

**REGULAMENTO DE EXECUÇÃO (UE) 2022/893 DA COMISSÃO****de 7 de junho de 2022****que altera o anexo VI do Regulamento (CE) n.º 152/2009 no que diz respeito aos métodos de análise para a deteção de constituintes de invertebrados terrestres no quadro do controlo oficial dos alimentos para animais****(Texto relevante para efeitos do EEE)**

A COMISSÃO EUROPEIA,

Tendo em conta o Tratado sobre o Funcionamento da União Europeia,

Tendo em conta o Regulamento (UE) 2017/625 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 15 de março de 2017, relativo aos controlos oficiais e outras atividades oficiais que visam assegurar a aplicação da legislação em matéria de géneros alimentícios e alimentos para animais e das regras sobre saúde e bem-estar animal, fitossanidade e produtos fitofarmacêuticos, que altera os Regulamentos (CE) n.º 999/2001, (CE) n.º 396/2005, (CE) n.º 1069/2009, (CE) n.º 1107/2009, (UE) n.º 1151/2012, (UE) n.º 652/2014, (UE) 2016/429 e (UE) 2016/2031 do Parlamento Europeu e do Conselho, os Regulamentos (CE) n.º 1/2005 e (CE) n.º 1099/2009 do Conselho, e as Diretivas 98/58/CE, 1999/74/CE, 2007/43/CE, 2008/119/CE e 2008/120/CE do Conselho, e que revoga os Regulamentos (CE) n.º 854/2004 e (CE) n.º 882/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, as Diretivas 89/608/CEE, 89/662/CEE, 90/425/CEE, 91/496/CEE, 96/23/CE, 96/93/CE e 97/78/CE do Conselho e a Decisão 92/438/CEE do Conselho (Regulamento sobre os controlos oficiais) <sup>(1)</sup>, nomeadamente o artigo 34.º, n.º 6, primeiro parágrafo, alínea a),

Considerando o seguinte:

- (1) O Regulamento (CE) n.º 152/2009 da Comissão <sup>(2)</sup> estabelece os métodos de ensaio a utilizar para apoiar os controlos oficiais destinados a assegurar o cumprimento da proibição da utilização de proteínas animais transformadas em alimentos para animais destinados a animais produtores de géneros alimentícios. O regulamento inclui métodos de análise para a determinação de constituintes de origem animal no quadro do controlo oficial dos alimentos para animais, que são descritos no respetivo anexo VI e são realizados por microscopia ótica ou por reação de polimerização em cadeia (PCR).
- (2) A utilização de proteínas animais transformadas provenientes de insetos de criação foi autorizada nos alimentos para animais de aquicultura pelo Regulamento (UE) 2017/893 da Comissão <sup>(3)</sup> e nos alimentos para suínos e aves de capoeira pelo Regulamento (UE) 2021/1372 da Comissão <sup>(4)</sup>, mas continua a ser proibida nos termos do Regulamento (CE) n.º 999/2001 do Parlamento Europeu e do Conselho <sup>(5)</sup> em determinados alimentos para animais, nomeadamente nos alimentos para ruminantes.
- (3) O laboratório de referência da União Europeia para as proteínas animais em alimentos para animais desenvolveu e validou um protocolo especial, abrangendo uma etapa de sedimentação dupla, que assegura a deteção de partículas de invertebrados terrestres, incluindo insetos, se estiverem presentes nas matérias-primas para alimentação animal, nos alimentos compostos para animais e nas pré-misturas submetidos a ensaios laboratoriais. Com esta medida adicional, esse protocolo deve ser utilizado no quadro dos controlos oficiais destinados a verificar a correta aplicação da proibição da utilização de proteínas animais transformadas de insetos em determinados alimentos para animais produtores de géneros alimentícios.

<sup>(1)</sup> JO L 95 de 7.4.2017, p. 1.

<sup>(2)</sup> Regulamento (CE) n.º 152/2009 da Comissão, de 27 de janeiro de 2009, que estabelece os métodos de amostragem e análise para o controlo oficial dos alimentos para animais (JO L 54 de 26.2.2009, p. 1).

<sup>(3)</sup> Regulamento (UE) 2017/893 da Comissão, de 24 de maio de 2017, que altera os anexos I e IV do Regulamento (CE) n.º 999/2001 do Parlamento Europeu e do Conselho e os anexos X, XIV e XV do Regulamento (UE) n.º 142/2011 da Comissão no que respeita às disposições em matéria de proteínas animais transformadas (JO L 138 de 25.5.2017, p. 92).

<sup>(4)</sup> Regulamento (UE) 2021/1372 da Comissão, de 17 de agosto de 2021, que altera o anexo IV do Regulamento (CE) n.º 999/2001 do Parlamento Europeu e do Conselho no que diz respeito à proibição de alimentar animais de criação não ruminantes, com exceção de animais destinados à produção de peles com pelo, com proteínas provenientes de animais (JO L 295 de 18.8.2021, p. 1).

<sup>(5)</sup> Regulamento (CE) n.º 999/2001 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de maio de 2001, que estabelece regras para a prevenção, o controlo e a erradicação de determinadas encefalopatias espongiformes transmissíveis (JO L 147 de 31.5.2001, p. 1).

- (4) A descrição do método de microscopia ótica constante do anexo VI do Regulamento (CE) n.º 152/2009 deve, por conseguinte, ser ajustada a fim de incluir uma etapa de sedimentação dupla no protocolo para a preparação de amostras a submeter a ensaio para a deteção de constituintes de invertebrados terrestres.
- (5) O anexo VI do Regulamento (CE) n.º 152/2009 deve, pois, ser alterado em conformidade.
- (6) As medidas previstas no presente regulamento estão em conformidade com o parecer do Comité Permanente dos Vegetais, Animais e Alimentos para Consumo Humano e Animal,

ADOTOU O PRESENTE REGULAMENTO:

*Artigo 1.º*

O anexo VI do Regulamento (CE) n.º 152/2009 é alterado em conformidade com o anexo do presente regulamento.

