

**REGULAMENTO(UE) N.º 589/2014 DA COMISSÃO****de 2 de junho de 2014****que estabelece métodos de amostragem e análise para o controlo dos teores de dioxinas, PCB sob a forma de dioxina e PCB não semelhantes a dioxinas em determinados géneros alimentícios e que revoga o Regulamento (UE) n.º 252/2012****(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 (CE) n.º 882/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de abril de 2004, relativo aos controlos oficiais realizados para assegurar a verificação do cumprimento da legislação relativa aos alimentos para animais e aos géneros alimentícios e das normas relativas à saúde e ao bem-estar dos animais <sup>(1)</sup>, nomeadamente o artigo 11.º, n.º 4,

Considerando o seguinte:

- (1) O Regulamento (CE) n.º 1881/2006 da Comissão <sup>(2)</sup> define os teores máximos para PCB não semelhantes a dioxinas, dioxinas e furanos e para a soma de dioxinas, furanos e de PCB sob a forma de dioxina em determinados géneros alimentícios.
- (2) A Recomendação 2013/711/UE da Comissão <sup>(3)</sup> define os níveis de ação para estimular uma abordagem proativa destinada a reduzir a presença de dibenzo-p-dioxinas policloradas e dibenzofuranos policlorados (PCDD/F) e PCB sob a forma de dioxina nos alimentos. Estes níveis de ação são um instrumento ao serviço das autoridades competentes e dos operadores para determinar as situações nas quais se justifica identificar uma fonte de contaminação e adotar medidas com vista à sua redução ou eliminação.
- (3) O Regulamento (UE) n.º 252/2012 da Comissão, de 21 de março de 2012 <sup>(4)</sup>, define disposições específicas relativamente ao procedimento de amostragem e aos métodos de análise a serem aplicados para fins de controlo oficial.
- (4) As disposições estabelecidas no presente regulamento referem-se exclusivamente à amostragem e à análise de dioxinas, de PCB sob a forma de dioxina e PCB não semelhantes a dioxinas em aplicação do Regulamento (CE) n.º 1881/2006 e da Recomendação 2013/711/UE. As referidas disposições não afetam a estratégia de amostragem, os níveis de amostragem nem a frequência, tal como especificado nos anexos III e IV da Diretiva 96/23/CE do Conselho <sup>(5)</sup>. Não afetam os critérios de seleção da amostragem previstos na Decisão 98/179/CE da Comissão <sup>(6)</sup>.
- (5) Pode utilizar-se um método de análise de pré-seleção com validação amplamente aceitável e com rendimento elevado para identificar as amostras com teores significativos de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina (de preferência, selecionando amostras que excedam os níveis de ação e garantindo a seleção de amostras que excedam os teores máximos). Os teores de PCDD/F e de PCB sob a forma de dioxina nestas amostras têm de ser determinados por um método de análise de confirmação. Por conseguinte, é conveniente estabelecer requisitos adequados para o método de pré-seleção certificando-se de que a taxa de falsos resultados conformes relativamente aos teores máximos é inferior a 5 % e requisitos rigorosos para os métodos de análise de confirmação. Além disso, os métodos de confirmação com sensibilidade suficiente permitem a determinação de teores também na gama inferior dos níveis de contaminação de base. Tal é importante para o acompanhamento das tendências ao longo do tempo, a avaliação da exposição e para a reavaliação dos teores máximos e dos níveis de ação.
- (6) A amostragem de peixes de grandes dimensões deve ser especificada, por forma a garantir uma abordagem harmonizada em toda a União.

<sup>(1)</sup> JO L 165 de 30.4.2004, p. 1.

<sup>(2)</sup> Regulamento (CE) n.º 1881/2006 da Comissão, de 19 de dezembro de 2006, que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios (JO L 364 de 20.12.2006, p. 5).

<sup>(3)</sup> Recomendação 2013/711/UE da Comissão, de 3 de dezembro de 2013, relativa à redução da presença de dioxinas, furanos e PCB nos alimentos para animais e nos géneros alimentícios (JO L 323 de 4.12.2013, p. 37).

<sup>(4)</sup> Regulamento (UE) n.º 252/2012 da Comissão, de 21 de março de 2012, que estabelece métodos de amostragem e análise para o controlo oficial dos teores de dioxinas, PCB sob a forma de dioxina e PCB não semelhantes a dioxinas em determinados géneros alimentícios e que revoga o Regulamento (CE) n.º 1883/2006 (JO L 84 de 23.3.2012, p. 1).

<sup>(5)</sup> Diretiva 96/23/CE do Conselho, de 29 de abril de 1996, relativa às medidas de controlo a aplicar a certas substâncias e aos seus resíduos nos animais vivos e respetivos produtos e que revoga as Diretivas 85/358/CEE e 86/469/CEE e as Decisões 89/187/CEE e 91/664/CEE (JO L 125 de 23.5.1996, p. 10).

<sup>(6)</sup> Decisão 98/179/CE da Comissão, de 23 de fevereiro de 1998, que estabelece regras para a colheita das amostras oficiais a utilizar na pesquisa de determinadas substâncias e seus resíduos nos animais vivos e respetivos produtos (JO L 65 de 5.3.1998, p. 31).

- (7) Em peixes da mesma espécie provenientes da mesma região, o teor de dioxinas, de PCB sob a forma de dioxina e de PCB não semelhantes a dioxinas pode ser diferente, consoante o tamanho e/ou a idade do peixe. Além disso, o teor de dioxinas, de PCB sob a forma de dioxina e de PCB não semelhantes a dioxinas não é necessariamente o mesmo em todas as partes do peixe. Por conseguinte, é necessário que a amostragem e a preparação da amostra sejam especificadas, por forma a garantir uma abordagem harmonizada em toda a União.
- (8) É importante que os resultados analíticos sejam notificados e interpretados de maneira uniforme, a fim de assegurar uma abordagem harmonizada do controlo do cumprimento em toda a União.
- (9) Para além da cromatografia gasosa/espectrometria de massa de alta resolução (GC-HRMS), o progresso e os desenvolvimentos técnicos têm revelado que se pode utilizar também a cromatografia gasosa/espectrometria de massa em tandem (GC-MS/MS) como método confirmatório para verificar o cumprimento do teor máximo. O Regulamento (UE) n.º 252/2012 deve, por conseguinte, ser substituído por um novo regulamento que preveja a utilização da cromatografia gasosa/espectrometria de massa em tandem (GC-MS/MS) como um método confirmatório adequado para verificar o cumprimento do teor máximo.
- (10) As medidas previstas no presente regulamento estão em conformidade com o parecer do Comité Permanente da Cadeia Alimentar e da Saúde Animal,

ADOTOU O PRESENTE REGULAMENTO:

*Artigo 1.º*

Para efeitos do presente regulamento, são aplicáveis as definições e abreviaturas estabelecidas no anexo I.

*Artigo 2.º*

A amostragem destinada ao controlo oficial dos teores de dioxinas, furanos, PCB sob a forma de dioxina e PCB não semelhantes a dioxinas nos géneros alimentícios enumerados na secção 5 do anexo do Regulamento (CE) n.º 1881/2006 deve realizar-se em conformidade com os métodos descritos no anexo II do presente regulamento.

*Artigo 3.º*

A preparação e a análise das amostras destinadas ao controlo dos teores de dioxinas, furanos e PCB sob a forma de dioxina nos géneros alimentícios enumerados na secção 5 do anexo do Regulamento (CE) n.º 1881/2006 devem realizar-se em conformidade com os métodos descritos no anexo III do presente regulamento.

*Artigo 4.º*

As análises destinadas ao controlo dos teores de PCB não semelhantes a dioxinas nos géneros alimentícios enumerados na secção 5 do anexo do Regulamento (CE) n.º 1881/2006 são realizadas em conformidade com os requisitos aplicáveis aos métodos de análise descritos no anexo IV do presente regulamento.

*Artigo 5.º*

É revogado o Regulamento (UE) n.º 252/2012.

As referências ao regulamento revogado devem entender-se como sendo feitas ao presente regulamento.

*Artigo 6.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 2 de junho de 2014.

*Pela Comissão*  
*O Presidente*  
José Manuel BARROSO

## ANEXO I

## DEFINIÇÕES E ABREVIATURAS

## I. DEFINIÇÕES

Para efeitos do presente regulamento, são aplicáveis as definições estabelecidas no anexo I da Decisão 2002/657/CE da Comissão <sup>(1)</sup>.

Além destas definições, para efeitos do disposto no presente regulamento, são aplicáveis as seguintes definições:

- 1.1. «*Nível de ação*», o teor de uma dada substância, tal como definido no anexo da Recomendação 2013/711/UE, que dá início a investigações para identificar a fonte dessa substância, nos casos em que é detetado um aumento dos teores da substância.
- 1.2. «*Métodos de pré-seleção*», os métodos utilizados na seleção das amostras com teores de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina que excedam os teores máximos, ou os níveis de ação. Esta abordagem deve permitir um método de pré-seleção que permita uma boa relação custo-eficácia com a análise de um elevado número de amostras, aumentando assim a oportunidade de descobrir novos incidentes com elevada exposição e riscos para a saúde dos consumidores. Os métodos de pré-seleção devem basear-se em métodos bioanalíticos ou em GC-MS. Os resultados de amostras que excedem o valor-limite para verificar a conformidade com o teor máximo devem ser verificados por uma reapreciação completa da amostra inicial com recurso a um método de confirmação.
- 1.3. «*Métodos de confirmação*», métodos que fornecem informação completa ou complementar que permite a identificação e a quantificação inequívocas do teor máximo ou, em caso de necessidade, do nível de ação de PCDD/F e de PCB sob a forma de dioxina. Tais métodos utilizam a cromatografia em fase gasosa/espectrometria de massa de alta resolução (GC-HRMS) ou cromatografia gasosa/espectrometria de massa em tandem (GC-MS/MS).
- 1.4. «*Métodos bioanalíticos*», os métodos baseados na utilização de princípios biológicos, como ensaios com células, ensaios com recetores ou imunoenaios. Não dão resultados ao nível do congénere, mas apenas uma indicação <sup>(2)</sup> do valor TEQ, expresso em equivalentes bioanalíticos (BEQ), no sentido de reconhecer o facto de que nem todos os compostos presentes num extrato de amostra que produzem uma resposta no teste podem cumprir todos os requisitos do princípio de TEQ.
- 1.5. «*Recuperação aparente do bioensaio*», o valor BEQ calculado a partir da curva de calibração da TCDD ou do PCB 126 corrigida em função do resultado do ensaio em branco e, em seguida, dividido pelo valor TEQ determinado pelo método de confirmação. Visa corrigir fatores como a perda de PCDD/PCDF (a seguir PCDD/F) e de compostos sob a forma de dioxina durante as fases de extração e de limpeza, compostos co-extraídos que aumentam ou diminuem a resposta (efeitos agonísticos e antagonísticos), a qualidade de ajustamento da curva, ou diferenças entre os valores FET e REP. A recuperação aparente do bioensaio é calculada a partir de amostras de referência apropriadas com padrões de congéneres representativos próximos do teor máximo ou do nível de ação.
- 1.6. «*Métodos semiquantitativos*», métodos que dão uma indicação aproximada da concentração do analito suposto, embora o resultado numérico não preencha os requisitos para os métodos quantitativos.
- 1.7. «*Limite de quantificação específico aceite para um congénere individual numa amostra*», o teor mais baixo do analito que pode ser medido com uma certeza estatística razoável, cumprindo os critérios de identificação, tal como descritos em normas reconhecidas internacionalmente, por exemplo, na norma EN 16215:2012 (Alimentação animal — determinação de dioxinas e de PCB sob a forma de dioxina por GC/HRMS e de PCB indicadores por GC/HRMS) e/ou nos métodos EPA 1613 e 1668, revistos.

