiera un Reglamento adoptado de conformidad con el procedimiento previsto en el apartado 2 del artículo 31.

Artículo 11

Requisitos

Para poder ejercer sus actividades profesionales, los explotadores de empresas de piensos deberán:

- a) estar inscritos en un registro, tal y como se establece en el artículo 9,

o

- b) contar con una autorización, cuando así se requiera de conformidad con el artículo 10.

Artículo 12

Información sobre las normas nacionales de autorización

Los Estados miembros cuya legislación nacional requiera la autorización, con arreglo al apartado 2 del artículo 10, de ciertos establecimientos ubicados en su territorio deberán informar a la Comisión y a los demás Estados miembros de las normas nacionales aplicables.

Artículo 13

Autorización de establecimientos

1. La autoridad competente sólo autorizará un establecimiento cuando de una inspección sobre el terreno previa al inicio de la actividad se desprenda que cumple los requisitos del presente Reglamento que les son aplicables.

2. La autoridad competente podrá conceder una autorización condicional si en la inspección sobre el terreno se pone de manifiesto que el establecimiento cumple todos los requisitos de infraestructura y equipamiento. Únicamente concederá la autorización plena si en una nueva inspección sobre el terreno efectuada al cabo de tres meses de la autorización condicional comprueba que el establecimiento cumple los demás requisitos previstos en el apartado 1. Si se han producido claros progresos pero el establecimiento todavía no cumple todos estos requisitos, la autoridad competente podrá prorrogar la autorización condicional. No obstante, la duración total de esta última no será superior a seis meses.

Artículo 14

Suspensión del registro o de la autorización

La autoridad competente suspenderá temporalmente el registro o la autorización de un establecimiento para una, varias o todas sus actividades, si se demuestra que ha dejado de cumplir las condiciones aplicables a esas actividades.

La suspensión durará hasta que el establecimiento vuelva a cumplir dichas condiciones. En caso de que no se cumplan en el plazo de un año, se aplicará el artículo 15.

Artículo 15

Revocación del registro o de la autorización

La autoridad competente revocará el registro o la autorización de un establecimiento para una o varias de sus actividades, en caso de que:

- a) el establecimiento cese en una o varias de sus actividades;
- b) se demuestre que no ha cumplido las condiciones aplicables a sus actividades durante un período de un año;
- c) observe deficiencias graves o haya tenido que interrumpir de manera reiterada la producción en un establecimiento y el explotador de la empresa de piensos no pueda todavía ofrecer garantías adecuadas con respecto a la producción futura.

Artículo 16

Modificaciones del registro o de la autorización de un establecimiento

La autoridad competente modificará, previa solicitud, el registro o la autorización de un establecimiento si éste ha demostrado su capacidad para dedicarse a actividades que complementen o reemplacen aquéllas para las cuales había sido inicialmente registrado o autorizado.

Artículo 17

Exención relativa a las inspecciones sobre el terreno

1. Los Estados miembros estarán exentos de la obligación de llevar a cabo las inspecciones sobre el terreno previstas en el artículo 13 en aquellas empresas de piensos que actúen únicamente en calidad de comerciantes sin tener nunca el producto en sus locales.
2. Estas empresas presentarán a la autoridad competente una declaración, en la forma definida por la autoridad competente, en la que confirmarán que los piensos comercializados por ellas cumplen las condiciones del presente Reglamento.

Artículo 18

Medidas transitorias

1. Los establecimientos y los intermediarios autorizados y/o registrados de conformidad con la Directiva 95/69/CE podrán proseguir sus actividades a condición de que presenten a la autoridad competente de la zona en la que estén situadas sus instalaciones una notificación a tal efecto, a más tardar el 1 de enero de 2006.
2. Los establecimientos y los intermediarios que no requieran registro ni autorización de conformidad con la Directiva 95/69/CE, pero que deban ser registrados de conformidad con el presente Reglamento, podrán proseguir sus actividades a condición de que presenten a la autoridad competente de la zona en la que estén situadas sus instalaciones una solicitud de registro, a más tardar el 1 de enero de 2006.
3. A más tardar el 1 de enero de 2008, los solicitantes deberán declarar, en la forma definida por la autoridad competente, que se han cumplido las condiciones estipuladas en el presente Reglamento.
4. Las autoridades competentes tendrán en cuenta los sistemas ya existentes para la recogida de datos y pedirán al notificador o solicitante que facilite sólo la información suplementaria que sea necesaria para garantizar el cumplimiento de las condiciones del presente Reglamento. En particular, las autoridades competentes podrán considerar como una solicitud con arreglo al apartado 2 una notificación con arreglo al artículo 6 del Reglamento (CE) n° 852/2004.

Artículo 19

Lista de establecimientos registrados o autorizados

1. Para cada actividad, la autoridad competente inscribirá en una o varias listas nacionales los establecimientos que haya autorizado de conformidad con el artículo 9.

2. Los establecimientos autorizados por la autoridad competente conforme al artículo 13 se inscribirán en una lista nacional con un número de identificación individual.

3. Los Estados miembros mantendrán actualizadas las inscripciones de los establecimientos que figuran en las listas indicadas en los apartados 1 y 2 en función de las decisiones de suspensión, revocación o modificación del registro o de la autorización contempladas en los artículos 14, 15 y 16.

4. La lista contemplada en el apartado 2 deberá elaborarse siguiendo el modelo que figura en el capítulo I del anexo V.

5. El número de identificación al que se hace referencia en el apartado 2 tendrá la forma prevista en el capítulo II del anexo V.

6. La Comisión consolidará y pondrá a disposición del público aquella parte de la lista de los Estados miembros que incluya los establecimientos mencionados en el apartado 2 por primera vez en noviembre de 2007 y posteriormente, a más tardar el 30 de noviembre de cada año. La lista consolidada tendrá en cuenta las modificaciones introducidas a lo largo del año.

7. Los Estados miembros pondrán a disposición del público las listas de establecimientos a que se refiere el apartado 1.

CAPÍTULO III

GUÍAS DE BUENAS PRÁCTICAS

Artículo 20

Elaboración, difusión y utilización de guías

1. La Comisión fomentará la elaboración de guías comunitarias de buenas prácticas en el sector de la alimentación animal, así como para la aplicación de los principios HACCP, de conformidad con lo dispuesto en el artículo 22.

Cuando sea necesario, los Estados miembros fomentarán la elaboración de guías nacionales con arreglo a lo dispuesto en el artículo 21.

2. Las autoridades competentes fomentarán la difusión y la utilización de guías nacionales y comunitarias.

3. Sin embargo, la utilización de estas guías por los explotadores de empresas de piensos tendrá carácter voluntario.

Artículo 21

Guías nacionales

1. Cuando se elaboren las guías nacionales de buenas prácticas, serán elaboradas y difundidas por la industria de alimentos para animales:

a) en consulta con los representantes de las partes cuyos intereses puedan verse afectados de manera sustancial, como por ejemplo las autoridades competentes y las asociaciones de consumidores;

b) teniendo en cuenta los códigos de prácticas pertinentes del *Codex Alimentarius*,

y

c) teniendo en cuenta las recomendaciones que figuran en el anexo I, cuando se refieran a la producción primaria de piensos.

2. Los Estados miembros examinarán las guías nacionales para garantizar que:

a) se han elaborado de conformidad con lo dispuesto en el apartado 1;

b) su contenido puede ser puesto en práctica en los sectores a los que se refieren,

y

c) son idóneas para asegurar el cumplimiento de las disposiciones de los artículos 4, 5 y 6 en los sectores y/o para los piensos a los que se refieren.

3. Los Estados miembros remitirán a la Comisión las guías nacionales.

4. La Comisión llevará y gestionará un sistema de registro de dichas guías y lo pondrá a disposición de los Estados miembros.

Artículo 22

Guías comunitarias

1. Antes de proceder a la elaboración de guías comunitarias de buenas prácticas en materia de higiene, la Comisión consultará al Comité indicado en el apartado 1 del artículo 31. El objeto de esta consulta será estudiar la conveniencia de elaborar dichas guías, así como su alcance y su contenido.

2. En caso de que se confeccionen las guías comunitarias, la Comisión garantizará que sean elaboradas y difundidas:

- a) por, o en consulta con, representantes pertinentes de los sectores europeos de la industria de piensos y otras partes interesadas, como las organizaciones de consumidores;
- b) en colaboración con las partes cuyos intereses puedan verse afectados de manera sustancial, incluidas las autoridades competentes.

3. Las guías comunitarias serán elaboradas y difundidas teniendo en cuenta:

- a) los códigos de prácticas pertinentes del *Codex Alimentarius*,

y
- b) cuando conciernan a la producción primaria de piensos, los requisitos establecidos en el anexo I.

4. El Comité indicado en el apartado 1 del artículo 31 examinará los proyectos de guías comunitarias para garantizar que:

- a) se han elaborado de conformidad con lo dispuesto en los apartados 2 y 3;
- b) su contenido puede ser puesto en práctica en toda la Comunidad en los sectores a los que se refieren,

y
- c) son idóneos para asegurar el cumplimiento de las disposiciones de los artículos 4, 5 y 6 en los sectores y/o para los piensos a los que se refieren.

5. La Comisión invitará periódicamente al Comité indicado en el apartado 1 del artículo 31 a que revise las guías comunitarias preparadas de conformidad con el presente artículo, en cooperación con las instancias a las que se hace referencia en el apartado 2 del presente artículo. El propósito de dicha revisión consistirá en garantizar que las guías siguen siendo viables y tener en cuenta los progresos tecnológicos y científicos.

6. Los títulos y las referencias a las guías comunitarias preparadas de conformidad con el presente artículo se publicarán en la serie C del *Diario Oficial de la Unión Europea*.

CAPÍTULO IV

IMPORTACIONES Y EXPORTACIONES

Artículo 23

Importaciones

1. Los explotadores de empresas de piensos que importen piensos procedentes de terceros países garantizarán que sólo se realicen importaciones si se cumplen las siguientes condiciones:

- a) el tercer país de expedición figura en una lista, elaborada de conformidad con el artículo 48 del Reglamento (CE) n° 882/2004, de terceros países desde los cuales se permiten las importaciones de piensos;
- b) el establecimiento de expedición figura en una lista, elaborada y actualizada por el país tercero de conformidad con el artículo 48 del Reglamento (CE) n° 882/2004, de establecimientos desde los cuales se permiten las importaciones de piensos;
- c) los piensos se produjeron en un establecimiento de expedición o en otro establecimiento inscrito en la lista indicada en la letra b) o en la Comunidad,

y

d) los piensos cumplen:

- i) los requisitos establecidos en el presente Reglamento y en cualquier otra legislación comunitaria por la que se establezcan normas para los piensos,

o

- ii) condiciones que la Comunidad considere al menos equivalentes,

o

- iii) cuando exista un acuerdo específico entre la Comunidad y el país exportador, los requisitos que figuran en él.

2. Podrá adoptarse un modelo de certificado de importación de conformidad con el procedimiento previsto en el apartado 2 del artículo 31.

Artículo 24

Medidas provisionales

No obstante lo dispuesto en el artículo 33 y hasta que finalice la elaboración de las listas previstas en las letras a) y b) del apartado 1 del artículo 23, las importaciones seguirán siendo autorizadas conforme a las condiciones establecidas en el artículo 6 de la Directiva 98/51/CE.

Artículo 25

Exportaciones

Los piensos, incluidos los piensos para animales no destinados a la producción de alimentos, producidos en la Comunidad y destinados al mercado de los terceros países, deberán cumplir las disposiciones del artículo 12 del Reglamento (CE) n° 178/2002.

CAPÍTULO V

DISPOSICIONES FINALES

Artículo 26

Medidas de aplicación

Podrán establecerse medidas de aplicación de conformidad con el procedimiento previsto en el apartado 2 del artículo 31.

Artículo 27

Modificación de los anexos I, II, y III

Los anexos I, II y III podrán ser modificados de conformidad con el procedimiento previsto en el apartado 2 del artículo 31, a fin de tener en cuenta:

- a) la elaboración de guías de buenas prácticas;
- b) la experiencia adquirida en la aplicación de sistemas basados en los principios HACCP de conformidad con el artículo 6;
- c) los progresos tecnológicos;
- d) los dictámenes científicos, particularmente nuevas evaluaciones de riesgos;
- e) el establecimiento de objetivos específicos en materia de seguridad de los piensos,
- y
- f) el desarrollo de requisitos relacionados con operaciones específicas.

Artículo 28

Exenciones a los anexos I, II, y III

Podrán concederse exenciones a los anexos I, II y III de conformidad con el procedimiento previsto en el apartado 2 del artículo 31, por razones particulares, a condición de que dichas exenciones no pongan en peligro la consecución de los objetivos del presente Reglamento.

Artículo 29

Sistema de alerta rápida

Cuando un pienso determinado, incluidos los piensos para animales no destinados a la producción de alimentos, represente un riesgo grave para la salud humana o animal o para el medio ambiente, se aplicará el artículo 50 del Reglamento (CE) n° 178/2002, *mutatis mutandis*.

Artículo 30

Sanciones

Los Estados miembros establecerán las normas relativas a las sanciones aplicables en caso de infracción del presente Reglamento y tomarán las medidas necesarias para garantizar su aplicación. Las sanciones establecidas deberán ser eficaces, proporcionadas y disuasorias. Los Estados miembros notificarán esas disposiciones a la Comisión a más tardar el 8 de febrero de 2007 y le informarán sin demora de cualquier modificación posterior de las mismas.

Artículo 31

Procedimiento de Comité

1. La Comisión estará asistida por el Comité permanente de la cadena alimentaria y de sanidad animal creado por el Reglamento (CE) n° 178/2002 (en lo sucesivo denominado «el Comité»).

2. En los casos en que se haga referencia al presente apartado, serán de aplicación los artículos 5 y 7 de la Decisión 1999/468/CE, observando lo dispuesto en su artículo 8.

El plazo contemplado en el apartado 6 del artículo 5 de la Decisión 1999/468/CE queda fijado en tres meses.

3. El Comité aprobará su reglamento interno.

Artículo 32

Consulta a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

La Comisión consultará con la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria cualquier cuestión que entre dentro del ámbito de competencia del presente Reglamento y que pueda tener una incidencia significativa sobre la salud pública y, en particular, antes de proponer criterios u objetivos específicos de conformidad con el apartado 3 del artículo 5.

Artículo 33

Derogación

Quedan derogadas, sin perjuicio de las obligaciones de los Estados miembros en lo tocante a los plazos de incorporación a su legislación, y con efecto a partir del 1 de enero de 2006, las Directivas siguientes:

- a) Directiva 95/69/CE del Consejo;
- b) Directiva 98/51/CE de la Comisión.

Artículo 34

Entrada en vigor

El presente Reglamento entrará en vigor el día de su publicación en el *Diario Oficial de la Unión Europea*.

Será aplicable a partir del 1 de enero de 2006.

El presente Reglamento será obligatorio en todos sus elementos y directamente aplicable en cada Estado miembro.

Hecho en Estrasburgo, el 12 de enero de 2005.

Por el Parlamento Europeo
El Presidente
J. P. BORRELL FONTENELLES

Por el Consejo
El Presidente
N.SCHMIT

ANEXO I

PRODUCCIÓN PRIMARIA

PARTE A

Requisitos aplicables a las empresas de piensos por lo que respecta a la producción primaria de piensos a que se refiere el apartado 1 del artículo 5

I. Disposiciones sobre higiene

1. Los explotadores de empresas de piensos responsables de la producción primaria de piensos deberán garantizar que las operaciones se gestionen y pongan en práctica de manera que se puedan prevenir, eliminar o reducir al mínimo los peligros que puedan afectar a la seguridad de los piensos.
2. Los explotadores de empresas de piensos deberán garantizar, en la medida de lo posible, que los productos primarios producidos, preparados, limpiados, embalados, almacenados y transportados bajo su responsabilidad estén protegidos contra la contaminación y el deterioro.
3. Los explotadores de empresas de piensos deberán cumplir las obligaciones impuestas en los puntos 1 y 2 ajustándose a las disposiciones legislativas nacionales y comunitarias pertinentes relativas al control de los peligros, en particular:
 - i) las medidas destinadas a controlar la contaminación peligrosa como la procedente del aire, el suelo, el agua, los fertilizantes, los productos fitosanitarios, los biocidas, los medicamentos veterinarios y la manipulación y eliminación de residuos,
 - y
 - ii) las medidas relativas a los aspectos fitosanitarios, la salud animal y el medio ambiente que tengan efectos sobre la seguridad de los piensos, incluidos los programas de vigilancia y control de las zoonosis y de los agentes zoonóticos.
4. Cuando proceda, los explotadores de empresas de piensos adoptarán medidas apropiadas para, en particular:
 - a) mantener limpios y, siempre que sea necesario una vez limpios, desinfectar de forma adecuada las instalaciones, el equipo, los contenedores, los cajones de embalaje y los vehículos utilizados en la producción, la preparación, la clasificación, el embalaje, el almacenamiento y el transporte de piensos;
 - b) garantizar, siempre que sea necesario, condiciones higiénicas en la producción, el transporte y el almacenamiento de los piensos, así como su limpieza;
 - c) utilizar, siempre que sea necesario, agua limpia para evitar la contaminación peligrosa;
 - d) evitar, en la medida de lo posible, la contaminación peligrosa provocada por animales y plagas;
 - e) almacenar y manipular los residuos y las sustancias peligrosas por separado y de forma segura a fin de evitar la contaminación peligrosa;
 - f) garantizar que los materiales de embalaje no constituyan una fuente de contaminación peligrosa de los piensos;
 - g) tener en cuenta los resultados de cualquier análisis de muestras tomadas de productos primarios o de otras muestras que sean pertinentes para la seguridad de los piensos.

II. Registros

1. Los explotadores de empresas de piensos llevarán registros de las medidas adoptadas para controlar los peligros, de forma adecuada y por un período apropiado, teniendo en cuenta la naturaleza y el tamaño de sus empresas. Además, deberán poner toda la información pertinente recogida en estos registros a disposición de la autoridad competente.
2. En concreto, los explotadores de empresas de piensos deberán llevar registros sobre:
 - a) cualquier utilización de productos fitosanitarios y biocidas;

- b) la utilización de semillas modificadas genéticamente;
 - c) cualquier presencia de plagas o enfermedades que puedan afectar a la seguridad de los productos primarios;
 - d) los resultados de todos los análisis efectuados en muestras tomadas de productos primarios o de otras muestras recogidas con fines de diagnóstico que revistan importancia para la seguridad de los piensos;
 - e) el origen y cantidad de cada entrada de piensos y el destino y cantidad de cada salida de piensos.
3. Otras personas, como veterinarios, agrónomos y técnicos agrícolas, podrán asistir a los explotadores de empresas de piensos a llevar los registros que sean pertinentes para las actividades llevadas a cabo en la explotación agrícola.

PARTE B

Recomendaciones de guías de buenas prácticas

1. En caso de que se redacten las guías nacionales y comunitarias contempladas en el capítulo III del presente Reglamento, contendrán orientaciones en materia de buenas prácticas para controlar los peligros en la producción primaria de piensos.
 2. Las guías de buenas prácticas deberán incluir información apropiada sobre los peligros que puedan surgir en la producción primaria de piensos y sobre las medidas para controlarlos, incluidas las acciones pertinentes previstas en disposiciones legislativas o programas comunitarios y nacionales, tales como:
 - a) el control de agentes contaminantes como las micotoxinas, los metales pesados y el material radiactivo;
 - b) la utilización de agua, residuos orgánicos y fertilizantes;
 - c) el uso correcto y apropiado de productos fitosanitarios y biocidas y su trazabilidad;
 - d) el uso correcto y apropiado de medicamentos veterinarios y aditivos para piensos y su trazabilidad;
 - e) la preparación, el almacenamiento y la trazabilidad de materias primas para piensos;
 - f) la eliminación adecuada de los animales muertos, los residuos y las yacijas;
 - g) medidas de protección para evitar la introducción de enfermedades contagiosas transmisibles a los animales a través de los piensos, y cualquier obligación de notificación al respecto a la autoridad competente;
 - h) los procedimientos, las prácticas y los métodos que garanticen que los piensos se producen, preparan, embalan, almacenan y transportan en condiciones higiénicas adecuadas, incluidas medidas eficaces de limpieza y de control de plagas;
 - i) detalles relativos al modo de llevar los registros.
-

ANEXO II

**REQUISITOS APLICABLES A LAS EMPRESAS DE PIENSOS QUE NO
INTERVIENEN EN LA PRODUCCIÓN PRIMARIA DE PIENSOS A QUE SE
REFIERE EL APARTADO 1 DEL ARTÍCULO 5**

INSTALACIONES Y EQUIPO

1. Las instalaciones, el equipo, los contenedores, los cajones de embalaje y los vehículos utilizados en la transformación y el almacenamiento de piensos, así como sus alrededores inmediatos, se mantendrán limpios y se aplicarán programas eficaces de control de plagas.
2. La disposición, el diseño, la construcción y las dimensiones de las instalaciones y el equipo deberán:
 - a) permitir una limpieza y desinfección adecuadas;
 - b) ser de tal forma que se reduzca al mínimo el riesgo de error y se evite la contaminación, incluida la contaminación cruzada, y, en general, cualquier efecto nocivo para la seguridad y la calidad de los productos. La maquinaria que haya entrado en contacto con los piensos deberá secarse después de cualquier proceso de limpieza en húmedo.
3. Las instalaciones y el equipo que deban utilizarse en las operaciones de mezclado y fabricación deberán ser objeto regularmente de controles apropiados, de conformidad con los procedimientos escritos previamente establecidos para los productos por el fabricante.
 - a) Todas las balanzas y dispositivos de medición utilizados en la fabricación de piensos deberán ser apropiados para la gama de pesos o volúmenes que deban medirse y ser sometidos regularmente a pruebas para garantizar su precisión.
 - b) Todos los dispositivos de mezcla utilizados en la fabricación de piensos deberán ser apropiados para la gama de pesos o volúmenes que deban mezclarse y capaces de fabricar mezclas y diluidos homogéneos idóneos. Los explotadores demostrarán la eficacia de los mezcladores en lo que se refiere a la homogeneidad.
4. Las instalaciones deberán contar con iluminación natural y/o artificial adecuadas.
5. Los desagües deberán ser adecuados para los fines perseguidos y estar diseñados y contruidos de modo que se evite cualquier riesgo de contaminación de los piensos.
6. El agua utilizada en la fabricación de piensos deberá ser la adecuada para los animales; los conductos de agua serán de material inerte.
7. La evacuación de las aguas residuales, de desecho y pluviales se efectuará de manera que no afecte al equipo ni a la seguridad y calidad de los piensos. Se controlarán el deterioro y el polvo para prevenir la proliferación de plagas.
8. Las ventanas y demás aberturas deberán, en su caso, ser a prueba de plagas. Las puertas deberán ser herméticas y, cuando estén cerradas, ser a prueba de plagas.
9. En caso necesario, los techos y las armaduras de las cubiertas deberán estar diseñados, contruidos y acabados de forma que impidan la acumulación de suciedad y reduzcan la condensación, la formación de moho no deseable y el desprendimiento de partículas que puedan afectar a la seguridad y a la calidad de los piensos.

PERSONAL

Las empresas de piensos deberán disponer de personal suficiente con las competencias y cualificaciones necesarias para la fabricación de los productos de que se trate. Se establecerá un organigrama en el que se precisarán las cualificaciones (por ejemplo, los títulos y la experiencia profesional) y responsabilidades del personal supervisor. Este organigrama se pondrá a disposición de las autoridades competentes responsables de la inspección. Deberá informarse claramente y por escrito a todo el personal de sus funciones, responsabilidades y competencias, en particular siempre que se realice una modificación, a fin de que los productos tengan la calidad deseada.

PRODUCCIÓN

1. Se designará a una persona cualificada como responsable de la producción.
2. Los explotadores de empresas de piensos deberán garantizar que las distintas etapas de la producción se realicen conforme a procedimientos e instrucciones previamente establecidos por escrito con vistas a definir, verificar y mantener bajo control los puntos críticos del proceso de fabricación.
3. Se adoptarán medidas de carácter técnico u organizativo para evitar o reducir al mínimo, según las necesidades, la contaminación cruzada y los errores. Deberá contarse con medios suficientes y apropiados para llevar a cabo controles en el transcurso de la fabricación.
4. Se supervisará la presencia de piensos prohibidos, de sustancias indeseables y demás contaminantes que puedan afectar a la salud humana o animal, y se pondrán a punto estrategias de control que permitan reducir al mínimo los riesgos.
5. Los residuos y los materiales no aptos como piensos deberán aislarse e identificarse. Todos los materiales de este tipo que contengan niveles peligrosos de medicamentos veterinarios, contaminantes u otros factores de peligro se eliminarán de forma apropiada y no se utilizarán como piensos.
6. Los explotadores de empresas de piensos tomarán las medidas adecuadas para garantizar el rastreo de los productos.

CONTROL DE LA CALIDAD

1. Cuando proceda, se designará a una persona cualificada como responsable del control de la calidad.
2. Las empresas de piensos deberán tener acceso, en el marco de un sistema de control de la calidad, a un laboratorio con el personal y el equipo adecuados.
3. Se redactará y pondrá en práctica un plan de control de la calidad, en el que se incluirán, en particular, los controles de los puntos críticos del proceso de fabricación, los procedimientos de toma de muestras y su periodicidad, los métodos de análisis y su periodicidad, el cumplimiento de las especificaciones — así como el destino que se deberá dar a los productos en caso de incumplimiento — desde los materiales transformados hasta los productos finales.
4. Con el fin de garantizar la trazabilidad, los fabricantes conservarán documentos relativos a la materias primas utilizadas en los productos finales. Tales documentos tendrán que estar disponibles para las autoridades competentes durante un período apropiado al uso para el que se comercializan los productos. Además, se tomarán y conservarán muestras, en cantidad suficiente, de los ingredientes y de cada lote de productos fabricados y comercializados, o de cada fracción específica de la producción (en caso de producción continua), a fin de garantizar su trazabilidad, de acuerdo con un procedimiento establecido previamente por el fabricante (estas tomas deberán ser periódicas en caso de que la fabricación se destine exclusivamente a sus propias necesidades). Dichas muestras se precintarán y etiquetarán de manera que resulten fácilmente identificables, y se conservarán en condiciones de almacenamiento que excluyan cualquier posibilidad de modificación anormal de su composición o de adulteración. Permanecerán a disposición de las autoridades competentes durante un período apropiado al uso para el que se comercializa el pienso. En el caso de piensos para animales no destinados a la producción de alimentos, el fabricante del pienso sólo deberá conservar muestras del producto acabado.

ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE

1. Los piensos transformados se separarán de las materias primas no transformadas y de los aditivos a fin de evitar cualquier contaminación cruzada de los primeros. Se utilizarán materiales de embalaje apropiados.
2. Los piensos deberán almacenarse y transportarse en contenedores adecuados. Se almacenarán en lugares diseñados, adaptados y mantenidos de manera que garanticen buenas condiciones de almacenamiento, y a los que sólo tenga acceso el personal autorizado por el explotador de la empresa de piensos.

3. Los piensos se almacenarán y se transportarán de manera que puedan ser fácilmente identificables a fin de evitar cualquier confusión o contaminación cruzada y de prevenir su deterioro.
4. Los contenedores y el equipo utilizados en el transporte, el almacenamiento, el acarreo, la manipulación y las operaciones de pesado del pienso deberán mantenerse limpios. Se pondrán a punto programas de limpieza y se reducirán al mínimo los rastros de detergentes y desinfectantes.
5. Deberá reducirse al mínimo y mantenerse bajo control cualquier deterioro a fin de limitar la proliferación de plagas.
6. Cuando proceda, las temperaturas se mantendrán al nivel más bajo posible para evitar la condensación y el deterioro.

MODO DE LLEVAR LOS REGISTROS

1. Todos los explotadores de empresas de piensos, incluidos los que actúan sólo como comerciantes sin tener nunca el producto en sus instalaciones, llevarán un registro con los datos pertinentes, incluidos los detalles relativos a la adquisición, la producción y las ventas, que permitan reconstituir el proceso desde la recepción hasta la entrega, con inclusión de la exportación hasta el destino final.
2. Los explotadores de empresas de piensos, salvo aquéllos que actúan sólo como comerciantes sin tener nunca el producto en sus instalaciones, deberán conservar en un registro los siguientes documentos:
 - a) Documentos relativos al proceso de fabricación y a los controles.

Las empresas de piensos deberán disponer de un sistema de documentación que permita definir los puntos críticos del proceso de fabricación y garantizar su control, y establecer y poner en práctica un plan de control de la calidad. Deberán conservar los resultados de los controles efectuados. Todos estos documentos deberán conservarse de forma que sea posible reconstituir el proceso de fabricación de cada lote de productos puesto en circulación y establecer las correspondientes responsabilidades en caso de reclamación.

- b) Documentos relativos a la trazabilidad, en particular:

- i) de los aditivos para piensos:

- la naturaleza y la cantidad de los aditivos producidos, las fechas respectivas de fabricación y, en su caso, el número del lote o de la fracción específica de la producción, en caso de fabricación continua,
 - el nombre y la dirección del establecimiento al que se entregan los aditivos, la naturaleza y la cantidad de los aditivos entregados y, en su caso, el número del lote o de la fracción específica de la producción, en caso de fabricación continua,

- ii) de los productos considerados en la Directiva 82/471/CEE:

- la naturaleza de los productos y la cantidad producida, las fechas respectivas de fabricación y, en su caso, el número del lote o de la fracción específica de la producción, en caso de fabricación continua,
 - el nombre y la dirección de los establecimientos o usuarios (establecimientos o agricultores) a quienes se entregan estos productos, así como detalles de la naturaleza y cantidad de los productos entregados y, en su caso, el número del lote o de la fracción específica de la producción, en caso de fabricación continua,

- iii) de las premezclas:

- el nombre y la dirección de los fabricantes o proveedores de aditivos, la naturaleza y cantidad de los aditivos utilizados y, en su caso, el número del lote o de la fracción específica de la producción, en caso de fabricación continua,

- la fecha de fabricación de la premezcla y, en su caso, el número del lote,
 - el nombre y la dirección del establecimiento al que se entrega la premezcla, la fecha de entrega, la naturaleza y cantidad de la premezcla entregada, y, en su caso, el número del lote,
- iv) de los piensos compuestos/materias primas para piensos:
- el nombre y la dirección de los fabricantes o proveedores de premezclas o aditivos, la naturaleza y cantidad de la premezcla utilizada, y, en su caso, el número del lote,
 - el nombre y la dirección de los proveedores de las materias primas para piensos y piensos complementarios y la fecha de entrega,
 - el tipo, la cantidad y la formulación de los piensos compuestos,
 - la naturaleza y cantidad de las materias primas para piensos o de los piensos compuestos fabricados, así como la fecha de fabricación, y el nombre y la dirección del comprador (por ejemplo un agricultor u otro explotador).

RECLAMACIONES Y RETIRADA DE LOS PRODUCTOS

1. Los explotadores de empresas de piensos deberán poner en práctica un sistema de registro y tratamiento de las reclamaciones.
 2. Asimismo, tendrán que establecer, si ello resultase necesario, un sistema de retirada rápida de los productos presentes en el circuito de distribución. Deberán definir, por procedimiento escrito, el destino de los productos retirados, que, antes de ser puestos de nuevo en circulación, deberán ser objeto de un nuevo control de calidad.
-

ANEXO III

BUENAS PRÁCTICAS EN MATERIA DE ALIMENTACIÓN DE LOS ANIMALES**APACENTAMIENTO**

El apacentamiento en pastos y campos de cultivo se llevará a cabo de forma que se reduzca al mínimo la contaminación de los alimentos de origen animal por factores de peligro físicos, biológicos o químicos.

Cuando proceda, se observará un período de descanso adecuado antes de dejar que el ganado pascue en pastos, cultivos y restos de cultivos, así como entre las rotaciones de pastos, a fin de reducir al mínimo, cuando pueda plantearse este problema, la contaminación cruzada biológica proveniente del estiércol, y de garantizar el respeto de los períodos de suspensión de las aplicaciones de sustancias químicas en el campo.

REQUISITOS RELATIVOS A LOS ESTABLOS Y EQUIPOS DE ALIMENTACIÓN

La unidad de producción animal se diseñará de forma que pueda limpiarse de manera adecuada. La unidad de producción animal y el equipo utilizado para alimentar a los animales se limpiará a fondo regularmente para prevenir la acumulación de factores de peligro. Las sustancias químicas utilizadas en la limpieza y la esterilización se utilizarán conforme a las instrucciones y se almacenarán lejos de las zonas de almacenamiento de piensos y de alimentación de los animales.

Se pondrá a punto un sistema de control de plagas para impedir el acceso de éstas a la unidad de producción animal a fin de reducir al mínimo la posibilidad de contaminación de los piensos y los materiales de las yacijas o de las unidades para animales.

Los edificios y el equipo utilizados para alimentar a los animales se mantendrán limpios. Se pondrán a punto sistemas para evacuar regularmente el estiércol, los residuos y otras posibles fuentes de contaminación de los piensos.

Los piensos y los materiales de las yacijas utilizados en la unidad de producción animal se cambiarán frecuentemente evitándose que se enmohezcan.

ALIMENTACIÓN**1. Almacenamiento**

Los piensos se almacenarán separadamente de las sustancias químicas y de otros productos prohibidos para la alimentación animal. Las zonas de almacenamiento y los contenedores se mantendrán limpios y secos y, cuando sea necesario, se aplicarán las medidas apropiadas de control de plagas. Las zonas de almacenamiento y los contenedores se limpiarán regularmente para evitar la contaminación cruzada innecesaria.

Las semillas se almacenarán de manera apropiada y de forma que no sean accesibles a los animales.

Los piensos medicados y los piensos no medicados destinados a clases o especies diferentes de animales se almacenarán de manera que se reduzca el riesgo de alimentación de animales a los que no estén destinados.

2. Distribución

El sistema de distribución de los piensos en la explotación agrícola garantizará que se suministre el pienso adecuado al grupo de animales que corresponda. Durante la distribución y la alimentación de los animales, los piensos se manipularán de modo que no se produzca contaminación proveniente de zonas de almacenamiento y equipos contaminados. Los piensos no medicados se manipularán separadamente de los medicados para evitar cualquier forma de contaminación.

Los vehículos de transporte de la explotación y el equipo de alimentación se limpiarán periódicamente, en particular cuando se usen en la entrega y distribución de piensos medicados.

PIENSO Y AGUA

La calidad del agua destinada al abrevado o a la acuicultura deberá ser la adecuada para los animales que se estén explotando. Cuando haya motivos de inquietud respecto a la contaminación de animales o de productos animales por el agua, se tomarán medidas para evaluar y reducir al mínimo los riesgos.

Los equipos para el suministro de piensos y agua deberán estar diseñados, contruidos y ubicados de forma que se reduzca al mínimo el riesgo de contaminación de los piensos y del agua. Los sistemas para abrevar a los animales se limpiarán y serán objeto de mantenimiento regularmente, en la medida de lo posible.

PERSONAL

La persona responsable de alimentar y manipular los animales poseerá las aptitudes, los conocimientos y la competencia requeridos.

ANEXO IV

CAPÍTULO 1

Aditivos autorizados conforme al Reglamento (CE) n° 1831/2003:

- Aditivos nutricionales: todos los aditivos correspondientes al grupo
- Aditivos zootécnicos: todos los aditivos correspondientes al grupo
 - Aditivos tecnológicos: aditivos contemplados en la letra b) del punto 1 del anexo I («Antioxidantes») del Reglamento (CE) n° 1831/2003: solamente los que tienen un contenido máximo fijo
- Aditivos organolépticos: aditivos contemplados en la letra a) del punto 2 del anexo I («Colorantes») del Reglamento (CE) n° 1831/2003: carotenoides y xantofilas

Productos considerados en la Directiva 82/471/CEE:

- Productos proteicos obtenidos a partir de microorganismos pertenecientes a los grupos bacterias, levaduras, algas y setas inferiores: todos los productos correspondientes al grupo (salvo el subgrupo 1.2.1)
- Coproductos de la fabricación de aminoácidos por fermentación: todos los productos correspondientes al grupo.

CAPÍTULO 2

Aditivos autorizados conforme al Reglamento (CE) n° 1831/2003:

- Aditivos zootécnicos: aditivos contemplados en la letra d) del punto 4 del anexo I («Otros aditivos zootécnicos») del Reglamento (CE) n° 1831/2003
 - Antibióticos: todos los aditivos,
 - Coccidiostáticos y histomonostatos: todos los aditivos,
 - Promotores de crecimiento: todos los aditivos;
- Aditivos nutricionales:
 - aditivos contemplados en la letra a) del punto 3 del anexo I («Vitaminas, provitaminas y sustancias químicamente definidas de efecto análogo») del Reglamento (CE) n° 1831/2003: A y D,
 - Aditivos contemplados en la letra b) del punto 3 del anexo I («Compuestos de oligoelementos») del Reglamento (CE) n° 1831/2003: Cu y Se.

CAPÍTULO 3

Aditivos autorizados conforme al Reglamento (CE) n° 1831/2003:

Aditivos zootécnicos: aditivos contemplados en la letra d) del punto 4 del anexo I («Otros aditivos zootécnicos») del Reglamento (CE) n° 1831/2003

- Antibióticos: todos los aditivos,
 - Coccidiostáticos y histomonostatos: todos los aditivos,
 - Promotores de crecimiento: todos los aditivos.
-

ANEXO V

CAPÍTULO I

LISTA DE EMPRESAS DE PIENSOS AUTORIZADAS

1	2	3	4	5
Nº de identificación	Actividad	Nombre o denominación comercial ⁽¹⁾	Dirección ⁽²⁾	Observaciones

⁽¹⁾ Nombre o denominación comercial de las empresas de piensos.

⁽²⁾ Dirección de las empresas de piensos.

CAPÍTULO II

El número de identificación deberá tener la estructura siguiente:

- 1) el carácter «α», si la empresa es autorizada;
- 2) el código ISO del Estado miembro o del tercer país en que está establecida la empresa;
- 3) el número de referencia nacional, hasta un máximo de ocho caracteres alfanuméricos.

I

(Actos adoptados en aplicación de los Tratados CE/Euratom cuya publicación es obligatoria)

REGLAMENTOS

REGLAMENTO (CE) N° 767/2009 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO

de 13 de julio de 2009

sobre la comercialización y la utilización de los piensos, por el que se modifica el Reglamento (CE) n° 1831/2003 y se derogan las Directivas 79/373/CEE del Consejo, 80/511/CEE de la Comisión, 82/471/CEE del Consejo, 83/228/CEE del Consejo, 93/74/CEE del Consejo, 93/113/CE del Consejo y 96/25/CE del Consejo y la Decisión 2004/217/CE de la Comisión

(Texto pertinente a efectos del EEE)

EL PARLAMENTO EUROPEO Y EL CONSEJO DE LA UNIÓN EUROPEA,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea y, en particular, su artículo 37 y su artículo 152, apartado 4, letra b),

Vista la propuesta de la Comisión,

Visto el dictamen del Comité Económico y Social Europeo ⁽¹⁾,

Prevía consulta al Comité de las Regiones,

De conformidad con el procedimiento establecido en el artículo 251 del Tratado ⁽²⁾,

Considerando lo siguiente:

(1) La consecución de un elevado nivel de protección de la salud humana y animal constituye uno de los objetivos fundamentales de la legislación alimentaria, tal y como se establece en el Reglamento (CE) n° 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria ⁽³⁾. En dicho Reglamento también se estableció el «enfoque de la granja al tenedor», por el que se considera a los piensos como una fase sensible al inicio de la cadena alimentaria. Garantizar un alto nivel de protección de la salud pública es uno de los objetivos fundamentales del presente Reglamento.

(2) Muchos productos agrícolas europeos se dedican a la producción de piensos, pues la mayoría de las materias primas que se utilizan para su producción proceden de los productos agrícolas enumerados en el anexo I del Tratado. Además, el pienso es de crucial importancia para los cinco millones de ganaderos de la Comunidad, ya que es el factor de coste más importante.

(3) Los piensos pueden presentarse en forma de materias primas para piensos, piensos compuestos, aditivos para piensos, premezclas o piensos medicamentosos. Las normas relativas a la comercialización de aditivos para piensos se establecen en el Reglamento (CE) n° 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003, sobre los aditivos en la alimentación animal ⁽⁴⁾, y, en relación con los piensos medicamentosos, en la Directiva 90/167/CEE del Consejo, de 26 de marzo de 1990, por la que se establecen las condiciones de preparación, de puesta en el mercado y de utilización de los piensos medicamentosos en la Comunidad ⁽⁵⁾.

(4) Es preciso actualizar la legislación vigente en materia de circulación y utilización de materias primas para piensos y piensos compuestos, incluidos los alimentos para animales de compañía, en concreto, la Directiva 79/373/CEE del Consejo, de 2 de abril de 1979, relativa a la comercialización de los piensos compuestos ⁽⁶⁾, la Directiva 93/74/CEE del Consejo, de 13 de septiembre de 1993, relativa a los alimentos para animales destinados a objetivos de nutrición específicos ⁽⁷⁾ («piensos dietéticos»), la Directiva 96/25/CE del Consejo, de 29 de abril de 1996, sobre la circulación de materias primas para la alimentación animal ⁽⁸⁾, y la Directiva 82/471/CEE del Consejo, de 30 de junio de 1982, relativa a determinados productos utilizados en la alimentación animal ⁽⁹⁾ («bioproteínas»), y sustituirla por un reglamento único. En aras de

⁽¹⁾ DO C 77 de 31.3.2009, p. 84.

⁽²⁾ Dictamen del Parlamento Europeo de 5 de febrero de 2009 (no publicado aún en el Diario Oficial) y Decisión del Consejo de 22 de junio de 2009.

⁽³⁾ DO L 31 de 1.2.2002, p. 1.

⁽⁴⁾ DO L 268 de 18.10.2003, p. 29.

⁽⁵⁾ DO L 92 de 7.4.1990, p. 42.

⁽⁶⁾ DO L 86 de 6.4.1979, p. 30.

⁽⁷⁾ DO L 237 de 22.9.1993, p. 23.

⁽⁸⁾ DO L 125 de 23.5.1996, p. 35.

⁽⁹⁾ DO L 213 de 21.7.1982, p. 8.

la claridad deben derogarse, la Directiva 83/228/CEE del Consejo, de 18 de abril de 1983, relativa a la fijación de directrices para la valoración de determinados productos utilizados en los alimentos para animales ⁽¹⁾, y la Directiva 80/511/CEE de la Comisión, de 2 de mayo de 1980, por la que se autoriza, en determinados casos, la comercialización de piensos compuestos en embalajes o recipientes sin cerrar ⁽²⁾.

- (5) Como consecuencia de la derogación de la Directiva 79/373/CEE por el presente Reglamento, también debe derogarse la Directiva 93/113/CE del Consejo, de 14 de diciembre de 1993, relativa a la utilización y comercialización de enzimas, microorganismos y sus preparados en la alimentación animal ⁽³⁾. Además, a la vista de la derogación de la Directiva 79/373/CEE y, dado que el presente Reglamento incluye normas sobre el etiquetado de piensos a los que se han añadido aditivos, es preciso derogar el artículo 16 de la Directiva 70/524/CEE del Consejo, de 23 de noviembre de 1970, sobre los aditivos en la alimentación animal ⁽⁴⁾, que siguió en vigor después de la derogación de la Directiva 70/524/CEE mediante el Reglamento (CE) n° 1831/2003.
- (6) A diferencia de la definición de alimento del Reglamento (CE) n° 178/2002, la definición de pienso no incluye el agua. Además, dado que el agua no se comercializa con fines de alimentación animal, el presente Reglamento no debe incluir condiciones para el agua utilizada en la alimentación animal. No obstante, el presente Reglamento sí se debe aplicar a los piensos dispensados mediante agua. La utilización de agua por empresas de piensos está contemplada por el Reglamento (CE) n° 183/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 12 de enero de 2005, por el que se fijan requisitos en materia de higiene de los piensos ⁽⁵⁾, que exige que se utilice, siempre que sea necesario, agua limpia para evitar la contaminación peligrosa y que el agua utilizada en la fabricación de piensos sea de calidad adecuada.
- (7) Habida cuenta del riesgo de contaminación de la cadena alimentaria humana y animal, es conveniente que el presente Reglamento se aplique tanto a los piensos para animales destinados a la producción de alimentos, como a los piensos para animales no destinados a dicha producción, incluidos los animales salvajes.
- (8) Las responsabilidades de los explotadores de empresas de piensos establecidas en el Reglamento (CE) n° 178/2002 y en el Reglamento (CE) n° 183/2005 deben aplicarse, *mutatis mutandis*, a los piensos para animales no destinados a la producción de alimentos.
- (9) Con el fin de velar por el cumplimiento de lo establecido en el presente Reglamento, los Estados miembros deben efectuar controles oficiales de conformidad con el Reglamento (CE) n° 882/2004 del Parlamento Europeo y del

Consejo, de 29 de abril de 2004, sobre los controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales ⁽⁶⁾. Estos controles no deben limitarse a las indicaciones obligatorias del etiquetado, sino que también deben incluir las indicaciones voluntarias. Con el fin de permitir el control de los datos sobre la composición, deben determinarse tolerancias aceptables para los valores etiquetados.

- (10) Con el fin de gestionar los riesgos para la seguridad de los piensos, debe incluirse, en forma de anexo al presente Reglamento, la lista de materias primas cuya comercialización para la alimentación animal está prohibida, tal como se establece actualmente en la Decisión 2004/217/CE de la Comisión ⁽⁷⁾, junto con una lista de materias cuya comercialización para la alimentación animal está restringida. No obstante, la existencia de dicho anexo no debe interpretarse en el sentido de que todos los productos no incluidos en la misma puedan considerarse seguros por ello.
- (11) La distinción entre materias primas para piensos, aditivos para piensos y otros productos como los medicamentos veterinarios tiene repercusiones para las condiciones de comercialización de dichos productos. Las materias primas para piensos se utilizan en primer lugar para satisfacer las necesidades de los animales, por ejemplo de energía, nutrientes, minerales o fibras dietéticas. Por lo general, no están químicamente bien definidas, excepto para los componentes nutricionales básicos. Los efectos que pueden ser justificados mediante evaluación científica y que solo conciernen a los aditivos para piensos o los medicamentos veterinarios deben excluirse de los usos objetivos de las materias primas para piensos. Por eso es conveniente elaborar directrices no vinculantes para distinguir entre estos tipos de productos. En casos debidamente justificados, la Comisión debe estar habilitada para aclarar si un producto se considera pienso a efectos del presente Reglamento.
- (12) La definición de piensos complementarios de la Directiva 79/373/CEE ha provocado problemas de aplicación en varios Estados miembros. A efectos de la aplicación del Reglamento (CE) n° 183/2005, es conveniente aclarar la distinción entre piensos complementarios y premezclas.
- (13) A fin de permitir una aplicación uniforme de la legislación, las materias primas para piensos y los piensos complementarios no deben contener aditivos por encima de un determinado nivel. No obstante, los piensos altamente concentrados, como los cubos para lamer que contienen minerales, pueden utilizarse para la alimentación directa de animales si su composición cumple el objetivo de nutrición específico relacionado con el uso previsto pertinente. Las condiciones de utilización de tales piensos deben indicarse en el etiquetado para garantizar que se respetan los valores respectivos de aditivos para piensos en la ración diaria.

⁽¹⁾ DO L 126 de 13.5.1983, p. 23.

⁽²⁾ DO L 126 de 21.5.1980, p. 14.

⁽³⁾ DO L 334 de 31.12.1993, p. 17.

⁽⁴⁾ DO L 270 de 14.12.1970, p. 1.

⁽⁵⁾ DO L 35 de 8.2.2005, p. 1.

⁽⁶⁾ DO L 165 de 30.4.2004, p. 1.

⁽⁷⁾ DO L 67 de 5.3.2004, p. 31.

- (14) La Directiva 82/471/CEE tenía como objetivo mejorar el suministro de piensos utilizados como fuente de proteínas directa o indirecta en la Comunidad. En dicha Directiva se exige un procedimiento de autorización previo a la comercialización para todas las posibles bioproteínas. No obstante, solamente se ha concedido un pequeño número de nuevas autorizaciones en el pasado y aún puede observarse una escasez de piensos ricos en proteínas. Así pues, el requisito general de autorización previa a la comercialización resultó ser prohibitivo y, como alternativa, podría hacerse frente a los riesgos para la seguridad mediante la prohibición de los productos peligrosos gracias a la vigilancia del mercado. En aquellos casos en que el resultado de una evaluación del riesgo de una bioproteína sea negativo, o lo haya sido, debe prohibirse su circulación o su utilización. Así pues, debe abolirse el requisito especial de un procedimiento de autorización previa a la comercialización para las bioproteínas, lo que implica que los sistemas de seguridad para estos productos sean los mismos que para todas las otras materias primas para piensos. Las prohibiciones o restricciones en vigor de determinadas bioproteínas no deben verse afectadas.
- (15) Se ha observado el buen funcionamiento de las disposiciones de la Directiva 2008/38/CE de la Comisión, de 5 de marzo de 2008, por la que se establece una lista de usos previstos de los alimentos para animales destinados a objetivos de nutrición específicos⁽¹⁾. La lista de usos previstos así establecida debe, por ello, mantenerse y el presente Reglamento debe adoptar las disposiciones necesarias para su actualización. En particular, debe consultarse a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria sobre la eficacia y la seguridad de estos piensos en los casos en que, a partir de la información científica y técnica disponible, existan motivos para creer que el uso del pienso de que se trate pueda no satisfacer el objetivo nutricional específico previsto o pueda tener efectos adversos en la salud animal, la salud humana, el medio ambiente o el bienestar de los animales.
- (16) El fundamento científico debe ser el factor principal que debe tenerse en cuenta para hacer uso de alegaciones relativas a los piensos y los explotadores de empresas de piensos que hagan uso de alegaciones deben justificarlas. Una alegación puede estar fundamentada científicamente mediante la toma en consideración de la totalidad de los datos científicos disponibles y la ponderación de las pruebas.
- (17) El etiquetado cumple objetivos en materia de aplicación de la legislación, trazabilidad y control. Además, el etiquetado debe proporcionar a los compradores la información necesaria que les permita elegir de la mejor manera en función de sus necesidades, y debe ser consistente, coherente, transparente y comprensible. Dado que los compradores, en particular los ganaderos, no solamente eligen los productos en el punto de venta, en donde pueden comprobar el embalaje del pienso, los requisitos relativos a la información del etiquetado no deben ser únicamente válidos para las etiquetas del producto, sino también para otros tipos de comunicación entre el vendedor y el comprador. Además, estos principios también deben aplicarse a la presentación y la publicidad del pienso.
- (18) Las normas sobre el etiquetado establecen la información obligatoria y voluntaria. La información obligatoria debe combinar requisitos generales de etiquetado con otros específicos para las materias primas para piensos o los piensos compuestos respectivamente, y requisitos adicionales en caso de los piensos dietéticos, las materias primas contaminadas y los alimentos para animales de compañía.
- (19) Por lo que se refiere a las impurezas químicas derivadas del proceso de fabricación de materias primas para piensos y de los auxiliares tecnológicos, la situación actual no es satisfactoria. Para garantizar un alto nivel de seguridad de los piensos y, en consecuencia, un alto nivel de protección de la salud pública, así como para mejorar la transparencia, deben adoptarse medidas relativas a los niveles aceptables de dichas impurezas químicas, de conformidad con las buenas prácticas a que se refiere el Reglamento (CE) n° 183/2005.
- (20) Se ha observado que el principio de que solamente deben etiquetarse determinados aditivos para piensos cuando se utilizan en materias primas para piensos y piensos compuestos funciona bien. No obstante, tanto la categorización derivada del Reglamento (CE) n° 1831/2003 como el hecho de que, en particular, los propietarios de animales de compañía puedan verse confundidos por el etiquetado de algunos aditivos, hacen necesarias una actualización y una modernización.
- (21) Como consecuencia de las crisis de la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) y las dioxinas, en 2002 se introdujo por iniciativa del Parlamento Europeo la obligación de indicar el porcentaje en peso de todas las materias primas para piensos que se han añadido a los piensos compuestos mediante la Directiva 2002/2/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por la que se modifica la Directiva 79/373/CEE del Consejo relativa a la circulación de los piensos compuestos⁽²⁾. Además, se ha mejorado significativamente el nivel de seguridad de los alimentos y los piensos a raíz del Reglamento (CE) n° 178/2002 y del Reglamento (CE) n° 183/2005 así como de sus medidas de aplicación, a resultas en particular de haber hecho hincapié en la responsabilidad de los explotadores de empresas alimentarias y de piensos, la mejora del sistema de trazabilidad, la introducción del principio de análisis de peligros y puntos de control críticos (APPCC) en las empresas de piensos y la creación de guías de buenas prácticas de higiene en las empresas de piensos. A la vista de estos logros positivos, que se reflejan en las notificaciones del sistema de alerta rápida para alimentos y piensos, la obligación de indicar en el etiquetado el porcentaje en peso de todas las materias primas para piensos que se añaden a piensos compuestos ha dejado de ser necesaria a efectos de garantizar un alto nivel de seguridad de los piensos y, en consecuencia, un alto nivel de protección de la salud pública. Los porcentajes exactos pueden, no obstante,

⁽¹⁾ DO L 62 de 6.3.2008, p. 9.

⁽²⁾ DO L 63 de 6.3.2002, p. 23.

comunicarse de forma voluntaria para facilitar información adecuada a los compradores. Además, y dado que las autoridades competentes tienen acceso a la información relativa a los porcentajes exactos en peso de todas las materias primas para piensos añadidas a los piensos compuestos, deben poder facilitar información adicional a los compradores, con motivo de cualquier urgencia relacionada con la salud humana y animal o con el medio ambiente, y de conformidad con la Directiva 2004/48/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, relativa al respeto de los derechos de propiedad intelectual⁽¹⁾.

- (22) A fin de garantizar una información adecuada del comprador y evitar que se induzca a error al mismo, debe exigirse sin embargo el porcentaje en peso exacto en aquellos casos en que se destaque la materia prima para piensos en el etiquetado de un pienso compuesto.
- (23) La indicación en orden decreciente de peso de las materias primas para piensos que se han añadido a piensos compuestos ya proporciona importante información sobre la composición. En determinados ámbitos en los que el productor no está obligado a etiquetar indicaciones específicas, el comprador debe tener la posibilidad de solicitar información adicional. En tales casos debe mantenerse un margen de $\pm 15\%$ sobre el valor declarado.
- (24) Deben protegerse los derechos de propiedad intelectual de los productores. La aplicación de los derechos de propiedad intelectual debe atenerse a lo dispuesto en la Directiva 2004/48/CE. Debe también admitirse que, en determinadas circunstancias y a diferencia de la denominación de las materias primas para piensos que se hayan añadido, la composición cuantitativa del pienso compuesto pueda considerarse información confidencial objeto de protección.
- (25) La Directiva 2002/32/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 7 de mayo de 2002, sobre sustancias indeseables en la alimentación animal⁽²⁾, no se aplica al etiquetado de los piensos que tienen unos niveles excesivos de sustancias indeseables. Por consiguiente, deben establecerse disposiciones a fin de garantizar un etiquetado adecuado y una aplicación correcta de la prohibición de dilución contemplada en el artículo 5 de la presente Directiva, hasta que esas materias primas contaminadas hayan sido detoxificadas por un establecimiento de detoxificación autorizado conforme al artículo 10, apartados 2 o 3, del Reglamento (CE) n° 1831/2003, o hasta que se hayan limpiado.
- (26) Deben preverse excepciones de los requisitos generales de etiquetado en la medida en que no sea necesario aplicar estos requisitos a fin de proteger la salud humana o animal ni los intereses de los consumidores, y represente una carga indebida para el productor o el explotador de una empresa de piensos que sea responsable del etiquetado. A partir de la experiencia obtenida, deben preverse estas excepciones, en particular en relación con los piensos suministrados por un agricultor a otro agricultor para

su utilización en su explotación, así como con las pequeñas cantidades, los piensos compuestos que no estén constituidos por más de tres materias primas para piensos y las mezclas de granos enteros, semillas y frutos.

- (27) Por norma general, los piensos compuestos deben comercializarse en recipientes sellados, pero deben preverse las excepciones adecuadas, en la medida en que la aplicación de este requisito no sea necesaria para proteger la salud humana o animal o los intereses del consumidor y represente una carga excesiva para los explotadores de empresas de piensos.
- (28) La parte B del anexo de la Directiva 96/25/CE y las columnas 2 a 4 del anexo de la Directiva 82/471/CEE contienen listas con denominaciones, descripciones y disposiciones de etiquetado para determinadas materias primas para piensos. Estas listas facilitan el intercambio de información sobre las propiedades del producto entre el productor y el comprador. La experiencia de comprometer a las partes interesadas en la elaboración de normas voluntarias mediante directrices comunitarias en materia de higiene de los piensos ha sido plenamente positiva. La elaboración de unas listas más amplias por los interesados podría ser más flexible y estar mejor adaptada a las necesidades de información del usuario que si lo llevara a cabo el legislador. Las partes interesadas pueden decidir el esfuerzo que dedican a esa labor en función del valor de una lista de materias primas para piensos. Es por ello conveniente establecer un Catálogo no exhaustivo de materias primas para piensos, que los explotadores de empresas de piensos utilizarán voluntariamente, excepto en lo relativo al uso de la denominación de la materia prima para piensos.
- (29) Las listas actuales de materias primas para piensos que figuran en la parte B del anexo de la Directiva 96/25/CE y en las columnas 2 a 4 del anexo de la Directiva 82/471/CEE deben constituir la versión inicial del Catálogo comunitario de materias primas para piensos. Esta versión inicial debe luego completarse a iniciativa de los interesados en función de sus intereses, incluido mediante la adición de las nuevas materias primas para piensos.
- (30) En aras de la transparencia, es conveniente que una materia prima para piensos que no se encuentre en el catálogo se notifique a los representantes de las partes interesadas en cuanto se comercialice por vez primera.
- (31) Un etiquetado moderno facilita el desarrollo de un entorno del mercado competitivo en el que unos operadores dinámicos, eficaces e innovadores pueden utilizar plenamente el etiquetado para vender sus productos. Teniendo en cuenta tanto la relación entre empresas en la comercialización de piensos para el ganado como la relación entre el productor y el comprador de alimentos para animales de compañía, unos Códigos de buen etiquetado en estos dos ámbitos podrían ser un medio útil para conseguir los objetivos de un etiquetado moderno. Los Códigos deben prever disposiciones que permitan que el comprador tome decisiones con conocimiento de causa. También deben orientar en gran medida a la

⁽¹⁾ DO L 157 de 30.4.2004, p. 45.

⁽²⁾ DO L 140 de 30.5.2002, p. 10.

persona responsable del etiquetado sobre distintos elementos del mismo y pueden interpretar el marco proporcionado para el etiquetado voluntario o la presentación del etiquetado obligatorio. Los Códigos deben utilizarse de forma voluntaria, excepto en los casos en que su utilización venga indicada en el etiquetado.

- (32) La participación de todas las partes afectadas es el elemento crucial para la calidad y la adecuación del Catálogo y de los Códigos de buen etiquetado. Con el fin de mejorar el derecho de los usuarios a una información adecuada, deben tenerse en cuenta sus intereses. Este extremo puede garantizarlo la Comisión mediante la aprobación del Catálogo y los Códigos siempre que su contenido pueda ser puesto en práctica y sean adecuados para cumplir los objetivos del presente Reglamento.
- (33) Los Estados miembros han de establecer las sanciones que deban imponerse en caso de incumplimiento de las disposiciones del presente Reglamento y deben tomar todas las medidas necesarias para garantizar su cumplimiento. Estas sanciones deben ser eficaces, proporcionadas y disuasorias.
- (34) Se necesita un período transitorio, en particular por lo que se refiere a los piensos que cumplen un objetivo de nutrición específico y al nivel de impurezas químicas derivadas del proceso de fabricación y de los auxiliares tecnológicos. También debe permitirse la comercialización de las existencias actuales hasta que se agoten. Además, puede resultar conveniente precisar en qué circunstancias pueden etiquetarse los piensos conforme al presente Reglamento antes de su fecha de aplicación.
- (35) Dado que el objetivo del presente Reglamento, a saber, la armonización de las condiciones para la utilización comercialización de los piensos con el fin de garantizar un alto nivel de seguridad de los piensos y, en consecuencia, un alto nivel de protección de la salud pública, así como facilitar una información adecuada de los usuarios y los consumidores y consolidar el funcionamiento eficaz del mercado interior de los piensos no puede ser alcanzado de manera suficiente por los Estados miembros y, por consiguiente, puede lograrse mejor a nivel comunitario, la Comunidad puede adoptar medidas, de conformidad con el principio de subsidiariedad consagrado en el artículo 5 del Tratado. De conformidad con el principio de proporcionalidad enunciado en dicho artículo, el presente Reglamento no excede de lo necesario para alcanzar dicho objetivo.
- (36) Procede aprobar las medidas necesarias para la ejecución del presente Reglamento con arreglo a la Decisión 1999/468/CE del Consejo, de 28 de junio de 1999, por la que se establecen los procedimientos para el ejercicio de las competencias de ejecución atribuidas a la Comisión ⁽¹⁾.
- (37) Conviene, en particular, conferir competencias a la Comisión para que modifique la lista de materias primas cuya utilización como pienso está prohibida o restringida, autorice los piensos destinados a objetivos de nutrición específicos, establezca una lista de categorías de etiquetado de las materias primas para piensos para ani-

males no destinados a la producción de alimentos —excepto los animales de peletería—, adopte enmiendas al Catálogo por las que se establezca el contenido máximo en impurezas químicas, o los niveles de pureza botánica, los niveles del contenido de humedad, o las indicaciones sustitutivas de la declaración obligatoria, adapte los anexos en función del desarrollo científico y técnico, y apruebe medidas transitorias. Dado que estas medidas son de alcance general y están destinadas a modificar elementos no esenciales del presente Reglamento, incluso completándolo con nuevos elementos no esenciales, deben adoptarse con arreglo procedimiento de reglamentación con control previsto en el artículo 5 bis de la Decisión 1999/468/CE.

- (38) En aras de la eficacia, procede reducir los plazos normales del procedimiento de reglamentación con control para aprobar las actualizaciones de la lista de usos previstos. Cuando, por imperiosas razones de urgencia, los plazos normalmente aplicables en el procedimiento de reglamentación con control no puedan respetarse, la Comisión debe poder aplicar el procedimiento de urgencia previsto en el artículo 5 bis, apartado 6, de la Decisión 1999/468/CE para la modificación de la lista de las materias primas cuya comercialización o utilización a efectos de la alimentación animal están prohibidas o restringidas.
- (39) En el artículo 16 del Reglamento (CE) n° 1831/2003 se establecen las disposiciones para el etiquetado y el envasado de los aditivos para piensos y las premezclas. En particular, se ha observado que las normas relativas a las premezclas han provocado problemas prácticos de aplicación para la industria y las autoridades competentes. A fin de permitir un etiquetado más coherente de las premezclas, debe modificarse el artículo mencionado.

HAN ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

CAPÍTULO 1

DISPOSICIONES PRELIMINARES

Artículo 1

Objeto

El objetivo del presente Reglamento, de conformidad con los principios generales establecidos en el Reglamento (CE) n° 178/2002, es armonizar las condiciones para la comercialización y la utilización de los piensos, con el fin de garantizar un alto nivel de seguridad de los piensos y, en consecuencia, un alto nivel de protección de la salud pública, así como facilitar una información adecuada a los usuarios y los consumidores y consolidar el funcionamiento eficaz del mercado interior.

Artículo 2

Ámbito de aplicación

1. En el presente Reglamento se establecen normas para la comercialización y la utilización de los piensos, tanto para animales destinados a la producción de alimentos como para animales no destinados a dicha producción, dentro de la Comunidad, incluidos requisitos para su etiquetado, envasado y presentación.

⁽¹⁾ DO L 184 de 17.7.1999, p. 23.

2. El presente Reglamento se aplicará sin perjuicio de otras disposiciones comunitarias aplicables en materia de alimentación animal, en particular:

- a) Directiva 90/167/CEE;
- b) Directiva 2002/32/CE;
- c) el Reglamento (CE) n° 999/2001 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de mayo de 2001, por el que se establecen disposiciones para la prevención, el control y la erradicación de determinadas encefalopatías espongiformes transmisibles ⁽¹⁾;
- d) el Reglamento (CE) n° 1774/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 3 de octubre de 2002, por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales no destinados al consumo humano ⁽²⁾;
- e) el Reglamento (CE) n° 1829/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003, sobre alimentos y piensos modificados genéticamente ⁽³⁾;
- f) el Reglamento (CE) n° 1830/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003, relativo a la trazabilidad y al etiquetado de organismos modificados genéticamente y a la trazabilidad de los alimentos y piensos producidos a partir de estos ⁽⁴⁾;
- g) Reglamento (CE) n° 1831/2003, y
- h) el Reglamento (CE) n° 834/2007 del Consejo, de 28 de junio de 2007, sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos ⁽⁵⁾.

3. El presente Reglamento no se aplicará al agua, ni a la que consumen directamente los animales ni a la que se añade intencionadamente a los piensos. Sí se aplicará, sin embargo, a los piensos destinados a ser dispensados mediante agua.

Artículo 3

Definiciones

1. A efectos del presente Reglamento, se aplicarán las siguientes definiciones:

- a) las de «pienso», «empresa de piensos» y «comercialización» establecidas en el Reglamento (CE) n° 178/2002;
- b) las de «aditivo para piensos», «premezclas», «auxiliares tecnológicos» y «ración diaria» establecidas en el Reglamento (CE) n° 1831/2003, y

- c) las de «establecimiento» y «autoridad competente» establecidas en el Reglamento (CE) n° 183/2005.

2. Además, se aplicarán las siguientes definiciones:

- a) «explotador de empresa de piensos» cualquier persona física o jurídica responsable de asegurar el cumplimiento de los requisitos del presente Reglamento en la empresa de piensos bajo su control;
- b) «alimentación de los animales por vía oral» introducción de pienso en el tracto gastrointestinal de un animal a través de la boca, con el objetivo de cubrir las necesidades nutricionales del animal o de mantener la productividad de animales con un estado de salud normal;
- c) «animal destinado a la producción de alimentos» cualquier animal alimentado, criado o mantenido en cautividad para la producción de alimentos para el consumo humano, incluidos los animales que no son consumidos pero que pertenecen a especies que normalmente se utilizan para el consumo humano en la Comunidad;
- d) «animal no destinado a la producción de alimentos» cualquier animal alimentado, criado o mantenido en cautividad, pero no utilizado para el consumo humano, tales como los animales de peletería, los animales de compañía y los animales que se mantienen en cautividad en laboratorios, zoológicos o circos;
- e) «animal de peletería» cualquier animal no destinado a la producción de alimentos, alimentado, criado o mantenido en cautividad para la producción de pieles y no utilizado normalmente para el consumo humano;
- f) «animal de compañía» cualquier animal no destinado a la producción de alimentos que pertenece a una especie alimentada, criada o mantenida en cautividad, pero que normalmente no se utiliza para el consumo humano en la Comunidad;
- g) «materias primas para piensos» productos de origen vegetal o animal, cuyo principal objetivo es satisfacer las necesidades nutritivas de los animales, en estado natural, fresco o conservado, y los productos derivados de su transformación industrial, así como las sustancias orgánicas o inorgánicas, tanto si contienen aditivos para piensos como si no, destinadas a la alimentación de los animales por vía oral, directamente como tales o transformadas, o en la preparación de piensos compuestos o como soporte de premezclas;
- h) «pienso compuesto» mezcla de al menos dos materias primas para piensos, tanto si contienen aditivos para piensos como si no, para la alimentación de los animales por vía oral en forma de pienso completo o complementario;
- i) «pienso completo» pienso compuesto que, debido a su composición, es suficiente para una ración diaria;

⁽¹⁾ DO L 147 de 31.5.2001, p. 1.

⁽²⁾ DO L 273 de 10.10.2002, p. 1.

⁽³⁾ DO L 268 de 18.10.2003, p. 1.

⁽⁴⁾ DO L 268 de 18.10.2003, p. 24.

⁽⁵⁾ DO L 189 de 20.7.2007, p. 1.

- j) «pienso complementario» pienso compuesto con un contenido elevado de determinadas sustancias pero que, debido a su composición, no es suficiente para una ración diaria a menos que se utilice en combinación con otro pienso;
- k) «pienso mineral» pienso complementario que contiene como mínimo un 40 % de cenizas brutas;
- l) «pienso de lactancia» pienso compuesto administrado en forma seca o tras su dilución en una cantidad específica de líquido para alimentar animales jóvenes como complemento o sustituto de la leche poscalostrual, o para alimentar animales jóvenes como terneros, corderos o cabritos destinados al sacrificio;
- m) «soporte» sustancia utilizada para disolver, diluir, dispersar o bien modificar físicamente de otra manera un aditivo para piensos con el fin de facilitar su manipulación, aplicación o uso sin alterar su función tecnológica y sin ejercer ningún efecto tecnológico por sí misma;
- n) «objetivo de nutrición específico» el objetivo de satisfacer las necesidades nutritivas específicas de los animales cuyo proceso de asimilación, absorción o metabolismo está afectado, o podría estarlo temporalmente, o lo está irreversiblemente y, por tanto, puede beneficiarse de la ingestión de un pienso apropiado para su estado;
- o) «pienso destinado a objetivos de nutrición específicos» pienso que puede satisfacer un objetivo de nutrición específico gracias a su composición o método de fabricación concreto, que lo distingue claramente de los piensos ordinarios. El pienso destinado a objetivos de nutrición específicos no incluye los piensos medicamentosos con arreglo a la Directiva 90/167/CEE;
- p) «materiales contaminados» pienso que contiene un nivel de sustancias indeseables que supera los niveles aceptables según la Directiva 2002/32/CE;
- q) «fecha de durabilidad mínima» período durante el cual, en unas condiciones de almacenamiento adecuadas, la persona responsable del etiquetado garantiza que el pienso mantiene sus propiedades alegadas; solo podrá indicarse una fecha de durabilidad mínima para el pienso en su conjunto, que se determinará a partir de la fecha de durabilidad mínima de cada uno de sus componentes;
- r) «lote» cantidad identificable de pienso respecto de la cual se han determinado unas características comunes, tales como el origen, la variedad, el tipo de envase, el envasador, el expedidor o el etiquetado, y, en el caso de un proceso de producción, unidad de producción de una única planta que

utiliza parámetros uniformes de producción o una serie de estas unidades, cuando se producen en orden continuo y se almacenan juntas;

- s) «etiquetado» atribución de cualquier mención, indicación, marca de fábrica, marca comercial, imagen o símbolo a un pienso, colocando esta información en un medio como, por ejemplo, un envase, recipiente, anuncio, etiqueta, documento, anilla, collar o en Internet, que hace referencia a ese pienso o lo acompaña, incluso con fines publicitarios;
- t) «etiqueta» cualquier etiqueta, marca, signo, imagen y demás descripciones, escritas, impresas, dibujadas, marcadas, grabadas o sobrepresas que figuran en el embalaje o en un recipiente de piensos, o que acompañan al mismo;

- u) «presentación» la forma, el aspecto o el envasado y los materiales del envasado utilizados para el pienso, además de la manera en que se presenta y el entorno en el que se expone.

CAPÍTULO 2

REQUISITOS GENERALES

Artículo 4

Requisitos de seguridad y comercialización

1. Los piensos solamente podrán comercializarse y utilizarse si:

- a) son seguros;
- b) no tienen ningún efecto adverso directo en el medio ambiente ni en el bienestar de los animales.

Los requisitos establecidos en el artículo 15 del Reglamento (CE) n° 178/2002 se aplicarán, *mutatis mutandis*, a los piensos para animales no destinados a la producción de alimentos.

2. Además de los requisitos establecidos en el apartado 1 del presente artículo, los explotadores de empresas de piensos que comercialicen piensos garantizarán que estos:

- a) son sanos, genuinos, no están adulterados, son adecuados a sus objetivos y de calidad comercializable;
- b) están etiquetados, envasados y presentados de conformidad con las disposiciones establecidas en el presente Reglamento y en la demás legislación comunitaria de aplicación.

Los requisitos establecidos en el artículo 16 del Reglamento (CE) n° 178/2002 se aplicarán, *mutatis mutandis*, a los piensos para animales no destinados a la producción de alimentos.

3. Los piensos deberán ajustarse a las disposiciones técnicas sobre impurezas y otros determinantes químicos establecidas en el anexo I del presente Reglamento.

Artículo 5

Responsabilidades y obligaciones de las empresas de piensos

1. Los explotadores de empresas de piensos deberán cumplir, *mutatis mutandis*, las obligaciones establecidas en los artículos 18 y 20 del Reglamento (CE) n° 178/2002 y en el artículo 4, apartado 1, del Reglamento (CE) n° 183/2005 por lo que respecta a los piensos para animales no destinados a la producción de alimentos.

2. La persona responsable del etiquetado de los piensos transmitirá a las autoridades competentes cualquier información relativa a la composición o las propiedades alegadas de los piensos que ella misma comercialice y que permita verificar la exactitud de la información que figura en el etiquetado, incluidos los porcentajes exactos en peso de las materias primas utilizadas en los piensos compuestos.

3. En caso de cualquier urgencia relacionada con la salud humana o animal o con el medio ambiente, y sin perjuicio de lo dispuesto en la Directiva 2004/48/CE, la autoridad competente podrá facilitar al comprador la información de que disponga en virtud del apartado 2 del presente artículo siempre y cuando, tras sopesar los respectivos intereses legítimos de fabricantes y compradores, llegue a la conclusión de que la comunicación de dicha información está justificada. En su caso, la autoridad competente supeditará la comunicación de dicha información a la firma de una cláusula de confidencialidad por parte del comprador.

Artículo 6

Restricción y prohibición

1. Los piensos no deberán contener ni estar compuestos por materias primas cuya comercialización o utilización para la alimentación animal esté prohibida o restringida. La lista de dichas materias primas figura en el anexo III.

2. La Comisión modificará la lista de materias primas cuya comercialización o utilización para la alimentación animal esté prohibida o restringida teniendo en cuenta las pruebas científicas específicas, el progreso tecnológico, las notificaciones en el marco del sistema de alerta rápida para alimentos y piensos o los resultados de los controles oficiales efectuados en virtud del Reglamento (CE) n° 882/2004.

Estas medidas, destinadas a modificar elementos no esenciales del presente Reglamento completándolo, se adoptarán con arreglo al procedimiento de reglamentación con control contemplado en el artículo 28, apartado 4.

Por imperiosas razones de urgencia, la Comisión podrá hacer uso del procedimiento de urgencia contemplado en el artículo 28, apartado 5, con el fin de adoptar estas medidas.

CAPÍTULO 3

COMERCIALIZACIÓN DE TIPOS ESPECÍFICOS DE PIENSOS

Artículo 7

Características de los tipos de pienso

1. Con arreglo al procedimiento de reglamentación contemplado en el artículo 28, apartado 3, la Comisión podrá adoptar directrices que clarifiquen la distinción entre materias primas para piensos, aditivos para piensos y otros productos como los medicamentos veterinarios.

2. La Comisión podrá adoptar medidas, en caso necesario, para aclarar si determinado producto se considera pienso a efectos del presente Reglamento.

Estas medidas, destinadas a modificar elementos no esenciales del presente Reglamento completándolo, se adoptarán con arreglo al procedimiento de reglamentación con control contemplado en el artículo 28, apartado 4.

Artículo 8

Contenido de los aditivos para piensos

1. Sin perjuicio de las condiciones de utilización previstas en el acto jurídico pertinente por el que se autoriza cada aditivo para piensos, las materias primas para piensos y los piensos complementarios no deberán contener aditivos para piensos a niveles más de cien veces superiores al contenido máximo pertinente fijado para los piensos completos, o cinco veces en el caso de los coccidiostáticos y los histomonostáticos.

2. Solo podrá superarse el nivel de cien veces superior al contenido máximo pertinente fijado para los piensos completos a que se refiere el apartado 1 si la composición de los productos afectados cumple el objetivo de nutrición específico relacionado con el uso previsto pertinente, de acuerdo con el artículo 10 del presente Reglamento. Las condiciones de uso de dichos piensos se especificarán con más detalle en la lista de usos previstos. Si el productor de tales piensos utiliza alguno de los aditivos para piensos a que se refiere el capítulo 2 del anexo IV del Reglamento (CE) n° 183/2005, deberá disponer de una autorización para su establecimiento conforme al artículo 10, apartado 1, letra b), de dicho Reglamento.

Artículo 9

Comercialización de piensos destinados a objetivos de nutrición específicos

Los piensos destinados a objetivos de nutrición específicos únicamente podrán comercializarse como tales si su uso previsto figura en la lista de usos previstos establecida de conformidad con el artículo 10 y si cumplen las características nutricionales esenciales para el objetivo de nutrición específico establecido en dicha lista.

Artículo 10

Lista de usos previstos de piensos destinados a objetivos de nutrición específicos

1. La Comisión podrá actualizar la lista de usos previstos que figura en la Directiva 2008/38/CE añadiendo o retirando un uso

previsto, o añadiendo, suprimiendo o modificando las condiciones asociadas a un uso previsto concreto.

2. El procedimiento para la actualización de la lista de usos previstos podrá iniciarse mediante la presentación de una solicitud a la Comisión por parte de una persona física o jurídica establecida en la Comunidad o de un Estado miembro. Para que la solicitud sea válida deberá ir acompañada de un expediente en el que se demuestre que la composición específica del pienso cumple el objetivo de nutrición específico previsto y que no tiene ningún efecto adverso en la salud animal, la salud humana, el medio ambiente ni el bienestar de los animales.

3. La Comisión pondrá inmediatamente a disposición de los Estados miembros la solicitud, junto con el expediente.

4. En caso de que, en función de la información científica y técnica disponible, la Comisión tenga motivos para creer que la utilización del pienso específico puede incumplir el objetivo de nutrición específico deseado o pueda tener efectos adversos en la salud animal, la salud humana, el medio ambiente o el bienestar de los animales, recabará, en el plazo de tres meses a partir de la recepción de una solicitud válida, el dictamen de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (en lo sucesivo denominada «la Autoridad»). La Autoridad emitirá un dictamen en un plazo de seis meses a partir de la recepción de la petición. Este plazo se ampliará cuando la Autoridad recabe información complementaria del solicitante.

5. En el plazo de seis meses a partir de la recepción de la solicitud válida o, si procede, de la recepción del dictamen de la Autoridad, la Comisión adoptará un reglamento por el que se actualice la lista de usos previstos en caso de que se satisfagan las condiciones establecidas en el apartado 2.

Estas medidas, destinadas a modificar elementos no esenciales del presente Reglamento completándolo, se adoptarán con arreglo al procedimiento de reglamentación con control contemplado en el artículo 28, apartado 6.

6. No obstante lo dispuesto en el apartado 5, en el plazo de seis meses a partir de la recepción de una solicitud válida o, si procede, de la recepción del dictamen de la Autoridad, la Comisión podrá concluir el procedimiento y decidir no proceder a la actualización, en cualquier momento del proceso, si considera que dicha actualización no está justificada. La Comisión para ello actuará con arreglo al procedimiento de reglamentación con control contemplado en el artículo 28, apartado 3.

En este caso y si procede, la Comisión informará directamente al solicitante y a los Estados miembros indicando en su carta los motivos por los que no considera justificada la actualización.

7. La Comisión podrá adoptar, con arreglo al procedimiento de reglamentación contemplado en el artículo 28, apartado 3, las medidas de ejecución relativas a la preparación y presentación de la solicitud.

CAPÍTULO 4

ETIQUETADO, PRESENTACIÓN Y ENVASADO

Artículo 11

Principios para el etiquetado y la presentación

1. El etiquetado y la presentación del pienso no deberán inducir a error al usuario, en particular:

a) sobre el uso previsto o las características del pienso, en particular, la naturaleza, el método de fabricación o producción, las propiedades, la composición, la cantidad, la durabilidad ni las especies o categorías de animales a los que está destinado;

b) atribuyendo al pienso efectos o características que no posea o sugiriendo que posee características especiales, cuando, de hecho, todos los piensos similares poseen estas mismas características, o

c) en lo que respecta al cumplimiento en el etiquetado del Catálogo comunitario y los Códigos comunitarios mencionados en los artículos 24 y 25.

2. Las materias primas para piensos o los piensos compuestos comercializados a granel o en envases o recipientes sin sellar de conformidad con el artículo 23, apartado 2, deberán ir acompañados por un documento en el que figuren todas las indicaciones obligatorias del etiquetado de conformidad con el presente Reglamento.

3. Cuando se ofrezcan piensos a la venta mediante comunicación a distancia tal como se define en el artículo 2 de la Directiva 97/7/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de mayo de 1997, relativa a la protección de los consumidores en materia de contratos a distancia⁽¹⁾, las indicaciones obligatorias del etiquetado requeridas por el presente Reglamento, con excepción de las indicaciones previstas en el artículo 15, letras b), d) y e), y en el artículo 16, apartado 2, letra c), o el artículo 17, apartado 1, letra d), deberán figurar en el material de soporte de la venta a distancia o facilitarse por otros medios adecuados antes de la celebración del contrato a distancia. Las indicaciones previstas en el artículo 15, letras b), d) y e), y en el artículo 16, apartado 2, letra c), o el artículo 17, apartado 1, letra d), se facilitarán como muy tarde en el momento de entrega de los piensos.

4. En el anexo II se establecen disposiciones de etiquetado adicionales a las previstas en el presente capítulo.

5. En el anexo IV del presente Reglamento se enumeran los márgenes de tolerancia permitidos para las diferencias entre los valores de la composición de una materia prima para piensos o un pienso compuesto que figuran en la etiqueta y los valores analizados en los controles oficiales de conformidad con el Reglamento (CE) n° 882/2004.

⁽¹⁾ DO L 144 de 4.6.1997, p. 19.

Artículo 12

Responsabilidad

1. La persona responsable del etiquetado garantizará la presencia y exactitud sustancial de las indicaciones del etiquetado.
2. La persona responsable del etiquetado será el explotador de la empresa de piensos que comercialice por primera vez un pienso o, cuando proceda, el explotador de la empresa de piensos con cuyo nombre o razón social se comercialice el pienso.
3. En la medida en que sus actividades afecten al etiquetado dentro de la empresa bajo su control, los explotadores de empresas de piensos garantizarán que la información proporcionada a través de cualquier medio cumpla los requisitos del presente Reglamento.
4. Los explotadores de empresas de piensos responsables de actividades de venta al por menor o de distribución que no afecten al etiquetado deberán actuar con la debida diligencia a fin de contribuir a garantizar el cumplimiento de los requisitos de etiquetado, en particular, no suministrando piensos que, a partir de la información que poseen y en tanto que profesionales, sepan o deberían haber supuesto que no cumplen estos requisitos.
5. Dentro de las empresas bajo su control, los explotadores de empresas de piensos deberán garantizar que las indicaciones obligatorias del etiquetado se transmiten a lo largo de la cadena alimentaria con el fin de permitir la transmisión de la información al usuario final de los piensos de conformidad con el presente Reglamento.

Artículo 13

Alegaciones

1. En el etiquetado y la presentación de las materias primas para piensos y de los piensos compuestos podrá destacarse la presencia o la ausencia de una sustancia en el pienso, una característica o un proceso nutricional específico o bien una función específica relacionada con cualquiera de estos elementos, siempre y cuando se cumplan las siguientes condiciones:
 - a) la alegación es objetiva, verificable por las autoridades competentes y comprensible por el usuario del pienso, y
 - b) la persona responsable del etiquetado proporciona, a petición de la autoridad competente, un fundamento científico de la alegación, tanto por referencia a pruebas científicas públicamente disponibles como de investigaciones documentadas de la empresa. El fundamento científico deberá estar disponible en el momento de la comercialización del pienso. Los compradores tendrán derecho a llamar la atención de la autoridad competente acerca de sus dudas sobre la veracidad de la alegación. Si se llegara a la conclusión de que la alegación no está suficientemente fundamentada, se considerará que el etiquetado correspondiente induce a error a efectos del artículo 11. En caso de que la autoridad competente abrigue dudas sobre el fundamento científico de la alegación en cuestión, podrá someter la cuestión a la Comisión. La Comisión podrá adoptar una decisión, en su caso, previo

dictamen de la Autoridad, con arreglo al procedimiento consultivo contemplado en el artículo 28, apartado 2.

2. Sin perjuicio del apartado 1, las alegaciones relativas a la optimización de la nutrición y al apoyo o la protección de las condiciones fisiológicas estarán permitidas a menos que contengan una de las alegaciones mencionadas en el apartado 3, letra a).
3. En el etiquetado o la presentación de las materias primas para piensos o del pienso compuesto no deberá alegarse que estos:
 - a) prevendrán, tratarán o curarán una enfermedad, excepto en el caso de los coccidiostáticos y los histomonostáticos autorizados en virtud del Reglamento (CE) n° 1831/2003; la presente letra no se aplicará, sin embargo, a las alegaciones relativas a desequilibrios nutricionales siempre y cuando no lleven asociado ningún síntoma patológico;
 - b) tienen un objetivo de nutrición específico de los contemplados en la lista de usos previstos a que se refiere el artículo 9, a menos que cumplan los requisitos establecidos en la misma.
4. Podrán incluirse las especificaciones relativas a los requisitos establecidos en los apartados 1 y 2 en los Códigos comunitarios mencionados en el artículo 25.

Artículo 14

Presentación de las indicaciones del etiquetado

1. Las indicaciones obligatorias del etiquetado deberán presentarse completas en un lugar prominente del envase o el recipiente, o bien en una etiqueta fijada al mismo o bien en el documento de acompañamiento previsto en el artículo 11, apartado 2, de manera bien visible, claramente legible e indeleble, al menos en la lengua oficial o una de las lenguas oficiales del Estado miembro o región en el que se comercializa.
2. Las indicaciones obligatorias del etiquetado deberán ser fácilmente identificables y no quedar ocultas por ninguna otra información. Deberán presentarse en un color, unos caracteres y un tamaño que no oculte ni destaque ninguna parte de la información, salvo en caso de que se trate de llamar la atención sobre alguna advertencia.
3. Podrán incluirse especificaciones relativas a los requisitos establecidos en los apartados 1 y 2 y a la presentación del etiquetado voluntario a que se refiere el artículo 22 en los Códigos comunitarios mencionados en el artículo 25.

Artículo 15

Requisitos generales de etiquetado obligatorios

No podrá comercializarse ninguna materia prima para piensos ni ningún pienso compuesto en cuya etiqueta no figuren las indicaciones siguientes:

- a) el tipo de pienso: «materia prima para piensos», «pienso completo» o «pienso complementario», según proceda;

- en el caso del «pienso completo», podrá utilizarse la denominación «pienso completo de lactancia», si procede,
 - en el caso del «pienso complementario», podrán utilizarse las siguientes denominaciones, en su caso: «pienso mineral» o «pienso complementario de lactancia»,
 - en el caso de los animales de compañía diferentes de perros y gatos, las denominaciones «pienso completo» o «pienso complementario» podrán sustituirse por «pienso compuesto»;
- b) el nombre o la razón social y la dirección del explotador de la empresa de piensos responsable del etiquetado;
- c) en su caso, el número de autorización del establecimiento de la persona responsable del etiquetado concedido de conformidad con el artículo 13 del Reglamento (CE) n° 1774/2002 para los establecimientos autorizados con arreglo al artículo 23, apartado 2, letras a), b) y c), del Reglamento (CE) n° 1774/2002, o con el artículo 17 del Reglamento (CE) n° 1774/2002 o con el artículo 10 del Reglamento (CE) n° 183/2005; si la persona responsable del etiquetado tiene varios números de autorización, deberá utilizar el número que se le haya concedido de conformidad con el Reglamento (CE) n° 183/2005;
- d) el número de referencia del lote;
- e) la cantidad neta, expresada en unidades de masa cuando se trate de productos sólidos, y en unidades de masa o de volumen cuando se trate de líquidos;
- f) la lista de aditivos para piensos precedida del título «Aditivos», de conformidad con el capítulo I del anexo VI o VII, según proceda, y sin perjuicio de las disposiciones en materia de etiquetado establecidas en el acto jurídico por el que se autoriza el aditivo para piensos correspondiente;
- g) el contenido de humedad de conformidad con el punto 6 del anexo I.

Artículo 16

Requisitos específicos de etiquetado obligatorios para las materias primas para piensos

1. Además de los requisitos previstos en el artículo 15, el etiquetado de las materias primas para piensos también deberá incluir:
- a) la denominación de la materia prima para piensos; la denominación se utilizará de conformidad con el artículo 24, apartado 5;
 - b) la declaración obligatoria correspondiente a la categoría respectiva, tal como se establece en la lista del anexo V; la declaración obligatoria podrá sustituirse por las indicaciones establecidas en el Catálogo comunitario a que se refiere el artículo 24 para cada materia prima para piensos de la categoría respectiva.
2. Además de los requisitos previstos en el apartado 1, el etiquetado de las materias primas para piensos deberá incluir lo siguiente cuando se hayan añadido aditivos:

- a) las especies o categorías de animales a los que está destinada la materia prima para piensos cuando los aditivos en cuestión no hayan sido autorizados para todas las especies animales o lo hayan sido con límites máximos para algunas especies;
- b) las instrucciones para un uso adecuado de conformidad con el anexo II, punto 4, cuando se haya fijado un contenido máximo de los aditivos en cuestión;
- c) la fecha de durabilidad mínima para los aditivos que no sean tecnológicos.

Artículo 17

Requisitos específicos de etiquetado obligatorios para los piensos compuestos

1. Además de los requisitos previstos en el artículo 15, el etiquetado de los piensos compuestos también deberá incluir:

- a) las especies o categorías de animales a los que se destina el pienso compuesto;
- b) las instrucciones para un uso adecuado en las que se indique el destino previsto del pienso; dichas instrucciones deberán, cuando proceda, ser conformes a lo dispuesto en el anexo II, punto 4;
- c) cuando el productor no sea la persona responsable del etiquetado, deberá proporcionarse lo siguiente:
 - el nombre o la razón social y la dirección del productor, o bien
 - el número de autorización del productor a que se refiere el artículo 15, letra c), o un número de identificación con arreglo a los artículos 9, 23 o 24 del Reglamento (CE) n° 183/2005; en caso de que no se disponga de dicho número, un número de identificación concedido a petición del productor o del explotador de la empresa de piensos importadora de conformidad con las instrucciones establecidas en el capítulo II del anexo V del Reglamento (CE) n° 183/2005;

d) la indicación de la fecha de durabilidad mínima con arreglo a los requisitos siguientes:

- «utilizar antes del ...» seguido de una fecha (día) en el caso de piensos muy perecederos debido a procesos de degradación,
- «utilizar preferentemente antes del ...» seguido de una fecha (mes) en el caso de los demás piensos.

Si figura en la etiqueta la fecha de fabricación, también podrá indicarse la fecha de durabilidad mínima de la forma siguiente «... (período de tiempo en días o meses) después de la fecha de fabricación»;

e) la lista de las materias primas de que está compuesto el pienso, bajo el título «composición», e indicando el nombre de cada materia prima para piensos de conformidad con el

artículo 16, apartado 1, letra a), y enumerándolas en orden decreciente por peso, calculado a partir del contenido de humedad del pienso compuesto; en esta lista podrá incluirse el porcentaje en peso;

f) las declaraciones obligatorias previstas en el capítulo II del anexo VI o VII, según proceda.

2. En lo que respecta a la lista mencionada en el apartado 1, letra e), se aplicarán los requisitos siguientes:

a) deberá indicarse el nombre y el porcentaje en peso de una materia prima para piensos si se destaca su presencia en el etiquetado en forma de palabras, imágenes o representación gráfica;

b) si no se indican en el etiquetado los porcentajes en peso de las materias primas para piensos que se han añadido al pienso compuesto para animales destinados a la producción de alimentos, la persona responsable del etiquetado deberá, sin perjuicio de la Directiva 2004/48/CE, poner a disposición del comprador, previa solicitud de este, información sobre la composición cuantitativa en un margen de +/- 15 % del valor con arreglo a la fórmula del pienso;

c) en el caso de los piensos compuestos para animales no destinados a la producción de alimentos, con excepción de los animales de peletería, la indicación del nombre específico de la materia prima para piensos podrá sustituirse por el nombre de la categoría a la que pertenece dicha materia prima.

3. En caso de cualquier urgencia relacionada con la salud humana o animal o con el medio ambiente, y sin perjuicio de la Directiva 2004/48/CE, la autoridad competente podrá facilitar al comprador la información de que disponga en virtud del artículo 5, apartado 2, siempre y cuando, tras sopesar los respectivos intereses legítimos de fabricantes y compradores, llegue a la conclusión de que la comunicación de dicha información está justificada. En su caso, la autoridad competente supeditará la comunicación de dicha información a la firma de una cláusula de confidencialidad por parte del comprador.

4. A efectos del apartado 2, letra c), la Comisión establecerá una lista de categorías de materias primas para piensos que puedan ser indicadas, en lugar de materias primas para piensos específicas, en el etiquetado de los piensos para animales no destinados a la producción de alimentos, con excepción de los animales de peletería.

Estas medidas, destinadas a modificar elementos no esenciales del presente Reglamento completándolo, se adoptarán con arreglo al procedimiento de reglamentación con control contemplado en el artículo 28, apartado 4.

Artículo 18

Requisitos adicionales de etiquetado obligatorios para los piensos destinados a objetivos de nutrición específicos

Además de los requisitos generales obligatorios establecidos en los artículos 15, 16 o 17, según proceda, el etiquetado de los

piensos destinados a objetivos de nutrición específicos también deberá incluir:

a) la cualificación «dietéticos», exclusivamente en el caso de los piensos destinados a objetivos de nutrición específicos, junto con la denominación del pienso tal como se establece en el artículo 15, letra a);

b) las indicaciones prescritas para el uso previsto correspondiente que figuran en las columnas 1 a 6 de la lista de usos previstos mencionada en el artículo 9;

c) la mención de que es conveniente recabar la opinión de un experto en nutrición o de un veterinario antes de utilizar el pienso o de ampliar su período de utilización.

Artículo 19

Requisitos adicionales de etiquetado obligatorios para los alimentos para animales de compañía

En la etiqueta de los alimentos para animales de compañía deberá figurar un número de teléfono gratuito u otro medio de comunicación adecuado que permita al comprador obtener información adicional a las indicaciones obligatorias sobre:

a) los aditivos para piensos que contiene el alimento;

b) las materias primas para piensos que contiene, designadas por categoría tal como se menciona en el artículo 17, apartado 2, letra c).

Artículo 20

Requisitos adicionales de etiquetado obligatorios para piensos que incumplen la normativa

1. Además de los requisitos establecidos en los artículos 15, 16, 17 y 18, los piensos que no se ajusten a los requisitos de la legislación comunitaria establecidos en el anexo VIII, como las materias primas contaminadas, llevarán las indicaciones de etiquetado previstas en dicho anexo.

2. La Comisión podrá modificar el anexo VIII para adaptarlo a la evolución de la legislación en el desarrollo de normas.

Estas medidas, destinadas a modificar los elementos no esenciales del presente Reglamento complementándolas, se adoptarán con arreglo al procedimiento de reglamentación con control contemplado en el artículo 28, apartado 4.

Artículo 21

Excepciones

1. Las indicaciones mencionadas en el artículo 15, letras c), d), e) y g), y en el artículo 16, apartado 1, letra b), no serán obligatorias cuando, antes de cada transacción, el comprador haya declarado por escrito que no necesita esta información. Una transacción podrá consistir en varios envíos.

2. En el caso de los piensos envasados, las indicaciones mencionadas en el artículo 15, letras c), d) y e), y en el artículo 16, apartado 2, letra c), o el artículo 17, apartado 1, letras c), d) y e), podrán figurar en el envase en lugar distinto de la etiqueta a la que se refiere el artículo 14, apartado 1. En estos casos, deberá señalarse el lugar en el que se encuentran estas indicaciones.

3. Sin perjuicio del anexo I del Reglamento (CE) n° 183/2005, las indicaciones mencionadas en el artículo 15, letras c), d), e) y g), y en el artículo 16, apartado 1, letra b), del presente Reglamento, no serán obligatorias para las materias primas para piensos que no contengan aditivos para piensos, a excepción de los conservantes o los aditivos para ensilaje, y que hayan sido producidas y suministradas por un explotador de empresa de piensos de conformidad con el artículo 5, apartado 1, del Reglamento (CE) n° 183/2005, a un usuario de piensos de producción primaria para su utilización en su propia explotación.

4. Las declaraciones obligatorias mencionadas en el artículo 17, apartado 1, letra f), no serán necesarias para las mezclas de granos enteros, las semillas y los frutos.

5. En el caso de los piensos compuestos que no estén constituidos por más de tres materias primas para piensos, las indicaciones mencionadas en el artículo 17, apartado 1, letras a) y b), no serán obligatorias cuando las materias primas utilizadas aparezcan claramente en la descripción.

6. En lo que respecta a las cantidades que no superen los 20 kg de materias primas para piensos o piensos compuestos destinados al usuario final y vendidos a granel, las indicaciones mencionadas en los artículos 15, 16 y 17 podrán comunicarse al comprador mediante un anuncio apropiado en el punto de venta. En este caso, las indicaciones mencionadas en el artículo 15, letra a), y el artículo 16, apartado 1, o en el artículo 17, apartado 1, letras a) y b), según proceda, deberán facilitarse al comprador como muy tarde en la factura o adjunta a ella.

7. En cuanto a los alimentos para animales de compañía que se vendan envasados en varios recipientes, las indicaciones mencionadas en el artículo 15, letras b), c), f) y g), y en el artículo 17, apartado 1, letras b), c), e) y f), podrán presentarse solamente en el envasado exterior en lugar de en cada recipiente siempre y cuando el peso total combinado del envase no supere los 10 kg.

8. No obstante lo dispuesto en las disposiciones del presente Reglamento, los Estados miembros podrán aplicar disposiciones nacionales a los piensos destinados a animales que se mantienen en cautividad con fines científicos o experimentales a condición de que se indique claramente en la etiqueta este destino. Los Estados miembros notificarán estas disposiciones a la Comisión lo antes posible.

Artículo 22

Etiquetado voluntario

1. Además de los requisitos obligatorios de etiquetado, el etiquetado de las materias primas para piensos y de los piensos

compuestos también podrá incluir indicaciones voluntarias, siempre y cuando se cumplan los principios generales establecidos en el presente Reglamento.

2. El etiquetado voluntario podrá regularse con más detalle en los Códigos comunitarios a que se refiere el artículo 25.

Artículo 23

Envasado

1. Las materias primas para piensos y los piensos compuestos únicamente podrán comercializarse en envases o recipientes sellados. Los envases o los recipientes deberán sellarse de manera que, cuando se abran, el sistema de cierre quede dañado y no puedan reutilizarse.

2. No obstante lo dispuesto en el apartado 1, los piensos siguientes podrán comercializarse a granel o en envases o recipientes sin sellar:

- a) las materias primas para piensos;
- b) piensos compuestos obtenidos exclusivamente mezclando grano o frutos enteros;
- c) entregas entre productores de piensos compuestos;
- d) entregas de piensos compuestos realizadas directamente por el productor al usuario de los piensos;
- e) entregas de los productores de piensos compuestos a las empresas envasadoras;
- f) cantidades de piensos compuestos que no superen los 50 kilogramos de peso que estén destinados al usuario final y se tomen directamente de un envase o un recipiente sellado;
- g) bloques o piedras para lamer.

CAPÍTULO 5

CATÁLOGO COMUNITARIO DE MATERIAS PRIMAS PARA PIENSOS Y CÓDIGOS COMUNITARIOS DE BUENAS PRÁCTICAS DE ETIQUETADO

Artículo 24

Catálogo comunitario de materias primas para piensos

1. Se creará el Catálogo comunitario de materias primas para piensos (en lo sucesivo, «el Catálogo») como una herramienta para mejorar el etiquetado de estas materias primas y de los piensos compuestos. El Catálogo facilitará el intercambio de información sobre las propiedades del producto y enumerará las materias primas para piensos de manera no exhaustiva. En él se incluirán para cada materia prima para piensos enumerada al menos las siguientes indicaciones:

- a) la denominación;
- b) el número de identificación;
- c) una descripción de la materia prima para piensos, incluida información sobre el proceso de fabricación, en su caso;

d) indicaciones sustitutivas de la declaración obligatoria a efectos del artículo 16, apartado 1, letra b);

e) un glosario con la definición de los diferentes procesos y expresiones técnicas mencionados.

2. La primera versión del Catálogo se adoptará con arreglo al procedimiento de consulta contemplado en el artículo 28, apartado 2, a más tardar el 21 de marzo de 2010 y sus entradas serán las enumeradas en la parte B del anexo de la Directiva 96/25/CE y en las columnas 2 a 4 del anexo de la Directiva 82/471/CEE. El glosario consistirá en el punto IV de la parte A del anexo de la Directiva 96/25/CE.

3. El procedimiento establecido en el artículo 26 se aplicará a las modificaciones del Catálogo.

4. El presente artículo se aplica sin perjuicio de los requisitos de seguridad establecidos en el artículo 4.

5. La utilización del Catálogo por los explotadores de empresas de piensos será voluntaria. No obstante, solo podrá utilizarse el nombre de una materia prima para piensos que figure en el Catálogo cuando se cumplan todas las disposiciones pertinentes del mismo.

6. La persona que comercialice por vez primera una materia prima para piensos que no figure en el Catálogo deberá notificar inmediatamente su uso a los representantes de los sectores europeos de la producción de piensos a que se refiere el artículo 26, apartado 1. Los representantes de los sectores europeos de la producción de piensos publicarán un registro de dichas notificaciones en Internet y lo actualizarán periódicamente.

Artículo 25

Códigos comunitarios de buenas prácticas de etiquetado

1. La Comisión alentará la elaboración de dos Códigos comunitarios de buenas prácticas de etiquetado (en lo sucesivo, «los Códigos»), uno sobre los alimentos para animales de compañía y otro sobre los piensos compuestos para animales destinados a la producción de alimentos, que podrá incluir una sección dedicada a los piensos compuestos para animales de peletería.

2. Los Códigos tendrán por objetivo mejorar la adecuación del etiquetado. Deberán, en particular, establecer disposiciones sobre la presentación de las indicaciones del etiquetado contemplada en el artículo 14, sobre el etiquetado voluntario contemplado en el artículo 22 y sobre el uso de las alegaciones contemplado en el artículo 13.

3. El procedimiento establecido en el artículo 26 se aplicará al establecimiento y las posibles modificaciones de los Códigos.

4. La utilización de los Códigos por los explotadores de empresas de piensos será voluntaria. No obstante, la persona responsable del etiquetado solo podrá indicar la utilización de cualquiera de los Códigos en el etiquetado cuando se cumplan todas las disposiciones pertinentes de dicho Código.