*Artigo 2.º*

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

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

Feito em Bruxelas, em 7 de junho de 2022.

*Pela Comissão*  
*A Presidente*  
Ursula VON DER LEYEN

---

## ANEXO

O anexo VI do Regulamento (CE) n.º 152/2009 é alterado do seguinte modo:

1) O ponto 1 passa a ter a seguinte redação:

«1. Objetivo e campo de aplicação

A determinação de constituintes de origem animal nos alimentos para animais deve ser feita por microscopia ótica ou por reação de polimerização em cadeia (PCR), em conformidade com as disposições constantes do presente anexo.

Estes dois métodos tornam possível detetar a presença de constituintes de origem animal nas pré-misturas, nas matérias-primas para alimentação animal e nos alimentos compostos para animais. No entanto, não permitem calcular a quantidade desses constituintes nas pré-misturas, nas matérias-primas para alimentação animal e nos alimentos compostos para animais. Ambos os métodos têm um limite de deteção inferior a 0,1 % (m/m).

O método PCR permite identificar o grupo taxonómico dos constituintes de origem animal presentes nas pré-misturas, nas matérias-primas para alimentação animal e nos alimentos compostos para animais.

Estes métodos devem aplicar-se para efeitos do controlo do cumprimento das proibições estabelecidas no artigo 7.º, n.º 1, do Regulamento (CE) n.º 999/2001 do Parlamento Europeu e do Conselho (\*), no anexo IV desse regulamento e no artigo 11.º, n.º 1, do Regulamento (CE) n.º 1069/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho (\*\*).

Em função do tipo de alimento para animais a ser testado, estes métodos podem ser usados, no âmbito de um único protocolo operacional, quer isoladamente, quer combinados, em conformidade com os procedimentos operativos normalizados ("PON") estabelecidos pelo laboratório de referência da UE para as proteínas animais em alimentos para animais (LRUE-PA) e publicados no respetivo sítio Web (\*\*\*)

(\*) Regulamento (CE) n.º 999/2001 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de maio de 2001, que estabelece regras para a prevenção, o controlo e a erradicação de determinadas encefalopatias espongiformes transmissíveis (JO L 147 de 31.5.2001, p. 1).

(\*\*) Regulamento (CE) n.º 1069/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 21 de outubro de 2009, que define regras sanitárias relativas a subprodutos animais e produtos derivados não destinados ao consumo humano e que revoga o Regulamento (CE) n.º 1774/2002 (regulamento relativo aos subprodutos animais) (JO L 300 de 14.11.2009, p. 1).

(\*\*\*) <https://www.eurl.craw.eu/legal-sources-and-sops/method-of-reference-and-sops/>.

2) O ponto 2.1 passa a ter a seguinte redação:

«2.1. **Microscopia ótica**

2.1.1. *Princípio*

Os constituintes de origem animal suscetíveis de estar presentes em pré-misturas, matérias-primas para alimentação animal e alimentos compostos para animais enviados para análise são identificados com base em características típicas e detetáveis por exame microscópico, tais como fibras musculares e outras partículas de carne, cartilagens, ossos, chifres, pelos, cerdas, fragmentos cuticulares de invertebrados, estruturas traqueais de insetos, produtos derivados de sangue, glóbulos de leite, cristais de lactose, penas, cascas de ovos, espinhas e escamas.

Os exames microscópicos devem ser efetuados após a preparação das amostras por sedimentação.

As amostras devem ser submetidas a uma etapa de sedimentação do seguinte modo:

- a) para a deteção de constituintes de origem animal que não invertebrados terrestres, uma etapa de sedimentação única de tetracloretileno (TCE), conforme descrito no ponto 2.1.3.4.3;
- b) para a deteção de constituintes de invertebrados terrestres, uma etapa de sedimentação dupla de éter de petróleo/tetracloretileno (EP/TCE), conforme descrito no ponto 2.1.3.4.4.

2.1.2. *Reagentes e equipamento*

2.1.2.1. Reagentes

2.1.2.1.1. Agente de concentração

— Tetracloretileno (densidade específica: 1,62).

— Éter de petróleo (EP), ponto de ebulição de 40-60 °C (densidade específica: 0,65).

## 2.1.2.1.2. Reagente de coloração

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

## 2.1.2.1.3. Meio de montagem

- Solução alcalina (solução a 2,5 %, m/v, de NaOH ou solução a 2,5 %, m/v, de KOH).
- Glicerol (não diluído, viscosidade: 1 490 cP) ou um meio de montagem com propriedades equivalentes para preparação de lâminas não permanentes.
- Adesivo Ótico 65 Norland ® (viscosidade: 1 200 cP) ou resina com propriedades equivalentes para preparação de lâminas permanentes.

## 2.1.2.1.4. Meio de montagem com propriedades de coloração

- Solução de Lugol (dissolver 2 g de iodeto de potássio em 100 ml de água e adicionar 1 g de iodo, agitando com frequência).
- Reagente de cistina (2 g de acetato de chumbo, 10 g de NaOH/100 ml de água).
- Reagente de Fehling [preparado antes do seu uso a partir de partes iguais (1/1) de duas soluções-mãe A e B: solução A [dissolver 6,9 g de sulfato de cobre (II) penta-hidratado em 100 ml de água]; solução B (dissolver 34,6 g de tartarato de potássio e sódio tetra-hidratado e 12 g de NaOH em 100 ml de água)].
- Tetrametilbenzidina/peróxido de hidrogénio [dissolver 1 g de 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB) em 100 ml de ácido acético glacial e 150 ml de água. Antes de usar, misturar 4 partes desta solução de TMB com uma parte de peróxido de hidrogénio a 3 %].

