

DIRECTIVA 94/40/CE DE LA COMISIÓN

de 22 de julio de 1994

por la que se modifica la Directiva 87/153/CEE del Consejo por la que se fijan líneas directrices para la evaluación de los aditivos en la alimentación animal

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

Vista la Directiva 70/524/CEE del Consejo, de 23 de noviembre de 1970, sobre los aditivos de la alimentación animal ⁽¹⁾, cuya última modificación la constituye la Directiva 94/17/CE de la Comisión ⁽²⁾, y, en particular, el apartado 2 de su artículo 9,

Considerando que la Directiva 70/524/CEE prevé que se adopten líneas directrices para la evaluación de los aditivos en la alimentación animal, adoptadas posteriormente por la Directiva 87/153/CEE del Consejo ⁽³⁾, y que en ellas se introduzcan las modificaciones necesarias en función de los avances en los conocimientos científicos y técnicos;

Considerando que es preciso completar dichas líneas directrices con objeto de establecer criterios de evaluación de las solicitudes de autorización de microorganismos y enzimas para su uso como aditivos de los piensos;

Considerando que, de acuerdo con lo dispuesto en la Directiva 93/114/CE del Consejo ⁽⁴⁾, es necesario incorporar en el procedimiento comunitario de autorización de aditivos los requisitos relativos a una evaluación específica de riesgo para el medio ambiente, establecidos en la Directiva 90/220/CEE del Consejo, de 23 de abril de 1990, sobre la liberación intencional en el medio ambiente de organismos modificados genéticamente ⁽⁵⁾, modificada por la Directiva 94/15/CE de la Comisión ⁽⁶⁾, con objeto de que sean aplicables a todos los aditivos que contengan o consistan en organismos genéticamente modificados; que, por consiguiente, resulta oportuno modificar la Directiva 87/153/CEE, a fin de cumplir los requisitos de la Directiva 90/220/CEE;

Considerando que, debido al elevado número de modificaciones introducidas, resulta útil establecer en el Anexo de la presente Directiva una versión consolidada de las líneas directrices;

Considerando que las medidas previstas en la presente Directiva se ajustan al dictamen del Comité permanente de la alimentación animal,

HA ADOPTADO LA PRESENTE DIRECTIVA:

Artículo 1

El Anexo de la Directiva 87/153/CEE se sustituirá por el Anexo de la presente Directiva.

Artículo 2

Los Estados miembros adoptarán las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas necesarias para cumplir la presente Directiva a más tardar el 1 de octubre de 1994. Informarán inmediatamente de ello a la Comisión.

Cuando los Estados miembros adopten dichas disposiciones, éstas harán referencia a la presente Directiva o irán acompañadas de dicha referencia en su publicación oficial. Los Estados miembros establecerán las modalidades de la mencionada referencia.

Artículo 3

La presente Directiva entrará en vigor el vigésimo día siguiente al de su publicación en el *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*.

Hecho en Bruselas, el 22 de julio de 1994.

Por la Comisión

René STEICHEN

Miembro de la Comisión

⁽¹⁾ DO n° L 270 de 14. 12. 1970, p. 1.

⁽²⁾ DO n° L 105 de 26. 4. 1994, p. 19.

⁽³⁾ DO n° L 64 de 7. 3. 1987, p. 19.

⁽⁴⁾ DO n° L 334 de 31. 12. 1993, p. 24.

⁽⁵⁾ DO n° L 117 de 8. 5. 1990, p. 15.

⁽⁶⁾ DO n° L 103 de 22. 4. 1994, p. 20.

ANEXO

LÍNEAS DIRECTRICES PARA LA EVALUACIÓN DE LOS ADITIVOS EN LA ALIMENTACIÓN ANIMAL

CONSIDERACIONES GENERALES

Estas líneas directrices tienen por objeto servir de guía en la confección de los expedientes relativos a las sustancias y preparados para los que se solicite una autorización de uso como aditivos en los piensos. Los expedientes deberán permitir evaluar los aditivos según el estado actual de los conocimientos y comprobar que responden a los principios fundamentales que requiere para su autorización el apartado 2 del artículo 7 de la Directiva 70/524/CEE.

Podrá pedirse que se presenten todos los estudios indicados en estas líneas directrices y, en caso necesario, solicitarse información complementaria. Como norma general, deberán facilitarse estudios que tengan por objeto determinar la identidad, las condiciones de empleo, las propiedades fisicoquímicas y los métodos de determinación y eficacia del aditivo, así como su metabolismo y sus efectos biológicos y toxicológicos en las especies a las que se destine el mismo. Cuando el aditivo se destine a una categoría de animales pertenecientes a una especie determinada, los estudios deberán realizarse con esa misma categoría. Los estudios necesarios para evaluar los riesgos para la salud humana y el medio ambiente dependerán fundamentalmente del tipo de aditivo y de las circunstancias de su empleo. A este respecto, no se aplicará ninguna norma estricta.

No siempre será necesario someter los aditivos destinados exclusivamente a la alimentación de animales de compañía a pruebas de toxicidad crónica y de mutagénesis y carcinogénesis tan exhaustivas como las requeridas para los aditivos destinados a la alimentación de animales de abasto, de los que se obtienen productos destinados al consumo humano. Para determinar la toxicidad crónica, como norma general serán suficientes los estudios realizados durante un año con dos de las especies a las que se destine el aditivo o bien con una de esas especies y con ratas. En general, se podrá prescindir de los estudios de mutagénesis y carcinogénesis cuando ni la composición química ni la experiencia práctica ni otros motivos revelen indicios de alteración. Se podrá prescindir también de los análisis de residuos en el caso de los animales de compañía.