O limite de quantificação de um congénere individual pode ser identificado como:

- a) A concentração de um analito no extrato de uma amostra que produz uma resposta instrumental a dois iões diferentes a ser monitorizada com um rácio S/R (sinal/ruído) de 3:1 para o sinal de dados brutos menos intenso;  
ou se, por motivos de ordem técnica, o cálculo sinal/ruído não fornecer resultados fiáveis,
- b) O ponto de concentração mais baixo numa curva de calibração que apresenta um desvio aceitável ( $\leq 30\%$ ) e coerente (medido, pelo menos, no início e no fim de uma série analítica de amostras) em relação ao fator de resposta médio relativo calculado para todos os pontos da curva de calibração em cada série de amostras <sup>(3)</sup>.

<sup>(1)</sup> Decisão 2002/657/CE da Comissão, de 14 de agosto de 2002, que dá execução ao disposto na Diretiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados (JO L 221 de 17.8.2002, p. 8).

<sup>(2)</sup> Os métodos bioanalíticos não são específicos para os congéneres incluídos no sistema dos FET. Podem estar presentes no extrato de amostra outros compostos estruturalmente relacionados ativos como AhR (recetor aril-hidro-carboneto) que contribuem para a resposta global. Por conseguinte, os resultados bioanalíticos não podem ser uma estimativa, mas sim uma indicação do nível TEQ na amostra.

<sup>(3)</sup> O limite de quantificação (LOQ) é calculado a partir do ponto de concentração mais baixo tendo em conta a recuperação dos padrões internos e a quantidade da amostra.

- 1.8. «*Limite superior*», o conceito que preconiza que o contributo de cada congénere não quantificado seja igual ao limite de quantificação.
- 1.9. «*Limite inferior*», o conceito que preconiza que o contributo de cada congénere não quantificado seja igual a zero.
- 1.10. «*Limite médio*», o conceito que preconiza que o contributo de cada congénere não quantificado seja igual a metade do limite de quantificação.
- 1.11. «*Lote*», quantidade de alimentos identificável, entregue de uma vez, que apresenta, conforme estabelecido pelo agente responsável, características comuns tais como a origem, a variedade, o tipo de embalagem, o embalador, o expedidor ou a marcação. No caso do peixe e/ou de produtos da pesca, deve também ser comparável o seu tamanho. Se, dentro de uma remessa, o tamanho e/ou o peso do peixe não forem comparáveis, a remessa pode ainda ser considerada um lote, mas tem de ser aplicado um procedimento de amostragem específico.
- 1.12. «*Sublote*», parte designada de um grande lote para aplicação do método de amostragem a essa parte designada. Cada sublote deve ser fisicamente separado e identificável.
- 1.13. «*Amostra elementar*», quantidade de material colhido num só ponto do lote ou sublote.
- 1.14. «*Amostra global*», a combinação da totalidade das amostras elementares colhidas no lote ou sublote.
- 1.15. «*Amostra de laboratório*», uma parte/quantidade representativa da amostra global destinada ao laboratório.

## II. ABREVIATURAS UTILIZADAS

BEQ	Equivalentes bioanalíticos
GC	Cromatografia em fase gasosa
HRMS	Espectrometria de massa de elevada resolução
LRMS	Espectrometria de massa de baixa resolução
EM/EM	Espectrometria de massa em tandem
PCB	Bifenilos policlorados
PCDD	Dibenzeno-p-dioxinas policloradas
PCDF	Dibenzofuranos policlorados
QC	Controlo da qualidade
REP	Atividade relativa
FET	Fator de equivalência tóxica
TEQ	Equivalentes tóxicos
TCDD	Tetraclorodibenzodioxina
U	Incerteza expandida da medição

---

## ANEXO II

**MÉTODOS DE AMOSTRAGEM PARA O CONTROLO OFICIAL DOS TEORES DE DIOXINAS (PCDD/F), PCB SOB A FORMA DE DIOXINA E PCB NÃO SEMELHANTES A DIOXINAS EM DETERMINADOS GÉNEROS ALIMENTÍCIOS**

## I. ÂMBITO DE APLICAÇÃO

As amostras destinadas ao controlo oficial dos teores de dioxinas (PCDD/F), de PCB sob a forma de dioxina e de PCB não semelhantes a dioxinas, a seguir referidas como dioxinas e PCB, nos géneros alimentícios são colhidas em conformidade com os métodos descritos no presente anexo. As amostras globais assim obtidas são consideradas representativas dos lotes ou sublotos dos quais foram colhidas. A observância dos teores máximos definidos no Regulamento (CE) n.º 1881/2006 da Comissão, que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios, é estabelecida em função dos teores determinados nas amostras de laboratório.

## II. DISPOSIÇÕES GERAIS

**1. Pessoal**

A amostragem deve ser efetuada por uma pessoa autorizada nomeada pelo Estado-Membro.

**2. Material a amostrar**

Cada lote ou sublote a analisar deve ser objeto de uma amostragem separada.

**3. Precauções a tomar**

Durante a amostragem e a preparação das amostras, devem ser tomadas precauções para evitar qualquer alteração que possa afetar o teor de dioxinas e de PCB, afetar negativamente a determinação analítica ou tornar as amostras globais não representativas.

**4. Amostras elementares**

Na medida do possível, as amostras elementares devem ser colhidas em diversos pontos do lote ou sublote. Qualquer inobservância deste procedimento deve ser assinalada no registo previsto no ponto II.8 do presente anexo.

**5. Preparação da amostra global**

A amostra global é obtida através da junção das amostras elementares. Deve pesar, no mínimo, 1 kg, a menos que tal não seja prático, por exemplo, quando a amostra tiver sido colhida de uma única embalagem ou quando o produto tiver um elevado valor comercial.

**6. Amostras idênticas**

As amostras idênticas, destinadas à eventual tomada de medidas de execução, a ações judiciais e para efeitos de arbitragem, devem ser obtidas a partir da amostra global homogeneizada, desde que esse procedimento não infrinja as regras dos Estados-Membros no que respeita aos direitos dos operadores das empresas do setor alimentar. A dimensão das amostras de laboratório para efeitos de medidas de execução deve ser de ordem a permitir, no mínimo, análises em duplicado.

**7. Acondicionamento e envio das amostras**

Colocar cada amostra num recipiente limpo, de material inerte, protegendo-a adequadamente de qualquer possível contaminação, de perda de analitos por adsorção na parede interna do recipiente ou de qualquer dano durante o transporte. Devem ser tomadas todas as precauções necessárias para evitar qualquer modificação da composição da amostra que possa ocorrer durante o transporte ou a armazenagem.

**8. Selagem e rotulagem das amostras**

Cada amostra colhida para efeitos oficiais deve ser selada no local de amostragem e identificada de acordo com as regras dos Estados-Membros.

Para cada amostragem, deve ser mantido um registo que permita identificar sem ambiguidade o lote amostrado, indicando a data e o local de amostragem, bem como qualquer informação suplementar que possa ser útil ao analista.

## III. PLANO DE AMOSTRAGEM

O método de amostragem aplicado deve garantir que a amostra global é representativa do (sub)lote a controlar.

## 1. Divisão dos lotes em sublotos

Os grandes lotes devem ser subdivididos em sublotos, desde que os sublotos possam ser fisicamente separados. Para produtos comercializados em remessas a granel (por exemplo, os óleos vegetais), é aplicável o quadro 1. Para outros produtos, é aplicável o quadro 2. Dado que o peso do lote nem sempre é um múltiplo exato do peso dos sublotos, o peso dos sublotos pode exceder o peso indicado até um máximo de 20 %.

Quadro 1

**Subdivisão de lotes em sublotos para produtos comercializados em remessas a granel**

Peso do lote (toneladas)	Peso ou número de sublotos
$\geq 1\ 500$	500 toneladas
$> 300$ e $< 1\ 500$	3 sublotos
$\geq 50$ e $\leq 300$	100 toneladas
$< 50$	—

Quadro 2

**Subdivisão de lotes em sublotos para outros produtos**

Peso do lote (toneladas)	Peso ou número de sublotos
$\geq 15$	15-30 toneladas
$< 15$	—

## 2. Número de amostras elementares

A amostra global, proveniente da junção de todas as amostras elementares, deve ser, no mínimo, de 1 kg (ver ponto II.5 do presente anexo).

O número mínimo de amostras elementares a colher do lote ou do sublote é o indicado nos quadros 3 e 4.

No caso de produtos líquidos comercializados a granel, o lote ou sublote deve, na medida do possível, ser cuidadosamente misturado e de forma a não afetar a qualidade do produto, quer manual quer mecanicamente, imediatamente antes da colheita da amostra. Neste caso, pode pressupor-se uma distribuição homogénea dos contaminantes dentro de um determinado lote ou sublote. Por conseguinte, é suficiente colher três amostras elementares de um lote ou sublote para constituir uma amostra global.

As amostras elementares são de peso semelhante. Uma amostra elementar deve pesar, no mínimo, 100 gramas.

Todas as alterações a esse procedimento devem ser assinaladas no registo previsto no ponto II.8 do presente anexo. Em conformidade com as disposições da Decisão 97/747/CE, que fixa o nível e a frequência de amostragem previstos pela Diretiva 96/23/CE do Conselho para a pesquisa de determinadas substâncias e seus resíduos em certos produtos de origem animal, a dimensão da amostra global para ovos de galinha é de, pelo menos, 12 ovos (para lotes por grosso e para lotes constituídos por embalagens individuais, aplicam-se os quadros 3 e 4).