## 2.1.2.1.5. Agentes de lavagem

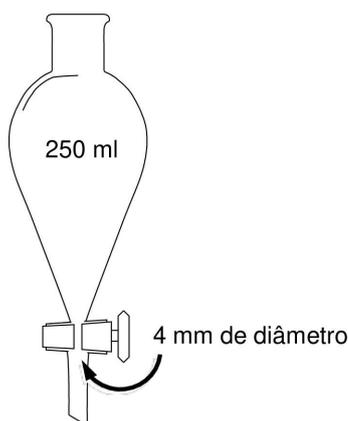
- Etanol  $\geq$  96 % (grau técnico).
- Acetona (grau técnico).

## 2.1.2.1.6. Reagente descolorante

- Solução comercial de hipoclorito de sódio (9-14 % de cloro ativo).

## 2.1.2.2. Equipamento

- Balança analítica com uma precisão de 0,001 g.
- Equipamento de moagem: moinho de facas ou moinho rotativo. Se for utilizado um moinho rotativo, são proibidos os peneiros com furos  $\leq$  0,5 mm.
- Peneiros de malha quadrada com 0,25 mm e 1 mm de lado. Com exceção do pré-peneiramento de amostras, o diâmetro dos peneiros não pode exceder 10 cm para evitar perdas de materiais. Não é necessário calibrar os peneiros.
- Ampola de decantação cónica de vidro com capacidade de 250 ml com torneira de Teflon ou de vidro esmerilhado na base do cone. O diâmetro de abertura da torneira deve ser  $\geq$  4 mm. Em alternativa, apenas em relação à sedimentação única de TCE, pode usar-se um vaso de decantação de fundo cónico desde que o laboratório tenha demonstrado que os níveis de deteção são equivalentes aos obtidos com a ampola de decantação cónica de vidro.



Ampola de decantação

- Microscópio estereoscópico que contemple, pelo menos, um intervalo de amplificação de 6,5 a 40 vezes.
- Microscópio composto de campo claro com luz transmitida que contemple, pelo menos, um intervalo de amplificação de 100 a 400 vezes. Pode também usar-se luz polarizada, contraste de interferência diferencial.
- Material de vidro de uso laboratorial corrente.
- Equipamento para preparação de lâminas: lâminas de microscópio, lâminas côncavas, lamelas (20 x 20 mm), pinças, espátulas finas.
- Forno de laboratório.
- Centrífuga.
- Papel de filtro: filtro de celulose qualitativo (tamanho dos poros 4-11 µm).

### 2.1.3. Colheita e preparação das amostras

#### 2.1.3.1. Amostragem

Utilizar uma amostra representativa, colhida em conformidade com o anexo I.

##### 2.1.3.1.1. Secagem de amostras

Secar as amostras com teor de humidade superior a 14 % antes do manuseamento, em conformidade com o anexo III.

##### 2.1.3.1.2. Pré-peneiramento de amostras

A fim de recolher informações sobre uma possível contaminação ambiental dos alimentos para animais, recomenda-se peneirar previamente em rede de 1 mm os alimentos para animais em granulado e os grãos, procedendo-se subsequentemente à preparação, análise e comunicação dos resultados separadamente para as duas frações resultantes, que devem ser consideradas amostras distintas.

##### 2.1.3.2. Precauções a tomar

A fim de evitar contaminação cruzada no laboratório, limpar cuidadosamente todos os equipamentos reutilizáveis antes de os usar. Desmontar as peças das ampolas de decantação antes de as limpar. Pré-lavar manualmente as ampolas de decantação e os instrumentos de vidro e, de seguida, lavá-los na máquina de lavar. Limpar os peneiros com uma escova sintética rija. Recomenda-se a limpeza final dos peneiros com acetona e ar comprimido após o peneiramento de materiais gordurosos como farinhas de peixe.

##### 2.1.3.3. Preparação de amostras compostas por óleos ou gorduras

Na preparação de amostras compostas por gorduras deve seguir-se o seguinte protocolo:

- se a gordura se apresentar no estado sólido, aquecer num forno até fundir,
- com uma pipeta, transferir 40 ml de gordura da base da amostra para um tubo de centrifugação,
- centrifugar a amostra a 4 000 rpm durante 10 minutos,
- se a gordura se apresentar no estado sólido após a centrifugação, aquecer num forno até fundir,
- voltar a centrifugar a 4 000 rpm durante 5 minutos,
- usando uma pequena colher ou espátula, transferir metade das impurezas decantadas para lâminas de microscópio para análise. Recomenda-se o uso de glicerol como meio de montagem,
- utilizar as restantes impurezas para preparar o sedimento, tal como descrito no ponto 2.1.3.4.3, primeiro travessão.

O mesmo protocolo, com exceção do primeiro e do quarto travessão, é aplicável à preparação de amostras compostas por óleos.

##### 2.1.3.4. Preparação de amostras que não óleos ou gorduras

##### 2.1.3.4.1. Subamostragem e moagem: proceder à subamostragem para análise de pelo menos 50 g da amostra e à sua subsequente moagem.

2.1.3.4.2. Preparação das matérias-primas: preparar uma toma de pelo menos 5 g da subamostra moída. Peneirar em rede de 0,25 mm e analisar as duas frações resultantes.