Artículo 26

Elaboración de los Códigos y modificaciones del Catálogo y de los Códigos

1. Los proyectos de modificación del Catálogo y los proyectos de los Códigos, así como cualquier proyecto de modificación de los mismos, se elaborarán y modificarán, según proceda, por todos los representantes pertinentes de los sectores europeos de la producción de piensos:

a) en consulta con otras partes interesadas, como los usuarios de los piensos;

b) en colaboración con las autoridades competentes de los Estados miembros y, cuando proceda, la Autoridad;

c) teniendo en cuenta las experiencias pertinentes procedentes de los dictámenes emitidos por la Autoridad y la evolución de los conocimientos científicos o técnicos.

2. Sin perjuicio del apartado 3, la Comisión adoptará medidas a los efectos del presente artículo con arreglo al procedimiento consultivo contemplado en el artículo 28, apartado 2.

3. Deberán adoptarse enmiendas al Catálogo por las que se establezca el contenido máximo en impurezas químicas a que se refiere el anexo I, apartado 1, o los niveles de pureza botánica a que se refiere el anexo I, apartado 2, o los niveles del contenido de humedad a que se refiere el anexo I, apartado 6, o las indicaciones sustitutivas de la declaración obligatoria a que se refiere el artículo 16, apartado 1, letra b). Estas medidas de alcance general, destinadas a modificar elementos no esenciales del presente Reglamento, se adoptarán con arreglo al procedimiento de reglamentación con control contemplado en el artículo 28, apartado 4.

4. Solo se podrán adoptar medidas en virtud del presente artículo si se cumplen las condiciones siguientes:

a) que se hayan elaborado de conformidad con lo dispuesto en el apartado 1;

b) que su contenido pueda aplicarse en toda la Comunidad en los sectores a los que se refieran, y

c) que sean adecuadas para cumplir los objetivos del presente Reglamento.

5. El Catálogo se publicará en la serie L del *Diario Oficial de la Unión Europea*. El título y las referencias de los Códigos se publicarán en la serie C del *Diario Oficial de la Unión Europea*.

CAPÍTULO 6

DISPOSICIONES GENERALES Y FINALES

Artículo 27

Medidas de aplicación

1. La Comisión podrá modificar los anexos con el fin de adaptarlos a la luz de la evolución científica y técnica.

Estas medidas destinadas a modificar elementos no esenciales del presente Reglamento, incluso completándolo, se adoptarán con arreglo al procedimiento de reglamentación con control contemplado en el artículo 28, apartado 4.

2. Podrán adoptarse otras medidas de ejecución que sean necesarias para la aplicación del presente Reglamento con arreglo al procedimiento de reglamentación con control contemplado en el artículo 28, apartado 3, salvo que se disponga expresamente lo contrario.

Artículo 28

Procedimiento de comité

1. La Comisión estará asistida por el Comité permanente de la cadena alimentaria y de sanidad animal creado por el artículo 58 del Reglamento (CE) n° 178/2002, denominado en lo sucesivo «el Comité».

2. En los casos en que se haga referencia al presente apartado, serán de aplicación los artículos 3 y 7 de la Decisión 1999/468/CE, observando lo dispuesto en su artículo 8.

3. En los casos en que se haga referencia al presente apartado, serán de aplicación los artículos 5 y 7 de la Decisión 1999/468/CE, observando lo dispuesto en su artículo 8.

El plazo contemplado en el artículo 5, apartado 6, de la Decisión 1999/468/CE, queda fijado en tres meses.

4. En los casos en que se haga referencia al presente apartado, serán de aplicación el artículo 5 bis, apartados 1 a 4, y el artículo 7 de la Decisión 1999/468/CE, observando lo dispuesto en su artículo 8.

5. En los casos en que se haga referencia al presente apartado, serán de aplicación el artículo 5 bis, apartados 1, 2, 4 y 6, y el artículo 7 de la Decisión 1999/468/CE, observando lo dispuesto en su artículo 8.

6. En los casos en que se haga referencia al presente apartado, serán de aplicación el artículo 5 bis, apartados 1 a 4, y apartado 5, letra b), y el artículo 7 de la Decisión 1999/468/CE, observando lo dispuesto en su artículo 8.

Los plazos contemplados en el artículo 5 bis, apartado 3, letra c), y apartado 4, letras b) y e), de la Decisión 1999/468/CE quedan fijados en dos meses, un mes y dos meses, respectivamente.

Artículo 29

Modificación del Reglamento (CE) n° 1831/2003

El artículo 16 del Reglamento (CE) n° 1831/2003 queda modificado como sigue:

1) El apartado 1 queda modificado como sigue:

a) la letra d) se sustituye por el texto siguiente:

«d) cuando corresponda, el número de autorización del establecimiento que fabrica o comercializa el aditivo para piensos o la premezcla con arreglo al artículo 10 del Reglamento (CE) n° 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 12 de enero de 2003, por el

que se fijan requisitos en materia de higiene de los piensos (*), o, según proceda, al artículo 5 de la Directiva 95/69/CE;

(*) DO L 35 de 8.2.2005, p. 1.»;

b) se añade el párrafo siguiente al final del apartado:

«En el caso de las premezclas, las letras b), d), e) y g) no se aplicarán a los aditivos para piensos añadidos.».

2) El apartado 3 se sustituye por el texto siguiente:

«3. Además de la información indicada en el apartado 1, en el envase o recipiente que contenga un aditivo para piensos perteneciente a uno de los grupos funcionales especificados en el anexo III, o una premezcla que contenga un aditivo perteneciente a uno de los grupos funcionales especificados en el anexo III, deberá figurar, de manera bien visible, claramente legible e indeleble, la información indicada en dicho anexo.».

3) El apartado 4 se sustituye por el texto siguiente:

«4. En el caso de las premezclas, la palabra “Premezcla” deberá figurar en la etiqueta. Deberán declararse los soportes, en el caso de las materias primas para piensos, de conformidad con el artículo 17, apartado 1, letra e), del Reglamento (CE) n° 767/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 13 de julio de 2009, sobre la comercialización y la utilización de los piensos (*), y cuando se utilice agua como soporte, se declarará asimismo el contenido de humedad de la premezcla. Solo podrá indicarse una fecha de durabilidad mínima para cada premezcla en su conjunto; dicha fecha de durabilidad mínima se determinará a partir de la fecha de durabilidad mínima de cada uno de sus componentes.».

(*) DO L 229 de 1.9.2009, p. 1.».

Artículo 30

Derogación

Con efecto a partir del 1 de septiembre de 2010 quedan derogados el artículo 16 de la Directiva 70/524/CEE, las Directivas 79/373/CEE, 80/511/CEE, 82/471/CEE, 83/228/CEE, 93/74/CEE, 93/113/CE y 96/25/CE, y la Decisión 2004/217/CE.

Las referencias a las Directivas y a la Decisión derogadas se entenderán hechas al presente Reglamento con arreglo a la tabla de correspondencias que figura en el anexo IX.

Artículo 31

Sanciones

Los Estados miembros determinarán las sanciones que se impondrán en caso de infracción de las disposiciones del presente Reglamento y adoptarán todas las medidas necesarias para garantizar su cumplimiento. Las sanciones establecidas deberán ser efectivas, proporcionadas y disuasorias.

Los Estados miembros notificarán dichas disposiciones a la Comisión a más tardar el 1 de septiembre de 2010, así como cualquier modificación posterior de las mismas lo antes posible.

Artículo 32

Disposiciones transitorias

1. No obstante lo dispuesto en el artículo 33, párrafo segundo, el pienso comercializado o etiquetado de conformidad con las Directivas 79/373/CEE, 82/471/CEE, 93/74/CEE y 96/25/CE antes del 1 de septiembre de 2010 podrá comercializarse o permanecer en el mercado hasta que se agoten las existencias.

2. No obstante lo dispuesto en el artículo 8, apartado 2, las clases de pienso a que se refiere dicho artículo que hayan sido legalmente comercializadas antes del 1 de septiembre de 2010 podrán comercializarse o permanecer en el mercado hasta que se adopte una decisión sobre la solicitud de actualización de la lista de usos previstos a que se refiere el artículo 10, siempre y cuando dicha solicitud se haya presentado antes del 1 de septiembre de 2010.

3. No obstante lo dispuesto en el anexo I, apartado 1, del presente Reglamento, las materias primas para piensos podrán comercializarse y utilizarse hasta que se fije el contenido má-

ximo de impurezas químicas derivadas de su proceso de fabricación y de los auxiliares tecnológicos, siempre y cuando cumplan al menos las condiciones establecidas en el anexo, parte A, punto II, apartado 1, de la Directiva 96/25/CE. Esta excepción dejará de aplicarse el 1 de septiembre de 2012.

4. Se podrán adoptar medidas para facilitar la transición a la aplicación del presente Reglamento. En particular, podrá precisarse en qué circunstancias pueden etiquetarse los piensos conforme al presente Reglamento antes de su fecha de aplicación. Estas medidas, destinadas a modificar elementos no esenciales del presente Reglamento, incluso completándolo, se adoptarán con arreglo al procedimiento de reglamentación con control contemplado en el artículo 28, apartado 4.

Artículo 33

Entrada en vigor

El presente Reglamento entrará en vigor a los veinte días de su publicación en el *Diario Oficial de la Unión Europea*.

Será aplicable a partir del 1 de septiembre de 2010.

Sin embargo, los artículos 31 y 32 se aplicarán a partir de la fecha de entrada en vigor del presente Reglamento.

El presente Reglamento será obligatorio en todos sus elementos y directamente aplicable en cada Estado miembro.

Hecho en Bruselas, el 13 de julio de 2009.

Por el Parlamento Europeo
El Presidente
H.-G. PÖTTERING

Por el Consejo
El Presidente
E. ERLANDSSON

ANEXO I

Disposiciones técnicas sobre impurezas, piensos de lactancia, materias primas para piensos aglutinantes o desnaturalizantes, nivel de cenizas y contenido de humedad a que se hace referencia en el artículo 4

1. De conformidad con las buenas prácticas a que se refiere el artículo 4 del Reglamento (CE) n° 1831/2003, las materias primas para piensos carecerán de impurezas químicas como consecuencia de su proceso de fabricación y de los auxiliares tecnológicos, excepto en caso de que se establezca un contenido máximo específico en el Catálogo mencionado en el artículo 24.
2. La pureza botánica de las materias primas para piensos no será inferior al 95 %, salvo en caso de que se haya establecido un nivel diferente en el Catálogo mencionado en el artículo 24. Las impurezas botánicas incluyen impurezas de materiales vegetales sin efectos adversos en los animales, como por ejemplo la paja y las semillas de otras especies cultivadas o las malas hierbas. En el caso de impurezas botánicas tales como residuos de otras semillas oleaginosas o frutos oleaginosos derivados de un proceso de fabricación anterior, no deberán superar el 0,5 % para cada tipo de semilla oleaginosa o fruto oleaginoso.
3. El nivel de hierro en los piensos de lactancia para terneros con un peso en vivo inferior o igual a 70 kilogramos será, como mínimo, de 30 miligramos por kilogramo de pienso completo con un contenido de humedad del 12 %.
4. Cuando se utilicen materias primas para piensos para desnaturalizar o aglutinar otras materias primas para piensos, el producto todavía podrá considerarse como una materia prima para piensos. Deberá etiquetarse la denominación, la naturaleza y la cantidad de la materia prima para piensos utilizada para aglutinar o desnaturalizar. Si una materia prima para piensos está aglutinada por otra, el porcentaje de esta última no deberá superar el 3 % del peso total.
5. El nivel de cenizas insolubles en ácido clorhídrico no superará el 2,2 % de la materia seca. No obstante, el nivel del 2,2 % podrá superarse para:
 - las materias primas para piensos,
 - los piensos compuestos que contengan agentes aglutinantes minerales autorizados,
 - los piensos minerales,
 - los piensos compuestos que contengan más del 50 % de subproductos del arroz o la remolacha azucarera,
 - los piensos compuestos destinados a peces de piscifactoría con un contenido de harina de pescado superior al 15 %,siempre que se declare el nivel en la etiqueta.
6. A condición de que no se establezca otro nivel en el anexo V o en el Catálogo mencionado en el artículo 24, deberá declararse el contenido de humedad del pienso si supera:
 - el 5 % en el caso de los piensos minerales que no contienen sustancias orgánicas,
 - el 7 % en el caso de los piensos de lactancia y de otros piensos compuestos con un contenido de leche que supere el 40 %,
 - el 10 % en el caso de los piensos minerales que contienen sustancias orgánicas,
 - el 14 % en el caso de otros piensos.

ANEXO II

Disposiciones generales sobre el etiquetado a que se hace referencia en el artículo 11, apartado 4

1. Los contenidos o niveles indicados o de declaración necesaria se expresarán en relación con el peso del pienso, salvo que se indique lo contrario.
 2. La indicación numérica de las fechas deberá ordenarse por día, mes y año y el formato se indicará en la etiqueta con la siguiente abreviación: «DD/MM/AA».
 3. Expresiones sinónimas en algunas lenguas:
 - a) en checo, la denominación «krmiva» puede sustituirse por «produkty ke krmení» cuando proceda; en alemán, la denominación «Einzelfuttermittel» puede sustituirse por «Futtermittel-Ausgangserzeugnis», en griego «πρώτη ύλη ζωοτροφών» puede sustituirse por «απλή ζωοτροφή» y en italiano «materia prima per mangimi» puede sustituirse por «mangime semplice»;
 - b) se autorizarán las siguientes expresiones para la denominación de los piensos para animales de compañía: en búlgaro «храна»; en español «alimento»; en checo, la denominación «kompletní krmná směs» puede sustituirse por «kompletní krmivo» y «doplňková krmná směs» por «doplňkové krmivo»; en inglés «pet food»; en italiano «alimento»; en húngaro «állateledel»; en neerlandés «samengesteld voeder»; en polaco «karma»; en esloveno «hrana za hišne živali»; en finés «lemmikkieläinten ruoka».
 4. En las instrucciones para el uso adecuado de los piensos complementarios y de las materias primas para piensos que contienen aditivos por encima de los niveles máximos establecidos para los piensos completos deberá señalarse la cantidad máxima
 - en gramos o kilogramos o unidades de volumen de piensos complementarios y materias primas para piensos por animal y por día, o
 - en porcentaje de la ración diaria, o
 - por kilo o en porcentaje del pienso completo,para garantizar que se respetan los valores máximos respectivos de aditivos para piensos en la ración diaria.
 5. Sin que ello afecte a los métodos analíticos, para los alimentos para animales de compañía, la expresión «proteína bruta» puede sustituirse por «proteína», «aceites y grasas brutos» puede sustituirse por «contenido de grasa», y «ceniza bruta» puede sustituirse por «residuo de incineración» o «materia inorgánica».
-

ANEXO III

Lista de materias primas cuya comercialización o utilización para la alimentación animal está prohibida o restringida a la que se hace referencia en el artículo 6

Capítulo 1: Materias primas prohibidas

- 1) heces, orina y otros contenidos gastrointestinales procedentes del vaciado o de la eliminación del aparato digestivo, independientemente de la forma de tratamiento o mezcla aplicada;
- 2) pieles tratadas con sustancias curtientes, incluidos sus residuos;
- 3) semillas y otros materiales de multiplicación de plantas que, debido a su uso previsto (multiplicación), hayan sido sometidos a un tratamiento especial con productos fitosanitarios tras la recolección, así como sus subproductos;
- 4) madera, incluido el serrín u otros materiales derivados de la madera, que haya sido tratada con protectores para maderas, tal como se definen en el anexo V de la Directiva 98/8/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de febrero de 1998, relativa a la comercialización de biocidas ⁽¹⁾;
- 5) todos los residuos obtenidos en las distintas fases del proceso de tratamiento de aguas residuales urbanas, domésticas e industriales, tal como se definen en el artículo 2 de la Directiva 91/271/CEE del Consejo, de 21 de mayo de 1991, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas ⁽²⁾, independientemente de cualquier proceso posterior al que se sometan dichos residuos y del origen de las aguas residuales;
- 6) residuos urbanos sólidos, tales como las basuras domésticas;
- 7) envases y partes de envases procedentes de la utilización de productos de la industria agroalimentaria.

Capítulo 2: Materias primas restringidas

⁽¹⁾ DO L 123 de 24.4.1998, p. 1.

⁽²⁾ DO L 135 de 30.5.1991, p. 40.

ANEXO IV

Tolerancias admitidas relativas a las indicaciones del etiquetado sobre la composición de las materias primas para piensos o los piensos compuestos contemplados en el artículo 11, apartado 5

1. Las tolerancias establecidas en el presente anexo incluyen desviaciones técnicas y analíticas. Cuando se hayan fijado a nivel comunitario tolerancias analíticas que incluyan incertidumbres de medición y variaciones de procedimiento, los valores establecidos en el punto 2 deberán adaptarse en consecuencia con el fin de incluir únicamente las tolerancias técnicas.
2. En los casos en que se descubra que la composición de una materia prima para piensos o un pienso compuesto se aparta de la composición que figura en la etiqueta de manera que se reduzca su valor, se permitirán las tolerancias siguientes:
 - a) para la proteína bruta, los azúcares, el almidón y la inulina:
 - 3 unidades para contenidos declarados iguales o superiores al 30 %,
 - 10 % del contenido declarado para contenidos declarados inferiores al 30 %, pero no inferiores al 10 %,
 - 1 unidad para contenidos declarados inferiores al 10 %;
 - b) para la fibra bruta, aceites y grasas brutos:
 - 2,2 unidades para contenidos declarados iguales o superiores al 15 %,
 - 15 % del contenido declarado para contenidos declarados inferiores al 15 %, pero no inferiores al 5 %,
 - 0,8 unidades para contenidos declarados inferiores al 5 %;
 - c) para la humedad, la ceniza bruta, la ceniza insoluble en ácido clorhídrico y los cloruros expresados como NaCl, el fósforo total, el sodio, el carbonato de calcio, el calcio, el magnesio, el índice de acidez y la materia insoluble en éter de petróleo:
 - 1,5 unidades para contenidos (valores) declarados iguales o superiores al 15 % (15), según proceda,
 - 10 % del contenido (valor) declarado para contenidos (valores) declarados inferiores al 15 % (15), pero no inferiores al 2 % (2), según proceda,
 - 0,2 unidades para contenidos (valores) declarados inferiores al 2 % (2), según proceda;
 - d) 5 % para el valor energético y 10 % para el valor proteico;
 - e) para los aditivos para piensos ⁽¹⁾:
 - 10 % si el contenido declarado es igual o superior a 1 000 unidades,
 - 100 unidades para contenidos declarados inferiores a 1 000 unidades pero no inferiores a 500 unidades,
 - 20 % del contenido declarado inferior a 500 unidades pero no inferior a 1 unidad,
 - 0,2 unidades para contenidos declarados inferiores a 1 unidad pero no inferiores a 0,5 unidades,
 - 40 % del contenido declarado inferior a 0,5 unidades.

Estas tolerancias también se aplicarán a los niveles máximos de aditivos para piensos en los piensos compuestos.
3. Siempre que no se supere el nivel máximo fijado para cada aditivo para piensos, la desviación en relación con el contenido declarado podrá ser de hasta tres veces la tolerancia correspondiente establecida en el punto 2.
4. Para los aditivos para piensos que pertenezcan al grupo de los microorganismos, el límite superior aceptable corresponderá al nivel máximo fijado.

⁽¹⁾ 1 unidad en este apartado significa 1 mg, 1 000 IU, 1×10^9 UFC o 100 unidades de actividad enzimática del aditivo para piensos respectivo.

ANEXO V

Declaración obligatoria para materias primas para piensos contemplada en el artículo 16, apartado 1, letra b)

	Materia prima para piensos constituida por	Declaración obligatoria de
1.	Forrajes, incluidos los forrajes groseros	Proteína bruta, si > 10 % Fibra bruta
2.	Granos de cereales	
3.	Productos y subproductos de granos de cereales	Almidón, si > 20 % Proteína bruta, si > 10 % Aceites y grasas brutos, si > 5 % Fibra bruta
4.	Semillas y frutos oleaginosos	
5.	Productos y subproductos de semillas y frutos oleaginosos	Proteína bruta, si > 10 % Aceites y grasas brutos, si > 5 % Fibra bruta
6.	Semillas de leguminosas	
7.	Productos y subproductos de semillas de leguminosas	Proteína bruta, si > 10 % Fibra bruta
8.	Tubérculos y raíces	
9.	Productos y subproductos de tubérculos y raíces	Almidón Fibra bruta Ceniza insoluble en HCl, si > 3,5 % de la materia seca
10.	Productos y subproductos de la industria azucarera de remolacha	Fibra bruta, si > 15 % Azúcar total expresado en sacarosa Ceniza insoluble en HCl, si > 3,5 % de la materia seca
11.	Productos y subproductos de la industria azucarera de caña	Fibra bruta, si > 15 % Azúcar total expresado en sacarosa
12.	Otras semillas y frutos, sus productos y subproductos, excepto los mencionados en los puntos 2 a 7	Proteína bruta Fibra bruta Aceites y grasas brutos, si > 10 %
13.	Otras plantas, sus productos y subproductos, excepto los mencionados en los puntos 8 a 11	Proteína bruta, si > 10 % Fibra bruta
14.	Productos y subproductos lácteos	Proteína bruta Humedad, si > 5 % Lactosa, si > 10 %
15.	Productos y subproductos de animales terrestres	Proteína bruta, si > 10 % Aceites y grasas brutos, si > 5 % Humedad, si > 8 %
16.	Pescados y otros animales marinos, sus productos y subproductos	Proteína bruta, si > 10 % Aceites y grasas brutos, si > 5 % Humedad, si > 8 %
17.	Minerales	Calcio Sodio Fósforo Otros minerales pertinentes
18.	Varios	Proteína bruta, si > 10 % Fibra bruta Aceites y grasas brutos, si > 10 % Almidón, si > 30 % Azúcar total expresado en sacarosa si > 10 % Ceniza insoluble en HCl, si > 3,5 % de la materia seca

ANEXO VI

Indicaciones del etiquetado para materias primas para piensos y piensos compuestos para animales destinados a la producción de alimentos

Capítulo I: Etiquetado de los aditivos para piensos contemplados en el artículo 15, letra f), y del artículo 22, apartado 1

1. Los siguientes aditivos deberán incluirse en la lista con su denominación específica definida en el acto jurídico pertinente por el que se autoriza el aditivo para piensos en cuestión, la cantidad añadida, su número de identificación y la denominación del grupo funcional, tal como se establece en el anexo I del Reglamento (CE) n° 1831/2003, o la categoría a que se refiere el artículo 6, apartado 1, de dicho Reglamento:
 - a) aditivos para los que se establece un contenido máximo para cualquiera de las especies de destino;
 - b) aditivos que pertenecen a las categorías «aditivos zootécnicos» y «coccidiostáticos e histomonostáticos»;
 - c) aditivos que pertenecen al grupo funcional de «urea y sus derivados» de la categoría «aditivos nutricionales», tal como se establece en el anexo I del Reglamento (CE) n° 1831/2003.
2. La denominación tal y como figura en el acto jurídico pertinente por el que se autoriza el aditivo para piensos en cuestión y la cantidad añadida del aditivo para piensos deberán indicarse si se destaca su presencia en el etiquetado en forma de palabras, imágenes o representación gráfica.
3. La persona responsable del etiquetado deberá revelar al comprador, si este lo solicita, los nombres, el número de identificación y el grupo funcional de los aditivos para piensos no mencionados en el punto 1.
4. Los aditivos para piensos no mencionados en el punto 1 podrán indicarse de manera voluntaria de la misma forma prevista en dicho apartado o bien parcialmente.
5. Si se etiqueta de forma voluntaria un aditivo organoléptico o nutricional para piensos, tal como se menciona en el anexo I del Reglamento (CE) n° 1831/2003, deberá indicarse la cantidad de aditivo añadida.
6. Si un aditivo pertenece a más de un grupo funcional, deberá indicarse el grupo funcional o la categoría correspondiente a su función principal en lo que respecta al pienso en cuestión.

Capítulo II: Etiquetado de los componentes analíticos a que se hace referencia en el artículo 17, apartado 1, letra f), y en el artículo 22, apartado 1

1. Los componentes analíticos de los piensos compuestos para animales destinados a la producción de alimentos se etiquetará de la manera siguiente:

Pienso	Componentes y niveles analíticos	Especies objetivo
Pienso completo	— Proteína bruta	Todas las especies
	— Fibra bruta	Todas las especies
	— Aceites y grasas brutos	Todas las especies
	— Ceniza bruta	Todas las especies
	— Lisina	Porcinos y aves de corral
	— Metionina	Porcinos y aves de corral
	— Calcio	Todas las especies
	— Sodio	Todas las especies
	— Fósforo	Todas las especies
Pienso complementario — Mineral	— Lisina	Porcinos y aves de corral
	— Metionina	Porcinos y aves de corral
	— Calcio	Todas las especies
	— Sodio	Todas las especies
	— Fósforo	Todas las especies
	— Magnesio	Rumiantes

Pienso	Componentes y niveles analíticos	Especies objetivo
Pienso complementario — Otros	— Proteína bruta	Todas las especies
	— Fibra bruta	Todas las especies
	— Aceites y grasas brutos	Todas las especies
	— Ceniza bruta	Todas las especies
	— Lisina	Porcinos y aves de corral
	— Metionina	Porcinos y aves de corral
	— Calcio $\geq 5 \%$	Todas las especies
	— Sodio	Todas las especies
	— Fósforo $\geq 2 \%$	Todas las especies
	— Magnesio $\geq 0,5 \%$	Rumiantes

2. En caso de que se indiquen aminoácidos, vitaminas u oligoelementos bajo el título de «componentes analíticos», se declarará su cantidad total.
3. En caso de que se indiquen el valor energético y/o el valor proteico, dicha indicación se efectuará con arreglo al método CE, si está disponible, o al método nacional oficial respectivo del Estado miembro en el que se comercializa el pienso, si está disponible.

ANEXO VII

Indicaciones del etiquetado para materias primas para piensos y piensos compuestos para animales no destinados a la producción de alimentos

Capítulo I: Etiquetado de los aditivos para piensos contemplados en el artículo 15, letra f) y en el artículo 22, apartado 1

1. Los siguientes aditivos deberán incluirse en la lista con su denominación específica definida en el acto jurídico pertinente por el que se autoriza el aditivo para piensos en cuestión y/o con su número de identificación, la cantidad añadida y la denominación respectiva del grupo funcional, tal como se establece en el anexo I del Reglamento (CE) n° 1831/2003, o la categoría a que se refiere el artículo 6, apartado 1, de dicho Reglamento:

- a) aditivos para los que se establece un contenido máximo para cualquiera de las especies objetivo;
- b) aditivos que pertenecen a las categorías «aditivos zootécnicos» y «coccidiostáticos e histomonostáticos»;
- c) aditivos que pertenecen al grupo funcional de «urea y sus derivados» de la categoría «aditivos nutricionales», tal como se establece en el anexo I del Reglamento (CE) n° 1831/2003.

2. No obstante lo dispuesto en el apartado primero, para los aditivos de los grupos funcionales «conservantes», «antioxidantes» y «colorantes» tal y como se establecen en el anexo I del Reglamento (CE) n° 1831/2003, podrá indicarse únicamente el grupo funcional correspondiente.

En ese caso, la persona responsable del etiquetado podrá comunicar al comprador, si este lo solicita, la información a que se refiere el párrafo primero.

- 3. La denominación tal y como figura en el acto jurídico pertinente por el que se autoriza el aditivo para piensos en cuestión y la cantidad añadida del aditivo para piensos deberán indicarse si se destaca su presencia en el etiquetado en forma de palabras, imágenes o representación gráfica.
- 4. La persona responsable del etiquetado deberá revelar al comprador, si este lo solicita, los nombres, el número de identificación y el grupo funcional de los aditivos para piensos no mencionados en el punto 1.
- 5. Los aditivos para piensos no mencionados en el punto 1 podrán indicarse de manera voluntaria de la misma forma prevista en dicho apartado o bien parcialmente.
- 6. Si se etiqueta de forma voluntaria un aditivo organoléptico o nutricional para piensos, tal como se menciona en el anexo I del Reglamento (CE) n° 1831/2003, deberá indicarse la cantidad de aditivo añadida.
- 7. Si un aditivo pertenece a más de un grupo funcional, deberá indicarse el grupo funcional o la categoría correspondiente a su función principal en lo que respecta al pienso en cuestión.
- 8. La persona responsable del etiquetado transmitirá a las autoridades competentes cualquier información relativa a la composición o las propiedades alegadas de los piensos que ella misma comercialice y que permita verificar la exactitud de la información que figura en el etiquetado, incluida toda la información sobre todos los aditivos utilizados.

Capítulo II: Etiquetado de los componentes analíticos a que se hace referencia en el artículo 17, apartado 1, letra f), y en el artículo 22, apartado 1

1. Los componentes analíticos de los piensos compuestos para animales no destinados a la producción de alimentos se etiquetará de la manera siguiente:

Pienso	Componentes analíticos	Especies objetivo
Pienso completo	— Proteína bruta	Gatos, perros y animales de peletería
	— Fibras brutas	Gatos, perros y animales de peletería
	— Aceites y grasas brutos	Gatos, perros y animales de peletería
	— Ceniza bruta	Gatos, perros y animales de peletería

Pienso	Componentes analíticos	Especies objetivo
Pienso complementario — Mineral	— Calcio	Todas las especies
	— Sodio	Todas las especies
	— Fósforo	Todas las especies
Pienso complementario — Otros	— Proteína bruta	Gatos, perros y animales de peletería
	— Fibras brutas	Gatos, perros y animales de peletería
	— Aceites y grasas brutos	Gatos, perros y animales de peletería
	— Ceniza bruta	Gatos, perros y animales de peletería

- En caso de que se indiquen aminoácidos, vitaminas u oligoelementos bajo el título de «componentes analíticos», se declarará su cantidad total.
- En caso de que se indiquen el valor energético y/o el valor proteico, dicha indicación se efectuará con arreglo al método CE, si está disponible, o al método nacional oficial respectivo del Estado miembro en el que se comercializa el pienso, si está disponible.

ANEXO VIII

Disposiciones específicas para el etiquetado de piensos que no cumplen los requisitos de la legislación comunitaria en materia de seguridad y comercialización a que se hace referencia en el artículo 20, apartado 1

1. Los materiales contaminados se etiquetarán como «pienso con nivel(es) excesivo(s) de ... [denominación de la(s) sustancia(s) indeseable(s) de conformidad con el anexo I de la Directiva 2002/32/CE]; utilícese como pienso únicamente previa detoxificación en establecimientos autorizados». Las autorizaciones de estos establecimientos se basarán en el artículo 10, apartado 2 o apartado 3, del Reglamento (CE) n° 183/2005.
 2. En caso de que vaya a reducirse o eliminarse la contaminación mediante limpieza, el etiquetado adicional de las materias primas contaminadas deberá ser «pienso con nivel(es) excesivo(s) de ... [denominación de la(s) sustancia(s) indeseable(s) de conformidad con el anexo I de la Directiva 2002/32/CE]; utilícese como pienso únicamente después de una limpieza adecuada».
-

ANEXO IX

TABLA DE CORRESPONDENCIAS

Directiva 79/373/CEE	Directiva 96/25/CE	Otros actos: Directivas 80/511/CEE (1), 82/471/CEE (2), 93/74/CEE (3), 93/113/CE (4), o Decisión 2004/217/CE (5)	El presente Reglamento
—	—	—	Artículo 1
Artículo 1	Artículo 1	(2), (4): Artículo 1 (3): Artículo 4	Artículo 2
Artículo 2	Artículo 2	(2), (3): Artículo 2	Artículo 3
—	—	—	Artículo 4, apartado 1
Artículo 3	Artículo 3	(3): Artículo 1, apartado 2	Artículo 4, apartado 2
—	Artículo 4	—	Artículo 4, apartado 3
—	—	—	Artículo 5, apartado 1
Artículo 12	—	(3): Artículo 10, apartado 2	Artículo 5, apartado 2
Artículo 10 bis, apartado 3	Artículo 11, letra b)	(2): Artículo 8	Artículo 6
—	—	—	Artículo 7
—	—	—	Artículo 8
—	—	(3): Artículo 3	Artículo 9
—	—	(3): Artículo 6	Artículo 10
Artículo 5 sexies	—	—	Artículo 11, apartado 1
Artículo 5, apartado 2	Artículo 5, apartado 1	(2): Artículo 5, apartado 2	Artículo 11, apartado 2
—	—	—	Artículo 11, apartado 3
Artículo 5, apartado 6	Artículo 4 y artículo 6, apartado 4	—	Artículo 11, apartado 4
Artículo 6	Artículo 4	—	Artículo 11, apartado 5
Artículo 5, apartado 1	Artículo 5, apartado 1	—	Artículo 12
Artículo 5 sexies	Artículo 5, apartado 2	(3): Artículo 5, apartado 6	Artículo 13
Artículo 5, apartado 1, y artículo 11	Artículo 5, apartado 1, y artículo 9	—	Artículo 14
Artículo 5, apartados 1 y 5, letra c)	Artículo 5, apartado 1	(4): Artículo 7, apartado 1), letra E, y Directiva 70/524/CEE: Artículo 16	Artículo 15
—	Artículo 5, apartado 1, letras c), d), y artículo 7	—	Artículo 16
Artículo 5, apartado 1, artículo 5 quater y 5 artículo quinquies	—	—	Artículo 17, apartado 1
—	—	—	Artículo 17, apartado 2
Artículo 5 quater, apartado 3	—	—	Artículo 17, apartado 3
—	—	(3): Artículo 5, apartados 1, 4 y 7, y artículo 6, letra a)	Artículo 18
—	—	—	Artículo 19
—	Artículo 8	—	Artículo 20
—	Artículo 6, apartado 1, letra a)	—	Artículo 21, apartado 1
Artículo 5, apartado 5, letra d)	—	—	Artículo 21, apartado 2

Directiva 79/373/CEE	Directiva 96/25/CE	Otros actos: Directivas 80/511/CEE (1), 82/471/CEE (2), 93/74/CEE (3), 93/113/CE (4), o Decisión 2004/217/CE (5)	El presente Reglamento
	Artículo 6, apartado 3, letra a)		Artículo 21, apartado 3
Artículo 5, apartado 5, letra b)			Artículo 21, apartado 4
Artículo 5, apartado 5, letra a)			Artículo 21, apartado 5
Artículo 5, apartado 2	Artículo 5, apartado 3, y artículo 6, apartado 1, letra b)		Artículo 21, apartado 6
—	—	—	Artículo 21, apartado 7
Artículo 14, letra c)			Artículo 21, apartado 8
Artículo 5, apartado 3, artículo 5 <i>quater</i> , apartado 4, y artículo 5 <i>sexies</i>	Artículo 5, apartado 2		Artículo 22
Artículo 4, apartado 1		(1): Artículo 1	Artículo 23
—	—	—	Artículo 24
—	—	—	Artículo 25
—	—	—	Artículo 26
Artículo 10	Artículo 11		Artículo 27
Artículo 13	Artículo 13	(2): Artículos 13 y 14 (3): Artículo 9	Artículo 28
—	—	—	Artículo 29
—	—	—	Artículo 30
—	—	—	Artículo 31
—	—	—	Artículo 32
—	—	—	Artículo 33
Anexo, parte A, puntos 2, 3 y 4	Anexo, parte A, puntos II y VI		Anexo I
Anexo, parte A, punto 1, y artículo 5, apartado 6	Artículo 6, apartado 4		Anexo II
		(5): Anexo	Anexo III
Anexo, parte A, puntos 5 y 6	Anexo, parte A, punto VII		Anexo IV
	Anexo, parte C		Anexo V
Anexo, parte B			Anexo VI
Anexo, parte B			Anexo VII

REGLAMENTO (CE) Nº 1831/2003 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO**de 22 de septiembre de 2003****sobre los aditivos en la alimentación animal****(Texto pertinente a efectos del EEE)**

EL PARLAMENTO EUROPEO Y EL CONSEJO DE LA UNIÓN EUROPEA,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea, y en particular su artículo 37 y la letra b) del apartado 4 de su artículo 152,

Vista la propuesta de la Comisión ⁽¹⁾,

Visto el dictamen del Comité Económico y Social Europeo ⁽²⁾,

Prevía consulta al Comité de las Regiones,

De conformidad con el procedimiento establecido en el artículo 251 del Tratado ⁽³⁾,

Considerando lo siguiente:

- (1) La producción ganadera ocupa un lugar muy importante en la agricultura de la Comunidad; los resultados satisfactorios dependen en gran medida del uso de piensos seguros y de buena calidad.
- (2) La libre circulación de alimentos y alimentos para animales seguros y saludables constituye un aspecto esencial del mercado interior y contribuye notablemente a la salud y el bienestar de los ciudadanos, al tiempo que favorece sus intereses sociales y económicos.
- (3) Al aplicar las políticas comunitarias debe garantizarse un nivel elevado de protección de la vida y la salud de las personas.
- (4) A fin de proteger la salud humana, la sanidad animal y el medio ambiente, los aditivos para alimentación animal, antes de ser comercializados, utilizados o transformados en la Comunidad, deben ser sometidos a una evaluación de su seguridad mediante un procedimiento comunitario. Dado que los alimentos para animales domésticos no son parte de la cadena alimentaria y no tienen consecuencias medioambientales para las tierras de labranza, procede introducir disposiciones específicas relativas a los aditivos para dichos alimentos.
- (5) El artículo 11 del Reglamento (CE) nº 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria ⁽⁴⁾, consagra el principio de la legislación alimentaria comunitaria de que los alimentos y piensos importados a la Comunidad para ser comercializados en ella deben cumplir los requisitos pertinentes de la legislación

alimentaria o condiciones que la Comunidad reconozca al menos como equivalentes. Por consiguiente, es necesario someter las importaciones de aditivos en la alimentación animal procedentes de terceros países a condiciones equivalentes a las aplicables a los aditivos producidos en la Comunidad.

- (6) La acción comunitaria en materia de salud humana, de sanidad animal y de medio ambiente debe basarse en el principio de precaución.
- (7) De acuerdo con el artículo 153 del Tratado, la Comunidad contribuirá a promover el derecho de los consumidores a la información.
- (8) La aplicación de la Directiva 70/524/CEE del Consejo, de 23 de noviembre de 1970, sobre los aditivos en la alimentación animal ⁽⁵⁾, ha puesto de manifiesto la necesidad de revisar todas las normas sobre los aditivos para proteger mejor la sanidad de los animales, la salud humana y el medio ambiente. También es necesario tener en cuenta que el progreso tecnológico y el avance científico han puesto a disposición nuevos tipos de aditivos, tales como los utilizados en el ensilaje o en el agua.
- (9) El presente Reglamento debe aplicarse también a las mezclas de aditivos vendidos al consumidor final, y la comercialización y la utilización de dichas mezclas deberán ajustarse a las condiciones establecidas en la autorización de cada aditivo particular.
- (10) Las premezclas no deben considerarse preparados comprendidos en la definición de aditivo.
- (11) El principio fundamental en este sector debe ser que sólo los aditivos autorizados conforme al procedimiento establecido en el presente Reglamento puedan comercializarse, utilizarse o transformarse para la alimentación animal en las condiciones previstas por dicha autorización.
- (12) Deben definirse las categorías de aditivos para piensos para facilitar el procedimiento de evaluación con vistas a la autorización. Los aminoácidos, sales de aminoácidos o sustancias análogas, y la urea y derivados, que están actualmente cubiertos por la Directiva 82/471/CEE del Consejo, de 30 de junio de 1982, relativa a determinados productos utilizados en la alimentación animal ⁽⁶⁾, deben incluirse como una categoría de aditivos para piensos y ser transferidos por tanto del ámbito de aplicación de dicha Directiva al presente Reglamento.

⁽¹⁾ DO C 203 E de 27.8.2002, p. 10.

⁽²⁾ DO C 61 de 14.3.2003, p. 43.

⁽³⁾ Dictamen del Parlamento Europeo de 21 de noviembre de 2002 (no publicado aún en el Diario Oficial), Posición Común del Consejo de 17 de marzo de 2003 (DO C 113 E de 13.5.2003, p. 1) y Decisión del Parlamento Europeo de 19 de junio de 2003 (no publicada aún en el Diario Oficial). Decisión del Consejo de 22 de julio de 2003.

⁽⁴⁾ DO L 31 de 1.2.2002, p. 1.

⁽⁵⁾ DO L 270 de 14.12.1970, p. 1; Directiva cuya última modificación la constituye el Reglamento (CE) nº 1576/2002 (DO L 265 de 3.10.2002, p. 1).

⁽⁶⁾ DO L 213 de 21.7.1982, p. 8; Directiva cuya última modificación la constituye la Directiva 1999/20/CE (DO L 80 de 25.3.1999, p. 20).

- (13) Las normas de ejecución referentes a la solicitud de autorización de aditivos para alimentación animal deben tener en cuenta los diferentes requisitos en materia de documentación aplicables a los animales productores de alimentos y a otros animales.
- (14) A fin de garantizar una evaluación científica armonizada de los aditivos para piensos, ésta debe ser efectuada por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria creada por el Reglamento (CE) n° 178/2002. Las solicitudes deben completarse con estudios sobre los residuos a fin de evaluar la fijación de límites máximos de residuos (LMR).
- (15) La Comisión debe elaborar las directrices relativas a la autorización de aditivos para piensos en colaboración con la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Al elaborar estas directrices, se debe prestar atención a la posibilidad de extrapolar a las especies menores los resultados de los estudios realizados sobre las especies mayores.
- (16) Conviene prever asimismo un procedimiento de autorización simplificado para aquellos aditivos que hayan superado con éxito el procedimiento de autorización para uso alimentario establecido en la Directiva 89/107/CEE del Consejo, de 21 de diciembre de 1988, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros sobre los aditivos alimentarios autorizados en los productos alimenticios destinados al consumo humano ⁽¹⁾.
- (17) Se reconoce que en algunos casos, la evaluación científica del riesgo no puede por sí sola ofrecer toda la información en la que debe basarse una decisión relacionada con la gestión del riesgo, y que es legítimo tener en cuenta otros factores pertinentes, entre ellos factores de carácter sociológico, económico y medioambiental, así como la viabilidad de los controles y el beneficio para los animales o para los consumidores de productos de origen animal. Por tanto, la autorización de un aditivo debe ser concedida por la Comisión.
- (18) Con objeto de asegurar el nivel adecuado de protección del bienestar animal y de la seguridad del consumidor, debe animarse a los solicitantes a solicitar la prórroga de la autorización para las especies menores, garantizándoles un año más de protección de los datos además de los diez años de protección de los datos relativos a todas las especies para las cuales se autoriza el aditivo.
- (19) Debe conferirse a la Comisión la competencia en materia de autorización de los aditivos para piensos y de establecimiento de las condiciones para su utilización, así como en materia de mantenimiento y publicación de un registro de aditivos para piensos autorizados, con arreglo a un procedimiento que garantice una estrecha colaboración entre los Estados miembros y la Comisión en el marco del Comité Permanente de la Cadena Alimentaria y de Sanidad Animal.
- (20) Cuando sea necesario, el titular de la autorización debe aplicar un plan de vigilancia consecutivo a la comercialización para localizar e identificar cualquier efecto directo o indirecto, inmediato, diferido o imprevisto derivado de la utilización de los aditivos para piensos en la salud humana, en la sanidad animal o en el medio ambiente, utilizando un marco de rastreo del producto similar al ya existente en otros sectores y acorde con los requisitos de trazabilidad establecidos en la legislación alimentaria.
- (21) Para hacer posible que se tengan en cuenta el progreso tecnológico y el avance científico, es necesario revisar periódicamente las autorizaciones de aditivos para piensos. El carácter limitado en el tiempo de las autorizaciones debe permitir realizar dicha revisión.
- (22) Se debe establecer un registro de los aditivos para piensos autorizados que incluirá información específica sobre los productos y métodos de detección. Toda la información que no sea confidencial debe ponerse a disposición del público.
- (23) Es necesario establecer normas transitorias para tener en cuenta los aditivos ya presentes en el mercado y que se autorizaron con arreglo a la Directiva 70/524/CEE, y los aminoácidos, sales de aminoácidos o sustancias análogas, la urea y derivados, actualmente autorizados con arreglo a la Directiva 82/471/CEE, y los agentes de ensilaje, así como los aditivos para los que está en marcha el procedimiento de autorización. En particular, conviene prever que dichos productos puedan permanecer en el mercado únicamente en la medida en que se haya presentado a la Comisión una notificación con vistas a su evaluación en el plazo de un año a partir de la entrada en vigor del presente Reglamento.
- (24) Actualmente se comercializan y se utilizan en la Comunidad varios aditivos para ensilaje sin estar autorizados con arreglo a la Directiva 70/524/CEE. Aunque es indispensable aplicar las disposiciones del presente Reglamento a dichas sustancias dadas su naturaleza y uso, es conveniente aplicar las mismas disposiciones transitorias. De esta forma, será posible obtener información sobre todas las sustancias que actualmente se utilizan y elaborar una lista de ellas, lo que permitirá, cuando sea necesario, adoptar medidas de salvaguardia para aquellas sustancias que no cumplan los requisitos de autorización mencionados en el artículo 5 del presente Reglamento.
- (25) En su dictamen de 28 de mayo de 1999, el Comité científico director señaló que: «La utilización de antimicrobianos promotores del crecimiento pertenecientes a categorías utilizadas o que pueden utilizarse en la medicina humana o veterinaria (es decir, cuando hay un riesgo de selección de una resistencia cruzada a los medicamentos utilizados para tratar las infecciones bacterianas) debe ir reduciéndose lo más rápidamente posible y, por último, suprimirse». El segundo dictamen del Comité científico director sobre la resistencia a los antimicrobianos, que se adoptó los días 10 y 11 de mayo de 2001, confirmó la necesidad de prever un período de tiempo suficiente para reemplazar dichos antimicrobianos por productos alternativos: «El proceso de retirada progresiva debe planificarse y coordinarse adecuadamente, ya que una acción precipitada podría tener repercusiones en la sanidad animal».

⁽¹⁾ DO L 40 de 11.2.1989, p. 27; Directiva modificada por la Directiva 94/34/CE del Parlamento Europeo y del Consejo (DO L 237 de 10.9.1994, p. 1).

- (26) Por consiguiente, es necesario fijar una fecha a partir de la cual quede prohibida la utilización de los antibióticos promotores del crecimiento que siguen estando autorizados, previendo tiempo suficiente para desarrollar productos alternativos que sustituyan a dichos antibióticos. También es necesario prohibir la autorización de nuevos antibióticos para su utilización como aditivos para piensos. En el marco de la retirada progresiva de los antibióticos promotores del crecimiento y para garantizar un alto nivel de protección de la sanidad de los animales, se pedirá a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria que examine los progresos realizados en el desarrollo de sustancias alternativas y métodos alternativos de gestión, alimentación, higiene, etc. antes de 2005.
- (27) Algunas sustancias con efectos coccidiostáticos e histomonostáticos deben considerarse aditivos para piensos a efectos del presente Reglamento.
- (28) Debe exigirse el etiquetado detallado de los productos porque permite al usuario final elegir con pleno conocimiento de causa y crea el menor número de obstáculos al comercio, además de facilitar la equidad de las transacciones. En este contexto, conviene, de modo general, que los requisitos aplicables a los aditivos para alimentación animal reflejen los que se aplican a los aditivos alimentarios. Por consiguiente, resulta adecuado prever requisitos simplificados en materia de etiquetado para los aromatizantes similares a los aplicables a los aromatizantes presentes en los alimentos sin perjuicio, no obstante, de la posibilidad de fijar requisitos específicos en materia de etiquetado para autorizar aditivos concretos.
- (29) El Reglamento (CE) n° 1829/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003, sobre alimentos y piensos modificados genéticamente⁽¹⁾, prevé un procedimiento de autorización para la comercialización de alimentos y piensos modificados genéticamente, incluidos los aditivos para piensos que constan de, contienen o están producidos a partir de organismos modificados genéticamente. Dado que los objetivos de dicho Reglamento difieren de los del presente Reglamento, los aditivos para piensos deben ser sometidos antes de su comercialización a un procedimiento de autorización además del procedimiento de autorización previsto en el citado Reglamento.
- (30) Los artículos 53 y 54 del Reglamento (CE) n° 178/2002 establecen procedimientos para la adopción de medidas de emergencia en relación con piensos de origen comunitario o importados de un tercer país. Autorizan a adoptar dichas medidas cuando exista la probabilidad de que un pienso constituya un riesgo grave para la salud de las personas, la sanidad de los animales o para el medio ambiente, y dicho riesgo no pueda controlarse satisfactoriamente mediante la adopción de medidas por parte de los Estados miembros afectados.
- (31) Las medidas necesarias para la ejecución del presente Reglamento deben aprobarse con arreglo a la Decisión 1999/468/CE del Consejo, de 28 de junio de 1999, por la que se establecen los procedimientos para el ejercicio de las competencias de ejecución atribuidas a la Comisión⁽²⁾.
- (32) Los Estados miembros deben establecer las normas sobre las sanciones aplicables a las infracciones de lo dispuesto por el presente Reglamento y garantizar la aplicación de dichas normas. Dichas sanciones deben ser eficaces, proporcionadas y disuasorias.
- (33) Debe derogarse la Directiva 70/524/CEE. No obstante, las disposiciones de etiquetado aplicables a los piensos compuestos que contienen aditivos deben mantenerse hasta que se finalice la revisión de la Directiva 79/373/CEE del Consejo, de 2 de abril de 1979, relativa a la comercialización de los piensos compuestos⁽³⁾.
- (34) Las líneas directrices dirigidas a los Estados miembros para la presentación de un expediente de solicitud figuran en la Directiva 87/153/CEE del Consejo, de 16 de febrero de 1987, por la que se fijan líneas directrices para la evaluación de los aditivos en la alimentación animal⁽⁴⁾. La verificación de la conformidad de los expedientes corresponderá a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Es, por tanto, necesario derogar la Directiva 87/153/CEE, manteniendo no obstante en vigor el anexo hasta que se hayan adoptado nuevas normas de ejecución.
- (35) Es necesario un período transitorio para evitar interrupciones en la utilización de los aditivos para alimentación animal. En consecuencia, hasta que las normas del presente Reglamento sean aplicables, se debe permitir el mantenimiento en el mercado de las sustancias ya autorizadas y su utilización con arreglo a la legislación vigente.

HAN ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

CAPÍTULO I

ÁMBITO DE APLICACIÓN Y DEFINICIONES

Artículo 1

Ámbito de aplicación

1. El objetivo del presente Reglamento es establecer un procedimiento comunitario para autorización de la comercialización y uso de los aditivos para alimentación animal e introducir normas de vigilancia y etiquetado de los aditivos y premmezclas para alimentación animal a fin de facilitar la base para garantizar un alto nivel de protección de la salud humana, la sanidad y el bienestar de los animales, el medio ambiente y los intereses de los usuarios y consumidores con respecto a los aditivos para alimentación animal, garantizando al mismo tiempo el funcionamiento eficaz del mercado interior.

⁽²⁾ DO L 184 de 17.7.1999, p. 23.

⁽³⁾ DO L 86 de 6.4.1979, p. 30; Directiva cuya última modificación la constituye el Reglamento (CE) n° 807/2003 (DO L 122 de 16.5.2003, p. 36).

⁽⁴⁾ DO L 64 de 7.3.1987, p. 19; Directiva cuya última modificación la constituye la Directiva 2001/79/CE de la Comisión (DO L 267 de 6.10.2001, p. 1).

⁽¹⁾ Véase la página 1 del presente Diario Oficial.

2. El presente Reglamento no se aplicará a:

- a) los auxiliares tecnológicos;
- b) los medicamentos veterinarios, tal como se definen en la Directiva 2001/82/CE ⁽¹⁾, excepto los coccidiostáticos y los histomonostatos usados como aditivos para piensos.

Artículo 2

Definiciones

1. A efectos del presente Reglamento, se aplicarán las definiciones de «pienso», «empresa de piensos», «explotador de empresa de piensos», «comercialización» y «trazabilidad» del Reglamento (CE) n° 178/2002.

2. Se aplicarán igualmente las definiciones siguientes:

- a) «aditivo para alimentación animal»: sustancias, microorganismos y preparados distintos de las materias primas para piensos y de las premezclas, que se añaden intencionadamente a los piensos o al agua a fin de realizar, en particular, una o varias de las funciones mencionadas en el apartado 3 del artículo 5;
- b) «materias primas para piensos»: los productos definidos en la letra a) del artículo 2 de la Directiva 96/25/CE del Consejo, de 29 de abril de 1996, sobre la circulación de materias primas para la alimentación animal ⁽²⁾;
- c) «piensos compuestos»: los productos definidos en la letra b) del artículo 2 de la Directiva 79/373/CEE;
- d) «piensos complementarios»: los productos definidos en la letra e) del artículo 2 de la Directiva 79/373/CEE;
- e) «premezclas»: mezclas de aditivos para alimentación animal o mezclas de uno o más aditivos para alimentación animal con materias primas para piensos o agua utilizadas como soporte que no se destinan a la alimentación directa de los animales;
- f) «ración diaria»: la cantidad total de alimentos, referida a un contenido en humedad del 12 %, que necesita como media diaria un animal de una especie, una categoría de edad y un rendimiento determinados para satisfacer el conjunto de sus necesidades;
- g) «piensos completos»: los productos definidos en la letra c) del artículo 2 de la Directiva 1999/29/CE del Consejo, de 22 de abril de 1999, relativa a las sustancias y productos indeseables en la alimentación animal ⁽³⁾;
- h) «auxiliares tecnológicos»: cualquier sustancia no consumida por sí misma como pienso, sino utilizada intencionadamente en la elaboración de piensos o materias primas para piensos para lograr un objetivo tecnológico durante el tratamiento o la transformación que puede originar la presencia no intencionada pero técnicamente inevitable de residuos de sustancias o sus derivados en el producto final, siempre que estos residuos no tengan efectos adversos en la sanidad de los animales, en la salud de las personas ni en el medio ambiente y no tengan efectos tecnológicos en el producto acabado;

- i) «antimicrobianos»: sustancias producidas sintéticamente o naturalmente que se utilizan para eliminar o inhibir el crecimiento de microorganismos, entre ellos bacterias, virus y hongos, y de parásitos, en particular protozoos;
- j) «antibióticos»: antimicrobianos producidos por un microorganismo o derivados de éste que destruyen o inhiben el crecimiento de otros microorganismos;
- k) «coccidiostáticos» e «histomonostatos»: sustancias destinadas a eliminar o inhibir protozoos;
- l) «límite máximo de residuos»: la concentración máxima de residuos derivada de la utilización de un aditivo en la alimentación animal que la Comunidad puede autorizar o reconocer legalmente como aceptable en un alimento o sobre él;
- m) «microorganismo»: microorganismos capaces de formar colonias;
- n) «primera comercialización»: la primera comercialización de un aditivo después de su fabricación, la importación de un aditivo o, cuando un aditivo se ha añadido a piensos no comercializados, la primera comercialización de dichos piensos.

3. Cuando sea necesario, se podrá determinar, de conformidad con el procedimiento mencionado en el apartado 2 del artículo 22, si una sustancia, microorganismo o preparado es un aditivo para alimentación animal dentro del ámbito de aplicación del presente Reglamento.

CAPÍTULO II

AUTORIZACIÓN, UTILIZACIÓN, SEGUIMIENTO Y MEDIDAS TRANSITORIAS APLICABLES A LOS ADITIVOS PARA ALIMENTACIÓN ANIMAL

Artículo 3

Comercialización, transformación y utilización

1. No se comercializará, transformará o utilizará un aditivo para alimentación animal a no ser que:

- a) se disponga de una autorización concedida con arreglo al presente Reglamento;
- b) se cumplan las condiciones de utilización establecidas en el presente Reglamento, incluidas las condiciones generales establecidas en el anexo IV, a no ser que la autorización disponga otra cosa, y en la autorización de la sustancia;
- c) se cumplan los requisitos de etiquetado establecidos en el presente Reglamento.

2. Para experimentos con fines científicos, los Estados miembros podrán autorizar el uso como aditivos de sustancias que no estén autorizadas a nivel comunitario, con la excepción de los antibióticos, siempre que dichos experimentos se efectúen con arreglo a los principios y condiciones previstos en la Directiva 87/153/CEE, en la Directiva 83/228/CEE ⁽⁴⁾, o en las normas mencionadas en el apartado 4 del artículo 7 del presente Reglamento, y siempre que exista una supervisión oficial adecuada. Los animales en cuestión sólo podrán utilizarse para la producción de alimentos si las autoridades establecen que no tendrá efectos adversos en la sanidad de los animales, en la salud de las personas ni en el medio ambiente.

⁽¹⁾ DO L 311 de 28.11.2001, p. 1.

⁽²⁾ DO L 125 de 23.5.1996, p. 35; Directiva cuya última modificación la constituye el Reglamento (CE) n° 806/2003 (DO L 122 de 16.5.2003, p. 1).

⁽³⁾ DO L 115 de 4.5.1999, p. 32; Directiva cuya última modificación la constituye el Reglamento (CE) n° 806/2003.

⁽⁴⁾ DO L 126 de 13.5.1983, p. 23.

3. En el caso de los aditivos pertenecientes a las categorías d) y e) del apartado 1 del artículo 6 y de los aditivos incluidos en el ámbito de aplicación de la legislación comunitaria relativa a la comercialización de productos que consten de, contengan o estén producidos a partir de organismos modificados genéticamente (OMG), nadie podrá comercializar por primera vez el producto, salvo el titular de la autorización indicado en el reglamento de autorización a que se refiere el artículo 9, su sucesor o sucesores legales, o una persona a la que éste haya autorizado por escrito.

4. Salvo disposición contraria, se permitirá la mezcla de aditivos destinada a la venta directa al usuario final, sin perjuicio del respeto de las condiciones de utilización contempladas en la autorización de cada aditivo específico. Por consiguiente, la mezcla de aditivos autorizados no estará sujeta a una autorización específica distinta de los requisitos establecidos en la Directiva 95/69/CE⁽¹⁾.

5. En caso necesario, como consecuencia del progreso tecnológico o de los avances científicos, las condiciones generales establecidas en el anexo IV podrán ser adaptadas de conformidad con el procedimiento mencionado en el apartado 2 del artículo 22.

Artículo 4

Autorización

1. Cualquier persona que desee obtener una autorización de un aditivo para alimentación animal o de un nuevo uso de un aditivo para alimentación animal presentará una solicitud con arreglo al artículo 7.

2. Sólo se concederá, rechazará, prorrogará, modificará, suspenderá o revocará una autorización por los motivos y con arreglo a los procedimientos establecidos en el presente Reglamento o de conformidad con los artículos 53 y 54 del Reglamento (CE) n° 178/2002.

3. El solicitante de una autorización o su representante deberá estar establecido en la Comunidad.

Artículo 5

Requisitos de autorización

1. No se autorizará un aditivo para piensos si el solicitante de la autorización no demuestra adecuada y suficientemente, con arreglo a las medidas de ejecución establecidas en el artículo 7 que, utilizado con arreglo a las condiciones establecidas en el reglamento por el que se autoriza la utilización del aditivo, éste cumple los requisitos del apartado 2 y posee al menos una de las características del apartado 3.

2. El aditivo para alimentación animal no deberá:

- a) tener un efecto adverso para la sanidad animal, la salud humana o el medio ambiente;
- b) ser presentado de manera que induzca a error al consumidor;

⁽¹⁾ Directiva 95/69/CE del Consejo, de 22 de diciembre de 1995, por la que se establecen los requisitos y las normas aplicables a la autorización y el registro de determinados establecimientos e intermediarios del sector de la alimentación animal y se modifican las Directivas 70/524/CEE, 76/63/CEE, 79/373/CEE y 82/471/CEE (DO L 332 de 30.12.1995, p. 15); Directiva cuya última modificación la constituye el Reglamento (CE) n° 806/2003.

c) perjudicar al consumidor influyendo negativamente en las características distintivas de los productos animales o inducirle a error con respecto a las características distintivas de dichos productos.

3. El aditivo para alimentación animal deberá:

- a) influir positivamente en las características del pienso;
- b) influir positivamente en las características de los productos animales;
- c) influir favorablemente en el color de los pájaros y peces ornamentales;
- d) satisfacer las necesidades alimenticias de los animales;
- e) influir positivamente en las repercusiones medioambientales de la producción animal;
- f) influir positivamente en la producción, la actividad o el bienestar de los animales, especialmente actuando en la flora gastrointestinal o la digestibilidad de los piensos, o
- g) tener un efecto coccidiostático o histomonostático.

4. Los antibióticos distintos de los coccidiostáticos o de los histomonostatos no se autorizarán como aditivos para alimentación animal.

Artículo 6

Categorías de aditivos para alimentación animal

1. Un aditivo para alimentación animal se asignará a una o más de las siguientes categorías con arreglo a sus funciones y propiedades, de conformidad con el procedimiento establecido en los artículos 7, 8 y 9:

- a) aditivos tecnológicos: cualquier sustancia añadida a los piensos con fines tecnológicos;
- b) aditivos organolépticos: cualquier sustancia que, añadida a los piensos, mejora o modifica las propiedades organolépticas de éstos o las características visuales de los alimentos de origen animal;
- c) aditivos nutricionales;
- d) aditivos zootécnicos: cualquier aditivo utilizado para influir positivamente en la productividad de los animales sanos o en el medio ambiente;
- e) coccidiostáticos e histomonostatos.

2. Dentro de las categorías mencionadas en el apartado 1, los aditivos para alimentación animal se asignarán además a uno o más de los grupos funcionales mencionados en el anexo I, con arreglo a su función o funciones principales, de conformidad con el procedimiento especificado en los artículos 7, 8 y 9.

3. Cuando sea necesario, como consecuencia del progreso tecnológico o del avance científico, podrán establecerse nuevas categorías y grupos funcionales de aditivos para alimentación animal, de conformidad con el procedimiento mencionado en el apartado 2 del artículo 22.

*Artículo 7***Solicitud de autorización**

1. La solicitud de autorización prevista en el artículo 4 deberá presentarse a la Comisión, que informará inmediatamente de ello a los Estados miembros y transmitirá la solicitud a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, denominada en lo sucesivo «la Autoridad».

2. La Autoridad:

- a) enviará por escrito el acuse de recibo de la solicitud, incluidos la información y la documentación mencionados en el apartado 3, al solicitante en los quince días siguientes a su recepción, indicando la fecha en que se recibió la solicitud;
- b) pondrá a disposición de los Estados miembros y de la Comisión cualquier información complementaria que haya presentado el solicitante;
- c) pondrá a disposición del público el resumen del expediente mencionado en la letra h) del apartado 3 del presente artículo, respetando los requisitos de confidencialidad establecidos en el apartado 2 del artículo 18.

3. Cuando presente la solicitud, el solicitante deberá enviar directamente a la Autoridad la información y la documentación siguientes:

- a) el nombre y la dirección del solicitante;
- b) la identificación del aditivo para alimentación animal, una propuesta para clasificarlo por categoría y grupo funcional con arreglo al artículo 6, y sus datos específicos, incluido, cuando sea aplicable, el grado de pureza;
- c) una descripción del método de producción y fabricación y de las utilidades previstas del aditivo para alimentación animal, del método de análisis del aditivo del pienso en función de su uso previsto, y, cuando proceda, del método de análisis que se aplica para determinar el nivel de los residuos del aditivo para alimentación animal, o sus metabolitos, en los alimentos;
- d) una copia de los estudios llevados a cabo y cualquier otro material disponible para demostrar que el aditivo para alimentación animal cumple los criterios establecidos en los apartados 2 y 3 del artículo 5;
- e) las condiciones propuestas para la comercialización del aditivo para alimentación animal, incluidos los requisitos de etiquetado y, si procede, las condiciones específicas de utilización y manipulación (incluidas las incompatibilidades conocidas), los niveles de uso en piensos complementarios y las especies animales y las categorías a las que va destinado el aditivo para piensos;
- f) una declaración escrita en la que se indique que el solicitante ha enviado directamente tres muestras al laboratorio comunitario de referencia mencionado en el artículo 21 con arreglo a los requisitos establecidos en el anexo II;
- g) para los aditivos que de acuerdo con la propuesta a que se refiere la letra b) no pertenecen a las categorías a) y b) mencionadas en el apartado 1 del artículo 6, y en el caso de los aditivos incluidos en el ámbito de aplicación de la legislación comunitaria relativa a la comercialización de productos que constan de, contienen o están producidos a partir de OMG, una propuesta de seguimiento consecutivo a la comercialización;

h) un resumen del expediente que incluya la información suministrada con arreglo a las letras a) a g);

i) para los aditivos incluidos en el ámbito de aplicación de la legislación comunitaria relativa a la comercialización de productos que constan de, contienen o están producidos a partir de OMG, información sobre cualquier autorización concedida con arreglo a la legislación aplicable.

4. Tras consultar a la Autoridad, la Comisión, de conformidad con el procedimiento mencionado en el apartado 2 del artículo 22, establecerá normas de ejecución del presente artículo, incluidas normas relativas a la preparación y presentación de la solicitud.

Hasta que se adopten dichas normas de ejecución, ésta se realizará con arreglo al anexo de la Directiva 87/153/CEE.

5. Tras consultar a la Autoridad, se establecerán orientaciones específicas para la autorización de aditivos, en caso necesario para cada categoría de aditivos a que se refiere el apartado 1 del artículo 6 de conformidad con el procedimiento mencionado en el apartado 2 del artículo 22. Estas orientaciones tendrán en cuenta la posibilidad de extrapolar a las especies menores los resultados de los estudios realizados sobre las especies principales.

Tras consultar a la Autoridad, se podrán establecer normas ulteriores para la ejecución del presente artículo de conformidad con el procedimiento mencionado en el apartado 2 del artículo 22. En caso pertinente, estas normas deberían diferenciar entre los requisitos relativos a los aditivos para alimentación animal con respecto a los animales productores de alimentos y los requisitos con respecto a otros animales, en particular a los animales domésticos. Las normas de ejecución incluirán disposiciones que permitan utilizar procedimientos simplificados para la autorización de aditivos que hayan sido autorizados para su uso en la alimentación humana.

6. La Autoridad publicará instrucciones detalladas para ayudar al solicitante en la preparación y presentación de la solicitud.

*Artículo 8***Dictamen de la Autoridad**

1. La Autoridad emitirá dictamen en los seis meses siguientes a la recepción de una solicitud válida. Este plazo se ampliará cuando la Autoridad recabe información complementaria del solicitante, tal como se establece en el apartado 2.

2. Cuando proceda, la Autoridad podrá pedir al solicitante que complemente, en un plazo determinado por la Autoridad previo acuerdo con el solicitante, la información que acompaña a la solicitud.

3. Para preparar su dictamen, la Autoridad:

- a) verificará que la información y la documentación presentadas por el solicitante son conformes con lo dispuesto en el artículo 7 y efectuará una evaluación para determinar si el aditivo para alimentación animal cumple con las condiciones establecidas en el artículo 5;
- b) verificará el informe del laboratorio comunitario de referencia.

4. En caso de dictamen favorable a la autorización del aditivo para alimentación animal, este dictamen deberá incluir:

- a) el nombre y la dirección del solicitante;
- b) la denominación del aditivo para alimentación animal, incluida su clasificación por categoría y grupo funcional con arreglo al artículo 6, y sus datos específicos incluidos, cuando sean aplicables, los criterios de pureza y el método de análisis;
- c) en función del resultado de la evaluación, las condiciones o restricciones específicas relativas a la manipulación, los requisitos del seguimiento consecutivo a la comercialización y el uso, incluidas las especies animales y categorías de especies animales a las que va destinado el aditivo;
- d) requisitos adicionales específicos del etiquetado del aditivo para alimentación animal como consecuencia de las condiciones y restricciones de la letra c);
- e) una propuesta para el establecimiento de límites máximos de residuos (LMR) en los alimentos de origen animal de que se trate, a no ser que el dictamen de la Autoridad llegue a la conclusión de que no es necesario fijar LMR para la protección de los consumidores o ya se hayan fijado LMR en el anexo I o III del Reglamento (CEE) n° 2377/90 del Consejo, de 26 de junio de 1990, por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal ⁽¹⁾.

5. La Autoridad enviará sin dilación su dictamen a la Comisión, a los Estados miembros y al solicitante, incluyendo un informe en el que se exponga su evaluación del aditivo para alimentación animal y señalando las razones en que se basa su conclusión.

6. La Autoridad hará público su dictamen tras haber eliminado cualquier dato que sea confidencial de conformidad con el apartado 2 del artículo 18.

Artículo 9

Autorización de la Comunidad

1. En los tres meses siguientes a la recepción del dictamen de la Autoridad, la Comisión preparará un proyecto de reglamento para la concesión o la denegación de la autorización. Dicho proyecto tendrá en cuenta los requisitos de los apartados 2 y 3 del artículo 5, la legislación comunitaria y otros factores legítimos relacionados con la cuestión considerada, en particular los beneficios para la sanidad y el bienestar de los animales y para el consumidor de productos animales.

Si el proyecto está en desacuerdo con el dictamen de la Autoridad, explicará el por qué de las diferencias existentes.

En casos excepcionalmente complejos, podrá ampliarse el plazo de tres meses.

2. El proyecto se adoptará de conformidad con el procedimiento mencionado en el apartado 2 del artículo 22.

3. Las normas para la aplicación de este artículo y en concreto lo referente al número de identificación para los aditivos autorizados podrán ser establecidas de conformidad con el procedimiento mencionado en el apartado 2 del artículo 22.

4. La Comisión informará sin demora al solicitante del reglamento adoptado de acuerdo con el apartado 2.

5. El reglamento que otorgue la autorización deberá incluir los elementos mencionados en las letras b), c), d) y e) del apartado 4 del artículo 8 y un número de identificación.

6. El reglamento que conceda la autorización para aditivos pertenecientes a las categorías d) y e) mencionadas en el apartado 1 del artículo 6, y para aditivos que consten de, contengan o estén producidos a partir de OMG, deberá indicar el nombre del titular de la autorización y, si procede, el identificador único asignado al OMG que se menciona en el Reglamento (CE) n° 1830/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003, relativo a la trazabilidad y al etiquetado de organismos modificados genéticamente y a la trazabilidad de los alimentos y piensos producidos a partir de éstos, y por el que se modifica la Directiva 2001/18/CE ⁽²⁾.

7. Cuando las cantidades de residuos de un aditivo en los alimentos de origen animal, procedentes de los piensos para animales alimentados con dicho aditivo, puedan tener un efecto perjudicial para la salud humana, el reglamento incluirá límites máximos de residuos (LMR) de la sustancia activa o sus metabolitos en los alimentos de origen animal de que se trate. En tal caso, la sustancia activa se considerará, a efectos de la Directiva 96/23/CE del Consejo ⁽³⁾, como perteneciente al ámbito de aplicación del anexo I de dicha Directiva. Cuando ya se haya establecido en normas comunitarias un LMR para la sustancia en cuestión, dicho LMR se aplicará también a los residuos de la sustancia activa o sus metabolitos procedentes de la utilización de la sustancia como aditivo para alimentación animal.

8. La autorización concedida conforme al procedimiento establecido en el presente Reglamento será válida en toda la Comunidad por un período de diez años renovable de acuerdo con el artículo 14. El aditivo para alimentación animal autorizado será inscrito en el registro al que se refiere el artículo 17 (en lo sucesivo «el registro»). Cada entrada de ese registro mencionará la fecha de autorización e incluirá los datos mencionados en los apartados 5, 6 y 7.

9. La concesión de la autorización no eximirá al explotador de la empresa de piensos de su responsabilidad civil y penal en relación con el aditivo para alimentación animal en cuestión.

Artículo 10

Estatuto de los productos existentes

1. No obstante lo dispuesto en el artículo 3, los aditivos para piensos comercializados con arreglo a la Directiva 70/524/CEE y la urea y derivados, los aminoácidos, sales de aminoácidos o sustancias análogas, incluidas en los puntos 2.1, 3 y 4 del anexo de la Directiva 82/471/CEE, podrán comercializarse y utilizarse con arreglo a las condiciones especificadas en las Directivas 70/524/CEE o 82/471/CEE y sus medidas de ejecución, incluidas en particular las disposiciones específicas de etiquetado para piensos compuestos y materias primas para piensos, siempre que se cumplan las siguientes condiciones:

⁽¹⁾ DO L 224 de 18.8.1990, p. 1; Reglamento cuya última modificación la constituye el Reglamento (CE) n° 1490/2003 de la Comisión (DO L 214 de 26.8.2003, p. 3).

⁽²⁾ Véase la página 24 del presente Diario Oficial.

⁽³⁾ DO L 125 de 23.5.1996, p. 10.

a) en el plazo de un año desde la entrada en vigor del presente Reglamento, las personas que comercialicen por primera vez un aditivo para alimentación animal, o cualquier otra parte interesada, lo notificarán a la Comisión. Al mismo tiempo, la información mencionada en las letras a), b) y c) del apartado 3 del artículo 7 se enviará directamente a la Autoridad;

b) en el año siguiente a la notificación mencionada en la letra a), la Autoridad, una vez que haya verificado que se ha presentado toda la información requerida, comunicará a la Comisión que ha recibido la información que exige el presente artículo. Los productos en cuestión serán inscritos en el registro. Cada entrada del registro mencionará la fecha en que el producto en cuestión se inscribió por primera vez y, si procede, la fecha de expiración de la autorización en vigor.

2. Deberá presentarse una solicitud con arreglo al artículo 7, a más tardar un año antes de la fecha de expiración de la autorización concedida con arreglo a la Directiva 70/524/CEE para los aditivos con un período de autorización limitado, y en un plazo máximo de siete años después de la entrada en vigor del presente Reglamento para los aditivos autorizados por un período de tiempo ilimitado o de conformidad con la Directiva 82/471/CEE. De conformidad con el procedimiento mencionado en el apartado 2 del artículo 22, se podrá adoptar un calendario detallado en el que se enumeren, por orden de prioridad, las distintas clases de aditivos que deberán reexaminarse. Se consultará a la Autoridad en relación con la elaboración de esta lista.

3. Los productos inscritos en el registro estarán sujetos a las disposiciones del presente Reglamento, en particular a los artículos 8, 9, 12, 13, 14 y 16 que, sin perjuicio de las condiciones específicas relativas al etiquetado, la comercialización y la utilización de cada sustancia con arreglo al apartado 1, se aplicarán a dichos productos como si hubieran sido autorizados con arreglo al artículo 9.

4. Si las autorizaciones no se han concedido a un titular concreto, la persona que importe o fabrique los productos contemplados en el presente artículo o cualquier otra parte interesada podrán presentar a la Comisión la información mencionada en el apartado 1 o la solicitud a la que se refiere el apartado 2.

5. Si la notificación y la información que debe acompañarla, contempladas en la letra a) del apartado 1, no se presentan en el plazo especificado o resultan ser incorrectas, o si la solicitud no se presenta como exige el apartado 2 en el plazo previsto, se adoptará un reglamento de conformidad con el procedimiento mencionado en el apartado 2 del artículo 22, por el que se exija la retirada del mercado de los aditivos en cuestión. En esa medida podrá preverse un período de tiempo limitado durante el cual puedan agotarse las existencias del producto.

6. Si, por razones que escapan al control del solicitante, no se toma ninguna decisión con respecto a la renovación de la autorización antes de la fecha de expiración, el período de autorización del producto se ampliará automáticamente hasta que la Comisión tome una decisión. La Comisión comunicará al solicitante esta prórroga de la autorización.

7. No obstante lo dispuesto en el artículo 3, las sustancias, los microorganismos y los preparados utilizados en la Comunidad como aditivos para ensilaje en la fecha a la que se refiere

el apartado 2 del artículo 26, se podrán comercializar y utilizar en la Comunidad siempre que se cumplan las disposiciones de las letras a) y b) del apartado 1 y del apartado 2. Los apartados 3 y 4 se aplicarán por analogía. Para dichas sustancias, el plazo de solicitud a que hace referencia el apartado 2 será de siete años desde la entrada en vigor del presente Reglamento.

Artículo 11

Retirada

1. Con vistas a la adopción de una decisión con respecto a la supresión progresiva de la utilización de los coccidiostáticos y los histomonóstatos como aditivos para alimentación animal a más tardar el 31 de diciembre de 2012, la Comisión presentará al Parlamento Europeo y al Consejo, antes del 1 de enero de 2008, un informe sobre la utilización de estas sustancias como aditivos para alimentación animal así como las alternativas disponibles acompañado, en su caso, de propuestas legislativas.

2. No obstante lo dispuesto el artículo 10, y sin perjuicio del artículo 13, la comercialización y la utilización como aditivos para alimentación animal de antibióticos distintos de los coccidiostáticos y los histomonóstatos sólo podrá efectuarse hasta el 31 de diciembre de 2005; a partir del 1 de enero de 2006, estas sustancias se eliminarán del registro.

Artículo 12

Supervisión

1. Después de autorizarse un aditivo con arreglo al presente Reglamento, las personas que utilicen o comercialicen dicha sustancia, o un pienso al que se haya añadido, así como cualquier otra persona interesada, garantizarán el cumplimiento de las condiciones y restricciones que se hayan impuesto a la comercialización, utilización y manipulación de dicho aditivo o de los piensos que lo contengan.

2. Cuando se hayan impuesto requisitos de seguimiento mencionados en la letra c) del apartado 4 del artículo 8, el titular de la autorización garantizará dicho seguimiento y presentará informes a la Comisión de conformidad con la autorización. El titular de la autorización comunicará inmediatamente a la Comisión cualquier nueva información que pueda influir en la evaluación de la seguridad de la utilización del aditivo para alimentación animal, en particular los efectos para la salud de categorías específicas de consumidores. El titular de la autorización deberá informar inmediatamente a la Comisión de cualquier prohibición o restricción impuesta por la autoridad competente de un tercer país en el que se comercialice el aditivo para alimentación animal.

Artículo 13

Modificación, suspensión y revocación de autorizaciones

1. Por propia iniciativa o a petición de un Estado miembro o de la Comisión, la Autoridad emitirá un dictamen sobre si una autorización todavía cumple los requisitos establecidos en el presente Reglamento, y enviará inmediatamente su dictamen a la Comisión, a los Estados miembros y, cuando proceda, al titular de la autorización. El dictamen se hará público.

2. La Comisión estudiará sin demora el dictamen de la Autoridad. Toda medida apropiada se tomará con arreglo a los artículos 53 y 54 del Reglamento (CE) n° 178/2002. Se tomará una decisión sobre la modificación, suspensión o revocación de la autorización de conformidad con el procedimiento mencionado en el apartado 2 del artículo 22 del presente Reglamento.

3. Si el titular de la autorización desea cambiar los términos de la autorización mediante la presentación de una solicitud a la Comisión, acompañada de los datos pertinentes en las que se apoya su propuesta de modificación, la Autoridad transmitirá su dictamen sobre la propuesta a la Comisión y a los Estados miembros. La Comisión estudiará sin demora el dictamen de la Autoridad y tomará una decisión de conformidad con el procedimiento mencionado en el apartado 2 del artículo 22.

4. La Comisión informará sin demora al solicitante de la decisión adoptada. En el registro se introducirá la correspondiente modificación cuando proceda.

5. Los apartados 1 y 2 del artículo 7 y los artículos 8 y 9 se aplicarán por analogía.

Artículo 14

Renovación de autorizaciones

1. Las autorizaciones en virtud del presente Reglamento serán prorrogables por períodos de diez años. Las solicitudes de renovación se enviarán a la Comisión al menos un año antes de la fecha de expiración de la autorización.

Si las autorizaciones no se han concedido a un titular concreto, cualquier persona que comercialice por primera vez el aditivo o cualquier otra persona interesada podrá presentar a la Comisión la solicitud y será considerada como solicitante.

En el caso de autorizaciones concedidas a un titular específico, el titular de la autorización o su sucesor o sucesores podrán presentar a la Comisión la solicitud y serán considerados como solicitantes.

2. Cuando presente la solicitud, el solicitante deberá enviar directamente a la Autoridad la información y la documentación siguientes:

- una copia de la autorización para comercializar el aditivo para alimentación animal;
- un informe sobre los resultados del seguimiento consecutivo a la comercialización si la autorización exige la realización de dicho seguimiento;
- todo nuevo dato disponible con respecto a la evaluación de la seguridad en relación con el uso del aditivo para alimentación animal y a los riesgos que presente para los animales, las personas o el medio ambiente;
- cuando proceda, una propuesta para modificar o complementar las condiciones de la autorización original, como son, entre otras, las relacionadas con el futuro seguimiento.

3. Los apartados 1, 2, 4 y 5 del artículo 7 y los artículos 8 y 9 se aplicarán por analogía.

4. Si, por razones que escapan al control del solicitante, no se toma ninguna decisión con respecto a la renovación de la autorización antes de la fecha de expiración, el período de

autorización del producto se ampliará automáticamente hasta que la Comisión tome una decisión. La información sobre la prórroga de la autorización estará a disposición del público en el Registro mencionado en el artículo 17.

Artículo 15

Autorización urgente

En casos concretos en los que sea necesaria una autorización urgente para garantizar la protección del bienestar animal, la Comisión, de conformidad con el procedimiento mencionado en el apartado 2 del artículo 22, podrá autorizar la utilización de un aditivo con carácter provisional durante un período máximo de cinco años.

CAPÍTULO III

ETIQUETADO Y ENVASADO

Artículo 16

Etiquetado y envasado de aditivos para alimentación animal y de premezclas

1. No se podrá comercializar un aditivo para alimentación animal, o una premezcla de aditivos, a no ser que su envase o contenedor esté etiquetado bajo la responsabilidad de un productor, envasador, importador, vendedor o distribuidor establecido en la Comunidad y figure en él, de manera bien visible, claramente legible e indeleble, en al menos la lengua o lenguas nacionales de los Estados miembros en que se comercialice, la siguiente información sobre cada aditivo contenido en el material:

- el nombre específico dado a los aditivos en el momento de la autorización, precedido del nombre del grupo funcional indicado en la autorización;
- el nombre o razón social y el domicilio o domicilio social del responsable de las indicaciones contempladas en el presente artículo;
- el peso neto o, para los aditivos líquidos y premezclas, el volumen neto o el peso neto;
- cuando corresponda, el número de autorización atribuido al establecimiento o al intermediario, con arreglo al artículo 5 de la Directiva 95/69/CE, o el número de registro atribuido al establecimiento o al intermediario, con arreglo al artículo 10 de dicha Directiva;
- las instrucciones de uso, las recomendaciones para una utilización segura y, en su caso, los requisitos específicos mencionados en la autorización, incluidas las especies y categorías de animales a las que está destinado el aditivo o la premezcla de aditivos;
- el número de identificación;
- el número de referencia del lote y la fecha de fabricación.

2. En relación con los aromatizantes, la lista de los aditivos podrá sustituirse por la expresión «mezcla de aromatizantes». Lo anterior no se aplicará a los aromatizantes sujetos a una limitación cuantitativa utilizados para la alimentación animal y en el agua potable.

3. Además de la información indicada en el apartado 1, en el envase o contenedor de un aditivo perteneciente a uno de los grupos funcionales especificados en el anexo III deberá figurar, de manera bien visible, claramente legible e indeleble, la información indicada en dicho anexo.

4. Además, en el caso de las premezclas, la palabra «PREMEZCLA» deberá figurar claramente en la etiqueta y deberá declararse el soporte.

5. Los aditivos y premezclas sólo serán comercializados en envases o contenedores cerrados cuyo sistema de cierre se rompa al abrirlos y no pueda utilizarse de nuevo.

6. Podrá modificarse el anexo III para tener en cuenta el progreso tecnológico y el avance científico de conformidad con el procedimiento mencionado en el apartado 2 del artículo 22.

CAPÍTULO IV

DISPOSICIONES GENERALES Y FINALES

Artículo 17

Registro comunitario de aditivos para alimentación animal

1. La Comisión creará y mantendrá actualizado un *Registro comunitario de aditivos para alimentación animal*.

2. El registro deberá ser de acceso público.

Artículo 18

Confidencialidad

1. El solicitante podrá indicar qué datos de los presentados conforme al presente Reglamento desea que reciban un tratamiento confidencial porque su revelación pudiera perjudicar seriamente su posición competitiva. En tal caso, deberá aportar una justificación verificable.

2. La Comisión determinará, tras consultar al solicitante, qué información, distinta de la indicada en el apartado 3, debe mantenerse confidencial e informará de su decisión al solicitante.

3. No se considerará confidencial la siguiente información:

- a) el nombre y la composición del aditivo para alimentación animal y, en su caso, la indicación de la cepa productora;
- b) las propiedades fisicoquímicas y biológicas del aditivo para alimentación animal;
- c) las conclusiones de los resultados del estudio sobre los efectos del aditivo para alimentación animal para la salud humana, para la sanidad de los animales y para el medio ambiente;
- d) las conclusiones de los resultados del estudio sobre los efectos del aditivo para alimentación animal sobre las características de los productos animales y sus propiedades nutricionales;
- e) los métodos de detección e identificación del aditivo para alimentación animal y, en su caso, los requisitos relativos al seguimiento y un resumen de los resultados del seguimiento.

4. No obstante lo dispuesto en el apartado 2, la Autoridad proporcionará a la Comisión y a los Estados miembros toda la información que esté en su poder si así se le solicita, incluida cualquier información considerada confidencial con arreglo al apartado 2.

5. Al tramitar solicitudes de acceso a los documentos que obren en su poder, la Autoridad aplicará los principios contenidos en el Reglamento (CE) nº 1049/2001 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de mayo de 2001, relativo al acceso del público a los documentos del Parlamento Europeo, del Consejo y de la Comisión ⁽¹⁾.

6. Los Estados miembros, la Comisión y la Autoridad mantendrán el carácter confidencial de toda la información que se haya determinado como tal conforme al apartado 2, salvo que se trate de información que deba hacerse pública para proteger la salud de las personas, la sanidad de los animales o el medio ambiente. Los Estados miembros tramitarán las solicitudes de acceso a los documentos que se les haya transmitido con arreglo al presente Reglamento de conformidad con lo dispuesto en el artículo 5 del Reglamento (CE) nº 1049/2001.

7. Si un solicitante retira o ha retirado su solicitud, los Estados miembros, la Comisión y la Autoridad respetarán la confidencialidad de la información comercial e industrial, incluida la relativa a la investigación y el desarrollo, así como aquella con respecto a cuya confidencialidad la Comisión y el solicitante no estén de acuerdo.

Artículo 19

Revisión administrativa

Las decisiones o inhibiciones en virtud de las competencias que confiere a la Autoridad el presente Reglamento podrán ser revisadas por la Comisión a iniciativa propia o a petición de un Estado miembro o de cualquier persona directa e individualmente afectada.

A tal fin se presentará una solicitud a la Comisión en un plazo de dos meses a partir de la fecha en que la parte afectada tenga conocimiento de la acción u omisión de que se trate.

La Comisión adoptará una decisión en el plazo de dos meses exigiendo, si procediera, a la Autoridad que, dentro de un plazo establecido, anule su decisión, o que actúe si se inhibió.

Artículo 20

Protección de datos

1. Los datos científicos y demás información contenida en el expediente de solicitud conforme al artículo 7 no podrán ser utilizados en provecho de otro solicitante durante un período de diez años contado a partir de la fecha de autorización, salvo que el otro solicitante haya acordado con el solicitante anterior el uso de esos datos y esa información.

2. Con objeto de estimular los esfuerzos de obtención de autorizaciones para especies menores relativas a aditivos cuya utilización está autorizada para otras especies, el período de protección de datos de diez años se ampliará en un año por cada especie menor para la cual se conceda una prórroga de la autorización de utilización.

⁽¹⁾ DO L 145 de 31.5.2001, p. 43.

3. El solicitante y el solicitante anterior harán todo lo necesario para alcanzar un acuerdo sobre el intercambio de información, con objeto de evitar repetir pruebas toxicológicas en vertebrados. Si, no obstante, no se llega a un acuerdo para compartir dicha información, la Comisión podrá decidir acerca de la divulgación de la información necesaria para evitar repetir pruebas toxicológicas en vertebrados, garantizando un equilibrio razonable entre los intereses de las partes afectadas.

4. Al finalizar el período de diez años, los resultados de toda la evaluación o parte de la evaluación realizada sobre la base de los datos y la información científicos incluidos en el expediente de solicitud podrán ser utilizados por la Autoridad en provecho de otro solicitante.

Artículo 21

Laboratorios de referencia

El laboratorio comunitario de referencia, así como sus deberes y tareas, figuran en el anexo II.

Los solicitantes de autorización de aditivos contribuirán a sufragar los costes de las tareas del laboratorio comunitario de referencia y del consorcio de laboratorios nacionales de referencia mencionadas en el anexo II.

Las normas detalladas para la aplicación del anexo II, así como las modificaciones del mismo, podrán adoptarse de conformidad con el procedimiento mencionado en el apartado 2 del artículo 22.

Artículo 22

Procedimiento del Comité

1. La Comisión estará asistida por el Comité permanente de la cadena alimentaria y de sanidad animal creado por el artículo 58 del Reglamento (CE) n° 178/2002, denominado en lo sucesivo «el Comité».

2. En los casos en que se haga referencia al presente apartado, serán de aplicación los artículos 5 y 7 de la Decisión 1999/468/CE, observando lo dispuesto en su artículo 8.

El plazo contemplado en el apartado 6 del artículo 5 de la Decisión 1999/468/CE queda fijado en tres meses.

3. El Comité aprobará su reglamento interno.

Artículo 23

Derogaciones

1. Queda derogada la Directiva 70/524/CEE con efectos a partir de la fecha de aplicación del presente Reglamento. No obstante, el artículo 16 de la Directiva 70/524/CEE permanecerá en vigor hasta que se haya revisado la Directiva 79/373/CEE para incluir normas relativas al etiquetado de los piensos a los que se han añadido aditivos.

2. Se suprimen los puntos 2.1, 3 y 4 del anexo de la Directiva 82/471/CEE con efectos a partir de la fecha de aplicación del presente Reglamento.

3. Queda derogada la Directiva 87/153/CEE con efectos a partir de la fecha de aplicación del presente Reglamento. No obstante, el anexo de dicha Directiva permanecerá en vigor hasta que se adopten las normas de ejecución previstas en el apartado 4 del artículo 7 del presente Reglamento.

4. Las referencias a la Directiva 70/524/CEE se entenderán como referencias al presente Reglamento.

Artículo 24

Sanciones

Los Estados miembros establecerán las normas sobre las sanciones aplicables a las infracciones de lo dispuesto por el presente Reglamento y adoptarán todas las medidas necesarias para asegurar la aplicación de dichas normas. Las sanciones fijadas deberán ser eficaces, proporcionadas y disuasorias.

Los Estados miembros notificarán esas normas y medidas a la Comisión, a más tardar, en los 12 meses siguientes a la fecha de publicación del presente Reglamento, y le comunicarán de inmediato cualquier modificación de las mismas.

Artículo 25

Medidas transitorias

1. Las solicitudes presentadas con arreglo al artículo 4 de la Directiva 70/524/CEE antes de la fecha de aplicación del presente Reglamento se tratarán como solicitudes en virtud del artículo 7 del presente Reglamento cuando todavía no se hayan enviado a la Comisión las observaciones iniciales previstas en el apartado 4 del artículo 4 de la Directiva 70/524/CEE. Los Estados miembros designados como ponentes con respecto a tal solicitud deberán transmitir inmediatamente a la Comisión el expediente presentado con arreglo a dicha solicitud. No obstante el apartado 1 del artículo 23, dichas solicitudes continuarán siendo tratadas conforme al artículo 4 de la Directiva 70/524/CEE cuando ya se hayan enviado a la Comisión las observaciones iniciales previstas en el apartado 4 del artículo 4 de dicha Directiva 70/524/CEE.

2. Los requisitos de etiquetado establecidos en el capítulo III no se aplicarán a los productos que se hayan fabricado y etiquetado legalmente en la Comunidad, o que se hayan importado y comercializado legalmente en la Comunidad, con anterioridad a la fecha de aplicación del presente Reglamento.

Artículo 26

Entrada en vigor

1. El presente Reglamento entrará en vigor a los veinte días de su publicación en el *Diario Oficial de la Unión Europea*.

2. Se aplicará una vez transcurridos 12 meses a partir de la fecha de su publicación.

El presente Reglamento será obligatorio en todos sus elementos y directamente aplicable en cada Estado miembro.

Hecho en Bruselas, el 22 de septiembre de 2003.

Por el Parlamento Europeo

El Presidente

P. COX

Por el Consejo

El Presidente

R. BUTTIGLIONE

ANEXO I

GRUPOS DE ADITIVOS

1. La categoría de los «aditivos tecnológicos» incluye los siguientes grupos funcionales:
 - a) conservantes: sustancias o, en su caso, los microorganismos que protegen los piensos contra el deterioro causado por microorganismos o sus metabolitos;
 - b) antioxidantes: sustancias que prolongan el período de conservación de los piensos y las materias primas para piensos, protegiéndolos contra el deterioro causado por la oxidación;
 - c) emulgentes: sustancias que hacen posible la formación o el mantenimiento de una mezcla homogénea de dos o más fases no miscibles en los piensos;
 - d) estabilizantes: sustancias que posibilitan el mantenimiento del estado fisicoquímico de los piensos;
 - e) espesantes: sustancias que aumentan la viscosidad de los piensos;
 - f) gelificantes: sustancias que dan textura a un pienso mediante la formación de un gel;
 - g) ligantes: sustancias que aumentan la tendencia a adherirse de las partículas de piensos;
 - h) sustancias para el control de la contaminación por radionucleidos: sustancias que suprimen la absorción de radionucleidos o que estimulan su excreción;
 - i) antiaglomerantes: sustancias que reducen la tendencia de las partículas individuales de un pienso a adherirse;
 - j) reguladores de la acidez: sustancias que regulan la acidez o alcalinidad de los piensos;
 - k) aditivos para ensilaje: sustancias, incluidas enzimas o microorganismos destinados a ser incorporados a los piensos para mejorar la producción de ensilaje;
 - l) desnaturalizantes: sustancias que, cuando se utilizan en la fabricación de piensos transformados, permiten identificar el origen del pienso o las materias primas para piensos específicos.
 2. La categoría de los «aditivos organolépticos» incluye los grupos funcionales siguientes:
 - a) colorantes:
 - i) sustancias que añaden o devuelven color a los piensos,
 - ii) sustancias que, suministradas a los animales, añaden color al alimento de origen animal,
 - iii) sustancias que afectan favorablemente al color de los peces y pájaros ornamentales;
 - b) aromatizantes: sustancias cuya adición a los piensos aumenta su aroma o palatabilidad.
 3. La categoría de los «aditivos nutricionales» incluye los siguientes grupos funcionales:
 - a) vitaminas, provitaminas y sustancias químicamente definidas de efecto análogo;
 - b) oligoelementos o compuestos de oligoelementos;
 - c) aminoácidos, sus sales y análogos;
 - d) urea y sus derivados.
 4. La categoría de los «aditivos zootécnicos» incluye los grupos funcionales siguientes:
 - a) digestivos: sustancias que, suministradas a los animales, facilitan la digestión de los alimentos ingeridos, actuando sobre determinadas materias primas para piensos;
 - b) estabilizadores de la flora intestinal: microorganismos u otras sustancias definidas químicamente que, suministradas a los animales, tienen un efecto positivo para la flora intestinal;
 - c) sustancias que influyen positivamente en el medio ambiente;
 - d) otros aditivos zootécnicos.
-

ANEXO II

DEBERES Y TAREAS DEL LABORATORIO COMUNITARIO DE REFERENCIA

1. El laboratorio comunitario de referencia a que se refiere el artículo 21 es el Centro Común de Investigación de la Comisión (CCI).
2. Para realizar las tareas esbozadas en el presente anexo, el CCI podrá estar asistido por una asociación de laboratorios nacionales de referencia.
El CCI estará encargado de:
 - recibir, preparar, almacenar y mantener las correspondientes muestras de referencia;
 - someter a prueba y evaluar o validar el método de detección;
 - evaluar los datos suministrados por el solicitante de la autorización para comercializar el aditivo para alimentación animal, con el fin de someter a prueba y evaluar o validar el método de detección;
 - presentar a la Autoridad informes completos de evaluación.
3. El laboratorio comunitario de referencia intervendrá para resolver las controversias entre Estados miembros relacionadas con los resultados de las tareas esbozadas en este anexo.

ANEXO III

REQUISITOS ESPECÍFICOS RELATIVOS AL ETIQUETADO DE ALGUNOS ADITIVOS PARA ALIMENTACIÓN ANIMAL Y PREMEZCLAS

- a) Aditivos zootécnicos, coccidiostáticos e histomonóstatos:
 - la fecha límite de la garantía o la duración de conservación a partir de la fecha de fabricación,
 - las instrucciones de uso, y
 - la concentración.
- b) Enzimas: además de las indicaciones mencionadas anteriormente:
 - el nombre específico del componente o componentes activos con arreglo a su actividad enzimática, de conformidad con la autorización concedida,
 - el número de identificación de la International Union of Biochemistry, y
 - en lugar de concentración: unidades de actividad (unidades de actividad por gramo o unidades de actividad por mililitro).
- c) Microorganismos:
 - la fecha límite de la garantía o la duración de conservación a partir de la fecha de fabricación,
 - las instrucciones de uso,
 - el número de identificación de la cepa, y
 - el número de las unidades que forman colonias por gramo.
- d) Aditivos nutricionales:
 - el contenido en sustancia activa, y
 - la fecha límite de garantía del contenido o la duración de conservación a partir de la fecha de fabricación.
- e) Aditivos tecnológicos y organolépticos, con la excepción de los aromatizantes:
 - el contenido en sustancia activa.
- f) Aromatizantes:
 - la tasa de incorporación en premezclas.

ANEXO IV

CONDICIONES GENERALES DE USO

1. Se hará un cálculo de la cantidad de aditivos que existe también en estado natural en determinadas materias primas para piensos, de forma que el total de los elementos añadidos y el total de los elementos presentes naturalmente no exceda del nivel máximo previsto en el reglamento de autorización.
 2. La mezcla de aditivos sólo se autorizará en premezclas y piensos cuando haya compatibilidad fisicoquímica y biológica entre los componentes de la mezcla respecto de los efectos buscados.
 3. Los piensos complementarios, diluidos según las especificaciones, no podrán contener aditivos en niveles superiores a los establecidos para los piensos completos.
 4. En el caso de las premezclas que contengan aditivos para ensilaje, en la etiqueta se añadirán de forma clara, tras «PREMEZCLA», las palabras «de aditivos para ensilaje».
-



European
Commission

European Union Register of Feed Additives

pursuant to Regulation
(EC) No 1831/2003

Category	Functional Group		Code	Additive	Reference(s) of Community legal act	Reference in OJ	Date of authorisation	Expiry date of authorisation(s)	Date of first entry in the Register
					(Title and/or No. of legal measure)	Reference in OJ			
		Subclassification							
2	b	natural or corresponding synthetic chemically defined flavourings		CAS No. 107-03-9 / 1-Propane-1-thiol / Flavis No. 12.071	Council Directive 70/524/EEC concerning additives in feedingstuffs – List of authorised additives in feedingstuffs (2004/C 50/01)	OJ C 50, 25.02.2004, p. 1	-	Following the provisions of Art. 10 § 2 of Reg. (EC) No 1831/2003, an application, in accordance with Article 7, has been submitted	07.11.05
2	b	natural or corresponding synthetic chemically defined flavourings		CAS No. 1072-83-9 / 2-Acetylpyrrole / Flavis No. 14.047	Council Directive 70/524/EEC concerning additives in feedingstuffs – List of authorised additives in feedingstuffs (2004/C 50/01)	OJ C 50, 25.02.2004, p. 1	-	Following the provisions of Art. 10 § 2 of Reg. (EC) No 1831/2003, an application, in accordance with Article 7, has been submitted	07.11.05
2	b	natural or corresponding synthetic chemically defined flavourings		CAS No. 107-35-7 / Taurine / Flavis No. 16.056	Council Directive 70/524/EEC concerning additives in feedingstuffs – List of authorised additives in feedingstuffs (2004/C 50/01)	OJ C 50, 25.02.2004, p. 1	-	Following the provisions of Art. 10 § 2 of Reg. (EC) No 1831/2003, an application, in accordance with Article 7, has been submitted	29.04.06
2	b	natural or corresponding synthetic chemically defined flavourings		CAS No. 1076-56-8 / 1-Isopropyl-2-methoxy-4-methylbenzene / Flavis No. 04.043	Council Directive 70/524/EEC concerning additives in feedingstuffs – List of authorised additives in feedingstuffs (2004/C 50/01)	OJ C 50, 25.02.2004, p. 1	-	Following the provisions of Art. 10 § 2 of Reg. (EC) No 1831/2003, an application, in accordance with Article 7, has been submitted	07.11.05
2	b	natural or corresponding synthetic chemically defined flavourings		CAS No. 107-85-7 / 3-Methylbutylamine / Flavis No. 11.001	Council Directive 70/524/EEC concerning additives in feedingstuffs – List of authorised additives in feedingstuffs (2004/C 50/01)	OJ C 50, 25.02.2004, p. 1	-	Following the provisions of Art. 10 § 2 of Reg. (EC) No 1831/2003, an application, in accordance with Article 7, has been submitted	07.11.05
2	b	natural or corresponding synthetic chemically defined flavourings		CAS No. 107-87-9 / Pentan-2-one / Flavis No. 07.054	Council Directive 70/524/EEC concerning additives in feedingstuffs – List of authorised additives in feedingstuffs (2004/C 50/01)	OJ C 50, 25.02.2004, p. 1	-	Following the provisions of Art. 10 § 2 of Reg. (EC) No 1831/2003, an application, in accordance with Article 7, has been submitted	07.11.05
2	b	natural or corresponding synthetic chemically defined flavourings		CAS No. 107-92-6 / Butyric acid / Flavis No. 08.005	Council Directive 70/524/EEC concerning additives in feedingstuffs – List of authorised additives in feedingstuffs (2004/C 50/01)	OJ C 50, 25.02.2004, p. 1	-	Following the provisions of Art. 10 § 2 of Reg. (EC) No 1831/2003, an application, in accordance with Article 7, has been submitted	07.11.05
2	b	natural or corresponding synthetic chemically defined flavourings		CAS No. 107-95-9 / beta-Alanine / Flavis No. 17.001	Council Directive 70/524/EEC concerning additives in feedingstuffs – List of authorised additives in feedingstuffs (2004/C 50/01)	OJ C 50, 25.02.2004, p. 1	-	Following the provisions of Art. 10 § 2 of Reg. (EC) No 1831/2003, an application, in accordance with Article 7, has been submitted	07.11.05

Category	Functional Group		Code	Additive	Reference(s) of Community legal act		Date of authorisation	Expiry date of authorisation(s)	Date of first entry in the Register
		(Annex I of Reg. 1831/03)					Reference in OJ		
		Subclassification			(Title and/or No. of legal measure)				
3	a	Chemically well defined substances having a similar biological effect to vitamins		Betaine / Betaine hydrochloride	Council Directive 70/524/EEC concerning additives in feedingsuffs – List of authorised additives in feedingsuffs (2004/C 50/01)	OJ C 50, 25.02.2004, p. 1	-	Following the provisions of Art. 10 § 2 of Reg. (EC) No 1831/2003, an application, in accordance with Article 7, has been submitted	07.11.05
3	a	Chemically well defined substances having a similar biological effect to vitamins		Taurine	Council Directive 70/524/EEC concerning additives in feedingsuffs – List of authorised additives in feedingsuffs (2004/C 50/01)	OJ C 50, 25.02.2004, p. 1	-	Following the provisions of Art. 10 § 2 of Reg. (EC) No 1831/2003, an application, in accordance with Article 7, has been submitted	07.11.05
3	a	Chemically well defined substances having a similar biological effect to vitamins		Omega-6 Essential Unsaturated Fatty acids (as octadecadienoic acid)	Council Directive 70/524/EEC concerning additives in feedingsuffs – List of authorised additives in feedingsuffs (2004/C 50/01)	OJ C 50, 25.02.2004, p. 1	-	Following the provisions of Art. 10 § 2 of Reg. (EC) No 1831/2003, an application, in accordance with Article 7, has been submitted	07.11.05
3	a	Vitamins and provitamins	E 160 a	Beta-carotene / (See also category 2; a (iii); Carotenoids and xanthophylls)	Council Directive 70/524/EEC concerning additives in feedingsuffs – List of authorised additives in feedingsuffs (2004/C 50/01)	OJ C 50, 25.02.2004, p. 1	-	Following the provisions of Art. 10 § 2 of Reg. (EC) No 1831/2003, an application, in accordance with Article 7, has been submitted	07.11.05
3	a	Vitamins and provitamins	E 300	Vitamin C / L-Ascorbic acid / (see also section 1 b antioxidants)	Council Directive 70/524/EEC concerning additives in feedingsuffs – List of authorised additives in feedingsuffs (2004/C 50/01)	OJ C 50, 25.02.2004, p. 1	-	Following the provisions of Art. 10 § 2 of Reg. (EC) No 1831/2003, an application, in accordance with Article 7, has been submitted	07.11.05
3	a	Vitamins and provitamins	E 301	Vitamin C / Sodium L-ascorbate / (see also section 1 b antioxidants)	Council Directive 70/524/EEC concerning additives in feedingsuffs – List of authorised additives in feedingsuffs (2004/C 50/01)	OJ C 50, 25.02.2004, p. 1	-	Following the provisions of Art. 10 § 2 of Reg. (EC) No 1831/2003, an application, in accordance with Article 7, has been submitted	07.11.05
3	a	Vitamins and provitamins	E 302	Vitamin C / Calcium L-ascorbate / (see also section 1 b antioxidants)	Council Directive 70/524/EEC concerning additives in feedingsuffs – List of authorised additives in feedingsuffs (2004/C 50/01)	OJ C 50, 25.02.2004, p. 1	-	Following the provisions of Art. 10 § 2 of Reg. (EC) No 1831/2003, an application, in accordance with Article 7, has been submitted	07.11.05
3	a	Vitamins and provitamins	E 304	Vitamin C / 6-Palmityl-L-ascorbic acid / (see also section 1 b antioxidants)	Council Directive 70/524/EEC concerning additives in feedingsuffs – List of authorised additives in feedingsuffs (2004/C 50/01)	OJ C 50, 25.02.2004, p. 1	-	Following the provisions of Art. 10 § 2 of Reg. (EC) No 1831/2003, an application, in accordance with Article 7, has been submitted	07.11.05

I

(Actos adoptados en aplicación de los Tratados CE/Euratom cuya publicación es obligatoria)

REGLAMENTOS

REGLAMENTO (CE) n° 429/2008 DE LA COMISIÓN

de 25 de abril de 2008

sobre normas de desarrollo para la aplicación del Reglamento (CE) n° 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que se refiere a la preparación y presentación de solicitudes y a la evaluación y autorización de aditivos para piensos

(Texto pertinente a efectos del EEE)

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

Visto el Reglamento (CE) n° 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003, sobre los aditivos en la alimentación animal ⁽¹⁾, y, en particular, su artículo 7, apartados 4 y 5,

Previa consulta a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria de conformidad con el artículo 7, apartados 4 y 5, del Reglamento (CE) n° 1831/2003,

Considerando lo siguiente:

(1) Es necesario establecer normas de aplicación relativas al procedimiento de autorización de aditivos para piensos conforme al Reglamento (CE) n° 1831/2003, en especial normas para la preparación y presentación de las solicitudes y para la evaluación y autorización de esos aditivos. Estas normas han de sustituir a las disposiciones establecidas en el anexo de la Directiva 87/153/CEE del Consejo ⁽²⁾, por la que se fijan líneas directrices para la evaluación de los aditivos en la alimentación animal.