Quadro 3

**Número mínimo de amostras elementares a colher do lote ou sublote**

Peso ou volume do lote/sublote (em kg ou litros)	Número mínimo de amostras elementares a colher
$< 50$	3
50 a 500	5
$> 500$	10

Caso o lote ou sublote sejam constituídos por embalagens individuais ou unidades, o número de embalagens ou unidades a colher para formar a amostra global é o que consta do quadro 4.

Quadro 4

**Número de embalagens ou unidades (amostras elementares) a colher para formar a amostra global caso o lote ou sublote consista em embalagens individuais ou unidades**

Número de embalagens ou unidades no lote ou sublote	Número de embalagens ou unidades a colher
1 a 25	no mínimo, 1 embalagem ou unidade
26 a 100	cerca de 5 %, no mínimo 2 embalagens ou unidades
> 100	cerca de 5 %, no máximo 10 embalagens ou unidades

**3. Disposições específicas para a amostragem de lotes contendo peixes inteiros de tamanho e peso comparáveis**

Os peixes são considerados como tendo um tamanho e peso comparáveis se a diferença em tamanho e peso não exceder cerca de 50 %.

O número de amostras elementares a colher do lote está definido no quadro 3. A amostra global, proveniente da junção de todas as amostras elementares, deve ser, no mínimo, de 1 kg (ver ponto II.5).

- Caso o lote a amostrar contenha peixes pequenos (cada um com peso inferior a cerca de 1 kg), o peixe inteiro é colhido como amostra elementar para efeitos de constituição da amostra global. Se a amostra global daí resultante pesar mais de 3 kg, as amostras elementares podem consistir da parte do meio dos peixes que formam a amostra global, pesando cada parte pelo menos 100 gramas. A parte inteira à qual o teor máximo seja aplicável é usada para a homogeneização da amostra.

A parte do meio do peixe é aquela em que se situa o centro de gravidade e que está localizado, na maioria dos casos, na barbatana dorsal (se o peixe tiver uma barbatana dorsal) ou a meio entre a abertura branquial e o ânus.

- Caso o lote a amostrar contenha peixes maiores (cada um com peso superior a cerca de 1 kg), a amostra elementar consistirá na parte do meio do peixe. Cada amostra elementar deve pesar, no mínimo, 100 gramas.

Para peixes de tamanho intermédio (com cerca de 1-6 kg), a amostra elementar é colhida como uma porção da parte do meio do peixe, entre a espinha dorsal e a barriga.

Para peixes muito grandes (por exemplo, com peso superior a cerca de 6 kg), a amostra elementar é colhida da parte comestível lateral-dorsal do lado direito (perspetiva frontal) da parte do meio do peixe. Caso a extração de uma porção da parte do meio do peixe possa resultar num prejuízo económico significativo, pode considerar-se suficiente a extração de três amostras elementares de, pelo menos, 350 gramas cada, independentemente da dimensão do lote, ou, em alternativa, podem ser colhidas porções iguais da parte comestível perto da cauda e da parte comestível perto da cabeça de um único peixe para formar a amostra elementar representativa do teor de dioxinas no peixe inteiro.

**4. Amostragem de lotes de peixe contendo peixes inteiros de tamanho e/ou peso diferentes**

- São aplicáveis as disposições do ponto III.3 no que respeita à constituição da amostra.
- No caso de uma classe/categoria de tamanho ou peso ser predominante (cerca de 80 % ou mais do lote), a amostra é colhida dos peixes com o tamanho ou peso predominantes. Esta amostra deve ser considerada representativa do lote inteiro.
- Se não predominar nenhuma classe/categoria específica de tamanho ou peso, então é necessário garantir que os peixes selecionados para a amostra são representativos do lote. No documento de orientação para a amostragem de peixes inteiros de tamanho e/ou peso diferentes <sup>(1)</sup> («*Guidance on sampling of whole fishes of different size and/or weight*») são apresentadas diretrizes específicas para estes casos.

**5. Amostragem na fase de venda a retalho**

A amostragem dos géneros alimentícios na fase de venda a retalho deve fazer-se, sempre que possível, em conformidade com as disposições a ela referentes, constantes do ponto III.2 do presente anexo.

<sup>(1)</sup> [http://ec.europa.eu/comm/food/food/chemicalsafety/contaminants/dioxins\\_en.htm](http://ec.europa.eu/comm/food/food/chemicalsafety/contaminants/dioxins_en.htm)

Sempre que tal não seja possível, pode ser utilizado um método de amostragem alternativo na fase de venda a retalho, desde que assegure a representatividade suficiente relativamente ao lote ou sublote submetido a amostragem.

#### IV. CONFORMIDADE DO LOTE OU DO SUBLOTE COM A ESPECIFICAÇÃO

##### 1. No que se refere a PCB não semelhantes a dioxinas

O lote é aceite se o resultado analítico não for superior ao teor máximo de PCB não semelhantes a dioxinas, tal como estabelecido no Regulamento (CE) n.º 1881/2006, tomando em consideração a incerteza de medição.

O lote não é conforme com o teor máximo estabelecido no Regulamento (CE) n.º 1881/2006 se o resultado analítico do limite superior, confirmado por análise em duplicado (\*), for superior ao teor máximo, com um grau de certeza elevado, tendo em conta a incerteza de medição. Para verificar a conformidade, é utilizada a média das duas determinações, tendo em conta a incerteza de medição.

A incerteza da medição pode ser tomada em consideração de acordo com uma das seguintes abordagens:

- calculando a incerteza expandida, utilizando um fator de expansão de 2, que permite obter um nível de confiança de cerca de 95 %. Um lote ou sublote não é conforme se o valor medido menos U for superior ao teor permitido definido,
- estabelecendo o limite de decisão (CC $\alpha$ ) em conformidade com o disposto na Decisão 2002/657/CE (ponto 3.1.2.5 do anexo I da referida decisão — caso das substâncias com um teor permitido definido). Um lote ou sublote não está conforme se o valor medido for igual ou superior ao CC $\alpha$ .

Estas regras são aplicáveis ao resultado analítico obtido na amostra para controlo oficial. Nos casos em que se efetuam análises para efeitos de ações judiciais ou de arbitragem, são aplicáveis as regras nacionais.

##### 2. No que se refere a dioxinas (PCDD/F) e PCB sob a forma de dioxina

O lote é aceite se o resultado de uma única análise:

- realizada mediante um método de pré-selecção, com uma taxa de falsos resultados conformes inferior a 5 %, indicar que o teor não excede o respetivo teor máximo de PCDD/F nem a soma de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina, tal como previsto no Regulamento (CE) n.º 1881/2006;
- realizada mediante um método de confirmação não exceder o respetivo teor máximo de PCDD/F nem a soma de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina, tal como previsto no Regulamento (CE) n.º 1881/2006, tendo em conta a incerteza da medição.

Para os ensaios de pré-selecção, deve ser estabelecido um valor-limite para a decisão sobre o cumprimento dos respetivos teores máximos fixados quer para PCDD/F, quer para a soma de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina.

O lote não é conforme com o teor máximo estabelecido no Regulamento (CE) n.º 1881/2006 se o resultado analítico do limite superior, obtido com um método de confirmação e confirmado por análise em duplicado (\*\*), for superior ao teor máximo, com um grau de certeza elevado, tendo em conta a incerteza de medição. Para verificar a conformidade, é utilizada a média das duas determinações, tendo em conta a incerteza de medição.

A incerteza da medição pode ser tomada em consideração de acordo com uma das seguintes abordagens:

- calculando a incerteza expandida, utilizando um fator de expansão de 2, que permite obter um nível de confiança de cerca de 95 %. Um lote ou sublote não é conforme se o valor medido menos U for superior ao teor permitido definido. No caso de uma determinação em separado de PCDD/F e de PCB sob a forma de dioxina, a soma da incerteza expandida estimada dos resultados analíticos separados de PCDD/F e de PCB sob a forma de dioxina tem de ser utilizada para a incerteza expandida estimada da soma dos PCDD/F e dos PCB sob a forma de dioxina,
- estabelecendo o limite de decisão (CC $\alpha$ ) em conformidade com o disposto na Decisão 2002/657/CE (ponto 3.1.2.5 do anexo I da referida decisão — caso das substâncias com um limite permitido definido). Um lote ou sublote não é conforme se o valor medido for igual ou superior ao CC $\alpha$ .

Estas regras são aplicáveis ao resultado analítico obtido na amostra para controlo oficial. Nos casos em que se efetuam análises para efeitos de ações judiciais ou de arbitragem, são aplicáveis as regras nacionais.

(\*) A análise em duplicado é necessária se o resultado da primeira determinação com recurso aos métodos de confirmação que utilizam padrões internos marcados com <sup>13</sup>C para os analitos pertinentes não for conforme. A análise em duplicado é necessária para se excluir a possibilidade de contaminação cruzada interna ou de uma troca accidental de amostras. No caso de a análise ser realizada no contexto de um incidente de contaminação por dioxinas, a confirmação através de uma análise em duplicado poderá ser omitida, se as amostras selecionadas para análise estiverem associadas, através da rastreabilidade, a esse incidente de contaminação e o teor obtido for significativamente superior ao teor máximo.

(\*\*) A explicação e os requisitos para as análises em duplicado para efeitos de controlo dos níveis de ação são idênticos aos referidos na nota de rodapé (\*) para os teores máximos.

## V. SUPERAÇÃO DE NÍVEIS DE AÇÃO

Os níveis de ação servem de instrumento para a seleção de amostras nos casos em que se justifica identificar uma fonte de contaminação e adotar medidas com vista à sua redução ou eliminação. Os métodos de pré-seleção devem estabelecer valores-limite adequados para a seleção dessas amostras. Caso sejam necessários esforços significativos para identificar a fonte e reduzir ou eliminar a contaminação, pode ser adequado confirmar a superação do nível de ação por uma análise em duplicado mediante um método de confirmação e tendo em conta a incerteza de medição (\*\*).

---

## ANEXO III

**PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E REQUISITOS RESPEITANTES AOS MÉTODOS DE ANÁLISE UTILIZADOS NO CONTROLO DOS TEORES DE DIOXINAS (PCDD/F) E PCB SOB A FORMA DE DIOXINA EM DETERMINADOS GÊNEROS ALIMENTÍCIOS****1. ÂMBITO DE APLICAÇÃO**

Os requisitos expostos no presente anexo devem ser aplicados quando se analisam géneros alimentícios para efeitos de controlo oficial dos teores de dibenzo-p-dioxinas policloradas e dibenzofuranos policlorados (PCDD/F) substituídos nas posições 2, 3, 7 e 8, e de bifenilos policlorados (PCB) sob a forma de dioxina, bem como para outros fins regulamentares.