2.1.3.4.3. Sedimentação única de TCE para a deteção de constituintes de origem animal que não invertebrados terrestres.

— Extração e preparação do sedimento:

transferir uma porção de 10 g (com uma aproximação de 0,01 g) da subamostra moída para a ampola de decantação ou para o vaso de decantação de fundo cónico e adicionar 50 ml de TCE. Limitar a porção transferida para a ampola a 3 g no caso da farinha de peixe ou outros produtos de origem animal puros, ingredientes minerais ou pré-misturas que gerem mais de 10 % de sedimento. Agitar vigorosamente a mistura no mínimo 30 segundos e acrescentar cuidadosamente mais 50 ml de TCE, lavando a superfície interior da ampola para remover eventuais partículas aderentes. Deixar assentar a mistura resultante durante pelo menos 5 minutos antes de separar o sedimento, abrindo a torneira.

Se for usado um vaso de decantação de fundo cónico, agitar vigorosamente a mistura no mínimo 15 segundos, lavando cuidadosamente eventuais partículas aderentes aos lados interiores do vaso com pelo menos 10 ml de TCE fresco. Deixar assentar a mistura 3 minutos e agitar novamente 15 segundos, lavando cuidadosamente eventuais partículas aderentes aos lados interiores do vaso com pelo menos 10 ml de TCE fresco. Deixar assentar a mistura resultante pelo menos 5 minutos, retirar e rejeitar a fração líquida, decantando cuidadosamente para não perder nenhuma parte do sedimento.

Recolher o sedimento em papel de filtro colocado num funil para permitir a separação do restante TCE, evitando ao mesmo tempo a deposição de gordura no sedimento. Secar o sedimento. Recomenda-se a subsequente pesagem do sedimento (com uma aproximação de 0,001 g) para controlar a etapa da sedimentação. Por último, peneirar o sedimento em rede de 0,25 mm e examinar as duas frações resultantes, a menos que o peneiramento não seja considerado necessário.

— Extração e preparação do sobrenadante:

após a recuperação do sedimento pelo método anteriormente descrito, duas fases restam na ampola de decantação: uma líquida composta por TCE e uma sólida, o sobrenadante. Recuperar o sobrenadante, esvaziando completamente o TCE da ampola pela abertura da torneira. Invertendo a ampola de decantação, depositar o sobrenadante numa placa de Petri grande e secá-lo ao ar numa *hotte* de extração. Peneirar em rede de 0,25 mm e analisar as duas frações resultantes.

— Uso de reagentes de coloração:

para facilitar a correta identificação dos constituintes de origem animal, o operador pode usar reagentes de coloração na preparação de amostra, de acordo com as orientações emitidas pelo LRUE-PA e publicadas no respetivo sítio Web.

Se for usada solução de vermelho de alizarina para corar o sedimento, deve aplicar-se o seguinte protocolo:

— transferir o sedimento seco para um tubo de ensaio de vidro e lavar duas vezes com aproximadamente 5 ml de etanol (utilizar um agitador de vórtex durante 30 segundos em cada lavagem e deixar a mistura em repouso durante cerca de 1 minuto e 30 segundos, para as partículas em suspensão assentarem, antes de o decantar),

— decorar o sedimento com pelo menos 1 ml de solução de hipoclorito de sódio. Deixar reagir durante 10 minutos. Encher o tubo de água, deixar assentar o sedimento durante 2-3 minutos e decantar cuidadosamente a água e as partículas suspensas,

— lavar mais duas vezes o sedimento com cerca de 10 ml de água (utilizar um agitador de vórtex durante 30 segundos, deixar assentar e decantar a água de cada vez),

— acrescentar 2 a 10 gotas de solução e vermelho de alizarina e agitar a mistura em vórtex. Deixar reagir 30 segundos e lavar o sedimento corado duas vezes com aproximadamente 5 ml de etanol e uma vez com acetona (utilizar um agitador de vórtex durante 30 segundos em cada lavagem e deixar as partículas assentarem durante cerca de 1 minuto antes de o decantar),

— secar o sedimento corado.

#### 2.1.3.4.4. Sedimentação dupla de EP/TCE para a deteção de constituintes de invertebrados terrestres.

Todas as etapas devem ser realizadas numa ampola de decantação cónica de vidro de 250 ml, conforme descrito no ponto 2.1.2.2, quarto travessão.

- Transferir para a ampola de decantação uma porção de 10 g (com uma aproximação de 0,01 g) da subamostra moída e submetê-la em primeiro lugar a uma sedimentação única de TCE, tal como descrito no ponto 2.1.3.4.3, incluindo a recuperação do sedimento num papel de filtro colocado numa ampola. Este sedimento pode ser usado do mesmo modo que o sedimento obtido de acordo com o ponto 2.1.3.4.3.
- Transferir para um cilindro volumétrico o pequeno volume de TCE escorrido juntamente com o sedimento. Ao abrir a torneira da ampola de decantação, encher novamente o cilindro volumétrico até se obter 30 ml de TCE. Uma vez atingido este volume, fechar a torneira.
- Substituir este volume de TCE recolhido acrescentando um volume de 30 ml de éter de petróleo com um ponto de ebulição de 40-60 °C na ampola de decantação. Misturar cuidadosamente o teor da ampola de decantação para obter uma mistura de 30 % de EP/70 % de TCE (com uma densidade de aproximadamente 1,26 g.cm<sup>-3</sup>). Deixar repousar o material durante 10 minutos. Duas novas frações separar-se-ão: um segundo sedimento e um sobrenadante final (< 1,26 g.cm<sup>-3</sup>). O segundo sedimento é recuperado numa placa de Petri (ou num papel de filtro colocado numa ampola), abrindo a torneira até que na ampola de decantação apenas restem uma pequena quantidade de mistura solvente e o sobrenadante final. Recolher separadamente o líquido restante e o sobrenadante final num papel de filtro colocado numa ampola. Enxaguar a parede da ampola de decantação com uma descarga de EP para recolher todo o material do sobrenadante final. Deixar secar o sobrenadante final. Peneirar o sobrenadante final em rede de 0,25 mm, a menos que o peneiramento não seja considerado necessário, e examinar as duas frações resultantes para a deteção de constituintes de invertebrados terrestres.