(2) Dichas normas deben prescribir los requisitos que ha de cumplir el expediente del que se acompaña la solicitud. En

particular, deben exponer los datos científicos que han de presentarse para identificar y caracterizar el aditivo en cuestión, así como los estudios que deben aportarse con el fin de demostrar su eficacia y su inocuidad para las personas, los animales y el medio ambiente, a fin de que la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria («la Autoridad») pueda verificar y evaluar las solicitudes de autorización.

(3) La extensión de los estudios necesarios para evaluar las propiedades o los efectos del aditivo puede variar en función de su naturaleza o de las condiciones de utilización solicitadas. Debe concederse, pues, una cierta flexibilidad a los explotadores de las empresas en cuanto al tipo de estudios y de material que deben presentar para demostrar la inocuidad y la eficacia del aditivo de que se trate. Los que decidan aprovechar esa flexibilidad deben justificar su decisión en el expediente.

(4) La Autoridad debe tener la posibilidad de pedir información suplementaria, cuando proceda, para determinar si el aditivo cumple las condiciones de autorización mencionadas en el artículo 5 del Reglamento (CE) n° 1831/2003.

(5) Es indispensable aplicar normas de calidad apropiadas al elaborar los expedientes de aditivos destinados a ser utilizados en piensos o en agua, para asegurarse de que los resultados de las pruebas de laboratorio son irrefutables.

(6) Si es necesario, deben establecerse requisitos específicos para cada categoría de aditivos mencionada en el artículo 6, apartado 1, del Reglamento (CE) n° 1831/2003.

(7) Para fomentar las solicitudes de autorización en relación con especies menores, manteniendo el nivel necesario de

⁽¹⁾ DO L 268 de 18.10.2003, p. 29. Reglamento modificado por el Reglamento (CE) n° 378/2005 de la Comisión (DO L 59 de 5.3.2005, p. 8).

⁽²⁾ DO L 64 de 7.3.1987, p. 19. Directiva derogada por el Reglamento (CE) n° 1831/2003.

seguridad, deben establecerse condiciones específicas para que puedan extrapolarse a las especies menores los resultados de estudios efectuados con especies mayores.

- (8) En las normas de aplicación relativas a las solicitudes de autorización debe tenerse en cuenta que los requisitos son diferentes según se trate de animales productores de alimentos o de otros animales, pues en relación con estos últimos los aspectos relativos a la evaluación de la inocuidad para el consumidor humano carecen de importancia.
- (9) El recurso a procedimientos que impliquen el uso de animales de laboratorio con fines experimentales o científicos de otro tipo y la realización de pruebas con animales de conformidad con la Directiva 86/609/CEE del Consejo, de 24 de noviembre de 1986, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos ⁽¹⁾, debe ser mínimo.
- (10) A fin de evitar la repetición innecesaria de estudios, deben establecerse procedimientos simplificados para autorizar aditivos cuya utilización ya está autorizada en la alimentación humana.
- (11) Por lo que respecta a los aditivos ya autorizados sin límite de tiempo conforme a la Directiva 70/524/CEE del Consejo ⁽²⁾, cuando proceda debe establecerse la posibilidad de que el solicitante, si no tiene estudios a su disposición, pueda demostrar la eficacia con otro material a su disposición, en particular el relativo a un amplio historial de uso del aditivo en cuestión.
- (12) Deben establecerse normas relativas a las solicitudes de modificación de autorizaciones conforme al artículo 13, apartado 3, del Reglamento (CE) n° 1831/2003.
- (13) Asimismo, deben establecerse normas relativas a las solicitudes de renovación de autorizaciones conforme al artículo 14 del Reglamento (CE) n° 1831/2003.
- (14) Por lo que se refiere a las disposiciones concernientes a los estudios de inocuidad y eficacia que deben efectuarse en apoyo de la solicitud, es necesario establecer un período transitorio durante el cual sigan siendo de aplicación las normas actuales. Las solicitudes presentadas antes de la entrada en vigor del presente Reglamento deben seguir tramitándose de acuerdo con lo dispuesto en el anexo de la Directiva 87/153/CEE. Con respecto a las solicitudes presentadas durante un determinado período tras la entrada en vigor, y teniendo en cuenta que algunos estudios requieren un largo período de tiempo, debe ofrecerse a los solicitantes la posibilidad de elegir entre las normas establecidas en el presente Reglamento y las dispuestas en el anexo de la Directiva 87/153/CEE. Las normas de aplicación han sido elaboradas sobre la base de los conocimientos científicos y técnicos actuales, por lo que,

en caso necesario, tendrían que adaptarse a los posibles avances.

- (15) Las medidas previstas en el presente Reglamento se ajustan al dictamen del Comité permanente de la cadena alimentaria y de sanidad animal.

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

Artículo 1

Definiciones

A los efectos del presente Reglamento se entenderá por:

- 1) «mascotas y otros animales no productores de alimentos»: los animales de especies que el ser humano usualmente alimenta, cría con fines de reproducción o cuida, pero no consume, con excepción de los caballos;
- 2) «especie menor»: la formada por animales productores de alimentos distintos de los bovinos (animales lecheros y de carne, incluidos los terneros), ovinos (animales de carne), porcinos, pollos (incluidas las gallinas ponedoras), pavos y peces salmónidos.

Artículo 2

Aplicación

1. La solicitud de autorización de un aditivo para piensos, según establece el artículo 7 del Reglamento (CE) n° 1831/2003, se presentará utilizando el formulario que figura en el anexo I.

Se acompañará del expediente que se establece en el artículo 3 (en lo sucesivo, «el expediente»), que contendrá los datos y los documentos mencionados en el artículo 7, apartado 3, del Reglamento (CE) n° 1831/2003.

2. Cuando, de conformidad con el artículo 18 del Reglamento (CE) n° 1831/2003, el solicitante pida que se traten como confidenciales determinadas partes del expediente al que se refiere el apartado 1, deberá aportar en relación con cada documento o parte de documento una justificación verificable de que la revelación de esa información podría dañar significativamente su posición competitiva. Las partes confidenciales se presentarán por separado del resto del expediente y no se incluirán en el resumen al que se refiere el artículo 7, apartado 3, letra h), del Reglamento (CE) n° 1831/2003. El solicitante deberá enviar a la Comisión una copia de las partes del documento para las que haya pedido un trato confidencial y de la justificación correspondiente.

Artículo 3

Expediente

1. El expediente demostrará de forma adecuada y suficiente que el aditivo para piensos cumple las condiciones de autorización establecidas en el artículo 5 del Reglamento (CE) n° 1831/2003.

⁽¹⁾ DO L 358 de 18.12.1986, p. 1. Directiva modificada por la Directiva 2003/65/CE del Parlamento Europeo y del Consejo (DO L 230 de 16.9.2003, p. 32).

⁽²⁾ DO L 270 de 14.12.1970, p. 1. Directiva modificada en último lugar por el Reglamento (CE) no 1800/2004 de la Comisión (DO L 317 de 16.10.2004, p. 37).

2. Los requisitos generales para la preparación y presentación del expediente serán los expuestos en el anexo II.

Los requisitos específicos que, en su caso, deberá cumplir el expediente, serán los expuestos en el anexo III.

La duración mínima de los estudios prolongados será la que se indica en el anexo IV.

3. No obstante lo dispuesto en el apartado 2, el solicitante podrá presentar un expediente que no satisfaga los requisitos establecidos en dicho apartado si presenta una justificación por cada elemento que no los cumpla.

anterioridad a la fecha de entrada en vigor del presente Reglamento.

2. En relación con las solicitudes de autorización presentadas antes del 11 de junio de 2009, los solicitantes podrán escoger que sigan siendo de aplicación las secciones III y IV de las partes I y II del anexo de la Directiva 87/153/CEE en lugar de los puntos 1.3, 1.4, 2.1.3, 2.1.4, 2.2.3, 2.2.4, 3.3, 3.4, 4.1.3, 4.1.4, 4.2.3, 4.2.4, 5.3, 5.4, 6.3, 6.4, 7.3, 7.4, 8.3 y 8.4 del anexo III y en lugar de las disposiciones establecidas en la columna «Duración mínima de los estudios de eficacia prolongados» de los cuadros del anexo IV.

Artículo 4

Medidas transitorias

1. El anexo de la Directiva 87/153/CEE seguirá siendo de aplicación para las solicitudes de autorización presentadas con

Artículo 5

Entrada en vigor

El presente Reglamento entrará en vigor el vigésimo día siguiente al de su publicación en el *Diario Oficial de la Unión Europea*.

El presente Reglamento será obligatorio en todos sus elementos y directamente aplicable en cada Estado miembro.

Hecho en Bruselas, el 25 de abril de 2008.

Por la Comisión

Androulla VASSILIOU

Miembro de la Comisión

ANEXO I

FORMULARIO DE SOLICITUD AL QUE SE REFIERE EL ARTÍCULO 2, APARTADO 1, Y DATOS ADMINISTRATIVOS**1. FORMULARIO DE SOLICITUD**

COMISIÓN EUROPEA

DIRECCIÓN GENERAL DE

SANIDAD Y PROTECCIÓN DE LOS CONSUMIDORES

(Dirección)

Fecha:

Asunto: Solicitud de autorización de un aditivo para piensos conforme al Reglamento (CE) n° 1831/2003

- ☐ Autorización de un aditivo para piensos o de un nuevo uso de un aditivo para piensos [artículo 4, apartado 1, del Reglamento (CE) n° 1831/2003]
- ☐ Autorización de un producto ya existente [artículo 10, apartados 2 o 7, del Reglamento (CE) n° 1831/2003]
- ☐ Modificación de una autorización ya existente [artículo 13, apartado 3, del Reglamento (CE) n° 1831/2003]
- ☐ Renovación de la autorización de un aditivo para piensos [artículo 14 del Reglamento (CE) n° 1831/2003]
- ☐ Autorización urgente [artículo 15 del Reglamento (CE) n° 1831/2003]

(Marque claramente la casilla correspondiente)

El solicitante o solicitantes y sus representantes en la Comunidad [artículo 4, apartado 3, del Reglamento (CE) n° 1831/2003], en las condiciones que exige el artículo 7, apartado 3, letra a), del Reglamento (CE) n° 1831/2003 (nombre, dirección, etc.),

.....

.....

presentan esta solicitud para obtener la autorización del siguiente producto como aditivo para piensos:

1.1. Identificación y caracterización del aditivo

Nombre del aditivo (caracterización de las sustancias o los agentes activos según se definen en los puntos 2.2.1.1 y 2.2.1.2 del anexo II):

.....

.....

Nombre comercial (si procede, para las autorizaciones vinculadas al titular):

.....

.....

Categorías y grupos funcionales de aditivos ⁽¹⁾ (lista):

.....
.....

Especies destinatarias:

.....
.....
.....

Nombre del titular de la autorización: [artículo 9, apartado 6, del Reglamento (CE) n° 1831/2003]

.....
.....

Este aditivo ya está autorizado en la legislación sobre piensos por la Directiva .../.../CE(E) o el Reglamento (CE[E]) n° .../... con el número ... como (categoría de aditivos).

.....

Este aditivo ya está autorizado en la legislación alimentaria por la Directiva .../.../CE(E) o el Reglamento (CE[E]) n° .../... con el número ... como

.....

para ser utilizado en

.....

Si el producto contiene, se compone o ha sido producido a partir de un organismo modificado genéticamente (OMG), facilite la siguiente información:

☐ identificador único [Reglamento (CE) n° 65/2004 de la Comisión ⁽²⁾] (cuando proceda):

.....

☐ o bien los datos de una autorización concedida conforme al Reglamento (CE) n° 1829/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo ⁽³⁾:

.....

☐ o bien los datos de una solicitud de autorización pendiente conforme al Reglamento (CE) n° 1829/2003:

.....

1.2. Condiciones de utilización

1.2.1. Utilización en piensos completos

Especie o categoría de animales:

.....
.....

⁽¹⁾ En relación con el grupo funcional «otros aditivos zootécnicos», dentro de la categoría de «aditivos zootécnicos», será necesario definir claramente qué función se solicita para el aditivo.

⁽²⁾ DO L 10 de 16.1.2004, p. 5.

⁽³⁾ DO L 268 de 18.10.2003, p. 1. Reglamento modificado en último lugar por el Reglamento (CE) n° 298/2008 (DO L 97 de 9.4.2008, p. 64).

Edad o peso máximos:

.....

.....

Dosis mínima (si procede): mg, unidades de actividad ⁽⁴⁾, unidades formadoras de colonias (UFC) o ml/kg de pienso completo con un contenido de humedad del 12 %

.....

.....

Dosis máxima (si procede): mg, unidades de actividad, UFC o ml/kg de pienso completo con un contenido de humedad del 12 %

.....

.....

En el caso de piensos líquidos, las dosis mínima y máxima podrán expresarse por litro.

1.2.2. Utilización en agua

Dosis mínima (si procede): mg, unidades de actividad, UFC o ml/l de agua

.....

.....

Dosis máxima (si procede): mg, unidades de actividad, UFC o ml/l de agua

.....

.....

1.2.3. Condiciones especiales de utilización (si procede)

Especie o categoría de animales:

.....

.....

Edad máxima:

.....

.....

Dosis mínima (si procede): mg, unidades de actividad o UFC/kg de pienso complementario con un contenido de humedad del 12 %

.....

.....

⁽⁴⁾ El solicitante deberá proporcionar una definición de «unidad».

Dosis máxima (si procede): mg, unidades de actividad o UFC/kg de pienso complementario con un contenido de humedad del 12 %

.....
.....

En el caso de piensos líquidos, las dosis mínima y máxima podrán expresarse por litro.

Condiciones o restricciones de utilización (si procede):

.....
.....
.....

Condiciones o restricciones específicas de manipulación (si procede):

.....
.....
.....
.....

Límite máximo de residuos (si procede):

Especie o categoría de animales:

.....
.....

Residuo marcador:

.....
.....

Tejidos o productos diana:

.....
.....
.....

Residuo máximo en los tejidos o productos (µg/kg):

.....
.....
.....

Tiempo de espera:

.....

1.3. Muestras de referencia

Número de la muestra del laboratorio comunitario de referencia (LCR) (en su caso):

.....

Número/código de lote:

.....

Fecha de fabricación:

.....

Fecha de caducidad:

.....

Concentración:

.....

Peso:

.....

Descripción física:

.....

Descripción del recipiente:

.....

Requisitos de almacenamiento:

.....

1.4. Modificación solicitada (si procede):

.....

.....

.....

.....

Se ha enviado directamente copia de esta solicitud a la Autoridad, acompañada del expediente, y al LCR, acompañada de las muestras de referencia.

Firma.....

1.5. Anexos:

- ☐ expediente completo (solo para la Autoridad),
- ☐ resumen público del expediente,
- ☐ resumen pormenorizado del expediente,
- ☐ lista de las partes del expediente para las que se ha pedido un trato confidencial y copia de dichas partes (solo para la Comisión y la Autoridad),
- ☐ copia de los datos administrativos del solicitante o solicitantes,
- ☐ tres muestras del aditivo para piensos destinadas al LCR, de acuerdo con el artículo 7, apartado 3, letra f), del Reglamento (CE) n° 1831/2003 (solo para el LCR),
- ☐ ficha de datos de seguridad de los materiales (solo para el LCR),
- ☐ certificado de identificación y análisis (solo para el LCR), y
- ☐ confirmación del pago de la tasa al LCR [artículo 4 del Reglamento (CE) n° 378/2005 ⁽⁵⁾].

Rellene las partes procedentes del formulario y suprima las que no sean pertinentes. El formulario de solicitud original (con los demás anexos requeridos) deberá enviarse directamente a la Comisión Europea.

2. DATOS ADMINISTRATIVOS DEL SOLICITANTE O SOLICITANTES

Datos de contacto para la presentación de una solicitud de autorización de un aditivo para piensos conforme al Reglamento (CE) n° 1831/2003

- 1) Empresa o persona solicitante
 - a) Nombre del solicitante o de la empresa
 - b) Dirección (calle, número, código postal, ciudad y país)
 - c) Teléfono
 - d) Fax
 - e) Correo electrónico (si tiene)
- 2) Persona de contacto (para toda la correspondencia con la Comisión, la Autoridad y el LCR)
 - a) Nombre y apellidos de la persona de contacto
 - b) Cargo
 - c) Dirección (calle, número, código postal, ciudad y país)
 - d) Teléfono
 - e) Fax
 - f) Correo electrónico (si tiene)

⁽⁵⁾ Reglamento (CE) n° 378/2005 de la Comisión, de 4 de marzo de 2005, sobre normas detalladas para la aplicación del Reglamento (CE) n° 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que se refiere a los deberes y las tareas del laboratorio comunitario de referencia en relación con las solicitudes de autorización de aditivos para alimentación animal (DO L 59 de 5.3.2005, p. 8). Reglamento modificado por el Reglamento (CE) n° 850/2007 (DO L 188 de 20.7.2007, p. 3).

ANEXO II

REQUISITOS GENERALES QUE DEBE SATISFACER EL EXPEDIENTE ESTABLECIDO EN EL ARTÍCULO 3

ASPECTOS DE CARÁCTER GENERAL

El presente anexo expone los requisitos para establecer la lista y las características de los estudios y los datos sobre sustancias, microorganismos y preparados que deben presentarse con los expedientes conforme al artículo 7 del Reglamento (CE) n° 1831/2003, con vistas a una:

- autorización como nuevo aditivo para piensos,
- autorización de un nuevo uso de un aditivo para piensos,
- modificación de la actual autorización de un aditivo para piensos, o
- renovación de la autorización de un aditivo para piensos.

Los expedientes deberán permitir evaluar los aditivos sobre la base del estado actual de los conocimientos y verificar que cumplen los principios fundamentales que exige para su autorización el artículo 5 del Reglamento (CE) n° 1831/2003.

Los estudios que deben presentarse, así como su extensión, dependerán de la naturaleza del aditivo, de la categoría y el grupo funcional, del tipo de autorización (no específica del titular o específica del titular), de la propia sustancia, de los animales a los que está destinado y de las condiciones de utilización. El solicitante deberá remitirse al presente anexo y al anexo III para estimar qué estudios y qué información deberá presentar con la solicitud.

El solicitante deberá exponer claramente las razones de que en el expediente se haya omitido o alterado cualquier dato prescrito en el presente anexo o en los anexos III o IV.

El expediente contendrá informes detallados de todos los estudios realizados, que se presentarán según el sistema de numeración propuesto en el presente anexo. Incluirá, asimismo, referencias y copias de todos los datos científicos publicados que se citen, así como copias de los dictámenes pertinentes que ya haya emitido cualquier organismo científico reconocido. Cuando estos estudios hayan sido ya evaluados por un organismo científico europeo conforme a la legislación vigente en la Comunidad, bastará con hacer referencia al resultado de esa evaluación. Los datos procedentes de estudios realizados y publicados con anterioridad o de revisiones *inter pares* deberán referirse claramente al mismo aditivo que sea objeto de la solicitud de autorización.

Los estudios, incluidos los realizados y publicados con anterioridad o procedentes de revisiones *inter pares*, se efectuarán y documentarán conforme a normas de calidad adecuadas (por ejemplo, buenas prácticas de laboratorio) según la Directiva 2004/10/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 11 de febrero de 2004, sobre la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas relativas a la aplicación de los principios de buenas prácticas de laboratorio y al control de su aplicación para las pruebas sobre las sustancias químicas ⁽¹⁾, o la Organización Internacional de Normalización (ISO).

Cuando se lleven a cabo estudios *in vivo* o *in vitro* fuera de la Comunidad, el solicitante deberá demostrar que las instalaciones de que se trate cumplen los principios de buenas prácticas de laboratorio de la Organización de Cooperación y Desarrollo Económicos (OCDE) o las normas ISO.

La determinación de las propiedades fisicoquímicas, toxicológicas y ecotoxicológicas deberá llevarse a cabo de acuerdo con los métodos establecidos en la Directiva 67/548/CEE del Consejo, de 27 de junio de 1967, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, embalaje y etiquetado de las sustancias peligrosas ⁽²⁾, modificada en último lugar por la Directiva 2004/73/CE de la Comisión ⁽³⁾, o con métodos actualizados reconocidos por organismos científicos internacionales. El uso de métodos distintos de los mencionados deberá justificarse debidamente.

Deberá fomentarse el uso de métodos *in vitro* o de métodos que afinen o reemplacen las pruebas habituales con animales de laboratorio, o que reduzcan el número de animales empleados en estas pruebas. Tales métodos deberán ser de la misma calidad y ofrecer el mismo nivel de garantía que el método que pretendan reemplazar.

⁽¹⁾ DO L 50 de 20.2.2004, p. 44.

⁽²⁾ DO L 196 de 16.8.1967, p. 1. Directiva modificada en último lugar por la Directiva 2006/121/CE del Parlamento Europeo y del Consejo (DO L 396 de 30.12.2006, p. 853). Versión corregida en el DO L 136 de 29.5.2007, p. 281.

⁽³⁾ DO L 152 de 30.4.2004, p. 1. Versión corregida en el DO L 216 de 16.6.2004, p. 3.

La descripción de los métodos de análisis en piensos o en agua deberá ser conforme con las normas de buenas prácticas de laboratorio que se establecen en la Directiva 2004/10/CE o en la norma EN ISO/IEC 17025. Estos métodos deberán cumplir los requisitos establecidos en el artículo 11 del Reglamento (CE) n° 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, sobre los controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales ⁽⁴⁾.

Cada expediente contendrá un resumen público y un resumen científico pormenorizado, de modo que el aditivo en cuestión pueda identificarse y caracterizarse.

Cada expediente deberá contener una propuesta de seguimiento consecutivo a la comercialización cuando así lo exija el artículo 7, apartado 3, letra g), del Reglamento (CE) n° 1831/2003, así como una propuesta de etiquetado según su artículo 7, apartado 3, letra e).

Evaluación de la inocuidad

Se basa en estudios dirigidos a demostrar que el uso del aditivo es seguro para:

- a) las especies destinatarias, a los niveles máximos propuestos de incorporación en el pienso o en el agua y a un múltiplo del nivel correspondiente para establecer un margen de seguridad;
- b) los consumidores que ingieren productos alimenticios obtenidos de animales que han recibido el aditivo, sus residuos o sus metabolitos; en este caso, la inocuidad se garantizará fijando límites máximos de residuos (LMR) y tiempos de espera basados en una ingesta diaria admisible (IDA) o un nivel superior de ingesta tolerable (NS);
- c) las personas que pueden verse expuestas al aditivo por inhalación o por contacto con las mucosas, los ojos o la piel mientras lo manipulan o lo incorporan a premezclas, piensos completos o agua, o mientras utilizan piensos o agua que contienen el aditivo en cuestión;
- d) los animales y las personas, en lo que se refiere a la selección y propagación de genes resistentes a los antimicrobianos, y
- e) el medio ambiente, en relación con los efectos del propio aditivo o de los productos de él derivados, bien directamente, bien como excreciones de los animales.

Si el aditivo tiene varios componentes, podrá evaluarse cada uno por separado en lo que respecta a la inocuidad para los consumidores y, a continuación, examinar el efecto acumulativo (cuando pueda demostrarse que no hay interacciones entre los componentes). La alternativa será evaluar la mezcla completa.

Evaluación de la eficacia

Se basa en estudios encaminados a demostrar la eficacia de un aditivo según los objetivos de su uso previsto, de acuerdo con las definiciones del artículo 6, apartado 1, del Reglamento (CE) n° 1831/2003.

1. SECCIÓN I: RESUMEN DEL EXPEDIENTE

1.1. Resumen público de acuerdo con el artículo 7, apartado 3, letra h), del Reglamento (CE) n° 1831/2003

El solicitante deberá presentar un resumen en el que indique las características principales del aditivo de que se trate. Este resumen no contendrá información confidencial y se estructurará como sigue:

1.1.1. Contenido

- a) nombre del solicitante o solicitantes;
- b) identificación del aditivo;
- c) método de producción y método de análisis;
- d) estudios sobre la inocuidad y la eficacia del aditivo;
- e) condiciones de utilización propuestas, y
- f) propuesta de seguimiento consecutivo a la comercialización.

⁽⁴⁾ DO L 165 de 30.4.2004. Versión corregida en el DO L 191 de 28.5.2004, p. 1.

1.1.2. Descripción

a) Nombre y dirección del solicitante o solicitantes

Esta información deberá proporcionarse en todos los casos, independientemente del tipo de autorización (específica del titular o no específica del titular). Cuando el expediente sea presentado por un grupo de solicitantes, deberá indicarse el nombre de cada uno de ellos.

b) Identificación del aditivo

Incluirá un resumen de la información exigida conforme a los anexos II o III, en función del tipo de autorización. En particular: el nombre del aditivo, la clasificación por categoría y grupo funcional propuesta, las especies o categorías de animales destinatarias y las dosis.

c) Método de producción y método de análisis

Se describirá el proceso de fabricación.

Asimismo, deberán describirse los procedimientos generales de los métodos analíticos que deben emplearse para el análisis con fines de control oficial del aditivo como tal y del aditivo en premezclas y en piensos, según se exige en el presente anexo y en el anexo III. Si procede, sobre la base de la información presentada de acuerdo con el presente anexo y el anexo III, deberá incluirse el procedimiento del método o métodos que deben aplicarse para el análisis con fines de control oficial de los aditivos o sus metabolitos en alimentos de origen animal.

d) Estudios sobre la inocuidad y la eficacia de aditivo

Se presentará la conclusión relativa a la inocuidad y la eficacia del aditivo basada en los diversos estudios realizados. Los resultados de los estudios podrán incluirse en cuadros para fundamentar la conclusión del solicitante o solicitantes. En el resumen solo se indicarán los estudios exigidos conforme al anexo III.

e) Condiciones de utilización propuestas

El solicitante o solicitantes deberán proponer unas condiciones de utilización. En particular, el solicitante deberá describir el nivel de uso en el agua o los piensos, junto con las condiciones detalladas de utilización en piensos complementarios. También deberá aportarse información cuando se empleen otros métodos de administración o de incorporación en el agua o los piensos. Asimismo, deberán describirse las condiciones específicas de utilización (por ejemplo, incompatibilidades), los requisitos específicos de etiquetado y las especies animales a las que esté destinado el aditivo.

f) Propuesta de seguimiento consecutivo a la comercialización

Esta parte solo se referirá a los aditivos que, de acuerdo con el artículo 7, apartado 3, letra g), del Reglamento (CE) nº 1831/2003, no pertenezcan a las categorías de las letras a) y b) de su artículo 6, apartado 1, y a los aditivos que entren en el ámbito de aplicación de la legislación comunitaria sobre la comercialización de productos que contienen, se componen o han sido producidos a partir de OMG.

1.2. Resumen científico del expediente

Se presentará un resumen científico que incluya datos concretos de cada parte de la documentación aportada en apoyo de la solicitud, conforme al presente anexo y al anexo III. Dicho resumen contendrá las conclusiones del solicitante o solicitantes.

El resumen seguirá el orden establecido en el presente anexo y abordará cada una de las partes haciendo referencia a las páginas correspondientes del expediente.

1.3. Lista de documentos y otros particulares

El solicitante deberá indicar el número de volúmenes de documentación presentados en apoyo de la solicitud, así como sus títulos, y añadirá un índice detallado que remita a los volúmenes y a las páginas.

1.4. **Lista de las partes del expediente para las que se haya solicitado un trato confidencial, en su caso**

La lista remitirá a los volúmenes y a las páginas correspondientes del expediente.

2. **SECCIÓN II: IDENTIDAD, CARACTERÍSTICAS Y CONDICIONES DE UTILIZACIÓN DEL ADITIVO; MÉTODOS DE ANÁLISIS**

El aditivo deberá estar plenamente identificado y caracterizado.

2.1. **Identidad del aditivo**

2.1.1. *Nombre del aditivo*

Si procede, deberá hacerse una propuesta de nombre comercial para los aditivos vinculados a un titular de la autorización.

2.1.2. *Propuesta de clasificación*

Deberá proponerse la clasificación del aditivo en una o varias de las categorías y grupos funcionales atendiendo a sus principales funciones según el artículo 6 y el anexo I del Reglamento (CE) n° 1831/2003.

Asimismo, deberá proporcionarse todo dato extraído de otros usos conocidos de sustancias o agentes activos idénticos (por ejemplo en alimentos, en medicina humana o veterinaria, en agricultura y en industria). Deberá especificarse también cualquier otra autorización de la sustancia activa como aditivo para piensos, aditivo alimentario, medicamento veterinario u otros usos.

2.1.3. *Composición cualitativa y cuantitativa (sustancia o agente activos, otros componentes, impurezas, variación entre lotes)*

Se enumerarán las sustancias o agentes activos y todos los demás componentes del aditivo, indicando el porcentaje en peso en el producto final, y se determinarán las variaciones cualitativas y cuantitativas de las sustancias o agentes activos de un lote a otro.

En el caso de los microorganismos se determinará el número de células o esporas viables, expresado como UFC por gramo.

En el caso de las enzimas se describirá cada actividad (principal) declarada y se indicará el número de unidades de cada actividad en el producto final. Asimismo, se mencionarán las actividades secundarias pertinentes. Deberán definirse las unidades de actividad, preferiblemente en μ moles de producto liberado por minuto del sustrato, indicando también el pH y la temperatura.

Si el componente activo del aditivo es una mezcla de sustancias o agentes activos claramente definibles (cualitativa y cuantitativamente), deberán describirse por separado, indicando sus respectivas proporciones en la mezcla.

Otras mezclas cuyos elementos no puedan describirse mediante una fórmula química única, o no puedan identificarse en su totalidad, vendrán caracterizadas por los elementos que contribuyan a su actividad o por sus principales elementos típicos.

Sin que ello sea óbice para cualquier petición de información suplementaria que formule la Autoridad conforme al artículo 8, apartado 2, del Reglamento (CE) n° 1831/2003, el solicitante podrá omitir la descripción de otros componentes que no planteen problemas de inocuidad y no sean sustancias o agentes activos para aditivos no incluidos en las categorías de aditivos zootécnicos, coccidiostatos e histomonostatos ni en el ámbito de aplicación del Reglamento (CE) n° 1829/2003. En cualquier caso, todos los estudios mencionados en el expediente deberán basarse en el aditivo concreto cuya autorización se solicite y podrán facilitar información sobre los demás preparados que puedan elaborarse. Podrán permitirse identificadores internos fijados en documentos de terceros, y se exigirá una declaración en la que se enumeren los identificadores y se confirme que se refieren a las formulaciones para las que se hace la solicitud.

2.1.4. Pureza

El solicitante deberá identificar y cuantificar las impurezas químicas y microbianas, así como las sustancias con efectos tóxicos u otras propiedades no deseables que no se añadan de forma deliberada ni contribuyan a la actividad del aditivo. Además, en el caso de productos de fermentación, el solicitante deberá confirmar la ausencia de organismos productores en el aditivo. Deberá describirse el protocolo de examen selectivo habitual de los lotes de producción aplicado para detectar la presencia de agentes contaminantes e impurezas.

Todos los datos aportados habrán de apoyar la propuesta de especificación del aditivo.

A continuación se exponen los requisitos específicos en función del proceso de producción, con arreglo a la legislación comunitaria vigente.

2.1.4.1. Aditivos cuya autorización está vinculada al titular de la autorización

En este caso, deberá proporcionarse la información pertinente relacionada con el proceso concreto empleado por el fabricante, sobre la base de normas vigentes aplicadas para otros fines relacionados. Podrán emplearse las especificaciones del Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) o las especificaciones extraídas de las autorizaciones de aditivos alimentarios de la Comunidad Europea.

2.1.4.2. Aditivos cuya autorización no está vinculada al titular de la autorización

En este caso podrán utilizarse normas vigentes aplicadas para otros fines relacionados o que contengan especificaciones para aditivos alimentarios autorizados en la Comunidad Europea, o especificaciones del JECFA. Si no se dispone de tales normas, o cuando sea pertinente para el proceso de fabricación, deberán describirse al menos los siguientes particulares y determinarse las correspondientes concentraciones:

- en el caso de los microorganismos: contaminación microbiológica, micotoxinas y metales pesados,
- en el caso de productos de la fermentación (que no contengan microorganismos como agentes activos): deberán cumplir los mismos requisitos que los productos de microorganismos (véase más arriba); también se indicará en qué medida el medio de cultivo utilizado se ha incorporado al producto final,
- en el caso de sustancias derivadas de plantas: contaminación microbiológica y botánica (por ejemplo, ricino, semillas de malas hierbas y, en particular, cornezuelo del centeno), micotoxinas, contaminación por plaguicidas, valores máximos de disolventes y, si procede, sustancias de interés toxicológico cuya presencia en la planta original es conocida,
- en el caso de sustancias derivadas de animales: contaminación microbiológica, metales pesados y valores máximos de disolventes, si procede,
- en el caso de sustancias minerales: metales pesados, dioxinas y PCB,
- en el caso de productos obtenidos por síntesis y procesos químicos: deberán identificarse todas las sustancias químicas empleadas en los procesos de síntesis y cualquier producto intermedio que permanezca en el producto final, indicando sus correspondientes concentraciones.

La selección de micotoxinas para análisis se efectuará de acuerdo con las diferentes matrices, cuando proceda.

2.1.5. Estado físico de cada forma del producto

Cuando se trate de preparados sólidos, deberán aportarse datos sobre distribución granulométrica, forma de las partículas, densidad, densidad aparente, capacidad de polvorización y aplicación de procesos que afecten a las propiedades físicas. Tratándose de preparados líquidos, se facilitarán datos de viscosidad y tensión superficial. Cuando el aditivo esté pensado para utilizarse en agua, deberá demostrarse la solubilidad o el grado de dispersión.

2.2. Caracterización de las sustancias o agentes activos**2.2.1. Descripción**

Deberá hacerse una descripción cualitativa de la sustancia o el agente activos en la que se indiquen su pureza y origen, así como cualquier otra característica relevante.

2.2.1.1. Sustancias químicas

Las sustancias químicamente bien definidas se describirán mediante su denominación genérica, su denominación química conforme a la nomenclatura de la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada), otras denominaciones y abreviaturas genéricas internacionales o su número del Servicio de Resúmenes Químicos (número CAS). Deberán incluirse las fórmulas estructural y molecular, así como el peso molecular.

En el caso de los compuestos químicamente definidos utilizados como aromatizantes, deberá indicarse el número FLAVIS en relación con el grupo químico pertinente. Con respecto a los extractos de plantas, se facilitarán los marcadores fitoquímicos.

Las mezclas cuyos elementos no puedan describirse mediante una fórmula química única o no puedan identificarse en su totalidad, vendrán caracterizadas por los elementos que contribuyan a su actividad o por sus principales elementos típicos. Se identificarán los compuestos marcadores para poder evaluar la estabilidad y proporcionar un medio de trazabilidad.

En el caso de las enzimas y los preparados de enzimas se indicará, en relación con cada actividad declarada, el número y la denominación sistemática propuestos por la Unión Internacional de Bioquímica (IUB) en la última edición de la «Nomenclatura de Enzimas». En cuanto a las actividades aún no incluidas, se utilizará una denominación sistemática coherente con las normas de nomenclatura de la IUB. Podrán emplearse denominaciones corrientes siempre y cuando sean inequívocas y se utilicen de manera coherente en todo el expediente, y a condición de que puedan relacionarse claramente con la denominación sistemática y el número IUB la primera vez que se mencionen. Deberá indicarse el origen biológico de cada actividad enzimática.

También deberá describirse el origen microbiano de las sustancias químicas producidas por fermentación (véase el punto 2.2.1.2, «Microorganismos»).

2.2.1.2. Microorganismos

Deberá señalarse el origen de todo microorganismo, ya se utilice como producto o como cepa de producción.

Con respecto a los microorganismos empleados como producto o como cepa de producción, deberá indicarse, en su caso, el historial de modificación. Asimismo, deberán proporcionarse la denominación y el taxón de cada microorganismo, de acuerdo con la última información publicada en los Códigos Internacionales de Nomenclatura. Las cepas microbianas deberán depositarse en un banco de cultivos que goce de reconocimiento internacional (situado preferiblemente en la Unión Europea) y guardarse allí mientras esté autorizado el aditivo. Deberá facilitarse un certificado de depósito expedido por dicho banco, en el que se especificará el número de acceso con el que se guarda la cepa. Se describirán, además, todas las características morfológicas, fisiológicas y moleculares pertinentes que sean necesarias para proporcionar la identificación única de la cepa y los medios para confirmar su estabilidad genética. En el caso de los OMG, se describirá la modificación genética y se indicará en cada caso el identificador único según el Reglamento (CE) n° 65/2004, por el que se establece un sistema de creación y asignación de identificadores únicos a los organismos modificados genéticamente.

2.2.2. *Propiedades pertinentes*

2.2.2.1. Sustancias químicas

Deberán describirse las propiedades físicas y químicas. Se indicarán, cuando proceda, la constante de disociación, el pKa, las propiedades electrostáticas, el punto de fusión, el punto de ebullición, la densidad, la presión de vapor, la solubilidad en agua y en disolventes orgánicos, los valores K_{ow} y K_d/K_{oc} , los espectros de masa y de absorción, los datos de la resonancia magnética nuclear, los posibles isómeros y cualquier otra propiedad física pertinente.

Las sustancias producidas por fermentación no presentarán ninguna actividad antimicrobiana que afecte al uso de antibióticos en los seres humanos o los animales.

2.2.2.2. Microorganismos

— Toxinas y factores de virulencia

Deberá demostrarse la ausencia de toxinas o factores de virulencia, o su insignificancia. Las cepas bacterianas pertenecientes a un grupo taxonómico en el que haya miembros de los que se sepa que pueden producir toxinas u otros factores de virulencia deberán someterse a las pruebas adecuadas para demostrar, desde el punto de vista molecular y, si es necesario, celular, que no hay ningún motivo de preocupación.

En el caso de cepas de microorganismos que no cuenten con un historial de uso aparentemente seguro y cuya biología siga conociéndose mal, se requerirá todo un conjunto de estudios toxicológicos.

— Producción de antibióticos y resistencia a los antibióticos

Los microorganismos utilizados como aditivos o como cepa de producción no presentarán ninguna actividad antibiótica ni serán capaces de producir sustancias antibióticas que se utilicen como antibióticos en los humanos o los animales.

Las cepas de microorganismos que vayan a emplearse como aditivos no contribuirán a la reserva de genes de resistencia a los antibióticos ya presente en la flora intestinal de los animales y en el medio ambiente. Por consiguiente, todas las cepas bacterianas deberán someterse a pruebas para detectar la resistencia a antibióticos utilizados en medicina humana y veterinaria. Cuando se detecte dicha resistencia, deberán establecerse su base genética y la probabilidad de que se transfiera a otros organismos habitantes del intestino.

No se utilizarán como aditivos para piensos las cepas de microorganismos que hayan adquirido resistencia a uno o varios antimicrobianos, salvo que pueda demostrarse que dicha resistencia es el resultado de una o varias mutaciones cromosómicas y que es intransferible.

2.3. **Proceso de fabricación, incluidos los posibles procedimientos de transformación**

Para definir los puntos críticos del proceso que pueden influir en la pureza de las sustancias o agentes activos o del aditivo, deberá describirse el proceso de fabricación. Deberá facilitarse una ficha de datos de seguridad de las sustancias químicas empleadas en el proceso de producción.

2.3.1. *Sustancias o agentes activos*

Deberá describirse el proceso de producción (por ejemplo, síntesis química, fermentación, cultivo, extracción de material orgánico o destilación) seguido en la preparación de las sustancias o agentes activos del aditivo, si procede mediante un diagrama de flujo. Se indicará la composición del medio de fermentación o cultivo y se describirán al detalle los métodos de purificación.

En el caso de microorganismos modificados genéticamente (MMG) empleados como fuente de aditivos y cultivados en condiciones controladas, será de aplicación la Directiva 90/219/CE del Consejo ⁽⁵⁾. Se incluirá una descripción de los procesos de fermentación (medio de cultivo, condición de fermentación y transformación ulterior de los productos de la fermentación).

2.3.2. *Aditivo*

Se presentará una descripción detallada del proceso de fabricación del aditivo. Deberán indicarse, si procede mediante un diagrama de flujo, las principales fases de preparación del aditivo, en particular los puntos en que se introducen las sustancias o agentes activos y otros componentes, así como cualquier otra etapa de transformación posterior que afecte a la preparación del aditivo.

2.4. **Propiedades fisicoquímicas y tecnológicas del aditivo**

2.4.1. *Estabilidad*

La estabilidad suele medirse efectuando un seguimiento analítico de las sustancias o agentes activos o de su actividad o viabilidad. La estabilidad puede definirse, en el caso de las enzimas, en función de la pérdida de actividad catalítica; en el caso de los microorganismos, en función de la pérdida de viabilidad; y, en el caso de los aromatizantes, en función de la pérdida de aroma. Tratándose de otras mezclas y extractos químicos, la estabilidad puede evaluarse haciendo un seguimiento de la concentración de una o varias sustancias marcadoras apropiadas.

Estabilidad del aditivo

Se estudiará la estabilidad de cada formulación del aditivo al exponerla a diferentes condiciones ambientales (luz, temperatura, pH, humedad, oxígeno y material de envasado). La vida útil prevista para el aditivo, tal como se comercialice, deberá basarse, como mínimo, en dos situaciones tipo que abarquen toda la gama de posibles condiciones de utilización (por ejemplo, 25 °C y una humedad relativa del aire del 60 %, y 40 °C y una humedad relativa del aire del 75 %).

⁽⁵⁾ DO L 117 de 8.5.1990, p. 1. Directiva modificada en último lugar por la Decisión 2005/174/CE de la Comisión (DO L 59 de 5.3.2005, p. 20).

Estabilidad del aditivo utilizado en premezclas y piensos

En el caso de aditivos utilizados en premezclas y piensos, con excepción de los compuestos aromatizantes, deberá estudiarse la estabilidad de cada formulación del aditivo en las condiciones normales de fabricación y almacenamiento de las premezclas y los piensos. Los estudios de estabilidad en premezclas se realizarán a lo largo de, como mínimo, seis meses. Preferiblemente, la estabilidad se pondrá a prueba con premezclas que contengan oligoelementos; de lo contrario, en la etiqueta del aditivo debería figurar el texto «no mezclar con oligoelementos».

Los estudios de estabilidad en piensos deberán extenderse, por lo general, durante un mínimo de tres meses. En general, la estabilidad se comprobará en piensos en harina y en gránulos (teniendo en cuenta también la influencia del granulado u otras formas de tratamiento) destinados a las principales especies animales a las que se refiera la solicitud.

En el caso de aditivos destinados a ser utilizados en agua, la estabilidad de cada formulación del aditivo habrá de estudiarse en agua y en condiciones que simulen el uso en la práctica.

Si se produce una pérdida de estabilidad, y si procede, se caracterizarán los productos potenciales de la degradación o la descomposición.

Deberán aportarse datos procedentes de análisis que incluyan, como mínimo, una observación al principio y otra al final del período de almacenamiento.

Cuando sea necesario, los estudios reflejarán la composición cuantitativa y cualitativa detallada de las premezclas o los piensos utilizados en los ensayos.

2.4.2. *Homogeneidad*

Deberá demostrarse la capacidad del aditivo para piensos (distinto de compuestos aromatizantes) de distribuirse homogéneamente en premezclas, piensos o agua.

2.4.3. *Otras características*

Se describirán también otras características, como son la capacidad de polvorización, las propiedades electrostáticas o la dispersabilidad en líquidos.

2.4.4. *Incompatibilidades o interacciones fisicoquímicas*

Deberán mostrarse las incompatibilidades o interacciones fisicoquímicas que quepa esperar con piensos, soportes, otros aditivos autorizados o medicamentos.

2.5. **Condiciones de utilización del aditivo**

2.5.1. *Modo de empleo propuesto en la alimentación animal*

Las especies o categorías de animales, el grupo de edad o la fase de producción de los animales se indicarán de acuerdo con las categorías enumeradas en el anexo IV del presente Reglamento. Deberán mencionarse las posibles contraindicaciones. Deberá asimismo definirse el uso propuesto, en piensos o en agua.

Para las premezclas, los piensos o el agua de abrevadero deberá detallarse el método de administración y el nivel de inclusión propuestos. Además, deberán especificarse, cuando proceda, la dosis en el pienso completo, la duración de la administración y el tiempo de espera propuestos. Cuando se proponga el uso particular de un aditivo en piensos complementarios, tendrá que presentarse una justificación.

2.5.2. *Información relativa a la seguridad de los usuarios y los trabajadores*

2.5.2.1. Sustancias químicas

Deberá aportarse una ficha de datos de seguridad de los materiales cuyo formato se ajuste a los requisitos de la Directiva 91/155/CEE de la Comisión, de 5 de marzo de 1991, por la que se definen y fijan, en aplicación del artículo 10 de la Directiva 88/379/CEE del Consejo, las modalidades del sistema de información específica, relativo a los preparados peligrosos ⁽⁶⁾. Si es necesario, deberán proponerse medidas de prevención de los riesgos laborales y medios de protección durante la fabricación, manipulación, utilización y eliminación.

⁽⁶⁾ DO L 76 de 22.3.1991, p. 35. Directiva modificada en último lugar por la Directiva 2001/58/CE (DO L 212 de 7.8.2001, p. 24).

2.5.2.2. Microorganismos

Deberá presentarse una clasificación conforme a la Directiva 2000/54/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de septiembre de 2000, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo (Séptima Directiva específica con arreglo al apartado 1 del artículo 16 de la Directiva 89/391/CEE) ⁽⁷⁾. Cuando se trate de microorganismos no clasificados en el grupo 1 de la Directiva citada, deberá informarse a los clientes de manera que puedan tomar las medidas de protección pertinentes para sus trabajadores, según el artículo 3, apartado 2, de dicha Directiva.

2.5.2.3. Requisitos de etiquetado

Sin perjuicio de las disposiciones de etiquetado y envasado establecidas en el artículo 16 del Reglamento (CE) n° 1831/2003, deberán indicarse todo requisito específico de etiquetado y, cuando proceda, toda condición específica de utilización y manipulación (en especial las incompatibilidades y contraindicaciones conocidas), así como las instrucciones para un empleo correcto.

2.6. Métodos de análisis y muestras de referencia

Los métodos de análisis se presentarán en el formato estándar recomendado por la ISO (a saber, la norma ISO 78-2).

Según los Reglamentos (CE) n° 1831/2003 y (CE) n° 378/2005, los métodos de análisis incluidos en esta sección deberán ser evaluados por el laboratorio comunitario de referencia. El laboratorio comunitario de referencia presentará a la Autoridad un informe de evaluación en el que indicará si estos métodos son adecuados para realizar los controles oficiales del aditivo para piensos objeto de la solicitud. Dicha evaluación se centrará en los métodos especificados en los puntos 2.6.1 y 2.6.2.

Si para la sustancia objeto de la solicitud se ha establecido un límite máximo de residuos en el Reglamento (CEE) n° 2377/90 del Consejo, de 26 de junio de 1990, por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal ⁽⁸⁾, la evaluación del laboratorio comunitario de referencia no atenderá al punto 2.6.2. El solicitante deberá cumplir lo dispuesto en el punto 2.6.2 ofreciendo el mismo método, la misma información y los mismos datos (incluidas las actualizaciones pertinentes) que han de presentarse a la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) de conformidad con el anexo V del Reglamento (CEE) n° 2377/1990 y de acuerdo con el documento «Notice to Applicants and Guidelines» (Nota a los solicitantes y directrices), volumen 8 de la serie «Rules governing medicinal products in the European Union» (Normas aplicables a los medicamentos en la Unión Europea).

En la evaluación podrán incluirse también los métodos analíticos descritos en el punto 2.6.3, si el laboratorio comunitario de referencia, la Autoridad o la Comisión lo consideran necesario.

De conformidad con el Reglamento (CE) n° 378/2005, el solicitante deberá proporcionar muestras de referencia directamente al laboratorio comunitario de referencia antes de que se evalúe el expediente técnico, y muestras de recambio antes de la fecha de caducidad.

Los solicitantes deberán remitirse a las directrices detalladas proporcionadas por el laboratorio comunitario de referencia de acuerdo con el artículo 12 del Reglamento (CE) n° 378/2005.

2.6.1. Métodos de análisis de la sustancia activa

Deberán describirse al detalle los métodos analíticos cualitativos y, en su caso, cuantitativos para determinar si se respetan los niveles máximos o mínimos de sustancias o agentes activos propuestos para el aditivo, las premezclas, los piensos y, si procede, el agua.

2.6.1.1. Estos métodos cumplirán los mismos requisitos que se establecen en el artículo 11 del Reglamento (CE) n° 882/2004 para los métodos de análisis empleados con fines de control oficial. En particular, satisfarán al menos uno de los siguientes requisitos:

- cumplirán las normas comunitarias pertinentes (por ejemplo, métodos comunitarios de análisis), cuando existan,
- cumplirán normas o protocolos reconocidos internacionalmente, por ejemplo los que haya aceptado el Comité Europeo de Normalización (CEN), o los acordados en la legislación internacional (por ejemplo, los métodos estándar del CEN),

⁽⁷⁾ DO L 262 de 17.10.2000, p. 21.

⁽⁸⁾ DO L 224 de 18.8.1990, p. 1. Reglamento modificado en último lugar por el Reglamento (CE) n° 203/2008 de la Comisión (DO L 60 de 5.3.2008, p. 18).

- se ajustarán al fin previsto y se habrán desarrollado de acuerdo con protocolos científicos y validado en una prueba interlaboratorios conforme a un protocolo sobre ensayos colaborativos reconocido internacionalmente (por ejemplo, ISO 5725 o IUPAC), o
- habrán sido objeto de una validación interna con respecto a los parámetros característicos mencionados en el punto 2.6.1.2, conforme a directrices internacionales armonizadas para la validación interna de métodos de análisis ⁽⁹⁾.

2.6.1.2. En la caracterización pormenorizada de los métodos se incluirán las características pertinentes expuestas en el anexo III del Reglamento (CE) n° 882/2004.

2.6.1.3. Las características de funcionamiento de los métodos objeto de una validación interna deberán verificarse sometiéndolos a ensayo en un segundo laboratorio acreditado e independiente. Deberán aportarse los resultados de esas pruebas, junto con cualquier otra información en apoyo de la transferibilidad del método a un laboratorio de control oficial. Por razones de independencia y de participación en la evaluación de la documentación proporcionada por el solicitante, cuando el segundo laboratorio forme parte del consorcio de laboratorios nacionales de referencia que ayudan al laboratorio comunitario de referencia, según se establece en el Reglamento (CE) n° 378/2005, enviará a dicho laboratorio comunitario, tan pronto como este reciba la solicitud, una declaración de intereses en la que describa el trabajo que realiza en relación con la solicitud, y se abstendrá de participar en la evaluación de la misma.

2.6.1.4. En su informe de evaluación a la Autoridad, el laboratorio comunitario de referencia podrá escoger las características apropiadas mencionadas en el anexo III del Reglamento (CE) n° 882/2004.

2.6.1.5. En las directrices detalladas proporcionadas por el laboratorio comunitario de referencia de acuerdo con el artículo 12 del Reglamento (CE) n° 378/2005 podrán establecerse criterios de funcionamiento para los métodos aplicables a grupos de sustancias específicos (por ejemplo, enzimas).

2.6.2. *Métodos de análisis para determinar los residuos del aditivo o de sus metabolitos en los alimentos*

Deberá presentarse una caracterización detallada de los métodos analíticos cualitativos y cuantitativos para la determinación de los residuos o los metabolitos marcadores del aditivo en tejidos y productos animales diana.

2.6.2.1. Estos métodos cumplirán los mismos requisitos que se establecen en el artículo 11 del Reglamento (CE) n° 882/2004 con respecto a los métodos de análisis empleados con fines de control oficial. En particular, satisfarán al menos uno de los requisitos mencionados en el punto 2.6.1.1.

2.6.2.2. En la caracterización pormenorizada de los métodos se incluirán las características pertinentes expuestas en el anexo III del Reglamento (CE) n° 882/2004 y se tendrán en cuenta los requisitos de la Decisión 2002/657/CE de la Comisión ⁽¹⁰⁾. Se tomarán en consideración, cuando proceda, los mismos criterios de funcionamiento que se prescriban en decisiones de la Comisión en las que se establezcan métodos analíticos para la detección de determinadas sustancias y sus residuos en animales vivos, de acuerdo con la Directiva 96/23/CE.

El límite de cuantificación aplicable a cada método no deberá ser superior a la mitad del LMR correspondiente, y deberá validarse en una gama que vaya, como mínimo, de la mitad a dos veces el LMR.

2.6.2.3. Las características de funcionamiento de los métodos objeto de una validación interna deberán verificarse sometiéndolos a ensayo en un segundo laboratorio acreditado e independiente. Deberán aportarse los resultados de esas pruebas. Por razones de independencia y de participación en la evaluación de la documentación proporcionada por el solicitante, cuando el otro laboratorio forme parte del consorcio de laboratorios nacionales de referencia que ayudan al laboratorio comunitario de referencia, según se establece en el Reglamento (CE) n° 378/2005, enviará a dicho laboratorio comunitario, tan pronto como este reciba la solicitud, una declaración de intereses en la que describa el trabajo que realiza en relación con la solicitud, y se abstendrá de participar en la evaluación de la misma.

2.6.2.4. En su informe de evaluación a la Autoridad, el laboratorio comunitario de referencia podrá escoger las características apropiadas entre las mencionadas en el punto 2.6.2.2.

⁽⁹⁾ M. Thompson et al.: «Harmonized Guidelines For Single Laboratory Validation Of Methods Of Analysis (IUPAC Technical Report) (Directrices armonizadas para la validación de métodos de análisis en un único laboratorio [Informe técnico de la IUPAC])», *Pure Appl. Chem.*, vol. 74, n° 5, pp. 835-855, 2002.

⁽¹⁰⁾ DO L 221 de 17.8.2002, p. 8. Decisión modificada en último lugar por la Decisión 2004/25/CE (DO L 6 de 10.1.2004, p. 38).

- 2.6.2.5. En las directrices detalladas proporcionadas por el laboratorio comunitario de referencia de acuerdo con el artículo 12 del Reglamento (CE) n° 378/2005 podrán establecerse criterios de funcionamiento para los métodos aplicables a grupos de sustancias específicos (por ejemplo, enzimas).

2.6.3. *Métodos de análisis en relación con la identidad y la caracterización del aditivo*

El solicitante deberá proporcionar una descripción de los métodos aplicados para determinar las características enumeradas en los puntos 2.1.3, 2.1.4, 2.1.5, 2.2.2, 2.4.1, 2.4.2, 2.4.3 y 2.4.4.

De acuerdo con el anexo II del Reglamento (CE) n° 1831/2003, modificado por el Reglamento (CE) n° 378/2005, los métodos presentados conforme a esta sección podrán ser también objeto de evaluación si la Autoridad o la Comisión lo consideran oportuno para evaluar la solicitud.

Se recomienda que los métodos descritos conforme a esta sección gocen de reconocimiento internacional. De lo contrario, deberán describirse por completo. En esos casos, los estudios deberán ser realizados por laboratorios acreditados e independientes y documentarse conforme a normas de calidad adecuadas (por ejemplo, buenas prácticas de laboratorio según la Directiva 2004/10/CE o normas ISO).

Los métodos para la identificación y caracterización del aditivo deberán cumplir los mismos requisitos que se establecen en el artículo 11 del Reglamento (CE) n° 882/2004 para los métodos de análisis empleados con fines de control oficial, en particular cuando se hayan establecido requisitos legales (relativos, por ejemplo, a impurezas o sustancias no deseables).

3. **SECCIÓN III: ESTUDIOS SOBRE LA INOCUIDAD DEL ADITIVO**

Los estudios incluidos en esta sección y en los anexos específicos tendrán como objetivo evaluar:

- la seguridad de utilización del aditivo en las especies destinatarias,
- los riesgos asociados a la selección o transferencia de resistencia a los antimicrobianos y al incremento de la persistencia y evacuación de enteropatógenos,
- los riesgos para los consumidores de alimentos derivados de animales a los que se han dado piensos que contienen o han sido tratados con el aditivo, o los que podría conllevar el consumo de alimentos que contengan residuos del aditivo o sus metabolitos,
- los riesgos que entrañan la inhalación y el contacto con las mucosas, los ojos o la piel para las personas que pueden manipular el aditivo como tal o una vez incorporado a premezclas o piensos, y
- los riesgos de efectos adversos en el medio ambiente, ya sea del propio aditivo, ya de los productos de él derivados, bien directamente, bien a través de las excreciones de animales.

3.1. **Estudios sobre la seguridad de utilización del aditivo para los animales a los que está destinado**

Los estudios incluidos en esta sección tendrán como finalidad evaluar:

- la seguridad de utilización del propio aditivo en las especies destinatarias, y
- cualquier riesgo asociado a la selección o transferencia de resistencia a los antimicrobianos y al incremento de la persistencia y evacuación de enteropatógenos.

3.1.1. *Estudios de tolerancia en las especies destinatarias*

El objetivo de la prueba de tolerancia es proporcionar una evaluación limitada de la toxicidad a corto plazo del aditivo para los animales destinatarios. Sirve asimismo para establecer un margen de seguridad, en caso de que se consuma el aditivo en dosis superiores a las recomendadas. Las pruebas de tolerancia deben realizarse para aportar pruebas de la inocuidad del aditivo para cada una de las especies o categorías de animales destinatarias en relación con las cuales se hace la solicitud. En algunos casos será aceptable incluir algunos elementos de la prueba de tolerancia en uno de los ensayos de eficacia, a condición de que se cumplan los requisitos que con respecto a estos se establecen más adelante. Todos los estudios a los que se haga referencia en esta sección deberán basarse en el aditivo descrito en la sección II.

3.1.1.1. En el diseño de una prueba de tolerancia se incluirán como mínimo tres grupos:

- un grupo sin suplementos,
- un grupo con la dosis máxima recomendada, y
- un grupo experimental con el nivel múltiplo de la dosis máxima recomendada.

En el grupo experimental, el aditivo se administrará, por lo general, en una dosis diez veces superior a la máxima recomendada. Los animales de ensayo se someterán regularmente a seguimiento para buscar pruebas visuales de efectos clínicos, comprobar las características de funcionamiento y, si procede, la calidad del producto, efectuar análisis hematológicos y los análisis bioquímicos habituales de la sangre, y examinar otros factores que puedan estar relacionados con las propiedades biológicas del aditivo. Deberán tenerse en cuenta los criterios críticos de valoración dados a conocer por los estudios toxicológicos realizados en animales de laboratorio. En esta sección se comunicará asimismo cualquier efecto adverso detectado durante los ensayos de eficacia. Las muertes por causa desconocida durante la prueba de tolerancia deberán investigarse mediante autopsia y, si procede, histología.

Si puede demostrarse que se tolera una dosis cien veces superior a la máxima recomendada, no serán necesarios análisis hematológicos ni los análisis bioquímicos habituales de la sangre. Si el producto solo se tolera a un nivel inferior a diez veces la dosis máxima recomendada, el estudio se diseñará de manera que pueda calcularse un margen de seguridad para el aditivo, y deberán proporcionarse criterios de valoración adicionales (autopsia, histología si procede, y otros criterios apropiados).

En el caso de algunos aditivos, dependiendo de su toxicología y su metabolismo o del uso que se haga de ellos, puede no ser necesario realizar pruebas de tolerancia.

En el diseño experimental utilizado deberá tenerse en cuenta una potencia estadística adecuada.

3.1.1.2. Duración de los ensayos de tolerancia

Cuadro 1

Duración de los ensayos de tolerancia: porcinos

Animales destinatarios	Duración de los estudios	Característica de los animales destinatarios
Lechones lactantes	14 días	Preferiblemente en los 14 días previos al destete
Lechones destetados	42 días	Durante 42 días tras el destete
Cerdos de engorde	42 días	Peso corporal al comienzo del estudio \leq 35 kg
Cerdas para reproducción	1 ciclo	Desde la inseminación hasta el final del período de destete

Si la solicitud se refiriera a lechones lactantes y destetados, se consideraría suficiente un estudio combinado (14 días con los lechones lactantes y 28 días con los destetados). Si se ha demostrado la tolerancia en los lechones destetados, no será necesario un estudio aparte con cerdos de engorde.

Cuadro 2

Duración de los ensayos de tolerancia: aves de corral

Animales destinatarios	Duración de los estudios	Característica de los animales destinatarios
Pollos de engorde/criados para puesta	35 días	Desde la incubación
Gallinas ponedoras	56 días	Preferiblemente durante el primer tercio del período de puesta
Pavos de engorde	42 días	Desde la incubación

Los datos sobre la tolerancia en pollos de engorde o pavos de engorde podrán utilizarse para demostrar la tolerancia, respectivamente, en pollos o pavos criados para puesta o reproducción.

Cuadro 3

Duración de los ensayos de tolerancia: bovinos

Animales destinatarios	Duración de los estudios	Característica de los animales destinatarios
Terneros de engorde	28 días	Peso corporal inicial \leq 70 kg
Terneros de cría; vacuno de engorde o de reproducción	42 días	
Vacas lecheras	56 días	

Si la solicitud se refiriera a terneros de cría y vacuno de engorde, se consideraría suficiente un estudio combinado (28 días cada período).

Cuadro 4

Duración de los ensayos de tolerancia: ovinos

Animales destinatarios	Duración de los estudios	Característica de los animales destinatarios
Corderos de cría o de reproducción	28 días	

Cuadro 5

Duración de los ensayos de tolerancia: salmónidos y otros peces

Animales destinatarios	Duración de los estudios	Característica de los animales destinatarios
Salmón y trucha	90 días	

En lugar de los 90 días de duración, podría realizarse un estudio en el que el pez aumentara su peso corporal inicial al comienzo del ensayo en un factor, como mínimo, de dos.

Si el aditivo está destinado a ser utilizado únicamente en animales de reproducción, las pruebas de tolerancia se efectuarán lo más próximas posible al desove. Las pruebas de tolerancia durarán 90 días, y deberá prestarse atención a la calidad y la supervivencia de los huevos.

Cuadro 6

Duración de los ensayos de tolerancia: mascotas y otros animales no productores de alimentos

Animales destinatarios	Duración de los estudios	Característica de los animales destinatarios
Perros y gatos	28 días	

Cuadro 7

Duración de los ensayos de tolerancia: conejos

Animales destinatarios	Duración de los estudios	Característica de los animales destinatarios
Conejos de engorde	28 días	
Conejas de reproducción	1 ciclo	Desde la inseminación hasta el final del período de destete

Si la solicitud se refiriera a conejos lactantes y destetados, se consideraría suficiente un período de 49 días (que comenzaría una semana después del nacimiento), en cuyo caso tendrían que incluirse las conejas hasta el destete.

Si el aditivo se aplica durante un período específico más breve que el señalado por la definición de la categoría de animales, se administrará conforme a las condiciones de utilización propuestas. Sin embargo, el período de observación no será inferior a 28 días e incluirá el criterio de valoración pertinente (por ejemplo, en el caso de las cerdas para reproducción, el número de lechones nacidos vivos, cuando se atienda al período de gestación, o el número y el peso de los lechones destetados, cuando se atienda al período de lactancia).

3.1.1.3. Condiciones experimentales

Se informará de cada uno de los estudios por separado, dando detalles de todos los grupos experimentales. El protocolo de ensayo se redactará cuidadosamente en lo que respecta a los datos descriptivos generales. En particular, se anotará lo siguiente:

- 1) hato o manada: ubicación y tamaño; condiciones de alimentación y de crianza y método de alimentación; en el caso de especies acuáticas, tamaño y cantidad de tanques o cisternas de la explotación, condiciones de iluminación y calidad del agua, en particular temperatura y salinidad;
- 2) animales: especie (las especies acuáticas destinadas al consumo humano se identificarán mediante su denominación coloquial seguida de su denominación latina, de dos términos, entre paréntesis), raza, edad (tamaño en el caso de especies acuáticas), sexo, procedimiento de identificación, fase fisiológica y estado general de salud;
- 3) fecha y duración exacta de las pruebas; fecha y naturaleza de los exámenes realizados;
- 4) dietas: descripción de la fabricación y la composición cuantitativa de las dietas en cuanto a ingredientes utilizados, nutrientes pertinentes (valores analizados) y energía; registros de ingesta de piensos;
- 5) concentración de las sustancias o agentes activos (y, en su caso, de las sustancias empleadas con fines de comparación) en los piensos, determinada mediante un análisis de control, utilizando los métodos reconocidos apropiados; números de referencia de los lotes;
- 6) número de grupos experimentales y de referencia; número de animales en cada grupo: el número de animales que participan en los ensayos deberá permitir el análisis estadístico; deben declararse los métodos de evaluación estadística aplicados; en el informe se incluirán todos los animales o unidades experimentales que participen en los ensayos; se informará de los casos que no puedan evaluarse debido a la falta o la pérdida de datos, así como de su distribución en los grupos de animales clasificados;
- 7) deberá informarse del momento en que el tratamiento haya tenido alguna consecuencia indeseable en individuos o grupos, y de la prevalencia de tales consecuencias (deberá detallarse el programa de observación aplicado en el estudio), y
- 8) los tratamientos terapéuticos o preventivos, si son necesarios, no deberán interactuar con el modo de acción propuesto del aditivo, y deberán registrarse cada uno por separado.

3.1.2. Estudios microbianos

Deberán aportarse estudios que permitan determinar la capacidad del aditivo para inducir resistencia cruzada a antibióticos empleados en medicina humana o veterinaria, seleccionar cepas bacterianas resistentes en condiciones de campo en las especies destinatarias, producir efectos en agentes patógenos oportunistas presentes en el aparato digestivo, o causar la evacuación o excreción de microorganismos zoonóticos.

Si las sustancias activas poseen actividad antimicrobiana al nivel de concentración en el aditivo, deberá determinarse la concentración mínima inhibitoria correspondiente a las especies bacterianas pertinentes, siguiendo procedimientos normalizados. Si se demuestra una actividad antimicrobiana significativa, deberá establecerse la capacidad del aditivo para seleccionar cepas bacterianas resistentes *in vitro* y en las especies destinatarias, y para inducir resistencia cruzada a los antibióticos pertinentes ⁽¹¹⁾.

Deberán haberse realizado pruebas al nivel de uso recomendado con todos los aditivos microbianos y en relación con aquellos aditivos en los que pueda anticiparse un efecto sobre la flora intestinal. Estos estudios deberán demostrar que el uso del aditivo no crea condiciones que den lugar a una proliferación y evacuación de microorganismos potencialmente patógenos.

La elección de los microorganismos que habrán de someterse a seguimiento dependerá de las especies destinatarias, pero, en cualquier caso, deberán incluirse las especies zoonóticas pertinentes, al margen de que produzcan o no síntomas en los animales destinatarios.

3.2. Estudios sobre la seguridad de utilización del aditivo para los consumidores

El objetivo es evaluar la inocuidad del aditivo para el consumidor y establecer la posible presencia de residuos del aditivo o de sus metabolitos en alimentos derivados de animales alimentados con piensos o agua que contienen o han sido tratados con el aditivo.

⁽¹¹⁾ Puede encontrarse una lista no exhaustiva en: www.efsa.europa.eu/en/science/feedap/feedap_opinion/993.html

3.2.1. Estudios metabólicos y de residuos

El establecimiento del destino metabólico del aditivo en las especies destinatarias es un paso decisivo en la identificación y cuantificación de los residuos presentes en los tejidos o productos comestibles derivados de animales alimentados con piensos o agua que contienen el aditivo. Deberán presentarse estudios relativos a la absorción, distribución, metabolismo y excreción de la sustancia (y sus metabolitos).

Los estudios deberán realizarse con métodos de ensayo validados a nivel internacional y de acuerdo con la legislación europea vigente o las directrices de la OCDE en cuanto a los detalles metodológicos, respetando los principios de las buenas prácticas de laboratorio. Los estudios se atenderán a las normas sobre bienestar animal establecidas en la legislación de la Comunidad Europea y no se repetirán sin necesidad.

Los estudios metabólicos y de residuos en los animales destinatarios se efectuarán con la sustancia activa incorporada en el pienso (que no se administrará de manera forzada, salvo que se justifique debidamente).

Deberá procederse a la identificación estructural de los metabolitos que constituyan más del 10 % de los residuos totales en los tejidos y productos comestibles y más del 20 % de los residuos totales en los excrementos. Si la vía metabólica de la sustancia activa genera inquietud desde el punto de vista toxicológico, deberán identificarse los metabolitos presentes por debajo de los límites que acaban de señalarse.

Los estudios cinéticos de los residuos constituirán la base para calcular la exposición de los consumidores y establecer un tiempo de espera y límites máximos de residuos, si es necesario. Deberá proponerse un residuo marcador.

En el caso de algunos aditivos, dependiendo de su naturaleza o del uso que se haga de ellos, puede no ser necesario realizar estudios metabólicos y de residuos.

3.2.1.1. Estudios metabólicos

La finalidad de los estudios metabólicos es evaluar la absorción, distribución, biotransformación y excreción del aditivo en las especies destinatarias.

Se requerirán los siguientes estudios:

- 1) equilibrio metabólico tras la administración de una dosis única de la sustancia activa a las dosis de uso propuestas (cantidad total correspondiente a la ingesta diaria) y, posiblemente, una dosis múltiple (si está justificado) para evaluar el índice y la extensión aproximados de absorción, distribución (plasma/sangre) y excreción (orina, bilis, heces, leche o huevos, aire exhalado y excreción a través de las branquias) en machos y hembras, si procede, y
- 2) deberán determinarse el perfil metabólico, los metabolitos presentes en las excreciones y los tejidos y la distribución en tejidos y productos tras administrar repetidamente a los animales una dosis del compuesto etiquetado hasta alcanzar el estado estable (equilibrio metabólico) identificado por niveles en plasma. La dosis corresponderá a la dosis máxima de uso propuesta e irá incorporada en el aditivo.

3.2.1.2. Estudios de residuos

Deberán tomarse en consideración la cantidad y la naturaleza de los residuos no extraíbles presentes en tejidos o productos comestibles.

Los estudios de residuos serán necesarios en relación con todas las sustancias para las que se requieran estudios metabólicos.

Si la sustancia es un elemento natural de los fluidos corporales o los tejidos, o está presente de forma natural y en cantidades significativas en los alimentos o los piensos, los estudios de residuos se limitarán a comparar los niveles en los tejidos y productos de un grupo no tratado con los de un grupo al que se hayan administrado suplementos en la dosis máxima indicada en la solicitud.

En el caso de especies mayores, los estudios deberán evaluar los residuos totales de importancia toxicológica e identificar, al mismo tiempo, el residuo marcador de la sustancia activa en los tejidos (hígado, riñón, músculo, piel, piel con grasa) y los productos (leche, huevos y miel) comestibles. El residuo marcador es el seleccionado con fines de ensayo cuya concentración guarda una relación conocida con el residuo total de interés toxicológico en los tejidos. Los estudios deberán demostrar, asimismo, la permanencia de residuos en los tejidos o los productos, a fin de establecer un tiempo de espera apropiado.

Para determinar el tiempo de espera, las cantidades mínimas de animales muestreados o productos en cada momento son:

- tejidos comestibles:
 - bovinos, ovinos, porcinos y especies menores, cuatro,
 - aves de corral, seis,
 - salmónidos y otros peces, diez,
- productos:
 - leche, ocho muestras por momento,
 - huevos, diez muestras por momento,
 - miel, ocho muestras por momento.

Se tendrá en cuenta la adecuada distribución por sexos.

Los residuos se medirán en el tiempo de espera «cero» (estado estable) y, como mínimo, en otros tres puntos temporales de muestreo.

Deberá proponerse un residuo marcador.

Los estudios sobre absorción, distribución y excreción, incluida la identificación de los principales metabolitos, deberán realizarse en las especies de animales de laboratorio en las que se haya obtenido el nivel al que no se observan efectos adversos (NOAEL, *no observed adverse effect*) más bajo o, en su defecto, en ratas (de ambos sexos). Podrá ser necesario realizar estudios adicionales sobre metabolitos particulares si estos son producidos por especies diana y no se forman en grado significativo en las especies de laboratorio.

3.2.1.3. Estudios metabólicos y de disposición

Deberá efectuarse un estudio que incluya el equilibrio metabólico, el perfil metabólico y la identificación de los principales metabolitos en la orina y las heces. Si otra especie de laboratorio muestra una diferencia de sensibilidad marcada con respecto a la rata, será necesario aportar información adicional.

3.2.1.4. Biodisponibilidad de los residuos

En la evaluación de los riesgos para los consumidores en relación con los residuos ligados presentes en los productos animales podrá tenerse en cuenta un factor de seguridad adicional basado en la determinación de su biodisponibilidad, para lo cual se emplearán animales de laboratorio adecuados y métodos reconocidos.

3.2.2. Estudios toxicológicos

La inocuidad del aditivo se evalúa sobre la base de los estudios toxicológicos realizados *in vitro* e *in vivo* en animales de laboratorio. Suelen incluir la medición de:

- 1) la toxicidad aguda;
- 2) la genotoxicidad (mutagenicidad y clastogenicidad);
- 3) la toxicidad oral subcrónica;
- 4) la toxicidad oral crónica o la carcinogenicidad;
- 5) la toxicidad reproductora, en especial la teratogenicidad, y
- 6) otros estudios.

Si persiste algún motivo de preocupación, se llevarán a cabo más estudios que proporcionen la información adicional necesaria para evaluar la inocuidad de la sustancia activa y de sus residuos.

Basándose en los resultados de estos estudios, deberá establecerse el nivel sin efectos toxicológicos observados.

Podrá ser necesario realizar estudios adicionales sobre metabolitos particulares si estos son producidos por especies diana y no se forman en grado significativo en las especies de ensayo de laboratorio. Si existen estudios metabólicos en humanos, sus datos se tendrán en cuenta para decidir la naturaleza de eventuales estudios adicionales.

Los estudios toxicológicos deberán realizarse con la sustancia activa. Si esta está presente en un producto de la fermentación, las pruebas se realizarán sobre este. El producto de la fermentación que vaya a ser sometido a las pruebas deberá ser idéntico al que vaya a utilizarse en el producto comercial.

Los estudios deberán realizarse con métodos de ensayo validados a nivel internacional y de acuerdo con la legislación europea vigente o las directrices de la OCDE en cuanto a los detalles metodológicos, respetando los principios de las buenas prácticas de laboratorio. Los estudios con animales de laboratorio se atenderán a las normas sobre bienestar animal establecidas en la legislación europea y no se repetirán sin necesidad.

3.2.2.1. Toxicidad aguda

Se requerirán estudios de toxicidad aguda para clasificar la toxicidad del compuesto y ofrecer una caracterización parcial de la misma.

Dichos estudios de toxicidad aguda se llevarán a cabo al menos en dos especies de mamíferos. Si procede, se sustituirá una de las especies de laboratorio por una especie diana.

No será necesario determinar la DL_{50} exacta; bastará con una determinación aproximada de la dosis letal mínima. La dosis máxima no superará los 2 000 mg/kg de peso corporal.

Con el fin de reducir el número de animales utilizados y su sufrimiento, se desarrollan continuamente nuevos protocolos para llevar a cabo la prueba de toxicidad por dosis única. Si están debidamente validados, se aceptarán los estudios realizados siguiendo estos nuevos procedimientos.

Deberán seguirse las Directrices de la OCDE n^{os} 402 (toxicidad cutánea aguda), 420 (método de la dosis predeterminada), 423 (método por clase de toxicidad aguda) y 425 (procedimiento de ajuste de las dosis).

3.2.2.2. Estudios de genotoxicidad, en especial la mutagenicidad

A fin de identificar las sustancias activas y, si procede, aquellos de sus metabolitos y productos de degradación que tienen propiedades mutagénicas y genotóxicas, deberá realizarse una combinación selectiva de diversas pruebas de genotoxicidad. Si procede, las pruebas se efectuarán con y sin activación metabólica de mamífero y deberá tenerse presente la compatibilidad del material de prueba con el sistema de prueba.

El conjunto básico comprende las siguientes pruebas:

- 1) inducción de mutaciones genéticas en bacterias o células de mamífero (preferiblemente el ensayo de linfoma de ratón tk);
- 2) inducción de aberraciones cromosómicas en células de mamífero, y
- 3) pruebas *in vivo* en especies mamíferas.

En función de los resultados de las pruebas mencionadas, y teniendo en cuenta el perfil toxicológico completo y el uso previsto de la sustancia, podrá ser necesario efectuar exámenes adicionales.

Los protocolos deberían estar en consonancia con las Directrices de la OCDE n^{os} 471 (prueba de mutación inversa *Salmonella typhimurium*), 472 (prueba de mutación inversa *Escherichia coli*), 473 (prueba de aberración cromosómica *in vitro* en mamíferos), 474 (prueba de micronúcleos en eritrocitos de mamíferos), 475 (prueba de aberración cromosómica en médula ósea de mamíferos), 476 (prueba de la mutación genética en células de mamíferos *in vitro*) o 482 (síntesis no programada de ADN en células de mamíferos *in vitro*), y otras directrices pertinentes de esta misma organización para ensayos *in vitro* e *in vivo*.

3.2.2.3. Estudios de toxicidad oral subcrónica a dosis repetidas

Para estudiar el potencial de toxicidad subcrónica de la sustancia activa, deberá realizarse al menos un estudio en una especie de roedores con una duración mínima de 90 días. Si se estima necesario, deberá efectuarse un segundo estudio con una especie no roedora. El objeto de ensayo deberá administrarse por vía oral en un mínimo de tres niveles, además de un grupo de referencia para obtener una respuesta a la dosis. Normalmente, cabría esperar que con la dosis máxima se pongan de manifiesto efectos adversos. Con la dosis mínima no debería esperarse ningún indicio de toxicidad.

Los protocolos de estos estudios deberán estar en consonancia con las Directrices de la OCDE n^{os} 408 (roedores) o 409 (no roedores).

3.2.2.4. Estudios de toxicidad oral crónica (en especial estudios de carcinogenicidad)

Para investigar el potencial de toxicidad crónica y de carcinogenicidad, deberá llevarse a cabo un estudio de toxicidad oral crónica al menos en una especie y con una duración mínima de 12 meses. La especie elegida deberá ser la más adecuada según todos los datos científicos disponibles, incluidos los resultados de los estudios de 90 días. La especie por defecto será la de las ratas. Si se pide un segundo estudio, se utilizará una especie de mamíferos roedores o no roedores. El objeto de ensayo deberá administrarse por vía oral en un mínimo de tres niveles, además de un grupo de referencia para obtener una respuesta a la dosis.

Si el estudio de toxicidad crónica se combina con un examen de carcinogenicidad, la duración se ampliará a dieciocho meses en el caso de los ratones y los hámsteres, y a 24 meses en el de las ratas.

No harán falta estudios de carcinogenicidad si la sustancia activa y sus metabolitos:

- 1) dan siempre resultados negativos en las pruebas de genotoxicidad;
- 2) no están estructuralmente relacionados con agentes carcinógenos conocidos, y
- 3) no producen ningún efecto indicativo de una posible (pre)neoplasia en ensayos de toxicidad crónica.

Los protocolos deberían estar en consonancia con las Directrices de la OCDE n^{os} 452 (estudio de toxicidad crónica) o 453 (estudio combinado de toxicidad crónica y carcinogenicidad).

3.2.2.5. Estudios de toxicidad reproductora (en especial la toxicidad durante el desarrollo prenatal)

A fin de identificar posibles alteraciones de la función reproductora masculina o femenina o efectos nocivos sobre la progenie causados por la administración de la sustancia activa, deberán efectuarse estudios de la función reproductora:

- 1) un estudio de toxicidad reproductora en dos generaciones, y
- 2) un estudio de toxicidad durante el desarrollo prenatal (estudio de teratogenicidad).

En los nuevos ensayos podrán aplicarse métodos alternativos validados que reduzcan el empleo de animales.

3.2.2.5.1. Estudio de toxicidad reproductora en dos generaciones

Deberán llevarse a cabo estudios de la función reproductora que se extiendan como mínimo a dos generaciones filiales (F1 y F2) en al menos una especie, normalmente de roedores, y que podrán combinarse con un examen de teratogenicidad. La sustancia objeto de investigación se administrará por vía oral a machos y hembras en un momento adecuado previo al apareamiento. Dicha administración se prolongará hasta el destete de la generación F2.

Todos los parámetros referentes a la fertilidad, la gestación, el parto, el comportamiento materno, la lactancia, el crecimiento y el desarrollo de los descendientes F1, desde la fecundación hasta la madurez, así como el desarrollo de los descendientes F2 hasta el destete, deberán observarse y anotarse cuidadosamente. Los protocolos para el estudio de toxicidad reproductora deberán estar en consonancia con la Directriz n^o 416 de la OCDE.

3.2.2.5.2. Estudio de toxicidad durante el desarrollo prenatal (estudio de teratogenicidad)

El objetivo es detectar los posibles efectos adversos sobre la hembra preñada y sobre el desarrollo del embrión y el feto como resultado de la exposición, a través de todo el período de gestación desde la implantación. Esos efectos pueden ser un aumento de la toxicidad en las hembras preñadas, la muerte del embrión o el feto, un crecimiento fetal alterado y anomalías o anomalías estructurales del feto.

Para el primer estudio suelen escogerse ratas. Si se observa un resultado negativo o equívoco en cuanto a la teratogenicidad, deberá realizarse otro estudio de toxicidad durante el desarrollo en una segunda especie, preferiblemente en conejos. Si el estudio con ratas da positivo con respecto a la teratogenicidad, no será necesario un estudio con una segunda especie, salvo que una revisión de todos los estudios principales indique que la IDA va a basarse en la teratogenicidad de la rata. En este caso sería necesario un estudio con una segunda especie para determinar cuál es la especie más sensible en relación con este criterio de valoración. Los protocolos deberían estar en consonancia con la Directriz n^o 414 de la OCDE.

3.2.2.6. Otros estudios toxicológicos y farmacológicos específicos

Si existen motivos de preocupación, se llevarán a cabo más estudios que proporcionen información adicional útil para evaluar la inocuidad de la sustancia activa y de sus residuos. Tales estudios podrán incluir el examen de los efectos farmacológicos, los efectos en los animales jóvenes (prepúberes), la inmunotoxicidad o la neurotoxicidad.

3.2.2.7. Determinación del nivel sin efectos adversos observados (NOAEL)

Aunque el NOAEL suele basarse en efectos toxicológicos, en ocasiones podrían resultar más apropiados los efectos farmacológicos.

Se seleccionará el NOAEL más bajo. Para determinar el NOAEL más bajo, expresado en mg/kg de peso corporal diarios, se tendrán en cuenta todos los resultados de las secciones anteriores, así como los demás datos pertinentes publicados (en especial cualquier información pertinente sobre los efectos de la sustancia activa en el ser humano) y, si procede, la información sobre sustancias químicas cuya estructura química esté estrechamente relacionada.

3.2.3. Evaluación de la seguridad de los consumidores

La seguridad de los consumidores se evalúa comparando la IDA establecida y la ingesta teórica calculada del aditivo o sus metabolitos a través de los alimentos. En el caso de las vitaminas y los oligoelementos, podrá utilizarse, en lugar de la IDA, el nivel superior de ingesta tolerable.

3.2.3.1. Propuesta de ingesta diaria admisible para las sustancias activas

La IDA (expresada en mg de aditivo o de material relacionado con el aditivo por persona y día) se obtiene dividiendo el NOAEL más bajo (mg/kg de peso corporal) por un factor de seguridad adecuado y multiplicando el resultado por un peso corporal humano medio de 60 kg.

Si procede, se propondrá una IDA. Asimismo, la IDA podrá ser «no especificada» si la toxicidad es baja en las pruebas con animales. No se propondrá una IDA si la sustancia presenta propiedades genotóxicas o carcinogénicas para los humanos.

El establecimiento de una IDA suele requerir que el destino metabólico de la sustancia activa sea similar en los animales destinatarios y en los animales de laboratorio (véase el punto 3.2.1.4, «Biodisponibilidad de los residuos»), lo que garantiza que los consumidores estarán expuestos a los mismos residuos que los animales de laboratorio empleados en los estudios toxicológicos. De no ser así, aún podrá fijarse una IDA si se realizan estudios adicionales con una segunda especie animal de laboratorio o con los metabolitos específicos de las especies destinatarias.

Al establecer el factor de seguridad aplicado para determinar la IDA de un aditivo concreto se tomarán en consideración la naturaleza de los efectos biológicos y la calidad de los datos empleados para identificar el NOAEL, la pertinencia de estos efectos con respecto al hombre y su reversibilidad, así como todo conocimiento que se tenga sobre los efectos directos de los residuos en los seres humanos.

Cuando se calcule la IDA deberá emplearse un factor de seguridad de, como mínimo, 100 (si se ha aportado un paquete toxicológico completo). Si se dispone de datos sobre la sustancia activa en relación con el ser humano, podrá aceptarse un factor de seguridad más bajo. Podrían aplicarse factores de seguridad más altos para tener en cuenta fuentes adicionales de incertidumbre en los datos, o cuando el NOAEL se fije sobre la base de un criterio de valoración crítico concreto, como es la teratogenicidad.

3.2.3.2. Nivel superior de ingesta tolerable

En el caso de algunos aditivos puede resultar más apropiado basar la evaluación de la inocuidad en el nivel superior de ingesta tolerable, que es el nivel máximo de ingesta diaria total crónica de un nutriente (a partir de todas las fuentes) que, en opinión de organismos científicos nacionales o internacionales, no es probable que presente un riesgo de efectos adversos en la salud de los consumidores o de grupos concretos de consumidores.

El expediente deberá contener datos que demuestren que el uso del aditivo no va a hacer que pueda excederse el nivel superior de ingesta tolerable, teniendo en cuenta todas las fuentes posibles del nutriente.

Si los niveles de residuos del aditivo nutricional o sus metabolitos presentes en productos de origen animal son superiores a lo que se considera normal o previsto para estos productos, deberá indicarse claramente.

3.2.3.3. Exposición de los consumidores

La ingesta total del aditivo o sus metabolitos a partir de todas las fuentes deberá estar por debajo de la IDA o del nivel superior de ingesta tolerable.

El cálculo de la ingesta teórica a través de alimentos de origen animal se efectuará teniendo en cuenta la concentración (residuos totales como media aritmética y el valor individual máximo) medida en tejidos y productos al terminar el uso del aditivo. Además, si es necesario, se determinarán, en los diferentes tiempos de espera, los valores de consumo diario de alimentos en el ser humano, partiendo del peor supuesto posible.

Tratándose de aditivos destinados a varias especies, la exposición a través de los tejidos se calculará separadamente en relación con los mamíferos, las aves y los peces, y se tomará el valor más alto. Cuando proceda, se sumará a esa cifra la exposición a través de la leche y los huevos. Por ejemplo, cuando el aditivo se utilice en mamíferos lactantes y aves de puesta, los respectivos valores máximos en tejidos comestibles se añadirán a los correspondientes al consumo de leche y huevos. Cuando el aditivo se utilice en peces, aves de puesta y mamíferos lactantes, los respectivos valores máximos en tejidos comestibles se añadirán a los correspondientes al consumo de leche y huevos. Del mismo modo se tendrán previstas otras combinaciones posibles.

En determinadas situaciones (por ejemplo, en el caso de algunos aditivos nutricionales u organolépticos, o de aditivos destinados a especies menores), puede ser apropiado afinar ulteriormente la evaluación de la exposición humana utilizando cifras de consumo más realistas, aunque manteniendo el planteamiento más conservador. Si es posible, se tomarán como base datos de la Comunidad.

Cuadro 1

Cifras teóricas de consumo humano diario (g de tejidos o productos)

	Mamíferos	Aves	Pescado	Otros
Músculo	300	300	300 (*)	
Hígado	100	100	—	
Riñón	50	10	—	
Grasa	50 (**)	90 (***)	—	
+ Leche	1 500	—	—	
+ Huevos	—	100	—	
+ Miel				20

(*) Músculo y piel en proporciones normales.

(**) En el caso de los porcinos, 50 g de grasa y piel en proporciones normales.

(***) Grasa y piel en proporciones normales.

3.2.3.4. Propuesta de límites máximos de residuos

El límite máximo de residuos es la concentración más alta de residuos (expresada en µg de residuo marcador por kg de tejido o producto comestible húmedo) que la Comunidad puede aceptar que se autorice legalmente o se reconozca como admisible en los alimentos. Se basa en el tipo y la cantidad de residuo que se considera exento de todo peligro toxicológico para la salud humana según expresa la IDA. Solo puede fijarse un LMR si existe una IDA.

Al establecer los LMR aplicables a aditivos para piensos deberán tenerse también presentes los residuos procedentes de otras fuentes (por ejemplo, alimentos de origen vegetal). Por otro lado, el LMR podrá reducirse para que sea coherente con las condiciones de utilización de los aditivos para piensos y en la medida en que se disponga de métodos analíticos prácticos.

Cuando proceda, se fijarán LMR individuales (expresados en mg de residuo marcador por kg de tejido o producto natural comestible) para los diferentes tejidos o productos de las especies animales destinatarias. Los LMR individuales relativos a diferentes tejidos o productos deberán reflejar la cinética de reducción y la variabilidad de los niveles de residuos en esos tejidos o productos en las especies animales en las que se vaya a emplear el aditivo. Normalmente, la variabilidad se reflejará utilizando el límite de confianza del 95 % de la media. Si no pudiera calcularse el límite de confianza debido al número reducido de muestras, la variabilidad se expresaría en su lugar tomando el valor individual más alto.

Deberán llevarse a cabo estudios sobre los límites máximos de residuos de coccidiostatos e histomonostatos siguiendo las normas vigentes pertinentes que se aplican a los medicamentos veterinarios (volumen 8 de «The rules governing medicinal products in the European Union» [Normas aplicables a los medicamentos en la Unión Europea]: *Notice to applicants and guidelines. Veterinary medicinal products. Establishment of maximum residue limits (MRLs) for residues of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin* [Nota a los solicitantes y directrices. Medicamentos veterinarios. Establecimiento de límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en productos alimenticios de origen animal], octubre de 2005).

Los estudios dirigidos a establecer límites máximos de residuos para categorías de aditivos distintas de los coccidiostatos e histomonostatos, cuando sean necesarios, se aportarán con arreglo al presente anexo.

Para determinar la exposición de los consumidores a los residuos totales (calculados conforme al punto 3.2.3.3), al proponer el LMR aplicable a los distintos tejidos y productos deberá tenerse en cuenta la relación del residuo marcador con respecto al residuo total (cuadro 2).

Cuadro 2

Definiciones utilizadas en la deducción de un LMR

$i-j$	Tejidos o productos concretos (hígado, riñón, músculo, piel con grasa, leche, huevos y miel) en diferentes momentos
LMR_{i-j}	Límite máximo de residuos en tejidos o productos (mg de sustancia marcadora por kg^{-1})
Qt_{i-j}	Consumo humano diario de los tejidos o productos concretos (kg) fijado en el cuadro 1 o en el cuadro 1 afinado
CTR_{i-j}	Concentración total de residuos en tejidos o productos concretos ($mg\ kg^{-1}$)
CRM_{i-j}	Concentración de residuo marcador en tejidos o productos concretos ($mg\ kg^{-1}$)
$RMRT_{i-j}$	Relación de CRM_{i-j} con respecto a CTR_{i-j} en tejidos o productos concretos
$IART_{i-j}$	Ingesta alimentaria de tejidos o productos concretos calculada a partir de los residuos totales (mg) $IART_{i-j} = Qt_{i-j} \times CTR_{i-j}$
$IART_{LMR\ i-j}$	Ingesta alimentaria calculada a partir de los LMR (mg) de tejidos o productos concretos $IART_{LMR\ i-j} = Qt_{i-j} \times LMR_{i-j} \times RMRT_{i-j}^{-1}$

Los valores medidos de CTR y CRM se introducirán como corresponda en la plantilla del cuadro 3, y se calcularán los demás valores. Cuando no se disponga de un conjunto completo de datos, porque los valores estén por debajo del límite de detección, podrá aceptarse una extrapolación de la RMRT.

Solo podrá deducirse un LMR si la suma de las IART individuales está por debajo de la IDA. Si se excediera la IDA, una alternativa consistiría en utilizar datos derivados de un tiempo de espera más largo o dosis menores. Una primera propuesta de LMR puede obtenerse empleando como guía el valor de CRM y tomando en consideración el límite de cuantificación del método analítico. La suma de $IART_{LMR}$ que se obtiene de los LMR propuestos deberá estar por debajo de la IDA y próxima a la suma de las IART individuales. Si se supera la IDA, deberá proponerse un LMR más bajo y repetirse la comparación.

Algunos residuos de determinados aditivos podrían aparecer por debajo de los LMR en la leche, los huevos o la carne y, no obstante, incidir en la calidad de los alimentos, especialmente en determinados procesos de transformación. En esos casos, además de establecer valores de LMR, quizá sea conveniente fijar un «residuo máximo compatible con el proceso de transformación (de productos alimenticios)».

Cuadro 3

Plantilla para deducir una propuesta de LMR

	Hígado	Riñón	Músculo	Piel con grasa	Leche	Huevos	Miel	Suma
CTR ⁽¹⁾ ($mg\ kg^{-1}$)								—
CRM ⁽²⁾ ($mg\ kg^{-1}$)								—
RMRT ⁽²⁾								—
IART ⁽³⁾ (mg)								
LMR propuesto ($mg\ kg^{-1}$)								—
$IART_{LMR}$ (mg)								

⁽¹⁾ Teniendo en cuenta el tiempo de espera propuesto.

⁽²⁾ Establecida, idealmente, al mismo tiempo que la CTR.

⁽³⁾ Calculada a partir de los valores de CTR.

3.2.3.5. Propuesta de tiempo de espera

El tiempo de espera es el período necesario para que, una vez ha dejado de administrarse el aditivo, los niveles de residuos disminuyan por debajo de los LMR.

3.3. Estudios sobre la seguridad de utilización del aditivo para los usuarios o los trabajadores

Los trabajadores pueden verse expuestos, principalmente, por inhalación o contacto durante la fabricación, la manipulación o la utilización del aditivo. Por ejemplo, la exposición de los trabajadores agropecuarios puede producirse cuando manipulan o mezclan el aditivo. Deberá proporcionarse información adicional sobre la manera de manipular las sustancias.

Se incluirá una evaluación del riesgo que corren los trabajadores. La experiencia en la fábrica, cuando se dispone de ella, es con frecuencia una fuente de información importante a la hora de evaluar los riesgos que plantea para los trabajadores la exposición al propio aditivo, tanto por vía respiratoria como por vía cutánea. Especial atención merecen los aditivos, los piensos tratados con aditivos o los excrementos animales que se presentan en forma de polvo seco o pueden generar este tipo de polvo, así como los aditivos para piensos que pueden tener un potencial alergénico.

3.3.1. Evaluación del riesgo toxicológico para la seguridad de los usuarios o los trabajadores

Los riesgos para los trabajadores deberán evaluarse en una serie de estudios realizados con el aditivo en la forma para la que se haya presentado la solicitud. Se realizarán estudios sobre la toxicidad aguda por inhalación, salvo que sea improbable que el producto forme polvo o neblina respirables. Asimismo, deberán llevarse a cabo estudios sobre el efecto irritante en la piel y, si los resultados son negativos, se evaluará el efecto irritante en las membranas mucosas (por ejemplo, el ojo). También deberá evaluarse el potencial alergénico o de sensibilización cutánea. Los datos de toxicidad generados en relación con la seguridad de los consumidores (véase el punto 3.2.2) se utilizarán para evaluar la toxicidad general potencial del aditivo. Todo ello deberá evaluarse, si es necesario, por medio de mediciones directas y estudios específicos.

3.3.1.1. Efectos en el aparato respiratorio

Deberá demostrarse que los niveles de polvo o niebla del aditivo presentes en el aire no constituyen un peligro para la salud de los usuarios o los trabajadores. Para ello se presentarán, en su caso:

- pruebas de inhalación en animales de laboratorio.
- datos epidemiológicos publicados, o datos del propio solicitante sobre su fábrica o sobre el efecto irritante, y
- pruebas de sensibilización del aparato respiratorio.

Si más del 1 % en peso del producto está constituido por partículas o gotas de diámetro inferior a 50 µm, deberán realizarse estudios de toxicidad aguda por inhalación.

Los protocolos deberán estar en consonancia con la Directriz n° 403 de la OCDE. Si se considera necesario llevar a cabo estudios de toxicidad subcrónica, estos deberán estar en consonancia con las Directrices de la OCDE n° 412 (toxicidad por inhalación a dosis repetidas: estudio de 28 o 14 días) o 413 (toxicidad subcrónica por inhalación: estudio de 90 días).

3.3.1.2. Efectos en los ojos y en la piel

Cuando se disponga de ellas, deberán presentarse pruebas directas de la ausencia de efectos irritantes y sensibilización en los seres humanos en situaciones conocidas. Tales pruebas se complementarán con los resultados de pruebas validadas de irritación ocular y cutánea y de sensibilización en animales, efectuadas con el aditivo adecuado. También se evaluará el potencial alergénico y de sensibilización cutánea. Los protocolos de estos estudios deberán estar en consonancia con las Directrices de la OCDE n° 404 (efecto irritante o corrosivo en la piel), 405 (efecto irritante o corrosivo en los ojos), 406 (sensibilización cutánea) y 429 (sensibilización cutánea: ensayo de ganglios linfáticos locales).

Si se conocen las propiedades corrosivas a partir de datos publicados o de pruebas *in vitro* específicas, no se realizarán más pruebas *in vivo*.

Si el aditivo es tóxico por inhalación, deberá tenerse en cuenta la toxicidad cutánea. Los estudios deberán estar en consonancia con la Directriz n° 402 de la OCDE (toxicidad cutánea aguda).

3.3.1.3. Toxicidad general

Los datos sobre toxicidad generados para cumplir, entre otros, los requisitos relativos a la seguridad de los consumidores (pruebas de toxicidad a dosis repetidas, mutagenicidad, carcinogenicidad, toxicidad reproductora y destino metabólico) se utilizarán para evaluar la toxicidad general.