El conocimiento del metabolismo del aditivo en los animales de abasto y de los residuos y su biodisponibilidad reviste una importancia fundamental. En especial, dicho conocimiento deberá permitir determinar la amplitud de los estudios toxicológicos que deban realizarse con animales de laboratorio a fin de evaluar los riesgos que el aditivo pueda entrañar para el consumidor. Tal evaluación no podrá basarse únicamente en datos circunscritos a los efectos directos del aditivo de los animales de laboratorio, que no proporcionan información específica sobre los efectos reales de los residuos resultantes del metabolismo en las especies a las que se destine el aditivo.

Toda solicitud de autorización de un aditivo o de un nuevo uso de un aditivo deberá documentarse con un expediente constituido por informes detallados, los cuales se presentarán según el orden y la numeración propuestos en estas líneas directrices. La omisión en el expediente de cualquiera de los datos previstos en ellas deberá justificarse. Se adjuntarán las publicaciones a que se haga referencia. Los informes de experimentos incluirán el plan, el número de referencia y la fecha del principio y fin del experimento, una descripción pormenorizada de las pruebas, de sus resultados y de sus análisis, y el nombre, dirección y firma del responsable del estudio. Todos los lotes de piensos que se utilicen en los estudios experimentales con animales tendrán que analizarse con un método apropiado a fin de determinar la concentración de las sustancias activas pertinentes, debiéndose facilitar un informe con los resultados analíticos obtenidos. El informe indicará también las dosis individuales determinadas en cada uno de los estudios experimentales, así como las fechas correspondientes y el nombre, dirección y firma de la persona responsable de los controles. Además, al informe se adjuntará un certificado, expedido por el laboratorio o laboratorios donde hayan tenido lugar los experimentos, en el que se indique que las pruebas se han realizado de acuerdo con los principios que rigen las prácticas correctas de laboratorio según la Directiva 87/18/CEE del Consejo, de 18 de diciembre de 1986, sobre la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas relativas a la aplicación de los principios de prácticas correctas de laboratorio y al control de su aplicación para las pruebas sobre las sustancias químicas⁽¹⁾.

La determinación de las propiedades fisicoquímicas, toxicológicas y ecotoxicológicas se llevará a cabo utilizando los métodos fijados 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, empaque y etiquetado de las sustancias peligrosas⁽²⁾, cuya última modificación la constituye la Directiva 93/105/CE de la Comisión⁽³⁾ o haciendo uso de métodos internacionalmente reconocidos por organismos científicos. El empleo de otros métodos habrá de justificarse.

(1) DO nº L 15 de 17. 1. 1987, p. 29.

(2) DO nº L 196 de 16. 8. 1967, p. 1.

(3) DO nº L 294 de 30. 11. 1993, p. 21.

Cada expediente incluirá un resumen adecuado. Los expedientes que se refieran a antibióticos, coccidiostáticos u otras sustancias medicamentosas o a promotores del crecimiento, microorganismos o preparados enzimáticos deberán llevar además una monografía, presentada según el modelo que figura en el capítulo V, que permite identificar y caracterizar el aditivo con arreglo a lo dispuesto en el apartado 1 del artículo 8 de la Directiva 70/524/CEE.

En estas líneas directrices, el término « aditivo » hace referencia a las sustancias activas y a los preparados que contengan sustancias activas en la forma en que se vayan a incorporar a las premezclas y a los piensos. Sustancias activas pueden ser las sustancias químicamente definidas, los microorganismos o los preparados enzimáticos.

A efectos de estas directrices, se entenderá por « sustancias químicamente definidas » las sustancias químicas para las que se haya acordado un nombre químico con arreglo a la nomenclatura UIQPA.

El Estado miembro que presente un expediente deberá notificar a la Comisión en un plazo razonable cualquier modificación que se produzca en el proceso de fabricación o en la composición del aditivo, en su campo de aplicación o en sus condiciones de empleo. En estos casos podrá ser necesario presentar documentación adecuada para una nueva evaluación. Estos requisitos se exigirán, en especial, cuando se trate de productos derivados de microorganismos cuyos rasgos genéticos hayan sido modificados o que constituyan mutantes naturales.

ÍNDICE

- CAPÍTULO I: Resumen de los datos del expediente
- CAPÍTULO II: Identidad, características y condiciones de empleo del aditivo — Métodos de control
- CAPÍTULO III: Estudios sobre la eficacia del aditivo
1. Estudios sobre la mejora de las características de los piensos
 2. Estudios de los efectos de los aditivos en la producción animal
 3. Estudios de la calidad de los productos animales
- CAPÍTULO IV: Estudios sobre la seguridad de empleo del aditivo
1. Estudios sobre las especies a las que se destine el aditivo
 - 1.1. Estudios toxicológicos del aditivo
 - 1.2. Estudios microbiológicos del aditivo
 - 1.3. Estudio del metabolismo y de los residuos
 2. Estudios de los residuos excretados
 3. Estudios con animales de laboratorio
- CAPÍTULO V: Modelo de monografía

CAPÍTULO I

RESUMEN DE LOS DATOS DEL EXPEDIENTE

CAPÍTULO II

IDENTIDAD, CARACTERÍSTICAS Y CONDICIONES DE EMPLEO DEL ADITIVO —
MÉTODOS DE CONTROL

1. Identidad del aditivo

- 1.1. Denominación o denominaciones comerciales previstas
- 1.2. Tipo de aditivo según su función principal
- 1.3. Composición cualitativa y cuantitativa (sustancia activa, otros componentes, impurezas)
- 1.4. Estado físico, tamaño de las partículas
- 1.5. Procedimiento de fabricación y tratamientos específicos

N.B. : Si la sustancia activa es una mezcla de componentes activos, cada uno de los cuales será claramente definido, deberán describirse por separado los principales, indicándose su proporción en la mezcla.

2. Características de la sustancia activa

- 2.1. Sustancias químicamente definidas : denominación genérica, denominación química en la nomenclatura UIQPA, otras denominaciones genéricas internacionales y abreviaturas. Número CAS (Chemical Abstracts Service Number).

Microorganismos : denominación y descripción taxonómica según los códigos de nomenclatura internacionales. También podrán emplearse otros manuales de clasificación reconocidos internacionalmente⁽¹⁾.