#### 2.1.4. Exame microscópico

##### 2.1.4.1. Preparação da lâmina

Preparar as lâminas de microscópio com o sedimento e, em função da opção do operador, com o sobrenadante ou a matéria-prima. Se for caso disso, apenas para a deteção de constituintes de invertebrados terrestres, preparar também as lâminas a partir do sobrenadante final obtido conforme descrito no ponto 2.1.3.4.4. Preparar as duas frações resultantes (a de menor e maior granulometria). As tomas de ensaio das frações preparadas nas lâminas de montagem devem ser representativas da fração inteira.

Preparar um número suficiente de lâminas, a fim de garantir a possibilidade de realização de um protocolo de exame completo, tal como previsto no ponto 2.1.4.2.

Preparar as lâminas de microscópio com o meio de montagem adequado, de acordo com o PON estabelecido pelo LRUE-PA e publicado no respetivo sítio Web. Cobrir as lâminas com lamelas.

##### 2.1.4.2. Fluxograma de observação para a deteção de partículas de origem animal nos alimentos compostos para animais, nas matérias-primas para alimentação animal e nas pré-misturas.

As lâminas de microscópio preparadas devem ser observadas de acordo com os fluxogramas de observação nos diagramas 1 e 2.

Proceder às observações microscópicas utilizando o microscópio composto no sedimento e, em função da opção do operador, no sobrenadante ou na matéria-prima. Além disso, para a deteção de constituintes de invertebrados terrestres, proceder igualmente a observações do flutuante final obtido conforme descrito no ponto 2.1.3.4.4, em conformidade com o diagrama 3. Para as frações de maior granulometria, pode ser também usado o microscópio estereoscópico para além do microscópio composto. Observar inteiramente cada lâmina em várias ampliações. São dadas explicações precisas sobre a utilização dos fluxogramas num PON estabelecido pelo LRUE-PA e publicado no seu sítio Web.

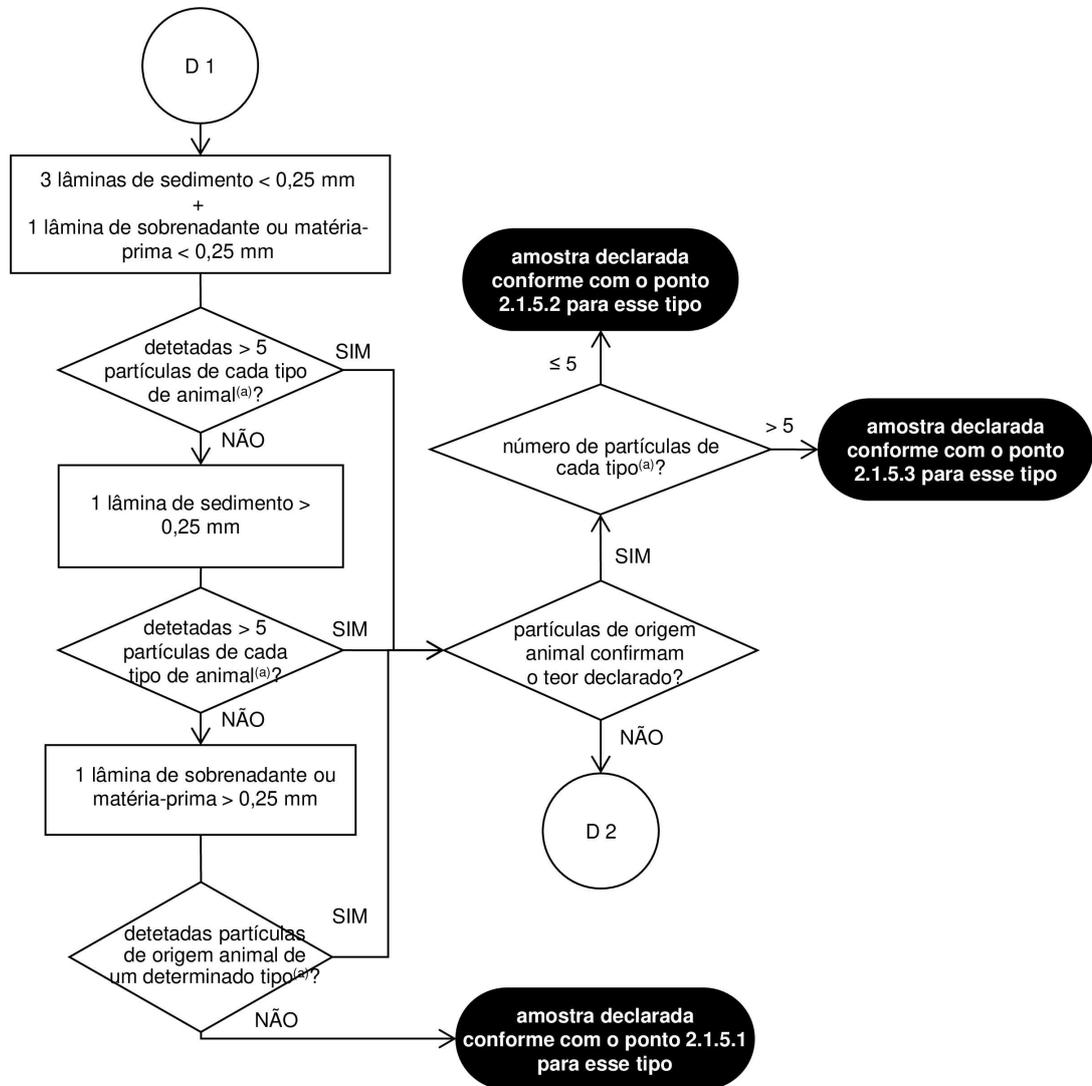
Respeitar estritamente o número mínimo de lâminas a observar em cada fase do fluxograma de observação, a menos que a totalidade do material que compõe a fração não permita chegar ao número estipulado de lâminas, por exemplo se não se obtiver qualquer sedimento. Para o registo do número de partículas, não devem ser utilizadas mais de 6 lâminas por determinação.