3.3.1.4. Evaluación de la exposición

Deberá presentarse información sobre la manera en que el empleo del aditivo puede dar lugar a una exposición a través de todas las vías (respiratoria, cutánea o digestiva). Tal información incluirá, si se dispone de ella, una evaluación cuantitativa, como la concentración típica en el aire, la contaminación cutánea o la ingesta. Cuando no se disponga de datos cuantitativos, deberá aportarse información suficiente para que se pueda evaluar adecuadamente la exposición.

3.3.2. Medidas de control de la exposición

Partiendo de la información obtenida con la evaluación toxicológica y la evaluación de la exposición, deberá extraerse una conclusión sobre los riesgos para la salud de los usuarios o los trabajadores (inhalación, efecto irritante, sensibilización y toxicidad general). Podrán proponerse medidas preventivas para reducir o eliminar la exposición. Sin embargo, el uso de dispositivos de protección personal deberá considerarse únicamente como medida de última instancia para proteger contra cualquier riesgo residual que pueda persistir una vez aplicadas las medidas de control. Es preferible, por ejemplo, plantearse la reformulación del producto.

3.4. Estudios sobre la seguridad de utilización del aditivo para el medio ambiente

Es importante atender al impacto ambiental de los aditivos, pues estos suelen administrarse durante largos períodos de tiempo a grandes grupos de animales que pueden excretar en un grado considerable las sustancias activas, ya sea en la forma del compuesto original, ya en la de sus metabolitos.

Para determinar el impacto ambiental de los aditivos deberá adoptarse un planteamiento gradual. Todos los aditivos deberán someterse a la evaluación de la fase I para identificar aquellos que no requieran más pruebas. Los demás deberán pasar a la segunda fase (fase II) de evaluación para obtener información adicional, en función de la cual quizá se considere necesario realizar otros estudios. Estos estudios se llevarán a cabo de acuerdo con la Directiva 67/548/CEE.

3.4.1. Evaluación de la fase I

La finalidad de la evaluación de la fase I es determinar si es probable que el aditivo o sus metabolitos tengan un efecto ambiental significativo y si es necesario pasar a la fase II (véase el árbol de decisiones).

La decisión de no pasar a la fase II puede basarse en uno de los dos criterios siguientes, salvo que haya motivos de preocupación con una base científica:

- a) la naturaleza química y el efecto biológico del aditivo, así como sus condiciones de utilización, indican que el impacto será despreciable, es decir, que el aditivo:
 - es una sustancia fisiológica o natural que no dará lugar a un incremento sustancial de la concentración en el medio ambiente, o
 - está destinado a animales no productores de alimentos;
- b) en el peor de los casos, la concentración ambiental prevista (PEC) es demasiado baja para resultar preocupante; la PEC deberá evaluarse en relación con cada compartimento de interés (véase más adelante), partiendo del supuesto de que el 100 % de la dosis ingerida se excreta en la forma del compuesto original.

Si el solicitante no puede demostrar que el aditivo entra en una de estas dos categorías eximentes, habrá que pasar a la fase II.

3.4.1.1. Aditivos para animales terrestres

Cuando las excreciones del ganado se aplican en la tierra, el uso de aditivos para piensos puede dar lugar a una contaminación del suelo y de las aguas subterráneas y superficiales (por drenaje y escorrentía).

La peor PEC para el suelo (PEC_{soil}) sería el resultado de esparcir por la tierra todos los compuestos excretados. Si la PEC_{soil} (por defecto: 5 cm de profundidad) es inferior a 10 µg/kg, no se requerirán más evaluaciones.

Si la PEC correspondiente a la contaminación de aguas subterráneas (PEC_{gw}) es inferior a $0,1 \mu\text{g/l}$, no será necesario pasar a la evaluación de la fase II del impacto ambiental del aditivo sobre las aguas subterráneas.

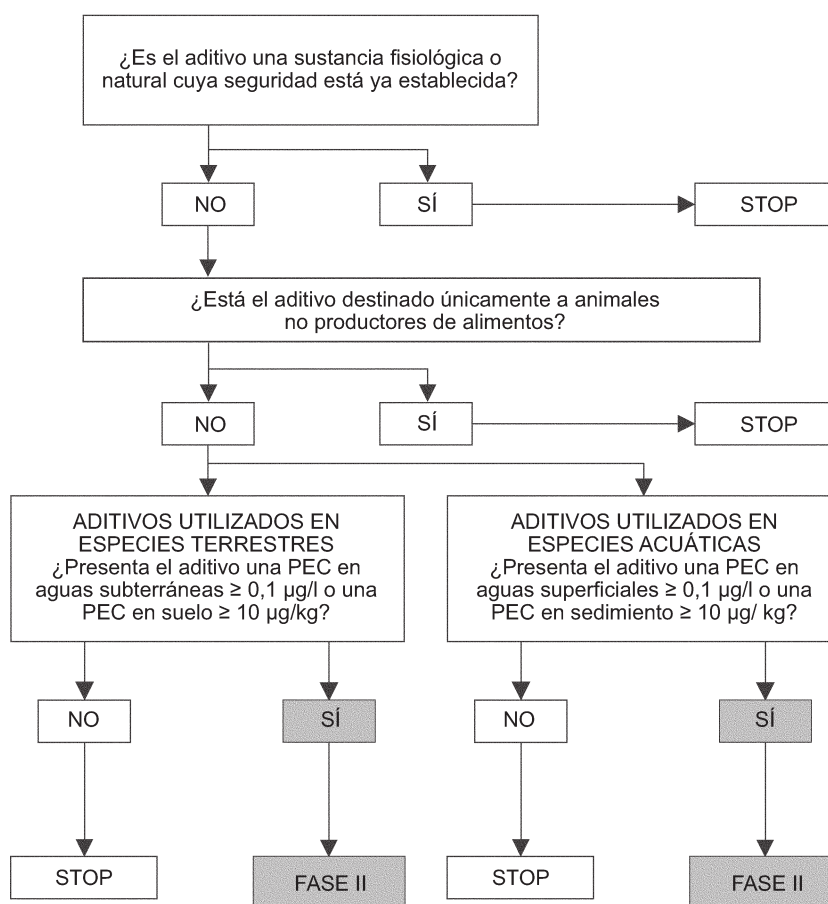
3.4.1.2. Aditivos para animales acuáticos

Los aditivos para piensos utilizados en la acuicultura pueden contaminar el sedimento y el agua. Para la evaluación del riesgo ambiental correspondiente a los peces criados en jaulas se toma como compartimento de interés el sedimento. En el caso de los peces criados en sistemas tierra adentro, se considera que el efluente que fluye a las aguas superficiales es el que plantea el mayor riesgo ambiental.

La peor PEC para el sedimento (PEC_{sediment}) sería el resultado de que se depositaran en el sedimento todos los compuestos excretados. Si la PEC_{sediment} (por defecto: 20 cm de profundidad) es inferior a $10 \mu\text{g/kg}$ de peso húmedo, no se requerirán más evaluaciones.

Si la PEC en el agua superficial (PEC_{sw}) es inferior a $0,1 \mu\text{g/l}$, no se requerirán más evaluaciones.

Fase I — Árbol de decisiones



3.4.2. Evaluación de la fase II

El objetivo de la fase II es evaluar el potencial que tienen los aditivos de afectar a especies no destinatarias del entorno, ya sean acuáticas o terrestres, o de llegar a las aguas subterráneas en niveles inaceptables. No resulta práctico evaluar los efectos de los aditivos sobre cada una de las especies del entorno que pueden verse expuestas tras administrarse el aditivo a las especies destinatarias. Los niveles taxonómicos sometidos a prueba han de servir de sustitutos o indicadores para toda la gama de especies presentes en el entorno.

La evaluación de la fase II se basa en un cociente de riesgo, y en ella se compararán los valores de PEC y de concentración sin efectos prevista (PNEC) calculados en relación con cada compartimento. La PNEC se determina a partir de criterios de valoración establecidos experimentalmente y divididos por un factor de evaluación apropiado. El valor PNEC deberá calcularse en relación con cada compartimento.

La evaluación de la fase II comienza, si es posible, afinando la PEC, y en ella se adopta un enfoque de dos niveles con respecto a la evaluación del riesgo ambiental.

En el primer nivel, o fase IIA, se hace uso de unos pocos estudios sobre el destino y los efectos para elaborar una evaluación conservadora del riesgo basada en la exposición y en los efectos sobre el compartimento ambiental de interés. Si la relación de la PEC con respecto a la PNEC es inferior a uno (1), ya no se requerirán más evaluaciones, salvo que quepa esperar una bioacumulación.

Si la relación PEC-PNEC predice un riesgo inaceptable (relación > 1), el solicitante deberá avanzar a la fase IIB para afinar la evaluación del riesgo ambiental.

3.4.2.1. Fase II A

Además de los compartimentos tratados en la fase I, habrá que calcular la PEC en aguas superficiales teniendo en cuenta la escorrentía y el drenaje.

A partir de los datos no computados en la fase I, podrá calcularse una PEC más afinada para cada compartimento ambiental de interés. Al evaluar la PEC afinada, deberá tenerse en cuenta lo siguiente:

- a) la concentración de las sustancias activas o los metabolitos de interés en el estiércol de granja o las heces de los peces tras la administración del aditivo a los animales en la dosis propuesta; en este cálculo se tendrán en cuenta las dosis y la cantidad de excrementos;
- b) la posible degradación de las sustancias activas o los metabolitos de interés excretados durante el proceso normal de transformación y almacenamiento del estiércol antes de ser utilizado en la tierra;
- c) la adsorción o desorción de las sustancias activas o los metabolitos de interés en el suelo o el sedimento de acuicultura, determinadas preferiblemente mediante estudios del suelo o el sedimento (OCDE n° 106);
- d) la degradación en el suelo y en los sedimentos acuáticos (OCDE n°s 307 y 308, respectivamente), y
- e) otros factores como la hidrólisis, la fotólisis, la evaporación o la dilución por el arado.

Para la evaluación del riesgo de la fase II se adoptará el valor de PEC más alto obtenido con estos cálculos en relación con cada compartimento ambiental de interés.

Si se espera una elevada persistencia en el suelo o el sedimento (tiempo hasta la degradación del 90 % de la concentración original del compuesto: $DT_{90} > 1$ año), deberá tenerse en cuenta el potencial de acumulación.

Deberán determinarse las concentraciones de aditivos (o sus metabolitos) que perjudican gravemente a diversos niveles tróficos de los compartimentos ambientales de interés. Se tratará, en la mayoría de los casos, de pruebas de efectos agudos que deberán realizarse conforme a las directrices de la OCDE o a otras directrices similares bien establecidas. Los estudios relativos al entorno terrestre incluirán: la toxicidad para las lombrices; tres plantas terrestres y los microorganismos del suelo (por ejemplo, efectos sobre la fijación del nitrógeno). Los estudios relativos al entorno de aguas dulces incluirán: la toxicidad para los peces; *Daphnia magna*; algas y un organismo que habite el sedimento. En el caso de las jaulas marinas, se estudiarán tres especies de diferente taxón de organismos que habiten el sedimento.

Se calculará el valor de PNEC en relación con cada compartimento ambiental de interés. La PNEC suele deducirse del valor de toxicidad más bajo observado en los estudios mencionados dividido por un factor de seguridad mínimo de 100, dependiendo del criterio de valoración y del número de especies de ensayo.

El potencial de bioacumulación puede estimarse a partir del coeficiente de partición n-octanol/agua, Log K_{ow} . Unos valores ≥ 3 son indicativos de que la sustancia puede bioacumularse. Para evaluar el riesgo de intoxicación secundaria, se estudiará la posibilidad de efectuar un estudio de factor de bioconcentración en la fase IIB.

3.4.2.2. Fase IIB (estudios ecotoxicológicos más detallados)

Por lo que se refiere a los aditivos en relación con los cuales, tras la evaluación de la fase IIA, no pueda descartarse un riesgo ambiental, será necesario recabar más información sobre los efectos en las especies biológicas de los compartimentos ambientales que, según los estudios de la fase IIA, puedan plantear problemas. En este caso, será necesario realizar pruebas adicionales para determinar los efectos crónicos y otros más específicos en las especies microbianas, vegetales y animales pertinentes. Esta información adicional permitirá aplicar un factor de seguridad más bajo.

En varias publicaciones, por ejemplo en las directrices de la OCDE, se describen las pruebas adicionales de ecotoxicidad que conviene realizar. Habrá que elegir cuidadosamente estas pruebas, asegurándose de que son las adecuadas para las situaciones en las que el aditivo o sus metabolitos pueden liberarse o dispersarse en el medio ambiente. La afinación de la evaluación de los efectos en el suelo (PNEC_{soil}) podría basarse en estudios sobre los efectos crónicos en lombrices, en estudios adicionales sobre la microflora del suelo y sobre una serie de especies vegetales pertinentes y en estudios sobre invertebrados de pastizal (incluidos los insectos) y aves silvestres.

La afinación de la evaluación de los efectos en el agua o el sedimento podría basarse en pruebas de toxicidad crónica realizadas a los organismos acuáticos o bentónicos más sensibles que se hubieran identificado en la evaluación de la fase IIA.

Los estudios de bioacumulación, si fueran necesarios, deberían realizarse conforme a la Directriz n° 305 de la OCDE.

4. SECCIÓN IV: ESTUDIOS SOBRE LA EFICACIA DEL ADITIVO

Los estudios deberán demostrar la eficacia de cada uso propuesto y tener, al menos, una de las características expuestas en el artículo 5, apartado 3, del Reglamento (CE) n° 1831/2003, de acuerdo con las categorías y grupos funcionales de aditivos para piensos establecidos en el artículo 6 y el anexo I de dicho Reglamento. Además, esos estudios deberán permitir evaluar la eficacia del aditivo de acuerdo con prácticas ganaderas comunes en la Unión Europea.

El diseño experimental deberá justificarse en función del uso del aditivo y de la especie y categoría de animales. Cuando se utilicen animales, los ensayos se realizarán de tal manera que su salud y condiciones de cría no afecten negativamente a la interpretación de los resultados. En relación con cada experimento se describirán los efectos positivos y negativos, tanto tecnológicos como biológicos. Asimismo, se demostrará la ausencia de efectos que alteren las características distintivas de los productos animales. Idealmente, los ensayos cumplirán los criterios establecidos por un sistema de aseguramiento de la calidad reconocido y sometido a auditoría externa. En ausencia de un sistema de ese tipo, deberán presentarse pruebas de que el trabajo fue realizado por personal cualificado, en instalaciones y con equipos apropiados y bajo la supervisión de un director de estudios designado.

El director de estudios deberá elaborar cuidadosamente el protocolo de ensayo en lo que respecta a los datos descriptivos generales, por ejemplo métodos, aparatos y materiales empleados, detalles de las especies, raza o línea de los animales, número de animales y condiciones en las que se guardaron y alimentaron. En todos los estudios con animales, las condiciones experimentales deberán describirse conforme al punto 3.1.1.3. Los informes finales, los datos brutos, los planes de estudio y las sustancias de prueba, bien caracterizadas e identificadas, deberán archivararse como material de referencia para el futuro.

Los estudios se diseñarán de modo que se demuestre la eficacia de la dosis mínima de aditivo recomendada, comparando parámetros sensibles con un grupo de referencia negativo y, opcionalmente, con otro positivo. Esos estudios incluirán también la dosis máxima recomendada, cuando se proponga. No se recomienda ningún método en particular, sino que los científicos gozarán de la flexibilidad necesaria para diseñar y realizar los estudios como consideren oportuno.

También deberá prestarse atención a las interacciones biológicas o químicas, conocidas o potenciales, entre el aditivo y otros aditivos, medicamentos veterinarios o componentes de la dieta, cuando puedan afectar a la eficacia del aditivo de que se trate (por ejemplo, compatibilidad del aditivo microbiano con los coccidiostatos e histomonostatos o con ácidos orgánicos).

4.1. Estudios *in vitro*

La eficacia de todos los aditivos tecnológicos y de algunos organolépticos que afecten a las características del pienso deberá demostrarse por medio de un estudio de laboratorio. Dicho estudio deberá diseñarse de modo que abarque una gama representativa de materiales en los que vaya a aplicarse el aditivo. Los resultados se evaluarán, preferiblemente, mediante pruebas sin parámetros, y deberán demostrar los cambios esperados con una probabilidad de $P \leq 0,05$.

En apoyo de la eficacia podrán realizarse estudios *in vitro*, especialmente los que simulan aspectos del tubo digestivo, en relación con otros tipos de aditivos. Estos estudios deberían ser susceptibles de evaluación estadística.

4.2. Estudios de eficacia breves con animales

Podrán utilizarse estudios de biodisponibilidad para demostrar en qué medida una nueva forma o una nueva fuente de un nutriente o un colorante pueden sustituir a un aditivo equivalente ya autorizado o establecido.

En apoyo de los estudios de rendimiento en animales podrán emplearse estudios de digestibilidad o equilibrio, para aportar pruebas del modo de actuación. En algunos casos, sobre todo en relación con los beneficios medioambientales, la eficacia puede demostrarse mejor mediante estudios de equilibrio, que pueden ser preferibles a los estudios de eficacia prolongados. En estos experimentos deberán utilizarse un número y unas especies o categorías de animales adecuados a las condiciones de utilización propuestas.

Podrán proponerse, según proceda, otros estudios de eficacia breves con animales, que podrán sustituir a los estudios prolongados, siempre que esté plenamente justificado.

4.3. Estudios de eficacia prolongados con animales

Los estudios deberían realizarse por lo menos en dos lugares diferentes.

En el diseño experimental utilizado deberá tenerse en cuenta una potencia estadística adecuada y los riesgos de tipo 1 y 2. El protocolo deberá ser lo bastante sensible para detectar cualquier efecto del aditivo a la dosis mínima recomendada (riesgo de tipo 1- α , $P \leq 0,05$ en general y $P \leq 0,1$ para los rumiantes, las especies menores, las mascotas y los animales no productores de alimentos) y tener la suficiente potencia estadística para garantizar que se ajusta al objetivo del estudio. El riesgo de tipo 2 β deberá ser inferior o igual al 20 % en general, y al 25 % en el caso de los experimentos con rumiantes, especies menores, mascotas y animales no productores de alimentos, y tener pues una potencia (1- β) superior o igual al 80 % (al 75 % en relación con los rumiantes, las especies menores, las mascotas y los animales no productores de alimentos).

Cierto es que la naturaleza de algunos aditivos hace difícil definir las condiciones experimentales en las que cabe obtener resultados óptimos. En consecuencia, cuando se disponga de más de tres ensayos, se estudiará la posibilidad de recurrir al metanálisis. Por eso, los protocolos de todos los ensayos deberán tener un diseño similar, a fin de que, en su caso, pueda comprobarse la homogeneidad de los datos y estos puedan combinarse (si las pruebas así lo indican) para una evaluación estadística de $P \leq 0,05$.

4.4. Duración de los estudios de eficacia prolongados con animales destinatarios

En general, la duración de los ensayos de eficacia se corresponderá con el período de aplicación solicitado.

Los ensayos de eficacia se llevarán a cabo conforme a las prácticas ganaderas de la Unión Europea y tendrán la duración mínima establecida en el anexo IV.

Si el aditivo se aplica durante un período específico más breve que el señalado por la definición de la categoría de animales, se administrará conforme a las condiciones de utilización propuestas. Sin embargo, el período de observación no será inferior a 28 días e incluirá los criterios de valoración pertinentes (por ejemplo, en el caso de las cerdas para reproducción, el número de lechones nacidos vivos, cuando se atienda al período de gestación, o el número y el peso de los lechones destetados, cuando se atienda al período de lactancia).

Con respecto a otras especies o categorías de animales para las que no se haya establecido en el anexo IV una duración mínima de los estudios, se tendrá en cuenta un período de administración según las condiciones de utilización propuestas.

4.5. Requisitos de eficacia aplicables a las categorías de aditivos y grupos funcionales

Se requerirán estudios *in vivo* para todos los aditivos destinados a tener un efecto en los animales.

En el caso de los aditivos zootécnicos y los coccidiostatos e histomonostatos, la eficacia se demostrará por medio, como mínimo, de tres estudios de eficacia prolongados. Sin embargo, con algunos aditivos zootécnicos y las demás categorías de aditivos que tienen un efecto en los animales, podrán aceptarse estudios de eficacia breves si la eficacia puede demostrarse de manera inequívoca.

Tratándose de categorías de aditivos sin un efecto directo en los animales, deberá aportarse al menos un estudio de eficacia *in vitro*.

4.6. **Estudios sobre la calidad de los productos animales cuando no es este el efecto objeto de la solicitud**

Para demostrar que el aditivo no tiene un efecto negativo, u otro efecto que no sea objeto de la solicitud, sobre las características organolépticas y nutricionales (e higiénicas y tecnológicas, si procede) de los alimentos derivados de animales a los que se haya administrado el aditivo (cuando no es este el efecto deseado), deberán tomarse las muestras adecuadas durante uno de los ensayos de eficacia. Se someterán a observación dos grupos: un grupo sin suplementos y un grupo con la dosis máxima de aditivo propuesta. Los datos deberán permitir la evaluación estadística. La omisión de estos estudios deberá justificarse adecuadamente.

5. **SECCIÓN V: PLAN DE SEGUIMIENTO CONSECUTIVO A LA COMERCIALIZACIÓN**

De acuerdo con el artículo 7, apartado 3, letra g), del Reglamento (CE) n° 1831/2003, deberá presentarse una propuesta de seguimiento consecutivo a la comercialización en relación con determinadas categorías de aditivos, con el fin de rastrear e identificar los efectos directos o indirectos, inmediatos, retardados o imprevistos que el uso del aditivo tenga sobre la salud humana o animal o sobre el medio ambiente, según las características de los productos de que se trate.

El plan de seguimiento se diseñará caso por caso, y en él se establecerá quién (por ejemplo, el solicitante o los usuarios) va a desempeñar las diversas tareas que exige y quién será responsable de garantizar su puesta en funcionamiento y su ejecución correctas y la existencia de una vía a través de la cual pueda proporcionarse a las autoridades competentes cualquier nuevo dato sobre el uso seguro del aditivo. Deberá informarse a la Comisión y a la Autoridad de todo efecto adverso observado, sin perjuicio de las disposiciones sobre supervisión establecidas en el artículo 12 del Reglamento (CE) n° 1831/2003.

Cuando la sustancia activa sea un antibiótico reconocido y se haya demostrado que, al nivel en que se emplea en los piensos, conlleva la selección de cepas bacterianas resistentes, deberán realizarse estudios de campo como parte del seguimiento consecutivo a la comercialización, a fin de vigilar la resistencia bacteriana al aditivo.

En el caso de los coccidiostatos e histomonostatos, se efectuará un seguimiento de campo de la resistencia del género *Eimeria* y de *Histomonas meleagridis*, respectivamente, con preferencia durante la última parte del período de autorización.

ANEXO III

REQUISITOS ESPECÍFICOS QUE DEBE SATISFACER EL EXPEDIENTE CONTEMPLADO EN EL ARTÍCULO 3 CON RESPECTO A DETERMINADAS CATEGORÍAS DE ADITIVOS O SITUACIONES CONCRETAS, SEGÚN ESTABLECE EL ARTÍCULO 7, APARTADO 5, DEL REGLAMENTO (CE) N° 1831/2003

El Reglamento (CE) n° 1831/2003 prevé una asistencia adicional en la preparación de los expedientes, cuando sea necesaria, en relación con cada categoría de aditivos o con otros objetivos particulares conforme a su artículo 7, apartado 5.

Lista de requisitos específicos para la elaboración de expedientes relativos a:

- 1) aditivos tecnológicos;
- 2) aditivos organolépticos;
- 3) aditivos nutricionales;
- 4) aditivos zootécnicos;
- 5) coccidiostatos e histomonostatos;
- 6) extrapolación de las especies mayores a las menores;
- 7) mascotas y otros animales no productores de alimentos;
- 8) aditivos ya autorizados en la alimentación humana;
- 9) modificación de autorizaciones;
- 10) renovación de autorizaciones;
- 11) reevaluación de determinados aditivos ya autorizados conforme a la Directiva 70/524/CEE.

La solicitud podrá presentarse ateniéndose a más de uno de los requisitos específicos mencionados.

Condiciones generales

Deberá justificarse la omisión en el expediente de cualquiera de los datos prescritos en estas secciones.

1. ADITIVOS TECNOLÓGICOS**1.1. Sección I: Resumen del expediente**

Será de aplicación la sección I del anexo II en su totalidad.

1.2. Sección II: Identidad, características y condiciones de utilización del aditivo; métodos de análisis

La sección II del anexo II se aplicará como sigue:

- en relación con los aditivos no sujetos a un titular de la autorización específico, serán de aplicación los puntos 2.1.2, 2.1.3, 2.1.4, 2.1.4.2, 2.2, 2.3.1, 2.3.2, 2.4.1, 2.4.2, 2.4.4, 2.5 y 2.6,
- en relación con otros aditivos sujetos a un titular de la autorización específico, será de aplicación la sección II en su totalidad.

1.3. Sección III: Estudios sobre la inocuidad del aditivo

Las subsecciones 3.1, 3.2 y 3.4 del anexo II no se aplicarán a los aditivos de ensilado cuando pueda demostrarse que:

- en el pienso final no quedan cantidades detectables de las sustancias activas o los metabolitos pertinentes, ni de los agentes activos, o
- las sustancias o agentes activos aparecen como componentes normales del ensilado y el uso del aditivo no aumenta sustancialmente su concentración si se compara con el ensilado preparado sin el aditivo (es decir, que no se produce un cambio sustancial de la exposición).

En los demás casos, será de aplicación la sección III del anexo II en su totalidad.

1.3.1. Estudios sobre la seguridad de utilización del aditivo para los animales destinatarios

En relación con las sustancias xenobióticas ⁽¹⁾: será de aplicación la subsección 3.1 del anexo II en su totalidad.

1.3.1.1. Estudios de tolerancia en las especies destinatarias

Aditivos de ensilado:

- el producto se añadirá a una dieta básica y los resultados se compararán con un grupo de referencia negativo con la misma dieta. La dieta básica podrá contener una fuente única de ensilado preparado sin el aditivo,
- la dosis escogida para los estudios de tolerancia será un múltiplo de la concentración presente en el material ensilado en el momento de utilización normal, siempre que pueda establecerse de manera concluyente. Deberá prestarse una atención especial a los productos que contengan microorganismos viables y a la capacidad de estos para sobrevivir y proliferar durante el ensilaje.

Por lo general, los estudios de tolerancia pueden limitarse a una especie rumiante, normalmente las vacas lecheras. Solo se requieren estudios con otras especies cuando la naturaleza del material ensilado lo hace más apropiado para animales no rumiantes.

Otras sustancias:

En el caso de otras sustancias para las que se solicite la autorización como aditivos tecnológicos cuyo uso no esté ya autorizado en los piensos, deberá demostrarse que, al máximo nivel propuesto, no causan daños a los animales. Esta demostración podrá limitarse a un experimento con una de las especies destinatarias más sensibles o con una especie de animales de laboratorio.

1.3.1.2. Estudios microbianos

Será de aplicación el punto 3.1.2 del anexo II en su totalidad.

1.3.2. Estudios sobre la seguridad de utilización del aditivo para los consumidores

1.3.2.1. Estudios metabólicos y de residuos

No se requerirán estudios metabólicos y de residuos si:

- 1) ni la sustancia ni sus metabolitos están presentes en los piensos en el momento de su administración, o
- 2) la sustancia se excreta sin modificar, o puede demostrarse que, en esencia, sus metabolitos no son absorbidos; o

⁽¹⁾ Xenobiótica es aquella sustancia química que no constituye un componente natural del organismo expuesto a ella. También pueden ser xenobióticas las sustancias presentes en concentraciones muy superiores a las habituales.

- 3) la sustancia se absorbe en forma de compuestos fisiológicos, o
- 4) los componentes activos del aditivo consisten únicamente en microorganismos o enzimas.

Tampoco será necesario realizar estudios metabólicos si la sustancia está presente de forma natural y en cantidades importantes en alimentos o piensos, o si es un componente normal de los fluidos corporales o los tejidos. Sin embargo, en estos casos sí habrá que realizar estudios de residuos, que podrán limitarse a comparar los niveles en los tejidos o productos de un grupo no tratado con los del grupo que haya recibido suplementos de la dosis máxima recomendada.

1.3.2.2. Estudios toxicológicos

No se requerirán estudios toxicológicos si:

- 1) ni la sustancia ni sus metabolitos están presentes en los piensos en el momento de su administración, o
- 2) la sustancia se absorbe en forma de compuestos fisiológicos, o
- 3) el producto consiste en microorganismos que se encuentran habitualmente en los materiales ensilados o que ya se emplean en la alimentación humana, o
- 4) el producto consiste en enzimas con un elevado grado de pureza obtenidas de microorganismos con un historial de uso seguro documentado.

En relación con los microorganismos y enzimas no excluidos anteriormente, serán necesarios estudios de genotoxicidad (en especial la mutagenicidad) y un estudio de toxicidad oral subcrónica. Los estudios de genotoxicidad no se realizarán en presencia de células vivas.

En el caso de las sustancias xenobióticas no eximidas anteriormente, será de aplicación el punto 3.2.2 del anexo II en su totalidad.

Con respecto a las demás sustancias, deberá analizarse cada caso en particular, teniendo en cuenta el nivel y el medio de exposición.

1.3.2.3. Evaluación de la seguridad de los consumidores

El punto 3.2.3 del anexo II se aplicará en su totalidad a los aditivos cuya autorización se solicite para animales productores de alimentos.

1.3.3. Estudios sobre la seguridad de utilización del aditivo para los usuarios o los trabajadores

Será de aplicación la subsección 3.3 del anexo II en su totalidad. Se presupone que los aditivos que contienen enzimas y microorganismos son sensibilizantes respiratorios, salvo que se aporten pruebas convincentes de lo contrario.

1.3.4. Estudios sobre la seguridad de utilización del aditivo para el medio ambiente

Será de aplicación la subsección 3.4 del anexo II en su totalidad. En el caso de los aditivos de ensilado, deberán estudiarse los efectos del aditivo en la producción de efluente procedente del almiar o el silo durante el ensilaje.

1.4. Sección IV: Estudios sobre la eficacia del aditivo

Los aditivos tecnológicos tienen como finalidad mejorar o estabilizar las características del pienso, pero, por lo general, carecen de efectos biológicos directos en la producción animal. Deberá probarse la eficacia del aditivo por medio de criterios adecuados recogidos en métodos reconocidos aceptables, en las condiciones prácticas de utilización previstas y en comparación con piensos de referencia adecuados.

La eficacia se evaluará en estudios *in vitro*, con excepción de las sustancias para el control de la contaminación con radionucleidos. En el siguiente cuadro se indican los criterios de valoración apropiados para los diversos grupos funcionales.

Criterios de valoración para diversos aditivos tecnológicos

Grupo funcional	Criterios de valoración para demostrar la eficacia
a) Conservantes	Inhibición del crecimiento microbiano, en especial de los organismos bióticos y de deterioro. Deberá demostrarse el período con efecto conservador que se solicita
b) Antioxidantes	Protección contra el daño oxidativo de nutrientes o componentes esenciales durante la transformación o el almacenamiento del pienso. Deberá demostrarse el período con efecto protector que se solicita
c) Emulgentes	Formación o mantenimiento de emulsiones estables de ingredientes de piensos que, de lo contrario, serían inmiscibles o muy poco miscibles
d) Estabilizantes	Mantenimiento del estado fisicoquímico de los piensos
e) Espesantes	Viscosidad de los materiales para piensos o los piensos
f) Gelificantes	Formación de un gel que modifica la textura del pienso
g) Ligantes	Durabilidad de los gránulos o eficacia de la granulación
h) Sustancias para el control de los radionucleidos	Pruebas de una menor contaminación de los alimentos de origen animal
i) Antiaglomerantes	Capacidad fluidificante. Deberá demostrarse el período con efecto antiaglomerante que se solicita
j) Reguladores de la acidez	pH o capacidad amortiguadora en los piensos
k) Aditivos de ensilado	— Mejor producción de ensilado — Inhibición de microorganismos indeseables — Reducción de efluentes — Mejor estabilidad aeróbica
l) Desnaturalizantes	Identificación indeleble de los materiales para piensos

Aditivos de ensilado

Deberán realizarse pruebas aparte para demostrar el efecto objeto de la solicitud en el proceso de ensilaje ⁽²⁾. Los ensayos se llevarán a cabo con un ejemplo de cada una de las siguientes categorías (en las que se incluyen todos los forrajes o forrajes no específicos):

- forraje fácil de ensilar: > 3 % de hidratos de carbono solubles en el material fresco (por ejemplo, la planta de maíz entera, ballico, bromo o pulpa de remolacha azucarera),
- forraje moderadamente difícil de ensilar: 1,5 a 3,0 % de hidratos de carbono solubles en el material fresco (por ejemplo, poa, cañuela o alfalfa marchita),
- forraje difícil de ensilar: < 1,5 % de hidratos de carbono solubles en el material fresco (por ejemplo, dátilo o plantas leguminosas).

Cuando las solicitudes se limiten a subcategorías de forraje descritas en términos de materia seca, deberá indicarse explícitamente el intervalo de materia seca. Se realizarán tres pruebas con material representativo de ese intervalo, a ser posible con ejemplos de origen botánico diverso.

Los piensos particulares requerirán pruebas específicas.

⁽²⁾ A los efectos de este Reglamento, se entenderá por «proceso de ensilaje» el proceso por el cual el deterioro natural de la materia orgánica se controla mediante la acidificación en condición anaeróbica resultante de la fermentación natural o la adición de aditivos de ensilado.

El estudio tendrá normalmente una duración mínima de 90 días, a una temperatura constante (intervalo recomendado: 15-25 °C). Si la duración es inferior, deberá justificarse.

Por norma, deberán aportarse mediciones de los siguientes parámetros comparadas con el grupo de referencia negativo:

- materia seca y pérdidas de materia seca calculadas (con corrección por volátiles),
- reducción del pH,
- concentración de ácidos grasos volátiles (por ejemplo, acéticos, butíricos y propiónicos) y ácido láctico,
- concentración de alcoholes (etanol),
- concentración de amoníaco (g/kg de nitrógeno total), y
- contenido de hidratos de carbono hidrosolubles.

Además, para fundamentar la solicitud específica presentada se incluirán otros parámetros microbiológicos y químicos apropiados (por ejemplo, recuento de levaduras asimiladoras de lactato, recuento de *Clostridia*, recuento de *Listeria* y aminas biogénicas).

El efecto de reducción de efluente se evaluará tomando como referencia el volumen total de efluente producido a lo largo de todo el período experimental, teniendo en cuenta el efecto probable sobre el medio ambiente (por ejemplo, toxicidad del efluente o demanda biológica de oxígeno). La disminución en la producción de efluente deberá demostrarse directamente. El silo tendrá capacidad suficiente para que el efluente pueda liberarse aplicando presión. La duración normal del estudio será de 50 días. Si el período tiene una duración diferente, deberá justificarse.

La mejora de la estabilidad aeróbica se demostrará por comparación con un grupo de referencia negativo. Los estudios de estabilidad deberán durar al menos 7 días tras la exposición al aire, y el aditivo tendrá que dar pruebas de estabilidad al menos durante 2 días más que el grupo de referencia sin tratamiento. Se recomienda realizar el experimento a una temperatura ambiente de 20 °C y tomar como indicio de inestabilidad un aumento de 3 °C o más sobre la temperatura de base. Las mediciones de la temperatura podrán sustituirse por la medición de la producción de CO₂.

1.5. **Sección V: Plan de seguimiento consecutivo a la comercialización**

Esta sección se aplicará conforme a lo dispuesto en el artículo 7, apartado 3, letra g), del Reglamento (CE) n° 1831/2003. Es decir, que solo se requerirá un plan de seguimiento consecutivo a la comercialización para los aditivos que sean OMG o se hayan producido a partir de OMG.

2. **ADITIVOS ORGANOLÉPTICOS**

2.1. **Colorantes**

2.1.1. *Sección I: Resumen del expediente*

Será de aplicación la sección I del anexo II en su totalidad.

2.1.2. *Sección II: Identidad, características y condiciones de utilización del aditivo; métodos de análisis*

La sección II del anexo II se aplicará como sigue:

- en relación con los aditivos no sujetos a un titular de la autorización específico, serán de aplicación los puntos 2.1.2, 2.1.3, 2.1.4, 2.1.4.2, 2.2, 2.3.1, 2.3.2, 2.4.1, 2.4.2, 2.4.4, 2.5 y 2.6,
- en relación con otros aditivos sujetos a un titular de la autorización específico, será de aplicación la sección II en su totalidad.

2.1.3. *Sección III: Estudios sobre la seguridad de utilización del aditivo*

La subsección 3.3 del anexo II será aplicable en su totalidad a cada aditivo.

- 1) En relación con las sustancias que, cuando se administran a los animales, dan color a los alimentos de origen animal, serán de aplicación las subsecciones 3.1, 3.2 y 3.4 de la sección III del anexo II en su totalidad.
- 2) Con respecto a las sustancias que dan color a los piensos, o restauran su color, se realizarán los estudios contemplados en la subsección 3.1 de la sección III, en animales que reciban el aditivo a la dosis recomendada. También se admitirán como pruebas las referencias a la literatura científica disponible. Serán de aplicación las subsecciones 3.2 y 3.4 de la sección III del anexo II.
- 3) Por lo que se refiere a las sustancias que afectan favorablemente al color de los peces y las aves ornamentales, deberán realizarse los estudios contemplados en la subsección 3.1 de la sección III del anexo II, en animales que reciban el aditivo a la dosis recomendada. También se admitirán como pruebas las referencias a la literatura científica disponible. Sin embargo, no será necesario seguir lo dispuesto en las subsecciones 3.2 y 3.4.

2.1.4. *Sección IV: Estudios sobre la eficacia del aditivo*

Será de aplicación la sección IV del anexo II en su totalidad.

- a) En relación con las sustancias que, cuando se administran a los animales, dan color a los alimentos de origen animal:

Deberán medirse, con la metodología apropiada, los cambios de color de los productos obtenidos de animales a los que se administre el aditivo en las condiciones de utilización recomendadas. Deberá demostrarse que el uso del aditivo no afecta negativamente a la estabilidad de los productos ni a las cualidades organolépticas y nutricionales de los alimentos. En principio, si los efectos de una sustancia concreta sobre la composición o las características de productos animales están bien documentados, otros estudios (por ejemplo, de biodisponibilidad) podrán ofrecer pruebas adecuadas de la eficacia.

- b) Con respecto a las sustancias que dan color a los piensos, o restauran su color:

Deberán aportarse pruebas de la eficacia por medio de estudios de laboratorio adecuados en los que queden reflejadas las condiciones de utilización previstas, en comparación con piensos de referencia.

- c) Por lo que se refiere a las sustancias que afectan favorablemente al color de los peces y las aves ornamentales:

Deberán realizarse estudios que demuestren los efectos en animales que reciban el aditivo a los niveles de uso recomendados. Los cambios de color deberán medirse con la metodología apropiada. También podrá demostrarse la eficacia con otros estudios experimentales (por ejemplo, de biodisponibilidad) o con referencias a la literatura científica.

2.1.5. *Sección V: Plan de seguimiento consecutivo a la comercialización*

Esta sección se aplicará conforme a lo dispuesto en el artículo 7, apartado 3, letra g), del Reglamento (CE) nº 1831/2003. Es decir, que solo se requerirá un plan de seguimiento consecutivo a la comercialización para los aditivos que sean OMG o se hayan producido a partir de OMG.

2.2. **Compuestos aromatizantes**

2.2.1. *Sección I: Resumen del expediente*

Será de aplicación la sección I del anexo II en su totalidad.

2.2.2. *Sección II: Identidad, características y condiciones de utilización del aditivo; métodos de análisis*

En general, en el caso del grupo «productos naturales», las plantas enteras, los animales y otros organismos, así como las partes o productos de los mismos que sean el resultado de una transformación muy limitada, como es la trituration, la molienda o la desecación (como ocurre, por ejemplo, con muchas hierbas y especias), no se considerarán incluidos en el grupo funcional de los aromatizantes dentro de la categoría de aditivos organolépticos.

A efectos de la evaluación de las solicitudes relativas a estos productos, los aromatizantes se clasifican como sigue:

1. Productos naturales:
 - 1.1. Productos naturales, botánicamente definidos.
 - 1.2. Productos naturales, de origen no vegetal.
2. Aromatizantes naturales, o los correspondientes aromatizantes sintéticos, químicamente definidos.
3. Sustancias artificiales.

Deberá indicarse el grupo al que pertenece el producto objeto de la solicitud. Si el producto no encaja en ninguno de los grupos mencionados, deberá señalarse y justificarse esta circunstancia.

2.2.2.1. Caracterización de las sustancias o agentes activos

Será de aplicación la subsección 2.2 del anexo II en su totalidad.

Además:

En relación con todos los grupos de aromatizantes, deberán indicarse, siempre que estén disponibles, los números distintivos pertinentes (FLAVIS ⁽³⁾), Consejo de Europa ⁽⁴⁾), JECFA, CAS ⁽⁵⁾ o cualquier otro sistema de numeración aceptado a nivel internacional) utilizados específicamente para identificar los productos aromatizantes empleados en piensos y alimentos.

- 1) Productos naturales, botánicamente definidos.

La caracterización de los productos naturales botánicamente definidos incluirá la denominación científica de la planta de origen, su clasificación botánica (familia, género, especie y, si procede, subespecie y variedad) y los nombres comunes y sinónimos en el mayor número de lenguas europeas posible o en otras lenguas (por ejemplo, las del lugar de cultivo o de origen), si los hay. Deberán indicarse las partes de la planta utilizadas (hojas, flores, semillas, frutos, tubérculos, etc.) y, en el caso de plantas menos conocidas, el lugar de cultivo, los criterios de identificación y otros aspectos relevantes. Se identificarán y cuantificarán los principales componentes del extracto y se indicará su gama o variabilidad. Deberá prestarse una atención especial a las impurezas según el punto 2.1.4 del anexo II. Asimismo, deberá informarse de las concentraciones de sustancias de interés toxicológico ⁽⁶⁾ para las personas y los animales que pueden estar presentes en la planta de la que proviene el extracto.

Deberá hacerse un estudio completo de las propiedades farmacológicas o relacionadas de la planta de origen, de sus partes o de los productos derivados, e informarse al respecto.

- 2) Productos naturales, de origen no vegetal.

Podrá seguirse un enfoque equivalente al anterior.

- 3) Aromatizantes naturales, o los correspondientes aromatizantes sintéticos, químicamente definidos.

Además de los requisitos generales del punto 2.2.1.1 del anexo II, deberá especificarse el origen del aromatizante.

⁽³⁾ Número de identificación de las sustancias aromatizantes químicamente definidas empleado en el sistema de la UE de información sobre aromatizantes, FLAVIS, la base de datos utilizada conforme al Reglamento (CE) n° 1565/2000 de la Comisión, de 18 de julio de 2000, por el que se establecen las medidas necesarias para la adopción de un programa de evaluación con arreglo al Reglamento (CE) n° 2232/96 del Parlamento Europeo y del Consejo (DO L 180 de 19.7.2000, p. 8).

⁽⁴⁾ N° CoE: Número del Consejo de Europa empleado para los productos aromatizantes botánicamente definidos en el Informe n° 1 del Consejo de Europa sobre «*Natural sources of flavourings*» (fuentes naturales de aromatizantes), volumen I, Estrasburgo 2000, y volúmenes posteriores.

⁽⁵⁾ Número de registro del Chemical Abstracts Service, identificador único de las sustancias químicas ampliamente utilizado en los listados de inventarios químicos.

⁽⁶⁾ A los efectos del presente Reglamento, se entiende por «sustancia de interés toxicológico» una sustancia con una ingesta diaria o semanal tolerable, una IDA o una restricción de uso, o bien un principio activo según se define en la Directiva 88/388/CEE, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en el ámbito de los aromas que se utilizan en los productos alimenticios y de los materiales de base para su producción, o bien una sustancia indeseable.

2.2.2.2. Método de producción y fabricación

Será de aplicación la subsección 2.3 del anexo II en su totalidad.

En el caso de productos naturales que no estén bien definidos químicamente, normalmente mezclas complejas de muchos compuestos obtenidos mediante un proceso de extracción, deberá describirse al detalle dicho proceso. Se recomienda emplear en la descripción la terminología pertinente, como aceite esencial, absoluto, tintura, extracto y términos relacionados⁽⁷⁾, que suele utilizarse en relación con los productos aromatizantes botánicamente definidos para describir el proceso de extracción. Deberán especificarse los disolventes de extracción utilizados y las precauciones tomadas para evitar los residuos de disolventes, así como los niveles de residuos cuando revistan interés toxicológico y su presencia sea inevitable. En la caracterización del extracto podrá hacerse referencia al método de extracción.

2.2.2.3. Métodos de análisis

- 1) En relación con los productos naturales (botánicamente definidos o de origen no vegetal) que no contengan sustancias de interés toxicológico para las personas ni los animales, el requisito estándar relativo a los métodos de análisis de la subsección 2.6 del anexo II podrá sustituirse por un método cualitativo de análisis más sencillo que se ajuste a los fines y sea pertinente para los componentes principales o característicos del producto.
- 2) En relación con los aromatizantes naturales, o los correspondientes aromatizantes sintéticos, químicamente definidos que no sean sustancias de interés toxicológico para las personas ni los animales, el requisito estándar relativo a los métodos de análisis de la subsección 2.6 del anexo II podrá sustituirse por un método cualitativo de análisis más sencillo que se ajuste a los fines.

La subsección 2.6 del anexo II se aplicará en su totalidad a todos los demás aromatizantes, como son los extractos naturales que contienen sustancias de interés toxicológico y los aromatizantes naturales, o los correspondientes aromatizante sintéticos, químicamente definidos que son en sí mismos sustancias de interés toxicológico, así como los aromatizantes artificiales.

2.2.3. Sección III: Estudios sobre la inocuidad del aditivo

Deberán aportarse, en relación con todos los aromatizantes, cálculos de la exposición y la ingesta animales que se deriven de la exposición natural y de la adición del aromatizante a los piensos.

En el caso de los aromatizantes del grupo de las sustancias artificiales, será de aplicación la sección III del anexo II en su totalidad.

2.2.3.1. Estudios sobre la seguridad de utilización del aditivo para los animales destinatarios

- 1) Productos naturales (botánicamente definidos o de origen no vegetal)

La inocuidad de estos productos podrá evaluarse sobre la base de sus componentes principales y característicos y teniendo en cuenta sustancias conocidas de interés toxicológico. Si los componentes principales o característicos no están ya autorizados como aromatizantes químicamente definidos ni como aditivos para piensos, habrá que verificar si son sustancias de interés toxicológico para las personas o los animales, y deberán indicarse sus propiedades toxicológicas de acuerdo con la subsección 3.1 del anexo II.

- 2) Aromatizantes naturales, o los correspondientes aromatizantes sintéticos, químicamente definidos

Si estas sustancias son aromatizantes autorizados para los humanos, la inocuidad para las especies destinatarias podrá evaluarse comparando su nivel de ingesta a través del pienso, propuesto por el solicitante, con el de las personas a través de los alimentos. Deberán presentarse los datos metabólicos y toxicológicos en los que se haya basado la evaluación relativa a la utilización en los humanos.

En todos los casos en que el nivel de ingesta no sea similar, por ejemplo cuando el nivel de ingesta del animal destinatario propuesto por el solicitante sea muy superior al de las personas a través de los alimentos, o cuando no esté autorizado el uso de la sustancia en la alimentación humana, la inocuidad para los animales destinatarios podrá evaluarse teniendo en cuenta los siguientes datos: el principio de umbral de interés toxicológico⁽⁸⁾, los datos toxicológicos y metabólicos disponibles sobre compuestos relacionados y la alerta estructural química [por analogía con el Reglamento (CE) n° 1565/2000 de la Comisión, de 18 de julio de 2000, por el que se establecen las medidas necesarias para la adopción de un programa de evaluación con arreglo al Reglamento (CE) n° 2232/96 del Parlamento Europeo y del Consejo⁽⁹⁾].

Solo serán necesarios estudios de tolerancia cuando se sobrepasen o no puedan determinarse los valores umbral.

⁽⁷⁾ Definidos en el apéndice 4 del Informe n° 1 del Consejo de Europa sobre «Natural sources of flavourings», volumen I, Estrasburgo, 2000.

⁽⁸⁾ El umbral correspondiente del JECFA (FAO/WHO, 1996, *Food additive series* 35, IPCS, OMS, Ginebra) para el animal destinatario debería ajustarse a fin de tener en cuenta el peso del animal y la ingesta del pienso.

⁽⁹⁾ DO L 180 de 19.7.2000, p. 8.

2.2.3.2. Estudios sobre la seguridad de utilización del aditivo para los consumidores

Deberán aportarse pruebas de que los metabolitos del aromatizante no dan lugar a una acumulación en los productos animales de interés toxicológico para los humanos. Cuando la adición del producto aromatizante objeto de la solicitud en los piensos genere residuos en los alimentos de origen animal, deberá calcularse con precisión la exposición de los consumidores.

a) Estudios metabólicos y de residuos

1) Productos naturales (botánicamente definidos o de origen no vegetal)

La inocuidad de estos productos para las personas cuando se utilicen como aromatizantes en los piensos, por lo que se refiere a su metabolismo, podrá basarse en los estudios metabólicos (en el animal destinatario) y de residuos de sus componentes principales y característicos y en la ausencia de sustancias de interés toxicológico en el extracto.

Si los componentes principales o característicos no están ya autorizados como aromatizantes químicamente definidos o el nivel de ingesta de los animales destinatarios a través de los piensos es muy superior al de los humanos a través de los alimentos, será de aplicación el punto 3.2.1 del anexo II en su totalidad.

2) Aromatizantes naturales, o los correspondientes aromatizantes sintéticos, químicamente definidos

Si estos productos no están autorizados como aromatizantes para el consumo humano, o si el nivel de ingesta del animal destinatario a través de los piensos, propuesto por el solicitante, es muy superior al de las personas a través de los alimentos, deberán aportarse y utilizarse los datos disponibles sobre el destino metabólico para evaluar la acumulación potencial en los tejidos y productos comestibles conforme al punto 3.2.1 del anexo II.

b) Estudios toxicológicos

1) Productos naturales (botánicamente definidos o de origen no vegetal)

La inocuidad de estos productos para las personas cuando se utilicen como aromatizantes en los piensos podrá basarse en los datos toxicológicos de sus componentes principales y característicos y en la ausencia de sustancias de interés toxicológico en el extracto.

Se requerirá un conjunto de estudios toxicológicos cuando los estudios metabólicos de los componentes principales o característicos muestren que existe acumulación en los tejidos o productos animales y que se sobrepasan los umbrales de interés toxicológico para el animal destinatario. Dicho conjunto comprenderá estudios de genotoxicidad, en especial la mutagenicidad, y un estudio de toxicidad oral subcrónica, de acuerdo con el punto 3.2.2 del anexo II.

2) Aromatizantes naturales, o los correspondientes aromatizantes sintéticos, químicamente definidos

Cuando los estudios metabólicos de los componentes principales o característicos muestren que existe acumulación en los tejidos o productos animales y que se sobrepasan los umbrales de interés toxicológico para el animal destinatario, se requerirá un conjunto de estudios toxicológicos que comprenderá estudios de genotoxicidad, en especial la mutagenicidad, y un estudio de toxicidad oral subcrónica, de acuerdo con el punto 3.2.2 del anexo II.

2.2.3.3. Estudios sobre la seguridad de utilización del aditivo para los usuarios o los trabajadores

Será de aplicación la subsección 3.3 del anexo II en su totalidad.

2.2.3.4. Estudios sobre la seguridad de utilización del aditivo para el medio ambiente

Será de aplicación la subsección 3.4 del anexo II en su totalidad.

2.2.4. Sección IV: Estudios sobre la eficacia del aditivo

Se aportarán pruebas de las propiedades del aromatizante, normalmente basadas en la bibliografía publicada. También podrán demostrarse mediante la experiencia del uso en la práctica, si se tiene, o, de lo contrario, serán necesarios estudios con animales.

Toda función que el producto objeto de la solicitud ejerza en el pienso, el animal o el alimento de origen animal distinta de la contemplada en la definición de compuesto aromatizante del anexo I del Reglamento (CE) n° 1831/2003 deberá estudiarse en profundidad y comunicarse.

2.2.5. *Sección V: Plan de seguimiento consecutivo a la comercialización*

Esta sección se aplicará conforme a lo dispuesto en el artículo 7, apartado 3, letra g), del Reglamento (CE) nº 1831/2003. Es decir, que solo se requerirá un plan de seguimiento consecutivo a la comercialización para los aditivos que sean OMG o se hayan producido a partir de OMG.

3. **ADITIVOS NUTRICIONALES**

3.1. **Sección I: Resumen del expediente**

Será de aplicación la sección I del anexo II en su totalidad.

3.2. **Sección II: Identidad, características y condiciones de utilización del aditivo; métodos de análisis**

La sección II del anexo II se aplicará como sigue:

- en relación con los aditivos no sujetos a un titular de la autorización específico, serán de aplicación los puntos 2.1.2, 2.1.3, 2.1.4, 2.1.4.2, 2.2, 2.3.1, 2.3.2, 2.4.1, 2.4.2, 2.4.4, 2.5 y 2.6,
- en relación con otros aditivos sujetos a un titular de la autorización específico, será de aplicación la sección II en su totalidad.

3.3. **Sección III: Estudios sobre la inocuidad del aditivo**

3.3.1. *Estudios sobre la seguridad de utilización del aditivo en las especies destinatarias*

3.3.1.1. Tolerancia de las especies destinatarias

1. No serán necesarios estudios en relación con la urea, con los aminoácidos y sus sales y análogos autorizados por la Directiva 82/471/CEE, con los compuestos de oligoelementos ni con las vitaminas, provitaminas y sustancias químicamente bien definidas de efecto análogo que carezcan de potencial de acumulación y estén ya autorizados como aditivos para piensos conforme a la Directiva 70/524/CEE.
2. En relación con aquellos aditivos que entren en el grupo funcional de las «vitaminas, provitaminas y sustancias químicamente bien definidas de efecto análogo» y sean susceptibles de acumulación, solo deberá demostrarse la tolerancia con respecto a los compuestos cuya potencia esperada o probada sea diferente de la de las vitaminas bien establecidas. En determinados casos, podrán combinarse elementos de la prueba de tolerancia (diseño o criterios) con uno de los ensayos de eficacia.
3. La tolerancia se demostrará con respecto a los derivados de la urea, los análogos de aminoácidos y los compuestos de oligoelementos no autorizados previamente. Las solicitudes relativas a productos de la fermentación se realizarán demostrando la tolerancia, salvo que la sustancia activa se separe del producto de la fermentación crudo y se someta a un alto grado de purificación, o que el organismo de producción tenga un historial de uso aparentemente seguro y una biología bien conocida como para descartar que pueda producir metabolitos tóxicos.
4. Cuando la solicitud se refiera a todas las especies o categorías de animales, bastará con un estudio de tolerancia en la especie más sensible (o incluso un animal de laboratorio apropiado) según los conocimientos más avanzados.

3.3.1.2. Estudios microbianos

Será de aplicación el punto 3.1.2 del anexo II en su totalidad.

3.3.2. *Estudios sobre la seguridad de utilización del aditivo para los consumidores*

3.3.2.1. Estudios metabólicos y de residuos

Normalmente no serán necesarios estudios metabólicos. En relación con los derivados de la urea, el metabolismo de los rumiantes se estudiará en los ensayos de eficacia.

Solo se requerirán estudios de residuos y de deposiciones en relación con los aditivos incluidos en el grupo funcional «vitaminas, provitaminas y sustancias químicamente bien definidas de efecto análogo» susceptibles de acumulación en el cuerpo y en relación con el grupo funcional de los compuestos de oligoelementos cuando la biodisponibilidad se haya incrementado. En tal caso, no será de aplicación el procedimiento descrito en el punto 3.2.1 del anexo II. El requisito se limita a la comparación de los niveles en los tejidos o los productos entre el grupo suplementado con la dosis máxima de la sustancia objeto de la solicitud y un grupo de referencia positivo (compuesto de referencia).

3.3.2.2. Estudios toxicológicos

Serán necesarios para los productos de la fermentación y los aditivos que no estén ya autorizados. Por lo que respecta a los productos de la fermentación, deberán aportarse estudios de genotoxicidad y de toxicidad subcrónica, a no ser que:

- 1) la sustancia activa se separe del producto de fermentación crudo y se someta a un alto grado de purificación, o
- 2) el organismo de producción tenga un historial de uso aparentemente seguro y su biología se conozca lo bastante como para descartar que pueda producir metabolitos tóxicos.

Si el organismo de producción pertenece a un grupo en el que se sabe que hay cepas productoras de toxinas, estas se excluirán específicamente.

3.3.2.3. Evaluación de la seguridad de los consumidores

Será de aplicación el punto 3.2.3 del anexo II en su totalidad.

3.3.3. Estudios sobre la seguridad de utilización del aditivo para los usuarios o los trabajadores

Será de aplicación la subsección 3.3 del anexo II en su totalidad.

3.3.4. Estudios sobre la seguridad de utilización del aditivo para el medio ambiente

La subsección 3.4 del anexo II será de aplicación en su totalidad para las nuevas sustancias activas pertenecientes al grupo de los compuestos de oligoelementos.

3.4. Sección IV: Estudios sobre la eficacia del aditivo

No serán necesarios estudios de eficacia en relación con la urea, con los aminoácidos y sus sales y análogos, con los compuestos de oligoelementos ni con las vitaminas, provitaminas y sustancias químicamente bien definidas de efecto análogo que ya estén autorizados como aditivos para piensos.

Se requerirá un estudio breve en apoyo de la eficacia en relación con los derivados de la urea, las sales y análogos de aminoácidos, los compuestos de oligoelementos y las vitaminas, provitaminas y sustancias químicamente bien definidas de efecto análogo que no estén ya autorizados como aditivos para piensos.

Las solicitudes relativas al efecto nutricional de otras sustancias deberán incluir al menos un estudio de eficacia prolongado conforme a lo dispuesto en la sección IV del anexo II.

Cuando así se requiera, los estudios deberán demostrar que el aditivo puede satisfacer las exigencias nutricionales de los animales. Los ensayos deberán incluir un grupo experimental con una dieta que contenga el nutriente en concentraciones inferiores a las exigencias de los animales. Sin embargo, se evitarán los ensayos en los que se utilice un grupo de referencia extremadamente deficitario. En general, bastará con demostrar la eficacia en una única especie o categoría de animales, incluidos los de laboratorio.

3.5. Sección V: Plan de seguimiento consecutivo a la comercialización

Esta sección se aplicará conforme a lo dispuesto en el artículo 7, apartado 3, letra g), del Reglamento (CE) nº 1831/2003.

4. ADITIVOS ZOOTÉCNICOS

4.1. Aditivos zootécnicos distintos de las enzimas y los microorganismos

4.1.1. Sección I: Resumen del expediente

Será de aplicación la sección I del anexo II en su totalidad.

4.1.2. Sección II: Identidad, características y condiciones de utilización del aditivo; métodos de análisis

Será de aplicación la sección II del anexo II en su totalidad.

4.1.3. Sección III: Estudios sobre la inocuidad del aditivo

4.1.3.1. Estudios sobre la seguridad de utilización del aditivo para los animales destinatarios

Será de aplicación la subsección 3.1 del anexo II en su totalidad.

4.1.3.2. Estudios sobre la seguridad de utilización del aditivo para los consumidores

1) Estudios metabólicos y de residuos

No se requerirán estos estudios si:

- se puede demostrar que la sustancia o sus metabolitos se excretan sin modificar y que, en esencia, no son absorbidos, o
- la sustancia se absorbe en la forma y nivel fisiológicos de los compuestos.

Tampoco será necesario realizar estudios metabólicos si la sustancia está presente de forma natural y en cantidades importantes en alimentos o piensos, o si es un componente normal de los fluidos corporales o los tejidos. Sin embargo, en estos casos sí habrá que realizar estudios de residuos, que podrán limitarse a comparar los niveles en los tejidos o productos de un grupo no tratado con los del grupo que haya recibido suplementos de la dosis máxima recomendada.

En todos los demás casos, será de aplicación el punto 3.2.1 del anexo II en su totalidad.

2) Estudios toxicológicos

No serán necesarios estudios toxicológicos si la sustancia se absorbe en forma de compuestos fisiológicos.

En relación con las sustancias xenobióticas, será de aplicación el punto 3.2.2 del anexo II en su totalidad.

Con respecto a otras sustancias, deberá analizarse cada caso en particular teniendo en cuenta el nivel y el medio de exposición, y la omisión de cualquier dato prescrito en la presente sección deberá ser plenamente justificada.

3) Evaluación de la seguridad de los consumidores

El punto 3.2.3 del anexo II se aplicará en su totalidad a los animales productores de alimentos.

4.1.3.3. Estudios sobre la seguridad del aditivo para los usuarios o los trabajadores

Será de aplicación la subsección 3.3 del anexo II en su totalidad.

4.1.3.4. Estudios sobre la seguridad del aditivo para el medio ambiente

Será de aplicación la subsección 3.4 del anexo II en su totalidad.

4.1.4. Sección IV: Estudios sobre la eficacia del aditivo

Será de aplicación la sección IV del anexo II en su totalidad.

- 1) Aditivos con efectos positivos en la producción animal o el rendimiento o bienestar de los animales e incluidos en el grupo funcional «otros aditivos zootécnicos»

Los efectos solo podrán demostrarse en relación con cada especie o categoría de animales destinataria. Dependiendo de las propiedades del aditivo, las medidas resultantes podrán basarse en las características de rendimiento (por ejemplo, la eficiencia de conversión del pienso, la ganancia de peso diaria media o el aumento de los productos animales), la composición de la canal, el rendimiento del hato, los parámetros reproductivos o el bienestar animal. Las pruebas del modo de actuación podrán consistir en estudios de eficacia breves o estudios de laboratorio en los que se mida el criterio de valoración pertinente.

- 2) Aditivos con efectos positivos en las repercusiones medioambientales de la producción animal

En relación con estos aditivos que afectan favorablemente al medio ambiente (por ejemplo, reducción de las excreciones de nitrógeno o fósforo o de la producción de metano, malos sabores), podrán presentarse pruebas de la eficacia en las especies destinatarias en tres estudios breves de eficacia con animales que muestren unos efectos beneficiosos significativos. En estos estudios deberá tenerse presente la posibilidad de una respuesta adaptativa al aditivo.

4.1.5. Sección V: Plan de seguimiento consecutivo a la comercialización

Esta sección se aplicará conforme a lo dispuesto en el artículo 7, apartado 3, letra g), del Reglamento (CE) nº 1831/2003.

4.2. Aditivos zootécnicos: enzimas y microorganismos

4.2.1. Sección I: Resumen del expediente

Será de aplicación la sección I del anexo II en su totalidad.

4.2.2. Sección II: Identidad, características y condiciones de utilización del aditivo; métodos de análisis

Será de aplicación la sección II del anexo II en su totalidad.

4.2.3. Sección III: Estudios sobre la inocuidad del aditivo

4.2.3.1. Estudios sobre la seguridad de utilización del aditivo para los animales destinatarios

Será de aplicación el punto 3.1.1 del anexo II en su totalidad.

Se anima a los solicitantes a que empleen, siempre que sea posible, una sobredosis al menos cien veces mayor en el grupo experimental y, por consiguiente, reduzcan el número de criterios de valoración requeridos. Para ello podrá utilizarse una forma concentrada del aditivo. La concentración se ajustará reduciendo la cantidad de soporte presente, pero la relación de sustancias o agentes activos con respecto a los demás productos de la fermentación deberá seguir siendo la misma que en el producto final. En el caso de las enzimas, la dieta proporcionará los sustratos apropiados.

El punto 3.1.2 del anexo II se aplicará en su totalidad a todos los microorganismos y a aquellas enzimas que tengan un efecto catalítico directo en elementos de la microbiota, o que afecten de otra manera, según la solicitud, a la microbiota intestinal.

Cuando se trate de una nueva exposición o de un aumento sustancial del grado de exposición a microorganismos, quizá sean necesarios estudios adicionales para demostrar la ausencia de efectos adversos sobre la microbiota comensal del aparato digestivo. En el caso de los rumiantes, serán necesarios recuentos directos de la microbiota únicamente si hay indicios de un cambio adverso en la función de la panza (medido *in vitro* como un cambio en las concentraciones de ácidos grasos volátiles, una reducción en la concentración de propionato o una disminución de la celulólisis).

4.2.3.2. Estudios sobre la seguridad de utilización del aditivo para los consumidores

- 1) No se requerirán estudios metabólicos y de residuos.
- 2) Estudios toxicológicos, de acuerdo con el punto 3.2.2 del anexo II.

Las enzimas y los microorganismos constituyen solo una parte del aditivo, el cual, en la mayoría de los casos, puede incluir otros componentes originados en el proceso de fermentación. Por consiguiente, será necesario realizar pruebas con el aditivo para asegurarse de que no contiene materiales mutagénicos o de otro tipo que puedan ser nocivos para las personas que consumen alimentos derivados de animales que se han alimentado con piensos o agua tratados con él.

Sin embargo, la mayor parte de las bacterias viables destinadas a ser ingeridas directa o indirectamente por mamíferos (incluidos los humanos) se seleccionan de grupos de organismos con un historial de uso aparentemente seguro, o de grupos cuyos peligros tóxicos están bien definidos. De modo similar, los peligros asociados a los microorganismos que se utilizan para la producción de enzimas son, por lo general, bien conocidos, y se reducen en gran medida con los modernos métodos de producción. Por tanto, en relación con las enzimas de fuentes microbianas y con los microorganismos con un historial de uso aparentemente seguro, y cuando los componentes del proceso de fermentación están bien definidos y se conocen bien, no se considera necesario efectuar pruebas de toxicidad (por ejemplo, de toxicidad oral o genotoxicidad). No obstante, en lo que se refiere a los organismos vivos y a los utilizados para la producción de enzimas, deberán abordarse siempre las cuestiones de interés específicas señaladas en el punto 2.2.2.2 del anexo II.

Cuando el organismo o su aplicación sean nuevos y no se sepa lo suficiente sobre la biología del organismo (de producción) como para descartar la posibilidad de que se produzcan metabolitos tóxicos, se realizarán estudios de genotoxicidad y toxicidad oral con aditivos que contengan microorganismos viables o enzimas. En este caso se tratará de estudios de genotoxicidad, en especial mutagenicidad, y de un estudio de toxicidad oral subcrónica. Se recomienda que esos estudios se lleven a cabo con el caldo de fermentación sin células o, en caso de fermentación sólida, con un extracto apropiado.

4.2.3.3. Estudios sobre la seguridad del aditivo para los usuarios o los trabajadores

Será de aplicación la subsección 3.3 del anexo II en su totalidad, con las siguientes excepciones:

- se presupone que las enzimas y los microorganismos, como sustancias proteínicas, son sensibilizantes respiratorios, salvo que se aporten pruebas convincentes de lo contrario. Por tanto, no será necesario realizar ninguna prueba directa,
- la formulación del producto (por ejemplo, microencapsulación) puede hacer innecesarias algunas o todas las pruebas. En tales casos, deberá aportarse una justificación apropiada.

4.2.3.4. Estudios sobre la seguridad del aditivo para el medio ambiente

La subsección 3.4 del anexo II se aplicará en su totalidad a los microorganismos de origen no intestinal o que no sean ubicuos en el medio ambiente.

4.2.4. Sección IV: Estudios sobre la eficacia del aditivo

Será de aplicación la sección IV del anexo II en su totalidad.

- 1) Aditivos con efectos positivos en la producción animal o el rendimiento o bienestar de los animales e incluidos en el grupo funcional «otros aditivos zootécnicos»

Los efectos solo podrán demostrarse en relación con cada especie o categoría de animales destinataria. Dependiendo de las propiedades del aditivo, las medidas resultantes podrán basarse en las características de rendimiento (por ejemplo, la eficiencia de conversión del pienso, la ganancia de peso diaria media o el aumento de los productos animales), la composición de la canal, el rendimiento del hato, los parámetros reproductivos o el bienestar animal. Las pruebas del modo de actuación podrán consistir en estudios de eficacia breves o estudios de laboratorio en los que se mida el criterio de valoración pertinente.

- 2) Aditivos con efectos positivos en las repercusiones medioambientales de la producción animal

En relación con estos aditivos que afectan favorablemente al medio ambiente (por ejemplo, reducción de las excreciones de nitrógeno o fósforo o de la producción de metano, malos sabores), podrán presentarse pruebas de la eficacia en las especies destinatarias en tres estudios breves de eficacia con animales que muestren unos efectos beneficiosos significativos. En estos estudios deberá tenerse presente la posibilidad de una respuesta adaptativa al aditivo.

4.2.5. **Sección V: Plan de seguimiento consecutivo a la comercialización**

Esta sección se aplicará conforme a lo dispuesto en el artículo 7, apartado 3, letra g), del Reglamento (CE) n° 1831/2003.

5. **COCCIDIOSTATOS E HISTOMONOSTATOS**

5.1. **Sección I: Resumen del expediente**

Será de aplicación la sección I del anexo II en su totalidad.

5.2. **Sección II: Identidad, características y condiciones de utilización del aditivo; métodos de análisis**

Será de aplicación la sección II del anexo II en su totalidad.

5.3. **Sección III: Estudios sobre la inocuidad del aditivo**

5.3.1. *Estudios sobre la seguridad de utilización del aditivo para los animales destinatarios*

Será de aplicación la subsección 3.1 del anexo II en su totalidad.

5.3.2. *Estudios sobre la seguridad de utilización del aditivo para los consumidores*

Será de aplicación la subsección 3.2 del anexo II en su totalidad.

5.3.3. *Estudios sobre la seguridad de utilización del aditivo para los usuarios o los trabajadores*

Será de aplicación la subsección 3.3 del anexo II en su totalidad.

5.3.4. *Estudios sobre la seguridad de utilización del aditivo para el medio ambiente*

Será de aplicación la subsección 3.4 del anexo II en su totalidad.

5.4. **Sección IV: Estudios sobre la eficacia del aditivo**

Estos aditivos protegen a los animales contra las consecuencias de una infestación de *Eimeria* spp. o *Histomonas meleagridis*. Deberá atenderse a la comprobación de los efectos específicos del aditivo (por ejemplo, especies controladas) y sus propiedades profilácticas (por ejemplo, reducción de la morbilidad, mortalidad, recuento de ooquistes y alcance de las lesiones). Se proporcionará información, según proceda, sobre los efectos en el crecimiento y la eficiencia de conversión del pienso (aves de engorde, ponedoras de reposición y conejos) y sobre la incubabilidad (aves de reproducción).

Los datos sobre la eficacia requeridos se extraerán de tres tipos de experimentos con animales destinatarios:

- infecciones artificiales únicas y combinadas,
- infección natural o artificial para simular las condiciones de utilización,
- condiciones de utilización reales en ensayos de campo.

Los experimentos con infecciones artificiales únicas o combinadas (por ejemplo, jaulas en batería en el caso de las aves de corral) tienen como finalidad demostrar la eficacia relativa contra los parásitos y no requieren replicación. Para los estudios que simulen las condiciones de utilización serán precisos tres resultados significativos (por ejemplo, estudios con aves de corral criadas en suelo y estudios con conejos criados en jaulas en batería). También serán necesarios tres estudios de campo en los que haya un cierto grado de infección natural.

5.5. **Sección V: Plan de seguimiento consecutivo a la comercialización**

Esta sección del anexo II se aplicará conforme a lo dispuesto en el artículo 7, apartado 3, letra g), del Reglamento (CE) n° 1831/2003.

6. EXTRAPOLACIÓN DE LAS ESPECIES MAYORES A LAS MENORES

La definición de «especie menor» figura en el artículo 1, apartado 2, del presente Reglamento.

Normalmente se aceptará un número más limitado de estudios cuando se proponga ampliar el uso de un aditivo ya autorizado en una especie a otra especie fisiológicamente comparable.

Los requisitos que se exponen a continuación solo se aplican a las autorizaciones de aditivos ya autorizados en especies mayores solicitadas para especies menores. Si se trata de autorizaciones de nuevos aditivos para piensos solicitadas únicamente para especies menores, se aplicarán en su totalidad todas las secciones, dependiendo de la categoría o el grupo funcional del aditivo (véanse los requisitos específicos correspondientes del anexo III).

6.1. Sección I: Resumen del expediente

Será de aplicación la sección I del anexo II en su totalidad.

6.2. Sección II: Identidad, características y condiciones de utilización del aditivo; métodos de análisis

La sección II del anexo II se aplicará como sigue:

- en relación con aditivos sujetos a un titular de la autorización específico, será de aplicación la sección II en su totalidad,
- en relación con otros aditivos, serán de aplicación los puntos 2.1.2, 2.1.3, 2.1.4, 2.1.4.2, 2.2, 2.3.1, 2.3.2, 2.4.1, 2.4.2, 2.4.4, 2.5 y 2.6.

6.3. Sección III: Estudios sobre la seguridad de utilización del aditivo

6.3.1. Estudios sobre la seguridad de utilización del aditivo para los animales destinatarios

6.3.1.1. Tolerancia de las especies destinatarias

Serán de aplicación los requisitos relativos a las diferentes categorías y grupos funcionales de aditivos.

En principio, no serán necesarios estudios de tolerancia en relación con especies menores si el aditivo mostró un amplio margen de inocuidad (como mínimo, un factor de diez) en las pertinentes especies mayores fisiológicamente similares.

Si tres especies mayores destinatarias (incluidos mamíferos monogástricos y rumiantes y aves de corral) mostraron un amplio margen de inocuidad similar, no se requerirán estudios de tolerancia adicionales para especies menores que no se parezcan fisiológicamente (por ejemplo, caballos o conejos). Cuando se requieran estudios de tolerancia, su duración con respecto a las especies menores (excepto los conejos) será, como mínimo, de 28 días para los animales en fase de crecimiento y de 42 días para los animales adultos. En el caso de los conejos, la duración será como sigue: conejos de engorde, 28 días; conejas de reproducción, un ciclo (desde la inseminación hasta el final del período de destete). Si la solicitud se refiriera a conejos lactantes y destetados, se consideraría suficiente un período de 49 días (que comenzaría una semana después del nacimiento), en cuyo caso tendrían que incluirse las conejas hasta el destete. Para los peces (no salmónidos) se requerirá un período de 90 días.

6.3.2. Estudios sobre la seguridad de utilización del aditivo para los consumidores humanos

6.3.2.1. Estudios metabólicos

Serán de aplicación los requisitos relativos a las diferentes categorías y grupos funcionales de aditivos.

Por otro lado, no serán necesarios estudios metabólicos si el uso del aditivo está ya autorizado en una especie fisiológicamente comparable a la especie menor para la que se solicita la autorización. De no existir esa similitud fisiológica, se considerará suficiente para evaluar la proximidad metabólica una comparación del perfil metabólico basada en estudios *in vitro* (por ejemplo, realizados en hepatocitos con un compuesto marcado).

Si la especie menor no se parece fisiológicamente a ninguna especie mayor, deberá obtenerse en ella un indicio del destino metabólico del aditivo.

6.3.2.2. Estudios de residuos

Cuando se dé o se demuestre la proximidad metabólica, solo será necesario cuantificar los residuos marcadores en los tejidos y productos comestibles. En todos los demás casos, será de aplicación el punto 3.2.1.2 del anexo II en su totalidad.

6.3.2.3. Evaluación de la seguridad de los consumidores

Propuesta de límites máximos de residuos

Podrán fijarse LMR presuponiendo que el contenido de residuos en los tejidos comestibles de la especie menor no presenta diferencias significativas si se compara con una especie mayor similar.

Los LMR podrán extrapolarse entre clases de animales como sigue:

- de los rumiantes mayores en fase de crecimiento a todos los rumiantes en fase de crecimiento,
- de la leche de vacas lecheras a la leche de otros rumiantes lecheros,
- de los cerdos a todos los mamíferos monogástricos, salvo los caballos,
- de los pollos o los pavos a otras aves de corral,
- de las gallinas ponedoras a otras aves ponedoras, y
- de los salmónidos a todos los peces de aleta.

Los LMR correspondientes a los caballos podrían extrapolarse si existieran LMR para un rumiante mayor y un mamífero monogástrico mayor.

Si se dedujeran LMR idénticos en el ganado vacuno (u ovino), en los cerdos y en los pollos (o las aves de corral), que representan especies mayores con capacidades metabólicas y composición tisular diferentes, podrían fijarse los mismos LMR para los ovinos, los équidos y los conejos, lo que significa que puede hacerse una extrapolación a todos los animales productores de alimentos, salvo los peces. A la vista de la directriz del Comité de medicamentos de uso veterinario ⁽¹⁰⁾ sobre el establecimiento de LMR para los salmónidos y otros peces de aleta, según la cual los LMR en el músculo de una especie mayor pueden extrapolarse a los salmónidos y otros peces de aleta siempre que la sustancia original sea aceptable como residuo marcador para el LMR en el músculo y la piel, los LMR podrán extrapolarse a todos los animales productores de alimentos.

Deberá disponerse de métodos analíticos para hacer un seguimiento de los residuos en los tejidos y productos comestibles de todos los animales productores de alimentos.

6.3.3. Estudios sobre la seguridad de utilización del aditivo para los usuarios o los trabajadores

Será de aplicación la subsección 3.3 del anexo II en su totalidad.

6.3.4. Estudios sobre la seguridad de utilización del aditivo para el medio ambiente

La evaluación del riesgo ambiental podrá extrapolarse de la evaluación efectuada en relación con la especie mayor fisiológicamente comparable. Por lo que se refiere a los aditivos que vayan a utilizarse en conejos, será de aplicación la sección en su totalidad, teniendo en cuenta los requisitos aplicables a cada categoría o grupo funcional de aditivos.

6.4. Sección IV: Estudios sobre la eficacia del aditivo

Cuando el aditivo esté ya autorizado con la misma función para una especie mayor fisiológicamente comparable y se conozca o se haya demostrado su modo de actuación, las pruebas de que el modo de actuación es el mismo en la especie menor podrán servir como pruebas de eficacia. Cuando no pueda establecerse ese vínculo, la eficacia se demostrará siguiendo las normas generales de la sección IV del anexo II. En algunos casos, quizá convenga combinar especies animales en la misma fase productiva (por ejemplo, cabras y ovejas utilizadas para la producción de leche). La significación debería demostrarse en cada estudio ($P \leq 0,1$) o, si es posible, por metanálisis ($P \leq 0,05$).

⁽¹⁰⁾ Nota orientativa para el establecimiento de límites máximos de residuos aplicables a los salmónidos y otros peces de aleta. Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos. Unidad de Evaluación de Medicamentos Veterinarios. EMEA/CVMP/153b/97-FINAL.

Si es necesario demostrar la eficacia, la duración de los estudios correspondientes deberá ser análoga a las fases de producción comparables de la especie mayor fisiológicamente similar. En los demás casos, la duración mínima de los estudios de eficacia se ajustará a las disposiciones de la subsección 4.4 del anexo II y el anexo IV.

6.5. **Sección V: Plan de seguimiento consecutivo a la comercialización**

Esta sección del anexo II se aplicará conforme a lo dispuesto en el artículo 7, apartado 3, letra g), del Reglamento (CE) n° 1831/2003.

7. **MASCOTAS Y OTROS ANIMALES NO PRODUCTORES DE ALIMENTOS**

La definición de «mascotas y otros animales no productores de alimentos» figura en el artículo 1, apartado 1, del presente Reglamento.

7.1. **Sección I: Resumen del expediente**

Será de aplicación la sección I del anexo II en su totalidad.

7.2. **Sección II: Identidad, características y condiciones de utilización del aditivo; métodos de análisis**

La sección II del anexo II se aplicará como sigue:

- en relación con aditivos sujetos a un titular de la autorización específico, será de aplicación la sección II en su totalidad,
- en relación con otros aditivos, serán de aplicación los puntos 2.1.2, 2.1.3, 2.1.4, 2.1.4.2, 2.2, 2.3.1, 2.3.2., 2.4.1, 2.4.2, 2.4.4, 2.5 y 2.6.

7.3. **Sección III: Estudios sobre la inocuidad del aditivo**

7.3.1. *Estudios sobre la seguridad de utilización del aditivo para los animales destinatarios*

Serán de aplicación los requisitos relativos a las diferentes categorías y grupos funcionales de aditivos. Cuando se requiera un estudio de tolerancia, su duración mínima será de 28 días.

No será necesario un estudio de tolerancia si el aditivo ha mostrado un margen de inocuidad amplio y comparable en tres especies mayores (incluidos mamíferos monogástricos y rumiantes y aves de corral).

7.3.2. *Estudios sobre la seguridad de utilización del aditivo para los consumidores*

Normalmente, esta sección no se aplicará. Deberá tenerse en cuenta la seguridad del propietario.

7.3.3. *Estudios sobre la seguridad de utilización del aditivo para los usuarios o los trabajadores*

Será de aplicación la subsección 3.3 del anexo II en su totalidad.

7.3.4. *Estudios sobre la seguridad de utilización del aditivo para el medio ambiente*

No se aplicará la subsección 3.4 del anexo II.

7.4. **Sección IV: Estudios sobre la eficacia del aditivo**

Serán de aplicación los requisitos relativos a las diferentes categorías y grupos funcionales de aditivos.

Cuando el aditivo para el que se requieren estudios con animales haya sido autorizado previamente en otras especies fisiológicamente similares, no será necesario demostrar de otro modo la eficacia, siempre que el efecto objeto de la solicitud y el modo de actuación sean los mismos. Si el aditivo no ha sido previamente autorizado, o si el efecto objeto de la solicitud o el modo de actuación son diferentes a los de la autorización previa, deberá demostrarse la eficacia conforme a las normas generales de la sección IV del anexo II.

La duración de los ensayos de eficacia prolongados será, como mínimo, de 28 días.

7.5. **Sección V: Plan de seguimiento consecutivo a la comercialización**

Esta sección del anexo II se aplicará conforme a lo dispuesto en el artículo 7, apartado 3, letra g), del Reglamento (CE) n° 1831/2003.

8. **ADITIVOS YA AUTORIZADOS EN LA ALIMENTACIÓN HUMANA**

8.1. **Sección I: Resumen del expediente**

Será de aplicación la sección I del anexo II en su totalidad.

8.2. **Sección II: Identidad, características y condiciones de utilización del aditivo; métodos de análisis**

La sección II del anexo II se aplicará como sigue:

- en relación con aditivos sujetos a un titular de la autorización específico, será de aplicación la sección II en su totalidad,
- en relación con otros aditivos, serán de aplicación los puntos 2.1.2, 2.1.3, 2.1.4, 2.1.4.2, 2.2, 2.3.1, 2.3.2., 2.4.1, 2.4.2, 2.4.4, 2.5 y 2.6.

8.3. **Sección III: Estudios sobre la inocuidad del aditivo**

Se incluirán las últimas evaluaciones oficiales de la inocuidad del aditivo alimentario, que se complementarán con cualquier otro dato que se haya obtenido con posterioridad.

Por lo general, no serán necesarios estudios sobre la seguridad para los consumidores y los trabajadores en relación con aquellos aditivos que estén autorizados sin restricciones en la Unión Europea como aditivos alimentarios o componentes de productos alimenticios.

Se aportará toda la información exigida en las subsecciones 3.1, 3.2 y 3.3 del anexo II, teniendo en cuenta los conocimientos actuales sobre la inocuidad de estas sustancias cuando se emplean en alimentos. De acuerdo con ello, tales sustancias utilizadas también en alimentos pueden clasificarse como sigue:

- sin una IDA especificada (sin que se indique explícitamente el límite máximo de ingesta, en el caso de sustancias de muy baja toxicidad),
- con una IDA o límite máximo establecidos, o
- sin una IDA asignada (aplicable a las sustancias cuya inocuidad no puede establecerse por no haber suficiente información disponible).

8.3.1. *Estudios sobre la seguridad de utilización del aditivo para los animales destinatarios*

Si el nivel de uso del aditivo es similar en los piensos y en los alimentos, la seguridad para las especies destinatarias podrá evaluarse sobre la base de los datos toxicológicos *in vivo* disponibles y tomando en consideración la estructura química y la capacidad metabólica de dichas especies. Si el nivel de uso en los piensos es considerablemente más elevado que el correspondiente en los alimentos, quizá sea necesario un estudio de tolerancia en el animal destinatario, dependiendo de la naturaleza de la sustancia.

8.3.2. *Estudios sobre la seguridad de utilización del aditivo para los consumidores*

Si el uso como aditivo para piensos produce un aumento en la exposición de los consumidores, o un perfil de los metabolitos distinto al que resulta del empleo en los alimentos, será necesario aportar más datos toxicológicos y de residuos.

8.3.2.1. *Aditivos alimentarios para los que no se ha especificado una IDA*

No será necesario evaluar la inocuidad para los consumidores, salvo que el uso del aditivo en los piensos produzca un perfil de los metabolitos distinto al que resulta del uso en los alimentos.

8.3.2.2. Aditivos alimentarios para los que se han establecido una IDA o un límite superior

Deberá evaluarse la inocuidad para los consumidores teniendo en cuenta la exposición adicional resultante del uso de piensos o la exposición específica relacionada con los metabolitos derivados de la especie destinataria. Para ello podrán extrapolarse los datos sobre residuos contenidos en la bibliografía pertinente.

Cuando sean necesarios estudios sobre residuos, el requisito se limitará a una comparación de los niveles en los tejidos o productos de un grupo no tratado con los de un grupo suplementado con la dosis máxima objeto de la solicitud.

8.3.2.3. Aditivos alimentarios a los que no se haya asignado ninguna IDA

Deberán indicarse claramente las razones por las que no se ha asignado una IDA. Si esta cuestión fuera motivo de preocupación, y el uso del aditivo en los piensos contribuyera a un aumento significativo de la exposición de los consumidores, sería necesario efectuar una evaluación toxicológica completa.

La exposición adicional ocasionada por el empleo de piensos podrá extrapolarse de los datos sobre residuos contenidos en la bibliografía pertinente.

Cuando sean necesarios estudios sobre residuos, el requisito se limitará a una comparación de los niveles en los tejidos o productos de un grupo no tratado con los de un grupo suplementado con la dosis máxima objeto de la solicitud.

8.3.3. *Estudios sobre la seguridad de utilización del aditivo para los usuarios o los trabajadores*

Será de aplicación la subsección 3.3 del anexo II en su totalidad.

Las medidas preventivas establecidas para la manipulación de estas sustancias en su uso alimentario deberán tenerse en cuenta al examinar la seguridad del aditivo para piensos con respecto a los usuarios.

8.3.4. *Estudios sobre la seguridad de utilización del aditivo para el medio ambiente*

Se aplicará la subsección 3.4 del anexo II.

8.4. **Sección IV: Estudios sobre la eficacia del aditivo**

Cuando la función solicitada para los piensos sea la misma que en los alimentos, no será necesaria ninguna otra demostración de la eficacia. De lo contrario, los requisitos relativos a la eficacia serán los que se exponen en la sección IV del anexo II.

8.5. **Sección V: Plan de seguimiento consecutivo a la comercialización**

Esta sección del anexo II se aplicará conforme a lo dispuesto en el artículo 7, apartado 3, letra g), del Reglamento (CE) n° 1831/2003.

9. **MODIFICACIÓN DE LAS AUTORIZACIONES**

Puesto que puede confiarse en la evaluación de los datos aportados en relación con autorizaciones previas, el expediente que se prepare para una solicitud conforme al artículo 13, apartado 3, del Reglamento (CE) n° 1831/2003 no tendrá que cumplir más que los requisitos que se enumeran a continuación.

Cuando se solicite modificar los términos contenidos en un reglamento de autorización vigente, como son la identificación, las características o las condiciones de utilización del aditivo, deberá demostrarse que tal modificación no tiene efectos nocivos para la especie destinataria, los consumidores, los usuarios ni el medio ambiente. Un aditivo podrá considerarse idéntico a estos efectos si las sustancias o agentes activos y las condiciones de utilización son los mismos, su pureza es esencialmente similar y no se ha introducido ningún componente nuevo que sea motivo de preocupación. En relación con estos productos podrá presentarse una solicitud abreviada, pues por lo general no será necesario repetir los estudios con el fin de demostrar que son inocuos para las especies destinatarias, los consumidores y el medio ambiente, ni para demostrar su eficacia.

La solicitud deberá ajustarse a los siguientes requisitos:

- 1) será de aplicación el anexo I en su totalidad, y deberá detallarse la modificación solicitada;
- 2) será de aplicación la sección II del anexo II en su totalidad;

- 3) deberán aportarse datos que indiquen que las características químicas o biológicas del aditivo son esencialmente las mismas que las del producto ya establecido;
- 4) cuando proceda, deberán aportarse pruebas de bioequivalencia, ya sea mediante una especificación, ya mediante bibliografía publicada, o bien extrayéndolas de estudios específicos; si no se demuestra plenamente la bioequivalencia, deberá demostrarse la conformidad del tiempo de espera con el LMR;
- 5) asimismo, deberán presentarse pruebas de que, a la luz de los actuales conocimientos científicos y en las condiciones aprobadas, el aditivo sigue siendo inocuo para las especies destinatarias, los consumidores, los trabajadores y el medio ambiente;
- 6) se presentará un informe sobre los resultados del seguimiento consecutivo a la comercialización, si la autorización exige que se efectúe dicho seguimiento, y
- 7) los datos concretos en apoyo de la solicitud de modificación deberán presentarse con arreglo a las partes pertinentes de las secciones III, IV y V del anexo II.

10. RENOVACIÓN DE LAS AUTORIZACIONES

Las solicitudes de renovación de autorizaciones conforme al artículo 14 del Reglamento (CE) n° 1831/2003 deberán cumplir los siguientes requisitos:

10.1. Sección I: Resumen del expediente

Será de aplicación la sección I del anexo II en su totalidad. Deberá presentarse una copia de la autorización comunitaria original de comercialización del aditivo para piensos, o de la última renovación de autorización. Asimismo, se preparará un expediente actualizado que se ajuste a los requisitos más recientes, así como una lista de las variaciones introducidas desde la autorización original o la última renovación de la autorización. El solicitante deberá proporcionar un resumen del expediente en el que detalle el alcance de la solicitud y todo nuevo dato relativo a la identidad o la inocuidad del aditivo al que haya tenido acceso desde la autorización o la renovación previas.

10.2. Sección II: Identidad, características y condiciones de utilización del aditivo; métodos de análisis

La sección II del anexo II se aplicará como sigue:

- en relación con aditivos sujetos a un titular de la autorización específico, será de aplicación la sección II en su totalidad,
- en relación con otros aditivos, serán de aplicación los puntos 2.1.2, 2.1.3, 2.1.4, 2.1.4.2, 2.2, 2.3.1, 2.3.2, 2.4.1, 2.4.2, 2.4.4, 2.5 y 2.6.

Se presentarán pruebas de que no se han introducido modificaciones ni alteraciones significativas en la composición, la pureza o la actividad del aditivo ya autorizado. Deberá señalarse cualquier modificación introducida en el proceso de fabricación.

10.3. Sección III: Estudios sobre la inocuidad del aditivo

Deberán presentarse pruebas de que, a la luz de los actuales conocimientos y en las condiciones aprobadas, el aditivo sigue siendo inocuo para las especies destinatarias, los consumidores, los trabajadores y el medio ambiente. Asimismo, se presentará una actualización relativa a la inocuidad correspondiente al período transcurrido desde la autorización original o desde la última renovación de la autorización, que deberá contener información sobre los siguientes elementos:

- informes sobre efectos adversos, incluidos los accidentes (efectos previamente desconocidos, efectos graves de todo tipo, aumento de la incidencia de los efectos conocidos), para los animales destinatarios, los consumidores, los usuarios y el medio ambiente; en el informe sobre los efectos adversos se indicará la naturaleza del efecto, el número de individuos u organismos afectados, el resultado, las condiciones de utilización y la evaluación de la causalidad,
- informes sobre interacciones y contaminaciones cruzadas previamente desconocidas,
- datos procedentes del seguimiento de los residuos, si procede,

- datos extraídos de estudios epidemiológicos o toxicológicos,
- cualquier otra información sobre la inocuidad del aditivo y los riesgos que entraña para los animales, las personas y el medio ambiente.

Si no se presenta información adicional sobre alguna de estas cuestiones, deberá exponerse claramente el porqué.

Deberá presentarse un informe sobre los resultados del programa de seguimiento consecutivo a la comercialización, si la autorización previa exigía que se efectuara dicho seguimiento.

Cuando, según lo dispuesto en el artículo 14, apartado 2, letra d), del Reglamento (CE) n° 1831/2003, la solicitud de renovación de la autorización incluya una propuesta para modificar o complementar las condiciones de la autorización original, entre otras las relativas a un futuro seguimiento, los datos concretos en apoyo de esa propuesta de modificación deberán presentarse con arreglo a las partes pertinentes de las secciones III, IV y V del anexo II.

11. **REEVALUACIÓN DE DETERMINADOS ADITIVOS YA AUTORIZADOS CONFORME A LA DIRECTIVA 70/524/CEE**

Los aditivos a los que afecta este punto 11 son aquellos que fueron autorizados conforme a la Directiva 70/524/CEE y que han de ser reevaluados de acuerdo con el artículo 10, apartado 2, del Reglamento (CE) n° 1831/2003, pertenecientes a los siguientes grupos:

- sustancias antioxidantes,
- sustancias aromatizantes y saborizantes,
- sustancias emulsionantes y estabilizantes, espesantes y gelificantes,
- colorantes, incluidos los pigmentos,
- conservantes,
- vitaminas, provitaminas y sustancias con efecto análogo, químicamente bien definidas,
- oligoelementos,
- ligantes, agentes antiaglomerantes y coagulantes,
- reguladores de la acidez, y
- ligantes de radionucleidos.

El nivel y la calidad de la evaluación de riesgos de estos aditivos será similar a la de otros aditivos. Sin embargo, merced a su largo historial de uso seguro, podrán utilizarse, con arreglo a lo dispuesto en el presente Reglamento, los datos de estudios ya publicados para demostrar que el aditivo sigue siendo inocuo, en las condiciones aprobadas, para las especies destinatarias, los consumidores, los usuarios y el medio ambiente.

11.1. **Sección I: Resumen del expediente**

Será de aplicación la sección I del anexo II en su totalidad.

11.2. **Sección II: Identidad, características y condiciones de utilización del aditivo; métodos de análisis**

La sección II del anexo II se aplicará como sigue:

- en relación con los aditivos no sujetos a un titular de la autorización específico, serán de aplicación los puntos 2.1.2, 2.1.3, 2.1.4, 2.1.4.2, 2.2, 2.3.1, 2.3.2, 2.4.1, 2.4.2, 2.4.4, 2.5 y 2.6,
- en relación con otros aditivos sujetos a un titular de la autorización específico, será de aplicación la sección II en su totalidad.

11.3. Sección III: Estudios sobre la inocuidad del aditivo

Cuando la inocuidad de un aditivo para las especies destinatarias, los consumidores, los usuarios o los trabajadores y el medio ambiente ya haya sido evaluada, deberá aportarse un resumen de los estudios correspondientes presentados para la autorización previa, junto con toda la información nueva que haya aparecido desde entonces. Si no se ha evaluado oficialmente la seguridad de utilización de la sustancia como aditivo para piensos, podrán emplearse estudios y datos extraídos de la literatura científica, siempre que equivalgan a lo que se exigiría para una solicitud nueva. De lo contrario, deberá aportarse un conjunto completo de estudios relativos a la inocuidad del aditivo.

11.4. Sección IV: Estudios sobre la eficacia del aditivo

Cuando proceda, el cumplimiento del requisito de eficacia establecido en el artículo 5, apartado 3, del Reglamento (CE) n° 1831/2003 podrá demostrarse presentando materiales que no sean estudios y tengan que ver, en particular, con un largo historial de uso.

11.5. Sección V: Plan de seguimiento consecutivo a la comercialización

Esta sección del anexo II se aplicará conforme a lo dispuesto en el artículo 7, apartado 3, letra g), del Reglamento (CE) n° 1831/2003.

ANEXO IV

Categorías y definiciones de animales destinatarios e indicación de la duración mínima de los estudios de eficacia

1. Cuadro. Categoría de animales: cerdos

Categoría	Definición de la categoría de animales	Duración aproximada (peso/edad)			Duración mínima de los estudios de eficacia prolongados
		Período/edad	Edad	Peso	
Lechones (lactantes)	Porcinos jóvenes que maman de las cerdas	Desde el nacimiento	Hasta 21-42 días	Hasta 6-11 kg	14 días
Lechones (destetados)	Porcinos jóvenes que han completado el período de lactancia y se crían con fines de reproducción o de producción de carne	Desde los 21-42 días	Hasta 120 días	Hasta 35 kg	42 días
Lechones (lactantes y destetados)	Porcinos jóvenes criados con fines de reproducción o de producción de carne, desde el nacimiento	Desde el nacimiento	Hasta 120 días	Hasta 35 kg	58 días
Cerdos de engorde	Porcinos que han completado el período de destete y se destinan a la producción de carne, hasta el día de transporte al matadero	Desde los 60-120 días	Hasta 120-250 días (o según la costumbre local)	80-150 kg (o según la costumbre local)	Hasta el peso de sacrificio, pero no menos de 70 días
Cerdas para reproducción	Hembras de porcino inseminadas o apareadas al menos una vez	Desde la primera inseminación			Desde la inseminación hasta el final del segundo período de destete (dos ciclos)
Cerdas, para obtener beneficios en los lechones	Hembras de porcino inseminadas o apareadas al menos una vez				Al menos dos semanas antes del parto y hasta el final del período de destete

2. Cuadro. Categoría de animales: aves de corral

Categoría	Definición de la categoría de animales	Duración aproximada (peso/edad)			Duración mínima de los estudios de eficacia prolongados
		Período	Edad	Peso	
Pollos de engorde	Aves criadas para engorde	Desde la incubación	Hasta 35 días	Hasta ~1 600 g (hasta 2 kg)	35 días
Pollos criados para puesta	Hembras criadas para la producción de huevos de mesa o con fines de reproducción	Desde la incubación	Hasta ~16 semanas (hasta 20 semanas)	—	112 días (si no se dispone de datos de eficacia en relación con los pollos de engorde)

Categoría	Definición de la categoría de animales	Duración aproximada (peso/edad)			Duración mínima de los estudios de eficacia prolongados
		Período	Edad	Peso	
Gallinas ponedoras	Hembras productivas dedicadas a la producción de huevos	Desde las 16-21 semanas	Hasta ~13 meses (hasta 18 meses)	Desde 1 200 g (blancas) o 1 400 g (marrones)	168 días
Pavos de engorde	Aves criadas para engorde	Desde la incubación	Hasta ~14 semanas (hasta 20 semanas) Hasta ~16 semanas (hasta 24 semanas)	Pavos: hasta ~7 000 g (hasta 10 000 g) Pavos: hasta ~12 000 g (hasta 20 000 g)	84 días
Pavos destinados a la reproducción	Hembras y machos destinados a la reproducción	Todo el período	Desde 30 semanas hasta ~60 semanas	Pavos: desde ~15 000 g Pavos: desde ~30 000 g	Como mínimo seis meses
Pavos criados para reproducción	Hembras y machos jóvenes criados con fines de reproducción	Desde la incubación	Hasta 30 semanas	Pavos: hasta ~15 000 g Pavos: hasta ~30 000 g	Todo el período (si no se dispone de datos de eficacia en relación con los pavos de engorde)

3. Cuadro. Categoría de animales: bovinos (bovinos domésticos, incluidas las especies *Bubalus* y *Bison*)

Categoría	Definición de la categoría de animales	Duración aproximada (peso/edad)			Duración mínima de los estudios de eficacia prolongados
		Período	Edad	Peso	
Terneros destinados a la cría	Terneros criados con fines de reproducción o para la producción de carne de vacuno mayor	Desde el nacimiento	Hasta 4 meses	Hasta 60-80 kg (hasta 145 kg)	56 días
Terneros de engorde	Terneros para la producción de carne de ternera	Desde el nacimiento	Hasta 6 meses	Hasta 180 kg (hasta 250 kg)	Hasta el sacrificio, pero no menos de 84 días
Vacuno de engorde	Bovinos que han completado el período de destete y se destinan a la producción de carne, hasta el día de transporte al matadero	Desde el pleno desarrollo de la rumia	Hasta 10-36 meses	Hasta 350-700 kg	168 días

Categoría	Definición de la categoría de animales	Duración aproximada (peso/edad)			Duración mínima de los estudios de eficacia prolongados
		Período	Edad	Peso	
Vacas lecheras para la producción de leche	Hembras de bovino que han parido al menos un ternero				84 días (deberá indicarse el período de lactancia total)
Vacas para reproducción	Hembras de bovino inseminadas o apareadas al menos una vez	Desde la primera inseminación hasta el final del segundo período de destete			Dos ciclos (si se exigen los parámetros de reproducción)

4. Cuadro. Categoría de animales: ovejas

Categoría	Definición de la categoría de animales	Duración aproximada (peso/edad)			Duración mínima de los estudios de eficacia prolongados
		Período	Edad	Peso	
Corderos destinados a la cría	Corderos criados con fines de reproducción	Desde el nacimiento	Hasta 3 meses	15-20 kg	56 días
Corderos de engorde	Corderos criados para la producción de carne de cordero	Desde el nacimiento	Hasta 6 meses (o mayores)	Hasta 55 kg	Hasta el peso de sacrificio, pero no menos de 56 días
Ovejas lecheras (para la producción de leche)	Ovejas que han parido al menos un cordero				84 días (deberá indicarse el período de lactancia total)
Ovejas para reproducción	Hembras de ovino inseminadas o apareadas al menos una vez	Desde la primera inseminación hasta el final del segundo período de destete			Dos ciclos (si se exigen los parámetros de reproducción)

5. Cuadro. Categoría de animales: cabras

Categoría	Definición de la categoría de animales	Duración aproximada (peso/edad)			Duración mínima de los estudios de eficacia prolongados
		Período	Edad	Peso	
Cabritos destinados a la cría	Cabras jóvenes criadas con fines de reproducción	Desde el nacimiento	Hasta 3 meses	15-20 kg	Al menos 56 días

Categoría	Definición de la categoría de animales	Duración aproximada (peso/edad)			Duración mínima de los estudios de eficacia prolongados
		Período	Edad	Peso	
Cabritos de engorde	Cabras jóvenes criadas para la producción de carne de cabra	Desde el nacimiento	Hasta 6 meses		Al menos 56 días
Cabras lecheras (para la producción de leche)	Cabras que han parido al menos un cabrito				84 días (deberá indicarse el período de lactancia total)
Cabras para reproducción	Hembras de caprino inseminadas o apareadas al menos una vez	Desde la primera inseminación hasta el final del segundo período de destete			Dos ciclos (si se exigen los parámetros de reproducción)

6. Cuadro. Categoría de animales: peces

Categoría	Definición de la categoría de animales	Duración aproximada (peso/edad)			Duración mínima de los estudios de eficacia prolongados
		Período	Edad	Peso	
Salmón y trucha				200-300 g	90 días, o hasta que se duplique el peso corporal inicial
Salmón y trucha	Animales de reproducción	Lo más cerca posible del desove			90 días

7. Cuadro. Categoría de animales: conejos

Categoría	Definición de la categoría de animales	Duración aproximada (peso/edad)			Duración mínima de los estudios de eficacia prolongados
		Período	Edad	Peso	
Conejos lactantes y destetados		Comienzo una semana después del nacimiento			56 días
Conejos de engorde	Conejos criados para la producción de carne	Tras el período de destete	Hasta 8-11 semanas		42 días

Categoría	Definición de la categoría de animales	Duración aproximada (peso/edad)			Duración mínima de los estudios de eficacia prolongados
		Período	Edad	Peso	
Conejas de reproducción (con fines de reproducción)	Conejas inseminadas o apareadas al menos una vez	Desde la inseminación hasta el final del segundo periodo de destete			Dos ciclos (si se exigen los parámetros de reproducción)
Conejas de reproducción (para obtener beneficios en los gazapos)	Conejas inseminadas al menos una vez	Desde la primera inseminación			Al menos 2 semanas antes del parto y hasta el final del periodo de destete (por ejemplo, en el caso de microorganismos)

8. Cuadro. Categoría de animales: caballos

Categoría	Definición de la categoría de animales	Duración aproximada (peso/edad)			Duración mínima de los estudios de eficacia prolongados
		Período	Edad	Peso	
Caballos	Todas las categorías				56 días

I

(Actos adoptados en aplicación de los Tratados CE/Euratom cuya publicación es obligatoria)

REGLAMENTOS

REGLAMENTO (CE) nº152/2009 DE LA COMISIÓN

de 27 de enero de 2009.

por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los piensos

(Texto pertinente a efectos del EEE)

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

Visto el Reglamento (CE) nº 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, sobre los controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales ⁽¹⁾, y, en particular, su artículo 11, apartado 4, letras a), b) y c),

Considerando lo siguiente:

(1) Los actos que se citan a continuación se adoptaron para implementar la Directiva 70/373/CEE y siguen estando en vigor según el artículo 62, apartado 2, del Reglamento (CE) nº 882/2004:

- Primera Directiva 71/250/CEE de la Comisión, de 15 de junio de 1971, por la que se determinan métodos de análisis comunitarios para el control oficial de los alimentos para animales ⁽²⁾,
- Segunda Directiva 71/393/CEE de la Comisión, de 18 de noviembre de 1971, por la que se establecen métodos de análisis comunitarios para el control oficial de los alimentos para animales ⁽³⁾,
- Tercera Directiva 72/199/CEE de la Comisión, de 27 de abril de 1972, por la que se determinan métodos de análisis comunitario para el control oficial de los alimentos para animales ⁽⁴⁾,
- Cuarta Directiva 73/46/CEE de la Comisión, de 5 de diciembre de 1972, por la que se determinan

métodos de análisis comunitarios para el control oficial de los alimentos para animales ⁽⁵⁾,

- Primera Directiva 76/371/CEE de la Comisión, de 1 de marzo de 1976, sobre determinación de modos comunitarios de toma de muestras para el control oficial de la alimentación animal ⁽⁶⁾,
- Séptima Directiva 76/372/CEE de la Comisión, de 1 de marzo de 1976, sobre determinación de métodos de análisis comunitarios para el control oficial de la alimentación animal ⁽⁷⁾,
- Octava Directiva 78/633/CEE de la Comisión, de 15 de junio de 1978, por la que se fijan los métodos de análisis comunitario para el control oficial de los alimentos para animales ⁽⁸⁾,
- Novena Directiva 81/715/CEE de la Comisión, de 31 de julio de 1981, por la que se establecen métodos de análisis comunitarios para el control oficial de los alimentos para animales ⁽⁹⁾,
- Décima Directiva 84/425/CEE de la Comisión, de 25 de julio de 1984, por la que se fijan métodos de análisis comunitarios para el control oficial de los alimentos para animales ⁽¹⁰⁾,
- Directiva 86/174/CEE de la Comisión, de 9 de abril de 1986, por la que se fija el método de cálculo del valor energético de los piensos compuestos destinados a las aves de corral ⁽¹¹⁾,

⁽¹⁾ DO L 165 de 30.4.2004, p. 1. Versión corregida en el DO L 191 de 28.5.2004, p. 1.