A monitorização da presença de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina nos géneros alimentícios pode ser realizada com dois tipos diferentes de métodos analíticos:

**a) Métodos de pré-seleção**

O objetivo dos métodos de pré-seleção é selecionar as amostras com teores de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina que excedam os teores máximos, ou os níveis de ação. Os métodos de pré-seleção devem permitir uma boa relação custo-eficácia com a análise de um elevado número de amostras, aumentando assim a oportunidade de descobrir novos incidentes com elevada exposição e riscos para a saúde dos consumidores. A sua aplicação deverá ter como objetivo evitar falsos resultados conformes. Podem incluir métodos bioanalíticos e métodos GC/MS.

Os métodos de pré-seleção comparam o resultado analítico com um valor-limite, fornecendo uma decisão de tipo sim/não sobre a eventual superação do teor máximo ou do nível de ação. É necessário que a concentração de PCDD/F e a soma de PCDD/F e de PCB sob a forma de dioxina em amostras suspeitas de não conformidade com o teor máximo seja determinada/confirmada por um método de confirmação.

Além disso, os métodos de pré-seleção podem dar uma indicação dos teores de PCDD/F e de PCB sob a forma de dioxina presentes na amostra. Em caso de aplicação de métodos bioanalíticos de pré-seleção, o resultado é expresso em equivalentes bioanalíticos (BEQ) enquanto que em caso de aplicação de métodos físico-químicos GC-MS, o mesmo é expresso em equivalentes tóxicos (TEQ). Os resultados dos métodos de pré-seleção indicados numericamente são adequados para a demonstração da conformidade ou da suspeita de não conformidade ou da superação dos níveis de ação e fornecem uma indicação da gama de teores em caso de acompanhamento através de métodos de confirmação. Estes métodos não são adequados para fins como a avaliação dos níveis de base, a estimativa da ingestão, o seguimento das tendências ao longo do tempo dos teores ou a reavaliação dos níveis de ação e dos teores máximos.

**b) Métodos de confirmação**

Os métodos de confirmação permitem a identificação e a quantificação inequívocas de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina presentes numa amostra, e fornecem informações exaustivas com base nos congéneres. Por conseguinte, estes métodos permitem o controlo dos teores máximos e dos níveis de ação, incluindo a confirmação de resultados obtidos por métodos de pré-seleção. Além disso, os resultados podem ser utilizados para outros fins, como é o caso da determinação de níveis de base reduzidos na monitorização dos alimentos, o seguimento das tendências ao longo do tempo, a avaliação da exposição da população e a criação de uma base de dados para uma eventual reavaliação dos níveis de ação e dos teores máximos. São também importantes para o estabelecimento de padrões de congéneres com vista a identificar a fonte de uma eventual contaminação; tais métodos utilizam GC-HRMS. Para confirmar a conformidade ou não conformidade com o teor máximo, também se pode utilizar a GC-MS/MS.

**2. CONTEXTO**

Para o cálculo de concentrações de equivalentes de toxicidade (TEQ), as concentrações de cada substância numa determinada amostra são multiplicadas pelos respectivos Factores de equivalência tóxica (FET), definidos pela Organização Mundial de Saúde e enumerados no apêndice do presente anexo, sendo subsequentemente somadas para darem a concentração total de compostos sob a forma de dioxina expressos em equivalentes de toxicidade (TEQ).

Os métodos de pré-seleção e de confirmação apenas podem ser aplicados para o controlo de uma determinada matriz se os métodos forem suficientemente sensíveis para detetar fiavelmente o teor máximo ou o nível de ação.

**3. REQUISITOS DE GARANTIA DA QUALIDADE**

- Devem ser tomadas medidas para evitar a contaminação cruzada em cada etapa do procedimento de amostragem e de análise.
- As amostras devem ser conservadas e transportadas em recipientes de vidro, alumínio, polipropileno ou polietileno, adequados para o armazenamento sem qualquer influência nos níveis de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina das amostras. Devem ser removidos do recipiente da amostra os vestígios de poeiras de papel.

- O armazenamento e o transporte das amostras têm de ser realizados de modo a manter a integridade da amostra de alimentos.
- Desde que relevante, triturar finamente e misturar cuidadosamente cada amostra de laboratório, mediante um processo relativamente ao qual se tenha demonstrado que possibilita uma homogeneização completa (por exemplo, trituração que permita passar por um crivo de 1 mm); as amostras devem ser esicadas antes da trituração, caso o teor em humidade seja demasiado elevado.
- É de importância geral o controlo dos reagentes, do material de vidro e do equipamento relativamente a uma possível influência nos resultados baseados em TEQ ou em BEQ.
- Deve ser efetuada uma análise em branco através da realização de todo o procedimento analítico, omitindo apenas a amostra.
- Para os métodos bioanalíticos, é de grande importância que todo o material de vidro e solventes utilizados na análise sejam testados para verificar se estão livres de compostos que interfiram com a deteção de compostos-alvo na gama de trabalho. O material de vidro deve ser enxaguado com solventes ou/e aquecido a temperaturas adequadas para remover da sua superfície vestígios de PCDD/F, de compostos sob a forma de dioxina e de compostos interferentes.
- A quantidade de amostra utilizada para a extração deve ser suficiente para cumprir os requisitos relativos a uma gama de trabalho suficientemente baixa, incluindo as concentrações dos teores máximos ou dos níveis de ação.
- Os procedimentos específicos de preparação de amostras utilizados para os produtos em causa devem seguir orientações aceites internacionalmente.
- No caso dos peixes, a pele tem de ser removida, dado que o teor máximo é aplicável à parte comestível sem pele. Contudo, é necessário que todos os restos da parte comestível e do tecido adiposo do lado interno da pele sejam cuidadosamente raspados e completamente separados da pele e sejam adicionados à amostra a analisar.

#### 4. REQUISITOS APLICÁVEIS AOS LABORATÓRIOS

- Em conformidade com o disposto no Regulamento (CE) n.º 882/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho <sup>(1)</sup>, os laboratórios devem ser acreditados por um organismo reconhecido que opere em conformidade com o Guia ISO 58, a fim de assegurar que aplicam a garantia de qualidade analítica. Os laboratórios devem ser acreditados em conformidade com a norma EN ISO/IEC/17025.
- A competência de um laboratório é comprovada mediante uma participação contínua e bem-sucedida em estudos interlaboratoriais para a determinação de PCDD/F e de PCB sob a forma de dioxina nas matrizes alimentares e nas gamas de concentrações relevantes.
- Os laboratórios que aplicam métodos de pré-seleção para o controlo de rotina de amostras devem estabelecer uma estreita cooperação com os laboratórios que aplicam o método de confirmação, tanto para o controlo da qualidade como para a confirmação do resultado analítico das amostras suspeitas.

#### 5. REQUISITOS BÁSICOS A CUMPRIR PELO PROCEDIMENTO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE DIOXINAS (PCDD/F) E DE PCB SOB A FORMA DE DIOXINA

##### 5.1. Gama de trabalho e limites de quantificação reduzidos

- Para os PCDD/F, as quantidades detetáveis devem situar-se na gama alta dos femtogramas ( $10^{-15}$  g) devido à extrema toxicidade de alguns destes compostos. Para a maioria das congéneres de PCB, o limite de quantificação na gama dos nanogramas ( $10^{-9}$  g) já é suficiente. No entanto, para a medição dos congéneres de PCB sob a forma de dioxina mais tóxicos (designadamente, os congéneres não-orto substituídos), o limite inferior da gama de trabalho deve atingir os valores inferiores dos picogramas ( $10^{-12}$  g).

##### 5.2. Seletividade (especificidade) elevada

- É necessário estabelecer uma distinção entre PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina e inúmeros compostos coextraídos e eventualmente interferentes, que estão presentes em concentrações que podem atingir várias ordens de grandeza superiores às dos analitos requeridos. Nos métodos de cromatografia gasosa/espectrometria de massa (GC-MS), é necessária uma diferenciação entre vários congéneres, nomeadamente entre congéneres tóxicos (por exemplo, os dezassete PCDD/F substituídos nas posições 2,3,7 e 8 e os doze PCB sob a forma de dioxina) e outros congéneres.
- Os métodos bioanalíticos devem ser capazes de detetar os compostos-alvo como a soma de PCDD/F e/ou de PCB sob a forma de dioxina. A limpeza (*clean-up*) das amostras destina-se a remover compostos conducentes a falsos resultados não conformes ou compostos que possam diminuir a resposta, provocando falsos resultados conformes.

<sup>(1)</sup> Regulamento (CE) n.º 882/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de abril de 2004, relativo aos controlos oficiais realizados para assegurar a verificação do cumprimento da legislação relativa aos alimentos para animais e aos géneros alimentícios e das normas relativas à saúde e ao bem-estar dos animais (JO L 165 de 30.4.2004, p. 1).

### 5.3. Exatidão elevada (rigor e precisão, recuperação aparente do bioensaio)

- Para os métodos GC-MS, a determinação deve fornecer uma estimativa válida da verdadeira concentração numa amostra. É necessária uma exatidão elevada (exatidão da medição: proximidade da concordância entre o resultado de uma medição e o valor verdadeiro ou que se presume verdadeiro da grandeza medida) por forma a evitar a rejeição do resultado da análise de uma amostra com base na reduzida fiabilidade do valor TEQ determinado. A exatidão é expressa em termos de *rigor* (diferença entre o valor médio medido para um analito num material certificado e o respetivo valor certificado, expresso em percentagem deste valor) e de *precisão* ( $RSD_R$ , desvio-padrão relativo, calculado a partir de resultados obtidos em condições de reprodutibilidade).
- Para métodos bioanalíticos, deve ser determinada a recuperação aparente do bioensaio.

### 5.4. Validação na gama do teor máximo e medidas gerais de controlo de qualidade

- Os laboratórios devem demonstrar o desempenho de um método na gama do teor máximo (por exemplo,  $0,5 \times 1 \times$  e  $2 \times$  o teor máximo) com um coeficiente de variação aceitável para análises repetidas, durante o processo de validação e/ou durante a análise de rotina.
- Os controlos regulares com ensaios em branco, com amostras enriquecidas ou análises de amostras de controlo (de preferência, se disponível, material de referência certificado) devem ser realizados como medidas internas de controlo da qualidade. Devem registar-se e verificar-se os gráficos de controlo de qualidade (CQ) para ensaios em branco, com amostras enriquecidas ou análises de amostras de controlo, a fim de garantir que o desempenho analítico está em conformidade com os requisitos.