Preparados enzimáticos : denominación según las principales actividades enzimáticas descritas en IUB/UIQPA. Número EINECS y CAS.

- 2.2. Fórmula empírica y estructural y peso molecular. Si la sustancia activa es un producto de fermentación, composición cualitativa y cuantitativa de los principales elementos.

Microorganismos : nombre y lugar de la colección de cultivos donde se encuentre depositada la cepa, si es posible una colección de la CE, y número de registro, modificaciones genéticas y todas las propiedades pertinentes para su identificación. Asimismo, origen, características morfológicas y fisiológicas, fases de desarrollo, factores pertinentes que puedan afectar a su actividad biológica como aditivo y demás datos genéticos que faciliten la identificación. Número de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo.

Preparados enzimáticos : origen biológico (si son de origen microbiano : nombre y lugar de la colección de cultivos donde se encuentre depositada la cepa, si es posible una colección de la CE, y número de registro, modificaciones genéticas y todas las propiedades pertinentes para su identificación, incluidos los datos genéticos), actividades en relación con los correspondientes sustratos tipo químicamente puros y otras características fisicoquímicas.

2.3. Grado de pureza

Composición cualitativa y cuantitativa de las impurezas.

Microorganismos : estabilidad genética y pureza de las cepas cultivadas.

Preparados enzimáticos :

- pureza, comprobando el grado de contaminación microbiana, metales pesados, ausencia de toxinas procedentes del organismo fuente (por ejemplo, micotoxinas), demostrada por un método adecuado,
- ausencia de actividad antimicrobiana al nivel de utilización en el pienso, determinada por un método apropiado,
- composición de los componentes no enzimáticos [particularmente de los sólidos orgánicos totales⁽²⁾].

2.4. Propiedades pertinentes

Sustancias químicamente definidas : propiedades electrostáticas, punto de fusión, punto de ebullición, temperatura de descomposición, densidad, tensión de vapor, solubilidad en agua y en disolventes orgánicos, espectro de masa y de absorción y cualquier otra propiedad física pertinente.

⁽¹⁾ Como por ejemplo el *Manual of Systematic Bacteriology* de Bergey, *The Yeasts, a taxonomic study* de Lodder y Kreger van Rij, *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi* de Hawksworth, Sutton y Ainsworth y *The Genus Aspergillus* de Raper y Fennell.

⁽²⁾ % sólidos orgánicos totales = 100 - (% cenizas + % agua + % diluyentes o aditivos e ingredientes).

Microorganismos : propiedades relevantes para la identificación y el uso previsto (por ejemplo, forma vegetativa o esporulada, UFC por gramo, etc).

Preparados enzimáticos : valores óptimos de pH y temperatura y demás propiedades pertinentes.

2.5. *Procedimientos de obtención y de purificación y medios empleados*

Variación en la composición de los lotes durante el proceso de obtención.

3. **Propiedades fisicoquímicas, tecnológicas y biológicas del aditivo**

3.1. Estabilidad (para los microorganismos : pérdida de actividad biológica, por ejemplo, viabilidad) respecto a agentes atmosféricos tales como la luz, la temperatura, el pH, la humedad y el oxígeno. Período de validez.

3.2. Estabilidad (para los microorganismos : pérdida de actividad biológica, por ejemplo, viabilidad) durante la preparación de las premezclas y los piensos, en particular, estabilidad frente al calor, la presión y la humedad. Eventuales productos de descomposición.

3.3. Estabilidad (para los microorganismos : pérdida de actividad biológica, por ejemplo, viabilidad) durante la conservación de las premezclas y los piensos en condiciones determinadas. Período de validez.

Preparados enzimáticos : datos pormenorizados de la presencia de productos de reacción no previstos procedentes de reacciones enzimáticas o químicas del preparado enzimático con los componentes del pienso, o formados por degradación del preparado enzimático durante el almacenamiento del pienso.

3.4. Otras propiedades fisicoquímicas, tecnológicas y biológicas pertinentes, como la aptitud para formar mezclas homogéneas en las premezclas y en los piensos, propiedades en relación con la formación de polvo y, para los microorganismos y los preparados enzimáticos, evaluación de la resistencia a la degradación o a la pérdida de actividad biológica en el tracto digestivo o mediante sistemas de simulación « in vitro ».

3.5. Incompatibilidades o interacciones fisicoquímicas o biológicas (por ejemplo, con los piensos, con otros aditivos aprobados o con medicamentos).

4. **Condiciones de empleo del aditivo**

4.1. Empleos previstos en la alimentación animal (por ejemplo, especies o categorías de animales, tipo de pienso, período de utilización, tiempo de retirada, etc.).

4.2. *Contraindicaciones*

4.3. Dosificación propuesta en las premezclas y los piensos expresada en :

- porcentaje en peso de la sustancia activa para las premezclas y en mg/kg para los piensos, cuando se trate de sustancias químicamente definidas,
- unidades adecuadas de la actividad biológica, como UFC por gramo de producto, para los microorganismos, o unidades de actividad pertinentes para los preparados enzimáticos.

4.4. Otros empleos conocidos de la sustancia o del preparado (en alimentos, medicina humana o veterinaria, agricultura e industria). Para cada uso deberá hacerse constar la denominación comercial así como las indicaciones y las contraindicaciones.

4.5. En caso necesario, medidas de prevención de riesgos y medios de protección durante el proceso de obtención y la manipulación.

5. **Métodos de control**

5.1. Descripción de los métodos empleados para establecer los criterios enunciados en los puntos 1.3, 2.3, 2.4, 2.5, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 y 4.3.

5.2. Descripción de los métodos de análisis cualitativo y cuantitativo utilizados en el control de rutina del aditivo en las premezclas y en los piensos.

5.3. Descripción de los métodos de análisis cualitativo y cuantitativo utilizados para determinar los residuos de aditivos en los productos animales.