⁽²⁾ DO L 155 de 12.7.1971, p. 13.

⁽³⁾ DO L 279 de 20.12.1971, p. 7.

⁽⁴⁾ DO L 123 de 29.5.1972, p. 6.

⁽⁵⁾ DO L 83 de 30.3.1973, p. 21.

⁽⁶⁾ DO L 102 de 15.4.1976, p. 1.

⁽⁷⁾ DO L 102 de 15.4.1976, p. 8.

⁽⁸⁾ DO L 206 de 29.7.1978, p. 43.

⁽⁹⁾ DO L 257 de 10.9.1981, p. 38.

⁽¹⁰⁾ DO L 238 de 6.9.1984, p. 34.

⁽¹¹⁾ DO L 130 de 16.5.1986, p. 53.

- Undécima Directiva 93/70/CEE de la Comisión, de 28 de julio de 1993, por la que se fijan métodos de análisis comunitario para el control oficial de los alimentos para animales ⁽¹⁾,
 - Duodécima Directiva 93/117/CE de la Comisión, de 17 de diciembre de 1993, por la que se fijan métodos de análisis comunitarios para el control oficial de los alimentos para animales ⁽²⁾,
 - Directiva 98/64/CE de la Comisión, de 3 de septiembre de 1998, por la que se fijan métodos de análisis comunitarios para determinar la existencia de aminoácidos, de grasa bruta y de olaquinox en los alimentos para animales y se modifica la Directiva 71/393/CEE ⁽³⁾,
 - Directiva 1999/27/CE de la Comisión, de 20 de abril de 1999, por la que se fijan métodos de análisis comunitarios para la determinación de amprolio, diclazurilo y carbadox en los alimentos para animales y se modifican las Directivas 71/250/CEE, 73/46/CEE y se deroga la Directiva 74/203/CEE ⁽⁴⁾,
 - Directiva 1999/76/CE de la Comisión, de 23 de julio de 1999, por la que se fijan métodos de análisis comunitarios para la determinación de lasalocid sódico en los alimentos para animales ⁽⁵⁾,
 - Directiva 2000/45/CE de la Comisión, de 6 de julio de 2000, por la que se fijan métodos de análisis comunitarios para la determinación de vitamina A, vitamina E y triptófano en los piensos ⁽⁶⁾,
 - Directiva 2002/70/CE de la Comisión, de 26 de julio de 2002, por la que se establecen los requisitos para la determinación de los niveles de dioxinas y de PCB similares a las dioxinas en los piensos ⁽⁷⁾,
 - Directiva 2003/126/CE de la Comisión, de 23 de diciembre de 2003, relativa a los métodos de análisis para determinar los componentes de origen animal a los efectos del control oficial de los piensos ⁽⁸⁾.
- (2) Dado que la Directiva 70/373/CEE fue sustituida por el Reglamento (CE) n° 882/2004, conviene reemplazar los actos de desarrollo de dicha Directiva por un único reglamento. Al mismo tiempo, es conveniente adaptar los métodos a los nuevos conocimientos científicos y tecnológicos. Los métodos que han dejado de ser válidos para el fin al que están destinados deben suprimirse. Aunque está previsto actualizar a su debido tiempo las disposiciones relativas al muestreo, a fin de tener en cuenta los últimos avances en las formas de producción, almacenamiento, transporte y comercialización de los piensos, conviene mantener por el momento las disposiciones existentes a este respecto.

(3) Deben, pues, derogarse las Directivas 71/250/CEE, 71/393/CEE, 72/199/CEE, 73/46/CEE, 76/371/CEE, 76/372/CEE, 78/633/CEE, 81/715/CEE, 84/425/CEE, 86/174/CEE, 93/70/CEE, 93/117/CE, 98/64/CE, 1999/27/CE, 1999/76/CE, 2000/45/CE, 2002/70/CE y 2003/126/CE.

(4) Las medidas previstas en el presente Reglamento se ajustan al dictamen del Comité permanente de la cadena alimentaria y de sanidad animal.

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

Artículo 1

El muestreo para el control oficial de los piensos en lo que se refiere a la determinación de los componentes, los aditivos y las sustancias indeseables, con excepción de los residuos de plaguicidas y los microorganismos, se llevará a cabo de acuerdo con los métodos expuestos en el anexo I.

Artículo 2

La preparación de las muestras para el análisis y la expresión de los resultados se efectuarán conforme a los métodos expuestos en el anexo II.

Artículo 3

Los análisis para el control oficial de los piensos se realizarán aplicando los métodos expuestos en el anexo III (Métodos de análisis para el control de la composición de los materiales para piensos y los piensos compuestos), el anexo IV (Métodos de análisis para el control del nivel de aditivos autorizados en los piensos), el anexo V (Métodos de análisis para el control de sustancias indeseables en los piensos) y el anexo VI (Métodos de análisis para la determinación de componentes de origen animal con fines de control oficial de los piensos).

Artículo 4

El valor energético de los piensos compuestos para aves de corral se calculará conforme al anexo VII.

Artículo 5

Los métodos de análisis expuestos en el anexo VIII, utilizados para controlar la presencia ilícita de aditivos que ya no están autorizados en los piensos, se emplearán con fines de confirmación.

Artículo 6

Quedan derogadas las Directivas 71/250/CEE, 71/393/CEE, 72/199/CEE, 73/46/CEE, 76/371/CEE, 76/372/CEE, 78/633/CEE, 81/715/CEE, 84/425/CEE, 86/174/CEE, 93/70/CEE, 93/117/CE, 98/64/CE, 1999/27/CE, 1999/76/CE, 2000/45/CE, 2002/70/CE y 2003/126/CE.

Las referencias a las Directivas derogadas se entenderán hechas al presente Reglamento y se leerán con arreglo a la tabla de correspondencias que figura en el anexo IX.

⁽¹⁾ DO L 234 de 17.9.1993, p. 17.

⁽²⁾ DO L 329 de 30.12.1993, p. 54.

⁽³⁾ DO L 257 de 19.9.1998, p. 14.

⁽⁴⁾ DO L 118 de 6.5.1999, p. 36.

⁽⁵⁾ DO L 207 de 6.8.1999, p. 13.

⁽⁶⁾ DO L 174 de 13.7.2000, p. 32.

⁽⁷⁾ DO L 209 de 6.8.2002, p. 15.

⁽⁸⁾ DO L 339 de 24.12.2003, p. 78.

Artículo 7

El presente Reglamento entrará en vigor el vigésimo día siguiente al de su publicación en el *Diario Oficial de la Unión Europea*.

Será aplicable a partir del 26 de agosto de 2009

El presente Reglamento será obligatorio en todos sus elementos y directamente aplicable en cada Estado miembro.

Hecho en Bruselas, el 27 de enero de 2009.

Por la Comisión

Androulla VASSILIOU

Miembro de la Comisión

ANEXO I

MÉTODOS DE MUESTREO

1. OBJETO Y ÁMBITO DE APLICACIÓN

Las muestras destinadas al control oficial de los piensos se tomarán siguiendo los métodos que se describen a continuación. Las muestras así obtenidas se considerarán representativas de las porciones objeto de muestreo.

2. PERSONAL ENCARGADO DEL MUESTREO

La toma de muestras correrá a cargo de personas autorizadas al efecto por los Estados miembros.

3. DEFINICIONES

Lote objeto de muestreo: una cantidad de producto que constituye una unidad y tiene características presuntamente uniformes.

Muestra elemental: cantidad tomada en un punto del lote objeto de muestreo.

Muestra global: suma de las muestras elementales tomadas del mismo lote objeto de muestreo.

Muestra reducida: parte representativa de la muestra global, obtenida por reducción de esta.

Muestra final: parte de la muestra reducida o de la muestra global homogeneizada.

4. INSTRUMENTAL

4.1. El instrumental de muestreo debe estar hecho de materiales que no puedan contaminar los productos de los se hayan de tomar muestras. Este instrumental puede ser aprobado oficialmente por los Estados miembros.

4.2. Instrumental recomendado para el muestreo de piensos sólidos

4.2.1. Muestreo manual

4.2.1.1. Pala de fondo plano y bordes verticales

4.2.1.2. Sonda con hendidura larga o compartimentos. Las dimensiones de la sonda deben ajustarse a las características del lote objeto de muestreo (profundidad del recipiente, dimensiones del saco, etc.) y al tamaño de las partículas del pienso.

4.2.2. Muestreo mecánico

Podrán utilizarse aparatos mecánicos homologados para el muestreo de piensos en movimiento.

4.2.3. Divisor

Para tomar muestras elementales y preparar muestras reducidas y muestras finales podrán utilizarse aparatos diseñados para dividir la muestra en partes aproximadamente iguales.

5. REQUISITOS CUANTITATIVOS

5.A.	En relación con el control de sustancias o productos repartidos de manera uniforme en el pienso
5.A.1.	Lote objeto de muestreo El lote objeto de muestreo debe tener un tamaño que permita tomar muestras de todas las partes que lo compongan.

5.A.2.	Muestras elementales	
5.A.2.1.	Piensos a granel	Número mínimo de muestras elementales
5.A.2.1.1.	Lotes objeto de muestreo que no superen las 2,5 toneladas	Siete
5.A.2.1.2.	Lotes objeto de muestreo que superen las 2,5 toneladas	√ Veinte veces el número de toneladas que constituyen el lote objeto de muestreo (*), hasta un máximo de 40 muestras elementales
5.A.2.2.	Piensos envasados	Número mínimo de envases de los que deben tomarse muestras (**)
5.A.2.2.1.	Envases con un contenido superior a 1 kg	
5.A.2.2.1.1.	Lotes objeto de muestreo compuestos de uno a cuatro envases	Todos los envases
5.A.2.2.1.2.	Lotes objeto de muestreo compuestos de cinco a 16 envases	Cuatro
5.A.2.2.1.3.	Lotes objeto de muestreo compuestos de más de 16 envases	√ Número de envases que componen el lote objeto de muestreo (*), hasta un máximo de 20 envases
5.A.2.2.2.	Envases de no más de 1 kg	Cuatro
5.A.2.3.	Piensos líquidos o semilíquidos	Número mínimo de recipientes de los que deben tomarse muestras (**)
5.A.2.3.1.	Recipientes de más de 1 l	
5.A.2.3.1.1.	Lotes objeto de muestreo compuestos de uno a cuatro recipientes	Todos los recipientes
5.A.2.3.1.2.	Lotes objeto de muestreo compuestos de cinco a 16 recipientes	Cuatro
5.A.2.3.1.3.	Lotes objeto de muestreo compuestos de más de 16 recipientes	√ Número de recipientes que componen el lote objeto de muestreo (*), hasta un máximo de 20 recipientes
5.A.2.3.2.	Recipientes de no más de 1 l	Cuatro
5.A.2.4.	Piensos en bloques y piedras para lamer de sales minerales	Número mínimo de bloques o piedras para lamer de los que deben tomarse muestras (**): un bloque o una piedra para lamer por lote objeto de muestreo compuesto de 25 unidades, hasta un máximo de cuatro bloques o piedras.
5.A.3.	Muestra global Se requiere una sola muestra global por cada lote objeto de muestreo. La cantidad total de las muestras elementales que constituyen la muestra global no será inferior a las cantidades siguientes:	
5.A.3.1.	Piensos a granel	4 kg
5.A.3.2.	Piensos envasados	
5.A.3.2.1.	Envases de más de 1 kg	4 kg
5.A.3.2.2.	Envases de no más de 1 kg	Peso del contenido de cuatro envases originales
5.A.3.3.	Piensos líquidos o semilíquidos:	
5.A.3.3.1.	Recipientes de más de 1 l	4 l
5.A.3.3.2.	Recipientes de no más de 1 l	Volumen del contenido de cuatro envases originales
5.A.3.4.	Piensos en bloques o piedras para lamer	
5.A.3.4.1.	De un peso superior a 1 kg cada uno	4 kg
5.A.3.4.2.	De un peso no superior a 1 kg cada uno	El peso de cuatro bloques o piedras para lamer

5.A.4.	Muestras finales La muestra global da lugar, una vez reducida si es necesario, a las muestras finales. Se requiere el análisis de, por lo menos, una muestra final. La cantidad de muestra final destinada al análisis no será inferior a lo que se indica a continuación:	
	Pensos sólidos	500 g
	Pensos líquidos o semilíquidos	500 ml
5.B.	En relación con el control de sustancias o productos indeseables que pueden estar repartidos de manera no uniforme en el pienso, como son las aflatoxinas, el cornezuelo del centeno, el ricino y las crotalarias en los materiales para piensos (***)	
5.B.1.	Lote objeto de muestreo: véase 5.A.1.	
5.B.2.	Muestras elementales	
5.B.2.1.	Pensos a granel: véase 5.A.2.1.	
5.B.2.2.	Pensos envasados	Número mínimo de envases de los que deben tomarse muestras
5.B.2.2.1.	Lotes objeto de muestreo compuestos de uno a cuatro envases	Todos los envases
5.B.2.2.2.	Lotes objeto de muestreo compuestos de cinco a 16 envases	Cuatro
5.B.2.2.3.	Lotes objeto de muestreo compuestos de más de 16 envases	√ Número de envases que componen el lote objeto de muestreo (*), hasta un máximo de 40 envases
5.B.3.	Muestras globales El número de muestras globales variará en función del tamaño del lote objeto de muestreo. A continuación se indica el número mínimo de muestras globales por cada lote objeto de muestreo. El peso total de las muestras elementales que componen cada muestra global no será inferior a 4 kg.	
5.B.3.1.	Pensos a granel	
	Peso del lote objeto de muestreo en toneladas	Número mínimo de muestras globales por cada lote objeto de muestreo
	hasta 1	1
	más de 1 y hasta 10	2
	más de 10 y hasta 40	3
	más de 40	4
5.B.3.2.	Pensos envasados	
	Tamaño del lote objeto de muestreo en número de envases	Número mínimo de muestras globales por cada lote objeto de muestreo
	1 a 16	1
	17 a 200	2
	201 a 800	3
	más de 800	4
5.B.4.	Muestras finales Cada muestra global da lugar, una vez reducida, a las muestras finales. Se requiere el análisis de por lo menos una muestra final <i>por cada muestra global</i> . El peso de la muestra final destinada al análisis no puede ser inferior a 500 g.	

(*) Cuando la cifra obtenida sea un quebrado, deberá redondearse al siguiente número entero.

(**) En el caso de envases o recipientes cuyo contenido no exceda de 1 kg o 1 l, y en el de los bloques o piedras para lamer que no pesen más de 1 kg cada uno, la muestra elemental estará formada por el contenido de un envase o recipiente original, o por un bloque o una piedra para lamer.

(***) Los métodos presentados en 5.A se emplean para el control de las aflatoxinas, el cornezuelo del centeno, el ricino y las crotalarias en piensos completos y complementarios.

6. INSTRUCCIONES PARA LA TOMA, LA PREPARACIÓN Y EL ENVASADO DE LAS MUESTRAS

6.1. Generalidades

Las muestras deben tomarse y prepararse lo más rápidamente posible, tomando las precauciones necesarias para evitar que el producto se altere o contamine. Los instrumentos, así como las superficies y los recipientes destinados a recibir las muestras, deben estar limpios y secos.

6.2. Muestras elementales

6.2.A. *En relación con el control de sustancias o productos repartidos de manera uniforme en el pienso*

Las muestras elementales deben tomarse al azar en todo el lote objeto de muestreo y tener aproximadamente el mismo tamaño.

6.2.A.1. Piensos a granel

El lote objeto de muestreo deberá dividirse simbólicamente en varias partes aproximadamente iguales. Deberá seleccionarse al azar un número de partes que se corresponda con el número de muestras elementales requeridas en el punto 5.A.2, y de cada una de esas partes deberá tomarse al menos una muestra.

En su caso, el muestreo puede realizarse mientras el lote objeto de muestreo está en movimiento (carga o descarga).

6.2.A.2. Piensos envasados

Una vez seleccionado el número requerido de envases para muestreo según se indica en el punto 5.A.2, deberá tomarse parte del contenido de cada envase con una sonda o una pala. Si es necesario, las muestras se tomarán después de haber vaciado por separado los envases. Los grumos se desharán, si es necesario, apartándolos y devolviéndolos a la muestra, en cada muestra global por separado.

6.2.A.3. Piensos líquidos o semilíquidos homogéneos u homogeneizables

Una vez seleccionado el número requerido de recipientes para muestreo según se indica en el punto 5.A.2, deberá homogeneizarse el contenido, si es necesario, y tomarse una cantidad de cada recipiente.

Las muestras elementales pueden tomarse mientras se vacía el contenido.

6.2.A.4. Piensos líquidos o semilíquidos no homogeneizables

Una vez seleccionado el número requerido de recipientes para muestreo según se indica en el punto 5.A.2, se tomarán muestras en diferentes niveles.

También pueden tomarse muestras mientras se vacía el contenido, pero, en ese caso, deberán desecharse las primeras fracciones.

En cualquier caso, el volumen total recogido no debe ser inferior a 10 l.

6.2.A.5. Piensos en bloques y piedras para lamer de sales minerales

Una vez seleccionado el número requerido de bloques o piedras para muestreo según se indica en el punto 5.A.2, se tomará una parte de cada bloque o piedra para lamer.

6.2.B. *En relación con el control de sustancias o productos indeseables que pueden estar repartidos de manera no uniforme en el pienso, como son las aflatoxinas, el cornezuelo del centeno, el ricino y las crotalarias en los materiales para piensos*

El lote objeto de muestreo deberá dividirse simbólicamente en un número de partes aproximadamente iguales correspondiente al número de muestras globales que se establece en el punto 5.B.3. Si este número es mayor de uno, el número total de muestras elementales establecido en el punto 5.B.2 se distribuirá de manera aproximadamente igual en las diferentes partes. A continuación se tomarán muestras de aproximadamente el mismo tamaño ⁽¹⁾, de manera que la cantidad total en las muestras de cada parte no sea inferior al mínimo de 4 kg requerido para cada muestra global. No se unirán muestras elementales tomadas de partes diferentes.

⁽¹⁾ En el caso de piensos envasados, parte del contenido de los envases que vayan a someterse a muestreo se extraerá con una sonda o una pala, después de haber vaciado los envases por separado, si es necesario.

6.3. Preparación de muestras globales**6.3.A. En relación con el control de sustancias o productos repartidos de manera uniforme en el pienso**

Las muestras elementales se mezclarán para formar una sola muestra global.

6.3.B. En relación con el control de sustancias o productos indeseables que pueden estar repartidos de manera no uniforme en el pienso, como son las aflatoxinas, el cornezuelo del centeno, el ricino y las crotalarias en los materiales para piensos

Se mezclarán las muestras elementales de cada parte del lote objeto de muestreo y se constituirán el número de muestras globales que se establece en el punto 5.B.3, teniendo cuidado de anotar el origen de cada muestra global.

6.4. Preparación de muestras finales

El material de cada muestra global deberá mezclarse cuidadosamente para obtener una mezcla homogénea ⁽¹⁾. Si fuera necesario, la muestra global deberá reducirse hasta un mínimo de 2 kg o 2 l (muestra reducida), bien con ayuda de un divisor mecánico o automático, bien con el método de cuarteo.

Deberán prepararse a continuación, como mínimo, tres muestras finales que tengan aproximadamente la misma cantidad y se ajusten a las exigencias cuantitativas del punto 5.A.4 o 5.B.4. Cada muestra deberá introducirse en un recipiente apropiado. Deberán tomarse todas las precauciones necesarias para evitar cualquier alteración en la composición de la muestra o cualquier contaminación o adulteración que pudiera sobrevenir durante el transporte o el almacenamiento.

6.5. Envasado de muestras finales

Los recipientes o los envases deberán precintarse y etiquetarse (la etiqueta debe estar totalmente incorporada en el precinto) de manera que sea imposible abrirlos sin deteriorar el precinto.

7. ACTA DE MUESTREO

De cada muestreo deberá levantarse un acta que permita identificar sin ambigüedad el lote objeto de muestreo.

8. DESTINO DE LA MUESTRAS

De cada muestra global deberá enviarse cuanto antes al laboratorio de análisis autorizado, como mínimo, una muestra final, con la información necesaria para el analista.

⁽¹⁾ Los grumos se desharán (si es necesario, apartándolos y devolviéndolos a la muestra) en cada muestra global por separado.

ANEXO II

DISPOSICIONES GENERALES SOBRE MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA PIENSOS**A. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS****1. Objeto**

Los procedimientos descritos a continuación se refieren a la preparación para el análisis de muestras finales enviadas a los laboratorios de control tras ser tomadas conforme a lo dispuesto en el anexo I.

Estas muestras deben prepararse de manera que las cantidades pesadas según disponen los métodos de análisis sean homogéneas y representativas de las muestras finales.

2. Precauciones que deben tomarse

El procedimiento que debe seguirse para preparar las muestras depende de los métodos de análisis empleados. Por tanto, es muy importante que dicho procedimiento se adecúe al método de análisis aplicado.

Todas las operaciones necesarias deben realizarse de modo que se eviten en lo posible la contaminación de la muestra y los cambios en su composición.

La molienda, la mezcla y el tamizado deberán efectuarse lo más rápidamente posible, a fin de minimizar la exposición de la muestra al aire y a la luz. No se emplearán molinos ni molidoras que puedan calentar perceptiblemente la muestra.

Para los piensos especialmente sensibles al calor se recomienda la molienda manual. Deberá cuidarse también de que el propio instrumental no sea fuente de contaminación de los oligoelementos.

Si la muestra no puede prepararse sin que su contenido de humedad sufra cambios significativos, debe determinarse dicho contenido antes y después de prepararla, de acuerdo con el método establecido en la parte A del anexo III.

3. Procedimiento

Dividir la muestra en las submuestras adecuadas para ser analizadas y servir de referencia, empleando técnicas divisorias apropiadas como la formación de montones alternativos con pala o la subdivisión con divisores mecánicos estacionarios o rotatorios. No se recomienda la técnica de conos y cuarteo, pues las submuestras resultantes pueden presentar un elevado error de división. Guardar la muestra de referencia en un recipiente adecuado, limpio y seco, con tapa hermética, y preparar las submuestras para el análisis de al menos 100 g, según se indica más adelante.

3.1. Piensos que pueden molerse tal como se presentan

Salvo que se especifique lo contrario en los métodos de análisis, tamizar la muestra completa por un tamiz con una luz de malla de 1 mm (conforme a la Recomendación ISO R565) tras molerla, si es necesario. No moler en exceso.

Mezclar la muestra tamizada y recogerla en un recipiente limpio y seco adecuado, provisto de tapón hermético. Volver a mezclar inmediatamente antes de pesar la cantidad para análisis.

3.2. Piensos que pueden molerse tras secarse

Salvo que se especifique lo contrario en los métodos de análisis, secar la muestra hasta que su contenido de humedad disminuya a un nivel del 8 % al 12 %, de acuerdo con el procedimiento preliminar de secado descrito en el punto 4.3 del método de determinación de la humedad mencionado en la parte A del anexo III. Proceder a continuación como se indica en el punto 3.1.

3.3. Piensos líquidos o semilíquidos

Colocar la muestra en un recipiente limpio y seco adecuado, provisto de tapón hermético. Mezclar bien inmediatamente antes de pesar la cantidad para análisis.

3.4. Otros piensos

Las muestras que no puedan prepararse conforme a uno de los procedimientos anteriores deberán someterse a cualquier otro procedimiento que garantice que las cantidades pesadas para el análisis son homogéneas y representativas de las muestras finales.

4. Almacenamiento de las muestras

Las muestras deben almacenarse a una temperatura que no altere su composición. Las destinadas al análisis de vitaminas o sustancias especialmente fotosensibles deberán guardarse en recipientes de vidrio marrón.

B. DISPOSICIONES RELATIVAS A LOS REACTIVOS Y EL INSTRUMENTAL EMPLEADOS EN LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS

1. Salvo que se especifique lo contrario en el método de análisis, todos los reactivos deben ser analíticamente puros (a.p.). Si se analizan oligoelementos, debe comprobarse la pureza de los reactivos por medio de un ensayo en blanco. Dependiendo de los resultados que se obtengan, quizá sea necesaria una mayor purificación de los reactivos.
2. Siempre que en los métodos de análisis se mencionen operaciones que impliquen preparación de soluciones, dilución, enjuague o lavado sin indicar la naturaleza del disolvente o el diluyente, debe utilizarse agua. Por regla general, el agua deberá desmineralizarse o destilarse. En casos particulares, indicados en los métodos de análisis, debe someterse a procedimientos especiales de purificación.
3. Habida cuenta del equipamiento que se encuentra normalmente en los laboratorios de control, en los métodos de análisis solo se hace referencia a los instrumentos y aparatos especiales o que requieren un uso específico. Deben estar limpios, sobre todo cuando hayan de determinarse cantidades muy pequeñas de sustancias.

C. APLICACIÓN DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

1. Procedimiento de extracción

Varios métodos establecen un procedimiento de extracción específico. Como regla general, puede aplicarse un procedimiento de extracción distinto al mencionado en el método si se ha demostrado que su eficacia de extracción es equivalente para la matriz analizada.

2. Procedimiento de limpieza (*cleanup*)

Varios métodos establecen un procedimiento de limpieza específico. Como regla general, puede aplicarse un procedimiento de limpieza distinto al mencionado en el método si se ha demostrado que sus resultados analíticos son equivalentes para la matriz analizada.

3. Comunicación del método de análisis empleado

En general se establece un único método de análisis para determinar cada una de las sustancias del pienso. Si se ofrecen varios métodos, en el informe de análisis debe indicarse el método particular empleado por el laboratorio de control.

4. Número de determinaciones

El resultado indicado en el informe de análisis deberá ser el valor medio obtenido de, como mínimo, dos determinaciones, efectuadas en porciones de la muestra distintas y de repetibilidad satisfactoria.

Sin embargo, en el caso de análisis de sustancias indeseables, si el resultado de la primera determinación es significativamente ($> 50\%$) inferior a la especificación que ha de controlarse, no serán necesarias más determinaciones, a condición de que se apliquen los procedimientos de calidad adecuados.

Si se controla el contenido declarado de una sustancia o un ingrediente y el resultado de la primera determinación confirma dicho contenido, es decir, que el resultado analítico entra en el intervalo de variación aceptable del contenido declarado, no será necesaria una segunda determinación, siempre que se apliquen los procedimientos de calidad apropiados.

En algunos casos, este intervalo de variación aceptable está definido en la legislación, por ejemplo en la Directiva 79/373/CEE de la Comisión ⁽¹⁾.

5. Comunicación de los resultados analíticos

El resultado analítico se expresará según establezca el método de análisis, con el número adecuado de cifras significativas, y se corregirá, si es necesario, con respecto al contenido de humedad de la muestra final antes de la preparación.

⁽¹⁾ DO L 86 de 6.4.1979, p. 30.

6. Incertidumbre de medida y tasa de recuperación en caso de análisis de sustancias indeseables

Por lo que se refiere a las sustancias indeseables según se definen en la Directiva 2002/32/CE, en especial las dioxinas y los PCB similares a las dioxinas, se considerará que un producto destinado a la alimentación animal no cumple los requisitos relativos al contenido máximo establecido si se estima que el resultado analítico excede del contenido máximo, teniendo en cuenta la incertidumbre de medida expandida y la corrección en función de la recuperación. Para evaluar el cumplimiento se emplea la concentración analizada, una vez corregida en función de la recuperación y tras deducirse la incertidumbre de medida expandida. Este procedimiento solo es aplicable en los casos en que el método de análisis permite estimar la incertidumbre de medida expandida y la corrección en función de la recuperación (no es posible, por ejemplo, en caso de análisis microscópico).

El resultado analítico se comunicará como sigue (en la medida en que el método de análisis utilizado permita estimar la incertidumbre de medida y la tasa de recuperación):

- a) corregido en función de la recuperación, indicando el nivel de la misma; dicha corrección no será necesaria si la tasa de recuperación es del 90 % al 110 %;
- b) como « $x \pm U$ », donde x es el resultado analítico y U la incertidumbre de medida expandida, utilizando un factor de cobertura de 2, que da un nivel de confianza del 95 % aproximadamente.

Sin embargo, si el resultado del análisis fuera notablemente inferior (> 50 %) a la especificación que ha de controlarse, podría comunicarse sin corrección en función de la recuperación, y la tasa de recuperación y la incertidumbre de medida podrían omitirse, a condición de que se aplicaran los procedimientos de calidad apropiados y de que el análisis sirviera exclusivamente para comprobar el cumplimiento de las disposiciones legales.

ANEXO III

MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA EL CONTROL DE LA COMPOSICIÓN DE LOS MATERIALES PARA PIENSOS Y LOS PIENSOS COMPUESTOS**A. DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD****1. Objeto y ámbito de aplicación**

Este método permite determinar el contenido de humedad de los piensos. Si el pienso contiene sustancias volátiles, como ácidos orgánicos, debe tenerse presente que, junto con el contenido de humedad, también se determina una cantidad importante de esas sustancias.

No incluye el análisis de productos lácteos como materiales para piensos, el análisis de sustancias minerales y mezclas compuestas predominantemente de sustancias minerales, el análisis de grasas y aceites animales y vegetales, ni el análisis de semillas y frutos oleaginosos.

2. Principio

La muestra se deseca en las condiciones especificadas, que varían en función de la naturaleza del pienso. La pérdida de peso se determina por pesada. Cuando se trata de piensos sólidos con un elevado contenido de humedad, es necesario efectuar un secado preliminar.

3. Instrumental

- 3.1. Trituradora de material que no absorba la humedad, fácil de limpiar, que permita un triturado rápido y uniforme sin provocar un calentamiento sensible, evite al máximo el contacto con el aire exterior y cumpla los requisitos indicados en los puntos 4.1.1 y 4.1.2 (por ejemplo, microtrituradoras de martillos o de enfriamiento por agua, molinos de conos plegables, trituradoras de movimiento lento o de discos dentados).
- 3.2. Balanza analítica, con una exactitud de 1 mg
- 3.3. Recipientes secos de metal no corrosible o de vidrio, con tapas que garanticen un cierre hermético; la superficie de trabajo debe permitir que la muestra de ensayo se esparza a razón de 0,3 g/cm² aproximadamente.
- 3.4. Estufa isotérmica de calentamiento eléctrico (± 2 °C), adecuadamente ventilada, que permita una rápida regulación de la temperatura ⁽¹⁾.
- 3.5. Estufa de vacío regulable de calentamiento eléctrico, provista de una bomba de aceite y un mecanismo para introducir, o bien aire desecado caliente, o bien un agente desecante (por ejemplo, óxido de calcio)
- 3.6. Desecador con una placa gruesa perforada de metal o porcelana, que contenga un agente desecante eficaz.

4. Procedimiento

Nota: Las operaciones que se describen en esta sección deben realizarse inmediatamente después de abrir los paquetes de muestras. Los análisis deben efectuarse, como mínimo, por duplicado.

4.1. Preparación**4.1.1. Piensos distintos de los contemplados en los puntos 4.1.2 y 4.1.3.**

Tomar, como mínimo, 50 g de la muestra. Si es necesario, triturar o dividir de manera que no se produzca variación alguna en el contenido de humedad (véase el punto 6).

4.1.2. Cereales y grañones

Tomar, como mínimo, 50 g de la muestra. Moler en partículas de las que al menos el 50 % pasen por un tamiz con una luz de malla de 0,5 mm y no dejen más de un 10 % de desecho en un tamiz con una luz de malla redonda de 1 mm.

⁽¹⁾ Para el secado de cereales, harina, grañones y sémola, la estufa debe tener una capacidad térmica tal que, precalentada a 131 °C, recupere esa temperatura en menos de 45 minutos una vez puestas a secar simultáneamente en su interior el máximo número de muestras de ensayo. La ventilación debe ser tal que, tras dos horas secando el máximo número de muestras de trigo candeal que pueda contener, los resultados difieran en menos de un 0,15 % de los obtenidos tras cuatro horas de secado.

4.1.3. Piensos líquidos o en forma de pasta, piensos compuestos predominantemente de aceites y grasas

Tomar unos 25 g de la muestra, pesar con una precisión de 10 mg, añadir una cantidad apropiada de arena anhidra pesada con una precisión de 10 mg y mezclar hasta obtener un producto homogéneo.

4.2. *Desecación*

4.2.1. Piensos distintos de los contemplados en los puntos 4.2.2 y 4.2.3.

Tarar un recipiente (3.3) con su tapa, con una precisión de 1 mg. En el recipiente tarado, pesar, con una precisión de 1 mg, unos 5 g de la muestra y esparcirla uniformemente. Colocar el recipiente, sin su tapa, en la estufa precalentada a 103 °C. Para impedir que la estufa se enfríe en exceso, introducir el recipiente lo más rápidamente posible. Dejar secar durante cuatro horas, contadas a partir del momento en que la estufa haya alcanzado de nuevo una temperatura de 103 °C. Volver a colocar la tapa sobre el recipiente, retirarlo de la estufa, dejarlo enfriar durante 30 a 45 minutos en el desecador (3.6) y pesar con una precisión de 1 mg.

En el caso de piensos compuestos predominantemente de aceites y grasas, secar en la estufa durante otros 30 minutos a 130 °C. La diferencia entre las dos pesadas no debe superar el 0,1 % de humedad.

4.2.2. Cereales, harina, grañones y sémola

Tarar un recipiente (3.3) con su tapa, con una precisión de 0,5 mg. En el recipiente tarado, pesar, con una precisión de 1 mg, unos 5 g de la muestra triturada y esparcirla uniformemente. Colocar el recipiente, sin su tapa, en la estufa precalentada a 130 °C. Para impedir que la estufa se enfríe en exceso, introducir el recipiente lo más rápidamente posible. Dejar secar durante dos horas, contadas a partir del momento en que la estufa haya alcanzado de nuevo una temperatura de 130 °C. Volver a colocar la tapa sobre el recipiente, retirarlo de la estufa, dejarlo enfriar durante 30 a 45 minutos en el desecador (3.6) y pesar con una precisión de 1 mg.

4.2.3. Piensos compuestos con más de un 4 % de sacarosa o lactosa: materiales para piensos como algarrobas, productos cerealísticos hidrolizados, semillas de malta, lonchas de remolacha desecadas, pescado y azúcares solubles; piensos compuestos con más de un 25 % de sales minerales que contengan agua de cristalización.

Tarar un recipiente (3.3) con su tapa, con una precisión de 0,5 mg. En el recipiente tarado, pesar, con una precisión de 1 mg, unos 5 g de la muestra y esparcirla uniformemente. Colocar el recipiente, sin su tapa, en la estufa de vacío (3.5) precalentada a una temperatura comprendida entre 80 °C y 85 °C. Para impedir que la estufa se enfríe en exceso, introducir el recipiente lo más rápidamente posible.

Elevar la presión a 100 Torr y dejar secar durante cuatro horas a esa presión, bien en una corriente de aire seco caliente, bien mediante un agente desecante (unos 300 g para 20 muestras). En este último caso, desconectar la bomba de vacío cuando se haya alcanzado la presión prescrita. Calcular el tiempo de secado a partir del momento en que la estufa haya alcanzado de nuevo una temperatura de 80 °C a 85 °C. A continuación, restablecer con precaución la presión atmosférica en la estufa. Abrirla, tapar inmediatamente el recipiente, retirarlo de la estufa, dejarlo enfriar durante 30 a 45 minutos en el desecador (3.6) y pesar con una precisión de 1 mg. Proceder a una desecación complementaria de 30 minutos en la estufa de vacío a una temperatura de 80 °C a 85 °C y volver a pesar. La diferencia entre las dos pesadas no debe superar el 0,1 % de humedad.

4.3. *Pre-desecación*

4.3.1. Piensos distintos de los contemplados en el punto 4.3.2.

Los piensos sólidos con un contenido de humedad elevado que dificulte su trituración deben someterse a una pre-desecación, del siguiente modo:

Pesar, con una precisión de 10 mg, unos 50 g de la muestra *no triturada* (los piensos comprimidos o aglomerados pueden dividirse someramente, si es necesario) en un recipiente apropiado (por ejemplo, una placa de aluminio de 20 × 12 cm con un borde de 0,5 cm). Dejar secar en una estufa a una temperatura de 60 °C a 70 °C, hasta que el contenido de humedad se haya reducido a un valor comprendido entre el 8 % y el 12 %. Retirar de la estufa, dejar enfriar al descubierto en el laboratorio durante una hora y pesar con una precisión de 10 mg. Triturar inmediatamente después como se indica en el punto 4.1.1 y efectuar la desecación como se indica en el punto 4.2.1 o 4.2.3, según la naturaleza del pienso.

4.3.2. Cereales

Los granos con un índice de humedad superior al 17 % deben someterse a una desecación preliminar del siguiente modo:

Pesar, con una precisión de 10 mg, unos 50 g de grano sin moler en un recipiente apropiado (por ejemplo, una placa de aluminio de 20 × 12 cm con un borde de 0,5 cm). Dejar secar en una estufa durante cinco a siete minutos a una temperatura de 130 °C. Retirar de la estufa, dejar enfriar al descubierto en el laboratorio durante dos horas y pesar con una precisión de 10 mg. Moler inmediatamente después como se indica en el punto 4.1.2 y efectuar la desecación como se indica en el punto 4.2.2.

5. Cálculo de los resultados

El contenido de humedad (X), en porcentaje de la muestra, se calcula con las fórmulas siguientes:

5.1. Desecación sin predesecación

$$X = \frac{(m - m_0)}{m} \times 100$$

donde:

m = peso inicial, en gramos, de la muestra de ensayo;

m₀ = peso, en gramos, de la muestra de ensayo seca.

5.2. Desecación con predesecación

$$X_p = \left[\frac{(m_2 - m_0) \times m_1}{m_2} + m - m_1 \right] \times \frac{100}{m} = 100 \times \left(1 - \frac{m_1 \times m_0}{m \times m_2} \right)$$

donde:

m = peso inicial, en gramos, de la muestra de ensayo;

m₁ = peso, en gramos, de la muestra de ensayo tras la predesecación;

m₂ = peso, en gramos, de la muestra de ensayo una vez triturada o molida;

m₀ = peso, en gramos, de la muestra de ensayo seca.

5.3. Repetibilidad

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas con la misma muestra no excederá del 0,2 % del valor absoluto de humedad.

6. Observación

Cuando resulte necesario efectuar una trituración y se considere que esta modifica el contenido de humedad del producto, los resultados del análisis de los componentes del pienso deben corregirse atendiendo al contenido de humedad de la muestra en su estado inicial.

B. DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD EN GRASAS Y ACEITES ANIMALES Y VEGETALES

1. Objeto y ámbito de aplicación

Este método permite determinar el contenido de agua y sustancias volátiles de las grasas y los aceites animales y vegetales.

2. Principio

Se deseca la muestra a 103 °C con un peso constante (la pérdida de peso entre dos pesadas sucesivas debe ser inferior o igual a 1 mg). La pérdida de peso se determina mediante pesada.

3. Instrumental

3.1. Plato de fondo plano de material resistente a la corrosión, de 8 cm a 9 cm de diámetro y de aproximadamente 3 cm de alto

3.2. Termómetro de bulbo reforzado con tubo capilar en el extremo superior, graduado entre aproximadamente 80 °C y, como mínimo, 110 °C, de unos 10 cm de longitud

3.3. Baño de arena o placa calefactora eléctrica

3.4. Desecador con un agente desecante eficaz

3.5. Balanza analítica

4. Procedimiento

Pesar, con una precisión de 1 mg, unos 20 g de la muestra homogeneizada en el plato tarado seco (3.1) que contiene el termómetro (3.2). Calentar en el baño de arena o la placa calefactora (3.3), removiendo continuamente con el termómetro, de manera que la temperatura alcance 90 °C en unos siete minutos.

Reducir el calor, observando con qué frecuencia salen burbujas del fondo del plato. La temperatura no debe sobrepasar los 105 °C. Seguir removiendo, raspando el fondo del plato, hasta que dejen de formarse burbujas.

Para eliminar completamente la humedad, calentar varias veces a 103 °C ± 2 °C, enfriando a 93 °C entre los sucesivos calentamientos. A continuación, dejar enfriar a temperatura ambiente en el desecador (3.4) y pesar. Repetir esta operación hasta que la pérdida de peso entre dos pesadas sucesivas deje de sobrepasar los 2 mg.

Nota: El incremento del peso de la muestra tras varios calentamientos es indicio de una oxidación de la grasa, en cuyo caso debe calcularse el resultado a partir de la pesada efectuada inmediatamente antes de que empezara a producirse ese incremento.

5. Cálculo de los resultados

El contenido de humedad (X), como porcentaje de la muestra, viene dado por la fórmula siguiente:

$$X = (m_1 - m_2) \times \frac{100}{m}$$

donde:

m = peso, en gramos, de la muestra de ensayo;

m_1 = peso, en gramos, del plato con su contenido, antes del calentamiento;

m_2 = peso, en gramos, del plato con su contenido, tras el calentamiento.

Los resultados inferiores al 0,05 % deben registrarse como «inferior al 0,05 %».

Repetibilidad

La diferencia de humedad entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas con la misma muestra no debe exceder del 0,05 %, en valor absoluto.

C. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA BRUTA

1. Objeto y ámbito de aplicación

Este método permite determinar el contenido de proteína bruta del pienso sobre la base del contenido de nitrógeno, determinado por el método Kjeldahl.

2. Principio

La muestra se digiere con ácido sulfúrico en presencia de un catalizador. La solución ácida se alcaliniza con una solución de hidróxido de sodio. El amoníaco se destila y se recoge en una cantidad medida de ácido sulfúrico, cuyo exceso se titula con una solución patrón de hidróxido de sodio.

Alternativamente, el amoníaco desprendido se destila en un exceso de solución de ácido bórico, tras lo cual se efectúa la titulación con una solución de ácido clorhídrico o ácido sulfúrico.

3. Reactivos

3.1. Sulfato de potasio

- 3.2. Catalizador: óxido de cobre (II), CuO, o sulfato de cobre (II) pentahidratado, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- 3.3. Cinc granulado
- 3.4. Ácido sulfúrico, $\rho_{20} = 1,84 \text{ g/ml}$
- 3.5. Ácido sulfúrico, solución volumétrica patrón, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,25 \text{ mol/l}$
- 3.6. Ácido sulfúrico, solución volumétrica patrón, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,10 \text{ mol/l}$
- 3.7. Ácido sulfúrico, solución volumétrica patrón, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/l}$
- 3.8. Indicador de rojo de metilo; disolver 300 mg de rojo de metilo en 100 ml de etanol, $\sigma = 95\text{-}96 \text{ \% (v/v)}$.
- 3.9. Solución de hidróxido de sodio (puede utilizarse la calidad técnica), $\beta = 40 \text{ g/100 ml (m/v: 40 \%)}$
- 3.10. Hidróxido de sodio, solución volumétrica patrón, $c(\text{NaOH}) = 0,25 \text{ mol/l}$
- 3.11. Hidróxido de sodio, solución volumétrica patrón, $c(\text{NaOH}) = 0,10 \text{ mol/l}$
- 3.12. Piedra pómez granulada, lavada en ácido clorhídrico y calcinada
- 3.13. Acetanilida (punto de fusión = $114 \text{ }^\circ\text{C}$, contenido de N = $10,36 \text{ \%}$)
- 3.14. Sacarosa (exenta de nitrógeno)
- 3.15. Ácido bórico (H_3BO_3)
- 3.16. Solución de indicador de rojo de metilo: disolver 100 mg de rojo de metilo en 100 ml de etanol o metanol.
- 3.17. Solución de verde de bromocresol: disolver 100 mg de verde de bromocresol en 100 ml de etanol o metanol.
- 3.18. Solución de ácido bórico (10 g/l a 40 g/l, en función del instrumental empleado)

Si se aplica la detección colorimétrica del punto final, debe añadirse rojo de metilo y verde de bromocresol a las soluciones de ácido bórico. Si se prepara 1 l de solución de ácido bórico, antes de ajustar el volumen deberán añadirse 7 ml de solución de indicador de rojo de metilo (3.16) y 10 ml de solución de verde de bromocresol (3.17).

Dependiendo del agua utilizada, el pH de la solución de ácido bórico podría variar de un lote a otro. A menudo es necesario un ajuste con un pequeño volumen de álcali para obtener un blanco positivo.

Nota: Añadiendo de 3 ml a 4 ml aproximadamente de NaOH (3.11) a 1 l de solución de ácido bórico de 10 g/l se suelen conseguir buenos ajustes. Guardar la solución a temperatura ambiente, al abrigo de la luz y de fuentes de vapores amoniacales.

- 3.19. Ácido clorhídrico, solución volumétrica patrón, $c(\text{HCl}) = 0,10 \text{ mol/l}$

Nota: Pueden emplearse otras concentraciones de soluciones volumétricas (3.5, 3.6, 3.7, 3.10, 3.11 y 3.19), si en los cálculos se hacen las correcciones correspondientes. Las concentraciones deberán expresarse siempre con cuatro decimales.

4. Instrumental

El adecuado para efectuar la digestión, la destilación y la titulación conforme al procedimiento Kjeldahl.

5. Procedimiento

5.1. Digestión

Pesar, con una precisión de 0,001 g, 1 g de la muestra, y pasar esta al matraz del aparato de digestión. Añadir 15 g de sulfato de potasio (3.1.), una cantidad apropiada de catalizador (3.2) (de 0,3 g a 0,4 g de óxido de cobre [II] o de 0,9 g a 1,2 g de sulfato de cobre [II] pentahidratado), 25 ml de ácido sulfúrico (3.4) y, si es necesario, unos pocos gránulos de piedra pómez (3.12), y mezclar.

Calentar el matraz, moderadamente al principio, agitándolo en círculos de vez en cuando, si es necesario, hasta que la masa se haya carbonizado y la espuma haya desaparecido; a continuación, calentar más intensamente hasta que el líquido hierva de manera constante. El calentamiento es el adecuado si el ácido en ebullición se condensa en la pared del matraz. Evitar que los lados se sobrecalienten y que se adhieran a ellos partículas orgánicas.

Cuando la solución se aclare y adopte un color verde claro, seguir hirviendo durante otras dos horas, y dejar enfriar a continuación.

5.2. Destilación

Añadir con cuidado suficiente agua para que los sulfatos se disuelvan por completo. Dejar enfriar y, a continuación, si es necesario, añadir unos pocos gránulos de cinc (3.3). Proceder conforme al punto 5.2.1 o 5.2.2.

5.2.1. Destilación en ácido sulfúrico

Verter en el matraz receptor del aparato de destilación exactamente 25 ml de ácido sulfúrico (3.5) o (3.7), en función del supuesto contenido de nitrógeno. Añadir unas pocas gotas del indicador de rojo de metilo (3.8).

Conectar el matraz de digestión al refrigerante del aparato de destilación y sumergir el extremo del refrigerante, como mínimo, 1 cm en el líquido contenido en el matraz receptor (véase la observación del punto 8.3). Verter lentamente 100 ml de solución de hidróxido de sodio (3.9) en el matraz de digestión sin pérdida de amoníaco (véase la observación del punto 8.1). Calentar el matraz hasta que el amoníaco se haya destilado.

5.2.2. Destilación en ácido bórico

Si la titulación del contenido de amoníaco del destilado se efectúa manualmente, se aplica el procedimiento mencionado a continuación. Si la unidad de destilación está completamente automatizada e incluye la titulación del contenido de amoníaco del destilado, seguir las instrucciones de empleo del fabricante.

Colocar un matraz receptor que contenga de 25 ml a 30 ml de la solución de ácido bórico (3.18) bajo la salida del refrigerante, de manera que el tubo de descarga quede bajo la superficie del exceso de solución de ácido bórico. Ajustar la unidad de destilación para que dispense 50 ml de solución de hidróxido de sodio (3.9). Poner en funcionamiento la unidad de destilación siguiendo las instrucciones del fabricante y destilar el amoníaco desprendido por la adición de la solución de hidróxido de sodio. Recoger el destilado en la solución receptora de ácido bórico. La cantidad de destilado (tiempo de destilación de vapor) depende de la cantidad de nitrógeno que contiene la muestra. Seguir las instrucciones del fabricante.

Nota: En una unidad de destilación semiautomática, la adición de exceso de hidróxido de sodio y la destilación de vapor se realizan de forma automática.

5.3. Titulación

Proceder conforme al punto 5.3.1 o 5.3.2.

5.3.1. Ácido sulfúrico

Titular el exceso de ácido sulfúrico en el matraz receptor con solución de hidróxido de sodio (3.10 o 3.11), dependiendo de la concentración del ácido sulfúrico empleado, hasta alcanzar el punto final.

5.3.2. Ácido bórico

Titular, empleando una bureta, el contenido del matraz receptor con la solución volumétrica patrón de ácido clorhídrico (3.19) o con la solución volumétrica patrón de ácido sulfúrico (3.6), y leer la cantidad de titulante utilizado.

Si se aplica la detección colorimétrica del punto final, este se alcanza cuando aparece el primer rastro de coloración rosa en el contenido. Leer la bureta con una precisión de 0,05 ml. Una placa agitadora magnética iluminada o un detector fotométrico pueden ayudar a visualizar el punto final.

También puede hacerse automáticamente utilizando un destilador de vapor con titulación automática.

Utilizar el destilador o el destilador/titulador siguiendo las correspondientes instrucciones del fabricante.

Nota: Si se utiliza un sistema de titulación automática, la titulación empieza inmediatamente después de que comience la destilación, y se emplea la solución de ácido bórico al 1 % (3.18).

Si se utiliza una unidad de destilación completamente automática, la titulación automática del amoníaco puede también llevarse a cabo con detección del punto final mediante un sistema de pH potenciométrico.

En este caso se emplea un titulador automático con pehachímetro. El pehachímetro deberá calibrarse adecuadamente en el intervalo de pH 4 a pH 7, siguiendo los procedimientos normales de laboratorio para la calibración del pH.

El punto final del pH de la titulación se alcanza con un pH 4,6, que es el punto álgido de la curva de titulación (punto de inflexión).

5.4. Ensayo en blanco

Para confirmar que los reactivos no tienen nitrógeno, efectuar un ensayo en blanco (digestión, destilación y titulación) con un 1 g de sacarosa (3.14) en lugar de la muestra.

6. Cálculo de los resultados

Los cálculos se realizan conforme al punto 6.1 o 6.2.

6.1. Cálculo para la titulación según el punto 5.3.1

El contenido de proteína bruta, expresado en porcentaje en peso, se calcula según la fórmula siguiente:

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

donde:

V_0 = es el volumen (ml) de NaOH (3.10 o 3.11) empleado en el ensayo en blanco;

V_1 = es el volumen (ml) de NaOH (3.10 o 3.11) empleado en la titulación de la muestra;

c = es la concentración (mol/l) de hidróxido de sodio (3.10 o 3.11);

m = es el peso (g) de la muestra.

6.2 Cálculo para la titulación según el punto 5.3.2

6.2.1. Titulación con ácido clorhídrico

El contenido de proteína bruta, expresado en porcentaje en peso, se calcula según la fórmula siguiente:

$$\frac{(V_1 - V_0) \times c \times 1,4 \times 6,25}{m}$$

donde:

m = es el peso (g) de la porción de ensayo;

c = es la concentración (mol/l) de solución volumétrica patrón de ácido clorhídrico (3.19);

V_0 = es el volumen (en mililitros) de ácido clorhídrico empleado en el ensayo en blanco;

V_1 = es el volumen (en mililitros) de ácido clorhídrico empleado para la porción de ensayo.

6.2.2. Titulación con ácido sulfúrico

El contenido de proteína bruta, expresado en porcentaje en peso, se calcula según la fórmula siguiente:

$$\frac{(V_1 - V_0) \times c \times 2,8 \times 6,25}{m}$$

donde:

m = es el peso (g) de la porción de ensayo;

c = es la concentración (mol/l) de solución volumétrica patrón de ácido sulfúrico (3.6);

V_0 = es el volumen (en mililitros) de ácido sulfúrico (3.6) empleado para el ensayo en blanco;

V_1 = es el volumen (en mililitros) de ácido sulfúrico (3.6) empleado para la porción de ensayo.

7. Verificación del método**7.1. Repetibilidad**

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas con la misma muestra no debe exceder del:

- 0,2 % en valor absoluto, en el caso de contenidos de proteína bruta inferiores al 20 %,
- 1,0 % del valor superior, en el caso de contenidos de proteína bruta del 20 % a 40 %,
- 0,4 % en valor absoluto, en el caso de contenidos de proteína bruta superiores al 40 %.

7.2. Exactitud

Efectuar el análisis (digestión, destilación y titulación) con 1,5 g a 2,0 g de acetanilida (3.13) en presencia de 1 g de sacarosa (3.14); 1 g de acetanilida consume 14,80 ml de ácido sulfúrico (3.5). La recuperación debe ser de al menos el 99 %.

8. Observaciones

- 8.1. El instrumental puede ser de tipo manual, semiautomático o automático. Si requiere un transvase entre la digestión y la destilación, este debe tener lugar sin pérdidas. Si el matraz del aparato de destilación no va provisto de un embudo de decantación, añadir el hidróxido de sodio inmediatamente antes de conectarlo al refrigerante, vertiendo el líquido de forma que caiga lentamente por la pared del matraz.
- 8.2. Si el producto de la digestión se solidifica, recomenzar la determinación con una cantidad de ácido sulfúrico (3.4) mayor que la especificada anteriormente.
- 8.3. En el caso de productos con un bajo contenido de nitrógeno, el volumen de ácido sulfúrico (3.7) que se pone en el matraz receptor puede reducirse, si es necesario, a 10 ml o 15 ml, enrasando a continuación con agua hasta los 25 ml.
- 8.4. Aunque para los análisis ordinarios pueden emplearse métodos de determinación de la proteína bruta alternativos, el método Kjeldahl descrito en esta parte C es el método de referencia. La equivalencia de los resultados obtenidos con el método alternativo (por ejemplo, DUMAS) respecto de los obtenidos con el método de referencia debe demostrarse para cada una de las matrices. Puesto que los resultados obtenidos con un método alternativo, aun habiéndose verificado la equivalencia, pueden desviarse ligeramente de los obtenidos con el método de referencia, es necesario mencionar en el informe analítico el método de análisis empleado para la determinación de la proteína bruta.

D. DETERMINACIÓN DE LA UREA**1. Objeto y ámbito de aplicación**

Este método permite determinar el nivel de urea en los piensos.

2. Principio

La muestra se suspende en agua con un agente clarificante. A continuación se filtra la suspensión. El contenido de urea del filtrado se determina tras añadir 4-dimetilaminobenzaldehído (4-DMAB) midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 420 nm.

3. Reactivos

- 3.1. Solución de 4-dimetilaminobenzaldehído: disolver 1,6 g de 4-DMAB en 100 ml de etanol al 96 % y añadir 10 ml de ácido clorhídrico (p_{20} 1,19 g/ml). Este reactivo se conserva como máximo dos semanas.
- 3.2. Solución de Carrez I: disolver en agua 21,9 g de acetato de cinc, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$, y 3 g de ácido acético glacial. Enrasar con agua a 100 ml.
- 3.3. Solución de Carrez II: disolver en agua 10,6 g de ferrocianuro de potasio, $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. Enrasar con agua a 100 ml.
- 3.4. Carbón activo que no absorba urea (debe comprobarse).

- 3.5. Solución de urea al 0,1 % (p/v)

4. **Instrumental**

- 4.1. Mezclador (tambor): de 35 a 40 revoluciones por minuto aproximadamente
- 4.2. Tubos de ensayo: 160 × 16 mm con tapones esmerilados
- 4.3. Espectrofotómetro

5. **Procedimiento**

5.1. *Análisis de la muestra*

Pesar, con una precisión de 1 mg, 2 g de la muestra e introducirlos con 1 g de carbón activo (3.4) en un matraz aforado de 500 ml. Añadir 400 ml de agua y 5 ml de solución de Carrez I (3.2), mezclar durante aproximadamente 30 segundos y añadir 5 ml de solución de Carrez II (3.3). Mezclar durante 30 minutos en el tambor. Enrasar con agua, agitar y filtrar.

Retirar 5 ml de los filtrados incoloros transparentes, colocarlos en tubos de ensayo con tapones esmerilados, añadir 5 ml de solución de 4-DMAB (3.1) y mezclar. Colocar los tubos en una baño maría a 20 °C (+/- 4 °C). Transcurridos 15 minutos, medir la densidad óptica de la solución de muestra con el espectrofotómetro a 420 nm. Comparar con la solución de ensayo en blanco de los reactivos.

5.2. *Curva de calibración*

Retirar de la solución de urea (3.5) unos volúmenes de 1, 2, 4, 5 y 10 ml, verterlos en matraces aforados de 100 ml y enrasar con agua. Retirar 5 ml de cada solución, añadir a cada una de ellas 5 ml de solución de 4-DMAB (3.1), homogeneizar y medir la densidad óptica, como se ha mostrado anteriormente, comparándola con una solución de control que contenga 5 ml de 4-DMAB y 5 ml de agua sin urea. Trazar la curva de calibración.

6. **Cálculo de los resultados**

Determinar la cantidad de urea de la muestra empleando la curva de calibración.

Expresar el resultado en porcentaje de la muestra.

7. **Observaciones**

- 7.1. Si el contenido de urea excede del 3 %, reducir la muestra a 1 g o diluir la solución inicial de manera que en 500 ml no haya más de 50 mg de urea.
- 7.2. Si los contenidos de urea son bajos, incrementar la muestra, siempre que el filtrado siga siendo transparente e incoloro.
- 7.3. Si la muestra contiene compuestos nitrogenados simples, como aminoácidos, la densidad óptica deberá medirse a 435 nm.

E. DETERMINACIÓN DE LAS BASES NITROGENADAS VOLÁTILES

I. **POR MICRODIFUSIÓN**

1. **Objeto y ámbito de aplicación**

Este método permite determinar el contenido de bases nitrogenadas volátiles de los piensos, expresadas en amoniaco.

2. **Principio**

La muestra se extrae con agua y la solución se clarifica y se filtra. Las bases nitrogenadas volátiles se desplazan por microdifusión con una solución de carbonato de potasio, se recogen en una solución de ácido bórico y se titulan con ácido sulfúrico.

3. Reactivos

- 3.1. Ácido tricloroacético, solución al 20 % (p/v)
- 3.2. Indicador: disolver 33 mg de verde de bromocresol y 65 mg de rojo de metilo en 100 ml de etanol al 95-96 % (v/v).
- 3.3. Solución de ácido bórico: en un matraz aforado de 1 l, disolver 10 g de ácido bórico en 200 ml de etanol al 95-96 % (v/v) y 700 ml de agua. Añadir 10 ml de indicador (3.2). Mezclar y, si es necesario, ajustar la coloración de la solución al rojo claro añadiendo una solución de hidróxido de sodio. Con 1 ml de esta solución se fijarán, como máximo, 300 µg de NH₃.
- 3.4. Solución saturada de carbonato de potasio: disolver 100 g de carbonato de potasio en 100 ml de agua en ebullición. Dejar enfriar y filtrar.
- 3.5. Ácido sulfúrico de 0,01 mol/l

4. Instrumental

- 4.1. Mezclador (tambor): de 35 a 40 revoluciones por minuto aproximadamente
- 4.2. Células de Conway de vidrio o de plástico (véase el diagrama)
- 4.3. Microburetas graduadas a 1/100 ml

5. Procedimiento

Pesar, con una precisión de 1 mg, 10 g de la muestra e introducirlos con 100 ml de agua en un matraz aforado de 200 ml. Mezclar o remover en el tambor durante 30 minutos. Añadir 50 ml de solución de ácido tricloroacético (3.1), enrasar con agua, agitar enérgicamente y filtrar por un filtro de pliegues.

Empleando una pipeta, verter 1 ml de solución de ácido bórico (3.3) en la parte central de la célula de Conway y 1 ml del filtrado de la muestra en la corona de la célula. Cubrir parcialmente con la tapa engrasada. Dejar caer rápidamente en la corona 1 ml de solución saturada de carbonato de potasio (3.4) y cerrar la tapa de manera que la célula quede herméticamente cerrada. Girar con precaución la célula haciéndola rotar en un plano horizontal, de forma que se mezclen los dos reactivos. Dejar incubar, bien durante al menos cuatro horas a temperatura ambiente, bien durante una hora a 40 °C.

Con ayuda de una microbureta (4.3), titular las bases volátiles en la solución de ácido bórico con ácido sulfúrico (3.5).

Efectuar un ensayo en blanco siguiendo el mismo procedimiento, pero sin la muestra que debe analizarse.

6. Cálculo de los resultados

1 ml de una solución de 0,01 mol/l de H₂SO₄ corresponde a 0,34 mg de amoníaco.

Expresar el resultado en porcentaje de la muestra.

Repetibilidad

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas con la misma muestra no excederá del:

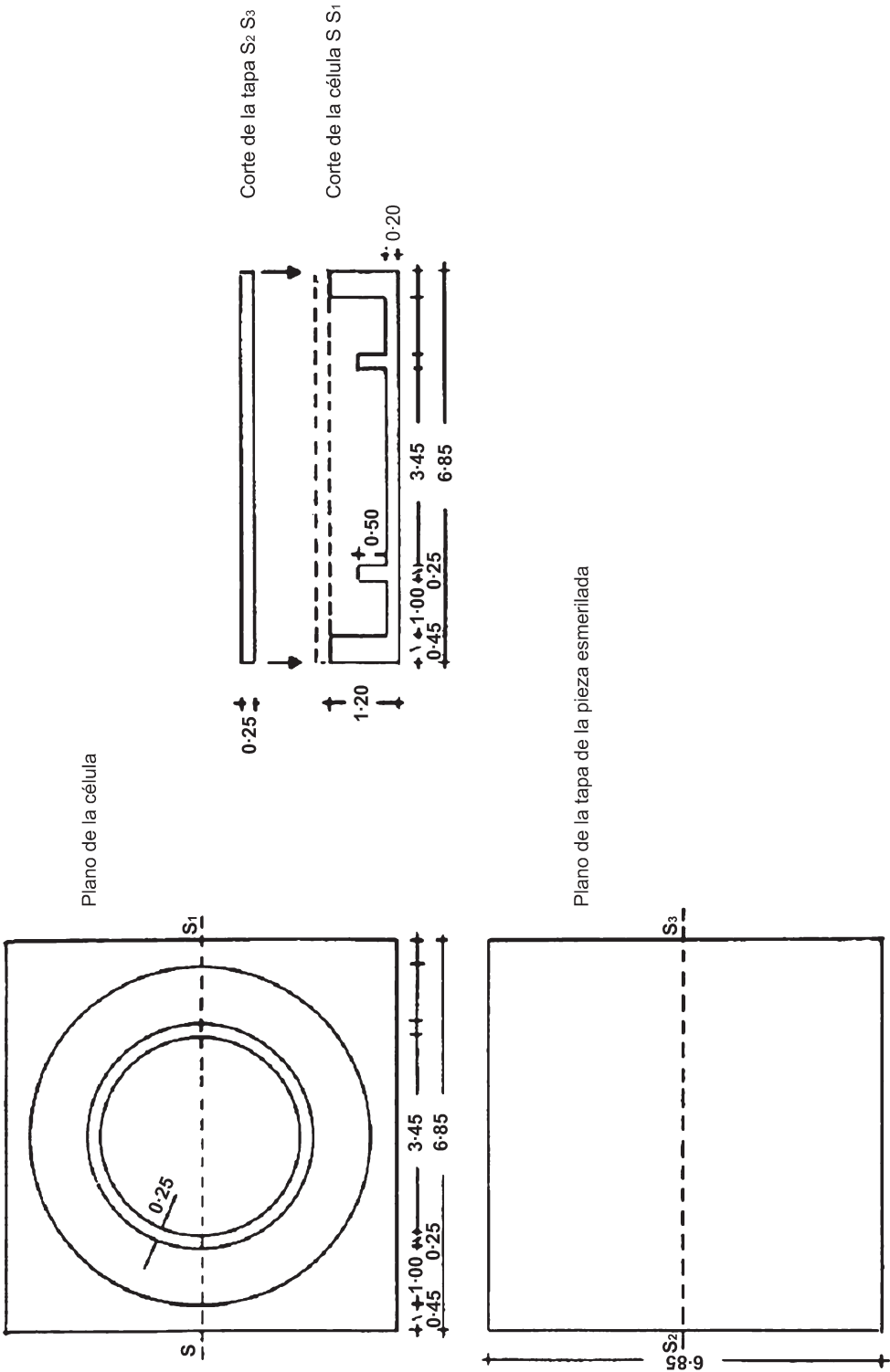
- 10 % en valor relativo, en el caso de contenidos de amoníaco inferiores al 1,0 %,
- 0,1 % en valor absoluto, en el caso de contenidos de amoníaco iguales o superiores al 1,0 %.

7. Observación

Si el contenido de amoníaco de la muestra es superior al 0,6 %, diluir el filtrado inicial.

CONWAY CELL

Scale 1/1



II. POR DESTILACIÓN

1. Objeto y ámbito de aplicación

Este método permite determinar el contenido de bases nitrogenadas volátiles, expresadas en amoníaco, de la harina de pescado que no contenga prácticamente urea. Únicamente es aplicable para contenidos de amoníaco inferiores al 0,25 %.

2. Principio

La muestra se extrae con agua y la solución se clarifica y se filtra. Las bases nitrogenadas volátiles se desplazan en el punto de ebullición añadiendo óxido de magnesio y se recogen en una cantidad determinada de ácido sulfúrico, cuyo exceso se titula por retroceso con una solución de hidróxido de sodio.

3. Reactivos

- 3.1. Ácido tricloroacético, solución al 20 % (p/v)
- 3.2. Óxido de magnesio
- 3.3. Emulsión antiespumante (por ejemplo, silicona)
- 3.4. Ácido sulfúrico de 0,05 mol/l
- 3.5. Solución de hidróxido de sodio de 0,1 mol/l
- 3.6. Solución de rojo de metilo al 0,3 % en etanol al 95 %-96 % (v/v)

4. Instrumental

- 4.1. Mezclador (tambor): de 35 a 40 revoluciones por minuto aproximadamente
- 4.2. Aparato de destilación de tipo Kjeldahl

5. Procedimiento

Pesar, con una precisión de 1 mg, 10 g de la muestra e introducirlos con 100 ml de agua en un matraz aforado de 200 ml. Mezclar o remover en el tambor durante 30 minutos. Añadir 50 ml de solución de ácido tricloroacético (3.1), enrasar con agua, agitar enérgicamente y filtrar por un filtro de pliegues.

Tomar una cantidad de filtrado limpio que sea adecuada para el contenido supuesto de bases nitrogenadas volátiles (en general, basta con 100 ml). Diluir hasta 200 ml y añadir 2 g de óxido de magnesio (3.2) y unas pocas gotas de emulsión antiespumante (3.3). La solución debe ser alcalina en el papel de tornasol; si no lo es, añadir un poco de óxido de magnesio (3.2). Proceder conforme a los puntos 5.2 y 5.3 del método de análisis para la determinación del contenido de proteína bruta (parte C del presente anexo).

Efectuar un *ensayo en blanco* siguiendo el mismo procedimiento, pero sin la muestra que debe analizarse.

6. Cálculo de los resultados

1 ml de solución de 0,05 mol/l de H_2SO_4 corresponde a 1,7 mg de amoníaco.

Expresar el resultado en porcentaje de la muestra.

Repetibilidad

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas con la misma muestra no excederá del 10 % de amoníaco, en valor relativo.

F. DETERMINACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS (EXCEPTO TRIPTÓFANO)

1. Objeto y ámbito de aplicación

Este método permite determinar la presencia en los piensos de aminoácidos libres (sintéticos y naturales) y totales (unidos en péptidos y libres), utilizando un analizador de aminoácidos. Es aplicable a los siguientes aminoácidos:

cistina y cisteína, metionina, lisina, treonina, alanina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, fenilalanina, prolina, serina, tirosina y valina.

El método no distingue entre las sales de los aminoácidos, y tampoco permite diferenciar entre sus formas D y L. No es válido para determinar el triptófano ni los análogos hidroxilados de los aminoácidos.

2. Principio

2.1. Aminoácidos libres

Los aminoácidos libres se extraen con ácido clorhídrico diluido. Las macromoléculas nitrogenadas extraídas a la vez se precipitan con ácido sulfosalicílico y se eliminan por filtración. El pH de la solución filtrada se ajusta a 2,20. Los aminoácidos se separan por cromatografía de intercambio iónico y se determinan por reacción con ninhidrina mediante detección fotométrica a 570 nm.

2.2. Aminoácidos totales

El procedimiento elegido depende de los aminoácidos estudiados. La cistina, la cisteína y la metionina deben oxidarse a ácido cisteico y metionina sulfona, respectivamente, antes de la hidrólisis. La tirosina debe determinarse en hidrolizados de muestras no oxidadas. Todos los demás aminoácidos citados en el punto 1 pueden determinarse tanto en muestras oxidadas como no oxidadas.

La oxidación se realiza a 0 °C con una mezcla de ácido per fórmico y fenol. El exceso de reactivo oxidante se descompone con disulfito de sodio. La muestra oxidada o no oxidada se hidroliza con ácido clorhídrico (3.20) durante 23 horas. El pH del hidrolizado se ajusta a 2,20. Los aminoácidos se separan por cromatografía de intercambio iónico y se determinan por reacción con ninhidrina mediante detección fotométrica a 570 nm (440 nm en el caso de la prolina).

3. Reactivos

Debe utilizarse agua bidestilada o agua de calidad equivalente (conductividad < 10 µS).

- 3.1. Peróxido de hidrógeno, p (p/p) = 30 %
- 3.2. Ácido fórmico, p (p/p) = 98-100 %
- 3.3. Fenol
- 3.4. Disulfito de sodio
- 3.5. Hidróxido de sodio
- 3.6. Ácido 5-sulfosalicílico dihidratado
- 3.7. Ácido clorhídrico, con una densidad aproximada de 1,18 g/ml
- 3.8. Citrato trisódico dihidratado
- 3.9. 2,2'-Tiodietanol (tiodiglicol)
- 3.10. Cloruro de sodio
- 3.11. Ninhidrina
- 3.12. Éter de petróleo, con un intervalo de ebullición de 40-60 °C
- 3.13. Norleucina, u otro compuesto adecuado para ser utilizado como patrón interno
- 3.14. Gas nitrógeno (< 10 ppm de oxígeno)
- 3.15. 1-Octanol

- 3.16. Aminoácidos
- 3.16.1. Sustancias patrón enumeradas en el punto 1. Compuestos puros sin agua de cristalización. Desecar en vacío sobre P_2O_5 o H_2SO_4 durante una semana antes de su utilización.
- 3.16.2. Ácido cisteico
- 3.16.3. Metionina sulfona
- 3.17. Solución de hidróxido de sodio, $c = 7,5 \text{ mol/l}$:
Disolver 300 g de NaOH (3.5) en agua y enrasar a 1 l.
- 3.18. Solución de hidróxido de sodio, $c = 1 \text{ mol/l}$:
Disolver 40 g de NaOH (3.5) en agua y enrasar a 1 l.
- 3.19. Solución de ácido fórmico y fenol:
Mezclar 889 g de ácido fórmico (3.2) con 111 g de agua y añadir 4,73 g de fenol (3.3).
- 3.20. Mezcla de hidrólisis, $c = 6 \text{ mol de HCl/l}$, con 1 g de fenol/l:
Añadir 1 g de fenol (3.3) a 492 ml de HCl (3.7) y enrasar a 1 l con agua.
- 3.21. Mezcla de extracción, $c = 0,1 \text{ mol de HCl/l}$, con un 2 % de tiodiglicol: tomar 8,2 ml de HCl (3.7), diluir con unos 900 ml de agua, añadir 20 ml de tiodiglicol (3.9) y enrasar a 1 l con agua (no mezclar 3.7 y 3.9 directamente).
- 3.22. Ácido 5-sulfosalicílico, $\beta = 6 \%$:
Disolver 60 g de ácido 5-sulfosalicílico (3.6) en agua y enrasar a 1 l con agua.
- 3.23. Mezcla de oxidación (ácido per fórmico y fenol):
Mezclar 0,5 ml de peróxido de hidrógeno (3.1) con 4,5 ml de solución de ácido fórmico y fenol (3.19) en un pequeño vaso de precipitado. Incubar a 20-30 °C durante una hora a fin de que se forme ácido per fórmico y, a continuación, enfriar sobre baño de hielo y agua (15 minutos) antes de añadir a la muestra.
Precaución: evitar el contacto con la piel y llevar vestimenta de protección.
- 3.24. Solución reguladora de citrato, $c = 0,2 \text{ mol de Na}^+/\text{l}$, $\text{pH} = 2,20$:
Disolver 19,61 g de citrato de sodio (3.8), 5 ml de tiodiglicol (3.9), 1 g de fenol (3.3) y 16,50 ml de HCl (3.7) en unos 800 ml de agua. Ajustar el pH a 2,20. Enrasar a 1 l con agua.
- 3.25. Soluciones reguladoras de elución, preparadas según las condiciones del analizador utilizado (4.9)
- 3.26. Reactivo de ninhidrina, preparado según las condiciones del analizador utilizado (4.9)
- 3.27. Soluciones patrón de aminoácidos. Estas soluciones deberán conservarse a una temperatura inferior a 5 °C.
- 3.27.1. Solución patrón madre de aminoácidos (3.16.1)
 $c = 2,5 \mu\text{mol/ml}$ de cada uno en ácido clorhídrico
Disponibles en los comercios
- 3.27.2. Solución patrón madre de ácido cisteico y metionina sulfona, $c = 1,25 \mu\text{mol/ml}$
Disolver 0,2115 g de ácido cisteico (3.16.2) y 0,2265 g de metionina sulfona (3.16.3) en solución reguladora de citrato (3.24) en un matraz aforado de 1 l y enrasar con solución reguladora de citrato. Conservar a menos de 5 °C durante un período máximo de 12 meses. Esta solución no se utiliza si la solución patrón madre (3.27.1) contiene ácido cisteico y metionina sulfona.

3.27.3. Solución patrón madre del patrón interno, por ejemplo, norleucina, $c = 20 \mu\text{mol/ml}$

Disolver 0,6560 g de norleucina (3.13) en solución reguladora de citrato (3.24) en un matraz aforado y enrasar a 250 ml con solución reguladora de citrato. Conservar a menos de 5 °C durante un período máximo de seis meses.

3.27.4. Solución de calibración de los aminoácidos patrón para utilizar con los hidrolizados, $c = 5 \text{ nmol}/50 \mu\text{l}$ de ácido cisteico y metionina sulfona y $c = 10 \text{ nmol}/50 \mu\text{l}$ de los demás aminoácidos. Disolver 2,2 g de cloruro de sodio (3.10) en un vaso de precipitado de 100 ml con 30 ml de solución reguladora de citrato (3.24). Añadir 4,00 ml de solución patrón madre de aminoácidos (3.27.1), 4,00 ml de solución patrón madre de ácido cisteico y metionina sulfona (3.27.2) y 0,50 ml de solución patrón madre de patrón interno (3.27.3), si se utiliza. Ajustar el pH a 2,20 con hidróxido de sodio (3.18).

Transvasar cuantitativamente a un matraz aforado de 50 ml, enrasar con solución reguladora de citrato (3.24) y mezclar.

Conservar a menos de 5 °C durante un período máximo de tres meses.

Véanse también las observaciones del punto 9.1.

3.27.5. Solución de calibración de los aminoácidos patrón para utilizar con los hidrolizados preparados según el punto 5.3.3.1 y con los extractos (5.2). La solución de calibración se prepara con arreglo al punto 3.27.4, pero sin cloruro de sodio.

Conservar a menos de 5 °C durante un período máximo de tres meses.

4. Instrumental

4.1. Matraz de fondo redondo de 100 ml o 250 ml, provisto de refrigerante de reflujo

4.2. Frasco de vidrio borosilicato de 100 ml con tapón de rosca provisto de junta de goma/teflón (por ejemplo Duran, Schott), para uso en estufa

4.3. Estufa con ventilación forzada y con un regulador de la temperatura de exactitud superior a $\pm 2 \text{ °C}$

4.4. Pehachímetro (lectura con tres decimales)

4.5. Filtro de membrana (0,22 μm)

4.6. Centrífuga

4.7. Evaporador rotativo de vacío

4.8. Agitador mecánico o magnético

4.9. Analizador de aminoácidos o equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) con columna de intercambio iónico, dispositivo para ninhidrina, derivatización postcolumna y detector fotométrico

La columna se llena con resinas de poliestireno sulfonadas capaces de separar unos aminoácidos de otros y los aminoácidos de otros materiales que reaccionan con la ninhidrina. El flujo en las conducciones de solución reguladora y de ninhidrina se regula mediante bombas con una estabilidad de flujo de $\pm 0,5 \%$ en el período que abarca tanto la fase de calibración del patrón como el análisis de la muestra.

Con algunos analizadores de aminoácidos pueden utilizarse procedimientos de hidrólisis en los que el hidrolizado presenta una concentración de sodio de $c = 0,8 \text{ mol/l}$ y contiene todo el ácido fórmico residual de la fase de oxidación. Otros no proporcionan una separación satisfactoria de determinados aminoácidos si el hidrolizado contiene ácido fórmico en exceso o elevadas concentraciones de ión sodio. En este caso, el volumen de ácido se reduce por evaporación hasta aproximadamente 5 ml después de la hidrólisis y antes de ajustar el pH. La evaporación deberá realizarse en vacío a 40 °C como máximo.

5. Procedimiento

5.1. Preparación de la muestra

La muestra se muele hasta que pase por un tamiz de 0,5 mm. Las muestras con humedad elevada deben secarse al aire a una temperatura no superior a 50 °C, o bien liofilizarse antes de la molienda. Las muestras con un elevado contenido de grasa deberán someterse a extracción con éter de petróleo (3.12) antes de la molienda.

5.2. *Determinación de los aminoácidos libres en piensos y premezclas*

Pesar en un Erlenmeyer, con una precisión de 0,2 mg, una cantidad adecuada (1-5 g) de la muestra preparada (5.1), y añadir 100,0 ml de mezcla de extracción (3.21). Agitar la mezcla durante 60 minutos utilizando un agitador mecánico o magnético (4.8). Dejar que sedimente y pipetear 10,0 ml de la solución sobrenadante a un vaso de precipitado de 100 ml.

Añadir removiendo 5,0 ml de solución de ácido sulfosalicílico (3.22) y seguir removiendo con ayuda de un agitador magnético durante cinco minutos. Filtrar o centrifugar el sobrenadante para eliminar el posible precipitado. Verter 10,0 ml de la solución resultante en un vaso de precipitado de 100 ml y ajustar el pH a 2,20 con solución de hidróxido de sodio (3.18), transvasar a un matraz aforado de volumen adecuado con solución reguladora de citrato (3.24) y enrasar con esta misma solución reguladora.

Si se utiliza un patrón interno, añadir 1,00 ml de patrón interno (3.27.3) por cada 100 ml de solución final y enrasar con la solución reguladora (3.24).

Pasar a la fase de cromatografía según el punto 5.4.

Si los extractos no se examinan el mismo día, deben conservarse a menos de 5 °C.

5.3. *Determinación de los aminoácidos totales*

5.3.1. Oxidación

Pesar, con una precisión de 0,2 mg, entre 0,1 g y 1 g de la muestra preparada (5.1), en:

- un matraz de fondo redondo de 100 ml (4.1) para hidrólisis abierta (5.3.2.3), o
- un matraz de fondo redondo de 250 ml (4.1), si se requiere una baja concentración de sodio (5.3.3.1), o
- un frasco de 100 ml con tapón de rosca (4.2) para hidrólisis cerrada (5.3.2.4).

La porción de muestra pesada debe tener un contenido de nitrógeno de unos 10 mg y un contenido de humedad no superior a 100 mg.

Colocar el matraz o el frasco en un baño de hielo y agua y enfriarlo a 0 °C, añadir 5 ml de mezcla de oxidación (3.23) y mezclar con una espátula de vidrio de punta curvada. Cerrar el matraz o el frasco, con la espátula dentro, por medio de una película impermeable al aire, colocar el baño de hielo y agua con el recipiente cerrado en un frigorífico a 0 °C y dejar durante 16 horas. Transcurridas esas 16 horas, sacar del frigorífico y descomponer el exceso de reactivo de oxidación añadiendo 0,84 g de disulfito de sodio (3.4).

Pasar al punto 5.3.2.1.

5.3.2. Hidrólisis

5.3.2.1. Hidrólisis de muestras oxidadas

Añadir 25 ml de mezcla de hidrólisis (3.20) a la muestra oxidada preparada según el punto 5.3.1, procurando arrastrar cualquier residuo de muestra que hubiera quedado adherido a las paredes del recipiente y a la espátula.

Según el procedimiento de hidrólisis utilizado, proceder según el punto 5.3.2.3 o 5.3.2.4.

5.3.2.2. Hidrólisis de muestras no oxidadas

Pesar en un matraz de fondo redondo de 100 ml o 250 ml (4.1), o en un frasco de 100 ml con tapón de rosca (4.2), con una precisión de 0,2 mg, entre 0,1 g y 1 g de la muestra preparada (5.1). La porción de muestra pesada debe tener un contenido de nitrógeno de unos 10 mg. Añadir cuidadosamente 25 ml de mezcla de hidrólisis (3.20) y mezclar con la muestra. Proceder según el punto 5.3.2.3 o 5.3.2.4.

5.3.2.3. Hidrólisis abierta

Añadir 3 perlas de vidrio a la mezcla del matraz (preparada según el punto 5.3.2.1 o 5.3.2.2) y hervir con borboteo continuo y reflujo durante 23 horas. Al terminar la hidrólisis, lavar el refrigerante con 5 ml de solución reguladora de citrato (3.24). Desconectar el matraz y enfriarlo en un baño de hielo.

Proceder según el punto 5.3.3.

5.3.2.4. Hidrólisis cerrada

Colocar el frasco con la mezcla preparada según el punto 5.3.2.1 o 5.3.2.2 en una estufa (4.3) a 110 °C. Durante la primera hora, para prevenir la formación de presión (debido a la producción de sustancias gaseosas) y evitar el peligro de explosión, poner el tapón de rosca encima del recipiente, pero sin cerrarlo. Al cabo de una hora, cerrar el recipiente con el tapón y dejarlo en la estufa (4.3) durante 23 horas. Una vez terminada la hidrólisis, sacar el frasco de la estufa, desenroscar cuidadosamente el tapón y colocar el frasco en un baño de hielo y agua. Dejar enfriar.

En función del método de ajuste del pH (5.3.3), transvasar cuantitativamente el contenido del frasco a un vaso de precipitado de 250 ml o a un matraz de fondo redondo de 250 ml, utilizando solución reguladora de citrato (3.24).

Proceder según el punto 5.3.3.

5.3.3. Ajuste del pH

En función de la tolerancia al sodio del analizador de aminoácidos (4.9), proceder según el punto 5.3.3.1 o 5.3.3.2 para ajustar el pH.

5.3.3.1. En el caso de sistemas cromatográficos (4.9) que requieran una baja concentración de sodio

Es recomendable utilizar una solución patrón madre de patrón interno (3.27.3) si se utilizan analizadores de aminoácidos que requieran una baja concentración de sodio (cuando haya que reducir el volumen de ácido).

En este caso, añadir al hidrolizado 2,00 ml de la solución patrón madre (3.27.3) interna antes de la evaporación.

Añadir 2 gotas de 1-octanol (3.15) al hidrolizado obtenido según el punto 5.3.2.3 o 5.3.2.4.

Por medio de un evaporador rotativo (4.7), reducir el volumen a 5-10 ml en vacío a 40 °C. Si el volumen se reduce accidentalmente a menos de 5 ml, debe desecharse el hidrolizado y recomenzarse el análisis.

Ajustar el pH a 2,20 con solución de hidróxido de sodio (3.18) y pasar al punto 5.3.4.

5.3.3.2. Para los demás analizadores de aminoácidos (4.9)

Tomar los hidrolizados obtenidos de acuerdo con el punto 5.3.2.3 o 5.3.2.4 y neutralizarlos parcialmente añadiendo, mientras se remueve, 17 ml de solución de hidróxido de sodio (3.17), cuidando de que la temperatura se mantenga por debajo de 40 °C.

Ajustar el pH a 2,20 a temperatura ambiente con solución de hidróxido de sodio (3.17) y, finalmente, con solución de hidróxido de sodio (3.18). Pasar al punto 5.3.4.

5.3.4. Solución de muestra para cromatografía

Transvasar cuantitativamente el hidrolizado de pH ajustado (5.3.3.1 o 5.3.3.2) con solución reguladora de citrato (3.24) a un matraz aforado de 200 ml y enrasar con solución reguladora (3.24).

Si aún no se ha utilizado un patrón interno, añadir 2,00 ml de patrón interno (3.27.3) y enrasar con solución reguladora de citrato (3.24). Mezclar perfectamente.

Pasar a la fase de cromatografía (5.4).

Si las soluciones de muestra no se van a examinar el mismo día, deben conservarse a menos de 5 °C.

5.4. Cromatografía

Antes de realizar la cromatografía, llevar el extracto (5.2) o el hidrolizado (5.3.4) a temperatura ambiente. Agitar la mezcla y filtrar una cantidad adecuada a través de un filtro de membrana de 0,22 µm (4.5). Se obtiene una solución clara que se somete a cromatografía de intercambio iónico, utilizando un analizador de aminoácidos (4.9).

La inyección puede realizarse de forma manual o automática. Es importante que siempre se añada a la columna la misma cantidad de solución ± 0,5 % para el análisis de patrones y muestras, excepto cuando se utilice un patrón interno, y que las relaciones sodio/aminoácidos de las soluciones patrón y de muestra sean lo más parecidas posible.

En general, la frecuencia de las calibraciones depende de la estabilidad del reactivo de ninhidrina y del sistema analítico. El patrón o la muestra se diluyen con solución reguladora de citrato (3.24) para conseguir un área de pico del patrón equivalente al 30-200 % del área de pico de los aminoácidos de la muestra.

La cromatografía de aminoácidos variará ligeramente según el tipo de analizador empleado y la resina utilizada. El sistema elegido debe ser capaz de separar unos aminoácidos de otros y los aminoácidos de otros materiales que reaccionan con la ninhidrina. En el intervalo de funcionamiento, el sistema cromatográfico debe proporcionar una respuesta lineal a los cambios en las cantidades de aminoácidos que se añadan a la columna.

Durante la fase de cromatografía, cuando se analice una solución equimolar (de los aminoácidos determinados), se aplicarán las relaciones altura de valle/altura de pico que se mencionan más adelante. Esta solución equimolar debe contener al menos el 30 % de la carga máxima de cada aminoácido que puede medirse con exactitud con el sistema de análisis de aminoácidos (4.9).

Para separar la treonina de la serina, la relación altura de valle/altura de pico del más bajo de los dos aminoácidos que se solapan en el cromatograma no debe pasar de 2/10 (si solo se determinan cistina, cisteína, metionina, treonina y lisina, una separación insuficiente entre picos adyacentes afectará negativamente a la determinación). Respecto a los demás aminoácidos, la separación debe ser mejor que 1/10.

El sistema debe garantizar que la lisina se separe de los «artefactos de lisina» y de la ornitina.

6. Cálculo de los resultados

Las áreas de los picos de la muestra y el patrón se miden para cada aminoácido y la cantidad correspondiente (X) se calcula en gramos de aminoácidos por kilogramo de muestra.

$$X = \frac{A \times c \times M \times V}{B \times m \times 1\,000}$$

Si se utiliza un patrón interno, debe multiplicarse por: $\frac{D}{C}$

A = área de pico, hidrolizado o extracto

B = área de pico, solución patrón de calibración

C = área de pico, patrón interno en el hidrolizado o el extracto

D = área de pico, patrón interno, solución patrón de calibración

M = peso molecular del aminoácido que se está determinando

c = concentración del patrón en µmol/ml

m = peso de la muestra (g) (corregido para obtener el peso original si se ha desecado o desengrasado)

V = mililitros de hidrolizado total (5.3.4) o mililitros de volumen de dilución total calculado del extracto (6.1).

Tanto la cistina como la cisteína se determinan como ácido cisteico en hidrolizados de la muestra oxidada, pero se calculan como cistina ($C_6H_{12}N_2O_4S_2$, M 240,30 g/mol) utilizando un M de 120,15 g/mol (= 0,5 x 240,30 g/mol).

La metionina se determina como metionina sulfona en hidrolizados de muestra oxidada, pero se calcula como metionina utilizando el M de la metionina: 149,21 g/mol.

La metionina libre añadida se determina tras extracción como metionina, utilizando para el cálculo el mismo M.

- 6.1. El volumen total de dilución de los extractos (F) para la determinación de los aminoácidos libres (5.2) se calcula como sigue:

$$F = \frac{100 \text{ ml} \times (10 \text{ ml} + 5 \text{ ml})}{10 \text{ ml}} \times \frac{V}{10}$$

V = volumen del extracto final

7. Evaluación del método

El método se puso a prueba en un estudio intercomparativo realizado a nivel internacional en 1990 con cuatro piensos diferentes (pienso mezclado para cerdos, pienso compuesto para pollos de engorde, concentrado de proteínas y premezcla). Los resultados, tras descartar los valores atípicos, de la media y de la desviación típica se indican en los cuadros que figuran en el presente punto:

Medias en g/kg

Material de referencia	Aminoácido			
	Treonina	Cistina y cisteína	Metionina	Lisina
Pienso mezclado para cerdos	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Pienso compuesto para pollos de engorde	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
Concentrado de proteínas	22,32 n = 16	5,06 n = 17	12,01 n = 17	47,74 n = 15
Premezcla	58,42 n = 16	—	90,21 n = 16	98,03 n = 16

n = número de laboratorios participantes

7.1. Repetibilidad

La repetibilidad del citado estudio intercomparativo, expresada como «desviación típica intralaboratorio», se indica en los cuadros siguientes:

Desviación típica intralaboratorio (S_r) en g/kg

Material de referencia	Aminoácido			
	Treonina	Cistina y cisteína	Metionina	Lisina
Pienso mezclado para cerdos	0,13 n = 15	0,10 n = 17	0,11 n = 17	0,26 n = 13
Pienso compuesto para pollos de engorde	0,20 n = 16	0,11 n = 18	0,16 n = 18	0,28 n = 16
Concentrado de proteínas	0,48 n = 16	0,13 n = 17	0,27 n = 17	0,99 n = 15
Premezcla	1,30 n = 16	—	2,19 n = 16	2,06 n = 16

n = número de laboratorios participantes

Coeficiente de variación (%) de la desviación típica intralaboratorio (S_r)

Material de referencia	Aminoácido			
	Treonina	Cistina y cisteína	Metionina	Lisina
Pienso mezclado para cerdos	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Pienso compuesto para pollos de engorde	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Concentrado de proteínas	2,7 n = 16	2,6 n = 17	2,2 n = 17	2,4 n = 15

Material de referencia	Aminoácido			
	Treonina	Cistina y cisteína	Metionina	Lisina
Premezcla	2,2 n = 16	—	2,4 n = 16	2,1 n = 16

n = número de laboratorios participantes

7.2 Reproducibilidad

En el cuadro siguiente se indican los resultados de la desviación típica interlaboratorios obtenida en el citado estudio intercomparativo:

Desviación típica interlaboratorios (S_R) en g/kg

Material de referencia	Aminoácido			
	Treonina	Cistina y cisteína	Metionina	Lisina
Pienso mezclado para cerdos	0,28 n = 15	0,30 n = 17	0,23 n = 17	0,30 n = 13
Pienso compuesto para pollos de engorde	0,48 n = 16	0,34 n = 18	0,55 n = 18	0,75 n = 16
Concentrado de proteínas	0,85 n = 16	0,62 n = 17	1,57 n = 17	1,24 n = 15
Premezcla	2,49 n = 16	—	6,20 n = 16	6,62 n = 16

n = número de laboratorios participantes

Coefficiente de variación (%) de la desviación típica interlaboratorios (S_R)

Material de referencia	Aminoácido			
	Treonina	Cistina y cisteína	Metionina	Lisina
Pienso mezclado para cerdos	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Pienso compuesto para pollos de engorde	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Concentrado de proteínas	3,8 n = 16	12,3 n = 17	13,0 n = 17	3,0 n = 15
Premezcla	4,3 n = 16	—	6,9 n = 16	6,7 n = 16

n = número de laboratorios participantes

8. Uso de materiales de referencia

La correcta aplicación del método se verificará haciendo mediciones reiteradas de materiales de referencia certificados, cuando estén disponibles. Se recomienda la calibración con solución de calibración de aminoácidos certificada.

9. Observaciones

- 9.1. Debido a las diferencias entre los analizadores de aminoácidos, las concentraciones finales de las soluciones de calibración de los aminoácidos patrón (véanse los puntos 3.27.4 y 3.27.5) y del hidrolizado (véase el punto 5.3.4) deberán entenderse como orientativas.

El intervalo de respuesta lineal del aparato debe comprobarse con todos los aminoácidos.

La solución patrón se diluye con una solución reguladora de citrato para obtener áreas de pico en el centro del intervalo.

- 9.2. Si se usa un equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución para analizar los hidrolizados, deben optimizarse las condiciones experimentales siguiendo las recomendaciones del fabricante.
- 9.3. Si se aplica este método a piensos que contengan más de un 1 % de cloruro (concentrados, piensos minerales, piensos complementarios), es posible que se subestimen los valores de metionina, por lo que debe aplicarse un tratamiento especial.

G. DETERMINACIÓN DEL TRIPTÓFANO

1. Objeto y ámbito de aplicación

Este método permite determinar el triptófano total y libre en los piensos. No distingue entre formas L y D.

2. Principio

Para la determinación del triptófano total, la muestra se hidroliza en condiciones alcalinas con solución saturada de hidróxido de bario y se calienta a 110 °C durante veinte horas. Tras la hidrólisis se añade patrón interno.

Para la determinación del triptófano libre, la muestra se somete a extracción en condiciones de acidez suave en presencia de patrón interno.

El triptófano y el patrón interno presentes en el hidrolizado o en el extracto se determinan mediante CLAR con detección por fluorescencia.

3. Reactivos

- 3.1. Debe utilizarse agua bidestilada o agua de calidad equivalente (conductividad < 10 µS/cm).
- 3.2. Sustancia patrón: triptófano (pureza/contenido ≥ 99 %), desecado al vacío sobre pentóxido de fósforo
- 3.3. Patrón interno: α-metiltriptófano (pureza/contenido ≥ 99 %), desecado al vacío sobre pentóxido de fósforo
- 3.4. Hidróxido de bario octahidratado (deberá procurarse no exponer excesivamente el $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ al aire a fin de evitar la formación de BaCO_3 , que podría interferir en la determinación) (véase la observación del punto 9.3)
- 3.5. Hidróxido de sodio
- 3.6. Ácido ortofosfórico, p (p/p) = 85 %
- 3.7. Ácido clorhídrico, $\rho_{20} = 1,19 \text{ g/ml}$
- 3.8. Metanol, equivalente al de calidad CLAR
- 3.9. Éter de petróleo, con un intervalo de ebullición de 40-60 °C
- 3.10. Solución de hidróxido de sodio, $c = 1 \text{ mol/l}$:
Disolver 40,0 g de NaOH (3.5) en agua y enrasar a 1 l con agua (3.1).
- 3.11. Ácido clorhídrico, $c = 6 \text{ mol/l}$:

Tomar 492 ml de HCl (3.7) y enrasar a 1 l con agua.

- 3.12. Ácido clorhídrico, $c = 1 \text{ mol/l}$:
- Tomar 82 ml de HCl (3.7) y enrasar a 1 l con agua.
- 3.13. Ácido clorhídrico, $c = 0,1 \text{ mol/l}$:
- Tomar 8,2 ml de HCl (3.7) y enrasar a 1 l con agua.
- 3.14. Ácido ortofosfórico, $c = 0,5 \text{ mol/l}$:
- Tomar 34 ml de ácido ortofosfórico (3.6) y enrasar a 1 l con agua (3.1).
- 3.15. Solución concentrada de triptófano (3.2), $c = 2,50 \text{ } \mu\text{mol/ml}$:
- En un matraz aforado de 500 ml, disolver 0,2553 g de triptófano (3.2) en ácido clorhídrico (3.13) y enrasar con ácido clorhídrico (3.13). Conservar a $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante cuatro semanas como máximo.
- 3.16. Solución concentrada de patrón interno, $c = 2,50 \text{ } \mu\text{mol/ml}$:
- En un matraz aforado de 500 ml, disolver 0,2728 g de α -metiltryptófano (3.3) en ácido clorhídrico (3.13) y enrasar con ácido clorhídrico (3.13). Conservar a $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante cuatro semanas como máximo.
- 3.17. Solución patrón de calibración de triptófano y patrón interno:
- Tomar 2,00 ml de solución concentrada de triptófano (3.15) y 2,00 ml de solución concentrada de patrón interno (α -metiltryptófano) (3.16). Diluir con agua (3.1) y metanol (3.8) hasta conseguir aproximadamente el mismo volumen y la misma concentración de metanol (10-30 %) que en el hidrolizado acabado.
- Esta solución debe prepararse poco antes de utilizarse.
- Proteger de la luz solar directa mientras se prepara.
- 3.18. Ácido acético
- 3.19. 1,1,1-tricloro-2-metil-2-propanol
- 3.20. Etanolamina p (p/p) > 98 %
- 3.21. Solución de 1 g de 1,1,1-tricloro-2-metil-2-propanol (3.19) en 100 ml de metanol (3.8)
- 3.22. Fase móvil para la CLAR: 3,00 g de ácido acético (3.18) + 900 ml de agua (3.1) + 50,0 ml de solución (3.21) de 1,1,1-tricloro-2-metil-2-propanol (3.19) en metanol (3.8) (1 g/100 ml). Ajustar el pH a 5,00 con etanolamina (3.20). Enrasar a 1 000 ml con agua (3.1).
4. **Instrumental**
- 4.1. Equipo de CLAR con detector por espectrofluorometría
- 4.2. Columna cromatográfica de líquidos, de 125 mm x 4 mm, C_{18} , relleno de $3 \text{ } \mu\text{m}$, o equivalente
- 4.3. pH-metro
- 4.4. Matraz de polipropileno, de 125 ml de capacidad, cuello ancho y tapón de rosca
- 4.5. Filtro de membrana de $0,45 \text{ } \mu\text{m}$
- 4.6. Autoclave, $110 (\pm 2) \text{ }^{\circ}\text{C}$, $1,4 (\pm 0,1) \text{ bar}$
- 4.7. Agitador mecánico o magnético
- 4.8. Agitador vortex

5. Procedimiento

5.1. Preparación de las muestras

La muestra se muele hasta que pase por un tamiz de 0,5 mm. Las muestras con humedad elevada deben secarse al aire a una temperatura no superior a 50 °C, o bien liofilizarse antes de la molienda. Las muestras con un elevado contenido de grasa deberán someterse a extracción con éter de petróleo (3.9) antes de la molienda.