### 5.5. Limite de quantificação

- Para o método bioanalítico de pré-seleção, o estabelecimento do LOQ não é um requisito indispensável, mas deve provar-se que o método é capaz de distinguir entre o valor do branco e o valor-limite. Quando se transmite um valor BEQ, deve ser estabelecido um nível de notificação para lidar com as amostras com uma resposta abaixo desse nível. Deve demonstrar-se que o nível de notificação é diferente, pelo menos por um fator de três, das amostras em branco do procedimento com uma resposta inferior à gama de trabalho. Por conseguinte, deve ser calculado a partir das amostras que contenham os compostos-alvo próximos do teor mínimo exigido, e não a partir de um rácio S/R ou um ensaio em branco.
- O limite de quantificação (LOQ) de um método de confirmação deve ser de cerca de um quinto do teor máximo.

### 5.6. Critérios analíticos

- Para obter resultados fiáveis a partir dos métodos de confirmação ou de pré-seleção, devem ser satisfeitos os seguintes critérios na gama do teor máximo ou do nível de ação, respetivamente, para o valor TEQ ou o valor BEQ, quer determinado como valor TEQ total (como a soma de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina) ou separadamente para PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina.

	Pré-seleção com métodos bioanalíticos ou físico-químicos	Métodos de confirmação
Taxa de falsos resultados conformes (*)	< 5 %	
Rigor		-20 % a +20 %
Repetibilidade (RSD)	< 20 %	
Reprodutibilidade intralaboratorial ( $RSD_R$ )	< 25 %	< 15 %

(\*) No que diz respeito aos teores máximos.

### 5.7. Requisitos específicos para métodos de pré-seleção

- Para a pré-seleção tanto podem ser utilizados métodos bioanalíticos como GC-MS. Para os métodos GC-MS devem ser utilizados os requisitos descritos no ponto 6 do presente anexo. Para os métodos bioanalíticos baseados em células, os requisitos específicos estão descritos no ponto 7 do presente anexo.
- Os laboratórios que aplicam métodos de pré-seleção para o controlo de rotina de amostras devem estabelecer uma estreita cooperação com os laboratórios que aplicam o método de confirmação.

— A verificação do desempenho do método de pré-seleção é necessária durante a análise de rotina, por controlo da qualidade analítica e validação contínua do método. Deve existir um programa contínuo para o controlo dos resultados conformes.

— Controlo da eventual supressão da resposta das células e da citotoxicidade

20 % dos extratos de amostras devem ser medidos em pré-seleção de rotina com e sem adição de 2,3,7,8-TCDD, correspondente ao teor máximo ou ao nível de ação, a fim de verificar se a resposta é eventualmente suprimida por substâncias interferentes presentes no extrato da amostra. A concentração medida da amostra enriquecida é comparada com a soma da concentração do extrato não enriquecido mais a concentração do enriquecimento. Se esta concentração medida for inferior à (soma da) concentração calculada em mais do que 25 %, tal é uma indicação de uma potencial supressão do sinal e a respetiva amostra deve ser submetida a análise de confirmação. Os resultados devem ser monitorizados através de gráficos de controlo de qualidade.

— Controlo da qualidade de amostras conformes

Aproximadamente 2 % a 10 % das amostras conformes, dependendo da matriz da amostra e da experiência do laboratório, devem ser confirmadas.

— Determinação das taxas de falsos resultados conformes a partir de dados de controlo de qualidade

A taxa de falsos resultados conformes obtidos na pré-seleção de amostras abaixo e acima do teor máximo ou do nível de ação deve ser determinada. As taxas reais de falsos resultados conformes devem ser inferiores a 5 %.

Logo que o controlo de qualidade das amostras conformes revele, pelo menos, 20 resultados confirmados por matriz/grupo de matrizes, devem ser retiradas conclusões sobre a taxa de falsos resultados conformes a partir dessa base de dados. Os resultados das amostras analisadas em ensaios interlaboratoriais ou durante incidentes de contaminação, abrangendo uma gama de concentrações que pode atingir, por exemplo, duas × o teor máximo (TM), também podem ser incluídos no mínimo de 20 resultados para a avaliação da taxa de falsos resultados conformes. As amostras devem abranger os padrões de congéneres mais frequentes, que representem diferentes fontes.

Embora os testes de pré-seleção devam, de preferência, ter como objetivo a deteção de amostras que excedem o nível de ação, o critério para determinar as taxas de falsos resultados conformes é o teor máximo, tendo em conta a incerteza de medição do método de confirmação.

— Os resultados potencialmente não conformes na pré-seleção devem ser sempre verificados por uma reanálise completa da amostra inicial por um método de confirmação. Estas amostras podem também servir para avaliar a taxa de falsos resultados não conformes. Para os métodos de pré-seleção, a taxa de «falsos resultados não conformes» é a fração dos resultados conformes que foram confirmados por análises de confirmação, quando na pré-seleção realizada anteriormente a amostra tinha sido declarada suspeita de ser não conforme. No entanto, a avaliação da vantagem do método de pré-seleção deve basear-se na comparação das amostras com falsos resultados não conformes com o número total de amostras verificadas. Esta taxa deve ser suficientemente baixa para tornar vantajoso o uso do instrumento de pré-seleção.

— Pelo menos nas condições de validação, os métodos bioanalíticos devem fornecer uma indicação válida do valor TEQ, calculado e expresso em BEQ.

— Para os métodos bioanalíticos levados a cabo em condições de repetibilidade, a  $RSD_i$  intralaboratorial devia tipicamente ser inferior à reprodutibilidade  $RSD_R$ .

## 6. REQUISITOS ESPECÍFICOS APLICÁVEIS AOS MÉTODOS GC-MS USADOS PARA FINS DE PRÉ-SELEÇÃO OU DE CONFIRMAÇÃO

### 6.1. Diferenças aceitáveis entre teores TEQ-OMS relativos ao limite superior e ao limite inferior

— A diferença entre os limites superior e inferior não deve ultrapassar 20 % para a confirmação da superação do teor máximo ou, em caso de necessidade, dos níveis de ação.

### 6.2. Controlo das recuperações

— Logo no início do método analítico, por exemplo antes da extração, deve proceder-se à adição de padrões internos de PCDD/F marcados com  $^{13}\text{C}$  e substituídos com cloro nas posições 2,3,7 e 8 e de padrões internos de PCB sob a forma de dioxina marcados com  $^{13}\text{C}$ , por forma a validar o procedimento analítico. Deve ser adicionado, pelo menos, um congénere para cada grupo homólogo de PCDD/F tetra a octo-clorado e, pelo menos, um congénere para cada grupo homólogo de PCB sob a forma de dioxina (alternativamente, deve ser utilizado para o controlo de PCDD/F e de PCB sob a forma de dioxina, pelo menos, um congénere para cada função de registo de iões selecionados por espectrometria de massa). No caso dos métodos de confirmação, deve utilizar-se a totalidade dos 17 padrões internos de PCDD/F substituídos nas posições 2,3,7 e 8 e marcados com  $^{13}\text{C}$  e a totalidade dos 12 padrões internos de PCB sob a forma de dioxina marcados com  $^{13}\text{C}$ .

- Também devem ser determinados fatores de resposta relativos no caso dos congéneres para os quais não se adiciona um composto análogo marcado com  $^{13}\text{C}$ , através da utilização de soluções de calibração adequadas.
- Em relação aos géneros alimentícios de origem vegetal e aos géneros alimentícios de origem animal que contenham menos de 10 % de gorduras, a adição de padrões internos é obrigatória antes da extração. Em relação aos géneros alimentícios de origem animal que contenham mais de 10 % de gorduras, os padrões internos podem ser adicionados antes ou após a extração de gorduras. Deve ser efetuada uma validação adequada da eficácia da extração, dependendo da fase em que são introduzidos os padrões internos e de os resultados serem notificados com base no produto ou nas gorduras.
- Antes da análise por GC-MS, devem ser adicionados 1 ou 2 padrões de recuperação (substitutos).
- É necessário efetuar um controlo da recuperação. Para os métodos de confirmação, as recuperações de cada padrão interno devem situar-se na gama de 60 a 120 %. São aceitáveis recuperações inferiores ou superiores para congéneres individuais, nomeadamente para algumas dibenzo-p-dioxinas e alguns dibenzofuranos hepta- e octo-clorados, desde que a sua contribuição para o valor TEQ não exceda 10 % do valor TEQ total (com base na soma de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina). Para os métodos de pré-selecção GC-MS, as recuperações devem situar-se na gama de 30 a 140 %.

### 6.3. Remoção de substâncias interferentes

- Deve proceder-se à separação entre PCDD/F e compostos clorados interferentes, tais como PCB não semelhantes a dioxinas e éteres difenílicos clorados através de técnicas cromatográficas adequadas (de preferência, com uma coluna de florisil, alumina e/ou carbono).
- É suficiente a separação de isómeros por cromatografia gasosa (< 25 % de pico a pico entre 1,2,3,4,7,8-HxCDF e 1,2,3,6,7,8-HxCDF).

### 6.4. Calibração com curva padrão

- A gama da curva de calibração deve abranger a gama relevante dos teores máximos ou dos níveis de ação.

### 6.5. Critérios específicos para métodos de confirmação

- Para GC-HRMS:

Na HRMS, a resolução deve, normalmente, ser maior ou igual a 10 000 para toda a gama de massas a 10 % do vale.

Cumprimento de outros critérios de identificação e confirmação, tal como descritos em normas reconhecidas internacionalmente, por exemplo, na norma EN 16215:2012 (Alimentação animal — determinação de dioxinas e de PCB sob a forma de dioxina por GC/HRMS e de PCB indicadores por GC/HRMS) e/ou nos métodos EPA 1613 e 1668, revistos.

- Para GC-MS/MS:

Monitorização de, pelo menos, 2 iões precursores específicos, cada um com um ião-produto de transição específico correspondente, para todos os analitos marcados e não marcados no âmbito da análise.

Tolerância máxima permitida das intensidades iónicas relativas de  $\pm 15\%$  para transições selecionadas de iões-produto em comparação com valores calculados ou medidos (média dos padrões de calibração), aplicando condições MS/MS idênticas, nomeadamente energia de colisão e pressão do gás de colisão, para cada transição de um analito.

Resolução para cada quadrupolo a ser definida igual ou melhor do que a resolução da unidade de massa (resolução da unidade de massa: resolução suficiente para separar dois picos com uma distância entre eles de uma unidade de massa) para minimizar eventuais interferências sobre os analitos pertinentes.

Cumprimento dos outros critérios de identificação e confirmação, tal como descritos em normas reconhecidas internacionalmente, por exemplo, na norma EN 16215:2012 (Alimentação animal — determinação de dioxinas e de PCB sob a forma de dioxina por GC/HRMS e de PCB indicadores por GC/HRMS) e/ou nos métodos EPA 1613 e 1668, revistos, exceto a obrigação de utilizar GC-HRMS.