N.B. : Los métodos descritos y los resultados deberán ir acompañados de datos sobre la tasa de recuperación, la especificidad, la sensibilidad, los límites de detección, las eventuales interferencias, la reproducibilidad y el método de muestreo utilizado. Asimismo, deberá proporcionarse un patrón de referencia del preparado y de la sustancia activa.

Cuando se trate de microorganismos, se indicarán los métodos de detección, enumeración e identificación y los marcadores adecuados.

CAPÍTULO III

ESTUDIOS SOBRE LA EFICACIA DEL ADITIVO

1. Estudios sobre la mejora de las características de los piensos

Estos estudios tendrán por objeto los aditivos tecnológicos, tales como los agentes antioxidantes, conservantes, aglutinantes, emulsionantes, estabilizadores, gelificantes, etc., que se destinen a mejorar o estabilizar las características de las premezclas y de los piensos. Algunos microorganismos y preparados enzimáticos podrán considerarse aditivos tecnológicos si mejoran características importantes del pienso.

Deberá probarse la eficacia del aditivo con criterios adecuados, comparando, en las condiciones de empleo previstas, el pienso con aditivo con piensos testigo y, en su caso, con piensos que contengan aditivos tecnológicos de eficacia reconocida.

En cada estudio será necesario precisar la naturaleza exacta de las sustancias activas, de los preparados, de las premezclas y de los piensos analizados, el número de referencia de los lotes, la concentración de sustancias activas en las premezclas y en los piensos, las condiciones de ensayo (por ejemplo, temperatura y humedad) y las fechas y la duración de los ensayos, así como los efectos adversos y negativos observados durante los ensayos.

2. Estudios de los efectos de los aditivos en la producción animal

Estos estudios abordarán los aditivos zootécnicos que tienen efectos en la producción animal. Los estudios indicados a continuación, que incluirán la relación dosis/respuesta, habrán de realizarse comparando cada una de las especies a las que se destine el aditivo con grupos de animales testigo y, eventualmente, con grupos de animales que reciban piensos con aditivos de eficacia conocida.

Si la sustancia activa es una mezcla de componentes activos, la presencia de cada uno de éstos deberá justificarse.

2.1. Coccidiostáticos y otras sustancias medicamentosas : deberá atenderse, en primer lugar, a la comprobación de los efectos específicos y especialmente a las propiedades profilácticas (por ejemplo, morbilidad, número de ooquistes y calificación de las lesiones). Se adjuntará información sobre la eficacia nutritiva, sobre el crecimiento de los animales y sobre la cantidad y la calidad comercial de los productos animales derivados de ellos.

2.2. Otros aditivos zootécnicos (incluidos, en su caso, los microorganismos y preparados enzimáticos) : se facilitará información sobre los efectos en la eficacia nutritiva, en el crecimiento de los animales, en las características y el rendimiento de la producción animal, en el bienestar animal y en otros parámetros que tengan efectos positivos en la producción animal.

2.3. Condiciones experimentales

Las pruebas que se realicen y los resultados deberán describirse por separado y de forma detallada. Se indicarán la valoración estadística y los métodos empleados. Se deberán precisar los siguientes datos :

2.3.1. Especie, raza, edad y sexo de los animales y método de identificación.

2.3.2. Número de los grupos de experimentación y control ; número de animales de cada grupo. A efectos estadísticos, deberá seleccionarse un número suficiente de animales de los dos sexos.

2.3.3. Concentración en los piensos de la sustancia activa (y, en su caso, de las sustancias utilizadas como elemento de comparación), determinada mediante un análisis de control con el método reconocido apropiado. Número de referencia de los lotes. Composición cualitativa y cuantitativa de la ración diaria.

2.3.4. Lugar donde se haya realizado cada prueba. Estado sanitario y fisiológico de los animales y condiciones de alimentación y cría de los mismos con relación a las prácticas habituales de la Comunidad. Control de alimentación y medidas tomadas para evitar la contaminación de los grupos testigo durante las pruebas (en especial, en el caso de los microorganismos, a través de la contaminación cruzada del pienso por el propio microorganismo).

2.3.5. Fecha y duración exacta de las pruebas. Fecha y tipo de los exámenes realizados.

2.3.6. Efectos desfavorables y otras incidencias observadas durante las pruebas y tiempo de aparición de los mismos.

3. Estudios de la calidad de los productos animales

Estudio de las características organolépticas, nutricionales, higiénicas y tecnológicas de los productos obtenidos de animales que hayan recibido piensos que contengan el aditivo.

CAPÍTULO IV

ESTUDIOS SOBRE LA SEGURIDAD DE EMPLEO DEL ADITIVO

Los estudios a que se refiere este capítulo se destinarán a evaluar :

- la seguridad de empleo del aditivo para las especies a que se destine éste,
- los riesgos que puedan entrañar la inhalación y el contacto con las mucosas, los ojos o la piel para las personas que manipulen el aditivo puro o incorporado a las premezclas o a los piensos,
- los riesgos que pueda representar para el consumidor la ingestión de alimentos que contengan residuos del aditivo o sus metabolitos,
- los riesgos de contaminación o de persistencia en el medio ambiente del propio aditivo o de los productos derivados de él y excretados por los animales,
- los posibles riesgos para especies a las que no se destine el aditivo.

Estos estudios se requerirán en su totalidad o en parte, dependiendo del tipo de aditivo y de las condiciones de empleo previstas.

Como principio general, los microorganismos y preparados enzimáticos deberán ser o proceder de microorganismos que, en las condiciones de empleo previstas, no sean patógenos ni toxicógenos para las especies a las que se destine el aditivo ni para las personas.

En el caso de los microorganismos y de los preparados enzimáticos se realizarán pruebas de seguridad apropiadas, a menos que se presente otro tipo de documentación satisfactoria al respecto. Además, para los microorganismos se realizará al menos una prueba de tolerancia en las especies a las que se destine el aditivo.