5.2. Determinación del triptófano libre (extracto)

Pesar en un Erlenmeyer, con una precisión de 1 mg, una cantidad adecuada (1-5 g) de la muestra preparada (5.1). Añadir 100,0 ml de ácido clorhídrico (3.13) y 5,00 ml de solución concentrada de patrón interno (3.16). Agitar o mezclar durante 60 minutos utilizando un agitador mecánico o magnético (4.7). Dejar sedimentar y pipetear 10,0 ml de la solución sobrenadante a un vaso de precipitado. Añadir 5 ml de ácido ortofosfórico (3.14). Ajustar el pH a 3 utilizando hidróxido de sodio (3.10). Añadir suficiente metanol (3.8) para obtener en el volumen final una concentración de metanol del 10 % al 30 %. Transvasar a un matraz aforado de capacidad adecuada y diluir con agua hasta conseguir el volumen necesario para la cromatografía (aproximadamente el mismo volumen que la solución patrón de calibración [3.17]).

Filtrar unos pocos mililitros de la solución por un filtro de membrana de 0,45 µm (4.5) antes de inyectarla en la columna de CLAR. Pasar a la fase de cromatografía según el punto 5.4.

Proteger la solución patrón y los extractos de la luz solar directa. Si no es posible analizar los extractos el mismo día, pueden conservarse a 5 °C durante tres días como máximo.

5.3. Determinación del triptófano total (hidrolizado)

Pesar en el matraz de polipropileno (4.4), con una precisión de 0,2 mg, entre 0,1 g y 1 g de la muestra preparada (5.1). La porción de muestra pesada deberá tener un contenido de nitrógeno de unos 10 mg. Añadir 8,4 g de hidróxido de bario octahidratado (3.4) y 10 ml de agua. Mezclar con un agitador vortex (4.8) o un agitador magnético (4.7). Dejar dentro de la mezcla el imán recubierto de teflón. Lavar las paredes del recipiente con 4 ml de agua. Poner el tapón de rosca y cerrar el matraz sin apretar. Pasar al autoclave (4.6) con agua hirviendo y dejar al vapor durante 30 a 60 minutos. Cerrar el autoclave y dejar a 110 (± 2) °C durante 20 horas.

Antes de abrir el autoclave, reducir la temperatura hasta justo por debajo de 100 °C. Para evitar la cristalización del $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$, añadir a la mezcla caliente 30 ml de agua que esté a temperatura ambiente. Agitar o remover suavemente. Añadir 2,00 ml de solución concentrada de patrón interno (α -metiltryptófano) (3.16). Enfriar el recipiente en baño de agua y hielo durante 15 minutos.

A continuación, añadir 5 ml de ácido ortofosfórico (3.14). Mantener el recipiente en el baño frío y neutralizar con HCl (3.11), al tiempo que se remueve; ajustar el pH a 3,0 con HCl (3.12). Añadir suficiente metanol para obtener en el volumen final una concentración de metanol del 10 % al 30 %. Pasar a un matraz aforado de capacidad adecuada y diluir con agua hasta conseguir el volumen definido necesario para la cromatografía (por ejemplo, 100 ml). La adición de metanol no deberá producir precipitación.

Filtrar unos pocos mililitros de la solución por un filtro de membrana de 0,45 µm (4.5) antes de inyectarla en la columna de CLAR. Pasar a la fase de cromatografía según el punto 5.4.

Proteger la solución patrón y los hidrolizados de la luz solar directa. Si no es posible analizar los hidrolizados el mismo día, pueden conservarse a 5 °C durante tres días, como máximo.

5.4. Determinación mediante CLAR

Las siguientes condiciones de elución isocrática tienen carácter orientativo; pueden aplicarse otras, siempre que ofrezcan resultados equivalentes (véanse también las observaciones de los puntos 9.1 y 9.2).

Columna cromatográfica de líquidos:	125 mm x 4 mm, C ₁₈ , relleno de 3 µm, o equivalente
Temperatura de la columna:	Temperatura ambiente
Fase móvil (3.22):	3,00 g de ácido acético (3.18) + 900 ml de agua (3.1) + 50,0 ml de solución (3.21) de 1,1,1-tricloro-2-metil-2-propanol (3.19) en metanol (3.8) (1 g/100 ml). Ajustar el pH a 5,00 con etanolamina (3.20). Enrasar a 1 000 ml con agua (3.1).
Caudal:	1 ml/min.
Tiempo total del ciclo:	Aproximadamente 34 minutos
Longitud de onda de detección:	Excitación: 280 nm, emisión: 356 nm.
Volumen de inyección:	20 µl

6. Cálculo de los resultados

Se calcula la cantidad de triptófano (X) en gramos por cada 100 g de muestra.

$$X = \frac{A \times B \times V_1 \times c \times V_2 \times M}{C \times D \times V_3 \times 10\,000 \times m}$$

A = área de pico del patrón interno, solución patrón de calibración (3.17)

B = área de pico del triptófano, extracto (5.2) o hidrolizado (5.3)

V₁ = volumen en mililitros (2 ml) de la solución concentrada de triptófano (3.15) añadida a la solución de calibración (3.17)

c = concentración en µmol/ml (= 2,50) de la solución concentrada de triptófano (3.15) añadida a la solución de calibración (3.17)

V₂ = volumen en mililitros de la solución concentrada de patrón interno (3.16) añadida al extracto (5.2) (= 5,00 ml) o al hidrolizado (5.3) (= 2,00 ml)

C = área de pico del patrón interno, extracto (5.2) o hidrolizado (5.3)

D = área de pico del triptófano, solución patrón de calibración (3.17)

V₃ = volumen en mililitros (= 2,00 ml) de la solución concentrada de patrón interno (3.16) añadida a la solución patrón de calibración (3.17)

m = peso de la muestra en gramos (corregido al peso original si se ha desecado o desengrasado)

M = peso molecular del triptófano (= 204,23 g/mol)

7. Repetibilidad

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas con la misma muestra no debe rebasar el 10 % del resultado más elevado.

8. Resultados de un estudio colaborativo

Se organizó un estudio colaborativo de la Comunidad Europea (cuarta comparación interlaboratorios), en el cual hasta 12 laboratorios analizaron tres muestras para certificar el método de hidrólisis. Con cada muestra se repitieron varios análisis (5). Los resultados se recogen en el cuadro siguiente:

	Muestra 1 Pienso para cerdos	Muestra 2 Pienso para cerdos con complemento de L-triptó- fano	Muestra 3 Pienso concentrado para cer- dos
L	12	12	12
n	50	55	50
Media [g/kg]	2,42	3,40	4,22
s _r [g/kg]	0,05	0,05	0,08
r [g/kg]	0,14	0,14	0,22
CV _r [%]	1,9	1,6	1,9
S _R [g/kg]	0,15	0,20	0,09
R [g/kg]	0,42	0,56	0,25
CV _R [%]	6,3	6,0	2,2

L = número de laboratorios que presentaron resultados

n = número de resultados individuales aceptados tras eliminar los valores atípicos (identificados mediante las pruebas de Cochran y Dixon)

s_r = desviación típica de la repetibilidad

S_R = desviación típica de la reproducibilidad

r = repetibilidad

R = reproducibilidad

CV_r = coeficiente de variación de la repetibilidad, en tanto por ciento

CV_R = coeficiente de variación de la reproducibilidad, en tanto por ciento

En otro estudio colaborativo de la Comunidad Europea (tercera comparación interlaboratorios), hasta trece laboratorios analizaron dos muestras para certificar el método de extracción del triptófano libre. Con cada muestra se repitieron varios análisis (5). Los resultados se recogen en el cuadro siguiente:

	Muestra 4 Mezcla de trigo y soja	Muestra 5 Mezcla de trigo y soja (= muestra 4) con triptófano añadido (0,457 g/kg)
L	12	12
n	55	60
Media [g/kg]	0,391	0,931
s_r [g/kg]	0,005	0,012
r [g/kg]	0,014	0,034
CV_r [%]	1,34	1,34
S_R [g/kg]	0,018	0,048
R [g/kg]	0,050	0,134
CV_R [%]	4,71	5,11

L = número de laboratorios que presentaron resultados

n = número de resultados individuales aceptados tras eliminar los valores atípicos (identificados mediante las pruebas de Cochran y Dixon)

s_r = desviación típica de la repetibilidad

S_R = desviación típica de la reproducibilidad

r = repetibilidad

R = reproducibilidad

CV_r = coeficiente de variación de la repetibilidad, en tanto por ciento

CV_R = coeficiente de variación de la reproducibilidad, en tanto por ciento

En otro estudio intercomparativo de la Comunidad Europea, hasta siete laboratorios analizaron cuatro muestras para certificar el método de hidrólisis de triptófano. A continuación figuran los resultados del estudio. Con cada muestra se repitieron varios análisis (5).

	Muestra 1 Pienso mezclado para cerdos (CRM 117)	Muestra 2 Harina de pescado con poca grasa (CRM 118)	Muestra 3 Sémola de soja (CRM 119)	Muestra 4 Leche desnatada en polvo (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
Media [g/kg]	2,064	8,801	6,882	5,236
s_r [g/kg]	0,021	0,101	0,089	0,040
r [g/kg]	0,059	0,283	0,249	0,112
CV_r [%]	1,04	1,15	1,30	0,76
S_R [g/kg]	0,031	0,413	0,283	0,221
R [g/kg]	0,087	1,156	0,792	0,619
CV_R [%]	1,48	4,69	4,11	4,22

L = número de laboratorios que presentaron resultados

n = número de resultados individuales aceptados tras eliminar los valores atípicos (identificados mediante las pruebas de Cochran y Dixon)

s_r = desviación típica de la repetibilidad

S_R = desviación típica de la reproducibilidad

r = repetibilidad

R = reproducibilidad

CV_r = coeficiente de variación de la repetibilidad, en tanto por ciento

CV_R = coeficiente de variación de la reproducibilidad, en tanto por ciento

9. Observaciones

- 9.1. Las siguientes condiciones cromatográficas pueden ofrecer una mejor separación entre el triptófano y el α -metiltryptófano.

Elución isocrática, seguida de lavado de la columna de gradiente:

Columna cromatográfica de líquidos:	125 mm x 4 mm, C ₁₈ , relleno de 5 µm, o equivalente		
Temperatura de la columna:	32 °C		
Fase móvil:	A: 0,01 mol/l KH ₂ PO ₄ /metanol, 95 + 5 (V + V)		
	B: Metanol		
Programa de gradientes:	0 min.	100 % A	0 % B
	15 min.	100 % A	0 % B
	17 min.	60 % A	40 % B
	19 min.	60 % A	40 % B
	21 min.	100 % A	0 % B
	33 min.	100 % A	0 % B
Caudal:	1,2 ml/min.		
Tiempo total del ciclo:	aproximadamente 33 minutos		

- 9.2. La cromatografía variará en función del tipo de CLAR y del material de relleno de la columna. El sistema elegido debe proporcionar una separación en la línea base entre el triptófano y el patrón interno. Asimismo, es importante que los productos de degradación se separen bien del triptófano y del patrón interno. Deberán pasarse hidrolizados sin patrón interno para comprobar las impurezas de la línea base bajo el patrón interno. También es importante que el ciclo dure lo suficiente para que se eluyan todos los productos de degradación, pues, de lo contrario, los picos de elución tardía pueden interferir en los ciclos cromatográficos posteriores.

En el intervalo de funcionamiento, el sistema cromatográfico deberá dar una respuesta lineal. Esta deberá medirse con una concentración constante (la normal) del patrón interno y con concentraciones variables de triptófano. Es importante que el tamaño de los picos tanto de triptófano como de patrón interno estén dentro del intervalo lineal del sistema de CLAR/fluorescencia. Si los picos de triptófano o de patrón interno son demasiado pequeños o demasiado grandes, deberá repetirse el análisis con otro tamaño de muestra o con un volumen final distinto.

- 9.3. *Hidróxido de bario*

Con el tiempo, el hidróxido de bario es más difícil de disolver. Esto hace que la solución para la determinación por CLAR esté turbia, lo que puede dar unos resultados bajos de triptófano.

H. DETERMINACIÓN DE LOS ACEITES Y LAS GRASAS BRUTOS

1. Objeto y ámbito de aplicación

Este método sirve para determinar el contenido de aceites y grasas brutos de los piensos. No abarca el análisis de semillas y frutos oleaginosos.

La aplicación de uno u otro de los dos procedimientos que se describen a continuación dependerá de la naturaleza y la composición del pienso y de la razón por la que se lleve a cabo el análisis.

1.1. Procedimiento A. Aceites y grasas brutos directamente extraíbles

Este método es aplicable a los materiales para piensos de origen vegetal, excepto los incluidos en el ámbito de aplicación del procedimiento B.

1.2. Procedimiento B. Aceites y grasas brutos totales

Este método es aplicable a los materiales para piensos de origen animal y a todos los piensos compuestos. Se ha de utilizar con todos los materiales de los que los aceites y las grasas no puedan extraerse completamente sin hidrólisis previa (por ejemplo, los glútenes, las levaduras, las proteínas de patata y los productos sujetos a procesos como la extrusión, la floculación y el calentamiento).

1.3. Interpretación de los resultados

En todos los casos en que el resultado obtenido con el procedimiento B sea mayor que el obtenido con el procedimiento A, el resultado obtenido con el procedimiento B se aceptará como el valor real.

2. Principio

2.1. Procedimiento A

La muestra se somete a extracción con éter de petróleo. El disolvente se extrae por destilación y el residuo se seca y se pesa.

2.2. Procedimiento B

La muestra se trata en caliente con ácido clorhídrico. La mezcla se enfría y se filtra. Una vez lavado y secado, el residuo se somete a la determinación según el procedimiento A.

3. Reactivos

3.1. Éter de petróleo con un intervalo de ebullición de 40 °C a 60 °C. El índice de bromo debe ser inferior a 1 y el residuo en evaporación inferior a 2 mg/100 ml.

3.2. Sulfato de sodio, anhidro

3.3. Ácido clorhídrico, $c = 3 \text{ mol/l}$

3.4. Coadyuvante de filtración, como, por ejemplo, Kieselgur o Hyflo Supercel

4. Instrumental

4.1. Aparato de extracción. Si el aparato está provisto de un sifón (aparato Soxhlet), el caudal de reflujo deberá regularse de forma que se obtengan como mínimo diez ciclos por hora; si se trata de un aparato sin sifón, el caudal de reflujo deberá ser de alrededor de 10 ml por minuto.

4.2. Cartuchos de extracción, exentos de sustancias solubles en el éter de petróleo y de porosidad compatible con las exigencias del punto 4.1

4.3. Estufa de secado, bien de vacío a $75 \text{ °C} \pm 3 \text{ °C}$, bien de aire a $100 \text{ °C} \pm 3 \text{ °C}$

5. Procedimiento

5.1. Procedimiento A (véase el punto 8.1)

Pesar, con una precisión de 1 mg, 5 g de la muestra, pasarlos a un cartucho de extracción (4.2) y cubrirlos con un poco de algodón hidrófilo exento de grasa.

Colocar el cartucho en un extractor (4.1) y extraer durante seis horas con éter de petróleo (3.1). Recoger el extracto de éter de petróleo en un matraz seco tarado que contenga fragmentos de piedra pómez ⁽¹⁾.

Extraer el disolvente por destilación. Secar el residuo dejando el matraz hora y media en la estufa de secado (4.3). Dejar enfriar en un desecador y pesar. Volver a secar durante 30 minutos para que el peso de los aceites y las grasas se mantenga constante (la pérdida de peso entre dos pesadas sucesivas debe ser inferior o igual a 1 mg).

5.2. Procedimiento B

Pesar, con una precisión de 1 mg, 2,5 g de la muestra (véase el punto 8.2), introducirlos en un vaso de precipitado de 400 ml o en un Erlenmeyer de 300 ml y añadir 100 ml de ácido clorhídrico (3.3), junto con algunos fragmentos de piedra pómez. Cubrir el vaso de precipitado con un vidrio de reloj o dotar al Erlenmeyer de un refrigerante de reflujo. Llevar la mezcla a ebullición suave sobre una llama pequeña o una placa calefactora eléctrica y mantenerla así durante una hora. No dejar que el producto se adhiera a las paredes del recipiente.

Enfriar y añadir una cantidad de coadyuvante de filtración (3.4) suficiente para evitar que se pierda aceite o grasa durante la filtración. Filtrar sobre un papel de filtro doble humedecido exento de grasa. Lavar el residuo con agua fría hasta obtener un filtrado neutro. Comprobar que el filtrado no contiene aceites ni grasas. Si los contiene, la muestra debe someterse a extracción con éter de petróleo, según el procedimiento A, antes de la hidrólisis.

⁽¹⁾ Sustituir los fragmentos de piedra pómez por perlas de vidrio cuando el aceite o la grasa deban someterse a exámenes cualitativos ulteriores.

Colocar el papel de filtro doble que contiene el residuo sobre un vidrio de reloj y secar durante hora y media en la estufa de aire (4.3) a $100\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Introducir el papel de filtro doble que contiene el residuo seco en un cartucho de extracción (4.2) y cubrirlo con un poco de algodón hidrófilo exento de grasa. Colocar el cartucho en un extractor (4.1) y proceder según se indica en los párrafos segundo y tercero del punto 5.1.

6. **Expresión de los resultados**

Expresar el peso del residuo en porcentaje de la muestra.

7. **Repetibilidad**

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas con la misma muestra por el mismo analista no deberá superar:

- el 0,2 % en valor absoluto, en el caso de contenidos de aceites y grasas brutos inferiores al 5 %,
- el 4,0 % del resultado más elevado, en relación con contenidos del 5 % al 10 %,
- el 0,4 % en valor absoluto, en el caso de contenidos superiores al 10 %.

8. **Observaciones**

- 8.1. Con los productos que tienen un alto contenido de aceites y grasas y son difíciles de triturar o inapropiados para obtener una muestra de ensayo reducida homogénea, proceder del modo siguiente:

Pesar, con una precisión de 1 mg, 20 g de la muestra y mezclarlos con 10 g o más de sulfato de sodio anhidro (3.2). Extraer con éter de petróleo (3.1) según se indica en el punto 5.1. Enrasar el extracto obtenido a 500 ml con éter de petróleo (3.1) y mezclar. Tomar 50 ml de la solución y ponerlos en un matraz pequeño, seco y tarado con fragmentos de piedra pómez. Extraer el disolvente por destilación, secar y proceder según se indica en el último párrafo del punto 5.1.

Eliminar el disolvente del residuo de extracción que haya quedado en el cartucho, triturar el residuo a una finura de 1 mm, colocarlo de nuevo en el cartucho de extracción (no añadir sulfato de sodio) y proceder según se indica en los párrafos segundo y tercero del punto 5.1.

Calcular el contenido de aceites y grasas en porcentaje de la muestra aplicando la siguiente fórmula:

$$(10\ m_1 + m_2) \times 5$$

donde:

m_1 = peso en gramos del residuo tras la primera extracción (parte alícuota del extracto);

m_2 = peso en gramos del residuo tras la segunda extracción.

- 8.2. En el caso de productos pobres en aceites y grasas, la muestra de ensayo puede aumentarse a 5 g.
- 8.3. Es posible que los piensos para animales de compañía con un alto contenido de agua deban mezclarse con sulfato de sodio anhidro antes de la hidrólisis y la extracción conforme al procedimiento B.
- 8.4. En el punto 5.2 puede resultar más eficaz utilizar agua caliente en lugar de agua fría para lavar el residuo tras la filtración.
- 8.5. Con algunos piensos quizá sea necesario aumentar el tiempo de secado de hora y media. Se evitará un secado excesivo, ya que puede producir resultados bajos. También puede utilizarse un horno microondas.
- 8.6. Si el contenido de aceites o grasas brutos es superior al 15 %, se recomienda la preextracción por el procedimiento A antes de la hidrólisis y la reextracción por el procedimiento B. Hasta cierto punto, esto depende de la naturaleza del pienso y de la naturaleza del aceite o la grasa que contenga.

I. DETERMINACIÓN DE LA FIBRA BRUTA

1. Objeto y ámbito de aplicación

Este método permite determinar las sustancias orgánicas de los piensos exentas de grasa, que son insolubles en medios ácidos y alcalinos y se designan convencionalmente como fibra bruta.

2. Principio

La muestra, si es necesario desengrasada, se trata sucesivamente con soluciones en ebullición de ácido sulfúrico e hidróxido de potasio de concentraciones determinadas. El residuo se separa por filtración en un filtro de vidrio sinterizado, se lava, se deseca, se pesa y se calcina en un intervalo de 475 °C a 500 °C. La pérdida de peso resultante de la calcinación corresponde a la fibra bruta presente en la muestra de ensayo.

3. Reactivos

- 3.1. Ácido sulfúrico, $c = 0,13 \text{ mol/l}$
- 3.2. Agente antiespumante (por ejemplo, n-octanol)
- 3.3. Coadyuvante de filtración (Celite 545 o equivalente), calentado a 500 °C durante cuatro horas (8.6)
- 3.4. Acetona
- 3.5. Éter de petróleo, con un intervalo de ebullición de 40 °C a 60 °C
- 3.6. Ácido clorhídrico, $c = 0,5 \text{ mol/l}$
- 3.7. Solución de hidróxido de sodio, $c = 0,23 \text{ mol/l}$

4. Instrumental

- 4.1. Unidad de calentamiento para digestión con ácido sulfúrico y solución de hidróxido de potasio, provista de un soporte para el crisol filtrante (4.2) y de un tubo de salida con una llave conectada a la salida de líquidos y al vacío, posiblemente con aire comprimido. Antes de usarla, precalentar la unidad todos los días con agua hirviendo durante cinco minutos.
- 4.2. Crisol de vidrio filtrante, con placa filtrante de vidrio sinterizado fundido de porosidad comprendida entre 40 μm y 90 μm . Antes de utilizarlo por primera vez, calentarlo a 500 °C durante unos minutos y enfriarlo (8.6).
- 4.3. Probeta apta para ebullición, de 270 ml como mínimo, con refrigerante de reflujo
- 4.4. Horno de secado con termostato
- 4.5. Horno de mufla con termostato
- 4.6. Unidad de extracción consistente en una placa soporte para el crisol filtrante (4.2), con un tubo de descarga provisto de llave conectada al vacío y a la salida de líquidos
- 4.7. Aros de conexión para unir la unidad de calentamiento (4.1), el crisol (4.2) y la probeta (4.3) y conectar la unidad de extracción en frío (4.6) y el crisol

5. Procedimiento

Pesar, con una precisión de 1 mg, 1 g de la muestra, ponerlo en el crisol (4.2) (véanse las observaciones 8.1, 8.2 y 8.3) y añadir 1 g de coadyuvante de filtración (3.3).

Tras ensamblar la unidad de calentamiento (4.1) y el crisol filtrante (4.2), unir a este último la probeta (4.3). Verter 150 ml de ácido sulfúrico (3.1) en ebullición en la probeta y el crisol ensamblados y, si es necesario, añadir unas pocas gotas de agente antiespumante (3.2).

Llevar el líquido a ebullición en 5 ± 2 minutos y dejar hervir con fuerza durante 30 minutos exactos.

Abrir la llave del tubo de descarga (4.1), filtrar al vacío el ácido sulfúrico a través del crisol filtrante y lavar tres veces consecutivas con 30 ml de agua hirviendo cada vez, cuidando de que el residuo se filtre seco después de cada lavado.

Cerrar la llave de salida y verter 150 ml de solución de hidróxido de potasio (3.7) hirviendo en la probeta y el crisol ensamblados, añadiendo después unas pocas gotas de agente antiespumante (3.2). Llevar el líquido al punto de ebullición en 5 ± 2 minutos y dejar hervir con fuerza durante 30 minutos exactos. Filtrar y repetir el proceso de lavado empleado en la fase de ácido sulfúrico.

Después del lavado y secado finales, desconectar el crisol con su contenido y volverlo a conectar a la unidad de extracción en frío (4.6). Aplicar el vacío y lavar el residuo en el crisol tres veces consecutivas con 25 ml de acetona (3.4) cada vez, cuidando de que el residuo se filtre seco después de cada lavado.

Secar el crisol en la estufa a 130 °C hasta alcanzar un peso constante. Después de cada secado, enfriar en el desecador y pesar rápidamente. Colocar el crisol en un horno de mufla y calcinar, hasta alcanzar un peso constante (la pérdida de peso entre dos pesadas sucesivas debe ser inferior o igual a 2 mg), a 475 °C durante 30 minutos como mínimo.

Después de cada calentamiento, enfriar, primero en el horno y después en el desecador, antes de pesar.

Realizar una prueba en blanco sin la muestra. La pérdida de peso debida a la calcinación no debe exceder de 4 mg.

6. Cálculo de los resultados

El contenido de fibra bruta en porcentaje de la muestra viene dado por la fórmula:

$$X = \frac{(m_0 - m_1) \times 100}{m}$$

donde:

m = peso de la muestra, en gramos;

m₀ = pérdida de peso tras la calcinación durante la determinación, en gramos;

m₁ = pérdida de peso tras la calcinación durante el ensayo en blanco, en gramos.

7. Repetibilidad

La diferencia entre dos determinaciones paralelas efectuadas con la misma muestra no debe exceder:

- del 0,6 % en valor absoluto, en el caso de contenidos de fibra bruta inferiores al 10 %,
- del 6 % del resultado superior, en el caso de contenidos de fibra bruta iguales o superiores al 10 %.

8. Observaciones

- 8.1. Los piensos con más de un 10 % de grasa bruta deben desengrasarse antes de efectuar el análisis con éter de petróleo (3.5). Conectar el crisol filtrante (4.2), con su contenido, a la unidad de extracción en frío (4.6), aplicar vacío y lavar tres veces consecutivas con 30 ml de éter de petróleo cada vez, cuidando de que el residuo esté seco. Conectar el crisol, con su contenido, a la unidad de calentamiento (4.1) y continuar según se describe en el punto 5.
- 8.2. Los piensos que contengan grasas que no puedan extraerse directamente con éter de petróleo (3.5) deben desengrasarse con arreglo al punto 8.1 y someterse a un nuevo desengrasado después de haber sido hervidos con ácido. Tras el hervor con ácido y el subsiguiente lavado, unir el crisol, con su contenido, a la unidad de extracción en frío (4.6) y lavar tres veces con 30 ml de acetona y otras tres veces con 30 ml de éter de petróleo cada vez. Filtrar en vacío hasta sequedad y continuar el análisis como se describe en el punto 5, comenzando por el tratamiento con hidróxido de potasio.

- 8.3. Si los piensos contienen más de un 5 % de carbonatos, expresados en carbonato de calcio, conectar el crisol (4.2), con la muestra pesada, a la unidad de calentamiento (4.1). Lavar la muestra tres veces con 30 ml de ácido clorhídrico (3.6). Después de cada adición, dejar reposar la muestra durante un minuto aproximadamente antes de filtrar. Lavar una vez con 30 ml de agua y proseguir como se describe en el punto 5.
- 8.4. Si se utiliza una batería de aparatos (varios crisoles unidos a la misma unidad de calentamiento), no pueden realizarse dos determinaciones distintas de la misma muestra en la misma serie.
- 8.5. Si, tras el hervor, resulta difícil filtrar las soluciones ácidas y alcalinas, introducir aire comprimido por el tubo de descarga de la unidad de calentamiento y seguir filtrando a continuación.
- 8.6. Con objeto de alargar la duración de los crisoles filtrantes de vidrio, la temperatura de calcinación no superará los 500 °C. Asimismo, deben evitarse los cambios bruscos de temperatura en los ciclos de calentamiento y enfriamiento.

J. DETERMINACIÓN DEL AZÚCAR

1. Objeto y ámbito de aplicación

Este método permite determinar la cantidad de azúcares reductores y azúcares totales tras la inversión, expresados en glucosa o, si procede, en sacarosa, por conversión mediante un factor de 0,95. Es aplicable a los piensos compuestos. Para otros piensos se establecen métodos especiales. Si es necesario, la lactosa deberá medirse por separado y tenerse en cuenta al calcular los resultados.

2. Principio

Los azúcares se extraen en etanol diluido; la solución se clarifica con las soluciones de Carrez I y II. Tras eliminar el etanol se determinan las cantidades antes y después de la inversión, siguiendo el método de Luff-Schoorl.

3. Reactivos

- 3.1. Solución de etanol al 40 % (v/v), de 0,948 g/ml de densidad a 20 °C, neutralizada frente a la fenolftaleína.
- 3.2. Solución de Carrez I: disolver en agua 21,9 g de acetato de cinc, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, y 3 g de ácido acético glacial. Enrasar con agua a 100 ml.
- 3.3. Solución de Carrez II: disolver en agua 10,6 g de ferrocianuro de potasio, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Enrasar con agua a 100 ml.
- 3.4. Naranja de metilo, solución al 0,1 % (p/v).
- 3.5. Ácido clorhídrico de 4 mol/l.
- 3.6. Ácido clorhídrico de 0,1 mol/l.
- 3.7. Solución de hidróxido de sodio de 0,1 mol/l.
- 3.8. Reactivo de Luff-Schoorl:

Verter la solución de ácido cítrico (3.8.2) en la solución de carbonato de sodio (3.8.3), removiendo con cuidado. Añadir la solución de sulfato de cobre (3.8.1) y enrasar a 1 l con agua. Dejar reposar una noche y filtrar.

Comprobar la concentración del reactivo así obtenido (0,05 mol de Cu/l; 1 mol de Na_2CO_3 /l), véase el punto 5.4, último párrafo. El pH de la solución deberá ser de 9,4 aproximadamente.

- 3.8.1. Solución de sulfato de cobre: disolver 25 g de sulfato de cobre, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, exento de hierro, en 100 ml de agua.

- 3.8.2. Solución de ácido cítrico: disolver 50 g de ácido cítrico, $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$, en 50 ml de agua.
- 3.8.3. Solución de carbonato de sodio: disolver 143,8 g de carbonato de sodio anhidro en 300 ml aproximadamente de agua caliente. Dejar enfriar.
- 3.9. Solución de tiosulfato de sodio de 0,1 mol/l
- 3.10. Solución de almidón: añadir una mezcla de 5 g de almidón soluble en 30 ml de agua a 1 l de agua hirviendo. Hervir durante tres minutos, dejar enfriar y, si es necesario, añadir 10 mg de yoduro de mercurio como conservante.
- 3.11. Ácido sulfúrico de 3 mol/l
- 3.12. Yoduro de potasio, solución al 30 % (p/v)
- 3.13. Piedra pómez granulada, hervida en ácido clorhídrico, lavada en agua y desecada
- 3.14. 3-metilbutan-1-ol

4. Instrumental

Mezclador (tambor): de 35 a 40 revoluciones por minuto aproximadamente

5. Procedimiento

5.1. Extracción de la muestra

Pesar, con una precisión de 1 mg, 2,5 g de la muestra e introducirlos en un matraz aforado de 250 ml. Añadir 200 ml de etanol (3.1) y mezclar en el tambor durante una hora. Añadir 5 ml de solución de Carrez I (3.2) y remover durante 30 segundos aproximadamente. Añadir 5 ml de solución de Carrez II (3.3) y volver a remover durante un minuto. Enrasar con etanol (3.1), homogeneizar y filtrar. Tomar 200 ml del filtrado y evaporar alrededor de la mitad del volumen, con el fin de eliminar la mayor parte del etanol. Transvasar cuantitativamente el residuo de evaporación, por medio de agua caliente, a un matraz aforado de 200 ml, enfriar, enrasar con agua, homogeneizar y filtrar, si es necesario. Esta solución se empleará para determinar la cantidad de azúcares reductores y, tras la inversión, la cantidad de azúcares totales.

5.2. Determinación de los azúcares reductores

Pipetear no más de 25 ml de la solución que contenga menos de 60 mg de azúcares reductores, expresados en glucosa. Si es necesario, enrasar a 25 ml con agua destilada y determinar el contenido de azúcares reductores siguiendo el método de Luff-Schoorl. El resultado se expresará en porcentaje de glucosa de la muestra.

5.3. Determinación de los azúcares totales tras la inversión

Pipetear 50 ml de solución y transvasarlos a un matraz aforado de 100 ml. Añadir a continuación unas pocas gotas de solución de naranja de metilo (3.4), con cuidado y sin parar de remover, y añadir ácido clorhídrico (3.5) hasta que el líquido se vuelva definitivamente rojo. Añadir 15 ml de ácido clorhídrico (3.6), sumergir el matraz en un baño maría en fuerte ebullición y mantenerlo allí durante 30 minutos. Enfriar rápidamente a unos 20 °C y añadir 15 ml de solución de hidróxido de sodio (3.7). Enrasar a 100 ml con agua y homogeneizar. Retirar no más de 25 ml con un contenido de azúcares reductores inferior a 60 mg, expresados en glucosa. Si es necesario, enrasar a 25 ml con agua destilada y determinar el contenido de azúcares reductores siguiendo el método de Luff-Schoorl. El resultado se expresa en porcentaje de glucosa o, si procede, de sacarosa, multiplicando por un factor de 0,95.

5.4. Titulación por el método de Luff-Schoorl

Pipetear 25 ml del reactivo de Luff-Schoorl (3.8) y transvasarlos a un Erlenmeyer de 300 ml; añadir exactamente 25 ml de la solución de azúcares clarificada. Añadir dos gránulos de piedra pómez (3.13), calentar, removiendo manualmente, sobre una llama desnuda de altura media y llevar el líquido a ebullición en dos minutos aproximadamente. Colocar inmediatamente el Erlenmeyer sobre una tela metálica revestida de amianto con un orificio de unos 6 cm de diámetro, bajo el cual se habrá encendido una llama. La llama se regulará de forma que solo se caliente el fondo del Erlenmeyer. Ajustar a este último un refrigerante de reflujo. Hervir durante diez minutos exactos. Enfriar inmediatamente en agua fría y, transcurridos unos cinco minutos, titular como se indica a continuación:

Añadir 10 ml de solución de yoduro de potasio (3.12), e inmediatamente después (con cuidado, ya que puede formarse mucha espuma) 25 ml de ácido sulfúrico (3.11). Titular con solución de tiosulfato de sodio (3.9) hasta que aparezca una coloración amarilla mate, añadir el indicador de almidón (3.10) y completar la titulación.

Efectuar la misma titulación en una mezcla exactamente medida de 25 ml de reactivo de Luff-Schoorl (3.8) y 25 ml de agua, después de añadir 10 ml de solución de yoduro de potasio (3.12) y 25 ml de ácido sulfúrico (3.11) sin hervir.

6. Cálculo de los resultados

Establecer, con ayuda de la tabla, la cantidad de glucosa en miligramos que corresponde a la diferencia entre los valores de las dos titulaciones, expresados en miligramos de tiosulfato de sodio de 0,1 mol/l. Expresar el resultado en porcentaje de la muestra.

7. Procedimientos especiales

- 7.1. En el caso de piensos ricos en melaza y otros piensos no muy homogéneos, pesar 20 g e introducirlos con 500 ml de agua en un matraz aforado de 1 l. Mezclar durante una hora en el tambor. Clarificar con los reactivos de Carrez I (3.2) y II (3.3) según se describe en el punto 5.1, empleando esta vez una cantidad cuatro veces superior de cada reactivo. Enrasar con etanol al 80 % (v/v).

Homogeneizar y filtrar. Eliminar el etanol como se describe en el punto 5.1. En ausencia de almidón dextrinado, enrasar con agua destilada.

- 7.2. En el caso de melazas y materiales para piensos que sean ricos en azúcares y no tengan prácticamente almidón (algarrobo, peladuras desecadas de remolachas, etc.), pesar 5 g e introducirlos en un matraz aforado de 250 ml, añadir 200 ml de agua destilada y mezclar en el tambor durante una hora o más, si es necesario. Clarificar con los reactivos de Carrez I (3.2) y II (3.3) según se describe en el punto 5.1. Enrasar con agua fría, homogeneizar y filtrar. Para determinar la cantidad de azúcares totales, proseguir como se describe en el punto 5.3.

8. Observaciones

- 8.1. Es recomendable añadir (sea cual sea el volumen) aproximadamente 1 ml de 3-metilbutan-1-ol (3.14) antes de hervir con el reactivo de Luff-Schoorl, a fin de evitar la formación de espuma.
- 8.2. La diferencia entre el contenido de azúcares totales después de la inversión, expresados en glucosa, y el contenido de azúcares reductores, expresados en glucosa, multiplicada por 0,95, da el porcentaje de sacarosa.
- 8.3. Para determinar el contenido de azúcares reductores, excluida la lactosa, pueden adoptarse dos métodos:
- 8.3.1. Para un cálculo aproximado, multiplicar por 0,675 el contenido de lactosa establecido mediante un método de análisis diferente y restar el resultado obtenido al contenido de azúcares reductores.
- 8.3.2. Para un cálculo exacto de los azúcares reductores, excluida la lactosa, debe emplearse la misma muestra en las dos determinaciones finales. Uno de los análisis se efectúa con una parte de la solución obtenida según el punto 5.1, y el otro con una parte de la solución obtenida al determinar la lactosa conforme al método establecido al efecto (previa fermentación de los otros tipos de azúcares y clarificación).

En ambos casos, la cantidad de azúcar presente se determina según el método de Luff-Schoorl y se calcula en miligramos de glucosa. Los dos valores se restan y la diferencia se expresa en porcentaje de la muestra.

Ejemplo

Los dos volúmenes tomados corresponden, para cada determinación, a una muestra de 250 mg.

En el primer caso se consumen 17 ml de solución de tiosulfato de sodio de 0,1 mol/l, lo que corresponde a 44,2 mg de glucosa; en el segundo, 11 ml, que corresponden a 27,6 mg de glucosa.

La diferencia es de 16,6 mg de glucosa.

El contenido de azúcares reductores (excluida la lactosa), calculado en glucosa, es pues de:

$$\frac{4 \times 16,6}{10} = 6,64 \%$$

Tabla de valores correspondientes a 25 ml de reactivo de Luff-Schoorl

mililitros de $\text{Na}_2 \text{S}_2 \text{O}_3$ de 0,1 mol/l, calentamiento de dos minutos, hervor de diez minutos

$\text{Na}_2 \text{S}_2 \text{O}_3$ 0,1 mol/l	Glucosa, fructosa y azúcares invertidos $\text{C}_6 \text{H}_{12} \text{O}_6$		Lactosa $\text{C}_{12} \text{H}_{22} \text{O}_{11}$		Maltosa $\text{C}_{12} \text{H}_{22} \text{O}_{11}$		$\text{Na}_2 \text{S}_2 \text{O}_3$ 0,1 mol/l
ml	mg	diferencia	mg	diferencia	mg	diferencia	ml
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	11,7	3,9	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	27,5	4,0	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	35,5	4,0	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4,0	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	55,7	4,1	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	63,9	4,1	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,2	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	72,2	4,3	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	76,5	4,4	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	80,9	4,5	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6	22
23	62,2		88,0		94,6		23

K. DETERMINACIÓN DE LA LACTOSA

1. Objeto y ámbito de aplicación

Este método permite determinar el contenido de lactosa de los piensos que contienen más de un 0,5 % de este azúcar.

2. Principio

Los azúcares se disuelven en agua. La solución se somete a fermentación por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que deja intacta la lactosa. Tras clarificación y filtración se determina el contenido de lactosa por el método de Luff-Schoorl.

3. Reactivos

- 3.1. Suspensión de *Saccharomyces cerevisiae*: suspender 25 g de levadura fresca en 100 ml de agua. En el frigorífico, el período máximo de conservación de la suspensión es de una semana.
- 3.2. Solución de Carrez I: disolver en agua 21,9 g de acetato de cinc, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, y 3 g de ácido acético glacial. Enrasar con agua a 100 ml.
- 3.3. Solución de Carrez II: disolver en agua 10,6 g de ferrocianuro de potasio, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Enrasar con agua a 100 ml.
- 3.4. Reactivo de Luff-Schoorl:

Verter la solución de ácido cítrico (3.4.2) en la solución de carbonato de sodio (3.4.3), removiendo con cuidado. Añadir la solución de sulfato de cobre (3.4.1) y enrasar a 1 l con agua. Dejar reposar una noche y filtrar. Comprobar la concentración del reactivo así obtenido (0,05 mol de Cu/l ; 1 mol de $\text{Na}_2 \text{CO}_3/\text{l}$). El pH de la solución deberá ser de 9,4 aproximadamente.

- 3.4.1. Solución de sulfato de cobre: disolver 25 g de sulfato de cobre, $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, exento de hierro, en 100 ml de agua.
- 3.4.2. Solución de ácido cítrico: disolver 50 g de ácido cítrico, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, en 50 ml de agua.
- 3.4.3. Solución de carbonato de sodio: disolver 143,8 g de carbonato de sodio anhidro en 300 ml aproximadamente de agua caliente. Dejar enfriar.
- 3.5. Piedra pómez granulada, hervida en ácido clorhídrico, lavada en agua y desecada.
- 3.6. Yoduro de potasio, solución al 30 % (p/v).
- 3.7. Ácido sulfúrico de 3 mol/l.
- 3.8. Solución de tiosulfato de sodio de 0,1 mol/l.
- 3.9. Solución de almidón: añadir una mezcla de 5 g de almidón soluble en 30 ml de agua a 1 l de agua hirviendo. Hervir durante tres minutos, dejar enfriar y, si es necesario, añadir 10 mg de yoduro de mercurio como conservante.

4. Instrumental

Baño maría con termostato, regulado a 38-40 °C

5. Procedimiento

Pesar, con una precisión de 1 mg, 1 g de la muestra e introducirlo en un matraz aforado de 100 ml. Añadir de 25 ml a 30 ml de agua. Colocar el matraz durante 30 minutos en un baño maría hirviendo y, a continuación, enfriar a 35 °C aproximadamente. Añadir 5 ml de suspensión de levadura (3.1) y homogeneizar. Dejar reposar el matraz durante dos horas en un baño maría, a una temperatura de 38-40 °C. Enfriar a 20 °C aproximadamente.

Añadir 2,5 ml de solución de Carrez I (3.2) y remover durante 30 segundos, añadiendo a continuación 2,5 ml de solución de Carrez II (3.3) y volviendo a remover durante otros 30 segundos. Enrasar a 100 ml con agua, mezclar y filtrar. Pipetear no más de 25 ml de filtrado que contenga preferiblemente de 40 mg a 80 mg de lactosa y transvasarlos a un Erlenmeyer de 300 ml. Si es necesario, enrasar a 25 ml con agua.

Efectuar de la misma manera un ensayo en blanco con 5 ml de suspensión de levadura (3.1). Determinar, como se indica a continuación, el contenido de lactosa siguiendo el método de Luff-Schoorl: añadir exactamente 25 ml de reactivo de Luff-Schoorl (3.4) y dos gránulos de piedra pómez (3.5). Remover manualmente sobre una llama desnuda de media altura y llevar el líquido a ebullición en dos minutos aproximadamente. Colocar inmediatamente el Erlenmeyer sobre una tela metálica revestida de amianto con un orificio de unos 6 cm de diámetro, bajo el cual se habrá encendido una llama. La llama se regulará de forma que solo se caliente el fondo del Erlenmeyer. Ajustar a este último un refrigerante de reflujo. Hervir durante diez minutos exactos. Enfriar inmediatamente en agua fría y, transcurridos unos cinco minutos, titular como se indica a continuación:

Añadir 10 ml de solución de yoduro de potasio (3.6), e inmediatamente después (con cuidado, ya que puede formarse mucha espuma) 25 ml de ácido sulfúrico (3.7). Titular con solución de tiosulfato de sodio (3.8) hasta que aparezca una coloración amarilla mate, añadir el indicador de almidón (3.9) y completar la titulación.

Efectuar la misma titulación en una mezcla exactamente medida de 25 ml de reactivo de Luff-Schoorl (3.4) y 25 ml de agua, después de añadir 10 ml de solución de yoduro de potasio (3.6) y 25 ml de ácido sulfúrico (3.7) sin hervir.

6. Cálculo de los resultados

Establecer, con ayuda de la tabla aneja, la cantidad de lactosa en miligramos que corresponde a la diferencia entre los resultados de las dos titulaciones, expresados en mililitros de tiosulfato de sodio de 0,1 mol/l.

Expresar el resultado de lactosa anhidra como porcentaje de la muestra.

7. Observación

Para productos que contengan más de un 40 % de azúcares fermentables, emplear más de 5 ml de suspensión de levadura (3.1).

Tabla de valores correspondientes a 25 ml de reactivo de Luff-Schoorl

mililitros de $\text{Na}_2 \text{S}_2 \text{O}_3$ de 0,1 mol/l, calentamiento de dos minutos, hervor de diez minutos

$\text{Na}_2 \text{S}_2 \text{O}_3$ 0,1 mol/l	Glucosa, fructosa y azúcares invertidos $\text{C}_6 \text{H}_{12} \text{O}_6$		Lactosa $\text{C}_{12} \text{H}_{22} \text{O}_{11}$		Maltosa $\text{C}_{12} \text{H}_{22} \text{O}_{11}$		$\text{Na}_2 \text{S}_2 \text{O}_3$ 0,1 mol/l
	mg	diferencia	mg	diferencia	mg	diferencia	
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	11,7	3,9	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	27,5	4,0	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	35,5	4,0	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4,0	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	55,7	4,1	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	63,9	4,1	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,2	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	72,2	4,3	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	76,5	4,4	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	80,9	4,5	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6	22
23	62,2		88,0		94,6		23

L. DETERMINACIÓN DEL ALMIDÓN

MÉTODO POLARIMÉTRICO

1. Objeto y ámbito de aplicación

Este método permite determinar los niveles de almidón y de productos de la degradación del almidón de elevado peso molecular presentes en los piensos, a fin de comprobar que se cumple el valor energético declarado (disposiciones del anexo VII) y lo dispuesto en la Directiva 96/25/CE del Consejo ⁽¹⁾.

2. Principio

El método comprende dos determinaciones. En la primera, la muestra se trata con ácido clorhídrico diluido. Tras clarificación y filtración, se mide la rotación óptica de la solución por polarimetría.

En la segunda, la muestra se extrae con etanol al 40 %. Tras acidificación del filtrado con ácido clorhídrico, clarificación y filtración, se mide la rotación óptica como en la primera determinación.

La diferencia entre las dos mediciones, multiplicada por un factor conocido, da el contenido de almidón de la muestra.

3. Reactivos

3.1. Ácido clorhídrico, solución al 25 % (p/p), con una densidad de 1,126 g/ml

⁽¹⁾ DO L 125 de 23.5.1996, p. 35.

- 3.2. Ácido clorhídrico, solución al 1,13 % (p/v)

La concentración debe comprobarse por titulación con una solución de hidróxido de sodio de 0,1 mol/l en presencia de rojo de metilo al 0,1 % (p/v) en etanol al 94 % (v/v). Para la neutralización de 10 ml se necesitan 30,94 ml de NaOH de 0,1 ml/l.

- 3.3. Solución de Carrez I: disolver en agua 21,9 g de acetato de cinc, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, y 3 g de ácido acético glacial. Enrasar con agua a 100 ml.
- 3.4. Solución de Carrez II: disolver en agua 10,6 g de ferrocianuro de potasio, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Enrasar con agua a 100 ml.
- 3.5. Etanol, solución al 40 % (v/v), con una densidad de 0,948 g/ml a 20 °C

4. Instrumental

- 4.1. Erlenmeyer de 250 ml con junta esmerilada estándar y refrigerante de reflujo.
- 4.2. Polarímetro o sacarímetro.

5. Procedimiento

- 5.1. *Preparación de la muestra*

Triturar la muestra hasta que sea lo suficientemente fina para pasar en su totalidad por un tamiz con una luz de malla redonda de 0,5 mm.

- 5.2. *Determinación de la rotación óptica total (P o S) (véase la observación del punto 7.1)*

Pesar, con una precisión de 1 mg, 2,5 g de la muestra triturada e introducirlos en un matraz aforado de 100 ml. Añadir 25 ml de ácido clorhídrico (3.2), agitar para obtener una distribución uniforme de la muestra de ensayo y añadir otros 25 ml de ácido clorhídrico (3.2). Sumergir el matraz en un baño maría hirviendo y, durante los tres primeros minutos, agitar enérgica y constantemente para evitar la formación de aglomerados. La cantidad de agua del baño maría debe ser suficiente para que pueda mantenerse en ebullición cuando se introduzca en él el matraz. Este no debe retirarse del baño mientras se agita. Transcurridos exactamente 15 minutos, sacarlo del baño, añadir 30 ml de agua fría y enfriar inmediatamente a 20 °C.

Añadir 5 ml de solución de Carrez I (3.3) y agitar durante 30 segundos aproximadamente. Añadir 5 ml de solución de Carrez II (3.4) y agitar durante 30 segundos aproximadamente. Enrasar con agua, mezclar y filtrar. Si el filtrado no está perfectamente claro (lo cual es raro), repetir la determinación con una cantidad mayor de soluciones de Carrez I y II, por ejemplo 10 ml.

Medir la rotación óptica de la solución en un tubo de 200 mm con el polarímetro o el sacarímetro.

- 5.3. *Determinación de la rotación óptica (P' o S') de sustancias solubles en etanol al 40 %*

Pesar, con una precisión de 1 mg, 5 g de la muestra, introducirlos en un matraz aforado de 100 ml y añadir unos 80 ml de etanol (3.5) (véase la observación 7.2). Dejar reposar el matraz durante una hora a temperatura ambiente; durante este tiempo, agitar enérgicamente seis veces de manera que la muestra se mezcle completamente con el etanol. Enrasar con etanol (3.5), mezclar y filtrar.

Pipetear 50 ml del filtrado (correspondientes a 2,5 g de la muestra) y transvasarlos a un Erlenmeyer de 250 ml, añadiendo a continuación 2,1 ml de ácido clorhídrico (3.1) y agitando enérgicamente. Ajustar un refrigerante de reflujo al Erlenmeyer y sumergir este último en un baño maría hirviendo. Transcurridos exactamente 15 minutos, retirar el Erlenmeyer del baño, transvasar su contenido a un matraz aforado de 100 ml, enjuagando con un poco de agua fría, y enfriar a 20 °C.

Clarificar con soluciones de Carrez I (3.3) y II (3.4), enrasar con agua, mezclar, filtrar y medir la rotación óptica como se indica en los párrafos segundo y tercero del punto 5.2.

6. Cálculo de los resultados

El contenido de almidón (%) se calcula como sigue:

- 6.1. *Medición con polarímetro*

$$\text{Porcentaje de almidón} = \frac{2\,000(P - P')}{[\alpha]_D^{20}}$$

P = rotación óptica total en grados de ángulo

- P' = rotación óptica en grados de ángulo de las sustancias solubles en etanol al 40 % (V/V)
- $[\alpha]_D^{20}$ = rotación óptica específica del almidón puro. Los valores numéricos D aceptados convencionalmente para este factor son los siguientes:
- + 185,9°: almidón de arroz
 - + 185,7°: fécula de patata
 - + 184,6°: almidón de maíz
 - + 182,7°: almidón de trigo
 - + 181,5°: almidón de cebada
 - + 181,3°: almidón de avena
 - + 184,0°: otros tipos de almidón y mezclas de almidón en piensos compuestos

6.2. Medición con sacarímetro

$$\text{Porcentaje de almidón} = \frac{2\,000}{[\alpha]_D^{20}} \times \frac{(2\,N \times 0,665) \times (S - S')}{100} - \frac{26,6\,N \times (S - S')}{[\alpha]_D^{20}}$$

- S = rotación óptica total, en grados de sacarímetro
- S' = rotación óptica, en grados de sacarímetro, de las sustancias solubles en etanol al 40 % (v/v)
- N = peso (g) de la sacarosa en 100 ml de agua que da una rotación óptica de 100 grados de sacarímetro cuando se mide con un tubo de 200 mm
- 16,29 g para sacarímetros franceses
 - 26,00 g para sacarímetros alemanes
 - 20,00 g para sacarímetros mixtos
- $[\alpha]_D^{20}$ = rotación óptica específica del almidón puro (véase el punto 6.1)

6.3. Repetibilidad

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas con la misma muestra no debe exceder de 0,4 en valor absoluto, en el caso de un contenido de almidón inferior al 40 %, ni del 1 % en el caso de contenidos de almidón iguales o superiores al 40 %.

7. Observaciones

- 7.1. Si la muestra contiene más de un 6 % de carbonatos, calculados en carbonato de calcio, deben destruirse mediante un tratamiento con la cantidad exacta apropiada de ácido sulfúrico diluido antes de proceder a la determinación de la rotación óptica total.
- 7.2. En el caso de productos con un elevado contenido de lactosa, como el suero de leche en polvo o la leche desnatada en polvo, proceder como sigue tras añadir 80 ml de etanol (3.5). Ajustar un refrigerante de reflujo al Erlenmeyer y sumergir este último en un baño maría a 50 °C durante 30 minutos. Dejar enfriar y seguir con el análisis como se indica en el punto 5.3.
- 7.3. Cuando están presentes en cantidades importantes en los piensos, los siguientes materiales producen interferencias en la determinación del contenido de almidón por el método polarimétrico, lo que podría dar lugar a resultados incorrectos:
- productos de la remolacha (azucarera), como la pulpa de remolacha (azucarera), las melazas de remolacha (azucarera), la pulpa de remolacha (azucarera) melazada, la vinaza de remolacha (azucarera) o el azúcar (de remolacha),
 - pulpa de cítricos,
 - linaza; torta de linaza obtenida por presión; torta de linaza obtenida por extracción,
 - semillas de colza; torta de semillas de colza obtenida por presión; torta de semillas de colza obtenida por extracción; cáscaras de semillas de colza,
 - semillas de girasol; torta de semillas de girasol obtenida por extracción; torta de semillas de girasol parcialmente peladas obtenida por extracción,
 - torta de copra obtenida por presión; torta de copra obtenida por extracción,
 - pulpa de patata,
 - levadura deshidratada,

- productos ricos en inulina (por ejemplo, rodajas y sémola de patacas),
- chicharrones.

M. DETERMINACIÓN DE LA CENIZA BRUTA

1. **Objeto y ámbito de aplicación**

Este método permite determinar el contenido de ceniza bruta de los piensos.

2. **Principio**

La muestra se incinera a 550 °C; el residuo se pesa.

3. **Reactivos**

Nitrato de amonio, solución al 20 % (p/v).

4. **Instrumental**

4.1. Placa calefactora.

4.2. Horno eléctrico de mufla con termostato.

4.3. Crisoles de incineración de sílice, porcelana o platino, bien rectangulares (60 x 40 x 25 mm, aproximadamente), bien redondos (60 mm a 75 mm de diámetro y 20 mm a 40 mm de altura).

5. **Procedimiento**

Pesar, con una precisión de 1 mg, 5 g aproximadamente de la muestra (2,5 g en el caso de productos con tendencia a hincharse) e introducirlos en un crisol de incineración previamente calentado a 550 °C, enfriado y tarado. Colocar el crisol sobre la placa calefactora y calentar gradualmente hasta que se carbonice la sustancia. Incinerar conforme al punto 5.1 o 5.2.

5.1. Introducir el crisol en el horno de mufla calibrado, regulado a 550 °C. Mantener a esta temperatura hasta obtener una ceniza blanca, gris claro o rojiza aparentemente exenta de partículas carbonosas. Colocar el crisol en un desecador, dejar enfriar y pesar inmediatamente.

5.2. Introducir el crisol en el horno de mufla calibrado, regulado a 550 °C. Incinerar durante tres horas. Colocar el crisol en un desecador, dejar enfriar y pesar inmediatamente. Volver a incinerar durante 30 minutos para que el peso de la ceniza se mantenga constante (la pérdida de peso entre dos pesadas sucesivas debe ser inferior o igual a 1 mg).

6. **Cálculo de los resultados**

Calcular el peso del residuo deduciendo la tara.

Expresar el resultado en porcentaje de la muestra.

7. **Observaciones**

7.1. La ceniza de *sustancias difíciles de incinerar* debe someterse a una primera incineración de, como mínimo, tres horas y después enfriarse, para a continuación añadirle unas pocas gotas de una solución de nitrato de amonio al 20 % o agua (con cuidado de que no se disperse la ceniza ni se formen grumos). Continuar la calcinación después de desecar en la estufa. Repetir la operación las veces necesarias hasta que la incineración sea completa.

7.2. En el caso de *sustancias resistentes al tratamiento* descrito en el punto 7.1, proceder como sigue: tras incinerar durante tres horas, poner la ceniza en agua caliente y filtrar por un filtro pequeño sin cenizas. Incinerar el filtro y su contenido en el crisol inicial. Colocar el filtrado en el crisol enfriado, evaporar hasta que esté seco, incinerar y pesar.

- 7.3. En el caso de *aceites y grasas*, pesar con exactitud una muestra de 25 g en un crisol de tamaño adecuado. Carbonizar inflamando la sustancia con una tira de papel de filtro sin cenizas. Tras la combustión, humedecer con el mínimo estrictamente necesario de agua. Secar e incinerar como se describe en el punto 5.

N. DETERMINACIÓN DE LA CENIZA INSOLUBLE EN ÁCIDO CLORHÍDRICO

1. Objeto y ámbito de aplicación

Este método permite determinar el nivel de sustancias minerales de los piensos que son insolubles en ácido clorhídrico. Pueden seguirse dos métodos, en función de la naturaleza de la muestra.

- 1.1. *Método A*: aplicable a los materiales para piensos orgánicos y a la mayor parte de los piensos compuestos.
- 1.2. *Método B*: aplicable a los compuestos y mezclas minerales y a los piensos compuestos cuyo contenido de sustancias insolubles en ácido clorhídrico, determinado por el método A, sea superior al 1 %.

2. Principio

- 2.1. *Método A*: la muestra se incinera, la ceniza se hierve en ácido clorhídrico y el residuo insoluble se filtra y se pesa.
- 2.2. *Método B*: la mezcla se trata con ácido clorhídrico. La solución se filtra, el residuo se incinera y la ceniza así obtenida se trata conforme al método A.

3. Reactivos

- 3.1. Ácido clorhídrico de 3 mol/l.
- 3.2. Ácido tricloroacético, solución al 20 % (p/v).
- 3.3. Ácido tricloroacético, solución al 1 % (p/v).

4. Instrumental

- 4.1. Placa calefactora.
- 4.2. Horno eléctrico de mufla con termostato.
- 4.3. Crisoles de incineración de sílice, porcelana o platino, bien rectangulares (60 x 40 x 25 mm, aproximadamente), bien redondos (60 mm a 75 mm de diámetro y 20 mm a 40 mm de altura).

5. Procedimiento

5.1. *Método A*:

Incinerar la muestra según el método descrito para la determinación de la ceniza bruta. También puede emplearse la ceniza obtenida en ese análisis.

Introducir la ceniza en un vaso de precipitado de 250 ml a 400 ml, empleando 75 ml de ácido clorhídrico (3.1). Llevar lentamente a ebullición y hervir suavemente durante 15 minutos. Filtrar la solución caliente por un papel de filtro sin cenizas y lavar el residuo con agua caliente hasta que deje de ser visible la reacción ácida. Secar el filtro que contiene el residuo e incinerarlo en un crisol tarado a una temperatura no inferior a 550 °C ni superior a 700 °C. Enfriar en un desecador y pesar.

5.2. *Método B*

Pesar, con una precisión de 1 mg, 5 g de la muestra e introducirlos en un vaso de precipitado de 250 ml a 400 ml. Añadir sucesivamente 25 ml de agua y 25 ml de ácido clorhídrico (3.1), mezclar y esperar a que cese la efervescencia. Añadir otros 50 ml de ácido clorhídrico (3.1). Esperar a que cese cualquier posible desprendimiento de gas, colocar a continuación el vaso de precipitado en un baño maría hirviendo y mantenerlo allí durante 30 minutos o más, si fuera necesario, con el fin de hidrolizar completamente el almidón.

que pueda estar presente. Filtrar en caliente por un filtro sin cenizas y lavar el filtro en 50 ml de agua caliente (véase la observación del punto 7). Colocar el filtro que contiene el residuo en un crisol de incineración, secar e incinerar a una temperatura no inferior a 550 °C ni superior a 700 °C. Introducir la ceniza en un vaso de precipitado de 250 ml a 400 ml, empleando 75 ml de ácido clorhídrico (3.1); continuar como se describe en el punto 5.1, párrafo segundo.

6. **Cálculo de los resultados**

Calcular el peso del residuo deduciendo la tara. Expresar el resultado en porcentaje de la muestra.

7. **Observación**

Si la filtración resultara difícil, recomenzar el análisis sustituyendo los 50 ml de ácido clorhídrico (3.1) por 50 ml de ácido tricloracético al 20 % (3.2) y lavando el filtro en una solución caliente de ácido tricloracético al 1 % (3.3).

O. DETERMINACIÓN DE LOS CARBONATOS

1. **Objeto y ámbito de aplicación**

Este método permite determinar la cantidad de carbonatos, convencionalmente expresados en carbonato de calcio, en la mayoría de los piensos.

Sin embargo, en determinados casos (carbonato de hierro, por ejemplo), es necesario emplear un método especial.

2. **Principio**

Los carbonatos se descomponen en ácido clorhídrico; el dióxido de carbono desprendido se recoge en un tubo graduado y su volumen se compara con el desprendido, en las mismas condiciones, por una cantidad conocida de carbonato de calcio.

3. **Reactivos**

- 3.1. Ácido clorhídrico de 1,10 g/ml de densidad.
- 3.2. Carbonato de calcio.
- 3.3. Ácido sulfúrico, de aproximadamente 0,05 mol/l, coloreado con rojo de metilo.

4. **Instrumental**

Aparato de Scheibler-Dietrich (véase el diagrama) o equivalente.

5. **Procedimiento**

Según el contenido de carbonatos de la muestra, pesar una porción de muestra según se indica a continuación:

- 0,5 g en el caso de productos que contengan del 50 % al 100 % de carbonatos, expresados en carbonato de calcio,
- 1 g en el caso de productos que contengan del 40 % al 50 % de carbonatos, expresados en carbonato de calcio,
- 2 g a 3 g en los demás casos.

Introducir la porción de muestra en el matraz especial (4) del aparato, provisto de un pequeño tubo de material irrompible con 10 ml de ácido clorhídrico (3.1), y conectar el matraz al aparato. Girar el grifo de tres vías (5) de forma que el tubo (1) se conecte con el exterior. Con ayuda del tubo móvil (2), que está lleno de ácido sulfúrico coloreado (3.3) y conectado al tubo graduado (1), llevar el nivel del líquido a la marca cero. Girar el grifo (5) para conectar los tubos (1) y (2) y comprobar que el nivel está en cero.

Dejar correr lentamente el ácido clorhídrico (3.1) sobre la porción de muestra, inclinando el matraz (4). Igualar la presión bajando el tubo (2). Agitar el matraz (4) hasta que deje de desprenderse dióxido de carbono por completo.

Restablecer la presión llevando el líquido al mismo nivel en los tubos (1) y (2). Hacer la lectura cuando hayan transcurrido *unos pocos minutos* y el volumen de gas se haya hecho constante.

Efectuar un ensayo de control en las mismas condiciones con 0,5 g de carbonato de calcio (3.2).

6. **Cálculo de los resultados**

El contenido de carbonatos, expresados en carbonato de calcio, se calcula con la siguiente fórmula:

$$X = \frac{V \times 100}{V_1 \times 2m}$$

donde:

X = porcentaje (p/p) de carbonatos de la muestra, expresados en carbonato de calcio;

V = mililitros de CO₂ desprendidos por la porción de muestra;

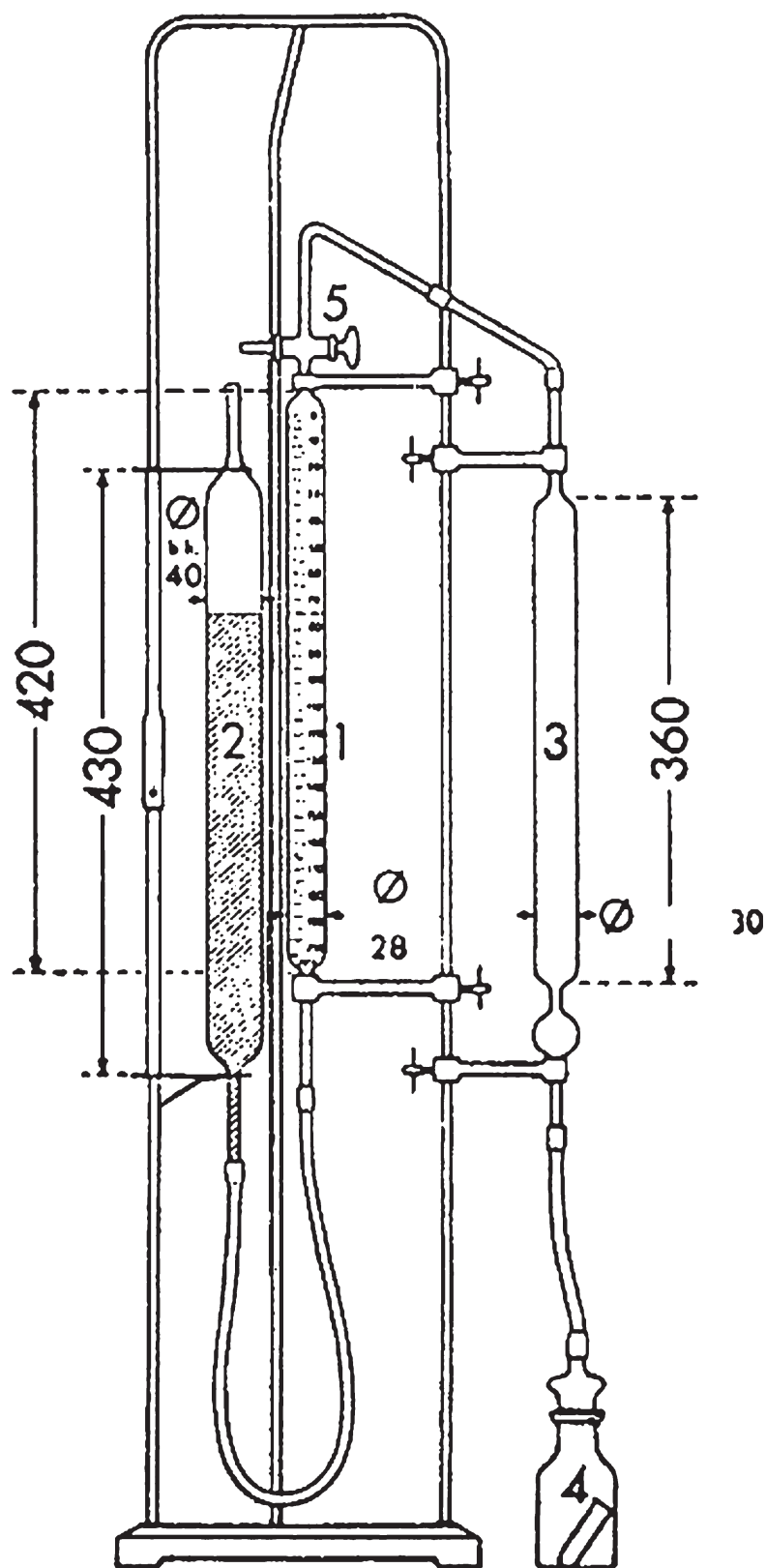
V₁ = mililitros de CO₂ desprendidos por 0,5 g de CaCO₃;

m = peso en gramos de la porción de muestra.

7. **Observaciones**

7.1. Cuando la porción de muestra pese más de 2 g, introducir previamente en el matraz (4) 15 ml de agua destilada y mezclar antes de comenzar el ensayo. Emplear el mismo volumen de agua para el ensayo de control.

7.2. Si el aparato utilizado tiene un volumen diferente al del aparato de Scheibler-Dietrich, deben adaptarse en consecuencia tanto las porciones de muestra y de sustancia de control como el cálculo de los resultados.

APARATO SCHEIBLER-DIETRICH PARA LA DETERMINACIÓN DE CO₂

(medidas en mm)

P. DETERMINACIÓN DEL FÓSFORO TOTAL

MÉTODO FOTOMÉTRICO**1. Objeto y ámbito de aplicación**

Este método permite determinar el contenido de fósforo total de los piensos. Está indicado, en particular, para el análisis de los productos pobres en fósforo. En determinados casos (productos ricos en fósforo), puede aplicarse un método gravimétrico.

2. Principio

La muestra se mineraliza, bien por combustión seca (en el caso de piensos orgánicos), bien por digestión ácida (en el caso de compuestos minerales y piensos líquidos), y se pone en una solución ácida. La solución se trata con el reactivo de molibdovanadato. La densidad óptica de la solución amarilla así formada se mide en el espectrofotómetro a 430 nm.

3. Reactivos

3.1. Carbonato de calcio.

3.2. Ácido clorhídrico, $\rho_{20} = 1,10$ g/ml (aproximadamente 6 mol/l).

3.3. Ácido nítrico, $\rho_{20} = 1,045$ g/ml.

3.4. Ácido nítrico, $\rho_{20} = 1,38$ a $1,42$ g/ml.

3.5. Ácido sulfúrico, $\rho_{20} = 1,84$ g/ml.

3.6. Reactivo de molibdovanadato: mezclar 200 ml de solución de heptamolibdato de amonio (3.6.1), 200 ml de solución de monovanadato de amonio (3.6.2) y 134 ml de ácido nítrico (3.4) en un matraz aforado de 1 l. Enrasar con agua.

3.6.1. Solución de heptamolibdato de amonio: disolver en agua caliente 100 g de heptamolibdato de amonio, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Añadir 10 ml de amoniaco (densidad 0,91 g/ml) y enrasar a 1 l con agua.

3.6.2. Solución de monovanadato de amonio: disolver 2,35 g de monovanadato de amonio, NH_4VO_3 , en 400 ml de agua caliente. Añadir lentamente y sin parar de remover 20 ml de ácido nítrico diluido (7 ml de HNO_3 (3.4) + 13 ml de H_2O) y enrasar a 1 l con agua.

3.7. Solución patrón de 1 mg de fósforo por mililitro: disolver en agua 4,387 g de dihidrogenofosfato de potasio, KH_2PO_4 . Enrasar a 1 l con agua.

4. Instrumental

4.1. Cisoles de incineración de sílice, porcelana o platino.

4.2. Horno eléctrico de mufla con termostato, regulado a 550 °C.

4.3. Matraz Kjeldahl de 250 ml.

4.4. Matraces aforados y pipetas de precisión.

4.5. Espectrofotómetro.

4.6. Tubos de ensayo de 16 mm de diámetro aproximadamente, con tapones rebajados a un diámetro de 14,5 mm y con una capacidad de 25 ml a 30 ml.

5. Procedimiento**5.1. Preparación de la solución**

Según la naturaleza de la muestra, preparar una solución como se indica en el punto 5.1.1 o 5.1.2.

5.1.1. Procedimiento habitual

Pesar, con una precisión de 1 mg, 1 g o más de la muestra. Introducirla en un matraz Kjeldahl, añadir 20 ml de ácido sulfúrico (3.5), agitar para impregnar completamente la sustancia de ácido y evitar que se adhiera a las paredes del matraz, calentar y mantener durante diez minutos en el punto de ebullición. Dejar enfriar ligeramente, añadir 2 ml de ácido nítrico (3.4), calentar suavemente, dejar enfriar ligeramente, añadir un poco más de ácido nítrico (3.4) y llevar de nuevo al punto de ebullición. Repetir este procedimiento hasta obtener una solución incolora. Enfriar, añadir un poco de agua y decantar el líquido en un matraz aforado de 500 ml, enjuagando el matraz Kjeldahl con agua caliente. Dejar enfriar, enrasar con agua, homogeneizar y filtrar.

5.1.2. Muestras que contengan sustancias orgánicas y estén exentas de dihidrogenofosfatos de calcio y de magnesio

Pesar, con una precisión de 1 mg, 2,5 g aproximadamente de la muestra en un crisol de incineración. Mezclar la muestra de ensayo hasta su completa fusión con 1 g de carbonato de calcio (3.1). Incinerar en el horno a 550 °C hasta obtener una ceniza blanca o gris (no importa que quede algo de carbón). Transferir la ceniza a un vaso de precipitado de 250 ml. Añadir 20 ml de agua y de ácido clorhídrico (3.2) hasta que cese la efervescencia. Añadir otros 10 ml de ácido clorhídrico (3.2). Poner el vaso de precipitado sobre un baño de arena y evaporar hasta sequedad para insolubilizar la sílice. Volver a disolver el residuo en 10 ml de ácido nítrico (3.3) y hervir durante cinco minutos sobre el baño de arena o la placa calefactora, sin evaporación, hasta sequedad. Decantar el líquido en un matraz aforado de 500 ml, enjuagando el vaso de precipitado varias veces con agua caliente. Dejar enfriar, enrasar con agua, homogeneizar y filtrar.

5.2. Desarrollo de la coloración y medición de la densidad óptica

Diluir una parte alícuota del filtrado obtenido con el procedimiento del punto 5.1.1 o 5.1.2 para obtener una concentración de fósforo no superior a 40 µg/ml. Introducir 10 ml de esta solución en un tubo de ensayo (4.6) y añadir 10 ml del reactivo de molibdovanadato (3.6). Homogeneizar y dejar reposar un mínimo de diez minutos a 20 °C. Medir la densidad óptica en un espectrofotómetro a 430 nm por comparación con una solución obtenida añadiendo 10 ml del reactivo de molibdovanadato (3.6) a 10 ml de agua.

5.3. Curva de calibración

A partir de la solución patrón (3.7), preparar soluciones que contengan, respectivamente, 5, 10, 20, 30 y 40 µg de fósforo por mililitro. Tomar 10 ml de cada una de estas soluciones y añadirles 10 ml del reactivo de molibdovanadato (3.6). Homogeneizar y dejar reposar un mínimo de diez minutos a 20 °C. Medir la densidad óptica como se indica en el punto 5.2. Trazar la curva de calibración relacionando las densidades ópticas con las correspondientes cantidades de fósforo. La curva será lineal para concentraciones comprendidas entre 0 µg/ml y 40 µg/ml.

6. Cálculo de los resultados

Determinar la cantidad de fósforo de la muestra de ensayo por medio de la curva de calibración.

Expresar el resultado en porcentaje de la muestra.

Repetibilidad

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas con la misma muestra no excederá del:

- 3 % del resultado superior, en el caso de contenidos de fósforo inferiores al 5 %,
- 0,15 % en valor absoluto, en el caso de contenidos de fósforo iguales o superiores al 5 %.

Q. DETERMINACIÓN DEL CLORO DE LOS CLORUROS

1. Objeto y ámbito de aplicación

Este método permite determinar la cantidad de cloro de los cloruros solubles en agua, expresada convencionalmente en cloruro de sodio. Es aplicable a todos los piensos.

2. Principio

Los cloruros se disuelven en agua. Si el producto contiene materia orgánica, se procede a una clarificación. La solución se acidifica ligeramente con ácido nítrico y los cloruros se precipitan en forma de cloruro de plata por medio de una solución de nitrato de plata. El exceso de nitrato de plata se titula con una solución de tiocianato de amonio por el método de Volhard.

3. Reactivos

- 3.1. Solución de tiocianato de amonio de 0,1 mol/l.
- 3.2. Solución de nitrato de plata de 0,1 mol/l.
- 3.3. Solución saturada de sulfato férrico de amonio $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$.
- 3.4. Ácido nítrico, de 1,38 g/ml de densidad.
- 3.5. Éter dietílico.
- 3.6. Acetona.
- 3.7. Solución de Carrez I: disolver en agua 21,9 g de acetato de cinc, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, y 3 g de ácido acético glacial. Enrasar con agua a 100 ml.
- 3.8. Solución de Carrez II: disolver en agua 10,6 g de ferrocianuro de potasio, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Enrasar con agua a 100 ml.
- 3.9. Carbón activo, exento de cloruros y que no los absorba.

4. Instrumental

Mezclador (tambor): de 35 a 40 revoluciones por minuto aproximadamente.

5. Procedimiento**5.1. Preparación de la solución**

Según la naturaleza de la muestra, preparar una solución como se muestra en el punto 5.1.1, 5.1.2 o 5.1.3.

Al mismo tiempo, efectuar un *ensayo en blanco* sin la muestra que debe analizarse.

5.1.1. Muestras exentas de materia orgánica

Pesar, con una precisión de 1 mg, una muestra de no más de 10 g que no contenga más de 3 g de cloro en forma de cloruros. Introducirla con 400 ml de agua en un matraz aforado de 500 ml a unos 20 °C. Mezclar durante 30 minutos en el tambor, enrasar, homogeneizar y filtrar.

5.1.2. Muestras que contienen materia orgánica, excepto los productos mencionados en el punto 5.1.3

Pesar, con una precisión de 1 mg, 5 g aproximadamente de la muestra e introducirlos con 1 g de carbón activo en un matraz aforado de 500 ml. Añadir 400 ml de agua a unos 20 °C y 5 ml de solución de Carrez I (3.7), remover durante 30 segundos y, a continuación, añadir 5 ml de solución de Carrez II (3.8). Mezclar durante 30 minutos en el tambor, enrasar, homogeneizar y filtrar.

5.1.3. Piensos cocidos, tortas y harina de lino, productos ricos en harina de lino y otros productos ricos en mucílago o en sustancias coloidales (por ejemplo, almidón dextrinado)

Preparar la solución como se describe en el punto 5.1.2, pero no filtrar. Decantar (si fuera necesario, centrifugar), retirar 100 ml del líquido sobrenadante y transvasar a un matraz aforado de 200 ml. Mezclar con acetona (3.6) y enrasar con este disolvente, homogeneizar y filtrar.

5.2. Titulación

Transvasar con una pipeta al Erlenmeyer de 25 ml a 100 ml del filtrado (según el contenido supuesto de cloro) obtenido según se describe en el punto 5.1.1, 5.1.2 o 5.1.3. La parte alícuota no debe contener más de 150 mg de cloro (Cl). Diluir, si es necesario, a no menos de 50 ml con agua, añadir 5 ml de ácido nítrico (3.4), 20 ml de solución saturada de sulfato férrico de amonio (3.3) y dos gotas de solución de tiocianato de amonio (3.1) transvasadas mediante una bureta llena hasta la marca cero. Transvasar con una bureta la solución de nitrato de plata (3.2) de forma que se obtenga un exceso de 5 ml. Añadir 5 ml de éter dietílico (3.5) y agitar fuertemente para coagular el precipitado. Titular el exceso de nitrato de plata con la solución de tiocianato de amonio (3.1) hasta que la tinción marrón rojiza haya persistido un minuto.

6. Cálculo de los resultados

El contenido de cloro, expresado en porcentaje de cloruro de sodio, se calcula con la fórmula siguiente:

$$X = \frac{5,845 \times (V_1 - V_2)}{m}$$

donde:

V_1 = mililitros de solución de nitrato de plata de 0,1 mol/l añadidos;

V_2 = mililitros de solución de tiocianato de amonio de 0,1 mol/l empleados para la titulación;

m = peso de la muestra.

Si el ensayo en blanco indica un consumo de solución de nitrato de plata de 0,1 mol/l, deducir este valor del volumen ($V_1 - V_2$).

7. Observaciones

7.1. La titulación también puede hacerse por potenciometría.

7.2. En el caso de productos muy ricos en aceites y grasas, proceder primero a un desengrasado con éter dietílico o éter de petróleo.

7.3. En el caso de las harinas de pescado, la titulación puede efectuarse por el método Mohr.

ANEXO IV

MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA EL CONTROL DEL NIVEL DE ADITIVOS AUTORIZADOS EN LOS PIENSOS**A. DETERMINACIÓN DE LA VITAMINA A****1. Objeto y ámbito de aplicación**

Este método permite determinar el nivel de vitamina A (retinol) en piensos y premezclas. La vitamina A incluye el alcohol todo-trans-retinilo y sus isómeros cis, que se determinan con este método. El contenido de vitamina A se expresa en unidades internacionales (UI) por kilogramo. Una UI corresponde a la actividad de 0,300 µg de alcohol todo-trans-retinilo, 0,344 µg de acetato de todo-trans-retinilo o 0,550 µg de palmitato de todo-trans-retinilo.

El límite de cuantificación es de 2 000 UI de vitamina A por kilogramo.

2. Principio

La muestra se hidroliza con solución etanólica de hidróxido de potasio y la vitamina A se extrae en éter de petróleo. El disolvente se elimina por evaporación y el residuo se disuelve en metanol y, en caso necesario, se diluye hasta conseguir la concentración necesaria. El contenido de vitamina A se determina mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) de fase reversa con detector de UV o de fluorescencia. Los parámetros cromatográficos se seleccionan de forma que no haya separación entre el alcohol todo-trans-retinilo y sus isómeros cis.

3. Reactivos

- 3.1. Etanol, $\sigma = 96 \%$.
- 3.2. Éter de petróleo, con un intervalo de ebullición de 40 °C-60 °C.
- 3.3. Metanol.
- 3.4. Solución de hidróxido de potasio, $c = 50 \text{ g}/100 \text{ ml}$.
- 3.5. Solución de ascorbato de sodio, $c = 10 \text{ g}/100 \text{ ml}$ (véanse las observaciones del punto 7.7).
- 3.6. Sulfuro de sodio, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{ H}_2\text{O}$ ($x = 7 - 9$).
- 3.6.1. Solución de sulfuro de sodio, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ en glicerol, $\rho = 120 \text{ g/l}$ (para $x = 9$) (véanse las observaciones del punto 7.8).
- 3.7. Solución de fenoltaleína, $c = 2 \text{ g}/100 \text{ ml}$ en etanol (3.1).
- 3.8. 2-Propanol.
- 3.9. Fase móvil para la CLAR: mezcla de metanol (3.3) y agua, por ejemplo 980 + 20 (v+v). La proporción exacta se determinará en función de las características de la columna empleada.
- 3.10. Nitrógeno, exento de oxígeno.
- 3.11. Acetato de todo-trans-retinilo, extra puro, de actividad certificada, por ejemplo $2,80 \times 10^6 \text{ UI/g}$.
- 3.11.1. Solución madre de acetato de todo-trans-retinilo: pesar, con una precisión de 0,1 mg, 50 mg de acetato de vitamina A (3.11) en un matraz aforado de 100 ml. Disolver en 2-propanol (3.8) y enrasar con el mismo disolvente. La concentración nominal de esta solución es de 1 400 UI de vitamina A por mililitro. El contenido exacto ha de determinarse según el punto 5.6.3.1.
- 3.12. Palmitato de todo-trans-retinilo, extra puro, de actividad certificada, por ejemplo $1,80 \times 10^6 \text{ UI/g}$.
- 3.12.1. Solución madre de palmitato de todo-trans-retinilo: pesar, con una precisión de 0,1 mg, 80 mg de palmitato de vitamina A (3.12) en un matraz aforado de 100 ml. Disolver en 2-propanol (3.8) y enrasar con el mismo disolvente. La concentración nominal de esta solución es de 1 400 UI de vitamina A por mililitro. El contenido exacto ha de determinarse según el punto 5.6.3.2.

- 3.13. 2,6-Di-*tert*-butil-4-metilfenol (BHT) (véanse las observaciones del punto 7.5).

4. Instrumental

- 4.1. Evaporador rotativo de vacío.
- 4.2. Material de vidrio ámbar.
- 4.2.1. Matrazes Erlenmeyer o de fondo plano, de 500 ml, con boca esmerilada.
- 4.2.2. Matrazes aforados con tapón esmerilado, de cuello estrecho, de 10, 25, 100 y 500 ml.
- 4.2.3. Embudos cónicos de decantación, de 1 000 ml, con tapón esmerilado.
- 4.2.4. Matrazes piriformes, de 250 ml, con boca esmerilada.
- 4.3. Condensador de Allihn, con camisa de 300 mm de longitud, junta esmerilada y adaptador para tubo de alimentación de gas.
- 4.4. Papel de filtro de pliegues para separación de fases, de 185 mm de diámetro (por ejemplo, Schleicher & Schuell 597 HY 1/2).
- 4.5. Equipo de CLAR con sistema de inyección.
- 4.5.1. Columna cromatográfica de líquidos, de 250 mm x 4 mm, C₁₈, relleno de 5 µm o 10 µm, o equivalente (criterio de funcionamiento: un único pico para todos los isómeros de retinol en las condiciones de CLAR).
- 4.5.2. Detector de UV o de fluorescencia, con ajuste de longitud de onda variable.
- 4.6. Espectrofotómetro con cubetas de cuarzo de 10 mm.
- 4.7. Baño maría con agitador magnético.
- 4.8. Aparato de extracción (véase la figura 1) con los siguientes elementos:
- 4.8.1. Probeta de 1 l de capacidad con cuello y tapón esmerilados.
- 4.8.2. Pieza esmerilada provista de una oliva lateral y de un tubo ajustable que la atraviesa por el centro. El extremo inferior del tubo ajustable deberá tener forma de U, mientras que el superior debe ser una tobera, de forma que pueda transvasarse la fase superior de líquido de la probeta a un embudo de decantación.

5. Procedimiento

Nota: La vitamina A es sensible a la luz (UV) y a la oxidación. Todas las operaciones deberán realizarse en ausencia de luz (utilizando material de vidrio ámbar o protegido con papel de aluminio) y de oxígeno (chorro de nitrógeno). Durante la extracción, el aire que se encuentre por encima del líquido deberá sustituirse por nitrógeno (evitar un exceso de presión aflojando el tapón de vez en cuando).

5.1. Preparación de la muestra

Triturar la muestra de modo que pase por un tamiz con una luz de malla de 1 mm, cuidando de que no se produzca calor. La trituración debe hacerse **inmediatamente** antes de la pesada y la saponificación, pues, de lo contrario, puede haber pérdidas de vitamina A.

5.2. Saponificación

En función del contenido de vitamina A, pesar, con una precisión de 1 mg, entre 2 g y 25 g de la muestra en un matraz Erlenmeyer o de fondo plano de 500 ml (4.2.1). Añadir sucesivamente, agitando en círculos, 130 ml de etanol (3.1), unos 100 mg de BHT (3.13), 2 ml de solución de ascorbato de sodio (3.5) y 2 ml de solución de sulfuro de sodio (3.6). Ajustar un refrigerante (4.3) al matraz y sumergir este en un baño maría con agitador magnético (4.7). Calentar hasta ebullición y dejar refluir durante cinco minutos. Añadir entonces 25 ml de solución de hidróxido de potasio (3.4) a través del refrigerante (4.3) y dejar refluir durante otros 25 minutos, removiendo bajo una corriente lenta de nitrógeno. Enjuagar después el refrigerante con unos 20 ml de agua y enfriar el contenido del matraz hasta la temperatura ambiente.

5.3. Extracción

Transvasar cuantitativamente por decantación la solución de saponificación a un embudo de decantación de 1 000 ml (4.2.3) o al aparato de extracción (4.8), enjuagando con un volumen total de 250 ml de agua. Enjuagar el matraz de saponificación sucesivamente con 25 ml de etanol (3.1) y 100 ml de éter de petróleo (3.2) y transvasar los líquidos de enjuague al embudo de decantación o al aparato de extracción. La proporción de agua y etanol en las soluciones combinadas debe ser aproximadamente de 2/1. Agitar enérgicamente durante dos minutos y dejar reposar durante otros dos minutos.

5.3.1. Extracción con embudo de decantación (4.2.3)

Cuando se hayan separado las fases (véase la observación del punto 7.3), transvasar la fase de éter de petróleo a otro embudo de decantación (4.2.3). Repetir esta extracción dos veces con 100 ml de éter de petróleo (3.2) y dos veces con 50 ml de éter de petróleo (3.2).

Lavar dos veces los extractos combinados en el embudo de decantación, agitando suavemente en círculos (para evitar la formación de emulsiones), con sendas porciones de 100 ml de agua y después, agitando repetidas veces, con más porciones de 100 ml de agua hasta que el agua no se coloree al añadir solución de fenoltaleína (3.7) (normalmente es suficiente con lavar cuatro veces). Pasar el extracto lavado a un matraz aforado de 500 ml (4.2.2) a través de un filtro de pliegues seco para separación de fases (4.4), a fin de eliminar el agua que pudiera quedar en suspensión. Enjuagar el embudo de decantación y el filtro con 50 ml de éter de petróleo (3.2), enrasar con éter de petróleo (3.2) y mezclar bien.

5.3.2. Extracción con aparato de extracción (4.8)

Cuando se hayan separado las fases (véase la observación del punto 7.3), sustituir el tapón de la probeta (4.8.1) por la pieza esmerilada (4.8.2) y colocar el extremo inferior con forma de U del tubo ajustable de manera que quede justo por encima del nivel de la interfase. Aplicando a la oliva la presión de un conducto de nitrógeno, transvasar la fase superior de éter de petróleo a un embudo de decantación de 1 000 ml (4.2.3). Añadir 100 ml de éter de petróleo (3.2) a la probeta, tapar y agitar bien. Dejar que se separen las fases y transvasar la fase superior al embudo de decantación, como antes. Repetir el procedimiento de extracción con otros 100 ml de éter de petróleo (3.2) y otras dos veces con sendas porciones de 50 ml de éter de petróleo (3.2), añadiendo a continuación las fases de éter de petróleo al embudo de decantación.

Lavar los extractos combinados de éter de petróleo como se describe en el punto 5.3.1 y seguir el procedimiento allí descrito.

5.4. Preparación de la solución de muestra para la CLAR

Pipetear una parte alícuota de la solución de éter de petróleo (de 5.3.1 o 5.3.2) a un matraz piriforme de 250 ml (4.2.4). Evaporar el disolvente casi hasta sequedad en el evaporador rotativo (4.1) a presión reducida y a una temperatura del baño no superior a 40 °C. Restaurar la presión atmosférica introduciendo nitrógeno (3.10) y sacar el matraz del evaporador rotativo. Eliminar el disolvente restante con una corriente de nitrógeno (3.10) y disolver inmediatamente el residuo en un volumen conocido (10-100 ml) de metanol (3.3) (la concentración de vitamina A debe quedar en un intervalo de 5 UI/ml a 30 UI/ml).

5.5. Determinación mediante CLAR

La vitamina A se separa en una columna de fase reversa de C_{18} (4.5.1) y su concentración se mide mediante un detector de UV (325 nm) o un detector de fluorescencia (excitación: 325 nm, emisión: 475 nm) (4.5.2).

Inyectar una parte alícuota (por ejemplo, 20 µl) de la solución metanólica obtenida según el punto 5.4 y eluir con la fase móvil (3.9). Calcular la altura (área) media de pico de varias inyecciones de la misma solución de muestra, así como la altura (área) media de pico de varias inyecciones de las soluciones de calibración (5.6.2).

Condiciones de la CLAR

Las siguientes condiciones se ofrecen con carácter orientativo; pueden aplicarse otras si arrojan resultados equivalentes.

Columna cromatográfica 250 mm x 4 mm, C_{18} , relleno de 5 µm o 10 µm, o equivalente de líquidos (4.5.1):

Fase móvil (3.9): Mezcla de metanol (3.3) y agua, por ejemplo 980 + 20 (v+v)

Caudal: 1-2 ml/min.

Detector (4.5.2): Detector de UV (325 nm) o detector de fluorescencia (excitación: 325 nm; emisión: 475 nm)

5.6. Calibración

5.6.1. Preparación de las soluciones patrón de trabajo

Pipetear a un matraz Erlenmeyer o de fondo plano de 500 ml (4.2.1) 20 ml de la solución madre de acetato de vitamina A (3.11.1) o 20 ml de la solución madre de palmitato de vitamina A (3.12.1), e hidrolizar según se describe en el punto 5.2, pero sin añadir BHT. Extraer después con éter de petróleo (3.2) según el punto 5.3 y enrasar a 500 ml con éter de petróleo (3.2). Evaporar 100 ml de este extracto casi hasta sequedad en el evaporador rotativo (véase el punto 5.4), eliminar el disolvente restante con una corriente de nitrógeno (3.10) y volver a disolver el residuo en 10,0 ml de metanol (3.3). La concentración nominal de esta solución es de 560 UI de vitamina A por mililitro. El contenido exacto debe determinarse según el punto 5.6.3.3. La solución patrón de trabajo debe prepararse poco antes de utilizarse.

Pipetear 2,0 ml de esta solución patrón de trabajo a un matraz aforado de 20 ml, enrasar con metanol (3.3) y mezclar. La concentración nominal de esta solución patrón de trabajo **diluida** es de 56 UI de vitamina A por mililitro.

5.6.2. Preparación de las soluciones de calibración y de la curva de calibración

Transvasar 1,0, 2,0, 5,0 y 10,0 ml de la solución patrón de trabajo **diluida** a una serie de matraces aforados de 20 ml, enrasar con metanol (3.3) y mezclar. Las concentraciones nominales de estas soluciones son de 2,8, 5,6, 14,0 y 28,0 UI de vitamina A por mililitro.

Injectar varias veces 20 µl de cada solución de calibración y determinar las alturas (áreas) medias de pico. Utilizar estas últimas para trazar la curva de calibración teniendo en cuenta los resultados del control de UV (5.6.3.3).

5.6.3. Normalización UV de las soluciones patrón.

5.6.3.1. Solución madre de acetato de vitamina A.

Pipetear 2,0 ml de la solución madre de acetato de vitamina A (3.11.1) a un matraz aforado de 50 ml (4.2.2) y enrasar con 2-propanol (3.8). La concentración nominal de esta solución es de 56 UI de vitamina A por mililitro. Pipetear 3,0 ml de esta solución diluida de acetato de vitamina A a un matraz aforado de 25 ml y enrasar con 2-propanol (3.8). La concentración nominal de esta solución es de 6,72 UI de vitamina A por mililitro. Medir en el espectrofotómetro (4.6) a 300-400 nm el espectro de UV de esta solución frente al 2-propanol (3.8). El coeficiente máximo de extinción debe ser de 325 nm a 327 nm.

Cálculo del contenido de vitamina A:

$$\text{UI de vitamina A/ml} = E_{326} \times 19,0$$

$$(E_{1\text{ cm}}^{1\%} \text{ para el acetato de vitamina A} = 1\,530 \text{ a } 326 \text{ nm en 2-propanol})$$

5.6.3.2. Solución madre de palmitato de vitamina A.

Pipetear 2,0 ml de la solución madre de palmitato de vitamina A (3.12.1) a un matraz aforado de 50 ml (4.2.2) y enrasar con 2-propanol (3.8). La concentración nominal de esta solución es de 56 UI de vitamina A por mililitro. Pipetear 3,0 ml de esta solución diluida de palmitato de vitamina A a un matraz aforado de 25 ml y enrasar con 2-propanol (3.8). La concentración nominal de esta solución es de 6,72 UI de vitamina A por mililitro. Medir en el espectrofotómetro (4.6) a 300-400 nm el espectro de UV de esta solución frente al 2-propanol (3.8). El coeficiente máximo de extinción debe ser de 325 nm a 327 nm.

Cálculo del contenido de vitamina A:

$$\text{UI de vitamina A/ml} = E_{326} \times 19,0$$

$$(E_{1\text{ cm}}^{1\%} \text{ para el palmitato de vitamina A} = 957 \text{ a } 326 \text{ nm en 2-propanol})$$

5.6.3.3. Solución patrón de trabajo de vitamina A.

Pipetear a un matraz aforado de 50 ml (4.2.2) 3,0 ml de la solución patrón de trabajo de vitamina A **sin diluir**, preparada de acuerdo con el punto 5.6.1, y enrasar con 2-propanol (3.8). Pipetear 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 25 ml y enrasar con 2-propanol (3.8). La concentración nominal de esta solución es de 6,72 UI de vitamina A por mililitro. Medir en el espectrofotómetro (4.6) a 300-400 nm el espectro de UV de esta solución frente al 2-propanol (3.8). El coeficiente máximo de extinción debe ser de 325 nm a 327 nm.

Cálculo del contenido de vitamina A:

$$\text{UI de vitamina A/ml} = E_{326} \times 18,3$$

($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ para el alcohol de vitamina A = 1 821 a 325 nm en 2-propanol)

6. Cálculo de los resultados

A partir de la altura (área) media de los picos de vitamina A de la solución de muestra, determinar la concentración de esta última en UI/ml tomando como referencia la curva de calibración (5.6.2).

El contenido w de vitamina A de la muestra en UI/kg viene dado por la siguiente fórmula:

$$w = \frac{500 \times c \times V_2 \times 1\,000}{V_1 \times m} \text{ [UI/kg]}$$

en la cual:

c = concentración de vitamina A de la solución de muestra (5.4), en UI/ml;

V_1 = volumen de la solución de muestra (5.4), en mililitros;

V_2 = volumen de la parte alícuota tomada en el punto 5.4, en mililitros;

m = peso de la porción de ensayo, en gramos.

7. Observaciones

- 7.1. En caso de muestras con baja concentración de vitamina A puede ser útil combinar los extractos de éter de petróleo de dos cargas de saponificación (cantidad pesada: 25 g) en una única solución de muestra para la determinación por CLAR.
- 7.2. La muestra tomada para el análisis no contendrá en peso más de 2 g de grasa.
- 7.3. Si no se produce la separación de las fases, añadir unos 10 ml de etanol (3.1) para romper la emulsión.
- 7.4. Con aceite de hígado de bacalao y otras grasas puras, el tiempo de saponificación deberá prolongarse hasta durar de 45 a 60 minutos.
- 7.5. Puede utilizarse hidroquinona en lugar de BHT.
- 7.6. Con una columna de fase normal se pueden separar los isómeros del retinol. Pero, en ese caso, para hacer los cálculos deben sumarse las alturas (áreas) de todos los picos de los isómeros *cis* y *trans*.
- 7.7. En lugar de la solución de ascorbato de sodio pueden utilizarse unos 150 mg de ácido ascórbico.
- 7.8. En lugar de la solución de sulfuro de sodio pueden utilizarse unos 50 mg de EDTA.
- 7.9. Cuando se analice la vitamina A de sustitutivos de la leche, debe prestarse una atención especial a:
 - la saponificación (5.2): debido a la cantidad de grasa presente en la muestra, quizá sea necesario incrementar la cantidad de solución de hidróxido de potasio (3.4),
 - la extracción (5.3): debido a la presencia de emulsiones, puede ser necesario adaptar la relación agua/etanol de 2/1.

Para comprobar si el método de análisis aplicado arroja resultados fiables para esta matriz concreta (sustitutivo de la leche), deberá efectuarse un ensayo de recuperación con una porción de ensayo adicional. Si el porcentaje de recuperación es inferior al 80 %, el resultado analítico debe corregirse para tener en cuenta la recuperación.

8. Repetibilidad

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas con la misma muestra no debe rebasar el 15 % del resultado superior.

9. **Resultados de un estudio colaborativo ⁽¹⁾**

	Premezcla	Pienso de pre- mezcla	Concentrado de minerales	Pienso proteínico	Lechón
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
media [UI/kg]	17,02 x 10 ⁶	1,21 x 10 ⁶	537 100	151 800	18 070
S _r [UI/kg]	0,51 x 10 ⁶	0,039 x 10 ⁶	22 080	12 280	682
r [UI/kg]	1,43 x 10 ⁶	0,109 x 10 ⁶	61 824	34 384	1 910
CV _r [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
S _R [UI/kg]	1,36 x 10 ⁶	0,069 x 10 ⁶	46 300	23 060	3 614
R [UI/kg]	3,81 x 10 ⁶	0,193 x 10 ⁶	129 640	64 568	10 119
CV _R [%]	8,0	6,2	8,6	15	20

L = número de laboratorios

n = número de valores individuales

S_r = desviación típica de la repetibilidadS_R = desviación típica de la reproducibilidad

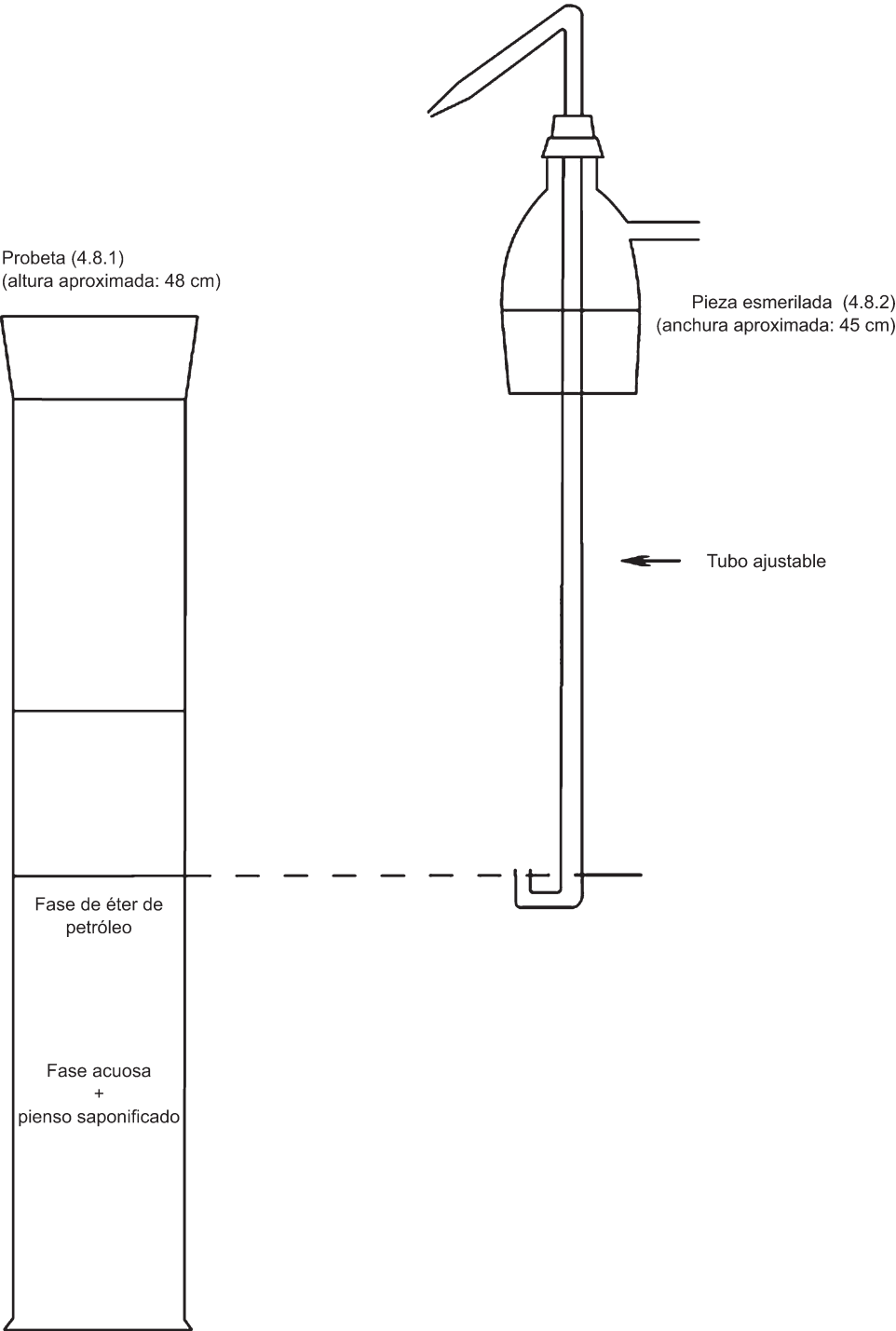
r = repetibilidad

R = reproducibilidad

CV_r = coeficiente de variación de la repetibilidadCV_R = coeficiente de variación de la reproducibilidad.