## 7. REQUISITOS ESPECÍFICOS PARA MÉTODOS BIOANALÍTICOS

Os métodos bioanalíticos são métodos baseados na utilização de princípios biológicos, como ensaios com células, ensaios com recetores ou imunoenaios. O presente ponto 7 estabelece requisitos para os métodos bioanalíticos em geral.

Um método de pré-selecção, em princípio, classifica uma amostra como conforme ou suspeita de ser não conforme. Para tal, o valor BEQ calculado é comparado com o valor-limite (ver 7.3). As amostras abaixo do valor-limite são declaradas conformes, as amostras iguais ou acima do valor-limite são declaradas suspeitas de ser não conformes e necessitam de uma análise por um método de confirmação. Na prática, um valor BEQ correspondente a 2/3 do teor máximo pode servir como valor-limite, desde que se assegure uma taxa de falsos resultados conformes inferior a 5 % e uma taxa aceitável de falsos resultados não conformes. Com teores máximos distintos para os PCDD/F e para a soma dos PCDD/F e dos PCB sob a forma de dioxina, a verificação da conformidade das amostras sem fracionamento requer valores-limite de bioensaio adequados para os PCDD/F. Para a verificação de amostras que excedam os níveis de ação, o valor-limite poderia ser uma percentagem adequada do respetivo nível de ação.

Além disso, no caso de determinados métodos bioanalíticos, pode ser dado um teor indicativo expresso em BEQ para amostras na gama de trabalho e excedendo o limite de notificação (ver 7.1.1 e 7.1.6).

## 7.1. Avaliação da resposta ao teste

### 7.1.1. Requisitos gerais

- Ao calcular as concentrações a partir de uma curva de calibração da TCDD, os valores nas extremidades inferior e superior da curva apresentam uma grande variação [coeficiente de variação (CV) elevado]. A gama de trabalho é a área em que este CV é inferior a 15 %. A extremidade inferior da gama de trabalho (limite de notificação) deve ainda ser estabelecida num nível significativamente superior (pelo menos, por um fator de três) ao dos ensaios em branco do procedimento. A extremidade superior da gama de trabalho é geralmente representada pelo valor  $EC_{70}$  (70 % da concentração efetiva máxima), mas deve ser inferior caso o CV seja superior a 15 % nesta gama. A gama de trabalho é estabelecida durante a validação. Os valores-limite (7.3) devem situar-se dentro da gama de trabalho.
- As soluções-padrão e os extratos de amostras devem ser testados, pelo menos, em duplicado. No caso de utilização de duplicados, uma solução-padrão ou um extrato-testemunha testado em 4 a 6 cavidades reparadas ao longo da placa deve produzir uma resposta ou concentração (apenas possível na gama de trabalho) com base numa  $CV < 15 \%$ .

### 7.1.2. Calibração

#### 7.1.2.1. Calibração com curva padrão

- Os teores nas amostras podem ser estimados por comparação da resposta ao teste com uma curva de calibração da TCDD (ou do PCB 126 ou de uma mistura-padrão de PCDD/F/PCB sob a forma de dioxina) para calcular o valor BEQ no extrato e, posteriormente, na amostra.
- As curvas de calibração devem conter 8 a 12 concentrações (pelo menos em duplicado), com concentrações suficientes na parte inferior da curva (gama de trabalho). Será dada especial atenção à qualidade de ajustamento da curva na gama de trabalho. Como tal, o valor  $R^2$  tem pouco ou nenhum valor para estimar a adequação do ajustamento em regressão não linear. Um melhor ajustamento será alcançado através de uma redução da diferença entre os teores calculados e os teores observados na gama de trabalho da curva (por exemplo, minimizando a soma dos quadrados dos desvios).
- O teor estimado no extrato de amostra é posteriormente corrigido em função do valor BEQ calculado para uma amostra em branco de matriz/solvente (para ter em conta as impurezas provenientes dos solventes e dos produtos químicos utilizados) e da recuperação aparente (calculada a partir do valor BEQ de amostras de referência adequadas com padrões de congéneres representativos próximos do teor máximo ou do nível de ação). Para a correção da recuperação, a recuperação aparente deve sempre situar-se dentro dos limites da gama exigida (ver ponto 7.1.4). As amostras de referência utilizadas para a correção da recuperação devem cumprir os requisitos indicados no ponto 7.2.

#### 7.1.2.2. Calibração com amostras de referência

Em alternativa, pode utilizar-se uma curva de calibração preparada a partir de, pelo menos, quatro amostras de referência (ver ponto 7.2): um ensaio em branco da matriz e três amostras de referência com  $0,5 \times$ ,  $1,0 \times$  e  $2,0 \times$  o teor máximo ou o nível de ação, eliminando a necessidade de correção em função do ensaio em branco e da recuperação. Neste caso, a resposta ao teste correspondente a 2/3 do teor máximo (ver 7.3) pode ser calculada diretamente a partir destas amostras e servir de valor-limite. Para a verificação de amostras que excedam os níveis de ação, o valor-limite poderia ser uma percentagem adequada destes níveis de ação.

#### 7.1.3. Determinação em separado de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina

Os extratos podem ser divididos em frações contendo PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina, permitindo uma indicação separada de valores TEQ (em BEQ) de PCDD/F e de PCB sob a forma de dioxina. Convém utilizar, de preferência, uma curva de calibração-padrão do PCB 126 para avaliar os resultados da fração que contém PCB sob a forma de dioxina.

#### 7.1.4. Recuperações aparentes do bioensaio

A «recuperação aparente do bioensaio» deve ser calculada a partir de amostras de referência adequadas com padrões de congéneres representativos próximos do teor máximo ou do nível de ação e expressa em percentagem do valor BEQ em comparação com o valor TEQ. Em função do tipo de ensaio e dos FET <sup>(1)</sup> utilizados, as diferenças entre os fatores FET e REP relativos aos PCB sob a forma de dioxina podem causar recuperações aparentes baixas para os PCB sob a forma de dioxina em comparação com os PCDD/F. Por conseguinte, no caso de uma determinação em separado de PCDD/F e de PCB sob a forma de dioxina, as recuperações aparentes do bioensaio devem ser: para os PCB sob a forma de dioxina, de 20 % a 60 %, para os PCDD/F, de 50 % a 130 % (as gamas aplicam-se à curva de calibração de TCDD). Como o contributo dos PCB sob a forma de dioxina para a soma de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina pode variar entre diferentes matrizes e amostras, as recuperações aparentes do bioensaio para o parâmetro da soma refletem estas gamas e devem situar-se entre 30 % e 130 %.

#### 7.1.5. Controlo das recuperações para a limpeza (*clean-up*)

A perda de compostos durante a limpeza (*clean-up*) deve ser verificada durante a validação. Uma amostra em branco enriquecida com uma mistura dos diferentes congéneres deve ser submetida a limpeza (*clean-up*) (pelo menos, n=3) e a recuperação e a variabilidade verificadas por um método de confirmação. A recuperação deve situar-se entre 60 % e 120 %, em especial para congéneres que contribuam mais de 10 % para o valor TEQ em várias misturas.

#### 7.1.6. Limite de notificação

Ao notificar valores BEQ, deve ser determinado um limite de notificação a partir de amostras de matriz pertinentes que envolvam padrões de congéneres típicos, mas não a partir da curva de calibração dos padrões, devido à baixa precisão na gama inferior da curva. Devem ser tidos em conta os efeitos da extração e da limpeza (*clean-up*). O limite de notificação deve ser estabelecido significativamente acima (pelo menos, por um fator de três) do valor dos ensaios em branco do procedimento.

### 7.2. Utilização de amostras de referência

- As amostras de referência representam a matriz da amostra, os padrões de congéneres e as gamas de concentrações dos PCDD/F e dos PCB sob a forma de dioxina próximos do teor máximo ou do nível de ação.
- Cada série de testes deve comportar um ensaio em branco do procedimento, ou de preferência um ensaio em branco da matriz, bem como uma amostra de referência com o teor máximo ou o nível de ação. Estas amostras devem ser extraídas e testadas ao mesmo tempo e em condições idênticas. A amostra de referência deve apresentar uma resposta claramente elevada em comparação com a amostra em branco e, por conseguinte, assegurar a adequação do teste. Estas amostras podem servir para as correções em função do ensaio em branco e da recuperação.
- As amostras de referência escolhidas para efetuar uma correção em função da recuperação devem ser representativas das amostras de ensaio, o que significa que os padrões de congéneres não devem conduzir a uma subestimação dos teores.
- Podem incluir-se amostras de referência suplementares com teores, por exemplo de  $0,5 \times$  e  $2 \times$  o teor máximo ou o nível de ação, para demonstrar o desempenho correto do teste dentro da gama requerida para o controlo do teor máximo ou do nível de ação. Combinadas, estas amostras podem servir para calcular os valores BEQ em amostras de ensaio (7.1.2.2).

### 7.3. Determinação de valores-limite

A relação entre os resultados bioanalíticos em BEQ e os resultados dos métodos de confirmação em TEQ deve ser estabelecida [por exemplo, através de experiências de calibração ajustadas em função da matriz, envolvendo amostras de referência enriquecidas a  $0,5 \times$ ,  $1 \times$  e  $2 \times$  o teor máximo (TM), com seis repetições em cada nível (n = 24)]. Os fatores de correção (branco e recuperação) podem ser estimados a partir desta relação, mas devem ser verificados em cada série de testes ao incluir ensaios em branco do procedimento/da matriz e amostras de recuperação (7.2).

Devem ser estabelecidos valores-limite para decidir da conformidade da amostra com teores máximos ou para verificar se os níveis de ação, se relevantes, estão conformes aos respetivos teores máximos ou níveis de ação fixados tanto para os PCDD/F e os PCB sob a forma de dioxina, isoladamente, como para a soma dos PCDD/F e dos PCB sob a forma de dioxina. São representados pela extremidade *inferior* da distribuição dos resultados bioanalíticos (corrigidos em função do ensaio em branco e da recuperação) correspondendo ao limite de decisão do método de confirmação com base num nível de confiança de 95 %, o que implica uma taxa de falsos resultados conformes < 5 %, e uma  $RSD_r < 5 \%$ . O limite de decisão do método de confirmação é o teor máximo, tendo em conta a incerteza de medição.

<sup>(1)</sup> Os requisitos atuais baseiam-se nos FET publicados em: M. Van den Berg *et al*, *Toxicol Sci* 93 (2), 223-241 (2006).