Por lo que se refiere a las enzimas derivadas de partes comestibles de animales o plantas, en principio no se requerirán pruebas toxicológicas ; cuando se trate de partes que generalmente no se consideren normales en la alimentación, podrá exigirse alguna prueba toxicológica.

Si la sustancia activa es una sustancia químicamente definida, el conocimiento de su metabolismo en las distintas especies a las que se destine el aditivo así como de la composición y biodisponibilidad de sus residuos tisulares será determinante para definir la amplitud de los estudios que hayan de realizarse con animales de laboratorio a fin de evaluar los riesgos para el consumidor. Por otra parte, el conocimiento de la composición y de las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los residuos excretados procedentes del aditivo será indispensable para definir la amplitud de los estudios necesarios para evaluar los riesgos de contaminación o de persistencia en el medio ambiente.

1. Estudios sobre las especies a las que se destine el aditivo

1.1. Estudios toxicológicos del aditivo

Pruebas de tolerancia.

Estudio de los efectos biológicos, toxicológicos, macroscópicos e histológicos.

Determinación del margen de seguridad entre la dosis máxima propuesta y la dosis que provoque efectos desfavorables. Podrá ser suficiente con indicar un valor mínimo o aproximado para ese margen si se comprueba que la dosis que produce efectos desfavorables excede ampliamente de la dosis máxima propuesta.

1.2. Estudios microbiológicos del aditivo

1.2.1. Si la sustancia activa es una sustancia químicamente definida y posee actividad antimicrobiana al nivel de utilización en el pienso, deberán presentarse estudios del espectro de acción antibacteriana del aditivo mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) en diversas bacterias patógenas y no patógenas gram-negativas y gram-positivas.

1.2.2. Estudios de la resistencia cruzada frente a antibióticos terapéuticos mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria en mutantes producidos « in vitro » cuya resistencia cromosómica al aditivo sea conocida. En el caso de los microorganismos que sean resistentes a los antibióticos terapéuticos, se demostrará la base genética de esa resistencia.

1.2.3. Estudios destinados a determinar si el aditivo puede seleccionar factores de resistencia. Estos estudios deberán realizarse en condiciones de campo con las especies animales a las que se destine prioritariamente el aditivo. A continuación se investigará si los factores R que eventualmente se hayan descubierto son portadores de una resistencia múltiple y transmisible.

- 1.2.4. Estudios destinados a determinar el efecto del aditivo sobre :
- la microflora del tracto digestivo,
 - la colonización del tracto digestivo, si se trata de un microorganismo o de una mezcla de varias cepas de microorganismos,
 - la diseminación o excreción de microorganismos patógenos, si la sustancia activa está químicamente definida y posee actividad antimicrobiana.
- 1.2.5. En caso de que la sustancia activa demuestre poseer una acción antimicrobiana, se efectuarán estudios de campo para determinar el porcentaje de bacterias resistentes al aditivo. Dichos estudios se realizarán a grandes intervalos temporales antes, durante y después (un mes) de la utilización del aditivo.
- 1.2.6. Si la sustancia activa es un microorganismo, deberá determinarse si es resistente a los antibióticos.
- 1.2.7. Si la sustancia activa (por ejemplo, preparados enzimáticos) es producida por microorganismos, se determinará la cantidad de organismos productores viables.
- 1.2.8. Si el aditivo contiene o consiste en un organismo genéticamente modificado, en los términos de los apartados 1 y 2 del artículo 2 de la Directiva 90/220/CEE, se proporcionará la siguiente información :
- una copia del consentimiento o consentimientos por escrito de las autoridades competentes para la liberación intencional en el medio ambiente de los organismos modificados genéticamente, con fines de investigación y desarrollo, de conformidad con el apartado 4 del artículo 6 de la Directiva 90/220/CEE, y el resumen de la notificación contemplada en el artículo 9 de dicha Directiva con arreglo al modelo establecido en la Decisión 91/596/CEE del Consejo⁽¹⁾,
 - el expediente técnico completo con la información que se dispone en el Anexo II de la Directiva 90/220/CEE, ampliado en caso necesario para tener en cuenta la diversidad de entornos de uso del aditivo, que contenga información sobre los datos y resultados obtenidos en la liberación de los organismos con fines de investigación y desarrollo en los ecosistemas que puedan verse afectados y una evaluación de los posibles riesgos que presenten para la salud humana, la salud animal y el medio ambiente los organismos modificados genéticamente contenidos en el producto, evaluación que deberá incluir datos obtenidos en la fase experimental,
 - las condiciones de comercialización del aditivo, entre las que figurarán las condiciones especiales de uso y manipulación y una propuesta de etiquetado y envasado que deberá ajustarse como mínimo a los requisitos del Anexo III de la Directiva 90/220/CEE.

Si la persona responsable del expediente, a la vista de los resultados de una liberación de tales organismos notificada con arreglo a la parte B de la Directiva 90/220/CEE o por motivos científicos justificados y razonados, considera que la comercialización o el uso del aditivo no presenta riesgos para la salud humana, la salud animal ni el medio ambiente, podrá proponer que no sea obligatorio cumplir uno o varios de los requisitos del Anexo III B.

Deberá incluirse información sobre los datos o resultados obtenidos en la liberación, notificada previamente o en el momento y efectuada por la persona responsable del expediente dentro o fuera de la Comunidad, del mismo organismo modificado genéticamente o de las mismas combinaciones de organismos.

Podrán mencionarse otros datos o resultados extraídos de notificaciones presentadas previamente por terceros, con la autorización escrita de éstos.

- 1.3. *Estudios del metabolismo y de los residuos⁽²⁾ ⁽³⁾ (si la sustancia activa es una sustancia químicamente definida)*
- 1.3.1. Estudio del metabolismo
- balance metabólico : velocidad y grado de absorción y de eliminación de la sustancia activa,
 - determinación de las vías metabólicas y de los principales metabolitos,
 - distribución y excreción (biliar, urinaria, fecal) de los metabolitos,
 - en su caso, influencia de la microflora del intestino o de la panza, del ciclo enterohepático y de la cecotrofia en el metabolismo.
- 1.3.2. Estudios analíticos de los residuos : composición cualitativa y cuantitativa de los residuos (sustancia activa, metabolitos) en los diferentes productos alimenticios de origen animal, en equilibrio metabólico y en las condiciones prácticas de empleo del aditivo.