⁽¹⁾ Realizado por el Grupo de Trabajo sobre Piensos de la Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

Figura 1: Aparato de extracción (4.8)



B. DETERMINACIÓN DE LA VITAMINA E

1. **Objeto y ámbito de aplicación**

Este método permite determinar el nivel de vitamina E en piensos y premezclas. El contenido de vitamina E se expresa en miligramos de acetato de DL- α -tocoferol por kilogramo. Un miligramo de acetato de DL- α -tocoferol corresponde a 0,91 mg de DL- α -tocoferol (vitamina E).

El límite de cuantificación es de 2 mg de vitamina E por kilogramo. Este límite de cuantificación solo puede alcanzarse con un detector de fluorescencia. Con un detector de UV, el límite de cuantificación es de 10 mg/kg.

2. **Principio**

La muestra se hidroliza con solución etanólica de hidróxido de potasio y la vitamina E se extrae en éter de petróleo. El disolvente se elimina por evaporación y el residuo se disuelve en metanol y, en caso necesario, se diluye hasta conseguir la concentración necesaria. El contenido de vitamina E se determina mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) de fase reversa con detector de fluorescencia o de UV.

3. **Reactivos**

- 3.1. Etanol, $\sigma = 96 \%$.
- 3.2. Éter de petróleo con un intervalo de ebullición de 40 °C-60 °C.
- 3.3. Metanol.
- 3.4. Solución de hidróxido de potasio, $c = 50 \text{ g/100 ml}$.
- 3.5. Solución de ascorbato de sodio, $c = 10 \text{ g/100 ml}$ (véanse las observaciones del punto 7.7).
- 3.6. Sulfuro de sodio, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{ H}_2\text{O}$ ($x = 7 - 9$).
- 3.6.1. Solución de sulfuro de sodio, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ en glicerol, $\beta = 120 \text{ g/l}$ (para $x = 9$) (véanse las observaciones del punto 7.8).
- 3.7. Solución de fenolftaleína, $c = 2 \text{ g/100 ml}$ en etanol (3.1).
- 3.8. Fase móvil para la CLAR: mezcla de metanol (3.3) y agua, por ejemplo 980 + 20 (v+v). La proporción exacta estará en función de las características de la columna empleada.
- 3.9. Nitrógeno, exento de oxígeno.
- 3.10. Acetato de DL- α -tocoferol, extra puro, de actividad certificada.
- 3.10.1. Solución madre de acetato de DL- α -tocoferol: pesar, con una precisión de 0,1 mg, 100 mg de acetato de DL- α -tocoferol (3.10) en un matraz aforado de 100 ml. Disolver en etanol (3.1) y enrasar con el mismo disolvente. Un mililitro de esta solución contiene 1 mg de acetato de DL- α -tocoferol. (Con respecto al control de UV, véase el punto 5.6.1.3; con respecto a la estabilización, véanse las observaciones del punto 7.4).
- 3.11. Acetato de DL- α -tocoferol, extra puro, de actividad certificada.
- 3.11.1. Solución madre de DL- α -tocoferol: pesar, con una precisión de 0,1 mg, 100 mg de DL- α -tocoferol (3.10) en un matraz aforado de 100 ml. Disolver en etanol (3.1) y enrasar con el mismo disolvente. Un mililitro de esta solución contiene 1 mg de DL- α -tocoferol. (Con respecto al control de UV, véase el punto 5.6.2.3; con respecto a la estabilización, véanse las observaciones del punto 7.4).
- 3.12. 2,6-Di-*tert*-butil-4-metilfenol (BHT) (véanse las observaciones del punto 7.5).

4. **Instrumental**

- 4.1. Evaporador rotativo de película.
- 4.2. Material de vidrio ámbar.
- 4.2.1. Matraces Erlenmeyer o de fondo plano, de 500 ml, con boca esmerilada.

- 4.2.2. Matraces aforados con tapón esmerilado, de cuello estrecho, de 10, 25, 100 y 500 ml.
- 4.2.3. Embudos cónicos de decantación, de 1 000 ml, con tapón esmerilado.
- 4.2.4. Matraces piriformes, de 250 ml, con boca esmerilada.
- 4.3. Condensador de Allihn, con camisa de 300 mm de longitud, junta esmerilada y adaptador para tubo de alimentación de gas.
- 4.4. Papel de filtro de pliegues para separación de fases, de 185 mm de diámetro (por ejemplo, Schleicher & Schuell 597 HY 1/2).
- 4.5. Equipo de CLAR con sistema de inyección.
- 4.5.1. Columna cromatográfica de líquidos, de 250 mm x 4 mm, C₁₈, relleno de 5 µm o 10 µm, o equivalente.
- 4.5.2. Detector de fluorescencia o de UV, con ajuste de longitud de onda variable.
- 4.6. Espectrofotómetro con cubetas de cuarzo de 10 mm.
- 4.7. Baño maría con agitador magnético.
- 4.8. Aparato de extracción (véase la figura 1) con los siguientes elementos:
 - 4.8.1. Probeta de 1 l de capacidad con cuello y tapón esmerilados.
 - 4.8.2. Pieza esmerilada provista de una oliva lateral y de un tubo ajustable que la atraviesa por el centro. El extremo inferior del tubo ajustable deberá tener forma de U, mientras que el superior debe ser una tobera, de forma que pueda pasarse la fase superior de líquido de la probeta a un embudo de decantación.

5. Procedimiento

Nota: La vitamina E es sensible a la luz (UV) y a la oxidación. Todas las operaciones deberán realizarse en ausencia de luz (utilizando material de vidrio ámbar o protegido con papel de aluminio) y de oxígeno (chorro de nitrógeno). Durante la extracción, el aire que se encuentre por encima del líquido deberá sustituirse por nitrógeno (evitar un exceso de presión aflojando el tapón de vez en cuando).

5.1. Preparación de la muestra.

Triturar la muestra de modo que pase por un tamiz con una luz de malla de 1 mm, cuidando de que no se produzca calor. La trituración debe hacerse **inmediatamente** antes de la pesada y la saponificación, pues, de lo contrario, puede haber pérdidas de vitamina E.

5.2. Saponificación.

En función del contenido de vitamina E, pesar, con una precisión de 0,01 g, entre 2 g y 25 g de la muestra en un matraz Erlenmeyer o de fondo plano de 500 ml (4.2.1). Añadir sucesivamente, agitando en círculos, 130 ml de etanol (3.1), unos 100 mg de BHT (3.12), 2 ml de solución de ascorbato de sodio (3.5) y 2 ml de solución de sulfuro de sodio (3.6). Ajustar el refrigerante (4.3) al matraz y sumergir este en un baño maría con agitador magnético (4.7). Calentar hasta ebullición y dejar refluir durante cinco minutos. Añadir entonces 25 ml de solución de hidróxido de potasio (3.4) a través del refrigerante (4.3) y dejar refluir durante otros 25 minutos, removiendo bajo una corriente lenta de nitrógeno. Enjuagar después el refrigerante con unos 20 ml de agua y enfriar el contenido del matraz hasta la temperatura ambiente.

5.3. Extracción.

Pasar cuantitativamente por decantación la solución de saponificación, enjuagando con un volumen total de 250 ml de agua, a un embudo de decantación de 1 000 ml (4.2.3) o al aparato de extracción (4.8). Enjuagar el matraz de saponificación sucesivamente con 25 ml de etanol (3.1) y 100 ml de éter de petróleo (3.2) y transvasar los líquidos de enjuague al embudo de decantación o al aparato de extracción. La proporción de agua y etanol en las soluciones combinadas debe ser aproximadamente de 2/1. Agitar enérgicamente durante dos minutos y dejar reposar durante otros dos minutos.

5.3.1. Extracción con embudo de decantación (4.2.3).

Cuando se hayan separado las fases (véase la observación del punto 7.3), transvasar la fase de éter de petróleo a otro embudo de decantación (4.2.3). Repetir esta extracción dos veces con 100 ml de éter de petróleo (3.2) y dos veces con 50 ml de éter de petróleo (3.2).

Lavar dos veces los extractos combinados en el embudo de decantación, agitando en círculos suavemente (para evitar la formación de emulsiones), con sendas porciones de 100 ml de agua y después, agitando repetidas veces, con más porciones de 100 ml de agua hasta que el agua no se colorea al añadir solución de fenoltaleína (3.7) (normalmente es suficiente con lavar cuatro veces). Pasar el extracto lavado a un matraz aforado de 500 ml (4.2.2) a través de un filtro de pliegues seco para separación de fases (4.4), a fin de eliminar el agua que pudiera quedar en suspensión. Enjuagar el embudo de decantación y el filtro con 50 ml de éter de petróleo (3.2), enrasar con éter de petróleo (3.2) y mezclar bien.

5.3.2. *Extracción con aparato de extracción (4.8)*

Cuando se hayan separado las fases (véase la observación del punto 7.3), sustituir el tapón de la probeta (4.8.1) por la pieza esmerilada (4.8.2) y colocar el extremo inferior con forma de U del tubo ajustable de manera que quede justo por encima del nivel de la interfase. Aplicando a la oliva la presión de un conducto de nitrógeno, transvasar la fase superior de éter de petróleo a un embudo de decantación de 1 000 ml (4.2.3). Añadir 100 ml de éter de petróleo (3.2) a la probeta, tapar y agitar bien. Dejar que se separen las fases y transvasar la fase superior al embudo de decantación, como antes. Repetir el procedimiento de extracción con otros 100 ml de éter de petróleo (3.2) y otras dos veces con sendas porciones de 50 ml de éter de petróleo (3.2), añadiendo a continuación las fases de éter de petróleo al embudo de decantación.

Lavar los extractos combinados de éter de petróleo como se describe en el punto 5.3.1 y seguir el procedimiento allí descrito.

5.4. *Preparación de la solución de muestra para la CLAR*

Pipetear una parte alícuota de la solución de éter de petróleo (de 5.3.1 o 5.3.2) a un matraz piriforme de 250 ml (4.2.4). Evaporar el disolvente casi hasta sequedad en el evaporador rotativo (4.1) a presión reducida y a una temperatura del baño no superior a 40 °C. Restaurar la presión atmosférica introduciendo nitrógeno (3.9) y sacar el matraz del evaporador rotativo. Eliminar el disolvente restante con una corriente de nitrógeno (3.9) y disolver inmediatamente el residuo en un volumen conocido (10-100 ml) de metanol (3.3) (la concentración de DL- α -tocoferol debe quedar en un intervalo de 5 μ g/ml a 30 μ g/ml).

5.5. *Determinación mediante CLAR*

La vitamina E se separa en una columna de fase reversa de C_{18} (4.5.1) y su concentración se mide mediante un detector de fluorescencia (excitación: 295 nm, emisión: 330 nm) o un detector de UV (292 nm) (4.5.2).

Inyectar una parte alícuota (por ejemplo, 20 μ l) de la solución metanólica obtenida según el punto 5.4 y eluir con la fase móvil (3.8). Calcular las alturas (áreas) medias de pico de varias inyecciones de la misma solución de muestra, así como las alturas (áreas) medias de pico de varias inyecciones de las soluciones de calibración (5.6.2).

Condiciones de la CLAR

Las siguientes condiciones se ofrecen con carácter orientativo; pueden aplicarse otras si arrojan resultados equivalentes.

Columna cromatográfica 250 mm x 4 mm, C_{18} , relleno de 5 μ m o 10 μ m, o equivalente de líquidos (4.5.1):

Fase móvil (3.8):	Mezcla de metanol (3.3) y agua, por ejemplo 980 + 20 (v+v)
Caudal:	1-2 ml/min.
Detector (4.5.2):	Detector de fluorescencia (excitación: 295 nm/emisión: 330 nm) o detector de UV (292 nm)

5.6. *Calibración (acetato de DL- α -tocoferol o DL- α -tocoferol)*

5.6.1. *Patrón de acetato de DL- α -tocoferol*

5.6.1.1. *Preparación de la solución patrón de trabajo*

Pipetear a un matraz Erlenmeyer o de fondo plano de 500 ml (4.2.1) 25 ml de la solución madre de acetato de DL- α -tocoferol (3.10.1) e hidrolizar según se describe en el punto 5.2. Extraer después con éter de petróleo (3.2) según el punto 5.3 y enrasar a 500 ml con éter de petróleo. Evaporar 25 ml de este extracto casi hasta sequedad en el evaporador rotativo (véase el punto 5.4), eliminar el disolvente restante con una corriente de nitrógeno (3.9) y volver a disolver el residuo en 25,0 ml de metanol (3.3). La concentración nominal de esta solución es de 45,5 μ g de DL- α -tocoferol por mililitro, equivalente a 50 μ g de acetato de DL- α -tocoferol por mililitro. La solución patrón de trabajo debe prepararse poco antes de utilizarse.

5.6.1.2. Preparación de las soluciones de calibración y de la curva de calibración

Transvasar 1,0, 2,0, 4,0 y 10,0 ml de la solución patrón de trabajo a una serie de matraces aforados de 20 ml, enrasar con metanol (3.3) y mezclar. Las concentraciones nominales de estas soluciones son de 2,5, 5,0, 10,0 y 25,0 µg/ml de acetato de DL-α-tocoferol, es decir, 2,28, 4,55, 9,10 y 22,8 µg/ml de DL-α-tocoferol.

Inyectar varias veces 20 µl de cada solución de calibración y determinar las alturas (áreas) medias de pico. Utilizar las alturas (áreas) medias de pico para trazar una curva de calibración.

5.6.1.3. Normalización UV de la solución madre de acetato de DL-α-tocoferol (3.10.1)

Diluir 5,0 ml de solución madre de acetato de DL-α-tocoferol (3.10.1) con etanol hasta un volumen de 25 ml y medir en el espectrofotómetro (4.6) a 250-320 nm el espectro de UV de esta solución frente al etanol (3.1).

El máximo de absorción a 284 nm deberá ser de:

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 43,6 \text{ a } 284 \text{ nm en etanol}$$

Con esta dilución debe obtenerse un valor de extinción de 0,84 a 0,88.

5.6.2. Patrón de DL-α-tocoferol.

5.6.2.1. Preparación de la solución patrón de trabajo.

Pipetear 2 ml de la solución madre de DL-α-tocoferol (3.11.1) a un matraz aforado de 50 ml, disolver en metanol (3.3) y enrasar con metanol. La concentración nominal de esta solución es de 40 µg de DL-α-tocoferol por mililitro, equivalente a 44,0 µg de acetato de DL-α-tocoferol por mililitro. La solución patrón de trabajo debe prepararse poco antes de utilizarse.

5.6.2.2. Preparación de las soluciones de calibración y de la curva de calibración.

Transvasar 1,0, 2,0, 4,0 y 10,0 ml de la solución patrón de trabajo a una serie de matraces aforados de 20 ml, enrasar con metanol (3.3) y mezclar. Las concentraciones nominales de estas soluciones son de 2,0, 4,0, 8,0 y 20,0 µg/ml de DL-α-tocoferol, es decir, 2,20, 4,40, 8,79 y 22,0 µg/ml de acetato de DL-α-tocoferol.

Inyectar varias veces 20 µl de cada solución de calibración y determinar las alturas (áreas) medias de pico. Utilizar las alturas (áreas) medias de pico para trazar una curva de calibración.

5.6.2.3. Normalización UV de la solución madre de DL-α-tocoferol (3.11.1).

Diluir 2,0 ml de solución madre de DL-α-tocoferol (3.11.1) con etanol hasta un volumen de 25 ml y medir en el espectrofotómetro (4.6) a 250-320 nm el espectro de UV de esta solución frente al etanol (3.1). El máximo de absorción a 292 nm deberá ser de:

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 75,8 \text{ a } 292 \text{ nm en etanol}$$

Con esta dilución debe obtenerse un valor de extinción de 0,6.

6. Cálculo de los resultados

A partir de la altura (área) media de los picos de vitamina E de la solución de muestra, determinar la concentración de esta última en microgramos por mililitro (calculada en acetato de α-tocoferol) tomando como referencia la curva de calibración (5.6.1.2 o 5.6.2.2).

El contenido p de vitamina E de la muestra, en miligramos por kilogramo, viene dado por la siguiente fórmula:

$$w = \frac{500 \times c \times V_2}{V_1 \times m} \text{ [mg/kg]}$$

en la cual:

c = concentración de vitamina E (en acetato de α-tocoferol) de la solución de muestra (5.4), en microgramos por mililitro;

V₁ = volumen de la solución de muestra (5.4), en mililitros;

V₂ = volumen de la parte alícuota tomada en el punto 5.4, en mililitros;

m = peso de la porción de ensayo, en gramos.

7. Observaciones

- 7.1. En caso de muestras con baja concentración de vitamina E puede ser útil combinar los extractos de éter de petróleo de dos cargas de saponificación (cantidad pesada: 25 g) en una única solución de muestra para la determinación por CLAR.
- 7.2. La muestra tomada para el análisis no contendrá en peso más de 2 g de grasa.
- 7.3. Si no se produce la separación de las fases, añadir unos 10 ml de etanol (3.1) para romper la emulsión.
- 7.4. Tras la medición espectrofotométrica de la solución de acetato de DL- α -tocoferol o de la solución de DL- α -tocoferol conforme al punto 5.6.1.3 o 5.6.2.3, respectivamente, añadir unos 10 mg de BHT (3.12) a la solución (3.10.1 o 3.10.2) y guardarla en el frigorífico (período máximo de conservación: cuatro semanas).
- 7.5. Puede utilizarse hidroquinona en lugar de BHT.
- 7.6. Con una columna de fase normal se pueden separar el α -tocoferol, el β -tocoferol, el γ -tocoferol y el δ -tocoferol.
- 7.7. En lugar de la solución de ascorbato de sodio pueden utilizarse unos 150 mg de ácido ascórbico.
- 7.8. En lugar de la solución de sulfuro de sodio pueden utilizarse unos 50 mg de EDTA.
- 7.9. El acetato de vitamina E se hidroliza muy deprisa en condiciones alcalinas y, por tanto, es muy sensible a la oxidación, especialmente en presencia de oligoelementos como el hierro o el cobre. La vitamina E puede degradarse si se determina en premezclas a niveles superiores a 5 000 mg/kg. Por consiguiente, se recomienda confirmar los resultados mediante una CLAR que incluya la digestión enzimática de la formulación de vitamina E, sin la fase de saponificación alcalina.

8. Repetibilidad

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas con la misma muestra no debe rebasar el 15 % del resultado superior.

9. Resultados de un estudio colaborativo ⁽¹⁾

	Premezcla	Pienso de pre-mezcla	Concentrado de minerales	Pienso proteínico	Lechón
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
media [mg/kg]	17 380	1 187	926	315	61,3
S _r [mg/kg]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r [mg/kg]	1 075	126,8	70,6	36,4	6,4
CV _r [%]	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8
S _R mg/kg]	830	65,0	55,5	18,9	7,8
R [mg/kg]	2 324	182,0	155,4	52,9	21,8
CV _R [%]	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7

L = número de laboratorios

n = número de valores individuales

S = desviación típica de la repetibilidad

S_R = desviación típica de la reproducibilidad

r = repetibilidad

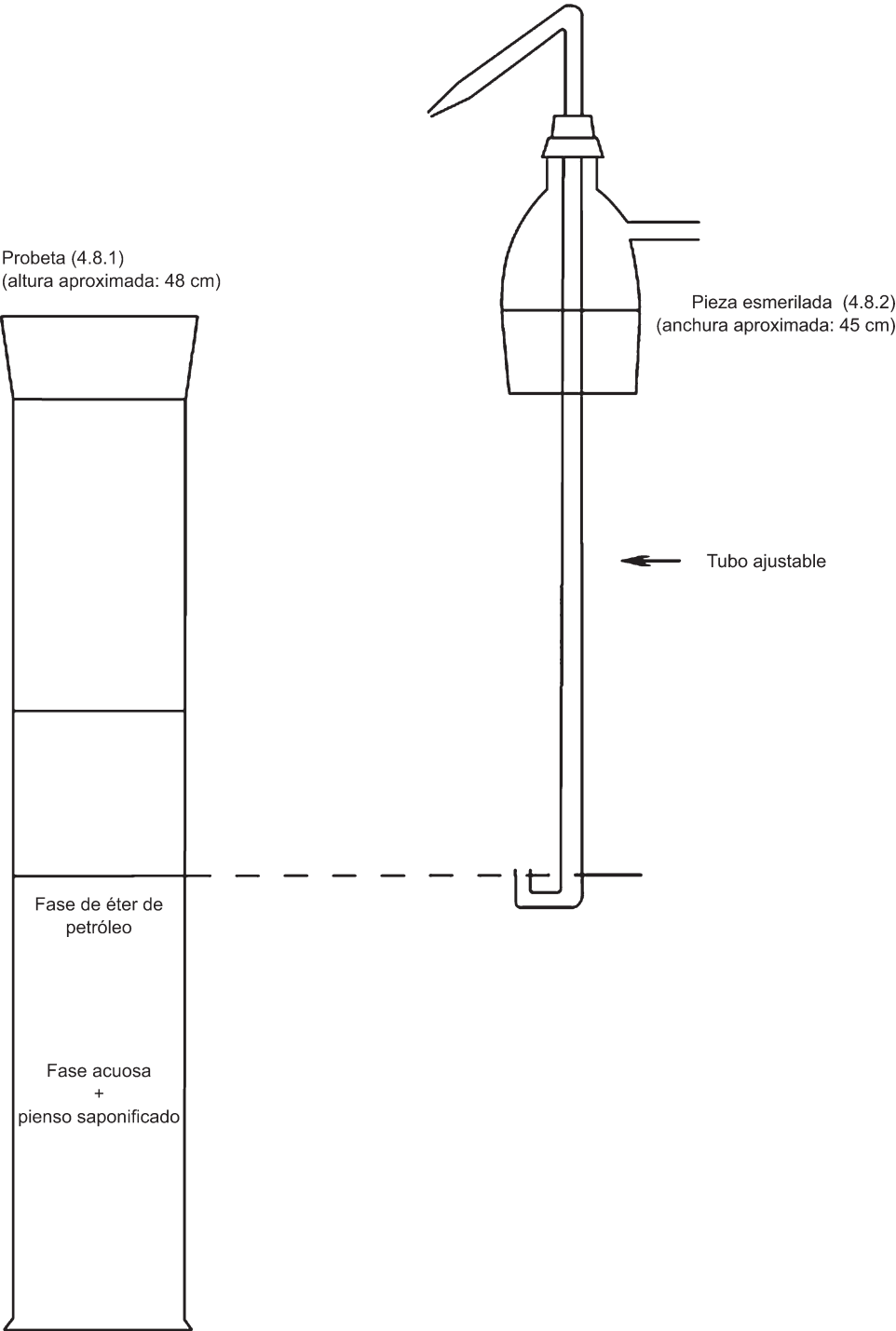
R = reproducibilidad

CV_r = coeficiente de variación de la repetibilidad

CV_R = coeficiente de variación de la reproducibilidad.

⁽¹⁾ Realizado por el Grupo de Trabajo sobre Piensos de la Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

Figura 1: Aparato de extracción (4.8)



C. DETERMINACIÓN DE LOS OLIGOELEMENTOS HIERRO, COBRE, MANGANESO Y CINCO

1. **Objeto y ámbito de aplicación**

Este método permite determinar los oligoelementos hierro, cobre, manganeso y cinc en los piensos. Los límites de cuantificación son:

- hierro (Fe): 20 mg/kg,
- cobre (Cu): 10 mg/kg,
- manganeso (Mn): 20 mg/kg,
- cinc (Zn): 20 mg/kg.

2. **Principio**

Tras destruir las posibles materias orgánicas, la muestra se disuelve en ácido clorhídrico. Los oligoelementos hierro, cobre, manganeso y cinc se determinan, tras la dilución apropiada, por espectrometría de absorción atómica.

3. **Reactivos***Observaciones preliminares*

Para preparar los reactivos y las soluciones analíticas, utilizar agua exenta de los cationes por determinar, obtenida bien por destilación doble en un frasco de vidrio borosilicato o un alambique de cuarzo, bien por tratamiento doble en resina de intercambio iónico.

Los reactivos deben ser al menos de calidad analítica. La ausencia del elemento por determinar debe comprobarse en un ensayo en blanco. Si es necesario, los reactivos deben someterse a una purificación más profunda.

Las soluciones patrón descritas a continuación pueden sustituirse por soluciones patrón comerciales, siempre que estén garantizadas y se hayan comprobado antes de ser utilizadas.

- 3.1. Ácido clorhídrico (d: 1,19 g/ml).
- 3.2. Ácido clorhídrico (6 mol/l).
- 3.3. Ácido clorhídrico (0,5 mol/l).
- 3.4. Ácido fluorhídrico al 38-40 % (v/v), con un contenido de hierro (Fe) inferior a 1 mg/l y un residuo de evaporación inferior a 10 mg (en sulfatos)/l.
- 3.5. Ácido sulfúrico (d: 1,84 g/ml).
- 3.6. Peróxido de hidrógeno (aproximadamente 100 volúmenes de oxígeno [30 % en peso]).
- 3.7. Solución patrón de hierro (1 000 µg Fe/ml), preparada como sigue, o solución comercial equivalente: disolver 1 g de alambre de hierro en 200 ml de ácido clorhídrico de 6 mol/l (3.2), añadir 16 ml de peróxido de hidrógeno (3.6) y enrasar a 1 l con agua.
 - 3.7.1. Solución patrón de hierro de trabajo (100 µg Fe/ml), preparada diluyendo una parte de solución patrón (3.7) con nueve partes de agua.
- 3.8. Solución patrón de cobre (1 000 µg Cu/ml), preparada como sigue, o solución comercial equivalente:
 - disolver 1 g de cobre en polvo en 25 ml de ácido clorhídrico de 6 mol/l (3.2), añadir 5 ml de peróxido de hidrógeno (3.6) y enrasar a 1 l con agua.

- 3.8.1. Solución patrón de cobre de trabajo (10 µg Cu/ml), preparada diluyendo una parte de solución patrón (3.8) con nueve partes de agua, y diluyendo a continuación una parte de la solución resultante con nueve partes de agua.
- 3.9. Solución patrón de manganeso (1 000 µg Mn/ml), preparada como sigue, o solución comercial equivalente:
- disolver 1 g de manganeso en polvo en 25 ml de ácido clorhídrico de 6 mol/l (3.2) y enrasar a 1 l con agua.
- 3.9.1. Solución patrón de manganeso de trabajo (10 µg Mn/ml), preparada diluyendo una parte de solución patrón (3.9) con nueve partes de agua, y diluyendo a continuación una parte de la solución resultante con nueve partes de agua.
- 3.10. Solución patrón de cinc (1 000 µg Zn/ml), preparada como sigue, o solución comercial equivalente:
- disolver 1 g de cinc en tira o en hoja en 25 ml de ácido clorhídrico de 6 mol/l (3.2) y enrasar a 1 l con agua.
- 3.10.1. Solución patrón de cinc de trabajo (10 µg Zn/ml), preparada diluyendo una parte de solución patrón (3.10) con nueve partes de agua, y diluyendo a continuación una parte de la solución resultante con nueve partes de agua.
- 3.11. Solución de cloruro de lantano: disolver 12 g de óxido de lantano en 150 ml de agua, añadir 100 ml de ácido clorhídrico de 6 mol/l (3.2) y enrasar a 1 l con agua.

4. Instrumental

- 4.1. Horno de mufla de temperatura regulable y, preferiblemente, con registrador.
- 4.2. El material de vidrio debe ser de borosilicato resistente, y se recomienda utilizar un instrumental que esté reservado exclusivamente a la determinación de oligoelementos.
- 4.3. Espectrofotómetro de absorción atómica que responda a las exigencias del método en cuanto a sensibilidad y precisión en el intervalo requerido.

5. Procedimiento ⁽¹⁾

5.1. *Muestras que contienen materia orgánica*

5.1.1. Incineración y preparación de la solución para análisis ⁽²⁾

- 5.1.1.1. Introducir de 5 g a 10 g de la muestra, pesados con una precisión de 0,2 mg, en un crisol de cuarzo o de platino [véase la nota b)], secar en una estufa a 105 °C e introducir el crisol en el horno de mufla (4.1) frío. Cerrar el horno [véase la nota c)] y elevar progresivamente la temperatura hasta alcanzar de 450 °C a 475 °C en 90 minutos aproximadamente. Mantener dicha temperatura durante cuatro a 16 horas (por ejemplo, durante la noche) para eliminar el material carbonoso, abrir a continuación el horno y dejar enfriar [véase la nota d)].

Humedecer las cenizas con agua e introducir las en un vaso de precipitado de 250 ml. Lavar el crisol con no más de 5 ml de ácido clorhídrico (3.1) y añadir este último lentamente y con precaución al vaso de precipitado (puede producirse una fuerte reacción debido a la formación de CO₂). Añadir gota a gota, agitando, ácido clorhídrico (3.1) hasta que cese la efervescencia. Evaporar hasta sequedad, removiendo de vez en cuando con una varilla de vidrio.

⁽¹⁾ Pueden emplearse otros métodos de digestión, siempre que se haya demostrado que ofrecen resultados similares (por ejemplo, digestión a presión por microondas).

⁽²⁾ El forraje verde (fresco o desecado) puede contener grandes cantidades de sílice vegetal, que puede retener oligoelementos y debe eliminarse. Por tanto, con las muestras de estos piensos debe aplicarse el procedimiento modificado que sigue. Efectuar la operación del punto 5.1.1.1, hasta la filtración. Lavar el papel de filtro que contiene el residuo insoluble dos veces con agua hirviendo e introducirlo en un crisol de cuarzo o platino. Calcinar en el horno de mufla (4.1) a una temperatura por debajo de 550 °C hasta que haya desaparecido por completo todo el material carbonoso. Dejar enfriar, añadir unas pocas gotas de agua y, a continuación, de 10 ml a 15 ml de ácido fluorhídrico (3.4), evaporando después hasta sequedad a unos 150 °C. Si el residuo sigue conteniendo sílice, volver a disolverlo en unos pocos mililitros de ácido fluorhídrico (3.4) y evaporar hasta sequedad. Añadir cinco gotas de ácido sulfúrico (3.5) y calentar hasta que dejen de desprenderse vapores. Tras añadir 5 ml de ácido clorhídrico de 6 mol/l (3.2) y unos 30 ml de agua, calentar, filtrar la solución en el matraz aforado de 250 ml y enrasar con agua (concentración de HCl: 0,5 mol/l aproximadamente). Proseguir entonces con la determinación a partir del punto 5.1.2.

A continuación, añadir al residuo 15 ml de ácido clorhídrico de 6 mol/l (3.2), y luego unos 120 ml de agua. Remover con la varilla de vidrio, que deberá dejarse en el vaso de precipitado, y cubrir este con un vidrio de reloj. Llevar suavemente a ebullición y mantener en el punto de ebullición hasta que aparentemente ya no se disuelvan las cenizas. Filtrar en un papel de filtro exento de cenizas y recoger el filtrado en un matraz aforado de 250 ml. Lavar el vaso de precipitado y el filtro con 5 ml de ácido clorhídrico de 6 mol/l (3.2) caliente y dos veces con agua hirviendo. Enrasar el matraz aforado con agua (concentración de HCl: 0,5 mol/l aproximadamente).

- 5.1.1.2. Si el residuo que queda en el filtro es negro (carbón), volver a introducirlo en el horno y a incinerarlo a una temperatura de 450 °C a 475 °C. Esta incineración, que solo requiere unas horas (de tres a cinco horas, aproximadamente), se termina cuando la ceniza tiene un aspecto blanco o casi blanco. Disolver el residuo con unos 2 ml de ácido clorhídrico (3.1), evaporar hasta sequedad y añadir 5 ml de ácido clorhídrico de 6 mol/l (3.2). Calentar, filtrar la solución en el matraz aforado y enrasar con agua (concentración de HCl: 0,5 mol/l, aproximadamente).

Notas:

- a) Al determinar los oligoelementos, es importante estar alerta ante los riesgos de contaminación, en particular por el cinc, el cobre y el hierro. Por consiguiente, el equipo utilizado para preparar las muestras no debe contener estos metales.

Para reducir el riesgo general de contaminación, trabajar en atmósfera sin polvo con un equipo escrupulosamente limpio y material de vidrio cuidadosamente lavado. La determinación del cinc es especialmente sensible a muchos tipos de contaminación, por ejemplo la producida por el material de vidrio, los reactivos, el polvo, etc.

- b) El peso de la muestra que va a incinerarse se calcula partiendo del contenido aproximado de oligoelementos del pienso en relación con la sensibilidad del espectrofotómetro utilizado. Para determinados piensos pobres en oligoelementos, quizá sea necesario comenzar con una muestra de 10 g a 20 g y enrasar la solución final tan solo a 100 ml.
- c) La incineración debe efectuarse en un horno cerrado sin inyección de aire ni de oxígeno.
- d) La temperatura indicada por el pirómetro no debe sobrepasar los 475 °C.

5.1.2. Determinación espectrofotométrica

5.1.2.1. Preparación de las soluciones de calibración.

Preparar, para cada elemento por determinar, una gama de soluciones de calibración a partir de las soluciones patrón de trabajo de los puntos 3.7.1, 3.8.1, 3.9.1 y 3.10.1, de forma que cada solución de calibración tenga una concentración de HCl de 0,5 mol/l aproximadamente y (en el caso del hierro, del manganeso y del cinc) una concentración de cloruro de lantano equivalente a 0,1 % La (p/v).

Las concentraciones escogidas de oligoelementos deben encontrarse en el intervalo de sensibilidad del espectrofotómetro utilizado. Los cuadros siguientes muestran, a título de ejemplo, las composiciones de gamas típicas de soluciones de calibración; sin embargo, en función del tipo y la sensibilidad del espectrofotómetro utilizado, puede ser necesario escoger otras concentraciones.

Hierro

µg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
ml de solución patrón de trabajo (3.7.1) (1 ml = 100 µg Fe)	0	0,5	1	2	3	4	5
ml HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7

añadir 10 ml de solución de cloruro de lantano (3.11) y enrasar a 100 ml con agua

Cobre

µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml de solución patrón de trabajo (3.8.1) (1 ml = 10 µg Cu)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (3.2)	8	8	8	8	8	8	8

Manganeso

µg Mn/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml de solución patrón de trabajo (3.9.1) (1 ml = 10 µg Mn)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7

añadir 10 ml de solución de cloruro de lantano (3.11) y enrasar a 100 ml con agua

Cinc

µg Zn/ml	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
ml de solución patrón de trabajo (3.10.1) (1 ml = 10 µg Zn)	0	0,5	1	2	4	6	8
ml HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7

añadir 10 ml de solución de cloruro de lantano (3.11) y enrasar a 100 ml con agua

5.1.2.2. Preparación de la solución para el análisis.

Para la determinación del cobre, la solución preparada según el punto 5.1.1 puede, en general, utilizarse directamente. Si es necesario ajustar su concentración a la gama de las soluciones de calibración, puede pipetarse una parte alícuota a un matraz aforado de 100 ml, enrasando a continuación con ácido clorhídrico de 0,5 mol/l (3.3).

Para la determinación del hierro, del manganeso y del cinc, pipetear una parte alícuota de la solución preparada según el punto 5.1.1 a un matraz aforado de 100 ml, añadir 10 ml de solución de cloruro de lantano (3.11) y enrasar con ácido clorhídrico de 0,5 mol/l (3.3) (véase también la observación del punto 8).

5.1.2.3. Experimento en blanco.

El experimento en blanco debe incluir todas las etapas prescritas del procedimiento, pero omitiendo el material de muestra. La solución de calibración «0» no debe utilizarse como blanco.

5.1.2.4. Medición de la absorción atómica.

Medir la absorción atómica de las soluciones de calibración y de la solución objeto de análisis utilizando una llama oxidante aire-acetileno con las siguientes longitudes de onda:

Fe: 248,3 nm

Cu: 324,8 nm

Mn: 279,5 nm

Zn: 213,8 nm

Realizar cuatro veces cada medición.

5.2. Piensos minerales

Si la muestra no contiene materia orgánica, no es necesaria la incineración previa. Proceder como se describe en el punto 5.1.1.1, comenzando a partir del párrafo segundo. Puede omitirse la evaporación con ácido fluorhídrico.

6. Cálculo de los resultados

Por medio de una curva de calibración, calcular la concentración de oligoelementos de la solución objeto de análisis y expresar el resultado en miligramos de oligoelemento por kilogramo de muestra (ppm).

7. Repetibilidad

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas con la misma muestra por el mismo analista no deberá superar:

- 5 mg/kg en valor absoluto, en el caso de que el contenido del oligoelemento en cuestión no supere los 50 mg/kg,
- el 10 % del resultado superior, en el caso de que el contenido del oligoelemento en cuestión sea de 50-100 mg/kg,
- 10 mg/kg en valor absoluto, en el caso de que el contenido del oligoelemento en cuestión sea de 100-200 mg/kg,
- el 5 % del resultado superior, en el caso de que el contenido del oligoelemento en cuestión supere los 200 mg/kg.

8. Observación

La presencia de grandes cantidades de fosfatos puede interferir en la determinación del hierro, del manganeso y del cinc. Tal interferencia debe corregirse añadiendo solución de cloruro de lantano (3.11). Si, de todas formas, la relación de peso Ca + Mg/P de la muestra es > 2, no es necesario añadir solución de cloruro de lantano (3.11) a la solución objeto de análisis ni a las soluciones de calibración.

D. DETERMINACIÓN DE LA HALOFUGINONA

Bromhidrato de DL-trans-7-bromo-6-cloro-3-[3-(3-hidroxi-2-piperidil)acetoni]l-quinazolin-4-(3H)-ona

1. Objeto y ámbito de aplicación

Este método permite determinar el nivel de halofuginona en los piensos. El límite de cuantificación es de 1 mg/kg.

2. Principio

Tras tratamiento con agua caliente, la halofuginona se extrae como base libre en acetato de etilo y posteriormente se somete a separación como clorhidrato en una solución ácida acuosa. El extracto se purifica mediante cromatografía de intercambio iónico. El contenido de halofuginona se determina mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) de fase reversa, empleando un detector de UV.

3. Reactivos

- 3.1. Acetonitrilo, equivalente al de calidad CLAR.
- 3.2. Resina Amberlite XAD-2.
- 3.3. Acetato de amonio.
- 3.4. Acetato de etilo.
- 3.5. Ácido acético glacial.
- 3.6. Halofuginona patrón (hidrobromuro de DL-trans-7-bromo-6-cloro-3-[3-(3-hidroxi-2-piperidil)acetoni]l-quinazolin-4-(3H)-ona, E 764).
 - 3.6.1. Solución patrón madre de halofuginona de 100 µg/ml.

Pesar, con una precisión de 0,1 mg, 50 mg de halofuginona (3.6) en un matraz aforado de 500 ml, disolver en solución reguladora de acetato de amonio (3.18), enrasar con la solución reguladora y mezclar. Esta solución se mantiene estable durante tres semanas a 5 °C, si se guarda al abrigo de la luz.
 - 3.6.2. Soluciones de calibración.

Transvasar 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 y 6,0 ml de la solución patrón madre (3.6.1) a una serie de matraces aforados de 100 ml. Enrasar con fase móvil (3.21) y mezclar. Estas soluciones tienen concentraciones de halofuginona de 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 y 6,0 µg/ml, respectivamente. Deben prepararse poco antes de utilizarse.

- 3.7. Ácido clorhídrico ($\rho_{20} = 1,16$ g/ml aproximadamente).
- 3.8. Metanol.
- 3.9. Nitrato de plata.
- 3.10. Ascorbato de sodio.
- 3.11. Carbonato de sodio.
- 3.12. Cloruro de sodio.
- 3.13. EDTA (ácido etilendiaminotetracético, sal disódica).
- 3.14. Agua, equivalente a la de calidad CLAR.
- 3.15. Solución de carbonato de sodio, $c = 10$ g/100 ml.
- 3.16. Solución de carbonato de sodio saturada de cloruro de sodio, $c = 5$ g/100 ml.
- Disolver 50 g de carbonato de sodio (3.11) en agua, diluir hasta 1 l y añadir cloruro de sodio (3.12) hasta que la solución esté saturada.
- 3.17. Ácido clorhídrico de aproximadamente 0,1 mol/l.
- Diluir 10 ml de HCl (3.7) con agua, hasta 1 l.
- 3.18. Solución reguladora de acetato de amonio de aproximadamente 0,25 mol/l.
- Disolver 19,3 g de acetato de amonio (3.3) y 30 ml de ácido acético (3.5) en agua (3.14) y diluir hasta 1 l.
- 3.19. Preparado de resina Amberlite XAD-2.
- Lavar una cantidad adecuada de resina Amberlite (3.2) con agua hasta que se hayan eliminado todos los iones de cloruro, lo cual se comprobará mediante una prueba con nitrato de plata (3.20) en la fase acuosa desechada. A continuación, lavar la resina con 50 ml de metanol (3.8), desechar el metanol y guardar la resina bajo metanol nuevo.
- 3.20. Solución de nitrato de plata de aproximadamente 0,1 mol/l.
- Disolver 0,17 g de nitrato de plata (3.9) en 10 ml de agua.
- 3.21. Fase móvil para la CLAR.
- Mezclar 500 ml de acetonitrilo (3.1) con 300 ml de solución reguladora de acetato de amonio (3.18) y 1 200 ml de agua (3.14). Ajustar el pH a 4,3 empleando ácido acético (3.5). Filtrar por un filtro de $0,22\ \mu\text{m}$ (4.8) y desgasificar la solución (por ejemplo, aplicando ultrasonidos durante diez minutos). Esta solución, almacenada al abrigo de la luz y en un recipiente cerrado, es estable durante un mes.
4. **Instrumental**
- 4.1. Baño ultrasónico.
- 4.2. Evaporador rotativo de película.
- 4.3. Centrífuga.
- 4.4. Equipo para CLAR con detector ultravioleta de longitud de onda variable o detector de red de diodos.
- 4.4.1. Columna cromatográfica de líquidos, de 300 mm x 4 mm, C_{18} , relleno de $10\ \mu\text{m}$, o equivalente.
- 4.5. Columna de vidrio (300 mm x 10 mm) provista de filtro de vidrio sinterizado y llave de cierre.
- 4.6. Filtros de fibra de vidrio de un diámetro de 150 mm.

4.7. Filtros de membrana de 0,45 µm.

4.8. Filtros de membrana de 0,22 µm.

5. Procedimiento

Nota: La halofuginona como base libre es inestable en soluciones alcalinas y de acetato de etilo. No deberá permanecer en acetato de etilo durante más de 30 minutos.

5.1. Generalidades

5.1.1. Deberá analizarse un pienso en blanco para comprobar la ausencia de halofuginona y de sustancias interferentes.

5.1.2. Asimismo, deberá realizarse un ensayo de recuperación analizando el pienso en blanco, que se habrá enriquecido añadiendo una cantidad de halofuginona similar a la presente en la muestra. Para enriquecer a un nivel de 3 mg/kg, añadir 300 µl de la solución patrón madre (3.6.1) a 10 g del pienso en blanco, mezclar y esperar diez minutos antes de proceder a la extracción (5.2).

Nota: A los efectos de este método, el pienso en blanco deberá ser de tipo similar al de la muestra y en su análisis no deberá detectarse halofuginona.

5.2. Extracción

Pesar, con una precisión de 0,1 g, 10 g de la muestra preparada en un tubo de centrifuga de 200 ml, añadir 0,5 g de ascorbato de sodio (3.10), 0,5 g de EDTA (3.13) y 20 ml de agua, y mezclar. Poner el tubo en un baño maría a (80 °C) durante cinco minutos. Tras enfriar a temperatura ambiente, añadir 20 ml de solución de carbonato de sodio (3.15) y mezclar. Añadir inmediatamente 100 ml de acetato de etilo (3.4) y agitar enérgicamente a mano durante 15 segundos. Colocar después el tubo en el baño ultrasónico (4.1) durante tres minutos y aflojar el tapón. Centrifugar durante dos minutos y decantar la fase de acetato de etilo en un embudo de decantación de 500 ml a través de un filtro de fibra de vidrio (4.6). Repetir la extracción de la muestra con una segunda porción de 100 ml de acetato de etilo. Lavar los extractos combinados durante un minuto con 50 ml de solución de carbonato de sodio saturada de cloruro de sodio (3.16) y desechar la fase acuosa.

Extraer la fase orgánica durante un minuto con 50 ml de ácido clorhídrico (3.17). Pasar la fase ácida inferior a un embudo de decantación de 250 ml. Extraer de nuevo la fase orgánica durante minuto y medio con otros 50 ml de ácido clorhídrico y combinar con el primer extracto. Lavar los extractos ácidos combinados agitando en círculos durante aproximadamente diez segundos con 10 ml de acetato de etilo (3.4).

Transvasar cuantitativamente la fase acuosa a un matraz de fondo redondo de 250 ml y desechar la fase orgánica. Evaporar todo el acetato de etilo que quede en la solución ácida empleando un evaporador rotativo de película (4.2). La temperatura del baño maría no debe superar los 40 °C. A un vacío de aproximadamente 25 mbar, todo el acetato de etilo residual se eliminará en cinco minutos a 38 °C.

5.3. Limpieza (cleanup)

5.3.1. Preparación de la columna de Amberlite

Preparar una columna de XAD-2 para cada extracto de muestra. Pasar 10 g de resina Amberlite preparada (3.19) a una columna de vidrio (4.5) con metanol (3.8). Poner un trozo pequeño de lana de vidrio encima del lecho de resina. Dejar salir el metanol de la columna y lavar la resina con 100 ml de agua, cortando el flujo cuando el líquido alcance la parte superior del lecho de resina. Antes de utilizarla, dejar que la columna se equilibre durante diez minutos. No dejar nunca que se seque.

5.3.2. Limpieza de la muestra

Transferir el extracto (5.2) cuantitativamente a la parte superior de la columna de resina Amberlite preparada (5.31) y eluir, desechando el eluido. La velocidad de elución no debe exceder de 20 ml/min. Enjuagar el matraz de fondo redondo con 20 ml de ácido clorhídrico (3.17) y emplear este líquido para lavar la columna de resina. Eliminar todo resto de solución ácida con un chorro de aire. Desechar los líquidos de lavado. Añadir 100 ml de metanol (3.8) a la columna y dejar eluir de 5 ml a 10 ml, recogiendo el eluido en un matraz de fondo redondo de 250 ml. Dejar que el metanol restante se equilibre durante diez minutos con la resina y continuar con la elución a una velocidad que no supere los 20 ml/min., recogiendo el eluido en el mismo matraz de fondo redondo. Evaporar el metanol en el evaporador rotativo de película (4.2) sin que la temperatura del baño maría sobrepase los 40 °C. Transferir cuantitativamente el residuo a un matraz aforado de 10 ml empleando la fase móvil (3.21). Enrasar con fase móvil y mezclar. Filtrar una parte alícuota por un filtro de membrana (4.7). Reservar esta solución para la determinación mediante CLAR (5.4).

5.4. *Determinación mediante CLAR*

5.4.1. *Parámetros.*

Las siguientes condiciones se ofrecen con carácter orientativo; pueden aplicarse otras si arrojan resultados equivalentes.

Columna cromatográfica de líquidos (4.4.1).

Fase móvil para la CLAR (3.21).

Caudal: 1,5-2 ml/min.

Longitud de onda de detección: 243 nm.

Volumen de inyección: 40-100 µl.

Comprobar la estabilidad del sistema cromatográfico inyectando varias veces la solución de calibración (3.6.2) de 3,0 µg/ml, hasta que se alcancen alturas (o áreas) de pico y tiempos de retención constantes.

5.4.2. *Curva de calibración.*

Inyectar varias veces cada solución de calibración (3.6.2) y medir las alturas (áreas) de pico de cada concentración. Trazar una curva de calibración empleando las alturas o áreas de pico medias de las soluciones de calibración como ordenadas y las concentraciones correspondientes, en microgramos por mililitro, como abscisas.

5.4.3. *Solución de muestra.*

Inyectar varias veces el extracto de muestra (5.3.2) empleando el mismo volumen que para las soluciones de calibración, y determinar la altura (área) media de los picos de halofuginona.

6. **Cálculo de los resultados**

Determinar la concentración de la solución de muestra, en microgramos por mililitro, a partir de la altura (área) media de sus picos de halofuginona, tomando como referencia la curva de calibración (5.4.2).

El contenido de halofuginona p (mg/kg) de la muestra viene dado por la siguiente fórmula:

$$w = \frac{c \times 10}{m}$$

en la cual:

c = concentración de halofuginona de la solución de muestra, en microgramos por mililitro;

m = peso de la porción de ensayo, en gramos.

7. **Validación de los resultados**

7.1. *Identidad*

La identidad del analito puede confirmarse mediante cocromatografía, o utilizando un detector de red de diodos con el cual se comparan los espectros del extracto de muestra y de la solución de calibración (3.6.2) de 6,0 µg/ml.

7.1.1. *Cocromatografía.*

Enriquecer un extracto de muestra añadiéndole una cantidad apropiada de solución de calibración (3.6.2). La cantidad de halofuginona añadida debe ser similar a la cantidad estimada de halofuginona hallada en el extracto de muestra.

Solo la altura del pico de halofuginona deberá aumentar en función de la cantidad añadida y de la dilución del extracto. La anchura del pico, a la mitad de su altura máxima, debe ser igual $\pm 10\%$ a la anchura original.

7.1.2. Detección por red de diodos.

Los resultados se evalúan con arreglo a los siguientes criterios:

- la longitud de onda de absorción máxima de los espectros de la muestra y del patrón, registrados en el vértice del pico del cromatograma, debe ser la misma dentro de un margen determinado por el poder de resolución del sistema de detección; en el caso de la detección por red de diodos, el margen típico se sitúa en ± 2 nm;
- entre 225 nm y 300 nm, los espectros de la muestra y del patrón registrados en el vértice del pico del cromatograma no deben ser diferentes por lo que respecta a aquellas partes del espectro que se encuentran en un intervalo del 10 % al 100 % de la absorbancia relativa; se cumple este criterio cuando están presentes los mismos máximos y en ningún punto observado la desviación entre los dos espectros excede del 15 % de la absorbancia del analito patrón;
- entre 225 nm y 300 nm, los espectros de la pendiente ascendente, del vértice y de la pendiente descendente del pico producido por el extracto de muestra no deben diferir entre sí por lo que respecta a las partes del espectro que se encuentran en un intervalo del 10 % al 100 % de la absorbancia relativa; se cumple este criterio cuando están presentes los mismos máximos y en ningún punto observado la desviación entre los espectros excede del 15 % de la absorbancia del espectro del vértice.

Si no se cumple alguno de estos criterios, la presencia del analito no queda confirmada.

7.2. Repetibilidad

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas llevadas a cabo con la misma muestra no debe superar los 0,5 mg/kg, en relación con contenidos de halofuginona de hasta 3 mg/kg.

7.3. Recuperación

La recuperación de la muestra en blanco enriquecida deberá ser al menos del 80 %.

8. Resultados de un estudio colaborativo

Se organizó un estudio colaborativo ⁽¹⁾ en el que ocho laboratorios analizaron tres muestras.

Resultados

	Muestra A (blanco) A la recepción	Muestra B (sémola)		Muestra C (gránulos)	
		A la recepción	Tras dos meses	A la recepción	Tras dos meses
Media [mg/kg]	ND	2,80	2,42	2,89	2,45
S _R [mg/kg]	—	0,45	0,43	0,40	0,42
CV _R [%]	—	16	18	14	17
Rec. [%]		86	74	88	75

ND = no detectada

S_R = desviación típica de la reproducibilidad

CV_R = coeficiente de variación de la reproducibilidad (%)

Rec. = recuperación (%)

E. DETERMINACIÓN DE LA ROBENIDINA

Clorhidrato de 1,3-bis [(4-clorobencilideno)amino]guanidina

1. Objeto y ámbito de aplicación

Este método permite determinar el nivel de robenidina en los piensos. El límite de cuantificación es de 5 mg/kg.

⁽¹⁾ The Analyst 108, 1983, pp. 1252-1256.

2. Principio

La muestra se extrae con metanol acidificado. El extracto se seca y una parte alícuota se limpia en una columna de óxido de aluminio. La robenidina se eluye de la columna con metanol, se concentra y se enrasa a un volumen adecuado con fase móvil. El contenido de robenidina se determina mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) de fase reversa, empleando un detector de UV.

3. Reactivos

3.1. Metanol

3.2. Metanol acidificado

Transvasar 4,0 ml de ácido clorhídrico ($\rho_{20} = 1,18$ g/ml) a un matraz aforado de 500 ml, enrasar con metanol (3.1) y mezclar. Esta solución deberá prepararse poco antes de utilizarse.

3.3. Acetonitrilo, equivalente al de calidad CLAR

3.4. Tamiz molecular

Tipo 3A, perlas de 8-12 mallas (perlas de 1,6 - 2,5 mm, aluminosilicato cristalino, poros de 0,3 mm de diámetro).

3.5. Óxido de aluminio de actividad ácida de grado I para cromatografía de columna

Transferir 100 g de óxido de aluminio a un recipiente apropiado y añadir 2,0 ml de agua. Tapar y agitar durante 20 minutos aproximadamente. Almacenar en un recipiente bien cerrado.

3.6. Solución de dihidrogenofosfato de potasio, $c = 0,025$ mol/l

Disolver 3,40 g de dihidrogenofosfato de potasio en agua (de calidad CLAR) en un matraz aforado de 1 000 ml, enrasar y mezclar.

3.7. Solución de hidrogenofosfato de disodio, $c = 0,025$ mol/l

Disolver 3,55 g de hidrogenofosfato de disodio anhidro (o 4,45 g de dihidrato u 8,95 g de dodecahidrato) en agua (equivalente a la de calidad CLAR) en un matraz aforado de 1 l, enrasar y mezclar.

3.8. Fase móvil para la CLAR

Mezclar los reactivos siguientes:

650 ml de acetonitrilo (3.3),

250 ml de agua (equivalente a la de calidad CLAR),

50 ml de solución de dihidrogenofosfato de potasio (3.6),

50 ml de solución de hidrogenofosfato de disodio (3.7).

Filtrar por un filtro de 0,22 μm (4.6) y desgasificar la solución (por ejemplo, aplicando ultrasonidos durante diez minutos).

3.9. Sustancia patrón

Robenidina pura: clorhidrato de 1,3-bis [(4-clorobencilideno)amino]guanidina

3.9.1. Solución patrón madre de robenidina de 300 $\mu\text{g/ml}$

Pesar, con una precisión de 0,1 mg, 30 mg de sustancia patrón de robenidina (3.9). Disolver en metanol acidificado (3.2) en un matraz aforado de 100 ml, enrasar con el mismo disolvente y mezclar. Envolver el matraz con papel de aluminio y guardar al abrigo de la luz.

3.9.2. Solución patrón intermedia de robenidina de 12 µg/ml

Transvasar 10,0 ml de la solución patrón madre (3.9.1) a un matraz aforado de 250 ml, enrasar con la fase móvil (3.8) y mezclar. Envolver el matraz con papel de aluminio y guardar al abrigo de la luz.

3.9.3. Soluciones de calibración

Transvasar 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 y 25,0 ml de la solución patrón intermedia (3.9.2) a una serie de matraces aforados de 50 ml. Enrasar con fase móvil (3.8) y mezclar. Estas soluciones corresponden, respectivamente, a 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 y 6,0 µg/ml de robenidina. Deben prepararse poco antes de utilizarse.

3.10. Agua, equivalente a la de calidad CLAR

4. **Instrumental**

4.1. Columna de vidrio

Columna de vidrio ámbar provista de llave de cierre y de un depósito de aproximadamente 150 ml de capacidad, con un diámetro interior de 10-15 mm y una longitud de 250 mm.

4.2. Agitador mecánico o magnético

4.3. Evaporador rotativo de película

4.4. Equipo para CLAR con detector ultravioleta de longitud de onda variable o detector de red de diodos que funcione en el intervalo de 250-400 nm

4.4.1. Columna cromatográfica de líquidos: 300 mm x 4 mm, C₁₈, relleno de 10 µm, o equivalente.

4.5. *Papel de filtro de fibra de vidrio* (Whatman GF/A o equivalente)

4.6. Filtros de membrana de 0,22 µm

4.7. Filtros de membrana de 0,45 µm

5. **Procedimiento**

Nota: La robenidina es sensible a la luz. Deberá utilizarse material de vidrio ámbar en todas las operaciones.

5.1. *Generalidades*

5.1.1. Deberá analizarse un pienso en blanco para comprobar la ausencia de robenidina y de sustancias interferentes.

5.1.2. Asimismo, deberá realizarse un ensayo de recuperación analizando el pienso en blanco (5.1.1), que se habrá enriquecido añadiendo una cantidad de robenidina similar a la presente en la muestra. Para enriquecer a un nivel de 60 mg/kg, transvasar 3,0 ml de la solución patrón madre (3.9.1) a un Erlenmeyer de 250 ml. Evaporar la solución en una corriente de nitrógeno hasta que resten 0,5 ml, aproximadamente. Añadir 15 g del pienso en blanco, mezclar y esperar diez minutos antes de proceder a la extracción (5.2).

Nota: A los efectos de este método, el pienso en blanco deberá ser de tipo similar al de la muestra y en su análisis no deberá detectarse robenidina.

5.2. *Extracción*

Pesar, con una precisión de 0,01 g, 15 g aproximadamente de la muestra preparada. Transferirlos a un Erlenmeyer de 250 ml y añadir 100,0 ml de metanol acidificado (3.2), tapar y agitar durante una hora en el agitador (4.2). Filtrar la solución por un papel de filtro de fibra de vidrio (4.5) y recoger todo el filtrado en un Erlenmeyer de 150 ml. Añadir 7,5 g de tamiz molecular (3.4), tapar y agitar durante cinco minutos. Filtrar inmediatamente por un papel de filtro de fibra de vidrio. Conservar esta solución para la fase de purificación (5.3).

5.3. Purificación

5.3.1. Preparación de la columna de óxido de aluminio

Introducir un pequeño tapón de lana de vidrio en el extremo inferior de la columna de vidrio (4.1) y atacarlo con una varilla de vidrio. Pesar 11,0 g del óxido de aluminio preparado (3.5) y transferirlos a la columna. Durante esta fase deberá procurarse minimizar la exposición a la atmósfera. Golpear suavemente el extremo inferior de la columna cargada a fin de que se sedimente el óxido de aluminio.

5.3.2. Purificación de la muestra

Pipetear a la columna 5,0 ml del extracto de muestra preparado según el punto 5.2, colocando la punta de la pipeta cerca de la pared de la columna y dejando que la solución se absorba en el óxido de aluminio. Eluir la robenidina de la columna con 100 ml de metanol (3.1), manteniendo un caudal de 2-3 ml/min., y recoger el eluido en un matraz de fondo redondo de 250 ml. Evaporar hasta sequedad la solución de metanol a presión reducida y a una temperatura de 40 °C, utilizando un evaporador rotativo de película (4.3). Disolver nuevamente el residuo en 3-4 ml de fase móvil (3.8) y transvasar cuantitativamente a un matraz aforado de 10 ml. Enjuagar el matraz con varias porciones de 1-2 ml de fase móvil y transvasar estos líquidos de enjuague al matraz aforado. Enrasar con el mismo disolvente y mezclar. Filtrar una parte alícuota por un filtro de membrana de 0,45 µm (4.7). Reservar esta solución para la determinación mediante CLAR (5.4).

5.4. Determinación mediante CLAR.

5.4.1. Parámetros.

Las siguientes condiciones se ofrecen con carácter orientativo; pueden aplicarse otras si arrojan resultados equivalentes.

Columna cromatográfica de líquidos (4.4.1).

Fase móvil para la CLAR (3.8).

Caudal: 1,5-2 ml/min.

Longitud de onda del detector: 317 nm.

Volumen de inyección: 20-50 µl.

Comprobar la estabilidad del sistema cromatográfico inyectando varias veces la solución de calibración (3.9.3) de 3,6 µg/ml, hasta que se alcancen alturas de pico y tiempos de retención constantes.

5.4.2. Curva de calibración.

Inyectar varias veces cada solución de calibración (3.9.3) y medir las alturas (áreas) de pico de cada concentración. Trazar una curva de calibración empleando las alturas o áreas de pico medias de las soluciones de calibración como ordenadas y las concentraciones correspondientes, en microgramos por mililitro, como abscisas.

5.4.3. Solución de muestra.

Inyectar varias veces el extracto de muestra (5.3.2) empleando el mismo volumen que para las soluciones de calibración, y determinar la altura (área) media de los picos de robenidina.

6. Cálculo de los resultados

Determinar la concentración de la solución de muestra, en microgramos por mililitro, a partir de la altura (área) media de sus picos de robenidina, tomando como referencia la curva de calibración (5.4.2).

El contenido de robenidina p (mg/kg) de la muestra viene dado por la siguiente fórmula:

$$w = \frac{c \times 200}{m}$$

en la cual:

c = concentración de robenidina de la solución de muestra, en microgramos por mililitro;

m = peso de la porción de ensayo, en gramos.

7. Validación de los resultados

7.1. Identidad.

La identidad del analito puede confirmarse mediante cocromatografía, o utilizando un detector de red de diodos con el cual se comparan los espectros del extracto de muestra y de la solución de calibración (3.9.3) de 6 µg/ml.

7.1.1. Cocromatografía.

Enriquecer un extracto de muestra añadiéndole una cantidad apropiada de solución de calibración (3.9.3). La cantidad de robenidina añadida debe ser similar a la cantidad estimada de robenidina hallada en el extracto de muestra.

Solo la altura del pico de robenidina deberá aumentar en función de la cantidad añadida y de la dilución del extracto. La anchura del pico, a la mitad de su altura máxima, debe ser igual $\pm 10\%$ a la anchura original.

7.1.2. Detección por red de diodos.

Los resultados se evalúan con arreglo a los siguientes criterios:

- la longitud de onda de absorción máxima de los espectros de la muestra y del patrón, registrados en el vértice del pico del cromatograma, debe ser la misma dentro de un margen determinado por el poder de resolución del sistema de detección; en el caso de la detección por red de diodos, el margen típico se sitúa en aproximadamente 2 nm;
- entre 250 nm y 400 nm, los espectros de la muestra y del patrón registrados en el vértice del pico del cromatograma no deben ser diferentes por lo que respecta a aquellas partes del espectro que se encuentran en un intervalo del 10 % al 100 % de la absorbancia relativa; se cumple este criterio cuando están presentes los mismos máximos y en ningún punto observado la desviación entre los dos espectros excede del 15 % de la absorbancia del analito patrón;
- entre 250 nm y 400 nm, los espectros de la pendiente ascendente, del vértice y de la pendiente descendente del pico producido por el extracto de muestra no deben diferir entre sí por lo que respecta a las partes del espectro que se encuentran en un intervalo del 10 % al 100 % de la absorbancia relativa; se cumple este criterio cuando están presentes los mismos máximos y en ningún punto observado la desviación entre los espectros excede del 15 % de la absorbancia del espectro del vértice.

Si no se cumple alguno de estos criterios, la presencia del analito no queda confirmada.

7.2. Repetibilidad.

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas con la misma muestra no debe rebasar el 10 % del resultado superior en el caso de contenidos de robenidina mayores de 15 mg/kg.

7.3. Recuperación.

La recuperación de la muestra en blanco enriquecida deberá ser al menos del 85 %.

8. Resultados de un estudio colaborativo

Se organizó un estudio colaborativo de la Comunidad Europea en el que 12 laboratorios analizaron cuatro muestras de piensos para aves de corral y conejos, en forma de sémola o de gránulos. De cada muestra se hicieron análisis por duplicado. Los resultados se recogen en el cuadro siguiente:

	Aves de corral		Conejos	
	Sémola	Gránulos	Sémola	Gránulos
Media [mg/kg]	27,00	27,99	43,6	40,1
s_r [mg/kg]	1,46	1,26	1,44	1,66
CV_r [%]	5,4	4,5	3,3	4,1
S_R [mg/kg]	4,36	3,36	4,61	3,91
CV_R [%]	16,1	12,0	10,6	9,7
Recuperación [%]	90,0	93,3	87,2	80,2

s_r = desviación típica de la repetibilidad

CV_r = coeficiente de variación de la repetibilidad, en tanto por ciento

S_R = desviación típica de la reproducibilidad

CV_R = coeficiente de variación de la reproducibilidad, en tanto por ciento

F) DETERMINACIÓN DEL DICLAZURILO

(+)-4-clorofenil [2,6-dicloro-4-(2,3,4,5-tetrahidro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-il)fenil]acetoni-trilo

1. Objeto y ámbito de aplicación

Este método permite determinar el nivel de diclazurilo en piensos y premezclas. El límite de detección es de 0,1 mg/kg; el de cuantificación, de 0,5 mg/kg.

2. Principio

Tras añadir un patrón interno, la muestra se extrae con metanol acidificado. En el caso de los piensos, se purifica una parte alícuota del extracto en un cartucho de extracción en fase sólida de C₁₈. El diclazurilo se eluye del cartucho con una mezcla de metanol acidificado y agua. Previa evaporación, el residuo se disuelve en DMF/agua. En el caso de las premezclas, el extracto se evapora y el residuo se disuelve en DMF/agua. El contenido de diclazurilo se determina mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) de fase reversa y gradiente ternario, empleando un detector de UV.

3. Reactivos

3.1. Agua, equivalente a la de calidad CLAR.

3.2. Acetato de amonio.

3.3. Hidrogenosulfato de tetrabutilamonio.

3.4. Acetonitrilo, equivalente al de calidad CLAR.

3.5. Metanol, equivalente al de calidad CLAR.

3.6. N, N-dimetilformamida (DMF).

3.7. Ácido clorhídrico, $\rho_{20} = 1,19$ g/ml.

3.8. Sustancia patrón: diclazurilo II-24, es decir, (+)-4-clorofenil [2,6-dicloro-4-(2,3,4,5-tetrahidro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-il)fenil]acetoni-trilo de pureza garantizada, E 771.

3.8.1. Solución patrón madre de diclazurilo de 500 µg/ml.

Pesar, con una precisión de 0,1 mg, 25 mg de sustancia patrón de diclazurilo (3.8) en un matraz aforado de 50 ml. Disolver en DMF (3.6), enrasar con DMF (3.6) y mezclar. Envolver el matraz con papel de aluminio, o utilizar un matraz ámbar, y guardarlo en el frigorífico. A una temperatura de ≤ 4 °C, la solución es estable durante un mes.

3.8.2. Solución patrón de diclazurilo de 50 µg/ml.

Transvasar 5,00 ml de la solución patrón madre (3.8.1) a un matraz aforado de 50 ml, enrasar con DMF (3.6) y mezclar. Envolver el matraz con papel de aluminio, o utilizar un matraz ámbar, y guardarlo en el frigorífico. A una temperatura de ≤ 4 °C, la solución es estable durante un mes.

3.9. Patrón interno: 2,6-dicloro- α -(4-clorofenil)-4-(4,5-dihidro-3,5-dioxo-1,2,4-triazina-2 (3H)-il)- α -metilbenceno-acetonitrilo.

3.9.1. Solución patrón madre de patrón interno de 500 µg/ml.

Pesar, con una precisión de 0,1 mg, 25 mg de patrón interno (3.9) en un matraz aforado de 50 ml. Disolver en DMF (3.6), enrasar con DMF (3.6) y mezclar. Envolver el matraz con papel de aluminio, o utilizar un matraz ámbar, y guardarlo en el frigorífico. A una temperatura de ≤ 4 °C, la solución es estable durante un mes.

3.9.2. Solución de patrón interno de 50 µg/ml.

Transvasar 5,00 ml de la solución patrón madre de patrón interno (3.9.1) a un matraz aforado de 50 ml, enrasar con DMF (3.6) y mezclar. Envolver el matraz con papel de aluminio, o utilizar un matraz ámbar, y guardarlo en el frigorífico. A una temperatura de ≤ 4 °C, la solución es estable durante un mes.

3.9.3. Solución de patrón interno para premezclas, p/1 000 mg/ml.

(p = contenido nominal de diclazurilo en la premezcla, en miligramos por kilogramo).

Pesar, con una precisión de 0,1 mg, p/10 mg de patrón interno en un matraz aforado de 100 ml, disolver en DMF (3.6) en un baño ultrasónico (4.6), enrasar con DMF y mezclar. Envolver el matraz con papel de aluminio, o utilizar un matraz ámbar, y guardarlo en el frigorífico. A una temperatura de $\leq 4^{\circ}\text{C}$, la solución es estable durante un mes.

3.10. Solución de calibración de 2 µg/ml.

Pipetear 2,00 ml de la solución patrón de diclazurilo (3.8.2) y 2,00 ml de la solución de patrón interno (3.9.2) a un matraz aforado de 50 ml. Añadir 16 ml de DMF (3.6), enrasar con agua y mezclar. Esta solución debe prepararse poco antes de utilizarse.

3.11. Cartucho de extracción en fase sólida C_{18} , por ejemplo Bond Elut; tamaño: 1 cc; peso del sorbente: 100 mg.

3.12. Disolvente de extracción: metanol acidificado.

Pipetear 5,0 ml de ácido clorhídrico (3.7) a 1 000 ml de metanol (3.5) y mezclar.

3.13. Fase móvil para la CLAR.

3.13.1. Eluyente A: solución de acetato de amonio e hidrogenosulfato de tetrabutilamonio.

Disolver 5 g de acetato de amonio (3.2) y 3,4 g de hidrogenosulfato de tetrabutilamonio (3.3) en 1 000 ml de agua (3.1) y mezclar.

3.13.2. Eluyente B: acetonitrilo (3.4).

3.13.3. Eluyente C: metanol (3.5).

4. **Instrumental**

4.1. Agitador mecánico.

4.2. Equipo para CLAR de gradiente ternario.

4.2.1. Columna cromatográfica de líquidos, Hypersil ODS, relleno de 3 µm, de 100 mm x 4,6 mm, o equivalente.

4.2.2. Detector de UV de longitud de onda variable, o detector de red de diodos.

4.3. Evaporador rotativo de película.

4.4. Filtro de membrana de 0,45 µm.

4.5. Colector de vacío.

4.6. Baño ultrasónico.

5. **Procedimiento**

5.1. *Generalidades.*

5.1.1. Pienso en blanco.

Deberá analizarse un pienso en blanco para comprobar la ausencia de diclazurilo y de sustancias interferentes. El pienso en blanco deberá ser de tipo similar al de la muestra y en su análisis no deberá detectarse diclazurilo ni sustancias interferentes.

5.1.2. Ensayo de recuperación.

Deberá realizarse un ensayo de recuperación analizando el pienso en blanco, que se habrá enriquecido añadiendo una cantidad de diclazurilo similar a la presente en la muestra. Para enriquecer a un nivel de 1 mg/kg, añadir 0,1 ml de la solución patrón madre (3.8.1) a 50 g del pienso en blanco, mezclar completamente y esperar diez minutos, volviendo a mezclar varias veces antes de proceder a la extracción (5.2).

Si no se dispone de un pienso en blanco de tipo similar al de la muestra (véase el punto 5.1.1), también puede realizarse un ensayo de recuperación por el método de adición de patrón. En este caso, la muestra que debe analizarse se enriquece con una cantidad de diclazurilo similar a la que ya esté presente en ella. Esta muestra se analiza junto con la muestra sin enriquecer, y la recuperación puede calcularse por sustracción.

5.2. Extracción.

5.2.1. Piensos.

Pesar, con una precisión de 0,01 g, unos 50 g de la muestra. Pasarlos a un Erlenmeyer de 500 ml, añadir 1,00 ml de solución de patrón interno (3.9.2) y 200 ml de disolvente de extracción (3.12) y tapar el matraz. Agitar la mezcla en el agitador (4.1) hasta el día siguiente. Dejar reposar durante diez minutos. Transvasar una parte alícuota de 20 ml del sobrenadante a un recipiente de vidrio adecuado y diluir con 20 ml de agua. Transvasar esta solución a un cartucho de extracción (3.11) y pasarla a su través aplicando vacío (4.5). Lavar el cartucho con 25 ml de una mezcla de disolvente de extracción (3.12) y agua, 65 + 35 (V + V). Desechar las fracciones recogidas y eluir los compuestos con 25 ml de una mezcla de disolvente de extracción (3.12) y agua, 80 + 20 (V + V). Evaporar esta fracción hasta llegar justo a la sequedad mediante el evaporador rotativo (4.3) a 60 °C. Disolver el residuo en 1,0 ml de DMF (3.6), añadir 1,5 ml de agua (3.1) y mezclar. Filtrar a través de un filtro de membrana (4.4). Proceder a la determinación mediante CLAR (5.3).

5.2.2. Premezclas.

Pesar, con una precisión de 0,001 g, aproximadamente 1 g de la muestra. Pasarlo a un Erlenmeyer de 500 ml, añadir 1,00 ml de solución de patrón interno (3.9.3) y 200 ml de disolvente de extracción (3.12) y tapar el matraz. Agitar la mezcla en el agitador (4.1) hasta el día siguiente. Dejar reposar durante diez minutos. Pasar una parte alícuota de 10 000/p ml (p = contenido nominal de diclazurilo en la premezcla, en miligramos por kilogramo) del sobrenadante a un matraz de fondo redondo de tamaño adecuado. Evaporar hasta llegar justo a la sequedad a presión reducida y a 60 °C, por medio del evaporador rotativo (4.3). Volver a disolver el residuo en 10,0 ml de DMF (3.6), añadir 15,0 ml de agua (3.1) y mezclar. Proceder a la determinación mediante CLAR (5.3).

5.3. Determinación mediante CLAR.

5.3.1. Parámetros.

Las siguientes condiciones se ofrecen con carácter orientativo; pueden aplicarse otras si arrojan resultados equivalentes.

Columna cromatográfica 100 mm × 4,6 mm, Hypersil ODS, relleno de 3 µm, o equivalente

Fase móvil:	Eluyente A (3.13.1):	Solución acuosa de acetato de amonio e hidrogenosulfato de tetrabutilamonio
	Eluyente B (3.13.2):	Acetonitrilo
	Eluyente C (3.13.3):	Metanol
Modo de elución:	— Gradiente lineal — Condiciones iniciales: A + B + C = 60 + 20 + 20(V + V + V) — Tras diez minutos de elución de gradiente durante 30 minutos a: A + B + C = 45 + 20 + 35 (V + V + V) Chorro de B durante diez minutos	
Caudal:	1,5-2 ml/min.	
Volumen de inyección:	20 µl	
Longitud de onda del detector:	280 nm	

Comprobar la estabilidad del sistema cromatográfico inyectando varias veces la solución de calibración (3.10) de 2 µg/ml, hasta que se alcancen alturas de pico y tiempos de retención constantes.

5.3.2. Solución de calibración.

Inyectar varias veces 20 µl de la solución de calibración (3.10) y determinar la altura (área) media de los picos de diclazurilo y patrón interno.

5.3.3. Solución de muestra.

Inyectar varias veces 20 µl de la solución de muestra (5.2.1 o 5.2.2) y determinar la altura (área) media de los picos de diclazurilo y patrón interno.

6. Cálculo de los resultados

6.1. Piensos.

El contenido p (mg/kg) de diclazurilo de la muestra viene dado por la siguiente fórmula:

$$w = \frac{h_{d,s} \times h_{i,c}}{h_{i,s} \times h_{d,c}} \times \frac{c_{d,c} \times 10 V}{m} \text{ [mg/kg]}$$

donde:

- $h_{d,s}$ = altura (área) del pico de diclazurilo en la solución de muestra (5.2.1);
- $h_{i,s}$ = altura (área) del pico de patrón interno en la solución de muestra (5.2.1);
- $h_{d,c}$ = altura (área) del pico de diclazurilo en la solución de calibración (3.10);
- $h_{i,c}$ = altura (área) del pico de patrón interno en la solución de calibración (3.10);
- $c_{d,c}$ = concentración de diclazurilo en la solución de calibración (3.10), en microgramos por mililitro;
- m = peso de la porción de ensayo, en gramos;
- V = volumen del extracto de muestra según el punto 5.2.1 (es decir, 2,5 ml).

6.2. Premezclas.

El contenido p (mg/kg) de diclazurilo de la muestra viene dado por la siguiente fórmula:

$$w = \frac{h_{d,s} \times h_{i,c}}{h_{i,s} \times h_{d,c}} \times \frac{c_{d,c} \times 0,02V \times p}{m} \text{ [mg/kg]}$$

donde:

- $h_{d,c}$ = altura (área) del pico de diclazurilo en la solución de calibración (3.10);
- $h_{i,c}$ = altura (área) del pico de patrón interno en la solución de calibración (3.10);
- $h_{d,s}$ = altura (área) del pico de diclazurilo en la solución de muestra (5.2.2);
- $h_{i,s}$ = altura (área) del pico de patrón interno en la solución de muestra (5.2.2);
- $c_{d,c}$ = concentración de diclazurilo en la solución de calibración (3.10), en microgramos por mililitro;
- m = peso de la porción de ensayo, en gramos;
- V = volumen del extracto de muestra según el punto 5.2.2 (es decir, 25 ml);
- p = contenido nominal de diclazurilo de la premezcla, en miligramos por kilogramo.

7. Validación de los resultados

7.1. Identidad.

La identidad del analito puede confirmarse mediante cocromatografía, o utilizando un detector de red de diodos con el cual se comparan los espectros del extracto de muestra (5.2.1 o 5.2.2) y de la solución de calibración (3.10).

7.1.1. Cocromatografía.

Enriquecer un extracto de muestra (5.2.1 o 5.2.2) añadiéndole una cantidad apropiada de solución de calibración (3.10). La cantidad de diclazurilo añadida debe ser similar a la hallada en el extracto de muestra.

Solo la altura del pico de diclazurilo y del pico de patrón interno deberá aumentar en función de la cantidad añadida y de la dilución del extracto. La anchura del pico, a la mitad de su altura, debe ser igual $\pm 10\%$ a la anchura original del pico de diclazurilo o el pico de patrón interno del extracto de muestra sin enriquecer.

7.1.2. Detección por red de diodos.

Los resultados se evalúan con arreglo a los siguientes criterios:

- a) la longitud de onda de absorción máxima de los espectros de la muestra y del patrón, registrados en el vértice del pico del cromatograma, debe ser la misma dentro de un margen determinado por el poder de resolución del sistema de detección; en el caso de la detección por red de diodos, el margen típico se sitúa en ± 2 nm;
- b) entre 230 nm y 320 nm, los espectros de la muestra y del patrón registrados en el vértice del pico del cromatograma no deben ser diferentes por lo que respecta a aquellas partes del espectro que se encuentran en un intervalo del 10 % al 100 % de la absorbancia relativa; se cumple este criterio cuando están presentes los mismos máximos y en ningún punto observado la desviación entre los dos espectros excede del 15 % de la absorbancia del analito patrón;

- c) entre 230 nm y 320 nm, los espectros de la pendiente ascendente, del vértice y de la pendiente descendente del pico producido por el extracto de muestra no deben diferir entre sí por lo que respecta a las partes del espectro que se encuentran en un intervalo del 10 % al 100 % de la absorbancia relativa; se cumple este criterio cuando están presentes los mismos máximos y en ningún punto observado la desviación entre los espectros excede del 15 % de la absorbancia del espectro del vértice del pico.

Si no se cumple alguno de estos criterios, la presencia del analito no queda confirmada.

7.2. Repetibilidad.

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas con la misma muestra no debe exceder de:

- el 30 % del valor superior, en el caso de contenidos de diclazurilo de 0,5 mg/kg a 2,5 mg/kg,
- 0,75 mg/kg, en el caso de contenidos de diclazurilo de 2,5 mg/kg a 5 mg/kg,
- el 15 % del valor superior, en el caso de contenidos de diclazurilo superiores a 5 mg/kg.

7.3. Recuperación.

La recuperación de la muestra (en blanco) enriquecida deberá ser al menos del 80 %.

8. Resultados de un estudio colaborativo

Se organizó un estudio colaborativo en el que 11 laboratorios analizaron cinco muestras. Estas muestras consistieron en dos premezclas; una se mezcló con una matriz orgánica (O 100) y otra con una matriz inorgánica (A 100). El contenido teórico de diclazurilo fue de 100 mg por kilogramo. Los tres piensos mezclados para aves de corral fueron preparados por tres fabricantes diferentes (NL) (L1/Z1/K1). El contenido teórico de diclazurilo fue de 1 mg por kilogramo. Se dijo a los laboratorios que analizaran cada muestra una vez o por duplicado. (Puede encontrarse información más detallada sobre este estudio colaborativo en *Journal of AOAC International*, volumen 77, n° 6, 1994, pp. 1359-1361). Los resultados se recogen en el cuadro siguiente:

	Muestra 1 A 100	Muestra 2 O 100	Muestra 3 L1	Muestra 4 Z1	Muestra 5 K1
L	11	11	11	11	6
n	19	18	19	19	12
Media	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89
S _r (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03
CV _r (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34
S _R (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12
CV _R (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65
Contenido nominal (mg/kg)	100	100	1	1	1

L = número de laboratorios
n = número de valores individuales
S_r = desviación típica de la repetibilidad
CV_r = coeficiente de variación de la repetibilidad
S_R = desviación típica de la reproducibilidad
CV_R = coeficiente de variación de la reproducibilidad

9. Observaciones

Previamente debe haberse demostrado que la respuesta del diclazurilo es lineal en todo el intervalo de concentraciones sometidas a medición.

G) DETERMINACIÓN DEL LASALOCID SÓDICO

Sal sódica de un poliéter de ácido monocarboxílico producido por *Streptomyces lasaliensis*

1. Objeto y ámbito de aplicación

Este método permite determinar el nivel de lasalocid sódico en piensos y premezclas. El límite de detección es de 5 mg/kg; el de cuantificación, de 10 mg/kg.

2. Principio

El lasalocid sódico se extrae de la muestra en metanol acidificado y se determina mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) de fase reversa, empleando un detector espectrofluorométrico.

3. Reactivos

3.1. Dihidrogenofosfato de potasio (KH_2PO_4).

3.2. Ácido ortofosfórico, p (p/p) = 85 %.

3.3. Solución de ácido ortofosfórico, c = 20 %.

Diluir 23,5 ml de ácido ortofosfórico (3.2) con agua hasta 100 ml.

3.4. 6-metil-2-heptilamina (1,5-dimetilhexilamina), p (p/p) = 99 %.

3.5. Metanol, equivalente al de calidad CLAR.

3.6. Ácido clorhídrico, de 1,19 g/ml de densidad.

3.7. Solución reguladora de fosfato, c = 0,01 mol/l.

Disolver 1,36 g de KH_2PO_4 (3.1) en 500 ml de agua (3.11), añadir 3,5 ml de ácido ortofosfórico (3.2) y 10,0 ml de 6-metil-2-heptilamina (3.4). Ajustar el pH a 4,0 con solución de ácido ortofosfórico (3.3) y diluir con agua (3.11) hasta 1 000 ml.

3.8. Metanol acidificado.

Transvasar 5,0 ml de ácido clorhídrico (3.6) a un matraz aforado de 1 000 ml, enrasar con metanol (3.5) y mezclar. Esta solución debe prepararse poco antes de utilizarse.

3.9. Fase móvil para la CLAR: solución reguladora de fosfato y metanol, 5 + 95 (V + V).

Mezclar 5 ml de solución reguladora de fosfato (3.7) con 95 ml de metanol (3.5).

3.10. Sustancia patrón de lasalocid sódico de pureza garantizada, $\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{O}_8\text{Na}$ (sal sódica de un poliéter de ácido monocarboxílico producido por *Streptomyces lasaliensis*), E 763.

3.10.1. Solución patrón madre de lasalocid sódico, 500 µg/ml.

Pesar, con una precisión de 0,1 mg, 50 mg de lasalocid sódico (3.10) en un matraz aforado de 100 ml, disolver con metanol acidificado (3.8), enrasar con este mismo disolvente y mezclar. Esta solución debe prepararse poco antes de utilizarse.

3.10.2. Solución patrón intermedia de lasalocid sódico, 50 µg/ml.

Pipetear 10,0 ml de solución patrón madre (3.10.1) a un matraz aforado de 100 ml, enrasar con metanol acidificado (3.8) y mezclar. Esta solución debe prepararse poco antes de utilizarse.

3.10.3. Soluciones de calibración

Transvasar 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 y 10,0 ml de la solución patrón intermedia (3.10.2) a una serie de matraces aforados de 50 ml. Enrasar con metanol acidificado (3.8) y mezclar. Estas soluciones corresponden, respectivamente, a 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 y 10,0 µg de lasalocid sódico por mililitro. Deben prepararse poco antes de utilizarse.

3.11. Agua, equivalente a la de calidad CLAR.

4. Instrumental

4.1. Baño ultrasónico (o baño de agua con agitación), con control de temperatura.

4.2. Filtros de membrana de 0,45 µm.

4.3. Equipo para CLAR con un sistema de inyección que permita inyectar volúmenes de 20 µl.

4.3.1. Columna cromatográfica de líquidos, de 125 mm x 4 mm, fase reversa, C₁₈, relleno de 5 µm, o equivalente.

4.3.2. Espectrofluorímetro con ajuste variable de las longitudes de onda de excitación y emisión.

5. Procedimiento

5.1. Generalidades.

5.1.1. Pienso en blanco.

Para el ensayo de recuperación (5.1.2) deberá analizarse un pienso en blanco, a fin de comprobar la ausencia de lasalocid sódico y de sustancias interferentes. El pienso en blanco deberá ser de tipo similar al de la muestra y en su análisis no deberá detectarse lasalocid sódico ni sustancias interferentes.

5.1.2. Ensayo de recuperación.

Deberá realizarse un ensayo de recuperación analizando el pienso en blanco, que se habrá enriquecido añadiendo una cantidad de lasalocid sódico similar a la presente en la muestra. Para enriquecer a un nivel de 100 mg/kg, transvasar 10,0 ml de la solución patrón madre (3.10.1) a un Erlenmeyer de 250 ml y evaporar la solución a unos 0,5 ml. Añadir 50 g del pienso en blanco, mezclar completamente y esperar diez minutos, mezclando varias veces más antes de proceder a la extracción (5.2).

Si no se dispone de un pienso en blanco de tipo similar al de la muestra (véase el punto 5.1.1), también puede realizarse un ensayo de recuperación por el método de adición de patrón. En este caso, la muestra que debe analizarse se enriquece con una cantidad de lasalocid sódico similar a la que ya esté presente en ella. Esta muestra se analiza junto con la muestra sin enriquecer, y la recuperación se calcula por sustracción.

5.2. Extracción.

5.2.1. Pienso s.

Pesar, con una precisión de 0,01 g, de 5 g a 10 g de la muestra en un Erlenmeyer de 250 ml con tapón. Añadir con la pipeta 100,0 ml de metanol acidificado (3.8). Tapar sin apretar y agitar en círculos para dispersar. Colocar el matraz en un baño ultrasónico (4.1) a unos 40 °C durante 20 minutos, remover a continuación y enfriar a temperatura ambiente. Dejar reposar durante aproximadamente una hora hasta que la materia en suspensión se haya sedimentado; a continuación, verter una parte alícuota en un recipiente adecuado filtrándola por un filtro de membrana de 0,45 µm. Proceder a la determinación mediante CLAR (5.3).

5.2.2. Premezclas.

Pesar, con una precisión de 0,001 g, unos 2 g de premezcla sin moler en un matraz aforado de 250 ml. Añadir 100,0 ml de metanol acidificado (3.8) y agitar en círculos para dispersar. Colocar el matraz con su contenido en un baño ultrasónico (4.1) a unos 40 °C durante 20 minutos, remover a continuación y enfriar a temperatura ambiente. Diluir hasta la marca con metanol acidificado (3.8) y mezclar completamente. Dejar reposar durante una hora hasta que la materia en suspensión se haya sedimentado; a continuación, filtrar una parte alícuota por un filtro de membrana de 0,45 µm (4.2). Diluir un volumen apropiado del filtrado limpio con metanol acidificado (3.8) para producir una solución final de ensayo que contenga en torno a 4 µg/ml de lasalocid sódico. Proceder a la determinación mediante CLAR (5.3).

5.3. *Determinación mediante CLAR.*5.3.1. *Parámetros.*

Las siguientes condiciones se ofrecen con carácter orientativo; pueden aplicarse otras si arrojan resultados equivalentes.

Columna cromatográfica 125 mm × 4 mm, fase reversa C₁₈, relleno de 5 µm, o equivalente de líquidos (4.3.1):

Fase móvil (3.9): Mezcla de solución reguladora de fosfato(3.7) y metanol (3.5), 5+95 (V+V)

Caudal: 1,2 ml/min.

Longitudes de onda de detección:

Excitación: 10 nm

Emisión: 419 nm

Volumen de inyección: 20 µl

Comprobar la estabilidad del sistema cromatográfico inyectando varias veces la solución de calibración (3.10.3) de 4,0 µg/ml, hasta que se alcancen alturas (o áreas) de pico y tiempos de retención constantes.

5.3.2. *Curva de calibración.*

Inyectar varias veces cada solución de calibración (3.10.3) y determinar las alturas (áreas) de pico medias de cada concentración. Trazar una curva de calibración empleando las alturas (áreas) de pico medias como ordenadas y las concentraciones correspondientes, en microgramos por mililitro, como abscisas.

5.3.3. *Solución de muestra.*

Inyectar varias veces los extractos de muestra obtenidos en el punto 5.2.1 o 5.2.2 empleando el mismo volumen que para la solución de calibración, y determinar las alturas (áreas) medias de los picos de lasalocid sódico.

6. **Cálculo de los resultados**

Determinar la concentración de lasalocid sódico (µg/ml) a partir de la altura (área) de pico media producida por la inyección de la solución de muestra (5.3.3), tomando como referencia la curva de calibración.

6.1. *Pensos.*

El contenido p (mg/kg) de lasalocid sódico de la muestra viene dado por la siguiente fórmula:

$$w = \frac{c \times V_1}{m} \text{ [mg/kg]}$$

donde:

c = concentración de lasalocid sódico de la solución de muestra (5.2.1), en microgramos por mililitro;

V₁ = volumen del extracto de muestra según el punto 5.2.1, en mililitros (es decir, 100);

m = peso de la porción de ensayo, en gramos.

6.2. *Premezclas.*

El contenido p (mg/kg) de lasalocid sódico de la muestra viene dado por la siguiente fórmula:

$$w = \frac{c \times V_2 \times f}{m} \text{ [mg/kg]}$$

donde:

c = concentración de lasalocid sódico de la solución de muestra (5.2.2), en microgramos por mililitro;

V₂ = volumen del extracto de muestra según el punto 5.2.2, en mililitros (es decir, 250);

f = factor de dilución según el punto 5.2.2;

m = peso de la porción de ensayo, en gramos.

7. **Validación de los resultados**7.1. *Identidad.*

Los métodos basados en la espectrofluorometría están menos sujetos a interferencias que aquellos en los que se emplea la detección de UV. La identidad del analito puede confirmarse por cocromatografía.

7.1.1. *Cocromatografía.*

Enriquecer un extracto de muestra (5.2.1 o 5.2.2) añadiéndole una cantidad apropiada de solución de calibración (3.10.3). La cantidad de lasalocid sódico añadida debe ser similar a la hallada en el extracto de muestra. Solo la altura del pico de lasalocid sódico deberá aumentar en función de la cantidad de lasalocid sódico añadida y de la dilución del extracto. La anchura del pico, a la mitad de su altura, debe ser igual $\pm 10\%$ a la anchura del pico original producida por el extracto de muestra sin enriquecer.

7.2. *Repetibilidad.*

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas con la misma muestra no debe exceder de:

- el 15 % del valor superior, en el caso de contenidos de lasalocid sódico de 30 mg/kg a 100 mg/kg,
- 15 mg/kg, en el caso de contenidos de lasalocid sódico de 100 mg/kg a 200 mg/kg,
- el 7,5 % del valor superior, en el caso de contenidos de lasalocid sódico superiores a 200 mg/kg.

7.3. *Recuperación.*

La recuperación de la muestra (en blanco) de pienso enriquecida deberá ser al menos del 80 %. En el caso de las muestras de premezclas enriquecidas, la recuperación deberá ser al menos del 90 %.

8. **Resultados de un estudio colaborativo**

Se organizó un estudio colaborativo (*) en el que 12 laboratorios analizaron dos premezclas (muestras 1 y 2) y cinco piensos (muestras 3 a 7). De cada muestra se hicieron análisis por duplicado. Los resultados se recogen en el cuadro siguiente:

	Muestra 1 Premezcla para pollos	Muestra 2 Premezcla para pavos	Muestra 3 Gránulos para pavos	Muestra 4 Migajas para pollos	Muestra 5 Pienso para pavos	Muestra 6 Pienso A para pollos	Muestra 7 Pienso B para pollos
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Media [mg/kg]	5 050	16 200	76,5	78,4	92,9	48,3	32,6
S _r [mg/kg]	107	408	1,71	2,23	2,27	1,93	1,75
CV _r [%]	2,12	2,52	2,24	2,84	2,44	4,00	5,37
S _R [mg/kg]	286	883	3,85	7,32	5,29	3,47	3,49
CV _R [%]	5,66	5,45	5,03	9,34	5,69	7,18	10,70
Contenido nominal [mg/kg]	5 000 (*)	16 000 (*)	80 (*)	105 (*)	120 (*)	50 (**)	35 (**)

(*) contenido declarado por el fabricante

(**) pienso preparado en el laboratorio

L = número de laboratorios

n = número de resultados individuales

S_r = desviación típica de la repetibilidad

S_R = desviación típica de la reproducibilidad

CV_r = coeficiente de variación de la repetibilidad, en tanto por ciento

CV_R = coeficiente de variación de la reproducibilidad, en tanto por ciento

(*) *The Analyst*, 1995, 120, pp. 2175-2180

ANEXO V

MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA EL CONTROL DE SUSTANCIAS INDESEABLES EN LOS PIENSOS**A. DETERMINACIÓN DEL GOSIPOL LIBRE Y TOTAL****1. Objeto y ámbito de aplicación**

Este método permite determinar el gosipol libre, el gosipol total y las sustancias químicamente relacionadas presentes en las semillas de algodón y en las sémolas y tortas de semillas de algodón, así como en los piensos compuestos que contengan estos materiales para piensos, cuando los contenidos de gosipol libre, gosipol total y sustancias químicamente relacionadas superen los 20 mg/kg.

2. Principio

El gosipol se extrae en presencia de 3-aminopropan-1-ol, ya sea mediante una mezcla de propan-2-ol y hexano, para la determinación del gosipol libre, ya con dimetilformamida, para la determinación del gosipol total. El gosipol se transforma mediante anilina en gosipol-dianilina, cuya densidad óptica se mide a 440 nm.

3. Reactivos

- 3.1. Mezcla de propan-2-ol y hexano: mezclar 60 partes en volumen de propan-2-ol con 40 partes en volumen de *n*-hexano.
- 3.2. Disolvente A: verter en un matraz aforado de 1 l unos 500 ml de la mezcla de propan-2-ol y hexano (3.1), 2 ml de 3-aminopropan-1-ol, 8 ml de ácido acético glacial y 50 ml de agua. Enrasar con la mezcla de propan-2-ol y hexano (3.1). Este reactivo se mantiene estable durante una semana.
- 3.3. Disolvente B: pipetear 2 ml de 3-aminopropan-1-ol y 10 ml de ácido acético glacial a un matraz aforado de 100 ml. Enfriar a temperatura ambiente y enrasar con N, N-dimetilformamida. Este reactivo se mantiene estable durante una semana.
- 3.4. Anilina: si la densidad óptica del ensayo en blanco excede de 0,022, destilar la anilina sobre polvo de cinc, desechando la primera y la última fracción del destilado, cada una de ellas equivalente a un 10 % del mismo. Este reactivo se conserva varios meses si está refrigerado y se guarda en un matraz de vidrio oscuro tapado.
- 3.5. Solución patrón de gosipol A: introducir 27,9 mg de acetato de gosipol en un matraz aforado de 250 ml. Disolver y enrasar con el disolvente A (3.2). Pipetear 50 ml de esta solución a un matraz aforado de 250 ml y enrasar con el disolvente A. La concentración de gosipol de esta solución es de 0,02 mg/ml. Dejarla reposar durante una hora a temperatura ambiente antes de utilizarla.
- 3.6. Solución patrón de gosipol B: introducir 27,9 mg de acetato de gosipol en un matraz aforado de 50 ml. Disolver y enrasar con el disolvente B (3.3). La concentración de gosipol de esta solución es de 0,5 mg/ml.

Las soluciones patrón de gosipol A y B se mantendrán estables durante veinticuatro horas si están al abrigo de la luz.

4. Instrumental

- 4.1. Mezclador (tambor): aproximadamente 35 revoluciones por minuto.
- 4.2. Espectrofotómetro.

5. Procedimiento**5.1. Muestra de ensayo**

La cantidad de muestra de ensayo empleada depende del contenido supuesto de gosipol de la muestra. Es preferible trabajar con una muestra de ensayo pequeña y una parte alícuota del filtrado relativamente grande, de forma que se obtenga una cantidad de gosipol suficiente para poder efectuar una medición fotométrica precisa. *Para la determinación del gosipol libre* en las semillas de algodón y en las sémolas y tortas de semillas de algodón, la muestra de ensayo no excederá de 1 g; en el caso de los piensos compuestos, puede llegar a 5 g. En la mayoría de los casos, una parte alícuota de 10 ml de filtrado es adecuada; deberá contener de 50 µg a 100 µg de gosipol. *Para la determinación del gosipol total*, la muestra de ensayo deberá ser de 0,5 g a 5 g, de modo que una parte alícuota de 2 ml de filtrado contenga de 40 µg a 200 µg de gosipol.

El análisis deberá efectuarse a una temperatura ambiente en torno a los 20 °C.

5.2. *Determinación del gosipol libre*

Introducir la muestra en un matraz de cuello esmerilado de 250 ml, cuyo fondo esté cubierto de vidrio triturado. Añadir con la pipeta 50 ml de disolvente A (3.2), tapar el matraz y mezclar durante una hora en el mezclador. Filtrar por un filtro seco y recoger el filtrado en un matraz pequeño de cuello esmerilado. Durante la filtración, cubrir el embudo con un vidrio de reloj.

Pipetear a dos matraces aforados de 25 ml (A y B) partes alícuotas idénticas de filtrado que contengan de 50 µg a 100 µg de gosipol. Si es necesario, enrasar a 10 ml con disolvente A (3.2). A continuación, enrasar el matraz (A) con la mezcla de propan-2-ol y hexano (3.1). Esta solución servirá de referencia para medir la solución de muestra.

Pipetear a otros dos matraces aforados de 25 ml (C y D), respectivamente, 10 ml de disolvente A (3.2). Enrasar el matraz (C) con la mezcla de propan-2-ol y hexano (3.1). Esta solución servirá de referencia para medir la solución de ensayo en blanco.

Añadir 2 ml de anilina (3.4) al matraz (D) y al matraz (B). Calentar durante 30 minutos sobre un baño maría en ebullición para colorar. Enfriar a temperatura ambiente, enrasar con la mezcla de propan-2-ol y hexano (3.1), homogeneizar y dejar reposar durante una hora.

Determinar las densidades ópticas de la solución de ensayo en blanco (D) y de la solución de muestra (B) comparándolas, respectivamente, con la solución de referencia (C) y la solución de referencia (A) en el espectrofotómetro a 440 nm, empleando cubetas de vidrio de 1 cm.

Restar la densidad óptica de la solución de ensayo en blanco a la de la solución de muestra (= densidad óptica corregida). Partiendo de este valor, calcular el contenido de gosipol libre como se indica en el punto 6.

5.3. *Determinación del gosipol total*

Introducir una muestra de ensayo que contenga de 1 mg a 5 mg de gosipol en un matraz aforado de 50 ml y añadir 10 ml de disolvente B (3.3). Preparar simultáneamente un ensayo en blanco vertiendo 10 ml de disolvente B (3.3) en otro matraz aforado de 50 ml. Calentar ambos matraces durante 30 minutos sobre un baño maría en ebullición. Enfriar a temperatura ambiente y enrasar los dos matraces con la mezcla de propan-2-ol y hexano (3.1). Homogeneizar y dejar reposar durante diez a 15 minutos, filtrando a continuación y recogiendo los filtrados en matraces de cuello esmerilado.

Pipetear a dos matraces aforados de 25 ml, respectivamente, 2 ml del filtrado de muestra, y a otros dos matraces de 25 ml, respectivamente, 2 ml del filtrado de ensayo en blanco. Enrasar a 25 ml un matraz de cada serie con la mezcla de propan-2-ol y hexano (3.1). Estas soluciones se emplearán como soluciones de referencia.

Añadir 2 ml de anilina (3.4) a cada uno de los otros dos matraces. Calentar durante 30 minutos sobre un baño maría en ebullición para colorar. Enfriar a temperatura ambiente, enrasar a 25 ml con la mezcla de propan-2-ol y hexano (3.1), homogeneizar y dejar reposar durante una hora.

Determinar la densidad óptica como se indica en el punto 5.2 para el gosipol libre. Partiendo de este valor, calcular el contenido de gosipol total como se indica en el punto 6.

6. **Cálculo de los resultados**

Los resultados pueden calcularse, o bien a partir de la densidad óptica específica (6.1), o bien tomando como referencia una curva de calibración (6.2).

6.1. *A partir de la densidad óptica específica*

Las densidades ópticas específicas, en las condiciones descritas, serán las siguientes:

$$\text{Gosipol libre} \quad E \frac{1\%}{1\text{ cm}} = 625$$

$$\text{Gosipol total} \quad E \frac{1\%}{1\text{ cm}} = 600$$

El contenido de gosipol libre o total de la muestra se calcula por medio de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ gosipol} = \frac{E \times 1\,250}{E_{1\text{cm}} \times p \times a}$$

donde

E = densidad óptica corregida, determinada según se indica en el punto 5.2;

p = muestra de ensayo, en gramos;

a = parte alícuota del filtrado, en mililitros.

6.2. A partir de una curva de calibración

6.2.1. Gosipol libre

Preparar dos series de cinco matraces aforados de 25 ml. Pipetear partes alícuotas de 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 y 10,0 ml de la solución patrón de gosipol A (3.5) en cada serie de matraces. Enrasar a 10 ml con el disolvente A (3.2). Completar cada serie con un matraz aforado de 25 ml que contenga únicamente 10 ml del disolvente A (3.2) (ensayo en blanco).

Enrasar a 25 ml los matraces de la primera serie (incluido el matraz para el ensayo en blanco) con la mezcla de propan-2-ol y hexano (3.1) (serie de referencia).