Quando forem preparadas lâminas adicionais utilizando um meio de montagem mais específico com propriedades de coloração, tal como previsto no ponto 2.1.2.1.4, no sobrenadante ou na matéria-prima, para melhor caracterizar as estruturas (por exemplo, penas, pelos, músculos ou partículas de sangue) que tenham sido detetadas em lâminas preparadas com outros meios de montagem, conforme previstos no ponto 2.1.2.1.3, o número de partículas deve ser contado com base em não mais de 6 lâminas por determinação, incluindo as lâminas adicionais com um meio de montagem mais específico. As lâminas adicionais preparadas a partir do sobrenadante final obtido conforme descrito no ponto 2.1.3.4.4 para a deteção de constituintes de invertebrados terrestres não devem ser consideradas para a identificação de elementos de outro tipo de animais (vertebrados terrestres e peixes).

A fim de facilitar a identificação do tipo e origem das partículas, o operador pode usar instrumentos de apoio como sistemas de apoio à decisão, bibliotecas de imagens e amostras de referência.

Diagrama 1

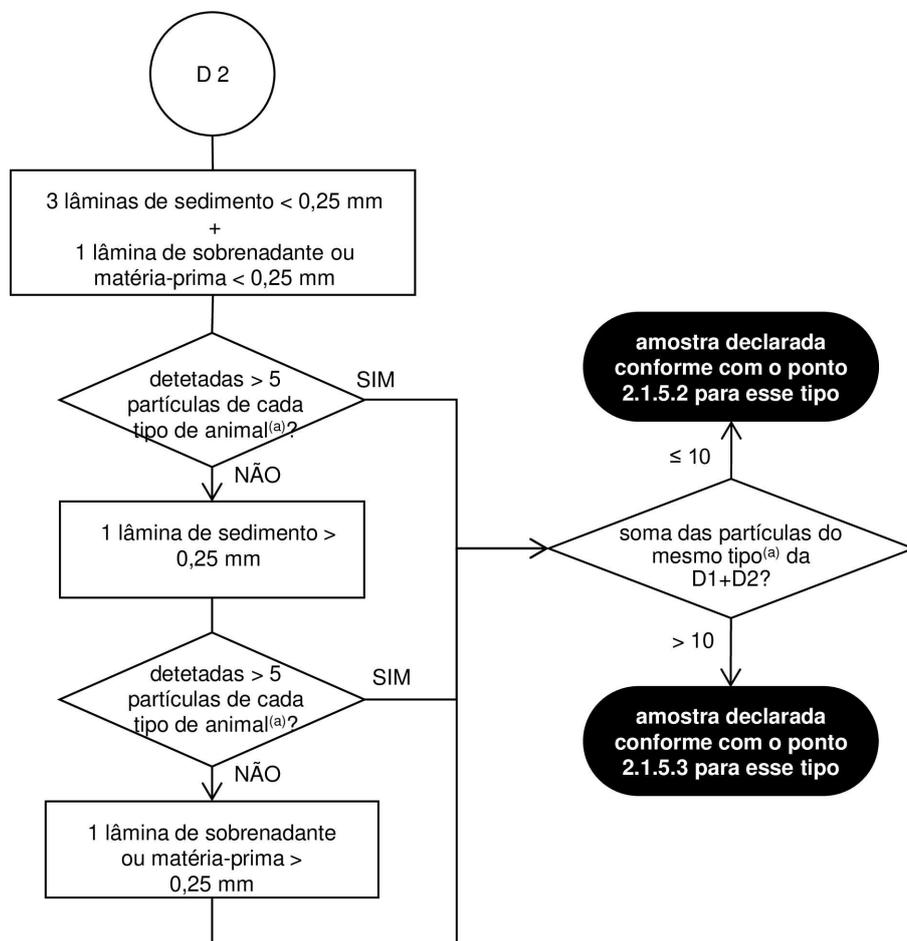
**Fluxograma de observação após sedimentação única de TCE para a deteção de partículas de origem animal que não sejam provenientes de invertebrados terrestres em alimentos compostos para animais, matérias-primas para alimentação animal e pré-misturas, para a primeira determinação**



(«D1» e «D2» referem-se à primeira e à segunda determinações; (a): vertebrados terrestres, peixes)