⁽¹⁾ DO nº L 322 de 23. 11. 1991, p. 1.

⁽²⁾ Los estudios indicados en los puntos 1.3.1, 1.3.3 y 1.3.4 se realizarán con moléculas marcadas u otros métodos apropiados, debiéndose justificar en cada caso el método elegido. El marcado deberá ajustarse al objetivo que se persiga.

⁽³⁾ Si la sustancia activa es producida por fermentación, los estudios deberán hacerse extensivos a las sustancias que se derivan del proceso de producción.

- 1.3.3. Estudio cinético de los residuos (tras la ingestión reiterada del aditivo según el empleo propuesto): persistencia de la sustancia activa y de los principales metabolitos en los diferentes órganos y tejidos después de retirar el pienso que contenga el aditivo.
- 1.3.4. Estudio de la biodisponibilidad de los residuos presentes en los productos alimenticios de origen animal (véase el punto 3.7).
- 1.3.5. Métodos de control: métodos de determinación cualitativa y cuantitativa utilizados en los estudios contemplados en los puntos 1.3.1 a 1.3.4, con indicación de los índices de recuperación, de la especificidad y de los límites de detección. Los métodos de determinación de los residuos deberán ser suficientemente sensibles para detectar los residuos hasta niveles toxicológicamente no significativos.

2. Estudios de los residuos excretados (si la sustancia activa es una sustancia químicamente definida)

- 2.1. Naturaleza y concentración de los residuos derivados del aditivo (sustancia activa, metabolitos) en los excrementos.
- 2.2. Persistencia (valor de semivida) y cinética de eliminación de los residuos en los purines, estiércoles y camas.
- 2.3. *Efectos en la producción de metano*
- 2.4. Degradación, persistencia (valor de semivida) y cinética de eliminación en los suelos (comparando diversos tipos de suelo).
- 2.5. Efectos en la fauna del suelo y en los procesos microbianos de transformación (por ejemplo, descomposición de los residuos vegetales y animales).
- 2.6. Efectos en los vegetales terrestres (por ejemplo, germinación de semillas, crecimiento de plantas, absorción a través de plantas, etc.). Estos estudios se efectuarán en condiciones controladas y en condiciones de campo con diferentes especies vegetales.
- 2.7. Solubilidad y estabilidad en el agua de los productos derivados del aditivo (sustancia activa, metabolitos).
- 2.8. *Efectos en la vida acuática*
 - 2.8.1. Efectos en la flor (por ejemplo, *Chlorella*).
 - 2.8.2. Toxicidad en invertebrados (por ejemplo, *Daphnia magna*).
 - 2.8.3. Toxicidad en peces (por lo menos dos especies salvajes del territorio de la Comunidad).

3. Estudios con animales de laboratorio

Estos estudios analizarán la sustancia activa y sus principales metabolitos o productos si también éstos se hallan presentes en los productos comestibles animales y están biodisponibles. En la medida de lo posible, se elegirán animales de laboratorio que puedan digerir y metabolizar el aditivo de forma similar al ser humano o a las especies a las que se destine el aditivo.

Se facilitará una descripción detallada de las pruebas efectuadas, precisando la especie y la estirpe de los animales utilizados, la magnitud y el número de grupos de ensayo y de grupos testigo, las dosis administradas, la composición de la dieta y los resultados de los análisis de piensos, las condiciones de cría, la duración exacta de las pruebas, las fechas de los distintos exámenes y la mortalidad. Se describirán en informes exhaustivos los fenómenos patológicos macroscópicos e histopatológicos observados en todos los animales de ensayo, con indicación del momento de la aparición de todas las lesiones patológicas. Todos los resultados, incluida la evaluación estadística de los mismos, se presentarán detalladamente.

- 3.1. *Toxicidad aguda (no pertinente para los macroorganismos)*
 - 3.1.1. Se efectuarán estudios de toxicidad aguda por vía oral con dos especies animales (una de ellas será, preferentemente, la rata). La dosis máxima no deberá sobrepasar 2 000 mg/kg de peso corporal. Se facilitarán observaciones detalladas de los efectos biológicos observados durante un período mínimo de dos semanas después de la ingestión. Estos estudios no serán necesarios cuando se trate de preparados enzimáticos.
 - 3.1.2. Se dedicarán estudios a la toxicidad aguda por inhalación, al efecto irritante en la piel, si fuere necesario en las mucosas, y al potencial alergénico, realizando para ello pruebas adecuadas que permitan la evaluación de los posibles riesgos asociados a la manipulación del aditivo.
- 3.2. *Mutagénesis*
 - 3.2.1. Si la sustancia activa es una sustancia químicamente definida:

Con objeto de identificar las sustancias activas o sus metabolitos o productos que posean propiedades mutagénicas, se efectuará una combinación selectiva de pruebas de mutagénesis basadas en diferentes mecanismos genéticos. Estas pruebas deberán realizarse para la activación metabólica en presencia y en ausencia de un preparado de microsomas de mamíferos.

Se recomienda la siguiente combinación de pruebas :

- a) una prueba de mutaciones de genes en sistema procariótico ;
- b) una prueba de mutaciones de genes en sistema eucariótico *in vitro* o una prueba letal recesiva asociada al sexo con *Drosophila melanogaster* ;
- c) una prueba de aberraciones cromosómicas *in vitro* e *in vivo*.

Sin embargo, esta combinación no significa que los demás tipos de pruebas sean inapropiados o que no se acepten como alternativa otras pruebas, especialmente *in vivo*.