Na prática, o valor-limite (em BEQ) pode ser calculado a partir das seguintes abordagens (ver figura 1):

7.3.1. Utilização da faixa *inferior* do intervalo de previsão de 95 % no limite de decisão do método de confirmação

$$\text{Valor-limite} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - s_{y,x} * t_{\alpha, f=m-2} \sqrt{1/n + 1/m + (x_i - \bar{x})^2 / Q_{xx}}$$

em que:

$\text{BEQ}_{\text{DL}}$  BEQ correspondente ao limite de decisão do método de confirmação é o TM incluindo a incerteza de medição

$s_{y,x}$  desvio-padrão residual

$t_{\alpha, f=m-2}$  fator de Student ( $\alpha = 5\%$ ,  $f =$  graus de liberdade, unilateral)

$m$  número total de pontos de calibração (índice  $j$ )

$n$  número de repetições para cada teor

$x_i$  Concentração da amostra (em TEQ) do ponto de calibração  $i$ , determinado por um método de confirmação

$\bar{x}$  média das concentrações (em TEQ) de todas as amostras de calibração

$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_j - \bar{x})^2$  parâmetro do quadrado da soma

$i =$  índice do ponto de calibração  $i$

7.3.2. Cálculo a partir dos resultados bioanalíticos (corrigidos em função do ensaio em branco e da recuperação) de múltiplas análises de amostras ( $n > 6$ ), contaminadas no limite de decisão do método de confirmação, como a extremidade *inferior* da distribuição dos dados no valor BEQ médio correspondente:

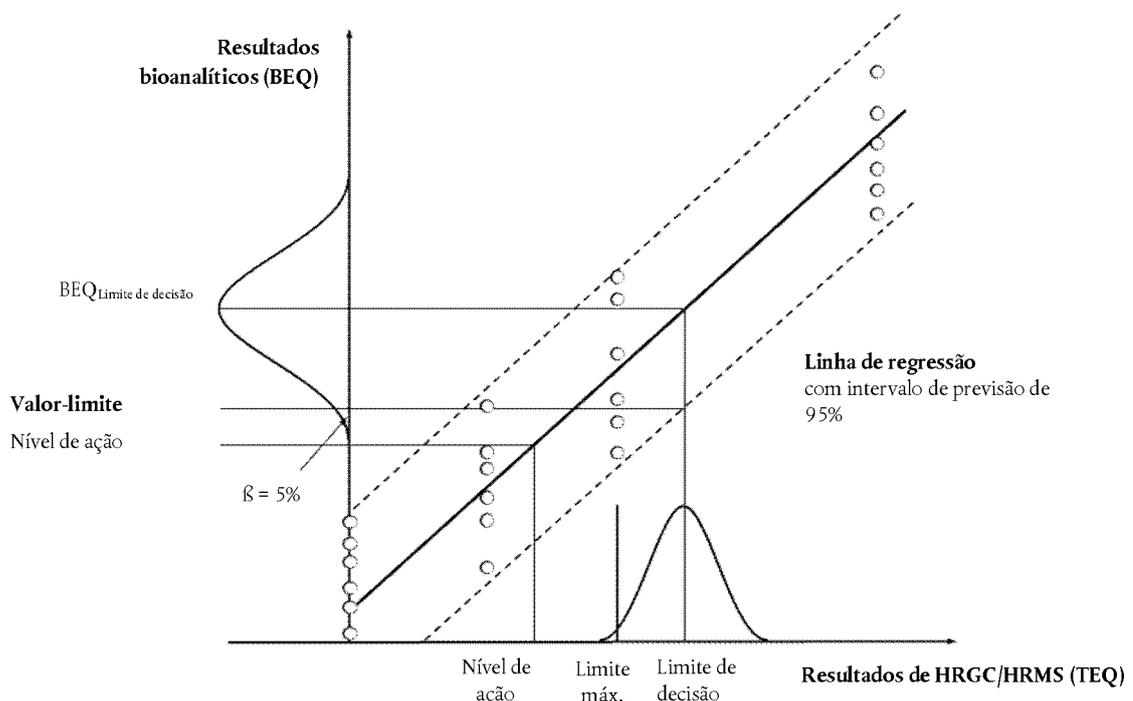
$$\text{Valor-limite} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - 1,64 \times \text{SD}_R$$

em que:

$\text{SD}_R$  desvio-padrão dos resultados do bioensaio no  $\text{BEQ}_{\text{DL}}$ , medidos em condições de reprodutibilidade intralaboratorial

7.3.3. Cálculo como o valor médio dos resultados bioanalíticos (em BEQ, corrigido em função do ensaio em branco e da recuperação) a partir de análises múltiplas de amostras ( $n > 6$ ) contaminadas a 2/3 do teor máximo ou do nível de ação. Tal baseia-se na observação de que esse teor estará próximo do valor-limite determinado em conformidade com 7.3.1 ou 7.3.2.

Figura 1



Cálculo dos valores-limite com base num nível de confiança de 95 %, o que implica uma taxa de falsos resultados conformes < 5 %, e uma  $RSD_R < 25$  %:

1. a partir da faixa *inferior* do intervalo de previsão de 95 % no limite de decisão do método de confirmação,
2. a partir de análises múltiplas de amostras ( $n > 6$ ) contaminadas no limite de decisão do método de confirmação como a extremidade *inferior* da distribuição dos dados (representados na figura por uma curva em forma de sino) no valor BEQ médio correspondente.

#### 7.3.4. Restrições aos valores-limite:

Os valores-limite baseados no valor BEQ, calculados a partir da  $RSD_R$  obtida durante a validação utilizando um número limitado de amostras com matrizes/padrões de /congêneres diferentes, podem ser superiores aos teores máximos ou aos níveis de ação baseados no valor TEQ, devido a uma melhor precisão do que a que é possível em análises de rotina quando tem de ser controlado um espectro desconhecido de possíveis padrões de congêneres. Em tais casos, os valores-limite devem ser calculados a partir de uma  $RSD_R = 25$  %, ou, de preferência, a dois terços do teor máximo ou do nível de ação.

#### 7.4. Características de desempenho

- Uma vez que não se podem utilizar padrões internos nos métodos bioanalíticos, devem ser realizados testes de repetibilidade para se obter informações sobre o desvio-padrão numa série de testes e entre séries de testes. A repetibilidade deve ser inferior a 20 % e a reprodutibilidade intralaboratorial inferior a 25 %. Tal deve basear-se nos valores calculados em BEQ após correção em função do ensaio em branco e da recuperação.
- Como parte do processo de validação, o teste deve demonstrar que discrimina entre uma amostra em branco e um teor no valor-limite, permitindo a identificação de amostras acima do valor-limite correspondente (ver ponto 7.1.2).
- Devem ser definidos os compostos-alvo, as possíveis interferências e os teores máximos toleráveis para a amostra em branco.
- O desvio-padrão percentual na resposta ou concentração calculada a partir da resposta (apenas possível na gama de trabalho) de uma determinação em triplicado de um extrato da amostra não deve ser superior a 15 %.
- Os resultados não corrigidos das amostras de referência expressos em BEQ (ensaio em branco e teor máximo ou nível de ação) devem ser utilizados para a avaliação do desempenho do método bioanalítico durante um período de tempo constante.
- Devem registar-se e verificar-se os gráficos de controlo de qualidade (CQ) para ensaios em branco do procedimento e para cada tipo de amostra de referência, a fim de garantir que o desempenho analítico está em conformidade com os requisitos, nomeadamente no tocante aos ensaios em branco do procedimento, no que respeita à diferença mínima requerida em relação à extremidade inferior da gama de trabalho e, no tocante às amostras de referência, no que respeita à reprodutibilidade intralaboratorial. Os ensaios em branco do procedimento devem ser bem controlados, a fim de evitar falsos resultados conformes, quando subtraídos.
- Os resultados dos métodos de confirmação de amostras suspeitas e 2 % a 10 % das amostras conformes (mínimo de 20 amostras por matriz) devem ser recolhidos e utilizados para avaliar o desempenho do método de pré-seleção e a relação entre BEQ e TEQ. Esta base de dados pode ser utilizada para efeitos de reavaliação dos valores-limite aplicáveis às amostras de rotina para as matrizes validadas.
- Os bons desempenhos do método podem também ser demonstrados pela participação em ensaios interlaboratoriais. Os resultados de amostras analisadas em ensaios interlaboratoriais, abrangendo uma gama de concentrações que pode atingir, por exemplo,  $2 \times$  o TM, também podem ser incluídos na avaliação da taxa de falsos resultados conformes, se um laboratório estiver em condições de demonstrar os seus bons desempenhos. As amostras devem abranger os padrões de congêneres mais frequentes, que representem diferentes fontes.
- Em caso de incidentes, os valores-limite podem ser reavaliados, refletindo a matriz e os padrões de congêneres específicos para cada incidente.

#### 8. NOTIFICAÇÃO DOS RESULTADOS

##### Métodos de confirmação

- Na medida em que o procedimento analítico utilizado o permita, os resultados analíticos devem conter os teores de cada congêneres de PCDD/F e PCB sob a forma de dioxina e serem notificados em termos de limite inferior, limite superior e limite médio, a fim de incluir o máximo de informações possível na notificação dos resultados e, deste modo, permitir a interpretação dos resultados de acordo com requisitos específicos.

- O relatório deve também incluir o método utilizado para a extração dos PCDD/F, dos PCB sob a forma de dioxina e dos lípidos. O teor de lípidos da amostra deve ser determinado e notificado para as amostras de alimentos com teores máximos expressos com base na gordura e com uma concentração esperada de gorduras na gama de 0 % — 2 % (em função da legislação em vigor); para as outras amostras, a determinação do teor de lípidos é facultativa.
- As recuperações de cada padrão interno devem ser disponibilizadas se se situarem fora da gama mencionada no ponto 6.2, se o teor máximo for excedido (neste caso, as recuperações para uma das duas análises duplicadas) e noutros casos mediante pedido.
- Como a incerteza da medição deve ser tida em conta ao decidir da conformidade de uma amostra, este parâmetro deve igualmente ser disponibilizado. Assim, os resultados analíticos devem ser notificados enquanto  $x \pm U$ , em que  $x$  é o resultado analítico e  $U$  é a incerteza expandida de medição, utilizando um fator de expansão de 2, o que permite obter um nível de confiança de cerca de 95 %. No caso de uma determinação em separado dos PCDD/F e dos PCB sob a forma de dioxina, a soma da incerteza expandida estimada dos resultados analíticos separados dos PCDD/F e dos PCB sob a forma de dioxina tem de ser utilizada para a soma dos PCDD/F e dos PCB sob a forma de dioxina.
- Se a incerteza de medição for tida em conta mediante a aplicação de um CC $\alpha$  (tal como descrito no anexo II, ponto IV.2), este parâmetro deve ser mencionado.
- Os resultados devem ser expressos nas mesmas unidades e com (pelo menos) o mesmo número de algarismos significativos que os teores máximos definidos no Regulamento (CE) n.º 1881/2006.