Diagrama 2

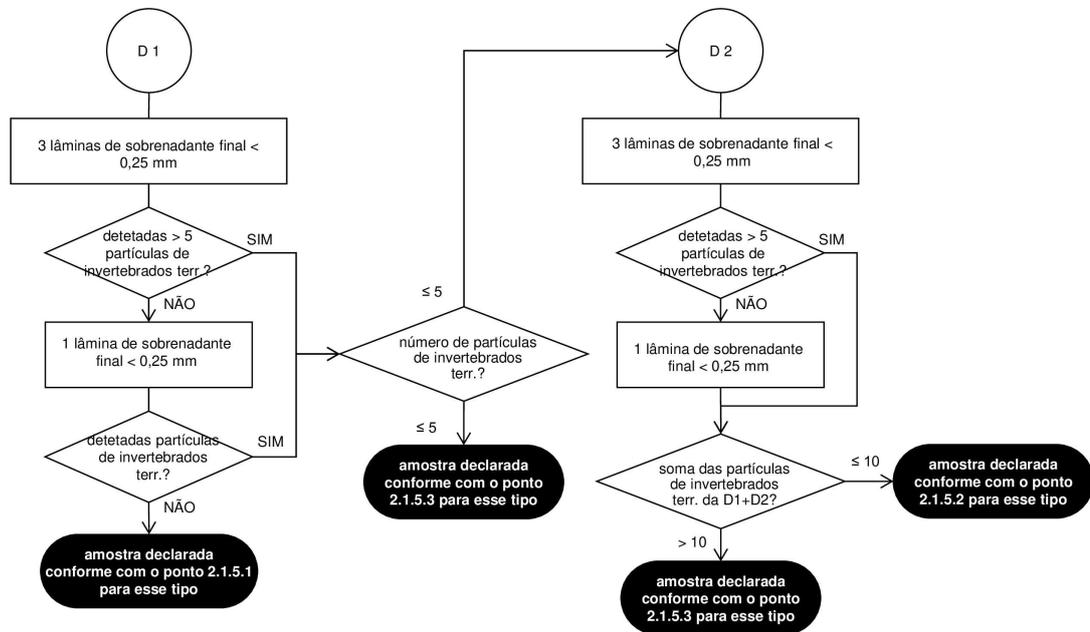
**Fluxograma de observação após sedimentação única de TCE para a deteção de partículas de origem animal que não sejam provenientes de invertebrados terrestres em alimentos compostos para animais, matérias-primas para alimentação animal e pré-misturas, para a segunda determinação**



(«D1» e «D2» referem-se à primeira e à segunda determinações; (a): vertebrados terrestres, peixes)

Diagrama 3

**Fluxograma de observação após sedimentação dupla de EP/TCE para a deteção de constituintes de invertebrados terrestres em alimentos compostos para animais, matérias-primas para alimentação animal e pré-misturas**



(«D1» e «D2» referem-se à primeira e à segunda determinações)

#### 2.1.4.3. Número de determinações

As determinações devem ser efetuadas em subamostras diferentes de 50 g cada.

Se, após a primeira determinação efetuada segundo o fluxograma de observação no diagrama 1, ou no diagrama 3 se for adequado, não forem detetadas partículas de origem animal, não é necessário proceder a uma determinação adicional e o resultado da análise deve ser comunicado usando a formulação constante do ponto 2.1.5.1.

Se, após a primeira determinação efetuada de acordo com o fluxograma de observação no diagrama 1, for detetada uma ou mais partículas de origem animal de um determinado tipo (isto é, vertebrados terrestres ou peixes) e o tipo das partículas detetadas confirmar o teor declarado da amostra, não é necessária uma segunda determinação. Se o número das partículas de origem animal de um determinado tipo detetadas durante esta primeira determinação for superior a 5, o resultado da análise deve ser comunicado por tipo de animal, usando a formulação constante do ponto 2.1.5.3. Caso contrário, o resultado da análise deve ser comunicado por tipo de animal usando a formulação constante do ponto 2.1.5.2.

Se, após a primeira determinação efetuada de acordo com o fluxograma de observação no diagrama 3, forem detetadas mais de 5 partículas de invertebrados terrestres, não é necessário proceder a uma segunda determinação e o resultado da análise deve ser comunicado usando a formulação constante do ponto 2.1.5.3 relativa a esse tipo.

Em todos os outros casos, incluindo quando não tiver sido fornecida ao laboratório uma declaração do teor, deve ser efetuada uma segunda determinação a partir de uma nova subamostra. Se, após a segunda determinação efetuada de acordo com o fluxograma de observação no diagrama 2, ou no diagrama 3 se for adequado, a soma das partículas de origem animal de um determinado tipo detetadas nas duas determinações for superior a 10, o resultado da análise deve ser comunicado por tipo de animal, usando a formulação constante do ponto 2.1.5.3. Caso contrário, o resultado da análise deve ser comunicado por tipo de animal usando a formulação constante do ponto 2.1.5.2.

### 2.1.5. Expressão dos resultados

Ao comunicar os resultados, o laboratório deve indicar em que tipo de material foi efetuada a análise (sedimento, sobrenadante, sobrenadante final ou matéria-prima). A comunicação deve indicar claramente quantas determinações foram efetuadas e se não foi realizado o peneiramento das frações antes da preparação das lâminas, em conformidade com o ponto 2.1.3.4.3, primeiro travessão, terceiro parágrafo, ou o ponto 2.1.3.4.4, terceiro travessão.

O relatório do laboratório deve conter, no mínimo, informações sobre a presença de constituintes originários de vertebrados terrestres e de peixe.

As diversas situações devem ser comunicadas do modo abaixo indicado.

#### 2.1.5.1. Se não foi detetada nenhuma partícula de origem animal de um determinado tipo:

- «Tanto quanto foi possível observar usando um microscópico ótico, não foram detetadas partículas originárias de vertebrados terrestres na amostra apresentada.»
- «Tanto quanto foi possível observar usando um microscópico ótico, não foram detetadas partículas originárias de peixe na amostra apresentada.»
- «Tanto quanto foi possível observar usando um microscópico ótico, não foram detetadas partículas originárias de invertebrados terrestres na amostra apresentada.»