En todos los casos deberá justificarse la elección de las pruebas. Éstas se habrán de realizar con arreglo a procedimientos establecidos y validados. En función de los resultados de las pruebas, del perfil toxicológico general de la sustancia y del uso previsto, podrá ser preciso efectuar exámenes complementarios.

3.2.2. Para los preparados enzimáticos derivados de microorganismos, las pruebas que normalmente se exigirán son las siguientes :

- a) una prueba de mutaciones génicas en bacterias ;
- b) una prueba de aberraciones cromosómicas (preferentemente *in vitro*).

Las pruebas toxicológicas se realizarán, en la medida de lo posible, en un lote del producto final de fermentación purificado, antes de añadir excipientes, diluyentes u otras sustancias. Por norma general, deberán realizarse con arreglo a directrices establecidas⁽¹⁾ por organismos internacionales reconocidos, si bien, debido a los efectos que la naturaleza proteica o las actividades enzimáticas de algunos preparados enzimáticos pueden producir a nivel celular, podrán necesitarse algunas modificaciones de los protocolos modelo de pruebas, especialmente en el caso de las pruebas *in vitro*. Dichas modificaciones se aceptarán si se aportan argumentos que las justifiquen.

El sistema de pruebas se diseñará para poner de manifiesto reacciones tóxicas no especificadas y posibles efectos genotóxicos. La combinación de la información de las características generales con la que arroje ese conjunto de pruebas hará posible detectar la presencia en el producto tanto de toxinas específicas bien conocidas como de componentes tóxicos desconocidos.

El informe toxicológico deberá incluir documentación que demuestre satisfactoriamente que las pruebas se han realizado con el material que constituye la base del producto comercial descrito en el expediente tecnológico.

3.3. Aspectos farmacocinéticos

Si la sustancia activa es una sustancia químicamente definida, deberán efectuarse estudios de balance y de identificación de metabolitos, empleando para ello moléculas debidamente marcadas u otras técnicas apropiadas y abarcando la administración tanto de dosis únicas como de dosis múltiples de la sustancia activa en períodos de tiempo convenientes. Los estudios del metabolismo habrán de comprender además la investigación de la farmacocinética de la sustancia activa y de los principales metabolitos. Se prestará atención a las diferencias que presente la metabolización de la sustancia activa por las distintas especies animales con objeto de elegir entre éstas la que sea más útil para las investigaciones toxicológicas posteriores.

3.4. Toxicidad subcrónica

En general, estos estudios deberán realizarse con dos especies animales (una de ellas será, preferentemente, la rata). La segunda podrá ser, en ciertos casos, una de las especies a las que se destine el aditivo. La sustancia se administrará por vía oral y se determinará la relación dosis-respuesta. La duración de la prueba en roedores será como mínimo de noventa días.

En algunos casos será preciso efectuar estudios de una duración de entre seis meses y dos años con animales no roedores para determinar las diferencias de sensibilidad de las distintas especies animales a la sustancia de que se trate.

Estos estudios no serán necesarios cuando se trate de microorganismos. En el caso de los preparados enzimáticos derivados de microorganismos, podrá bastar con una prueba de toxicidad oral de noventa días realizada con una especie de roedores.

3.5. Toxicidad crónica/carcinogenicidad

Los estudios de toxicidad crónica deberán efectuarse con una especie de roedores (preferentemente ratas) y los de carcinogenicidad preferentemente con dos. La sustancia se administrará por vía oral en diferentes dosis. Asimismo, se podrá efectuar un estudio combinado de toxicidad crónica y carcinogenicidad con exposición *in-utero*. Los ensayos se prolongarán un mínimo de veinticuatro meses en el caso de las ratas y de dieciocho meses en el de los ratones. Si se continúa más allá de este período mínimo, el experimento finalizará cuando el porcentaje de animales supervivientes de cada grupo, con excepción del que haya recibido la dosis más alta, quede reducido al 20 %.

⁽¹⁾ Como, por ejemplo :

— Presentación de una solicitud para la evaluación de un aditivo alimentario antes de su autorización. 1989 (ISBN 92-826-0135-B).

— Informe del Comité científico de alimentación humana sobre directrices para la evaluación de seguridad de los aditivos alimentarios. 1980, 10a serie de informes (EUR 6892).

Durante el período de pruebas se realizarán, a intervalos adecuados, análisis de química clínica, hematológicos y urinarios completos. Deberán efectuarse exámenes macroscópicos e histológicos completos de todos los animales que mueran durante las pruebas y de todos los que sobrevivan al término de éstas.

Estos estudios no serán necesarios cuando se trate de microorganismos o de preparados enzimáticos.

- 3.6. *Toxicidad reproductiva* (si la sustancia activa es una sustancia químicamente definida)
Los estudios de los efectos en la reproducción se efectuarán preferentemente con ratas. Se extenderán como mínimo a dos generaciones en línea directa y podrán combinarse con estudios de embriotoxicidad, teratogénesis incluida. Todos los parámetros referentes a la fertilidad, la gestación, el parto y la situación peri y postnatal deberán estudiarse y anotarse cuidadosamente. Los estudios específicos de teratogénesis tendrán que efectuarse con al menos dos especies animales apropiadas.
- 3.7. *Toxicología de los metabolitos* (si la sustancia activa es una sustancia químicamente definida)
Se requerirá información relativa al cálculo de la concentración de residuos como base para la evaluación de los riesgos para el ser humano.
Se presentarán las bases para el cálculo del tiempo de espera propuesto. Los estudios mencionados en el punto 1.3.4 deberán efectuarse con animales de laboratorio.
- 3.8. *Otros estudios*
Podrá presentarse cualquier otro estudio especial que aporte complementos de información útiles para la evaluación de la sustancia (por ejemplo, sobre la biodisponibilidad, la neurotoxicidad o la inmunotoxicidad).