#### **Métodos bioanalíticos de pré-seleção**

- O resultado da pré-selecção deve ser expresso como conforme ou suspeito de ser não conforme («suspeito»).
  - Além disso, pode ser dado um resultado de PCDD/F e/ou de PCB sob a forma de dioxina expresso em equivalentes bioanalíticos (BEQ) (não TEQ) (ver anexo III, ponto 1). As amostras com uma resposta inferior ao limite de notificação devem ser indicadas como inferiores ao limite de notificação.
  - Para cada tipo de matriz da amostra, o relatório deve mencionar o teor máximo ou o nível de ação em que se baseia a avaliação.
  - O relatório deve mencionar o tipo de teste aplicado, o princípio de base do teste e o tipo de calibração.
  - O relatório deve também incluir o método utilizado para a extração dos PCDD/F, dos PCB sob a forma de dioxina e dos lípidos. O teor de lípidos da amostra deve ser determinado e notificado para as amostras de alimentos com teores máximos ou níveis de ação expressos com base na gordura e com uma concentração esperada de gorduras na gama de 0 % — 2 % (em função da legislação em vigor); para as outras amostras, a determinação do teor de lípidos é facultativa.
  - Em caso de amostras suspeitas de não conformidade, o relatório deve incluir uma nota sobre as medidas a adotar. A concentração de PCDD/F e a soma de PCDD/F e de PCB sob a forma de dioxina nas amostras com teores elevados tem de ser determinada/confirmada por um método de confirmação.
-

## Apêndice ao ANEXO III

FET-OMS para avaliação dos riscos para o ser humano com base nas conclusões da reunião de peritos do Programa Internacional de Segurança Química (IPCS) da OMS realizada em Genebra, em junho de 2005 [Martin van den Berg *et al.*, *The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds* (Reavaliação de 2005 pela OMS dos fatores de equivalência tóxica (FET) em humanos e mamíferos respeitantes às dioxinas e aos compostos sob a forma de dioxina). *Toxicological Sciences* 93(2), 223–241 (2006)]

Congénere	Valor do FET	Congénere	Valor do FET
<b>Dibenzo-p-dioxinas (PCDD)</b>		<b>PCB sob a forma de dioxina: PCB não-orto + PCB mono-orto</b>	
2,3,7,8-TCDD	1	<b>PCB não-orto</b>	
1,2,3,7,8-PeCDD	1		
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
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	0,03
OCDD	0,0003		
<b>Dibenzofuranos («PCDF»)</b>		<b>PCB mono-orto</b>	
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 105	0,00003
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03	PCB 114	0,00003
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3	PCB 118	0,00003
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,00003
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,00003
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,00003
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00003
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 189	0,00003
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0003		

Abreviaturas utilizadas: «T» = tetra; «Pe» = penta; «Hx» = hexa; «Hp» = hepta; «O» = octo; «CDD» = clorodibenzodioxina; «CDF» = clorodibenzofurano; «CB» = clorobifenilo.

## ANEXO IV

**PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS E REQUISITOS RESPEITANTES AOS MÉTODOS DE ANÁLISE UTILIZADOS NO CONTROLO DOS TEORES DE PCB NÃO SEMELHANTES A DIOXINAS (PCB # 28, 52, 101, 138, 153 E 180) EM DETERMINADOS GÉNEROS ALIMENTÍCIOS**

Os requisitos expostos no presente anexo devem ser aplicados quando se analisam géneros alimentícios para efeitos de controlo oficial dos teores de bifenilos policlorados não semelhantes a dioxinas (PCB não semelhantes a dioxinas) e para outros fins regulamentares.

### 1. Métodos de deteção aplicáveis:

Cromatografia Gasosa/Deteção por captura de eletrões (GC-ECD), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS ou métodos equivalentes.

### 2. Identificação e confirmação dos analitos requeridos:

- Tempo de retenção relativo em relação a padrões internos ou padrões de referência (desvio aceitável de  $\pm 0,25$  %).
- Deve confirmar-se, por cromatografia gasosa, que houve separação entre os seis PCB indicadores (PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 e PCB 180) e substâncias interferentes, especialmente PCB co-eluídos, em especial se os teores das amostras se situarem na gama dos limites legais e da não conformidade.

Os congéneres que co-eluem frequentemente são, por exemplo, os PCB 28/31, os PCB 52/69 e os PCB 138/163/164. Em relação à GC-MS, devem também ter-se em conta as eventuais interferências de fragmentos de congéneres mais fortemente clorados.

- Para técnicas GC-MS:

- Verificação de, pelo menos:
  - dois iões específicos, para a HRMS,
  - dois iões específicos de  $m/z > 200$  ou três iões específicos de  $m/z > 100$  para a LRMS,
  - 1 precursor e 2 iões-produto para MS-MS.

- Tolerâncias máximas permitidas para os rácios de abundância relativos a fragmentos de massa selecionados:

Desvio relativo do rácio de abundância de fragmentos de massa selecionados em relação à abundância teórica ou ao padrão de calibração de iões-alvo (ião mais abundante controlado) e de iões qualificadores:

Intensidade relativa de iões qualificadores em relação aos iões-alvo	GC-EI-MS (desvio relativo)	GC-CI-MS, GC-MS <sup>n</sup> (desvio relativo)
> 50 %	$\pm 10$ %	$\pm 20$ %
> 20 % a 50 %	$\pm 15$ %	$\pm 25$ %
> 10 % a 20 %	$\pm 20$ %	$\pm 30$ %
$\leq 10$ %	$\pm 50$ % (*)	$\pm 50$ % (*)

(\*) Número suficiente de fragmentos de massa com intensidade relativa > 10 % disponíveis, pelo que não é recomendável a utilização de iões qualificadores com uma intensidade relativa inferior a 10 % em comparação com o ião-alvo.

- Para GC-ECD:

Confirmação de resultados que excedem a tolerância por meio de duas colunas de GC com fases estacionárias de polaridade diferente.

### 3. Demonstração do desempenho do método:

Validação na gama do teor máximo (0,5 a duas vezes o teor máximo) com um coeficiente de variação aceitável para análises repetidas (ver requisitos de precisão intermédia no ponto 8).

#### 4. Limite de quantificação:

Os valores dos ensaios em branco não devem ser superiores a 30 % do nível de contaminação correspondente ao teor máximo <sup>(1)</sup>.

#### 5. Controlo da qualidade:

Controlos regulares com ensaios em branco, análise de amostras enriquecidas, amostras de controlo da qualidade, participação em estudos interlaboratoriais em matrizes relevantes.

#### 6. Controlo das recuperações:

- Utilização de padrões internos adequados com propriedades físico-químicas comparáveis aos analitos requeridos.
- Adição de padrões internos:
  - adição a produtos (antes do processo de extração e limpeza (*clean-up*));
  - adição também possível a gorduras extraídas (antes do processo de limpeza (*clean-up*)), se o teor máximo for expresso com base na gordura.
- Requisitos para os métodos que utilizem os seis congéneres de PCB indicadores marcados com isótopos:
  - correção de resultados em função das recuperações de padrões internos;
  - recuperações geralmente aceitáveis de padrões internos marcados com isótopos entre 50 % e 120 %;
  - são aceitáveis recuperações inferiores ou superiores para congéneres individuais cujo contributo para a soma dos seis PCB indicadores seja inferior a 10 %.
- Requisitos para os métodos que não utilizem os seis padrões internos marcados com isótopos ou outros padrões internos:
  - controlo da recuperação de padrões internos para cada amostra;
  - recuperações aceitáveis de padrões internos entre 60 % e 120 %;
  - correção de resultados em função das recuperações de padrões internos.
- As recuperações de congéneres não marcados devem ser verificadas por amostras enriquecidas ou amostras de controlo da qualidade com concentrações na gama do teor máximo. As recuperações aceitáveis para estes congéneres situam-se entre 70 % e 120 %.

#### 7. Requisitos aplicáveis aos laboratórios

Em conformidade com o disposto no Regulamento (CE) n.º 882/2004, os laboratórios devem ser acreditados por um organismo reconhecido que opere em conformidade com o Guia ISO 58, a fim de assegurar que aplicam a garantia de qualidade analítica. Os laboratórios devem ser acreditados em conformidade com a norma EN ISO/IEC/17025.

#### 8. Características de desempenho: critérios aplicáveis à soma dos seis PCB indicadores no teor máximo:

Rigor	– 30 a +30 %
Precisão intermédia (RSD %)	≤ 20 %
Diferença do cálculo entre o limite superior e o limite inferior	≤ 20 %

#### 9. Notificação dos resultados

- Na medida em que o procedimento analítico utilizado o permita, os resultados analíticos devem conter os teores de cada congénere de PCB e ser indicados em termos de limite inferior, limite superior e limite médio, a fim de incluir o máximo de informações possível na notificação dos resultados e, deste modo, permitir a interpretação dos resultados de acordo com requisitos específicos.
- O relatório deve também incluir o método utilizado para a extração dos PCB e dos lípidos. O teor de lípidos da amostra deve ser determinado e notificado para as amostras de alimentos com teores máximos expressos com base na gordura e com uma concentração esperada de gorduras na gama de 0 %–2 % (em função da legislação em vigor); para as outras amostras a determinação do teor de lípidos é facultativa.

<sup>(1)</sup> Recomenda-se vivamente que o contributo do teor do reagente no ensaio em branco seja inferior ao do teor de um contaminante na amostra. Compete ao laboratório controlar a variação dos valores do branco, especialmente se esses valores forem subtraídos.

- As recuperações de cada padrão interno devem ser disponibilizadas se se situarem fora da gama mencionada no ponto 6, se o teor máximo for excedido e noutros casos mediante pedido.
  - Como a incerteza da medição deve ser tida em conta ao decidir da conformidade de uma amostra, este parâmetro deve igualmente ser disponibilizado. Assim, os resultados analíticos devem ser notificados enquanto  $x \pm U$ , em que  $x$  é o resultado analítico e  $U$  é a incerteza expandida de medição, utilizando um fator de expansão de 2, o que permite obter um nível de confiança de cerca de 95 %.
  - Se a incerteza de medição for tida em conta mediante a aplicação de um CCa (tal como descrito no anexo II, ponto IV.1), este parâmetro deve ser mencionado.
  - Os resultados devem ser expressos nas mesmas unidades e com (pelo menos) o mesmo número de algarismos significativos que os teores máximos definidos no Regulamento (CE) n.º 1881/2006.
-