#### 2.1.5.2. Se forem detetadas entre 1 e 5 partículas de origem animal de um determinado tipo quando tiver sido efetuada apenas uma determinação, ou entre 1 e 10 partículas de um determinado tipo no caso de duas determinações (o número de partículas detetadas é inferior ao limite de decisão estabelecido nos PON definidos pelo LRUE-PA e publicados no seu sítio Web):

Quando tiver sido efetuada apenas uma determinação:

- «Tanto quanto foi possível observar usando um microscópico ótico, não foram detetadas mais de 5 partículas originárias de vertebrados terrestres na amostra apresentada. As partículas foram identificadas como sendo ... [osso, cartilagem, músculo, pelo, chifre, outro (especificar conforme adequado)]. Este baixo nível de presença é inferior ao limite de decisão estabelecido para este método microscópico.»
- «Tanto quanto foi possível observar usando um microscópico ótico, não foram detetadas mais de 5 partículas originárias de peixe na amostra apresentada. As partículas foram identificadas como sendo ... [espinhas, escamas, cartilagem, músculo, otólito, brânquias, outros (especificar conforme adequado)]. Este baixo nível de presença é inferior ao limite de decisão estabelecido para este método microscópico.»

Quando tiverem sido efetuadas duas determinações:

- «Tanto quanto foi possível observar usando um microscópico ótico, não foram detetadas mais de 10 partículas originárias de vertebrados terrestres nas duas determinações na amostra apresentada. As partículas foram identificadas como sendo ... [osso, cartilagem, músculo, pelo, chifre, outro (especificar conforme adequado)]. Este baixo nível de presença é inferior ao limite de decisão estabelecido para este método microscópico.»
- «Tanto quanto foi possível observar usando um microscópico ótico, não foram detetadas mais de 10 partículas originárias de peixe nas duas determinações na amostra apresentada. As partículas foram identificadas como sendo ... [espinhas, escamas, cartilagem, músculo, otólito, brânquias, outros (especificar conforme adequado)]. Este baixo nível de presença é inferior ao limite de decisão estabelecido para este método microscópico.»
- «Tanto quanto foi possível observar usando um microscópico ótico, não foram detetadas mais de 10 partículas originárias de invertebrados terrestres nas duas determinações na amostra apresentada. As partículas foram identificadas como sendo ... [fragmentos cuticulares, partes bocais, músculos, estruturas traqueais, outros (especificar conforme adequado)]. Este baixo nível de presença é inferior ao limite de decisão estabelecido para este método microscópico.»

Além disso:

- Em caso de amostra previamente peneirada, o relatório do laboratório deve mencionar em que fração (fração peneirada, fração granulada ou grãos) foram detetadas as partículas de origem animal, na medida em que a deteção destas partículas apenas na fração peneirada pode ser indício de contaminação ambiental.

- Se apenas forem detetadas partículas de origem animal que não possam ser classificadas como de vertebrados terrestres ou de peixe (por exemplo, fibras musculares), o relatório deve mencionar que apenas foram detetadas tais partículas de origem animal e que não se pode excluir que provenham de vertebrados terrestres.

2.1.5.3. Se forem detetadas mais de 5 partículas de origem animal de um determinado tipo quando tiver sido efetuada apenas uma determinação, ou mais de 10 partículas de um determinado tipo no caso de duas determinações:

Quando tiver sido efetuada apenas uma determinação:

- “Tanto quanto foi possível observar usando um microscópico ótico, foram detetadas mais de 5 partículas originárias de vertebrados terrestres na amostra apresentada. As partículas foram identificadas como sendo ... [osso, cartilagem, músculo, pelo, chifre, outro (especificar conforme adequado)].”
- “Tanto quanto foi possível observar usando um microscópico ótico, foram detetadas mais de 5 partículas originárias de peixe na amostra apresentada. As partículas foram identificadas como sendo ... [espinhas, escamas, cartilagem, músculo, otólito, brânquias, outros (especificar conforme adequado)].”
- “Tanto quanto foi possível observar usando um microscópico ótico, foram detetadas mais de 5 partículas originárias de invertebrados terrestres na amostra apresentada. As partículas foram identificadas como sendo ... [fragmentos cuticulares, partes bocais, músculos, estruturas traqueais, outros (especificar conforme adequado)].”

Quando tiverem sido efetuadas duas determinações:

- “Tanto quanto foi possível observar usando um microscópico ótico, foram detetadas mais de 10 partículas originárias de vertebrados terrestres nas duas determinações na amostra apresentada. As partículas foram identificadas como sendo ... [osso, cartilagem, músculo, pelo, chifre, outro (especificar conforme adequado)].”
- “Tanto quanto foi possível observar usando um microscópico ótico, foram detetadas mais de 10 partículas originárias de peixe nas duas determinações na amostra apresentada. As partículas foram identificadas como sendo ... [espinhas, escamas, cartilagem, músculo, otólito, brânquias, outros (especificar conforme adequado)].”
- “Tanto quanto foi possível observar usando um microscópico ótico, foram detetadas mais de 10 partículas originárias de invertebrados terrestres nas duas determinações na amostra apresentada. As partículas foram identificadas como sendo ... [fragmentos cuticulares, partes bocais, músculos, estruturas traqueais, outros (especificar conforme adequado)].”

Além disso:

- Em caso de amostra previamente peneirada, o relatório do laboratório deve mencionar em que fração (fração peneirada, fração granulada ou grãos) foram detetadas as partículas de origem animal, na medida em que a deteção destas partículas apenas na fração peneirada pode ser indício de contaminação ambiental.
  - Se apenas forem detetadas partículas de origem animal que não possam ser classificadas como de vertebrados terrestres ou de peixe (por exemplo, fibras musculares), o relatório deve mencionar que apenas foram detetadas tais partículas de origem animal e que não se pode excluir que provenham de vertebrados terrestres.».
-