CAPÍTULO V

MODELO DE MONOGRAFÍA

1. **Identidad del aditivo**
 - 1.1. *Denominación o denominaciones comerciales propuestas*
 - 1.2. *Tipo de aditivo según su función principal*
 - 1.3. *Composición cualitativa y cuantitativa (sustancia activa, otros componentes, impurezas)*
 - 1.4. *Estado físico, tamaño de las partículas*
 - 1.5. *Tratamientos específicos eventuales*
N. B. : Si la sustancia activa es una mezcla de componentes activos, cada uno de los cuales será claramente definido, deberán describirse por separado los principales, indicándose su proporción en la mezcla.
2. **Características de la sustancia activa**
 - 2.1. Sustancias químicamente definidas : denominación genérica, denominación química según la nomenclatura UIQPA, otras denominaciones genéricas internacionales y abreviaturas. Número CAS (Chemical Abstracts Service Number).
Microorganismos : denominación y descripción taxonómica según los códigos de nomenclatura internacionales. También podrán emplearse otros manuales de clasificación reconocidos internacionalmente (!).
Preparados enzimáticos : denominación según las principales actividades enzimáticas descritas en IUB/UIQPA. Números EINECS y CAS.
 - 2.2. Fórmula empírica y estructural y peso molecular. Si la sustancia activa es un producto de fermentación, composición cualitativa y cuantitativa de los principales componentes.
Microorganismos : nombre y lugar de la colección de cultivos donde se encuentre depositada la cepa, si es posible una colección de la CE, y número de registro, modificaciones genéticas y todas las propiedades pertinentes para su identificación.
Preparados enzimáticos : origen biológico (si son de origen microbiano : nombre y lugar de la colección de cultivos donde se encuentre depositada la cepa, si es posible una colección de la CE, y número de registro, modificaciones genéticas y todas las propiedades pertinentes para su identificación), actividades en relación con los correspondientes sustratos tipo químicamente puros y otras características fisicoquímicas.
 - 2.3. *Grado de pureza*
Composición cualitativa y cuantitativa de las impurezas.
Microorganismos : estabilidad genética y pureza de las cepas cultivadas.
Preparados enzimáticos :
— pureza [grado de contaminación microbiana, metales pesados, ausencia de toxinas (por ejemplo, micotoxinas) procedentes del organismo fuente, demostrada por un método adecuado];

(!) Como el *Manual of Systematic Bacteriology* de Bergey, *The Yeasts, a taxonomic study* de Lodder y Kreger van Rij, *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi* de Hawksworth, Sutton y Ainsworth, o *The Genus Aspergillus* de Raper y Fennel.

- ausencia de actividad antimicrobiana al nivel de utilización en el pienso, determinada por un método apropiado ;
- composición de los componentes no enzimáticos (particularmente de los sólidos orgánicos totales).

2.4. *Propiedades pertinentes*

Sustancias químicamente definidas : propiedades electrostáticas, punto de fusión, punto de ebullición, temperatura de descomposición, densidad, tensión de vapor, solubilidad en agua y en disolventes orgánicos, espectro de masa y de absorción y cualquier otra propiedad física pertinente.

Microorganismos : propiedades relevantes para la identificación y el uso previsto (por ejemplo, forma vegetativa o esporulada, UFC por gramo, etc.).

Preparados enzimáticos : valores óptimos de pH y temperatura y demás propiedades pertinentes.

3. **Propiedades fisicoquímicas, tecnológicas y biológicas del aditivo**

- 3.1. Estabilidad (para los microorganismos : pérdida de actividad biológica, por ejemplo, viabilidad) respecto a agentes atmosféricos tales como la luz, la temperatura, el pH, la humedad y el oxígeno. Período de validez.
- 3.2. Estabilidad (para los microorganismos : pérdida de actividad biológica, por ejemplo, viabilidad) durante la preparación de las premezclas y los piensos, en particular, estabilidad frente al calor, la presión y la humedad. Eventuales productos de descomposición.
- 3.3. Estabilidad (para los microorganismos : pérdida de actividad biológica, por ejemplo, viabilidad) durante la conservación de las premezclas y los piensos en condiciones determinadas. Período de validez.
- 3.4. Otras propiedades fisicoquímicas, tecnológicas y biológicas pertinentes, como la aptitud para formar mezclas homogéneas en las premezclas y en los piensos, propiedades en relación con la formación de polvo y, para los microorganismos y los preparados enzimáticos, evaluación de la resistencia a la degradación o a la pérdida de actividad biológica en el tracto digestivo o mediante sistemas de simulación *in vitro*.
- 3.5. Incompatibilidades o interacciones fisicoquímicas o biológicas (por ejemplo con los piensos, con otros aditivos aprobados o con medicamentos).

4. **Métodos de control**

- 4.1. Descripción de los métodos aplicados para establecer los criterios enunciados en los puntos 1.3, 2.3, 2.4, 3.1, 3.2, 3.3 y 3.4 de este capítulo.
- 4.2. Descripción de los métodos de análisis cualitativo y cuantitativo empleados para determinar los residuos de aditivos en los productos animales.
- 4.3. Si dichos métodos han sido publicados, bastará con indicar las referencias bibliográficas, debiéndose facilitar una separata de la publicación.

5. **Propiedades biológicas del aditivo**

- 5.1. Coccidiostáticos y otros medicamentos : datos sobre los efectos profilácticos (por ejemplo, morbilidad, número de ooquistes y calificación de las lesiones).
- 5.2. Aditivos zootécnicos distintos de los contemplados en el punto 5.1, incluidos, en su caso, los microorganismos y preparados enzimáticos : datos sobre los efectos en la eficacia nutritiva, en el crecimiento de los animales, en las características y el rendimiento de la producción animal, en el bienestar animal y en otros parámetros que tengan efectos positivos en la producción animal.
- 5.3. Eventuales contraindicaciones o advertencias, incluidas las incompatibilidades biológicas, justificándolas.

6. **Indicación cuantitativa y cualitativa de los eventuales residuos encontrados en productos de origen animal después de haber seguido las condiciones de empleo del aditivo previstas.**

7. **Otras características pertinentes para la identificación del aditivo.**