Añadir 2 ml de anilina (3.4) a cada uno de los matraces de la segunda serie (incluido el matraz para el ensayo en blanco). Calentar durante 30 minutos sobre un baño maría en ebullición para colorar. Enfriar a temperatura ambiente, enrasar con la mezcla de propan-2-ol y hexano (3.1), homogeneizar y dejar reposar durante una hora (serie de referencia).

Determinar la densidad óptica de las soluciones de la serie patrón como se indica en el punto 5.2, comparándola con las correspondientes soluciones de la serie de referencia. Trazar la curva de calibración relacionando las densidades ópticas con las cantidades de gosipol (en microgramos).

6.2.2. Gosipol total

Preparar seis matraces aforados de 50 ml. Verter 10 ml del disolvente B (3.3) en el primer matraz y, en el resto, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 y 10,0 ml, respectivamente, de solución patrón de gosipol B (3.6). Enrasar cada matraz a 10 ml con disolvente B (3.3). Calentar durante 30 minutos sobre un baño maría en ebullición. Enfriar a temperatura ambiente, enrasar con la mezcla de propan-2-ol y hexano (3.1) y homogeneizar.

Verter respectivamente 2,0 ml de estas soluciones en dos series de seis matraces aforados de 25 ml. Enrasar los matraces de la primera serie a 25 ml con la mezcla de propan-2-ol y hexano (3.1) (serie de referencia).

Añadir 2 ml de anilina (3.4) a cada matraz de la segunda serie. Calentar durante 30 minutos sobre un baño maría en ebullición. Enfriar a temperatura ambiente, enrasar con la mezcla de propan-2-ol y hexano (3.1), homogeneizar y dejar reposar durante una hora (serie de referencia).

Determinar la densidad óptica de las soluciones de la serie patrón como se indica en el punto 5.2, comparándola con las correspondientes soluciones de la serie de referencia. Trazar la curva de calibración relacionando las densidades ópticas con las cantidades de gosipol (en microgramos).

6.3. Repetibilidad

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas con la misma muestra no debe exceder de:

- el 15 % del valor superior, en el caso de contenidos de gosipol inferiores a 500 ppm,
- 75 ppm en valor absoluto, en el caso de contenidos no inferiores a 500 ppm ni superiores a 750 ppm,
- el 10 % del valor superior, en el caso de contenidos superiores a 750 ppm.

B. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE DIOXINAS (PCDD/PCDF) Y PCB SIMILARES A LAS DIOXINAS

I. MÉTODOS DE MUESTREO E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS ANALÍTICOS

1. Objeto y ámbito de aplicación

Las muestras destinadas al control oficial de los niveles de dioxinas (dibenzo-p-dioxinas policloradas [PCDD] y dibenzofuranos policlorados [PCDF]) y bifenilos policlorados similares a las dioxinas (PCB) ⁽¹⁾ en los piensos se tomarán conforme a las disposiciones del anexo I. Son de aplicación los requisitos cuantitativos relacionados con el control de las sustancias o los productos distribuidos uniformemente por el pienso que se establecen en el punto 5.A del anexo I. Las muestras globales así obtenidas se considerarán representativas de los lotes o sublotos de los que se tomen. El cumplimiento de los niveles máximos establecidos en la Directiva 2002/32/CE del Parlamento Europeo y del Consejo ⁽²⁾ se establecerá sobre la base de los niveles determinados en las muestras de laboratorio.

2. Conformidad del lote o sub lote con la especificación

El lote es aceptado si el resultado analítico de un análisis único no supera el nivel máximo correspondiente fijado en la Directiva 2002/32/CE, teniendo en cuenta la incertidumbre de medida.

Se considera que el lote incumple el nivel máximo establecido en la Directiva 2002/32/CE si el resultado analítico del límite superior ⁽³⁾, confirmado por el análisis por duplicado ⁽⁴⁾, supera el nivel máximo más allá de cualquier duda razonable, teniendo en cuenta la incertidumbre de medida.

⁽¹⁾ Tabla de FET (= factores de equivalencia tóxica) correspondientes a dioxinas, furanos y PCB similares a las dioxinas

Congénere	Valor FET	Congénere	Valor FET
Dibenzo-p-dioxinas («PCDD»)		<i>PCB similares a las dioxinas:</i>	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	PCB no-orto	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0001
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 169	0,01
OCDD	0,0001	PCB mono-orto	
		PCB 105	0,0001
Dibenzofuranos («PCDF»)		PCB 114	0,0005
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 118	0,0001
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05	PCB 123	0,0001
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5	PCB 156	0,0005
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 157	0,0005
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00001
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 189	0,0001
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1		
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01		
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0001		

Abreviaturas utilizadas: «T» = tetra; «Pe» = penta; «Hx» = hexa; «Hp» = hepta; «O» = octo; «CDD» = clorodibenzo-p-dioxina; «CDF» = clorodibenzofurano; «CB» = clorobifenilo.

⁽²⁾ DO L 140 de 30.5.2002, p. 10.

⁽³⁾ El concepto de «límite superior» exige suponer que la contribución de cada congénere no cuantificado al equivalente tóxico (EQT) es igual al límite de cuantificación.

El concepto de «límite inferior» exige suponer que la contribución de cada congénere no cuantificado al EQT es igual a cero.

El concepto de «límite intermedio» exige suponer que la contribución de cada congénere no cuantificado al EQT es igual a la mitad del límite de cuantificación.

⁽⁴⁾ El análisis por duplicado es necesario para descartar la posibilidad de contaminación cruzada interna o de combinación accidental de muestras. El primer análisis, teniendo en cuenta la incertidumbre de medida, se realiza para verificar el cumplimiento. Si el análisis se lleva a cabo en el marco de un incidente de contaminación con dioxinas, puede prescindirse de la confirmación mediante un análisis por duplicado si la trazabilidad pone de manifiesto que las muestras seleccionadas para el análisis están relacionadas con dicho incidente.

La incertidumbre de medida puede tenerse en cuenta con arreglo a uno de los siguientes métodos:

- calculando la incertidumbre expandida con un factor de cobertura de 2, que ofrece un nivel de confianza del 95 % aproximadamente; un lote no es conforme si el valor medido menos U está por encima del nivel máximo; en caso de que se determinen por separado las dioxinas y los PCB similares a las dioxinas, para la suma de ambos debe emplearse la suma de la incertidumbre expandida calculada correspondiente a los resultados analíticos obtenidos por separado para las dioxinas y los PCB similares a las dioxinas,
- estableciendo el límite de decisión (CCa) con arreglo a la Decisión 2002/657/CE de la Comisión ⁽¹⁾ (punto 3.1.2.5 del anexo, en el caso de sustancias para las que se ha establecido un límite permitido); un lote no es conforme si el valor medido es igual o superior al CCa.

Las presentes normas de interpretación se aplican al resultado analítico obtenido con la muestra para control oficial. No afectan al derecho de los Estados miembros de aplicar normas nacionales a los análisis con fines de defensa o arbitraje.

II. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS Y REQUISITOS APLICABLES A LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS UTILIZADOS EN EL CONTROL OFICIAL DE LOS NIVELES DE DIOXINAS (PCDD/PCDF) Y PCB SIMILARES A LAS DIOXINAS

1. Objeto y ámbito de aplicación

Estos requisitos deberán aplicarse en el análisis de piensos y materiales para piensos realizado para la determinación de dioxinas [dibenzo-p-dioxinas policloradas (PCDD) y dibenzofuranos policlorados (PCDF)] y policlorobifenilos similares a las dioxinas (PCB).

El control de la presencia de dioxinas en los piensos puede efectuarse mediante una estrategia que incluya un método de cribado para seleccionar aquellas muestras cuyo nivel de dioxinas y PCB similares a las dioxinas sea menos de un 25 % inferior al nivel considerado o exceda de dicho nivel. La concentración de dioxinas en esas muestras con niveles significativos debe determinarse o confirmarse mediante un método de confirmación.

Los métodos de cribado son los que se utilizan para detectar la presencia de dioxinas y PCB similares a las dioxinas con el nivel considerado. Estos métodos se caracterizan por un elevado rendimiento de muestras y se utilizan para cribar grandes cantidades de muestras en busca de posibles positivos. Están específicamente diseñados para evitar los falsos negativos.

Son métodos de confirmación los que proporcionan una información completa o complementaria que permite la identificación y cuantificación inequívoca de las dioxinas y los PCB similares a las dioxinas con el nivel considerado.

2. Antecedentes

Ya que las muestras ambientales y biológicas (incluidas las muestras de piensos o materiales para piensos) contienen, por lo general, mezclas complejas de diferentes congéneres de dioxinas, se ha desarrollado el concepto de factores de equivalencia tóxica (FET) para facilitar la evaluación de los riesgos. Estos FET se han establecido para expresar concentraciones de mezclas de PCDD y PCDF sustituidos en las posiciones 2, 3, 7 y 8 y de algunos PCB no-ortosustituidos y mono-ortosustituidos con actividad similar a las dioxinas en equivalentes tóxicos (EQT) de 2,3,7,8-TCDD. Las concentraciones de cada sustancia en una muestra dada se multiplican por sus respectivos FET y se suman a continuación para obtener la concentración total de compuestos similares a las dioxinas, expresada en EQT.

Únicamente a los efectos del presente Reglamento, el límite de cuantificación específico aceptado de un congener individual es la concentración de un analito en el extracto de una muestra que produce una respuesta instrumental a dos iones diferentes que debe controlarse con una relación señal/ruido (S/R) de 3/1 para la señal menos sensible, y que cumple requisitos básicos tales como, por ejemplo, el tiempo de retención y la relación isotópica con arreglo al procedimiento de determinación descrito en el método EPA 1613, revisión B.

3. Requisitos de aseguramiento de la calidad que han de cumplirse en la preparación de las muestras

Son de aplicación las disposiciones generales sobre preparación de las muestras para análisis que se establecen en el anexo II.

Deben cumplirse, además, los siguientes requisitos:

- las muestras deben almacenarse y transportarse en recipientes de vidrio, aluminio, polipropileno o polietileno. Deben eliminarse del recipiente que contiene la muestra los restos de polvo de papel. Los recipientes de vidrio deberán enjuagarse con disolventes previamente sometidos a un control de detección de dioxinas,

⁽¹⁾ DO L 221 de 17.8.2002, p. 8.

- debe efectuarse un análisis en blanco realizando todo el procedimiento analítico, únicamente sin la muestra,
- el peso de la muestra utilizada para la extracción debe ser suficiente para que se cumplan los requisitos relativos a la sensibilidad.

4. Requisitos que deben cumplir los laboratorios

- Los laboratorios deberán demostrar la eficacia de un método en el intervalo del nivel considerado, por ejemplo 0,5, una y dos veces el nivel considerado, con un coeficiente de variación aceptable para análisis repetidos. Por lo que se refiere a los criterios de aceptación, véase el punto 5.
- El límite de cuantificación en un método de confirmación deberá situarse en un intervalo de aproximadamente un quinto del nivel considerado, a fin de garantizar coeficientes de variación aceptables en el intervalo de dicho nivel.
- Como medidas internas de control de calidad, deberán realizarse regularmente controles en blanco y experimentos con muestras enriquecidas o análisis de muestras de control (de preferencia, si existe, material de referencia certificado).
- La participación con éxito en estudios interlaboratorios, que evalúan la aptitud del laboratorio, es la mejor manera de demostrar su competencia para efectuar análisis específicos. No obstante, la participación con éxito en estudios interlaboratorios con muestras, por ejemplo, de suelos o de aguas residuales, no demuestra necesariamente la competencia en relación con muestras de alimentos o de piensos, que presentan niveles de contaminación más bajos. Por tanto, es obligatoria la participación continua en estudios interlaboratorios para la determinación de dioxinas y PCB similares a las dioxinas en las matrices pertinentes de piensos o alimentos.
- Los laboratorios deberán estar acreditados por un organismo reconocido que opere de conformidad con la Guía ISO 58, para asegurarse de que llevan a cabo el aseguramiento de la calidad analítica. Dicha acreditación deberá efectuarse conforme a la norma ISO/IEC/17025.

5. Requisitos aplicables a los procedimientos analíticos para dioxinas y PCB similares a las dioxinas

Requisitos básicos de aceptación de los procedimientos analíticos:

- **Sensibilidad elevada y límites de detección bajos.** En el caso de las PCDD y los PCDF, los umbrales de detección deben situarse en el intervalo de picogramos de EQT (10^{-12} g), habida cuenta de la extrema toxicidad de algunos de estos compuestos. Se sabe que los PCB se presentan en cantidades más elevadas que las PCDD y los PCDF. Para la mayoría de los congéneres de PCB, es suficiente una sensibilidad en el intervalo de nanogramos (10^{-9} g). No obstante, para medir los congéneres de PCB similares a las dioxinas más tóxicos (en particular, los congéneres no-ortosustituídos), es preciso conseguir la misma sensibilidad que para las PCDD y los PCDF.
- **Selectividad elevada (especificidad).** Es necesario distinguir las PCDD, los PCDF y los PCB similares a las dioxinas de una multitud de otros compuestos extraídos simultáneamente de la muestra, que posiblemente interfieran y que están presentes en concentraciones de hasta varios órdenes de magnitud superiores a las de los analitos considerados. Por lo que respecta a los métodos de cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM), es necesario distinguir entre varios congéneres, en particular entre los tóxicos (por ejemplo, los 17 PCDD y PCDF sustituidos en las posiciones 2, 3, 7 y 8 y los PCB similares a las dioxinas) y otros. Los bioensayos deben permitir una determinación selectiva de los valores EQT como suma de PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas.
- **Exactitud elevada (veracidad y precisión).** La determinación deberá proporcionar una estimación válida y fiable de la concentración real en una muestra. A fin de evitar que el resultado del análisis de una muestra sea rechazado debido a la escasa fiabilidad de la estimación de EQT, es necesario lograr un alto grado de exactitud (exactitud de la medición: grado de concordancia entre el resultado de la medición y el valor real o atribuido del mensurando). La exactitud se expresa como veracidad (diferencia entre el valor medio medido de un analito en un material certificado y su valor certificado, expresado como porcentaje de este valor) y precisión (desviación típica relativa, RSD_R , calculada a partir de los resultados obtenidos en condiciones de reproducibilidad).

Los métodos de cribado pueden incluir bioensayos y métodos CG/EM; los métodos de confirmación son métodos de cromatografía de gases de alta resolución/espectrometría de masas de alta resolución (CGAR/EMAR).

Deben cumplirse los siguientes criterios con respecto al valor de EQT total:

	Métodos de cribado	Métodos de confirmación
Porcentaje de falsos negativos	< 1 %	
Veracidad		20 % a + 20 %
Precisión RSD _R	< 30 %	< 15 %

6. **Requisitos específicos que deben cumplir los métodos cg/em utilizados con fines de cribado o de confirmación**

- A fin de validar el procedimiento analítico, deben añadirse, desde el mismo comienzo del método analítico —por ejemplo, antes de la extracción—, patrones internos de PCDD/F clorosustituidos en las posiciones 2, 3, 7 y 8 y marcados con ¹³C, así como patrones internos de PCB similares a las dioxinas marcados con ¹³C. Debe añadirse al menos un congénere por cada grupo homólogo tetra a octoclorado de PCDD/F y al menos un congénere por cada grupo homólogo de PCB similares a las dioxinas (otra posibilidad es añadir al menos un congénere por cada función de registro de iones seleccionada por espectrometría de masas y utilizada para el control de PCDD/F y PCB similares a las dioxinas). Se utilizará preferiblemente, y por supuesto en los métodos de confirmación, el conjunto de los diecisiete patrones internos de PCDD/F sustituidos en las posiciones 2, 3, 7 y 8 y marcados con ¹³C, así como los 12 patrones internos de PCB similares a las dioxinas marcados con ¹³C.
- Deberán determinarse asimismo factores de respuesta relativos en el caso de los congéneres para los que no se añade ningún análogo marcado con ¹³C, empleando las soluciones de calibración apropiadas.
- Para los piensos de origen vegetal y de origen animal con un contenido de grasa inferior al 10 %, es obligatorio añadir patrones internos antes de proceder a la extracción. Por lo que respecta a los piensos de origen animal con un contenido de grasa superior al 10 %, los patrones internos pueden añadirse antes de la extracción o después de la extracción de grasas. Deberá validarse adecuadamente la eficacia de la extracción, en función de la fase en la que se introduzcan los patrones internos y de si los resultados notificados se refieren al producto o a las grasas.
- Con anterioridad al análisis mediante CG/EM, deben añadirse uno o dos patrones de recuperación (sustitutos).
- Es preciso realizar un control de la recuperación. En los métodos de confirmación, los porcentajes de recuperación de cada patrón interno deben situarse en un intervalo del 60 % al 120 %. Se pueden aceptar porcentajes de recuperación inferiores o superiores para congéneres concretos, en particular en relación con algunas dibenzodioxinas y algunos dibenzofuranos hepta y octoclorados, siempre y cuando su contribución al valor de EQT no supere el 10 % del valor total (basado en la suma de PCDD/F y PCB similares a las dioxinas). En los métodos de cribado, los porcentajes de recuperación deben situarse en un intervalo del 30 % al 140 %.
- Las dioxinas deberán separarse de los compuestos clorados interferentes, como son los PCB no similares a las dioxinas y los éteres difenólicos clorados, mediante técnicas de cromatografía adecuadas (de preferencia con una columna de florisil, alúmina o carbono, o de varias de estas sustancias).
- La separación de los isómeros por cromatografía de gases será suficiente (< 25 % de pico a pico entre 1,2,3,4,7,8-HxCDF y 1,2,3,6,7,8-HxCDF).
- La determinación deberá realizarse con arreglo al método EPA 1613, revisión B: *Tetra- through octa-chlorinated dioxins and furans by isotope dilution HRGC/HRMS* (Dioxinas y furanos tetra a octoclorados por dilución isotópica con CGAR/EMAR), u otro método con criterios de rendimiento equivalentes.
- La diferencia entre el límite superior y el límite inferior no debe exceder del 20 % en los piensos cuya contaminación por dioxinas esté próxima o sea superior al nivel máximo. En el caso de los piensos con niveles de contaminación muy inferiores al nivel máximo, la diferencia puede ser del 25 % al 40 %.

7. **Métodos analíticos de cribado**

7.1. *Introducción*

En un método de cribado es posible aplicar distintos enfoques analíticos: un enfoque puramente de cribado y un enfoque cuantitativo.

Enfoque de cribado

La respuesta de las muestras se compara con la de una muestra de referencia en el nivel considerado. Las muestras cuya respuesta es inferior a la de la muestra de referencia se declaran negativas, mientras que las muestras cuya respuesta es superior se consideran supuestamente positivas. Requisitos:

- en cada serie de ensayos deben utilizarse una muestra en blanco y una o varias muestras de referencia, extraídas y analizadas al mismo tiempo y en condiciones idénticas. La respuesta de la muestra de referencia debe ser claramente superior a la del blanco,
- deberán incluirse otras muestras de referencia con una respuesta 0,5 y dos veces mayor que el nivel considerado, a fin de demostrar la eficacia del ensayo en el intervalo de interés para el control del nivel considerado,
- cuando se analicen otras matrices, debe demostrarse la validez de las muestras de referencia, de preferencia utilizando muestras cuyo nivel de EQT, determinado mediante CGAR/EMAR, sea similar, aproximadamente, al de la muestra de referencia o, de lo contrario, un blanco enriquecido hasta ese nivel,
- puesto que en los bioensayos no pueden utilizarse patrones internos, los ensayos de repetibilidad son muy importantes para obtener información sobre la desviación típica en una serie de ensayos. El coeficiente de variación debe ser inferior al 30 %,
- en el caso de los bioensayos, deberán definirse los compuestos de interés, las posibles interferencias y los niveles máximos tolerables de blanco.

Enfoque cuantitativo

El enfoque cuantitativo exige series de diluciones patrón, procesos de limpieza y medición dobles o triples, así como controles en blanco y de recuperación. El resultado puede expresarse en EQT, suponiendo en tal caso que los compuestos responsables de la señal cumplen el principio de EQT. Para ello, puede utilizarse la TCDD (o una mezcla patrón de dioxinas/furanos/PCB similares a las dioxinas) a fin de producir una curva de calibración que permita calcular el nivel de EQT en el extracto y, por tanto, en la muestra. Posteriormente, este resultado se corrige con respecto al nivel de EQT calculado para una muestra en blanco (a fin de tener en cuenta las impurezas procedentes de los disolventes o productos químicos utilizados) y una recuperación (calculada a partir del nivel de EQT en una muestra de control de calidad próxima al límite considerado). Es fundamental tener en cuenta que parte de la pérdida de recuperación aparente puede deberse a efectos matriciales o a las diferencias entre los valores de FET de los bioensayos y los valores oficiales de FET fijados por la OMS.

7.2. Requisitos aplicables a los métodos analíticos de cribado

- El cribado puede realizarse utilizando métodos analíticos de CG/EM o bioensayos. Para los métodos de CG/EM deben aplicarse los criterios establecidos en el punto 6. Por lo que se refiere a los bioensayos celulares y los bioensayos realizados con kits, los requisitos específicos aplicables figuran, respectivamente, en los puntos 7.3 y 7.4.
- Es necesario proporcionar información sobre el número de resultados falsos positivos y falsos negativos obtenidos en una amplia serie de muestras por debajo y por encima del nivel máximo o umbral de intervención, en comparación con el contenido de EQT determinado mediante un método analítico de confirmación. Los porcentajes reales de falsos negativos deben ser inferiores al 1 %. La tasa de falsas muestras positivas deberá ser lo suficientemente baja para que la herramienta de cribado resulte eficaz.
- Los resultados positivos deben confirmarse siempre mediante un método analítico de confirmación (CGAR/EMAR). Además, las muestras de una gama amplia de EQT deberán ser confirmadas por CGAR/EMAR (aproximadamente del 2 % al 10 % de las muestras negativas). Deberá facilitarse información sobre la correspondencia entre los resultados de los bioensayos y los de la CGAR/EMAR.

7.3. Requisitos específicos aplicables a los bioensayos celulares

- Al efectuar un bioensayo, debe utilizarse en cada prueba una serie de concentraciones de referencia de TCDD o una mezcla de dioxinas y furanos (curva de respuesta con un $R^2 > 0,95$ para una dosis completa). Sin embargo, a efectos del cribado, en el análisis de las muestras de baja concentración podría utilizarse una curva detallada en los niveles bajos.
- Para los resultados del bioensayo en un intervalo de tiempo constante, deberá utilizarse una concentración de referencia de la TCDD (aproximadamente tres veces el límite de cuantificación) en una ficha de control de calidad. Otra posibilidad sería utilizar la respuesta relativa de una muestra de referencia comparada con la línea de calibración de la TCDD, ya que la respuesta de las células puede depender de múltiples factores.
- Deberán registrarse y comprobarse los gráficos de control de calidad correspondientes a cada tipo de material de referencia, para asegurarse de que el resultado es conforme con las directrices establecidas.

- La inducción de la dilución de la muestra utilizada debe situarse en la parte lineal de la curva de respuesta, en particular para los cálculos cuantitativos. Las muestras situadas por encima de la parte lineal de la curva de respuesta deben diluirse y analizarse de nuevo. Por tanto, se recomienda analizar tres o más diluciones a la vez.
- La desviación típica porcentual no deberá ser superior al 15 % en una determinación por triplicado de cada dilución de la muestra, ni superior al 30 % entre tres experimentos independientes.
- El límite de detección puede fijarse en tres veces la desviación típica del blanco de disolvente o de la respuesta de fondo. Otro enfoque consiste en aplicar una respuesta superior a la de fondo (factor de inducción cinco veces superior al blanco de disolvente) calculada a partir de la curva de calibración del día. El límite de cuantificación puede fijarse en cinco a seis veces la desviación típica del blanco de disolvente o de la respuesta de fondo, o bien puede aplicarse una respuesta muy superior a la de fondo (factor de inducción diez veces superior al blanco de disolvente) calculada a partir de la curva de calibración del día.

7.4. *Requisitos específicos aplicables a los bioensayos realizados con kits*

- Deberá estar garantizado que los bioensayos realizados con kits tienen la suficiente sensibilidad y son lo bastante fiables para ser empleados con piensos.
- Deben respetarse las instrucciones del fabricante por lo que respecta a la preparación de las muestras y los análisis.
- Los kits no se utilizarán después de la fecha de caducidad.
- No se utilizarán materiales o componentes previstos para otros kits.
- Los kits de ensayo deberán conservarse y utilizarse a las temperaturas de almacenamiento y empleo indicadas.
- El límite de detección para los inmunoensayos viene determinado por la suma de la media más un valor igual a tres veces la desviación típica, para una serie de diez análisis repetidos del blanco, cuyo resultado ha de dividirse por el valor de la pendiente de la ecuación de regresión lineal.
- Deberán utilizarse patrones de referencia para los análisis de laboratorio, a fin de garantizar que el grado de respuesta al patrón se sitúa en un intervalo aceptable.

8. **Comunicación de los resultados**

En la medida en que el procedimiento analítico seguido lo permita, los resultados del análisis deberán incluir los niveles de los congéneres individuales de PCDD/F y PCB e indicarse como límite inferior, límite superior y límite intermedio, a fin de aportar el máximo de información posible en la comunicación de los resultados, permitiendo así interpretarlos en función de los requisitos específicos.

El informe deberá indicar, asimismo, el contenido en lípidos de la muestra, así como el método utilizado para su extracción.

Deben indicarse los porcentajes de recuperación de cada patrón interno en caso de que estén fuera del intervalo mencionado en el punto 6 o de que se supere el nivel máximo, y en otros casos en que se solicite.

Puesto que, al decidir sobre la conformidad de una muestra, se ha de tener en cuenta la incertidumbre de medida, también deberá indicarse este parámetro. Así pues, los resultados analíticos deberán expresarse como $x \pm U$, donde x es el resultado analítico y U la incertidumbre de medida expandida, aplicando un factor de cobertura de 2, que ofrece un nivel de confianza aproximado del 95 %. En caso de que se determinen por separado las dioxinas y los PCB similares a las dioxinas, para la suma de ambos debe emplearse la suma de la incertidumbre expandida calculada correspondiente a los resultados analíticos obtenidos por separado para las dioxinas y los PCB similares a las dioxinas.

Si la incertidumbre de medida se tuviera en cuenta aplicando un CCa (según se describe en el punto I.2 de esta parte B), deberá indicarse este parámetro.

ANEXO VI

MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPONENTES DE ORIGEN ANIMAL CON FINES DE CONTROL OFICIAL DE LOS PIENSOS**Condiciones para la detección, identificación o estimación microscópica de los componentes de origen animal presentes en los piensos****1. Objeto y ámbito de aplicación**

Las presentes condiciones se aplicarán cuando la detección de componentes de origen animal (definidos como productos derivados del procesamiento de cuerpos y partes de cuerpos de mamíferos, aves de corral y pescado) en los piensos se realice mediante examen microscópico en el marco del programa de inspección coordinado en el ámbito de la alimentación animal, conforme al Reglamento (CE) n° 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo ⁽¹⁾. Si en todos los exámenes oficiales se utilizan los métodos del presente anexo, podrá también efectuarse un segundo examen utilizando variantes de los métodos o métodos alternativos, a fin de mejorar la detección de determinados tipos de componentes animales o precisar más el origen de estos componentes. Por otra parte, en el examen de determinados componentes animales específicos, como son el plasma o los huesos presentes en el sebo (véase el punto 9), podrá utilizarse una variante del protocolo, a condición de que los correspondientes análisis se realicen como complemento de los previstos en el programa de inspección coordinado.

2. Sensibilidad

En función de su naturaleza, pueden detectarse en los piensos cantidades muy pequeñas de componentes de origen animal (< 0,1 %).

3. Principio

Para la identificación se emplea una muestra representativa tomada conforme a lo dispuesto en el anexo I y preparada convenientemente. El siguiente protocolo es apto para la manipulación de piensos con bajo contenido de humedad. Los piensos con un contenido de humedad superior al 14 % deberán secarse (condensarse) antes de ser manipulados. Determinados piensos o materiales para piensos (por ejemplo, grasas y aceites) requieren un tratamiento específico (véase el punto 9). Los componentes de origen animal se identifican sobre la base de unas características típicas microscópicamente identificables (por ejemplo, fibras musculares y otras partículas de carne, cartílago, huesos, cuerno, pelo, cerdas, sangre, plumas, cáscaras de huevo y espinas o escamas de pescado). La identificación debe realizarse tanto en la fracción de tamiz (6.1) como en el sedimento concentrado (6.2) de la muestra.

4. Reactivos**4.1. Agente de inclusión**

4.1.1. Hidrato de cloral (acuoso, 60 % p/v).

4.1.2. Lejía (NaOH al 2,5 % p/v, o KOH al 2,5 % p/v) para fracciones de tamiz.

4.1.3. Aceite de parafina o glicerol (viscosidad: 68-81) para las observaciones microscópicas en el sedimento.

4.2. Agentes de lavado

4.2.1. Alcohol al 96 %.

4.2.2. Acetona.

4.3. Agente de concentración

4.3.1. Tetracloroetileno (densidad 1,62).

⁽¹⁾ DO L 165 de 30.4.2004, p. 1. Versión corregida en el DO L 191 de 28.5.2004, p. 1.

4.4. *Reactivos de tinción*

- 4.4.1. Solución de yodo y yoduro de potasio (disolver 2 g de yoduro de potasio en 100 ml de agua y añadir 1 g de yodo, agitando con frecuencia).
- 4.4.2. Rojo de alizarina (diluir 2,5 ml de ácido clorhídrico 1M en 100 ml de agua y añadir a esta solución 200 mg de rojo de alizarina).
- 4.4.3. Reactivo de cistina (2 g de acetato de plomo, 10 g de NaOH/100 ml de H₂O).
- 4.4.4. Solución de yodo y yoduro de potasio (disuelta en etanol al 70 %).

4.5. *Reactivo decolorante*

- 4.5.1 Solución comercial de hipoclorito de sodio (9,6 % de cloro activo).

5. **Equipo y accesorios**

- 5.1. Balanza analítica (exactitud de 0,01 g, salvo para el sedimento concentrado: 0,001 g).
- 5.2. Material de trituración (molino o mortero, especialmente para piensos que contengan > 15 % de grasa en análisis).
- 5.3. Tamiz con luces de malla cuadradas de 0,50 mm de lado como máximo.
- 5.4. Embudo de decantación o vaso de precipitado de fondo cónico.
- 5.5. Lupa binocular (mínimo de 40 aumentos).
- 5.6. Microscopio compuesto (mínimo de cuatrocientos aumentos) de luz transmitida o polarizada.
- 5.7. Material de vidrio habitual de laboratorio.

Todo el equipo se limpiará a fondo. Los embudos de decantación y el material de vidrio deben lavarse en máquina lavadora. Los tamices deben limpiarse con un cepillo de cerdas rígidas.

6. **Procedimiento**

Los piensos granulados pueden tamizarse previamente si ambas fracciones se analizan como muestras aparte.

Se tratarán al menos 50 g de muestra (cuidadosamente molidos con el equipo adecuado (5.2), si es necesario para lograr una estructura apropiada). Se tomarán dos porciones representativas del material molido, una para la fracción de tamiz (5 g como mínimo) (6.1) y otra para el sedimento concentrado (5 g como mínimo) (6.2). Para facilitar la identificación, pueden utilizarse también reactivos de tinción (6.3).

Para indicar la naturaleza de las proteínas animales y el origen de las partículas, puede utilizarse un sistema de apoyo a la decisión como ARIES y pueden documentarse muestras de referencia.

6.1. *Identificación de componentes de origen animal en las fracciones de tamiz*

Se pasan por el tamiz (5.3) un mínimo de 5 g de la muestra en dos fracciones.

La fracción o fracciones de tamiz con partículas grandes (o una parte representativa de la fracción) se aplican en una capa fina a un portaobjetos adecuado y se observan sistemáticamente a la lupa binocular (5.5) a diversos aumentos, para comprobar la presencia de componentes de origen animal.

Las extensiones hechas con la fracción o las fracciones de tamiz con partículas finas se observan sistemáticamente al microscopio compuesto (5.6) a diversos aumentos, para comprobar la presencia de componentes de origen animal.

6.2. *Determinación de componentes de origen animal del sedimento concentrado*

Se transferirán un mínimo de 5 g (con una exactitud de 0,01 g) de la muestra a un embudo de decantación o un vaso de precipitado de fondo cónico y se tratarán con al menos 50 ml de tetracloroetileno (4.3.1). La mezcla se agitará o removerá varias veces.

- Si se utiliza un embudo de decantación cerrado, deberá dejarse reposar el sedimento durante tiempo suficiente (al menos tres minutos) antes de separarlo. Después volverá a agitarse y a dejarse reposar el sedimento durante al menos tres minutos. Seguidamente, el sedimento volverá a separarse.
- Si se utiliza un vaso de precipitado abierto, el sedimento se dejará reposar durante al menos cinco minutos antes de separarlo.

El sedimento total se secará y posteriormente se pesará (con una exactitud de 0,001 g). La pesada solo será necesaria si se requiere una estimación. Si el sedimento se compone de muchas partículas grandes, podrá pasarse por un tamiz (5.3) en dos fracciones. El sedimento seco se examinará a la lupa binocular (5.5) y al microscopio compuesto (5.6) para buscar componentes óseos.

6.3. *Uso de agentes de inclusión y de reactivos de tinción*

La identificación microscópica de los componentes de origen animal puede facilitarse utilizando agentes de inclusión y reactivos de tinción especiales.

Hidrato de cloral (4.1.1): al calentarse cuidadosamente, las estructuras celulares pueden apreciarse con más claridad, pues los granos de almidón se gelatinizan y el contenido celular no deseado se elimina.

Lejía (4.1.2): tanto el hidróxido de sodio como el hidróxido de potasio clarifican las materias constitutivas de los piensos, lo que ayuda a detectar fibras musculares, pelos y otras estructuras queratínicas.

Aceite de parafina o glicerol (4.1.3): los componentes óseos pueden identificarse bien en este agente de inclusión, ya que la mayor parte de las lagunas se mantienen llenas de aire y aparecen como agujeros negros de 5-15 µm.

Solución de yodo y yoduro de potasio (4.4.1): se utiliza para la detección de almidón (color entre azul y violeta) y proteínas (color entre amarillo y naranja). Si es necesario, las soluciones pueden diluirse.

Solución de rojo de alizarina (4.4.2): coloración roja/rosada de huesos, espinas y escamas. Antes de secar el sedimento (véase el punto 6.2), el sedimento total se transferirá a un tubo de ensayo de vidrio y se enjuagará dos veces con unos 5 ml de alcohol (4.2.1) (en ambas ocasiones deberá utilizarse un vortex y deberá dejarse reposar el disolvente aproximadamente un minuto antes de decantarlo). Antes de utilizar este reactivo de tinción, el sedimento se decolorará añadiendo al menos 1 ml de solución de hipoclorito de sodio (4.5.1). Se dejará que la reacción continúe durante diez minutos. El tubo se llenará de agua y se dejará sedimentar durante dos a tres minutos, tras lo cual se decantarán el agua y las partículas suspendidas. El sedimento se enjuagará dos veces más con unos 10 ml de agua (utilizar un vortex, dejar reposar y decantar el agua cada vez). Se añadirán de dos a diez gotas o más (dependiendo de la cantidad de residuo) de la solución de rojo de alizarina. Se agitará la mezcla y se dejará reaccionar unos segundos. El sedimento coloreado se enjuagará dos veces con aproximadamente 5 ml de alcohol (4.2.1) y seguidamente una vez con acetona (4.2.2) (en cada ocasión deberá utilizarse un vortex y deberá dejarse reposar el disolvente alrededor de un minuto antes de decantarlo). El sedimento estará entonces listo para secar.

Reactivo de cistina (4.4.3): calentados cuidadosamente, los componentes que contienen cistina (pelo, plumas, etc.) adquieren un color entre negro y marrón.

6.4. *Examen de piensos que posiblemente contienen harina de pescado*

Se examinará al microscopio compuesto al menos una extensión de la fracción fina de tamiz y de la fracción fina del sedimento (véanse los puntos 6.1 y 6.2).

Cuando la etiqueta indique que los ingredientes incluyen harina de pescado, o si se sospecha o se ha detectado su presencia en el examen inicial, se examinarán al menos dos extensiones adicionales de la fracción fina de tamiz de la muestra original y de la fracción de sedimento total.

7. **Cálculo y evaluación**

Los Estados miembros velarán por que se apliquen los procedimientos descritos en este punto cuando se realice un análisis oficial para estimar la cantidad (y no sólo la presencia) de componentes animales.

El cálculo solo puede hacerse si los componentes de origen animal contienen fragmentos óseos.

En el portaobjetos, los fragmentos óseos de especies terrestres de sangre caliente (es decir, mamíferos y aves) pueden distinguirse de los diversos tipos de espinas de pescado gracias a sus típicas lagunas. La proporción de componentes de origen animal en el material de muestra se estima tomando en consideración:

- la proporción estimada (porcentaje en peso) de fragmentos óseos en el sedimento concentrado, y
- la proporción (porcentaje en peso) de hueso presente en los componentes de origen animal.

La estimación debe basarse en al menos tres (si es posible) extensiones y al menos cinco campos por extensión. En los piensos compuestos, el sedimento concentrado contiene, por regla general, no solo fragmentos de huesos de animales terrestres y espinas de pescado, sino también otras partículas de peso específico elevado como, por ejemplo, minerales, arena, fragmentos vegetales lignificados y similares.

7.1. Valor estimado del porcentaje de fragmentos óseos

Porcentaje de fragmentos de huesos de animales terrestres = $(S \times c)/P$.

Porcentaje de fragmentos de espinas y escamas de pescados = $(S \times d)/P$.

(S = peso del sedimento [miligramos]; c = factor de corrección [tanto por ciento] para la porción estimada de huesos de animales terrestres del sedimento; d = factor de corrección [tanto por ciento] para la porción estimada de fragmentos de espinas y escamas de pescado del sedimento, P = peso del material de muestra para la sedimentación [miligramos]).

7.2. Valor estimado de los componentes de origen animal

La proporción de componentes óseos en productos animales puede variar considerablemente. (El porcentaje óseo en el caso de las harinas de huesos es del orden del 50-60 %, y en el de las harinas de carne del orden del 20-30 %; en el caso de las harinas de pescado, el contenido de espinas y escamas varía según la categoría y el origen de la harina, pero normalmente es del orden del 10-20 %).

Si se conoce el tipo de harina animal presente en la muestra, pueden hacerse la siguientes estimaciones del contenido:

contenido estimado de componentes de productos de animales terrestres (en tanto por ciento) = $(S \times c)/(P \times f) \times 100$,

contenido estimado de componentes de productos de pescado (en tanto por ciento) = $(S \times d)/(P \times f) \times 100$.

(S = peso del sedimento [miligramos]; c = factor de corrección [tanto por ciento] para la porción estimada de componentes de huesos de animales terrestres del sedimento; d = factor de corrección [tanto por ciento] para la porción estimada de fragmentos de espinas y escamas de pescado del sedimento; f = factor de corrección para la proporción ósea de los componentes de origen animal de la muestra examinada; P = peso del material de muestra para la sedimentación [miligramos]).

8. Expresión del resultado del examen

El informe contendrá, como mínimo, información sobre la presencia de componentes derivados de animales terrestres y de harina de pescado. Los diversos casos se comunicarán de la siguiente forma:

8.1. En cuanto a la presencia de componentes derivados de animales terrestres:

- dentro de los límites del examen microscópico, no se ha detectado en la muestra presentada ningún componente derivado de animales terrestres,

o bien:

- dentro de los límites del examen microscópico, se han detectado en la muestra presentada componentes derivados de animales terrestres.

8.2. Y, en cuanto a la presencia de harina de pescado:

- dentro de los límites del examen microscópico, no se ha detectado en la muestra presentada ningún componente derivado de pescado,

o bien:

- dentro de los límites del examen microscópico, se han detectado en la muestra presentada componentes derivados de pescado.

En caso de que se detecten componentes derivados de pescado o de animales terrestres, el informe del resultado del examen puede incluir también, si es necesario, una estimación de la cantidad de componentes detectada (x %, < 0,1 %, 0,1-0,5 %, 0,5-5 % o > 5 %) y especificar el tipo de animal terrestre, si es posible, así como los componentes animales identificados (fibras musculares, cartilago, huesos, cuerno, pelo, cerdas, plumas, sangre, cáscaras de huevo y espinas o escamas de pescado).

Si se hace una estimación de la cantidad de ingredientes animales, se indicará el factor de corrección, f, utilizado.

Si se identifican componentes óseos de animales terrestres, el informe deberá incluir la frase siguiente:

«No puede descartarse la posibilidad de que los componentes mencionados procedan de mamíferos».

No será necesario incluir esta frase cuando se haya especificado que los fragmentos óseos de animales terrestres proceden de aves de corral o de mamíferos.

9. **Protocolo opcional para el análisis de grasas o aceites**

En el análisis de grasas o aceites podrá utilizarse el siguiente protocolo:

- Si la grasa es sólida, se calienta, por ejemplo, en un microondas hasta su licuefacción.
 - A continuación, se pipetea 40 ml de grasa del fondo de la muestra a un tubo de centrifugación.
 - Se centrifuga durante diez minutos a 4 000 revoluciones por minuto.
 - Si, tras la centrifugación, la grasa se ha solidificado, se vuelve a calentar en una estufa hasta su licuefacción. Se repite la centrifugación durante cinco minutos a 4 000 revoluciones por minuto.
 - Por medio de una cucharilla o una espátula se transfiere la mitad de las impurezas decantadas a una pequeña placa de Petri o a un portaobjetos, para determinar al microscopio la posible presencia de componentes de origen animal (fibras de carne, plumas, fragmentos óseos, etc.). Como agente de inclusión para la microscopia se recomienda aceite de parafina o glicerol.
 - Las impurezas restantes se utilizan para la sedimentación descrita en el punto 6.2.
-

ANEXO VII

MÉTODO DE CÁLCULO DEL VALOR ENERGÉTICO DE LOS PIENSOS PARA AVES DE CORRAL**1. Método de cálculo y expresión del valor energético**

El valor energético de los piensos compuestos para aves de corral debe calcularse según la fórmula que figura más abajo, sobre la base de los porcentajes de determinados componentes analíticos de los piensos. Este valor ha de expresarse en megajulios (MJ) de energía metabolizable (EM), corregida en nitrógeno, por kilogramo de pienso compuesto:

$$\text{MJ/kg de EM} = 0,1551 \times \% \text{ proteína bruta} + 0,3431 \times \% \text{ grasa bruta} + 0,1669 \times \% \text{ almidón} + 0,1301 \times \% \text{ azúcar total (expresada en sacarosa).}$$

2. Tolerancias aplicables a los valores declarados

Si la inspección oficial pone de manifiesto una discrepancia (valor energético del pienso aumentado o reducido) entre el resultado de la inspección y el valor energético declarado, se aplicará una tolerancia mínima de 0,4 MJ/kg de EM.

3. Expresión del resultado

El resultado obtenido tras aplicar la fórmula anteriormente indicada se expresará con un decimal.

4. Métodos de muestreo y análisis

El muestreo del pienso compuesto y la determinación del contenido de los compuestos analíticos indicados en el método de cálculo deben realizarse de conformidad, respectivamente, con los métodos comunitarios de muestreo y los métodos comunitarios de análisis para el control oficial de los piensos.

Han de aplicarse:

- para la determinación del contenido de grasa bruta: el procedimiento B del método para la determinación de los aceites y las grasas brutos, establecido en la parte H del anexo III,
 - para la determinación del contenido de almidón: el método polarimétrico establecido en la parte L del anexo III.
-

ANEXO VIII

MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA EL CONTROL DE LA PRESENCIA ILEGAL DE ADITIVOS YA NO AUTORIZADOS EN LOS PIENSOS*Nota importante:*

Para detectar la presencia ilegal de aditivos ya no autorizados en los piensos pueden emplearse métodos de análisis más sensibles que los mencionados en el presente anexo.

Los métodos de análisis expuestos en este anexo se utilizarán con fines de confirmación.

A) DETERMINACIÓN DEL METILBENZOCUATO

7-benziloxi-6-butil-3-metoxicarbonil-4-quinolona

1. Objeto y ámbito de aplicación

Este método permite determinar el nivel de metilbenzocuat en los piensos. El límite de cuantificación es de 1 mg/kg.

2. Principio

El metilbenzocuat se extrae de la muestra con solución metanólica de ácido metanosulfónico. El extracto se purifica con diclorometano, por cromatografía de intercambio iónico y, a continuación, nuevamente con diclorometano. El contenido de metilbenzocuat se determina mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) de fase reversa con un detector de UV.

3. Reactivos

3.1. Diclorometano

3.2. Metanol, equivalente al de calidad CLAR

3.3. Fase móvil para la CLAR

Mezcla de metanol (3.2) y agua (equivalente a la de calidad CLAR) 75 + 25 (v + v).

Filtrar por un filtro de 0,22 µm (4.5) y desgasificar la solución (por ejemplo, aplicando ultrasonidos durante diez minutos).

3.4. Solución de ácido metanosulfónico, c = 2 %

Diluir 20,0 ml de ácido metanosulfónico a 1 000 ml con metanol (3.2).

3.5. Solución de ácido clorhídrico, c = 10 %

Diluir 100 ml de ácido clorhídrico (ρ_{20} 1,18 g/ml) a 1 000 ml con agua.

3.6. Resina de intercambio catiónico Amberlite CG-120 (Na), de 100 a 200 mallas

La resina se trata previamente antes de utilizarla. Preparar una lechada con 100 g de resina y 500 ml de solución de ácido clorhídrico (3.5) y llevar a ebullición en una placa calefactora sin parar de remover. Dejar enfriar y decantar el ácido. Filtrar en vacío a través de un papel de filtro. Lavar la resina dos veces con porciones de agua de 500 ml y, a continuación, con 250 ml de metanol (3.2). Enjuagar la resina con otra porción de 250 ml de metanol y secar haciendo pasar aire a través de la torta de filtro. Guardar la resina desecada en una botella tapada.

- 3.7. Sustancia patrón: metilbenzocuoato puro (7-benziloxi-6-butil-3-metoxicarbonil-4-quinolona).
- 3.7.1. Solución patrón madre de metilbenzocuoato de 500 µg/ml.
- Pesar, con una precisión de 0,1 mg, 50 mg de la sustancia patrón (3.7), disolver en solución de ácido metanosulfónico (3.4) en un matraz aforado de 100 ml, enrasar y mezclar.
- 3.7.2. Solución patrón intermedia de metilbenzocuoato de 50 µg/ml.
- Transvasar 5,0 ml de la solución patrón madre de metilbenzocuoato (3.7.1) a un matraz aforado de 50 ml, enrasar con metanol (3.2) y mezclar.
- 3.7.3. Soluciones de calibración.
- Transvasar 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 y 5,0 ml de la solución patrón intermedia de metilbenzocuoato (3.7.2) a una serie de matraces aforados de 25 ml. Enrasar con la fase móvil (3.3) y mezclar. Estas soluciones tienen concentraciones de metilbenzocuoato de 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 y 10,0 µg/ml, respectivamente. Deben prepararse poco antes de utilizarse.
4. **Instrumental**
- 4.1. Agitador de laboratorio.
- 4.2. Evaporador rotativo de película.
- 4.3. Columna de vidrio (250 mm × 15 mm) provista de una llave de cierre y de un depósito de 200 ml de capacidad, aproximadamente.
- 4.4. Equipo para CLAR con detector ultravioleta de longitud de onda variable o detector de red de diodos.
- 4.4.1. Columna cromatográfica de líquidos: 300 mm x 4 mm, C₁₈, relleno de 10 µm, o equivalente.
- 4.5. Filtros de membrana de 0,22 µm.
- 4.6. Filtros de membrana de 0,45 µm.
5. **Procedimiento**
- 5.1. *Generalidades*
- 5.1.1. Deberá analizarse un pienso en blanco para comprobar la ausencia de metilbenzocuoato y de sustancias interferentes.
- 5.1.2. Asimismo, deberá realizarse un ensayo de recuperación analizando el pienso en blanco, que se habrá enriquecido añadiendo una cantidad de metilbenzocuoato similar a la presente en la muestra. Para enriquecer a un nivel de 15 mg/kg, añadir 600 µl de la solución patrón madre (3.7.1) a 20 g del pienso en blanco, mezclar y esperar diez minutos antes de proceder a la extracción (5.2).
- Debe tenerse en cuenta que, a los efectos de este método, el pienso en blanco deberá ser de tipo similar al de la muestra y en su análisis no debe detectarse metilbenzocuoato.
- 5.2. *Extracción*
- Pesar, con una precisión de 0,01 g, unos 20 g de la muestra preparada y pasarlos a un Erlenmeyer de 250 ml. Añadir 100,0 ml de la solución de ácido metanosulfónico (3.4) y agitar mecánicamente (4.1) durante 30 minutos. Filtrar la solución por un papel de filtro y conservar el filtrado para la fase de separación líquido-líquido (5.3).
- 5.3. *Separación líquido-líquido*
- Transvasar 25,0 ml del filtrado obtenido en el punto 5.2 a un embudo de decantación de 500 ml que contenga 100 ml de solución de ácido clorhídrico (3.5). Añadir 100 ml de diclorometano (3.1) al embudo y agitar durante un minuto. Dejar que se separen las fases y decantar la fase inferior (diclorometano) en un matraz de fondo redondo de 500 ml. Repetir la extracción de la fase acuosa con otras dos porciones de 40 ml de diclorometano y combinarlas con el primer extracto en el matraz de fondo redondo. Evaporar el extracto de diclorometano hasta sequedad en el evaporador rotativo (4.2) a 40 °C y a presión reducida. Disolver el residuo en 20-25 ml de metanol (3.2), tapar el matraz y guardar todo el extracto para la cromatografía de intercambio iónico (5.4).

5.4. *Cromatografía de intercambio iónico*

5.4.1. Preparación de la columna de intercambio catiónico.

Introducir un tapón de lana de vidrio en el extremo inferior de una columna de vidrio (4.3). Preparar una lechada con 5,0 g de la resina de intercambio catiónico tratada (3.6) y 50 ml de ácido clorhídrico (3.5), verterla en la columna de vidrio y dejarla reposar. Eliminar el ácido sobrante hasta justo por encima de la superficie de resina y lavar la columna con agua hasta que el líquido efluyente dé neutro al tornasol. Transvasar 50 ml de metanol (3.2) a la columna y dejar evacuar hasta la superficie de la resina.

5.4.2. Cromatografía de columna.

Pipetear cuidadosamente a la columna el extracto obtenido en el punto 5.3. Enjuagar el matraz de fondo redondo con dos porciones de 5 ml a 10 ml de metanol (3.2) y transvasar estos líquidos de lavado a la columna. Dejar correr el extracto hasta la superficie de resina y lavar la columna con 50 ml de metanol, cuidando de que el caudal no sea superior a 5 ml por minuto. Desechar el líquido efluyente. Eluir el metilbenzocato de la columna utilizando 150 ml de solución de ácido metanosulfónico (3.4) y recoger el eluido de la columna en un Erlenmeyer de 250 ml.

5.5. *Separación líquido-líquido*

Transferir el eluido obtenido en el punto 5.4.2 a un embudo de decantación de 1 l. Enjuagar el Erlenmeyer con 5 ml a 10 ml de metanol (3.2) y combinar los líquidos de lavado con el contenido del embudo de decantación. Añadir 300 ml de una solución de ácido clorhídrico (3.5) y 130 ml de diclorometano (3.1). Agitar durante un minuto y dejar que las fases se separen. Decantar la fase inferior (diclorometano) en un matraz de fondo redondo de 500 ml. Repetir la extracción de la fase acuosa con otras dos porciones de 70 ml de diclorometano y combinar estos extractos con el primero en el matraz de fondo redondo.

Evaporar el extracto de diclorometano hasta sequedad en el evaporador rotativo (4.2) a 40 °C y a presión reducida. Disolver el residuo en el matraz con unos 5 ml de metanol (3.2) y transvasar cuantitativamente esta solución a un matraz aforado de 10 ml. Enjuagar el matraz de fondo redondo con otras dos porciones de 1 ml a 2 ml de metanol y transvasarlas al matraz aforado. Enrasar con metanol y mezclar. Filtrar una parte alícuota por un filtro de membrana (4.6). Reservar esta solución para la determinación mediante CLAR (5.6).

5.6. *Determinación mediante CLAR*

5.6.1. Parámetros.

Las siguientes condiciones se ofrecen con carácter orientativo; pueden aplicarse otras si arrojan resultados equivalentes:

- columna cromatográfica de líquidos (4.4.1),
- fase móvil para la CLAR: mezcla de metanol y agua (3.3),
- caudal: 1-1,5 ml/min,
- longitud de onda de detección: 265 nm,
- volumen de inyección: 20-50 µl.

Comprobar la estabilidad del sistema cromatográfico inyectando varias veces la solución de calibración (3.7.3) de 4 µg/ml, hasta que se alcancen alturas (o áreas) de pico y tiempos de retención constantes.

5.6.2. Curva de calibración.

Inyectar varias veces cada solución de calibración (3.7.3) y medir las alturas (áreas) de pico de cada concentración. Trazar una curva de calibración empleando las alturas o áreas de pico medias de las soluciones de calibración como ordenadas y las concentraciones correspondientes, en microgramos por mililitro, como abscisas.

5.6.3. Solución de muestra.

Inyectar varias veces el extracto de muestra (5.5) empleando el mismo volumen que para las soluciones de calibración, y determinar la altura (área) media de los picos de metilbenzocato.

6. **Cálculo de los resultados**

A partir de la altura (área) media de los picos de metilbenzocato de la solución de muestra, determinar la concentración de esta última, en microgramos por mililitro, tomando como referencia la curva de calibración (5.6.2).

El contenido de metilbenzocuat p (miligramos por kilogramo) de la muestra viene dado por la siguiente fórmula:

$$w = \frac{c \times 40}{m}$$

en la cual:

c = concentración de metilbenzocuat de la solución de muestra, en microgramos por mililitro;

m = peso de la porción de ensayo, en gramos.

7. Validación de los resultados

7.1. Identidad

La identidad del analito puede confirmarse mediante cocromatografía, o utilizando un detector de red de diodos con el cual se comparan los espectros del extracto de muestra y de la solución de calibración (3.7.3) de 10 µg/ml.

7.1.1. Cocromatografía.

Enriquecer un extracto de muestra añadiéndole una cantidad apropiada de la solución patrón intermedia (3.7.2). La cantidad de metilbenzocuat añadida debe ser similar a la cantidad estimada de metilbenzocuat en el extracto de muestra.

Solo la altura del pico de metilbenzocuat deberá aumentar en función de la cantidad añadida y de la dilución del extracto. La anchura del pico, a la mitad de su altura máxima, debe ser igual ± 10 % a la anchura original.

7.1.2. Detección por red de diodos.

Los resultados se evalúan con arreglo a los siguientes criterios:

- a) la longitud de onda de absorción máxima de los espectros de la muestra y del patrón, registrados en el vértice del pico del cromatograma, debe ser la misma dentro de un margen determinado por el poder de resolución del sistema de detección; en el caso de la detección por red de diodos, el margen típico se sitúa en aproximadamente 2 nm;
- b) entre 220 nm y 350 nm, los espectros de la muestra y del patrón registrados en el vértice del pico del cromatograma no deben ser diferentes por lo que respecta a aquellas partes del espectro que se encuentran en un intervalo del 10 % al 100 % de la absorbancia relativa; se cumple este criterio cuando están presentes los mismos máximos y en ningún punto observado la desviación entre los dos espectros excede del 15 % de la absorbancia del analito patrón;
- c) entre 220 nm y 350 nm, los espectros de la pendiente ascendente, del vértice y de la pendiente descendente del pico producido por el extracto de muestra no deben diferir entre sí por lo que respecta a las partes del espectro que se encuentran en un intervalo del 10 % al 100 % de la absorbancia relativa; se cumple este criterio cuando están presentes los mismos máximos y en ningún punto observado la desviación entre los espectros excede del 15 % de la absorbancia del espectro del vértice.

Si no se cumple alguno de estos criterios, la presencia del analito no queda confirmada.

7.2. Repetibilidad

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas con la misma muestra no debe exceder del 10 % del resultado superior, en el caso de contenidos de metilbenzocuat de 4-20 mg/kg.

7.3. Recuperación

La recuperación de la muestra en blanco enriquecida deberá ser al menos del 90 %.

8. Resultados de un estudio colaborativo

Se analizaron cinco muestras en diez laboratorios. De cada muestra se hicieron análisis por duplicado.

	Blanco	Sémola 1	Gránulo 1	Sémola 2	Gránulo 2
Media [mg/kg]	ND	4,50	4,50	8,90	8,70
S _r [mg/kg]	—	0,30	0,20	0,60	0,50

	Blanco	Sémola 1	Gránulo 1	Sémola 2	Gránulo 2
CV _r [%]	—	6,70	4,40	6,70	5,70
S _R [mg/kg]	—	0,40	0,50	0,90	1,00
CV _R [%]	—	8,90	11,10	10,10	11,50
Recuperación [%]	—	92,00	93,00	92,00	89,00

ND = no detectado

S_r = desviación típica de la repetibilidad

CV_r = coeficiente de variación de la repetibilidad, en tanto por ciento

S_R = desviación típica de la reproducibilidad

CV_R = coeficiente de variación de la reproducibilidad, en tanto por ciento

B) DETERMINACIÓN DEL OLAQUINDOX

N¹,N⁴-dióxido de 2-[N-2'-(hidroxietil)carbamoil]-3-metilquinoxalina

1. Objeto y ámbito de aplicación

Este método permite determinar el nivel de olaquindox en los piensos. El límite de cuantificación es de 5 mg/kg.

2. Principio

La muestra se extrae mediante una mezcla de agua y metanol. El contenido de olaquindox se determina mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) de fase reversa, empleando un detector de UV.

3. Reactivos

3.1. Metanol.

3.2. Metanol, equivalente al de calidad CLAR.

3.3. Agua, equivalente a la de calidad CLAR.

3.4. Fase móvil para la CLAR.

Mezcla de agua (3.3) y metanol (3.2), 900 + 100 (V + V).

3.5. Sustancia patrón: olaquindox puro, N¹,N⁴-dióxido de 2-[N-2'-(hidroxietil)carbamoil]-3-metilquinoxalina, E 851.

3.5.1. Solución patrón madre de olaquindox de 250 µg/ml.

Pesar, con una precisión de 0,1 mg, 50 mg de olaquindox (3.5) en un matraz aforado de 200 ml y añadir unos 190 ml de agua. A continuación, introducir el matraz durante 20 minutos en un baño ultrasónico (4.1). Después del tratamiento de ultrasonidos, llevar la solución a temperatura ambiente, enrasar con agua y mezclar. Envolver el matraz con papel de aluminio y guardarlo en el frigorífico. Esta solución debe prepararse de nuevo cada mes.

3.5.2. Solución patrón intermedia de olaquindox de 25 µg/ml.

Transvasar 10,0 ml de la solución patrón madre (3.5.1) a un matraz aforado de 100 ml, enrasar con la fase móvil (3.4) y mezclar. Envolver el matraz con papel de aluminio y guardarlo en el frigorífico. Esta solución debe prepararse de nuevo cada día.

3.5.3. Soluciones de calibración.

Transvasar 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0 y 20,0 ml de la solución patrón intermedia (3.5.2) a una serie de matraces aforados de 50 ml. Enrasar con la fase móvil (3.4) y mezclar. Envolver los matraces con papel de aluminio. Estas soluciones corresponden, respectivamente, a 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 y 10,0 µg/ml de olaquindox.

Deben prepararse de nuevo cada día.

4. **Instrumental**

- 4.1. Baño ultrasónico.
- 4.2. Agitador mecánico.
- 4.3. Equipo para CLAR con detector ultravioleta de longitud de onda variable o detector de red de diodos.
- 4.3.1. Columna cromatográfica de líquidos, de 250 mm x 4 mm, C₁₈, relleno de 10 µm, o equivalente.
- 4.4. Filtros de membrana de 0,45 µm.

5. **Procedimiento**

Nota: El olaquinox es sensible a la luz. Realizar todas las operaciones con luz tenue o con material de vidrio ámbar.

5.1. *Generalidades.*

- 5.1.1. Deberá analizarse un pienso en blanco para comprobar la ausencia de olaquinox y de sustancias interferentes.
- 5.1.2. Asimismo, deberá realizarse un ensayo de recuperación analizando el pienso en blanco, que se habrá enriquecido añadiendo una cantidad de olaquinox similar a la presente en la muestra. Para enriquecer a un nivel de 50 mg/kg, transvasar 10,0 ml de la solución patrón madre (3.5.1) a un Erlenmeyer de 250 ml y evaporar la solución a unos 0,5 ml. Añadir 50 g del pienso en blanco, mezclar completamente y esperar diez minutos, mezclando varias veces más antes de proceder a la extracción (5.2).

Nota: A los efectos de este método, el pienso en blanco deberá ser de tipo similar al de la muestra y en su análisis no debe detectarse olaquinox.

5.2. *Extracción.*

Pesar, con una precisión de 0,01 g, aproximadamente 50 g de la muestra. Pasarlos a un Erlenmeyer de 1 000 ml, añadir 100 ml de metanol (3.1) e introducir el matraz durante cinco minutos en el baño ultrasónico (4.1). Añadir 410 ml de agua y dejar en el baño ultrasónico durante otros 15 minutos. Retirar el matraz del baño ultrasónico, agitar durante 30 minutos en el agitador (4.2) y filtrar por un filtro plegado. Transvasar 10,0 ml del filtrado a un matraz aforado de 20 ml, enrasar con agua y mezclar. Filtrar una parte alícuota por un filtro de membrana (4.4) (véase la observación del punto 9). Proceder a la determinación mediante CLAR (5.3).

5.3. *Determinación mediante CLAR.*5.3.1. *Parámetros:*

Las siguientes condiciones se ofrecen con carácter orientativo; pueden aplicarse otras si arrojan resultados equivalentes.

Columna analítica
(4.3.1)

Fase móvil (3.4): Mezcla de metanol (3.2) y agua (3.3), 900 + 100 (V + V)

Caudal: 1,5-2 ml/min.

Longitud de onda de
detección: 380 nm

Volumen de inyección: 20-100 µl

Comprobar la estabilidad del sistema cromatográfico inyectando varias veces la solución de calibración (3.5.3) de 2,5 µg/ml, hasta que se alcancen alturas de pico y tiempos de retención constantes.

5.3.2. *Curva de calibración.*

Inyectar varias veces cada solución de calibración (3.5.3) y determinar las alturas (áreas) de pico medias de cada concentración. Trazar una curva de calibración empleando las alturas (áreas) de pico medias de las soluciones de calibración como ordenadas y las concentraciones correspondientes, en microgramos por mililitro, como abscisas.

5.3.3. *Solución de muestra.*

Inyectar varias veces el extracto de muestra (5.2) empleando el mismo volumen que para las soluciones de calibración, y determinar la altura (área) media de los picos de olaquinox.

6. Cálculo de los resultados

Determinar la concentración de la solución de muestra, en microgramos por mililitro, a partir de la altura (área) media de sus picos de olaquinox, tomando como referencia la curva de calibración (5.3.2).

El contenido p de olaquinox de la muestra, en miligramos por kilogramo, viene dado por la siguiente fórmula:

$$w = \frac{c \times 1000}{m}$$

en la cual:

c = concentración de olaquinox del extracto de muestra (5.2), en microgramos por mililitro;

m = peso de la porción de ensayo, en gramos por mililitro (5.2).

7. Validación de los resultados

7.1. Identidad.

La identidad del analito puede confirmarse mediante cocromatografía, o utilizando un detector de red de diodos con el cual se comparan los espectros del extracto de muestra (5.2) y de la solución de calibración (3.5.3) de 5,0 µg/ml.

7.1.1. Cocromatografía.

Enriquecer un extracto de muestra (5.2) añadiéndole una cantidad apropiada de solución de calibración (3.5.3). La cantidad de olaquinox añadida debe ser similar a la hallada en el extracto de muestra.

Solo la altura del pico de olaquinox deberá aumentar en función de la cantidad añadida y de la dilución del extracto. La anchura del pico, a la mitad de su altura, debe ser igual $\pm 10\%$ a la anchura original del pico de olaquinox del extracto de muestra sin enriquecer.

7.1.2. Detección por red de diodos.

Los resultados se evalúan con arreglo a los siguientes criterios:

- la longitud de onda de absorción máxima de los espectros de la muestra y del patrón, registrados en el vértice del pico del cromatograma, debe ser la misma dentro de un margen determinado por el poder de resolución del sistema de detección; en el caso de la detección por red de diodos, el margen típico se sitúa en ± 2 nm;
- entre 220 nm y 400 nm, los espectros de la muestra y del patrón registrados en el vértice del pico del cromatograma no deben ser diferentes por lo que respecta a aquellas partes del espectro que se encuentran en un intervalo del 10 % al 100 % de la absorbancia relativa; se cumple este criterio cuando están presentes los mismos máximos y en ningún punto observado la desviación entre los dos espectros excede del 15 % de la absorbancia del analito patrón;
- entre 220 nm y 400 nm, los espectros de la pendiente ascendente, del vértice y de la pendiente descendente del pico producido por el extracto de muestra no deben diferir entre sí por lo que respecta a las partes del espectro que se encuentran en un intervalo del 10 % al 100 % de la absorbancia relativa; se cumple este criterio cuando están presentes los mismos máximos y en ningún punto observado la desviación entre los espectros excede del 15 % de la absorbancia del espectro del vértice del pico.

Si no se cumple alguno de estos criterios, la presencia del analito no queda confirmada.

7.2. Repetibilidad.

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas con la misma muestra no debe rebasar el 15 % del resultado superior, en el caso de contenidos de olaquinox de 10-200 mg/kg.

7.3. Recuperación.

La recuperación de la muestra en blanco enriquecida deberá ser al menos del 90 %.

8. **Resultados de un estudio colaborativo**

Se organizó un estudio colaborativo comunitario en el que hasta trece laboratorios analizaron cuatro muestras de piensos para lechones, incluido un pienso en blanco. A continuación figuran los resultados del estudio.

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4
L	13	10	11	11
n	40	40	44	44
media [mg/kg]	—	14,6	48,0	95,4
S _r [mg/kg]	—	0,82	2,05	6,36
S _R [mg/kg]	—	1,62	4,28	8,42
CV _r [%]	—	5,6	4,3	6,7
CV _R [%]	—	11,1	8,9	8,8
Contenido nominal [mg/kg]	—	15	50	100
recuperación %	—	97,3	96,0	95,4

L = número de laboratorios

n = número de valores individuales

S_r = desviación típica de la repetibilidad

S_R = desviación típica de la reproducibilidad

CV_r = coeficiente de variación de la repetibilidad

CV_R = coeficiente de variación de la reproducibilidad

9. **Observación**

Aunque el método no ha sido validado para piensos que contengan más de 100 mg/kg de olaquindox, quizá puedan obtenerse resultados satisfactorios tomando una muestra de menor peso y/o diluyendo el extracto (5.2) hasta alcanzar una concentración que se encuentre en el intervalo de la curva de calibración (5.3.2).

C) DETERMINACIÓN DEL AMPROLIO

Clorhidrato de cloruro de 1-[(4-amino-2-propilpirimidin-5-il)metil]-2-metil-piridinio

1. **Objeto y ámbito de aplicación**

Este método permite determinar el nivel de amprolio en piensos y premezclas. El límite de detección es de 1 mg/kg; el de cuantificación, de 5 mg/kg.

2. **Principio**

La muestra se extrae con una mezcla de agua y metanol. Tras dilución con la fase móvil y filtración por un filtro de membrana, el contenido de amprolio se determina mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) de intercambio catiónico, empleando un detector de UV.

3. **Reactivos**

3.1. Metanol.

3.2. Acetonitrilo, equivalente al de calidad CLAR.

3.3. Agua, equivalente a la de calidad CLAR.

3.4. Solución de dihidrogenofosfato de sodio, c = 0,1 mol/l.

Disolver 13,80 g de dihidrogenofosfato de sodio monohidrato en agua (3.3) en un matraz aforado de 1 000 ml, enrasar con agua (3.3) y mezclar.

- 3.5. Solución de perclorato de sodio, $c = 1,6 \text{ mol/l}$.
- Disolver 224,74 g de perclorato de sodio monohidrato en agua (3.3) en un matraz aforado de 1 000 ml, enrasar con agua (3.3) y mezclar.
- 3.6. Fase móvil para la CLAR (véase la observación 9.1).
- Mezcla de acetonitrilo (3.2), solución de dihidrogenofosfato de sodio (3.4) y solución de perclorato de sodio (3.5), $450 + 450 + 100 \text{ (v + v + v)}$. Antes de utilizarla, filtrar la solución por un filtro de membrana de $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ (4.3) y desgasificarla (por ejemplo, en el baño ultrasónico [4.4] durante, como mínimo, 15 minutos).
- 3.7. Sustancia patrón: amprolio puro, clorhidrato de cloruro de 1-[(4-amino-2-propilpirimidin-5-il)metil]-2-metilpiridinio, E 750 (véase el punto 9.2).
- 3.7.1. Solución patrón madre de amprolio de $500 \text{ }\mu\text{g/ml}$.
- Pesar, con una precisión de 0,1 mg, 50 mg de amprolio (3.7) en un matraz aforado de 100 ml, disolver en 80 ml de metanol (3.1) y poner el matraz en un baño ultrasónico (4.4) durante diez minutos. Después del tratamiento de ultrasonidos, llevar la solución a temperatura ambiente, enrasar con agua y mezclar. A una temperatura de $\leq 4 \text{ }^\circ\text{C}$, la solución es estable durante un mes.
- 3.7.2. Solución patrón intermedia de amprolio de $50 \text{ }\mu\text{g/ml}$.
- Pipetear 5,0 ml de la solución patrón madre (3.7.1) a un matraz aforado de 50 ml, enrasar con el disolvente de extracción (3.8) y mezclar. A una temperatura de $\leq 4 \text{ }^\circ\text{C}$, la solución es estable durante un mes.
- 3.7.3. Soluciones de calibración.
- Transvasar 0,5, 1,0 y 2,0 ml de la solución patrón intermedia (3.7.2) a una serie de matraces aforados de 50 ml. Enrasar con la fase móvil (3.6) y mezclar. Estas soluciones corresponden, respectivamente, a 0,5, 1,0 y 2,0 $\mu\text{g/ml}$ de amprolio. Deben prepararse poco antes de utilizarse.
- 3.8. Disolvente de extracción.
- Mezcla de metanol (3.1) y agua $2 + 1 \text{ (v + v)}$.
4. **Instrumental**
- 4.1. Equipo para CLAR con un sistema de inyección que permita inyectar volúmenes de $100 \text{ }\mu\text{l}$.
- 4.1.1. Columna cromatográfica de líquidos, de $125 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$, Nucleosil 10 SA de intercambio catiónico, relleno de $5 \text{ }\mu\text{m}$ o $10 \text{ }\mu\text{m}$, o equivalente.
- 4.1.2. Detector de UV de longitud de onda variable, o detector de red de diodos.
- 4.2. Filtro de membrana de politetrafluoretileno de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$.
- 4.3. Filtro de membrana de $0,22 \text{ }\mu\text{m}$.
- 4.4. Baño ultrasónico.
- 4.5. Agitador mecánico o magnético.
5. **Procedimiento**
- 5.1. *Generalidades*
- 5.1.1. Pienso en blanco.
- Para el ensayo de recuperación (5.1.2) deberá analizarse un pienso en blanco, a fin de comprobar la ausencia de amprolio y de sustancias interferentes. El pienso en blanco deberá ser de tipo similar al de la muestra y en su análisis no debe detectarse amprolio ni sustancias interferentes.

5.1.2 Ensayo de recuperación.

Deberá realizarse un ensayo de recuperación analizando el pienso en blanco, que se habrá enriquecido añadiendo una cantidad de amprolio similar a la presente en la muestra. Para enriquecer a un nivel de 100 mg/kg, transvasar 10,0 ml de la solución patrón madre (3.7.1) a un Erlenmeyer de 250 ml y evaporar la solución a unos 0,5 ml. Añadir 50 g del pienso en blanco, mezclar completamente y esperar diez minutos, mezclando varias veces más antes de proceder a la extracción (5.2).

Si no se dispone de un pienso en blanco de tipo similar al de la muestra (véase el punto 5.1.1), también puede realizarse un ensayo de recuperación por el método de adición de patrón. En este caso, la muestra que debe analizarse se enriquece con una cantidad de amprolio similar a la que ya esté presente en ella. Esta muestra se analiza junto con la muestra sin enriquecer, y la recuperación puede calcularse por sustracción.

5.2. Extracción

5.2.1. Premezclas (contenido de < 1 % de amprolio) y piensos.

En función del contenido de amprolio, pesar, con una precisión de 0,01 g, entre 5 g y 40 g de la muestra en un Erlenmeyer de 500 ml y añadir 200 ml de disolvente de extracción (3.8). Poner el matraz en el baño ultrasónico (4.4) y dejarlo 15 minutos. Retirar el matraz del baño ultrasónico, agitar durante una hora en el agitador o remover en el agitador magnético (4.5). Diluir una parte alícuota del extracto con la fase móvil (3.6) hasta obtener un contenido de amprolio de 0,5-2 µg/ml y mezclar (véase la observación del punto 9.3). Filtrar de 5 ml a 10 ml de esta solución diluida por un filtro de membrana (4.2). Proceder a la determinación mediante CLAR (5.3).

5.2.2. Premezclas (contenido de ≥ 1 % de amprolio).

En función del contenido de amprolio, pesar, con una precisión de 0,001 g, entre 1 g y 4 g de la premezcla en un Erlenmeyer de 500 ml y añadir 200 ml de disolvente de extracción (3.8). Poner el matraz en el baño ultrasónico (4.4) y dejarlo 15 minutos. Retirar el matraz del baño ultrasónico, agitar durante una hora en el agitador o remover en el agitador magnético (4.5). Diluir una parte alícuota del extracto con la fase móvil (3.6) hasta obtener un contenido de amprolio de 0,5-2 µg/ml y mezclar. Filtrar de 5 ml a 10 ml de esta solución diluida por un filtro de membrana (4.2). Proceder a la determinación mediante CLAR (5.3).

5.3. Determinación mediante CLAR

5.3.1. Parámetros:

Las siguientes condiciones se ofrecen con carácter orientativo; pueden aplicarse otras si arrojan resultados equivalentes.

Columna cromatográfica

de líquidos (4.1.1): 125 mm × 4 mm, Nucleosil 10 SA de intercambio catiónico, relleno de 5 µm o 10 µm, o equivalente

Fase móvil (3.6): Mezcla de acetonitrilo (3.2), solución de dihidrogenofosfato de sodio (3.4) y solución de perclorato de sodio (3.5), 450 + 450 + 100 (v + v + v).

Caudal: 0,7-1 ml/min.

Longitud de onda de detección: 264 nm

Volumen de inyección: 100 µl

Comprobar la estabilidad del sistema cromatográfico inyectando varias veces la solución de calibración (3.7.3) de 1,0 µg/ml, hasta que se alcancen alturas de pico y tiempos de retención constantes.

5.3.2. Curva de calibración.

Inyectar varias veces cada solución de calibración (3.7.3) y determinar las alturas (áreas) de pico medias de cada concentración. Trazar una curva de calibración empleando las alturas (áreas) de pico medias de las soluciones de calibración como ordenadas y las concentraciones correspondientes, en microgramos por mililitro, como abscisas.

5.3.3. Solución de muestra.

Inyectar varias veces el extracto de muestra (5.2) empleando el mismo volumen que para las soluciones de calibración, y determinar la altura (área) media de los picos de amprolio.

6. Cálculo de los resultados

Determinar la concentración de la solución de muestra, en microgramos por mililitro, a partir de la altura (área) media de sus picos de amprolio, tomando como referencia la curva de calibración (5.3.2).

El contenido w de ampolio de la muestra, en miligramos por kilogramo, viene dado por la siguiente fórmula:

$$w = \frac{V \times c \times f}{m} \text{ [mg/kg]}$$

en la cual:

V = volumen del disolvente de extracción (3.8) según el punto 5.2, en mililitros (es decir, 200 ml);

c = concentración de ampolio del extracto de muestra (5.2), en microgramos por mililitro;

f = factor de dilución según el punto 5.2;

m = peso de la porción de ensayo, en gramos.

7. Validación de los resultados

7.1. Identidad.

La identidad del analito puede confirmarse mediante cocromatografía, o utilizando un detector de red de diodos con el cual se comparan los espectros del extracto de muestra (5.2) y de la solución de calibración (3.7.3) de 2,0 µg/ml.

7.1.1. Cocromatografía.

Enriquecer un extracto de muestra (5.2) añadiéndole una cantidad apropiada de solución de calibración (3.7.3). La cantidad de ampolio añadida debe ser similar a la hallada en el extracto de muestra.

Solo la altura del pico de ampolio deberá aumentar en función de la cantidad añadida y de la dilución del extracto. La anchura del pico, a la mitad de su altura, debe ser igual $\pm 10\%$ a la anchura original del pico de ampolio del extracto de muestra sin enriquecer.

7.1.2. Detección por red de diodos.

Los resultados se evalúan con arreglo a los siguientes criterios:

- la longitud de onda de absorción máxima de los espectros de la muestra y del patrón, registrados en el vértice del pico del cromatograma, debe ser la misma dentro de un margen determinado por el poder de resolución del sistema de detección; en el caso de la detección por red de diodos, el margen típico se sitúa en ± 2 nm;
- entre 210 nm y 320 nm, los espectros de la muestra y del patrón registrados en el vértice del pico del cromatograma no deben ser diferentes por lo que respecta a aquellas partes del espectro que se encuentran en un intervalo del 10 % al 100 % de la absorbancia relativa; se cumple este criterio cuando están presentes los mismos máximos y en ningún punto observado la desviación entre los dos espectros excede del 15 % de la absorbancia del analito patrón;
- entre 210 nm y 320 nm, los espectros de la pendiente ascendente, del vértice y de la pendiente descendente del pico producido por el extracto de muestra no deben diferir entre sí por lo que respecta a las partes del espectro que se encuentran en un intervalo del 10 % al 100 % de la absorbancia relativa; se cumple este criterio cuando están presentes los mismos máximos y en ningún punto observado la desviación entre los espectros excede del 15 % de la absorbancia del espectro del vértice del pico.

Si no se cumple alguno de estos criterios, la presencia del analito no queda confirmada.

7.2. Repetibilidad.

La diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas con la misma muestra no debe exceder de:

- el 15 % del valor superior, en el caso de contenidos de ampolio de 25 mg/kg a 500 mg/kg,
- 75 mg/kg, en el caso de contenidos de ampolio de 500 mg/kg a 1 000 mg/kg,
- el 7,5 % del valor superior, en el caso de contenidos de ampolio superiores a 1 000 mg/kg.

7.3. Recuperación.

La recuperación de la muestra (en blanco) enriquecida deberá ser al menos del 90 %.

8. **Resultados de un estudio colaborativo**

Se organizó un estudio colaborativo en el que se analizaron tres piensos para aves de corral (muestras 1 a 3), un pienso mineral (muestra 4) y una premezcla (muestra 5). Los resultados se recogen en el cuadro siguiente:

	Muestra 1 (pienso en blanco)	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
media [mg/kg]	—	45,5	188	5 129	25 140
s _r [mg/kg]	—	2,26	3,57	178	550
CV _r [%]	—	4,95	1,90	3,46	2,20
s _R [mg/kg]	—	2,95	11,8	266	760
CV _R [%]	—	6,47	6,27	5,19	3,00
Contenido nominal [mg/kg]	—	50	200	5 000	25 000

L = número de laboratorios

n = número de valores individuales

s_r = desviación típica de la repetibilidad

CV_r = coeficiente de variación de la repetibilidad

s_R = desviación típica de la reproducibilidad

CV_R = coeficiente de variación de la reproducibilidad

9. **Observaciones**

- 9.1. Si la muestra contiene tiamina, su pico aparece en el cromatograma poco antes que el de amprolio. Según este método, el amprolio y la tiamina deben separarse. Si la columna (4.1.1) utilizada en este método no separa el amprolio de la tiamina, sustituir hasta el 50 % de la porción de acetonitrilo de la fase móvil (3.6) por metanol.
- 9.2. De acuerdo con la *British Pharmacopoeia*, el espectro de una solución de amprolio (c = 0,02 mol/l) en ácido clorhídrico (c = 0,1 mol/l) presenta máximos a 246 nm y 262 nm. La absorbancia será de 0,84 a 246 nm y de 0,80 a 262 nm.
- 9.3. El extracto debe estar siempre diluido con la fase móvil, ya que, de lo contrario, el tiempo de retención del pico de amprolio puede variar significativamente, debido a cambios en la fuerza iónica.

D) DETERMINACIÓN DEL CARBADOX

N¹,N⁴-dióxido de metil 3-(2-quinoxalinilmetileno)carbazonato

1. **Objeto y ámbito de aplicación**

Este método permite determinar el nivel de carbadox en piensos, premezclas y preparados. El límite de detección es de 1 mg/kg; el de cuantificación, de 5 mg/kg.

2. **Principio**

La muestra se equilibra con agua y se extrae con una mezcla de metanol y acetonitrilo. En el caso de los piensos, una parte alícuota del extracto filtrado se limpia en una columna de óxido de aluminio. En el caso de las premezclas y los preparados, una parte alícuota del extracto filtrado se diluye con agua, metanol y acetonitrilo hasta obtener una concentración apropiada. El contenido de carbadox se determina mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) de fase reversa, empleando un detector de UV.

3. **Reactivos**

- 3.1. Metanol.
- 3.2. Acetonitrilo, equivalente al de calidad CLAR.

- 3.3. Ácido acético, $p = 100 \%$.
- 3.4. Óxido de aluminio: neutro, con grado de actividad I.
- 3.5. Mezcla de metanol y acetonitrilo 1 + 1 (v + v).
Mezclar 500 ml de metanol (3.1) con 500 ml de acetonitrilo (3.2).
- 3.6. Ácido acético, $\sigma = 10 \%$.
Diluir 10 ml de ácido acético (3.3) a 100 ml con agua.
- 3.7. Acetato de sodio.
- 3.8. Agua, equivalente a la de calidad CLAR.
- 3.9. Solución reguladora de acetato, $c = 0,01 \text{ mol/l}$, $\text{pH} = 6,0$.
Disolver 0,82 g de acetato de sodio (3.7) en 700 ml de agua (3.8) y ajustar el pH a 6,0 con ácido acético (3.6). Transvasar a un matraz aforado de 1 000 ml, enrasar con agua (3.8) y mezclar.
- 3.10. Fase móvil para la CLAR.
Mezclar 825 ml de solución reguladora de acetato (3.9) con 175 ml de acetonitrilo (3.2).
Filtrar por un filtro de $0,22 \mu\text{m}$ (4.5) y degasificar la solución (por ejemplo, aplicando ultrasonidos durante diez minutos).
- 3.11. Sustancia patrón.
Carbadox puro: N^1, N^4 -dióxido de metil 3-(2-quinoxalilmetileno)carbazato, E 850.
- 3.11.1. Solución patrón madre de carbadox de $100 \mu\text{g/ml}$ (véase la nota del punto 5, relativo al procedimiento).
Pesar, con una precisión de 0,1 mg, 25 mg de sustancia patrón de carbadox (3.11) en un matraz aforado de 250 ml. Disolver en una mezcla de metanol y acetonitrilo (3.5) por medio de ultrasonidos (4.7). Después del tratamiento de ultrasonidos, llevar la solución a temperatura ambiente, enrasar con la mezcla de metanol y acetonitrilo (3.5) y mezclar. Envolver el matraz con papel de aluminio, o utilizar material de vidrio ámbar, y guardarlo en el frigorífico. A una temperatura de $\leq 4^\circ\text{C}$, la solución es estable durante un mes.
- 3.11.2. Soluciones de calibración.
Transvasar 2,0, 5,0, 10,0 y 20,0 ml de la solución patrón madre (3.11.1) a una serie de matraces aforados de 100 ml. Añadir 30 ml de agua, enrasar con la mezcla de metanol y acetonitrilo (3.5) y mezclar. Envolver los matraces con papel de aluminio. Estas soluciones corresponden, respectivamente, a 2,0, 5,0, 10,0 y $20,0 \mu\text{g/ml}$ de carbadox.
Las soluciones de calibración deben prepararse poco antes de utilizarse.
Nota: Para la determinación del carbadox en piensos que contengan menos de 10 mg/kg, deben prepararse soluciones de calibración con una concentración inferior a $2,0 \mu\text{g/ml}$.
- 3.12. Mezcla de agua y metanol-acetonitrilo (3.5), 300 + 700 (v + v).
Mezclar 300 ml de agua con 700 ml de la mezcla de metanol y acetonitrilo (3.5).
4. **Instrumental**
- 4.1. Agitador de laboratorio o agitador magnético.
- 4.2. Papel de filtro de fibra de vidrio (Whatman GF/A o equivalente).

- 4.3. Columna de vidrio (de 300 mm a 400 mm de longitud y 10 mm aproximadamente de diámetro interior) con frita de vidrio sinterizado y válvula de extracción.

Nota: También puede utilizarse una columna de vidrio provista de una llave de cierre o una columna de vidrio con un extremo cónico; en este caso, introducir un pequeño tapón de lana de vidrio en el extremo inferior de la columna de vidrio y atacarlo con una varilla de vidrio.

- 4.4. Equipo para CLAR con un sistema de inyección que permita inyectar volúmenes de 20 µl.

- 4.4.1. Columna cromatográfica de líquidos: 300 mm x 4 mm, C₁₈, relleno de 10 µm, o equivalente.

- 4.4.2. Detector de UV de longitud de onda ajustable, o detector de red de diodos que funcione en el intervalo de 225-400 nm.

- 4.5. Filtro de membrana de 0,22 µm.

- 4.6. Filtro de membrana de 0,45 µm.

- 4.7. Baño ultrasónico.

5. Procedimiento

Nota: El carbadox es sensible a la luz. Realizar todas las operaciones con luz tenue o con material de vidrio ámbar o envuelto con papel de aluminio.

- 5.1. Generalidades.

- 5.1.1. Pienso en blanco.

Para el ensayo de recuperación (5.1.2) deberá analizarse un pienso en blanco, a fin de comprobar la ausencia de carbadox y de sustancias interferentes. El pienso en blanco deberá ser de tipo similar al de la muestra y en su análisis no debe detectarse carbadox ni sustancias interferentes.

- 5.1.2. Ensayo de recuperación.

Deberá realizarse un ensayo de recuperación analizando el pienso en blanco (5.1.1), que se habrá enriquecido añadiendo una cantidad de carbadox similar a la presente en la muestra. Para enriquecer a un nivel de 50 mg/kg, transvasar 5,0 ml de la solución patrón madre (3.11.1) a un Erlenmeyer de 200 ml. Evaporar la solución en una corriente de nitrógeno hasta que resten 0,5 ml, aproximadamente. Añadir 10 g del pienso en blanco, mezclar y esperar diez minutos antes de proceder a la extracción (5.2).

Si no se dispone de un pienso en blanco de tipo similar al de la muestra (véase el punto 5.1.1), también puede realizarse un ensayo de recuperación por el método de adición de patrón. En este caso, la muestra se enriquece con una cantidad de carbadox similar a la que ya esté presente en ella. Esta muestra se analiza junto con la muestra sin enriquecer, y la recuperación puede calcularse por sustracción.

- 5.2. Extracción.

- 5.2.1. Pienso.

Pesar, con una precisión de 0,01 g, 10 g de la muestra preparada y pasarlos a un Erlenmeyer de 200 ml. Añadir 15,0 ml de agua, mezclar y equilibrar durante cinco minutos. Añadir 35,0 ml de la mezcla de metanol y acetonitrilo (3.5), tapar y agitar durante 30 minutos en el agitador o remover en el agitador magnético (4.1). Filtrar la solución por un papel de filtro de fibra de vidrio (4.2). Conservar esta solución para la fase de purificación (5.3).

- 5.2.2. Premezclas (0,1 - 2,0 %).

Pesar, con una precisión de 0,001 g, 1 g de la muestra sin moler y pasarlo a un Erlenmeyer de 200 ml. Añadir 15,0 ml de agua, mezclar y equilibrar durante cinco minutos. Añadir 35,0 ml de la mezcla de metanol y acetonitrilo (3.5), tapar y agitar durante 30 minutos en el agitador o remover en el agitador magnético (4.1). Filtrar la solución por un papel de filtro de fibra de vidrio (4.2).

Pipetear una parte alícuota de filtrado a un matraz aforado de 50 ml. Añadir 15,0 ml de agua, enrasar con la mezcla de metanol y acetonitrilo (3.5) y mezclar. La concentración de carbadox de la solución final deberá ser de aproximadamente 10 µg/ml. Filtrar una parte alícuota por un filtro de 0,45 µm (4.6).

Proceder a la determinación mediante CLAR (5.4).

5.2.3. Preparados (> 2 %).

Pesar, con una precisión de 0,001 g, 0,2 g de la muestra sin moler y pasarlos a un Erlenmeyer de 250 ml. Añadir 45,0 ml de agua, mezclar y equilibrar durante cinco minutos. Añadir 105,0 ml de mezcla de metanol y acetonitrilo (3.5), tapar y homogeneizar. Aplicar ultrasonidos (4.7) a la muestra durante 15 minutos y, a continuación, agitar o remover durante otros 15 minutos (4.1). Filtrar la solución por un papel de filtro de fibra de vidrio (4.2).

Diluir una parte alícuota de filtrado con una mezcla de agua, metanol y acetonitrilo (3.12) hasta obtener una concentración de carbadox de 10-15 µg/ml (para un preparado al 10 %, el factor de dilución es 10). Filtrar una parte alícuota por un filtro de 0,45 µm (4.6).

Proceder a la determinación mediante CLAR (5.4).

5.3. Purificación.

5.3.1. Preparación de la columna de óxido de aluminio.

Pesar 4 g de óxido de aluminio (3.4) y transferirlos a la columna de vidrio (4.3).

5.3.2. Purificación de la muestra.

Pasar 15 ml del extracto filtrado (5.2.1) a la columna de óxido de aluminio y desechar los primeros 2 ml de eluido. Recoger los 5 ml siguientes y filtrar una parte alícuota por un filtro de 0,45 µm (4.6).

Proceder a la determinación mediante CLAR (5.4).

5.4. Determinación mediante CLAR.

5.4.1. Parámetros.

Las siguientes condiciones se ofrecen con carácter orientativo; pueden aplicarse otras si arrojan resultados equivalentes.

Columna cromatográfica

de líquidos (4.4.1): 300 mm × 4 mm, C₁₈, relleno de 10 µm, o equivalente

Fase móvil (3.10): Mezcla de solución reguladora de acetato (3.9) y acetonitrilo (3.2), 825 + 175 (v + v)

Caudal: 1,5-2 ml/min.

Longitud de onda de
detección: 365 nm

Volumen de inyección: 20 µl

Comprobar la estabilidad del sistema cromatográfico inyectando varias veces la solución de calibración (3.11.2) de 5,0 µg/ml, hasta que se alcancen alturas (áreas) de pico y tiempos de retención constantes.

5.4.2. Curva de calibración.

Inyectar varias veces cada solución de calibración (3.11.2) y medir las alturas (áreas) de pico de cada concentración. Trazar una curva de calibración empleando las alturas o áreas de pico medias de las soluciones de calibración como ordenadas y las concentraciones correspondientes, en microgramos por mililitro, como abscisas.

5.4.3. Solución de muestra.

Inyectar varias veces el extracto de muestra ([5.3.2] para los piensos, [5.2.2] para las premezclas y [5.2.3] para los preparados) y determinar la altura (área) media de los picos de carbadox.

6. Cálculo de los resultados

Determinar la concentración de carbadox de la solución de muestra, en microgramos por mililitro, a partir de la altura (área) media de sus picos de carbadox, tomando como referencia la curva de calibración (5.4.2).

6.1. *Piensos.*

El contenido de carbadox p (mg/kg) de la muestra viene dado por la siguiente fórmula:

$$w = \frac{c \times V_1}{m} \text{ [mg/kg]}$$

en la cual:

c = concentración de carbadox del extracto de muestra (5.3.2), en microgramos por mililitro;

V₁ = volumen de extracción, en mililitros (es decir, 50);

m = peso de la porción de ensayo, en gramos.

6.2. *Premezclas y preparados.*

El contenido de carbadox p (mg/kg) de la muestra viene dado por la siguiente fórmula:

$$w = \frac{c \times V_2 \times f}{m} \text{ [mg/kg]}$$

en la cual:

c = concentración de carbadox del extracto de muestra (5.2.2 o 5.2.3), en microgramos por mililitro;

V₂ = volumen de extracción, en mililitros (es decir, 50 para las premezclas y 150 para los preparados);

f = factor de dilución según el punto 5.2.2 (premezclas) o 5.2.3 (preparados);

m = peso de la porción de ensayo, en gramos.

7. **Validación de los resultados**7.1. *Identidad.*

La identidad del analito puede confirmarse mediante cocromatografía, o utilizando un detector de red de diodos con el cual se comparan los espectros del extracto de muestra y de la solución de calibración (3.11.2) de 10,0 µg/ml.

7.1.1. *Cocromatografía.*

Enriquecer un extracto de muestra añadiéndole una cantidad apropiada de solución de calibración (3.11.2). La cantidad de carbadox añadida debe ser similar a la cantidad estimada de carbadox hallada en el extracto de muestra.

Solo la altura del pico de carbadox deberá aumentar en función de la cantidad añadida y de la dilución del extracto. La anchura del pico, a la mitad de su altura máxima, debe ser igual ± 10 % a la anchura original.

7.1.2. *Detección por red de diodos.*

Los resultados se evalúan con arreglo a los siguientes criterios:

- a) la longitud de onda de absorción máxima de los espectros de la muestra y del patrón, registrados en el vértice del pico del cromatograma, debe ser la misma dentro de un margen determinado por el poder de resolución del sistema de detección; en el caso de la detección por red de diodos, el margen típico se sitúa en ± 2 nm;
- b) entre 225 nm y 400 nm, los espectros de la muestra y del patrón registrados en el vértice del pico del cromatograma no deben ser diferentes por lo que respecta a aquellas partes del espectro que se encuentran en un intervalo del 10 % al 100 % de la absorbancia relativa; se cumple este criterio cuando están presentes los mismos máximos y en ningún punto observado la desviación entre los dos espectros excede del 15 % de la absorbancia del analito patrón;
- c) entre 225 nm y 400 nm, los espectros de la pendiente ascendente, del vértice y de la pendiente descendente del pico producido por el extracto de muestra no deben diferir entre sí por lo que respecta a las partes del espectro que se encuentran en un intervalo del 10 % al 100 % de la absorbancia relativa; se cumple este criterio cuando están presentes los mismos máximos y en ningún punto observado la desviación entre los espectros excede del 15 % de la absorbancia del espectro del vértice.

Si no se cumple alguno de estos criterios, la presencia del analito no queda confirmada.

7.2. Repetibilidad.

Tratándose de contenidos iguales o superiores a 10 mg/kg, la diferencia entre los resultados de dos determinaciones paralelas efectuadas con la misma muestra no debe rebasar el 15 % del resultado superior.

7.3. Recuperación.

La recuperación de la muestra (en blanco) enriquecida deberá ser al menos del 90 %.

8. Resultados de un estudio colaborativo

Se organizó un estudio colaborativo en el que ocho laboratorios analizaron seis piensos, cuatro premezclas y tres preparados. De cada muestra se hicieron análisis por duplicado. (Puede encontrarse información más detallada sobre este estudio colaborativo en *Journal of AOAC International*, volumen 71, 1988, pp. 484-490). A continuación figuran los resultados del estudio (excluidos los valores atípicos).

Cuadro 1

Resultados del estudio colaborativo correspondientes a los piensos

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6
L	8	8	8	8	8	8
n	15	14	15	15	15	15
Media (mg/kg)	50,0	47,6	48,2	49,7	46,9	49,7
Sr (mg/kg)	2,90	2,69	1,38	1,55	1,52	2,12
CVr (%)	5,8	5,6	2,9	3,1	3,2	4,3
SR (mg/kg)	3,92	4,13	2,23	2,58	2,26	2,44
CVR (%)	7,8	8,7	4,6	5,2	4,8	4,9
Contenido nominal (mg/kg)	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0

Cuadro 2

Resultados del estudio colaborativo correspondientes a las premezclas y los preparados

	Premezclas				Preparados		
	A	B	C	D	A	B	C
L	7	7	7	7	8	8	8
n	14	14	14	14	16	16	16
Media (g/kg)	8,89	9,29	9,21	8,76	94,6	98,1	104
Sr (g/kg)	0,37	0,28	0,28	0,44	4,1	5,1	7,7
CVr (%)	4,2	3,0	3,0	5,0	4,3	5,2	7,4
SR (g/kg)	0,37	0,28	0,40	0,55	5,4	6,4	7,7
CVR (%)	4,2	3,0	4,3	6,3	5,7	6,5	7,4
Contenido nominal (mg/kg)	10,0	10,0	10,0	10,0	100	100	100

L = número de laboratorios
 n = número de valores individuales
 Sr = desviación típica de la repetibilidad
 CVr = coeficiente de variación de la repetibilidad
 SR = desviación típica de la reproducibilidad
 CVR = coeficiente de variación de la reproducibilidad

ANEXO IX

TABLAS DE CORRESPONDENCIAS A LAS QUE SE REFIERE EL ARTÍCULO 6

1. **Directiva 71/250/CEE**

Directiva 71/250/CEE	Presente Reglamento
Artículo 1, párrafo primero	Artículo 3
Artículo 1, párrafo segundo	Artículo 2
Artículo 2	—
Artículo 3	—
Anexo, parte 1	Anexo II
Anexo, parte 2	—
Anexo, parte 3	—
Anexo, parte 4	Anexo III, parte O
Anexo, parte 5	Anexo III, parte M
Anexo, parte 6	Anexo III, parte N
Anexo, parte 7	Anexo III, parte Q
Anexo, parte 9	Anexo III, parte K
Anexo, parte 10	—
Anexo, parte 11	—
Anexo, parte 12	Anexo III, parte J
Anexo, parte 14	Anexo III, parte D
Anexo, parte 16	—

2. **Directiva 71/393/CEE**

Directiva 71/393/CEE	Presente Reglamento
Artículo 1	Artículo 3
Artículo 2	—
Artículo 3	—
Anexo, parte I	Anexo III, parte A
Anexo, parte II	Anexo III, parte E
Anexo, parte III	Anexo III, parte P
Anexo, parte IV	Anexo III, parte H

3. **Directiva 72/199/CEE**

Directiva 72/199/CEE	El presente Reglamento
Artículo 1	Artículo 3
Artículo 2	—
Artículo 3	—
Artículo 4	—
Anexo I, parte 1	Anexo III, parte L
Anexo I, parte 2	Anexo III, parte C
Anexo I, parte 3	—
Anexo I, parte 4	—
Anexo I, parte 5	Anexo V, parte A
Anexo II	—

4. **Directiva 73/46/CEE**

Directiva 73/46/CEE	El presente Reglamento
Artículo 1	Artículo 3
Artículo 3	—
Artículo 4	—
Anexo I, parte 1	Anexo III, parte B
Anexo I, parte 2	—
Anexo I, parte 3	Anexo III, parte I

5. **Directiva 76/371/CEE**

Directiva 76/371/CEE	Presente Reglamento
Artículo 1	Artículo 1
Artículo 2	—
Artículo 3	—
Anexo	Anexo I

6. **Directiva 76/372/CEE**

Directiva 76/372/CEE	Presente Reglamento
Artículo 1	—
Artículo 2	—
Artículo 3	—
Anexo	—

7. **Directiva 78/633/CEE**

Directiva 78/633/CEE	Presente Reglamento
Artículo 1	Artículo 3
Artículo 2	—
Artículo 3	—
Anexo, parte 1	—
Anexo, parte 2	—
Anexo, parte 3	Anexo IV, parte C

8. **Directiva 81/715/CEE**

Directiva 81/715/CEE	Presente Reglamento
Artículo 1	—
Artículo 2	—
Artículo 3	—
Anexo	—

9. **Directiva 84/425/CEE**

Directiva 84/425/CEE	Presente Reglamento
Artículo 1	—
Artículo 2	—
Artículo 3	—
Anexo	—

10. **Directiva 86/174/CEE**

Directiva 86/174/CEE	Presente Reglamento
Artículo 1	Artículo 4
Artículo 2	—
Artículo 3	—
Anexo	Anexo VII

11. **Directiva 93/70/CEE**

Directiva 93/70/CEE	Presente Reglamento
Artículo 1	Artículo 3
Artículo 2	—
Artículo 3	—
Anexo	Anexo IV, parte D

12. **Directiva 93/117/CE**

Directiva 93/117/CE	Presente Reglamento
Artículo 1	Artículos 3 y 5
Artículo 2	—
Artículo 3	—
Anexo, parte 1	Anexo IV, parte E
Anexo, parte 2	Anexo VIII, parte A

13. **Directiva 98/64/CE**

Directiva 98/64/CE	Presente Reglamento
Artículo 1	Artículos 3 y 5
Artículo 2	—
Artículo 3	—
Artículo 4	—
Anexo, parte A	Anexo III, parte F
Anexo, parte C	Anexo VIII, parte B

14. **Directiva 1999/27/CE**

Directiva 1999/27/CE	Presente Reglamento
Artículo 1	Artículos 3 y 5
Artículo 2	—
Artículo 3	—
Artículo 4	—
Artículo 5	—
Artículo 6	—
Artículo 7	—
Anexo, parte A	Anexo VIII, parte C
Anexo, parte B	Anexo IV, parte F
Anexo, parte C	Anexo VIII, parte D

15. **Directiva 1999/76/CE**

Directiva 1999/76/CE	Presente Reglamento
Artículo 1	Artículo 3
Artículo 2	—
Artículo 3	—
Artículo 4	—
Anexo	Anexo IV, parte G

16. **Directiva 2000/45/CE**

Directiva 2000/45/CE	Presente Reglamento
Artículo 1	Artículo 3
Artículo 2	—
Artículo 3	—
Artículo 4	—
Anexo, parte A	Anexo IV, parte A
Anexo, parte B	Anexo IV, parte B
Anexo, parte C	Anexo III, parte G

17. **Directiva 2002/70/CE**

Directiva 2002/70/CE	Presente Reglamento
Artículo 1	Artículo 1
Artículo 2	Artículos 2 y 3
Artículo 3	—
Artículo 4	—
Artículo 5	—
Anexo I	Anexo I y anexo V, parte B (I)
Anexo II	Anexo II y anexo V, parte B (II)

18. Directiva 2003/126/CE

Directiva 2003/126/CE	Presente Reglamento
Artículo 1	Artículo 3
Artículo 2	—
Artículo 3	—
Artículo 4	—
Artículo 5	—
Artículo 6	—
Anexo	Anexo VI